

Aus der Universitätsfrauenklinik der Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. B. Gerber

**Untersuchung zur Wirkung eines Pflanzenextrakts
„*Petroselinum crispum* subsp. *tuberosum*“
auf humane benigne und maligne Mammaepithelzellen
(MCF-7 und MCF-12a)**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Franca Dudde,

geb. am 09.04.1985 in Berlin

Rostock, 2017

Gutachter:

Prof. Dr. B. Gerber, Universität Rostock, Universitätsfrauenklinik

Prof. Dr. J. Barbara Nebe, Universität Rostock, Arbeitsbereich Zellbiologie

Prof. Dr. N. Ditsch, Ludwig-Maximilians-Universität München, Frauenheilkunde

Jahr der Einreichung: 2017

Jahr der Verteidigung: 2018

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
1. Einleitung	1
1.1 Mammakarzinom.....	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren	2
1.1.2.1 Risikofaktoren für das Mammakarzinom	2
1.1.2.2 Hereditäre Risikofaktoren.....	3
1.1.2.3 Hormone und Hormonrezeptoren.....	3
1.1.2.4 Östrogen und Östrogenrezeptor	4
1.1.2.5 Progesteron und Progesteronrezeptor	7
1.1.3 Pathomechanismus der Karzinogenese	8
1.1.3.1 Zellzyklus.....	8
1.1.3.2 Karzinogenese.....	8
1.1.3.3 Tumorsuppressorgene und Proto-, Onkogene	9
1.1.4 Klassifikation des Mammakarzinoms	10
1.1.4.1 Proliferationsmarker	10
1.1.4.2 Her2-Rezeptor.....	11
1.1.5 Therapie des Mammakarzinoms	12
1.1.5.1 Hormonelle Therapie	12
1.2 Heilpflanzen.....	14
1.2.1 Sekundärer Pflanzenstoffwechsel.....	15
1.2.2 Phytoöstrogene.....	15
1.2.2.1 Isoflavonoide	17
1.2.2.2 Lignane	18
1.2.2.3 Coumestane	18
1.2.3 Phytoöstrogene und Brustkrebs	19
1.2.4 Petroselinum crispum subsp. Tuberosum	21
2. Zielstellung	25
3. Materialien und Methoden	27
3.1 Materialien	27
3.2 Methoden	29
3.2.1 Pflanzenextrakt.....	29
3.2.1.1 Pflanzenmaterial.....	29

3.2.1.2	Mikrowellenextraktion	29
3.2.1.3	Verdünnungsreihe des Extrakts	31
3.2.2	Massenspektrometrie.....	31
3.3	Zellen.....	32
3.3.1	MCF-7	32
3.3.2	MCF-12a	33
3.3.3	Zellmedium	33
3.3.4	Zellaufbewahrung	34
3.3.5	Zellkultivierung.....	34
3.3.6	Ermittlung der Lebendzellzahl.....	35
3.3.7	Immunhistochemie	37
3.4	Testmethoden.....	38
3.4.1	LDH-Zytotoxizitätstest.....	39
3.4.2	BrdU-Zellproliferationstest	41
3.4.3	MTT-Test (Viabilitätstest)	43
3.4.4	Zellmetabolismus.....	45
3.4.4.1	Glukosebestimmung	45
3.4.4.2	pH-Wert-Bestimmung	46
4.	Ergebnisse	49
4.1	Massenspektrometrie.....	49
4.2	Immunhistochemie	50
4.3	Testmethoden.....	54
4.3.1	Datenanalyse.....	54
4.3.2	LDH-Test	55
4.3.3	BrdU-Proliferationstest.....	58
4.3.4	MTT-Test	61
4.3.5	Zellmetabolismus	66
4.3.5.1	Glukosebestimmung	66
4.3.5.2	pH-Wert-Bestimmung	68
5.	Diskussion	71
5.1	Der Pflanzenextrakt und seine Inhaltsstoffe.....	71
5.2	Immunhistochemische Untersuchung der Zelllinien	75
5.3	Wirkung des reinen Pflanzenextrakts.....	76
5.4	Wirkung des Pflanzenextrakts in Kombination mit Tamoxifen	79
5.5	Kontrollparameter Tamoxifen und 17 β -Estradiol	83
5.6.	Einfluss des Pflanzenextrakts auf den Zellmetabolismus.....	84
5.7	Ausblick.....	86
6.	Zusammenfassung	89
7.	Thesen.....	91

Literaturverzeichnis	93
Eidesstattliche Erklärung	105
Danksagung	107
Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Weltweite Inzidenz- und Mortalitätsraten [3].....	2
Abb. 2 Theorie zu den Mechanismen der karzinogenen Wirkung von Östrogen.....	5
Abb. 3 Aufbau der Östrogenrezeptoren und Homologien in Prozent [16].....	6
Abb. 4 Verschiedene Signalwege der Östrogenrezeptoren [19].....	7
Abb. 5 Wirkungsmechanismen über Koaktivatoren und Korepressoren [41].	13
Abb. 6 Strukturformel des endogenen Östrogens [55].	16
Abb. 7 Strukturformeln der Isoflavonoide [55].....	17
Abb. 8 Strukturformeln der Lignane [55].....	18
Abb. 9 Beeinflussung der Signalwege durch Genistein [71].	20
Abb. 10 <i>Petroselinum crispum</i> [75].....	23
Abb. 11 Petersilienwurzel (eigene Quelle).	23
Abb. 12 Theorie der Mikrowellenstrahlung [82].....	29
Abb. 13 Discover SP-D [82].	30
Abb. 14 Prinzip der Feldionisation [84].....	32
Abb. 15 MCF-7-Zellen.....	33
Abb. 16 MCF-12a Zellen.....	33
Abb. 17 Bürker-Zählkammer [91].....	36
Abb. 18 Prinzip des LDH-Tests (modifiziert nach Roche) [95].....	40
Abb. 19 Prinzip des BrdU-Proliferationstests (eigene Quelle).	42
Abb. 20 Prinzip des MTT-Tests (modifiziert nach Roche) [97].....	44
Abb. 21 Prinzip der Glukosebestimmung (modifiziert) [99].	45
Abb. 22 Pyrolyse-Feldionisationsmassenspektrometrie des Petersilienwurzelextrakts	49
Abb. 23 Immunhistochemie MCF-7 nativ und des ER- α für die MCF-7-Zelllinie	51
Abb. 24 Immunhistochemie des ER- β und PR für die MCF-7-Zelllinie	52
Abb. 25 Immunhistochemie MCF-12a nativ und des ER- α für die MCF-12a-Zelllinie	52
Abb. 26 Immunhistochemie des ER- β und PR für die MCF-12a-Zelllinie;	53
Abb. 27 LDH-Test der MCF-7 und MCF-12a-Zelllinien	55
Abb. 28 LDH-Test der MCF-7 und MCF-12a-Zelllinien in Kombination mit Tamoxifen	56
Abb. 29 LDH-Test der MCF-7 und MCF-12a-Zelllinien; Überblick der Kontrollsubstanzen.....	57
Abb. 30 BrDU-Test der MCF-7 und MCF-12a-Zelllinien	58
Abb. 31 BrDU-Test der MCF-7 und MCF-12a-Zelllinien in Kombination mit Tamoxifen	59
Abb. 32 BrdU-Test der MCF-7 und MCF-12a-Zelllinien, Überblick Kontrollparameter	61
Abb. 33 MTT-Test der MCF-7 und MCF-12a-Zelllinien	62
Abb. 34 MTT-Test der MCF-7 und MCF-12a-Zelllinien in Kombination mit Tamoxifen	63

Abb. 35 MTT-Test der MCF-7 und MCF-12a-Zelllinien in Kombination mit Tamoxifen	65
Abb. 36 Glukosebestimmung der MCF-7- und MCF-12a-Zelllinien.....	66
Abb. 37 Glukosebestimmung der MCF-7- und MCF-12a-Zelllinien mit Tamoxifen.....	67
Abb. 38 Bestimmung des pH-Wertes der MCF-7- und MCF-12a-Zelllinien.....	68
Abb. 39 Bestimmung des pH-Wertes der MCF-7- und MCF-12a-Zelllinien mit Tamoxifen.....	69

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Risikofaktoren des Mammakarzinoms (leicht modifiziert) [4].....	2
Tabelle 2 Einteilung des Mammakarzinoms auf molekularer Ebene [11].....	11
Tabelle 3 Therapieformen: ET: Endokrine Therapie; CT: Chemotherapie [37].....	12
Tabelle 4 Vorkommen der Phytoöstrogene in der Nahrung [50].	16
Tabelle 5 Verdünnungsreihe des Pflanzenextrakts.	31
Tabelle 6 Überblick über alle Probenansätze in den Wellplatten.	39
Tabelle 7 Ergebnis der IHC dieser Arbeit anhand der roten Reaktion.....	53
Tabelle 8 Immunreaktiver Score nach Remmele und Stegner (IRS 0-12 Punkte) [101].....	54

Abkürzungsverzeichnis

α	Alpha
Abb.	Abbildung
Akt	Onkogen
ATM	Brustkrebsgen
β	Beta
Bad	proapoptotisches Protein
bar	Apoptoseregulator
Bax	Apoptoseregulator
Bcl-2/-xl	antiapoptotisches Proteine
biol.	biologisch
BRCA 1/2	Brustkrebsgen 1/2
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
BRIP1	Brustkrebsgen
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
Ca²⁺	Calciumionen
CAM	Complementary and Alternative Medicine
Casp	Caspase (Apoptoseprotein)
CHEK2	Brustkrebsgen
CK2	Casein-Kinase 2
cm	Zentimeter
cm²	Quadratzentimeter
CO₂	Kohlenstoffdioxid
Co. KG	Compagnie Kommanditgesellschaft
CT	Chemotherapie
CYP2D6	Cytochrom P2D6 (Enzym)
Cyto-c	Cytochrom c
d	Tag
DA	Dopamin
DAR	Dopaminrezeptor
DBD	DNA-bindende Domäne
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
div.	diverse
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Extinktion
E₂	17 β -Estradiol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ENL	Enterolignane
ER	Östrogenrezeptor
ERE	Hormon response Element

ER-IP	Östrogenrezeptor interagierendes Protein
Erk	extrazellulär signalregulierende Kinase
ET	endokrine Therapie
et al.	und andere
FADD	Tumornekrosefaktor
FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm
G	gap-Phase
geb.	geboren
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GLUT	Glukosetransporter
h	Stunde
HAM's F-12	Nutrient Mixture F-12
HBD	hormonbindende Domäne
Her2	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
H₂O	Wasserstoff
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
H₂SO₄	Schwefelsäure
HCl	Salzsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IGF	insulinähnlicher Wachstumsfaktor
IGFBP	insulinähnlicher Wachstumsfaktor-bindendes Protein
ICH	Immunhistochemie
IκB	Regulatorprotein
IκK	Kinase
Inc.	incorporated
INT	2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetra-zoliumchlorid
IRS	immunreaktiver Score
KGaA	Kommanditgesellschaft auf Aktien
Ki 67	Proliferationsmarker
kV	Kilovolt
l	Liter
LD 50	letale Dosis (50 % Versterben)
LDH	Laktatdehydrogenase
M	Molare Masse
MAPK	MAP-Kinase
MCF-7	maligne Mammaepithelzellen
MCF-12a	benigne Mammaepithelzellen
mg	Milligramm
Mi	Mitosephase
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mol	Stoffmenge
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
M.-V.	Mecklenburg-Vorpommern
m/z	Masse-Ladungsverhältnis

n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NEMO	NF-κB-Hemmer
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NK	Negativkontrolle
nm	Nanometer
o.g.	oben genannt
P	Phosphat
p50, 65	Transkriptionsfaktoren im NF-κB-Signalweg
p53	Tumorsuppressorgen
PALPB2	Brustkrebsgen
PBS	Phosphatgepufferte NaCl-Lösung
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PIP₃	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PK	Positivkontrolle
POD	Peroxidase
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren
PR	Progesteronrezeptor
PTEN	Phosphatase
PW	Petersilienwurzelextrakt
p-Wert	Signifikanzwert
Py-FIMS	Pyrolyse- Feldionisationsmassenspektrometrie
rpm	Umdrehungen pro Minute
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
S.	Seite
S	Synthesephase
SERM	selektiver Estrogenrezeptormodulator
SHBG	sexhormonbindendes Globulin
s.o.	siehe oben
Subsp.	Subspezies
Suppl.	Supplement
T4, 5	Tamoxifen 10 ⁻⁴ , 10 ⁻⁵ mol/l
Tam	Tamoxifen
TF	Transkriptionsfaktor
TK	Tyrosinkinase
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF-α	Tumornekrosefaktor alpha
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TNM	Tumorstadien
TRADD	Tumornekrosefaktor
TRAF2	Tumornekrosefaktor
u.a.	u.a.
UDP	Uridindiphosphat
µg	Mikrogramm
UV	Ultraviolett

VEGF Vascular Endothelial Growth Factor; Angiogenese-Wachstumsfaktor

WHO Weltgesundheitsorganisation

Z Zellen
z.B. zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Brustkrebs ist die häufigste Krebserkrankung der Frau. Mit rund 70.000 Neuerkrankungen jährlich (2012) erkrankt derzeit etwa eine von acht Frauen in Deutschland an Brustkrebs. Durch immer genauer werdende diagnostische Methoden erhöhte sich die Zahl der Neuerkrankungen auf Grund der gestiegenen Früherkennung. Jedoch sank demgegenüber die Zahl der Sterbefälle durch frühzeitige Behandlungsmöglichkeiten und Fortschritte in der Therapie. Dennoch trägt das Mammakarzinom mit 17.748 weiblichen Sterbefällen zu einer Sterberate von 23,9 gemessen an 1000 Personen einer Gesamtbevölkerung bezogen auf ein Jahr bei. Damit gehört Brustkrebs zu der häufigsten Todesursache bösartiger Neubildungen bei Frauen [1]. Mit dem Mammographiescreening, welches zwischen 2005 und 2009 eingeführt wurde, ergab sich eine diagnostische Methode, mit der es gelang bereits in einem frühen Stadium die Diagnose Brustkrebs zu stellen. Daraufhin war zunächst ein Anstieg der Neuerkrankungen zu verzeichnen. Die Inzidenzzahlen haben sich jedoch nunmehr auf ein Plateau eingependelt [2]. Demgegenüber erkrankten Männer deutlich seltener an Brustkrebs. Für das Jahr 2013 erkrankten laut Krebsregister 682 Männer neu [2]. Weltweit hat Brustkrebs bei Frauen laut dem WHO- Bericht von 2014 eine Inzidenz von 43,3 pro 100.000 Personen und damit die höchste Inzidenzrate aller Krebserkrankungen (s. Abb. 1). Allem voran finden sich im westeuropäischen Raum die höchsten Inzidenzraten. Im Gegensatz dazu ergeben sich die niedrigsten Inzidenzraten in ostasiatischen Regionen. Gleichzeitig besteht wiederum eine wesentlich geringere Mortalitätsrate in höher entwickelten Ländern [3].

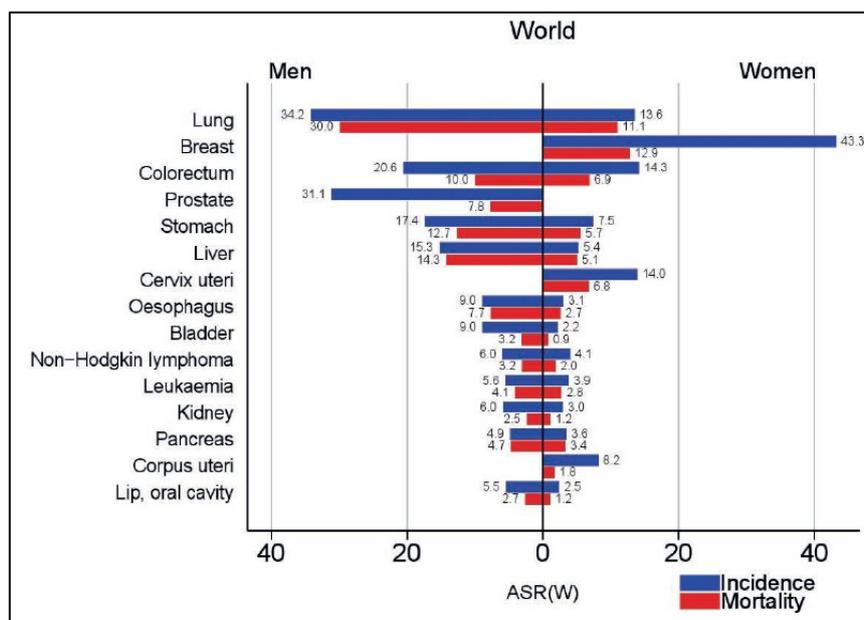


Abb. 1 Weltweite Inzidenz- und Mortalitätsraten [3].

1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Brustkrebs ist eine multifaktorielle Erkrankung aus einem Zusammenspiel genetischer und umweltbezogener Einflüsse [4].

1.1.2.1 Risikofaktoren für das Mammakarzinom

Tabelle 1 Risikofaktoren des Mammakarzinoms (modifiziert) [4].

Alter	Risiko steigt mit zunehmendem Alter
Geschlecht	Frauen >> Männer
Konstitution	Adipositas
Genetische Faktoren	BRCA1 und BRCA2
Endogene hormonelle Faktoren	- Alter zum Zeitpunkt der Menarche - Alter zum Zeitpunkt der ersten Geburt - Parität (vollendet und unvollendet) - Alter zum Zeitpunkt der Menopause
Exogene hormonelle Faktoren	- Östrogen-therapie - Progesteron-therapie - Hormonelle Kontrazeption
Diätetische Faktoren	- Hoher Konsum tierischer Fette - Alkoholkonsum - Vitamingehalt - Spurenelemente in der Nahrung
Ionisierende Strahlung	
Benigne Mammaparenchymveränderung	- Proliferative Läsionen - Atypische Hyperplasie
Anamnestisches Mammakarzinom	

1.1.2.2 Hereditäre Risikofaktoren

Auf Grund intensiver Forschungen wurden mittlerweile zahlreiche erbliche Mutationen bei Brustkrebsprädisponierenden Genen entdeckt. Etwa 5 % aller Brustkrebserkrankungen sind erblich bedingt. Die wohl bekanntesten sind die Mutationen im BRCA1- und BRCA2-Gen, welche mit einem hohen Risiko verbunden sind an Brust- und Eierstockkrebs zu erkranken [5]. Bei diesen Genen handelt es sich um Tumorsuppressorgene. Frauen mit dieser Mutation sind mit einem erhöhten Maß gefährdet an Brust- und Eierstockkrebs zu erkranken. Jedoch konnte auch eine Verantwortlichkeit für andere Krebsarten in Studien nachgewiesen werden, bei denen der Verlust der BRCA-Genfunktion zusätzlich zu einem höheren Risiko an Magen-, Bauchspeicheldrüsen-, Prostata- und Dickdarmkrebs zu erkranken führte [6]. Die Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung einer Brustkrebserkrankung ist mit einer solchen genetischen Disposition um ein zehnfaches höher als ohne. Bei Frauen mit familiärer Disposition beträgt das Risiko einer Brustkrebserkrankung etwa 50 % vor dem 50. Lebensjahr und ist damit häufiger prämenopausal als der sporadisch auftretende Brustkrebs. Mittlerweile wurden weitere Gene mit geringerer Penetranz entdeckt, unter anderem CHEK2, ATM, BRIP1, PALPB2, sowie das p53-Gen und PTEN-Gen [5]. Letztgenannte sind verantwortlich für das Li-Fraumeni-Syndrom und das Cowden-Syndrom [7]. Trotz einer geringen Inzidenz in der Allgemeinbevölkerung von 1:1000, ist das Risiko für Männer an Brustkrebs zu erkranken mit einer Mutation im BRCA1- und BRCA2-Gen relevant erhöht, wobei eine Fehlfunktion des BRCA2-Gen am häufigsten zu finden war [8]. Die BRCA-Gene sind für den Schutz genetischer Information bedeutsam. Unter anderem sind sie an der DNA-Schadenserkennung, Reparatur von Doppelstrangbrüchen, Überwachung von Kontrollpunkten des Zellzyklus, Regulation der Transkription, dem Chromatin-Remodelling sowie Beeinflussung der Aktivität des Östrogenrezeptors beteiligt [6, 9].

1.1.2.3 Hormone und Hormonrezeptoren

Hormone sind wichtig für die Übertragung von Informationen und entscheidend an Regulationsmechanismen und somit an der Aufrechterhaltung der Homöostase beteiligt.

Hormone binden als Liganden an ihre jeweiligen Hormonrezeptoren.

Östrogene und Gestagene sind Steroidhormone. Diese haben lipidlösliche Eigenschaften und diffundieren infolge dessen durch die Zellmembran in das Zytoplasma und bilden einen

Steroid-Rezeptor-Komplex, der direkte genomische Wirkung entfalten kann [10]. Hormonrezeptoren regulieren eine Vielzahl von Genen und wirken auf das Zusammenspiel von Wachstum und Differenzierung von normalem Brustgewebe ein. Zudem sind diese Hormone überdies an der Karzinogenese und dem Tumorwachstum beteiligt [11]. Bei den im Folgenden besprochenen Hormonrezeptoren handelt es sich um sogenannte Steroidrezeptoren. Sie gehören zu der Superfamilie der nukleären Rezeptoren. Dazu zählen die Rezeptoren für Glucocorticoide, Mineralocorticoide, Gestagene, Androgene und Östrogene [12].

1.1.2.4 Östrogen und Östrogenrezeptor

Östrogen vermittelt seine Wirkung über hormonabhängige Gewebe. Im Wesentlichen beinhaltet diese Mechanismen im Bereich der Reproduktion, aber auch die Aufrechterhaltung des Stoffwechselgleichgewichtes im Gewebe der Brust, des Uterus, der Vagina und der Eierstöcke. Zusätzlich übernimmt Östrogen Regulationsfunktionen im Knochenstoffwechsel, in dem es die Knochendichte bewahrt. Es schützt über eine Senkung des Cholesterinspiegels das Herz-Kreislauf-System und besitzt Funktionen im zentralen Nervensystem [13]. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass eine kumulative, übermäßige Exposition gegenüber endogenem Östrogen über die Lebenszeit einer Frau mit einem erhöhten Risiko an Brustkrebs zu erkranken korreliert [14]. Eine Hypothese ist (s. Abb. 2), dass Östrogene mit komplexen Mechanismen über zwei Wege den karzinogenen Prozess beeinflussen können. Zum einen durch, über den Abbau entstehende, genotoxische Östrogenmetabolite und zum anderen über eine Östrogenrezeptor vermittelte genomische und nicht-genomische Signalübertragung [14].

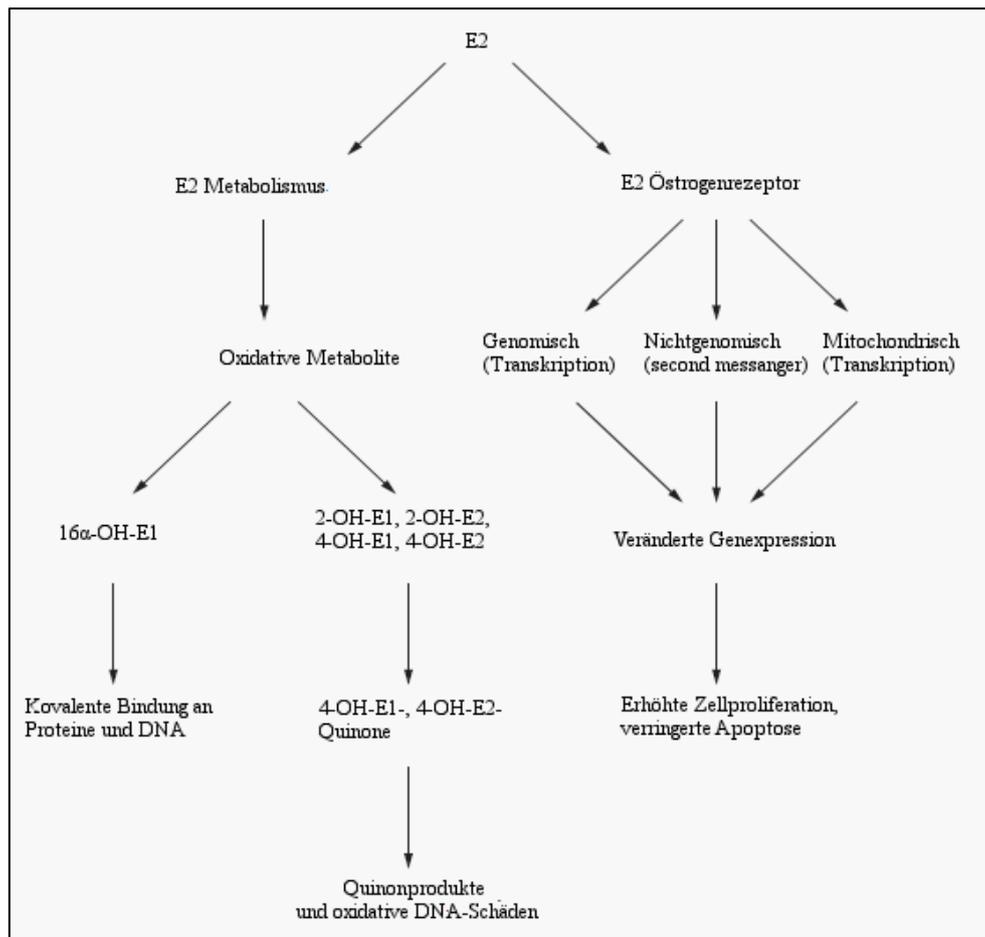


Abb. 2 Theorie zu den Mechanismen der karzinogenen Wirkung von Östrogen (E1=Östron; E2=Östradiol) [14].

Zu den prognostisch und therapeutisch entscheidenden Faktoren zählen die Östrogenrezeptoren. Es werden zwei verschiedene Östrogenrezeptoren (ER) voneinander unterschieden, ER- α und ER- β . Diese Rezeptoren setzen sich im Zellkern aus ihren Liganden und Koregulatorproteinen zu einem Signaltransduktionsmolekül zusammen [11]. Der Aufbau der Östrogenrezeptoren, in Abb. 3 dargestellt, besteht aus einer DNA-bindenden Domäne (DBD) und einer hormonbindenden Domäne (HBD). Während die DBD eine Homologie von 95 % aufweist, zeigt sich bei der HBD lediglich eine Homologie von etwa 50 % [15].

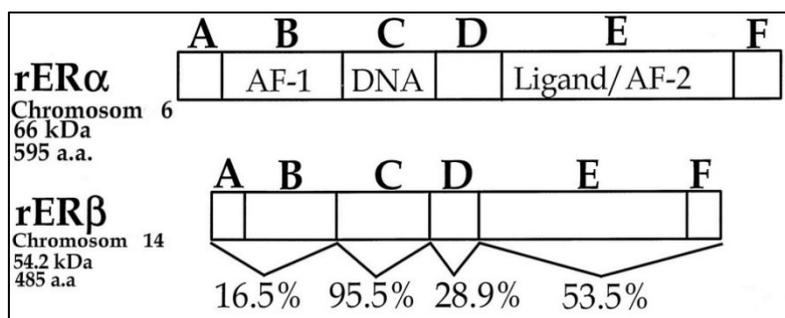


Abb. 3 Aufbau der Östrogenrezeptoren und Homologien in Prozent [16].

Aus diesem Grund lassen sich auf der einen Seite die funktionellen Unterschiede in der Transkription und auch in der Affinität für bestimmte Liganden ableiten, z.B. benötigt der ER- β wesentlich höhere Konzentrationen an Östrogen für eine maximale Transkriptionsrate. Auf der anderen Seite binden pflanzliche Östrogene, wie Coumestrol oder Genistein, mit einer zehnfach höheren Affinität zum ER- β [17]. Der selektive Estrogenrezeptormodulator (SERM) Tamoxifen, welcher zur Therapie und Prävention eingesetzt wird, hat wiederum eine gemischt agonistische und antagonistische Wirkung am ER- α , jedoch nur eine rein antagonistische Wirkung auf den ER- β [14]. Hier könnte der Schlüssel der gegensätzlichen Effekte des Östrogens liegen. Zum einen der Einfluss des Östrogens auf eine maligne Entartung, aber auch die Möglichkeit, dass Phytoöstrogene eventuell einen positiv schützenden Einfluss auf die Brustkrebsentstehung haben können und vermutlich für eine geringe Inzidenz in der asiatischen Bevölkerung verantwortlich sind [17]. Der ER- α ist im Endometrium, in den Ovarien und im Mammakarzinomgewebe exprimiert. Dagegen findet sich der ER- β hauptsächlich im Granulosagewebe, Nieren, Darmmukosa, Lungenparenchym, Knochen, Knochenmark, Gehirn und Prostatagewebe [15].

Östrogen ist in der weiblichen Brust ein wichtiger Faktor in der Entwicklung der Milchdrüse. Zellen des Drüsengewebes, die sich in der Proliferation befinden weisen normalerweise keine Östrogenrezeptoren auf. Jedoch bestätigen Forschungsergebnisse, dass sich in einem großen Anteil (70 %) des Brustkrebsgewebes ER- α nachweisen lässt [18]. In Abb. 4 sind die verschiedenen Signalwege der Östrogenrezeptoren und damit deren Komplexität dargestellt [19].

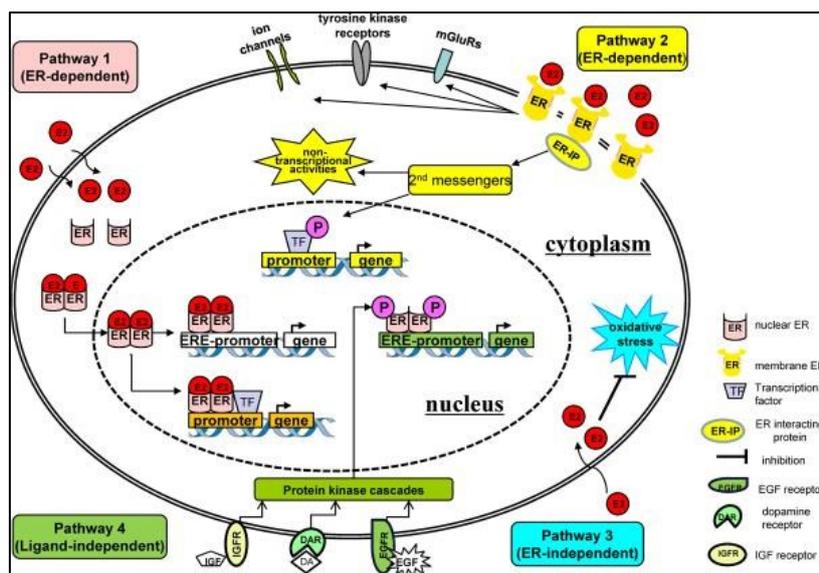


Abb. 4 Verschiedene Signalwege der Östrogenrezeptoren [19]

- Signalweg 1: Führt zu intranukleären Transkriptionsveränderungen in Östrogen gekoppelten Genen
- Signalweg 2: Östrogensignalweg über die Membran führt zu verschiedenen zytoplasmatischen Wirkungen
- Signalweg 3: Antioxidative Effekte ER-unabhängig
- Signalweg 4: Ligandenunabhängige genomische Abläufe.

1.1.2.5 Progesteron und Progesteronrezeptor

Die Progesteronwirkung erfolgt über zwei Rezeptoren, PRA und PRB. In gesundem Brustgewebe befindet sich zwischen diesen beiden Rezeptoren ein ausgeglichenes Verhältnis. Jedoch scheint schon früh im Karzinogeneseprozess dieses Verhältnis gestört zu sein. Dies hat eine veränderte Hormonreaktion zur Folge, welche zu genetischen und morphologischen Veränderungen auf Grund fehlgeleiteter PR-Transkriptionsaktivität in karzinogenem Mammagewebe führen kann [20]. Sowohl ER als auch PR können gleichzeitig im Brustkrebsgewebe vorkommen. Sie können jedoch auch jeweils einzeln exprimiert werden. Es wird eine Verknüpfung des PR's mit dem Signalweg des ER's vermutet, sodass bei der Existenz eines positiven PR-Status in Tumorgewebe derzeit von einem intakten ER-Signalweg ausgegangen wird und damit versucht wird das bessere Ansprechen der hormonellen Therapie zu erklären. Diese Vermutung bezieht sich sowohl auf die Befunde ER+/PR+ als auch ER-/PR+ [11].

1.1.3 Pathomechanismus der Karzinogenese

1.1.3.1 Zellzyklus

Der Zellzyklus gliedert sich in Interphase und Mitose. In der Interphase erfolgt die DNA-Replikation/-Synthese. Diese gliedert sich in die G1-, S- und G2-Phase. Die G1-Phase wird von Wachstumsfaktoren eingeleitet [9]. Für die Überleitung zum G1/S-Kontrollpunkt finden u.a. Dephosphorylierungen des Retinoblastomgens statt und Cycline binden an Cyclin-abhängige Kinasen (CDK). Es entsteht u.a. ein CDK/Cyclin D-Komplex, welcher für die Aktivierung der Transkription der DNA verantwortlich ist [21]. Entscheidend für die Einleitung der Zelle in die S-Phase und damit für den Start der DNA-Synthese ist die vorhandene Menge an p53-Protein. Die Bildung von p53 wird durch DNA-schädigende Prozesse stimuliert [9]. P53 sorgt in hoher Menge somit für ein Stoppsignal und ein Arrest der Zelle in der G1-Phase, wo dann Reparaturvorgänge stattfinden oder die Apoptose der Zelle veranlasst wird [21]. Sind diese abgeschlossen findet der Übergang in die S-Phase statt, wo die DNA-Replikation erfolgt. Anschließend erfolgen in der G2-Phase Reparaturmaßnahmen, die während der Replikation aufgetreten sind. Der Kontrollpunkt G2/Mi bildet den Übergang in die Mitose, der eigentlichen Zellteilung in zwei Tochterzellen, welche sich in mehrere Phasen aufteilt [9].

1.1.3.2 Karzinogenese

Zu den entscheidendsten Eigenschaften eines Tumors gehören unkontrollierte Zellproliferation, das Umgehen von Suppressoren des Wachstums, Apoptoseresistenz, Unsterblichkeit durch stetige Replikation, Förderung der Angiogenese und die Ausbreitung durch Invasion und Metastasierung [22].

An der Krebsentstehung ist eine Reihe an genetischer und molekularer Faktoren beteiligt. Dabei spielen unter anderem die Krebsanfälligkeit und die Reaktion auf eine Karzinogenexposition eine Rolle. Diese werden entweder durch erblich bedingte Krebs-Syndrome mit hoher Penetranz verursacht, z.B. BRCA1 und BRCA2, oder als gemeinsame genetische Variation oder Polymorphismen vererbt, welche mit einem niedrigen bis mittleren Risiko einhergehen. Bestimmte Umweltbelastungen zeigen eine Interaktion mit solchen Polymorphismen und beeinflussen so das Krebsrisiko über verschiedene Wege [7].

Das Tumorstadium allgemein beruht nach heutigen Erkenntnissen auf einem mehrstufigen Prozess [23]. Die Karzinogenese des sporadischen Mammakarzinoms ist ähnlich der anderer Krebserkrankungen [11]. Chromosomale Defekte und Schäden innerhalb von Nukleotidsequenzen der DNA werden hervorgerufen durch diverse molekulare Veränderungen. Tumorzellen sind charakterisiert durch expansives Wachstum und eine hohe Mutationsrate. Diese Hypermutableität könnte ein Hinweis darauf sein, dass bei Entstehung einer Krebserkrankung Mutationen in kritischen Zielgenen vorausgehen [23]. Zu Beginn kommt es durch Promotormethylierungen bzw. durch den Verlust der Heterozygotie zu einer Inaktivierung negativer Mediatoren der Zellproliferation, wie Tumorsuppressorgene. Daraus folgend kommt es vermehrt zu fehlerhaften DNA-Reparatur-Mechanismen. Im weiteren Verlauf erfolgt durch eine Häufung genetischer Schäden auch die Aktivierung positiver Mediatoren, unter anderem von Proto-/Onkogenen. Schlussendlich resultiert auf Grund sich potenzierender genetischer Veränderungen ein gestörtes Zusammenspiel aus Zellproliferation und Apoptose. Dies führt im Weiteren zu einer unaufhaltsamen Tumorexpansion mit konsekutiver Angiogenese zur Versorgung des Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen. Sobald der Tumor die Basalmembran überschreitet, kommt es zum Metastasierungsprozess [11].

1.1.3.3 Tumorsuppressorgene und Proto-, Onkogene

Tumorsuppressorgene verfügen über sogenannte Überwachungsmechanismen im Zellzyklus und sind dabei als Gatekeeper an der Regulation der Zellproliferation und der Apoptose beteiligt. Tumorsuppressorgene kodieren genauer gesagt Proteine, welche zusätzlich als Caretaker auch an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt sind. Bei einer Mutation eines Tumorsuppressorgens kommt es zu einem Verlust der Funktion des Proteins. Damit jedoch ein vollständiger Funktionsverlust auftritt, müssen in beiden Allelen des Gens Mutationen auftreten oder das intakte Allel geht verloren (Verlust der Heterozygotie) [24]. Zu den beteiligten Tumorsuppressorgen bei der Entstehung von Brustkrebs gehören BRCA1, BRCA2 und Tp53 [25]. Bei Proto-,Onkogenen kommt es dagegen nach einer Mutation zu einer Aktivierung von Funktionen (Funktionsgewinn), hier reicht demzufolge auch eine einzige Mutation eines Allels aus. Diese Gene kodieren ebenfalls bestimmte Proteine, welche an zahlreichen Signalwegen bezogen auf Zellproliferation und Apoptose beteiligt sind [26]. Bei der Entstehung von Brustkrebs sind wahrscheinlich häufiger Tumorsuppressorgene

beteiligt als Protoonkogene [27]. Bei CyclinD1 handelt es sich um ein typisches Onkogen bei der Brustkrebskrankung und dessen Überexpression führt zu einer Progression des Zellzyklus [28]. Das Erwerben der Aktivierung von Protoonkogenen oder der Inaktivierung der Tumorsuppressorgene kann erblich bedingt sein, durch karzinogene Stoffe aus der Umwelt hervorgerufen werden oder durch Fehler in der DNA-Replikation bzw. – Reparatur ausgelöst werden [26].

1.1.4 Klassifikation des Mammakarzinoms

Bei Verdacht auf ein Mammakarzinom erfolgt mittels einer Stanzbiopsie eine histologische Bestimmung. Nach WHO werden die invasiven Mammakarzinome wie folgt eingeteilt. Der mit Abstand häufigste Typ ist das invasive duktales Karzinom, gefolgt vom invasiven lobulären Karzinom. Weitere Formen sind das tubuläre, invasiv kribriiforme, medulläre, muzinöse, neuroendokrine, invasiv papilläre und das metaplastische Karzinom. Das Grading erfolgt von G1 gut differenziert bis G3 schlecht differenziert [29].

Ein Staging erfolgt zudem über die TNM-Stadien. Es findet die Bestimmung der Größe/Eindringtiefe des Primärtumors (T), Befall regionaler Lymphknoten (N), sowie das Vorhandensein von Fernmetastasen (M) statt [30].

Die Einteilung des Mammakarzinoms auf molekularer Ebene beruht auf den in der Tabelle 2 gezeigten vier Subtypen Luminal A und B, Her2, und Basal-like. An dieser Einteilung lassen sich prognostische und therapeutische Aussagemöglichkeiten ableiten [11].

1.1.4.1 Proliferationsmarker

Ki67 ist ein Protein, welches nur während aller aktiven Phasen der Mitose in den Zellen vorhanden ist, während es in der G0-Phase fehlt. Damit eignet sich das Protein, mittels Antikörpernachweis, gut als Marker für die Zellproliferation [31]. Dadurch konnte auch ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Ki67 positiven Tumorzellen und der Prognose zur Brustkrebskrankung hergestellt werden. Nachweisbar war in Studien ein schlechterer Krankheitsverlauf bei positivem Ki67- Status [32].

Tabelle 2 Einteilung des Mammakarzinoms auf molekularer Ebene [11].

	Luminal A und B	HER2	Basal-like
Expressionsmuster	<ul style="list-style-type: none"> - Expression von luminalen Keratinen 7/8/18 sowie fehlende Expression von basalen Keratinen 5/14/17 - Luminal A: hohe Expression von Hormonrezeptoren und assoziierten Genen - Luminal B: mäßige bis geringe Expression von Hormonrezeptoren und assoziierten Genen 	<ul style="list-style-type: none"> - Starke Expression von HER2 und assoziierten Genen - Geringe Expression von ER und assoziierten Genen - TP53-Mutation häufig 	<ul style="list-style-type: none"> - Expression basaler Keratine - Geringe Expression von ER und assoziierten Genen - Geringe Expression von HER2
Häufigkeit	~75-80 % aller Mammakarzinome	~15 % aller Mammakarzinome	~10 % aller Mammakarzinome
Histologie/IHC	<ul style="list-style-type: none"> - ER/PR positiv - Luminal A (etwa 50 %) meist besser differenziert - Luminal B (etwa 20 %) höhere Proliferationsrate - Her2 Expression negativ oder positiv - niedrige Proliferationsrate - Her2-negativ 	<ul style="list-style-type: none"> - Typisch ER/PR negativ - Häufig hoher Malignitätsgrad und nodal-positiv 	<ul style="list-style-type: none"> - Meist ER/PR/HER2 negativ (triple-negativ) - TP-Mutation häufig - Hohe Proliferationsrate - BRCA1-Inaktivierung (Keimbahn oder sporadisch) - Häufig hoher Malignitätsgrad - Bes. Epidemiologie
Klinik	<ul style="list-style-type: none"> - Ansprechen auf Hormontherapie (Luminal A besser als Luminal B) - Unterschiedliches Ansprechen auf Chemotherapie - Gute Prognose 	<ul style="list-style-type: none"> - Ansprechen auf Anthrazyklinbasierte Chemotherapie - Zumeist schlechte Prognose 	<ul style="list-style-type: none"> - Kein Ansprechen auf Hormon- und Trastuzumabtherapie (Herzeptin) - Ansprechen auf Platin-basierte Chemotherapie und PARP-Inhibitoren - Gewöhnlich schlechte Prognose - Ausnahmen wie z. B. „salivary gland like“ Tumoren

1.1.4.2 Her2-Rezeptor

Der zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren gehörende Her2 ist ein transmembranöser Rezeptor (EGFR). Dieser ist ein Protoonkogen und steuert in vielen epithelialen Zellsystemen die Zellproliferation. Tumorgewebe mit verstärkter Her2 Expression haben zumeist ein aggressiveres Wachstum und eine ausgeprägte Resistenz gegenüber Chemotherapeutika. Diese verstärkte Expression findet sich in 20-30 % der Fälle bei einer Brustkrebserkrankung [33]. Mittlerweile ist Trastuzumab, ein Antikörper, der sich gegen den extrazellulären Bestandteil des Her2 richtet, zum Standardtherapeutikum bei Her2-positivem Status geworden. Mittels immunhistochemischer Testung lässt sich der Grad der

Überexpression des Rezeptors einteilen. Somit können die Patienten erkannt werden, bei denen eine Antikörpertherapie wirksam wäre [34].

1.1.5 Therapie des Mammakarzinoms

Gemäß der aktuellen interdisziplinären S3-Leitlinie für das Mammakarzinom erfolgt eine individuelle Therapie [35]. Die Entscheidungen über die notwendigen Behandlungsmöglichkeiten basieren auf den TNM-Stadien, dem Status der axillären Lymphknoten, der Größe und dem Grading des Tumors, dem Hormonrezeptor- und Her2-Rezeptorstatus [32].

Bei der operativen Therapie ist heutzutage das Ziel brusterhaltend zu operieren. Jedoch ist dies abhängig unter anderem von der Tumorgröße, dem Tumor-Brust-Verhältnis und dem infiltrativen Ausbreitungsmuster. Bei Kontraindikationen zur brusterhaltenden Therapie wird eine radikale Mastektomie mit vielfältigen sekundären Rekonstruktionsverfahren durchgeführt. Im Anschluss erfolgt zumeist eine adjuvante Radiotherapie, um das Risiko eines Rezidivs zu vermindern [36]. Die systemische Therapie beruht zum einen auf der neoadjuvanten bzw. adjuvanten Chemotherapie und zum anderen auf der endokrinen Therapie. Die Entscheidung für eine neoadjuvante und damit präoperative Chemotherapie oder eine postoperative adjuvante Therapie, wird individuell, je nach Tumorgröße, Operabilität, dem Tumor-Brustverhältnisses bzw. der Tumorart gestellt. Beide Verfahren unterscheiden sich hinsichtlich des Outcomes nicht voneinander. Bei Her2 positivem Status wird zusätzlich ein Her2-Antikörper medikamentös eingesetzt [37]. Die verschiedenen therapeutischen Varianten sind in Tabelle 3 schematisch aufgelistet.

Tabelle 3 Therapieformen: ET: Endokrine Therapie; CT: Chemotherapie [37].

Subtyp	Therapie
Luminal A	ET
Luminal B (Her2-negativ)	ET ± CT („nach Risikoabwägung“)
Luminal B (Her2-positiv)	CT + Anti-HER2 + ET
Her2-positiv (non-luminal)	CT + Anti-HER2
Triple-negativ	CT

1.1.5.1 Hormonelle Therapie

Die Entwicklung der Anti-Hormon-Therapie basiert auf den karzinogenen Effekten des Östrogens in der Entstehung des Mammakarzinoms [18]. Für Brustkrebsgewebe mit

exprimierten Östrogenrezeptoren wurden Antiöstrogene, wie die selektiven Estrogenrezeptormodulatoren (SERM's) und die Aromatasehemmer entwickelt. Während die SERM's, wozu auch das Tamoxifen zählt, direkt am Rezeptor antiöstrogen wirken, hemmen die Aromatasehemmer den letzten Schritt der Östrogenbiosynthese [38].

SERM's können mit einer hohen Affinität an die Ligandenbindungsdomäne des Östrogenrezeptors binden. Über seine antagonistische Aktivität im Brustgewebe kann Tamoxifen bei der Behandlung von Brustkrebs eingesetzt werden. Dies geschieht durch eine selektive Modulation der Transkriptionsaktivität, welche gewebe- und zellspezifisch ist [39]. Die Bindung an die LBD, führt innerhalb dieser zu einer spezifisch antagonistischen Konformationsänderung [40]. Die Transkription im ER wird durch zwei separate Wege aktiviert, über die sogenannte AF-1-Region im aminoterminalen Ende A/B und die AF-2 Region im carboxyl-terminalen E-Bereich. Der Unterschied zur physiologischen Rezeptorbindung des 17 β -Estradiols zu Tamoxifen ist, dass letzteres die Gentranskription durch die AF-2-Region blockiert, während die Vermittlung über die AF-1 Region intakt bleibt. Es kommt also lediglich zu einer Verlangsamung, aber nicht zu einem vollständigen Abbruch der Transkription [13]. Unklar ist derzeit noch, warum Tamoxifen als Antagonist in Brustkrebszellen, aber als Agonist an Zellen des Endometriums und damit prokarzinogen wirkt. Vermutet wird ein unterschiedliches Vorhandensein von Koaktivatoren und Korepressoren (s. Abb. 5) [39].

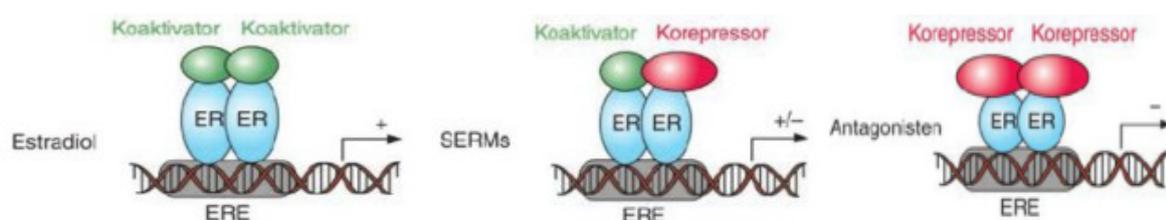


Abb. 5 Wirkungsmechanismen über Koaktivatoren und Korepressoren [41].

Auf Grund der vergleichsweise niedrigeren Affinität am ER gegenüber 17 β -Estradiol um den Faktor 100 wird eine entsprechend hohe Dosierung benötigt [41]. Tamoxifen wird über CYP2D6 in der Leber in seinen aktiven Metaboliten Endoxifen umgewandelt. Dies kann bei verminderter Aktivität dieses Enzyms und bei Medikamenten (z.B. Fluoxetin, Paroxetin), welche hemmend auf CYP2D6 wirken, zu einer verminderten Wirkung führen [42].

Laut Leitlinie wird bei Frauen, die prämenopausal erkrankt sind, Tamoxifen mit einer Dosierung von 20 mg/d zur Rezidivprophylaxe für 5 Jahre verordnet. Nach neusten Erkenntnissen wird Aromatasehemmern bei postmenopausalen Patientinnen der Vorzug

gegeben. Jedoch hat sich auch die sogenannte Sequenz- oder auch „switch“-Therapie etabliert, bei der Tamoxifen und Aromatasehemmer in verschiedenen Schemata nacheinander gegeben werden können. Insgesamt erfolgt die endokrine Therapie auch hier für 5 Jahre und bei Bedarf bis zu 10 Jahre [35].

Der Nachteil einer Tamoxifenbehandlung besteht in dem Risiko einer vorhandenen Resistenz oder einer sich im Laufe der Behandlung entwickelnden Resistenz. Hieraus ergibt sich die Gefahr eines wesentlich höheren Rezidivrisikos. Unterschiedliche Mechanismen sind daran beteiligt. Zum einen wurde ein Verlust der ER-Expression auf ER-positiven Tumorzellen und o.g. pharmakologische Prozesse beobachtet. Zum anderen werden diverse molekulare Modulationen unter Tamoxifen vermutet, welche sich auf Signalwege beziehen, die an der Zellproliferation und Apoptose beteiligt sind [43].

1.2 Heilpflanzen

Unter dem Begriff Alternativmedizin werden therapeutische und diagnostische Verfahren, welche an Stelle der leitlinienorientierten Medizin angewandt werden, zusammengefasst. Die komplementäre Medizin nutzt solche Verfahren zusätzlich zur klassischen Schulmedizin. Die sogenannte CAM (Complementary and Alternative Medicine) beinhaltet unter anderem auch die Verwendung von Naturprodukten, wie Nahrungsergänzungsmittel, Kräuter und andere pflanzliche Produkte [44]. Zahlreiche Studien wurden bereits zu diesem Thema in Zusammenhang mit der Brustkrebserkrankung durchgeführt. Unter anderem wird der Einsatz pflanzlicher Produkte zusätzlich zur klassischen Brustkrebstherapie, gerade bei hormonsensiblen Formen, kritisch gesehen, da das Ausmaß pflanzlicher Östrogene auf das Wachstum der Tumorzellen nicht abschließend beurteilt werden kann [45]. Insbesondere schwierig wird die Therapie, wenn Patienten ohne Wissen des Onkologen pflanzliche Mittel konsumieren, welche sich im Zweifel einer Therapie entgegenwirken. Deshalb sind ein gemeinsamer Konsens mit dem Patienten und das Wissen über komplementäre Möglichkeiten für den Mediziner von wichtiger Bedeutung [44].

Die Definition der Phytotherapie beinhaltet die Linderung, Heilung und Prävention von Erkrankungen durch Arzneipflanzen. Diese können in Form von Pflanzenteilen (Blüten, Wurzeln) benutzt werden, aus deren Bestandteilen, wie ätherischen Ölen, sowie der Zubereitung zu Trockenextrakten, Tinkturen oder Presssäften. Die Phytotherapie versteht sich als Teil der naturwissenschaftlich basierten Schulmedizin [46].

1.2.1 Sekundärer Pflanzenstoffwechsel

Den Primärstoffwechsel oder auch Grundstoffwechsel benötigt eine Pflanze für die Aufrechterhaltung des Lebens und der Fortpflanzung. Dieser ist grundsätzlich in allen Pflanzen gleich. Dazu gehört die Metabolisierung von Kohlenhydraten, Fetten, Acetylcoenzym A, Proteinen und Nucleinsäuren [47].

Der Sekundärstoffwechsel einer Pflanze bringt Metabolite hervor, welche in erster Linie nicht überlebensnotwendig oder essentiell für die Reproduktion sind, aber dennoch entscheidende ökologische Aufgaben im Stoffwechselsystem der Pflanze haben. Früher wurden die Sekundärmetabolite als unbrauchbare, teils toxische Nebenprodukte angesehen. Heute besteht das Wissen darin, dass Farb- und Aromastoffe Insekten anlocken können und andere Stoffe der Abwehr dienen, z.B. der Schutz vor Fressfeinden durch bitter schmeckende oder toxische Substanzen, sowie Schutz der Pflanze vor übermäßiger Einwirkung von UV-Strahlung [48]. Es wird vermutet, dass dieser sich durch verschiedene Mutationen und Neuarrangements von Genen des Primärstoffwechsels im Laufe der Evolution entwickelt hat. Der sekundäre Stoffwechsel charakterisiert sich durch eine sehr hohe Variabilität innerhalb der verschiedenen Pflanzenarten. Hierbei handelt es sich jedoch nicht um einen separaten Prozess, sondern um ein Netzwerk hervorgegangen aus dem Primärstoffwechsel. Stoffwechselwege werden untereinander verknüpft und Zwischenprodukte für die weitere Biosynthese sekundärer Pflanzenstoffe genutzt [47].

1.2.2 Phytoöstrogene

Bestimmte Tumorarten sind in westlichen Ländern häufiger anzutreffen als in der asiatischen Bevölkerung, z.B. Brust, Prostatakrebs und das Kolonkarzinom. Schon vor einigen Jahren wurde ein Zusammenhang mit der unterschiedlichen Ernährung und Umwelteinflüssen untersucht [49].

Zu den Phytoöstrogenen, welche zu den sekundären Pflanzenstoffen gehören, werden drei wichtige Gruppen gezählt, die Isoflavonoide, Coumestane und Lignane [50]. Erstere befinden sich vor allem in Sojaprodukten, Kichererbsen und Klee. Lignane sind in hohen Konzentrationen in Leinsamen, aber auch in Hülsenfrüchten, Getreide- oder Vollkornprodukten, sowie in Beeren und in bestimmten Gemüsearten nachweisbar, während Coumestane hauptsächlich in Sojasprossen vorhanden sind [50, 51].

Die Menge der aufgenommenen Phytoöstrogene aus der pflanzlichen Nahrung variiert stark und ist abhängig von kulturellen Einflüssen und Nahrungsgewohnheiten. In Deutschland wird die mittlere Aufnahme von Phytoöstrogenen auf weniger als 1 mg/d geschätzt, während in Asien eine Menge von ca. 50- 100 mg/d konsumiert wird [52].

Tabelle 4 Vorkommen der Phytoöstrogene in der Nahrung [50].

Isoflavonoide		Lignane		Coumestane	
Gemüse	Soja-Produkte	Getreide-sorten	Früchte, Gemüse, Samen	Bohnen-sprossen	Kräuter
Sojabohnen	Sojaschrot	Weizen	Äpfel	Alfalfa	Klee
Linsen	Sojamehl	Weizenkeime	Birnen	Sojabohnen	
Div. Bohnen	Sojamilch	Gerste	Leinsamen		
Kichererbsen	Tofu	Hopfen	Sonnenblumenkerne		
		Roggen	Möhren		
		Hafer	Fenchel		
			Zwiebeln		
			Pflanzliche Öle		

Der Aufbau der Phytoöstrogene ist durch Ähnlichkeiten mit dem endogenen Östrogen gekennzeichnet. Östrogen kann durch seinen phenolischen Ring A innerhalb des Steroidmoleküls in der Strukturformel an seinen Rezeptor binden. Die nichtsteroidalen Phytoöstrogene weisen auch eine Phenolgruppe auf. Diese können jedoch nur mit schwächerer Affinität binden. Dadurch sind wesentlich höhere Konzentrationen als beim endogenen Östrogen zur Wirksamkeit notwendig [42]. Diese entscheidende Phenolgruppe entsteht erst durch eine komplexe enzymatische Metabolisierung der pflanzlichen Phytoöstrogene im Magen-Darm-Trakt des Menschen [50]. Hierfür verantwortlich sind bakterielle Prozesse der Darmflora und ein sich anschließender Konjugationsprozess, welcher u.a. mit Hilfe der Enzyme UDP-Glukuronosyltransferase und Sulfotransferase in der Leber stattfindet [53]. Wieviel der biologisch aktiven Formen im Körper produziert werden, ist abhängig von der jeweiligen individuellen bakteriellen Mikroflora im Darm [54].

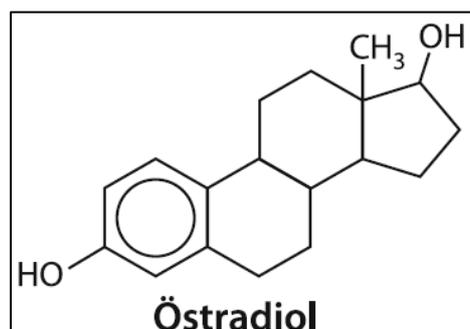


Abb. 6 Strukturformel des endogenen Östrogens [55].

1.2.2.1 Isoflavonoide

Zu den für den menschlichen Organismus bedeutendsten Isoflavonoiden zählen Genistein, Daidzein und Glycitein. Diese liegen in verschiedenen chemischen Formen vor, unkonjugiert (nichtiglykosidisch), als Glukoside, als Acetylglukoside und Malonylglukoside. Als sekundäre Pflanzenstoffe existieren Isoflavonoide hauptsächlich in den glukosidischen Formen, welche nicht vom Körper aufgenommen werden können. Diese werden nach oraler Aufnahme von einer in der Dünndarmmembran vorhandenen Hydrolase und von bakteriellen Glukosidasen im Darm in ihre aglykone Form hydrolysiert [56]. Daidzein wird zu Dihydrodaidzein, *O*-Desmethylangolensin, und Equol umgewandelt, wobei sich in Laborstudien die beiden letztgenannten am biologisch aktivsten zeigten. Genistein wird Analog zu Dihydrogenistein, 6'-hydroxy-*O*-desmethylangolensin und 2-(4-hydroxyphenyl)propionsäure umgewandelt. Eine weitere Umwandlung zu einem equoläquivalenten Metabolit konnte nicht beobachtet werden [57]. Equol kann nur von ca. 1/3 aller Personen produziert werden, darunter häufig Vegetarier und Menschen aus der asiatischen Bevölkerung [54].

Isoflavonoide gelangten auf Grund vielfältiger hormonabhängiger und hormonunabhängiger Wirkungen in den Fokus der Forschung. Ihr Einfluss auf den prämenopausalen und menopausalen Stoffwechsel der Frau, auf hormonabhängige Karzinome, auf kardiovaskuläre Erkrankungen, auf den Knochenstoffwechsel und bestimmte antioxidative Effekte wurden in den letzten Jahren intensiv untersucht [58]. In dieser Arbeit wird das Hauptaugenmerk auf die Wirkung der Isoflavonoide in Bezug auf die Karzinogenese der Brustkrebskrankung gelegt.

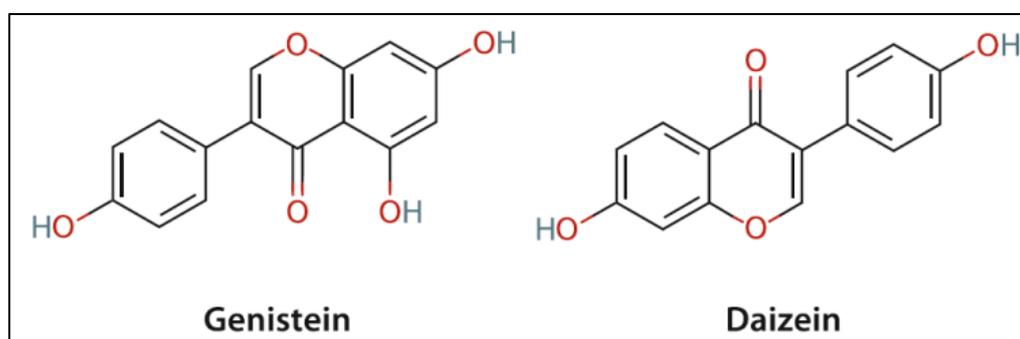


Abb. 7 Strukturformeln der Isoflavonoide [55].

1.2.2.2 Lignane

Ebenso, wie die Isoflavonoide gehören auch die Lignane zu wichtigen sekundären Pflanzensstoffen. Zu den Lignanen gehören u.a. Lariciresinol, Secoisolariciresinol und Pinoresinol [59].

Die Aufnahme und Umwandlung pflanzlicher Lignane in Enterolignane ist von Person zu Person sehr verschieden. Bis auf dem Oligomer in Leinsamen befinden sich Lignane in glykosidischer und nicht glykosidischer Form. Im Magen-Darm-Trakt werden die glykosidischen Lignane und das Oligomer aus den Leinsamen über einen komplexen bakteriellen Prozess hydrolysiert und zu den Enterolignanen Enterolacton und Enterodiol umgewandelt [60]. Die Lignane unterliegen ebenfalls dem enterohepatischen Kreislauf und somit der Glukuronidation und Sulfation. Die Ausscheidung erfolgt biliär, fäkal und über den Urin [61]. Auch bei Lignanen konnten antiöstrogene Effekte auf hormonabhängige Karzinome (Prostata, Brust) bereits in einzelnen Studien gezeigt werden, dazu kommen antioxidative Eigenschaften und die Beeinflussung über bestimmte Mechanismen des Herz-Kreislauf-Systems [62].

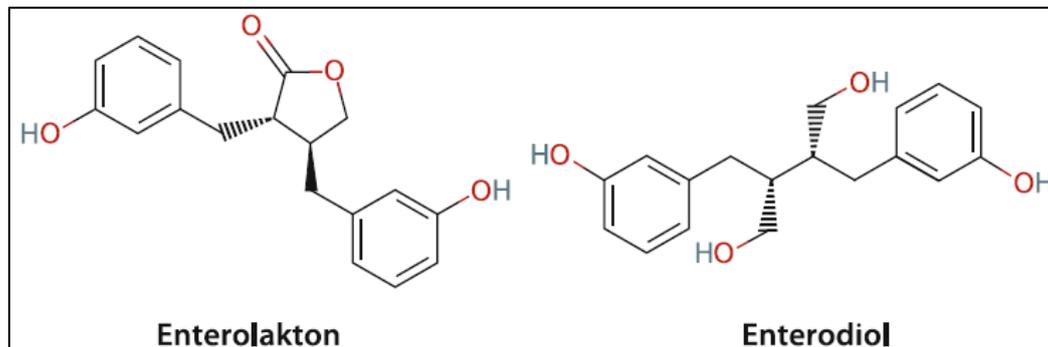


Abb. 8 Strukturformeln der Lignane [55].

1.2.2.3 Coumestane

Zu dem wissenschaftlich interessantesten Abkömmling der Coumestane gehört Coumestrol [63]. Die Forschung bezüglich dieser Gruppe an Phytoöstrogenen ist bisher noch nicht so vielfältig, aber Ergebnisse zeigen ebenso einen Einfluss auf das Brustkrebsgewebe [64]. Andere Arbeiten beschäftigen sich mit der entzündlichen Wirkung über die Bindung von Coumestrol am ER- β in Zusammenhang mit verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen

[65]. Auch wurden für Coumestrol antioxidative Effekte nachgewiesen, welche sich schützend vor einer malignen Entartung auswirken könnten [66].

1.2.3 Phytoöstrogene und Brustkrebs

In zahlreichen Studien wurden die Auswirkungen gesunder Ernährung bezogen auf Brustkrebs untersucht. Mit einer ausgewogenen Kost, vorwiegend bestehend aus Früchten, Gemüse, Vollkorn und verschiedenen Samen, konnten positive Effekte hinsichtlich einer Risikoreduktion, auf das Outcome, das Rezidivrisiko und das Ansprechen einer Therapie nachgewiesen werden [67]. Dafür spräche auch, dass asiatische Frauen, die in westliche Länder migrierten und sich den westlichen Ernährungsstil aneigneten, ein höheres Risiko hatten über Generationen hinweg an Brustkrebs zu erkranken [68].

Eine wichtige Rolle dabei spielen die ER's. Dem ER- α wird eine proöstrogene und damit proliferative Funktion auf ER-positive Brustkrebszellen zugesprochen. Naheliegender wird vermutet, dass über den ER- β diese proliferativen Effekten in gesundem Brustgewebe gesteuert werden können, jedoch diese Koeffekte in vielen Tumoren verloren gehen. Die präventiven Funktionen der Phytoöstrogene, welche fast alle bevorzugt am ER- β binden, ließen sich mittels dieser These erklären [67].

In Studien ließ sich nachweisen, dass eine hohe Konzentration an Phytoöstrogenen zu einer erhöhten Konzentration des sexhormonbindenden Globulins (sex hormone binding Globuline, SHBG) im Plasma führt. SHBG bindet dann verstärkt endogenes Östrogen, sodass die Konzentration von freiem aktivem Östrogen im Plasma geringer ist. Dies ist vermutlich hauptsächlich bei postmenopausalen Frauen der Fall [69].

Bei Isoflavonoiden wurde eine östrogene und antiöstrogene Wirkung nachgewiesen. Allgemein binden sie mit einer mehr als 100fach geringeren Affinität am ER als 17- β -Estradiol. Eine Ausnahme bildet Genistein, dessen Affinität vergleichbar ist, wobei die Affinität zum ER- β wesentlich höher ist als zum ER- α . Die Wirkung der Isoflavonoide ist abhängig von der endogenen Östrogenkonzentration. Bei einer niedrigen Konzentration erfolgt die Bindung vorrangig an ER- β , ist sie dagegen hoch, erfolgt die Bindung über ER- α und die endogene Östrogenwirkung wird gehemmt [70]. Mit Sicherheit ist diesbezüglich noch nicht abschließend geklärt, welche Effekte die östrogenähnliche Wirkung auf die Erkrankung an Brustkrebs hat.

Die beiden Enterolignane (ENL) besitzen nur eine schwache östrogene Aktivität und binden mit geringer Affinität am ER, bevorzugt am ER- α . Zudem konnte ebenfalls eine Wirkung abhängig von der endogenen Östrogenkonzentration nachgewiesen werden. Interessant war das Ergebnis einer Studie, in der gezeigt werden konnte, dass geringe ENL-Konzentrationen die DNA-Synthese und damit das Tumorwachstum von Brustkrebszellen steigerten, während hohe Konzentrationen es hemmten [72]. Es konnte auch gezeigt werden, dass ENL und 17- β -Estradiol (E2) jeweils für sich das Wachstum der Brustkrebszellen erhöhte, wohingegen die kombinierte Gabe dieses hemmte. Demzufolge resultierte die Annahme, dass ENL die Bindung von E2 an den ER und damit die proliferative Wirkung verhindert [62].

In einer weiteren Arbeit wurde gezeigt, dass Lignane in der Lage sind, die von E2 induzierte Angiogenese zu hemmen. E2 steigert die Konzentration des vaskular endothelial growth factors (VEGF), dieser ist ein starker Wachstumsfaktor für die Angiogenese [73].

Coumestrol wird zu den potentesten Phytoöstrogenen gezählt. Die Affinität zum ER ist zwar deutlich schwächer als die von E2, wie bei anderen Phytoöstrogenen, aber stärker als diejenige der Isoflavonoide oder Lignane. Die Konzentration an Phytoöstrogenen im menschlichen Körper ist zudem in der Lage diese von E2 deutlich zu übersteigen und entscheidende Prozesse zu beeinflussen [63]. Coumestrol bindet mit einer hohen Affinität und agonistischen Funktion an den ER- β ähnlich derer von E2, zeigte gegenüber anderen Phytoöstrogenen jedoch keine Hemmung bei gleichzeitiger Gabe mit E2 [64].

Auch für Coumestrol konnte die Hemmung einer Proteinkinase und zwar der Casein-Kinase 2 (CK2) nachgewiesen werden. Diese Kinase hat entscheidende Effekte auf die Zellproliferation, Apoptose und den Zellzyklus. Durch eine verminderte Phosphorylierung auf Grund der Hemmung durch Coumestrol zeigte sich eine Hemmung des Zellwachstums maligner Zellen [74].

1.2.4 *Petroselinum crispum* subsp. *Tuberosum*

Petroselinum crispum auch gemeinhin Petersilie genannt, gehört zu der Familie der Doldenblütengewächse. Es werden zwei Unterarten beschrieben, die klassische Blattpetersilie (*Petroselinum crispum* subsp. *crispum*) und die Wurzelpetersilie (*Petroselinum crispum* subsp. *tuberosum*) [75]. Ursprünglich kommt die Petersilienwurzel aus dem Mittelmeer und wird heute weltweit angebaut [76]. Es handelt sich um eine zweijährige krautige Pflanze. Diese benötigt für ihren Lebenszyklus zwei Wachstumsperioden. In der ersten Periode

wachsen die Wurzeln, Blätter und Sprossen und in der folgenden Periode werden Blüten, Früchte und Samen gebildet. Die Wurzelpetersilie wird zumeist schon in der vegetativen ersten Periode geerntet [77]. Der Stängel der Pflanze wächst ca. 30-100 cm in die Höhe und ist aufrecht und rund. Sie trägt dunkelgrüne Laubblätter, Blüten mit Doppeldolden und eine braune, ovale Frucht. Die Petersilienwurzel hat einen charakteristischen würzigen Geruch und eine dicke, spindel- bzw. rübenförmige Wurzel. Die Wurzel ist meist gelbweißlich und bildet einen süßlich, scharfen Geschmack aus [75]. Die Inhaltsstoffe der getrockneten Wurzel bestehen aus Ätherischem Öl (0,05-0,12 %) mit Apiol, β -Pinen und Myristicin als Hauptkomponenten, sowie α -Pinen, R-(+)-Limonen, β -Bisabolen. Weitere sind Phthalide (Ligustilid, Senkyunolid), Furanocumarine (Bergapten, Oxypeucedanin, Isopimpinellin, Psoralen, Xanthotoxin, Imperatorin), Flavonoide ca. 0,2-1,3 % (Apiin) und Polyine (Falcarinol, Falcarindiol) [76].

Die Petersilienwurzel hat eine harntreibende Wirkung und steigert Uteruskontraktionen. Zudem wird sie zur Behandlung von Harnwegsinfektionen und Nierensteinen genutzt. In der Schwangerschaft, auf Grund der Gefahr eines Abortes, bei entzündlichen Nierenerkrankungen, sowie Nierenversagen oder Herzinsuffizienz, ist sie kontraindiziert [46]. In Bezug auf die Auswirkung eines Extrakts der Petersilienwurzel auf Brustkrebsgewebe konnten bereits in einer früheren Arbeit antiproliferative Effekte auf benigne und maligne ER-positive Zellen (MCF-12a/ MCF-7) nachgewiesen werden. Ein Zusammenhang mit Phytoöstrogenen wird hierbei vermutet [78].

Bei weiteren Varianten von Extrakterstellungsverfahren aus den Blättern und Stängeln der Blattpetersilie gibt es zwei gegensätzlich Studienergebnisse. Ein Studienergebnis ging mit dem Nachweis eines proöstrogenen und somit proliferativen Einflusses des Extrakts auf ER-positive Zellen (MCF-7) einher. Vermutet wurde dies über den Nachweis verschiedener Isoflavone, speziell einem neuen Flavon-Glykosid, 6'-Acetylapiin, welches in Kombination mit einem Monoterpens östrogene Effekte zeigte [79]. Dieser Effekt bestätigte sich in der nachfolgenden Arbeit nicht. Hier zeigten sich im Gegenteil schwach antiproliferative Auswirkungen auf die ER-positiven Brustkrebszellen (MCF-7), weitere Untersuchungen wären hierbei jedoch noch bestätigend notwendig [80].

Eine weitere Arbeit beschäftigte sich mit der antikarzinogenen Wirkung von Petersiliensamen auf Brustkrebszellen. Es konnte eine wachstumshemmende Wirkung auf ER-positive Zellen (MCF-7) nachgewiesen werden [81].

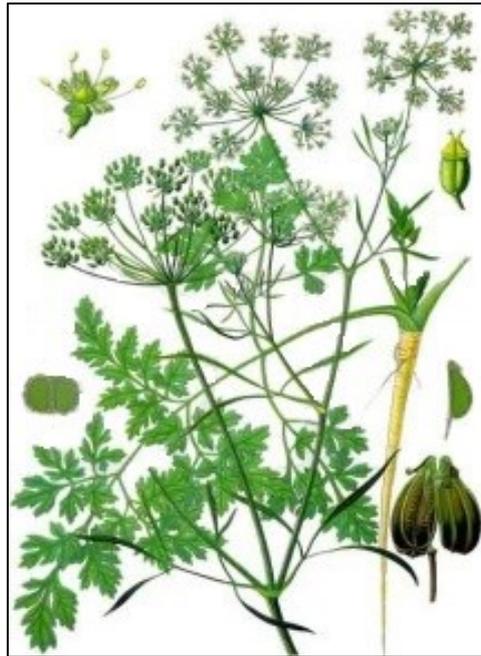


Abb. 10 *Petroselinum crispum* [75].



Abb. 11 Petersilienwurzel (eigene Quelle).

2. Zielstellung

Die Erkrankung an Brustkrebs, ist eine der häufigsten malignen Tumorerkrankungen der Frau und zeigt mit 43,3 / 100.000 die höchste aller Inzidenzraten für Krebserkrankungen überhaupt. Es ist eine Erkrankung, welche bisher schon Grundlage zahlreicher Forschungsansätze war, wodurch sich heutzutage immer effizientere und auch schonendere Therapieverfahren etablieren konnten. Ein Augenmerk liegt dabei auch auf der unterschiedlichen regionalen Verteilung. Schon seit längerem werden dahingehend Untersuchungen durchgeführt, welche den Fokus auf bestimmte Einflüsse der Ernährungsformen legen und exogene Einflüsse der Umwelt berücksichtigen. Die Nutrition der asiatischen Bevölkerung besitzt einen hohen Anteil an pflanzlichen Produkten, sodass sich Forschungsarbeiten auch auf die sekundären Pflanzenstoffe, allen voran auf die Phytoöstrogene und deren Einfluss auf die Prävention bzw. Therapie der Brustkrebserkrankung konzentrieren. Vor allem die Wirkung der einheimischen Leinpflanze, welche reich an Phytoöstrogenen ist, wurde vielfach untersucht. Diese Arbeit untersucht eine andere Pflanzenart, die Petersilienwurzel (*Petroselinum crispum subsp. Tuberosum*) und deren Wirkung auf Brustkrebszellen. Die Petersilienwurzel wird durch ihren aromatischen Geschmack in der Zubereitung von heimischen Speisen derzeit wiederentdeckt und besitzt eine lange Tradition in der pflanzlichen Heilkunde. Ziel dieser Arbeit ist es einen Pflanzenextrakt mit Hilfe von Ethanol als Lösungsmittel herzustellen, zunächst auf dessen Inhaltsstoffe zu untersuchen und dann mit Hilfe verschiedener Testverfahren die Auswirkungen auf zwei verschiedene Zelllinien, maligne und benigne Mammazellen, zu erfassen. Dafür wird der LDH-Test genutzt, um die zytotoxische Wirkung des Pflanzenextrakts zu ermitteln. Mit Hilfe des MTT- Testes wird die Viabilität der Zellen unter Einfluss des Extrakts untersucht und der BrdU- Proliferationstest wird zur Erfassung des Wachstums der Zellen genutzt. Zusätzlich werden Untersuchungen hinsichtlich des Zellmetabolismus vorgenommen. Dafür werden die Glukose und der pH-Wert im Zellüberstand bestimmt. Des Weiteren wird mit den gleichen Methoden das Verhalten der Tumorzellen unter Einwirkung des Pflanzenextrakts in Kombination mit dem selektiven Estrogenrezeptormodulator Tamoxifen untersucht. Zusätzlich erfolgt die Untersuchung der Hormonrezeptorexpression der Zelllinien hinsichtlich der zwei Östrogenrezeptoren und der Progesteronrezeptoren.

3. Materialien und Methoden

3.1 Materialien

Mikrowellenextraktion	
Materialien	<ul style="list-style-type: none"> • Mikrowelle Discover SP-D, <i>CEM GmbH</i> • Concentrator 5301, <i>Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH</i> • Vakuumpumpe, <i>vacuubrand GmbH + Co. KG</i> • Zentrifuge, <i>Andreas Hettich GmbH & Co. KG</i>
Chemikalien	<ul style="list-style-type: none"> • Petersilienwurzel, biol. Anbau, M.-V. • Ethanol 96 %, <i>Carl Roth GmbH + Co. KG</i>
Extraktanalyse	
Materialien	<ul style="list-style-type: none"> • Thermo Finnigan MAT95 Hochleistungs-Massenspektrometer, <i>Thermo Finnigan MAT GmbH</i> • Hochtemperatur-Probenschubstange, <i>IGT Instrumente- und Geräte-Technik GmbH</i>
Zellkultivierung	
Zelllinien	<ul style="list-style-type: none"> • MCF-7, <i>DSMZ GmbH</i> • MCF-12a, <i>DSMZ GmbH</i>
Materialien	<ul style="list-style-type: none"> • Sicherheitswerkbank, <i>Heraeus Instruments GmbH</i> • Zentrifuge, <i>Andreas Hettich GmbH & Co. KG</i> • Wärmeschrank (37 °C, 5 % CO₂), <i>Heraeus Instruments GmbH</i> • Lichtmikroskop Olympus CK-2 TR, <i>Olympus</i> • Kühl-, Gefrierschrank, <i>Liebherr</i>
Chemikalien	<ul style="list-style-type: none"> • Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM), <i>Sigma-Aldrich-Chemie</i> • Nutrient Mixture F-12 (Ham's F-12), <i>c.c.pro GmbH</i> • Fetales Kälberserum (FKS), <i>Sigma-Aldrich-Chemie</i> • Horse Serum, <i>Sigma-Aldrich-Chemie</i> • Suppl. Mammaepithel, <i>Promo Cell</i> • Penicillin/Streptomycin, <i>PAA Laboratories GmbH</i> • Amphotericin B, <i>PAA Laboratories GmbH</i>

	<ul style="list-style-type: none"> • Trypsin-EDTA, <i>PAA Laboratories GmbH</i> • Phoshatgepufferte NaCl-Lösung (PBS), <i>Invitrogen, England</i> • Trypanblau, <i>PAA Laboratories GmbH</i> • Dimethylsulfoxid (DMSO), <i>G. Vogler b.v. Rotterdam</i>
Testmethoden	
Testsysteme	<ul style="list-style-type: none"> • Cytotoxicity Detection Kit, <i>Roche Diagnostics GmbH</i> • Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric), <i>Roche Diagnostics GmbH</i> • Cell Proliferation Kit I (MTT), <i>Roche Diagnostics GmbH</i> • Hydrogen Peroxide Colorimetric Assay Kit, <i>BioVision inc.</i>
Materialien	<ul style="list-style-type: none"> • ELISA-Reader (Model 680 Microplate Reader), <i>Bio-Rad Laboratories Inc.</i> • Biosens 5140, <i>EKF Diagnostics</i> • Vortex-Genie, <i>Scientific Industries</i> • Orion 3 Star, pH-Benchtop, <i>Thermo scientific</i>
Chemikalien	<ul style="list-style-type: none"> • 17β-Estradiol, <i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i> • Tamoxifen, <i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i> • Triton X-100, <i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i> • Wasserstoffperoxid 35 %, <i>Merck KGaA</i> • Schwefelsäure 30 %, <i>Carl Roth GmbH & Co</i> • Salzsäure 32 %, <i>Carl Roth GmbH & Co</i>
Immunhistochemie	
Detektions-system	<ul style="list-style-type: none"> • ImmPRESS™ Universal Reagent, Anti-Mouse/Rabbit Ig Peroxidase, <i>Vector Laboratories</i>
Chemikalien	<ul style="list-style-type: none"> • LineRed IHC, <i>LINARIS Biologische Produkte GmbH</i> • Formafix, 4 %, <i>Grimm med. Recycling GmbH</i> • Wasserstoffperoxid 35 %, <i>Merck KGaA</i> • Horse Serum, <i>Sigma-Aldrich-Chemie</i> • Phoshatgepufferte NaCl-Lösung (PBS), <i>Invitrogen, England</i>
Materialien	<ul style="list-style-type: none"> • AxioCam MRC, <i>Carl Zeiss</i>

3.2 Methoden

3.2.1 Pflanzenextrakt

3.2.1.1 Pflanzenmaterial

Das Ausgangsmaterial bildeten Petersilienwurzeln (*Petroselinum crispum subsp. Tuberosum*), welche im April 2014 kommerziell aus biologischem Anbau und aus Mecklenburg-Vorpommern stammend, erworben wurden.

3.2.1.2 Mikrowellenextraktion

Die frischen Petersilienwurzeln wurden in rohem Zustand in ca. 5-7 mm große Stückchen zerkleinert und anschließend im Keramikmörser zu einem groben Fasergemisch verarbeitet. Die Extrakterstellung erfolgte anschließend im Mikrowellenverfahren. Anders als bei einer konvektiven Heizform, bei der Wärme von außen zugeführt werden muss und sich das Substrat durch Wärmeleitung erhitzt, erfolgt die Erhitzung durch Mikrowellentechnik im Substrat selbst (s. Abb. 12) [82].

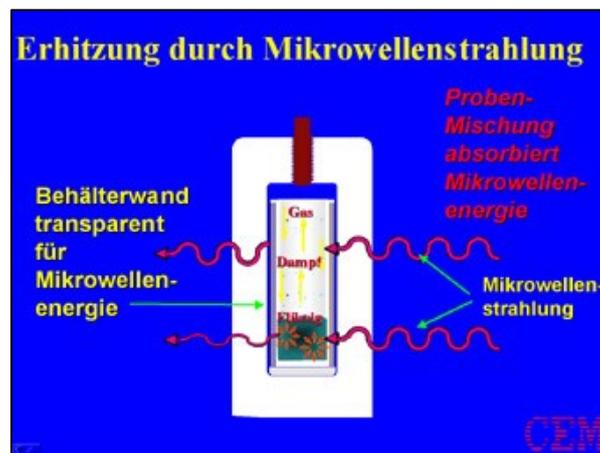


Abb. 12 Theorie der Mikrowellenstrahlung [82].

Der Vorteil gegenüber traditionellen Verfahren, ist eine schnellere Extraktion, welche weniger Lösungsmittel benötigt, eine höhere Extraktionsrate und bessere Energieeffizienz besitzt und kostensparenderes Arbeiten ermöglicht [83]. Bei Mikrowellen handelt es sich um elektromagnetische Wellen. Diese besitzen eine relativ niedrige Energie. Dadurch kann eine schonende Extraktion erfolgen, welche die Molekülstrukturen innerhalb der Proben nicht

angreift. Es erfolgt über Dipole eine Anregung von Ionen ohne dabei Elektronenübergänge zu verursachen. Bevorzugt werden polare Lösungsmittel genutzt, da diese ein Dipolmoment besitzen [84]. In dieser Arbeit wurde dafür Ethanol als polare Substanz verwendet. Im Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik und Poliklinik Rostock stand für das Extraktionsverfahren die Mikrowelle Discover SP-D zur Verfügung (s. Abb. 13).



Abb. 13 Discover SP-D [82].

Für die Extraktion wurden die dazugehörigen Druckgefäße aus Glas mit einem Volumen von 35 ml verwendet. In diese wurden jeweils 4g des Petersilienwurzelgemisches und 20 ml Ethanol als Lösungsmittel gefüllt. Eine hohe Durchrührungsrate wurde durch einen etwa 1 cm langen Magnetrührer gewährleistet. Der Prozess erfolgte bei einer Temperatur von 80 °C, einem Druck von 30 bar und einer Energieleistung von 800 Watt. Die Durchrührungszeit (stirring time) betrug 30 min und die Durchmischung erfolgte für 5 min (mix time). Das entstandene Produkt wurde danach in einem Zentrifugenröhrchen (50 ml) für 5 min zentrifugiert und der Überstand im Anschluss über eine Vakuumpumpe filtriert. Insgesamt wurden 100 g rohe Petersilienwurzel verarbeitet.

Dieser vorläufige Petersilienwurzelextrakt wurde in einem Konzentrator der Firma Eppendorf konzentriert. Bei diesem Verfahren wurde dem Rohextrakt Feuchtigkeit mittels eines Vakuums, Rotation und einer Temperatur von 45 °C entzogen. Dazu wurde nach und nach der Rohextrakt in Eppendorf-Röhrchen gefüllt und diesem Prozess 16x unterzogen bis ein hochkonzentrierter Endextrakt entstand, welcher im Kühlschrank bei – 85 °C für die nachfolgenden Zelltests aufbewahrt wurde.

3.2.1.3 Verdünnungsreihe des Extrakts

Es erfolgte für den gewonnenen Rohextrakt eine Gewichtsermittlung und im Anschluss wurde dieser mittels Ethanol gelöst, sodass sich eine Stammlösung mit einer Konzentration von 100 mg/ml ergab. Aus der Stammlösung wurden dann 7 Verdünnungsstufen mit Ethanol hergestellt. Die angegebenen Konzentrationen entsprechen den Endkonzentrationen der verschiedenen Testreihen. Diese sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5 Verdünnungsreihe des Pflanzenextrakts.

500 µg/ml	100 µg/ml	50 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml	0,1 µg/ml	0,01 µg/ml
-----------	-----------	----------	----------	---------	-----------	------------

3.2.2 Massenspektrometrie

Mittels der Massenspektrometrie werden Teilchen mit einheitlichem Masse-Ladungs-Verhältnis durch elektromagnetische Felder qualitativ und quantitativ aufgetrennt und erscheinen an derselben Stelle des Detektors. Die Massenspektren werden dann aus den Linienspektren der Ionen gebildet und stellen sich als Peaks dar. Mit dieser Methode lässt sich die Masse von Atomen und Molekülen messen und anhand der Peaks bestimmte Inhaltsstoffe ableiten [47]. Das Verfahren wurde mit freundlicher Unterstützung des Instituts für Bodenkunde der Fakultät für Agrar- und Umweltwissenschaften der Universität Rostock durchgeführt und die Ergebnisse für die Arbeit zur Verfügung gestellt. Dafür wurde der gewonnene Rohextrakt der Petersilienwurzel eingereicht, um durch dieses Verfahren Kenntnisse über die verschiedenen Inhaltsstoffe zu erlangen. Im speziellen wurde die Pyrolyse- Feldionisationsmassenspektrometrie (Py-FIMS) angewandt.

Zunächst werden in einem Pyrolyseverfahren die im Extrakt enthaltenen Stoffe unter sehr hohen Temperaturen thermisch aufgespalten [85]. Die Probe wird dann mittels einer Probenschubstange in die Ionenquelle des Massenspektrometers eingebracht. Grundsätzlich besteht der Aufbau eines Massenspektrometers aus einem Probeneinlass, einer Ionenquelle, einem Analysator und einem Detektor. Mittels der Ionenquelle erfolgt eine Ionisation der Moleküle der Probe. Die Feldionisation ist eine sogenannte weiche Ionisationsform bei der durch schonende Ionisation in Form starker elektrischer Anregung eine Fragmentationsionenbildung vermieden werden kann [84]. Es handelt sich dabei um eine Autoionisation, indem ein Molekül unter starker elektrischer Anregung ein Elektron verliert.

In der Feldionisation (s. Abb. 14) wird die dafür notwendige Spannung zwischen dem Feldemitter (Feldanode) und der Gegenelektrode (Feldkathode) generiert [85]. Im Massenanalysator erfolgt dann die Trennung der zuvor ionisierten Moleküle nach dem Masse-Ladungs-Verhältnis. Und der Detektor erkennt dann im Anschluss die getrennten Ionen. Die massenspektrometrisch ermittelten Ergebnisse werden automatisch graphisch aufgezeichnet. Dafür erfolgt die Auftragung der Intensität in Prozent gegen das Masse-Ladungs-Verhältnis. Daraus folgend ergeben sich die bestimmten Molekül-, bzw. auch einige Fragmentionen-peaks, letztere werden durch die Feldionisationstechnik weitestgehend umgangen [84].

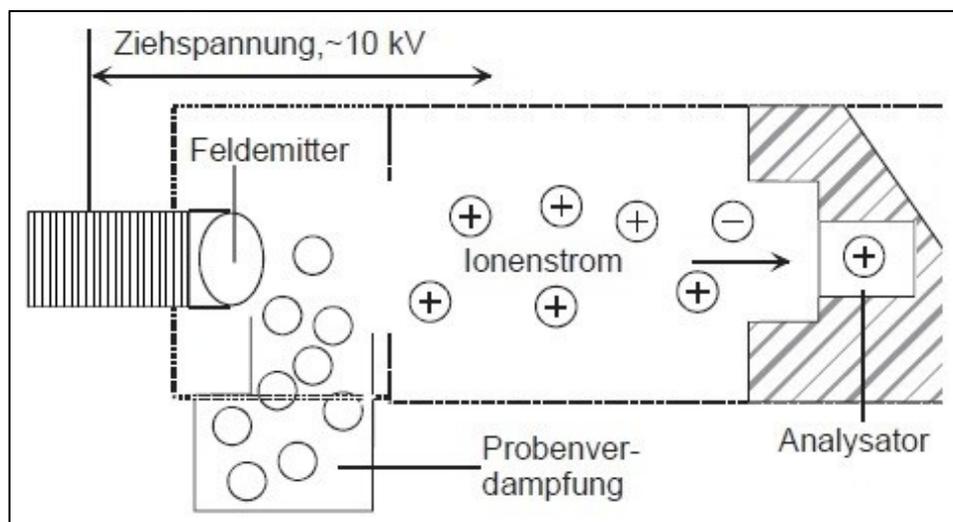


Abb. 14 Prinzip der Feldionisation [84].

3.3 Zellen

3.3.1 MCF-7

MCF-7 steht für Michigan Cancer Foundation-7. Es handelt sich dabei um menschliche maligne Brustkrebszellen eines Adenokarzinoms [86]. Diese Zelllinie wurde 1970 einer 69-jährigen kaukasischen Frau aus deren Pleurapunktat entnommen [87]. Sie wachsen in vitro Kulturen in Form eines einschichtigen Epithels und konfluieren zu Kuppeln [87]. Da die Zellen in der Lage sind über einen langen Zeitraum stabil zu bleiben, eigneten sie sich ideal für in vitro Experimente zum Verständnis von hormonregulierter DNA-Replikation und Zellproliferation [86]. Die Zellen sind positiv für die ER's und exprimieren das Onkogen WNT7B, und insulin-like growth-factor bindende Proteine (IGFBP), deren Sekretion durch Antiöstrogene gesteuert werden kann. Des Weiteren ist der Tumornekrosefaktor alpha

(TNF- α) in der Lage das Wachstum der Zellen zu hemmen [88]. Sie verfügen über keine Her2-Expression [89].

3.3.2 MCF-12a

Diese Zelllinie entstammt einer 60-jährigen Kaukasierin (nullipara) nach einer Reduktionsmammaplastik. Das entnommene Gewebe zeigte eine intraduktale Hyperplasie auf Grundlage einer fibrozystischen Mastopathie. Es handelt sich um benigne Zellen, welche keine Tumoraktivität besitzen. Sie zeigen ebenso ein konfluierendes und kuppelhaftes Wachstum [88]. Für ER- α und ER- β sind sie positiv [90].



Abb. 15 MCF-7-Zellen

10. Passage; 20x Vergrößerung (Phasenkontrastmikroskop)



Abb. 16 MCF-12a Zellen

26. Passage; 20x Vergrößerung (Phasenkontrastmikroskop)

3.3.3 Zellmedium

Das Medium für die Kultivierung der MCF-7 Zellen bestand aus 500 ml DMEM, dieses wurde mit 50 ml FKS (10 %) versetzt und zur Verhinderung einer Besiedlung mit Pilzen und Bakterien wurde dem Medium 1 ml Penicillin/ Streptomycin (0,2 %) und 2,5 ml (0,5 %) Amphotericin zugesetzt.

Für die MCF-12a Zellen wurden 500 ml HAM's F12 als Medium verwendet. Hinzugefügt wurden hier 50 ml Horse-Serum (10 %), 10 ml Suppl. Mammaepithelium (2 %) und ebenfalls 1 ml Penicillin/ Streptomycin (0,2 %) und 2,5 ml (0,5 %) Amphotericin.

3.3.4 Zellaufbewahrung

Um die Zellen für einen möglichst langen Zeitraum zu erhalten und aufzubewahren wurden die Zellen bei -185 °C in Stickstoff kryokonserviert. Dafür wurden die jeweiligen abzentrifugierten Zellpellets in ihrem Einfriermedium suspendiert. Das Einfriermedium bestand aus dem jeweiligen Medium plus 20 % FKS bzw. Horse-Serum und 10 % DMSO. Von der aufgeschwemmten Zellsuspension wurden dann je 1,5 ml in Kryoröhrchen (2 ml) gefüllt. Anschließend erfolgte zunächst ein Herunterfrieren der Zellen bei -85 °C (1°C/min) und nach 24 h fand die endgültige Lagerung in flüssigem Stickstoff (-180 °C) statt.

3.3.5 Zellkultivierung

Alle Arbeiten mit offenem Zellmaterial fanden unter sterilen Bedingungen an mikrobiologischen Sicherheitswerkbänken statt, welche vor und nach der Benutzung für 10 min mit UV-Licht bestrahlt wurden.

Zur Kultivierung der Zellen wurden die kryokonservierten Zellen mittels 5 ml ihres entsprechenden Zellmediums +10 % Serum in einem Zentrifugenröhrchen (50 ml) aufgeschwemmt und für 6 min und bei 1200 rpm bei 20 °C zentrifugiert. Dabei sammelte sich ein Zellpellet am Boden des Röhrchen und der entstandene Überstand wurde abpipettiert. Das Zellpellet wurde danach erneut mit 5 ml frischem Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in der kleinsten Kulturflasche mit 25 cm² Oberfläche ausgesät und die Zellen in einem Wärmeschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert.

Sobald der Boden der Kulturflasche dann zu 70-80 % mit Zellen konfluent war, wurden die Zellen passagiert und in die nächstgrößeren Kulturflaschen umgesetzt, 75 cm² und 150 cm². Im folgenden Abschnitt wird das Passagieren der Zellen für die größte Kulturflasche beschrieben. Im ersten Schritt wurde das Medium mittels einer Glaspipette aus der Kulturflasche vollständig entfernt, dann wurde der Boden der Flasche mit 5 ml PBS sorgfältig gespült, um das anhaftende FKS bzw. Horse-Serum von den Zellen abzuwaschen. Da es sich um adhärenente Zellen handelt, welche am Boden der Kulturflasche haften, erfolgte das

Ablösen dieser durch Zugabe von 5 ml Trypsin-EDTA. Dieser Vorgang erfolgte für 3-5 min im Wärmeschrank. Danach wurde 5-10 ml frisches Zellmedium mit 10 % des jeweiligen Serums zugegeben. Das Serum stoppt den Trypsinierungsvorgang. Diese Zellsuspension wurde dann in ein Zentrifugenröhrchen (50 ml) überführt und bei 20 °C, 1000 rpm und einem Programm ohne Bremsvorgang für 5 min zentrifugiert. Am Boden des Zentrifugenröhrchens entstand ein Zellpellet. Der Überstand wurde dekantiert. Das Zellpellet wurde mit 2-3 ml frischem Nährmedium mehrmals mit einem Vortexer sanft geschüttelt um die aneinanderhaftenden Zellen somit zu vereinzeln. Danach erfolgte die erneute Zugabe von Nährmedium auf ein Volumen von insgesamt 10 ml. Anschließend wurde die Zellzahlanalyse durchgeführt. Nach Einstellung der Zellzahl fand ein erneutes Aussäen statt, bzw. die Zellen konnten für die bevorstehenden Testserien genutzt werden. Bei dem Verschluss der Kulturflasche handelt es sich um einen Schraubdeckel mit integriertem Filter, welcher zum Gasaustausch mit der Umgebung dient. Bei diesem musste genauestens darauf geachtet werden, dass dieser beim Transport nicht feucht wird. Die Kulturflaschen wurden mit der jeweiligen Anzahl der Passage beschriftet und die Zellen in einem Inkubator unter sterilen Bedingungen kultiviert.

Alle 2-3 Tage erfolgte ein Wechsel des Zellmediums. Je nach Größe der Kulturflasche (25 cm² → 5 ml, 75 cm² → 15 ml, 150 cm² → 25 ml) wurde das alte Medium entfernt und frisches wieder hinzugegeben.

3.3.6 Ermittlung der Lebendzellzahl

Die Ermittlung der Zellzahl war notwendig, um in den verschiedenen Testserien stets die gleichen Voraussetzungen für die Zellen zu gewährleisten bzw. in allen Versuchen vergleichbare Ergebnisse zu erzielen. In verschiedenen Vorversuchen des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik Rostock wurde eine optimale Zellkonzentration von 5×10^5 Zellen / ml ermittelt, welche dann für alle Versuche galt.

Die Auszählung geschah mit Hilfe der Bürker-Zählkammer (s. Abb. 17).

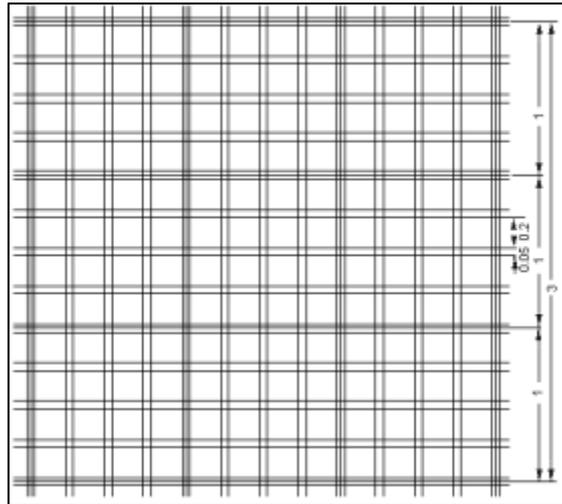


Abb. 17 Bürker-Zählkammer [91].

Dafür wurden zunächst die Zellen trypsinisiert, gewaschen und das gewonnene Zellpellet mit 10 ml Medium vereinzelt. Danach wurden 360 μl Medium mit 20 μl der Zellsuspension und 20 μl Trypanblau in ein Eppendorfröhrchen gemischt. Wodurch eine Verdünnung von 1:20 entstand. Trypanblau gehört zu den Azofarbstoffen und dessen Anion bindet an Zellproteine. Es handelt sich hierbei um eine sogenannte Ausschlussfärbung, da der Farbstoff nur die durchlässig gewordene Zellmembran avitaler Zellen durchdringen kann und diese toten Zellen somit blau färbt. Dieser Effekt wird bei der Lebendzellzählung genutzt und es werden nur die farblosen lebenden Zellen gezählt. Jedoch sollte die Zählung der Zellen unmittelbar erfolgen, da Trypanblau bei längerem Einwirken selbst zytotoxisch wirkt [92]. Von der 1:20 Verdünnten Zellsuspension wurden 20 μl auf beide Seiten der Bürker-Zählkammer gegeben und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Unter dem Lichtmikroskop bei 40x Vergrößerung erfolgte das Auszählen der vitalen Zellen in 25 Quadraten auf beiden Seiten. Die Gesamtlebendzellzahl / ml wurde dann mit folgender Formel unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors berechnet.

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

3.3.7 Immunhistochemie

Das immunhistochemische Verfahren wurde in dieser Arbeit genutzt um die Expression des ER- α und ER- β , sowie des PR nachzuweisen. Bei diesem Färbeverfahren werden Antikörper genutzt, welche an die zu detektierenden Antigene auf den verschiedenen Zelltypen binden. Diese Methodik geht dabei über traditionelle histologische Färbeverfahren hinaus. Für diese Antikörper-Antigen-Reaktion werden zumeist monoklonale Antikörper verwendet, die spezifisch nur an ein Epitop binden [93]. Hier wurde das indirekte Verfahren genutzt, bei dem zunächst ein Primärantikörper (monoklonaler Mauseantikörper) und im zweiten Schritt die Bindung eines Sekundärantikörpers, welcher mit einem Detektormolekül markiert ist, an den Primärantikörper erfolgt. Bei dem Detektormolekül handelt es sich um eine Peroxidase, die unter Zugabe von LineRed IHC zu einem roten Farbstoff reagiert, wodurch die Antigene sichtbar gemacht werden [94]. Zur Durchführung des immunhistochemischen Verfahrens wurde das ImmPRESS Detection System verwendet.

Durchführung:

1.	Zellen vorbereiten und Auszählen
2.	200 000 Zellen/ ml wurden auf eine 24er Well-Platte (300 μ l/ Well und zellspezifischem Medium) inkubiert bis zur Ausbildung der typischen Morphologie (48-72 h, im Wärmeschrank bei 37 °C, wasserdampfgesättigte Atmosphäre und 5 % CO ₂)
3.	Waschvorgang: Medium abpipettieren und 3 x mit PBS (300 μ l/ Well) waschen, jeweils 5 min
4.	Zellfixation mit Formafix 4 %, Dauer: 30 min bei Raumtemperatur (RT)
5.	Erneuter dreimaliger Waschvorgang mit PBS
6.	Zugabe von 300 μ l/ Well H ₂ O ₂ 0,3 % zur Hemmung der Peroxidase Dauer: 30 min bei RT
7.	2 x mit PBS waschen, jeweils 5 min einwirken lassen, zwischendurch schwenken, jeweils 5 min
8.	Zugabe von 200 μ l/ Well Horse Serum, zum blocken unspezifischer Antikörperbindungsstellen, Dauer: 20 min bei RT
9.	Entfernen des Serums, außer bei der Negativkontrolle
10.	Zugabe von 200 μ l/ Well des Primärantikörpers (Anti-Mouse Ig für ER- α , ER- β , PR),

	Dauer: 24 h im Kühlschrank (8 °C)
11.	Abpipettieren des Antikörpers
12.	Waschvorgang: 3x mit PBS, s.o.
13.	Zugabe von 200 µl/ Well des Sekundärantikörpers, Dauer: 30 min bei RT
14.	Erneuter Waschvorgang, s.o.
15.	Zugabe von 200 µl/ Well LineRed IHC, Dauer: 5- 15 min im Dunkeln bei RT
16.	Abstoppen der Farbreaktion mit 500 µl/ Well H ₂ O
17.	1x waschen mit PBS
18.	Beurteilung des Rezeptorstatus unter dem Lichtmikroskop, fotografieren der Zellen durch das Phasenkontrastmikroskop (AxioCam) bei 200x Vergrößerung

3.4 Testmethoden

Für diese Arbeit wurden drei verschiedene Testmethoden genutzt, welche jeweils drei- bis viermal wiederholt worden sind. Innerhalb einer Testserie wurden die Konzentrationen 4 x untersucht. Dabei handelte es sich um den LDH-Test zur Ermittlung der Zytotoxizität, der MTT-Test zur Beurteilung der Zellviabilität und der BrdU-Test für die Darstellung der Zellproliferation. Nach Einstellung der Zellen mit Trypanblau wurde in allen Testserien die gleiche Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml verwendet, um die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. Für jedes Testverfahren wurden Kontrollwerte parallel ermittelt. Für die Negativkontrolle wurden die Zellen plus Medium und unter Zugabe des reinen Ethanol (96 %) als verwendetes Verdünnungsmittel festgelegt. Im LDH-Test wurde zusätzlich eine Positivkontrolle bestehend aus Triton X-100 verwendet. Zusätzlich wurden zwei weitere Kontrollen mit 17β -Estradiol und Tamoxifen geführt. Die Endkonzentration von 17β -Estradiol in den Testserien war 10^{-9} mol/l und für Tamoxifen 10^{-4} mol/l.

Tabelle 6 Überblick über alle Probenansätze in den Wellplatten.

^1M	$^1\text{M} + \text{Z} + ^6\text{PW } 50 \mu\text{g/ml}$
$^1\text{M} + ^2\text{Z}$	$^1\text{M} + \text{Z} + ^6\text{PW } 10 \mu\text{g/ml}$
$^1\text{M} + ^2\text{Z} + \text{Ethanol}$	$^1\text{M} + \text{Z} + ^6\text{PW } 1 \mu\text{g/ml}$
$^1\text{M} + ^2\text{Z} + ^3\text{Tam}$	$^1\text{M} + \text{Z} + ^6\text{PW } 0,1 \mu\text{g/ml}$
$^1\text{M} + ^2\text{Z} + ^4\text{E2}$	$^1\text{M} + \text{Z} + ^6\text{PW } 0,01 \mu\text{g/ml}$
$^1\text{M} + ^2\text{Z} + \text{Triton (nur im LDH- Test)}$	$^1\text{M} + ^2\text{Z} + ^6\text{PW } 100 \mu\text{g/ml} + ^3\text{Tam}$
$^1\text{M} + ^2\text{Z} + ^5\text{Anti-BrdU (nur im BrdU- Test)}$	$^1\text{M} + ^2\text{Z} + ^6\text{PW } 50 \mu\text{g/ml} + ^3\text{Tam}$
$^1\text{M} + ^2\text{Z} + ^6\text{PW } 500 \mu\text{g/ml}$	$^1\text{M} + ^2\text{Z} + ^3\text{PW } 1 \mu\text{g/ml} + ^3\text{Tam}$
$^1\text{M} + ^2\text{Z} + ^6\text{PW } 100 \mu\text{g/ml}$	

 ^1M : Medium $^4\text{E2}$: 17β -Estradiol ^2Z : Zellen $^5\text{Anti- BrdU}$: Antikörper gegen Bromdesoxyuridin ^3Tam : Tamoxifen ^6PW : Petersilienwurzelextrakt

Der pH-Indikator Phenolrot ist zwar nur in geringen Mengen im DMEM vorhanden, aber ähnelt von seiner Struktur synthetisierten Östrogenen. Die Entfernung von Phenolrot aus Kulturmedien zeigte eine gesteigerte Proliferation getriggert durch Östrogen von ER-positiven Brustkrebszelllinien in der Kultur. Zur Untersuchung der Wirkung von exogenen Östrogenen und Antiöstrogenen und deren Ansprechen auf die Rezeptoren wird deswegen in allen Testverfahren phenolrotfreies Medium verwendet [16].

3.4.1 LDH-Zytotoxizitätstest

Der LDH-Test ist ein unspezifischer in-vitro-Zellzytotoxizitätstest und erfasst farbmetrisch den quantitativen Zelltod bzw. die Lyse von Zellen (s. Abb.18). Er beruht auf der Messung der Lactatdehydrogenase-Aktivität und beinhaltet zwei aufeinanderfolgende Redoxreaktionen. Die LDH kommt in allen menschlichen Zellen vor. Das Enzym katalysiert die Reaktion von Lactat zu Pyruvat. Werden Zellen geschädigt kommt es zur Freisetzung dieses Enzyms in das Zytoplasma. Bei dem Absterben oder der Lyse der Zellen der Zellkultur wird die LDH aus den Zellen in das Medium freigesetzt. Deswegen wird für den Test allein der zellfreie Überstand aus der Zellkultur entnommen, um zu verhindern, dass es noch während des Tests zu weiterer Zellschädigung kommt. Der Überstand wird mit einer Reaktionslösung (bestehend aus Diaphorase und Tetrazolium) inkubiert. Zunächst wird in diesem ersten Schritt Lactat zu Pyruvat oxidiert, während der Kofaktor NAD^+ zu NADH/H^+ reduziert wird. Dann folgt der

Transfer mit Hilfe des im Testreagenz enthaltenen Katalysators Diaphorase-Wasserstoff von H/H^+ des $NADH/H^+$ zu dem leicht gelb-gefärbten Tetrazoliumsalz INT (2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetra-zoliumchlorid), welches somit zu dem rotgefärbten Formazan reduziert wird. Die Intensität der Farbreaktion wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessen, der Referenzwert liegt bei 620 nm. Formazan zeigt ein Absorptionsmaximum bei 500 nm, während das Tetrazoliumsalz INT in diesem Bereich keine Absorption zeigt. Der Anstieg der LDH-Aktivität im Zellüberstand korreliert direkt mit dem Anstieg des gebildeten Formazan in einem bestimmten Zeitraum, somit gibt es auch einen direkten proportionalen Zusammenhang zur Anzahl der geschädigten Zellen im Zellüberstand. Für den Test wurde ein nährstoffärmeres Medium verwendet, damit die Zellen in einen Hungerzustand überführt werden. Des Weiteren wurde eine zusätzliche Positivkontrolle in Form einer Zugabe von Triton X-100 (im Test 1:100 verdünnt). Triton löst eine komplette Lyse aller Zellen aus und ist damit 100 % zytotoxisch [95].

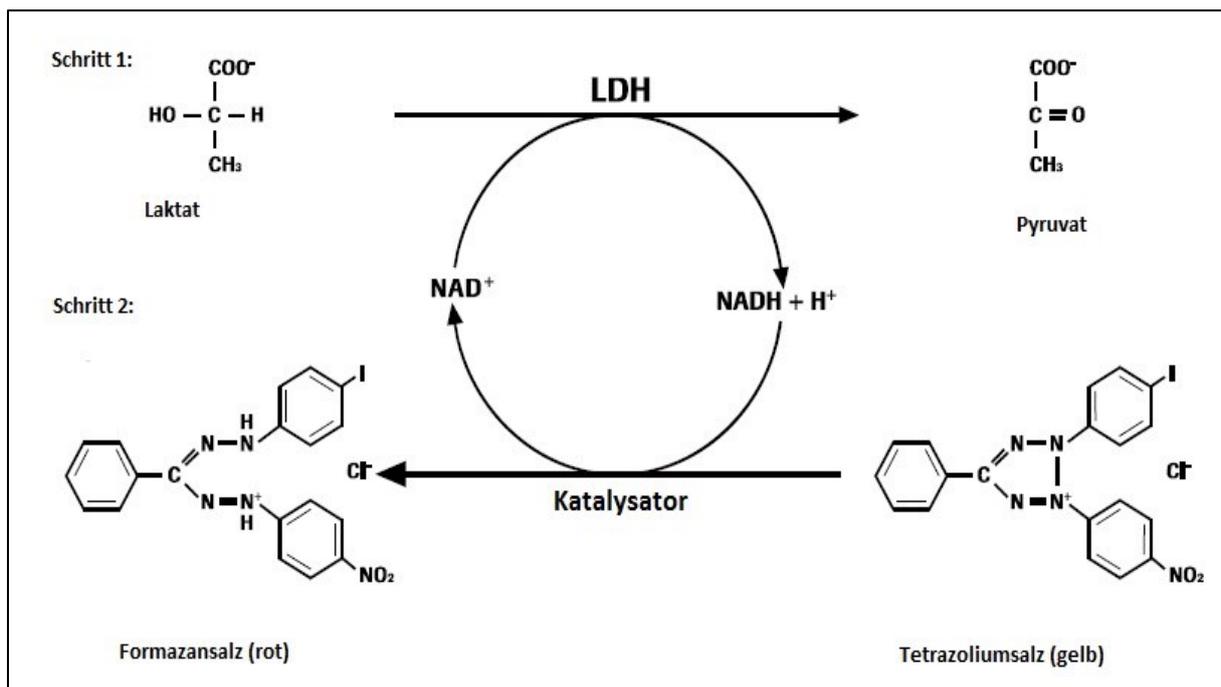


Abb. 18 Prinzip des LDH-Tests (modifiziert nach Roche) [95].

Durchführung:

1.	Vorbereiten und Auszählen der Zellen (500 000/ml)
2.	Aussaat der Zellen in 96er-Wellplatten mit 100 µl/ Well der Zellsuspension mit phenolfreiem Medium + 10 % FKS/ Horse-serum
3.	24 h Inkubation bei 37 ° C, wasserdampfgesättigte Atmosphäre und 5 % CO ₂

4.	Nach lichtmikroskopischer Kontrolle der Zellen Medium abpipettieren
5.	Zugabe von 198 µl/ Well phenolfreiem, nährstoffärmerem Medium (Medium + 1 % Serumzugabe) und Zugabe von 2 µl Probe (Ethanol; E2, Tam, PW, Triton)
6.	24 h Inkubation des Probenansatzes bei 37 °C, wasserdampfgesättigte Atmosphäre und 5 % CO ₂
7.	100 µl des Überstandes aus jedem Well auf eine neue 96er- Wellplatte überführen
8.	Zugabe von 100 µl/ Well LDH-Reaktionslösung, bestehend aus Diaphorase und Tetrazolium (1:46 gelöst)
9.	30 min Inkubation bei Dunkelheit und RT
10.	Abstoppen der Reaktion mit 50 µl/ Well 1M HCl
11.	Photometrische Messung im ELISA- Reader bei einer Wellenlänge von 492 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm
12.	Auswertung der Extinktionswerte und Berechnung mittels angegebener Formel

Zur Berechnung werden die Extinktionswerte (E) ins Verhältnis gesetzt. Als Positivkontrolle dient der Probenansatz aus Triton und als Negativkontrolle der Ansatz nur bestehend aus den Zellen und dem Medium.

$$\text{Zytoxizität [\%]} = \frac{\text{E (Probe)} - \text{E (Negativkontrolle)}}{\text{E (Positivkontrolle)} - \text{E (Negativkontrolle)}} \times 100$$

3.4.2 BrdU-Zellproliferationstest

Dieser Test wurde durchgeführt, um die Proliferation der Zellen objektiv zu beurteilen. Dazu wird das Pyrimidin-Analogon 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) genutzt, welches anstatt dem Nukleosid Thymidin während der Neusynthese in die DNA sich teilender Zellen eingebaut wird (s. Abb.19). BrdU kann im Anschluss als Marker mittels eines Immunoassays nachgewiesen werden. Dafür werden die kultivierten Zellen zunächst mit BrdU-Reagenz markiert. Im Anschluss erfolgt eine Zellfixation mit FixDenat. Bei diesem Vorgang erfolgt zeitgleich eine Denaturierung der DNA, wodurch die BrdU markierten Abschnitte für die folgende Zugabe des Antikörpers zugänglich sind. Bei dem Antikörper handelt es sich um einen peroxidase-gekoppelten monoklonalen Mausantikörper (Anti-BrdU-POD), welcher in Form einer Antikörper-Antigen-Reaktion spezifisch an BrdU bindet. Zur Detektion dieses

Immunkomplexes in Form einer Farbreaktion wird Tetramethylbenzidin (TMB) zugegeben, woraufhin sich eine Blaufärbung ergibt. Zum Stoppen dieser Reaktion wird Schwefelsäure hinzugegeben und es ergibt sich ein Farbumschlag in gelbliche Töne. Zwischen der Anzahl neu proliferierter Zellen und dementsprechend neu synthetisierter DNA und damit detektiertem BrdU besteht ein direkter Zusammenhang in der Erreichung der Farbintensität. Die verschiedenen Farbintensitäten können dann in einer photometrischen Messung mit Hilfe des ELISAREADERS quantitativ bei einer Wellenlänge von 450 nm erfasst werden, die Referenzmessung erfolgt bei 650 nm. Zur Überprüfung der Genauigkeit des Testverfahrens wurde zeitgleich eine Backgroundkontrolle durchgeführt. Dabei wurde unter Abwesenheit von BrdU die unspezifische Bindung von Anti-BrdU-POD an die DNA der Zellen überprüft. Die sich ergebene Extinktion sollte dafür bei Testabschluss 0,1 nicht überschreiten [96].

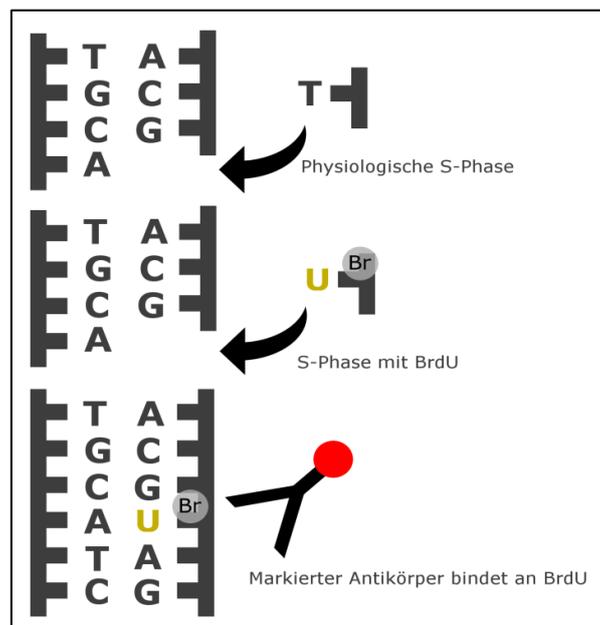


Abb. 19 Prinzip des BrdU-Proliferationstests (eigene Quelle).

Durchführung

1.	Vorbereiten und Auszählen der Zellen (500 000/ml)
2.	Aussaat der Zellen in 96er-Wellplatten mit 100 µl/ Well der Zellsuspension mit phenolfreiem Medium und 10 % Serumzusatz
3.	24 h Inkubation bei 37 °C, wasserdampfgesättigte Atmosphäre und 5 % CO ₂
4.	Zugabe von 1µl/ Well der Proben (Ethanol; E2, Tam, PW)
5.	24 h Inkubation des Probenansatzes bei 37 °C, wasserdampfgesättigte Atmosphäre und 5 % CO ₂

6.	Zugabe von 10 µl/ Well des BrdU-Markierungsreagenz, Backgroundkontrolle auslassen
7.	3 h Inkubation bei 37 ° C, wasserdampfgesättigte Atmosphäre und 5 % CO ₂
8.	Entfernen des Medium-Reagenzgemisches durch ausklopfen der Wellplatte
9.	Zugabe von 200 µl/ Well FixDenat
10.	30 min Inkubation bei RT
11.	FixDenat durch erneutes Ausklopfen der Wellplatte vollständig entfernen
12.	Zugabe von 100 µl/ Well der Anti-BrdU-POD-Lösung
13.	1 h Inkubation bei RT
14.	Anti-BrdU-POD-Lösung durch Ausklopfen vollständig entfernen
15.	Waschvorgang: 3x mit Waschpuffer (PBS und Aqua dest. 1:10 gelöst)
16.	Zugabe von 100 µl/ Well Farbsubstrat (TMB)
17.	5- 20 min Inkubation bei RT
18.	Abstoppen der Farbreaktion mit 25 µl/ Well 1M H ₂ SO ₄
19.	Photometrische Messung im ELISA- Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm
20.	Auswertung der Extinktionswerte und Berechnung mittels angegebener Formel

Für die Berechnung der prozentualen Zellproliferation wurde als Negativkontrolle der Ansatz bestehend aus Zellen, Medium und dem Verdünnungsmittel Ethanol verwendet. Da hierbei von einer 100 prozentigen Zellproliferation ausgegangen wurde. Zusätzlich wurde der Leerwert in Form des reinen Mediums abgezogen.

$$\text{Zellproliferation [\%]} = \frac{\text{E (Probe)}}{\text{E (Negativkontrolle)}} \times 100$$

3.4.3 MTT-Test (Viabilitätstest)

Der MTT-Test wurde mit dem Cell Proliferation Kit I (MTT) durchgeführt. MTT steht für 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid. Es handelt sich hierbei um ein gelbes Tetrazoliumsalz, welches in metabolisch aktiven Zellen zu violetten Formazankristallen gespalten werden kann. Der Test wird zur quantitativen Beurteilung der

metabolischen Aktivität und damit auch der Zellviabilität und der Zellproliferation genutzt. Bei der Umwandlung von MTT in Formazan erfolgt eine Reduktion mit Hilfe der pyridinhaltigen Reduktionsäquivalente NADH und NADPH (s. Abb. 20) [97].

Diese läuft in den Mitochondrien ab und ist nur teilweise von der dortigen Succinat-Dehydrogenase abhängig. Hauptsächlich spiegelt diese Reaktion die Glykolyse-Rate der vitalen Zellen wieder [98].

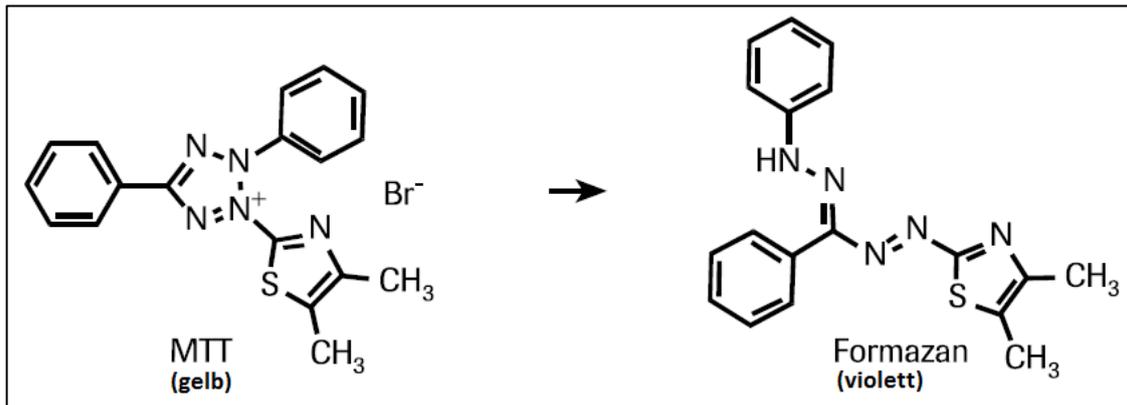


Abb. 20 Prinzip des MTT-Tests (modifiziert nach Roche) [97].

Durchführung:

1.	Vorbereiten und Auszählen der Zellen (500 000/ml)
2.	Aussaat der Zellen in 96er-Wellplatten mit 100 µl/ Well der Zellsuspension mit phenolfreiem Medium und 10 % Serumzusatz
3.	24 h Inkubation bei 37 ° C, wasserdampfgesättigte Atmosphäre und 5 % CO ₂
4.	Zugabe von 1µl/ Well der Proben (Ethanol; E2, Tam, PW)
5.	24 h Inkubation des Probenansatzes bei 37 ° C, wasserdampfgesättigte Atmosphäre und 5 % CO ₂
6.	Zugabe von 10 µl/ Well des MTT-Reagenz
7.	4 h Inkubation bei 37 ° C, wasserdampfgesättigte Atmosphäre und 5 % CO ₂
8.	Zugabe von 100 µl/ Well des Solubilisierungsreagenz (Lösungsvermittler)
9.	24 h Inkubation bei 37 ° C, wasserdampfgesättigte Atmosphäre und 5 % CO ₂
10.	Photometrische Messung im ELISA- Reader bei einer Wellenlänge von 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 655 nm
11.	Auswertung der Extinktionswerte und Berechnung mittels angegebener Formel

Für die Auswertung und Berechnung der prozentualen Zellviabilität wurde ebenfalls eine Negativkontrolle verwendet, bestehend aus Zellen, Medium und dem Verdünnungsmittel Ethanol. Hierunter wurde von einer maximalen Viabilität von 100 % ausgegangen. Als Leerwert diente wiederum der Ansatz mit reinem Medium.

$$\text{Zellviabilität [\%]} = \frac{\text{E (Probe)}}{\text{E (Negativkontrolle)}} \times 100$$

3.4.4 Zellmetabolismus

3.4.4.1 Glukosebestimmung

Die quantitative Analyse des Glukosegehalts der einzelnen Proben dient der Untersuchung des Glukoseumsatzes der Zelllinien unter Einwirkung des zugegebenen Petersilienwurzelextrakts. Die Ermittlung der Daten erfolgte mit Hilfe des Biosen 5140. Über einen Biosensor findet dabei eine elektrochemische Messung statt (s. Abb. 21). Automatisch wird die Probe in das Messgerät gezogen. Danach erfolgt eine enzymatische Reaktion, wobei das Enzym Glukosidase die Reaktion von der in der Probe enthaltenen β D-Glukose zu Glukonsäure und Wasserstoffperoxid katalysiert.

Der Sensor ermittelt anschließend das H_2O_2 elektrochemisch über eine Elektrode [99].

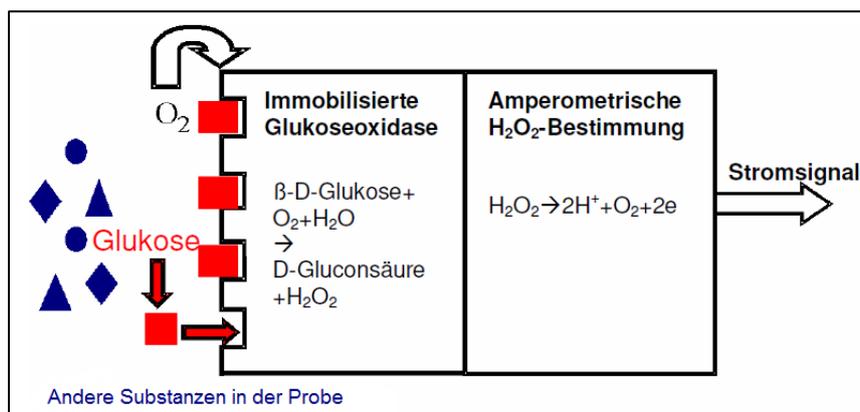


Abb. 21 Prinzip der Glukosebestimmung (modifiziert) [99].

Durchführung:

1.	Vorbereiten und Auszählen der Zellen (500 000/ml)
2.	Aussaat der Zellen in 96er-Wellplatten mit 100 µl/ Well der Zellsuspension mit phenolfreiem Medium und 10 % Serumzusatz
3.	24 h Inkubation bei 37 ° C, wasserdampfgesättigte Atmosphäre und 5 % CO ₂
4.	Zugabe von 1µl/ Well der Proben (Ethanol; E2, Tam, PW)
5.	24 h Inkubation des Probenansatzes bei 37 °C, wasserdampfgesättigte Atmosphäre und 5 % CO ₂
6.	Jeweils 20µl des Zellüberstand dekantieren, in Eppendorfröhrchen füllen und mit 1ml Glukoselösung vermischen
7.	Messung des Glukosegehalts der Proben mit dem Biosen 5140
8.	Auftragen der ermittelten Glukosewerte in ein Diagramm

3.4.4.2 pH-Wert-Bestimmung

Mit Hilfe der pH-Wert-Messung erfolgt die Bestimmung, ob eine Lösung neutral, sauer oder basisch ist. Er spiegelt die Wasserstoffionenaktivität wieder, bzw. entspricht dem negativen dekadischen Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration. Ein pH-Wert > 7 wird als basisch und ein pH-Wert < 7 als sauer definiert. Der Wert wird mittels einer Glaselektrode elektrometrisch gemessen. Diese beinhaltet eine Messelektrode und eine Referenzelektrode und ist mit pH-sensitivem Silikatglas verkleidet. Durch die in den Proben enthaltenen Wasserstoffionen und den am Silikatglas gebundenen Wasserstoffionen entsteht ein elektrisches Potenzial. Durch die entsprechende Potenzialdifferenz wird der pH-Wert ermittelt [100].



Durchführung:

1.	Vorbereiten und Auszählen der Zellen (500 000/ml)
2.	Aussaat der Zellen in 96er-Wellplatten mit 100 μ l/ Well der Zellsuspension mit phenolfreiem Medium und 10 % Serumzusatz
3.	24 h Inkubation bei 37 ° C, wasserdampfgesättigte Atmosphäre und 5 % CO ₂
4.	Zugabe von 1 μ l/ Well der Proben (Ethanol; E2, Tam, PW)
5.	24 h Inkubation des Probenansatzes bei 37 °C, wasserdampfgesättigte Atmosphäre und 5 % CO ₂
6.	Jeweils 50 μ l des Zellüberstand abpipettieren und in Eppendorfröhrchen geben
7.	pH-Messgerät kalibrieren und Elektrode mit Aqua dest. abspülen
8.	Elektrode in die einzelnen Probenansätze eintauchen und pH-Wert messen, dazwischen jeweils Elektrode mit Aqua dest. abspülen

4. Ergebnisse

4.1 Massenspektrometrie

Die Analyse der Massenspektrometrie wurde in Auftrag gegeben. Sie erfolgte beim Kooperationspartner Prof. Leinweber Agrar-Universität Rostock.

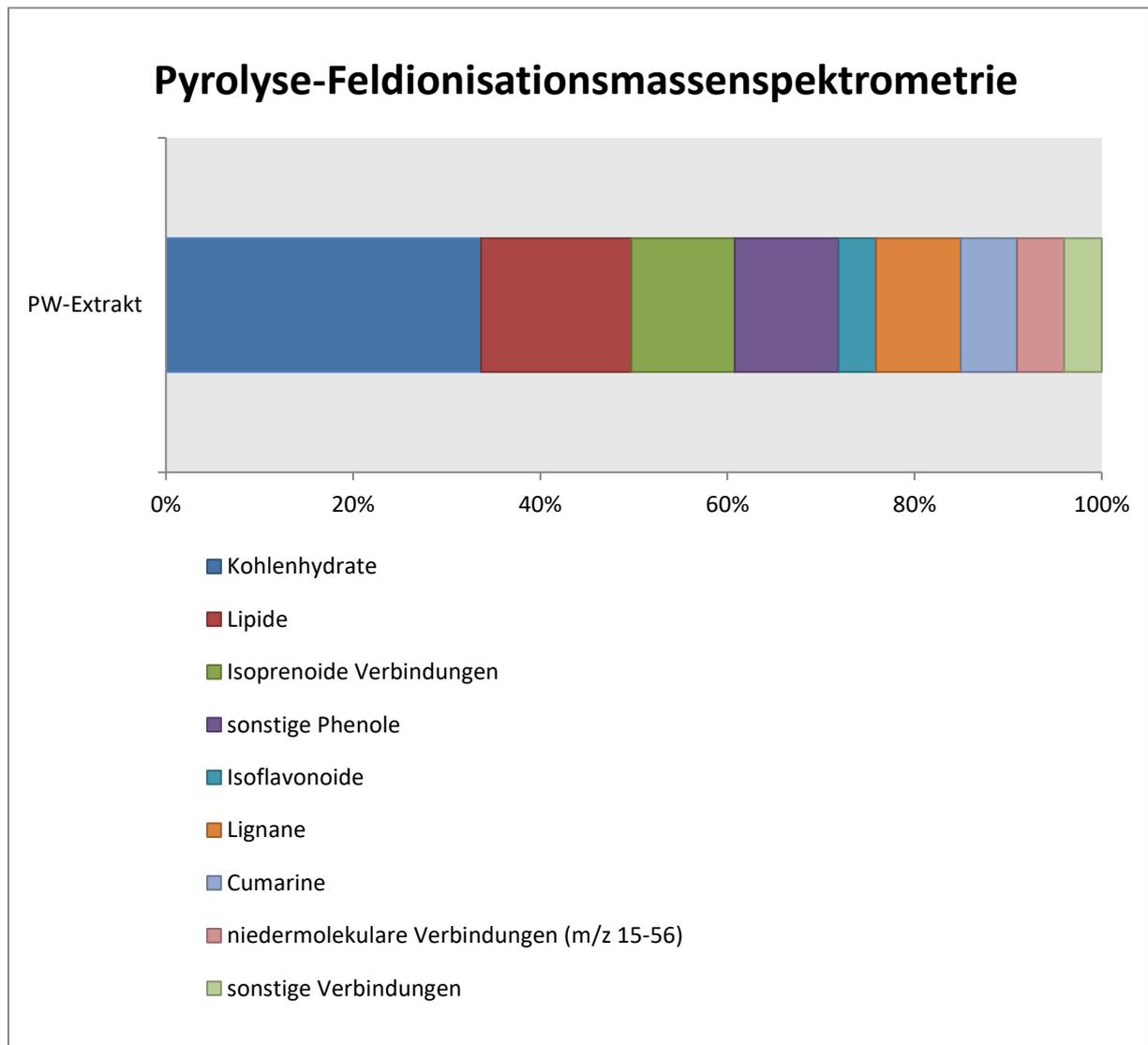


Abb. 22 Pyrolyse-Feldionisationsmassenspektrometrie des Petersilienwurzelextrakts (PW-Extrakts); prozentuale Verteilung der verschiedenen Stoffklassen; Mittelwerte (n=3).

Um genauere Kenntnisse über die einzelnen Inhaltsstoffe des rohen konzentrierten Pflanzenextrakts zu bekommen, wurde das Verfahren der Pyrolyse-Feldionisationsmassenspektrometrie genutzt. Hierbei erfolgte die Aufteilung der Stoffe bzw. der Moleküle hinsichtlich ihres Masse-Ladungs-Verhältnisses. Anhand der einzelnen Peaks und mit Hilfe

von Tabellen ließen sich die einzelnen Stoffe und Stoffklassen zuordnen und der prozentuale Anteil wurde berechnet (s. Abb. 22). Für die Auswertung und Analyse wurden hauptsächlich die übergeordneten Stoffklassen berücksichtigt wie Kohlenhydrate (Monosaccharide, Disaccharide), Lipide (freie Fettsäuren, Alkane, Alkene, Aldehyde, Alkohole), isoprenoide Verbindungen (Sterole, Terpene, Carotinoide), Phenole (Isoflavonoide, Lignane) und Cumarine (Furanocumarine). Für die Veranschaulichung der prozentualen Verteilung der einzelnen Stoffklassen wurde ein Diagramm erstellt.

Im Petersilienwurzelextrakt befanden sich zahlreiche Kohlenhydrate in Form von Monosacchariden und Disacchariden. Diese bildeten mit 34 % den Hauptanteil des Extrakts, gefolgt von diversen Lipiden (16 %). Letztere bestehend aus den Monoglyceriden wie Linolsäure, Diglyceride mit den jeweiligen Fettsäureresten (zweimal Linolsäure und Linolsäure + Palmitinsäure) und den pflanzlichen Triglyceriden (dreimal Linolsäure und zweimal Linolsäure + Palmitinsäure).

Ein insgesamt hoher Anteil wurde durch die Phenole bestimmt, darunter auch Isoflavonoide und Lignane. Vermutlich zu einem großen Teil enthalten war Myristicin, ein Hauptstoff der Petersilienwurzel, aber auch das Isoflavonoid Apigenin. Die enthaltenen Lignane wurden nicht näher bestimmt. Zudem enthalten waren auch die Cumarine, hierbei handelte es sich wahrscheinlich um die Furanocumarine Isopimpinellin und Bergapten. Eine weitere Stoffgruppe im Petersilienwurzelextrakt bildeten die Isoprenoide. Hierunter auffällig die Sterole, unter anderem vermutlich auch α -Tocopherol (Vitamin E). Zu den niedermolekularen Verbindungen zählten die Stoffe mit einem sehr kleinen Masse-Ladungs-Verhältnis von 15-56. Unter die sonstigen Verbindungen fielen alle Stoffe, welche in geringer Zahl vertreten waren und die nicht näher bestimmt wurden.

4.2 Immunhistochemie

Die immunhistochemische Bestimmung der MCF-7-Zellen und der MCF-12a-Zellen wurde zur Untersuchung der Expression der verschiedenen Hormonrezeptoren angewandt. Beide Zelllinien wurden auf das Vorhandensein von ER- α und ER- β und PR untersucht. Diese drei Rezeptorarten werden in die Gruppe der Steroidrezeptoren eingeordnet und befinden sich intrazellulär. Die Grundlage des Ergebnisses dieser Untersuchung bildete die Bindung des Farbstoffes LineRed IHC an das Detektormolekül. Dieses Detektormolekül war Teil des Sekundärantikörpers, welcher an den rezeptorspezifischen Antigen-Primärantikörper-

Komplex gebunden hat. Durch diesen Mechanismus ergab sich bei einem positiven Rezeptorstatus eine Rotfärbung des Zellinneren (Zytoplasma). Eine Nativaufnahme ungefärbter Zellen wurde zum Vergleich der Zytoplasmafärbung durchgeführt. Im klinischen Bereich wird diese Untersuchung als Grundlage für das anzuwendende Therapieschema genutzt und ist damit von hoher Relevanz.

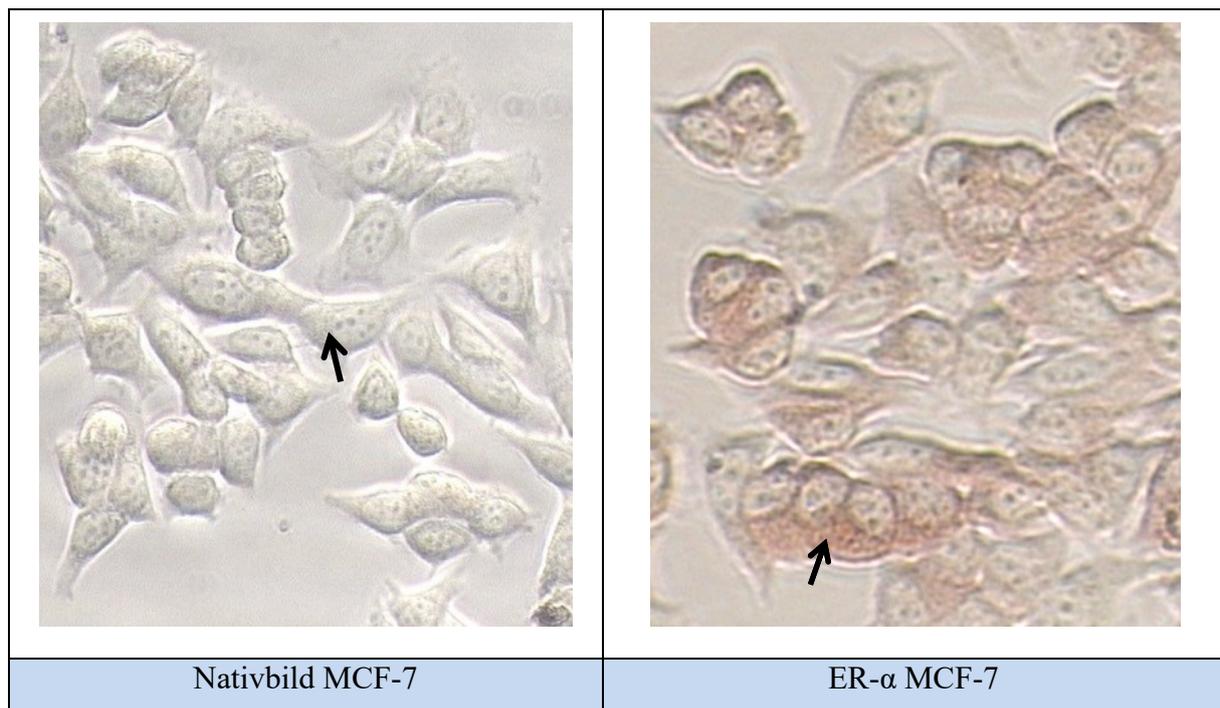


Abb. 23 Immunhistochemie MCF-7 nativ und des ER- α für die MCF-7-Zelllinie

MCF-7 nativ (links), ER- α (rechts); 10. Passage; Rotfärbung des Zytoplasmas entspricht positivem Rezeptorstatus (s. Pfeil); 20x Vergrößerung (Phasenkontrastmikroskop).

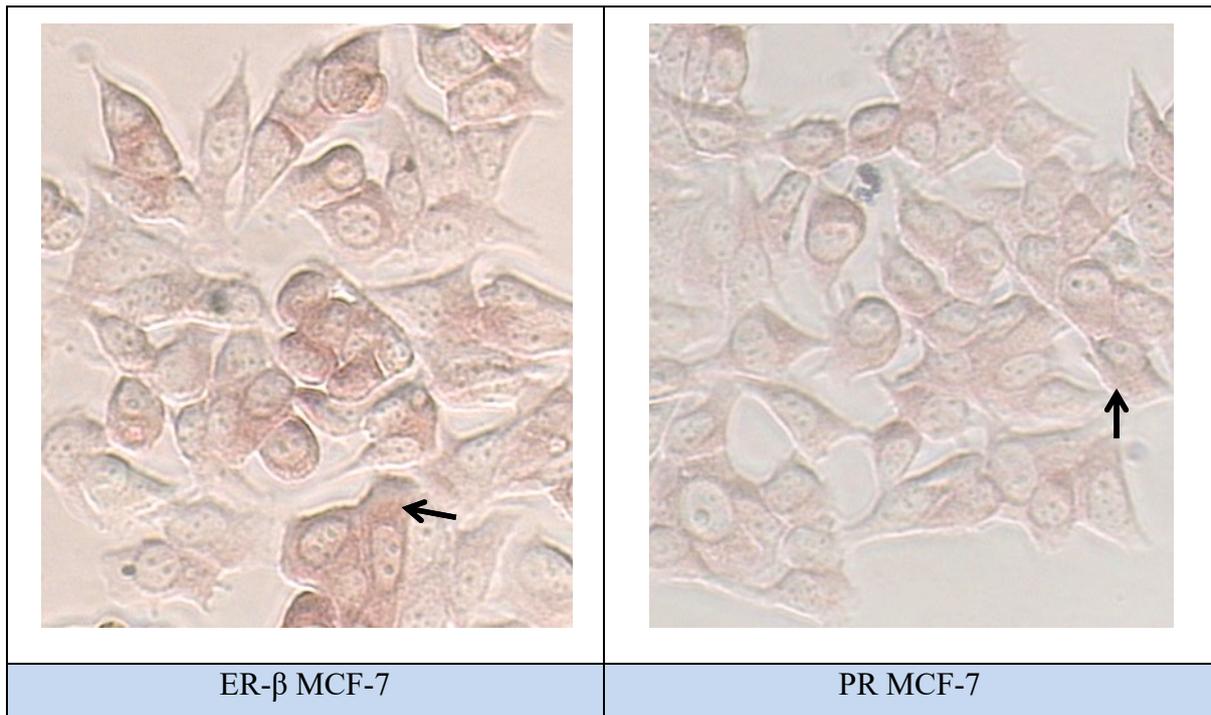


Abb. 24 Immunhistochemie des ER-β und PR für die MCF-7-Zelllinie
ER-β (links); PR (rechts); 10. Passage; Rotfärbung des Zytoplasmas entspricht positivem Rezeptorstatus (s. Pfeil); 20x Vergrößerung (Phasenkontrastmikroskop).

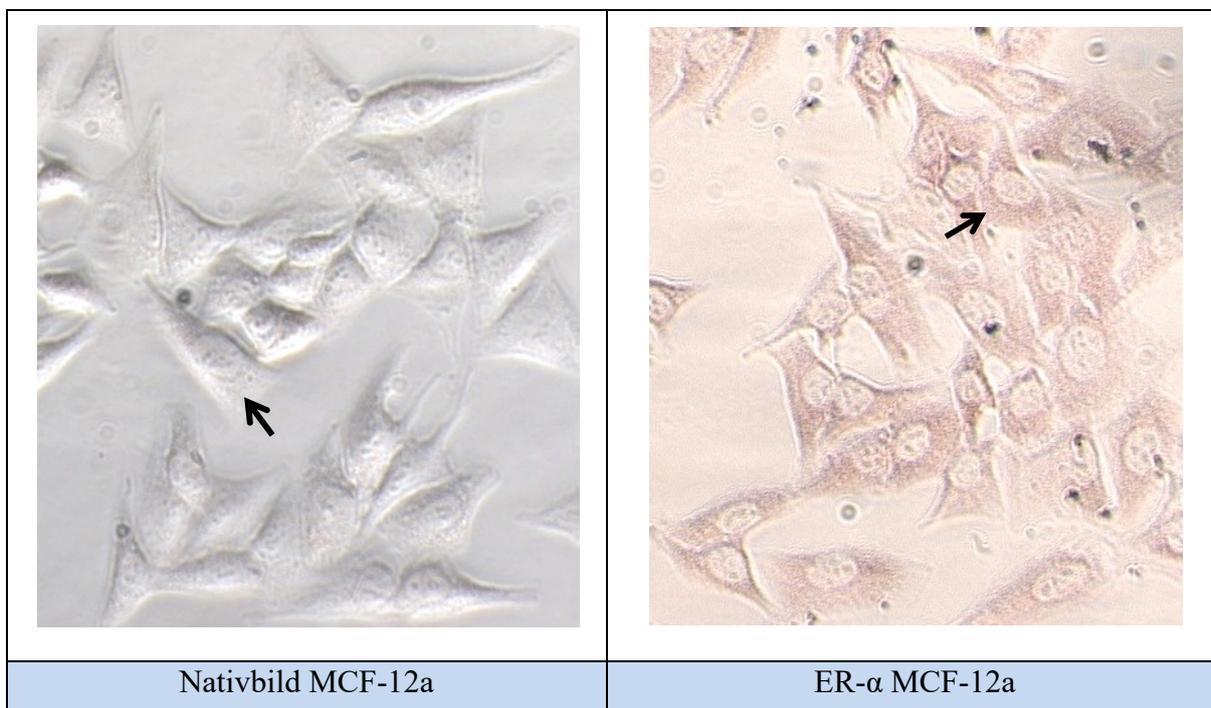


Abb. 25 Immunhistochemie MCF-12a nativ und des ER-α für die MCF-12a-Zelllinie
MCF-12a nativ (links); ER-α (rechts); 26. Passage; Rotfärbung des Zytoplasmas entspricht positivem Rezeptorstatus (s. Pfeil); 20x Vergrößerung (Phasenkontrastmikroskop).

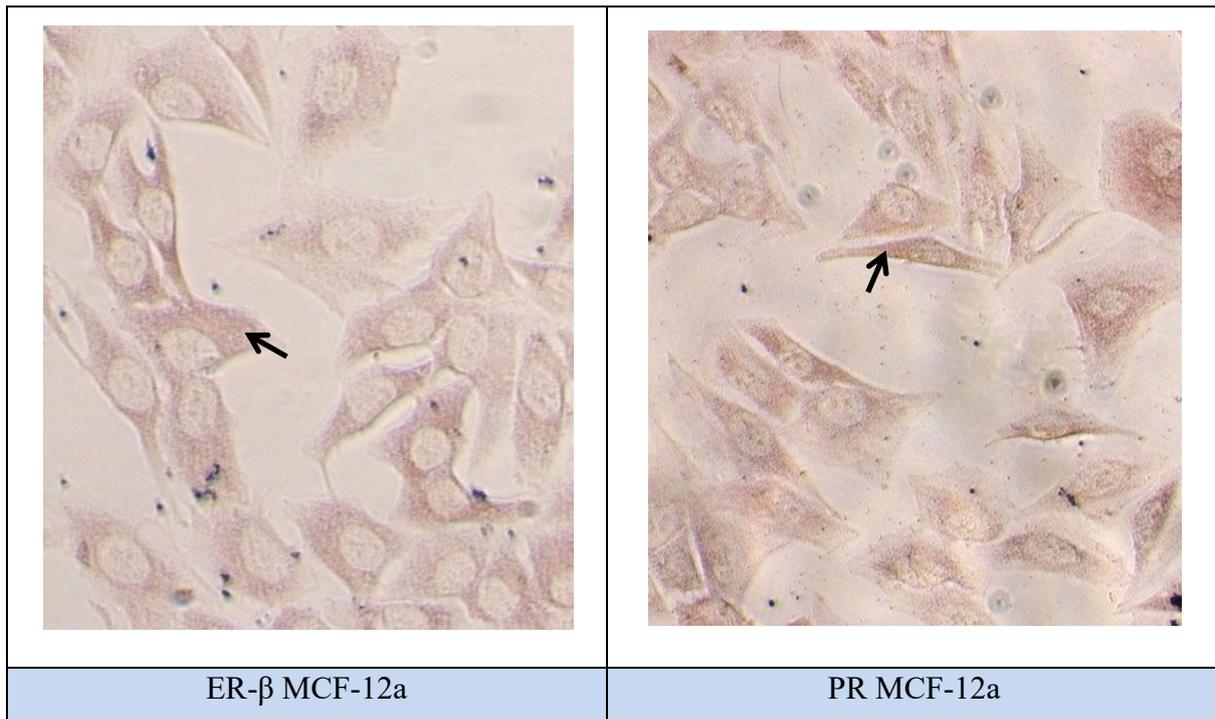


Abb. 26 Immunhistochemie des ER- β und PR für die MCF-12a-Zelllinie; ER- β (links); PR (rechts); 26. Passage; Rotfärbung des Zytoplasmas entspricht positivem Rezeptorstatus (s. Pfeil); 20x Vergrößerung (Phasenkontrastmikroskop).

Die Bildaufnahmen wurden über das Lichtmikroskop aufgenommen. Das Ergebnis zeigt einen dreifach positiven Rezeptorstatus für die MCF-7- und für die MFC-12a-Zelllinie. Demgegenüber zeigt sich in der Nativaufnahme, bei der zuvor auf die Gabe des Sekundärantikörpers verzichtet wurde, bei beiden Zelllinien keine Färbung des Zytoplasmas. Die unterschiedlichen Stufen der roten Reaktion zeigen für den ER- α die höchste, für den ER- β eine mittlere und für den PR die schwächste Intensität, wobei die MCF-12a-Zellreihe grundsätzlich etwas blasser erscheint.

Tabelle 7 Ergebnis der IHC dieser Arbeit anhand der roten Reaktion

	ER- α	ER- β	PR
MCF-7	starke Reaktion	mäßige Reaktion	schwache Reaktion
MCF-12a	starke Reaktion	mäßige Reaktion	schwache Reaktion

Die klinische Wertung des immunhistochemischen Verfahrens geschieht durch den immunreaktiven Score nach Remmele und Stegner. Hierbei werden der Prozentsatz und die rote Reaktion der Zellen berücksichtigt (s. Tabelle 8) [101].

Tabelle 8 Immunreaktiver Score nach Remmele und Stegner (IRS 0-12 Punkte) [101].

Prozentsatz positiver Zellen	Punkte	Farbintensität	Punkte
keine positiven Zellen	0	keine Reaktion	0
<10 % positive Zellen	1	schwache Reaktion	1
10-50 % positive Zellen	2	mäßige Reaktion	2
51-80 % positive Zellen	3	starke Reaktion	3
>80 % positive Zellen	4		

4.3 Testmethoden

4.3.1 Datenanalyse

Für die Auswertung der Ergebnisse wurden für die verschiedenen Testverfahren die prozentuale Verteilung der Ergebnisse anhand der jeweiligen Formeln berechnet und graphisch zur Veranschaulichung in Diagrammen dargestellt. Dafür wurde Microsoft Excel verwendet. Mit Hilfe dieser Software erfolgte schließlich auch die statistische Auswertung der Daten durch den t-Test (Zweistichprobentest für unabhängige Stichproben). Dafür wurden die einzelnen Mittelwerte der Daten der Proben entweder den Mittelwerten der NK (BrdU- und MTT-Test) oder der Positivkontrolle (LDH-Test) gegenübergestellt und damit überprüft, ob sie den gleichen Erwartungswert besitzen. Folgende Überlegung war dafür notwendig. Zunächst wurde eine Nullhypothese festgelegt. Für diese Arbeit lauten die Nullhypothesen je nach Testverfahren kein Unterschied in der Zellproliferation, Zellviabilität oder Zelltoxizität. Die Alternativhypothese besagt, dass ein Unterschied zwischen zwei Stichproben vorhanden ist. Da auf Grund von Variationen immer Unterschiede zwischen zwei Stichproben vorhanden sind, wurde eine Grenze festgelegt. Infolge dieser Grenze wird unterschieden, ob der Unterschied zwischen zwei Stichproben nur zufällig oder wesentlich (signifikant) entstanden ist. Dafür wurde in dieser Arbeit das sogenannte Signifikanzniveau bei $\alpha=0,05$ ausgewählt, d.h. in 5 % der Fälle wurde die Nullhypothese verworfen. Vereinfacht gesehen bedeutet dies für die Auswertung, dass wenn ein Unterschied zwischen zwei Stichproben derart groß ist, dass er nicht mehr auf einem Zufallsprozess beruhen kann, dann wird er als signifikant gewertet. Mit statistischen Tests kann letztlich geprüft werden, ob ein Stichprobenergebnis mit der Nullhypothese übereinstimmt. Durch die Durchführung des t-Tests wurde schlussendlich der durch die Stichprobe bestimmte p-Wert errechnet. Der p-Wert ist ein Wahrscheinlichkeitswert und eng gekoppelt an das Signifikanzniveau α . Er gibt an vorliegende oder noch extremere Werte zu erhalten, wenn die Nullhypothese zutrifft. Daraus resultiert, dass wenn die Werte extrem klein sind, vieles dafür spricht die Alternativhypothese

anzunehmen. Dabei gilt ist $p \leq \alpha=0,05$ wird die Nullhypothese abgelehnt und ist $p > \alpha=0,05$ wird sie angenommen [102].

4.3.2 LDH-Test

Dieser Test wurde genutzt, um zu erfahren, welche zytotoxische Wirkung der Pflanzenextrakt auf die malignen MCF-7-Zellen und auf die benignen MCF-12-Zellen ausübt. Dafür wurden die Zellen dem Pflanzenextrakt mit unterschiedlichen Konzentrationen ausgesetzt (500; 100; 50; 10; 1; 0,1 und 0,01 $\mu\text{g/ml}$) und verschiedenen Kontrollparametern gegenübergestellt (17 β -Estradiol 10^{-9} mol/l und Tamoxifen 10^{-4} mol/l). Wobei Tamoxifen als SERM zytotoxisch und 17 β -Estradiol nicht zytotoxisch wirkt. Als Positivkontrolle und damit 100 prozentiger Zytotoxizität wurde einem Probenansatz Triton X-100 zugeführt, welcher eine komplette Lyse der Zellen auslöste und damit den vollständigen Übergang der LDH in das Zellmedium zur Folge hatte. Die Negativkontrolle war in Form des Mediums und Ethanol als Verdünnungsmittel gegeben. Im LDH-Test erfolgte eine 24 stündige Einwirkung des reinen Extrakts in den verschiedenen Extraktkonzentrationen auf die beiden Zelllinien.

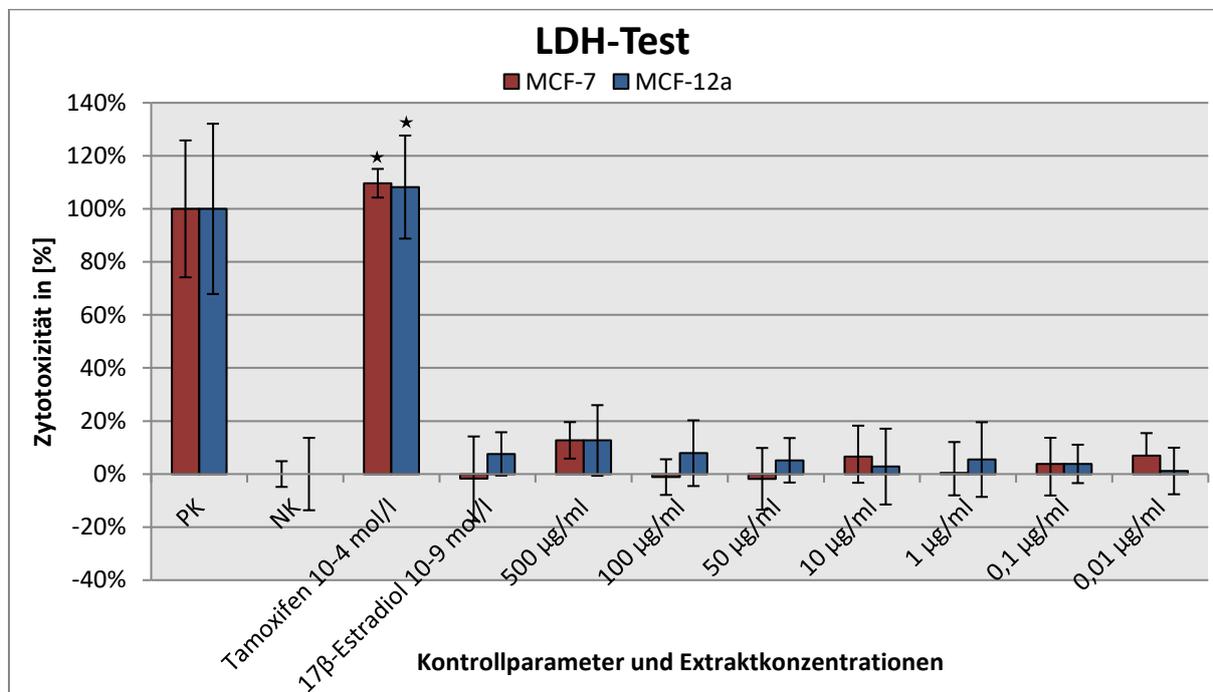


Abb. 27 LDH-Test der MCF-7 und MCF-12a-Zelllinien

Berechnete relative Zytotoxizität in Prozent im Verhältnis zur PK (Triton X-100); Fehlerindikatoren mit den Mittelwerten \pm Standardabweichung (MCF-7: n=15; MCF-12a: n=11); * Signifikanzniveau $p < 0,05$ im Vergleich zur PK.

Bei Betrachtung der MCF-7-Zelllinie zeigte im Vergleich zu der Positivkontrolle die Zugabe der einzelnen Extraktverdünnungsstufen (0,01-500µg/ml) keine signifikante Zytotoxizität (s. Abb. 27). Auch bei der benignen MCF-12a-Zelllinie konnte keine signifikante zytotoxische Wirkung auf die kultivierten Zellen nachgewiesen werden. Lediglich in der höchsten Verdünnungsstufe von 500 µg/ml zeigte sich auf beide Zelllinien eine prozentual leicht zytotoxische Wirkung von 13 %, welche jedoch nicht als signifikant bewertet werden kann. Für alle anderen Verdünnungsstufen ist der Wert kleiner als 10 %. Für die 17β-Estradiol-Kontrolle, die Verdünnungsstufen 100 µg/ml und 50 µg/ml ergaben sich für die MCF-7-Zellen rechnerisch negative Prozentzahlen. Dies bedeutet, dass hier mehr Zellen überlebt haben, als im Vergleich zur Negativkontrolle. Bezogen auf die Kontrollparameter 17β-Estradiol, Tamoxifen 10⁻⁴ mol/l und die Negativkontrollen resultierten jeweils für die MCF-7- und die MCF-12a-Zelllinien keine statistisch signifikanten Veränderungen in der Zytotoxizität. Lediglich bei den MCF-7-Zellen zeigte sich im Verhältnis zu der 17β-Estradiol-Kontrolle ein signifikant höheres Versterben der Zellen in der Kultur in der höchsten Pflanzenextraktkonzentration von 500 µg/ml.

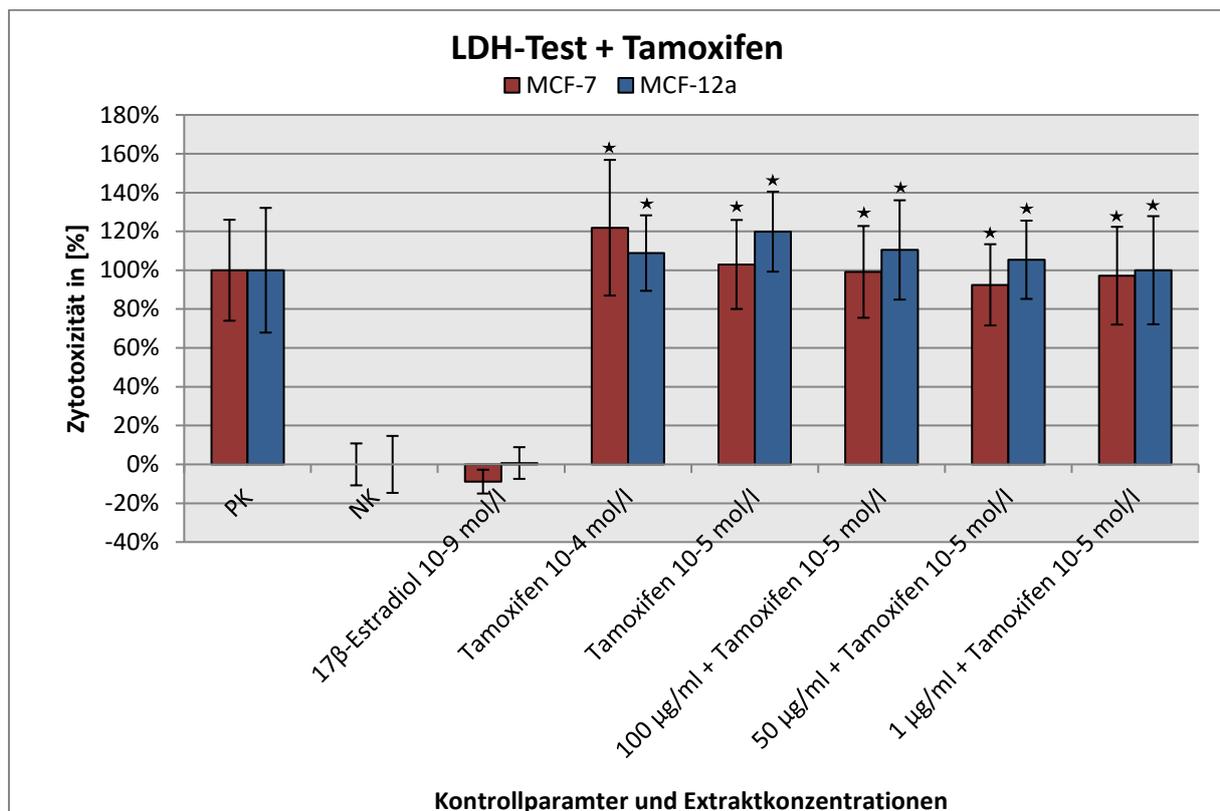


Abb. 28 LDH-Test der MCF-7 und MCF-12a-Zelllinien in Kombination mit Tamoxifen

Berechnete relative Zytotoxizität in Prozent im Verhältnis zur PK (Triton X-100); Fehlerindikatoren mit den Mittelwerten ± Standardabweichung (MCF-7: n=15; MCF-12a: n=11); * Signifikanzniveau p<0,05 im Vergleich zur PK; * Signifikanzniveau p<0,05 im Vergleich zur Tamoxifen 10⁻⁵ mol/l-Kontrolle.

Weiterhin wurde die zytotoxische Wirkung des Pflanzenextrakts in Kombination mit dem Medikament Tamoxifen untersucht (s. Abb. 28). Dafür wurden die Konzentrationen 100; 50 und 1 $\mu\text{g/ml}$ des Pflanzenextrakts mit Tamoxifen 10^{-5} mol/l zusammen auf die Zellproben gegeben und ihre Reaktion daraufhin ermittelt. Des Weiteren wurden u.a. auch hier Tamoxifen 10^{-4} mol/l und Tamoxifen 10^{-5} mol/l als Kontrollsubstanzen genutzt. Unter dem SERM ist unter beiden Konzentrationsstufen eine hundertprozentige Zytotoxizität auf beide Zelllinien zu verzeichnen. Die statistische Auswertung bezog sich auch hier auf die Positivkontrolle. Die Probenansätze mit dem Pflanzenextrakt konnten sowohl für die MCF-7- als auch die MCF-12a-Zelllinie keine signifikante Hemmung der Zytotoxizität aufweisen. Fast alle Proben unter dieser kombinierten Gabe zeigten eine hundertprozentige Zytotoxizität. Allein bei der mittleren Konzentration des Pflanzenextrakts von 50 $\mu\text{g/ml}$ konnte eine leichte, aber nicht signifikante prozentuale Senkung der Zytotoxizität von 8 % ermittelt werden. Für die Negativkontrolle und die 17β -Estradiol-Kontrolle konnten alle Verdünnungsstufen in der Kombination mit Tamoxifen 10^{-5} für die MCF-7- und die MCF-12a-Zellen eine im Vergleich signifikant gesteigerte Zytotoxizität aufweisen.

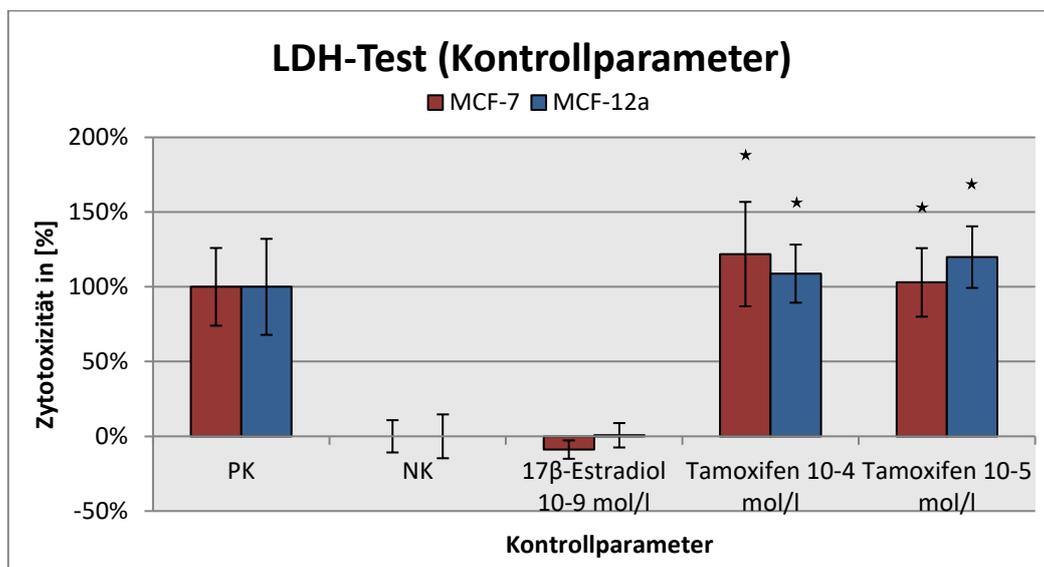


Abb. 29 LDH-Test der MCF-7 und MCF-12a-Zelllinien; Überblick der Kontrollsubstanzen

Berechnete relative Zytotoxizität in Prozent im Verhältnis zur Positivkontrolle (PK=Triton-X-100) Fehlerindikatoren mit den Mittelwerten \pm Standardabweichung (MCF-7: n=15; MCF-12a: n=11); * Signifikanzniveau $p < 0,05$ im Vergleich zur PK.

Bei Betrachtung der Kontrollparameter (s. Abb. 29) konnte für die Negativkontrolle und auch für 17β -Estradiol keine zytotoxische Wirkung auf die MCF-7- und MCF-12a-Zelllinien nachgewiesen werden. Die Positivkontrolle ergibt eine Zytotoxizität von 100 %. Der SERM

Tamoxifen zeigte in beiden verwendeten Konzentrationen (10^{-4} und 10^{-5} mol/l) eine stark zytotoxische Wirkung, welche im Verhältnis zur Positivkontrolle noch stärker ausfiel.

4.3.3 BrdU-Proliferationstest

Mit diesem Testverfahren wurde das Verhalten des Wachstums der MCF-7- und MCF-12a-Zelllinien untersucht und wie sich das Wachstum unter Aussetzung der verschiedenen Probenzugaben verhält. Hierfür wurde ebenfalls der Petersilienwurzelextrakt in den verschiedenen Verdünnungsstufen (500; 100; 50; 1; 0,1; 0,01 $\mu\text{g/ml}$) und ihr Einwirken auf die Zellkulturen hin untersucht. Die Werte der Negativkontrolle (Medium, Ethanol als Lösungsmittel) wurden als Vergleich für die statistische Auswertung herangezogen. Die Negativkontrolle soll das Wachstum der Zellen widerspiegeln, welches weder positiv noch negativ beeinflusst wurde. Somit wurde von einem ungestörten Wachstum und einer Wachstumsrate von 100 % ausgegangen. Als weitere Kontrollparameter dienen 17β -Estradiol, welches proliferationssteigernd wirkt und Tamoxifen, ein Proliferationshemmer.

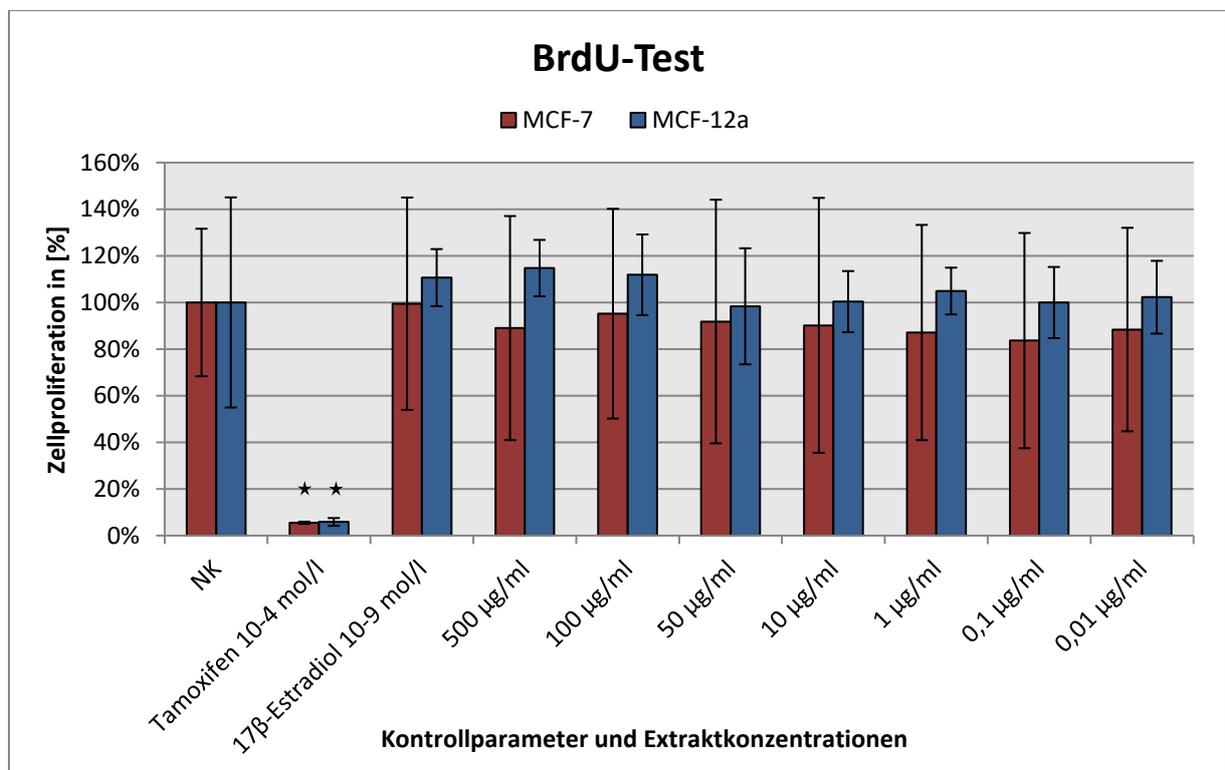


Abb. 30 BrdU-Test der MCF-7 und MCF-12a-Zelllinien

Berechnete relative Zellproliferation in Prozent im Verhältnis zur Negativkontrolle (Ethanol); Fehlerindikatoren mit den Mittelwerten \pm Standard-abweichung (MCF-7: $n=12$; MCF-12a: $n=11$); * Signifikanzniveau $p < 0,05$ im Vergleich zur NK.

Während unter Einfluss des Tamoxifens 10^{-4} mol/l eine nahezu fast vollständige Hemmung des Wachstums der MCF-7- und der MCF-12a-Zellen zu verzeichnen war, konnten eine signifikante Hemmung oder Steigerung der Proliferation unter dem Einfluss der verschiedenen Extraktkonzentrationen weder für die MCF-7- noch für die MCF-12a-Zellkulturen bezogen auf die Negativkontrolle nachgewiesen werden (s. Abb. 30). Im Verhältnis zur Tamoxifenkontrolle zeigten alle Verdünnungsstufen einen signifikanten Unterschied und damit ein eindeutig höheres Wachstum beider Zelllinien. Für die 17β -Estradiol-Kontrolle konnte ebenso wie bei der Negativkontrolle für beide Zelllinien kein signifikanter Einfluss des Extrakts auf die Proliferation nachgewiesen werden. Unter Extrakteinfluss auf die MCF-7-Zellen wurde lediglich eine prozentual berechnete Wachstumshemmung von maximal 16 % für die Konzentrationsstufe 0,1 $\mu\text{g/ml}$ erreicht. Bei der MCF-12a-Zelllinie zeigte sich eine leichte Steigerung der Proliferation unter dem Extrakt (500; 100 $\mu\text{g/ml}$) im Vergleich zur Negativkontrolle, jedoch auch hier höchstens um 15 % und ohne Signifikanz.

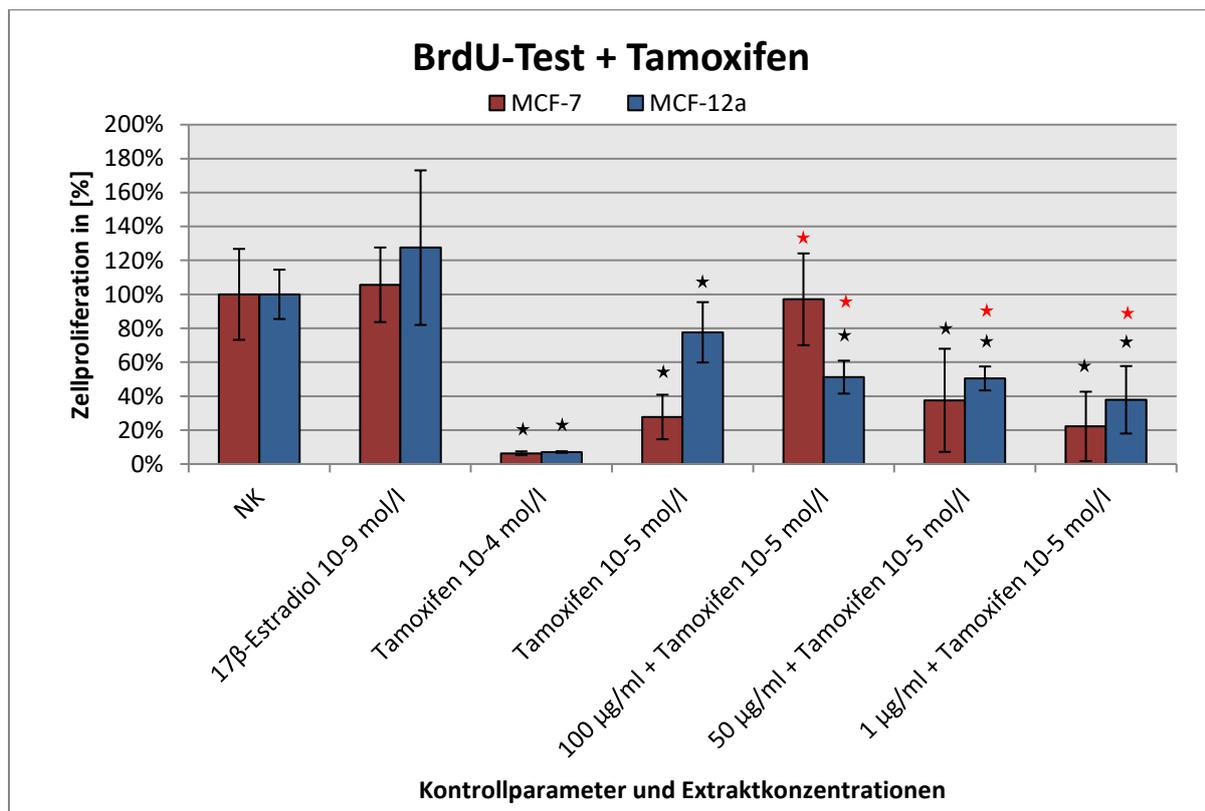


Abb. 31 BrDU-Test der MCF-7 und MCF-12a-Zelllinien in Kombination mit Tamoxifen

Berechnete relative Zellproliferation in Prozent im Verhältnis zur Negativkontrolle (Ethanol); Fehlerindikatoren mit den Mittelwerten \pm Standardabweichung (MCF-7: n=12; MCF-12a: n=11); * Signifikanzniveau $p < 0,05$ im Vergleich zur NK; * Signifikanzniveau $p < 0,05$ im Vergleich zur Tamoxifen 10^{-5} mol/l-Kontrolle.

Auch für den Proliferationstest wurde das Verhalten des Wachstums der MCF-7- und MCF-12a-Zelllinien in Kombination der Extraktkonzentrationen 100; 50; 1 µg/ml und Tamoxifen 10^{-5} mol/l untersucht (s. Abb. 31). Allgemein hat Tamoxifen als SERM einen wachstumshemmenden Einfluss. Die Negativkontrolle wurde hier ebenso für die Auswertung einer statistischen Signifikanz herangezogen. Zunächst sollen die Auswirkungen auf das Wachstum der MCF-7-Zellen beschrieben werden. Zunächst erreichte die Kontrollsubstanz Tamoxifen in den Konzentrationen 10^{-4} mol/l und 10^{-5} mol/l eine signifikante Hemmung des Zellwachstums. Auch die Hemmung in den Konzentrationen 50 µg/ml + Tamoxifen 10^{-5} mol/l und 1 µg/ml Tamoxifen 10^{-5} mol/l war signifikant. Bei ersterer Konzentrationsstufe wurde eine Proliferation von 38 % erreicht und bei letzterer eine von 22 %. Auffällig war, dass unter der Extraktkonzentration von 100 µg/ml + Tamoxifen 10^{-5} keine signifikante Hemmung des Zellwachstums eintrat. Prozentual betrachtet bedeutete dies ein Zellwachstum von 97 % unter Tamoxifeneinfluss. Interessant war auch die Betrachtung der Zellproliferation in Prozent. Dort stellte sich dar, dass je weniger der Extrakt konzentriert war, die Hemmung des Wachstums zunahm. (Zellproliferation: 100 µg/ml > 50 µg/ml > 1 µg/ml). Im Vergleich mit der 17β -Estradiol-Kontrolle ergab sich ebenfalls eine signifikant proliferationshemmender Einfluss bei den Konzentrationsstufen 50 µg/ml + Tamoxifen 10^{-5} mol/l und 1 µg/ml Tamoxifen 10^{-5} mol/l. Dagegen zeigte eine statistische Gegenüberstellung mit Tamoxifen 10^{-4} mol/l für alle Pflanzenextraktkonzentrationen eine signifikant gesteigerte Proliferation. Für die niedrigere Konzentration des Tamoxifens von 10^{-5} mol/l zeigte nur die höchste Extraktkonzentration mit 100 µg/ml eine signifikant proliferationssteigernde Wirkung.

Bei Betrachtung der Ergebnisse der MCF-12a-Zelllinie zeigte sich für den Kontrollparameter Tamoxifen 10^{-4} mol/l eine deutlich signifikante Hemmung des Wachstums in Bezug auf die Negativkontrolle. Demgegenüber war die Minderung der Proliferation durch Tamoxifen 10^{-5} zwar signifikant, jedoch nicht annähernd so ausgeprägt. Im Vergleich bedeutete dies für Tamoxifen 10^{-4} mol/l eine Zellproliferation von nur 7 % und bei Tamoxifen 10^{-5} mol/l von 78 %. Für die Verdünnungsstufen des Pflanzenextrakts zusammen mit Tamoxifen 10^{-5} mol/l ergab sich für alle Stufen eine signifikante Verringerung in der Zellproliferation. Deutlich zu erkennen war auch hier, dass unter Extrakteinfluss und der Kombination von Tamoxifen 10^{-5} mol/l die antiproliferative Wirkung deutlich stärker ausgeprägt war, als unter alleiniger Hinzugabe von Tamoxifen 10^{-5} mol/l. Die Hemmung des Wachstums fiel wiederum in der niedrigsten Konzentration von 1 µg/ml mit 38 % am höchsten aus. Hier ergibt sich für den Vergleich der mit Tamoxifen 10^{-5} mol/l kombinierten Pflanzenextraktproben mit Tamoxifen

10^{-4} mol/l für alle Konzentrationen eine signifikant gesteigerte Proliferation. Des Weiteren zeigen in Bezug auf Tamoxifen 10^{-5} mol/l die einzelnen Pflanzenextraktkonzentrationen kombiniert mit Tamoxifen 10^{-5} mol/l einen signifikant proliferationshemmenden Einfluss.

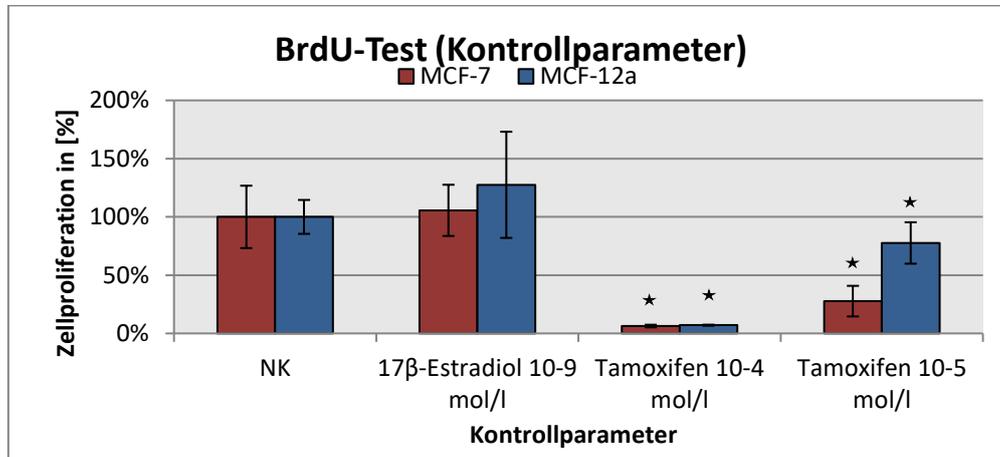


Abb. 32 BrdU-Test der MCF-7 und MCF-12a-Zelllinien, Überblick Kontrollparameter

Berechnete relative Zellproliferation in Prozent im Verhältnis zur Negativkontrolle (Ethanol); Fehlerindikatoren mit den Mittelwerten \pm Standardabweichung (MCF-7: n=15; MCF-12a: n=11); * Signifikanzniveau $p < 0,05$ im Vergleich zur NK.

Die Resultate der Kontrollparameter für den BrdU-Test (s. Abb. 32) ergeben eine hundertprozentige Proliferationsleistung für die Negativkontrolle. Für 17β -Estradiol, welches eine proliferationssteigernde Wirkung hat, zeigte sich für die MCF-12a-Zellen überdies eine Proliferationssteigerung um fast 30 % gegenüber der Negativkontrolle. Der proliferationssteigernde Effekt auf die MCF-7-Zellen fiel demgegenüber nicht so ausgeprägt aus. Tamoxifen 10^{-4} mol/l zeigte eine fast vollständige Wachstumshemmung für beide Zelllinien. In der Konzentration von 10^{-5} mol/l ergab sich für die MCF-7-Zelllinie eine Proliferationshemmung von mehr als 70 %, während bezogen auf die MCF-12a-Zellen nur eine proliferationshemmende Wirkung von etwas mehr als 20 % erreicht wurde. Bezogen auf die Tamoxifen 10^{-4} mol/l-Kontrolle bedeutete dies für beide Zelllinien einen signifikanten Unterschied unter Einwirkung von Tamoxifen 10^{-5} mol/l.

4.3.4 MTT-Test

Anhand des MTT-Tests war es möglich einen Eindruck über die metabolische Aktivität der Zellen zu gewinnen und darüber den Anteil lebender Zellen bestimmen zu können. Die kultivierten Zellen waren auch hier dem Pflanzenextrakt in den jeweiligen Verdünnungsstufen

24 Stunden ausgesetzt. Anschließend wurde das metabolische Verhalten indirekt gemessen. Zur Kontrolle wurden den Zellkulturen erneut Tamoxifen und 17β -Estradiol zugesetzt. Dabei wurde davon ausgegangen, dass Tamoxifen die Viabilität der Zellen senkt und 17β -Estradiol einen steigernden Effekt hat. Für die Ergebnisauswertung wurde zusätzlich vorausgesetzt, dass unter der Zugabe des Verdünnungsmittels eine ungestörte metabolische Aktivität erreicht werden muss. Daraus schließend wurde dieser Ansatz als Negativkontrolle verwendet und mit einer hundertprozentigen Zellviabilität gleichgesetzt.

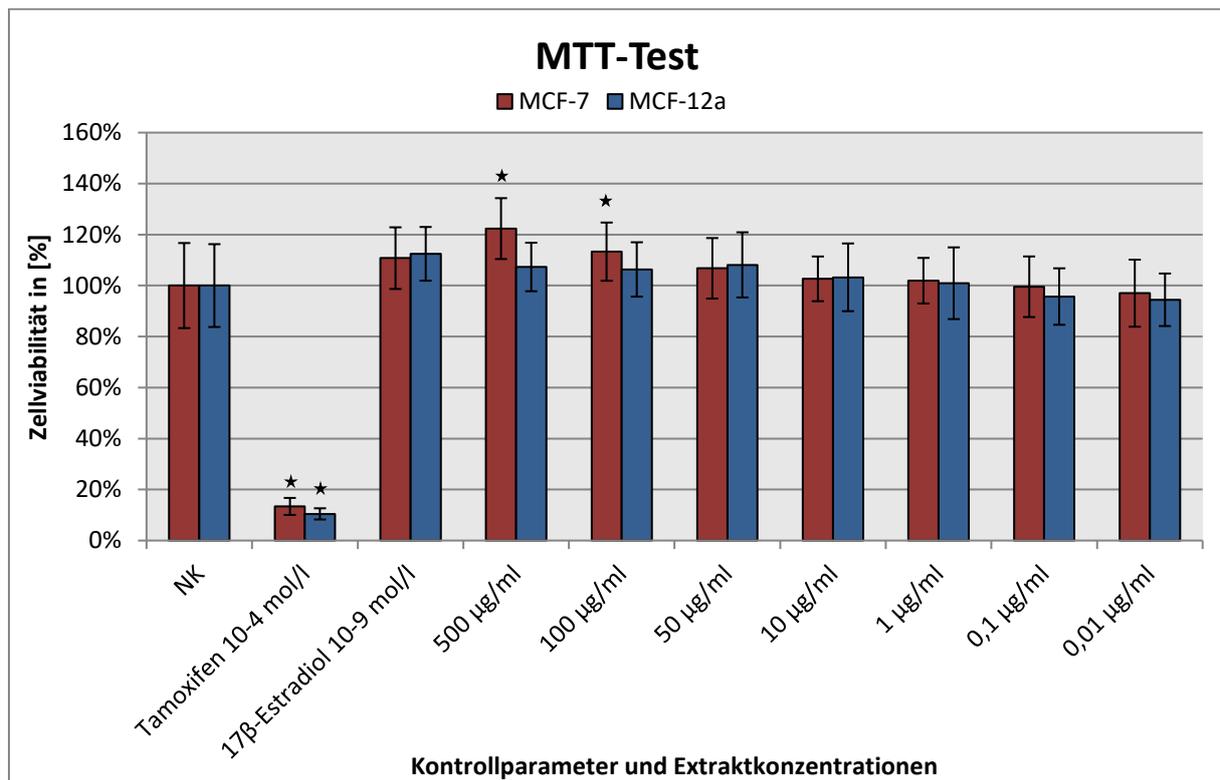


Abb. 33 MTT-Test der MCF-7 und MCF-12a-Zelllinien

Berechnete relative Zellviabilität in Prozent im Verhältnis zur Negativkontrolle (Ethanol); Fehlerindikatoren mit den Mittelwerten \pm Standardabweichung (MCF-7: n=15; MCF-12a: n=11); * Signifikanzniveau $p < 0,05$ im Vergleich zur NK.

Zunächst wurde der Einfluss des Pflanzenextrakts auf die MCF-7-Zelllinie untersucht (s. Abb. 33). Hier zeigte sich für die beiden höchsten Konzentrationsstufen im Vergleich zur Negativkontrolle eine signifikant gesteigerte Zellviabilität. Prozentual betrachtet ergab sich für die Konzentration von 500 $\mu\text{g/ml}$ eine Erhöhung der metabolischen Aktivität um 22 % und für die Konzentration 100 $\mu\text{g/ml}$ von 13 %. Für die folgenden Konzentrationsstufen (50; 10; 1; 0,1; 0,01 $\mu\text{g/ml}$) ergab sich keine signifikante Erhöhung oder Verringerung in der Viabilität der Zellen bezogen auf die Negativkontrolle. Im Vergleich mit der 17β -Estradiol-

Kontrolle resultierte für die Konzentrationsstufen 0,1 und 0,01 $\mu\text{g/ml}$ eine signifikant niedrigere Stoffwechselaktivität mit einem Unterschied von 11 % und 14 %.

Das Resultat des MTT-Tests für die MCF-12a-Zellen erbrachte für die Probenansätze unter Zugabe des Pflanzenextraktes weder eine signifikante Steigerung noch eine signifikante Hemmung der metabolischen Aktivität im Vergleich mit der Negativkontrolle. Gemessen an der 17β -Estradiol-Kontrolle zeigte sich für die kultivierten Zellen unter den Extraktkonzentrationen 1; 0,1 und 0,01 $\mu\text{g/ml}$ eine signifikant niedrigere Stoffwechselaktivität. Gegenüber der Tamoxifenkontrolle, ergaben alle Probenansätze eine signifikant höhere Zellviabilität.

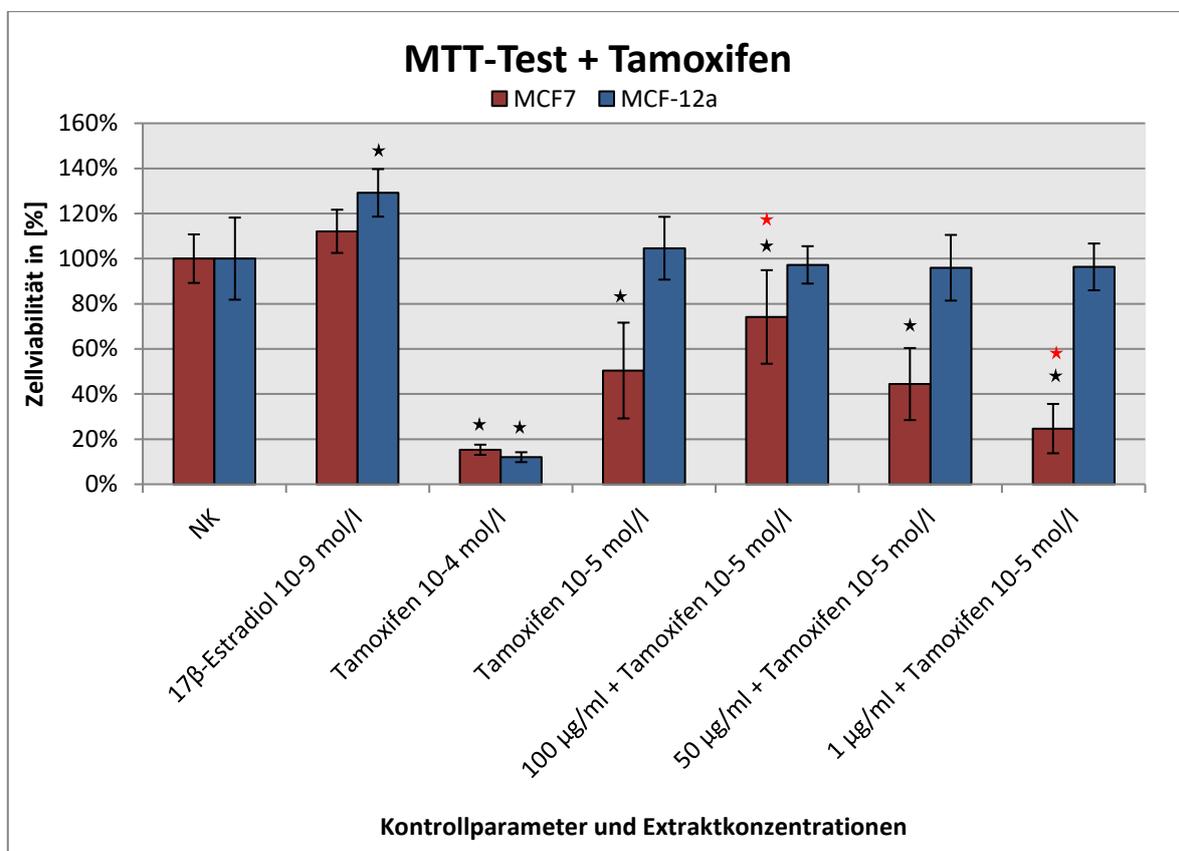


Abb. 34 MTT-Test der MCF-7 und MCF-12a-Zelllinien in Kombination mit Tamoxifen

Berechnete relative Zellviabilität in Prozent im Verhältnis zur Negativkontrolle (Ethanol); Fehlerindikatoren mit den Mittelwerten \pm Standardabweichung (MCF-7: $n=15$; MCF-12a: $n=11$); * Signifikanzniveau $p<0,05$ im Vergleich zur NK, * Signifikanzniveau $p<0,05$ im Vergleich zur Tamoxifen 10^{-5} mol/l-Kontrolle.

Die Veränderung der metabolischen Aktivität auf die kultivierten Zellen unter Zugabe des Pflanzenextrakts in drei verschiedenen Verdünnungsstufen und gleichzeitiger Zugabe von Tamoxifen 10^{-5} mol/l wurde auch mit dem MTT-Test untersucht (s. Abb34). Es erfolgte die statistische Auswertung in Bezug auf die Negativkontrolle (Ethanol), bei der eine normale

Zellviabilität vorausgesetzt wurde. Bei dieser Testung wurden auch wieder Kontrollansätze verwendet, Tamoxifen 10^{-4} mol/l, Tamoxifen 10^{-5} mol/l und 17β -Estradiol. Für die MCF-7-Zelllinie fand eine signifikante Hemmung der Stoffwechselaktivität bei einer Viabilität von 15 % unter Zugabe von Tamoxifen 10^{-4} mol/l statt. Auch die Zugabe von Tamoxifen 10^{-5} mol/l erreichte eine signifikant viabilitätshemmende Wirkung. Im Vergleich zu Tamoxifen 10^{-4} mol/l war die Stoffwechselaktivität mit 50 % hierbei wesentlich höher. Bei Betrachtung der Kombination des Pflanzenextrakts mit Tamoxifen 10^{-5} mol/l hatten alle Verdünnungsstufen einen signifikant stoffwechselhemmenden Einfluss. Wobei die höchste Konzentration des Pflanzenextrakts von 100 μ g/ml die höchste Viabilität mit 78 % erreichte und damit deutlich höher ausfiel als unter alleinigem Einfluss von Tamoxifen 10^{-5} mol/l. Unter Einfluss der mittleren Konzentration von 50 μ g/ml zeigte sich eine prozentuale metabolische Stoffwechselaktivität von 44 %. Die stärkste hemmende Wirkung auf die Viabilität ergab der Zusatz der niedrigsten Konzentrationsstufe von 1 μ g/ml mit einer Stoffwechselaktivität von nur 25 %. Daraus resultiert im Vergleich zur alleinigen Gabe von Tamoxifen 10^{-5} mol/l eine beträchtlichere Hemmung der Zellviabilität der MCF-7-Zellen. Die Berechnung einer Signifikanz bezogen auf die 17β -Estradiol-Kontrolle ergab ebenfalls einen wesentlichen viabilitätshemmenden Einfluss aller Pflanzenextraktstufen kombiniert mit Tamoxifen 10^{-5} mol/l. Im statistischen Vergleich mit Tamoxifen 10^{-4} mol/l resultierte dagegen ein signifikanter Anstieg der Zellviabilität. Gemessen an Tamoxifen 10^{-5} mol/l zeigte sich ausschließlich für die höchste Pflanzenextraktkonzentration von 100 μ g/ml zusammen mit Tamoxifen 10^{-5} mol/l eine signifikante stoffwechselsteigernde Wirkung. Die niedrigste Konzentration von 1 μ g/ml des Pflanzenextrakts ergab wiederum eine signifikante Viabilitätshemmung.

Die Ergebnisauswertung erfolgte auch bei der benignen MCF-12a-Zelllinie zunächst in Bezug auf die Negativkontrolle. Die Zugabe von Tamoxifen 10^{-4} mol/l zum Zellkulturansatz hatte eine signifikant viabilitätshemmende Auswirkung von 12 %. Dazu steht im deutlichen Gegensatz, dass unter Zusatz der niedrigeren Konzentration von Tamoxifen 10^{-5} mol/l kein hemmender Einfluss auf Zellviabilität nachzuweisen war. Es war mehr noch eine eher zunehmende Stoffwechselaktivität von 105 % zu sehen. Unter Einwirkung des Pflanzenextrakts stellte sich mit den drei verschiedenen Konzentrationsstufen in Verbindung mit Tamoxifen 10^{-5} mol/l keine signifikante Beeinflussung der Zellviabilität dar. Die prozentuale Viabilität der Zellen lag für alle drei Verdünnungsstufen > 95 %. Wie auch bei der MCF-7-Zelllinie erbrachte der Vergleich mit der 17β -Estradiol-Kontrolle einen signifikanten stoffwechselhemmenden Einfluss des Pflanzenextrakts mit Tamoxifen 10^{-5}

mol/l. Gemessen an der Kontrolle in Form von Tamoxifen 10^{-4} mol/l zeigte sich für alle Verdünnungsstufen kombiniert mit Tamoxifen 10^{-5} mol/l eine Steigerung der Zellviabilität. Demgegenüber ergab die statistische Berechnung mit der Tamoxifen 10^{-5} mol/l-Kontrolle keine signifikante Erhöhung oder Verringerung der Stoffwechselaktivität der MCF-12a-Zellen.

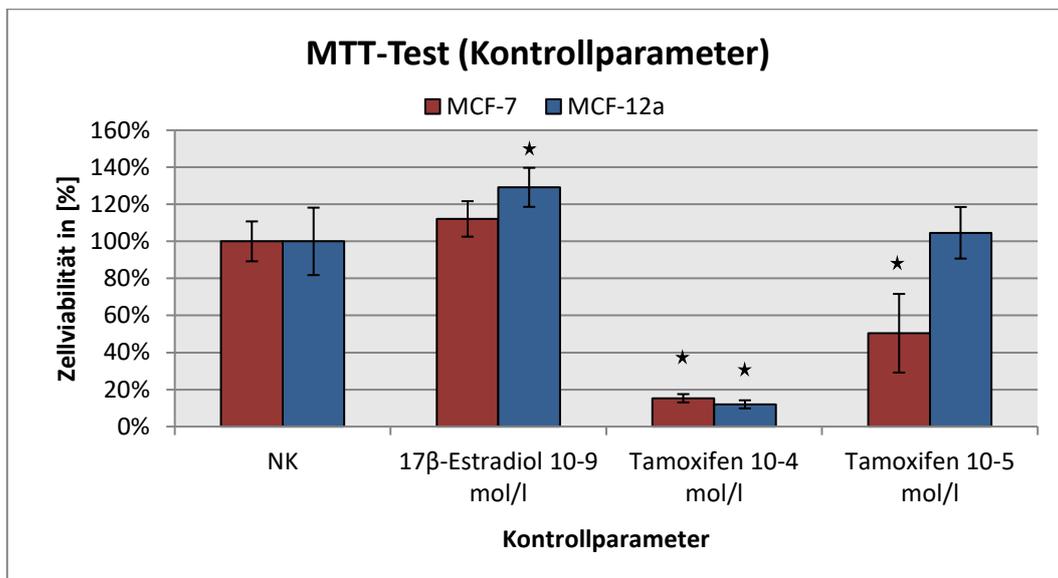


Abb. 35 MTT-Test der MCF-7 und MCF-12a-Zelllinien in Kombination mit Tamoxifen

Berechnete relative Zellproliferation in Prozent im Verhältnis zur Negativkontrolle (Medium+Zellen+Ethanol); Fehlerindikatoren mit den Mittelwerten \pm Standardabweichung (MCF-7: n=15; MCF-12a: n=11); * Signifikanzniveau $p < 0,05$ im Vergleich zur NK.

Bei der isolierten Betrachtung der einzelnen Kontrollparameter ergab sich für die MCF-7- und MCF-12a-Zelllinie bezogen auf die 17β -Estradiol-Kontrolle eine signifikant gesteigerte Zellviabilität bezogen auf die Negativkontrolle (s. Abb. 35). Bei den MCF-12a-Zellen betrug diese Steigerung fast 30 %. Tamoxifen 10^{-4} mol/l hatte auf beide Zelllinien einen stark viabilitätshemmenden Einfluss. Demgegenüber zeigte sich bei der niedrigeren Konzentration von Tamoxifen 10^{-5} mol/l im Vergleich zu Tamoxifen 10^{-4} mol/l eine signifikant gesteigerte Stoffwechselaktivität. Für die MCF-7-Zellen stellte sich eine Zellviabilität von 50 % und bei der MCF-12a-Zelllinie überdies eine Zellviabilität von mehr als 100 % unter Tamoxifen 10^{-5} mol/l dar.

4.3.5 Zellmetabolismus

4.3.5.1 Glukosebestimmung

Bei dieser Testmethodik wurde die Veränderung des Glukosegehaltes im Zellüberstand und damit indirekt die Glukoseaufnahme der MCF-7- und MCF-12a-Zellen unter Einfluss des Petersilienwurzelextrakts untersucht. Die Negativkontrolle, bestehend aus der Zugabe von Ethanol wurde hierbei als Vergleich herangezogen.

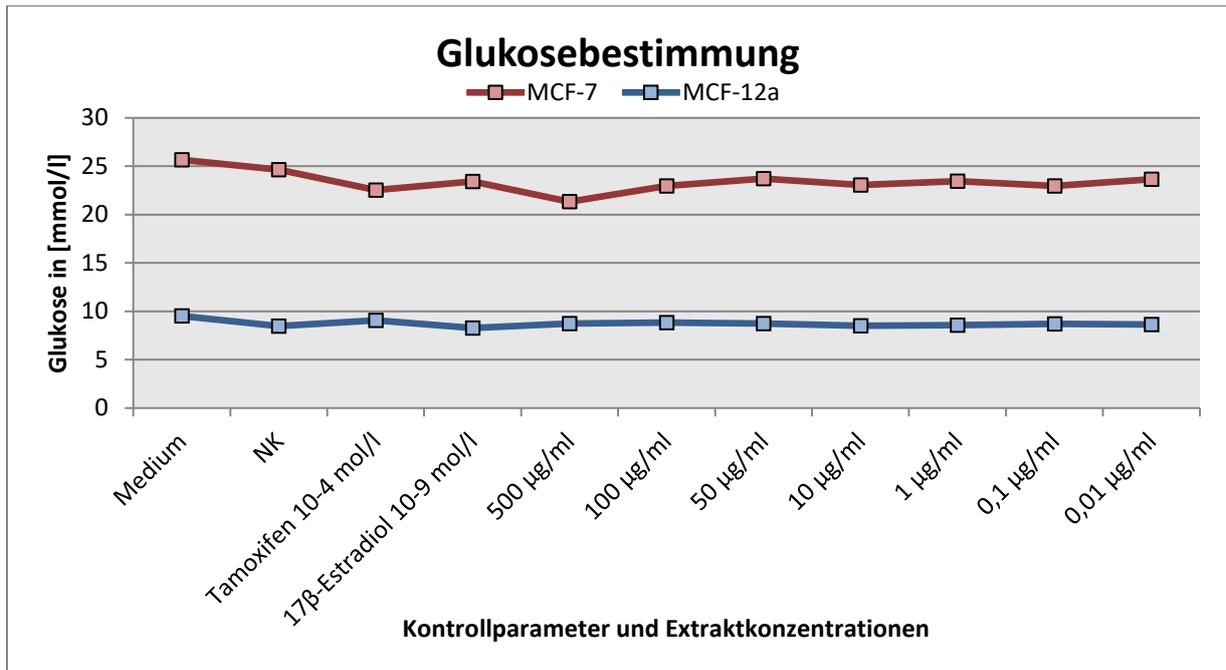


Abb. 36 Glukosebestimmung der MCF-7- und MCF-12a-Zelllinien

Bestimmung aus dem Zellüberstand im Vergleich zur NK=Negativkontrolle (Ethanol); MCF-7: n=4; MCF-12a: n=2.

Im reinen Medium der MCF-7-Zelllinie konnte ein Glukosegehalt von 25,7 mmol/l festgestellt werden (s. Abb36). Bei der Betrachtung der MCF-7-Zelllinie zeigte sich für alle Ansätze eine gesteigerte Glukoseaufnahme. Im Vergleich zur Negativkontrolle ergab sich eine Abnahme der Glukosekonzentration um 3,3 mmol/l unter Einfluss der höchsten Extraktkonzentration von 500 µg/ml. Bei den Konzentrationsstufen 100µg/ml und 0,1 µg/ml zeigte sich ebenfalls eine Erhöhung des Glukoseumsatzes und damit eine Verringerung des Glukosegehaltes um jeweils bis zu 1,7 mmol/l. Unter der Extraktkonzentration von 10 µg/ml erfolgte eine Abnahme um 1,6 mmol/l im Bezug zur Negativkontrolle. Die übrigen Konzentrationsstufen ergaben eine Steigerung der Glukoseaufnahme bzw. Verringerung der Glukosekonzentration um 0,9 mmol/l (50 µg/ml), 1,2 mmol/l (1 µg/ml) und 1,0 mmol/l (0,01

$\mu\text{g/ml}$). Interessant ist die deutliche Zunahme der Glukoseaufnahme der MCF-7-Zellen unter Einwirkung von Tamoxifen 10^{-4} mol/l und dadurch eine Abnahme um 2,1 mmol/l im Vergleich zur Negativkontrolle, während unter 17β -Estradiol eine Verringerung der Glukosekonzentration von 1,2 mmol/l erreicht wurde.

Demgegenüber zeigten die Zellen der MCF-12a-Zelllinie kaum Veränderungen im Glukosemetabolismus bezogen auf die Negativkontrolle. Wobei hier das reine Medium eine Konzentration der Glukose von 9,5 mmol/l aufwies. Der Glukoseumsatz unter dem Einfluss der verschiedenen Pflanzenextraktkonzentrationen lag dagegen eher niedriger mit einem Unterschied von 0,1-0,26 mmol/l gegenüber der Negativkontrolle. Unter Tamoxifen 10^{-4} mol/l zeigte sich eine Zunahme der Glukosekonzentration um 0,6 mmol/l und unter 17β -Estradiol eine dezente Abnahme von 0,2 mmol/l.

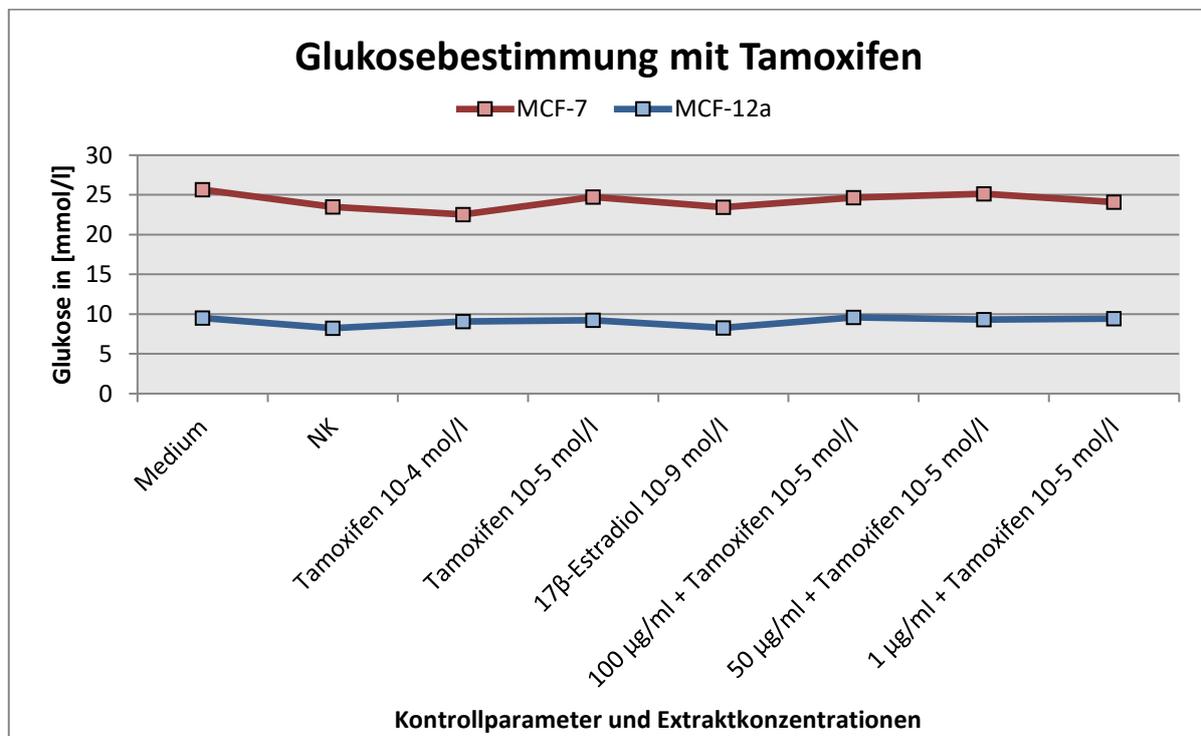


Abb. 37 Glukosebestimmung der MCF-7- und MCF-12a-Zelllinien mit Tamoxifen

Bestimmung aus dem Zellüberstand im Vergleich zur NK=Negativkontrolle (Ethanol); MCF-7: n=4; MCF-12a: n=2.

Im Folgenden wird die Glukoseaufnahme der MCF-7- und MCF-12a-Zelllinien unter der kombinierten Gabe der verschiedenen Pflanzenextraktkonzentration mit Tamoxifen 10^{-5} mol/l betrachtet (s. Abb. 37). Unter der höchsten Konzentrationsstufe (100 $\mu\text{g/ml}$) wurde eine deutliche Abnahme des Glukoseumsatzes und dementsprechend eine Zunahme des Glukosespiegels um 1,1 mmol/l bei der MCF-7-Zelllinie beobachtet. Bei der nächstfolgenden

Konzentrationsstufe (50 µg/ml) erhöhte sich die Glukosekonzentration überdies um 1,6 mmol/l im Vergleich zur Negativkontrolle. Unter der niedrigsten Extraktkonzentration (1 µg/ml) in Kombination mit Tamoxifen 10^{-5} mol/l wurde eine Abnahme des Glukoseumsatzes und damit Steigerung des Glukosegehaltes um 0,6 mmol/l erreicht. Tamoxifen 10^{-5} mol/l allein ergab eine Zunahme der Glukosekonzentration um 1,2 mmol/l in Bezug auf die Negativkontrolle. Demgegenüber stand eine Verringerung um 1,0 mmol/l unter Tamoxifen 10^{-4} mol/l.

Für die MCF-12a-Zellen zeigte sich ein minimaler Anstieg des Glukoseumsatzes unter Einwirkung des Pflanzenextrakts zusammen mit Tamoxifen 10^{-5} mol/l. Für die Konzentrationsstufe von 100 µg/ml bedeutete dies eine Steigerung der Glukosekonzentration um 1,4 mmol/l, für 50 µg/ml um 1,1 mmol/l und für die niedrigste Konzentration (1 µg/ml) um 1,2 mmol/l im Vergleich zur Negativkontrolle. Die alleinige Wirkung von Tamoxifen 10^{-5} mol/l erreichte eine Verringerung des Glukoseumsatzes bzw. Zunahme des Glukosegehaltes um 1,0 mmol/l, während unter Tamoxifen 10^{-4} mol/l eine Zunahme von 0,8 mmol/l stattfand.

4.3.5.2 pH-Wert-Bestimmung

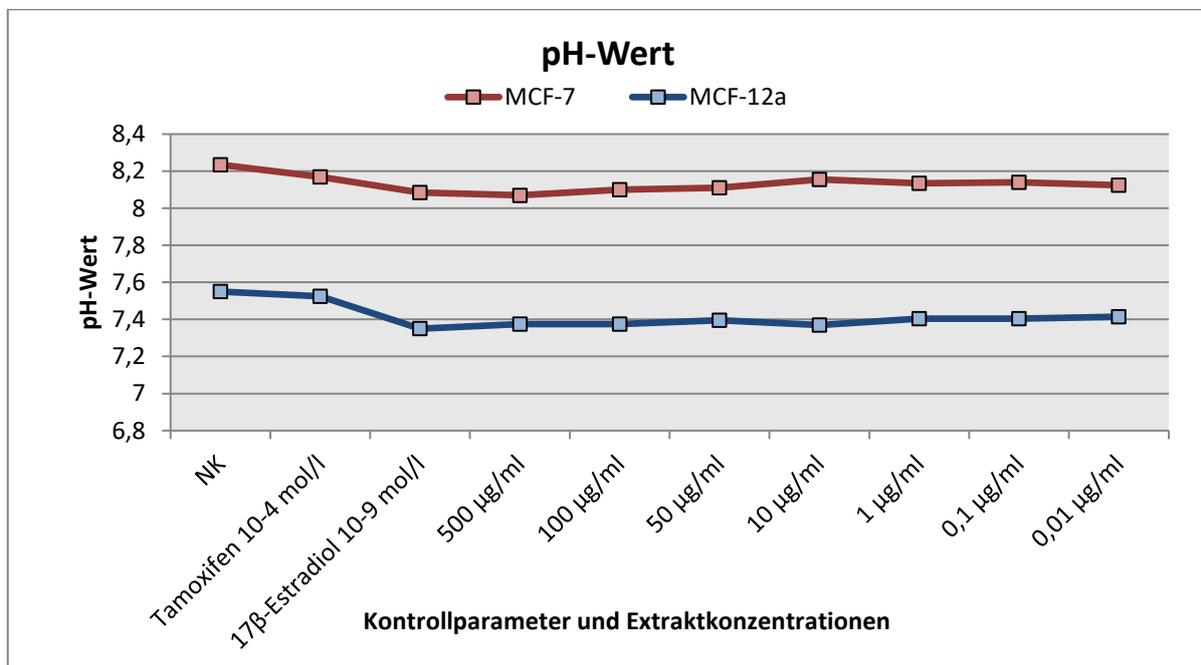


Abb. 38 Bestimmung des pH-Wertes der MCF-7- und MCF-12a-Zelllinien

Bestimmung aus dem Zellüberstand im Vergleich zur NK=Negativkontrolle (Ethanol).

Die pH-Wert-Messung erfolgte für die MCF-7- und MCF-12a-Zelllinien mit dem Orion Star 3 (pH-Messgerät). Für das reine Medium der MCF-7-Zellen betrug der pH-Wert 8,06 und dem der MCF-12a-Zellen 7,4. Unter der Negativkontrolle, bestehend aus der Zugabe von Ethanol, ergab sich für die MCF-7-Zellen ein pH-Wert von 8,2 und für die MCF-12a-Zellen ein pH-Wert von 7,55.

Unter der Zugabe des Petersilienwurzelextrakts ergaben sich unter Einwirkung aller Extraktkonzentrationsstufen für die MCF-7-Zelllinie niedrigere pH-Werte im Vergleich zur Negativkontrolle. Für die höchste Konzentration von 500 µg/ml war der pH-Wert-Unterschied mit 0,17 am höchsten (pH=8,07). Der Unterschied der folgenden Konzentrationsstufen für den pH-Wert lag bei 0,08-0,13.

Für die MCF-12a-Zelllinie erfolgte ebenfalls eine Verringerung des pH-Wertes im Zellüberstand nach Zugabe des Petersilienwurzelextrakts für alle Konzentrationsstufen im Vergleich zur Negativkontrolle. Dabei ergab sich ein Unterschied von 0,14-0,18. Wobei auch hier für die beiden höchsten Konzentrationen (500 µg/ml; 100 µg/ml) mit einer Senkung von jeweils 0,18 der Unterschied am höchsten war in Bezug zur Negativkontrolle.

Der Kontrollparameter Tamoxifen 10^{-4} mol/l ergab für die MCF-7-Zellen einen Unterschied von 0,065 und für die MCF-12a-Zellen einen Unterschied von 0,025. Unter Einwirkung von 17β -Estradiol kam es zu einer Erniedrigung des pH-Wertes für die MCF-7-Zellen um 0,15 und für die MCF-12a-Zellen um 0,2 im Gegensatz zur Negativkontrolle.

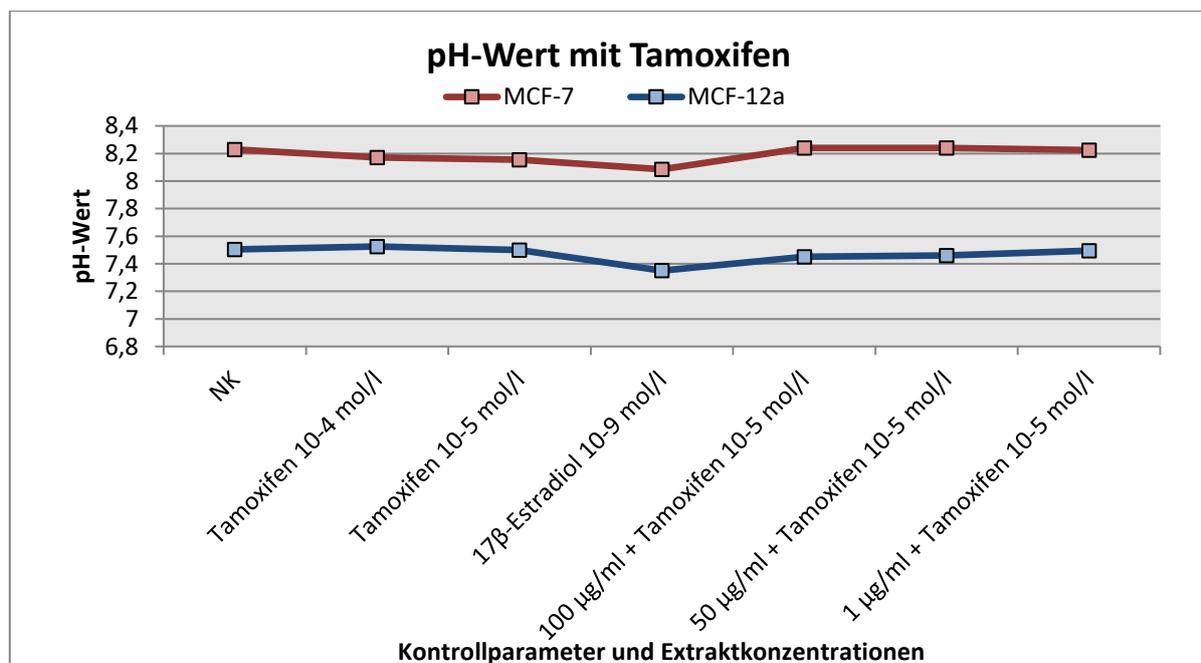


Abb. 39 Bestimmung des pH-Wertes der MCF-7- und MCF-12a-Zelllinien mit Tamoxifen
Bestimmung aus dem Zellüberstand im Vergleich zur NK=Negativkontrolle (Ethanol).

Die pH-Wert-Messung wurde auch für die Zellüberstände der MCF-7- und MCF-12a-Zelllinien nach der Zugabe des Petersilienwurzelextrakts in Kombination mit Tamoxifen 10^{-5} mol/l durchgeführt (s. Abb. 39). Bei der MCF-7-Zelllinie ergab sich für alle Extraktkonzentrationen ein pH-Wert zwischen 8,23 und 8,24. Demgegenüber zeigte sich für die Negativkontrolle ein pH-Wert von 8,23. Der pH-Wert unter alleiniger Gabe von Tamoxifen 10^{-5} mol/l war im Vergleich dazu mit einem Unterschied von 0,075 (pH=8,155) deutlich niedriger als unter Einwirkung des Petersilienwurzelextrakts.

Der pH-Wert der MCF-12a-Zelllinie erwies sich sowohl unter Zugabe der Kontrollparameter als auch für die Zugabe des Petersilienwurzelextrakts mit einem Unterschied von 0,01-0,055 als konstant und unterlag damit keiner relevanten Veränderung.

5. Diskussion

Die Pflanzenheilkunde nimmt auch in der Frauenheilkunde und insbesondere bei onkologischen Erkrankungen einen immer höheren Stellenwert ein. Dabei versteht sich die Phytotherapie als Bestandteil der wissenschaftlichen evidenzbasierten Medizin [103]. Deshalb sind wissenschaftliche Forschungen und insbesondere auch diese Arbeit von wichtiger grundlegender Bedeutung für das Fortschreiten neuer Therapieerkenntnisse.

Für diese Arbeit wurde ein Pflanzenextrakt, bestehend aus Petersilienwurzeln aus biologischem Anbau, hergestellt. Dieser Pflanzenextrakt wurde auf seine Inhaltsstoffe massenspektrometrisch untersucht und anschließend dessen Wirkung auf Brusttumorgewebe, im speziellen auf die benignen MCF-12a-Zellen und die malignen MCF-7-Zellen, analysiert. Der Einfluss des Pflanzenextrakts allein und in Kombination mit Tamoxifen auf beide Zelllinien wurde mit drei verschiedenen Testmethoden versucht zu objektivieren. Dafür ist der LDH-Zytotoxizitätstest, der BrdU-Proliferations-Test und der MTT-Zellviabilitätstest genutzt worden. Parallel wurden die Kontrollsubstanzen Tamoxifen und 17 β -Estradiol mitgetestet und in die Auswertung miteinbezogen. Des Weiteren erfolgte die Untersuchung der Zelllinien auf ihre Rezeptoreigenschaften. Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse reflektiert, diskutiert, mit anderen Literaturergebnissen verglichen und die Wertigkeit der Petersilienwurzel im Zusammenhang mit einer komplementären Medizin analysiert.

5.1 Der Pflanzenextrakt und seine Inhaltsstoffe

Die Herstellung des Pflanzenextrakts aus der Petersilienwurzel wurde mit Hilfe der Mikrowellenextraktion durchgeführt. Die allgemeine Grundlage solcher Extraktionsverfahren besteht zum einen im Lösen bestimmter Inhaltsstoffe durch Lösungsmittel und zum anderen um eine Konzentrierung der Inhaltsstoffe zu erreichen. In dieser Arbeit ist Ethanol als Lösungsmittel verwendet worden, welches sowohl hydrophile als auch hydrophobe Stoffe lösen kann. Bei den Inhaltsstoffen können diese u.a. in wirksamkeitsbestimmende Stoffe und in Stoffe, welche die Pflanze identifizieren können aufgegliedert werden [46]. Bei der Mikrowellenextraktion handelt es sich um ein besonders schonendes Extraktionsverfahren, welches die Molekülstrukturen innerhalb der Stoffe nicht angreift [84].

Es gibt bisher nur sehr wenige wissenschaftliche Arbeiten, welche eine Wirkung der Petersilienpflanze und im speziellen der Petersilienwurzel auf die Zellen von

Brusttumorgewebe hin untersucht haben. Im Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik Rostock gab es hierzu bereits eine vergleichende Arbeit. Für diese ist ebenfalls ein Pflanzenextrakt aus der Petersilienwurzel hergestellt worden. Jedoch erfolgte für die Extraktion der Inhaltsstoffe das Extraktionsverfahren nach Luyengi [78].

Nach massenspektrometrischer Analyse bildeten in dieser Arbeit Kohlenhydrate, Lipide, Phenole, Cumarine und isoprenoide Verbindungen die am häufigsten vertretenen Stoffklassen innerhalb des Pflanzenextrakts. Das angewandte Verfahren der Pyrolyse-Feldionisationsmassenspektrometrie ist nur in der Lage einen Überblick über mögliche Inhaltsstoffe zu geben. Für genauere Stoffbestimmungen wären aufwendigere und feinere chromatographische Messmethoden notwendig (HPLC) [47].

In der Einleitung konnte bereits ein Einblick auf die Bedeutsamkeit der Phytoöstrogene gewährt werden. In dem hergestellten Petersilienwurzelextrakt ließ sich ein kleiner Anteil an Phytoöstrogenen in Form der Stoffklasse der Isoflavonoide nachweisen. Vermutlich handelte es sich dabei um Apigenin. Nabavi et al. resümierten bereits, dass Apigenin Teil wissenschaftlicher Arbeiten im Zusammenhang mit dem Mammakarzinom gewesen ist. Dort zeigt es komplexe Wirkungen und auch widersprüchliche Ergebnisse. Apigenin besitzt antioxidative, antientzündliche und antikarzinogene Eigenschaften. In Bezug auf das Brustkrebsgewebe ist es in der Lage Apoptose über eine Aktivierung von p53 zu induzieren. Zudem kann Apigenin die Aromatase für die Östrogensynthese hemmen und hat bereits eine synergistische Aktivität in Kombination mit Medikamenten gegen Brustkrebs bewiesen. Dafür entscheidend sind komplexe Einflüsse auf verschiedene Signalwege, wie z. B. die Hemmung des MAPK-Weges, die Herunterregulation von NF- κ B, PI3K/AKT und VEGF, sowie die Beteiligung an einer verminderten Expression von Her2 [104]. Diese Komplexität erklärt, dass die Apigeninwirkung sowohl rezeptorabhängig über ER- α und ER- β erfolgen kann als auch rezeptorunabhängig. Des Weiteren lassen sich wie bei anderen Isoflavonoiden dosisabhängige Effekte nachweisen. Apigenin wirkt in niedrigen Dosierungen proöstrogen, indem es vorrangig an ER- β bindet, während das endogene Östrogen ER- α ungehindert binden kann. In höheren Dosierungen ist es in der Lage auch die ER- α zu besetzen und damit für endogenes Östrogen zu blockieren [103; 86]. In der vorliegenden Arbeit ließen sich durch den reinen Pflanzenextrakt keine antiproliferativen oder proapoptotischen Effekte auf die MCF-7- und MCF-12a-Zellen nachweisen. Demgegenüber zeigten sich interessanterweise synergistische Wirkungen in der Kombination aus dem Pflanzenextrakt und Tamoxifen. Welche Bedeutung hierbei die genauen Dosierungen der im Extrakt vorhanden

Phytoöstrogene besitzen bleibt offen und müsste mit Hilfe weiterer Arbeiten und messmethodisch genauerer Stoffklassifizierungen geklärt werden.

Als weitere Phytoöstrogene konnten neben den Isoflavonoiden die Lignane ausgemacht werden. Eine genaue Stoffzuordnung war für diese jedoch nicht möglich. Für die Lignane ließ sich ebenfalls eine konzentrationsabhängige Wirkung nachweisen. Während niedrige Lignandosierungen eher mit einer proliferationsfördernden Wirkung einhergingen, zeigten höhere einen proliferationshemmenden Effekt [72].

In der Vergleichsarbeit von Schröder et al. ließen sich in dem dort hergestellten Petersilienwurzelextrakt ebenfalls Phytoöstrogene in Form von Lignanen, Isoflavonoiden, Flavonoiden, Monolignolen, Lignindimeren und sonstige Phenolen nachweisen. Dort machten sie insgesamt einen Anteil von etwa 17 % aus [78]. In dem für diese Arbeit angefertigten Petersilienwurzelextrakt machten die Gruppe der Phytoöstrogene, bestehend u.a. aus Isoflavonoiden, Lignanen und sonstigen Phenolen, zusammengefasst einen Anteil von ca. 24 % aus. In der Studie um Yoshikawa et al. wurde für ein Extrakt aus den oberirdischen Anteilen der Petersilienpflanze eine feinere chromatographische Auftrennung der Inhaltsstoffe durchgeführt. Darunter waren die Flavone 6"-Acetylapiin, Apigenin, Apiin, Diosmetin und Kampferöl nachzuweisen. Die proöstrogenen Eigenschaften dieser genannten Stoffe ähneln denen der Isoflavonoide Genistein und Daidzein [79]. Apigenin konnte, wie bereits erwähnt, ebenfalls in dem hier untersuchten Petersilienwurzelextrakt nachgewiesen werden.

Neben den Phytoöstrogenen ließen sich weitere Stoffe nachweisen, welche antikarzinogene Effekte hormonunabhängig ausüben können.

Unter den isolierten Sterolen im Petersilienwurzelextrakt befindet sich vermutlich α -Tocopherol. Dieses gehört zu den Vitamin E-Derivaten. Die zwei Hauptgruppen werden repräsentiert durch Tocopherole und Tocotrienole. Für beide wurde nachgewiesen, dass sie wachstumshemmende und apoptosefördernde Effekte auf Brustkrebsgewebe ausüben können. Wobei die genauen molekularen Mechanismen bisher unbekannt bleiben [105]. In einer Studie von Wang et al. konnte gezeigt werden, dass eine Variante der Tocopherole (α -Tocopherol succinat) ebenfalls den tumorproliferationsfördernden NF- κ B-Signalweg in seiner Aktivität beeinflussen kann. Dies geschieht über eine Hemmung in der

Transkriptionsaktivität von NF- κ B. Das Vitamin α -Tocopherol hat vor allem in Bezug auf Her2 positive Tumorzellen proapoptotische Eigenschaften gezeigt [106]. Des Weiteren ließ sich im Gegensatz dazu nachweisen, dass α -Tocopherol-bindende Proteine häufiger auf benignen ER positiven Mammatumorzellen exprimiert werden, während sie auf malignen ER positiven Zellen vermindert vorhanden sind und bei Triple negativem Brustkrebsgewebe (ER, PR und Her2 negativ) nicht nachweisbar sind. Inwieweit die Gabe von Vitamin E-Präparaten Einfluss auf die Therapie und Prävention von Brustkrebs haben könnte, lässt damit noch Raum für weitere Nachforschungen [107].

Eine genaue Aussage inwiefern das enthaltene Tocopherol im hergestellten Pflanzenextrakt Einfluss auf die MCF-7- und MCF-12a- Zellen gezeigt haben könnte, bleibt offen, da sich bei den Testserien mit dem reinen Pflanzenextrakt bei beiden Zelllinien kein nachweisbar signifikant hemmender Einfluss auf die Zellproliferation, Zytotoxizität und Zellviabilität zeigte. Eventuell besteht hier auch eine gewisse Dosisabhängigkeit [108].

Weiterhin sehr interessant ist eine Studie von Akl et al., in der die synergistischen Effekte des Lignans Sesamin mit dem Vitamin E-Derivat γ -Tocotrienol untersucht wurden. Hierbei ergab sich, dass die kombinierte Gabe bei MCF-7-Zellen eine zytostatische Wirkung hervorrief, indem es einen G1-Arrest innerhalb des Zellzyklus induzierte. [109]. Auch in dem Petersilienwurzelextrakt befand sich eine Kombination aus Lignanen und Vitamin E-Derivaten. In der Vergleichsarbeit um Schröder et al. konnten ebenfalls Sterole aus dem Pflanzenextrakt isoliert werden und damit könnte vermutlich auch entsprechend α -Tocopherol enthalten gewesen sein [78]. Wie entscheidend das Verhältnis und die Konzentrationen der jeweiligen Stoffklassen sind, um eine zytostatische Wirkung zu erzielen, bleiben Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Zu den natürlich vorkommenden Cumarinen zählen auch die im Pflanzenextrakt enthaltenden und für die Petersilienwurzel typischen Furanocumarine Isopimpinellin und Bergapten. Diese gehören zu einer großen Anzahl von sekundären pflanzlichen Stoffen, deren antikarzinogene Wirkung bisher noch wenig untersucht wurde. Antikarzinogene Effekte konnten in der Studie von Prince et al. bereits in vitro nachgewiesen werden. Insbesondere für Isopimpinellin wurde diesbezüglich eine Wirkung auf MCF-7-Zellen gezeigt [110]. Eine weitere Arbeit von Panno et al. bezieht sich auf Bergapten und dessen proapoptotische und antiproliferative Wirkung auf in vitro Brustkrebszellen. Aus dieser resultierte, dass Bergapten in der Lage war infolge eines komplexen Mechanismus die ER- α -Dichte zu minimieren, welcher nicht in den Transkriptionsvorgang des ER- α direkt eingreift. Dieser Effekt konnte zudem auch auf

tamoxifenresistente Tumorzellen übertragen werden. Bei mehr als zweidrittel aller Mammakarzinome zeigt sich eine solche Überexpression an ER- α und gewährleistet durch Bindung von endogenen Östrogenen eine enorme Tumorpheriferation [111].

Die Stoffgruppe der Lipide nahm einen großen Anteil in der Stoffzusammensetzung des Petersilienwurzelextrakts ein. Die Publikation von Kliewer et al. resümierte, dass verschiedene freie Fettsäuren an sogenannte Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPAR) binden und diese dadurch hemmen können. Im menschlichen Organismus existieren drei Formen PPAR α , β und γ . PPAR's sind an der β -Oxidation in Peroxisomen beteiligt [112]. Vor allem der PPAR α und PPAR γ sind bisher in Zusammenhang mit dem Mammakarzinom untersucht worden. Nach Ligandenbindung funktionieren sie als Transkriptionsfaktoren und sind u.a. in der Lage über den NF- κ B Signalweg die Zellproliferation zu minimieren und die Apoptose zu induzieren [113, 114]. Hierüber kann dementsprechend ebenfalls eine anti-karzinogene Wirkung erfolgen.

Auf der Suche nach neuen Therapiealternativen, welche nicht allein auf hormoneller Ebene Mammakarzinomzellen beeinflussen, bieten die in der Petersilienwurzel enthaltenen Stoffklassen, wie die Vitamin E-Derivate, die Furanocumarine, aber auch das Isoflavonoid Apigenin somit weitere Grundlagen für interessante Forschungsansätze.

5.2 Immunhistochemische Untersuchung der Zelllinien

Im Ergebnisteil wurde bereits kurz erwähnt, dass die immunhistochemische Untersuchung des Brustkrebsgewebes auf den jeweiligen Hormonrezeptorstatus eine große klinische Bedeutung besitzt. Diese ist Grundlage dafür inwiefern eine hormonelle Therapie beim Patienten angewendet wird. Zudem wird der Hormonrezeptorstatus als prognostischer Faktor des Erkrankungsverlaufes gewertet [29].

Badowska-Kozakiewicz et al. beschrieben dabei die Abhängigkeit des Ansprechens einer hormonellen Therapie mit dem vorhandenen Hormonrezeptorstatus, d.h. je höher die Rezeptordichte, desto wahrscheinlicher ist eine bessere Ansprechrate. Für Patienten mit dem Status ER+/PR+ konnte eine Wirkung der hormonellen Therapie von über 70 % nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu beträgt diese 40 % bei ER+/ER-, 32 % bei ER-/PR+ und nur noch 10 % bei einem vollständig negativen Rezeptorstatus von ER-/PR-. Des

Weiteren besteht die prognostische Bedeutung darin, dass die Expression von ER und PR mit einem weniger aggressiven Wachstum einhergeht. Studienergebnisse bestätigten zudem, dass bei älteren und postmenopausalen Patienten die Expression von ER häufiger zu finden ist und dass die Expression im Verlauf der Erkrankung nicht konstant ist [115]. In der Klinik wird für die immunhistochemische Auswertung des Hormonrezeptorstatus der immunreaktive Score nach Remmele und Stegner verwendet. Hierbei wird mittels der Farbeintensität und dem prozentualen Anteil der gefärbten Zellen der Status bestimmt. Maximal kann ein Score von 12 Punkten erreicht werden. Ein Score von 0-2 findet sich nur bei 10 % der Brustkrebspatienten und definiert einen negativen Rezeptorstatus [11].

Für diese Arbeit wurde der Score in dieser Form nicht angewandt. Vielmehr ging es darum nachzuweisen, dass es sich sowohl bei den MCF-7- und bei den MCF-12a-Zellen um ER- α , ER- β und PR positive Tumorzellen handelt. Auf beiden Zelllinien war der ER- α auf Grund der höchsten Farbintensität am häufigsten exprimiert, gefolgt vom ER- β . Die Progesteronrezeptoren waren am geringsten ausgeprägt. Für die MCF-12a-Zellen zeigte sich im Verhältnis zur Farbreaktion der MCF-7-Zellen eine blässere Farbreaktion, welches mit der benignen Grundstruktur der Zelllinie zusammenhängen kann. Die Versuchsreihen und die Auswertung beziehen sich durch Verwendung dieser Zelllinien allein auf eine hormonrezeptorpositive Expression.

In der Arbeit von Schröder et al. wurden beide verwendeten Zelllinien ebenso hinsichtlich ihrer Rezeptorexpression untersucht. Sowohl bei der MCF-7- als auch bei der MCF-12a-Zelllinie zeigte der ER- α die stärkste Expression. Der ER- β und PR waren auch dort bei beiden Zelllinien schwächer exprimiert [78].

5.3 Wirkung des reinen Pflanzenextrakts

Zur Untersuchung der Auswirkungen des Petersilienwurzelextrakts auf die MCF-7- und MCF-12a-Zellen wurden Testmethoden genutzt, welche Auskunft über das Proliferations-, Viabilitäts- und das Metabolisierungsverhalten der Zellkulturen, sowie über die Zytotoxizität des Extrakts geben konnten.

Im LDH-Test ließ sich in dieser Arbeit keine relevante zytotoxische Wirkung auf die MCF-7-Zelllinie nachweisen. Lediglich in der höchsten Konzentrationsstufe des Pflanzenextrakts von 500 $\mu\text{g/ml}$ zeigte sich eine Erhöhung der zytotoxischen Wirkung um 13 %. Es erfolgte ein signifikant vermehrtes Absterben der Zellkultur unter der höchsten Extraktkonzentration im

Vergleich zu der Zellkultur unter Östrogeneinfluss. Einen ähnlichen geringen Einfluss auf die Zytotoxizität zeigte der Pflanzenextrakt auf die kultivierten MCF-12a-Zellen. Auch bei dieser Zelllinie resultierte nur für die höchste Konzentration ein vermehrtes Absterben der Zellen in der Kultur von ebenfalls unwesentlichen 13 %. Eine LD50 wurde in beiden Zelllinien nicht erreicht.

In der ebenfalls im Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik Rostock angefertigten Arbeit von Schröder et al., welche das Verhalten der MCF-7- und MCF-12a-Zelllinien unter Einwirkung eines Petersilienwurzelextrakts untersuchte, resultierte bezogen auf die Zytotoxizität eine Steigerung dieser für die MCF-7- und die MCF-12a-Zellen um bis zu 80 % in der höchsten Pflanzenextraktkonzentration (500 µg/ml) und erreichte damit fast die Zytotoxizität von Tamoxifen [78]. Festzuhalten bleibt hierbei, dass sich die verwendeten Extraktionsverfahren deutlich voneinander unterscheiden und dass davon ausgegangen werden muss, dass ein anderes Stoffverhältnis vorlag. Für die niedrigeren Konzentrationsstufen ergab sich auch dort keine signifikante Zytotoxizität [78]. In einer weiteren Arbeit um Tang et al., für die zur Extrakterstellung ausschließlich das Blatt- und Stängelwerk der Petersilienpflanze genutzt wurde, kam es zu einem gesteigerten Zugrundegehen der Zellen der MCF-7-Zelllinie. Dabei zeigte sich in Untersuchungen, dass es währenddessen zu keiner Zerstörung der Zell-DNA kam. Vermutet wurden Mechanismen, welche die Apoptose nicht über Caspase 3 einleiteten [80]. Caspase 3 zählt zu den Hauptenzymen in der Apoptoseeinleitung. Beschrieben wurde bereits ein Defizit dieser Caspase 3 für die MCF-7-Zelllinie, welches durch eine Mutation im CASP-3-Gen ausgelöst wurde [116]. In der Arbeit von Zheng et al. wurde beschrieben, dass bestimmte Isoflavonoide gezeigt haben, dass sie bei MCF-7-Zellen demgegenüber das Aufkommen der Caspase-6 erhöhen können. Des Weiteren wird vermutet, dass Isoflavonoide durch Bindung an den ER- α in der Lage sind Rezeptorsignale zu beeinflussen bzw. zu unterdrücken und dadurch den Zelltod hervorrufen können. Es wird zudem angenommen, dass eine Erhöhung bzw. Stimulierung von ER- β proapoptotische Wirkungen an den MCF-7-Zellen hervorrufen [117]. Zu der letztgenannten Hypothese gibt es widersprüchliche Ansichten. In einem Review von Johnson et al. wurde beschrieben, dass ER- β eher im Gegenteil dazu in der Lage ist die Signalwege über ER- α aufrechtzuerhalten oder gar zu verstärken [118].

Welche genauen Inhaltsstoffe des Pflanzenextrakts der Petersilienwurzel und Mechanismen letztendlich die Apoptose der MCF-7- und ebenso der MCF-12a-Zellen induzieren können und welche Konzentrationen dafür notwendig wären, müsste in zukünftigen Untersuchungen noch genauer spezifiziert werden.

Auf die Proliferation, welche mit Hilfe des BrdU-Tests objektiviert wurde, konnte die Zugabe des Pflanzenextrakts sowohl auf die MCF-7- als auch auf die MCF-12a-Zellen keinen relevanten Effekt ausüben. Für die höchsten Extraktkonzentrationen von 500 und 100 µg/ml ergab sich für die MCF-12a-Zellen ein um 15 % höheres Wachstumsverhalten. Eine Herabsetzung der Proliferation geschah unwesentlich um maximal 16 % in der MCF-7-Zelllinie unter der Konzentration von 0,1 µg/ml. In der bereits beschriebenen Vergleichsarbeit konnte für die höchsten Extraktkonzentrationen eine Wachstumshemmung der MCF-7-Zellen von bis 80 % nachgewiesen werden. Auch für die MCF-12a-Zellen resultierte eine proliferationshemmender Effekt von bis zu 60 % unter Extrakteinwirkung [78]. Inwieweit der Anteil der Phytoöstrogene und ein Unterschied der Stoffkonzentrationen in den verschiedenen Petersilienwurzelextrakten zur Erlangung der deutlich verschiedenen Ergebnisse führte, bleibt offen und somit Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Über welche Mechanismen eine Antiproliferation von Mammakarzinomzellen erreicht werden könnte und kann, ist sehr verschieden und macht die Forschung dahingehend sehr schwierig. Zum einen gibt es östrogenabhängige Signalwege, aber zum anderen auch östrogenunabhängige Mechanismen worüber Phytoöstrogene, aber auch andere in dieser Arbeit genannte Stoffklassen eine antiproliferative Wirkung ausüben könnten [71].

Interessanterweise führte die Einwirkung des Pflanzenextrakts in den beiden höchsten Konzentrationsstufen (500; 100 µg/ml) bei den MCF-7-Zellen zu einer signifikant gesteigerten Zellviabilität im MTT-Test. Schon in der Vergleichsarbeit ließ sich eine viabilitätssteigernde Wirkung für die Konzentrationen 100 und 50 µg/ml erkennen [78]. Entscheidend und von großem Interesse wäre die Frage, ob sich eventuell die höchsten Konzentrationsstufen dieser Arbeit mit den beiden der nächstniedrigeren Extraktstufen der Vergleichsarbeit in ihrer quantitativen Zusammensetzung ähneln. Im Vergleich zu Östrogen stellte sich für den hiesigen Pflanzenextrakt in den zwei niedrigsten Konzentrierungen eine signifikante Verringerung der Stoffwechselaktivität der MCF-7-Zellen dar.

Für die MCF-12a-Zellen resultierte keine relevante Beeinflussung der Zellviabilität. Erwähnenswert ist auch hier die verminderte Zellviabilität der drei niedrigsten Pflanzenextraktkonzentrationen im Gegensatz zu den kultivierten Zellen, welche unter Östrogeneinfluss standen. Aufschlussreich wäre, warum die niedrigeren Konzentrationsstufen mit einem vermutlich geringeren Gehalt an Phytoöstrogenen die Zellviabilität im Vergleich zu

Östrogen deutlicher verringern als die höheren Konzentrationsstufen. Beziehungsweise stellt sich die Frage, warum in den beiden höchsten Pflanzenextraktstufen die Stoffwechselaktivität überdies für die MCF-7-Zellen gesteigert wurde.

Eine etwas ältere Arbeit aus dem Jahr 2000 von Yoshikawa et al. untersuchte die Einwirkung der Petersilienpflanze auf MCF-7-Zellen und nutzte dafür die oberirdischen Pflanzenanteile für die Extrakterstellung. Darunter ergab sich eine gesteigerte Proliferation und damit vermutlich ein proöstrogener Effekt [79]. Hier ließe sich wiederum diskutieren inwieweit die Dosierungen bestimmter Stoffe Einfluss haben könnten. In den Reviews von Adlerkreutz und Pilsakova bestätigte sich zudem, dass Phytoöstrogene in hohen Dosierungen antiöstrogene und für niedrigere Dosierungen proöstrogene Eigenschaften besitzen [70]. Zumindest in dieser Arbeit bezogen auf die Zellviabilität konnte diese Erkenntnis nicht bestätigt werden.

5.4 Wirkung des Pflanzenextrakts in Kombination mit Tamoxifen

Phytoöstrogene werden auch als natürliche selektive Estrogenrezeptormodulatoren (SERM's) bezeichnet. Während Tamoxifen als synthetisch hergestellter SERM an beiden ER's mit einer ähnlichen Affinität bindet, binden die Phytoöstrogene vorrangig am ER- β . Beide besitzen eine agonistische und antagonistische Wirkung [119].

Für die Auswirkung eines Pflanzenextrakts aus der Petersilienwurzel in kombinierter Gabe mit Tamoxifen gibt es bisher noch keine vergleichenden Arbeiten. Wissenschaftliche Arbeiten, welche sich auf das Zusammenspiel von Tamoxifen und Phytoöstrogenen aus anderen Pflanzen konzentrieren sind dagegen öfter vertreten und lassen möglicherweise übertragbare Hypothesen zu.

Phytoöstrogene sind wie auch das Tamoxifen in der Lage, den G1/S-Übergang der Zelle während der Zellteilung zu unterbinden und damit die Proliferation von MCF-7-Zellen zu hemmen [120]. Unter niedrigeren Dosen des Tamoxifens in Kombination mit Phytoöstrogenen der Sojapflanze (wie z.B. Genistein) zeigten sich in der Arbeit von Mai et al. synergistische Effekte auf das Wachstum von MCF-7-Zellen. Vermutet wurde, dass es sich um unterschiedliche molekulare Prozesse handelt, welche zusammen die Proliferation hemmen und mitunter auch eine Apoptose einleiten können. Auch konnte herausgefunden werden, dass unter der kombinierten Gabe eine Herabsenkung von zirkulierendem Östrogen stattfand. Zudem kam es zu einer synergistischen Herunterregulation des Wachstumsfaktors EGFR, welcher auch an der Entstehung von Brustkrebs beteiligt ist [120]. In einer weiteren

Studie von Mai et al. zeigte sich eine Herabsetzung des EGFR und des Her2 in Mammakarzinomzellen unter der Kombination von Genistein und Tamoxifen. Vermutet wurde eine synergistische Hemmung einer Tyrosinkinase. Zusätzlich konnte eine verstärkte Apoptoseaktivierung festgestellt werden, indem Genistein und Tamoxifen zusammen in der Lage waren die Survivinbildung, einem apoptosehemmenden Protein in Brustkrebszellen, wesentlich zu verringern [121].

Für die vorliegende Arbeit wurden für die Untersuchung synergistischer Effekte mit Tamoxifen drei verschiedene Petersilienwurzelextraktkonzentrationen (100; 50 und 1 µg/ml) verwendet. Im LDH-Test konnte keine verstärkte Zytotoxizität unter dem Pflanzenextrakt und Tamoxifen für die MCF-7- und MCF-12a-Zellen gemessen werden. Es wurde in jedem Fall eine fast 100 prozentige Zytotoxizität erreicht.

Interessant war in dieser Arbeit der Einfluss auf das Wachstumsverhalten der beiden Zelllinien bei der gemeinsamen Gabe des Pflanzenextrakts und Tamoxifen. Im BrdU-Test zeigte sich für die MCF-7-Zelllinien unter der höchsten Pflanzenextraktkonzentration und Tamoxifen eine Proliferationssteigerung um fast 70 % im Vergleich zur alleinigen Gabe von Tamoxifen. Bei den nächstniedrigeren Extraktkonzentrationen glich sich die Proliferation derer von Tamoxifen allein an. Im Gegensatz dazu zeigten sich bei der MCF-12a-Zelllinie für den Pflanzenextrakt in Kombination mit Tamoxifen deutliche synergistische Effekte. Während allein unter Tamoxifen in niedriger Dosierung noch eine Proliferation von 78 % auftrat, resultierte für alle Konzentrationsstufen des Pflanzenextrakts eine signifikant stärkere proliferationshemmende Wirkung in Kombination mit Tamoxifen. Für die Konzentrationen von 100 und 50 µg/ml war jeweils ein Proliferationsunterschied von fast 30 % gegenüber der alleinigen Tamoxifeneinwirkung zu sehen. Für die niedrigste Konzentration von 1 µg/ml ergab sich die stärkste Proliferationshemmung von 40 %.

In einer Studie von Liu et al. wurde die gemeinsame Gabe von dem Isoflavonoid Genistein und Tamoxifen hinsichtlich verschiedener Genisteindosierungen untersucht. Dort wurde beschrieben, dass unter einer niedrigen Dosierung von Genistein zusammen mit Tamoxifen eine Proliferationsförderung stattgefunden hat, während hohe Dosierungen von Genistein mit Tamoxifen eine synergistische Wachstumshemmung zeigten. Vermutet wurden hier eine mitogenaktivierte Proteinkinaseaktivierung und anderen multifaktoriellen Mechanismen [122]. Eine Arbeit von Dünow aus dem Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik Rostock untersuchte die gemeinsame Wirkung von Tamoxifen und einem Leinwurzelextrakt. Auch

hier zeigten vor allem die hohen Konzentrationen einen proliferationshemmenden Effekt auf die MCF-7-Zellen [123].

Für die hier vorliegende Arbeit, ist diese Erkenntnis nicht übertragbar, da sich bei den höheren Konzentrationen der gemeinsamen Gabe von Tamoxifen und dem Pflanzenextrakt überdies eine proliferationssteigernde Wirkung bei der MCF-7-Zelllinie gegenüber der alleinigen Gabe von Tamoxifen ergab. Es fand damit eine Blockierung der Tamoxifenwirkung statt. Welchen Einfluss Phytoöstrogene, wie im speziellen Isoflavonoide, welche auch im hiesigen Extrakt nachweisbar waren, oder andere Inhaltsstoffe auf das Zellwachstum ausüben, wäre Grundlage weiterer Forschungsarbeiten.

Für die MCF-12a-Zelllinie gibt es kaum wissenschaftliche Arbeiten im Zusammenhang mit Tamoxifen und Phytoöstrogenen. Bekannt ist, dass Frauen mit einer benignen Brustkrankung meist ein höheres Risiko haben ein Mammkarzinom zu entwickeln. Cuzick et al. beschrieben präventive Effekte von Tamoxifen und damit eine Verringerung der Brustkrebsentwicklung [124].

In dieser Arbeit war ein deutlicher Unterschied der Tamoxifenwirkung in der niedrigeren Dosierung zwischen der MCF-7- und der MCF-12a-Zelllinie erkennbar. Die Proliferation war bei der MCF-12a-Zelllinie um 50 % höher als bei den MCF-7-Zellen. Der Pflanzenextrakt war hier zusammen mit Tamoxifen in der Lage synergistisch die Proliferation der MCF-12a-Zellen signifikant zu senken. Dieser Effekt verstärkte sich mit abnehmender Konzentration des Extrakts. Bisher gibt es nur wenige Studien, die sich mit gutartigen Mammaveränderungen beschäftigten. Eine Therapie mit Tamoxifen ist hierbei nicht generell empfohlen, da das Risiko unter Tamoxifen eine maligne Tumorerkrankung (z.B. Endometriumkarzinom) zu entwickeln höher wäre als der Nutzen gegenüber einer Therapie bei gutartigen Brusttumoren [125].

Der MTT-Test bestätigte für die MCF-7-Zelllinie die Ergebnisse aus dem BrdU-Test. Für die Zellviabilität resultierte eine signifikante Zunahme von fast 25 % unter der kombinierten Gabe des Pflanzenextrakts in der höchsten Konzentration (100 µg/l) mit Tamoxifen als unter alleiniger Tamoxifengabe. Es kam somit gleichermaßen zu einem Proliferationsanstieg und einer Zunahme der Stoffwechselaktivität. Interessant war das Resultat der niedrigsten Konzentrationsstufe (1 µg/ml) in Kombination mit Tamoxifen. Hierunter ergab sich gegenüber der höchsten Konzentrationsstufe eine signifikante Abnahme der Zellviabilität von 25 % im Vergleich zur alleinigen Gabe von Tamoxifen.

Anhand dieses Ergebnisses lässt sich vermuten, dass hohe Konzentrationen des Petersilienwurzelextrakts in der Lage sind bei der MCF-7-Zelllinie den hemmenden Einfluss von Tamoxifen zu blockieren, während niedrige Konzentrationen entgegengesetzt synergistisch eine viabilitätshemmende Wirkung ausüben. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um multifaktorielle Effekte, welche nicht allein der phytoöstrogenen Wirkung zugeschrieben werden können. Die Ergebnisse des MTT-Tests widersprechen somit der Theorie der oben genannten Arbeiten. Hilfreich wären weitere Studien, welche feinere Konzentrationsstufen des Petersilienwurzelextrakts berücksichtigen bzw. die Wirkung der einzelnen Stoffe (z.B. Apigenin, Vitamin E-Derivate, Isopimpinellin) im Zusammenspiel mit Tamoxifen untersuchen würden.

Konträr zu den Ergebnissen des BrdU-Tests für die MCF-12a-Zelllinie stehen die des MTT-Tests. In dieser Arbeit hatte Tamoxifen in der niedrigeren Dosierung keinen hemmenden Einfluss auf die Stoffwechselleistung der Zellen. Hierbei wurde darüber hinaus eine hundertprozentige Zellviabilität unter alleiniger Tamoxifengabe gemessen. Auch unter kombinierter Gabe mit dem Pflanzenextrakt zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der Stoffwechselaktivität. Bereits in der Vergleichsarbeit konnten solche Unterschiede zwischen den Resultaten des BrdU-Tests und des MTT-Tests für die MCF-12a-Zelllinie nachgewiesen werden. Dort zeigten die Zellen ebenfalls eine verminderte Proliferation, aber eine normale bis gesteigerte Stoffwechselaktivität. Als Grund für dieses Ergebnis wurden sogenannte Sekundäreffekte vermutet [78]. Auch in der Studie von Gee et al. wurde angenommen, dass Tumorzellen in der Lage sind flexibel über die Änderung von Signalwegen ihre Stoffwechsel und Transkriptionsleistungen aufrechtzuerhalten. Eine Hemmung, z.B. des EGFR in Mammakarzinomen über Antiöstrogene, wurde durch Neurekrutierung und Umstellung von molekularen Mechanismen innerhalb der Brustkrebszellen kompensiert und konnte somit umgangen werden [126]. Mutmaßlich könnten solche kompensatorischen Effekte die Ursache dafür sein, dass die in der Proliferation gehemmten MCF-12a-Zellen trotz dessen fähig sind ihre Stoffwechselleistung aufrechtzuerhalten [78]. Beim Übergang von benignem zu malignem Gewebe kommt es auch zu einer zunehmenden Veränderung innerhalb des Stoffwechsels der Zellen. Auf Grund einer diffusen Vaskularisation von Tumorgewebe ergibt sich ein Sauerstoffmangel im Gewebe und daraus resultiert eine notwendige Umstellung des Tumorstoffwechsels von einer aeroben hin zu einer anaeroben Energiegewinnung [127]. Wenn die benignen Zellen also in der Lage sind noch über andere Stoffwechselmechanismen zu verfügen, könnten sie eventuell somit hemmende Einflüsse von Stoffen besser kompensieren als maligne Tumore.

5.5 Kontrollparameter Tamoxifen und 17 β -Estradiol

Frauen mit einem hohen Plasmaspiegel an freiem 17 β -Estradiol besitzen ein wesentlich höheres Risiko an Brustkrebs zu erkranken. Durch die Bindung von 17 β -Estradiol an die Estrogenrezeptoren kann es zu einer gesteigerten Zellproliferation von Tumorzellen kommen. Des Weiteren können genotoxische Metabolite, die durch den oxidativen Abbau des 17 β -Estradiols entstehen, estrogenrezeptorunabhängig DNA-Schäden triggern, welche sich potenzieren und einen Karzinogeneseprozess auslösen können [128]. In dieser Arbeit wurde bei allen Testmethoden 17 β -Estradiol als Positivkontrolle parallel getestet. Im LDH-Test ergaben sich keine zytotoxischen Effekte durch 17 β -Estradiol für die MCF-7- und MCF-12a-Zelllinien. Im BrdU-Test zeigte vor allem die MCF-12a-Zelllinie eine gesteigerte Zellproliferation. Die Stoffwechselaktivität war wiederum unter beiden Zelllinien unter der Zugabe von 17 β -Estradiol erhöht. In Tumorgewebe, welches sowohl ER- α als auch ER- β exprimiert, wurden von Higa et al. Interaktionen zwischen beiden Rezeptoren beschrieben. ER- α werden vor allem prokarzinogene Auswirkungen zugeschrieben, während über ER- β antitumorale Effekte ausgeübt werden können. Über komplexe Mechanismen ist ER- β in der Lage die Auswirkungen über den ER- α zu antagonisieren [129]. Für beide vorliegenden Zelllinien wurde eine Koexpression der ER immunhistochemisch nachgewiesen. Entscheidend für die Auswirkungen auf das proliferative und metabolische Verhalten der Zellen wäre somit das Verhältnis beider Rezeptoren zueinander. Die beschriebenen Ergebnisse der MCF-12a-Zelllinie im BrdU- und MTT-Test könnten somit eventuell mit einem Überwiegen der ER- α im Vergleich zu ER- β zusammenhängen. Zwar sind auch bei der MCF-7-Zelllinie ER- α stärker exprimiert, aber der Unterschied war marginal und lässt vermuten, dass hier der unterdrückende Einfluss des ER- β auf den ER- α in der Lage war proliferierende Effekte zu hemmen.

Tamoxifen wurde als SERM in dieser Arbeit als ein weiterer Kontrollparameter genutzt. Die Eigenschaft von Tamoxifen besteht in seiner agonistischen und antagonistischen Wirkung am ER- α und seiner reinen antagonistischen Wirkung am ER- β . Zudem spielen Koregulatoren während der Transkription eine Rolle, inwiefern eine agonistische oder antagonistische Wirkung des Tamoxifens zum Ausdruck kommt [130]. Bei den Testmethoden konnte unter Tamoxifen 10^{-4} mol/l ein sowohl zytotoxischer, als auch proliferations- und

wachstumshemmender Einfluss auf die MCF-7- und MCF-12a-Zelllinien bestätigt werden. Die Tamoxifenkonzentration von 10^{-5} mol/l wirkte sich ebenfalls enorm zytotoxisch auf beide Zelllinien aus. Jedoch war der inhibitorische Effekt auf die Proliferation und die Zellviabilität nicht annähernd so stark ausgeprägt. Für die MCF-12a-Zellen war überdies fast keine Hemmung in der Proliferation und Zellviabilität feststellbar. Erklärt werden könnte dieses Resultat mit der in der Einleitung bereits beschriebenen Dosisabhängigkeit von Tamoxifen [41].

5.6. Einfluss des Pflanzenextrakts auf den Zellmetabolismus

Die Energiegewinnung von Tumorzellen wird mit dem sogenannten erweiterten Warburg-Effekt beschrieben. Bei dieser Hypothese wird davon ausgegangen, dass die Energiegewinnung hauptsächlich durch die aerobe Glykolyse erfolgt und im geringeren Ausmaß durch die oxidative Phosphorylierung [131].

Vermutet wird u.a., dass dieser Effekt und damit die metabolische Autonomie darauf beruht, welche Nährstoffe den Tumorzellen zur Verfügung stehen. Dabei beruht der aerobe Stoffwechsel hauptsächlich auf Glukose und Glutamin [132]. Auch beziehen sich Annahmen darauf, dass Östrogen eine Rolle bei dem Wechsel des Metabolismusschwerpunktes in Tumorzellen über eine Hochregulation von Mechanismen spielt, welche am Glukosestoffwechsel beteiligt sind [133].

Die MCF-7-Zellen dieser Arbeit hatten einen gesteigerten Glukoseumsatz. Unter Einwirkung der höchsten Konzentration ($500\mu\text{g/ml}$) des Petersilienwurzelextrakts zeigte sich eine Abnahme der Glukosekonzentration um $3,3\text{ mmol/l}$ und für die nächstfolgende Konzentration ($100\mu\text{g/ml}$) von $1,7\text{ mmol/l}$. Auch bei den weiteren Konzentrationsstufen ließ sich eine Verringerung des Glukosegehaltes beobachten ($50\mu\text{g/ml} \rightarrow 0,9\text{ mmol/l}$; $10\mu\text{g/ml} \rightarrow 1,6\text{ mmol/l}$; $1\mu\text{g/ml} \rightarrow 1,2\text{ mmol/l}$; $0,1\mu\text{g/ml} \rightarrow 1,7\text{ mmol/l}$ und $0,01\mu\text{g/ml} \rightarrow 1,0\text{ mmol/l}$). Unter Tamoxifen 10^{-4} mol/l ergab sich eine Erhöhung des Glukoseumsatzes, während unter Tamoxifen 10^{-5} mol/l eine Verringerung stattfand. Bei Betrachtung der Ergebnisse der mit der Kombination aus dem Petersilienwurzelextrakt und Tamoxifen 10^{-5} mol/l ausgesetzten MCF-7-Zellen zeigte für die mittlere Konzentrationsstufe ($50\mu\text{g/ml}$) nochmals eine Senkung der Glukoseaufnahme, während unter der niedrigsten Stufe ($1\mu\text{g/ml}$) eine Steigerung erfolgte im Vergleich zur alleinigen Tamoxifengabe. Somit ist es durchaus möglich, dass die in dem

enthaltenen Petersilienwurzelextrakt sekundären Pflanzenwirkstoffe tatsächlich den Glukosemetabolismus beeinflussen könnten.

Interessant ist, dass unter Tamoxifen 10^{-4} mol/l, trotz der stark zytotoxischen Wirkung, scheinbar eine Hochregulation des Glukoseumsatzes der MCF-7-Zellen erfolgte. Erklärt werden könnte dieser Effekt eventuell mit den bereits erwähnten Kompensationsmechanismen, wobei trotz zytotoxischer Einwirkung, die Zellen über Hochregulation von Stoffwechselwegen versuchen ihren Metabolismus aufrecht zu erhalten [126]. Rivenzon-Segal et al. beobachteten, dass unter Östrogeneinfluss eine Hochregulation des Glukosetransporters 1 (GLUT 1) stattfand und daher auch eine Steigerung der Glykolyserate erfolgte. Für Tamoxifen konnte dem entgegengesetzt eine antiöstrogene Wirkung durch eine Herunterregulation von GLUT 1 festgestellt werden [134]. Eine gesteigerte Glukoseverwertung zeigte sich in dieser Arbeit jedoch sowohl für 17β -Estradiol als auch für Tamoxifen.

Xintaropoulou et al. fanden heraus, dass sekundäre Pflanzenstoffe, wie bestimmte Flavonoide (Quercetin) den GLUT 1 ebenfalls hemmen und darüber den Glukosestoffwechsel inhibieren können [135]. In einer Arbeit von Harmon et al. wurde Naringenin untersucht. Dies ist ein weiterer sekundärer Pflanzenstoff, welcher die Glukoseverwertung über eine Beeinflussung des MAPK-Signalweges inhibierte und damit auch der insulinabhängigen Glukoseaufnahme in die Zellen über GLUT 4 [136].

Eine Studie von Sewha Kim et al. untersuchte die Veränderung des Tumorstoffwechsels eines benignen Mammatumors, dem Phylloides tumor, mit zunehmendem histologischem Grad. Dort zeigte sich, dass mit voranschreitender Verschlechterung des Tumorgrades auch der Glutaminstoffwechsel in den Tumorzellen zunehmend zu finden war [137]. Dies lässt annehmen, dass ein sogenannter Übergang des Stoffwechsels von der aeroben oxidativen Phosphorylierung hin zu einer aeroben Glykolyse zwischen benignen und malignen Mammatumorzellen stattfinden könnte.

In der vorliegenden Arbeit stellte sich für die benigne MCF-12a-Zelllinie in Bezug auf die Glukoseverwertung sowohl unter Einfluss des Petersilienwurzelextrakts als auch unter Zugabe der Kontrollparameter Tamoxifen und 17β -Estradiol eine annähernd gleichbleibende Glukoseaufnahme der Zellen dar. Hieraus ließe sich schlussfolgern, dass diese Zelllinie eine stabile Stoffwechsellage aufweisen könnte, bzw. die aerobe oxidative Phosphorylierung noch entscheidende Anteile an der Energiegewinnung haben könnte.

Bei Krebszellen ist ein Merkmal, dass das extrazelluläre Milieu angesäuert wird. Dies beruht auf veränderten Stoffwechselprozessen von malignen Tumorzellen. Wie bereits erwähnt besteht die Hauptenergiegewinnung auf der aeroben Glykolyse. Infolgedessen entsteht als Produkt das saure Laktat. Die dadurch erzeugte saure Umgebung wäre theoretisch lebensfeindlich. Tumorzellen exprimieren daher zum Schutz Protonenaustauscher und Transporter, welche Protonen abgeben. Dabei handelt es sich um ATPasen, Carbonsäureanhydrasen, Na^+ / H^+ - Austauscher, Monocarboxylattransporter und Anionenaustauscher [138]. Der pH-Wert der in der Umgebung eines Tumors vorherrscht, hat für die Therapie relevante Konsequenzen. Forschungen u.a. von Fang et al. beschäftigen sich mit pH-kontrollierbaren Arzneimittelträgern, welche Zytostatika in saurem Milieu freisetzen und dadurch vorrangig lokal wirken könnten [139].

In den Zellüberständen nach Zugabe des Petersilienwurzelextrakts ergaben sich keine wesentlichen pH-Wert-Erniedrigungen in Richtung eines sauren Milieus. Für die MCF-7-Zellen konnte unter der höchsten Extraktkonzentration von 500 $\mu\text{g/ml}$ die größte Verringerung des pH-Wertes ($\text{pH}=8,07$) gemessen werden. Dieses Ergebnis zeigt eine Übereinstimmung mit dem Ergebnis aus der Glukosebestimmung. Denn dort ergaben sich für die höchste Konzentrationsstufe auch der größte Glukoseumsatz und damit vermutlich auch eine gesteigerte Laktatproduktion.

Die Ergebnisse der pH-Wert-Messung der MCF-12a-Zelllinie unterlagen nur minimalen Unterschieden und auch für die Kombination des Petersilienwurzelextrakts und Tamoxifen konnten keine wesentlichen pH-Wert-Veränderungen gemessen werden.

Der physiologische pH-Wert des Blutes liegt bei 7,37-7,45 [140]. Die Werte der MCF-7-Zelllinie sind in Richtung des alkalischen Bereiches verschoben, dieses Ergebnis beruht auf der Kultivierung mit einem alkalisierten Medium.

5.7 Ausblick

Therapiemaßnahmen wie Operationen, Strahlen- oder Chemotherapie bedeuten oftmals einschneidende Erlebnisse für einen Patienten, zudem verursachen die hochmodernen Methoden oftmals Ängste. Daher ist gerade in der heutigen Zeit die Nachfrage nach schonenden natürlichen Therapiemöglichkeiten groß. Allen voran sind die sekundären Pflanzenstoffe in den Fokus der komplementären Onkologie gerückt [141]. In der Vergangenheit beschäftigten sich viele Arbeiten mit der Auswirkung einer

phytoöstrogenreichen Ernährungsform auf die Entstehung und Therapie von Brustkrebs. Diese ist eine Hypothese für das niedrige Aufkommen von Brustkrebs in der asiatischen Bevölkerung. Auch das Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik erforscht vor allem die Einflüsse einheimischer Pflanzenarten in Bezug auf die Brustkrebserkrankung. Neben der Petersilienwurzel wurden bisher auch Extrakte aus Leinsamen, Leinwurzeln und Ulmenborke mit vielversprechenden Ergebnissen untersucht. Diverse konträre bereits vorgestellte Studienergebnisse und auch die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen dabei jedoch, wie unberechenbar und Komplex sich Phytoöstrogene und auch andere pflanzliche Stoffe auf den Brustkrebs auswirken können. Schuld daran sind viele Faktoren, wie z.B. der unterschiedliche Gehalt in den einzelnen Pflanzen, die variierende Verarbeitung und die gemeinsame Einnahme mit anderen Lebensmitteln, die verschiedenen Verdauungs- und Absorptionsmechanismen, die Dauer und Dosishöhe der Einnahme, der hormonelle Rezeptorstatus, sowie die individuelle körperliche und genetische Konstitution [142].

Die Forschungsarbeit von Dörbecker konnte nachweisen, dass sowohl das Pflanzenalter als auch die Kultivierungsformen entscheidend für eine Wirkung eines Pflanzenextrakts sein können [143]. Widersprüchliche Resultate konnten auch in der Untersuchung der Interaktionen von Phytoöstrogenen und Tamoxifen erzielt werden. Zum einen resultierten synergistische Wirkungsverstärkungen und zum anderen Wirkungsminderungen [144]. Im Rahmen der evidenzbasierten Medizin ist daher eine abschließende eindeutige Bewertung zum derzeitigen Zeitpunkt nicht möglich. Von einem übermäßigen Verzehr phytoöstrogenreicher Nahrung wird Frauen mit einem hohen Risiko für eine Brustkrebserkrankung, mit vorhandenem Brustkrebs und bei gleichzeitiger Tamoxifeneinnahme eher abgeraten. Wobei ein mäßiger und gelegentlicher Konsum im Rahmen einer ausgewogenen Ernährung durchaus empfohlen und nicht als kontraindiziert angesehen wird [141, 142]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten für die Petersilienwurzel als reinen Extrakt keine toxischen oder wachstumsfördernden Effekte auf die Brustkrebszellen, sodass ein Genuss der Petersilienwurzel vermutlich unbedenklich erfolgen kann. Zur Vorsicht ist allerdings bei einer gleichzeitigen Einnahme von Tamoxifen geraten, denn hier waren die Ergebnisse für die malignen Zellen dosisabhängig mit einer Hemmung/Verstärkung der Tamoxifenwirkung einhergegangen, während bei den benignen Zellen eine Verstärkung der Tamoxifenwirkung zu verzeichnen war. Hierfür müssten noch weitere genauere Untersuchungen hinsichtlich der Interaktionen mit Tamoxifen erfolgen, um eine endgültige Bewertung zulassen zu können.

6. Zusammenfassung

Unter den Gesichtspunkten der komplementären Medizin ist ein großes Ziel natürliche bzw. pflanzliche Therapiemethoden auf der Grundlage evidenzbasierter wissenschaftlich fundierter Erkenntnisse in das Behandlungskonzept einer Brustkrebstherapie einzufügen. Phytoöstrogene, welche zu unterschiedlichen Anteilen in den verschiedensten Pflanzen vorkommen, dienen hierbei als Forschungsansatz. Bisher zeigten sich zahlreiche gegensätzliche Ergebnisse. Diese Arbeit versteht sich als Teil eines Gesamtkonstrukts zum besseren Verständnis der Wirkung pflanzlicher Inhaltsstoffe.

Das Ziel war die Petersilienwurzel als einheimische Pflanze zu einem Extrakt zu verarbeiten und dessen Wirkung allein und in Kombination mit Tamoxifen auf die benignen MCF-12a- und die malignen MCF-7-Zelllinien zu untersuchen.

Immunhistochemisch konnte ein positiver Hormonrezeptorstatus für beide Zelllinien nachgewiesen werden.

Zur Herstellung des Petersilienwurzelextrakts wurde das Verfahren der Mikrowellenextraktion verwendet. Die Inhaltsstoffe wurden massenspektrometrisch mittels der Pyrolyse-Feldionisationsmassenspektrometrie aufgeschlüsselt, wobei sich u.a. sekundäre Pflanzenstoffe wie Isoflavonoide, Lignane und Cumarine isolieren ließen.

Der reine Pflanzenextrakt in sieben Konzentrationsstufen zeigte weder zytotoxische Effekte noch konnten Änderungen im Proliferationsverhalten beider Zelllinien festgestellt werden. Im MTT-Test resultierte eine Viabilitätssteigerung der MCF-7-Zellen unter Einwirkung der beiden höchsten Pflanzenextraktkonzentrationen (500; 100 µg/ml).

Bei der Untersuchung der Auswirkungen des Petersilienwurzelextrakts in Kombination mit Tamoxifen konnte für die MCF-7-Zelllinie unter der höchsten Konzentration (100 µg/ml) eine höhere Proliferation gemessen werden als unter alleiniger Tamoxifengabe. Dieser Effekt ließ sich im MTT-Test reproduzieren. Die niedrigste Konzentration (1 µg/ml) zeigte hingegen eine synergistisch verstärkende Wirkung.

Für die MCF-12a-Zelllinie ergab sich für alle Verdünnungsstufen eine verstärkende Tamoxifenwirkung, welche mit abnehmender Konzentration zunahm.

Somit lassen sich zusammenfassend konzentrationsabhängige Interaktionen zwischen dem Petersilienwurzelextrakt und Tamoxifen nachweisen, während die Gabe des reinen Pflanzenextrakts kaum Einfluss auf die Zelllinien ausübte. Das Herausfinden der Ursache, inwiefern die im Pflanzenextrakt nachgewiesenen Phytoöstrogene oder andere Inhaltsstoffe für

dieses Interaktionsprofil verantwortlich sind, ist klinisch hochinteressant und sollte Anlass geben weitere Untersuchungen mit der Petersilienwurzel folgen zu lassen.

Der Zellmetabolismus hinsichtlich der Glukoseverwertung war für die MCF-7-Zellen unter der höchsten Konzentration gesteigert und ein generell erhöhter Glukoseumsatz durch die aerobe Glykolyse ist für die malignen Zellen anzunehmen. Der pH-Wert ergab für beide Zelllinien keine relevanten Veränderungen unter Zugabe des Petersilienwurzelextrakts.

7. Thesen

- 1) Das Mammakarzinom ist mit rund 70 000 Neuerkrankungen jährlich die häufigste Krebserkrankung der Frau. Damit erkrankt eine von acht Frauen pro Jahr.
- 2) Brustkrebs gehört zu den häufigsten Todesursachen unter den bösartigen Neubildungen bei Frauen.
- 3) Die Inzidenz für die Brustkrebserkrankung ist in asiatischen Regionen deutlich niedriger als in westlichen Industrienationen. Ursachen für diese regionalen Unterschiede werden u.a. den gegensätzlichen Ernährungsweisen zugeschrieben.
- 4) Das Mammakarzinom ist eine multifaktorielle Erkrankung. Ursachen sind hereditäre und erworbene genetische Veränderungen, sowie hormonelle Einflüsse in Form von genotoxischen Metaboliten und genomischen und nicht-genomischen Effekten.
- 5) Sekundäre Pflanzenstoffe, wie Phytoöstrogene besitzen im Aufbau eine Molekülstruktur, welche Ähnlichkeiten zu endogenem Östrogen aufweist. Dadurch sind Phytoöstrogene in der Lage an Östrogenrezeptoren von menschlichen Zellen zu binden.
- 6) Die Petersilienwurzel ist eine einheimische Pflanze, welche nicht nur wegen des aromatischen Geschmacks für die Zubereitung von Speisen verwendet wird, sondern bereits lange einen Nutzen in der traditionellen Pflanzenheilkunde besitzt.
- 7) Ein durch Mikrowellextraktion hergestellter Petersilienwurzelextrakt enthält pflanzliche Stoffe, welche antikarzinogenes Potenzial besitzen. Neben Phytoöstrogenen, wie Isoflavonoiden und Lignanen, sind dies Cumarine und Sterole.
- 8) Der Petersilienwurzelextrakt wirkt nicht zytotoxisch und hat keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten bezogen auf die MCF-7- und MCF-12a-Zelllinien. In hoher Konzentration steigert es die Zellviabilität der MCF-12a-Zellen.

- 9) Tamoxifen wird als selektiver Estrogenrezeptormodulator auf Grund seiner antagonistischen und damit antiöstrogenen Wirkung in der Therapie des Mammakarzinoms eingesetzt. Die Wirkung ist dosisabhängig oder wird durch Resistenzmechanismen beeinflusst.
- 10) Die Auswirkungen des Petersilienwurzelextrakts in Verbindung mit Tamoxifen auf die MCF-7- und MCF-12a-Zellen wurden in dieser Arbeit untersucht.
- 11) In der höchsten Extraktkonzentration zeigt die kombinierte Gabe mit Tamoxifen proliferations- und viabilitätssteigernde Einflüsse auf die MCF-7-Zellen. Die niedrigste Konzentration des Extrakts bewirkt eine Verstärkung der Viabilitätshemmung.
- 12) Der Petersilienwurzelextrakt zeigt eine mit abnehmender Konzentration zunehmende synergistische Wirkung mit Tamoxifen in Form einer verstärkt gehemmten Zellproliferation der MCF-12a-Zellen.
- 13) Inkongruente Verhaltensweisen der MCF-12a-Zellen im MTT-Test und BrdU-Test sind vermutlich Ursache von Kompensationsmechanismen der Zellen.
- 14) Genauere Untersuchungen bezüglich des synergistischen Verhaltens der Petersilienwurzel mit Tamoxifen sollten Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Vermutlich wird die Wirkung nicht allein durch Phytoöstrogene vermittelt. Wahrscheinlicher ist ein komplexes Zusammenspiel der in der Petersilienwurzel insgesamt wirksamen Stoffe.
- 15) Der Metabolismus maligner Tumorzellen ist verändert. Die malignen MCF-7-Zellen nutzen zur Energiegewinnung vermehrt die aerobe Glykolyse.
- 16) Der Patientenwunsch hinsichtlich natürlicher Therapiemöglichkeiten ist groß, daher sollten pflanzliche Stoffe in Zukunft innerhalb einer komplementären Medizin auf evidenzbasierter Grundlage mehr berücksichtigt und erforscht werden.

Literaturverzeichnis

- 1 *Kaatsch P, Spix C, Katalinic A, Hentschel S, Luttmann S, Stegmaier C, Caspritz S, Christ M, Ernst A, Folkerts J, Hansmann J, Klein S, Kranzhöfer K, Kunz B, Manegold K, Penzkofer A, Treml K, Weg-Remers S, Wittenberg K, Baras N, Barnes B, Bertz J, Buttman-Schweiger N, Dahm S, Fiebig J, Franke M, Haberland J, Kraywinkel K, Wienecke A, Wolf U.* Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Krebs in Deutschland 2011/2012. 10. Aufl. S. 74-75.
- 2 *Benjamin Barnes, Klaus Kraywinkel, Enno Nowossadeck, Ina Schönfeld, Anne Starker, Antje Wienecke, Ute Wolf;* 2016. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. S. 36-37.
- 3 *Stewart BW, Wild CP;* 2014. World Cancer Report 2014. Lyon: International Agency for Research on Cancer/World Health Organization. S. 16-17.
- 4 *Berlakovich G, Hausmaninger C, Hausmaninger H, Hirn B, Hölzenbein T, Jakesz R, Reiner A, Reiner G, Salomonowitz E, Seitz W, Teleky B, Zielinski C, Berlakovich G;* 1992. Mammakarzinom. Wien, New York: Springer-Verlag. S. 4.
- 5 *Ansgar Gerhardus, Henriette Schleberger, Brigitte Schlegelberger, Friedrich W. Schwartz;* 2005. BRCA-erblicher Brust- und Eierstockkrebs. Beratung- Testverfahren-Kosten. Heidelberg: Springer Medizin. S. 2.
- 6 *Friedenson B.* BRCA1 and BRCA2 Pathways and the Risk of Cancers Other Than Breast or Ovarian. *MedGenMed*; 7 (2): 60.
- 7 *Malhotra J* 2014; 80. Molecular and Genetic Epidemiology of Cancer in Low- and Medium-Income Countries. *A Global Perspective on Cancer Burden* (5): 418–425.
- 8 *Pritzlaff M, Summerour P, McFarland R et al.* 2016. Male breast cancer in a multi-gene panel testing cohort: insights and unexpected results. *Breast Cancer Research and Treatment*: 1–12.
- 9 *Leonard, Debra G. B;* 2007. Molecular pathology in clinical practice. New York: Springer. S. 7-8, 208.
- 10 *Runnebaum BC, Rabe T;* 2014. Gynäkologische Endokrinologie und Fortpflanzungsmedizin. Band 1: Gynäkologische Endokrinologie. Berlin: Springer Berlin. S. 1-7, 33.
- 11 *Klöppel G, Kreipe HH, Remmele W, Dietel M;* 2013. Pathologie. Mamma, Weibliches Genitale, Schwangerschaft und Kindererkrankungen. 3. Aufl. Berlin: Springer. S. 75, 168-170.

- 12 *Germain P, Staels B, Dacquet C et al.* Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacological Reviews* 2006; 58 (4): 685–704.
- 13 *Johnston, Stephen R D.* Endocrinology and hormone therapy in breast cancer: selective oestrogen receptor modulators and downregulators for breast cancer - have they lost their way? *Breast Cancer Res* 2005; 7 (3): 119–130.
- 14 *Yager JD, Davidson NE.* Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N Engl J Med* 2006; 354 (3): 270–282.
- 15 *Löffler G;* 2007. *Biochemie und Pathobiochemie. Mit 192 Tabellen ; [+ online specials].* 8. Aufl. Heidelberg: Springer. S. 883-884.
- 16 *Macgregor JI, Jordan VC* 1998; 50. *Basic Guide to the Mechanisms of Antiestrogen Action.* *Pharmacological Reviews* (2): 151–196.
- 17 *Pettersson K, Gustafsson JA.* Role of estrogen receptor beta in estrogen action. *Annu Rev Physiol* 2001; 63: 165–192.
- 18 *Dalvai M, Bystricky K.* Cell cycle and anti-estrogen effects synergize to regulate cell proliferation and ER target gene expression. *PLoS One* 2010; 5 (6): e11011.
- 19 *Cui J, Shen Y, Li R.* Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends Mol Med* 2013; 19 (3): 197–209.
- 20 *Conneely O, Otto C;* 2008. *Progestins and the mammary gland. From basic science to clinical applications.* 2007/1. Berlin, New York: Springer. S. 78.
- 21 *Koolman J, Röhm K-H, Wirth J;* 2003. *Taschenatlas der Biochemie.* 3. Aufl. Stuttgart [u.a.]: THIEME. S. 394.
- 22 *Hanahan D, Weinberg RA.* Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144 (5): 646–674.
- 23 *Coleman WB, Tsongalis GJ.* Molecular mechanisms of human carcinogenesis. *EXS* 2006 (96): 321–349.
- 24 *Wegner R-D, Stumm M, Trimborn M, Wieacker PF;* 2016. *Humangenetische Grundlagen für Gynäkologen. Fachgebundene genetische Beratung im Überblick.* Berlin, Boston: Walter de Gruyter GmbH & Co., KG. S. 297.
- 25 *Karlson P, Doenecke D;* 2005. *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie.* 15. Aufl. Stuttgart, New York: THIEME. S. 755.
- 26 *Aigner K, Stephens F;* 2016. *Onkologie Basiswissen. Mit 75 Abbildungen und 6 Tabellen.* Berlin: Springer Verlag. S. 19-20.

- 27 *Detlev Ganten KR*; 1998. Tumorerkrankungen-Handbuch der molekularen Medizin. Bd. 2. Handbuch der Molekularen Medizin. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. S. 8.
- 28 *Arnold A, Papanikolaou A*. Cyclin D1 in breast cancer pathogenesis. *J Clin Oncol* 2005; 23 (18): 4215–4224.
- 29 *Kreienberg R*; 2010. Mammakarzinom Interdisziplinär. 4. Aufl. Berlin, New York: Springer. S. 84, 88, 105.
- 30 *Brierley J, Gospodarowicz MK, Wittekind C*; 2016. TNM classification of malignant tumours. John Wiley & Sons, Inc. S. 5-6.
- 31 *Scholzen T, Gerdes J* 2000; 182. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J. Cell. Physiol.* (3): 311–322.
- 32 *Schatten H*; 2013. Cell and molecular biology of breast cancer. Springer Science & Business Media. S. 2, 16.
- 33 *Bronchud MH*; 2008. Principles of molecular oncology. 3. Aufl. Totowa, N.J: Humana Press. S. 30-31.
- 34 *Untch M, Jackisch C, Thomssen C et al.* 2006; 103. Adjuvante Therapie mit Trastuzumab bei Mammakarzinompatientinnen. *Dtsch Arztebl International* (50): A-3406-3407.
- 35 Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms (2012). Im Internet: http://leitlinienprogramm-onkologie.de/uploads/tx_sbdownloader/S3-Brustkrebs-v2012-OL-Langversion.pdf; Stand: 12.01.2017.
- 36 *Rolf Kreienberg, Walter Jonat, Tanja Volm, Volker Moebus, Dieter Alt*; 2006. Management des Mammakarzinoms. 3. Aufl. Heidelberg: Springer Medizin. S. 227-277.
- 37 *Bauerschlag DO, Schmidt M*. Mammakarzinom. *Gynäkologe*: 623–632.
- 38 *Riggins RB, Bouton AH, Liu MC et al.* Antiestrogens, aromatase inhibitors, and apoptosis in breast cancer. *Vitam Horm* 2005; 71: 201–237.
- 39 *Feng Q, O'Malley BW*. Nuclear receptor modulation--role of coregulators in selective estrogen receptor modulator (SERM) actions. *Steroids* 2014; 90: 39–43.
- 40 *Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z et al.* Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 1997; 389 (6652): 753–758.
- 41 *Aktories K*; 2006. Repetitorium Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Mit 68 Tabellen. München [u.a.]: Elsevier, Urban & Fischer. S. 292.
- 42 *Freissmuth M, Offermanns S, Böhm S*. Pharmakologie und Toxikologie. Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie. 2. Aufl. S. 595, 599.

- 43 *Viedma-Rodriguez R, Baiza-Gutman L, Salamanca-Gomez F et al.* Mechanisms associated with resistance to tamoxifen in estrogen receptor-positive breast cancer (review). *Oncol Rep* 2014; 32 (1): 3–15.
- 44 *Dobos GJ, Voiss P, Schwidde I et al.* Integrative oncology for breast cancer patients: introduction of an expert-based model. *BMC Cancer* 2012; 12: 539.
- 45 *Neuhouser ML, Smith AW, George SM et al.* 2016; 160. Use of complementary and alternative medicine and breast cancer survival in the Health, Eating, Activity, and Lifestyle Study. *Breast Cancer Research and Treatment* (3): 539–546.
- 46 *Schilcher H, Kammerer S, Wegener T;* 2007. Leitfaden Phytotherapie. 3. Aufl. München, Jena: Elsevier, Urban & Fischer. S. 2, 4-5, 644-678.
- 47 *Hänsel R, Sticher O, Steinegger E;* 2010. Pharmakognosie, Phytopharmazie. 9. Aufl. Heidelberg: Springer Medizin. S. 5-6, 40-41, 50-52.
- 48 *Bilger W;* 2009, c 2009. Botanik. 18 Tabellen. Stuttgart, New York, NY: THIEME. S. 359-360.
- 49 *Adlercreutz H, Mazur W.* Phyto-oestrogens and Western diseases. *Ann Med* 1997; 29 (2): 95–120.
- 50 *Murkies AL, Wilcox G, Davis SR.* Clinical review 92: Phytoestrogens. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83 (2): 297–303.
- 51 *Aflfred Wolf* 1998. Phytoestrogene. *Journal für Menopause* (5): 29–35.
- 52 *A. Feige, A. Rempen, W. Würfel, J. Jawny, A. Rohde;* 2005. Frauenheilkunde: Fortpflanzungsmedizin, Geburtsmedizin, Onkologie, Psychosomatik. Urban & Fischer. S. 22.
- 53 *Lampe JW.* Isoflavonoid and lignan phytoestrogens as dietary biomarkers. *J Nutr* 2003; 133 Suppl 3: 956S-964S.
- 54 *Possemiers S, Bolca S, Eeckhaut E et al.* Metabolism of isoflavones, lignans and prenylflavonoids by intestinal bacteria: producer phenotyping and relation with intestinal community. *FEMS Microbiol Ecol* 2007; 61 (2): 372–383.
- 55 *Freissmuth M, Offermanns S, Böhm S;* 2012. Pharmakologie & Toxikologie. Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie. Springer-Lehrbuch. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- 56 *Vitale DC, Piazza C, Melilli B et al.* Isoflavones: estrogenic activity, biological effect and bioavailability. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2013; 38 (1): 15–25.

- 57 *Matthies A, Clavel T, Gutschow M et al.* Conversion of daidzein and genistein by an anaerobic bacterium newly isolated from the mouse intestine. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74 (15): 4847–4852.
- 58 *Ko K-P.* Isoflavones: chemistry, analysis, functions and effects on health and cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15 (17): 7001–7010.
- 59 *Milder, Ivon E J, Arts, Ilja C W, van de Putte, Betty et al.* Lignan contents of Dutch plant foods: a database including lariciresinol, pinoresinol, secoisolariciresinol and matairesinol. *Br J Nutr* 2005; 93 (3): 393–402.
- 60 *Peterson J, Dwyer J, Adlercreutz H et al.* Dietary lignans: physiology and potential for cardiovascular disease risk reduction. *Nutr Rev* 2010; 68 (10): 571–603.
- 61 *Clavel T, Dore J, Blaut M.* Bioavailability of lignans in human subjects. *Nutr Res Rev* 2006; 19 (2): 187–196.
- 62 *Wang L-Q.* Mammalian phytoestrogens: enterodiol and enterolactone. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002; 777 (1-2): 289–309.
- 63 *Tuskaev VA* 2013; 47. Synthesis and biological activity of coumestan derivatives (Review). *Pharmaceutical Chemistry Journal* (1): 1–11.
- 64 *Harris, D. M., Besselink E, Henning, S. M. et al.* 2005; 230. Phytoestrogens Induce Differential Estrogen Receptor Alpha- or Beta-Mediated Responses in Transfected Breast Cancer Cells. *Experimental Biology and Medicine* (8): 558–568.
- 65 *Chandsawangbhuwana C, Baker ME.* 3D models of human ERalpha and ERbeta complexed with coumestrol. *Steroids* 2014; 80: 37–43.
- 66 *Robb EL, Stuart JA.* Multiple phytoestrogens inhibit cell growth and confer cytoprotection by inducing manganese superoxide dismutase expression. *Phytother Res* 2014; 28 (1): 120–131.
- 67 *Fritz H, Seely D, Flower G et al.* Soy, red clover, and isoflavones and breast cancer: a systematic review. *PLoS One* 2013; 8 (11): 1–18.
- 68 *Ziegler RG, Hoover RN, Pike MC et al.* Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85 (22): 1819–1827.
- 69 *Adlercreutz H, Hockerstedt K, Bannwart C et al.* Effect of dietary components, including lignans and phytoestrogens, on enterohepatic circulation and liver metabolism of estrogens and on sex hormone binding globulin (SHBG). *J Steroid Biochem* 1987; 27 (4-6): 1135–1144.
- 70 *Pilsakova L, Rieicansky I, Jagla F.* The physiological actions of isoflavone phytoestrogens. *Physiol Res* 2010; 59 (5): 651–664.

- 71 *Uifalean A, Schneider S, Ionescu C et al.* Soy Isoflavones and Breast Cancer Cell Lines: Molecular Mechanisms and Future Perspectives. *Molecules* 2015; 21 (1): 1–17.
- 72 *Adlercreutz H* 2007; 44. Lignans and Human Health. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* (5-6): 483–525.
- 73 *Bergman Jungstrom M, Thompson LU, Dabrosin C.* Flaxseed and its lignans inhibit estradiol-induced growth, angiogenesis, and secretion of vascular endothelial growth factor in human breast cancer xenografts in vivo. *Clin Cancer Res* 2007; 13 (3): 1061–1067.
- 74 *Liu S, Hsieh D, Yang Y-L et al.* Coumestrol from the national cancer Institute's natural product library is a novel inhibitor of protein kinase CK2. *BMC Pharmacol Toxicol* 2013; 14: 1–9.
- 75 *Thomas Schöpke.* Petersilienwurzel - Petroselinum radix (23.08.16). Im Internet: http://www.medizinalpflanzen.de/systematik/6_droge/petros-r.htm; Stand: 12.01.2017.
- 76 *Jänicke C, Brendler T, Grünwald J, Morgenstern R, Wobst B;* 2003. Handbuch Phytotherapie. Indikationen, Anwendungen, Wirksamkeit, Präparate. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges. S. 407, 410.
- 77 *Nabors MW, Scheibe R;* 2007. Botanik. München, Boston, Mass. [u.a.]: Pearson Studium. S. 78.
- 78 *Schröder L, Koch J, Mahner S et al.* The Effects of Petroselinum Crispum on Estrogen Receptor-positive Benign and Malignant Mammary Cells (MCF12A/MCF7). *Anticancer Res* 2017; 37 (1): 95–102.
- 79 *Yoshikawa M, Uemura T, Shimoda H et al.* Medicinal foodstuffs. XVIII. Phytoestrogens from the aerial part of Petroselinum crispum Mill. (Parsley) and structures of 6"-acetylapiin and a new monoterpene glycoside, petroside. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2000; 48 (7): 1039–1044.
- 80 *Tang EL-H, Rajarajeswaran J, Fung S et al.* Petroselinum crispum has antioxidant properties, protects against DNA damage and inhibits proliferation and migration of cancer cells. *J Sci Food Agric* 2015; 95 (13): 2763–2771.
- 81 *Farshori NN, Al-Sheddi ES, Al-Oqail MM et al.* Anticancer activity of Petroselinum sativum seed extracts on MCF-7 human breast cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14 (10): 5719–5723.
- 82 *CEM GmbH.* Im Internet: <http://www.cem.de/>; Stand: 19.01.2017.
- 83 *Delazar A, Nahar L, Hamedeyazdan S et al.* Microwave-assisted extraction in natural products isolation. *Methods Mol Biol* 2012; 864: 89–115.

- 84 *Gey MH*; 2015. Instrumentelle Analytik und Bioanalytik. Biosubstanzen, Trennmethode, Strukturanalytik, Applikationen. Springer-Lehrbuch. 3. Aufl. Berlin: Springer-Spektrum. S. 67-68, 316-324.
- 85 *Gross JH*; 2013. Massenspektrometrie. Ein Lehrbuch. Berlin [u.a.]: Springer Spektrum. S. 260, 414.
- 86 *Levenson AS, Jordan VC*. MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Res* 1997; 57 (15): 3071–3078.
- 87 *Soule HD, Vazquez J, Long A et al.* A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1973; 51 (5): 1409–1416.
- 88 *ATCC in Partnership with LGC Standards*. Im Internet: <https://www.lgcstandards-atcc.org/en.aspx>; Stand: 19.01.2017.
- 89 *Ross DT, Perou CM*. A comparison of gene expression signatures from breast tumors and breast tissue derived cell lines. *Dis Markers* 2001; 17 (2): 99–109.
- 90 *Marchese S, Silva E*. Disruption of 3D MCF-12A breast cell cultures by estrogens--an in vitro model for ER-mediated changes indicative of hormonal carcinogenesis. *PLoS One* 2012; 7 (10): 1–11.
- 91 *LO-Laboroptik Ltd*. Im Internet: <http://www.lo-laboroptik.de/deutsch/info/zaehl.html>; Stand: 01.02.2017.
- 92 *Schmitz S*; 2011. Der Experimentator: Zellkultur. 3. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. S. 206.
- 93 *Elling D, Pink V*; 2013. Tumormarker und Immunszintigraphie in der gynäkologischen Onkologie. Grundlagen - Bestimmungsmethoden - Indikationen. Springer-Verlag. S. 118.
- 94 *Büttner R, Fend F, Thomas C*; 2003. Allgemeine Pathologie. Mit 15 Tabellen. A. 3. Aufl. Stuttgart [u.a.]: Schattauer. S. 11-12.
- 95 *Roche*. Cytotoxicity Detection Kit (LDH)- Version 08. Im Internet: <https://pim-eservices.roche.com/LifeScience/Document/dc220baa-d3ed-e311-98a1-00215a9b0ba8>; Stand: 21.01.2017.
- 96 *Roche*. Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)- Version 16. Im Internet: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Roche/Bulletin/1/11647229001bul.pdf>; Stand: 21.01.2017.
- 97 *Roche*. Cell Proliferation Kit I (MTT) - Version 19. Im Internet: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Roche/Bulletin/1/11465007001bul.pdf>; Stand: 21.01.2017.

- 98 *Berridge, M. V., Tan, A. S., McCoy, K. D. & Wang, R.* 1996. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. *Biochemica* (4): 14–19.
- 99 *EKF-Diagnostik GmbH.* Biosen C-Line. Glukose und Laktatmesssystem (07/2013). Im Internet: http://www.gemar-celle.de/files/gemar/media/Produkte/Biosen_C-line/C-line_CLINIC-GP+_BA_de_2-00.pdf; Stand: 21.02.2017.
- 100 *Degner R;* 2012. pH-Messung: Der Leitfaden für Praktiker. Wiley. S. 1-15.
- 101 *Uhl B;* 2013. Gynäkologie und Geburtshilfe compact. Alles für Station, Praxis und Facharztprüfung; 191 Tab. 5. Aufl. Stuttgart, New York: THIEME. S. 725.
- 102 *Kundt G, Krentz H, Glass A;* 2011. Epidemiologie und medizinische Biometrie. Eine kurzgefasste übersichtliche Einführung; mit Prüfungsfragen und Übungsaufgaben. Berichte aus der Statistik. 6. Aufl. Aachen: Shaker. S. 159-177.
- 103 *Klein E* 2017; 50. Phytotherapie - Studienlage und Einsatzgebiete. *Der Gynäkologe* (1): 22–25.
- 104 *Nabavi SM, Habtemariam S, Daglia M et al.* Apigenin and Breast Cancers: From Chemistry to Medicine. *Anticancer Agents Med Chem* 2015; 15 (6): 728–735.
- 105 *Cheng G, Zielonka J, McAllister DM et al.* Mitochondria-targeted vitamin E analogs inhibit breast cancer cell energy metabolism and promote cell death. *BMC Cancer* 2013; 13: 1–14.
- 106 *WANG X-f, XIE Y, WANG H-g et al.* alpha-Tocopheryl succinate induces apoptosis in erbB2-expressing breast cancer cell via NF-kappaB pathway. *Acta Pharmacol Sin* 2010; 31 (12): 1604–1610.
- 107 *Johnykutty S, Tang P, Zhao H et al.* Dual expression of alpha-tocopherol-associated protein and estrogen receptor in normal/benign human breast luminal cells and the downregulation of alpha-tocopherol-associated protein in estrogen-receptor-positive breast carcinomas. *Mod Pathol* 2009; 22 (6): 770–775.
- 108 *Zhao L, Zhao X, Zhao K et al.* The alpha-tocopherol derivative ESeroS-GS induces cell death and inhibits cell motility of breast cancer cells through the regulation of energy metabolism. *Eur J Pharmacol* 2014; 745: 98–107.
- 109 *Wan Y, Li H, Fu G et al.* The relationship of antioxidant components and antioxidant activity of sesame seed oil. *J Sci Food Agric* 2015; 95 (13): 2571–2578.
- 110 *Prince M, Campbell CT, Robertson TA et al.* 2005; 27. Naturally occurring coumarins inhibit 7,12-dimethylbenz[a]anthracene DNA adduct formation in mouse mammary gland. *Carcinogenesis* (6): 1204–1213.

- 111 *Panno ML, Giordano F, Rizza P et al.* Bergapten induces ER depletion in breast cancer cells through SMAD4-mediated ubiquitination. *Breast Cancer Research and Treatment* 2012; 136 (2): 443–455.
- 112 *Kliwer SA, Sundseth SS, Jones SA et al.* Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94 (9): 4318–4323.
- 113 *Abduljabbar R, Al-Kaabi MM, Negm OH et al.* 2015; 150. Prognostic and biological significance of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in luminal breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* (3): 511–522.
- 114 *Hwang J-K, Yu H-N, Noh E-M et al.* DHA blocks TPA-induced cell invasion by inhibiting MMP-9 expression via suppression of the PPAR-gamma/NF-kappaB pathway in MCF-7 cells. *Oncol Lett* 2017; 13 (1): 243–249.
- 115 *Badowska-Kozakiewicz AM, Patera J, Sobol M et al.* The role of oestrogen and progesterone receptors in breast cancer - immunohistochemical evaluation of oestrogen and progesterone receptor expression in invasive breast cancer in women. *Contemp Oncol (Pozn)* 2015; 19 (3): 220–225.
- 116 *Wang S, He M, Li L et al.* Cell-in-Cell Death Is Not Restricted by Caspase-3 Deficiency in MCF-7 Cells. *J Breast Cancer* 2016; 19 (3): 231–241.
- 117 *Zheng N, Zhang P, Huang H et al.* ERalpha down-regulation plays a key role in silibinin-induced autophagy and apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells. *J Pharmacol Sci* 2015; 128 (3): 97–107.
- 118 *Jonsson P, Katchy A, Williams C.* Support of a bi-faceted role of estrogen receptor beta (ERbeta) in ERalpha-positive breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 2014; 21 (2): 143–160.
- 119 *Oseni T, Patel R, Pyle J et al.* Selective estrogen receptor modulators and phytoestrogens. *Planta Med* 2008; 74 (13): 1656–1665.
- 120 *Mai Z, Blackburn GL, Zhou J-R.* Soy phytochemicals synergistically enhance the preventive effect of tamoxifen on the growth of estrogen-dependent human breast carcinoma in mice. *Carcinogenesis* 2007; 28 (6): 1217–1223.
- 121 *Mai Z, Blackburn GL, Zhou J-R.* Genistein sensitizes inhibitory effect of tamoxifen on the growth of estrogen receptor-positive and HER2-overexpressing human breast cancer cells. *Mol Carcinog* 2007; 46 (7): 534–542.
- 122 *Liu B, Edgerton S, Yang X et al.* Low-dose dietary phytoestrogen abrogates tamoxifen-associated mammary tumor prevention. *Cancer Res* 2005; 65 (3): 879–886.

- 123 *Dünow A*; 2012. Die kumulative Wirkung von Leinwurzelextrakt der Pflanze *Linum usitatissimum* und Tamoxifen auf oestrogenpositive Mammakarzinomzellen [Dissertation]. Universität Rostock. S. 64-71.
- 124 *Cuzick J, Sestak I, Thorat MA*. Impact of preventive therapy on the risk of breast cancer among women with benign breast disease. *Breast* 2015; 24 Suppl 2: S51-S55.
- 125 *Fentiman IS, Powles TJ*. Tamoxifen and benign breast problems. *Lancet* 1987; 2 (8567): 1070–1072.
- 126 *Gee JMW, Shaw VE, Hiscox SE et al*. Deciphering antihormone-induced compensatory mechanisms in breast cancer and their therapeutic implications. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13 Suppl 1: S77-88.
- 127 *Deutzmann R, Rassow J*, Hrsg.; 2016. Duale Reihe Biochemie. Reihe, DUALE REIHE. 4. Aufl. Stuttgart: THIEME. S. 281-283.
- 128 *Yue W, Yager JD, Wang J-P et al*. Estrogen receptor-dependent and independent mechanisms of breast cancer carcinogenesis. *Steroids* 2013; 78 (2): 161–170.
- 129 *Higa GM, Fell RG*; 2013. Sex hormone receptor repertoire in breast cancer. *Int J Breast Cancer* 2013; DOI: 10.1155/2013/284036.
- 130 *Peng J, Sengupta S, Jordan VC*. Potential of selective estrogen receptor modulators as treatments and preventives of breast cancer. *Anticancer Agents Med Chem* 2009; 9 (5): 481–499.
- 131 *Kim S, Kim DH, Jung W-H et al*. 2013; 34. Metabolic phenotypes in triple-negative breast cancer. *Tumor Biology* (3): 1699–1712.
- 132 *Vitto H de, Pérez-Valencia J, Radosevich JA* 2016; 37. Glutamine at focus: versatile roles in cancer. *Tumor Biology* (2): 1541–1558.
- 133 *Tian H, Gao Z, Wang G et al*. 2016; 37. Estrogen potentiates reactive oxygen species (ROS) tolerance to initiate carcinogenesis and promote cancer malignant transformation. *Tumor Biology* (1): 141–150.
- 134 *Rivenzon-Segal D, Boldin-Adamsky S, Seger D et al*. Glycolysis and glucose transporter 1 as markers of response to hormonal therapy in breast cancer. *Int J Cancer* 2003; 107 (2): 177–182.
- 135 *Xintaropoulou C, Ward C, Wise A et al*. A comparative analysis of inhibitors of the glycolysis pathway in breast and ovarian cancer cell line models. *Oncotarget* 2015; 6 (28): 25677–25695.

- 136 *Harmon AW, Patel YM*. Naringenin inhibits glucose uptake in MCF-7 breast cancer cells: a mechanism for impaired cellular proliferation. *Breast Cancer Research and Treatment* 2004; 85 (2): 103–110.
- 137 *Kim S, Jung WH, Koo JS* 2013; 34. The expression of glutamine-metabolism-related proteins in breast phyllodes tumors. *Tumor Biology* (5): 2683–2689.
- 138 *Granja S, Tavares-Valente D, Queiros O et al*. Value of pH regulators in the diagnosis, prognosis and treatment of cancer. *Semin Cancer Biol* 2017: 1–18.
- 139 *Fang W, Wang Z, Zong S et al*. pH-controllable drug carrier with SERS activity for targeting cancer cells. *Biosens Bioelectron* 2014; 57: 10–15.
- 140 *Herold G*; 2014. Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung ; mit ICD-10 Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Köln: Herold. S. 967.
- 141 *Hübner J*; 2008. Komplementäre Onkologie. Supportive Massnahmen und evidenzbasierte Empfehlungen. Stuttgart: Schattauer. S. 7.
- 142 *Helferich WG, Andrade JE, Hoagland MS*. Phytoestrogens and breast cancer: a complex story. *Inflammopharmacology* 2008; 16 (5): 219–226.
- 143 *Dörbecker D*; 2014. Der inhibitorische Effekt dreier Leinwurzelpreparate aus der Klimakammer auf estrogenrezeptorpositive (MCF-7) und estrogenrezeptornegative (BT-20) Mammakarzinomzellen [Dissertation]. Universität Rostock. S. 91-92.
- 144 *van Duursen MB, van den Broek I, Jong PC de et al*. 2013; 157. Risks associated with phytoestrogen dietary supplementation and adjuvant hormonal therapy for breast cancer. *Ned Tijdschr Geneesk* (40): A6069.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit zuvor weder von mir an der Universitätsmedizin Rostock der Universität Rostock noch einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde. Ferner erkläre ich, dass diese Arbeit selbstständig verfasst und nur unter Verwendung der darin angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde.

Franca Dudde

Rostock, August 2017

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei Professor Briese für die Möglichkeit der Anfertigung der Dissertation im Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik Rostock bedanken. Zudem ein großes Dankeschön an Frau Dr. Richter für die Heranführung an das wissenschaftliche Arbeiten und die Beantwortung zahlreicher Fragen und Unterstützung während der Anfertigung der Dissertation. Ebenso möchte ich mich bei Frau Szewczyk für die Beantwortung von Fragen während des experimentellen Arbeitens im Labor bedanken. Auch ein großes Dankeschön an Frau Greschkovitz, für die Unterstützung bei der Laborarbeit. Besonders bedanken möchte ich mich bei Stefan Reinke für die enorm wichtige mentale Unterstützung und Hilfe in allen technischen Fragen.