

AUS DEM ZENTRUM FÜR INNERE MEDIZIN (LEHRSTUHL FÜR NATURHEILKUNDE)

DIREKTORIN: PROF. DR. MED. HABIL. KARIN KRAFT

FUNKTIONELLE UND ZYTOTOXISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR
WIRKUNG VON EXTRAKTEN AUS LAUBBLÄTTERN VON HIPPOPHAE
RHAMNOIDES AUF ÖSTROGENREZEPTOR-POSITIVE UND -NEGATIVE
MAMMAKARZINOMZELLEN UND HUMANE BENIGNE MAMMAZELLEN

INAUGURALDISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES

DOKTOR DER MEDIZIN

DER UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

VORGELEGT VON

ANNA-MARIA KUNERT | GEB. AM 03.10.1990 IN CRIVITZ

AUS WARIN

ROSTOCK | MÄRZ 2020

DEKAN: HERR PROF. DR.MED. EMIL CHRISTIAN REISINGER

ERSTGUTACHTER: FRAU PROF. DR. MED. KARIN KRAFT, UNIVERSITÄT ROSTOCK,
ZENTRUM FÜR INNERE MEDIZIN, LEHRSTUHL FÜR NATURHEILKUNDE,
ERNST-HEYDEMANN- STRAÙE 6, 18057 ROSTOCK

ZWEITGUTACHTER: FRAU PROF. DR. HABIL. K. BARBARA NEBE, UNIVERSITÄT ROSTOCK,
ZENTRUM FÜR MEDIZINISCHE FORSCHUNG, ARBEITSBEREICH ZELLBIOLOGIE,
SCHILLINGALLEE 69, 18057 ROSTOCK

DRITTGUTACHTER: PROF. DR. UDO SCHUMACHER, UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF,
ZENTRUM FÜR EXPERIMENTELLE MEDIZIN, INSTITUT FÜR ANATOMIE UND
EXPERIMENTELLE MORPHOLOGIE, MARTINISTRASSE 52, 20246 HAMBURG

VERTEIDIGUNG: 28.04.2021

Universität
Rostock



Tradio et Innovatio



Universitätsmedizin
Rostock

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Einführung.....	1
1.2 Brustkrebs.....	1
1.3 Östrogenrezeptor.....	9
1.4 Östrogene.....	10
1.5 Selektive Östrogenrezeptormodulatoren (SERMs).....	11
1.6 Sekundäre Pflanzenstoffe.....	12
1.7 Flavonoide.....	13
1.8 Sanddorn.....	16
2 Zielstellung.....	19
3 Material und Methoden.....	20
3.1 Pflanzenmaterial.....	20
3.2 Extraktion nach der Mikrowellenextraktionsmethode.....	20
3.3 Extraktion nach Luyengi.....	21
3.4 Teeanaloge Extraktion aus frischem und getrocknetem Pflanzenmaterial.....	21
3.5 Zelllinien.....	22
3.6 Zellkulturmedien.....	26
3.7 Zellkultivierung.....	27
3.8 Ermittlung der Lebendzellzahl.....	28
3.9 Immunhistochemie.....	28

3.10	Untersuchungen zur Zellproliferation und Zytotoxizität.....	29
3.11	Lichtmikroskopische Beurteilung der Zellmorphologie.....	33
3.12	Untersuchungen zum Metabolismus der Zellen	33
3.13	Auswertung.....	36
4	Ergebnisse	37
4.1	Ergebnisse der Immunhistochemie	37
4.2	Ergebnisse der Zytotoxizitätsuntersuchung (LDH-Test)	43
4.3	Ergebnisse der Zellproliferationsuntersuchung durch BrdU-Test.....	45
4.4	Ergebnisse der lichtmikroskopischen Beurteilung der Zellmorphologie	54
4.5	Ergebnisse der metabolischen Analyse – Glukose-Aufnahmetest.....	59
4.6	Ergebnisse der metabolischen Analyse - H ₂ O ₂ -Bestimmung	66
4.7	Ergebnisse der metabolischen Analyse – pH-Messung.....	70
5	Diskussion	77
5.1	Expression der Östrogen- und Progesteronrezeptoren	77
5.2	Wirkung von 17 β -Estradiol und Tamoxifen auf die Zellen	78
5.3	Die Wirkungen der Extrakte auf die Zellen.....	82
5.4	Methodenkritik.....	91
6	Zusammenfassung und Ausblick.....	93
7	Thesen.....	95
	Literaturverzeichnis.....	VIII
	Anhang.....	XIX
	Chemikalien und Materialien	XIX
	Selbstständigkeitserklärung	XXIII
	Danksagung	XXIV

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Brustkrebsinzidenz weltweit.....	2
Abbildung 2: Häufigste Todesursachen.....	3
Abbildung 3: Aromatasereaktion	5
Abbildung 4: Biosynthese der Östrogene	11
Abbildung 5: Effekte von Estradiol und ausgewählten SERMs	12
Abbildung 6: Flavan als das Grundgerüst der Flavonoide.....	13
Abbildung 7: Sanddorn.....	17
Abbildung 8: MCF-7.....	23
Abbildung 9: BT-20	23
Abbildung 10: T-47D.....	24
Abbildung 11: MCF-12A	24
Abbildung 12: MCF 10A.....	25
Abbildung 13: HMEPC	25
Abbildung 14: Testprinzip des LDH-Zytotoxizitäts-Testes.....	31
Abbildung 15: Beispiel einer Standardkurve	35
Abbildung 16: Immunhistochemie bei MCF-7-Zellen	38
Abbildung 17: Immunhistochemie bei BT-20-Zellen.....	39
Abbildung 18: Immunhistochemie bei T-47D-Zellen	40
Abbildung 19: Immunhistochemie bei MCF-12A-Zellen	41
Abbildung 20: Immunhistochemie bei MCF-10A-Zellen	42
Abbildung 21: Immunhistochemie bei HMEPC-Zellen	43
Abbildung 22: MCF-12A: LDH-Test.....	44
Abbildung 23: LDH-Test: Einfluss von Estradiol und Tamoxifen	45
Abbildung 24: MCF-7: BrdU-Test.....	46

Abbildung 25: BT-20: BrdU-Test.....	47
Abbildung 26: T-47D: BrdU-Test	48
Abbildung 27: MCF-12A: BrdU-Test	49
Abbildung 28: MCF-10A: BrdU-Test	50
Abbildung 29: HMEPC: BrdU-Test	51
Abbildung 30: BrdU-Test: Einfluss der Extrakte	52
Abbildung 31: BrdU-Test: Einfluss von Estradiol und Tamoxifen.....	53
Abbildung 32: MCF-7-Zelllinie, Negativkontrolle 2	54
Abbildung 33: MCF-7-Zelllinie, Tamoxifenkontrolle	54
Abbildung 34: MCF-7-Zelllinie, Estradiolkontrolle	55
Abbildung 35: MCF-7-Zelllinie, Luyengiextrakt (10 µg/ml)	55
Abbildung 36: MCF-7-Zelllinie, Luyengiextrakt (100 µg/ml)	56
Abbildung 37: MCF-7-Zelllinie, Luyengiextrakt (250 µg/ml)	56
Abbildung 38: MCF-7-Zelllinie, Luyengiextrakt (500 µg/ml)	57
Abbildung 39: MCF-7-Zelllinie, Luyengiextrakt (750 µg/ml)	57
Abbildung 40: MCF-7-Zelllinie, Luyengiextrakt (1000 µg/ml).....	58
Abbildung 41: MCF-7-Zelllinie: Glukoseaufnahme	59
Abbildung 42: BT-20-Zelllinie: Glukoseaufnahme.....	60
Abbildung 43: T-47D-Zelllinie: Glukoseaufnahme	61
Abbildung 44: MCF-12A-Zelllinie: Glukoseaufnahme	62
Abbildung 45: MCF10A-Zelllinie: Glukoseaufnahme	63
Abbildung 46: HMEPC-Zelllinie: Glukoseaufnahme	64
Abbildung 47: Glukoseaufnahme: Einfluss von Tamoxifen.....	65
Abbildung 48: Glukoseaufnahme: Einfluss von Estradiol.....	66
Abbildung 49: Stresstest: Einfluss der Extrakte auf die Messung.....	67

Abbildung 50: Stresstest: BT-20-Zelllinie.	68
Abbildung 51: Stresstest: Einfluss von Tamoxifen	69
Abbildung 52: Stresstest: Einfluss von Estradiol	69
Abbildung 53: BT-20-Zelllinie: pH-Messung.....	70
Abbildung 54: T-47D-Zelllinie: pH-Messung.....	71
Abbildung 55: MCF-12A-Zelllinie: pH-Messung.	72
Abbildung 56: MCF-10A-Zelllinie: pH-Messung.	73
Abbildung 57: HMEPC-Zelllinie: pH-Messung.	74
Abbildung 58: Einfluss der Extrakte auf die pH-Messung	75
Abbildung 59: Einfluss von Tamoxifen auf den pH-Wert.....	76
Abbildung 60: Einfluss von Estradiol auf den pH-Wert.....	76

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bestandteile des Sanddorns	18
Tabelle 2: Zelllinienübersicht	26
Tabelle 3: Endkonzentrationen der Extrakte und Kontrollen	30

Abkürzungsverzeichnis

AF-1.....	<i>Aktivierungsfunktion-1</i>
AF-2.....	<i>Aktivierungsfunktion-2</i>
ATM	<i>Ataxia teleangiectasia mutated</i>
BET.....	<i>Brusterhaltende Therapie</i>
BRCA1	<i>Breast cancer 1</i>
BRCA2	<i>Breast cancer 2</i>
BT-20.....	<i>Mammakarzinomzelllinie</i>
Chek2.....	<i>Checkpoint kinase 2</i>
CLIS	<i>Carcinoma lobulare in situ</i>
DCIS	<i>Duktales Carcinoma in situ</i>
dest.....	<i>destilliert</i>
DMEM.....	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>

Abkürzungsverzeichnis

DMSO.....	<i>Dimethylsulfoxid</i>
DNA.....	<i>deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraacetat</i>
EGF.....	<i>Epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ERE.....	<i>Estrogen response element</i>
Fa	<i>Firma</i>
FKS	<i>Fetales Kälber Serum</i>
GnRH.....	<i>Gonadotropin-Releasing-Hormon</i>
GOD	<i>Glukose-Oxidase</i>
H ₂ O ₂	<i>Wasserstoffperoxid</i>
H ₂ SO ₄	<i>Schwefelsäure</i>
HCl	<i>Salzsäure</i>
Hepes.....	<i>hydroxyethyl piperazine ethanesulfonic acid</i>
Her2-neu.....	<i>human epidermal growth factor receptor 2-neu</i>
ICD-10	<i>International Classification of Diseases</i>
INT	<i>Iodnitrotetrazoliumchlorid</i>
Ki-67.....	<i>Kiel-67</i>
MEM	<i>Minimal essential Medium</i>
mRNA.....	<i>messenger ribonucleic acid</i>
NAD ⁺	<i>Nicotinamidadenindinukleotid – oxidierte Form</i>
NADH/H ⁺	<i>Nicotinamidadenindinukleotid - reduzierte Form</i>
NK	<i>Negativkontrolle</i>
NO.....	<i>Stickstoffmonoxid</i>
P	<i>Wahrscheinlichkeit</i>
PBS.....	<i>phosphate buffered saline</i>
POD.....	<i>Peroxidase</i>
PR.....	<i>Progesteronrezeptor</i>
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute- Medium</i>
SHBG.....	<i>Sexualhormon-bindendes Globulin</i>

TMB	<i>Tetramethylbenzidin</i>
TNF- α	<i>Tumor-Nekrose-Faktor alpha</i>
TNM	<i>Tumor, Nodus, Metastasen</i>
UICC	<i>Union Internationale Contre le Cancer</i>

1 Einleitung

1.1 Einführung

In den letzten Jahrzehnten entfernte sich die Medizin mehr und mehr vom pathogenesebasierten Modell hin zum Modell der Salutogenese, der Lehre von der Entstehung und Erhaltung der Gesundheit. So ist eine ungesunde Ernährung ein wichtiger Risikofaktor für die Entwicklung von chronischen Krankheiten wie z. B. Diabetes mellitus Typ 2, Bluthochdruck und auch Krebserkrankungen (Robert Koch-Institut (RKI) 2016). Schon in den 1980er Jahren fiel auf, dass in einigen ostasiatischen Ländern die Inzidenz der koronaren Herzkrankheit und der Karzinome von Kolon, Mamma und Prostata erheblich niedriger war als in westlichen Ländern. Dieser Befund wurde früh in Zusammenhang mit einer sojaproduktreichen Ernährung gebracht, welche sich unter anderem durch einen erhöhten Phytoöstrogengehalt, insbesondere an Lignanen und Isoflavonen, auszeichnet. Dieser protektive Effekt basierte offenbar nicht auf einem unterschiedlichen Genpool, da Migrationsstudien ergaben, dass in westliche Länder migrierte Ostasiaten, die sich zunehmend an den westlichen Lebensstil anpassten, sich hinsichtlich des Mammakarzinomrisikos schon in zweiter Generation nicht mehr von der westlichen Bevölkerung unterschieden (Adlercreutz und Mazur 1997; Stanford et al. 1995). Dieses Beispiel soll den günstigen Einfluss beschreiben, den viele Pflanzeninhaltsstoffe auf die Gesundheit haben können.

1.2 Brustkrebs

1.2.1 Epidemiologie

Brustkrebs stellt die häufigste maligne Krebserkrankung bei Frauen in der westlichen Welt und Entwicklungsländern dar und ist unter den bösartigen Neubildungen bei Frauen die primäre Todesursache weltweit (Benson und Jatou 2012). Obwohl in Entwicklungsländern im Jahr 2012 mit 883.000 zunehmend mehr Fälle als in Industrieländern mit 794.000 auftraten, sind die Inzidenzraten in westlichen Ländern immer noch höher als in asiatischen Ländern (siehe Abbildung 1) (WHO: International Agency for Research on Cancer 2012). In Deutschland ist das Mammakarzinom auch die häufigste Todesursache bei malignen Erkrankungen für Frauen (siehe Abbildung 2) (Statistisches Bundesamt 2015). Im Jahr 2013 erkrankten 71.640 Frauen und 682 Männer in Deutschland an Brustkrebs, d.h. jede 8. Frau erhält in ihrem Leben diese

Einleitung

Diagnose (Robert Koch-Institut (RKI) 2016). Obwohl die Mortalität in den letzten 25 Jahren leicht gesenkt werden konnte, steigt die Inzidenz weiterhin an (Benson und Jatoi 2012). Dieser Umstand wird vor allem der Zunahme der Risikofaktoren und der Lebenserwartung zugeschrieben, aber auch einer sensitiveren Diagnosestellung. Eine Errungenschaft der letzten Jahre stellt hierbei das in Deutschland in den Jahren 2005-2009 flächendeckend eingeführte Mammographie-Screening für Frauen zwischen 50-69 Jahren dar. Erwartungsgemäß stieg dadurch in den Anfangsjahren die Rate der neu entdeckten fortgeschrittenen Karzinome an, um dann den Entdeckungen von Mammakarzinomen im Frühstadium zu weichen. Eine positive Entwicklung im Sinne einer Reduktion der Brustkrebsmortalität ist erst in den kommenden Jahren zu erwarten (Robert Koch-Institut (RKI) 2016). Eine schwedische Studie, in der Daten der nicht gescreenten Bevölkerung mit der gescreenten Population ausgewählter Landkreise verglichen wurden, legt jedoch nahe, dass durch das Mammographie-Screening für die partizipierenden Frauen eine Mortalitätsreduktion von 40 bis 45 % erreicht werden kann (Duffy et al. 2002).

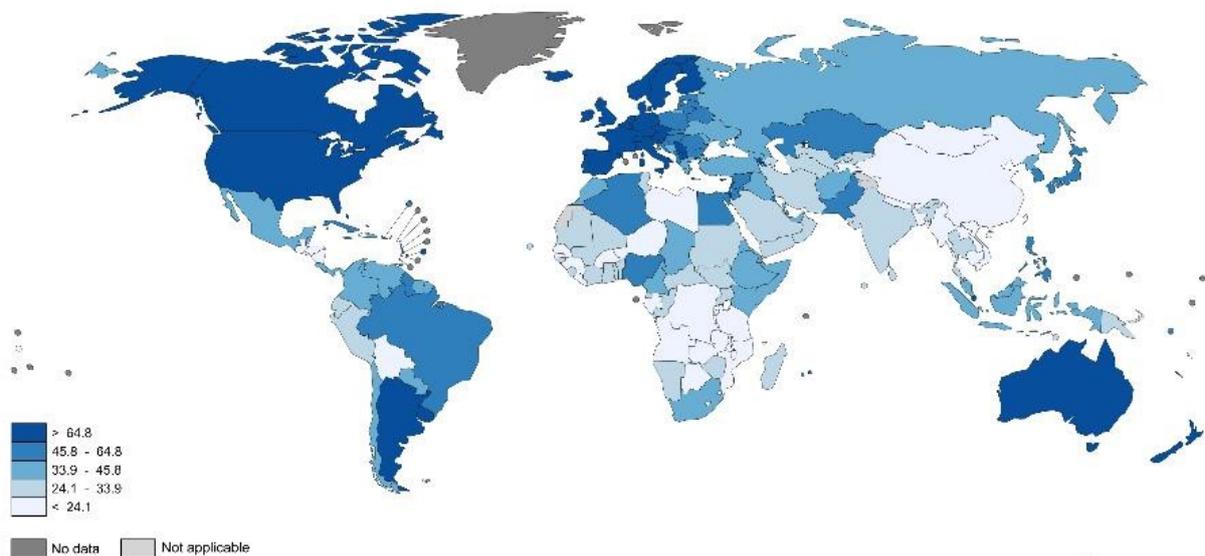


Abbildung 1: Brustkrebsinzidenz weltweit 2012 in Neuerkrankungen/100.000 Einwohner (WHO: International Agency for Research on Cancer 2012).

ICD-10 Positionsnummer	Bösartige Neubildung	Gestorbene ¹	Anteil in %
C50	der Brustdrüse (Brustdrüsenkrebs (Mamma))	18 136	17,5
C34	der Bronchien und der Lunge (Lungen- und Bronchialkrebs)	15 870	15,3
C25	des Pankreas (Bauchspeicheldrüsenkrebs)	8 659	8,4
C18	des Kolons (Dickdarmkrebs)	8 124	7,9
C56	des Ovars (Eierstockkrebs)	5 431	5,3
C80	ohne Angabe der Lokalisation	5 022	4,9
C16	des Magens	3 829	3,7
C20	des Rektums (Mastdarm oder Enddarm)	3 082	3,0
C22	der Leber und der intrahepatischen Gallengänge	2 611	2,5
C71	des Gehirns (Hirntumor)	2 492	2,4

¹ Ohne Totgeborene und ohne gerichtliche Todeserklärungen.

Abbildung 2: Häufigste Todesursachen bei bösartigen Neubildungen von Frauen in Deutschland 2015 nach ICD-10 (Statistisches Bundesamt 2015).

1.2.1 Ursachen und Risikofaktoren

Die wichtigsten populationsbezogenen Risikofaktoren für die Erkrankung an einem Mammakarzinom sind weibliches Geschlecht und höheres Lebensalter. Zu den wichtigsten individuellen Risikofaktoren gehört die genetische Disposition. Bei ca. 30 % aller Frauen mit Mammakarzinom sind bereits Fälle von Brustkrebs in der Verwandtschaft bekannt, dies weist auf einen genetischen Zusammenhang hin. Bei 25 % dieser Frauen besteht ein autosomal dominanter Erbgang: Am bedeutsamsten sind das BRCA1- und das BRCA2- Gen. Deren Mutationen lassen die betroffenen Frauen rund 20 Jahre früher erkranken als Patientinnen ohne Keimbahnmutation. Es besteht bei ihnen außerdem ein Lebenszeitrisiko von 60 % für ein Mammakarzinom, ein Lebenszeitrisiko von 40 %, auch an einem kontralateralen Mammakarzinom zu erkranken und eines von 16-25 % für eine Erkrankung an einem Ovarialkarzinom (Leitlinienprogramm Onkologie August 2019).

Ein wichtiger Faktor für Prognose und Therapie des Mammakarzinoms ist der Status des Her2-neu- Wachstumsfaktorrezeptors. Es wurden weitere Hochrisikogene identifiziert, die für verschiedene Syndrome verantwortlich sind und auch mit einem erhöhten Risiko für die

Einleitung

Erkrankung an einem Mammakarzinom einhergehen, wie die Mutationen BRIP-1 und PALB2, p-53, PTEN, STK11, Chek2 und ATM (Gage et al. 2012).

Ein anderer wichtiger individueller Risikofaktor ist eine Mastopathie, die mit erhöhter Dichte des Drüsengewebes in der Mammographie einhergeht. Hier besteht eine vier- bis sechsfach erhöhte Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung eines Mammakarzinoms (Robert Koch-Institut (RKI) 2016; Boyd Norman F. et al. 2007).

Bei den hormonellen Risikofaktoren spielen vor allem die Geschlechtshormone Progesteron und 17 β -Estradiol eine wichtige Rolle. Während ein erhöhter Östrogenspiegel mit einem erhöhten Risiko für Brustkrebs einhergeht, scheint Progesteron zumindest bei prämenopausalen Frauen protektiv zu wirken. Ein erhöhter Östrogenlevel kann endogene oder exogene Ursachen haben. Zu den endogenen Ursachen für erhöhte Östrogenkonzentrationen zählt Bewegungsmangel in Begleitung von Übergewicht vor allem in der Postmenopause, da die Aromatase im Fettgewebe, die Androstendion und Testosteron in Estradiol umwandelt, erhöht ist (siehe Abbildung 3). Auch hohe Testosteronspiegel führen zu einer erhöhten Aktivität der Aromatase (Yager und Davidson 2006). Das Lebenszeitrisko erhöht sich entsprechend mit der verlängerten Einwirkung von Östrogenen und der reduzierten Einwirkung von Gestagenen wie beispielsweise bei einer frühen Menarche oder einer späten Menopause. Dagegen scheinen mehrere und vor allem frühe Schwangerschaften mit längeren Stillzeiten protektiv zu wirken (Robert Koch-Institut (RKI) 2016).

Eine langzeitige hormonelle Kontrazeption mit einem Östrogen-Gestagen-Präparat erhöht das Risiko für ein Mammakarzinom: Während der Einnahme beträgt das relative Risiko 1,24 und es ist bis zu zehn Jahre nach Absetzen noch erhöht (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer ICEU, Radcliffe Infirmary, Oxford, UK 1996). Auch eine Hormonersatztherapie im Rahmen des klimakterischen Syndroms geht mit einem erhöhten Mammakarzinomrisiko einher. Dies gilt insbesondere für kombinierte Östrogen-Gestagen-Präparate und weniger für Östrogen-Monopräparate (Shah et al. 2005).

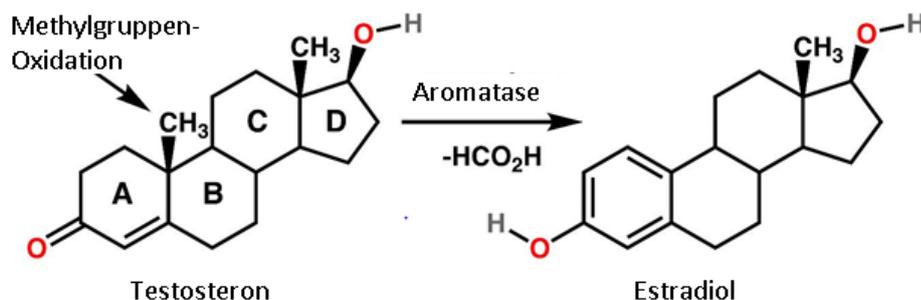


Abbildung 3: Aromatasereaktion von Testosteron zu Estradiol, modifiziert nach: (Boghog2 in Wikimedia Commons 2009).

Wichtige andere exogene Faktoren sind ionisierende Strahlen, Tabakkonsum und ein erhöhter Alkoholkonsum. Patientinnen, die in der Adoleszenz wegen eines Hodgkin-Lymphoms im Bereich der Mamma bestrahlt wurden, haben nach 15-30 Jahren ein erhöhtes Risiko, am Mammakarzinom zu erkranken (Leitlinienprogramm Onkologie August 2019) (Robert Koch-Institut (RKI) 2016). Tabakabusus ist nicht nur ein starker Risikofaktor für Bronchialkarzinome, sondern auch an der Entstehung anderer Karzinome beteiligt. In Abhängigkeit von der Intensität scheint Tabakkonsum das Risiko für Brustkrebs um 15 bis 40 % zu erhöhen (Johnson et al. 2011). Auch ein regelmäßiger geringer Alkoholkonsum (5,0-9,9 g pro Tag) erhöht das Brustkrebsrisiko um 15 %, bei höherer Alkoholzufuhr steigt es weiter an (Chen et al. 2011).

Die Zufuhr eines hohen Anteils pflanzlicher Nahrung in der Jugend, vor allem von Soja-Produkten, scheint wegen des relativ hohen Gehalts an Phytoöstrogenen, vor allem Isoflavonen, lebenslänglich protektiv zu wirken (Messina 2016). Aber auch andere flavonoidreiche Nahrungsmittel wirken protektiv (Bosetti et al. 2005).

1.2.2 Entstehung von Brustkrebs

Das Mammakarzinom geht entweder von den Milchgängen oder dem Epithel der Drüsenlobuli aus. Sie werden histologisch zu etwa 85-90 % den duktalem (*Ductus – lat. Gang*) und nur zu 10-15 % den lobulären Karzinomen (*Lobus – lat. Lappen*) zugeordnet. Weiterhin werden nach der Invasivität in *in-situ* oder invasiv wachsende Karzinome unterschieden. Das DCIS (Duktales Carcinoma in situ) wächst ausgehend vom Epithel der Milchgänge, ohne die Basalmembran zu überschreiten. Es kann nach einer relativ kurzen Latenzzeit von 10 Jahren in ein invasives duktales Karzinom übergehen. Es ist die häufigste Form des Mammakarzinoms. Das bildmorphologische Äquivalent in der Mammographie beim DCIS sind Mikroverkalkungen, die

nach Nekrosen entstehen. Das CLIS (Carcinoma lobulare in situ) ist gutartiger als das DCIS, da hier eine Latenzzeit von 25 Jahren für den Übergang in ein invasives lobuläres Karzinom anzunehmen ist. Mikrokalk ist für das CLIS eher untypisch, es tritt zu 60 % multizentrisch auf. In ca. einem Drittel der Fälle sind die Krebsvorstufen bilateral. Am häufigsten ist der äußere obere Quadrant der Brust betroffen. Bei invasivem Wachstum erfolgen relativ früh eine lymphogene und auch eine hämatogene Metastasierung, das Risiko steigt mit zunehmender Größe des Primärtumors an. Die hämatogene Metastasierung erfolgt bevorzugt in Skelettsystem, Pleura, Lungen, Leber und Gehirn, seltener Ovar und kann 15 oder mehr Jahre klinisch stumm bleiben. Die lymphogene Metastasierung erfolgt überwiegend über das Lymphabflusssystem der Mamma in die Axilla. Differentialdiagnosen sind eher benigne einzustufende Veränderungen wie das Fibroadenom oder die Mastopathie. Neben der Selbstuntersuchung durch die Patientin, der Anamnese und der klinischen Untersuchung ist die Mammographie die wichtigste technische Untersuchung. Bei einer Sensitivität je nach Dichte des Brustgewebes von 85-90 % können damit auch klinisch inapparente Tumoren detektiert werden. Die Sonographie bietet sich zur Einschätzung der Dignität eines palpablen Knotens an. Weitere Diagnosetechniken sind die Magnetresonanztomographie, die 3D-Tomosynthese, die farbkodierte Duplexsonographie und die Stanzbiopsie zur histologischen Auswertung, die Aufschluss über die molekularen Eigenschaften des Tumors gibt (Stauber und Weyerstahl 2007; Leitlinienprogramm Onkologie August 2019).

Mammakarzinome werden nach der TNM-Klassifikation der *Union Internationale Contre le Cancer* (UICC) eingeteilt. Diese macht Angaben zu der Tumorgroße, dem Lymphknotenstatus und Metastasierungsgrad (Uehiro et al. 2014).

Die malignen Tumoren werden laut dem *St. Gallen Expert Consensus* von 2011 je nach molekularer Ausprägung weiterhin in Gruppen unterteilt. Hierfür spielen die Ausprägung des Östrogenrezeptors (ER), des Progesteronrezeptors (PR), des Her2-neu als Wachstumsfaktorrezeptor und des Ki-67 als Proliferationsindex eine wichtige Rolle. Der „Luminal-A“-Subtyp ist ER und/oder PR-positiv, Her2-neu- negativ und weist einen niedrigen Ki-67 und damit eine niedrige Proliferation auf. Er ist der Subtyp mit der höchsten Inzidenz und zugleich der besten Prognose. „Luminal-B (mit Her2-neu-negativ)“ weist die gleichen Eigenschaften auf wie „Luminal-A“, hat aber eine höhere Ki-67 –Proliferationsrate. „Luminal-

B (mit Her2-neu-positiv)“ hat eine erhöhte Amplifikation des Her2-neu, kann jede Ki-67-Ausprägung haben und ist ansonsten ER- und PR-positiv. Der „Nonluminal“-Subtyp weist außer einer Her2-neu Überexpression keine Hormonrezeptorausprägung auf. Der „Basal-like“, oder „Triple-negativ (duktal)“ hat weder eine Her2-neu-Überexpression noch eine Ausprägung von ER oder PR und hat die ungünstigste Prognose (Goldhirsch et al. 2011; Garcia Fernandez et al. 2012).

1.2.3 Therapiemöglichkeiten

Die Therapie des Mammakarzinoms hat sich in den vergangenen Jahren stark gewandelt und geht dank neuerer Verfahren mit einer signifikanten Verbesserung des Überlebens und der Lebensqualität für die Patientinnen einher. Zur Verfügung stehen Operation, Radiotherapie, Chemotherapie und, je nach molekularen Eigenschaften des Tumors, eine endokrine Therapie oder eine Antikörpertherapie.

Bei den operativen Verfahren wurden radikale Maßnahmen wie die Mastektomie und Lymphonodektomie der Axilla weitgehend verlassen, da sie in vielen Fällen keine signifikanten Überlebensvorteile bieten, aber zu einer kurz- und mittelfristigen Morbiditätssteigerung der Patientin führen. Grundlegend sind weiterhin die genaue Vordiagnostik zur Feststellung des Ausmaßes des Tumors und des Metastasierungsgrades. Bei günstigem Tumor-Brust-Größenverhältnis, keinem nachweisbarem Befall der axillären Lymphknoten und ausreichend weitem Brustwandabstand des Tumors ist häufig eine brusterhaltende Therapie (BET) möglich. Hierbei wird der Tumor mit Sicherheitsrand entnommen und per *Sentinel-Node-Biopsie* der Lymphknotenstatus gesichert. Durch Lappenplastiken und plastischen Wiederaufbau der Mamma kann häufig ein zufriedenstellendes kosmetisches Ergebnis erzielt werden. An eine operative Therapie schließt sich zumeist eine perkutane Radiotherapie des ursprünglichen Tumorbettes an, um eventuell verbliebende Tumorzellen zu zerstören.

Bei inoperablen, rezeptornegativen Tumoren kann oft zuerst eine neoadjuvante Chemotherapie zur Verkleinerung des Tumors und dann die brusterhaltene Operation durchgeführt werden.

Bei der adjuvanten systemischen Therapie nach der Operation wird die Entscheidung hinsichtlich Chemotherapie, endokriner Therapie oder Antikörpertherapie je nach Rezeptorstatus, Alter und Allgemeinzustand der Patientin getroffen. Bei negativem

Einleitung

Rezeptorstatus wird meist eine Standard-Polychemotherapie für 18-24 Wochen, die Anthrazykline und Taxane beinhaltet, gewählt.

Bei Östrogen- oder Progesteronrezeptor-positivem Tumor schließt sich an die Polychemotherapie eine endokrine Therapie an. Bei prämenopausalen Frauen ist Tamoxifen mit 20 mg am Tag für fünf Jahre das Mittel der Wahl. Bei postmenopausalen Frauen werden verschiedene Therapiekonzepte mit einer Kombinationstherapie von Tamoxifen mit einem Aromatasehemmer der 3. Generation für 5-10 Jahre empfohlen. Eine Tamoxifentherapie kann die Rezidivrate um 40 % und die Mortalität um 31 % reduzieren. Bei prämenopausalen Frauen scheint bei rezeptorpositivem Status auch eine Ausschaltung der Ovarialfunktion sinnvoll zu sein, z. B. mit GnRH-Analoga (Leitlinienprogramm Onkologie August 2019).

Bei 15-30 % der invasiven Mammakarzinome liegt eine Amplifikation von Her2-neu vor, das für einen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGF-Rezeptor) kodiert. Durch die Überexpression dieses Rezeptors kommt es zu ungebremstem Wachstum und Ausbreitung des Tumors, dies geht mit einem schlechteren Ansprechen auf herkömmliche Therapien und einer verschlechterten Prognose einher. Seit 2000 ist in Deutschland eine Antikörpertherapie mit Trastuzumab zugelassen, die eine signifikante Verbesserung der Überlebenszeit erreicht. Standard ist hier eine Kombination mit einer Chemotherapie für ein Jahr (Leitlinienprogramm Onkologie August 2019; Fitzgibbons et al. 2000).

Neben diesen Therapiekonzepten sollen den Patientinnen stets supportive Therapien angeboten werden. Hierzu gehören Bewegungs- und Ernährungsberatung, psychoonkologische Betreuung, Analgesie nach WHO-Schema, antiemetische Therapie, Versorgung mit Prothesen und Perücken und die Vermittlung von Selbsthilfegruppen. Zusätzlich gibt es auch immer mehr Angebote aus der Komplementärmedizin, deren Wirksamkeit teilweise gut belegt ist. Manchmal sind die Daten widersprüchlich, häufig aber wegen der nahezu fehlenden Forschungsförderung in diesem Bereich noch mangelhaft. Wichtig ist hier vor allem Aufklärung durch den behandelnden Arzt (Leitlinienprogramm Onkologie August 2019).

1.3 Östrogenrezeptor

Östrogene wirken überwiegend über zytoplasmatische Östrogenrezeptoren (ER), die zur Familie der Steroid-Rezeptoren gehören (Dahlman-Wright et al. 2006). Es gibt zwei Isoformen, den α -ER und den β -ER. Sie sind östrogenabhängige nukleäre Transkriptionsfaktoren (Graefe et al. 2011).

In einigen Geweben liegen überwiegend α -ER vor, insbesondere in Vagina, Uterus, Stroma der Prostata, Leber, weißem Fettgewebe und Hypothalamus. In anderen Geweben finden sich überwiegend β -ER, z. B. im Colon, dem Epithel der Prostata, im Gehirn und in der Lunge. Beide Isoformen finden sich in den Ovarien (die α -ER in den Theka-Zellen, die β -ER in den Granulosa-Zellen), im Gefäßsystem, den Testes und in den Knochen. In der Mamma kommen α - und β -ER sowohl in den duktalem als auch in lobulären Epithelien vor, β -ER zudem im Stroma (Dahlman-Wright et al. 2006).

Die beiden Isoformen sind ähnlich aufgebaut. Die Aminosäuresequenzen in der DNA-bindenden Domäne stimmen zu 97 % überein. Hier ist die Bindungsstelle für das ERE (Estrogen response element) lokalisiert. Am C-terminalen Ende, in der Liganden-bindenden Domäne, beträgt die Übereinstimmung nur noch 56 % und am N-terminalen Ende nur 24 %. Am N-terminalen Ende ist die Liganden-unabhängige Aktivierungsfunktion (AF-1) lokalisiert, am C-terminalen Ende die Liganden-abhängige Aktivierungsfunktion (AF-2). Der β -ER scheint eine schwächere AF-1 zu haben und funktioniert somit vor allem ligandenabhängig (Dahlman-Wright et al. 2006).

Zunächst wird bei der Aktivierung 17β -Estradiol an der AF-2 gebunden, dann erfolgt die Dimerisation von zwei ER. Es können dann weitere Koaktivatoren oder Kosuppressoren angelagert werden, die zusätzlich die Expression bestimmter Gene fördern oder hemmen. Nach der Translokation in den Zellkern findet hier die Anlagerung der spezifischen Bindungsstelle an das ERE von Promotern der Zielgene statt. Nach Rekrutierung weiterer Hilfsfaktoren wird das Gen als mRNA abgelesen, aus der die entsprechenden Proteine translatiert werden können (Efferth 2006).

Die Wirkung der Östrogene kann auch nicht-genomisch und daher schneller vermittelt sein. Hier spielen z. B. G-Protein gekoppelte Rezeptoren oder Ionenkanäle in der Zellmembran eine

Rolle. Ein weiteres Beispiel ist die Steigerung der NO-Produktion in arteriellen Gefäßendothelzellen, die innerhalb von Minuten eintritt (Graefe et al. 2011).

1.4 Östrogene

Östrogene gehören zu den Steroidhormonen und werden überwiegend im Ovar von den Granulosa- und den Theka-Zellen des Graafschen Follikels und im Corpus luteum, während der Schwangerschaft zudem in der Plazenta gebildet. Geringere Mengen werden in Hoden, Nebennierenrinde, Gehirn und Binde-, Muskel- und Fettgewebe generiert (Stauber und Weyerstahl 2007). Ausgangsstoff ist das Cholesterin, aus dem über Pregnenolon und Androgene schlussendlich die Östrogene mittels Aromatase synthetisiert werden (siehe Abbildung 4).

Die wichtigsten Östrogene sind Estradiol, Estron und Estriol, wobei Estradiol biologisch am aktivsten ist. Estron hat nur ein Drittel, Estriol nur ein Zehntel der biologischen Wirkung von Estradiol (Stauber und Weyerstahl 2007). Die Östrogene sind maßgeblich für die Ausbildung und Aufrechterhaltung der sekundären weiblichen Geschlechtsmerkmale verantwortlich. Ihnen wird zudem eine schwach anabole Wirkung und eine förderliche Wirkung auf die Osteoblasten und damit auf das Knochenwachstum zugeschrieben. Im weiblichen Zyklus induzieren sie die Proliferation der Uterusschleimhaut für die Vorbereitung auf eine Einnistung der befruchteten Eizelle (Löffler 2008). Östrogene sind aber auch Promotoren für die Entwicklung von Brustkrebs (Cauley et al. 1999).

Im Serum werden Östrogene, ebenso wie Testosteron, an das Sex-Hormon-Bindungs-Protein (SHBG) gebunden transportiert. Nur 1-3 % liegen in ihrer ungebundenen und biologisch aktiven Form vor. In der Leber werden die Östrogene durch Glukuronidierung zu einem wasserlöslichen Produkt metabolisiert, das über die Niere ausgeschieden wird (Stauber und Weyerstahl 2007).

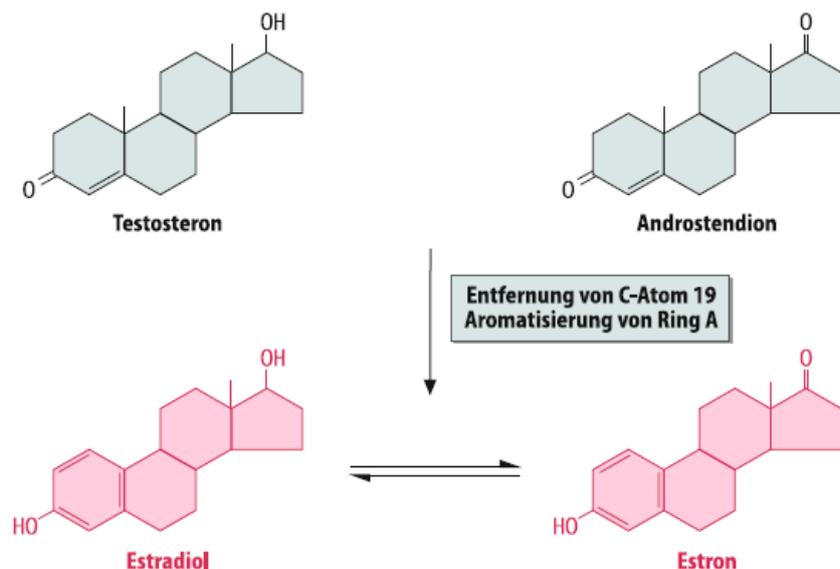


Abbildung 4: Biosynthese der Östrogene aus Androgenen (Löffler 2008).

1.5 Selektive Östrogenrezeptormodulatoren (SERMs)

SERMs sind synthetisch hergestellte Substanzen, die über den Östrogenrezeptor gewebebezogen und konzentrationsabhängig entweder Östrogen-antagonistische oder – agonistische Wirkungen haben können. Diese Unterschiede sind wahrscheinlich durch die unterschiedliche Ausprägung von α -ER und β -ER und die Anwesenheit verschiedener Co-Aktivatoren und Co-Repressoren in den verschiedenen Geweben bedingt. SERMs blockieren überwiegend die AF-2 und wirken damit in Geweben, die vor allem mit der AF-2 aktiviert werden, antagonistisch und in Geweben, die überwiegend mit AF-1 aktiviert werden, agonistisch. Diese Wirkung entsteht durch die verschiedenen Rezeptorkonformitäten, welche bei Bindung des SERM eingenommen werden und dann überwiegend Co-Aktivatoren oder Co-Repressoren binden (Dahlman-Wright et al. 2006). Ein wichtiger Vertreter ist das Tamoxifen, das an der Brustdrüse antagonistisch zum Östrogen wirkt und somit beim östrogenabhängigen Mammakarzinom als Therapie eingesetzt wird. Studien ergaben allerdings, dass Tamoxifen auch über ER-unabhängige Signalwege wirken muss, da eine Zytotoxizität auch bei rezeptornegativen Zellen nachweisbar ist (Petinari et al. 2004). Tamoxifen erhöht beispielsweise den Level des Transforming Growth factor β , moduliert Signalproteine wie die Proteinkinase C, Calmodulin und das Protoonkogen c-myc. Außerdem scheinen auch Caspasen und Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) bei der Tamoxifen-vermittelten Wirkung eine

Rolle zu spielen (Mandlekar et al. 2001). Tamoxifen hat jedoch auch Nebenwirkungen. Es steigert das Risiko für ein Endometriumkarzinom, erhöht das Thromboembolierisiko, wirkt nicht gegen klimakterische Beschwerden und beugt nur ungenügend einer Osteoporose vor. Für letztere Indikation wird Raloxifen eingesetzt, das eine östrogenähnliche Wirkung besitzt und das Endometriumkarzinomrisiko nicht erhöht. Toremifen wirkt wie die Muttersubstanz Tamoxifen (siehe Abbildung 5) (Lüllmann et al. 2010).

	Mammakarzinom-Risiko	Endometriumkarzinom-Risiko	Thromboembolie-Risiko	Linderung klimakterischer Beschwerden	Schutz vor Osteoporose
Estradiol	(++)*	+++*	++	+++	+++
Tamoxifen	-	+	++	-	+
Raloxifen	-	∅	++	-	++

* in Kombination mit Gestagen

** Risiko aufhebbar durch Gestagen-Gabe

grün: günstiger Effekt; rot: unerwünschter Effekt

Abbildung 5: Effekte von Estradiol und ausgewählten SERMs (Lüllmann et al. 2010).

1.6 Sekundäre Pflanzenstoffe

Bei den Pflanzen wird zwischen einem Primär- und Sekundärstoffwechsel unterschieden. Der Primärstoffwechsel ist prinzipiell für alle Pflanzen gleich und stellt die essentiellen Syntheseprodukte für Aufbau und Energiestoffwechsel her, insbesondere Kohlenhydrate (und damit auch Strukturstoffe wie die Zellulose), Fette und Eiweiße. Im Sekundärstoffwechsel werden die sekundären Pflanzenstoffe hergestellt, die in den verschiedenen Pflanzenarten unterschiedlich sind und sich zudem je nach Gewebe und Organ und manchmal auch in bestimmten Entwicklungsstadien voneinander unterscheiden können. Diese Stoffe sind nicht für den unmittelbaren Aufbau der Zelle bedeutsam, sondern eher für den Gesamtorganismus. Sie dienen z. B. als Farbstoffe, Fraßgifte, Sonnenschutz oder zur Abwehr von Mikroorganismen (Schopfer und Brennicke 2016, S. 355). Der Mensch, der als Fraßfeind der Pflanzen angesehen werden muss, hat im Lauf der Evolution verschiedene Verhaltensmaßnahmen (Erhitzen, Meiden giftiger Pflanzen) und Entgiftungsmechanismen (wie z. B. mit Phase I- und Phase II-Enzymen) entwickelt. Einige sekundäre Pflanzenstoffe sind trotzdem als gefährlich (z. B. die Alkaloide der Nachtschattengewächse) einzustufen, sehr viele andere allerdings haben, je nach Konzentration, positive Wirkungen und können als semiessentiell angesehen werden.

Bei ihnen wurden je nach Substanz antikanzerogene, antimikrobielle, antithrombotische, antiinflammatorische, immunmodulierende oder verdauungsfördernde Wirkungen entdeckt. Zudem sollen einige einen positiven Einfluss auf Blutdruck, Cholesterinspiegel und Blutglukosespiegel haben. Viele dieser Pflanzen werden schon seit der Antike in der Medizin eingesetzt und in den letzten Jahrzehnten zunehmend auch hinsichtlich sekundärer Inhaltsstoffe und deren Wirkung untersucht (Watzl und Leitzmann 1995, S. 16ff.). Die sekundären Pflanzenstoffe werden insbesondere in Polyphenole, Carotinoide, Phytoöstrogene, Glucosinolate, Sulfide, Monoterpene, Saponine, Protease-Inhibitoren, Phytosterine und Lektine eingeteilt. In Deutschland nimmt ein Mensch im Durchschnitt 1,5 g/Tag dieser Substanzen mit der Nahrung auf, bei Vegetarier*innen ist dies häufig deutlich mehr. Die Bioverfügbarkeit richtet sich nach der jeweiligen Substanzklasse, der Zubereitungsform (erhitzt, zerkleinert, Zugabe von Fett), der verfügbaren Menge und der Anwesenheit von Proteinen und Antioxidantien (Deutsche Gesellschaft für Ernährung 2012).

1.7 Flavonoide

Die Flavonoide sind eine Untergruppe der Polyphenole und dienen in den Pflanzen als roter, blauer, gelber und violetter Farbstoff. Die Flavonoide lassen sich in weitere Untergruppen unterteilen. Dazu gehören die Flavonole, Flavanone, Flavone, Anthocyane und Isoflavonoide. Ausgangsstoff für all diese Substanzen ist das Flavan (siehe Abbildung 6).

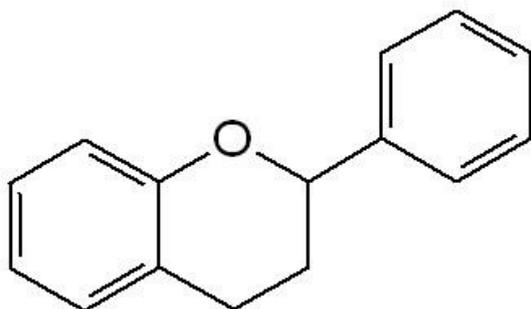


Abbildung 6: Flavan als das Grundgerüst der Flavonoide mit zwei aromatischen Ringen und einem O-heterozyklischen Ring (Nono64 in Wikimedia Commons 2009).

Die meisten Flavonoide liegen verknüpft als Oligomere (Proanthocyanidine) vor. Diese Verbindungen sind die in der menschlichen Nahrung am häufigsten vorkommenden Polyphenole und finden sich insbesondere in Äpfeln, Zwiebeln, Beeren, Rotwein, Nüssen, Schokolade, Soja und Tee. Flavonoide gehören zu den bestuntersuchtsten sekundären Pflanzenstoffen. Ihnen werden positive Effekte bei Herz-Kreislaufkrankungen und

bestimmten Krebserkrankungen zugeschrieben (Deutsche Gesellschaft für Ernährung 2012). In einer Metaanalyse von 2012 ging nur die Aufnahme des Flavonols Epicatechin mit einer statistisch signifikanten Risikoreduktion für die Entwicklung eines Kolonkarzinoms einher (Jin et al. 2012). In einer anderen Metaanalyse erzielten auch Flavonol-, Flavan-3-ol-, Proanthocyanidin- und Anthocyanidinzufuhr einen positiven Effekt (Woo und Kim 2013). Auch auf Blutdruck und Endothelfunktion scheinen Flavonoide eine positive, aber nicht dosislineare Wirkung zu haben (Kay et al. 2012).

In einer weiteren Metanalyse wurde die Wirkung von Flavonoiden auf das Brustkrebsrisiko untersucht. Nur die Zufuhr von Flavonolen und Flavonen geht mit einer Riskoreduktion einher, nicht aber die Einnahme anderer Flavonoid-Klassen. Von diesem Effekt profitierten besonders postmenopausale Frauen (Hui et al. 2013). Nicht nur in der Prävention können Flavonoide wirksam zu sein, auch bei der Behandlung von Brustkrebs mit *Multi Drug Resistance* scheint eine Einnahme sich positiv auszuwirken. Die Wirkung wird hier über verschiedene Signalkaskaden, aber auch Sensibilisierung gegenüber oxidativem Stress oder Inaktivierung der Zytostatika-Ausschleusung der Tumorzellen vermittelt, wie in dieser Übersichtsarbeit dargestellt (Costea et al. 2020). Die Wirkung der Flavonoide soll zumindest partiell auch über die Östrogenrezeptoren vermittelt werden (Breinholt und Larsen 1998). Manche Forscher ordnen das Flavonol Quercetin, welches auch im Sanddorn vorkommt, deshalb beispielsweise sogar den Phytoöstrogenen zu (van der Woude et al. 2005). Die Phytoöstrogene sind Substanzen, die den Östrogenen strukturell ähneln und mit ihnen um den Östrogenrezeptor konkurrieren und hier agonistische oder antagonistische Wirkungen haben können (Efferth 2006). Deshalb wird in der vorliegenden Arbeit die Wirkung der Extrakte auf ER-positive und -negative Brustkrebszelllinien untersucht.

Regelhaft den Phytoöstrogen zugeordnet werden die Vertreter der Isoflavonoide. Sie sind die am ausführlichsten untersuchten Phytoöstrogene. Diese kommen in besonders großen Mengen, mit Genistein und Daidzein als Hauptvertretern, in Sojabohnen vor (Foth 2003). Andere Isoflavone sind Glycitein, Formononetin, Biochanin A und die jeweiligen Glykoside.

Die Wirkung am ER ist konzentrationsabhängig. So wirkt Genistein auf MCF-7-Mammakarzinomzellen, welche auch in dieser Arbeit verwendet wurden, in niedrigeren Dosierungen proliferationssteigernd und in höheren Dosierungen proliferationshemmend

(Hsieh et al. 1998). Eine japanische Studie (Takeuchi et al. 2009) ergab, dass die meisten Phytoöstrogene am β -ER eine stärkere agonistische Wirkung haben als am α -ER, ihre Aktivität zeigt aber nur einen Bruchteil der Aktivität des Estradiols. In der Leber scheinen Phytoöstrogene eine Erhöhung der SHBG-Produktion zu verursachen und damit die Level an frei zirkulierenden Östrogenen und Testosteron zu senken und somit auch das Risiko für hormonabhängige Tumoren zu senken (Adlercreutz et al. 1987).

Die sojareiche Ernährung soll die Ursache für das verminderte Risiko für Erkrankungen wie Brust- und Prostatakarzinom, Herz-Kreislaufkrankungen und Dickdarmkrebs in den asiatischen Ländern sein (Adlercreutz und Mazur 1997). Die durchschnittliche Aufnahme von Isoflavonoiden in asiatischen Ländern beträgt ca. 50 mg/d, bei traditioneller japanischer Ernährung werden sogar 200 mg/d erreicht. In den westlichen Ländern werden dagegen nur etwa 5 mg/d aufgenommen (Foth 2003). Eine Metaanalyse von 2013 (Xie et al. 2013) zeigte, dass bei asiatischen Frauen eine hohe Isoflavonoidzufuhr im Vergleich zu einer niedrigen das Risiko für das Auftreten von Brustkrebs um 30 % reduziert. Dieser Effekt war bei postmenopausalen Frauen besonders stark ausgeprägt. Für westliche Frauen gilt dies nicht. Die Hypothese hierfür ist, dass eine sojareiche Ernährung besonders in jungen Lebensjahren einen protektiven Effekt hat, der lebenslang anhält (Messina 2016). Unterstützt wird diese These durch Migrationsstudien, in denen eine späte Migration meist keine Auswirkung auf das ursprüngliche populationsbezogene Brustkrebsrisiko hat und eine frühe Migration zu einem ähnlichen Risikoprofil wie in der Zielgesellschaft führt (Ziegler et al. 1993; Stanford et al. 1995). Ein erhöhtes Risiko bei erhöhter Isoflavonoidzufuhr bei bestehendem Brustkrebs oder nach dessen Therapie besteht jedoch nicht (Adlercreutz 2002). Einige Studien weisen darauf hin, dass Isoflavonoide auch bei Wechseljahresbeschwerden einen günstigen Einfluss haben können, aber dies gilt nur bei einigen Sojazubereitungsformen und lässt sich nicht immer vom Placebo-Effekt abgrenzen (Foth 2003). Allerdings kommen die vasomotorischen Beschwerden der Menopause in Japan viel seltener vor, als in westlichen Ländern (Foth 2003). Insofern ist ein Zusammenhang mit der Ernährung zumindest anzunehmen. Auch auf die postmenopausale Knochendichte konnte ein positiver Effekt nachgewiesen werden (Foth 2003).

Bei den Angaben zu phytoöstrogenhaltigen Nahrungsmitteln fällt auf, dass sich die Gehalte stark unterscheiden, was wahrscheinlich an unterschiedlichen Detektionsmethoden,

unterschiedlichen Anbaubedingungen oder verschiedenen Methoden der industriellen Verarbeitung der Lebensmittel liegt (Adlercreutz und Mazur 1997; Thompson et al. 2006; Horn-Ross et al. 2000). Der Garprozess scheint den Phytoöstrogengehalt jedoch nicht zu verändern. Der Zusatz von Sojabestandteilen in industriell verarbeiteten Lebensmitteln ist auch in traditionell nicht-soja-verzehrenden Populationen eine signifikante Quelle für Isoflavonoide (Boghog2 in Wikimedia Commons 2009; Horn-Ross et al. 2000).

1.8 Sanddorn

Eine einheimische Pflanze mit einem hohen Anteil an sekundären Pflanzenstoffe ist der Sanddorn (*Hippophae rhamnoides*), ein besonders in Asien und Europa verbreiteter Strauch von zwei bis vier Metern Wuchshöhe aus der Familie der Elaeagnaceae. Der Name *Hippophae* setzt sich aus den Worten für *Pferd* und *scheinen* zusammen und deutet darauf hin, dass Teile der Pflanze an Pferde verfüttert wurden, um für ein gepflegtes, schimmerndes Fell zu sorgen. *Rhamnoides* weist auf die Bedornung hin, denn die braun-grauen Zweige sind mit Dornen bewehrt. Die lanzettförmigen schmalen Blätter sind auf der Oberseite graugrün gefärbt und auf der Unterseite silbrig behaart. Charakteristisch sind die kleinen orangen Beeren (siehe Abbildung 7). Die Pflanze findet sich in Deutschland vor allem entlang der Ostseeküste in Dünengebieten und an Flussläufen (Li et al. 1996).

Der Sanddorn ist eine äußerst robuste Pflanze und kann auch unter widrigen Umständen gedeihen. Im Jahr 1938 importierte man Sanddorn aus Russland nach Kanada, um sie dort in den kargen Prärien anzupflanzen. Einerseits beugt das schnell wachsende, stark ausgeprägte oberflächliche Wurzelsystem des Sanddorns einer Bodenerosion vor, andererseits wird der Boden durch Stickstofffixierung durch symbiontisch lebende Bakterien und das Konservieren wichtiger Nährstoffe aufgewertet. Sanddorn eignet sich somit hervorragend als Grenzbeplantzung und zur Renaturierung von Halden und Tagebaugebieten. Das dichte Buschwerk dient nicht nur Vögeln als Habitat, sondern auch anderen Wildtieren (Li et al. 1996). Zudem werden die Beeren und die darin enthaltenen Kerne sowie Blätter vielfältig als Nahrungsmittel und zur Hautpflege genutzt. In der Volksheilkunde werden mit Sanddornzubereitungen traditionell Husten, Verdauungsprobleme, Kreislaufschwäche, Schmerzen und Haut- und Schleimhautdefekte behandelt (Li et al. 1996; Wani et al. 2016). Einen Überblick über Sanddornbestandteile, den Gehalt an bioaktiven Komponenten und ihre

Nutzung gibt Tabelle 1. Im Fokus stehen seit einiger Zeit aber nicht nur die Früchte und Samen des Sanddorn, sondern auch vermehrt die antiinflammatorischen, immunmodulatorischen (Ganju et al. 2005), antioxidativen (Geetha et al. 2003), antibakteriellen, zytoprotektiven (Upadhyay et al. 2010) und antineoplastischen (Teng et al. 2006) Eigenschaften der Sanddornblätter. Diese fallen bei der Beerenernte mit an, bei der fruchttragende Zweige von der Pflanze abgetrennt und tiefgefroren werden, um anschließend die Beeren abzuschütteln (Li et al. 1996). Diese vielfältig nutzbare Pflanze ist ein Hoffnungsträger bei der Bekämpfung von Volkskrankheiten wie Krebs, Übergewicht und Atherosklerose.

In der letzten Zeit fiel in Plantagen in Mecklenburg-Vorpommern, aber auch in Wildbeständen und auf anderen Kontinenten, ein zunehmendes Absterben erst einzelner Äste und dann ganzer Sanddornpflanzen auf. Eine Anfrage beim Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei M-V ergab, dass derzeit (Stand 03/2020) ein Forschungsprojekt zur Aufklärung der Schadursache beantragt ist. Die Vorarbeiten haben bisher aber zu keinen eindeutigen Ergebnissen geführt. Die Vermutung besteht, dass pilzliche Schaderreger eine Rolle spielen könnten. Auch in der internationalen Forschung wurden bisher keine Ergebnisse hierzu veröffentlicht.



Abbildung 7: Sanddorn mit Früchten, Blättern und Dornen (Karunakar Rayker in Wikimedia Commons 2008).

Tabelle 1: Bestandteile des Sanddorns, bioaktive Inhaltsstoffe und bisherige Nutzung (Wani et al. 2016; Yang et al. 2006; Li et al. 1996; Geetha et al. 2003; Guan et al. 2005; Michel et al. 2012):

Bestandteil	Bioaktive Inhaltsstoffe	Nutzung
Alle Pflanzenteile	Vitamine (A, C, E, Riboflavin, Folsäure, K) Karotinoide (α -, β -Karotine, Lycopin) Flavonoide Organische Säuren (Apfelsäure, Oxalsäure) Phytosterole (Ergosterol, Stigmasterin, Lanosterol, Amyrin) Einige essentielle Aminosäuren	Futtermittel, Heckenpflanze, Vogelnahrung im Winter, Bodenerosionsschutz
Früchte	Hoher Vitamin C-Gehalt (abhängig vom Reifegrad bis 360 mg/100g) Flavonoide (frisch: 120-1000 mg/100g) Vitamin E (Tocopherole, Tocotrienole) Einfach ungesättigte Fettsäuren Phytoöstrogene (Lignane)	Nahrungsmittel (Saft, Likör, Konfitüre, Süßigkeiten, Tee) Ölige Bestandteile: s. Kerne Pressrückstand: Futtermittel
Kerne	Vitamin E Ungesättigte Fettsäuren Triglycerin Flavonoide (Kaempherol, Catechine)	Ölige Bestandteile: Therapeutika für Mukositis, Sonnenbrand, Strahlenschäden, gastrointestinale Ulcera, Kosmetika
Blätter	Flavonoide (Kaempherol, Isorhamnetin, Quercetin, Epicatechin) (Phenolgehalt 2218 mg/ 100 g Frischblatt) Leukoanthocyanidin, Tannine, Triterpene	Tee

2 Zielstellung

Brustkrebs ist die häufigste Todesursache bei Frauen zwischen 30 und 60 Jahren in der westlichen Welt mit weiter steigender Inzidenz. Viele neue Therapieoptionen entstammen dem Pflanzenreich, auch die gesundheitsfördernde und sogar tumorpräventive Wirkung vieler sekundärer Pflanzenstoffe ist bekannt, wobei hier noch viel Forschungsbedarf besteht.

Sanddorn enthält einen hohen Anteil sekundärer Pflanzenstoffe, vor allem Flavonoide. Bei den isolierten Flavonoiden des Sanddorns wurden bereits antineoplastische Eigenschaften nachgewiesen (Teng et al. 2006). Bisher wurden jedoch vor allem die Früchte und Kerne untersucht, obwohl die meisten sekundären Pflanzenstoffe in allen Teilen der Pflanze vorkommen (siehe Tabelle 1). Da auch die Blätter bei der Ernte der Früchte anfallen, eignen sie sich besonders als möglicher Ausgangsstoff für Produktentwicklungen.

In der vorliegenden Arbeit wird die antineoplastische Wirkung von jeweils zwei nichtwässrigen und zwei wässrigen unterschiedlichen Sanddornblätterextrakten in verschiedenen Dosierungen bei Östrogen-/ Progesteronrezeptor-positiven und –negativen Mammakarzinomzellen sowie bei benigne entarteten Zelllinien und einer normalen humanen Mammazelllinie *in-vitro* getestet. Die Zellen werden hinsichtlich ihres Rezeptorstatus immunhistochemisch charakterisiert.

Messparameter sind die Inhibition der Zellproliferationshemmung durch die Inkubation mit den vier Extrakten und verschiedene Stoffwechseluntersuchungen wie die Veränderungen von pH-Wert, der Glukosekonzentration und von Parametern für den oxidativen Stress. 17 β -Estradiol und Tamoxifen dienen als Kontrollsubstanzen zur Einschätzung des Einflusses des Rezeptorstatus.

Ziel der Untersuchung ist, herauszufinden, ob die Sanddornblätterextrakte bei den Mammakarzinomzellen antiproliferativ wirken, ohne jedoch bei normalen Mammazellen zytotoxische Effekte zu zeigen. Bei einem derartigen Ergebnis könnten sie für einen Einsatz in der Prävention und Therapie von Brustkrebs geeignet sein und weiterentwickelt werden.

3 Material und Methoden

Vorbemerkung: Alle verwendeten Materialien und Geräte werden im Anhang aufgelistet.

3.1 Pflanzenmaterial

Das Ausgangsmaterial der Extrakte stammt von weiblichen Vertretern des Küstensanddorns (*Hippophae rhamnoides* subsp. *Rhamnoides*) vom Standort Rostock/Gehlsdorf. Die Sträucher wachsen dort in natürlich vorkommenden Beständen. Die Laubblätter wurden zweizeitig von Hand geerntet. Für die Extrakte aus Luyengi- und Mikrowellenextraktion (vergl. 3.2 und 3.3) wurden Blätter aus der Winterernte im Dezember 2011 verwendet, welche bei trockenem, frostfreiem Wetter erfolgte. Die zweite Ernte fand im Sommer 2012 Anfang September bei ebenfalls trockener Wetterlage statt. Die gewonnenen frischen bzw. getrockneten Blätter wurden für die teeanaloge wässrige Extraktion genutzt (vergl. 3.4). Nach der Ernte wurden die Blätter in 50ml-Eppendorf-Röhrchen bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Untersuchungen wurden in den Jahren 2012-2013 durchgeführt.

3.2 Extraktion nach der Mikrowellenextraktionsmethode

Vor der Mikrowellenextraktion wurden 50 g der frischen Laubblätter aus der Winterernte im Institut für Chemie, Universität Rostock, in einem Trockenschrank (Binder) bei 70°C für 24 h getrocknet. Die Temperaturbegrenzung war wichtig, da ab einer Trocknungstemperatur ab 80°C ein Teil der phenolischen Inhaltsstoffe verloren geht (Guan et al. 2005). Es resultierten 30 g Laubdroge, die in 9 spezielle Teflon-Schraub Röhrchen zu je 3 g überführt wurde. Die Röhrchen wurden mit je 20 ml Methanol reinst versetzt. Für die Extraktion wurde das Mikrowellengerät MarsXpress genutzt, das die Möglichkeit der temperaturgesteuerten Leistungsanpassung und mit dem Programm LIGFLAV1-Xpress eine spezielle Einstellung zur Extraktion sekundärer Pflanzenstoffe bietet. Der Zyklus beginnt mit einer 10-minütigen Aufwärmphase auf 60°C, in den nächsten 10 Minuten wird diese Temperatur gehalten und anschließend auf 40°C abgekühlt. Am Ende dieses Zyklus wurden die Röhrchen entnommen und geschüttelt. Nach weiteren zwei Zyklen einschließlich Verschüttelung wurde der Extrakt aus allen Röhrchen über ein Sieb und einen Filter mittels einer Unterdruckpumpe in einen Erlenmeyer-Kolben dekantiert (Kaufmann und Christen 2002). Anschließend wurde im Institut für Biologie der Universität Rostock die Ausbeute (80 ml) am Vakuumrotationsverdampfer in

einem in 45°C warmen Wasserbad rotierenden Rundkolben eingengt. Um den Siedepunkt nach unten zu verlagern, war eine Vakuumpumpe angeschlossen, die bei zunehmender Viskosität der Probe von 330 mbar auf 60 mbar heruntergeregelt wurde, um den Prozess zu beschleunigen bei gleichzeitiger Schonung der Inhaltsstoffe der Probe (Szewczyk 2007). Zur vollständigen Trocknung verblieb der Kolben mit der Probe über Nacht in einen Silicagel-Exsikkator. Der Trockenextrakt wurde dann gewogen, die Ausbeute betrug 3,6232 g. Er verblieb bis zur Nutzung in einem licht- und feuchtigkeitsgeschützten Kühlschrank.

3.3 Extraktion nach Luyengi

Bei dieser Methode handelt es sich um eine modifizierte Methode (Szewczyk 2007) zur Lignan-Isolierung (Luyengi et al. 1996). 35 g des gefrorenen Materials aus der Winterernte wurden grob gemörsert, in einen Erlenmeyer-Rundkolben überführt und mit 310 ml Methanol reinst versetzt. Unter einem Abzug wurde mit Hilfe des Rotationsverdampfers die Probe unter Rückfluss des Methanols bei 70-75°C für 15 min gekocht. Der auf Zimmertemperatur abgekühlte Extrakt wurde über einen 150 mm Faltenfilter zweimalig filtriert, das Filtrat wurde dann im Vakuumrotationsverdampfer bei 45°C eingengt, wobei der Druck wie oben beschrieben von 330 auf 60 mbar verringert wurde. Die Probe wurde in 7 ml Aqua dest. aufgenommen, im Ultraschallbad gelöst und in ein Falcon-Röhrchen überführt. Da noch Konglomerate sichtbar waren, wurden weitere 13 ml aqua dest. zugefügt. Nach Ausschütteln des Extraktes mit 29 ml Ethylacetat wurde die obere Phase mittels Pasteurpipette in einen zuvor ausgewogenen Rundkolben überführt. Die untere Phase wurde noch zweimal mit je 8 ml Ethylacetat ausgeschüttelt und die jeweils obere Phase ebenfalls überführt. Die obere Phase wurde bei 45°C mit dem Rotationsverdampfer eingedampft, der Kolben dann zum Lichtschutz mit Aluminiumpapier umschlossen und in den Silicagel-Exsikkator über Nacht zum Trocknen gelegt. Es ergaben sich 1,7575 g Trockenextrakt.

3.4 Teeanaloge Extraktion aus frischem und getrocknetem Pflanzenmaterial

Für den teeanalogen Extrakt (im Weiteren: wässrigen Extrakt) aus getrockneten Sanddornblättern wurden 27,44 g Frischmaterial im Trockenschrank bei 70°C für 8 h getrocknet und auf Raumtemperatur abgekühlt. Es ergaben sich 11,82 g Teedroge. Davon wurden je 4 g wurden grob zerkleinert, in einen Teefilter (Melitta) gegeben und zusammen mit je 100 ml Leitungswasser und vier Siedesteinchen auf einer Heizplatte (Heidolph) auf

100°C erhitzt und für 15 min gesiedet. Um für den Frischblattextrakt ein vergleichbares Verhältnis zu bekommen, wurden 9,30 g der Frischprobe in der gleichen Weise verarbeitet. Die wässrigen Extrakte wurden in abgekühlten Zustand über einen Faltentrichter filtriert. Zur Evaluation des Trockenanteils wurden je Extrakt drei Eppendorf-Röhrchen ausgewogen und mit je 500 µl des Extraktes befüllt. Er wurde mit Hilfe des eppendorf Concentrator 5301 für 2 h eingeeengt, die Röhrchen wurden anschließend wieder gewogen und das Gewicht des Extraktanteils gemittelt. Es ergaben sich eine Ausgangskonzentration von 0,01127 g/ml für den trockenen teeanalogen Extrakt (im Weiteren als Trockener Teeextrakt bezeichnet) und 0,0108 g/ml für den frischen teeanalogen Extrakt (im Weiteren als Frischer Teeextrakt bezeichnet). Zur Herstellung von Stammlösungen mit definierter Konzentration wurden die Gewichte der Feststoffe bestimmt: Die Extrakte wurden in ausgewogene Rundkolben überführt und am Vakuumrotationsverdampfer bei 80°C und 225 mbar eingeeengt. Die Proben wurden zur vollständigen Trocknung über Nacht im Silicagel-Exsikkator gelagert, anschließend gewogen und mit Aqua dest. zur Stammlösung mit einer Konzentration von 100 mg/ml im Ultraschallbad verdünnt. Die Extrakte wurden luftdicht bei -70°C gelagert.

3.5 Zelllinien

Für die Untersuchungen zur Wirkung der Extrakte wurden verschiedene Zelllinien humaner Mamma-Zellen verwendet, die sich hinsichtlich der Benignität oder der Rezeptorausprägung unterscheiden. Alle diese Zelllinien wachsen adhärent auf dem Boden von Zellkulturflaschen.

3.5.1 MCF-7

Die als MCF-7 bezeichnete Zelllinie ist eine Östrogenrezeptor-positive Mammakarzinomzelllinie eines epithelialen Adenokarzinoms. Sie wird dem Luminal B-Subtyp zugeordnet, da sie sowohl Östrogen- als auch Progesteronrezeptor-positiv ist, keine Her2-neu-Überexpression ausbildet und hohe Proliferationsraten aufweist (Prat et al. 2013). Sie entstammt dem malignen Pleuraerguss einer 69-jährigen Kaukasierin (ATCC 2016d).

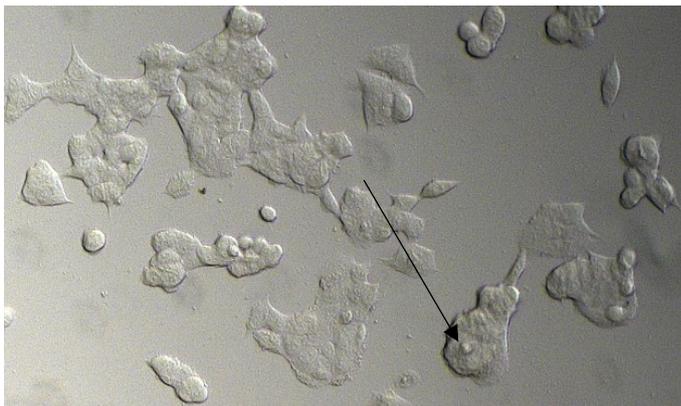


Abbildung 8: MCF-7 , 10. Passage, 10-fache Vergrößerung, Pfeil markiert eine Zelle (Foto: A.-M. Kunert).

3.5.2 BT-20

BT-20 ist eine Östrogenrezeptor-negative Mammakarzinomzelllinie, aus einem Tumor einer 74-jährigen Kaukasierin. Da hier keine Hormonrezeptoren und auch kein Her2-neu ausgeprägt sind, wird diese Zelllinie als „triple negativ“ oder „basal like“ eingeordnet (Subik et al. 2010). Sie weist aber eine Östrogenrezeptor-mRNA mit einer Deletion im Exon 5 auf. Das Wachstum der BT-20-Zelllinie wird durch den Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF- α) inhibiert (ATCC 2016a).

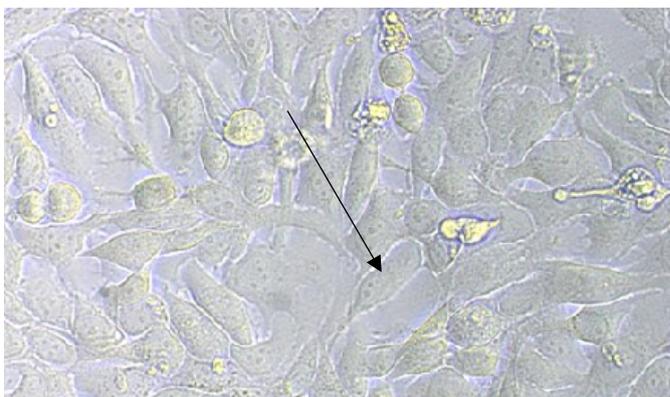


Abbildung 9: BT-20 , 21. Passage, 20-fache Vergrößerung, Pfeil markiert eine Zelle (Foto: D.-U. Richter).

3.5.3 T-47D

Diese Zelllinie stammt aus einem malignen Pleuraerguss bei einem infiltrierenden duktalem Mammakarzinom einer 54-jährigen Frau. Es werden sowohl Östrogen- als auch Progesteronrezeptoren, sowie Calcitonin-, Androgen-, Glucocorticoid- und Prolaktin-Rezeptoren exprimiert. Die Zelllinie ist überwiegend hypertriploid (ATCC 2016e). Sie wird dem molekularen Subtyp Luminal B (Her2/neu-negativ) zugeordnet (Prat et al. 2013).

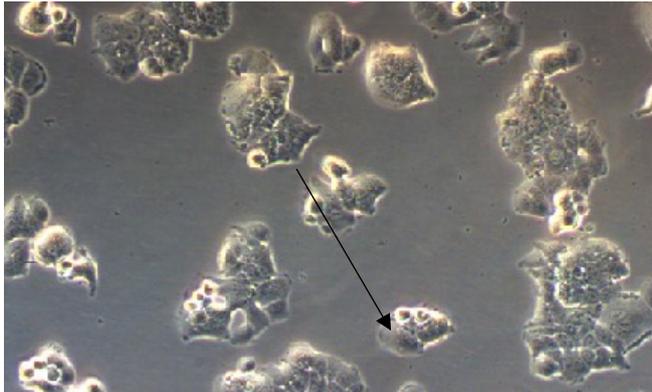


Abbildung 10: T-47D , 18. Passage, 20-fache Vergrößerung, Pfeil markiert eine Zelle (Foto: D.-U. Richter).

3.5.4 MCF-12A

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um nichttumoröse Mammaepithelzellen einer 60-jährigen Kaukasierin, die bei einer Mammareduktionsplastik bei Mastopathie mit fokalen Arealen mit intraduktaler Hyperplasie separiert wurden. Die Zellen sind genetisch modifiziert, so dass eine Apoptose nicht eingeleitet wird (ATCC 2016c). Es werden Östrogenrezeptoren exprimiert (Marchese und Silva 2012).

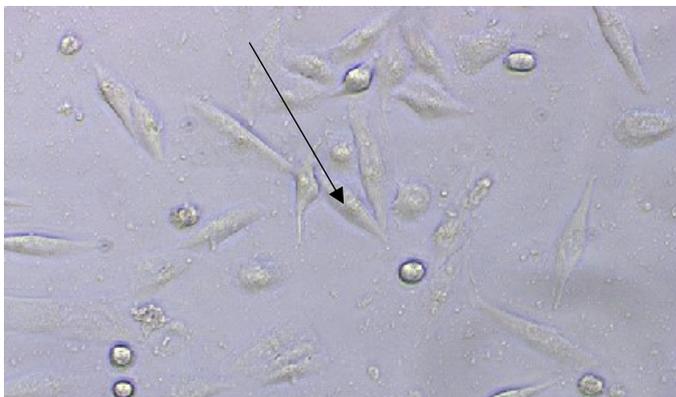


Abbildung 11: MCF-12A , 12. Passage, 20-fache Vergrößerung, Pfeil markiert eine Zelle (Foto: D.-U. Richter).

3.5.5 MCF-10A

Diese Zelllinie stammt von einem Präparat bei Mastopathie einer 36-jährigen Kaukasierin und ist nicht tumorös. Sie exprimiert keine Hormonrezeptoren oder Her2/neu und ist damit „triple negativ“ oder „basal like“ (Subik et al. 2010; ATCC 2016b).



Abbildung 12: MCF 10A , 9. Passage, 20-fache Vergrößerung, Pfeil markiert eine Zelle (Foto: D.-U. Richter).

3.5.6 HMEPC

Diese Zelllinie stammt von gesunden humanen Mammazellen, die nicht transformiert oder mutiert sind und somit eine begrenzte Lebens- und Passagedauer haben (provitro 2016a).

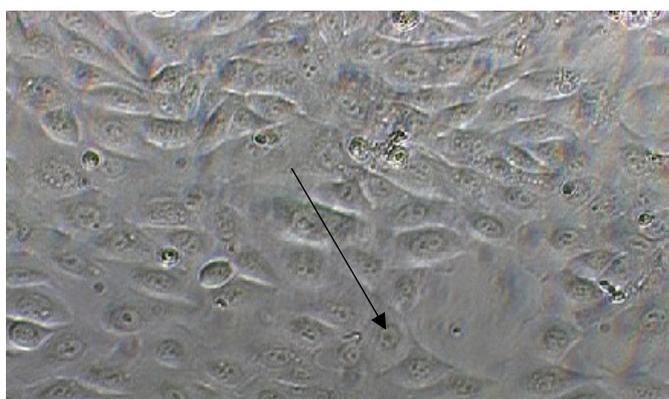


Abbildung 13: HMEPC, 1. Passage, 32-fache Vergrößerung, Pfeil markiert eine Zelle (Foto: D.-U. Richter).

Die Eigenschaften und Bezugsquellen der verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Zelllinienübersicht mit Herkunft, Rezeptorstatus und Bezugsort:

Zelllinie	Art	Eigenschaft	Firma	Bezugsnummer
MCF-7	Mammakarzinom-Zelllinie (Adenokarzinom)	α -, β - ER positiv PR positiv	ATCC®	ATCC® HTB-22™ (ATCC 2016d)
BT-20	Mammakarzinom-Zelllinie	α -, β - ER negativ PR negativ	ATCC®	ATCC® HTB-19 (ATCC 2016a)
T-47D	Mammakarzinom-Zelllinie (duktales Karzinom)	α -, β - ER positiv PR positiv	ATCC®	ATCC® HTB-133 (ATCC 2016e)
MCF-12A	Nichttumoröse Mammaepithel-Zelllinie	α -, β - ER positiv PR positiv	ATCC®	ATCC® CRL-10782 (ATCC 2016c)
MCF-10A	Nichttumoröse Mammaepithel-Zelllinie	α -, β - ER negativ PR negativ	ATCC®	ATCC® CRL-10317 (ATCC 2016b)
HMEPC	Humane Mammaepithel Zellen	α -, β - ER positiv PR positiv	provitro	1210731 (provitro 2016a)

3.6 Zellkulturmedien

Für die Zellkultivierung wurden unterschiedliche Medien genutzt, denen mittels FKS (Fetales Kälberserum) oder Horse-Serum Wachstumsfaktoren und andere Proteine zugesetzt wurden. Durch Zugabe von 1,0 % Penicillin/Streptomycin und 0,5 % Amphotericin B wurde das Wachstum von Bakterien und Pilzen gehemmt.

MCF-7 ließ sich in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) kultivieren. Es wurde durch das Lösen von 26,89 g DMEM, 5,2 g HEPES und 6 g NaHCO₃ in 2 l Aqua dest. hergestellt und mit 10 % FKS und den antimikrobiellen Wirkstoffen versetzt. Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt und das Medium anschließend unter sterilen Bedingungen filtriert. Nach dem Ausschälen auf die Platten und Inkubation im Brutschrank für 24 h bei 37°C, 5 % CO₂ wasserdampfgesättigter Atmosphäre (Standardbedingungen) erfolgte der Wechsel auf

DMEM 5 % FKS hormonfrei, um die Einwirkung der im FKS enthaltenen Hormone bei den Tests möglichst gering zu halten.

BT-20 wurde in *Minimal essential Medium* (MEM) mit 10% FKS und den anderen Zusätzen kultiviert. Der Wechsel auf den Well-Platten erfolgte auf RPMI 10 % FKS hormonfrei.

T-47D wurde in *Roswell Park Memorial Institute-Medium* (RPMI) kultiviert und dann auf RPMI 10 % FKS hormonfrei gewechselt.

MCF-12A und MCF-10A wurden in Ham's F12 mit 10 % Horse-Serum, Mammaepithel-Supplement und 1,0 % Penicillin/Streptomycin und 0,5 % Amphotericin B kultiviert. Hier erfolgte der Wechsel nach 24 h auf den Well-Platten auf Ham's F12 10 % FKS hormonfrei.

Zur Kultivierung der HMEPC wurde das Mammary epithel cell growth medium, serum-free mit Mammary epithelial cell Supplement-Mix, serum-free, 1,0 % Penicillin/Streptomycin und 0,5 % Amphotericin B versetzt (provitro 2016b).

3.7 Zellkultivierung

Vor der Zellkultur musste das Einfriermedium entfernt werden. Es bestand aus dem entsprechenden Nährmedium mit 20 % FKS und 10 % DMSO, das die Wasserkristallisation beim Gefriervorgang und bei der Lagerung bei - 80°C verhindert. Alle Arbeiten mit den Zellen wurden unter der Sterilbank erledigt. Die auf Raumtemperatur aufgetauten Zellen wurden in ein 50 ml-Röhrchen überführt und mit 15 ml des jeweiligen Nährmediums versetzt. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgossen, die Zellen in 5 ml des jeweiligen Kulturmediums mittels Vortexmischer resuspendiert, in eine kleine Zellkulturflasche überführt und im Brutschrank unter Standardbedingungen inkubiert. Die zunächst frei flotierenden Zellen adhärten über Peptidbindungen am Flaschenboden und begannen sich zu teilen. Je nach Proliferationsgeschwindigkeit wurde dreimal wöchentlich das Medium gewechselt.

Wenn lichtmikroskopisch ersichtlich wurde, dass auf dem Boden der Zellkulturflasche kein Ausbreitungspotenzial (70 – 90 % konfluent) für die Zellen mehr bestand, wurden diese in eine nächstgrößere Zellkulturflasche überführt oder auf mehrere Zellkulturflaschen aufgeteilt. Für die Passage wurde das Medium abgesaugt und Reste des Serums durch die Zugabe von 3 ml PBS abgespült. Der Puffer wurde dann verworfen. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin (Trypsin-EDTA 0,25 %) oder Accutase (400-600 units/mL, nur für MCF-12A) zur Spaltung der

Material und Methoden

Peptidbindungen für 5 min bei 37°C inkubiert. Durch anschließendes Beklopfen der Flaschen lösten sich die Zellen vom Flaschenboden ab, Trypsin bzw. Accutase wurden durch Zugabe von Kulturmedium mit FKS gebunden. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml-Röhrchen pipettiert und dann bei 1000 rpm für 5 min ohne Bremsschritt zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert, in eine Zellkulturflasche überführt und im Brutschrank unter Standardbedingungen gelagert.

3.8 Ermittlung der Lebendzellzahl

Zur Reproduzierbarkeit der eingesetzten Zellzahl wurden die isolierten Zellen gezählt. Dafür wurden 20 µl Zellsuspension mit 360 µl Zellkulturmedium und 20 µl Trypanblau versetzt und auf 1:20 verdünnt. Trypanblau färbt nur avitale, jedoch keine lebenden Zellen an. Eine Bürker-Zählkammer wurde mit einem Deckgläschen belegt, von jeder Seite mit 10 µl Lösung beschickt und die farblosen Zellen in jeweils 25 Quadraten beider Seiten der Kammer mit dem Lichtmikroskop ausgezählt. Die Lebendzellzahl pro ml Ausgangssuspension wurde mit der untenstehenden Formel ermittelt. Da zweimal 25 Quadrate ausgezählt wurden, halbiert sich der Verdünnungsfaktor.

$$\text{Zellzahl (aus 2 x 25 Quadraten) x 10 (Verdünnung) x 10}^4 = \text{Zellen/ml}$$

3.9 Immunhistochemie

3.9.1 Prinzip

Die Rezeptorausprägung der untersuchten Zellreihen hinsichtlich α -Östrogen-, β -Östrogen- und Progesteronrezeptor wurde immunhistochemisch nachgewiesen. Als relativ spezifischer Primärantikörper wurde Avidin verwendet, das vier Bindungsstellen für Biotin besitzt und seinerseits eine biotinylierte Meerrettich-Peroxidase als sekundären Antikörper binden kann, die bei Zugabe des sensitiven Chromogens „LinRed“ durch die Peroxidasereaktion zur Rotfärbung des entsprechenden Zellabschnittes führt.

3.9.2 Durchführung

Auf einer 24 Well-Platte wurden je Well 300 µl einer 200.000 Zellen / ml- Suspension ausgesät. Sie wurde für 48 h bei Standardbedingungen inkubiert. Nach Entfernung des Mediums und dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 300 µl „Formafix“ 4% (Grimm med.

Recycling GmbH) fixiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden sie mit 300 µl 0,3 % H₂O₂ für 30 min inkubiert, um die endogene Peroxidaseaktivität der Zellen zu inhibieren. Nach erneutem zweimaligem Waschen wurden die Zellen für 20 min mit vier Tropfen Horse Serum (50 µl) inkubiert, um das endogene Biotin zu blockieren. Nach Entfernung des Serums (außer bei der Negativkontrolle) wurden die Zellen mit 200 µl des Primärantikörpers über Nacht bei 8°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Antikörper entfernt und die Zellen mit PBS dreimal gewaschen. Nach Zugabe des sekundären Antikörpers (200 µl/Well) folgte die Inkubation bei Raumtemperatur für 30 min, anschließend ein dreimaliger Waschvorgang. Nach Zugabe von vier Tropfen (50 µl/Well) „LinRed“ wurden die Zellen für ca. 10 min lichtgeschützt inkubiert. Bei ausreichender Färbung der Zellen wurde die Reaktion mit Leitungswasser abgestoppt, der Rezeptorstatus wurde lichtmikroskopisch beurteilt und fotografiert (Abutayeh 2014).

3.10 Untersuchungen zur Zellproliferation und Zytotoxizität

Die Zellproliferation unter Extrakteinfluss und die Zytotoxizität wurden mit Hilfe des BrdU-Zellproliferationstests bzw. mittels LDH-Zytotoxizitätstest bestimmt.

Die Zellsuspensionen wurden zur Vorbereitung mit dem entsprechenden Medium auf eine Zellzahl von 3×10^5 Zellen/ml verdünnt, auf 96-Wellplatten (100 µl/Well) ausgesät und über Nacht im Brutschrank unter Standardbedingungen inkubiert. Es wurden 4 x 4-fach Bestimmungen durchgeführt.

3.10.1 Aufarbeitung der Extrakte und Kontrollen

Für die Untersuchungen wurden der Mikrowellen- und Luyengiextrakt in Ethanol 96 % (Stammkonzentration: 100 mg/ml) verwendet. Die Teeextrakte wurden mit Aqua dest. auf eine Stammkonzentration von 100 mg/ml eingestellt. Aus diesen Stammlösungen wurden die Ausgangskonzentrationsverdünnungen für die Tests hergestellt (vergl. Tabelle 3). Auf den Wellplatten wurden diese dann 1:100 mit dem jeweiligen Medium verdünnt. Für die Positivkontrollen wurden 17β-Estradiol und Tamoxifen in Ethanol 96 % gelöst. Die Ausgangskonzentrationen $2,7 \times 10^{-7}$ mg/ml (17β-Estradiol) und $5,63 \times 10^{-2}$ mg/ml (Tamoxifen) wurden ebenfalls 1:100 mit dem jeweiligen Medium verdünnt. Für den LDH-Zytotoxizitätstest wurde außerdem Triton X-100 als *high-control* (Endkonzentration 1 %) mitgeführt. Die Negativkontrolle 1 bestand aus Zellen und Medium, die Negativkontrolle 2 aus Zellen, Medium

und Ethanol (Endkonzentration 1 %). Auf jeder Well-Platte wurde ein Leerwert (Nährmedium) mitgeführt.

Tabelle 3: Endkonzentrationen der Extrakte und Kontrollen:

Ausgangskonzentration → Endkonzentration der Extrakte (Luyengi-, Mikrowellen-, trockener Tee-, frischer Teeextrakt)	Ausgangskonzentration → Endkonzentration der Positivkontrolle 17β- Estradiol	Ausgangskonzentration → Endkonzentration der Positivkontrolle Tamoxifen
100 mg/ml → 1000 µg/ml 75 mg/ml → 750 µg/ml 50 mg/ml → 500 µg/ml 25 mg/ml → 250 µg/ml 10 mg/ml → 100 µg/ml 1 mg/ml → 10 µg/ml	10^{-9} mol/l \triangleq $2,7 \times 10^{-7}$ mg/ml → $2,7 \times 10^{-9}$ mg/ml	10^{-4} mol/l \triangleq $5,63 \times 10^{-2}$ mg/ml → $5,63 \times 10^{-4}$ mg/ml

3.10.2 LDH – Zytotoxizität

3.10.2.1 Prinzip

Mit dem LDH-Zytotoxizitäts-Test kann die Zellyse durch Schädigung der Zellmembran quantitativ bestimmt werden. Es handelt sich um ein kolorimetrisches Testverfahren. Die Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein zytoplasmatisches Enzym, das bei Schädigung der Zellmembran rasch in das Kulturmedium austritt. Im ersten Schritt wird bei der durch LDH katalysierten Reaktion Laktat zu Pyruvat konvertiert, wobei NAD^+ zu NADH/H^+ reduziert wird. Im zweiten Schritt transferiert der zugegebene Katalysator Diaphorase H/H^+ vom NADH/H^+ auf das ebenfalls zugegebene gelbe Tetrazoliumsalz INT, das dadurch zum roten Formazansalz reagiert. Dabei wird das NADH/H^+ zu NAD^+ oxidiert. Die rote Färbung kann durch den ELISA-Reader photometrisch bei einer Wellenlänge von 490 nm quantifiziert werden. Die Anzahl der avitalen Zellen ist direkt proportional zum freigesetzten LDH und der gebildeten Menge an Formazansalz (Roche July 2005).

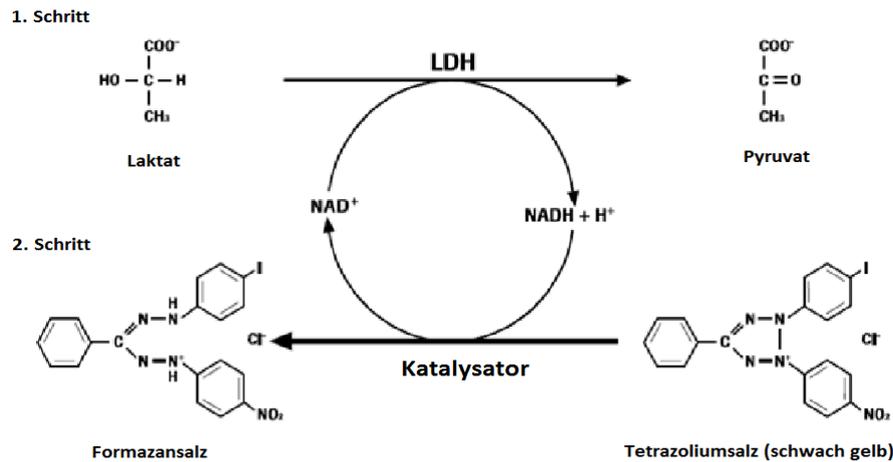


Abbildung 14: Testprinzip des LDH-Zytotoxizitäts-Testes, modifiziert nach: (Roche 2005).

3.10.2.2 Durchführung

Nach der Aussaat der Zellsuspension (100 µl/Well) wurden die Well-Platten für 24 h unter Standardbedingungen im Brutschrank inkubiert. Dann wurde das Medium mit 198 µl der jeweils hormonfreien Variante ausgewechselt, um den Einfluss der enthaltenen Wachstumshormone möglichst gering zu halten. Die Wells wurden mit 2 µl der Extraktverdünnungen bzw. den entsprechenden Zusätzen für die Positiv- und Negativkontrollen (NK) sowie der *high-control* beschickt. Nach 24 h Inkubation im Brutschrank wurde die LDH-Aktivität im Überstand bestimmt. Dafür werden 100 µl des Überstandes je Well auf eine neue Platte überführt und dann 100 µl / Well *Reaction mixture* dazugegeben. Die Platten wurden für ca. 7 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert, bis sich die *high-control* deutlich rot verfärbt hatte. Die Reaktion wurde mit 50 µl HCl / Well gestoppt. Die Ergebnisse wurden am ELISA-Reader bei Wellenlänge 490 nm und Referenzwellenlänge von 620 nm ausgelesen. Die Zytotoxizität wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Zytotoxizität \%} = \frac{\text{Extinktion}_{\text{Probe}} - \text{Extinktion}_{\text{NK 1 oder 2}}}{\text{Extinktion}_{\text{Hohe Kontrolle}} - \text{Extinktion}_{\text{NK 1 oder 2}}} \times 100$$

3.10.3 BrdU- Zellproliferationstest

3.10.3.1 Prinzip

Der BrdU-Zellproliferationstest ist ein kolorimetrisches Immunoassay zur Bestimmung der Zellproliferation. Er basiert darauf, dass nach Inkubation mit den Extrakten bzw. Kontrollen

das zugesetzte BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridin) anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut wird. Die Zellen werden anschließend fixiert und die DNA denaturiert, sodass ein BrdU-Antikörper an das eingebaute BrdU binden und mittels der verknüpften Peroxidase das Substrat TMB (Tetramethylbenzidin) umsetzen kann. Der resultierende Farbumschlag kann mittels ELISA-Reader quantifiziert werden und korreliert mit der Menge des eingebauten BrdU und damit mit der Zellproliferationsrate (Roche August 2007).

3.10.3.2 Durchführung

Nach der Aussaat von 100 µl/ Well Zellsuspension wurden die Platten bei Standardbedingungen für 24 h im Brutschrank inkubiert. Nach dem Wechsel des Mediums auf 99 µl der jeweils hormonfreien Variante und einer erneuten Inkubation über 24 h im Brutschrank wurden die Wells mit 1 µl der jeweiligen Extraktverdünnungen bzw. den Zusätzen für die Kontrollen beschickt. Neben den Positivkontrollen mit Tamoxifen und Estradiol und Negativkontrollen 1 und 2 wurde zudem ein zellfreier Blindwert mitgeführt, um das Ausmaß der Bindung von BrdU und anti-BrdU-POD an den Plattenboden der Platten zu erfassen, sowie eine Background-Kontrolle, die eine unspezifische Bindung der Anti-BrdU-POD an die Zellen bei Abwesenheit von BrdU nachweisen sollte. Die Zellen wurden für weitere 24 h im Brutschrank unter Standardbedingungen und anschließend mit 10 µl / Well BrdU für 3 h im Brutschrank inkubiert. Nach Entfernung des Mediums wurden die Zellen für 30 min mit *FixDenat* denaturiert und fixiert. Nach Entfernung des *FixDenat* wurde Anti-BrdU-POD *working solution* (100 µl /Well) hinzugefügt und die Zellen bei Raumtemperatur für 60 min inkubiert. Nach Entfernung der Anti-BrdU-POD und dreimaliger Waschung mit PBS wurden 100 µl der Substratlösung/Well hinzugefügt und die Farbreaktion lichtgeschützt bei Raumtemperatur für 10-30 min abgewartet. Die Reaktion wurde mit 25 µl / Well H₂SO₄ gestoppt und die Ergebnisse am ELISA-Reader bei 450 nm mit einer Referenz-Wellenlänge von 620 nm ausgelesen. Die Zellproliferationsraten wurden mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellproliferation \%} = \frac{\text{Extinktion}_{\text{probe}} - \text{Extinktion}_{\text{Blindwert}}}{\text{Extinktion}_{\text{Negativkontrolle 2}} - \text{Extinktion}_{\text{Blindwert}}} \times 100$$

3.11 Lichtmikroskopische Beurteilung der Zellmorphologie

Da der LDH-Test wegen der starken Eigenfärbung der Extrakte mit einhergehender Absorption anstelle von Extinktion in der photometrischen Messung nicht anwendbar war (vergl. 4.2), wurde in einer Pilotstudie die Zellmorphologie der Zelllinie MCF-7 unter Einwirkung des Luyengiextraktes lichtmikroskopisch erfasst, um Hinweise auf die Art der Wirkung zu erhalten.

3.11.1 Durchführung

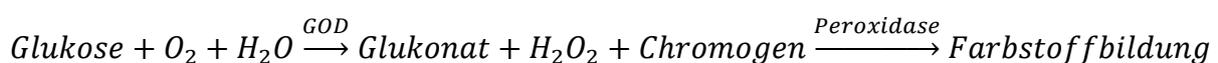
250 000 Zellen/ml MCF-7 wurden mit 300 µl/ Well Medium in eine 24-Wellplatte ausgesät und im Brutschrank für 24 h bei Standardbedingungen inkubiert. Nach dem Wechsel auf das hormonfreie Medium DMEM 10 % FKS hormonfrei und weiteren 24 h Inkubation wurden 3 µl des Luyengiextraktes bzw. die Kontrolllösungen zugegeben. Nach weiteren 24 h wurde der Zellüberstand mit PBS vorsichtig mehrfach ausgewaschen. Die Zellmorphologie wurde lichtmikroskopisch beurteilt, die Ergebnisse wurden fotografisch dokumentiert. Die Beurteilung der Zellen wurde nach folgenden Kriterien vorgenommen: Zellgröße und -form, Zellkernform, Verhältnis Zellkern zu Zellplasma, Zytogranula.

3.12 Untersuchungen zum Metabolismus der Zellen

3.12.1 Quantitative Glukosebestimmung

3.12.1.1 Prinzip

Der Glukosegehalt des Inkubationsmediums ist ein Maß für die Intensität des Zellstoffwechsels, da eine Reduktion der Zellvitalität, die zur Abnahme des Glukosetransportes und der Glykolyse führt, in einem verminderten Abfall der extrazellulären Glukosekonzentration resultiert. Die Glukoseaufnahme in die Zellen kann quantifiziert werden, das Testprinzip beruht auf dem enzymatischen Umsatz von Glukose zu Glukonat und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) durch die Glukoseoxidase (Richter 2016). Bei Anwesenheit eines Chromogen und einer Peroxidase kann ein Farbumschlag gesehen und mittels *BIOSEN 4140* (Fa. Biosen) quantifiziert werden.



3.12.1.2 Durchführung

3 x 10⁵ Zellen /ml Zellsuspension (100 µl/ Well) wurden auf eine 96-er Well-Platte ausgesät und für 24 h unter Standardbedingungen im Brutschrank inkubiert. Nach dem Wechsel des Mediums auf 99 µl des jeweils hormonfreien Mediums und erneuter Inkubation für 24 h im Brutschrank, wurden die jeweiligen Extraktverdünnungen und Kontrollsubstanzen zugegeben. Nach weiteren 24 Inkubation unter Standardbedingungen wurden aus jedem Well 20 µl Überstand abpipettiert und in ein Glucose-Teströhrchen überführt. Die Glukoseaufnahme wurde mit den folgenden Formeln berechnet:

$$\begin{aligned} \text{Glukoseaufnahme } \left[\frac{\text{mmol}}{\text{l}} \right] &= \text{Glukosegehalt } \left[\frac{\text{mmol}}{\text{l}} \right]_{\text{Medium}} - \text{Glukosegehalt } \left[\frac{\text{mmol}}{\text{l}} \right]_{\text{Probe}} \\ \text{Glukoseaufnahme } \% &= \frac{\text{Glukoseaufnahme } \left[\frac{\text{mmol}}{\text{l}} \right]_{\text{Probe}}}{\text{Glukoseaufnahme } \left[\frac{\text{mmol}}{\text{l}} \right]_{\text{Negativkontrolle}}} \times 100 \end{aligned}$$

3.12.2 Bestimmung des oxidativen Stresses mittels Hydrogen Peroxide Assay Kit (BioVision)

3.12.2.1 Prinzip

Das *Hydrogen Peroxide Assay Kit* von *BioVision* ist eine hochempfindliche, einfache, direkte kolorimetrische Methode, um die H₂O₂ -Konzentration in biologischen Proben zu messen. Hierfür wird die Meerrettich-Peroxidase genutzt, die bei der Reaktion vom zugegebenen *OxiRed* mit H₂O₂ einen Farbumschlag auslöst, der bei einer maximalen Wellenlänge von 570 nm gemessen werden kann. Der Normbereich reicht bis 40 nmol/Well (BioVision 2014).

3.12.2.2 Durchführung

3 x 10⁵ Zellen /ml Zellsuspension (100 µl/Well) wurden auf eine 96-er Well-Platte ausgesät. Die Zellkulturen wurden wie unter 3.12.1.2 beschrieben vorbehandelt. Nach Zugabe der Extraktverdünnungen bzw. Kontrollsubstanzen wurden sie 24 h unter Standardbedingungen im Brutschrank inkubiert. Aus jedem Well wurden jeweils 100 µl Überstand in ein Eppendorfröhrchen überführt. Nach der Zentrifugation (15 min, 1000 x G) wurden 50 µl des Überstandes in ein neues Eppendorfgemäß überführt. Zu jeder Probe und jedem H₂O₂ -

Standard wurden 50 μl *Reaction-Mix* gegeben und die Proben für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die photometrische Messung am ELISA-Reader bei 570 nm durchgeführt. Anhand der H_2O_2 -Standards wurde eine Standardkurve erstellt, mit der die H_2O_2 -Konzentrationen der Proben in nmol/Well berechnet wurden (Abbildung 15).

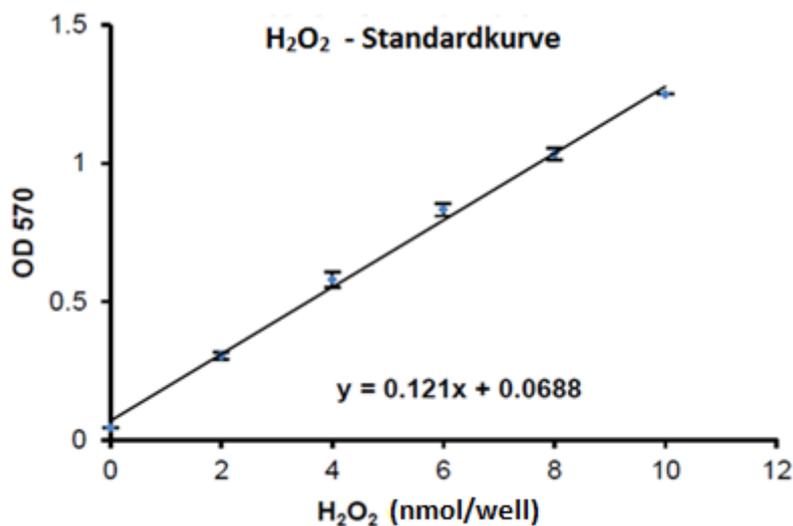


Abbildung 15: Beispiel einer Standardkurve, modifiziert nach (BioVision 2014).

3.12.3 pH-Messungen

3.12.3.1 Prinzip

Mit dem pH-Meter (*Orion star® and star plus meter®*) wird der pH-Wert elektrochemisch bestimmt.

3.12.3.2 Durchführung

3×10^5 Zellen /ml Zellsuspension (100 μl /Well) wurden auf eine 96-er Well-Platte ausgesät. Die Zellen wurden wie in 3.12.1.2 beschrieben behandelt, nach dem Aussäen und dem Mediumwechsel auf hormonfreies Medium jeweils 24 h im Brutschrank inkubiert und dann mit Extrakten und Kontrollsubstanzen beschickt. Nach weiteren 24 h bei Standardbedingungen wurde der Überstand abpipettiert und in einem Eppendorftube bei $1000 \times G$ zentrifugiert. Die pH-Messungen wurden mit dem pH-Meter im Überstand vorgenommen. Hierfür musste zuerst das pH-Meter mit Hilfe von Kalibrierlösungen mit unterschiedlichen Standard-pH-Werten justiert werden. Die Messelektrode wurde dann in die einzelnen Überstände getaucht, nach Einstellung des pH-Wertes wurde dieser protokolliert.

3.13 Auswertung

Die Untersuchungen zur Zellproliferation mittels BrdU-Tests wurden für jede Zelllinie viermal wiederholt. Für die jeweiligen Extraktkonzentrationen und Kontrollen wurden je Durchgang Vierfach-Bestimmungen durchgeführt, sodass sich die Ergebnisse aus mindestens 16 Einzelwerten zusammensetzen. Zur Auswertung der Ergebnisse wurde von den vier Einzelbestimmungen der Mittelwert gebildet und von diesem jeweils der Blindwert (reines Medium) abgezogen. Die Negativkontrolle 2 (Ethanolkontrolle für Luyengiextrakt und Mikrowellenextrakt) bzw. Negativkontrolle 1 (Mediumkontrolle für die beiden Teeextrakte) wurde jeweils als 100 % gesetzt und dazu entsprechend die Extinktion der Proben ins Verhältnis gesetzt.

Für die statistische Auswertung wurde das Programm *SPSS* (IBM SPSS Statistics 24) verwendet. Mittels ungepaartem T-Test wurde die Signifikanz der Werte, bezogen auf die Negativkontrolle 1 oder 2, ermittelt. Alle Werte mit $P < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant und sind mit einem Sternchen (*) in den Diagrammen gekennzeichnet.

Die Untersuchungen zur metabolischen Analyse (Glukosetest, Bestimmung des oxidativen Stresses, pH-Messung) wurden jeweils einmal durchgeführt. Es handelt sich also bei den Ergebnissen zu den Extrakten um Einfachbestimmungen. Für die Kontrollen mit Tamoxifen und Estradiol wurden jeweils vier Werte verwendet.

Die Diagrammdarstellung erfolgte mit Hilfe des Programms *Microsoft Excel 2010*.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Immunhistochemie

Die Zelllinien MCF-7, BT-20, T-47D, MCF-12A, MCF-10A und HMEPC wurden hinsichtlich des α -ER-, β -ER- und Progesteronrezeptorstatus untersucht. Eine Rotfärbung der Zellen spricht für das Vorhandensein des jeweiligen Rezeptors. Es wurde immer eine Negativkontrolle ohne Primärantikörperzugabe zum Ausschluss unspezifische Bindungen mitgeführt. Hierbei sind die Zellen farblos. In den untenstehenden Abbildungen (Abbildung 16-Abbildung 21) sind die immunhistochemischen Untersuchungen der getesteten Zelllinien dargestellt.

Bei den Zelllinien MCF-7, T-47D, MCF-12A und der Mammanormalzelllinie HMEPC findet sich eine deutliche Rotfärbung und somit ein positiver Rezeptorstatus für sowohl den α -ER und β -ER als auch den Progesteronrezeptor. Die Negativkontrollen sind farblos.

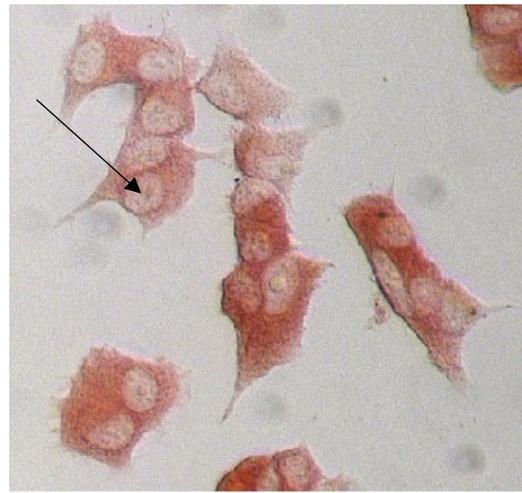
Für die Zelllinien BT-20 und MCF-10A zeigte sich keine bzw. eine nur sehr schwache Rotfärbung als Beleg für einen negativen α -ER-, β -ER- und Progesteronrezeptorstatus.

Ergebnisse

4.1.1 MCF-7



MCF-7, 21. Passage (21. PS), 10-fache Vergrößerung, Negativkontrolle, keine LinRed-Färbung



MCF-7, 21. PS, 20-fache Vergrößerung, α -Estrogenrezeptor, LinRed-Färbung



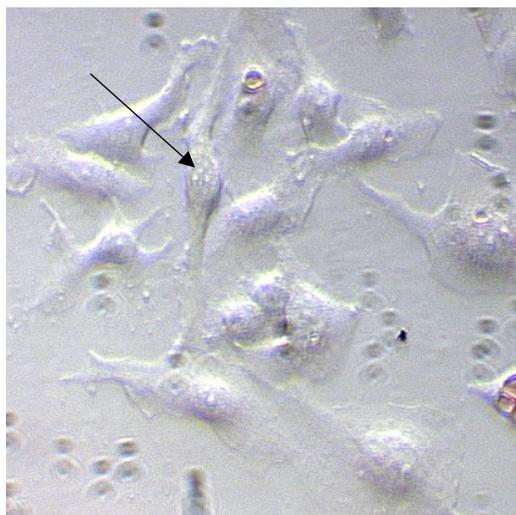
MCF-7, 21. PS, 10-fache Vergrößerung, β -Estrogenrezeptor, LinRed-Färbung



MCF-7, 21. PS, 20-fache Vergrößerung, Progesteronrezeptor, LinRed-Färbung

Abbildung 16: Immunhistochemie bei MCF-7-Zellen, Anfärbung der Hormonrezeptoren, Pfeile markieren eine Zelle (Fotos: A.-M. Kunert).

4.1.2 BT-20



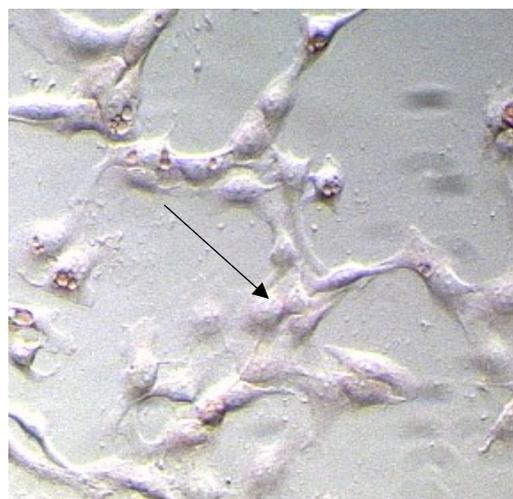
BT-20, 13. PS, 20-fache Vergrößerung,
Negativkontrolle, keine LinRed-Färbung



BT-20, 13. PS, 10-fache Vergrößerung,
 α -ER, schwache LinRed-Färbung



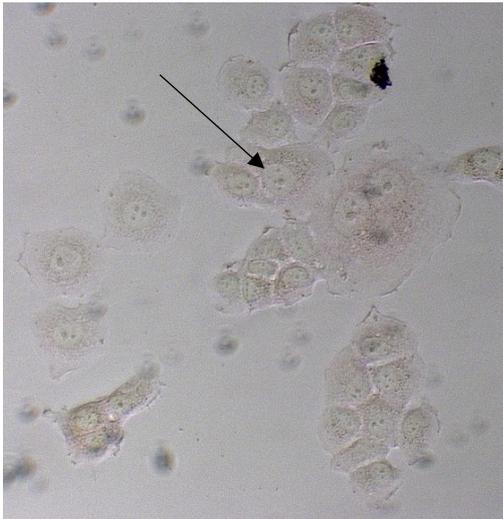
BT-20, 13. PS, 10-fache Vergrößerung,
 β -Estrogenrezeptor, schwache LinRed-Färbung



BT-20, 13. PS, 10-fache Vergrößerung,
Progesteronrezeptor, keine LinRed-Färbung

Abbildung 17: Immunhistochemie bei BT-20-Zellen, Anfärbung der Hormonrezeptoren, Pfeile markieren eine Zelle (Fotos: A.-M. Kunert).

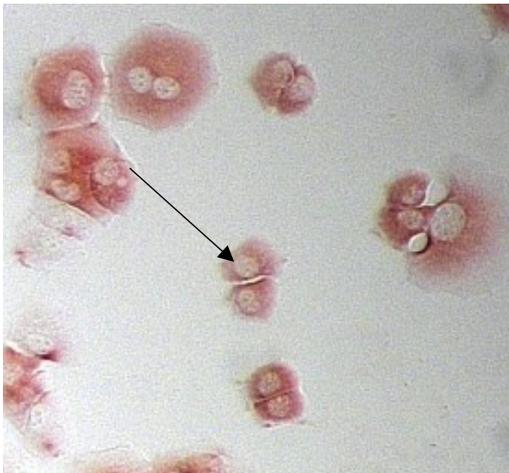
4.1.3 T-47D



T-47D, 13. PS, 20-fache Vergrößerung,
Negativkontrolle, keine LinRed-Färbung



T-47D, 13. PS, 20-fache Vergrößerung,
 α -Estrogenrezeptor, LinRed-Färbung



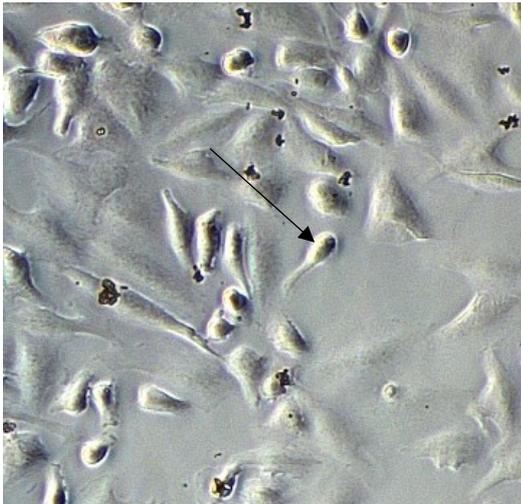
T-47D, 13. PS, 10-fache Vergrößerung,
 β -Estrogenrezeptor, LinRed-Färbung



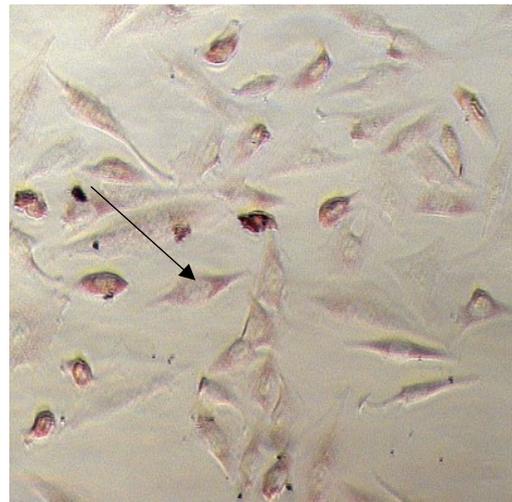
T-47D, 13. PS, 20-fache Vergrößerung,
Progesteronrezeptor, LinRed-Rotfärbung

Abbildung 18: Immunhistochemie bei T-47D-Zellen, Anfärbung der Hormonrezeptoren, Pfeile markieren eine Zelle (Fotos: A.-M. Kunert).

4.1.4 MCF-12A



MCF-12A, 26. PS, 10-fache Vergrößerung,
Negativkontrolle, keine LinRed-Färbung



MCF-12A, 26. PS, 20-fache Vergrößerung,
 α -Estrogenrezeptor, LinRed-Färbung



MCF-12A, 26. PS, 20-fache Vergrößerung,
 β -Estrogenrezeptor, LinRed-Färbung

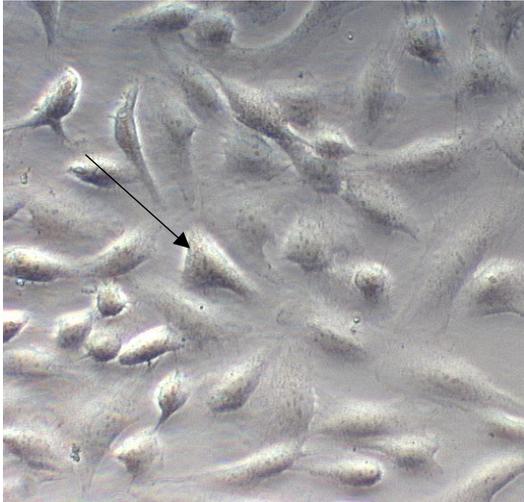


MCF-12A, 26. PS, 10-fache Vergrößerung,
Progesteronrezeptor, schwache LinRed-
Färbung

Abbildung 19: Immunhistochemie bei MCF-12A-Zellen, Anfärbung der Hormonrezeptoren, Pfeile markieren eine Zelle (Fotos: A.-M. Kunert).

Ergebnisse

4.1.5 MCF-10A



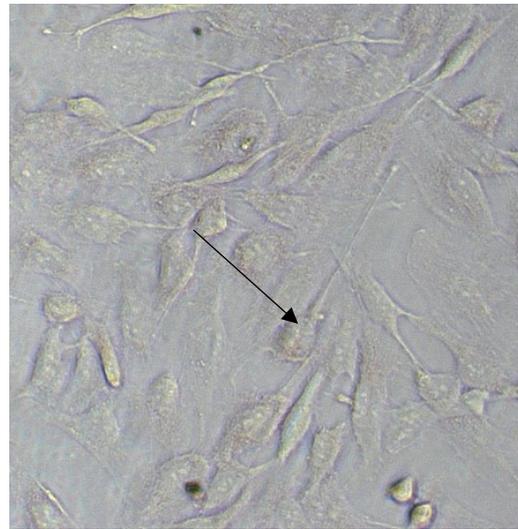
MCF-10A, 11. PS, 20-fache Vergrößerung,
Negativkontrolle, keine LinRed-Färbung



MCF-10A, 11. PS, 20-fache Vergrößerung,
 α -Estrogenrezeptor, keine LinRed-Färbung



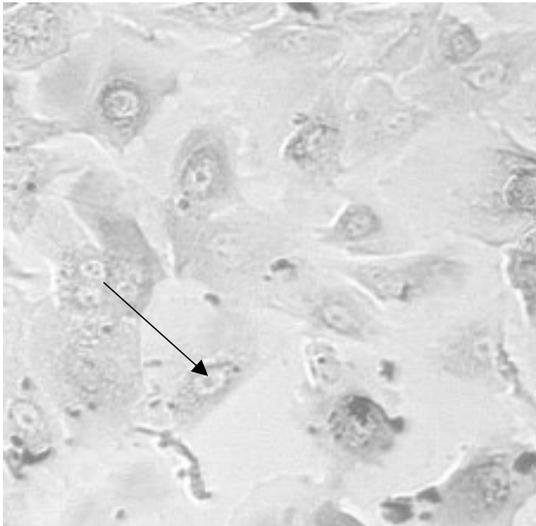
MCF-10A, 11. PS, 20-fache Vergrößerung
 β -Estrogenrezeptor, keine LinRed-Färbung



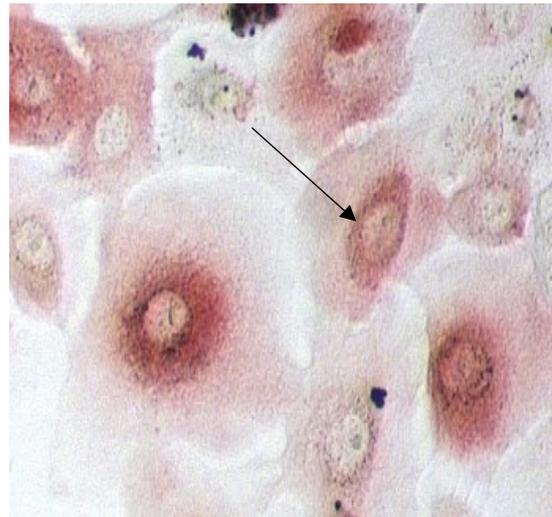
MCF-10A, 11. PS, 20-fache Vergrößerung,
Progesteronrezeptor, keine LinRed-Färbung

Abbildung 20: Immunhistochemie bei MCF-10A-Zellen, Anfärbung der Hormonrezeptoren, Pfeile markieren eine Zelle (Fotos: A.-M. Kunert).

4.1.6 HMEPC



HMEPC, 6. PS, 10-fache Vergrößerung,
Negativkontrolle, keine LinRed-Färbung



HMEPC, 6. PS, 20-fache Vergrößerung,
 α -Estrogenrezeptor, LinRed-Färbung



HMEPC, 6. PS, 20-fache Vergrößerung,
 β -Estrogenrezeptor, LinRed-Färbung



HMEPC, 6. PS, 20-fache Vergrößerung,
Progesteronrezeptor, LinRed-Färbung

Abbildung 21: Immunhistochemie bei HMEPC-Zellen, Anfärbung der Hormonrezeptoren, Pfeile markieren eine Zelle (Fotos: A.-M. Kunert).

4.2 Ergebnisse der Zytotoxizitätsuntersuchung (LDH-Test)

4.2.1 Wirkung der Extrakte auf die Mammazellen

Durch den LDH-Test lassen sich Aussagen zur Aktivität der LDH im Überstand infolge lysierter Zellen treffen. Als Bezugswert wurde eine *high-control* mit 1 % Triton X-100 bei den Untersuchungen mitgeführt, das stark zytotoxisch ist. Der Messwert dieser Probe wurde bei der Berechnung als 100 % Wert angesetzt. Als 0 % galten die Negativkontrolle 1 bei trockenem

Ergebnisse

und frischem Teeextrakt bzw. die Negativkontrolle 2 bei Mikrowellen- und Luyengiextrakt. Die Ergebnisse der Untersuchungen mit den Extrakten wurden entsprechend prozentual eingeordnet.

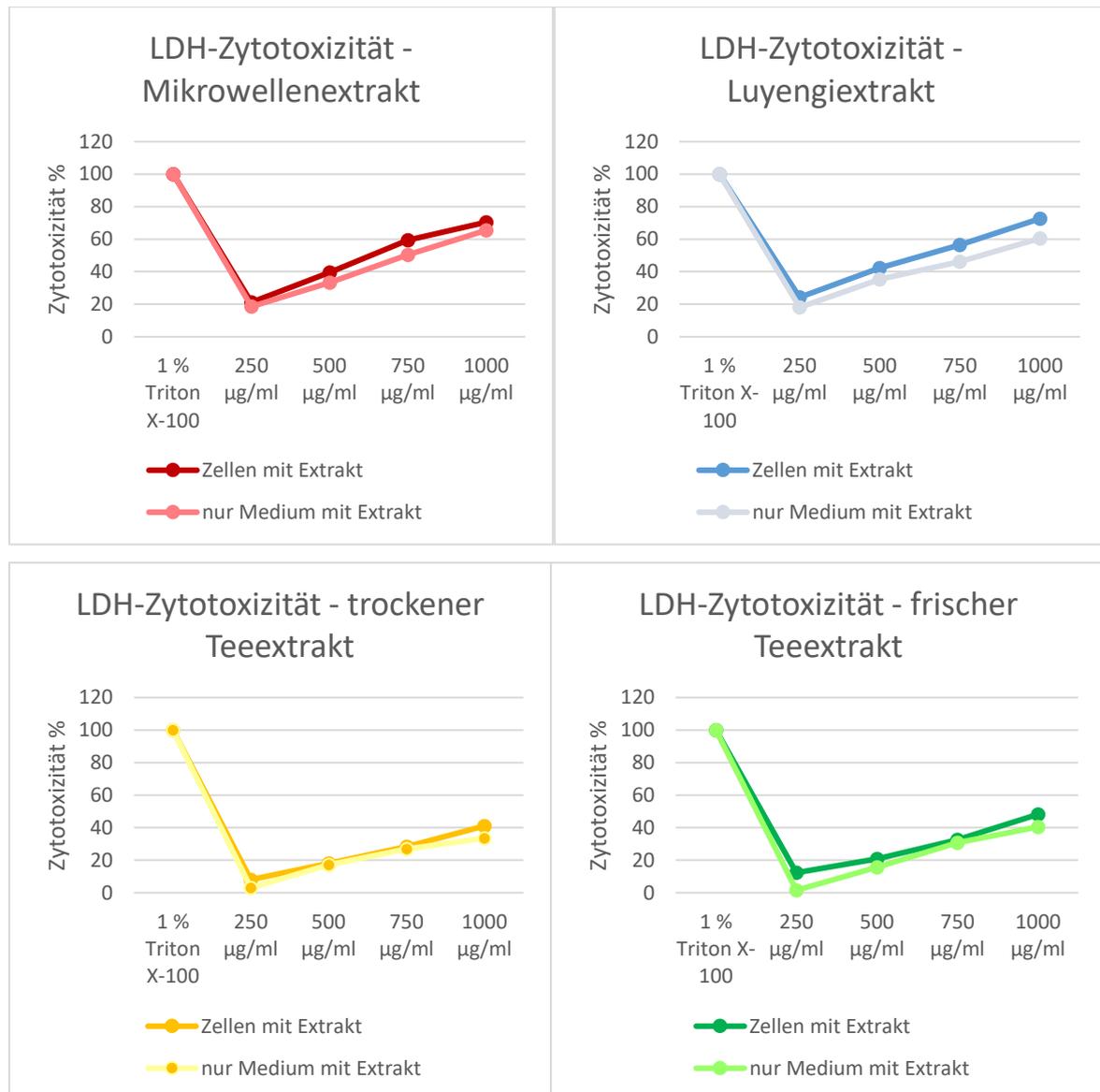


Abbildung 22: MCF-12A: LDH-Test; Einfluss von Mikrowellen- und Luyengiextrakt, trockenem – und frischem Teeextrakt aus Sanddornblättern in verschiedenen Konzentrationen auf die Mammazelllinie MCF-12A, Vergleich mit zellfreiem Medium, 1% Triton X-100 = 100 %, Negativkontrolle 1 oder 2 = 0 %, n (Anzahl der Versuche) =4.

Bei dieser Untersuchung wird der Zellüberstand nicht getrennt vom Bodensatz in den Wells getestet (siehe 3.10.2). Die Versuche (Abbildung 22) ergeben eine scheinbar konzentrationsabhängige Zytotoxizität der Extrakte bei der Mammazelllinie MCF-12A. Diese

ist in Wirklichkeit ein Artefakt, das durch die starke Eigenfärbung der Extrakte entsteht. Belegt wird dies durch die weitgehende Deckungsgleichheit der zellhaltigen mit den zellfreien Ansätzen bei allen vier Extrakten. Die Untersuchungen zur Zytotoxizität wurden deshalb nach einigen nicht zielführenden Pilotversuchen mit der Zelllinie MCF-12A nicht weiter fortgeführt.

4.2.2 Wirkung der Positivkontrollen auf die Mammazellen

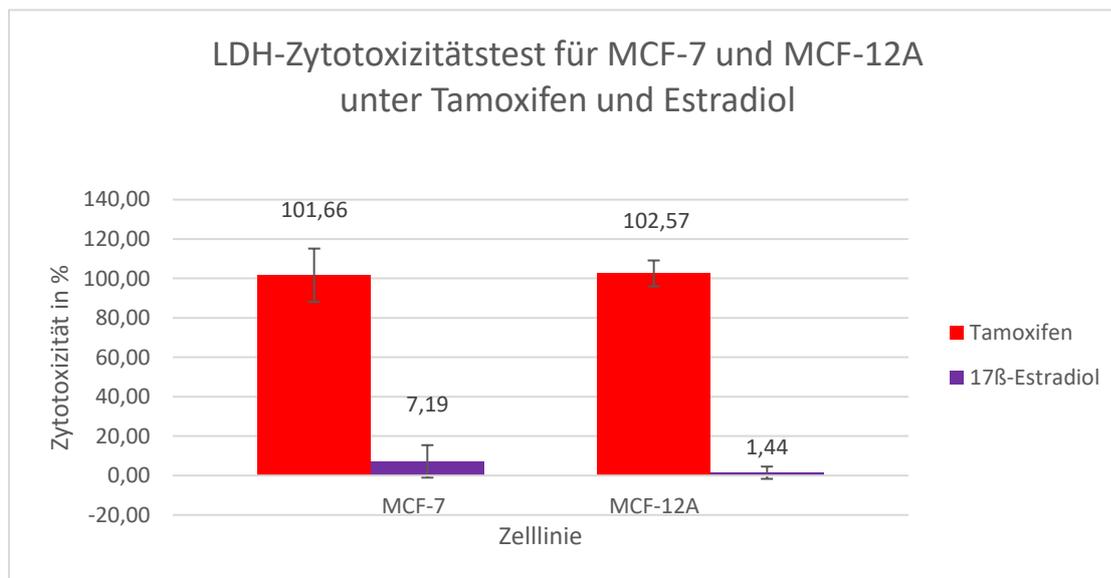


Abbildung 23: MCF-7 und MCF-12A: LDH-Test, Einfluss von 1 % Tamoxifen ($5,63 \times 10^{-2}$ mg/ml) und 1 % Estradiol ($2,7 \times 10^{-7}$ mg/ml) auf die Mammazelllinien MCF-7 und MCF-12A unter Angabe der Standardabweichung, 1 % Triton X-100 = 100 %, Negativkontrolle 1 oder 2 = 0 %, Anzahl der Versuche: $n = 16$.

Abbildung 23 zeigt die Ergebnisse der Positivkontrollen bei den Zelllinien MCF-7 und MCF-12A. Tamoxifen ist ähnlich stark zytotoxisch wie Triton X-100 mit 101,66 % bzw. 102,57 %, die Zytotoxizität von Estradiol mit 7,19 % bzw. 1,44 % zu vernachlässigen.

4.3 Ergebnisse der Zellproliferationsuntersuchung durch BrdU-Test

4.3.1 Wirkung der Extrakte auf die Mammazellen

Durch den BrdU-Test lassen sich Aussagen hinsichtlich des Proliferationsverhaltens der Zellen bei Extrakteinwirkung treffen. Als Bezugswert wurde bei den Untersuchungen mit trockenem bzw. frischem Teeextrakt die Negativkontrolle 1 (Zellen mit Medium), bzw. bei Mikrowellen- und Luyengiextrakt die Negativkontrolle 2 (Zellen, Medium, 1 % Ethanol absolut) auf 100 % gesetzt und die Messwerte der Untersuchungen mit Extraktzugabe entsprechend prozentual angegeben.

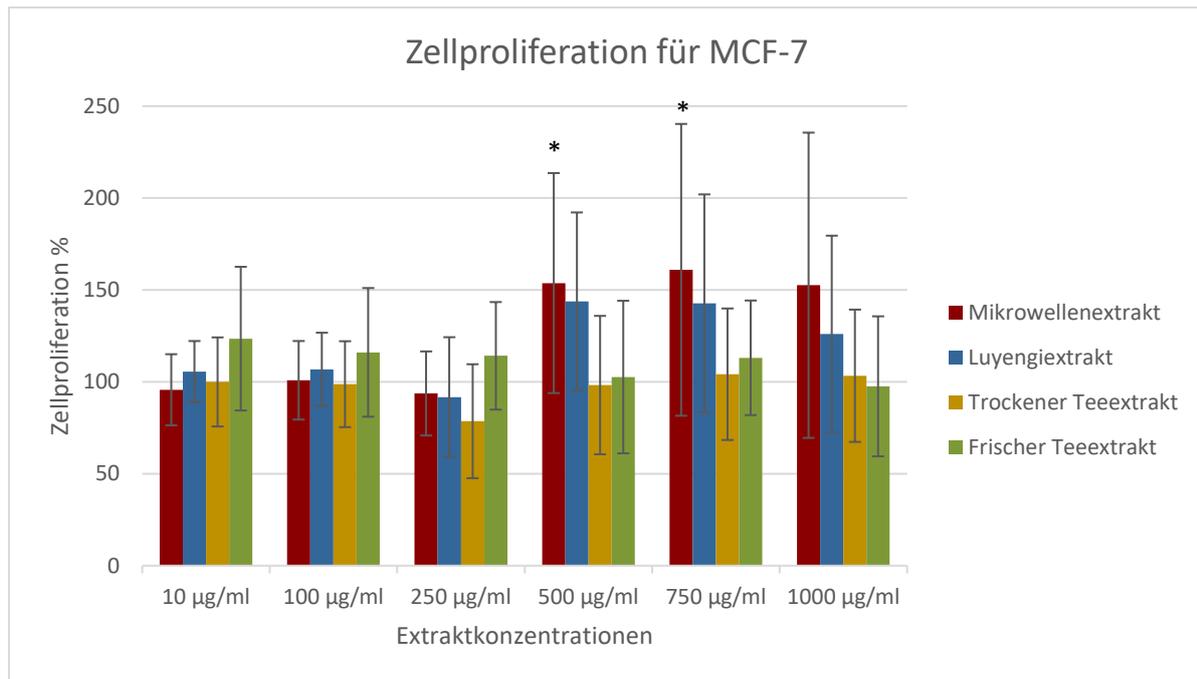


Abbildung 24: MCF-7: BrdU-Test; Einfluss von Mikrowellen- und Luyengiextrakt, trockenem – und frischem Teeextrakt der Sanddornblätter in verschiedenen Konzentrationen auf die entsprechende Mammazelllinie, dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung, * = signifikante Wirkung bezogen auf Negativkontrolle 1 und 2 (=100 %), Anzahl der Versuche: n = 28.

Alle Extrakte haben im niedrigeren Konzentrationsbereich (10 µg/ml – 250 µg/ml) keine signifikante Wirkung auf das Wachstum der MCF-7-Mammakarzinomzellen (Abbildung 24). Die Teeextrakte zeigten auch bei 500 µg/ml bis 1000 µg/ml keinen Effekt. Bei Mikrowellen- und Luyengiextrakt steigern diese Konzentrationen die Proliferation um 30-50 %. Statistisch signifikant ist dies allerdings nur beim Mikrowellenextrakt (500 µg/ml und 750 µg/ml).

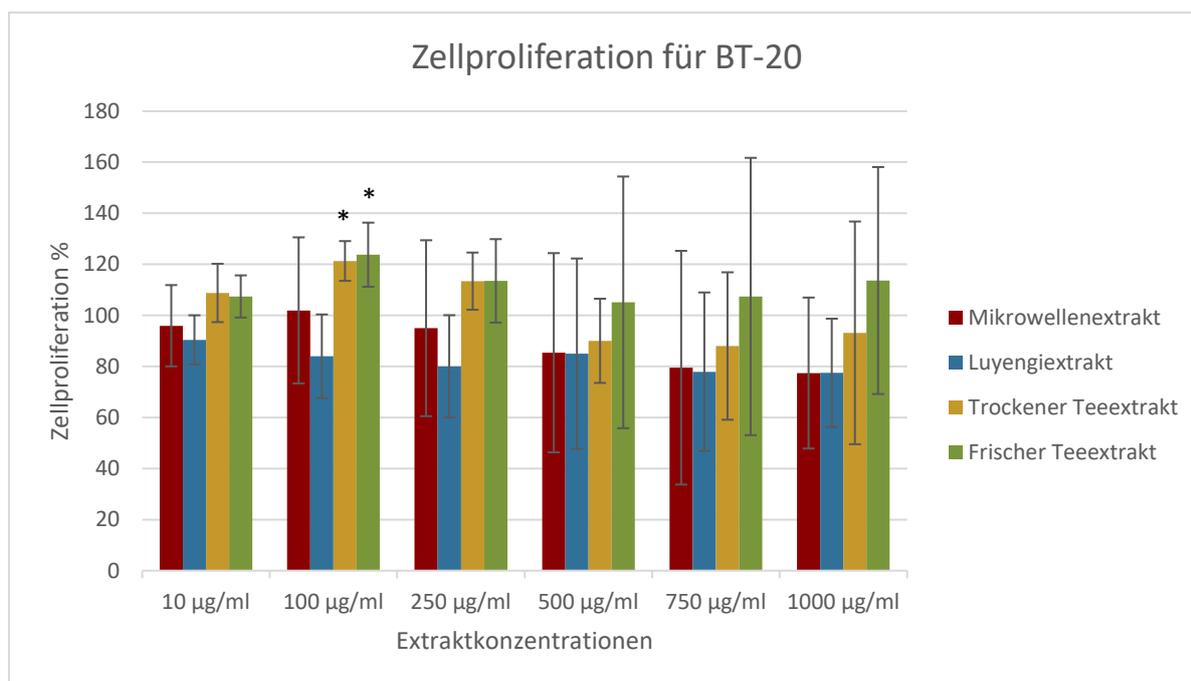


Abbildung 25: BT-20: BrdU-Test; Einfluss von Mikrowellen- und Luyengiextrakt, trockenem – und frischem Teeextrakt von Sanddornblättern in verschiedenen Konzentrationen auf BT-20 Zellen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung, * = signifikante Wirkung ($p < 0,05$) bezogen auf Negativkontrolle 1 und 2 (=100 %), Anzahl der Versuche: $n = 16$.

Die Zellproliferation der BT-20-Zellen unterscheidet sich bei Einwirkung des Mikrowellen- bzw. des Luyengiextraktes im niedrigen Konzentrationsbereich (10 µg/ml bis 250 µg/ml) nicht von der Negativkontrolle (Abbildung 25). Ab 500 µg/ml tendiert die Proliferation zur Abnahme. Die beiden Teeextrakte wirken nicht proliferationshemmend. Bei 100 µg/ml zeigte sich dagegen eine signifikante Proliferationssteigerung (um 21% und 23 %).

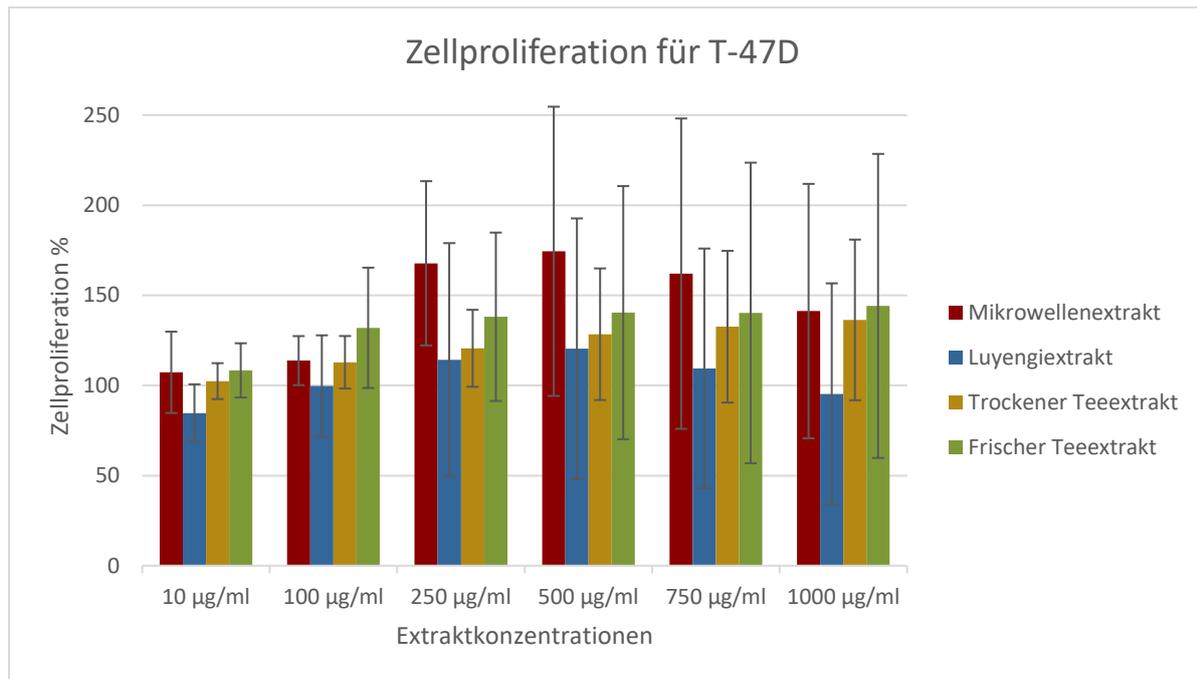


Abbildung 26: T-47D: BrdU-Test; Einfluss von Mikrowellen- und Luyengiextrakt, trockenem – und frischem Teeextrakt aus Sanddornblättern in verschiedenen Konzentrationen auf die T-47D Mammazelllinie. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung, * = signifikante Wirkung ($p < 0,05$) bezogen auf Negativkontrolle 1 und 2 (=100 %), Anzahl der Versuche: $n = 16$.

Der Mikrowellenextrakt beeinflusst bei der Zelllinie T-47D in niedrigen Konzentrationen (10 µg/ml und 100 µg/ml) die Zellproliferation nicht (Abbildung 26). Höhere Extraktkonzentrationen ab 500 µg/ml scheinen die Proliferation tendenziell zu steigern. Der Luyengiextrakt hat bei den Konzentrationen 10 µg/ml, 100 µg/ml und 1000 µg/ml keinen Effekt, bei den anderen Konzentrationen ergeben sich tendenzielle Proliferationsanstiege auf maximal 120 %. Der trockene Teeextrakt führt ab einer Konzentration von 100 µg/ml zu einer tendenziellen Zunahme der Proliferationsrate der T-47D-Zellen auf maximal 136 % (1000 µg/ml). Beim frischen Teeextrakt zeigt sich ein ähnlicher Effekt, bei 1000 µg/ml steigt die Proliferationsrate auf 144 % an.

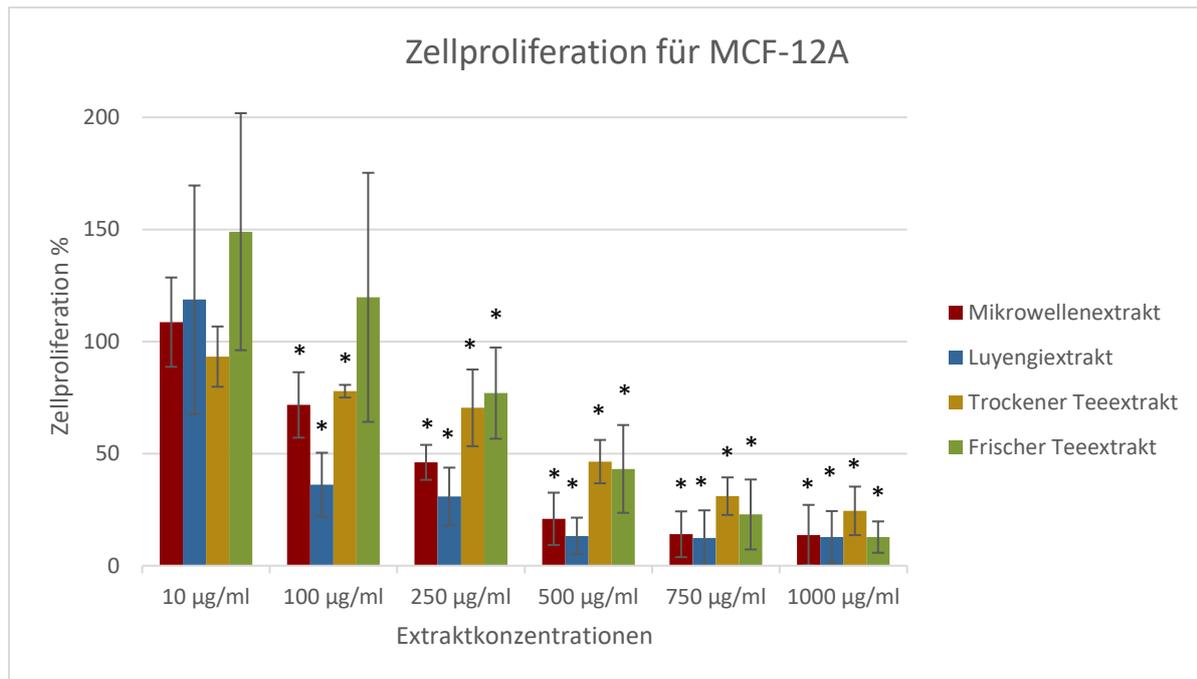


Abbildung 27: MCF-12A: BrdU-Test; Einfluss von Mikrowellen- und Luyengiextrakt, trockenem – und frischem Teeextrakt aus Sanddornblättern in verschiedenen Konzentrationen auf die MCF-12A Mammazelllinie. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung, * = signifikante Wirkung ($p < 0,05$) bezogen auf Negativkontrolle 1 und 2 (=100 %), Anzahl der Versuche: $n = 24$.

Bei den Mammazellen MCF-12A nimmt die Zellproliferation indirekt proportional zur zunehmenden Extraktkonzentration bei allen Extrakten signifikant ab, wobei Mikrowellen- und Luyengiextrakt wirksamer sind.

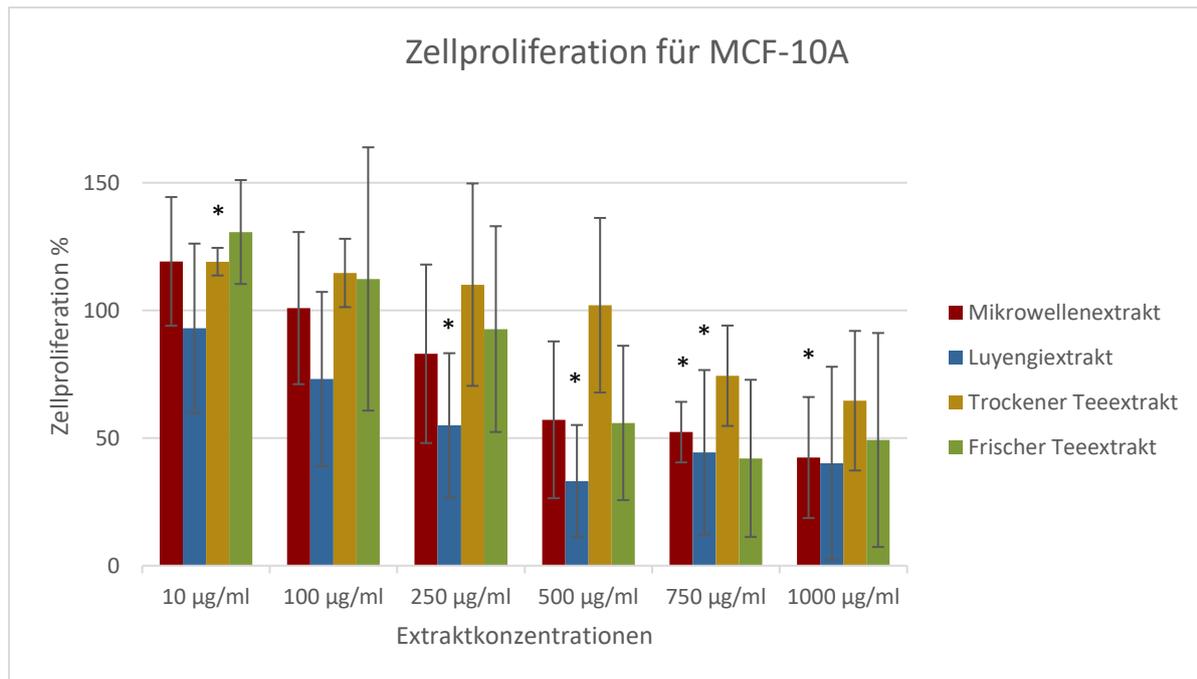


Abbildung 28: MCF-10A: BrdU-Test; Einfluss von Mikrowellen- und Luyengiextrakt, trockenem – und frischem Teeextrakt der Sanddornblätter in verschiedenen Konzentrationen auf die Mammazelllinie MCF-10A. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung, * = signifikante Wirkung ($p < 0,05$) bezogen auf Negativkontrolle 1 und 2 (=100 %), Anzahl der Versuche: $n = 16$.

Bei der Zelllinie MCF-10A wirken der Mikrowellenextrakt ab einer Konzentration von 250 µg/ml und der Luyengiextrakt (teils statistisch signifikant) ab 100 µg/ml hemmend auf das Zellwachstum (Abbildung 28). Dieser Effekt ist konzentrationsabhängig. Für den Mikrowellenextrakt wird bei 1000 µg/ml eine Hemmung um 60 % erreicht. Für den Luyengiextrakt ergaben sich Hemmungen ab 500 µg/ml bis 1000 µg/ml um 60-67 %. Der trockene Teeextrakt wirkt bei 10 µg/ml bis 250 µg/ml tendenziell leicht proliferativ und ab 750 µg/ml und 1000 µg/ml tendenziell antiproliferativ (maximale Hemmung um 25 % bei 1000 µg/ml). Der frische Teeextrakt wirkt ab 250 µg/ml konzentrationsabhängig tendenziell wachstumshemmend.

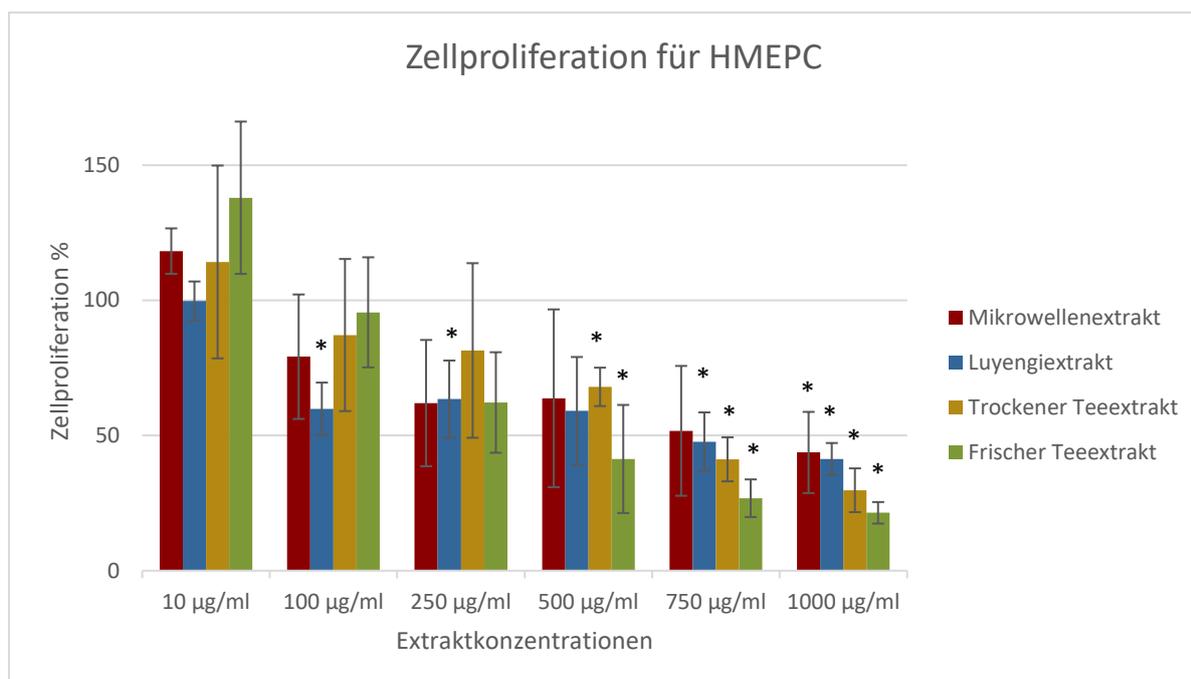


Abbildung 29: HMEPC: BrdU-Test; Einfluss von Mikrowellen- und Luyengiextrakt, trockenem – und frischem Teeextrakt aus Sanddornblättern in verschiedenen Konzentrationen auf die Mammazelllinie HMEPC. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung, * = signifikante Wirkung ($p < 0,05$) bezogen auf Negativkontrolle 1 und 2 (=100 %), Anzahl der Versuche: $n = 12$.

Alle Sanddornblätterextrakte wirken auf die Normalzelllinie HMEPC antiproliferativ (Abbildung 29). Dieser Effekt wird ab einer Konzentration von 100 µg/ml sichtbar und ist mit zunehmenden Konzentrationen signifikant. Ein Maximum wird bei allen Extrakten bei 1000 µg/ml erreicht: Für den Mikrowellenextrakt ergibt sich eine Hemmung um 57 %, für den Luyengiextrakt um 59%, für den trockenen Teeextrakt um 70 % und für den frischen Teeextrakt um 79 %.

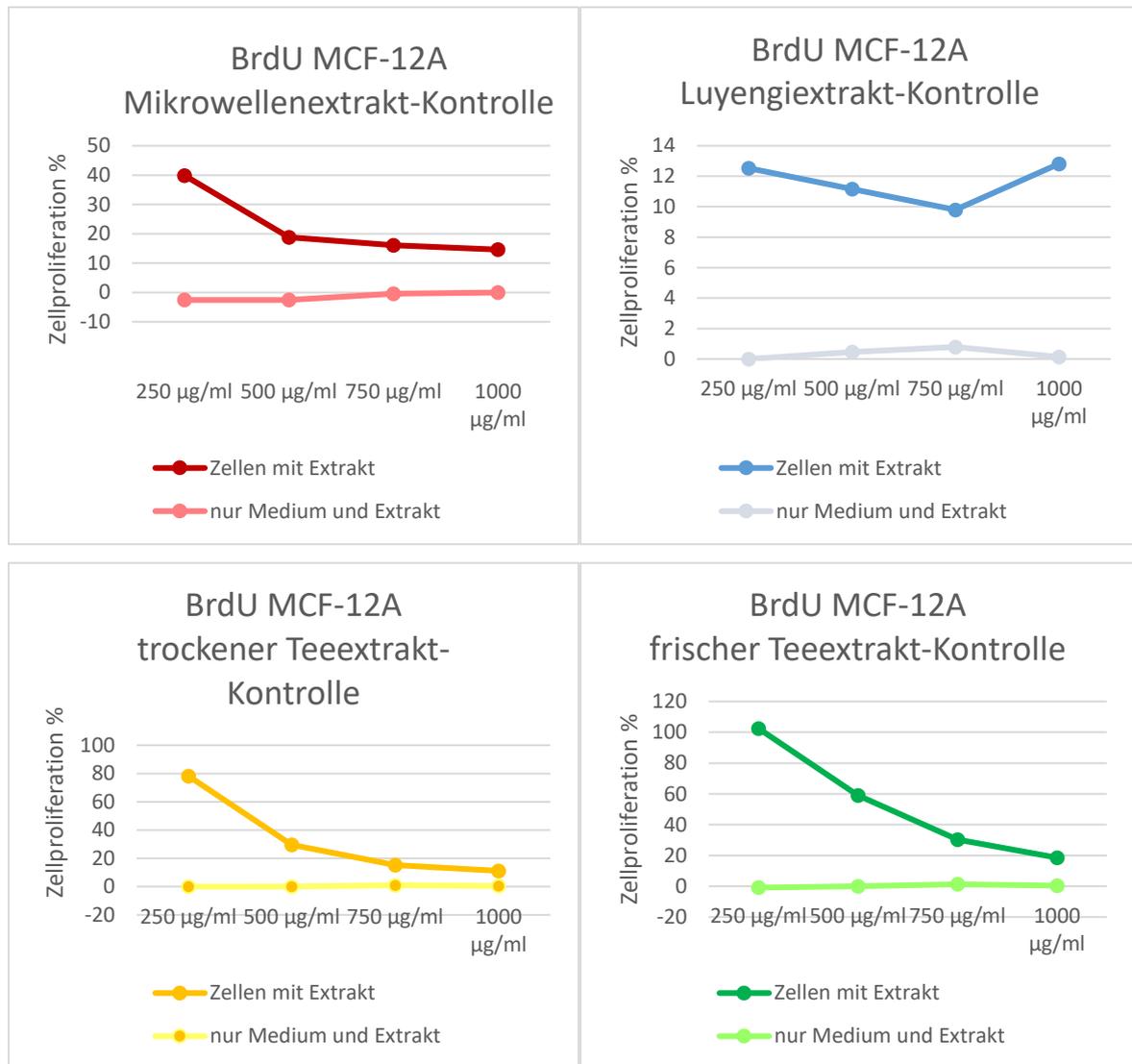


Abbildung 30: Proliferationsergebnisse: MCF-12A: BrdU-Test; Einfluss von Mikrowellen- und Luyengiextrakt, trockenem – und frischem Teeextrakt aus Sanddornblättern in verschiedenen Konzentrationen auf MCF-12A, verglichen mit der zellfreien Extraktkontrolle, Anzahl der Versuche: $n = 4$.

In der Abbildung 30 ist der Vergleich der Proliferation der Zelllinie MCF-12A unter Einwirkung der Extrakte mit einer zellfreien Extraktkontrolle dargestellt. Die Werte für die Extraktkontrollen liegen konzentrationsunabhängig um 0 %, d.h. sie beeinflussen die Messungen nicht.

4.3.2 Wirkung der Positivkontrollen auf die Mammazellen

In Abbildung 31 sind die Wirkungen von 17β -Estradiol und Tamoxifen auf die Zelllinien MCF-7, BT-20, T-47D, MCF-12A, MCF-10A und HMEPC dargestellt.

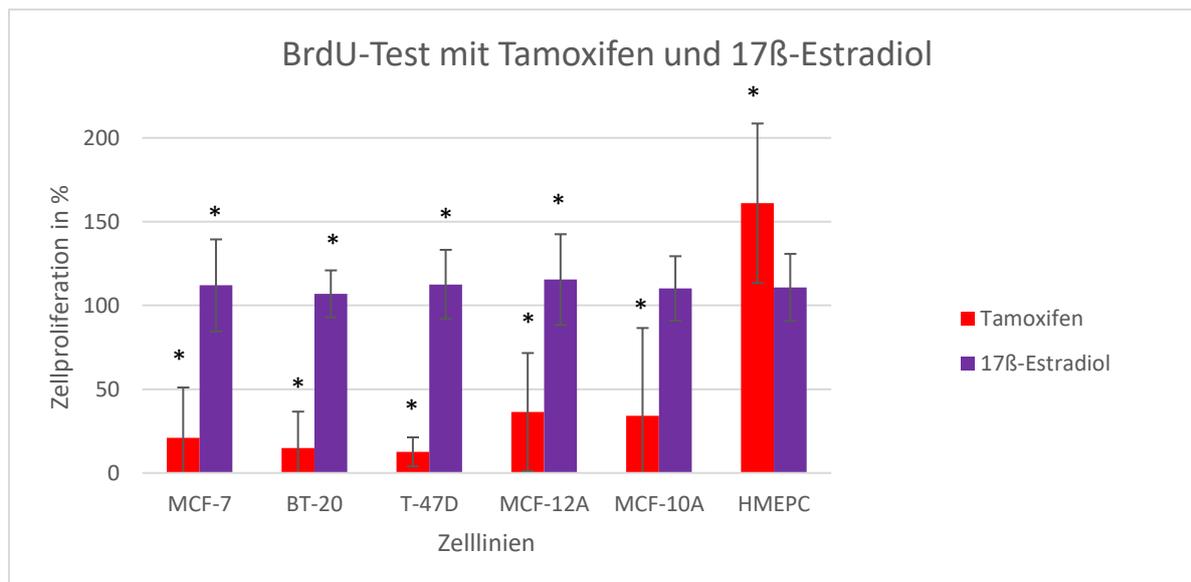
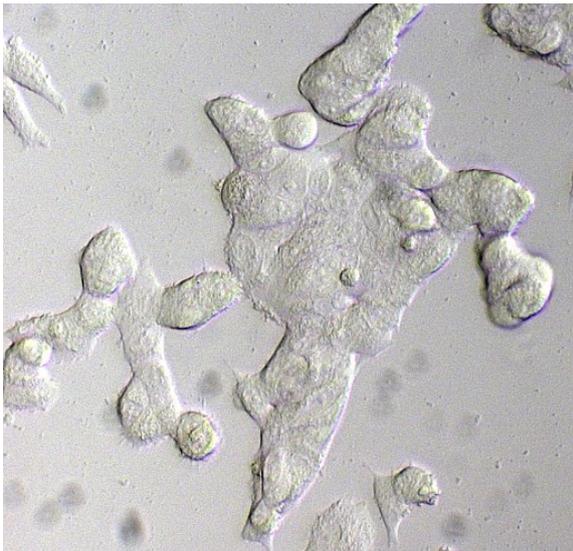


Abbildung 31: BrdU-Test: Einfluss von 1 % 17 β -Estradiol ($2,7 \times 10^{-7}$ mg/ml) und 1 % Tamoxifen ($5,63 \times 10^{-2}$ mg/ml) auf die Zellproliferation von MCF-7 (n=112), BT-20 (n=64), T-47D (n=64), MCF-12A (n=96), MCF-10A (n=64), HMEPC (n=48); Mittelwert mit Standardabweichung, * = signifikante Wirkung ($p < 0,05$), bezogen auf die Negativkontrolle 1 (Teeextrakte) und 2 (Mikrowellen- und Luyengiextrakt) (=100 %).

Alle Zelllinien bis auf die HMEPC werden von Tamoxifen statistisch signifikant im Wachstum gehemmt. Es werden Hemmungen von 70 % bis 85 % erreicht. Die HMEPC-Zellen zeigen dagegen eine signifikante Proliferationssteigerung um 60 %. Estradiol wirkt bei allen Zelllinien außer bei MCF-10A und HMEPC signifikant proliferationssteigernd (6 % bis 15 %).

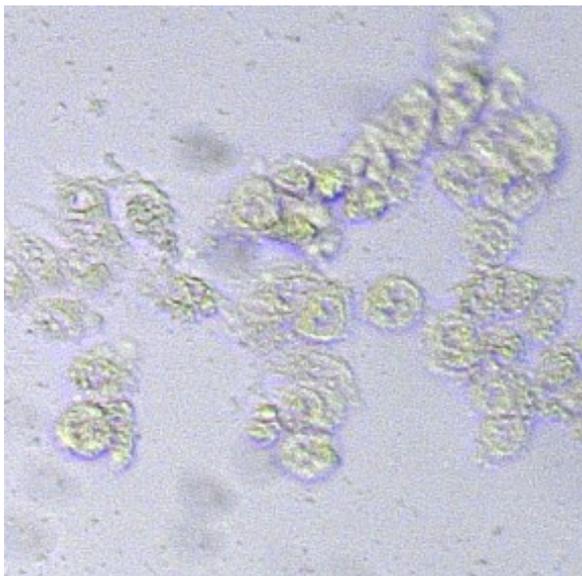
4.4 Ergebnisse der lichtmikroskopischen Beurteilung der Zellmorphologie

Um die Wirkung der Extrakte auf die Mammazellen lichtmikroskopisch darzustellen, wurde eine Pilotstudie mit der Zelllinie MCF-7 unter Einwirkung des Luyengiextraktes in den verschiedenen Konzentrationen und den Kontrollen durchgeführt. Die Bilder wurden unter den Gesichtspunkten Zellgröße und -form, Verhältnis Zellkern zu Zelle, Zellkernform, und Zytogranula beurteilt.



In der Abbildung 32 lässt sich bei der Negativkontrolle 2 eine für die Zelllinie typische Morphologie nachweisen. Die Zellen sind rund bis spindelförmig und unterschiedlich groß, aber glatt begrenzt, bilden Zellkolonien, die Zellkerne sind rund, nehmen 30 % des Zellvolumens ein und enthalten im Durchschnitt zwei Nukleoli. Das Zytoplasma ist durchschnittlich stark granuliert.

Abbildung 32: MCF-7-Zelllinie, Negativkontrolle 2, 23. Passage, 20-fache Vergrößerung



In Abbildung 33 zeigt sich eine deutliche Änderung der Zellmorphologie unter dem Einfluss von Tamoxifen. Die Zellen sind teilweise abgekugelt, kleiner, die Begrenzung der Zellen ist unscharf, deutliche Zell-Zell-Kontakte sind nicht zu erkennen, Zellkerne sind aufgrund einer zunehmenden Granulierung des Zellplasmas nicht mehr abgrenzbar.

Abbildung 33: MCF-7-Zelllinie, Tamoxifenkontrolle, 23. Passage, 20-fache Vergrößerung



Abbildung 34: MCF-7-Zelllinie, Estradiolkontrolle, 23. Passage, 10-fache Vergrößerung

Bei der Estradiolkontrolle (Abbildung 34) ist ein dichter Zellverband ohne große Wachstumsreserven zu erkennen. Einzelne Zellen sind spindelförmig, andere klein und rundlich, was jungen Zellen in der Zellteilung entspricht, bevor das Zytoplasma gebildet werden konnte. Ausgeprägte Zellkontakte sind zu erkennen, sodass eine Zuordnung der Zellkerne zu einzelnen Zellen schwerfällt. Nukleoli nur schwach zu erkennen. Deutliche Zellgrenzen am Rand des Zellverbandes und mittelstark ausgeprägte Zellplasmagranula.



Abbildung 35: MCF-7-Zelllinie, Luyengiextract (10 µg/ml), 23. Passage, 10-fache Vergrößerung

Abbildung 35 zeigt unter Luyengiextract (10 µg/ml) einen dichten Zellverband mit stark ausgeprägten Zell-Zell-Kontakten (erschwerter Beurteilung der Zellgrenzen und des Zellkern-Zellplasma-Verhältnisses). Kleine, abgekugelte Zellen sind das morphologische Korrelat der regen Zellteilung. Die Zellen sind sonst spindelförmig mit klaren Zellgrenzen am Rand des Zellverbandes. Die Zellgranulierung ist mittelmäßig stark ausgeprägt. Nukleoli sind nicht eindeutig erkennbar.



In Abbildung 36 sind die Effekte des Luyengiextraktes (100 µg/ml) auf die MCF-7 Zellen dargestellt. Die Zellen haben Kontakt untereinander, die Zellgrenzen sind aber deutlich unterscheidbar. Die Zellen wirken in Form und Größe unregelmäßig, aber insgesamt kleiner. Zellkerne nehmen ca. 50 % des Zellinhaltes ein. Das Zytoplasma wirkt granulierter.

Abbildung 36: MCF-7-Zelllinie, Luyengiextrakt (100 µg/ml), 23. Passage, 10-fache Vergrößerung



In Abbildung 37 ist die Wirkung des Luyengiextraktes (250 µg/ml) auf die MCF-7 Zellen dargestellt. Die Zellen wirken teilweise rundlich, unscharf und kleiner, es sind ausgeprägte Vakuolisierungen zu erkennen. Das Zytoplasmaverhältnis hat sich zugunsten der Zellkerne verschoben, es ist eine deutliche Granulierung und teilweise Zelldetritus erkennbar. Zellkerne normal konfiguriert. Nukleoli erkennbar.

Abbildung 37: MCF-7-Zelllinie, Luyengiextrakt (250 µg/ml), 23. Passage, 10-fache Vergrößerung



Abbildung 38: MCF-7-Zelllinie, Luyengiextrakt (500 µg/ml), 23. Passage, 20-fache Vergrößerung

In Abbildung 38 ist die Wirkung des Luyengiextraktes (500 µg/ml) auf die MCF-7 Zellen zu erkennen. Die Zellen und Zellgrenzen sind deutlich unscharf, die Zellkerne sind nur selten abgrenzbar, eine Vakuolisierung ist sichtbar, Zelldetritus und Zytogranula dominieren.

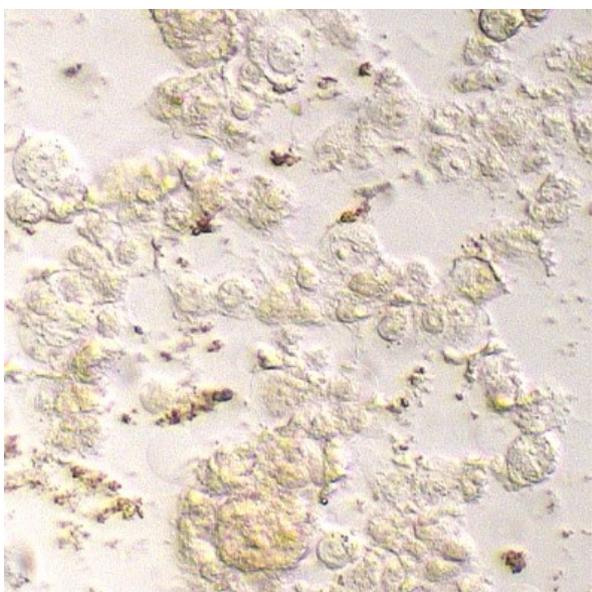


Abbildung 39: MCF-7-Zelllinie, Luyengiextrakt (750 µg/ml), 23. Passage, 20-fache Vergrößerung

Abbildung 39 zeigt einen scholligen Zerfall der MCF-7-Zellen nach Einwirkung des Luyengiextraktes (750 µg/ml), sie sind sehr klein und nur undeutlich abgrenzbar. Die Zellkerne nehmen (soweit abgrenzbar) den Großteil des Zellinhaltes ein. Starke Granulierung. Zwischen den Zellen sind Zelldetritus und dunkle Pigmente des Extraktes sichtbar.

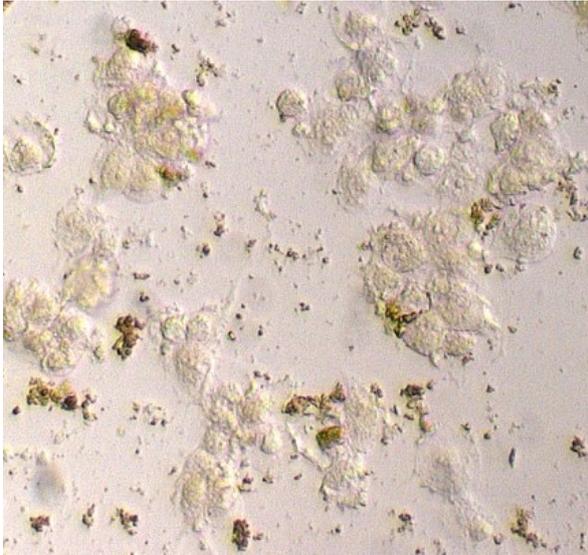


Abbildung 40 zeigt die Wirkung des Luyengiextraktes (1000 µg/ml) auf die MCF-7 Zellen. Sie sind unterschiedlich groß und geformt, insgesamt aber kleiner und die Granula dichter. Die Zellgrenzen sind unscharf. Die Zellkerne wirken kondensiert und nehmen einen Großteil des Zellvolumens ein. Zelldetritus und Pigmentablagerungen des Extraktes finden sich zwischen den Zellen.

Abbildung 40: MCF-7-Zelllinie, Luyengiextrakt, (1000 µg/ml), 23. Passage, 20-fache Vergrößerung

4.5 Ergebnisse der metabolischen Analyse – Glukose-Aufnahmetest

4.5.1 Wirkung der Extrakte auf die Mammazellen

Bei der Glukosebestimmung wurden die Zellen für 24 h mit den Extrakten und Kontrollen inkubiert und anschließend der Überstand ausgewertet. In den Diagrammen wird die Glukoseaufnahme bei Zugabe der Extrakte mit der Glukoseaufnahme der Negativkontrolle 1 (für trockenen und frischen Teeextrakt) oder Negativkontrolle 2 (für Mikrowellen- und Luyengiextrakt) verglichen. Diese wurde jeweils auf 100 % gesetzt.

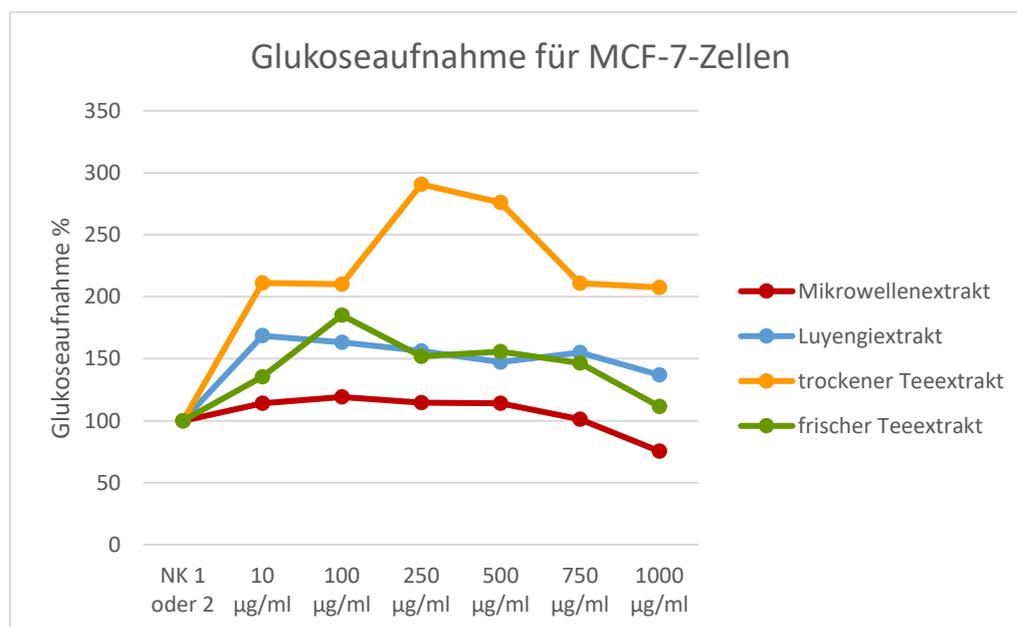


Abbildung 41: MCF-7-Zelllinie: Glukoseaufnahmetest: Einfluss von Mikrowellen- und Luyengiextrakt, trockenem – und frischem Teeextrakt aus Sanddornblättern in verschiedenen Konzentrationen auf die Glukoseaufnahme der Mammazelllinie MCF-7 verglichen mit der Negativkontrolle (NK), Anzahl der Versuche: n = 1.

Durch die Extrakte wird die Glukoseaufnahme bei der Zelllinie MCF-7 nicht gehemmt, sondern - mit Ausnahme des Mikrowellenextraktes - tendenziell stimuliert (Abbildung 41).

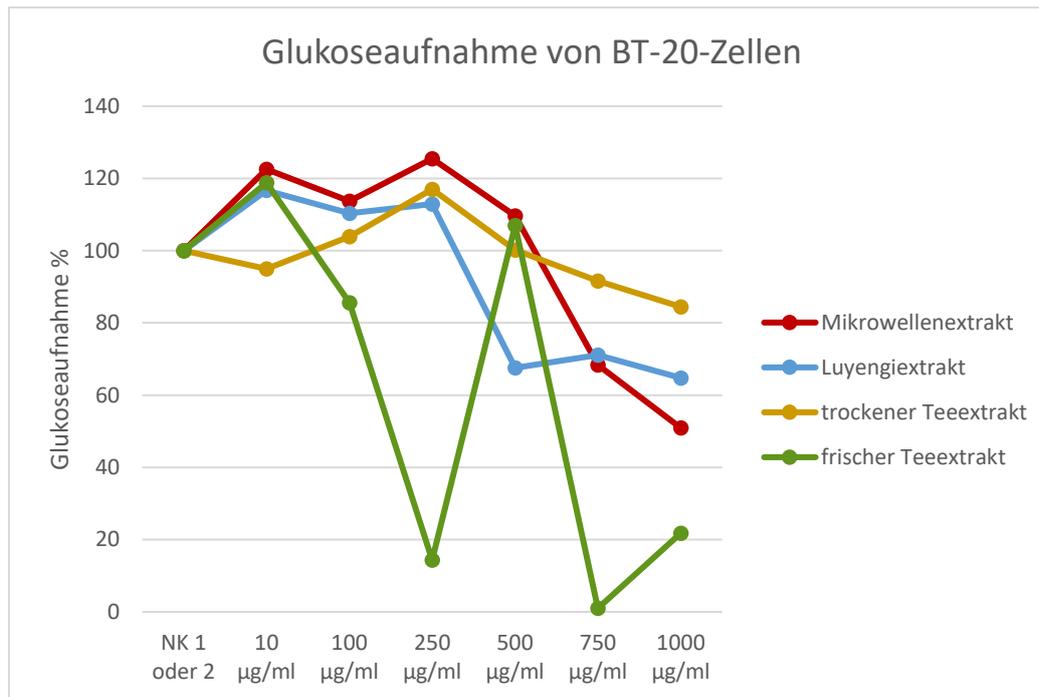


Abbildung 42: BT-20-Zelllinie: Glukoseaufnahmetest: Einfluss von Mikrowellen- und Luyengiextrakt, trockenem – und frischem Teeextrakt aus Sanddornblättern in verschiedenen Konzentrationen auf die Glukoseaufnahme der Mammazelllinie BT-20, verglichen mit der Negativkontrolle (NK), Anzahl der Versuche: $n = 1$.

Bei der Zelllinie BT-20 verringert sich die Glukoseaufnahme bei Zugabe der Sanddornblätterextrakte in den höheren Konzentrationen (Abbildung 42). Für den Mikrowellenextrakt ergab sich bei 750 µg/ml eine Reduktion um 32 % und für 1000 µg/ml eine Reduktion um 49 %. Die niedrigeren Konzentrationen gehen mit einer erhöhten Glukoseaufnahme einher. Die Inkubation mit dem Luyengiextrakt zeigte eine ähnliche Wirkung. Eine Reduktion der Glukoseaufnahme wurde bei 500 µg/ml mit 32 %, bei 750 µg/ml mit 29 % und bei 1000 µg/ml mit 35 % erreicht. Auch der trockene Teeextrakt hemmt erst ab der Konzentration 1000 µg/ml die Glukoseaufnahme um 15 %. Für den frischen Teeextrakt ist keine eindeutige Tendenz erkennbar. Die Messung erscheint am ehesten artefaktüberlagert.

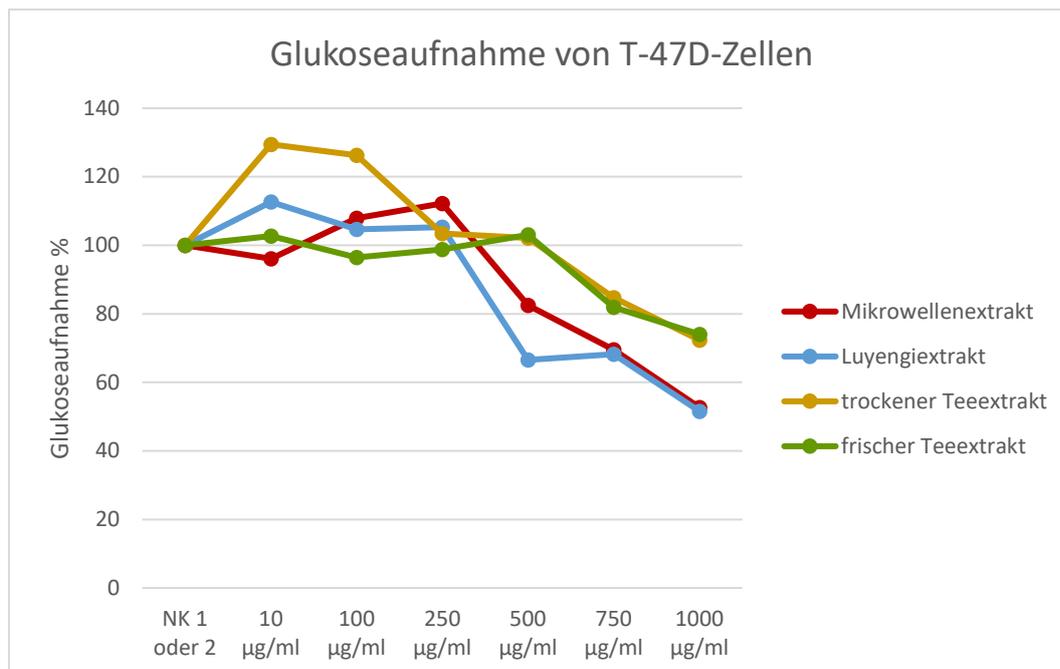


Abbildung 43: T-47D-Zelllinie: Glukoseaufnahmetest: Einfluss von Mikrowellen- und Luyengiextrakt, trockenem – und frischem Teeextrakt aus Sanddornblättern in verschiedenen Konzentrationen auf die Glukoseaufnahme der Mammazelllinie T-47D verglichen mit der Negativkontrolle (NK), Anzahl der Versuche: $n = 1$.

Die Extrakte reduzierten in höheren Konzentrationen bei T-47D nach 24 h Inkubation die Glukoseaufnahme (Abbildung 43). Für den Mikrowellenextrakt ergab sich ab 500 µg/ml eine Reduktion um 18 %, für 750 µg/ml um 30 % und für 1000 µg/ml um 47 %. Mit dem Luyengiextrakt wurden mit 33 % bei 500 µg/ml, 32 % bei 750 µg/ml und 48 % bei 1000 µg/ml ähnliche Werte erreicht. Mit dem trockenen Teeextrakt wurde eine Hemmung der Glukoseaufnahme bei 750 µg/ml um 15 % und bei 1000 µg/ml um 28 %, mit dem frischen Teeextrakt bei 500 µg/ml um 18 % und bei 1000 µg/ml um 26 % erreicht.

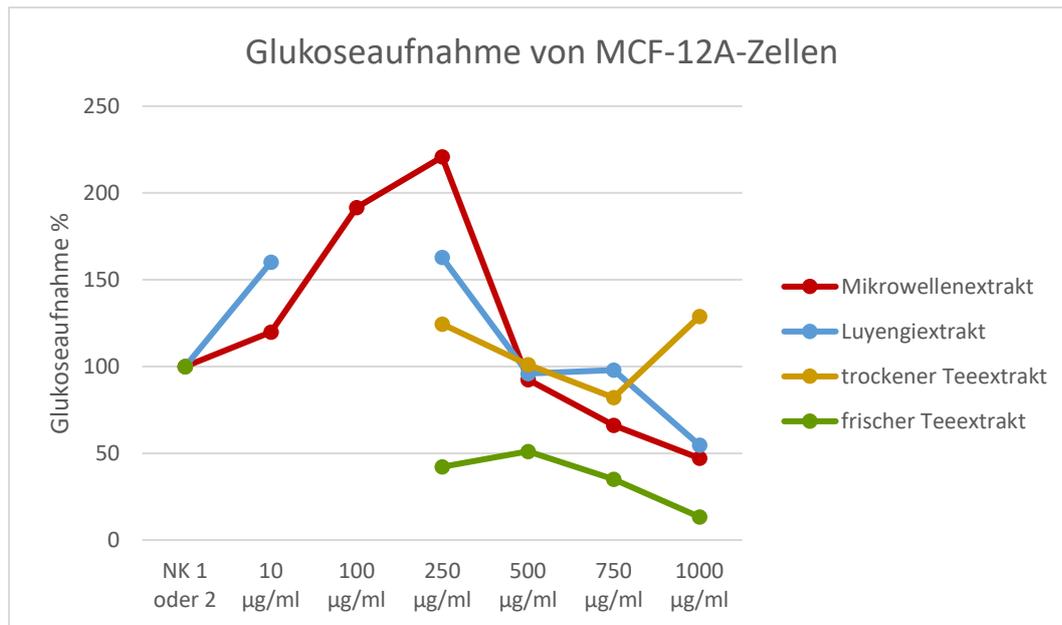


Abbildung 44: MCF-12A-Zelllinie: Glukoseaufnahmetest: Einfluss von Mikrowellen- und Luyengiextrakt, trockenem – und frischem Teeextrakt aus Sanddornblättern in verschiedenen Konzentrationen auf die Glukoseaufnahme der Mammazelllinie MCF-12A, verglichen mit der Negativkontrolle (NK), Anzahl der Versuche: $n = 1$.

Für die vollständige Auswertung der Glukoseaufnahme fehlen bei MCF-12A aus technischen Gründen einige Werte (Abbildung 44). Tendenziell wirken höhere Konzentrationen der Sanddornblätterextrakte hemmend auf die Glukoseaufnahme. Für den Mikrowellenextrakt ist bei 750 µg/ml um 34 % und bei 1000 µg/ml um 53 % zu verzeichnen. Der Luyengiextrakt führt bei 500 µg/ml zu einer Reduktion um 4 %, bei 750 µg/ml um 2 % und bei 1000 µg/ml um 45 %. Der frische Teeextrakt scheint bei Konzentrationen ab 250 µg/ml bis 1000 µg/ml die Glukoseaufnahme um 58 % bis 87 % zu reduzieren. Zum trockenen Teeextrakt ist wegen fehlender Werte keine Aussage möglich.

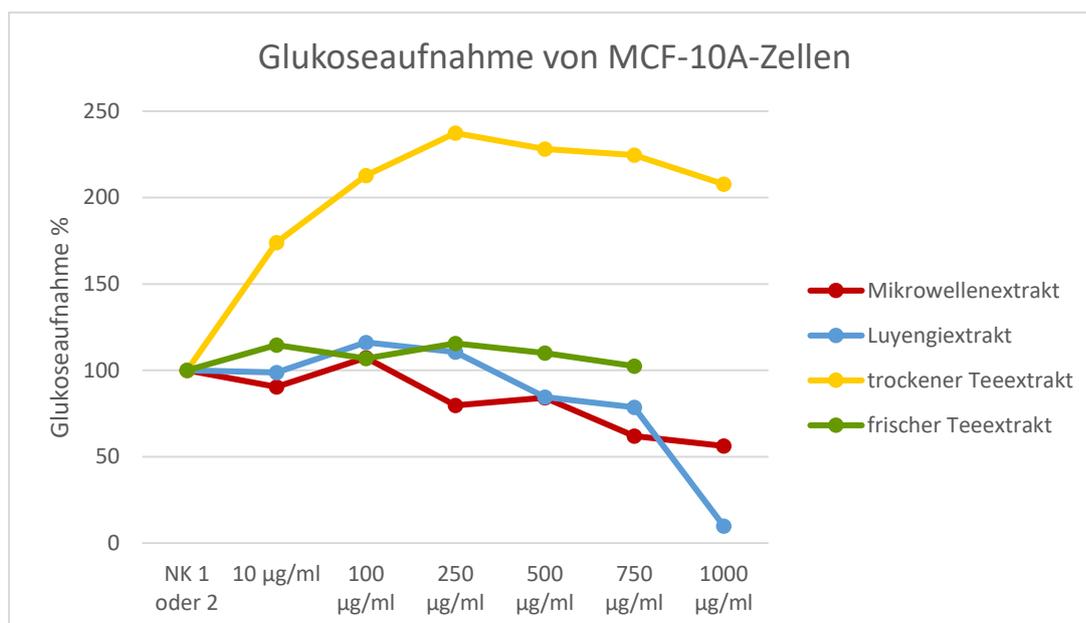


Abbildung 45: MCF10A-Zelllinie: Glukoseaufnahmetest: Einfluss von Mikrowellen- und Luyengiextrakt, trockenem – und frischem Teeextrakt aus Sanddornblättern in verschiedenen Konzentrationen auf die Glukoseaufnahme der Mammazelllinie MCF-10A, verglichen mit der Negativkontrolle (NK), Anzahl der Versuche: $n = 1$.

Bei den Zellen der Zelllinie MCF-10A reduzierten höhere Konzentrationen des Mikrowellen- und Luyengiextraktes die Glukoseaufnahme (Abbildung 45). Die Hemmung betrug beim Mikrowellenextrakt bei der Konzentration 250 µg/ml 20 %, bei 500 µg/ml 16 %, bei 750 µg/ml 38 % und bei 1000 µg/ml 44 %. Der Luyengiextrakt reduzierte die Glukoseaufnahme bei der Konzentration 500 µg/ml um 16 %, bei 750 µg/ml um 21 % und bei 1000 µg/ml um 90 %. Der trockene Teeextrakt steigerte die Glukoseaufnahme sehr stark, der frische Teeextrakt beeinflusste sie kaum.

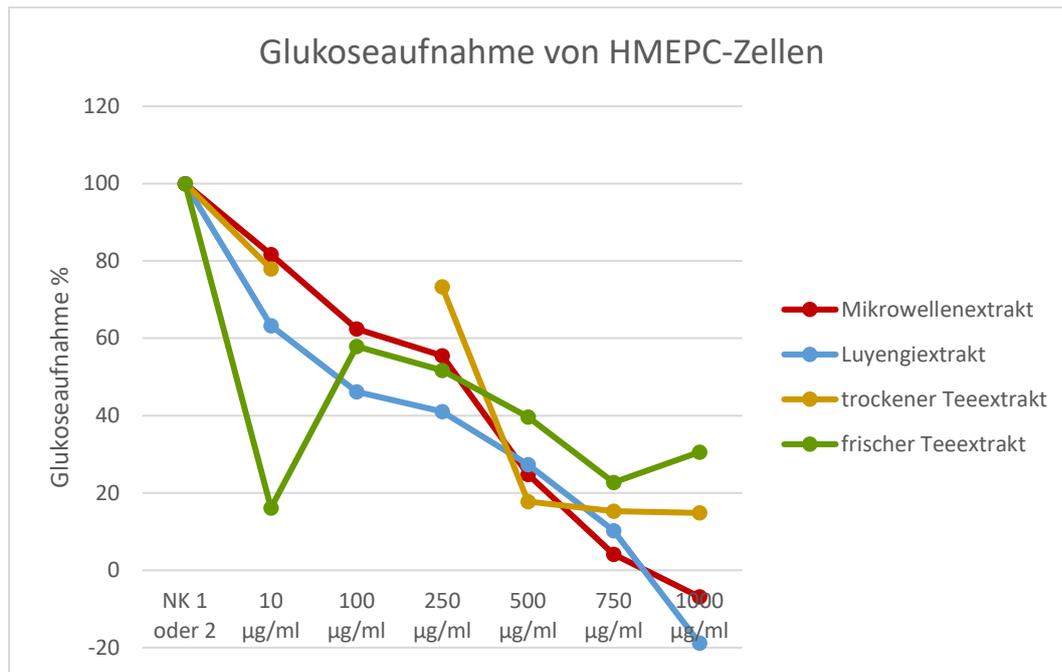


Abbildung 46: HMEPC-Zelllinie: Glukoseaufnahmetest: Einfluss von Mikrowellen- und Luyengiextrakt, trockenem – und frischem Teeextrakt aus Sanddornblättern in verschiedenen Konzentrationen auf die Glukoseaufnahme der Mammazelllinie HMEPC, verglichen mit der Negativkontrolle (NK), Anzahl der Versuche: $n = 1$.

Alle Sanddornblätterextrakte reduzierten mit steigenden Konzentrationen die Glukoseaufnahme der Zelllinie HMEPC (Abbildung 46). Für den Mikrowellenextrakt ergab sich für die Konzentration 10 µg/ml eine Reduktion um 8 %, für 100 µg/ml um 38 %, für 250 µg/ml um 44 %, für 500 µg/ml um 75 % und für 750 µg/ml 96 %. Beim Luyengiextrakt zeigt sich bei der Konzentration 10 µg/ml eine Reduktion um 37 %, für 100 µg/ml um 54 %, für 250 µg/ml um 59 %, für 500 µg/ml um 73 % und für 750 µg/ml um 90 %. Beide Extrakte wirkten bei der Konzentration 1000 µg/ml bezogen auf die Negativkontrolle 2 noch stärker. Der trockene Teeextrakt hemmte bei 1000 µg/ml die Glukoseaufnahme um 85 %, der frische Teeextrakt erreichte seine maximale Wirksamkeit bei 750 µg/ml (77 %). Der Wert für 10 µg/ml des frischen Teeextraktes ist vermutlich ein Ausreißer.

4.5.2 Wirkung der Positivkontrollen auf die Mammazellen

In Abbildung 47 und Abbildung 48 sind die Ergebnisse des Glukoseaufnahmetests bei den Positivkontrollen nach 24-stündiger Inkubation mit 1 % Tamoxifen bzw. 1 % 17 β -Estradiol dargestellt.

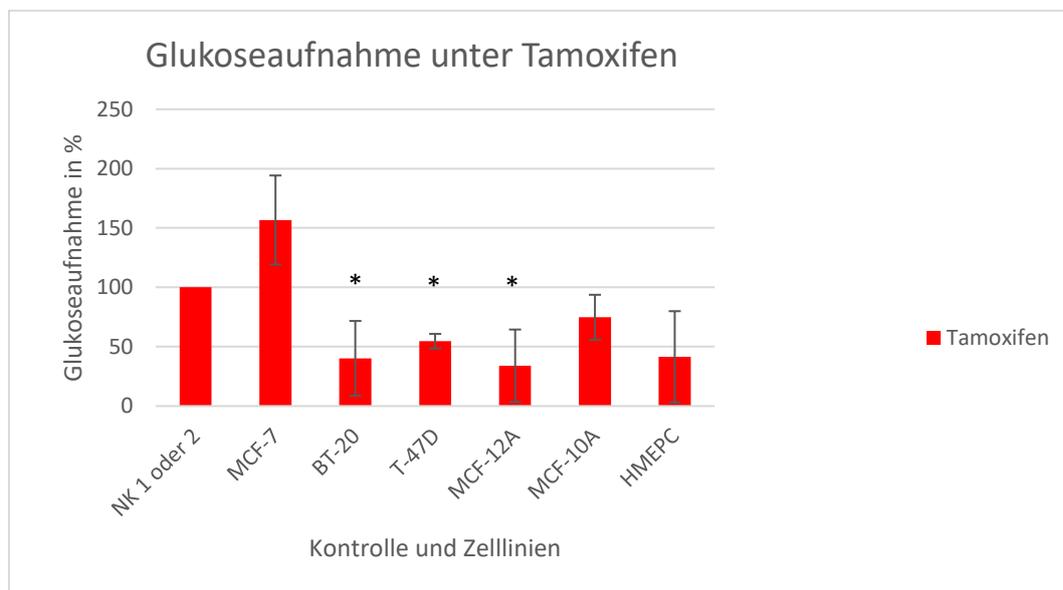


Abbildung 47: Glukoseaufnahmetest: Einfluss von 1 % Tamoxifen ($5,63 \times 10^{-2}$ mg/ml) auf die Glukoseaufnahme der verschiedenen Mammazelllinien. Angegeben ist der Mittelwert mit Standardabweichung, * = signifikante Wirkung ($p < 0,05$), bezogen auf die Negativkontrolle (NK) 1 (Teeextrakte) und 2 (Mikrowellen- und Luyengiextrakt) (=100 %), Anzahl der Versuche: $n = 4$.

Die 24-stündige Inkubation mit 1 % Tamoxifen reduzierte bei allen Zelllinien mit Ausnahme von MCF-7 (+ 57 %) die Glukoseaufnahme, wobei MCF-12A am stärksten reagierte (- 66 %). Bei den Zelllinien BT-20, T-47D und MCF-12A waren die Ergebnisse signifikant.

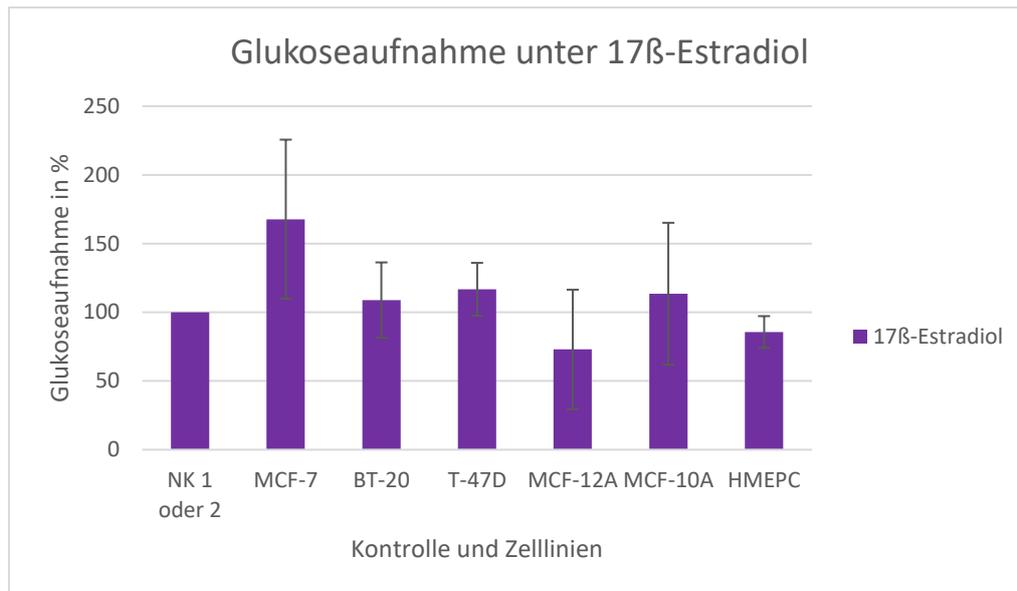


Abbildung 48: Glukoseaufnahmetest: Einfluss von 1 % Estradiol ($2,7 \times 10^{-7}$ mg/ml) auf die Glukoseaufnahme der verschiedenen Mammazelllinien. Angegeben ist der Mittelwert mit Standardabweichung, bezogen auf die Negativkontrolle (NK) 1 (Teextrakte) und 2 (Mikrowellen- und Luyengiextrakt) (=100%), Anzahl der Versuche: $n = 4$.

Die Zugabe von 17β-Estradiol führte bei den meisten Zelllinien zu einer tendenziellen Zunahme der Glukoseaufnahme, insbesondere bei MCF-7 (+68 %). Bei MCF-12A und HMEPC wurde sie leicht reduziert.

4.6 Ergebnisse der metabolischen Analyse - H₂O₂-Bestimmung

Die H₂O₂-Konzentration wurde als Indikator für den oxidativen Stress im Überstand nach 24-stündiger Inkubation mit den Extrakten gemessen.

4.6.1 Beeinflussung der Messung durch die Extrakte

Um einen Einfluss auf die H₂O₂-Messung durch die Extrakte, insbesondere durch deren Färbung zu prüfen, wurde Medium (Ham's F12 10 % FKS (hormonfrei)) in Kombination mit verschiedenen Konzentrationen der Extrakte untersucht.

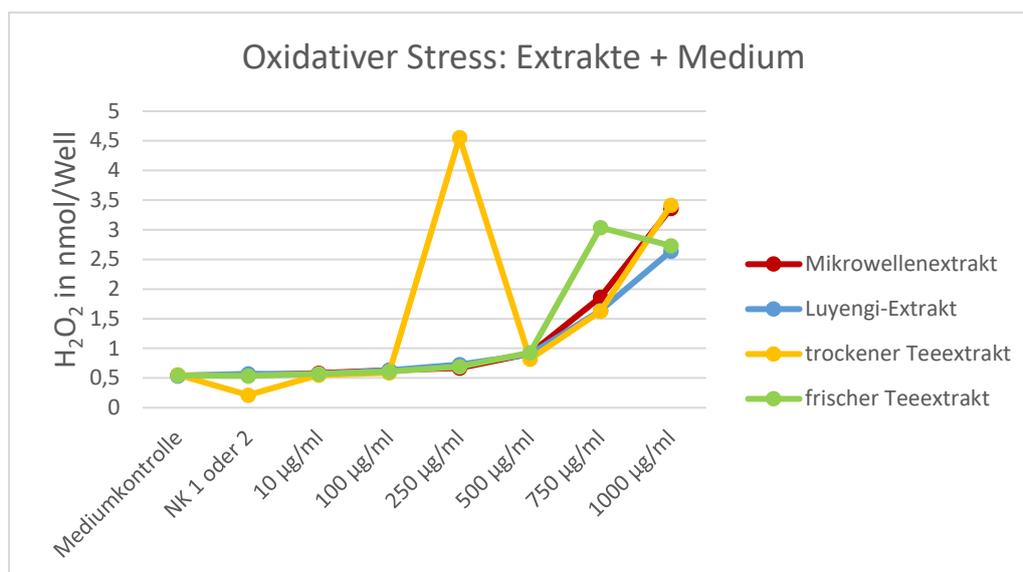


Abbildung 49: Einfluss von Mikrowellen- und Luyengiextrakt, trockenem und frischem Teeextrakt aus Sanddornblättern in verschiedenen Konzentrationen verdünnt mit Medium Ham's F 12 10 % FKS hormonfrei auf den H_2O_2 -Gehalt, Vergleich mit Medium- und Negativkontrolle (NK), Anzahl der Versuche: $n=1$.

Abbildung 49 zeigt, dass die Extrakte die Bestimmung von H_2O_2 vor allem bei höheren Konzentrationen beeinflussten. Ab $500 \mu\text{g/ml}$ stiegen die Messwerte konzentrationsabhängig deutlich an, bei $1000 \mu\text{g/ml}$ betragen sie $3,4 \text{ nmol}$ (Mikrowellenextrakt), $2,6 \text{ nmol}$ (Luyengiextrakt) und $3,4 \text{ nmol}$ (trockener Teeextrakt). Beim trockenen Teeextrakt zeigte sich ein Ausreißer bei der Konzentration $250 \mu\text{g/ml}$. Mit dem frischen Teeextrakt wird schon bei $750 \mu\text{g/ml}$ ein Wert von 3 nmol erreicht. Damit verfälscht die Eigenfärbung der Extrakte zumindest in höheren Konzentrationen die H_2O_2 -Bestimmungen in den Untersuchungen mit den Mammazelllinien.

4.6.2 Wirkung der Extrakte auf die Mammazellen

Da die Eigenfärbung der Extrakte die Bestimmungen von H_2O_2 beeinflusst, sind die Ergebnisse der Messung mit den Mammazellen nicht interpretierbar. Zur Illustration wird lediglich ein Beispiel (Versuch mit der Zelllinie BT-20) dargestellt.

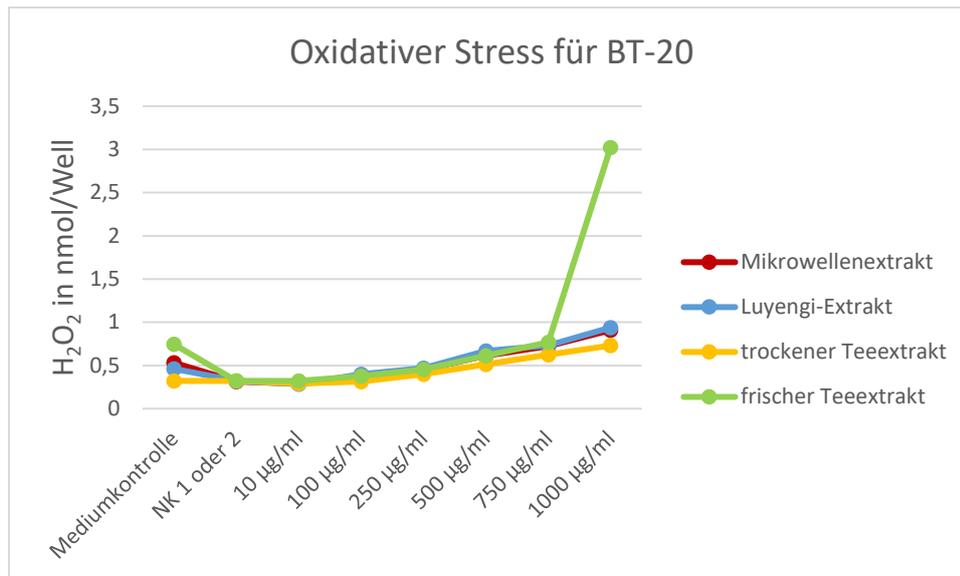


Abbildung 50: BT-20-Zelllinie: Einfluss von Mikrowellen- und Luyengiextrakt, trockenem und frischem Teeextrakt aus Sanddornblättern in verschiedenen Konzentrationen auf den oxidativen Stress der Mammazelllinie, Vergleich mit der Medium- und Negativkontrolle (NK), Anzahl der Versuche: $n=1$.

Bei der Zelllinie BT-20 nimmt der H_2O_2 –Gehalt im Überstand mit steigenden Extraktkonzentrationen zu (Abbildung 50). Dieses Messergebnis beruht aber nicht auf einer Wirkung der Extrakte auf die Zellen, sondern ist durch eine Interaktion des Testverfahrens mit dem Extrakt bedingt (Abbildung 49). Da alle Messwerte deutlich unter $40 \text{ nmol/Well } H_2O_2$ liegen, kann eine Schädigung der Zellen durch einen oxidativen Stress ausgeschlossen werden. Bei dem einzelnen hohen Wert (frischer Teeextrakt (1000 µg/ml)) dürfte es sich um einen Ausreißer handeln.

4.6.3 Wirkung der Positivkontrollen auf die Mammazellen

In Abbildung 51 bzw. Abbildung 52 sind die Ergebnisse der H_2O_2 –Bestimmung bei den Zelllinien nach 24-stündiger Inkubation mit den Positivkontrollen 1 % Tamoxifen ($5,63 \times 10^2 \text{ mg/ml}$) oder 1 % 17β -Estradiol ($2,7 \times 10^{-7} \text{ mg/ml}$) dargestellt. Es ergaben sich bei den H_2O_2 –Werten bei keiner der Mammazelllinien signifikante Unterschiede zur Negativkontrolle.

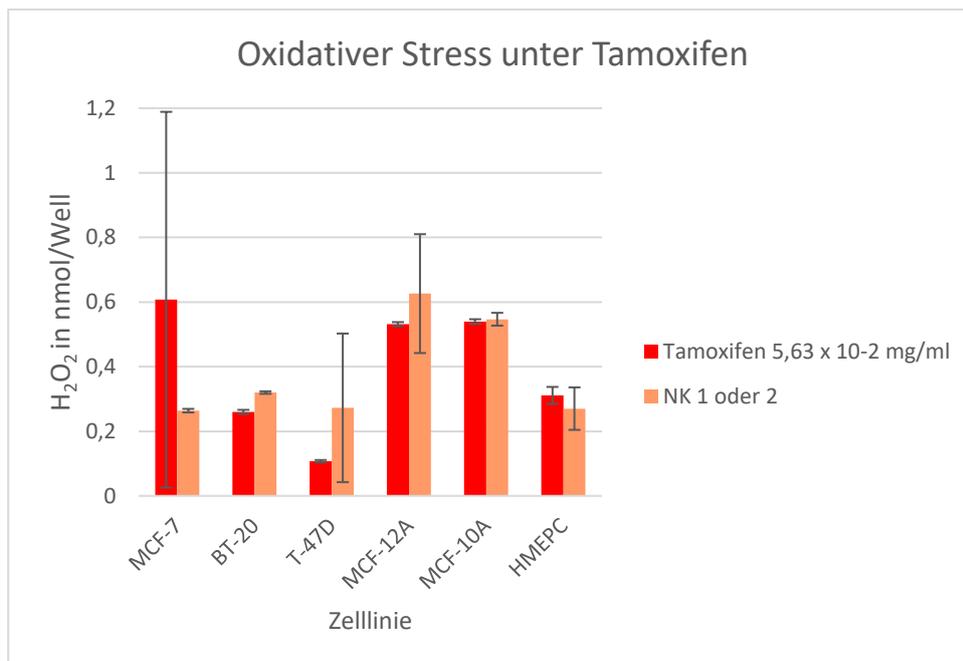


Abbildung 51: Stresstest: Einfluss von 1 % Tamoxifen ($5,63 \times 10^{-2}$ mg/ml) auf den oxidativen Stress der entsprechenden Mammazelllinie im Vergleich zur Negativkontrolle 1 oder 2 mit Standardabweichung, $n=4$.

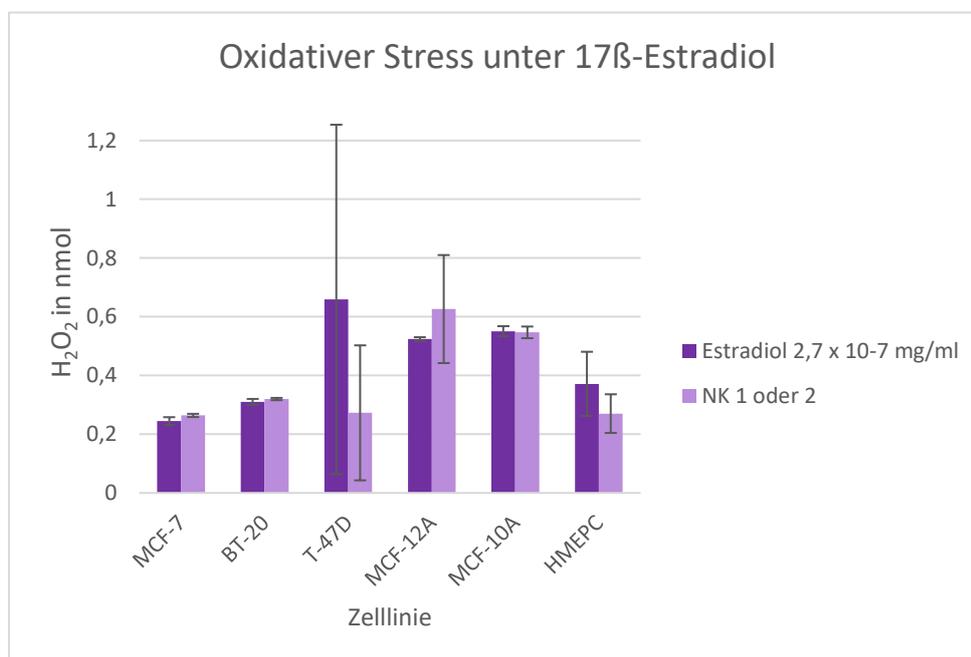


Abbildung 52: Stresstest: Einfluss von 1 % Estradiol ($2,7 \times 10^{-7}$ mg/ml) auf den oxidativen Stress der entsprechenden Mammazelllinie im Vergleich zur Negativkontrolle 1 oder 2, $n=4$.

Ergebnisse

4.7 Ergebnisse der metabolischen Analyse – pH-Messung

4.7.1 Wirkung der Extrakte auf die Mammazellen

Die Zellen wurden für 24 h mit den Extrakten bzw. Kontrollen inkubiert, anschließend wurde der pH-Wert in den Überständen gemessen. Die Werte der Zelllinie MCF-7 fehlen, weil das pH-Meter wegen eines Defekts nicht zur Verfügung stand.

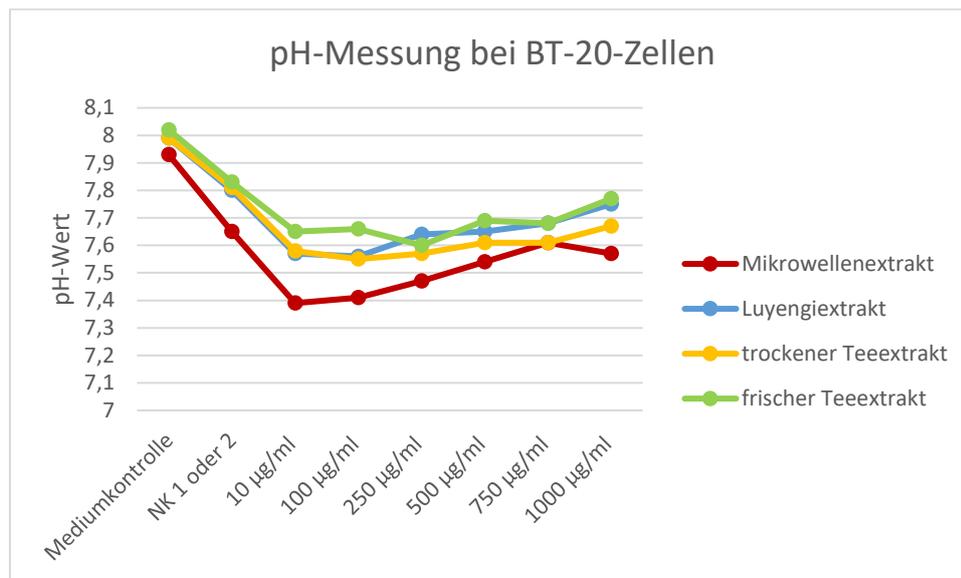


Abbildung 53: Mammazelllinie BT-20: Einfluss von Mikrowellen- und Luyengiextrakt, trockenem und frischem Teeextrakt aus Sanddornblättern in verschiedenen Konzentrationen auf den pH-Wert im Überstand. Vergleich mit Medium- und Negativkontrolle (NK), n=1.

Bei der Untersuchung mit der Mammakarzinom-Zelllinie BT-20 reduzierten niedrigere Konzentrationen des Mikrowellenextrakts den pH-Wert im Überstand. Der Wert für 10 µg/ml (7,39) ist deutlich niedriger als für die Negativkontrolle 2 (7,65). Von diesem Minimum steigen die Werte mit zunehmender Extraktkonzentration bis auf 7,61 (750 µg/ml) an. Bei den anderen Extrakten ist der Verlauf tendenziell vergleichbar, allerdings weniger stark ausgeprägt. Mit dem Luyengiextrakt steigen die Werte von 7,56 bei 100 µg/ml auf 7,75 bei 1000 µg/ml, mit dem trockenen Teeextrakt von 7,55 bei 100 µg/ml auf 7,67 bei 1000 µg/ml und mit dem frischen Teeextrakt von 7,6 bei 250 µg/ml auf 7,77 bei 1000 µg/ml. Bei der Mediumkontrolle ist der pH-Wert mit durchschnittlich 8,0 am höchsten (Abbildung 53).

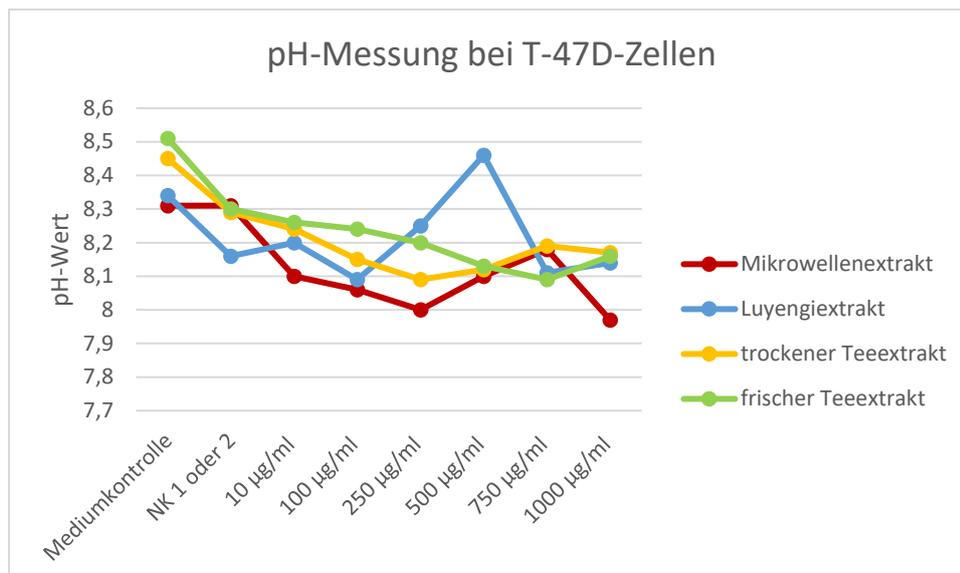


Abbildung 54: Mammazelllinie T-47D: Einfluss von Mikrowellen- und Luyengiextrakt, trockenem und frischem Teeextrakt aus Sanddornblättern in verschiedenen Konzentrationen auf den pH-Wert im Überstand. Vergleich mit Medium- und Negativkontrolle (NK), n=1.

Bei der Mammakarzinom-Zelllinie T-47D lag der pH-Wert mit dem Mikrowellenextrakt stets unter dem der Negativkontrolle (8,31). Er fiel bei den niedrigen Konzentrationen ab, erreichte bei 250 µg/ml 8,0 und stieg dann wieder leicht an (8,18 bei 750 µg/ml). Mit dem Luyengiextrakt erreichte der pH bei 100 µg/ml ein Minimum (8,09), bei 750 µg/ml und 1000 µg/ml war er mit 8,11 und 8,14 ähnlich hoch. Bei den Werten bei 250 und 500 µg/ml handelt es sich vermutlich um Ausreißer. Auch die beiden Teeextrakte senkten den pH-Wert mit steigenden Konzentrationen ab. Mit dem trockenen Teeextrakt (Negativkontrolle 8,29) fiel er bis auf 8,09 (250 µg/ml) ab und stieg dann bis auf 8,19 (750 µg/ml) an. Beim frischen Teeextrakt (Negativkontrolle 8,3) fiel er bis auf 8,09 (750 µg/ml) ab. Die pH-Werte der Mediumkontrolle (8,31 bis 8,51) waren deutlich höher als die anderen Werte (Abbildung 54).

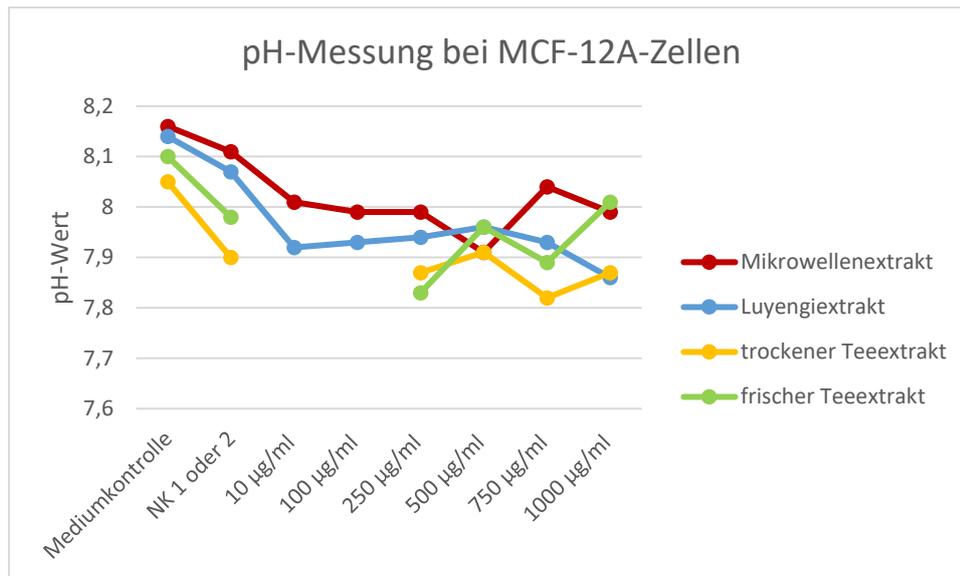


Abbildung 55: Mammazelllinie MCF-12A: Einfluss von Mikrowellen- und Luyengiextrakt, trockenem und frischem Teeextrakt aus Sanddornblättern in verschiedenen Konzentrationen auf den pH-Wert im Überstand. Vergleich mit Medium- und Negativkontrolle (NK), n=1.

Bei der Mammazelllinie MCF-12A fiel der pH-Wert im Vergleich zur Negativkontrolle (8,11) unter dem Mikrowellenextrakt schon bei 10 µg/ml deutlich ab (8,01) und veränderte sich dann kaum noch (8,04 bei 750 µg/ml). Der Wert 7,91 bei 500 µg/ml ist vermutlich ein Ausreißer. Auch mit dem Luyengiextrakt fiel der pH-Wert im Vergleich zur Negativkontrolle (8,07) schon bei 10 µg/ml deutlich ab (7,92) und blieb bis zur Konzentration 750 µg/ml mit 7,93 stabil. Bei 1000 µg/ml fiel er auf 7,86 ab (Abbildung 55).

Bei den Teeextrakten wurden die Konzentrationen 10 µg/ml und 100 µg/ml nicht untersucht. Mit dem trockenen Teeextrakt fand sich eine Tendenz zur Absenkung im Vergleich zur Negativkontrolle (7,9) mit einem Minimum von 7,82 bei 750 µg/ml. Der frische Teeextrakt schien im Vergleich zur Negativkontrolle (pH 7,98) den pH-Wert zunächst leicht zu senken (7,83 bei 250 µg/ml) und dann leicht zu steigern (8,01 bei 1000 µg/ml). Die Mediumkontrollen lagen mit 8,05 bis 8,16 oberhalb aller anderen Werte (Abbildung 55).

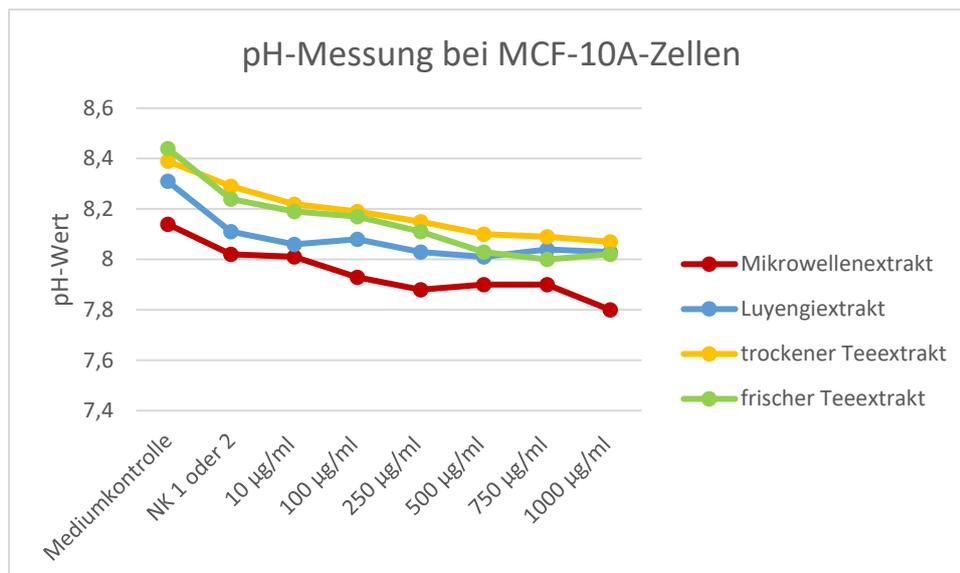


Abbildung 56: Mammazelllinie MCF-10A: Einfluss von Mikrowellen- und Luyengiextrakt, trockenem und frischem Teeextrakt aus Sanddornblättern in verschiedenen Konzentrationen auf den pH-Wert im Überstand. Vergleich mit Medium- und Negativkontrolle (NK), n=1.

Bei der Mammazelllinie MCF-10A fiel der pH-Wert im Vergleich zu den Negativkontrollen unter der Einwirkung aller Extrakte mit steigenden Konzentrationen kontinuierlich ab. Für den Mikrowellenextrakt nahm der pH-Wert von 8,02 (Negativkontrolle) bis 7,8 bei 1000 µg/ml ab. Für den Luyengiextrakt war der Abfall (von 8,11 auf 8,03) weniger deutlich ausgeprägt. Der trockene Teeextrakt zeigte mit einem Abfall von 8,29 auf 8,07 die gleiche Tendenz, ebenso der frische Teeextrakt, ausgehend von 8,24 (Negativkontrolle), das Minimum wurde schon bei 750 µg/ml mit 8,0 erreicht. Die Mediumkontrollen lagen mit 8,14 bis 8,44 deutlich oberhalb der anderen pH-Werte (Abbildung 56).

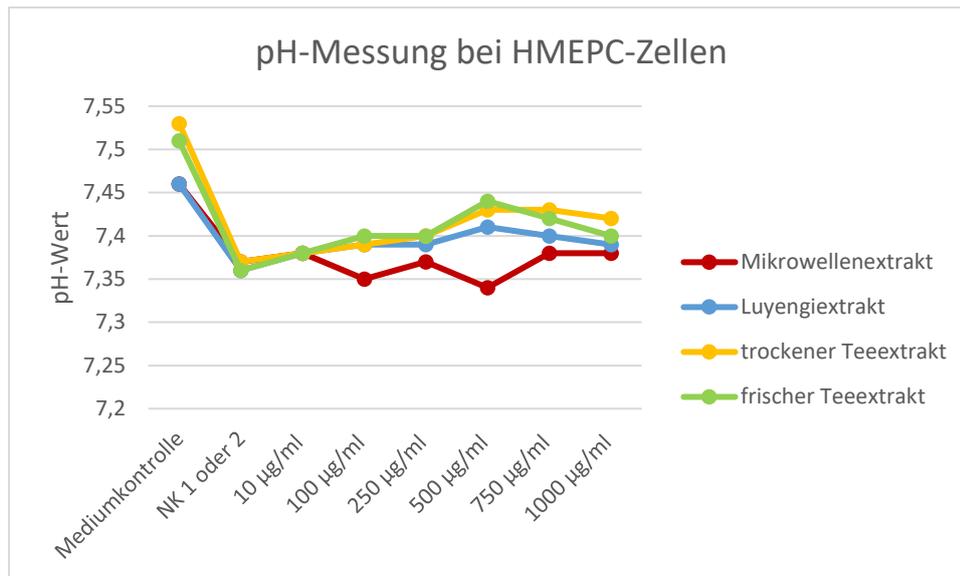


Abbildung 57: Mammazelllinie HMEPC: Einfluss von Mikrowellen- und Luyengiextrakt, trockenem und frischem Teeextrakt aus Sanddornblättern in verschiedenen Konzentrationen auf den pH-Wert im Überstand. Vergleich mit Medium- und Negativkontrolle (NK), n=1.

Bei der HMEPC-Zelllinie führten die Extrakte mit Ausnahme des Mikrowellenextraktes zu einer leichten Zunahme des pH-Wertes im Vergleich zur Negativkontrolle (7,36-7,37). Der Mikrowellenextrakt schien den pH-Wert kaum zu beeinflussen. Mit dem Luyengiextrakt ergab sich ein geringer Anstieg von der Negativkontrolle (7,36) auf 7,41 bei 500 µg/ml und dann ein leichter Abfall bis auf 7,29 bei 1000 µg/ml. Der trockene Teeextrakt führte zu einem geringen Anstieg von der Negativkontrolle (7,37) auf 7,42 bei 500 µg/ml, bis 1000 µg/ml blieb der pH-Wert stabil (7,40). Der frische Teeextrakt bewirkte einen geringen Anstieg von der Negativkontrolle (7,36) auf 7,44 bei 500 µg/ml, der Wert blieb dann nahezu stabil (7,4 bei 1000 µg/ml). Die Mediumkontrollen lagen mit 7,46 bis 7,53 deutlich oberhalb der anderen pH-Werte (Abbildung 57).

4.7.2 Auswirkung der Extrakte auf die Messung

Zur Prüfung des Einflusses der Extrakte auf die pH-Wert-Messung wurden sie mit 1:100 Medium (Ham's F 12 10 % FKS hormonfrei) verdünnt und der pH-Wert im Überstand bestimmt.

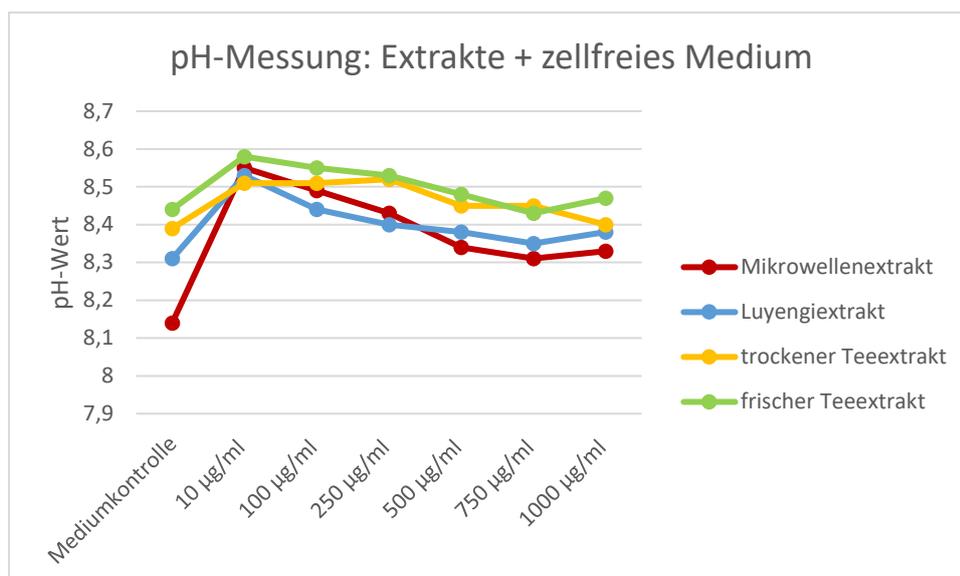


Abbildung 58: Einfluss von Mikrowellen- und Luyengiextrakt, trockenem und frischem Teeextrakt aus Sanddornblättern in verschiedenen Konzentrationen (Medium: Ham's F 12 10 % FKS hormonfrei) auf den pH-Wert, Vergleich mit der Mediumkontrolle, n=1

Während die pH-Werte der Mediumkontrolle zwischen 8,14 bis 8,44 liegen, sind die extrakthaltigen Proben basischer. Von initial 8,51 bis 8,58 bei der Konzentration 10 µg/ml scheinen sich die pH-Werte mit zunehmenden Konzentrationen der Extrakte wieder denen der Mediumkontrolle anzunähern: Bei 1000 µg/ml liegen sie zwischen 8,33 und 8,47 (Abbildung 58).

4.7.3 Wirkung der Positivkontrollen auf die Mammazellen

Zur Beurteilung des Einflusses der Positivkontrollen Tamoxifen und 17β-Estradiol wurde der pH-Wert im Überstand nach 24-stündiger Inkubation der Mammazelllinien mit den beiden Substanzen bestimmt. Der pH-Wert wurde durch 1 % Tamoxifen ($5,63 \times 10^{-2}$ mg/ml) bei keiner der getesteten Zelllinien signifikant verändert (Abbildung 59). Dagegen nahm der pH im Überstand bei 1 % 17β-Estradiol ($2,7 \times 10^{-7}$ mg/ml) im Vergleich zur Negativkontrolle bei der Zelllinie BT-20 von 7,77 auf 7,53 ab ($p < 0,05$), bei den anderen getesteten Überständen ergab sich kein Unterschied (Abbildung 60).

Ergebnisse

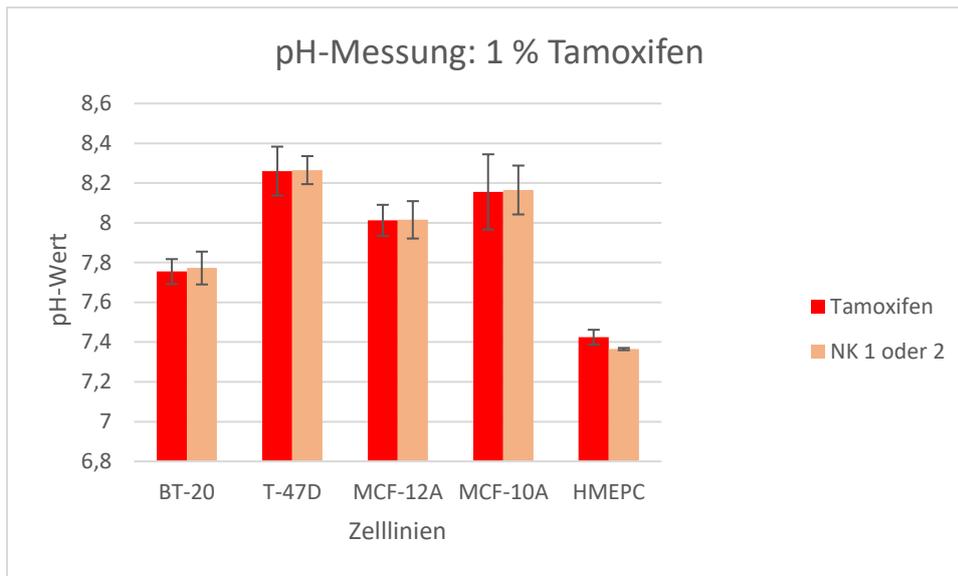


Abbildung 59: Einfluss von 1 % Tamoxifen auf den pH-Wert im Überstand der Mammazelllinien. Mittelwert mit Standardabweichung, bezogen auf die Negativkontrolle (NK) 1 (Teextrakte) und 2 (Mikrowellen- und Luyengiextrakt) (=100%), $n = 4$.

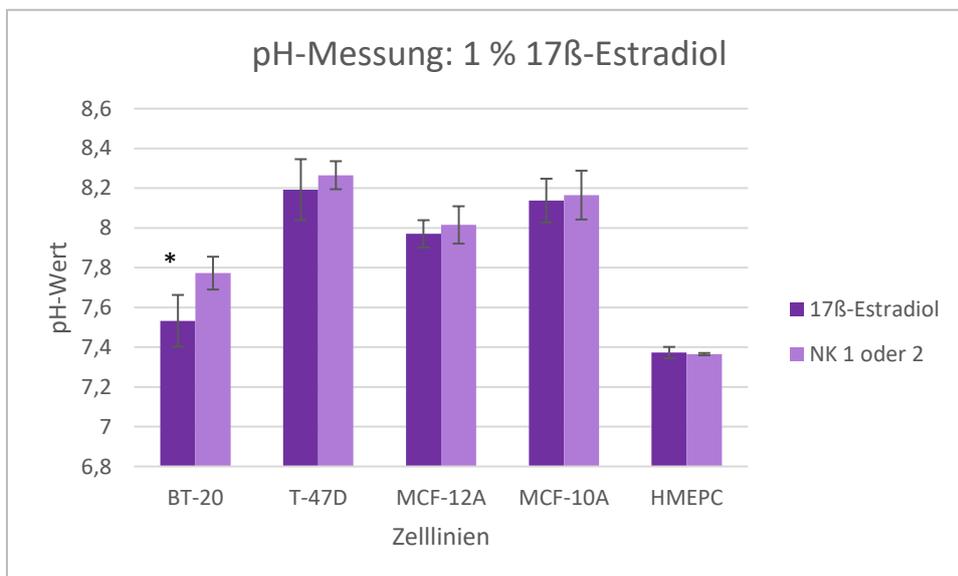


Abbildung 60: Einfluss von 1 % 17 β -Estradiol auf den pH-Wert im Überstand der Mammazelllinien. Mittelwert mit Standardabweichung, * = signifikante Wirkung ($p < 0,005$), bezogen auf die Negativkontrolle 1 (Teextrakte) und 2 (Mikrowellen- und Luyengiextrakt) (=100%), $n = 4$.

5 Diskussion

Das Mammakarzinom ist weltweit eines der am häufigsten vorkommenden Karzinome (Benson und Jatoi 2012). Auffällig sind dabei unterschiedliche Inzidenzen in Asien und den westlichen Ländern, die von vielen Wissenschaftlern auf die günstige traditionelle pflanzenbasierte Nahrung in den asiatischen Ländern zurück geführt wird, die reich an sekundären Pflanzenstoffen ist (Messina 2016). Die Gruppe der in der Nahrung am stärksten vertretenen sekundären Pflanzenstoffe sind die Flavonoide (Deutsche Gesellschaft für Ernährung 2012), deren Wirkung unter anderem auch über die Östrogenrezeptoren (ER) vermittelt wird und denen eine Risikoreduktion für die Entwicklung eines Mammakarzinomes zugeschrieben wird (Virgili et al. 2004). Eine besonders flavonoidreiche Pflanze ist der einheimische Sanddorn (Wani et al. 2016). Diese Arbeit zeigt die Wirkung von Sanddornblätterextrakten, die nach unterschiedlichen Extraktionsmethoden auf wässriger oder nicht-wässriger Basis hergestellt wurden, auf Mammazelllinien. Betrachtet werden dabei maligne und benigne Zelllinien, die jeweils positiv oder negativ für Östrogenrezeptoren (ER) und Progesteronrezeptor (PR) sind. Untersucht wurden hierbei die Rezeptorausprägung der Zellen mittels Immunhistochemie, die Zellproliferation mit dem BrdU-Test und verschiedene metabolische Parameter wie Glukoseaufnahme, oxidativer Stress und pH-Wert unter Extrakteinwirkung. Als Kontrollsubstanzen kamen 17β -Estradiol und Tamoxifen zum Einsatz. Im folgenden Kapitel sollen die Ergebnisse interpretiert, unter dem Gesichtspunkt der aktuellen Forschung eingeordnet und hinsichtlich ihrer potentiellen Eignung zur adjuvanten Therapie oder Prävention bei dem Mammakarzinom bewertet werden.

5.1 Expression der Östrogen- und Progesteronrezeptoren

Die Ausprägung von Östrogen- oder Progesteronrezeptoren ist für die Behandlung eines Mammakarzinoms von sehr hoher Bedeutung. Eine Expression bedeutet, dass die Hormone das Wachstum der Karzinomzellen beeinflussen können und somit an dieser Stelle die Möglichkeit für eine pharmakologische Intervention besteht. So gehen hormonrezeptorpositive Tumoren mit einer besseren Prognose einher. 50-60 % der prämenopausalen und 70-80 % der postmenopausalen Brustkrebspatientinnen haben ein rezeptorpositives Mammakarzinom, damit leiden im Umkehrschluss jüngere Patientinnen

häufiger an einem rezeptornegativen Karzinom mit schlechterer Prognose (Stauber und Weyerstahl 2007).

Da man annimmt, dass die Wirkung von Flavonoide zumindest teilweise über die Östrogenrezeptoren vermittelt wird, wurde bei der vorliegenden Arbeit der qualitative Nachweis einer Rezeptorexpression mittels Immunhistochemie erbracht. Hierbei dient die Stärke der Rotfärbung als Äquivalent für die Häufigkeit der jeweiligen Rezeptoren in der Zelle. Es kam in Übereinstimmung mit den Angaben in der Literatur und der jeweiligen Bezugsquelle bei den malignen Brustzelllinien MCF-7 und T-47D, der benignen MCF-12A und der Mammanormalzelllinie HMEPC zu einer starken Rotfärbung und damit zu einer nachgewiesenen Ausprägung von ER- α , ER- β und PR (Prat et al. 2013; Marchese und Silva 2012). Lediglich bei MCF-12A war bei dem PR nur eine leichte Rotfärbung und damit schwache Rezeptorausprägung nachzuweisen. Die maligne Mammazelllinien BT-20 und die benigne Mammazelllinie MCF-10A sind rezeptornegative Zellen, somit zeigte sich bei der Anfärbung der ER- α , ER- β und PR keine (MCF-10A) bzw. nur sehr schwache (BT-20) Rotfärbung (siehe Abbildung 16-Abbildung 21) (Subik et al. 2010; Marchese und Silva 2012). BT-20 weist zwar keine Östrogenrezeptoren, aber eine Ausprägung der Östrogenrezeptor-mRNA mit einer Deletion von Exon 5 auf (ATCC 2016a). Für die vorliegenden Versuche wurden sowohl rezeptorpositive als auch –negative Zellen untersucht, um die rezeptorassoziierten Wirkungen enthaltener Flavonoide in den Extrakten mit den nicht-Östrogenrezeptor vermittelten Wirkungen der Extrakte zu vergleichen.

5.2 Wirkung von 17 β -Estradiol und Tamoxifen auf die Zellen

Für die Untersuchung der Wirkung der Extrakte auf die Mammazelllinien wurden jeweils 1 % Tamoxifen $5,63 \times 10^{-2}$ mg/ml und 1 % Estradiol $2,7 \times 10^{-7}$ mg/ml als Positivkontrollen mitgeführt, um die Ergebnisse später besser einordnen zu können. In der Vergangenheit wurde der Zusammenhang zwischen erhöhtem Östrogenlevel im Blut und erhöhtem Risiko, ein Mammakarzinom zu entwickeln, mehrfach nachgewiesen (Cauley et al. 1999; Dorgan et al. 1996; Toniolo et al. 1995; Tamimi et al. 2007; Hankinson et al. 1998). Dies impliziert, dass Östrogene auf Mammakarzinomzellen nicht zytotoxisch, sondern eher zellproliferativ wirken. Tamoxifen dagegen ist ein selektiver Östrogenrezeptormodulator (SERM) und wird wegen

seiner antagonistischen Wirkung und damit antiproliferativen Wirkung am α -ER zur Behandlung des Mammakarzinoms eingesetzt.

Einhergehend mit diesen Vorüberlegungen zeigte sich beim LDH-Zytotoxizitätstest bei den rezeptorpositiven Mammazelllinien MCF-7 mit 101,66 % und MCF-12A mit 102,57 % (Abbildung 23) eine starke Zytotoxizität unter Tamoxifen, die mit der Zytotoxizität von Triton vergleichbar war. Andere Zelllinien als diese beiden wurden nicht mit dem LDH-Test untersucht, da bei dieser Messung der Zellüberstand verwertet wird und die Farbe der Extrakte einen zu großen Einfluss auf die Messergebnisse der photometrischen Messung hatte (siehe Abbildung 22). Bei der Zellproliferationsuntersuchung mittels BrdU-Test zeigte sich bei den rezeptorpositiven Zelllinien (MCF-7 [Abbildung 24], T-47D [Abbildung 26], MCF-12A [Abbildung 27]) genauso wie für die rezeptornegativen Zelllinien (BT-20 [Abbildung 25], MCF-10A [Abbildung 28]) eine signifikante starke Einschränkung der Zellproliferation auf nur noch 13 bis 36 % ($p \leq 0,05$). Dieses steht im Einklang mit den eingangs erwähnten rezeptorassoziierten und nicht-rezeptorassoziierten Wirkungen von Tamoxifen auf Mammazelllinien. Bei der Mammanormalzelllinie HMEPC (Abbildung 29) scheint Tamoxifen in den vorliegenden Versuchen dagegen eine Zunahme der Proliferation auf ca. 161 % zu verursachen. Dies steht im Gegensatz zu der beschriebenen Wirkung von Tamoxifen, welches sogar zur Prävention von Brustkrebs eingesetzt werden kann. So fanden Pierce et al. und Metcalfe et al. heraus, dass die Gabe von Tamoxifen bei Mammakarzinompatientinnen mit BRCA1 bzw. -2-Mutation, das Risiko, an einem kontralateralen Karzinom zu erkranken, um 69 % bzw. 38 % senken kann (Pierce et al. 2006; Metcalfe et al. 2004). Allerdings steigt unter Tamoxifen-Therapie auch das Endometriumkarzinomrisiko um 40 %, weshalb es nicht unbedenklich verschrieben werden sollte (Mandlekar et al. 2001). In den vorliegenden Versuchen kann eine Proliferationssteigerung durch Tamoxifen bei HMEPC nur durch einen Messfehler erklärt werden, der wahrscheinlich durch eine geringere Proliferationsrate bei einer genetisch nicht veränderten Mammazelllinie bedingt ist. In der lichtmikroskopischen Beurteilung der Zellmorphologie der MCF-7-Zelllinie (Abbildung 33) zeigte sich nach Tamoxifeneinwirkung eine deutliche Zellschädigung im Sinne einer Zelldestruktion. Eine Spezifizierung, ob es sich hierbei um Apoptose oder Nekrose handelt, kann allein aus den Bildern nicht entnommen werden. Hierfür wäre eine Untersuchung zum Apoptoseverhalten der Zellen mittels Durchflusszytometrie hilfreich. Zu vermuten ist aber die Einleitung einer Apoptose, da aus der Literatur bekannt ist, dass Tamoxifen bei Hormonrezeptor-positiven und

–negativen Zellen eine solche auszulösen vermag (Mandlekar et al. 2001). Hierbei spielen die eingangs erwähnten Wirkmechanismen des Tamoxifens eine wesentliche Rolle. Bei der Apoptose handelt es sich um einen programmierten Zelltod, bei dem die Zellen schrumpfen, die DNA fragmentiert wird und die Zellmembran in kleine Vesikel aufgelöst wird, im Gegensatz zu der Nekrose, bei der durch Ausschüttung des zellulären Inhaltes in der Folge eine Entzündungsreaktion in der Umgebung entsteht (Löffler 2008). Außer bei der Zelllinie MCF-7 senkt Tamoxifen bei den Zelllinien die Glukoseaufnahme auf 34-75 % (Abbildung 47), was mit einem verringerten Gesamtstoffwechsel und Transportfähigkeit zu erklären ist. Bei erhöhter Zytotoxizität kommt es zur Apoptose der Zellen und damit zu weniger stoffwechselaktiven Zellen. Die Ergebnisse für die Messung des oxidativen Stresses (Abbildung 51) sind mit Werten um 0,107 bis 0,607 nmol sehr niedrig und damit gegenüber dem Grenzwert von 40 nmol vernachlässigbar gering.

Bei den Zelllinien BT-20, T-47D, MCF-12A, MCF-10A und HMEPC (Abbildung 59) wurden bei der pH-Messung nach Tamoxifen-Inkubation für 24 h mit der Negativkontrolle vergleichbare Werte gemessen. Es deutet also nichts darauf hin, dass selbst bei deutlicher Proliferationseinschränkung oder sogar Zytotoxizität unter Tamoxifen eine Änderung des pH-Wertes erreicht wird. Dieser ist also nicht geeignet, eine Metabolismusänderung unter Tamoxifen nachzuweisen.

Unter Einwirkung von 1 % 17β -Estradiol $2,7 \times 10^{-7}$ mg/ml zeigten sich bei den durchgeführten Versuchen bei dem LDH-Test für MCF-7 mit 7,19 % und für MCF-12A mit 1,44 % (Abbildung 23), wie erwartet, eine vernachlässigbar geringe Zytotoxizität. Dagegen schien Estradiol bei allen Zelllinien eine leichte Steigerung der Zellproliferation zu bewirken, die bei MCF-7, BT-20, T-47D und MCF-12A (Abbildung 31) mit 107 % bis 115 % sogar statistisch signifikant war ($P \leq 0,05$). Auch die lichtmikroskopische morphologische Beurteilung der MCF-7 Zellen (Abbildung 34) zeigte mit der Negativkontrolle 2 vergleichbare Zellen. Es waren keine Hinweise auf eine Destruktion erkennbar. Die Platzreserven waren sogar vermindert, was auf die gesteigerte Proliferation zurückzuführen ist. Die Glukoseaufnahme steigerte sich für die Zelllinien BT-20, T-47D und MCF-10A auf 108 % bis 116 % (Abbildung 48) gegenüber der Negativkontrolle 1 oder 2, die als Referenzwert mit 100 % angesetzt wurde, was mit einem erhöhten Glukoseverbrauch bei erhöhtem Energieaufwand wegen gesteigerter Zellproliferation

erklärbar ist. MCF-7 zeigte mit 168 % einen so deutlich erhöhten Wert, dass in Hinsicht auf einen ähnlich hohen Wert bei der Tamoxifen-Positivkontrolle mit dort 157 % und unter Extrakteinwirkung mit 250 µg/ml trockenem Teeextrakt mit einer Glukoseaufnahme von 291 % Zweifel an der Messung bestehen müssen. Für die Zelllinien MCF-12A mit 73 % und HMEPC mit 86 % zeigt sich eine leichte Reduktion der Glukoseaufnahme. Bei trotzdem nachweisbarer erhöhter Zellproliferation beider Zelllinien kann dieser Umstand damit erklärt werden, dass die Zellen ab einem bestimmten Zeitpunkt ihre räumlichen Kapazitäten aufbrauchen. Von da an verbrauchen sie weniger Ressourcen und nehmen damit auch weniger Glukose auf. Bei der Messung der H₂O₂-Konzentration (Abbildung 52) zeigten sich für die Hormonrezeptor-negativen Zelllinien BT-20 und MCF-10A, sowie für die Hormonrezeptor-positive Zelllinie MCF-7 keine Abweichungen gegenüber der Negativkontrolle 1 oder 2. Für die Rezeptor-positiven Zelllinien MCF-12A und HMEPC scheint sich ein geringfügig erniedrigter oxidativer Stress zu ergeben und für T-47D ein geringfügig erhöhter Stress, allerdings bleiben alle diese Werte deutlich unter der Grenze von 40 nmol. Die individuellen Werte sind mit den jeweiligen Reaktionen der Zellen erklärbar, wenn diese aufgrund erhöhter Proliferation vermehrt die vorhandenen Antioxidantien verbrauchen. Dies sind sowohl intrazelluläre antioxidative Enzyme, wie Katalase, Glutathionperoxidase und Superoxiddismutase und nicht enzymatische Antioxidantien, wie Vitamin E, C und A, Flavonoide, Albumin, Glutathion, Thioredoxin, Harnsäure, Polyphenole und Metallionen-Chelatoren (Nourazarian et al. 2014). Karzinomzellen haben höhere Level an ROS (*reactive oxygen species*), zu denen auch H₂O₂ gehört, und eher niedrige Level an Enzymen, die freie Radikale einfangen (Gwin et al. 2011). Damit ist das Redoxsystem in Tumoren recht instabil und kann bei veränderten Anforderungen schnell kippen. Dies machen sich auch unterschiedliche Therapieoptionen, wie z. B. die Bestrahlung oder Chemotherapeutika, zunutze, indem sie über die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies DNA-Schäden verursachen und so die Apoptose induzieren (Sattler et al. 2007). Watson vertritt die These, dass die Einnahme von Nahrungsergänzungsmitteln, die reich an Antioxidantien sind, sogar eine Therapieresistenz der jeweiligen Tumoren verursachen und damit das Fortschreiten der Krebserkrankung beschleunigen könnten (Watson 2013).

Auf der anderen Seite spielt Sauerstoffperoxid auch bei der Entstehung verschiedener Krankheiten eine wichtige Rolle. So konnten Zusammenhänge zu der Entstehung von Asthma, Arthritis, Atherosklerose, diabetischer Vaskulopathie, Osteoporose und neurodegenerativen

Erkrankungen hergestellt werden (BioVision 2014). Nicht zuletzt die Tumorentstehung und damit auch die Entwicklung von Brustkrebs konnte in vorhergehenden Studien auf ein Ungleichgewicht im Redoxstatus der Zellen zurückgeführt werden (Nourazarian et al. 2014).

Bei der pH-Messung im Zellüberstand unter Einfluss von 17β -Estradiol (Abbildung 60) zeigten sich bei allen Zelllinien, außer der HMEPC, gegenüber der Negativkontrolle 1 oder 2 geringfügig saurere Werte, was mit einem erhöhten Metabolismus und damit vermehrtem Anfall von sauren Stoffwechselendprodukten bei erhöhter Zellproliferation zu erklären ist.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Zellen auf das Tamoxifen, wie zu erwarten war, mit erhöhter Zytotoxizität und verringerter Zellproliferation und auf das 17β -Estradiol mit geringer Zytotoxizität und vermehrter Zellproliferation reagierten. Dabei zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen malignen und benignen Zellen sowie ER-positiven und –negativen Zellen. Die metabolischen Untersuchungen konnten keine eindeutigen Aussagen liefern. Hier spielten sicherlich geringe Fallzahlen und damit eine höhere Fehleranfälligkeit eine große Rolle.

5.3 Die Wirkungen der Extrakte auf die Zellen

5.3.1 Vergleich der Extrakte aus Mikrowellen-, Luyengi-, trockener Tee- und frischer Teeextraktherstellung

Für die Extraktherstellung wurden Laubblätter des Sanddorns (*Hippophae rhamnoides*) genutzt, der aufgrund seiner positiven Eigenschaften schon lange als Heil- und Futtermittel genutzt wird. In der Volksheilkunde wurden überwiegend Früchte und Samen genutzt, aber in letzter Zeit sind auch die anderen Bestandteile der Pflanze in den Fokus der Wissenschaft geraten. Zwar scheinen die Früchte mehr Antioxidantien zu enthalten als die anderen Bestandteile der Pflanze, aber die Blätter fallen bei der Ernte mit an (Li et al. 1996). Den Hauptteil der sekundären Pflanzenstoffe in den Blättern machen die Flavonoide aus, die zu den Polyphenolen gehören. Allgemein haben der Erntezeitpunkt, Erntejahr und Wachstumsort einen Einfluss auf den Wirkstoffgehalt der Pflanzen (Wang H et al. 1994). Der Phenolgehalt der Blätter schwankt aber auch je nach Extraktionstechnik zwischen 28,35 mg/g und 86,7 mg/g (Wani et al. 2013). Ein Pflanzenextrakt ist dabei immer ein Stoffgemisch aus der Gesamtheit der Wirkstoffe, die durch unterschiedliche Extraktionsverfahren variieren

können (Kraft und Stange 2010). Dem entsprechend liegen bei einem wässrigen Extrakt überwiegend hydrophile und kaum lipophile Inhaltsstoffe vor, bei der Methanolextraktion nach Luyengi oder durch die Mikrowelle können auch lipophile Stoffe gelöst werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Mikrowellenextraktion einen höheren Gehalt an Phenolen und eine stärkere antioxidative Aktivität als beispielsweise Soxhlet-, ultraschallunterstützte - und Mazerationstechnik erreichen kann (Sharma et al. 2008). Bei der Untersuchung durch Maheshwari et al. konnte einem Sanddornblattextrakt, der, ähnlich der Luyengi-Methode, mittels Ethylacetat an Phenolen angereichert wurde, eine erhöhte antioxidative und hepatoprotektive Wirkung nachgewiesen werden, die überwiegend auf den Flavonoidgehalt zurückzuführen war (Maheshwari et al. 2011). Ein wässriger Extrakt, der aus getrockneten Sanddornblättern hergestellt wird, enthält immer noch 72 % an Phenolen und Flavonoiden verglichen mit einem ethanolischen Extrakt (Upadhyay et al. 2010). Aber auch der vorhergehende Trocknungsvorgang kann im Gegensatz zu dem Frischmaterial den Gehalt an Phenolen schon senken, da diese flüchtigen Substanzen im gleichen Ausmaß, wie die Temperaturen während des Trocknungsvorganges zunehmen, abnehmen. So enthält ein Extrakt, der aus getrockneten Sanddornblättern hergestellt wurde 34 bis 45 mg/g Trockenmasse und einer aus frischen Blättern 59 mg/ g Äquivalenztrockenmasse (Guan et al. 2005). Ausgehend von diesen Vorüberlegungen können auch bei den Zelluntersuchungen ähnlich ausgerichtete, doch unterschiedlich ausgeprägte Ergebnisse, je nach verwendetem Extrakt, erwartet werden. Aus der Literatur sind die Inhaltsstoffe für aus Sanddornblättern hergestellte Extrakte bekannt (siehe Tabelle 1), aber für die genaue Analyse der Inhaltsstoffe in der vorliegenden Arbeit wäre beispielsweise eine Pyrolyse-Feldionisation Massenspektrometrie sinnvoll gewesen.

Die Untersuchung zur Zellproliferation zeigte für beide wässrigen Extrakte bei den malignen Zellen keine Einschränkung der Zellproliferation, bei den Mikrowellen- und Luyengiextrakten war dies zumindest bei der ER-negativen BT-20 – Zelllinie der Fall, auf die malignen rezeptorpositiven T-47D und MCF-7 war auch hier keine einschränkende Wirkung feststellbar (Abbildung 24-Abbildung 26). Bei den benignen Zelllinien MCF-12A, MCF-10A und HMEPC (Abbildung 27-Abbildung 29) zeigte sich für alle Extrakte eine konzentrationsabhängige Minderung der Zellproliferation. Die Wirkung des Luyengiextraktes war stärker ausgebildet als die des Mikrowellenextraktes. Danach folgten in der Wirksamkeit die wässrigen Teeextrakte.

In den schwächeren Konzentrationen wirkte hier der trockene Teeextrakt stärker und in den stärkeren Konzentrationen der frische Teeextrakt.

Eine Hemmung der Glukoseaufnahme durch die Extrakte ist am eindrücklichsten bei der malignen, rezeptorpositiven T-47D-Zelllinie (Abbildung 43) zu sehen. Hier scheinen die nicht-wässrigen Extrakte untereinander eine ähnliche und gegenüber den wässrigen Extrakten eine stärkere Wirkung zu haben. Bei den beiden Zelllinien MCF-7 (Abbildung 41) und MCF-10A (Abbildung 45) scheint der trockene Teeextrakt im Gegensatz zu den restlichen Extrakten eine Steigerung der Glukoseaufnahme zu verursachen. Es würde sich hier eine nähere Betrachtung dieses Extraktes anbieten.

Bei den Messungen zum pH-Wert (Abbildung 53-Abbildung 57) liegen alle Messungen im eher alkalischen Bereich ($\text{pH} > 7$), es gibt allerdings Unterschiede zwischen den Extrakten, so scheint der Mikrowellenextrakt weniger alkalisch zu sein als die anderen Extrakte. Dies bestätigt sich auch in der Messung, in der nur Extrakte im zellfreien Medium gemessen wurden (Abbildung 58). Die Ausgangs-pH-Werte liegen hier weiter im alkalischen Bereich (zwischen 8,3 und 8,6).

Bei der Messung des oxidativen Stresses liegen alle Extrakte etwa gleichauf und scheinen ab der Konzentration von 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eine Zunahme der H_2O_2 -Konzentration zu bewirken. Wenn man sich allerdings im Vergleich die Messung der Extrakte in gleicher Verdünnung im zellfreien Medium ansieht (Abbildung 49), dann wird deutlich, dass die gemessene H_2O_2 -Konzentration bereits durch die Extrakte zustande kommt und nicht Folge der Wirkung auf die Zellen ist. Laut dem Test-Kit von BioVision sind solche Ergebnisse in einigen Fällen auch mit interferierenden Substanzen, die in der Probe enthalten sind, in Zusammenhang zu bringen. Eine im Extrakt wahrscheinlich in hohem Ausmaß enthaltene Substanz ist das Chlorophyll, es liegt also der Verdacht nahe, dass dieses eine Fehlmessung bedingen könnte (BioVision 2014). Dieser Test scheint also nicht geeignet für die Beurteilung der vorliegenden Extrakte. Ähnlich verhält es sich auch bei den LDH-Messungen, die nur bei den Zelllinien MCF-7 und MCF-12A durchgeführt wurden und dann aufgrund einer zu starken Auswirkung der Testsubstanz auf die Messqualität abgebrochen wurden. Hier zeigten sich bei der Messung auch ähnliche Werte für die Wirkung der Testsubstanz auf die Zellen und eine Messung ohne Zellen (Abbildung 22). Gründe hierfür können laut Hersteller darin liegen, dass in der Testsubstanz selbst LDH enthalten ist, oder der Test anderweitig mit der Testsubstanz interferiert (Roche July 2005).

Auffällig ist, dass bei diesem Test eine kolorimetrische Analyse des Zellüberstandes bei bestehendem Zellverband mit möglicherweise abgesunkenen Farbstoffpartikeln aus dem jeweilig verwendeten Extrakt erfolgte. Um diesen Umstand zu umgehen, könnte man möglicherweise einen Test verwenden, der nicht mit dem Zellüberstand arbeitet, oder durch Waschschriffe ein Auswaschen der Extraktückstände ermöglicht. Dieses Vorgehen wäre analog zu dem BrdU-Test, bei dem durch mehrere Waschschriffe ein Interferieren der Testsubstanz mit der Messmethode verhindert wurde. Einen Nachweis hierzu liefert Abbildung 30. Auch die moderneren Labortests, die auf Lumineszenzmessung basieren, könnten eine Alternative darstellen (Promega März 2016). Auch eine Reinigung des Extraktes von interferierenden Farbstoffen wäre denkbar, allerdings kann man diese Substanzen nicht genau benennen und außerdem besteht ein Pflanzenextrakt immer aus der Gesamtheit seiner Pflanzenwirkstoffe und kann auch nur in dieser in seiner Wirksamkeit beurteilt werden (Kraft und Stange 2010).

Von den Versuchen zum oxidativen Stress und zur Zytotoxizität abgesehen, scheint, einhergehend mit den Vorüberlegungen, wie bei Upadhyay et al. und Maheshwari et al., eine Anreicherung des Phenolgehaltes im Sinne einer Ausschüttelung mit Ethylacetat, wie bei der Luyengi-Extraktionsmethode, eine maximale Anreicherung der Inhaltsstoffe erreicht zu werden. Dieser Umstand wurde in der vorliegenden Arbeit anhand der maximalen Wirkung durch den Luyengiextrakt indirekt dargestellt. Auch im Mikrowellenextrakt wurde durch die Verwendung von Methanol als Lösungsmittel eine etwas erhöhte Wirkstoffkonzentration gegenüber den beiden wässrigen Teeextrakten erreicht. Diese wirken zwar nur an den benignen Zelllinien zellproliferationshemmend, weisen damit aber von der Art der Wirkung ein ähnliches, nur schwächeres, Wirkprofil auf wie die nicht-wässrigen Extrakte. Damit ist davon auszugehen, dass sie die selben Inhaltsstoffe, allerdings in geringerer Konzentration enthalten. Dies steht auch in Übereinstimmung mit Angaben aus der Literatur (Upadhyay et al. 2010; Maheshwari et al. 2011).

5.3.2 Vergleich von Tumorzellen und nicht entarteten Zellen

Sanddornblätter enthalten einen hohen Anteil an Flavonoiden (Wani et al. 2016). In vorhergehenden Untersuchungen wurde gezeigt, dass Flavonoide in verschiedener Hinsicht positive Auswirkungen auf die Gesundheit haben. So untersuchten Knekt et al. in der finnischen Bevölkerung den Zusammenhang zwischen der Flavonoidzufuhr durch die

Nahrungsaufnahme und der Inzidenz und Mortalität verschiedener chronischer Erkrankungen, wie kardiovaskuläre Erkrankungen, Lungen- und Prostatakarzinom, Asthma und Diabetes Typ 2. Die Forscher kamen zu dem Ergebnis, dass das Risiko für diese Erkrankungen bei erhöhter Flavonoidzufuhr sinkt (Knekt et al. 2002). Auch eine italienische Studie, die sich mit der Flavonoidzufuhr und dem Risiko für die Entstehung von Brustkrebs befasste, kam zu einem ähnlichen Ergebnis (Bosetti et al. 2005). Speziell der Sanddornblattextrakt hat in Tiermodellen einen hepatoprotektiven Effekt (Maheshwari et al. 2011).

Auch wenn also vieles darauf hin weist, dass Flavonoide eine durchweg positive Auswirkung auf die Gesundheit haben, muss bei einem potentiellen Wirkstoff gegen maligne Mammakarzinomzellen immer auch die Wirkung auf benigne Mammazellen untersucht werden, um eine Proliferationssteigerung und damit Entartungstendenz auszuschließen. In den vorliegenden Versuchen zeigte sich für die malignen Zelllinien MCF-7 (Abbildung 24), BT-20 (Abbildung 25) und T-47D (Abbildung 26) allerdings nicht, wie erwartet, eine Abnahme der Zellproliferation in höheren Konzentrationen. Im Gegenteil: Einige Extraktkonzentrationen bewirkten sogar eine Zunahme der Proliferation, allerdings nur selten signifikant. Dies scheint ein Widerspruch zu den Angaben in der Literatur zu sein, dass das aus Sanddornblättern isolierte Flavonoid Isorhamnetin auf Zellen aus einem hepatozellulären Karzinom zytotoxisch wirkt (Teng et al. 2006). Allerdings ist bekannt, dass Monosubstanzen anders wirken können als ein Extrakt, in dem sie u. a. enthalten sind (Kraft und Stange 2010). Auf die benignen Zelllinien MCF-12A (Abbildung 27), MCF-10A (Abbildung 28) und HMEPC (Abbildung 29) dagegen wirkten alle Extrakte ab jeweils unterschiedlichen Konzentrationen zellproliferationshemmend, meistens sogar signifikant. Dieser Unterschied zwischen malignen und benignen Zellen kann in der Tumorbologie begründet sein, aufgrund derer maligne Zellen durch Ausschaltung von Antionkogenen oder Mutation von Protoonkogenen einen abnormalen Zellzyklus besitzen. Dieses führt zu einer ausgeprägten Zellvermehrung, Zellwachstum und verlängerter Zelllebenszeit (Löffler 2008). Dieses ausgeprägte Wachstum der malignen Zellen gegenüber den benignen Zellen hat möglicherweise dazu beigetragen, dass dieser Test durch methodische Fehler verfälscht wurde. Um die Wirkung des hormonhaltigen Mediums auf die Testung zu verringern, wurde nach einem Tag auf ein hormonfreies Medium gewechselt und dann weitere 24 h abgewartet. Dadurch, dass erst nach

einer zweitägigen Wachstumszeit die Extrakte zu den Zellen gegeben wurden, konnte bei den malignen Zelllinien durch stärkeres Wachstum als bei den benignen, eine so große Zellzahl im Well erreicht werden, dass bei anschließender Zugabe der Extrakte die Platzreserven nicht mehr ausreichten, um ein ausreichendes Wachstum für den Test zu ermöglichen. Dann führte dies zu einer falsch geringen Proliferation bei der Negativkontrolle, zu längeren Wartezeiten bis zum Farbumschlag beim BrdU-Test und damit einhergehend im Verhältnis zu falsch hohen Werten bei den Extrakten. Zusätzlich kann möglicherweise durch das zweitägige Wachstum die im Testkit empfohlene Zellzahl von 2×10^4 Zellen/Well überschritten worden sein, was zu einer hohen unspezifischen Bindung des Antikörper-Konjugates an die Zellen führen und damit ebenfalls falsch hohe Ergebnisse hervorrufen kann. Diese Möglichkeiten sind in der Fehleranalyse des Herstellers benannt (Roche August 2007). Außerdem sind die vorliegenden Untersuchungen zur Wirkung der Sanddornblätterextrakte auf Mammakarzinomzellen bisher erstmalig durchgeführte Experimente und können daher mit keiner bekannten Literatur verglichen werden. Es muss auch der Umstand erwogen werden, dass die Extrakte auf maligne Brustkrebszellen möglicherweise proliferativ wirken. Dass eine Proliferationssteigerung bei den benignen Zellen ausgeschlossen werden kann, deutet darauf hin, dass hier zumindest kein karzinogenesförderndes Potential vorliegt. In den hohen Konzentrationen tritt sogar eine signifikante Proliferationshemmung ein. Dieser Umstand ist in einem zellexperimentellen Untersuchungsansatz sehr eindrücklich, würde aber bei einer möglichen Therapie eines Menschen keine Rolle spielen, da derartige Konzentrationen am Organ nicht erreicht werden könnten.

Ein Test zur Zytotoxizität der Extrakte (LDH-Test) konnte wegen der starken Eigenfärbung der Extrakte nicht durchgeführt werden. Um aber eine Einschätzung der Zytotoxizität zu erhalten, erfolgte eine lichtmikroskopische Beurteilung der Zellmorphologie unter Einwirkung des Luyengiextraktes auf die maligne Zelllinie MCF-7 (Abbildung 35-Abbildung 40). Hier zeigten sich mit zunehmender Extraktkonzentration ein Auflösen der Zellverbände und eine Schädigung der Zellen, welche anhand zunehmender Unschärfe, Vakuolisierung und Abrundung der Zellen sichtbar wurde und ab einer Konzentration von 500 µg/ml mit der Morphologie bei Tamoxifen-Einwirkung vergleichbar war. Diese dadurch zu vermutende Zytotoxizität und damit auch Einschränkung der Proliferation konnte im BrdU-Test nicht nachgewiesen werden, beziehungsweise besteht mit einer hier dargestellten Zunahme der

Zellproliferation unter Luyengiextrakt bei MCF-7 (Abbildung 24) auf 144 % bei 500 µg/ml ein starker Gegensatz.

Bei der Glukoseaufnahme zeigte sich für die malignen Zellen keine einheitliche Entwicklung unter Extrakteinwirkung. Während für die MCF-7 Zellen (Abbildung 41) eher eine Zunahme der Glukoseaufnahme gesehen wurde, nimmt diese bei BT-20 (Abbildung 42) und T-47D (Abbildung 43) ab einer Konzentration von 750 µg/ml ab. Diese Umstände können auf verschiedene Arten erklärt werden: Einerseits steigt bei zunehmender Proliferationsleistung der Energieverbrauch, andererseits ist aber auch die Apoptose der Zellen ein energieverbrauchender Prozess und kann ebenso zur Aufnahmesteigerung für Glukose führen (Löffler 2008). Bei den benignen Zellen ist ebenfalls keine eindeutige Tendenz zu erkennen. Die Zelllinien MCF-12A (Abbildung 44) und MCF-10A (Abbildung 45) steigern bis zu einer Konzentration von 500 µg/ml die Glukoseaufnahme, die dann unterhalb des Wertes für die Negativkontrolle abfällt. Die HMEPC (Abbildung 46) zeigen eine konzentrationsabhängige Abnahme der Glukoseaufnahme. Wahrscheinlich spielt die gesteigerte Apoptose bei den niedrigen Konzentrationen, die den Energieverbrauch steigert, und die niedrige Zell-Lebendzahl bei den höheren Konzentrationen, die einen geringeren Verbrauch mit sich bringt, eine Rolle.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass trotz schon erfolgter Untersuchungen die Sicherheitsevaluation des Sanddornblattextraktes noch sehr rudimentär ist, da hier bisher nur tierexperimentelle Untersuchungen durchgeführt wurden und Untersuchungen zur Verträglichkeit beim Menschen noch ausstehen (Wani et al. 2016). Aus den vorliegenden Untersuchungen kann aber der Schluss gezogen werden, dass ein Einsatz von Sanddornblätterextrakt zwar bei nicht entarteten Zellen keine negativen Effekte hervorruft, diese aber bei malignen Zellen nicht sicher ausgeschlossen werden können und somit hier ein weiterer Klärungsbedarf besteht. Da hier Widersprüche zwischen den verschiedenen Testmethoden bestehen, sollte eine Extraktfarben-unabhängige Messmethode, beispielsweise mittels Lumineszenzmessung, gewählt werden.

5.3.3 Vergleich von ER-positiven und ER-negativen Zellen

Es ist bekannt, dass nicht nur 17 β -Estradiol und andere Steroidhormone an den ER binden können, sondern auch diverse andere synthetische oder natürlich vorkommende Substanzen, wie z. B. DDT oder Phytoöstrogene (Matthews et al. 2000). Auch für das Flavonoid Quercetin, das ebenso wie Kaempferol, Isorhamnetin und Epicatechin wesentlicher Bestandteil der bioaktiven Inhaltsstoffe der Sanddornblätter ist (Wani et al. 2016), wurde eine Interaktion mit den Östrogenrezeptoren nachgewiesen. So verglichen niederländische Forscher die Wirkungen von Quercetin, Genistein und 17 β -Estradiol auf die ER-positiven Mammakarzinomzellen MCF-7 und T-47D, die auch in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, mit den Wirkungen auf Rezeptor-negative Zellen (van der Woude et al. 2005). Quercetin übte nur auf die Rezeptor-positiven Zellen einen biphasischen Effekt aus. In niedrigen und damit physiologisch erreichbaren Konzentrationen wirkte es genauso zellproliferationssteigernd wie das Phytoöstrogen. In höheren Konzentrationen kam es zu einer Einschränkung der Zellproliferation. Außerdem hatte Quercetin eine, im Vergleich zu Estradiol, ausgeprägtere Wirkung am ER β als am ER α . Die Forscher zogen daraus den Schluss, dass Quercetin in niedrigeren Konzentrationen über den ER eine Proliferation auszulösen vermag und damit auch den Phytoöstrogenen zuzuordnen ist. In höheren Konzentrationen würden dann andere Mechanismen überwiegen, sodass es hier zu einer Proliferationseinschränkung kommt. Andererseits scheint *in-vivo* die Stimulierung des β -ER eine protektive Bedeutung zu haben, da nachweislich ein erhöhter Verzehr von Flavonoiden zu einem verringerten Risiko für die Entstehung eines Mammakarzinoms führt (Bosetti et al. 2005). Für die vorliegenden Versuche würde dies bedeuten, dass ein Wirkungsunterschied an Rezeptor-positiven und Rezeptor-negativen Brustkrebszellen durch den Sanddornextrakt auszulösen wäre.

Wenn man sich hierzu allerdings die Diagramme ansieht, fällt auf, dass bei den rezeptor-positiven malignen Zelllinien MCF-7 (Abbildung 24) und T-47D (Abbildung 26) die Zugabe der Sanddornblattextrakte in den niedrigen Konzentrationen die Zellproliferation nicht verändert und in hohen Konzentrationen sogar steigert. Für die Rezeptor-negative maligne Zelllinie BT-20 (Abbildung 25) zeigt sich in den höheren Konzentrationen zumindest für die nicht-wässrigen Extrakte eine nicht signifikante Abnahme der Zellproliferation. Bei den benignen Zellen dagegen, scheint kein Unterschied zwischen den Rezeptor-positiven MCF-12A

(Abbildung 27) und HMEPC (Abbildung 29) sowie der Rezeptor-negativen MCF-10A (Abbildung 28) zu bestehen. Die Extrakte wirken bei allen benignen Zelllinien mit zunehmender Konzentration vermehrt signifikant hemmend auf die Zellproliferation. Diese Ergebnisse lassen sich nicht unbedingt mit den Vorüberlegungen in Einklang bringen, aber da keine Extraktanalyse durchgeführt wurde, kann nicht auf den Gehalt von Quercetin und dessen Konzentration geschlossen werden, damit können auch die Ergebnisse nicht dahingehend eingeordnet werden, ob sie durch Quercetin oder einen der anderen Inhaltsstoffe hervorgerufen wurden. Zusätzlich wirken hier auch die anderen in den Extrakten enthaltenen bioaktiven Bestandteile, wie die Flavonoide Kaempferol, Isorhamnetin und Epicatechin, auf Östrogenrezeptoren in allen Konzentrationen eher hemmend. So soll Kaempferol auf die ER von MCF-7 Zellen inhibierend wirken (Kraft und Stange 2010; Hung 2004). Auch für die Flavonoide Isorhamnetin und Epicatechin konnten Aktivitäten am ER nachgewiesen werden (Breinholt und Larsen 1998). In der vorliegenden Arbeit zeigt sich *in vitro* eher keine Wirkung über den ER und somit kann keine Zuordnung der Flavonoide zu den Phytoöstrogen vorgenommen werden.

Für die Glukoseaufnahme unter Extrakteinwirkung gibt es unter Berücksichtigung des Rezeptorstatus, keinen eindeutigen Zusammenhang. Bei den malignen Zellen beobachtet man bei der Rezeptor-positiven MCF-7 eher eine Zunahme und bei den BT-20 und T-47D zuerst eine Zunahme und in höheren Konzentrationen eine Abnahme der Glukoseaufnahme. Ein ähnliches Profil weisen sowohl die Rezeptor-positiven benignen MCF-12A als auch Rezeptor-negative MCF-10A auf. Lediglich bei der HMEPC verringern die Extrakte konzentrationsabhängig die Glukose schon in den niedrigsten Konzentrationen. Es kann also nicht von einer Rezeptorabhängigkeit bei der Wirkung ausgegangen werden.

Bei der pH-Wert-Messung zeigen die Rezeptor-negativen Zelllinien BT-20 und MCF-10A entgegengesetzte Wirkungen: Bei BT-20 scheint der pH-Wert mit zunehmender Konzentration zuzunehmen und bei MCF-10A abzunehmen. Bei den Rezeptor-positiven Zelllinien zeigt sich für T-47D und MCF-12A ein Gleichbleiben oder geringes Abnehmen der Werte und für HMEPC eine leichte Zunahme.

Zusammenfassend bleibt zu sagen, dass Flavonoide zwar auch über die ER wirken können, dieses Wirkprinzip in den vorliegenden Versuchen aber nicht im Vordergrund steht. Hier ist

die Malignität ausschlaggebender als der Rezeptorstatus. Möglicherweise sind es auch andere Komponenten im Extrakt, die die Effekte verursachen. Eventuell sind die Flavonoide wenig an der Wirkung beteiligt. Ein wichtiger Umstand liegt hierfür sicherlich darin, dass es sich bei dem Sanddornblattextrakt um ein Stoffgemisch handelt.

5.4 Methodenkritik

Wie in den vorhergehenden Abschnitten angemerkt, ist eine Ergebnisdiskussion in der vorliegenden Arbeit nur im Zusammenhang mit einer ausführlichen Fehleranalyse und Methodenkritik sinnvoll.

Aus der Art der verwendeten Extraktionsmethode kann zwar auf den Gehalt an eher lipophilen oder hydrophilen Bestandteilen geschlossen werden, aber eine genaue Extraktanalyse erfolgte nicht, sodass eine Zuordnung der beobachteten Wirkung zu einem bestimmten Inhaltsstoff nicht erfolgen kann.

Der LDH-Zytotoxizitätstest war für den vorliegenden Versuchsaufbau nicht geeignet und wurde deshalb abgebrochen. Die Vermutung liegt nahe, dass die Extraktfarbe mit der photometrischen Messmethode interferierte (siehe Abbildung 22). Mögliche Alternativen wären hier ein Auswaschen der Extrakt rückstände, eine Verwendung moderner Labortests mit beispielsweise Lumineszenzmessung (Promega März 2016) oder eine Extraktreinigung, wie bereits oben erwähnt.

Der BrdU-Proliferationstest umgeht das Problem mit der Extrakteigenfarbe durch verschiedene Waschschrte. Aber teilweise wurden hier hohe Proliferationsraten gemessen, die z. B. durch Messfehler bei zu geringer Proliferationsrate erklärt werden können. Problematisch ist hier sicherlich auch die längere Wachstumsphase der Zellen durch Wechsel auf ein hormonfreies Medium nach einem Tag und erneuter Inkubation für 24 Stunden. Hiermit bestehen dann bei Extraktzugabe nur geringe Platzreserven für ein weiteres Wachstum und bei erhöhter Zellzahl ist die Wahrscheinlichkeit von unspezifischen Bindungen des Antikörperkonjugates erhöht (Roche August 2007).

Das Verfahren der lichtmikroskopischen Beurteilung der Zellen war ursprünglich nicht geplant und wurde als Pilotstudie an einer Zelllinie durchgeführt um die widersprüchlichen Ergebnisse der anderen Methoden besser einordnen zu können. Für eine standardisierte

Untersuchungsmethode eignet sie sich nicht. Die Änderungen der Morphologie können nur semiquantitativ und -quantitativ eingeordnet werden.

Die metabolischen Analysen (Glukosebestimmung, oxidativer Stress und Messung des pH-Wertes) wurden je nur einmal durchgeführt. Somit besteht eine erhöhte Fehlerwahrscheinlichkeit bei den Messungen.

Die Glukosemessung ergibt in einigen Fällen eine stark erhöhte Glukoseaufnahme, die nicht durch die zellphysiologischen Vorgänge erklärt werden können und damit einen Messfehler wahrscheinlich machen.

Die Bestimmung des oxidativen Stresses erbrachte für diese Arbeit keinen Zugewinn an Erkenntnissen. Alle gemessenen Werte befinden sich weit unter dem Grenzwert von 40 nmol/Well. Zusätzlich wurde in einer Kontrolle ersichtlich, dass eine Wertänderung bereits durch die Extrakte allein ohne Einwirkung auf die Zellen zustande kommt (siehe Abbildung 50). Hier ist wiederum ein Interferieren der Extrakte mit der photometrischen Messmethode, ähnlich der LDH-Messung, wahrscheinlich.

An der pH-Messung müssen Zweifel bestehen hinsichtlich der Aussagekraft der gemessenen Werte. Viele liegen weit im unphysiologisch alkalischen Milieu und sind damit in keiner Weise mit pH-Werten um 7,4, wie sie im menschlichen Organismus bestehen, vergleichbar.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Die Zunahme chronischer Erkrankungen wie Karzinome infolge des demographischen Wandels erfordert eine ständige Entwicklung neuer Präventivansätze und Heilmethoden. Bisherige Untersuchungen ergaben, dass eine flavonoidreiche Ernährung mit einer geringeren Brustkrebsinzidenz assoziiert ist. Der in der traditionellen Medizin vielfältig verwendete Sanddorn hat einen hohen Flavonoidgehalt, der in den Früchten zwar höher als in den Blättern ist, letztere können aber einfacher geerntet und verarbeitet werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde eine mögliche Wirkung von zwei wässrigen Extrakten aus frischen bzw. getrockneten Sanddornblättern und zwei lipophilen Extrakten (Mikrowellenextraktion, Extraktion nach Luyengi) auf Mammakarzinomzellen (MCF-7, BT-20, T-47D), genetisch modifizierte benigne Mammazellen (MCF-12A, MCF-10A) sowie auf eine gesunde humane Mammazelllinie (HMEPC) mit unterschiedlichem Hormonrezeptorstatus *in vitro* geprüft.

Der Hormonrezeptorstatus wurde mittels Immunhistochemie evaluiert. Der Einfluss der Extrakte auf die Zellproliferation wurde mit dem BrdU-Test und lichtmikroskopisch geprüft. Zudem wurden zur Evaluation der Wirkung des Extraktes auf den Zellmetabolismus Glukose, oxidativer Stress und pH-Wert gemessen.

Zwischen benignen und malignen Zelllinien fanden sich deutliche Wirkungsunterschiede. Der BrdU-Test ergab bei den benignen Mammazellen keine proliferative Wirkung, d. h. keinen Hinweis auf ein karzinogenes Potenzial. Bei den malignen Mammazelllinien zeigte sich z. T. eine proliferative Wirkung bei höheren Extraktkonzentrationen. In der lichtmikroskopischen Pilotstudie fand sich dagegen eine zunehmend zytotoxische Wirkung des Extraktes nach Luyengi auf die Hormonrezeptor-positive MCF-7-Zelllinie. Die lipophilen Extrakte, insbesondere der Extrakt nach Luyengi, waren hinsichtlich der Wirkstärke den beiden wässrigen Extrakten überlegen, zwischen denen sich nur geringe Unterschiede zeigten.

Die Untersuchungen zum Zellmetabolismus ergaben keine spezifischen Hinweise auf die Art der Wirkung des Extraktes. Auch der Hormonrezeptorstatus schien nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, da sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Rezeptor-positiven und -negativen Mammazelllinien fanden.

Zusammenfassung und Ausblick

Die Aussagen der verschiedenen Tests waren uneinheitlich. Hierfür verantwortlich sind u.a. auch methodische Fehler, so waren z. B. die Ergebnisse einiger kolorimetrischer Tests (LDH-Zytotoxizitätstest, MTT-Zellviabilitätstest) wegen der starken Eigenfarbe des Zellüberstandes nicht aussagefähig.

Um die Wirkung von Sanddornblätterextrakten insbesondere auf maligne Mammakarzinomzelllinien einschätzen zu können, sollten weitere Experimente mit geeigneteren Methoden durchgeführt werden. Hier bieten sich sowohl Zellviabilitäts- und Zytotoxizitätstests, beispielsweise auf der Basis von Lumineszenz- und Fluoreszenzmessungen, als auch Experimente mit höherwertigen Modellen an.

7 Thesen

1. In epidemiologischen Untersuchungen z. B. in Ostasien, wurden präventive Effekte einer flavonoidreichen Ernährung hinsichtlich kardiovaskulärer Erkrankungen, Karzinomen, Asthma bronchiale und Diabetes mellitus Typ 2 nachgewiesen.
2. In den Früchten und Blättern des Sanddornes sind hohe Konzentrationen der Flavonoide Quercetin, Isorhamnetin, Kaempferol und Epicatechin enthalten. Ein tumorpräventives Potenzial wird deshalb diskutiert.
3. Ein lipophiler Extrakt scheint einem wässrigen Extrakt von Sanddornblättern (frisch oder getrocknet) hinsichtlich des Wirkstoffgehaltes überlegen zu sein. Der Extrakt nach Luyengi war dabei dem Mikrowellenextrakt überlegen.
4. Lichtmikroskopisch ergaben sich bei einer Pilotstudie Hinweise auf eine zytotoxische Wirkung auf die Hormonrezeptor-positive Mammakarzinomzelllinie MCF-7 bei zunehmender Konzentration des Extraktes nach Luyengi.
5. Keiner der Extrakte zeigte bei benignen Mammazellen eine proliferative Wirkung.
6. Bei den Mammakarzinomzelllinien (MCF-7, BT-20, T-47D) konnten dagegen eine proliferative Wirkung und damit ein karzinogenes Potenzial der Extrakte nicht sicher ausgeschlossen werden.
7. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Hormonrezeptor-positiven und -negativen Zelllinien waren hinsichtlich der Proliferation nicht nachweisbar. Die Hormonrezeptor-Expression scheint bei der Wirkungsvermittlung der Extrakte damit nur eine geringe Rolle zu spielen.
8. Die zur näheren Charakterisierung der antiproliferativen Wirkung durchgeführten metabolischen Untersuchungen (Glukosebestimmung, Bestimmung des oxidativen Stresses und pH-Messung) waren nicht zielführend.
9. Sanddornblätterextrakte sollten aufgrund der bekannten Eigenschaften der enthaltenen Flavonoide weiter hinsichtlich ihrer potenziellen Nutzbarkeit zur Prävention und Therapie des Mamma-Karzinoms untersucht werden.
10. Hier sollten beispielsweise Lumineszenz- und Fluoreszenzmessungen durchgeführt werden, da wegen der intensiven Färbung der Extrakte kolorimetrische Messverfahren kaum aussagefähig sind.

Literaturverzeichnis

- Abutayeh A (2014) Die Wirkung der kommerziell erworbenen Flavonoide (Quercetin, Kaempferol und Chrysin) auf die malignen Mammakarzinomzellen (MCF7 und BT20) und die benignen veränderten Mammazellen (MCF10a und MCF12a) (Östrogenrezeptor positiv und negativ) in vitro. Promotionsschrift, Universität Rostock
- Adlercreutz H, Höckerstedt K, Bannwart C, Bloigu S, Hämäläinen E, Fotsis T, Ollus A (1987) Effect of dietary components, including lignans and phytoestrogens, on enterohepatic circulation and liver metabolism of estrogens and on sex hormone binding globulin (SHBG). *Journal of Steroid Biochemistry* 27:1135–1144. doi:10.1016/0022-4731(87)90200-7
- Adlercreutz H (2002) Phytoestrogens and breast cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 83:113–118. doi:10.1016/S0960-0760(02)00273-X
- Adlercreutz H, Mazur W (1997) Phyto-oestrogens and Western Diseases. *Annals of Medicine* 29:95–120. doi:10.3109/07853899709113696
- ATCC (2016a) BT-20; ATCC® HTB-19™. <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-19.aspx>. Zugegriffen: 16. Dezember 2016
- ATCC (2016b) MCF-10A; ATCC® CRL-10317™. <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-10317.aspx>. Zugegriffen: 16. Dezember 2016
- ATCC (2016c) MCF-12A; ATCC® CRL-10782™. <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-10782.aspx>. Zugegriffen: 16. Dezember 2016
- ATCC (2016d) MCF7; ATCC® HTB-22™. <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-22.aspx>. Zugegriffen: 17. Dezember 2016
- ATCC (2016e) T-47D; ATCC® HTB-133™. <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-133.aspx>. Zugegriffen: 16. Dezember 2016
- Benson JR, Jatoi I (2012) The global breast cancer burden. *Future oncology (London, England)* 8:697–702. doi:10.2217/fon.12.61
- BioVision (2014) Hydrogen Peroxide Assay Kit; Katalognummer K265-200

- Boghog2 in Wikimedia Commons (2009) Conversion of testosterone to estradiol by aromatase.
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Testosterone_estradiol_conversion.png.
Zugegriffen: 04. März 2017
- Bosetti C, Spertini L, Parpinel M, Gnagnarella P, Laggiou P (2005) Flavonoids and Breast Cancer Risk in Italy. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 14:805–808
- Boyd Norman F., Guo Helen, Martin Lisa J., Sun Limei, Stone Jennifer, Fishell Eve, Jong Roberta A., Hislop Greg, Chiarelli Anna, Minkin Salomon, Yaffe Martin J. (2007) Mammographic Density and the Risk and Detection of Breast Cancer
- Breinholt V, Larsen JC (1998) Detection of weak estrogenic flavonoids using a recombinant yeast strain and a modified MCF7 cell proliferation assay. *Chemical research in toxicology* 11:622–629. doi:10.1021/tx970170y
- Cauley JA, Lucas FL, Kuller LH, Stone K, Browner W, Cummings SR, for the Study of Osteoporotic Fractures Research Group (1999) Elevated serum estradiol and testosterone concentrations are associated with a high risk for breast cancer. *Annals of Internal Medicine* 130:270–277. doi:10.7326/0003-4819-130-4_Part_1-199902160-00004
- Chen WY, Rosner B, Hankinson SE, Colditz GA, Willett WC (2011) Moderate alcohol consumption during adult life, drinking patterns, and breast cancer risk. *JAMA* 306:1884–1890. doi:10.1001/jama.2011.1590
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer ICEU, Radcliffe Infirmary, Oxford, UK (1996) Breast cancer and hormonal contraceptives; Collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *The Lancet* 347:1713–1727. doi:10.1016/S0140-6736(96)90806-5
- Costea T, Vlad OC, Miclea L-C, Ganea C, Szöllősi J, Mocanu M-M (2020) Alleviation of Multidrug Resistance by Flavonoid and Non-Flavonoid Compounds in Breast, Lung, Colorectal and Prostate Cancer. *International journal of molecular sciences* 21. doi:10.3390/ijms21020401

- Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA, Jordan VC, Katzenellenbogen JA, Korach KS, Maggi A, Muramatsu M, Parker MG, Gustafsson J-A (2006) International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen Receptors. *Pharmacological Reviews* 58:773–781. doi:10.1124/pr.58.4.8
- Deutsche Gesellschaft für Ernährung (2012) Sekundäre Pflanzenstoffe und ihre Wirkung auf die Gesundheit; Eine Aktualisierung anhand des Ernährungsberichts 2012. <https://www.dge.de/wissenschaft/weitere-publikationen/fachinformationen/sekundaere-pflanzenstoffe-und-ihre-wirkung/>
- Dorgan JF, Longcope C, Stephenson HE, Falk RT, Miller R, Franz C, Kahle L, Campbell WS, Tangrea JA, Schatzkin A (1996) Relation of prediagnostic serum estrogen and androgen levels to breast cancer risk. *American Association for Cancer Research* 5:533–539
- Duffy SW, Tabar L, Chen H-H, Holmqvist M, Yen M-F, Abdsalah S, Epstein B, Frodis E, Ljungberg E, Hedborg-Melander C, Sundbom A, Tholin M, Wiege M, Akerlund A, Wu H-M, Tung T-S, Chiu Y-H, Chiu C-P, Huang C-C, Smith RA, Rosen M, Stenbeck M, Holmberg L (2002) The impact of organized mammography service screening on breast carcinoma mortality in seven Swedish counties. *Cancer* 95:458–469. doi:10.1002/cncr.10765
- Efferth T (Hrsg) (2006) *Molekulare Pharmakologie und Toxikologie; Biologische Grundlagen von Arzneimitteln und Giften*. Springer, Berlin, Heidelberg
- Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, Ruby SG, O'Malley F, Simpson JF, Connolly JL, Hayes DF, Edge SB, Lichter A, Schnitt SJ (2000) Prognostic Factors in Breast Cancer. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 124:966–978. doi:10.1043/0003-9985(2000)124<0966:PFIBC>2.0.CO;2
- Foth D (2003) Alternativen zur Hormonsubstitutionstherapie. *Journal für Menopause* 10:32–35
- Gage M, Wattendorf D, Henry LR (2012) Translational advances regarding hereditary breast cancer syndromes. *Journal of surgical oncology* 105:444–451. doi:10.1002/jso.21856
- Ganju L, Padwad Y, Singh R, Karan D, Chanda S, Chopra MK, Bhatnagar P, Kashyap R, Sawhney RC (2005) Anti-inflammatory activity of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaves. *International Immunopharmacology* 5:1675–1684. doi:10.1016/j.intimp.2005.03.017

- Garcia Fernandez A, Gimenez N, Fraile M, Gonzalez S, Chabrera C, Torras M, Gonzalez C, Salas A, Barco I, Cirera L, Cambra MJ, Veloso E, Pessarrodona A (2012) Survival and clinicopathological characteristics of breast cancer patient according to different tumour subtypes as determined by hormone receptor and Her2 immunohistochemistry. a single institution survey spanning 1998 to 2010. *Breast (Edinburgh, Scotland)* 21:366–373. doi:10.1016/j.breast.2012.03.004
- Geetha S, Ram MS, Mongia SS, Singh V, Ilavazhagan G, Sawhney RC, Sai Ram M (2003) Evaluation of antioxidant activity of leaf extract of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) on chromium (VI) induced oxidative stress in albino rats // Evaluation of antioxidant activity of leaf extract of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) on chromium(VI) induced oxidative stress in albino rats. *Journal of Ethnopharmacology* 87:247–251. doi:10.1016/s0378-8741(03)00154-5
- Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn H-J, Panel members (2011) Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Annals of Oncology* 22:1736–1747. doi:10.1093/annonc/mdr304
- Graefe KH, Lutz W, Bönisch H (Hrsg) (2011) *Pharmakologie und Toxikologie; Duale Reihe.* Thieme, Stuttgart
- Guan TTY, Cenkowski S, Hydamaka A (2005) Effect of Drying on the Nutraceutical Quality of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L. ssp. *sinensis*) Leaves. *Journal of Food Science* 70:E514-E518. doi:10.1111/j.1365-2621.2005.tb08312.x
- Gwin J, Drews N, Ali S, Stamschror J, Sorenson M, Rajah TT (2011) Effect of Genistein on p90RSK Phosphorylation and Cell Proliferation in T47D Breast Cancer Cells. *Anticancer research* 31:209–214
- Hankinson SE, Willett WC, Manson JE, Colditz GA, Hunter DJ, Spiegelman D, Barbieri RL, Speizer FE (1998) Plasma Sex Steroid Hormone Levels and Risk of Breast Cancer in Postmenopausal Women. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 90:1292–1299. doi:10.1093/jnci/90.17.1292

- Horn-Ross PL, Barnes S, Lee M, Coward L, Mandel JE, Koo J, John EM, Smith M (2000) Assessing Phytoestrogen Exposure in Epidemiologic Studies: Development of a Database (United States). *Cancer Causes & Control* 11:289–298. doi:10.1023/A:1008995606699
- Hsieh C-Y, Santell RC, Haslam SZ, Helferich WG (1998) Estrogenic Effects of Genistein on the Growth of Estrogen Receptor-positive Human Breast Cancer (MCF-7) Cells in Vitro and in Vivo. *CANCER RESEARCH* 58:3833–3838
- Hui C, Qi X, Qianyong Z, Xiaoli P, Jundong Z, Mantian M (2013) Flavonoids, flavonoid subclasses and breast cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. *PLoS one* 8:e54318. doi:10.1371/journal.pone.0054318
- Hung H (2004) Inhibition of estrogen receptor alpha expression and function in MCF-7 cells by kaempferol. *Journal of cellular physiology* 198:197–208. doi:10.1002/jcp.10398
- Jin H, Leng Q, Li C (2012) Dietary flavonoid for preventing colorectal neoplasms. *The Cochrane database of systematic reviews*:CD009350. doi:10.1002/14651858.CD009350.pub2
- Johnson KC, Miller AB, Collishaw NE, Palmer JR, Hammond SK, Salmon AG, Cantor KP, Miller MD, Boyd NF, Millar J, Turcotte F (2011) Active smoking and secondhand smoke increase breast cancer risk: the report of the Canadian Expert Panel on Tobacco Smoke and Breast Cancer Risk (2009). *Tobacco control* 20:e2. doi:10.1136/tc.2010.035931
- Karunakar Rayker in Wikimedia Commons (2008) Seabuckthorn berries. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Seabuckthorn_berries,_Nubra_valley,_Ladakh.jpg?uselang=de
- Kaufmann B, Christen P (2002) Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochem. Anal.* 13:105–113. doi:10.1002/pca.631
- Kay CD, Hooper L, Kroon PA, Rimm EB, Cassidy A (2012) Relative impact of flavonoid composition, dose and structure on vascular function: a systematic review of randomised controlled trials of flavonoid-rich food products. *Molecular nutrition & food research* 56:1605–1616. doi:10.1002/mnfr.201200363

- Knekt P, Kumpulainen J, Järvinen R, Rissanen H, Heliövaara M, Reunanen A, Hakulinen T, Aromaa A (2002) Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *The American Journal of Clinical Nutrition* 76:560–568. doi:10.1093/ajcn/76.3.560
- Kraft K, Stange R (Hrsg) (2010) *Lehrbuch Naturheilverfahren*. Hippokrates-Verlag, Stuttgart
- Leitlinienprogramm Onkologie (August 2019) S3-Leitlinie Mammakarzinom; AWMF-Registernummer: 032-0450L
- Li TSC, Schroeder WR, Li TSC (1996) Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.): A Multipurpose Plant. *HortTechnology* 6:370–380. doi:10.21273/HORTTECH.6.4.370
- Löffler G (Hrsg) (2008) *Basiswissen Biochemie; Mit Pathobiochemie*. Springer Medizin Verlag, Berlin, Heidelberg
- Lüllmann H, Mohr K, Hein L, Kuschinsky G (Hrsg) (2010) *Pharmakologie und Toxikologie; Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen*. Thieme, Stuttgart, New York
- Luyengi L, Suh N, Fong HHS, Pezzuto JM, Kinghorn AD, Fong HHS, Kinghorn AD (1996) A lignan and four terpenoids from *Brucea javanica* that induce differentiation with cultured HL-60 promyelocytic leukemia cells. *Phytochemistry* 43:409–412. doi:10.1016/0031-9422(96)00258-0
- Maheshwari DT, Yogendra Kumar MS, Verma SK, Singh VK, Singh SN (2011) Antioxidant and hepatoprotective activities of phenolic rich fraction of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves. *Food and chemical toxicology* 49:2422–2428. doi:10.1016/j.fct.2011.06.061
- Mandlekar S, Kong A-NT, Kong AN (2001) Mechanisms of tamoxifen-induced apoptosis. *APOPTOSIS* 6:469–477. doi:10.1023/A:1012437607881
- Marchese S, Silva E (2012) Disruption of 3D MCF-12A breast cell cultures by estrogens; An In Vitro Model for ER-Mediated Changes Indicative of Hormonal Carcinogenesis. *PLoS one* 7:e45767. doi:10.1371/journal.pone.0045767
- Matthews J, Celius T, Halgren R, Zacharewski T (2000) Differential estrogen receptor binding of estrogenic substances; A species comparison. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 74:223–234. doi:10.1016/s0960-0760(00)00126-6

- Messina M (2016) Impact of Soy Foods on the Development of Breast Cancer and the Prognosis of Breast Cancer Patients. *Forschende Komplementärmedizin* (2006) 23:75–80. doi:10.1159/000444735
- Metcalfe K, Lynch HT, Gadirian P, Tung N, Olivotto I, Warner E, Olopade OI, Eisen A, Weber B, McLennan J, Sun P, Foulkes WD, Narod SA (2004) Contralateral breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Journal of clinical oncology* 22:2328–2335. doi:10.1200/JCO.2004.04.033
- Michel T, Destandau E, Le Floch G, Lucchesi ME, Elfakir C (2012) Antimicrobial, antioxidant and phytochemical investigations of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) leaf, stem, root and seed. *Food chemistry* 131:754–760. doi:10.1016/j.foodchem.2011.09.029
- Nono64 in Wikimedia Commons (2009) Flavan-Strukturformel. <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Flavan.PNG?uselang=de>
- Nourazarian AR, Kangari P, Salmaninejad A (2014) Roles of Oxidative Stress in the Development and Progression of Breast Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 15:4745–4751. doi:10.7314/APJCP.2014.15.12.4745
- Petinari L, Kohn LK, Carvalho JE de, Genari SC (2004) Cytotoxicity of tamoxifen in normal and tumoral cell lines and its ability to induce cellular transformation in vitro. *Cell biology international* 28:531–539. doi:10.1016/j.cellbi.2004.04.008
- Pierce LJ, Levin AM, Rebbeck TR, Ben-David MA, Friedman E, Solin LJ, Harris EE, Gaffney DK, Haffty BG, Dawson LA, Narod SA, Olivotto IA, Eisen A, Whelan TJ, Olopade OI, Isaacs C, Merajver SD, Wong JS, Garber JE, Weber BL (2006) Ten-year multi-institutional results of breast-conserving surgery and radiotherapy in BRCA1/2-associated stage I/II breast cancer. *Journal of clinical oncology* 24:2437–2443. doi:10.1200/JCO.2005.02.7888
- Prat A, Karginova O, Parker JS, Fan C, He X, Bixby L, Harrell JC, Roman E, Adamo B, Troester M, Perou CM (2013) Characterization of cell lines derived from breast cancers and normal mammary tissues for the study of the intrinsic molecular subtypes. *Breast cancer research and treatment* 142:237–255. doi:10.1007/s10549-013-2743-3
- Promega (März 2016) Zellbasierte & Biochemische Assays

- provitro (2016a) HMEPC; Bestellnummer 1210731.
http://www.provitro.de/primaerzellkulturen/humane_epithelzellen.htm. Zugegriffen:
16. Dezember 2016
- provitro (2016b) Mammary epithelial cell growth medium, serum-free; Bestellnummer 203
0703. http://www.provitro.de/primaerzellkulturen/humane_epithelzellen.htm.
Zugegriffen: 10. Januar 2017
- Richter D-U (2016) In-vitro Untersuchungen zur Biokompatibilität von polymeren
Netzstrukturen insbesondere zur Anwendung in der Urogynäkologie.
Habilitationsschrift, Universität Rostock
- Robert Koch-Institut (2016) Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016
- Roche (July 2005) Cytotoxicity Detection Kit (LDH); Katalognummer: 11644793001
- Roche (August 2007) Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric); Katalognummer:
11647229001
- Sattler UGA, Walenta S, Mueller-Klieser W (2007) Laktat und Redoxstatus in malignen
Tumoren. *Der Anaesthesist* 56:466–469. doi:10.1007/s00101-007-1164-2
- Schopfer P, Brennicke A (2016) Pflanzenphysiologie. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg
- Shah NR, Borenstein J, Dubois RW (2005) Postmenopausal hormone therapy and breast
cancer: a systematic review and meta-analysis. *Menopause (New York, N.Y.)* 12:668–
678. doi:10.1097/01.gme.0000184221.63459.e1
- Sharma UK, Sharma K, Sharma N, Sharma A, Singh HP, Sinha AK (2008) Microwave-assisted
efficient extraction of different parts of *Hippophae rhamnoides* for the comparative
evaluation of antioxidant activity and quantification of its phenolic constituents by
reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). *Journal of
agricultural and food chemistry* 56:374–379. doi:10.1021/jf072510j
- Stanford JL, Herrinton LJ, Schwartz SM, Weiss NS (1995) Breast cancer incidence in Asian
migrants to the United States and their descendants. *Epidemiology* 6:181–183.
doi:10.1097/00001648-199503000-00017

- Statistisches Bundesamt (2015) Die 10 häufigsten Todesfälle durch Krebserkrankungen. <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/Krebserkrankungen.html>
- Stauber M, Weyerstahl T (2007) Duale Reihe Gynäkologie und Geburtshilfe. Thieme, Stuttgart
- Subik K, Lee J-F, Baxter L, Strzepek T, Costello D, Crowley P, Xing L, Hung M-C, Bonfiglio T, Hicks DG, Tang P (2010) The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer : Basic and Clinical Research* 4:35–41
- Szewczyk M (2007) Untersuchungen zum Einfluss von Pflanzenextrakten aus der Leinpflanze *Linum usitatissimum* auf die Zellproliferation und Cytotoxizität humaner Karzinomzellen sowie Trophoblasten und Fibroblasten. Diplomarbeit, Universität Rostock
- Takeuchi S, Takahashi T, Sawada Y, Iida M, Matsuda T, Kojima H (2009) Comparative Study on the Nuclear Hormone Receptor Activity of Various Phytochemicals and Their Metabolites by Reporter Gene Assays Using Chinese Hamster Ovary Cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 32:195–202. doi:10.1248/bpb.32.195
- Tamimi RM, Byrne C, Colditz GA, Hankinson SE (2007) Endogenous hormone levels, mammographic density, and subsequent risk of breast cancer in postmenopausal women. *Journal of the National Cancer Institute* 99:1178–1187. doi:10.1093/jnci/djm062
- Teng B-S, Lu Y-H, Wang Z-T, Tao X-Y, Wei D-Z (2006) In vitro anti-tumor activity of isorhamnetin isolated from *Hippophae rhamnoides* L. against BEL-7402 cells. *Pharmacological research* 54:186–194. doi:10.1016/j.phrs.2006.04.007
- Thompson LU, Boucher BA, Liu Z, Cotterchio M, Kreiger N (2006) Phytoestrogen Content of Foods Consumed in Canada, Including Isoflavones, Lignans, and Coumestan. *Nutrition and Cancer* 54:184–201. doi:10.1207/s15327914nc5402_5
- Toniolo PG, Levitz M, Zeleniuch-Jacquotte A, Banerjee S, Koenig KL, Shore RE, Strax P, Pasternack BS (1995) A Prospective Study of Endogenous Estrogens and Breast Cancer

- in Postmenopausal Women. JNCI Journal of the National Cancer Institute 87:190–197. doi:10.1093/jnci/87.3.190
- Uehiro N, Horii R, Iwase T, Tanabe M, Sakai T, Morizono H, Kimura K, Iijima K, Miyagi Y, Nishimura S, Makita M, Ito Y, Akiyama F (2014) Validation study of the UICC TNM classification of malignant tumors, seventh edition, in breast cancer. Breast Cancer 21:748–753. doi:10.1007/s12282-013-0453-7
- Upadhyay NK, Kumar MSY, Gupta A (2010) Antioxidant, cytoprotective and antibacterial effects of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves. Food and chemical toxicology 48:3443–3448. doi:10.1016/j.fct.2010.09.019
- van der Woude H, Ter Veld MGR, Jacobs N, van der Saag PT, Murk AJ, Rietjens IMCM (2005) The stimulation of cell proliferation by quercetin is mediated by the estrogen receptor. Molecular nutrition & food research 49:763–771. doi:10.1002/mnfr.200500036
- Virgili F, Acconcia F, Ambra R, Rinna A, Totta P, Marino M (2004) Nutritional flavonoids modulate estrogen receptor alpha signaling. IUBMB life 56:145–151. doi:10.1080/15216540410001685083
- Wang H MP, Wang H, Murphy PA (1994) Isoflavone Composition of American and Japanese Soybeans in Iowa; Effects of Variety, Crop Year, and Location. Journal of agricultural and food chemistry 42:1674–1677. doi:10.1021/jf00044a017
- Wani TA, Wani SM, Shah AG, Masood FA (2013) Optimizing conditions for antioxidant extraction from Sea Buckthorn leaf (*Hippophae rhamnoides* L.) as herbal tea using response surface methodology (RSM). International Food Research Journal 20:1677–1681
- Wani TA, Wani SM, Ahmad M, Ahmad M, Gani A, Masoodi FA, Yildiz F (2016) Bioactive profile, health benefits and safety evaluation of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.): A review. Cogent Food & Agriculture 2:1128519. doi:10.1080/23311932.2015.1128519
- Watson J (2013) Oxidants, antioxidants and the current incurability of metastatic cancers. Open biology 3:120144. doi:10.1098/rsob.120144
- Watzl B, Leitzmann C (Hrsg) (1995) Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln. Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart

- WHO: International Agency for Research on Cancer (2012) GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence worldwide in 2012. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx
- Woo HD, Kim J (2013) Dietary flavonoid intake and risk of stomach and colorectal cancer. *World journal of gastroenterology* 19:1011–1019. doi:10.3748/wjg.v19.i7.1011
- Xie Q, Chen M-L, Qin Y, Zhang Q-Y, Xu H-X, Zhou Y, Mi M-T, Zhu J-D (2013) Isoflavone consumption and risk of breast cancer; A dose-response meta-analysis of observational studies. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 22:P118 - 127. doi:10.6133/apjcn.2013.22.1.16.
- Yager JD, Davidson NE (2006) Estrogen Carcinogenesis in Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* 354:270–282. doi:10.1056/NEJMra050776
- Yang B, Linko A-M, Adlercreutz H, Kallio H (2006) Secoisolariciresinol and matairesinol of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries of different subspecies and harvesting times. *Journal of agricultural and food chemistry* 54:8065–8070. doi:10.1021/jf061904s
- Ziegler RG, Hoover RN, Pike MC, Hildesheim A, Nomura AMY, West DW, Wu-Williams AH, Kolonel LN, Horn-Ross PL, Rosenthal JF, Hyer MB (1993) Migration Patterns and Breast Cancer Risk in Asian-American Women. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 85:1819–1827. doi:10.1093/jnci/85.22.1819

Anhang

Chemikalien und Materialien

Extraktion nach der Mikrowellenextraktionsmethode

- Trockenschrank Binder
- Methanol, Roth
- Mikrowelle MarsXpress von CEM
- Unterdruckpumpe
- Vakuumrotationsverdampfer, Heidolph VV2011
- Silicagel Exsikkator: Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
- Waage BP2105 (Sartorius, Deutschland)
- Ethanol absolut (Applichem)

Lignanextraktion nach Luyengi

- Metahanol, Roth
- Ethylacetat, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Faltentrichter, Durchmesser 185 mm, Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland
- Vakuumrotationsverdampfer, Heidolph VV2011
- Ethanol absolut (Applichem)

Teeextrakte

- Trockenschrank Binder
- Teefilter Melitta (von Rossmann)
- Heizplatte Heidolph
- Faltentrichter, Durchmesser 185 mm, Schleicher und Schuell 595 ¹/₂, Dassel, Deutschland
- Eppendorf Concentrator 5301
- Vakuumrotationsverdampfer, Heidolph VV2011
- Silicagel Exsikkator: Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
- Aqua dest

Zelllinien

- MCF-7: ATCC
- BT-20: ATCC
- MCF-12A: ATCC
- MCF-10A: ATCC
- T-47D: ATCC
- HMEPC: provitro

Kulturmedien

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM): High Glucose (4,5 g/l) mit L-Glutamine, Phenol Red und 3,7 g/l NaHCO₃, ohne Sodium Pyruvate (PAA THE CELL CULTURE COMPANY)
- RosWell Park Memorial Institute (RPMI): mit L-Glutamine, ohne Phenol Red (PAA THE CELL CULTURE COMPANY)
- Nutrient Mixture F-12 (Ham's F-12): mit 10% Horse Serum, Pen. /Strep., Amphot. und Supp. Mammaepithel (PAA THE CELL CULTURE COMPANY)
- MEM =Minimal Essential Medium (Sigma-Aldrich-Chemie)
- Mammary epithel cell growth medium (provitro)
- Supplement-Mix (Promo Cell)
- FKS (Fetales Kälberserum); Sigma-Aldrich-Chemie, Deisenhofen, Deutschland
- Amphotericin B: 250 µg/ml, PAA Laboratories GmbH, Deutschland
- Penicillin-Streptomycin-Solution: 10000 Einheiten Penicillin und 10 mg Streptomycin/ml; 0,9 % NaCl, Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, Deutschland
- Zusatz für Einfriermedium: DMSO: Dimethylsulfoxid rein (G. Vogler b.v. Rotterdam)

Lösungen und Chemikalien

- PBS (phosphatgepufferte NaCl-Lösung), 10 mM, pH = 7,4 (8,0 g NaCl + 2,9 g Na₂HPO₄ X 2 ww + 0,2 g Na₂HPO₄ + 0,2 KCl / 1,0 l Aqua dest.); Invitrogen, England
- Trypsin-EDTA (0,25 %): PAA Laboratories GmbH, Deutschland
- Accutase (Sigma-Aldrich-Chemie)
- Trypanblau (0,4 %); Sigma-Aldrich-Chemie, Deisenhofen, Deutschland
- 17β- Estradiol, Sigma-Aldrich-Chemie, Deisenhofen, Deutschland

- Tamoxifen, Sigma-Aldrich-Chemie, Deisenhofen, Deutschland
- Tritonlösung (FERAK Berlin)
- Ethanol absolut (Applichem)
- HCL: 37%, für LDH-Zytotoxizitätstest (Carl ROTH)
- H₂SO₄: 30%, zum BrdU-Zellproliferationstest (Carl ROTH)

Zellkulturmaterialien

- Zellkulturflaschen: 25cm², 75cm², 150cm² (TPP Techno Plastic Products AG)
- Reaktionsgefäße 25 ml, 50 ml; Grüner bio- one Cellstar[®]
- Zellkulturplatten: 24- Well- Platte, 96- Well- Platte; Grüner bio- one Cellstar[®]
- 1,5 ml Eppendorf-Tubes
- Kryoröhrchen: 2.0 ml (TPP Techno Plastic Products AG)
- Parafilm: (American National CanTM)
- Pipetten; Eppendorf Typ Research
- Pipetten (Glas) (5 ml, 10 ml, 25 ml) (TPP)
- Desinfektionsmittel; Bacillol R plus, Bode
- Bürker-Zählkammer: Poly-Optik GmbH, Bad Blankenburg

Geräte

- Brutschrank: (Temperatur ist 37 °C, 5% Kohlenstoffdioxid), Function Line (Heraeus Instruments GmbH, Hanau)
- Kühltruhe (-80°C); Heraeus
- Kühlschranks: Liebherr Premium (Liebherr)
- Sterilbox; Heraeus
- Zentrifuge Hettich „Universal 30 RF“
- Vortexer Heidolph „Reax 2000“
- ELISA-Photometer: BioRad Modell 680 (Microplate Reader, BioRad Laboratories GmbH, München)
- Mikroskope: Olympus CK2-TR (Optical Co., Ltd., Japan). Carl Zeiss Axiovert 40 C (Carl Zeiss Micro Imaging GmbH Göttingen)

Immunhistochemie

- ImmPRESS Universal Reagent Anti Mouse/Rabbit Ig Kit (Vector Laboratories)

Chemikalien und Materialien

- Formafix 4 % gepuffert (Grimm med. Recycling GmbH)
- Wasserstoffperoxid: H₂O₂ 0,3% (MERCK)
- Horse-Serum (Sigma-Aldrich)
- Östrogenrezeptor α : Isotyp IgG1, Klon 1D5, Ready-to-use-Lösung (DAKO)
- Östrogenrezeptor β : Isotyp IgG1, Klon 57/3, Ready-to-use-Lösung (Serotec)
- Progesteronrezeptor: Isotyp IgG1, Klon Clone PgR636, Ready-to-use-Lösung (DAKO)
- Sekundärantikörper: ImmPRESS TM Reagent Peroxidase
- Chromogen LinRed (Linaris-Biologische Produkte GmbH)

Detection – Kits

- LDH-Test: Cytotoxicity Detection Kit, Roche
- BrdU-Test: Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric), Roche

Quantitative Glukose-Messung:

- BIOSEN 4140 (Fa. Biosen)

Messung des Oxidativen Stresses

- Hydrogen Peroxide Assay Kit (BioVision)

pH-Messung

- pH-Messgerät von Orion Star[®] und Star Plus Meter[®] mit Thermo Scientific Elektrode Orion ROSS Ultra[®]

Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Rostock, März 2020

Anna-Maria Kunert

Danksagung

Folgenden Personen möchte ich meinen persönlichen Dank aussprechen:

Frau Prof. Dr. Kraft für die Bereitstellung des Themas, die Unterstützung bei der Abfassung der Dissertation und die Gutachtertätigkeit.

Frau Priv.-Doz. Dr. Richter für die Betreuung, Anleitung und Unterstützung meiner Versuche und mit ihr natürlich auch dem gesamten Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik Rostock, insbesondere Frau Dr. Szewczyk und Frau Greschkovitz.

Besonders hervorheben möchte ich meinen Partner Ferdinand, der mir bei meiner Arbeit kreativ, aber auch kritisch zur Seite stand und meine Eltern Dorothea und Andreas Kunert, die mich zu jeder Zeit unterstützten.

Danke an alle, die mich mit Unterkunft und Verpflegung unterstützt haben, sodass ich die arbeitsfördernde Atmosphäre unterschiedlicher Bibliotheken in Anspruch nehmen konnte. Dank an Silvio, Sophie, Holly und Ehepaar Groß.