

Aus der Universitätsfrauenklinik Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. B. Gerber

Der Einfluss von Leinwurzelextrakten der Pflanze *Linum usitatissimum* unterschiedlicher
Alterstufen auf die Vitalität verschiedener Mammakarzinomzelllinien

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

Vorgelegt von:

Nicole Strater

aus Rostock

Rostock, den 25.03.2011

urn:nbn:de:gbv:28-diss2011-0164-2

Dekan: Prof. Dr. med. E. Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. V. Briese, Universitätsfrauenklinik, Klinikum Südstadt der Hansestadt Rostock, Südring 81, 18059 Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. med. K. Kraft, Zentrum für Innere Medizin, Lehrstuhl für Naturheilkunde, Ernst-Heydemannstraße. 6, 18057 Rostock

3. Gutachter: Prof. Dr. K. Wimmers, FBN, Wilhelm-Stahl-Allee 2, 18196 Dummerstorf

Datum der Einreichung: 01.04.2011

Datum der Verteidigung: 15.11.2011

Gefördert durch

Dr.- Mildred- Scheel- Stiftung für Krebsforschung

Nr. 107820

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis | 6 |
| Abbildungsverzeichnis | 8 |
| Tabellenverzeichnis | 9 |
| 1. Einleitung | 11 |
| 1.1 Die Leinpflanze | 12 |
| 1.2 Der Hormonrezeptor | 14 |
| 1.3 Estrogen, ein Steroidhormon | 17 |
| 1.4 Phytoestrogene | 18 |
| 1.5 Stoffwechsel der Phytoestrogene | 22 |
| 1.6 Fragestellung | 24 |
| 2. Zielstellung | 25 |
| 3. Material und Methoden | 27 |
| 3.1 Pflanzenmaterial | 27 |
| 3.2 Extraktion | 27 |
| 3.3 Zellkulturlinien | 28 |
| 3.4 Zellkulturmedium | 29 |
| 3.5 Zellkultivierung | 29 |
| 3.6 Ermittlung der Lebendzellzahl | 30 |
| 3.7 Immunhistochemie | 31 |
| 3.8 Untersuchungen zur Cytotoxizität und Zellproliferation | 33 |
| 3.8.1 Aufarbeitung der Extrakte und der Kontrollen | 34 |
| 3.8.2 Vorbereitung der Platten | 35 |
| 3.8.3 LDH-Cytotoxizitätstest | 36 |
| 3.8.4 MTT-Zellproliferationstest | 39 |
| 3.8.5 BrdU-Zellproliferationstest | 41 |
| 3.9 Pyrolyse-Feldionisationsmassenspektrometrie | 44 |
| 3.10 Auswertung | 45 |
| 4. Ergebnisse | 46 |
| 4.1 Immunhistochemie | 46 |
| 4.2 Cytotoxizitäts- und Proliferationstests | 48 |
| 4.2.1 LDH-Test bei MCF7 | 49 |
| 4.2.2 MTT-Test bei MCF7 | 51 |
| 4.2.3 BrdU-Test bei MCF7 | 53 |
| 4.2.4 LDH-Test bei BT20 | 56 |
| 4.2.5 MTT-Test bei BT20 | 59 |

| | |
|--|-----------|
| 4.2.6 BrdU-Test bei BT20 | 61 |
| 4.2.7 LDH-Test bei den Fibroblasten | 63 |
| 4.2.8 BrdU-Test bei den Fibroblasten | 65 |
| 4.2.9 Ergebnis der Pyrolyse-Feldionisationsmassenspektroskopie | 68 |
| 5. Diskussion | 72 |
| 5.1 Cytotoxizität des Leinwurzelextraktes | 72 |
| 5.2 Untersuchungen zur Zellproliferation mittels MTT-Test | 73 |
| 5.3 Untersuchungen zur Zellproliferation mittels BrdU-Test | 74 |
| 5.4 Fibroblasten | 74 |
| 5.5 Massenspektrometrische Analyse der Inhaltstoffe der Extrakte | 76 |
| 5.6 Weitere Einflüsse | 79 |
| 6. Ausblick | 81 |
| 7. Zusammenfassung | 82 |
| 8. Literaturverzeichnis | 84 |
| 9. Thesen | 92 |
| 10. Veröffentlichungen | 95 |
| Danksagung | 96 |
| Selbständigkeitserklärung | 97 |
| Poster der 14. Tumormarkertagung Hamburg 2008 | 98 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------|---|
| AG | Antigen |
| AK | Antikörper |
| bFGF | basic fibroblast growth factor |
| BrdU | 5-bromo-2'-deoxyuridin |
| BT 20 | Mammakarzinomzelllinie |
| DAB | Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid |
| DKH | Deutsche Krebshilfe |
| DMEM | Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure) |
| DNase I | Desoxyribonuklease I |
| EDTA | Ethyldiamintetraacetat |
| ELISA | enzyme linked immunosorbent assay |
| ER α | Estrogenrezeptor α |
| ER β | Estrogenrezeptor β |
| ERE | estrogen response element |
| EtOH | Ethanol |
| FKS | fetales Kälberserum |
| H_2O_2 | Wasserstoffperoxid |
| H_2SO_4 | Schwefelsäure |
| HBSS | Hanks' gepufferte Salzmischung |
| HCl | Salzsäure |
| HEPES | N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure |
| HRE | hormone response element |
| HRT | Hormone Replacement Therapy |
| HSP | Hitzeschockprotein |
| HSS | Hanks Salt Solution |
| INT | 2-[4-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid |
| kDa | Kilodalton |
| LC/MS | Flüssigchromatographie/Massenspektrometrie |

| | |
|----------|--|
| LDH | Lactat-Dehydrogenase |
| MCF 7 | Mammakarzinomzelllinie |
| min | Minute(n) |
| mRNA | messenger- ribonucleic acid (Ribonukleinsäure) |
| MTT | 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromid |
| NAD | Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid |
| NBCS | neonatales Kälberserum |
| nM | nano Mol |
| PBS | Phosphat buffered saline |
| POD | Peroxidase |
| PPAR | peroxisome proliferator-activated receptor |
| PR | Progesteronrezeptor |
| Py- FIMS | Pyrolyse-Feldionisationsmassenspektrometrie |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute, Eigenname des Zellkulturmediums |
| REM | Rasterelektronenmikroskop |
| rpm | revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute |
| SERM | selektiver Estrogenrezeptor-Modulator |
| SHBG | sexual hormone binding globuline |
| TMB | Tetramethylbenzidin |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|-----------------|--|-------|
| Abb. 1 | Leinpflanze <i>Linum usitatissimum</i> , Sommer 2007 | S. 10 |
| Abb. 2 | G-Protein-gekoppelter Estrogenrezeptor | S. 15 |
| Abb. 3 | intrazellulärer Hormonrezeptor | S. 15 |
| Abb. 4 | Estrogenrezeptor | S. 16 |
| Abb. 5 | Strukturformel Estrogen | S. 17 |
| Abb. 6 | Strukturähnlichkeit Phytoestrogen und Estradiol | S. 18 |
| Abb. 7 | Strukturformeln verschiedener Lignane | S. 20 |
| Abb. 8 | Strukturformeln verschiedener Isoflavonoide | S. 21 |
| Abb. 9 | Beispiel für ein Coumestan | S. 22 |
| Abb. 10 | Prinzip des LDH-Testes | S. 36 |
| Abb. 11 | Prinzip des MTT-Testes | S. 39 |
| Abb. 12 | Prinzip des BrdU-Testes | S. 41 |
| Abb. 13 a) - h) | immunhistochemischer Nachweis der Rezeptoren | S. 47 |
| Abb. 14 | LDH-Test bei MCF7 | S. 49 |
| Abb. 15 | LDH-Testergebnis bei den Kontrollen | S. 50 |
| Abb. 16 | MTT-Test bei MCF7 | S. 51 |
| Abb. 17 | MTT-Testergebnis bei den Kontrollen | S. 52 |
| Abb. 18 | BrdU-Test bei MCF7 | S. 54 |
| Abb. 19 | BrdU-Testergebnis bei den Kontrollen | S. 55 |
| Abb. 20 | LDH-Test bei BT20 | S. 57 |
| Abb. 21 | LDH-Testergebnis bei den Kontrollen | S. 58 |
| Abb. 22 | MTT-Test bei BT20 | S. 59 |
| Abb. 23 | MTT-Testergebnis bei den Kontrollen | S. 60 |
| Abb. 24 | BrdU-Testergebnis bei BT20 | S. 61 |
| Abb. 25 | BrdU-Testergebnis bei den Kontrollen | S. 62 |
| Abb. 26 | LDH-Test bei Fibroblasten | S. 63 |
| Abb. 27 | LDH-Testergebnis bei den Kontrollen | S. 64 |
| Abb. 28 | BrdU-Test bei den Fibroblasten | S. 66 |
| Abb. 29 | BrdU-Testergebnis der Kontrollen | S. 67 |
| Abb. 30 | graphische Darstellung der py-FIMS | S. 69 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|--------|--|-------|
| Tab. 1 | Gehalt an Secoisolariciresinol und Matairesinol | S. 19 |
| Tab. 2 | Gehalt an verschiedenen Vertretern der Isoflavone | S. 21 |
| Tab. 3 | Verdünnungsstufen der Extrakte und der Kontrollen | S. 34 |
| Tab. 4 | tabellarische Auflistung der Anteile der Substanzklassen | S. 70 |



Abb. 1 Leinpflanze *Linum usitatissimum*, Sommer 2007.

Diese Abbildung zeigt die Leinpflanze *Linum usitatissimum*, Sorte Barbara, in voller Blüte im Sommer 2007 auf dem Gelände der Biowissenschaften der naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock. Die Wurzeln dieser Pflanze stehen im Mittelpunkt dieser Arbeit.

Die Leinpflanze tritt in den Mittelpunkt unseres Interesses:

- sie gilt als eine der ältesten Kulturpflanzen der Welt, erstmals erwähnt im siebten Jahrtausend vor Christus im vorderen Orient,
- ab dem dritten Jahrtausend vor Christus in Europa kultiviert,
- vielseitiger Einsatz in Nahrungsmittel- und Gewebeproduktion,
- heutzutage besonders in Lebensmitteln zu finden,
- als geeignetes Mittel bei Obstipation bekannt,
- *in vitro* bestätigte Wirksamkeit gegen Mammakarzinomzellen, die einen positiven Nachweis für einen zytoplasmatischen Estrogenrezeptor haben.

1. Einleitung

Das statistische Bundesamt (www.gbe-bund.de, letzter Zugriff 28.02.2011) hat in seiner Veröffentlichung 2009 die bösartige Neubildung der Mamma (C50 des ICD-10) als fünfthäufigste Todesursache bei Frauen herausgegeben. Diese Zahl bewegt sich in den letzten 5 Jahren auf einem recht konstanten Niveau. Damit ist die Bedeutung der Prävention und der Bekämpfung des Mammakarzinoms deutlicher denn je.

Zugleich wächst das Bedürfnis der Menschen, für sich selbst und die Gesundheit etwas zu tun. Eine gesunde Lebensweise mit ausgewogener Ernährung und Bewegung soll den Körper fit und gesund halten und möglichen Krebserkrankungen auf diesem Weg den Nährboden entziehen.

Dass die Ernährung einen nicht unerheblichen Anteil an der Prävention besonders estrogenabhängig wachsender Karzinome, wie zum Beispiel das Mammakarzinom, hat, ist durch die zahlreichen Forschungen verschiedener Arbeitsgruppen, unter anderem um Adlercreutz, Lamartiniere, Messina, untersucht worden.

Dabei konnte ermittelt werden, dass Asiatinnen, die von klein auf eine phytoestrogenreiche Ernährung zu sich nahmen, die auf einem hohen Anteil an Sojaprodukten beruht, eine wesentlich geringere Inzidenz an estrogenabhängig wachsenden Karzinomen aufwiesen als Nordamerikanerinnen. Im Umkehrschluss erhöhte sich diese Inzidenz, wenn die Asiatinnen ihre traditionelle Lebensweise aufgaben, wie zum Beispiel durch Emigration. Dies stellten McMichael 1988 und Shimizu 1991 dar.

Nun ist in unserem mitteleuropäischen Kulturkreis die Sojapflanze nicht heimisch und deren Konsum auch nicht durchgängig weit verbreitet.

Daher liegt es nahe, einheimische Pflanzen zu suchen, die ebenfalls einen hohen Anteil an Phytoestrogenen haben. Zu diesen Pflanzen gehören neben der Leinpflanze *Linum usitatissimum* auch Hülsenfrüchte, Spargel und Knoblauch.

1.1 Die Leinpflanze

Die Gattungsbezeichnung der Leinpflanze lautet *Linum usitatissimum* und bedeutet äußerst nützlicher Lein.

Sie gehört zu den ältesten Kulturpflanzen der Welt. Dies belegen archäologische Funde im Iran, die auf 7500 bis 6750 v. Chr. datiert werden konnten (Dambroth, Seehuber).

Von dort trat die Pflanze dann ihren Weg über Mesopotamien und Ägypten bis nach Europa an. Dortige Funde bestätigen den Einsatz der Leinpflanze schon im 3. Jahrtausend v. Chr. Schon im antiken Griechenland wurden der Samen der Leinpflanze zu Nahrungszwecken und die Faser zur Gewebeproduktion eingesetzt.

Durch den vermehrten Import und Einsatz der Baumwolle in der Neuzeit, ist die Bedeutung des Leins als Faserlieferant zur Gewebeproduktion rückläufig.

In der Lebensmittelindustrie ist der Lein durch die Verwendung seiner Samen in Backwaren und Müsli allgegenwärtig. Ferner wird er als probates Hausmittel gegen Obstipation empfohlen.

Die Leinpflanze gehört zur Familie der Linaceae mit 22 Gattungen. Die Gattung *Linum* umfasst weitere 200 Arten. Nur die Art *Linum usitatissimum* besitzt laut Diepenbrock und Fischbek Anbaubedeutung.

Das Wurzelsystem der Leinpflanze umfasst eine sog. Pfahlwurzel mit mehreren feinen Seitenwurzeln, wobei die Pfahlwurzel genauso lang werden kann wie der Spross. Allerdings sind das Wurzelwachstum und die Verzweigungsstärke von der Bodenart und der Wasserversorgung abhängig.

Das Aussehen des Sprosses unterscheidet sich dahingehend voneinander, als der Textilfaserlein aus einem langen, feinen Stängel mit schwachen Blütenstandverzweigungen besteht, wohingegen der Öllein eine ausgeprägte Verzweigung aufweist.

Die Länge der Pflanze beträgt zwischen 80 bis 100 cm, der Durchmesser der Pflanze liegt bei ca. 2 mm (Dambroth, Seehuber).

Die Blüte ist fünfzählig und die Farben sind zumeist blau, weiß und violett. Diese fünf Staubblätter sind bis zu 5 mm lang und haben in ihrer Mitte einen Stempel.

Die Frucht des *Linum usitatissimum* besteht aus einer fünffächrigen Kapsel. In jedem Fach sind 2 Samen vorhanden.

In dieser Arbeit ist das besondere Augenmerk auf die Wurzel gerichtet. In Vorarbeiten des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik Rostock (Diplomarbeit M. Szewczyk) konnte herausgearbeitet werden, dass die Wurzel eine besonders hohe Wirkung in Bezug auf estrogenrezeptorpositive Mammakarzinomzellen hat.

Zu Aussaat und Wuchsbedingungen der verwendeten Pflanze siehe Kapitel 3.

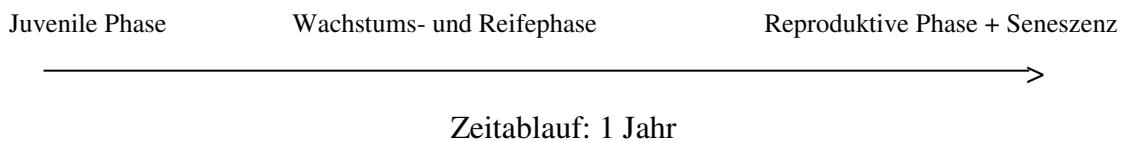
Nun ist noch zu beachten, dass der Lein keine besonderen Anspüche an den Boden stellt. Allerdings sollte er nicht staunass oder verschlämmungsgefährdet sein. Des Weiteren benötigt die Pflanze zum besseren Wachstum sog. Langtagsbedingungen (Diepenbrock, Fischbek) und Minimaltemperaturen zur Keimung von 2-3°C. Daher ist die Aussaat im Frühsommer zu bevorzugen.

Zum Schluss ist die Wasserversorgung zu beachten. In der Hauptwuchszeit, im Mai und Juni, sollten ca. 120mm Niederschlag fallen. Ansonsten sollte man die Pflanzen wässern um eine Ausreifung zu optimieren.

Die in Kapitel 3 genannte Einteilung in Alte, Mittlere und Junge Wurzel bezieht sich, wie beschrieben, auf die Wuchsdauer.

Allgemein betrachtet, lässt sich die Entwicklung höherer Pflanzen in drei Phasen gliedern:

- Juvenile Phase. Diese beginnt mit der Samenkeimung.
- Wachstums- und Reifephase. Sie beschreibt die Ausbildung der Organe und Gewebe und das vegetative Wachstum. Sie ist abgeschlossen, wenn die Reproduktionsorgane ihre volle Entfaltung erreicht haben.
- Reproduktive Phase und Seneszenz (energieabhängiger Alterungsprozess).



1.2 Der Hormonrezeptor

Hormone sind Signalstoffe des Körpers. Durch sie werden bestimmte Funktionen im Körper gesteuert und beeinflusst. Sie können entweder ins Blut abgegeben werden, zu Nachbarzellen diffundieren oder aber auf ihre Bildungszelle direkt wirken (Kreutzig). Es gibt verschiedene Arten von Hormonrezeptoren. Zu diesen gehören intrazelluläre und membranständige Rezeptortypen.

Ein Beispiel für letzteren ist der G-Protein-gekoppelte Rezeptor.

In der neuesten Arbeit von Sanden et al. 2010 konnte in ersten Beobachtungen festgehalten werden, dass der G-Protein-gekoppelte Estrogenrezeptor fähig ist, mit Intermediärfilamenten in Kontakt zu treten. Dies kann sowohl wichtig für die Regulation in epithelialen Zellen sein als auch eine Rolle spielen in der Relation der Ausprägung dieses Rezeptors und von Krebs.

In einer Arbeit von 2010 konnte die Arbeitsgruppe um Ignatov et al. nicht nur feststellen, dass ein G-Protein-gekoppelter Estrogenrezeptor in Endometriumzellen vorhanden ist. Sie zeigten weiterhin, dass dieser G-Protein-gekoppelte Estrogenrezeptor eine entscheidende Rolle bei Veränderung des Endometriums unter Tamoxifentherapie in der adjuvanten Behandlung des Mammakarzinoms spielt. Es ist bekannt, dass unter Tamoxifentherapie die Möglichkeit der erhöhten Proliferation von Endometriumzellen und eine damit einhergehende erhöhte Rate an Endometriumkarzinomen existiert.

Die Arbeit von Ignatov et al. zeigt einen Weg der Signaltransduktion bezüglich des Effektes von Tamoxifen auf Endometriumzellen über den G-Protein-gekoppelten Estrogenrezeptor.

Estrogene als Hormone, die nach ihrer Bildung ins Blut abgegeben werden, wirken über einen speziellen Rezeptor an ihrem Erfolgsorgan.

Der Vollständigkeit halber sollen noch die anderen Typen der membranständigen Hormonrezeptoren Erwähnung finden. Zu diesen gehört der Tyrosinkinase-Rezeptor, der Insulinrezeptor arbeitet nach diesem Prinzip.

Der ligandengesteuerte Ionenkanal ist auch ein membranständiger Rezeptor. Er vermittelt die Wirkung von Neurotransmittern.

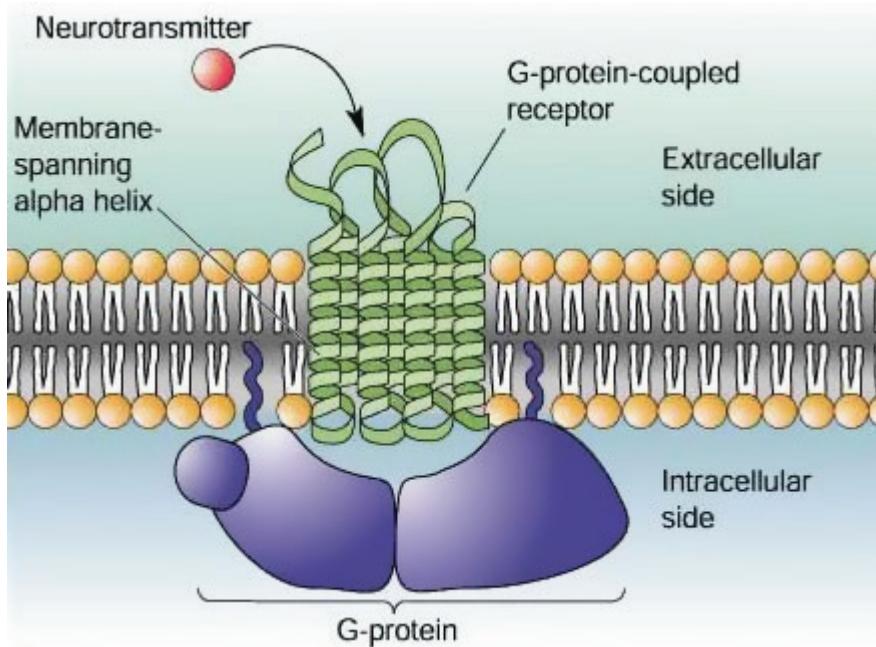


Abb.2 G-Protein-gekoppelter Rezeptor

(Quelle: <http://www.csuci.edu/alzheimer/images/gprotein.jpg>, letzter Zugriff 28.02.2011).

Die Beobachtungen in der hier vorliegenden Arbeit beziehen sich im Speziellen auf den intrazellulären Estrogenrezeptor.

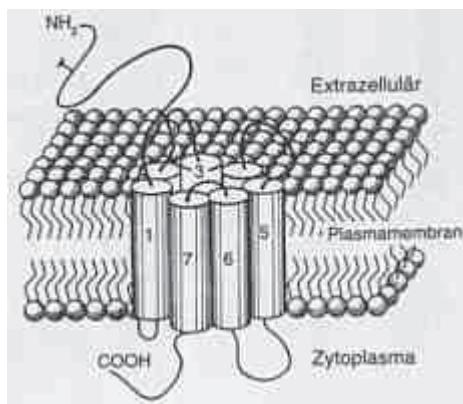


Abb.3 intrazellulärer Rezeptor

(Quelle: <http://www.zum.de/Faecher/Materialien/hupfeld/index.htm?/Faecher/Materialien/hupfeld/Cytologie/Prot-hel/prot-hel.htm>, letzter Zugriff 28.02.2011, Abb. 4 der Homepage).

Dieser spezielle Rezeptortyp wird intrazellulärer Rezeptor genannt, da das Hormon erst die Zellmembran durchdringen muss, bevor es in der Zelle von einem zytoplasmatischen Rezeptor gebunden werden kann. Nach dieser Bindung erfolgt die Beeinflussung der Transkription der DNA, so dass die nachfolgende Enzymproduktion

reguliert werden kann. Diese spezielle Rezeptorfamilie zeigt einen gemeinsamen Aufbau, in dem sich N-terminal Domänen befinden, die eine Aktivierung der Transkription vermitteln können. Daran schließt sich eine kurze DNA-Bindungseinheit an, gefolgt von der C-terminalen-Hormonbindungsdomäne. Diese C-terminale-Bindungsdomäne enthält die Signale für die Dimerisierung (Löffler, Petrides). Ist das Hormon nun gebunden, ändert der Rezeptor seine Konformation und dieser Hormon-Rezeptorkomplex kann an die DNA binden. Dies ermöglicht nun die Transkription verschiedener DNA-Sequenzen. Anschließend wird eine spezifische mRNA gebildet, die über die daraus folgende Proteinsynthese die Hormonwirkung vermittelt (Kreutzig). Somit kann der Estrogenrezeptor als Transkriptionsfaktor beschrieben werden.

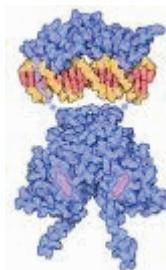


Abb. 4 Estrogenrezeptor

(Quelle: <http://de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/410707>, letzter Zugriff 28.02.2011).

Nun gibt es für das Steroidhormon Estradiol zwei spezifische intrazelluläre Rezeptoren: Den Estrogenrezeptor α (ER α) und den Estrogenrezeptor β (ER β), wobei ER α als der klassische Rezeptor bezeichnet wird. Er besteht aus 595 Aminosäuren und einer zentralen Domäne, die die DNA bindet. Zusätzlich findet sich noch eine Hormon-bindende Domäne am C-terminalen Ende.

Der ER β enthält 530 Aminosäuren. In der Domäne, die die DNA bindet, findet sich bei beiden Rezeptortypen eine Homologie von 95%, wohingegen in der Hormon-bindenden Domäne nur eine Homologie von 53% ausgemacht werden kann.

Man findet diese beiden Rezeptortypen nicht im gleichen Maße in allen Geweben. ER α findet sich vor allem im Endometrium, in den Stromazellen des Ovars und in Mammakarzinomzellen.

Der ER β wird vor allem in Granulosazellen nachgewiesen. Des Weiteren findet man ihn auch in sich entwickelnden Spermatiden, in Nieren, Darmmucosa, Lungenparenchym, Knochenmark, Knochen, Gehirn, Endothelzellen und Prostata (Löffler, Petrides).

1.3 Estrogen, ein Steroidhormon

Die Grundstruktur der Sexualhormone ist das Sterangerüst des Cholesterins. Sie werden in den Keimdrüsen beider Geschlechter, Testes und Ovarien, sowie in der Plazenta und in der Nebennierenrinde gebildet. Die Synthese erfolgt über die Zwischenstufen Progesteron und Androstendion.

Estrogene und Androgene werden von beiden Geschlechtern produziert. Lediglich in der Konzentration liegt der Unterschied.

Die Estradiolsynthese erfolgt im Ovar und in den Thekazellen des Graaf-Follikels unter dem Einfluss von LH und FSH. Die Zwischenstufen der Synthese verlaufen über Testosteron und Androsteron. Der entscheidende Schritt zur Synthese ist die Umwandlung von Testosteron in Estradiol durch den Cytochrom P450-Aromatase-Komplex, der auch als CYP 19 bezeichnet wird.

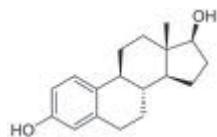


Abb. 5 Strukturformel Estrogen (nach: M. Szewczyk, Diplomarbeit, 2007).

Die physiologische Wirkung des Estrogens beruht auf der Wachstumsförderung der weiblichen Fortpflanzungsorgane und der Ausbildung sekundärer weiblicher Geschlechtsmerkmale (Kreutzig).

Allerdings ist erwiesen, dass Karzinome der Geschlechtsorgane häufig in Abhängigkeit von Estrogen wachsen beziehungsweise sich erst ausbilden.

Hier liegt oft eine Überexpression von Estrogenen zugrunde oder eine verstärkte Empfindlichkeit der Erfolgsorgane, die dann auf die Stimulation mit einem überschießenden Wachstum und einer Entartung reagieren.

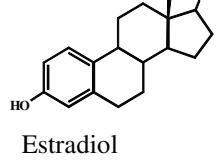
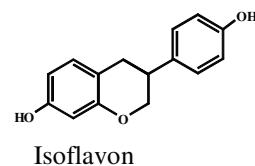
1.4 Phytoestrogene

Als Phytoestrogene werden Stoffe bezeichnet, die zu den sekundären Pflanzenstoffen gehören. Sie besitzen eine strukturelle Ähnlichkeit mit Estradiol, dem humanen Sexualhormon (s. Abb. 5).

Für die Pflanze erfüllen sie mehrere wichtige Funktionen, unter anderem findet man sie als Fraßgifte, als Blütenfarbstoffe und Lichtschutzsubstanzen. Ebenso wirken sie als antioxidative Agenzien.

Chemisch betrachtet sind Phytoestrogene Polyphenole, die sich vor allem drei Substanzklassen zuordnen lassen: den Lignanen, Isoflavonen und Coumestanen.

Abb. 6 Strukturähnlichkeit: Phytoestrogen und Estradiol
(nach: M. Szewczyk, Diplomarbeit, 2007).



Bei einem Vergleich zwischen westlicher Ernährung und der Ernährung im asiatischen Kulturkreis fällt auf, dass die Aufnahme von Phytoestrogenen in Asien wesentlich höher ist als im westlichen Kulturkreis. Dort werden Phytoestrogene eher in Form von Lignanen zugeführt, die sich besonders im Kürbis und im Leinsamen finden.

In Asien werden vor allem Isoflavone, die in vielen Sojaprodukten zu finden sind, konsumiert. Die Mengen werden mit 50 bis 60mg pro Tag beziffert. In Nordamerika oder Europa liegt die Menge von aufgenommenen Isoflavonen bei 5mg täglich (Kleine-Gunk, 2000).

Der deutliche Unterschied in der konsumierten Menge an Phytoestrogenen in diesen Kulturkreisen ist als Fingerzeig zu werten, dass Gewohnheiten der Ernährung eine nicht zu unterschätzende Rolle in der Inzidenz von hormonabhängig wachsenden Karzinomen und anderen Zivilisationserkrankungen spielen.

Eine besonders weit verbreitete und strukturell heterogene Gruppe der Phytoestrogene ist die der Lignane.

Sie sind in allen Getreidesorten und vielen ölhaltigen Früchten enthalten. Insbesondere in Samen wie Lein, Olive, Erdnuss, Sesam und Sonnenblume. Man kann Lignane auch in Früchten wie Äpfeln, Birnen, Kirschen, Pflaumen und Pfirsichen oder in Gemüse wie Kürbis, Karotten, Fenchel, Broccoli, Zwiebeln und Knoblauch finden (Tab. 1).

| Lebensmittel | Secoisolariciresinol | Matairesinol |
|---------------------|-----------------------------|---------------------|
| Leinsamen | 370.000 | 1100 |
| Kürbiskerne | 21.400 | n.b. |
| Roggen | 47-720 | 65 |
| Weizen | 8-280 | n.n. |
| Reis | 16-60 | n.n. |
| Nüsse* | 96-257 | 0-6 |
| Bohnen* | 64-3050 | n.n. bis Spuren |
| Spargel | 6510 | n.b. |
| Zwiebeln | 83 | 8 |
| Broccoli | 414 | 23 |
| Karotten | 192 | 3 |
| Kartoffeln | 10 | 6 |
| Weißwein, µg/l | 135-174 | 17-22 |
| Rotwein, µg/l | 686-1280 | 74-98 |

* verschiedene Sorten; n.n. unter der Nachweisgrenze; n.b. nicht bestimmt

Tab. 1 Gehalt an Secoisolariciresinol und Matairesinol als wichtige Vertreter der Lignane in ausgewählten Lebensmitteln (µg/100 g Trockengewicht) [Adlercreutz und Mazur, 1997; Horn-Ross et al., 2000].

Bei der Entstehung der Lignane verknüpfen sich zwei Phenylpropan-Einheiten (Coniferyl- oder Sinapylalkohol) über ein β -C-Atom der Arylseitenketten. Dieser Schritt erfolgt über Addition, oxidative Kopplung oder Polymerisation. Eine H_2O_2 -abhängige Peroxidase katalysiert die oxidative Kopplung von Monolignolen (Richter, 1996; Heldt, 2003).

Zu den wichtigen Vertretern der Lignane zählen Secoisolariciresinol und Matairesinol. Diese liegen in Pflanzen meist glycosidisch gebunden vor. Eine Glycosilierung erfolgt überwiegend mit D-Glucose oder D-Rhamnose (Kulling und Watzl, 2003). Ein wichtiger Vertreter ist das Secoisolariciresinoldiglycosid. Die Vorstufen der estrogenaktiven Lignane Enterolacton und Enterodiol sind Secoisolariciresinol und Matairesinol. Intestinale Mikroorganismen bilden Enterolacton und Enterodiol aus den genannten Vorstufen.

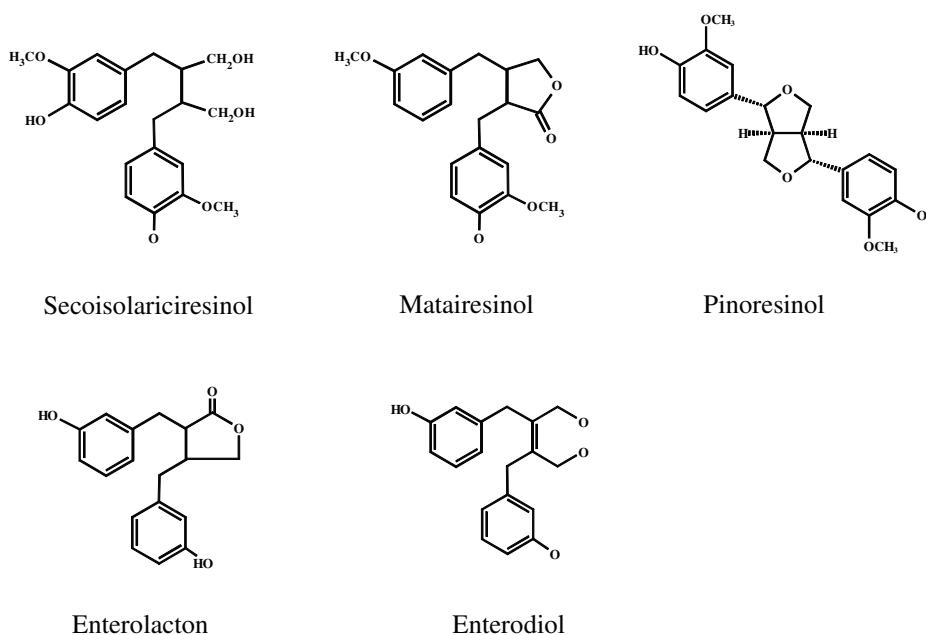


Abb. 7 Strukturformeln verschiedener Lignane (nach M. Szewczyk, Diplomarbeit 2007).

Die Bildung der Isoflavone erfolgt durch eine Arylwanderung aus Flavonoiden. Diese Isoflavone liegen als 3-Phenylchromonderivate vor und unterscheiden sich von denen in der Pflanzenwelt weit verbreiteten Flavonen durch die Position der Verknüpfung von Chromon- und Phenylring (Kulling und Watzl, 2003). Am weitesten in der Pflanzenwelt verbreitet ist die Form der Isoflavone, die glycosidisch gebunden vorliegt.

Häufig sind sie mit D-Glucose oder D-Rhamnose glycosiliert, selten auch mit anderen Kohlenhydraten.

Wichtige Aglyca sind Genistein, Daidzein und Glycitein (Kulling und Watzl, 2003).

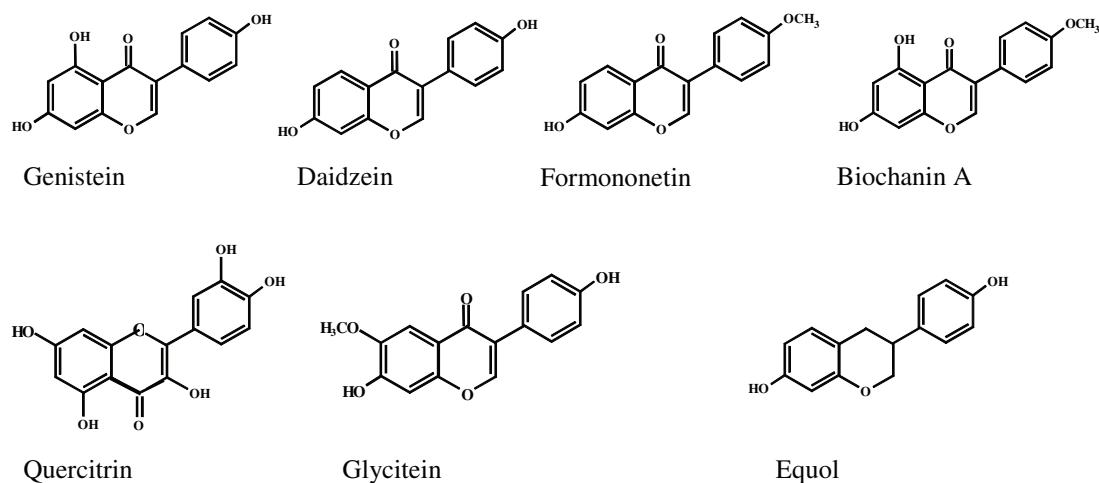


Abb. 8 Strukturformeln verschiedener Isoflavonoide (nach M. Szewczyk, Diplomarbeit, 2007).

Die Sojabohne war schon im Jahr 1931 Gegenstand einer Analyse, bei der hohe Konzentrationen an Isoflavonoiden nachgewiesen werden konnten (Foth, 2003). Andere Hülsenfrüchte wie Bohnen, Linsen oder Kichererbsen enthalten auch hohe Mengen an Isoflavonen (Tab. 2). Im Rotklee gelingt der Nachweis hoher Konzentrationen von Biochanin A und Formononetin (Abb. 7).

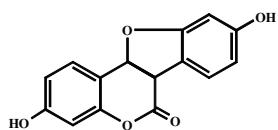
| Lebensmittel | Genistein | Daidzein | Glycitein | Biochanin A | Formononetin |
|--------------|-----------|----------|-----------|-------------|--------------|
| Sojabohnen | 30-92 | 20-52 | 10-14 | 0,01 | 0,07 |
| Sojamilch | 3-17 | 1-13 | 0-2 | n.n. | n.n. |
| Tofu | 8-20 | 7-11 | 0-5 | n.n. | n.n. |
| Sojasprossen | 2,0 | 2,5 | n.b. | n.n. | 0-0,2 |
| Kleesprossen | 0,1-0,4 | 0-0,1 | n.b. | 0,4-0,8 | 2,3-4,0 |
| Bohnen* | 0-0,7 | 0-0,02 | n.n. | 0-1,4 | 0-0,2 |
| Erbsen* | 0-0,6 | 0-7,3 | n.n. | n.n. | n.n. |
| Obst, Gemüse | 0-0,2 | 0-0,2 | n.n. | n.n. | n.n. |

*verschiedene Sorten; n.n. unter der Nachweisgrenze; n.b. nicht bestimmt

Tab. 2 Gehalt an verschiedenen Vertretern der Isoflavone in ausgewählten Lebensmitteln (mg/100 g Frischgewicht) [Horn-Ross et al., 2000].

Zu den phytoestrogen einzustufenden Vertretern der zahlreich vorhandenen Coumestanen gehören Coumestrol und 4'-Methoxycoumestrol. Sie sind vor allem in Gemüsekeimlingen (Lucerne und Alfalfa) und Sojasprossen vorhanden. In der Ernährung spielen Coumestane keine große Rolle, da sie in nur wenigen Pflanzen zu finden sind.

Als Phytoestrogen mit der höchsten estrogenen Aktivität gilt Coumestrol (Kulling und Watzl, 2003).



Coumestrol

Abb. 9 Beispiel für ein Coumestan (nach M. Szewczyk, Diplomarbeit, 2007).

1.5 Stoffwechsel der Phytoestrogene

Die in Lebensmitteln überwiegend vorkommende Form der Isoflavone ist die des Glycosidderivats, wobei diese Form wahrscheinlich nicht estrogen wirksam ist. Um nun eine Absorption möglich zu machen, erfolgt die Spaltung der Glycoside im Dickdarm durch mikrobielle Enzyme. Daraus werden die Aglyca freigesetzt (Setchell et al., 1988). Wegen ihrer geringeren Hydrophilität und Molmasse können die freien Verbindungen besser im Darm absorbiert werden.

Die Abspaltung des Zuckerrestes kann durch cytosolische Glucosidasen erfolgen. Diese sind im Dünndarm zu finden. Isoflavone, die nicht resorbiert wurden, gehen weiter in den Dickdarm. Eine Metabolisierung kann durch die hier ansässige Darmflora erfolgen. Nach ihrem Übertritt in den Blutkreislauf gelangen sie über die Pfortader in die Leber. Hier erfolgt ihr Umbau zu Monoglucuroniden. Diese Konjugate werden Bestandteil des systemischen Kreislaufs. Ihre Ausscheidung erfolgt sowohl biliär als auch renal. Gelangen sie mit der Gallenflüssigkeit in den Darm, werden sie durch die Enzyme der Darmflora erneut gespalten und die Aglyca resorbiert.

Somit unterliegen die Isoflavone ähnlich wie die körpereigenen Steroidhormone dem enterohepatischen Kreislauf (Kulling und Watzl, 2003).

Die Umwandlung der Lignane Secoisolariciresinol und Matairesinol erfolgt nahezu vollständig zu Enterolacton und Enterodiol. Dies geschieht unter Einfluss menschlicher Darmbakterien. Diese sorgen für eine Abspaltung von Zucker, eine Dehydroxylierung und Demethylierung (Kulling und Watzl, 2003). Die Lignane Pinoresinol, Lariciresinol und Syringresinol können ebenfalls in Säugerlignane umgewandelt werden (Heinonen et al., 2001). Die Arbeitsgruppe um Begum konstatierte, dass Lignin auch mittels Darmbakterien zu Enterolacton metabolisiert werden kann (Begum et al., 2004).

Studien auf biochemisch-epidemiologischer Basis zeigten, dass im Harn von Patientinnen mit Mammakarzinomen nur geringe Mengen der Abbauprodukte der Phytoestrogene vorhanden sind. Bei Vegetariern konnten wesentlich höhere Konzentrationen detektiert werden (Knasmüller et al., 2001). Die Plasma-Gesamtisoflavonoidkonzentration (Genistein, Daidzein und Equol) liegt bei Asiaten mit traditioneller Ernährung bei durchschnittlich etwa 870nM. Bei Europäern liegt sie bei 50nM.

Dagegen sind die Enterolactonkonzentrationen ähnlich hoch und liegen zwischen 10–40nM (Kulling und Watzl, 2003).

1.6 Fragestellung

Das Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik in Rostock hat sich in Vorarbeiten mit speziellen Pflanzenwirkungen in Bezug auf gynäkologische Tumorzellen beschäftigt.

Zu diesen zählen verschiedene Diplomarbeiten in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biowissenschaften der Universität Rostock

Zum Beispiel haben Abarzua et al. 2007 den Effekt von Extrakten der Leinpflanze auf die humanen Trophoblastzellen Jeg3 geprüft.

Die direkte Basis dieser Arbeit ist die Diplomarbeit von Szewczyk von 2007.

Darin zeigte sich, dass die Leinwurzel ein potentieller Kandidat zur Hemmung des Wachstums hormonabhängiger Karzinome *in vitro* ist.

Nun soll überprüft werden, ob die Wuchsdauer einen Einfluss auf die Wirkung der Leinwurzel hat.

Aus der internationalen Literatur sind keine Hinweise zur Wirkung der Leinwurzel bekannt. Gegenstand des Interesses war bisher der Leinsamen.

Was ist neu?

1. Es wird hinterfragt, inwieweit verschiedene Wachstumsphasen der Leinpflanze einen Einfluss auf die Hemmung des Tumorwachstums haben.
2. Es werden erstmals Ergebnisse zum Einfluss von Leinwurzelextrakten auf Mammakarzinomzellen in Abhängigkeit des Wachstumsalters dargestellt.
3. Durch die Verwendung estrogenrezeptorpositiver und -negativer Mammakarzinomzelllinien sollte es möglich sein, weitere Hinweise auf den Wirkmechanismus der estrogenrezeptorvermittelten Antikanzerogenität zu erhalten.

2. Zielstellung

In den vergangen Jahren stieg in unserer Gesellschaft immer mehr das Interesse an einer gesunden Lebensweise zur Erhaltung und Förderung der eigenen Gesundheit. Als Mittel zur Erreichung eines gesunden Körpers wurden hier Sport und Ernährung angesehen. Darüber hinaus sucht man auch abseits der schulmedizinischen Lehren nach Möglichkeiten, seinen Körper gesund zu halten oder bei der Bekämpfung einer Erkrankung zu unterstützen.

In Anbetracht der Tatsache, dass im asiatischen Raum hormonabhängige Karzinomerkrankungen, wie Mammakarzinom oder Prostatakarzinom, seltener vorkommen als in Deutschland, suchte man eine mögliche Ursache dafür. Eine Erklärung können die unterschiedlichen Ernährungsgewohnheiten sein. Diese treten nun in den Mittelpunkt der Forschung. Unter diesem Aspekt rücken die Phytoestrogene in den Focus, besonders in Hinblick auf die Krebsprävention oder als eine Alternative zur Hormonersatztherapie.

Die Sojapflanze gehört in Asien zu den Grundnahrungsmitteln und ist reich an Isoflavonen. Allerdings kann sie in Deutschland nicht kultiviert werden. Deshalb lag es nahe, nach einheimischen Alternativen phytoestrogenreicher Pflanzen zu suchen.

Die Leinpflanze ist eine einheimische Pflanze, die sich einfach kultivieren lässt und die schon seit Jahrhunderten in Mitteleuropa bekannt ist.

Sie verfügt über einen hohen Phytoestrogenanteil in Form von Lignanen. In vorangegangenen Arbeiten der Universitätsfrauenklinik Rostock ist bereits festgestellt worden, dass die Wurzel der Leinpflanze den vielversprechendsten Teil der Pflanze darstellt (Szewczyk, 2007).

In der vorliegenden Arbeit soll nun untersucht werden, inwieweit sich die Wachstumsdauer der Wurzeln auf ihren antiestrogenen Effekt auswirkt. Durch den Einsatz verschiedener Tests wird sowohl die Cytotoxizität der Leinwurzel als auch deren Einfluss auf die Proliferation und Stoffwechselaktivität von Krebszellen untersucht. Zum Einsatz kommen zwei verschiedene Mammakarzinomzellreihen, da so ein möglicher Unterschied zwischen ER-positiven und ER-negativen Zelllinien dargestellt werden kann.

Schon aus der mittelalterlichen Literatur (z. B. Paracelsus, Septem Defensiones, Basel 1589) und Voruntersuchungen ist bekannt, dass Pflanzenextrakte dosisabhängig wirken können. Daher werden die Extrakte in verschiedenen Konzentrationen angewendet. Ein Ziel ist es, herauszufinden, welches Wachstumsalter der Leinwurzel die höchste antikanzerogene Aktivität hat und das größte Potential für weitere Untersuchungen in sich birgt.

Teilweise wurden proliferationsfördernde Ergebnisse verschiedener Phytoestrogene im Zusammenhang mit Karzinomzellen beschrieben. Daher ist es wichtig, die Effekte der Extrakte auf Cytotoxizität und Zellentwicklung an gesunden Zellen zu testen. Im Idealfall werden Krebszellen beeinflusst, die nicht entarteten Zellen bleiben jedoch unbehelligt.

Die immunhistochemischen Untersuchungen erlauben eine Visualisierung der Hormonrezeptoren an der Zelloberfläche. Besonders der Nachweis der Estrogenrezeptoren α und β ist wichtig, da Phytoestrogene vor allem über diese Rezeptoren wirken. Der gleichzeitige Einsatz einer ER-positiven und einer ER-negativen Zelllinie soll Aufschluss über die Beteiligung des ER-Rezeptors am Wirkmechanismus der Phytoestrogene bringen.

Ergänzend gibt eine Pyrolyse-Feldionisationsmassenspektrometrische Analyse Aufschluss über die einzelnen Substanzklassen, die in den Wurzeln vorhanden sind. Sie soll auch zeigen, ob und in welchem Maße Phytoestrogene in den Wurzeln stecken oder in welchem Wurzelalter sie sich entwickeln und eine Wirkung hervorrufen.

3. Material und Methoden

3.1 Pflanzenmaterial

Es handelt sich um Wurzeln der Pflanze Linum Usitatissimum, Sorte Barbara. Sie wurden in drei verschiedenen Alterungsstadien geerntet. Die Junge Wurzel wurde Ende Mai 2007 ausgesät und Mitte Juni 2007 geerntet.

Die Mittlere Wurzel wuchs von Ende Mai 2007 bis Mitte Juli 2007, die Ernte der Alten Wurzel fand, nach der Aussaat Ende Mai 2007, zum Ende August 2007 statt.

3.2 Extraktion

Die Extraktion des Materials aus den Wurzeln erfolgt nach der Methode der Lignanextraktion nach Luyengi et al.

Dazu werden nach oben genannten Zeitraum 3,8g Wurzeln angefroren und im flüssigen Stickstoff zermörsert. Das daraus entstandene feine Pulver wird mit 33,8ml Methanol in einen 2-Liter-Rundkolben überführt.

Nach Zugabe von Glasperlen zur Vermeidung des Siedeverzugs kocht die Flüssigkeit unter Rückfluss bei 70°C für 15 Minuten. Der Rückfluss soll verhindern, dass leicht flüchtige Substanzen den Rundkolben verlassen. Die sich während der Reaktion bildenden Dämpfe können an der Glaswand kondensieren und gehen damit der Reaktionsflüssigkeit nicht verloren.

Die Flüssigkeit wird nach dem Abkühlen mittels Faltentrichter zweimal filtriert. Dabei bleibt eine hellgrüne, klare Flüssigkeit von ca. 20ml zurück, die in einen 100ml-Rundkolben überführt und bei 40°C und einem Druck von 320-40mbar in einem Vakuumrotationsverdampfer nicht ganz bis zur Trockne eingeengt wird. Dazu wird der rotierende Rundkolben, in dem sich die Probe befindet, in einen Heizkessel getaucht. Durch die Rotation im Heizbad verdampft das Lösungsmittel Methanol als feiner Film an der Kolbeninnenwand und strömt in den Kühler. Dort kann der Methanoldampf kondensieren und in einen Auffangkolben abfließen.

Durch das Anlegen des Vakuums steigt die Destillationsleistung, da die Siedetemperatur gesenkt wird.

Nach der Einengung wird die Probe in 3ml Aqua dest. aufgenommen und die Schwebstoffe im Ultraschallbad gelöst.

Danach erfolgt das fünfmalige Ausschütteln mit ca. 5ml Ethylacetat zur Auf trennung der Lignane. Dabei zeigt sich eine deutliche Phasentrennung. Die obere Phase ist die Ethylacetat-Phase, sie ist grün und klar und enthält die gelösten Extrakte. Die untere Phase enthält Schwebstoffe. Mit einer Pasteurpipette wird die obere Phase abgesogen und in einen Rundkolben überführt, dessen Leergewicht vorher bestimmt wird.

Diese Probe wird wieder im Rotationsverdampfer eingeengt und im Exsikkator über Nacht aufbewahrt. Der eingetrocknete Extrakt wird in entsprechender Menge Ethanol aufgenommen und im Ultraschallbad gelöst. Dieser endgültige Extrakt wird in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C bis zum Gebrauch aufbewahrt.

3.3 Zellkulturlinien

Die Extrakte werden an zwei verschiedenen Mammakarzinomzelllinien getestet. Die Zelllinien MCF7 und BT20 sind kommerziell erworben bei der deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Abteilung menschliche und tierische Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland).

Als Kontrollzellreihe dienen Fibroblastzellen. Diese stammen von Epithelgewebe aus den Beständen der Universitätsfrauenklinik Rostock. Laut Literatur (LGC Promocell) exprimieren MCF7 sowohl den Estrogenrezeptor α als auch β , BT20 ist dagegen Estrogenrezeptor negativ.

Der Androgenrezeptor findet sich bei MCF7-Zellen, bei BT20-Zellen ist er in absteigender Konzentration vorhanden.

Bei den Fibroblasten zeigt sich eine mäßige Expression von ER α . ER β und der Progesteronrezeptor wurden nachgewiesen.

Bis zur Aussaat lagerten die Zellen in einem Medium aus entsprechenden Nährösungen in flüssigem Stickstoff. So wurden jeweils 1×10^6 Zellen mit DMEM (MCF7), siehe 3.4, RPMI (BT20), Fibroblast Growth Mix (Fibroblasten), 20% fetalem Kälberserum (FKS) und 10% DMSO in Einfriertubes aufbewahrt.

3.4 Zellkulturmedium

Die MCF7-Zellen wurden nach dem Auftauen in DMEM suspendiert. Dabei handelt es sich um Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium, einer Lösung mit 4,5g/l Glucose und L-Glutamin. Dem setzt man noch 10% fetales Kälberserum als Protein- und Wachstumskomponente und 5ml Penicillin/Streptomycin und 2,5ml Amphotericin B zu. Penicillin und Streptomycin sind Antibiotika, die die bakterielle Besiedlung der Zellen verhindern sollen.

Amphotericin B ist ein Fungizid, das das Wachstum von Pilzen verhindern soll.

Bei den BT20-Zellen wurde RPMI-Medium, bei den Fibroblasten Fibroblast Growth Medium 2 + Supplement Mix verwendet, ebenfalls beide mit o. g. antibakteriellen und fungiziden Zusätzen.

3.5 Zellkultivierung

Nach dem Auftauen müssen die Zellen vom DMSO befreit werden. Dazu überführt man die Zellen in ein 50ml Röhrchen und gibt 15ml Medium dazu. Nach Zentrifugation der Zellsuspension für 5 Minuten mit 1000 Umdrehungen pro Minute und ohne Bremse, dekantiert man den Überstand ab. Die Zellen werden in 5ml Medium resuspendiert und in eine kleine Zellkulturflasche mit Bakterienfilter gegeben. Gelagert werden die Flaschen im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂. Durch den Bakterienfilter ist ein kontinuierlicher Gasaustausch möglich.

Je nach Wachstumsverhalten, erfolgt alle zwei Tage ein Mediumwechsel. Dabei wird das vorhandene Zellkulturmedium abgenommen und durch die gleiche Menge frischen Mediums ersetzt.

Findet ein starkes Zellwachstum statt, werden die Zellen in die nächst größere Zellkulturflasche passagiert. Dazu wird alles Medium aus der alten Flasche entfernt und mit 5ml PBS- Puffer gespült. Der PBS-Puffer soll verhindern, dass sich das Trypsin, statt an die Zellen, an das FKS bindet. Dieser wird wieder abgesaugt und durch 5ml Trypsin-EDTA ersetzt. Die Flasche inkubiert nun für 5 Minuten bei 37°C und 5% CO₂.

Das Trypsin soll die Peptidbindung der Zellen an den Flaschenboden lösen. Zum Abstoppen des Andauvorganges wird die eineinhalbache Menge DMEM zugegeben und die Zellsuspension bei 1000 Umdrehungen 5 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert, das Zellpellet in der entsprechenden Menge Medium aufgelöst und in die nächst größere Zellkulturflasche gegeben.

Diese Schritte sind bei der Passage der Fibroblasten ähnlich, jedoch fungiert hier als Waschpuffer Hepes und die Trypsinierung wird mittels TNS gestoppt. Nach Zentrifugation und dem Abdekantieren des Überstandes wird das Zellpellet in Fibroblast Growth Medium gelöst.

3.6 Ermittlung der Lebendzellzahl

Vor der Durchführung der immunhistochemischen Beurteilung eventueller Hormonrezeptoren auf den Zellen oder vor Durchführung der Testreihen zu Cytotoxizität und Zellproliferation, ist eine Bestimmung der Lebendzellzahl in der entsprechenden Aussaat erforderlich.

Dazu werden die Zellen, nach Abnahme des Mediums und Spülen mit PBS, mit Trypsin-EDTA bei 37°C und 5% CO₂ 5 Minuten lang inkubiert. Durch das Trypsin-EDTA werden die Peptidbrücken zwischen den Zellen und der Zellkulturflasche gelöst. Nach Zugabe der eineinhalbachen Menge Medium zur Trypsin-Zellsuspension erfolgt die Zentrifugation bei 1000 Umdrehungen und 20°C für 5 Minuten.

Nach Abdekantierung des Überstandes werden die Zellen in 20ml Medium aufgeschwemmt. Von dieser Lösung werden 2ml abgenommen und mit 8ml Medium gemischt. Von diesen 10ml Zellsuspension gibt man 20µl in 360µl Medium und 20µl Trypanblau in ein Eppendorfreaktionsgefäß. Somit erreicht man eine Verdünnung von 1:20.

Damit kann die Lebendzellzählung durchgeführt werden. Dazu werden 10µl dieser Mischung auf jede Seite einer Bürker-Zählkammer gegeben und diese unter das Mikroskop gelegt. So ist es möglich, die aufleuchtenden Zellen zu zählen, die den lebenden Zellen entsprechen. Sind die Zellen tot, kann das Trypanblau in sie eindringen und färben. Somit gelingt die Unterscheidung.

Von der Bürker-Zählkammer werden 5 x 5 Quadrate ausgezählt und die ermittelte Zellzahl wird in folgende Formel eingesetzt:

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

Mittels dieser Formel kann man nun die benötigte Verdünnung ermitteln, da in jedes Well der für die Immunhistochemie genutzten teflonbeschichteten Objektträger 300 μ l Zellsuspension pipettiert werden, so, dass 100 000 Zellen/ml vorhanden sind.

(Beispiel: Bei 4 gezählten Zellen handelt es sich durch die genannte Formel um 400 000 Zellen, für die Konzentration von 100 000 Zellen/ml verdünnt man 1:4.)

3.7 Immunhistochemie

Zur Durchführung der Immunhistochemie benötigt man sterilisierte, teflonbeschichtete Objektträger. Bevor diese mit der auf Hormonrezeptoren zu prüfenden Zellsuspensionen, im vorliegenden Fall Zellen der Zelllinien MCF7 und BT20 und Fibroblasten, bestückt werden, wird eine feuchte Kammer vorbereitet, um den Zellen auch hier gute Lebensbedingungen zu schaffen. Dazu wird ein mit Aqua dest. befeuchtetes Papiertuch in eine Petrischale gegeben. Darauf wird dann der Objektträger gelagert, nachdem in jedes Well 300 μ l der Zellsuspension pipettiert wurden. Die Objektträger lagern dann im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂.

48 Stunden später wird das überschüssige Medium von den Objektträgern gekippt und sie werden weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet.

Nach der Trocknung erfolgt die Fixation in 4%igem Formalin. Dazu wird Formalin auf jedes Well getropft und wirkt für 20 Minuten ein. Nach Spülung mit PBS trocknen die Objektträger für weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur.

Am nächsten Tag werden die Objektträger beschriftet (Datum, Zellreihe und Antikörper) und in eine dunkle, feuchte Kammer gelegt. Nach erneuter Spülung mit PBS und 5 minütiger Inkubation erfolgt das Pipettieren von Normal Serum auf jedes Well. Dabei handelt es sich um R.T.U. Normal Horse Serum des ImmPress[®] Reagent Kit der Vector Laboratories, Linaris Biologische Produkte GmbH.

Nach 20minütiger Inkubation wird das Normal Serum abdekantiert und die zu prüfenden Antikörper pipettiert.

Es handelt sich dabei um ER α -Antikörper in 1:10-Verdünnung, einen ER β -Antikörper in 1:10-Verdünnung, einen Progesteron-Rezeptor (fertig) von der Maus und zwei Androgenrezeptor-Antikörper in 1:100- und 1:200-Verdünnung.

In das untere Well kommt jeweils Normalserum zur Negativkontrolle.

Die Objektträger inkubieren so 24 Stunden in der feuchten, dunklen Kammer im Kühlschrank.

Nachdem die Antikörper abdekantiert und die Objektträger mit PBS gespült wurden, kommt in jedes Well ein Tropfen Sekundär- Antikörper „Universal Anti-Mouse/Rabbit Ig“, welches wieder für 30 Minuten bei Raumluft in der Schachtel inkubiert.

Als nächster Schritt erfolgt die Färbung mit „HistoPrimeTM“, HistoGreen, Substrat für Peroxidase“. Nach Fertigung der Färbelösung, direkt vor dem Gebrauch, kann man sie auf jedes Well auftragen. Die präparierten Objektträger inkubieren unter Sichtkontrolle, bis eine Grünfärbung eintritt (ca. 5 Minuten).

Nach Spülung der Objektträger mit PBS und Aqua dest., erfolgt die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 50%igem, 75%igem, 100%igem Alkohol und zuletzt reinem Xylol für jeweils 30 Sekunden.

Anschließend werden Deckgläschchen mittels Vecta MountTM Permanent Mounting Medium auf den Objektträgern fixiert und es erfolgt die Auswertung unter dem Mikroskop.

Dabei bedeuten lichtmikroskopisch grün erscheinende Zellen eine positive Reaktion mit dem Primärantikörper, das heißt, sie sind Rezeptor-positiv.

Bei den getesteten MCF7-Zellen handelt es sich um ER α -, ER β -, Progesteron-Rezeptor-, und Androgen- Rezeptor- positive Zellen.

Die getesteten BT20-Zellen sind ER α -, ER β -negativ und Progesteronrezeptor positiv. Bei der 1:200-Verdünnung des Androgenrezeptors zeigt sich ebenfalls eine positive Reaktion.

Die getesteten Fibroblasten weisen eine schwache positive Reaktion auf ER α auf. ER β und PR sind negativ (siehe Abbildung 13).

3.8 Untersuchungen zur Cytotoxizität und Zellproliferation

Zur Untersuchung der Zellproliferation und Cytotoxizität kamen der LDH-Cytotoxizitätstest, der MTT- und der BrdU-Zellproliferationstest der Firma Roche zum Einsatz.

Die unten beschriebenen Schritte zur Durchführung der Tests beruhen auf den Anwendungshinweisen der Firma Roche aus den Instruction Manuals der Jahre 2006 (BrdU) und 2007 (LDH und MTT).

Die beschriebenen Schritte der Immunhistochemie stammen aus den Instruktionen der Firma Vector Laboratories Inc.

Die Vorbereitungen für diese Tests sehen identisch aus. Zuerst werden die Zellen nach vorheriger Lebendzellzahlbestimmung in 96er-Wellplatten ausgesät. Die Zellzahl beläuft sich hier auf 5×10^5 Zellen/ml. Diese werden in DMEM aufgenommen.

Von dieser Zellsuspension sät man 100µl/Well aus und inkubiert sie für 24 h im Brutschrank bei 5% CO₂ und 37°C.

3.8.1 Aufarbeitung der Extrakte und der Kontrollen

Zur Durchführung der *In-vitro* Tests müssen die Extrakte in Ethanol (96%) aufgenommen und im Ultraschallbad gelöst werden. Es wird eine Stammlösung mit 100mg/ml hergestellt, die die Basis für die weiteren Verdünnungen liefert.

Als Positivkontrollen dienen 17 β -Estradiol und Tamoxifen. Deren Verdünnungsstufen werden ebenfalls mit Ethanol (96%) gelöst und mit den Extraktten bei -18°C gelagert. Eine weitere 1:100-Verdünnung, die mit Auftragen auf die Zellen erfolgte, sorgte dafür, dass Ethanol in einer nicht-toxischen Konzentration vorlag.

| Wurzelextrakt in $\mu\text{g}/\text{ml}$ | 17 β - Estradiol in $\mu\text{g}/\text{ml}$ | Tamoxifen in $\mu\text{g}/\text{ml}$ |
|--|---|--------------------------------------|
| 0,01 | 0,01 | 0,01 |
| 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| 1 | | |
| 10 | | |
| 50 | 50 | 50 |
| 100 | | |
| 500 | | |
| 1000 | | |

Tab. 3 Verdünnungsstufen der Extrakte und der Kontrollen.

Die Tabelle zeigt die Verdünnungsstufen der Extrakte bzw. der Positivkontrollen, die auf die Zellen einwirken.

Als weitere Kontrollen werden bei allen Tests und Bestimmungen zwei Negativkontrollen mitgeführt. Die Negativkontrolle 1 besteht aus der reinen Zellsuspension, das heißt Zellen + Zellkulturmedium.

Der Negativkontrolle 2 mischt man zusätzlich zur Zellsuspension noch Ethanol (96%), das Lösungsmittel der Extrakte, zu. Die Endkonzentration des Ethanolos liegt bei 1%.

Das Mitführen der Negativkontrollen 1 und 2 bei jedem Test erlaubt den Rückschluss, dass Ethanol keinen toxischen Effekt auf die Zellen ausübt.

Zusätzlich wird auf jeder 96er-Wellplatte ein Blindwert mitgeführt. Dieser besteht nur aus Zellkulturmedium ohne Zellen.

3.8.2 Vorbereitung der Platten

Aufgrund der Vorversuche des Forschungslabors ergibt sich als optimale Zellzahl für die Versuche zur Cytotoxizität und Zellproliferation eine Zellzahl von 5×10^5 Zellen/ml. Durch diese Zellzahl kann nach einer Inkubation von 24h im Brutschrank eine Konfluenz von 80% erreicht werden. Des Weiteren liegt die Zellzahl nicht zu hoch, was sich sonst negativ auf die Zellproliferation auswirken kann.

Nach Bestimmung dieser Zellzahl erfolgt die Aussaat der Zellsuspension auf eine 96-Well-Mikrotiter-Platte und erneuter Inkubation von 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ erfolgt die Durchführung der Tests zur Bestimmung der Cytotoxizität und der Zellproliferation.

3.8.3 LDH-Cytotoxizitätstest

Prinzip:

Durch diesen Test lässt sich der Zelltod bzw. die Zellyse quantitativ bestimmen, indem man die Lactat-Dehydrogenase-Aktivität im Überstand toter Zellen misst, da diese ihren Zellinhalt nach dem Tod in das Medium abgeben. Die Lactat-Dehydrogenase (im Folgenden LDH) kommt ubiquitär vor und ist für dieses Testverfahren sehr gut geeignet. Sie liegt stabil im Kulturmedium vor, ist resistent gegen den Abbau von Proteasen und kommt in ausreichender Menge in den Zielzellen vor.

In vivo wird die Reduktion von Pyruvat in Lactat im Rahmen der Glykolyse durch die LDH katalysiert. Das benötigte Reduktionsmittel ist NADH, das zu NAD^+ reduziert wird.

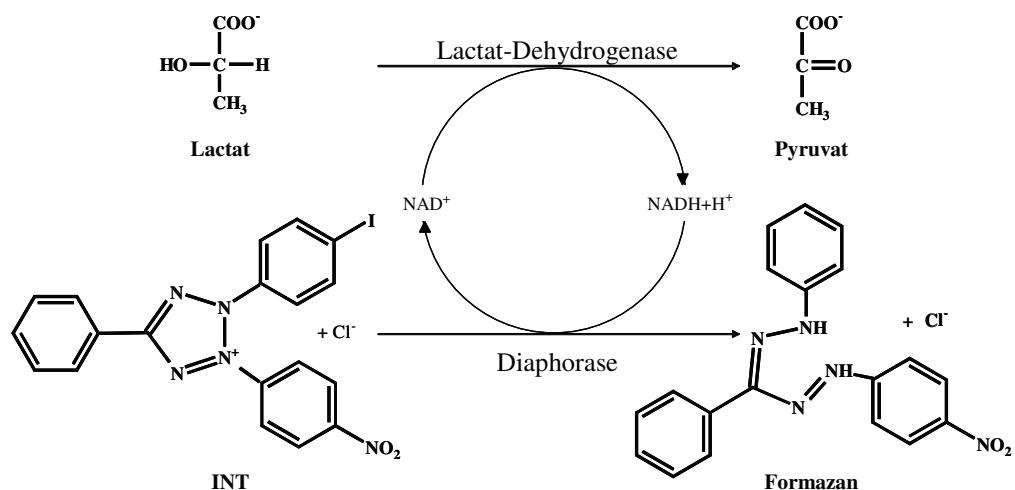


Abb. 10 Prinzip des LDH-Testes (nach Testkitbeschreibung Roche GmbH).

Im zweiten Schritt dieses *in vitro* ablaufenden Tests transferiert die Diaphorase H^+/H vom NADH/ H^+ zum gelben Tetrazoliumsalz INT (2-[4-iodophenyl]-3-[a-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid). INT wird in diesem Schritt zu Formazan reduziert.

Am ELISA-Reader wird das so entstandene Formazan photometrisch quantifiziert. Die Menge des entstandenen Formazans ist proportional zu der LDH-Aktivität im Überstand und korreliert mit der Anzahl toter Zellen.

Durchführung:

Nach 24stündiger Inkubation findet ein Mediumwechsel auf den Platten statt. Hierbei wird das Medium mit 10%igem FKS-Zusatz entfernt und durch 198 μ l DMEM mit 1%igem FKS-Zusatz (aufgrund der LDH-Aktivität des FKS) ersetzt. Zusätzlich zu dem Mediumwechsel erfolgt die Zugabe der Testextrakte in o. g. Konzentrationen und der Kontrollen (Tamoxifen, 17 β -Estradiol). Darüber hinaus ist für den LDH-Test noch eine weitere Kontrolle nötig. Sie besteht aus 198 μ l Medium mit Zellen und 1% Triton X-100 (2 μ l). Durch diese High Control kann die maximale LDH-Aktivität der Zellen quantifiziert werden.

Nach weiteren 24 Stunden Inkubationszeit mit den Testsubstanzen kann die LDH-Aktivität im Überstand gemessen und mit folgender Formel der prozentuale Anteil toter Zellen errechnet werden:

$$\text{Cytotoxizität (\%)} = \frac{\text{Extinktion}_{\text{Probe}} - \text{Extinktion}_{\text{Negativkontrolle 2}}}{\text{Extinktion}_{\text{High Control}} - \text{Extinktion}_{\text{Negativkontrolle 2}}} \times 100$$

1.Schritt:

Bestimmung und Einstellung der Zellzahl auf 5×10^5 Zellen/ml.

Aussaat von 100 μ l in jedes Well einer 96er-Wellplatte.

Inkubation für 24h im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂).

2.Schritt:

Mediumwechsel: 198 μ l DMEM mit 1% FKS.
2 μ l Wurzelextrakt/Well bzw. Kontrollen.
24h Inkubation im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂).

3.Schritt:

100 μ l des Überstandes in eine neue 96er-Wellplatte pipettieren.

4.Schritt:

100 μ l/Well Reaction mixture (frisch zubereitet) zum Überstand.
10 bis 30min Inkubation bei Raumtemperatur in abgedunkelter Atmosphäre.

5.Schritt:

Abstoppen der Reaktion mit 1N HCl.

6. Schritt:

Messung am ELISA-Reader bei 490nm, Referenz 620nm.

3.8.4 MTT-Zellproliferationstest

Prinzip:

Beim MTT-Test handelt es sich um einen nicht-radioaktiven Test zur Quantifizierung der Zellproliferation und -entwicklungsähnlichkeit.

Er basiert auf der Spaltung des gelben Tetrazolium Salzes MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromid) in den violetten Formazan-Farbstoff durch mitochondriale Dehydrogenasen des Succinat-Tetrazolium-Reduktase-Systems. Dieses Enzymsystem ist nur in vitalen Zellen aktiv. Somit dient die Umwandlung von MTT zu Formazan als Maß für die Viabilität der Zellen. Die Intensität der Farbänderung ist proportional zu Zellzahl und Stoffwechselaktivität. Die Quantifizierung dieser Daten erfolgt durch eine spektrometrische Bestimmung der Absorption des entstandenen Formazans am ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 570nm. Diese Wellenlänge wurde gewählt, weil das Substrat MTT in diesem Bereich nicht absorbiert. Da das Formazan in wässriger Lösung leicht kristallisiert, müssen diese Kristalle vor der Messung durch die Zugabe von Lösungsmitteln vollständig gelöst werden.

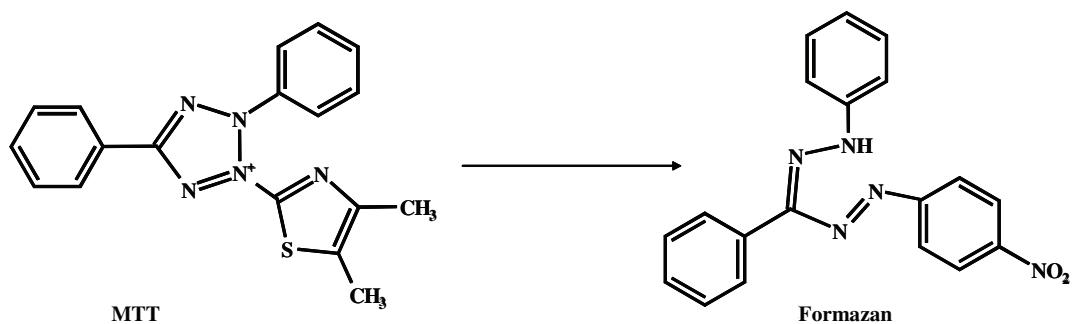


Abb. 11: Prinzip des MTT-Tests (aus der Testkitbeschreibung Roche GmbH).

Durchführung:

Die Zellen wurden auf 96er-Wellplatten ausgesät. Nach 24stündiger Inkubation im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) konnten die Extrakte in den verschiedenen Konzentrationen und die Kontrollen dazugegeben werden. Außer des Blindwertes wurde keine weitere Kontrolle mitgeführt.

1. Schritt:

Einstellen der Zellzahl auf 5 x 10⁴ Zellen/ml.

Zellkultivierung: 100µl/Well Zellsuspension in eine 96er-Wellplatte.

24 h Inkubation im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂).

2. Schritt:

Zugabe von 1µl Extrakt/Well bzw. 17β-Estadiol und Tamoxifen in den entsprechenden Konzentrationen.

Inkubation im Brutschrank, (24h, 37°C, 5 % CO₂)

3. Schritt:

Zugabe von 10µl/Well MTT Labeling Reagent

Inkubation im Brutschrank:

MCF7 4h

BT20 4h

Fibroblasten 4h

Zugabe von 100µl/Well Solubilization Solution

Inkubation im Brutschrank (24h, 37°C, 5 % CO₂)

4. Schritt:

Auslesen am ELISA-Reader bei 570 nm

3.8.5 BrdU-Zellproliferationstest

Prinzip:

Der BrdU-Zellproliferationstest ist ein colorimetrischer Immunoassay zur Quantifizierung der Zellproliferation. Er basiert auf der Messung des Einbaus des Pyrimidinanalogs BrdU (5-Bromo-2,-Deoxyuridin) anstelle von Thymidin in die DNA.

Nach Zellkultivierung und Behandlung mit den Leinwurzelextrakten und Kontrollen erfolgt die Zugabe des Thymidinanalogs BrdU. Während der nun folgenden Inkubationzeit wird BrdU anstelle des Thymidin durch die DNA-Polymerase in die DNA der proliferierenden Zellen eingebaut. Anschließend werden die Zellen fixiert und die DNA denaturiert. Diese Denaturierung erlaubt dem nun hinzugefügten Antikörper eine erleichterte Bindung an die BrdU-Bausteine der neusynthetisierten, zellulären DNA. Bei dem verwendeten Antikörper handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper von Maus-Maus-Hybridzellen, der mit Peroxidase konjugiert ist. Die Quantifizierung des Immunkomplexes erfolgt mittels einer Substrataktion mit Farbumschlag. Als Substrat dient in diesem Fall TMB (Tetramethylbenzidin).

Die Absorption des Substratproduktes wird bei entsprechender Wellenlänge am ELISA-Reader gemessen, wobei die Stärke der Färbung und somit der Absorption mit der Menge neu synthetisierter DNA und dementsprechend der Anzahl proliferierender Zellen korreliert.

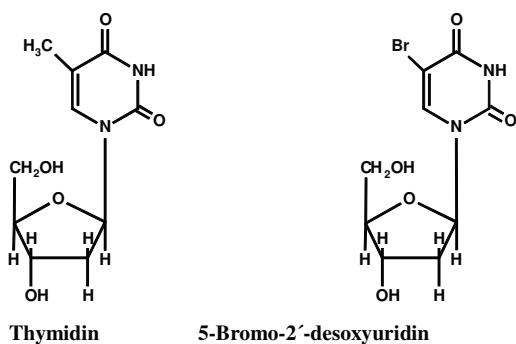


Abb. 12 Prinzip des BrdU-Testes: Einbau von BrdU anstelle von Thymidin in die DNA
(nach Testkitbeschreibung Roche GmbH).

Durchführung:

Nach Zellzählung und -aussaat in 96er-Wellplatten konnten die Zellen 24h auf den Platten adhärieren. Danach erfolgte die Zugabe des Leinwurzelextraktes in den verschiedenen Konzentrationen und der Kontrollen. Zusätzlich zu den Positivkontrollen 17 β -Estradiol und Tamoxifen und den Negativkontrollen 1 und 2 wurde der Blindwert und eine Backgroundkontrolle mitgeführt. Der Blindwert ist nötig, um die Information über eine eventuelle unspezifische Bindung des BrdU und anti-BrdU-POD an die Mikrotiterplatte zu gewinnen. Die Backgroundkontrolle gibt Aufschluß darüber, ob eine unspezifische Bindung von anti- BrdU-POD an die Zellen in Abwesenheit von BrdU erfolgt.

Wegen verschiedener Wachstumsraten der Zellen, war es nötig, die BrdU-labeling- und Substratinkubationszeit zu variieren.

1. Schritt:

Zellzahlbestimmung und -kultivierung: 100 μ l/Well Zellsuspension in 96er-Wellplatte

Inkubation für 24h im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂)

2. Schritt:

Zugabe von 1 μ l/Well Extrakt bzw. Kontrollen

24h Inkubation im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂)

3. Schritt:

Markierung mit 10 μ l/Well BrdU

Inkubation im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂)

MCF7: 3 h

BT20: 3 h

Fibroblasten: 4 h

Entfernung des Mediums

4. Schritt:

200 μ l/Well FixDenat

30 min Inkubation bei Raumtemperatur

Entfernung des Mediums

5. Schritt:

100 μ l/Well Anti-BrdU-POD-working solution
60min Inkubation bei Raumtemperatur
Entfernung der Anti-BrdU-POD-working solution

6. Schritt:

3 x Waschen mit Waschpuffer

7. Schritt:

100 μ l/Well Substratlösung
Inkubation für 10 min bis 30 min bei Raumtemperatur entsprechend der Blaufärbung

8. Schritt:

Abstoppen der Reaktion mit 25 μ l/Well 1 M H₂SO₄

9. Schritt:

Messung am ELISA-Reader bei 450 nm, Referenz bei 620nm

3.9 Pyrolyse-Feldionisationsmassenspektrometrie

Die Durchführung der Pyrolyse-Feldionisationsmassenspektrometrie erfolgte in meiner Anwesenheit von Dr. Schlichting, STC Soil of Biotechnology, Groß Lüsewitz.

Bei der Pyrolyse-Feldionisationsmassenspektrometrie erfolgt die Auftrennung der eingesetzten Probe in ihre einzelnen Bestandteile.

Dazu werden 5µl der Probe bzw. des Extraktes in einen Quarzbehälter gegeben. Dieser wird in einem Mikroheizer platziert und in die Ionenquelle eingebracht. Durch einen kurzen Abbauschritt im Vakuum mit gleichzeitig angelegter Heizrate von 6,66K je Scan (entspricht ca. 0,9K s⁻¹) werden die in der Probe enthaltenen biologischen Makromoleküle in ihre chemischen Untereinheiten zerlegt. Die thermische Verdampfung erfolgt in kürzester Zeit und mit minimalen Substanzmengen. Durch das sehr hohe elektrische Feld (FI) erfolgt die Ionisierung besonders schonend. Die unmittelbare Zuführung der Molekülionen zum Massenspektrometer begünstigt die Bildung und Detektion primärer thermischer Bruchstücke. Diese lassen sich dann mit der Struktur der zu untersuchenden Substanz korrelieren.

Die durch den thermischen Abbau entstandenen molekularen Bruchstücke ionisieren im Folgenden hohen elektrischen Feld (FI Emitter +4,8kV, Gegenelektrode -5,5kV). Die gasförmigen Ionen werden im Finnigan MAT 900 Massenspektrometer beschleunigt, getrennt, elektrisch verstärkt und registriert.

91 Massenspektren können, während der Aufheizphase von 110°C bis 700°C, in den 12 Minuten der Analysendauer im Bereich von 50 bis 700 Dalton registriert und im Datensystem gespeichert werden.

Für diese Arbeit erfolgte die Analyse von 5 Proben. Zum einen die eingeengten und in Ethanol aufgenommenen Stammlösungen der Alten, Mittleren und Jungen Wurzel, zum anderen noch vorhandenes Rohmaterial der Alten und Mittleren Wurzel.

3.10 Auswertung

Die Testreihen zur Bestimmung von Zellproliferation und Cytotoxizität (LDH-, MTT-, BrdU-Test) wurden für jede Zelllinie drei- bis viermal wiederholt und jede Wurzelextraktkonzentration und Kontrolle in Vierfachwiederholung bestimmt. Zur Auswertung der Ergebnisse wurde nach Abzug des Blindwertes aus den entsprechenden Konzentrationen der Mittelwert gebildet und die Standardabweichung berechnet. Der Mittelwert der Negativkontrolle 2 (Zellsuspension und Ethanol) wurde für die Berechnung der Zellproliferation beim BrdU-Test und der Zellvitalität beim MTT-Test mit 100% gleichgesetzt. Die gemessenen Extinktionen der Proben konnten in Prozent umgerechnet werden.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Student's t-Test des Programms Excel (Microsoft Office). Die Signifikanz der Ergebnisse bezüglich der Negativkontrolle 2 konnte so ermittelt werden. Alle Werte mit $p < 0,01$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 1\%$) sind signifikant unterschiedlich zur Negativkontrolle 2. Sie sind in den Diagrammen mit einem Sternchen (*) markiert.

4. Ergebnisse

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Untersuchungen dargestellt. Die dabei zur Anwendung gekommenen Zelllinien sind die kommerziell erworbenen Mammakarzinomzelllinien MCF7 und BT20. Die als Normalkontrolle mitgetestete Zelllinie der Fibroblasten stammt aus den Beständen der Universitätsfrauenklinik Rostock. Zuerst wird in diesem Abschnitt auf den Hormonrezeptorstatus als Resultat der Immunhistochemie eingegangen. Im Anschluss folgen die Ergebnisse der Cytotoxizitäts- und Proliferationstests in Bezug auf die einzelnen Zelllinien und Kontrollen. Abschließend werden die Ergebnisse der Pyrolyse-Feldionisationsmassenspektrometrie dargestellt.

4.1 Immunhistochemie

Zuerst werden die Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse der Hormonrezeptoren der untersuchten Zelllinien dargestellt. Bei den drei Zelllinien, MCF7, BT20 und den Fibroblasten, wurden die Estrogenrezeptoren α und β bestimmt, ebenso der Progesteronrezeptor und der Androgenrezeptor. Die Rezeptoren wurden nachgewiesen, indem man die Hormone zu den Zellen gibt, einen definierten Antikörper hinzufügt und mittels Farbreaktion die Bindung zwischen Zellen und Hormon und somit einen positiven Rezeptorstatus nachweist. Als positiver Nachweis erscheint an den Zellen bei diesem Test eine grüne Färbung. Bleibt die Grünfärbung aus, ist der Hormonrezeptorstatus negativ (siehe Abb. 13).

Die MCF7-Zellen wurden beide Estrogenrezeptoren nachgewiesen, ebenso der Progesteron- und Androgenrezeptor.

Bei den BT20-Zellen gelang der Estrogenrezeptornachweis erwartungsgemäß nicht, da es sich bei diesen Zellen im Gegensatz zu MCF7 um eine estrogenrezeptornegative Zelllinie handelt. Allerdings sind hier der Progesteron- und der Androgenrezeptornachweis positiv.

Die Fibroblasten zeigten einen schwach negativen Nachweis des Estrogenrezeptors α . Die anderen Rezeptoren konnten nicht nachgewiesen werden.

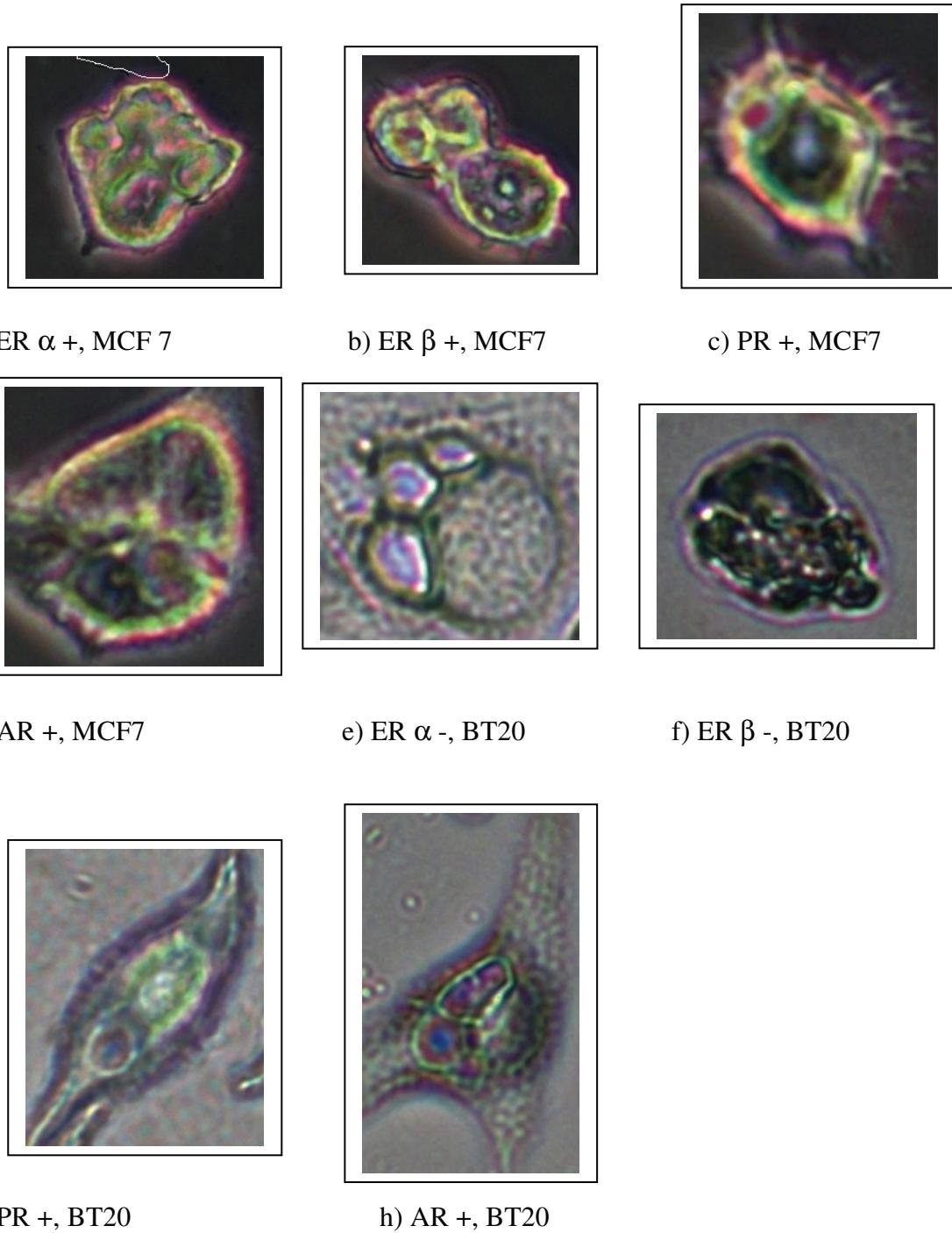


Abb. 13 a) – h) Nachweis der Rezeptoren auf den Zellen. Bei positivem Nachweis erfolgt eine Grünfärbung.

4.2 Cytotoxizitäts- und Proliferationstests

Die folgende Ergebnisdarstellung beginnt mit der Zusammenstellung der Resultate der Versuche bei der estrogenrezeptorpositiven Zelllinie MCF7. Darauf folgt die Darstellung der Ergebnisse der BT20-Zelllinie und der Fibroblasten.

Die Cytotoxizitäts- und Proliferationstest wurden mit den Mammakarzinomzellen und den Fibroblasten unter stets gleichen Bedingungen durchgeführt.

Als Kontrollen dienten Tamoxifen und 17 β -Estradiol.

In den Tests, die eine Aussage über die Cytotoxizität des Leinwurzelextraktes erlauben, konnte ein deutlicher Effekt festgestellt werden. Die Ergebnisse wurden nach Extraktkonzentration und erreichter Cytotoxizität in den Ergebnisdiagrammen aufgeschlüsselt, so dass ein Vergleich zwischen den Altersstufen und den Konzentrationen möglich ist.

4.2.1 LDH-Test bei MCF7

Eine signifikante Cytotoxizität lässt sich in den hohen Konzentrationen (1000µg/ml; 500µg/ml) für die Alte (9 Wochen) und die Junge (3 Wochen) Wurzel feststellen. Die Cytotoxizität liegt dabei bei ca. 55% bei 1000µg/ml und bei ca. 35% bis 39% bei 500µg/ml. Die Mittlere (6 Wochen) Wurzel erreicht in diesen Konzentrationen einen cytotoxischen Effekt von ca. 38% bei 1000µg/ml und ca. 16% bei 500µg/ml. In Bezug zur Negativkontrolle 2 (Zellen + Ethanol) ergibt sich auch bei diesen Werten eine signifikante cytotoxische Wirkung.

In den folgenden Konzentrationen von 100µg/ml bis 0,01µg/ml erreichen die Werte im Mittel knapp die 10%-Marke, ein deutlicher cytotoxischer Effekt lässt sich bei allen drei Alterstufen nicht detektieren.

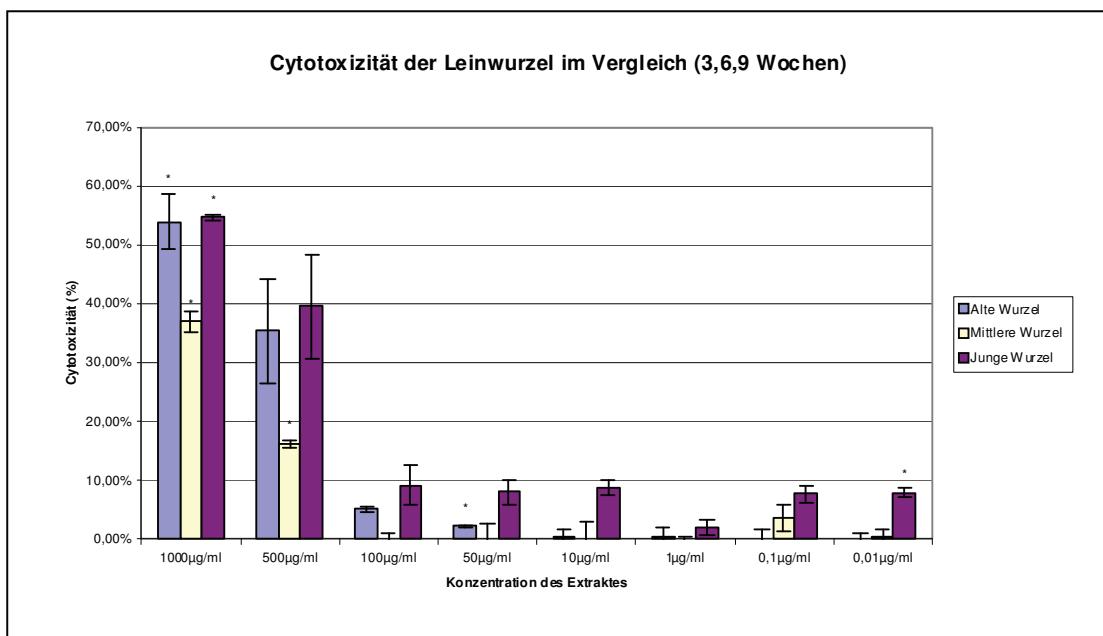


Abb. 14 LDH-Test bei MCF7, Bezugsgröße ist die Negativkontrolle 2 (Zellen + Ethanol) mit 0% Cytotoxizität.

Zum Vergleich der Wirkung der Leinwurzelextrakte wurden die beiden Positivkontrollen Tamoxifen und 17β -Estradiol bei jedem Versuch mitgeführt. Tamoxifen, als sogenanntes Antiestrogen, blockiert *in vivo* periphere Estrogenrezeptoren mit partiellem Agonismus (Ruß, Endres) und entfaltet *in vitro* die volle antiestrogene Wirkung an den estrogenrezeptorpositiven Zellen (MCF7). Estradiol als Agonist an diesen Rezeptoren soll im Gegensatz dazu keinen negativen Effekt auf diese Zelllinie ausüben.

Beim LDH-Test mit den Kontrollen zeigte sich, dass Tamoxifen in den niedrigen Konzentrationen, $0,1\mu\text{g}/\text{ml}$ und $1\mu\text{g}/\text{ml}$, nahezu keinen zytotoxischen Effekt auf die Zellen hat (0% bzw. -1%). 17β -Estradiol zeigt einen kleinen Effekt von ca. 7% bei $0,1\mu\text{g}/\text{ml}$ bzw. ca. 5% bei $1\mu\text{g}/\text{ml}$ und ca. 5% bei $50\mu\text{g}/\text{ml}$.

Tamoxifen zeigt in der hohen Konzentration von $50\mu\text{g}/\text{ml}$ einen signifikanten zytotoxischen Effekt von ca. 90%, das heißt, mit dieser Konzentration sterben *in vitro* ca. 90% der vorhandenen MCF7-Zellen.

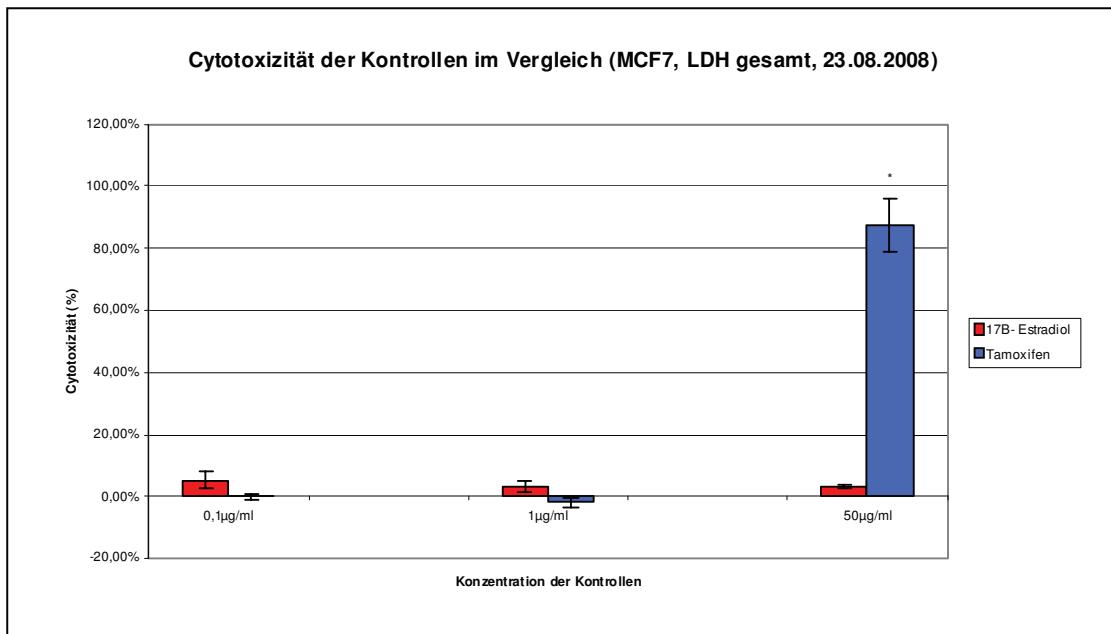


Abb. 15 LDH-Test. Ergebnis der Kontrollen Tamoxifen und 17β -Estradiol. Bezugsgröße ist hier ebenfalls die Negativkontrolle 2 mit 0% Cytotoxizität.

4.2.2 MTT-Test bei MCF7

Der folgende Test zur Bestimmung der Zellvitalität (MTT-Test) beruht auf der Detektion von Mitochondrien-DNA in Medium. Mittels dieses Test-Kits erfolgt die Registrierung von intakten Enzymsystemen in lebenden Zellen.

Hierbei wurden die MCF7-Zellen wieder nach Testvorschrift ausgesät und den Extrakten ausgesetzt.

In den hohen Konzentrationen 1000 μ g/ml und 500 μ g/ml liegt die Vitalität der Zellen bei 120%. Dieser Wert sagt aus, dass es unter dem konzentrierten Einfluss des Extraktes eine Entwicklungssteigerung der Zellen gegeben hat. Die Werte der Alten Wurzel und der Mittleren Wurzel liegen bei 1000 μ g/ml sogar noch über 120% und sind signifikant, ebenso die Werte bei 500 μ g/ml. In dieser Konzentration konnte auch wieder der Extrakt der Jungen Wurzel getestet werden. Sein Ergebnis liegt bei 120% bei 500 μ g/ml. Leider ergab die Ernte der Jungen Wurzel nach drei Wochen Wuchsdauer sehr wenig Material. Damit konnte nur die Cytotoxizitätsmessung durchgeführt werden.

In den übrigen Konzentrationen von 100 μ g/ml bis 0,01 μ g/ml liegen die Werte um 100%. Das bedeutet, dass es hier weder zu einer Steigerung der Vitalität bzw. der Entwicklungsfähigkeit noch zu einer Verringerung der Zellvitalität gekommen ist.

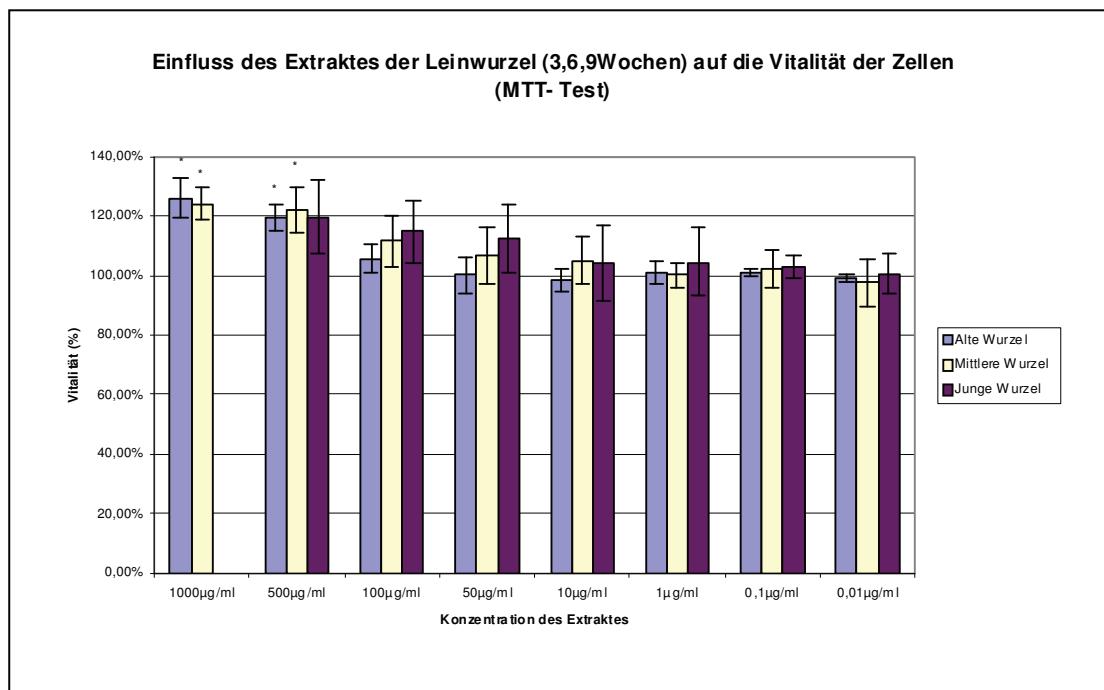


Abb. 16 MTT-Test bei MCF7. Bezugsgröße ist die Negativkontrolle 2 mit 100%.

Die Kontrollen 17 β -Estradiol und Tamoxifen wurden auch in diesen Testreihen mit den Konzentrationen 0,1 μ g/ml, 1 μ g/ml und 50 μ g/ml als Positivkontrollen mitgeführt. In diesem Test zeigte sich, dass die kleinen Konzentrationsstufen keinen nennenswerten Einfluss auf die Vitalität bzw. die Entwicklungsfähigkeit der Zellen haben. Die detektierten Werte liegen hier bei ca. 100%. In der Konzentrationsstufe 50 μ g/ml kommt es bei beiden Stoffen zu einer signifikanten Vitalitätshemmung. 17 β -Estradiol verringert die Vitalität auf 68%. Das ist ein Verlust um über 30%.

Der Einfluss des Tamoxifens ist in dieser Konzentration (50 μ g/ml) ebenfalls signifikant und noch deutlicher. Hier wird eine Vitalität von rechnerisch sogar unter 0% angegeben. Dies bedeutet eine komplette Vitalitätshemmung durch das Tamoxifen.

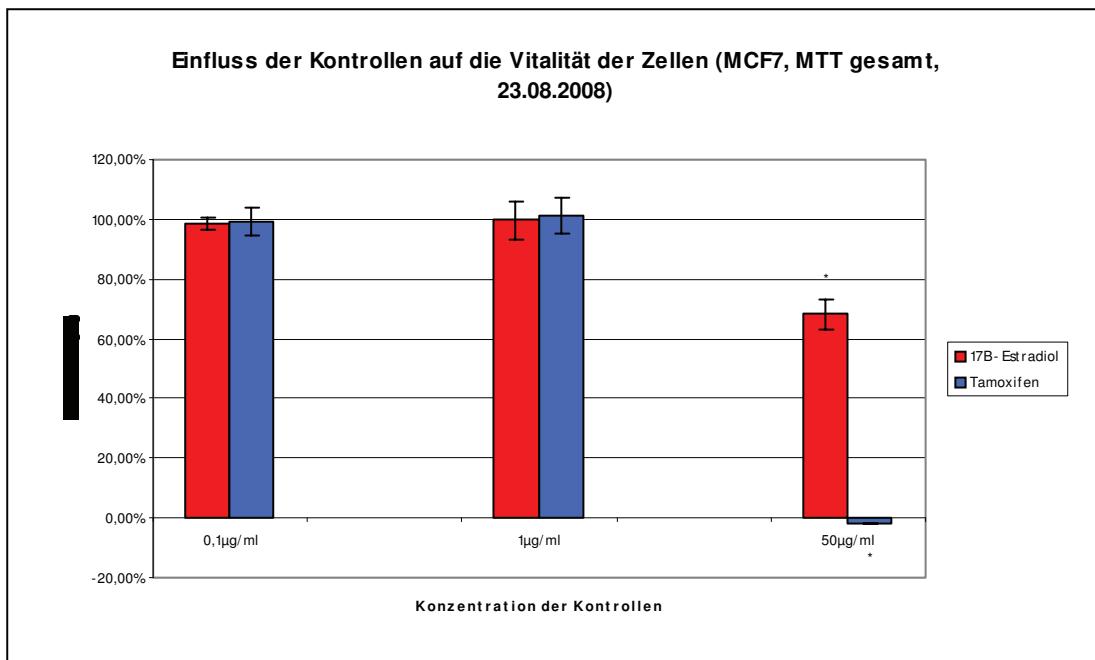


Abb. 17 MTT-Testergebnis bei den Kontrollen Tamoxifen und 17 β -Estradiol. Bezugsgröße ist die Negativkontrolle 2 mit 100% Vitalität.

4.2.3 BrdU-Test bei MCF7

Der letzte Test zur Bestimmung der Proliferation ist der nicht radioaktive BrdU-Test. Er basiert auf der Detektion der Zellkern-DNA, die mit Hilfe einer farblich markierten Antigen- Antikörperreaktion visualisiert werden kann. Er gilt somit als noch spezifischer zur Bestimmung des eventuellen Einflusses eines gestesteten Stoffes auf die Vitalität und Proliferation von Zellen.

Bei den Tests an der MCF7-Zelllinie konnten mehrere Effekte dargestellt werden:

In der hohen Konzentration (1000 μ g/ml) sank bei der Alten Wurzel die Vitalität der Zellen auf ca. 43%. Dies stellt einen signifikanten Rückgang der Vitalität unter dem Einfluss des Extraktes dar.

Bei der Mittleren Wurzel erreichte die Messung der vitalen Zellen einen Wert von ca. 58%. In diesem Fall bedeutet das einen Rückgang um ca. 42% im Vergleich zur Negativkontrolle 2 (Zellen + Ethanol).

Bei der Konzentration 500 μ g/ml ist das Ergebnis der Alten Wurzel wieder signifikant in Bezug zur Negativkontrolle 2 mit 53%. Hier konnte wieder eine Messung mit der Jungen Wurzel durchgeführt werden. Dieser Extrakt bewirkt ebenfalls einen signifikanten Vitalitätsrückgang um ca. 15% auf 85% in Bezug zur Negativkontrolle. Die Mittlere Wurzel weist in dieser Konzentrationsstufe einen Wert von ca. 69% auf. Unter seinem Einfluss verringert sich die Vitalität der Zellen um 31%.

Die folgende Konzentration 100 μ g/ml zeigt bei der Alten und Mittleren Wurzel einen Wert von jeweils ca. 84%. Dieses Ergebnis zeigt sich nur für die Mittlere Wurzel signifikant. Die Junge Wurzel hat einen Wert von 106%, der somit einer Proliferationssteigerung nahe kommt. Die folgenden Konzentrationsstufen pendeln sich dann, auch im Rahmen der Standardabweichungen, auf Werte um 100% ein. Dies lässt den Schluss zu, dass die hauptsächliche Wirkung sich in den weitgehend unverdünnten Konzentrationen durchsetzt.

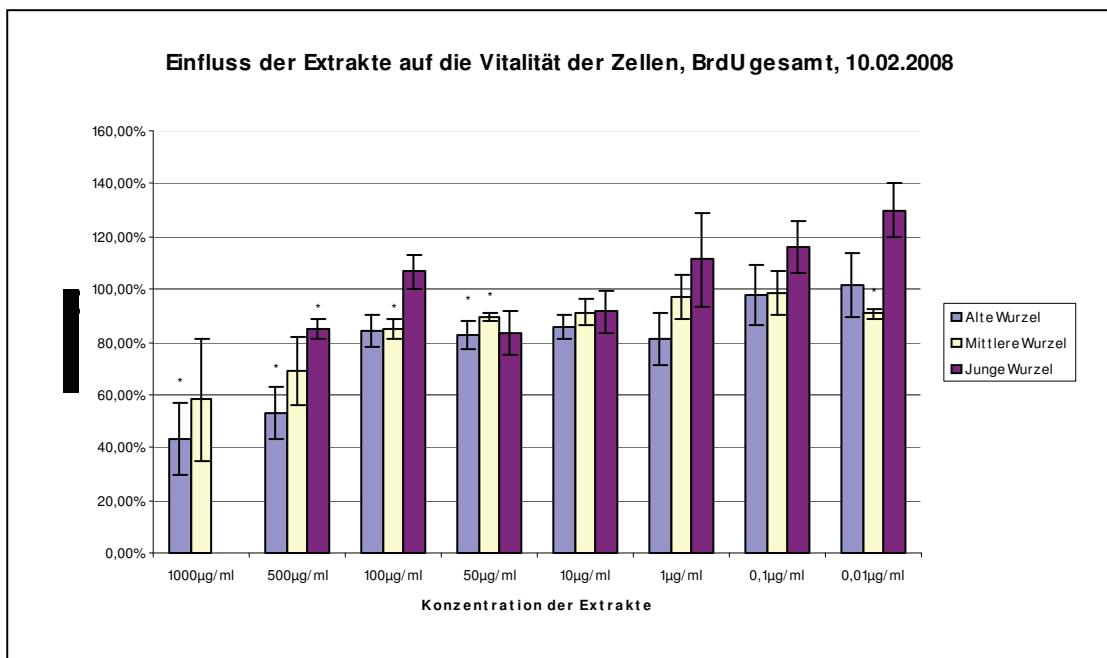


Abb. 18 BrdU-Ergebnis bei MCF7. Bezugsgröße ist hier Negativkontrolle 2 mit 100% Vitalität.

Die Kontrollen 17 β -Estradiol und Tamoxifen wurden auch hier in der gleichen Weise getestet wie die Extrakte. In der am höchsten verdünnten Konzentrationsstufe (0,1 μ g/ml) lag bei beiden Stoffen kein signifikanter Einfluss auf die Vitalität der Zellen vor. Die Werte beider Stoffe lagen um 90% bzw. 102%. In der Verdünnung 1 μ g/ml lag die ermittelte Vitalität nur noch bei ca. 80%.

In der höchsten Konzentration erreichte 17 β -Estradiol eine Vitalität von ungefähr 95%, während Tamoxifen einen höchst signifikant negativen Einfluss auf die Vitalität hatte. Nur ca. 2% der Zellen waren noch vital. Dies zeugt von dem immens cytotoxischen und proliferationshemmenden Potential des Tamoxifens. 17 β -Estradiol scheint in diesem Zusammenhang einen geringeren Einfluss auf die Vitalität und Proliferation der MCF7-Zellen zu haben. Jedenfalls ist er nicht sonderlich proliferationssteigernd und auch nicht sehr stark hemmend.

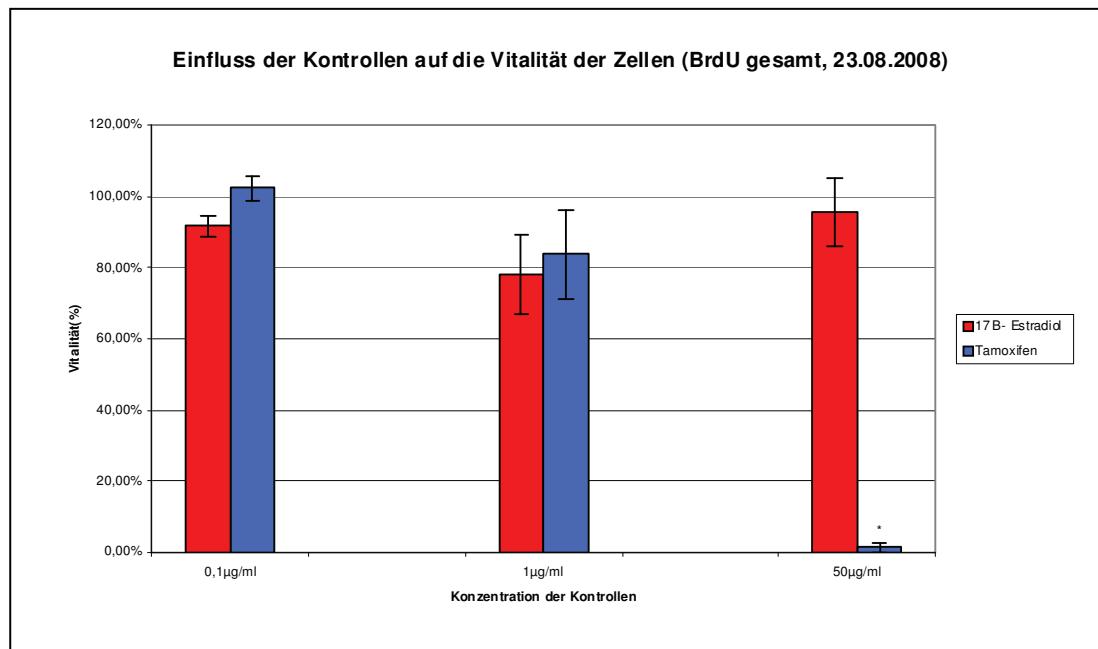


Abb. 19 BrdU-Testergebnis der Kontrollen Tamoxifen und 17 β -Estradiol. Bezugsgröße ist die Negativkontrolle 2 mit 100% Vitalität.

4.2.4 LDH-Test bei BT20

Bei der estrogenrezeptornegativen Zelllinie BT20 wurden analog zur MCF7-Zelllinie der LDH-, MTT- und der BrdU-Test durchgeführt.

Der cytotoxische Einfluss des Leinwurzelextraktes auf diese Zellen ist in allen drei Reifegraden um ein Vielfaches geringer als bei MCF7. So ist bei der Alten Wurzel in der höchsten Konzentration (1000 μ g/ml) eine Cytotoxizität von 10% festzustellen. Zum Vergleich: Bei MCF7 lag die Cytotoxizität dieses Extraktes bei über 50% (s. o.). Alle weiteren Konzentrationsstufen liegen ebenfalls unter 10%. Allerdings bewirkt der auf 1 μ g/ml verdünnte Extrakt nochmals eine Cytotoxizität von annähernd 10%.

Der Einfluss des Extraktes der Mittleren Wurzel hat nahezu keinen cytotoxischen Effekt auf die BT20- Zelllinie. Die ermittelten Werte in den hohen Konzentrationstufen 1000 μ g/ml bis 0,1 μ g/ml zeigen graphisch dargestellt keinen Einfluss, der einzige cytotoxische Effekt zeigt sich in den Konzentration von 0,01 μ g/ml. Allerdings müssten weitergehende Tests diesen Effekt erneut belegen.

Bei diesem Test zur Cytotoxizität war noch eine Testreihe mit dem Material der Jungen Wurzel möglich. Die restlichen Tests mussten mangels Wurzelwuchs eingestellt werden. Es zeigt sich, dass der Extrakt der jungen Wurzel keinen nennenswerten cytotoxischen Einfluss auf die BT20-Zelllinie hat. Ein Effekt lässt sich erst in einer Konzentration von 10 μ g/ml detektieren. Der bleibt bei 3% (10 μ g/ml) bis 4% (1 μ g/ml) nachweisbar.

Rechnerisch entstehen Signifikanzen beim Extrakt der Alten Wurzel bei 1000 μ g/ml, 500 μ g/ml, 50 μ g/ml, 1 μ g/ml und bei dem Extrakt der Mittleren Wurzel bei 1000 μ g/ml und 0,01 μ g/ml. Allerdings kann es zu einer wirklich effektvollen cytotoxischen Wirkung erst ab ca. 60% kommen. Von daher lässt sich sagen, dass die Extrakte der Leinwurzel keinen cytotoxischen Effekt auf die estrogenrezeptornegative Zelllinie BT20 haben.

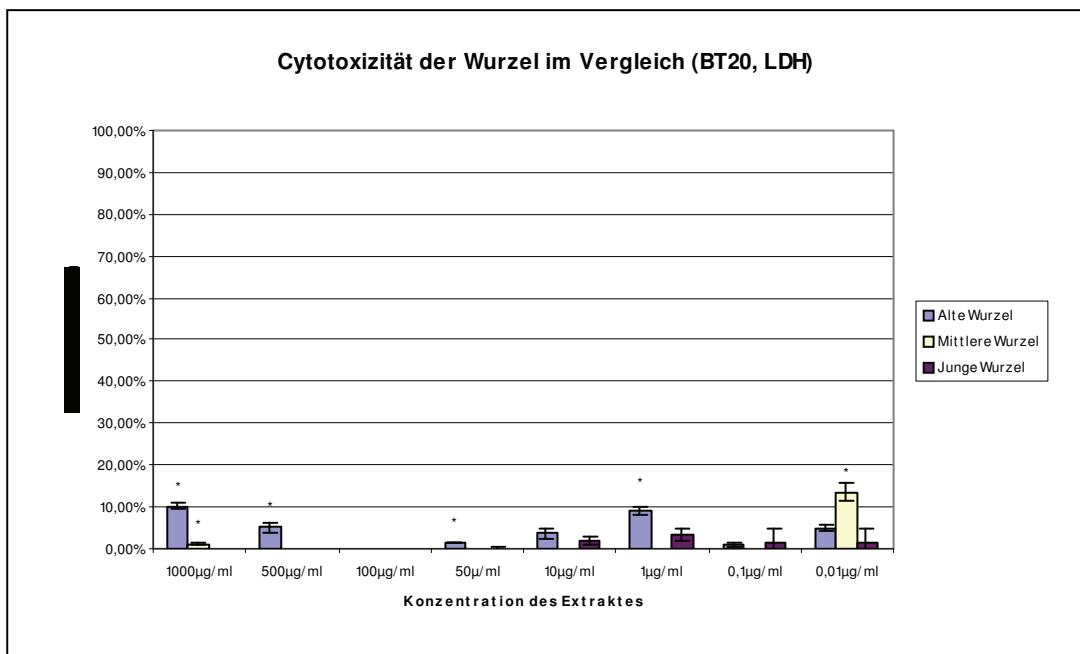


Abb. 20 LDH-Testergebnis bei BT20. Hier ist die Bezugsgröße die Negativkontrolle 2 mit 0% Cytotoxizität.

Auch bei der BT20-Zelllinie wurden die Kontrollen 17 β -Estradiol und Tamoxifen in den Konzentrationen 0,1 μ g/ml, 1 μ g/ml und 50 μ g/ml mitgeführt.

In den Konzentrationen 0,1 μ g/ml und 1 μ g/ml zeigt sich eine Cytotoxizität von unter 5% für beide Stoffe.

Bei 50 μ g/ml wirkt 17 β -Estradiol zu ca. 6% cytotoxisch, während Tamoxifen zu ca. 86% eine cytotoxische Wirkung entfaltet. Hier zeigt sich auch eine Signifikanz in Bezug zur Negativkontrolle 2 (Zellen + Ethanol). Auch wenn sich bei dieser Zelllinie kein Estrogenrezeptor nachweisen lässt, wirkt Tamoxifen zelltötend. Dieser Effekt kann auf den generellen toxischen Charakter des Tamoxifens in dieser sehr konzentrierten Form zurückgeführt werden.

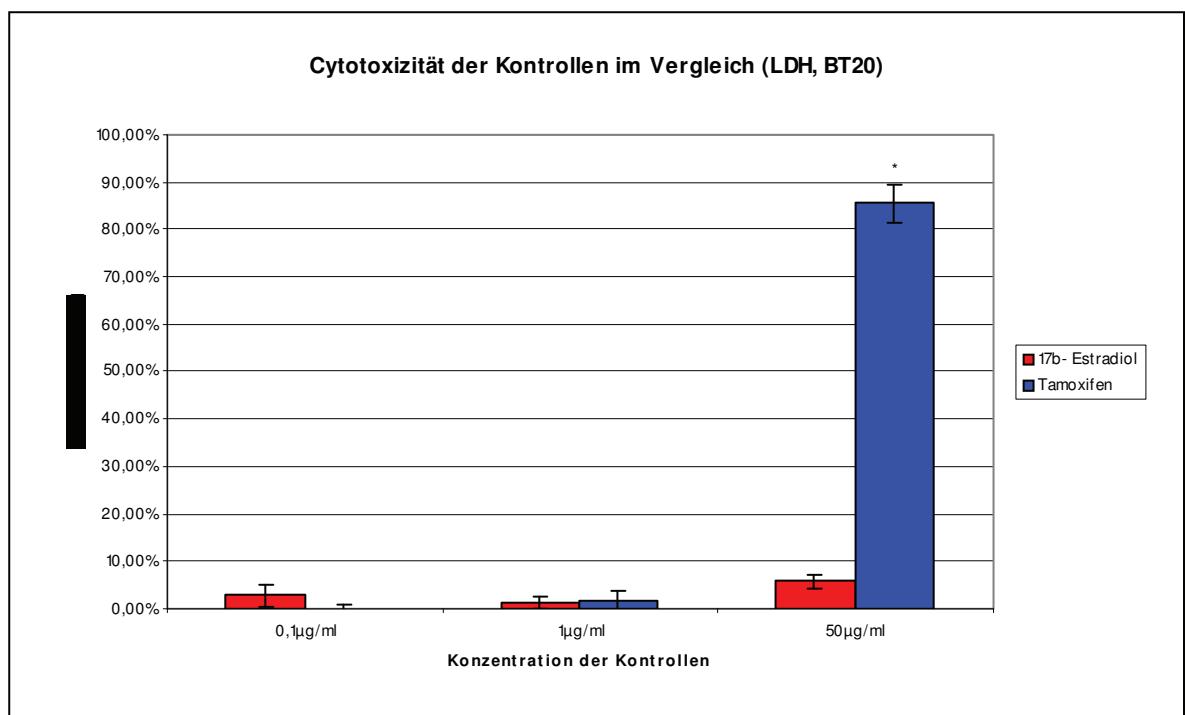


Abb. 21 LDH-Testergebnis der Kontrollen. Bezugsgröße ist die Negativkontrolle 2 mit 0% Cytotoxizität.

4.2.5 MTT-Test bei BT20

Die Anwendung des MTT-Test erfolgte bei der Estrogenrezeptor negativen Zelllinie BT20 analog der Anwendungsweise bei der Estrogenrezeptor positiven Zelllinie MCF7. Nach Aussaat und Testung ergab sich folgendes Bild:

In den hohen Konzentrationen 1000µg/ml und 500µg/ml erreicht der Extrakt der Mittleren Wurzel eine Proliferationssteigerung auf 140% (1000µg/ml) bzw. 136% (500µg/ml). In den übrigen Konzentrationsstufen liegt die gemessene Vitalität der Zellen um die 100%. Das bedeutet, dass keine Beeinflussung des Zellstoffwechsels, insbesondere der Mitochondrien, durch den Extrakt zu detektieren ist.

Ähnlich verhält es sich bei dem Extrakt der Alten Wurzel. Hier erreicht nur der Extrakt der Konzentrationsstufe 500µg/ml eine Vitalitätssteigerung der Zellen von ca. 122%. Der Extrakt mit 100µg/ml steigert die Vitalität noch auf ca. 116%, die übrigen Konzentrationsstufen zeigen keinen großen Einfluss auf die Zellvitalität. Die ermittelten Werte liegen hier bei 100%.

Der Test konnte mit den Extrakten der Jungen Wurzel nicht durchgeführt werden, da das Wurzelmateriel einen zu geringen Ernteertrag ergab.

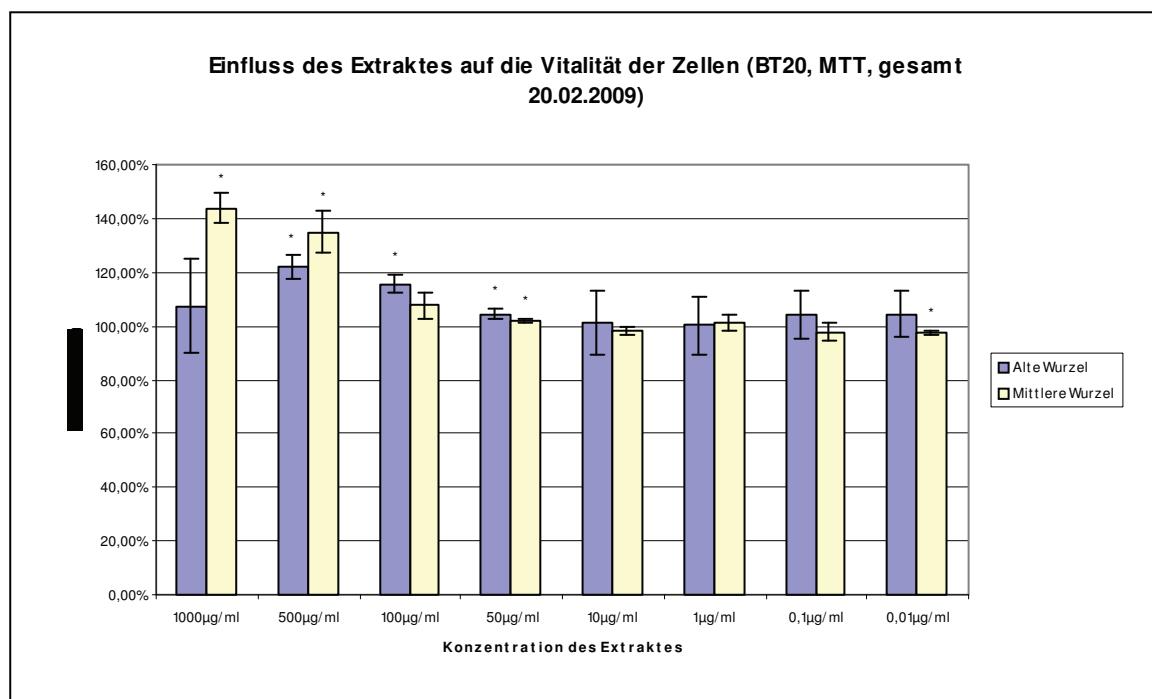


Abb. 22 MTT-Testergebnis bei BT20. Bezugsgröße ist die Negativkontrolle 2 mit 100% Vitalität.

Mit den Kontrollen 17 β -Estradiol und Tamoxifen wurde die MTT-Testreihe ebenfalls durchgeführt, wieder in den bekannten Konzentrationsstufen 0,1 μ g/ml, 1 μ g/ml und 50 μ g/ml.

In den kleinen Verdünnungsstufen 0,1 μ g/ml und 1 μ g/ml konnte nahezu kein Einfluss der Kontrollen auf die Vitalität der Zellen gemessen werden, die Werte liegen bei 100%.

Mit der Konzentration 50 μ g/ml misst man bei 17 β -Estradiol einen Rückgang der Vitalität um ca. 30% auf ca. 70%. Diese Hemmung kann als signifikant angesehen werden.

In der gleichen Konzentration von Tamoxifen wird keine Vitalität nachgewiesen, die Werte liegen bei 0%. Auch hier zeigt sich wieder die signifikante Hemmung.

Dieser deutliche Rückgang der Zellvitalität lässt sich wahrscheinlich mit einem generell toxischen Verhalten von Tamoxifen in dieser hohen Konzentration erklären.

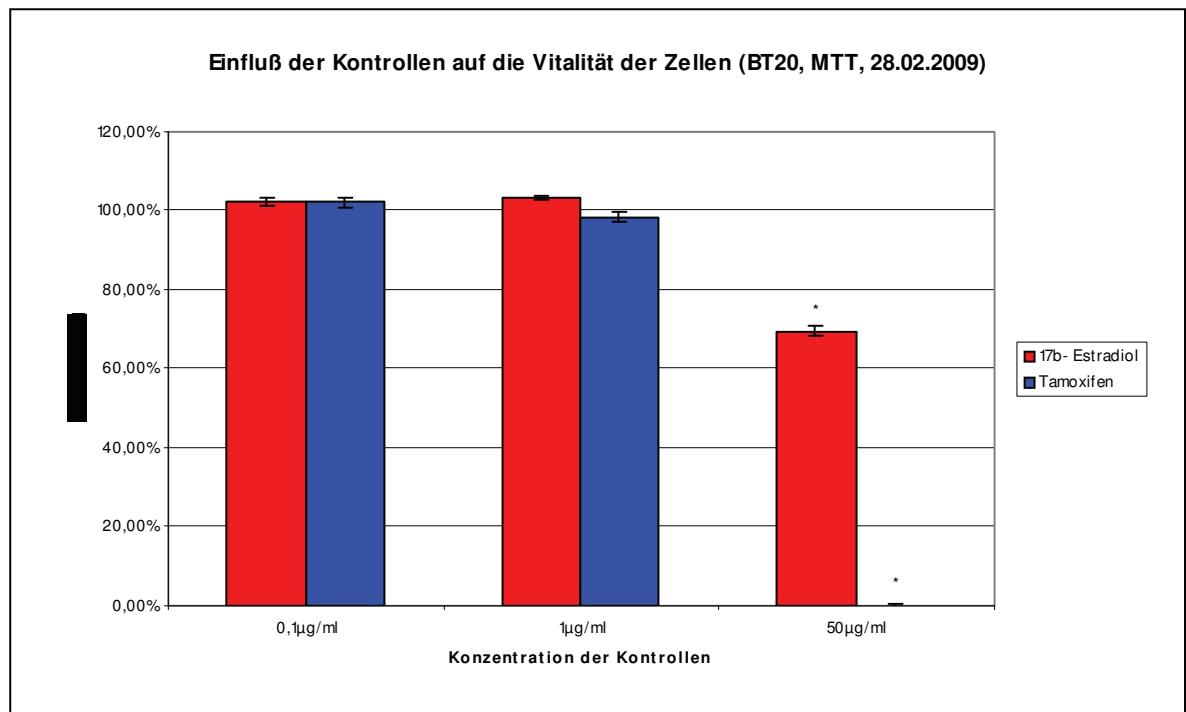


Abb. 23 MTT-Test der Kontrollen Tamoxifen und 17 β -Estradiol. Bezugsgröße ist die Negativkontrolle 2 mit 100% Vitalität.

4.2.6 BrdU-Test bei BT20

Auch die Verwendung des BrdU-Testes erfolgte bei der Testung der BT20-Zelllinie analog zu der Vorgehensweise bei der estrogenrezeptorpositiven Zelllinie MCF7.

Auch hier konnten die Extrakte der Alten und Mittleren Wurzel getestet werden, da aufgrund mangelnder Ertragsernte das Material der Jungen Wurzel nicht mehr vorhanden war.

Es stellte sich folgendes Ergebnis dar: In den hohen Konzentrationen 1000µg/ml und 500µg/ml kam es durch beide Extrakte zu einem deutlichen Vitalitätsrückgang um ca. 50% - 45% auf 50% - 55%. Hier stellt man auch eine Signifikanz fest. Dieses Ergebnis zeigt, dass ein Einbau von BrdU in sich teilende Zellen nicht stattgefunden hat. Somit zeigt sich hier ein Einbruch der Zellteilungsrate.

Die restlichen Konzentrationen (100µg/ml bis 0,01µg/ml) liegen alle um 80% Vitalitätsrate, das bedeutet, dass hier keine signifikante Vitalitätseinschränkung besteht.

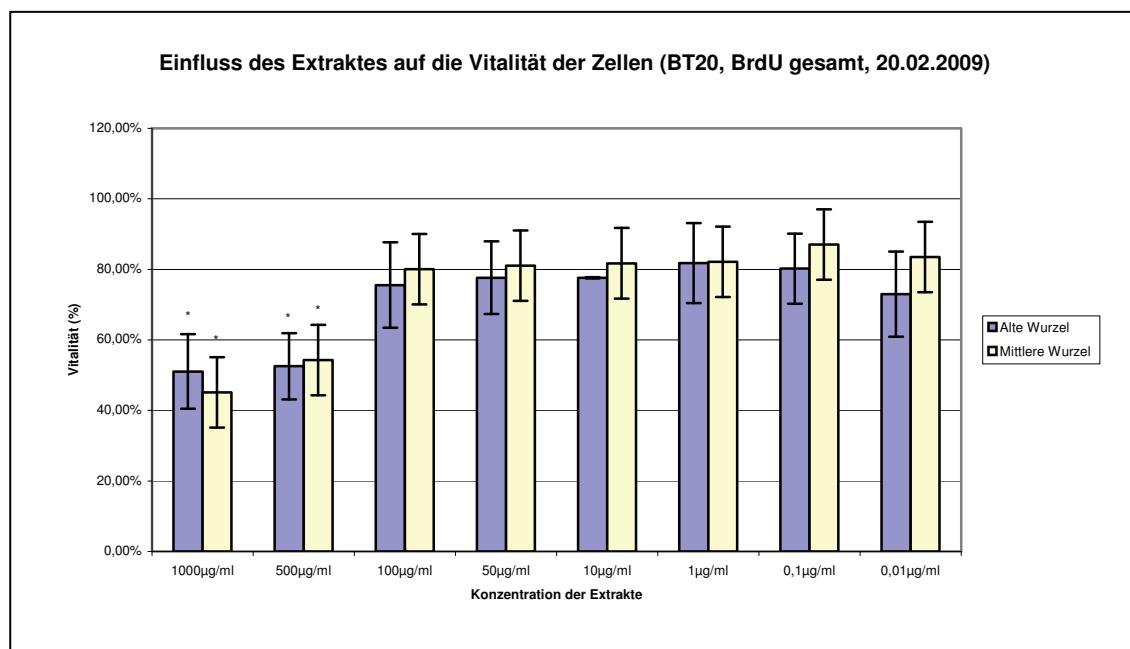


Abb. 24 BrdU-Testergebnis bei BT20. Bezugsgröße ist die Negativkontrolle 2 mit 100% Vitalität.

Die Kontrollen 17 β -Estradiol und Tamoxifen wurden auch hier wieder in den bekannten Konzentrationen 0,1 μ g/ml, 1 μ g/ml und 50 μ g/ml mitgeführt.

In der Konzentration 0,1 μ g/ml hat Tamoxifen eine Vitalitätsrate von 90%, 17 β -Estradiol eine von 95%. Hier ist keine signifikante Beeinträchtigung der Zellvitalität zu detektieren.

Bei der Konzentration 1 μ g/ml liegen beide Substanzen bei ca. 85%. Dies entspricht auch hier keiner signifikanten Vitalitätseinschränkung.

Bei 50 μ g/ml liegt der Wert von 17 β -Estradiol bei 60% und zeigt somit eine deutliche Einschränkung der Vitalität. Tamoxifen ist in der Grafik nicht visualisierbar, sein Einfluss auf die Vitalität der Zelle ist deutlich. Hier erfolgte keine Zellteilung, es kann kein Einbau von BrdU detektiert werden.

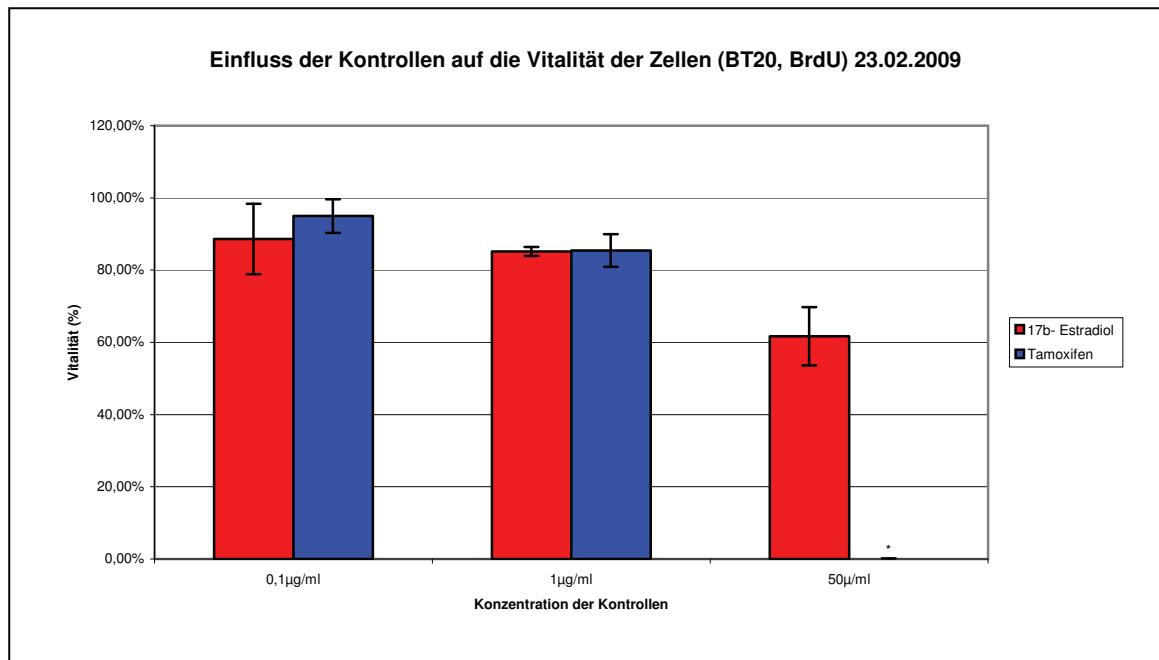


Abb. 25 BrdU-Test der Kontrollen Tamoxifen und 17 β -Estradiol. Bezugsgröße ist hier die Negativkontrolle 2 mit 100% Vitalität.

4.2.7 LDH-Test bei den Fibroblasten

Die Fibroblasten dienten als Kontrolle in dieser Arbeit. Sie wurden aus gesundem Gewebe isoliert und zeigten, wie bei der Immunhistochemie erwähnt, eine schwache Ausprägung für die Hormonrezeptoren α und β .

Des Weiteren ist zu den Testreihen mit den Fibroblasten festzuhalten, dass der Ertrag der Leinpflanze nur sehr begrenzten Umfang hatte, so dass sich die Testungen auf LDH und BrdU einschließlich der Kontrollen beschränkten.

Bei den LDH-Tests zeigte sich eine durchweg sehr schwache cytotoxische Wirkung des Extraktes auf die Zellen. In allen Verdünnungsstufen lag die Cytotoxizität bei unter 10%. In den hohen Konzentrationen von 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bis 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ liegt die zelltötende Wirkung bei über 5%, vor allem bei dem Extrakt der Mittleren und der Jungen Wurzel bei 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

In den kleineren Konzentrationen 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ – 0,01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ lässt sich nur eine schwache cytotoxische Wirkung unter 3% detektieren.

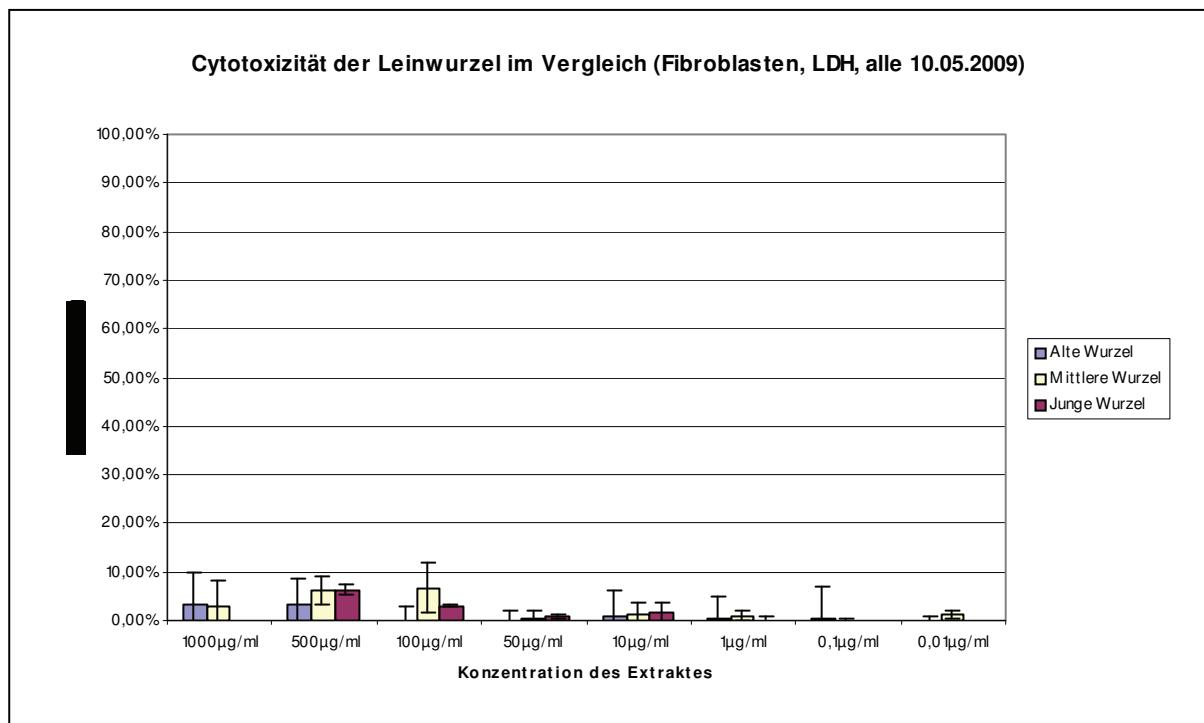


Abb. 26 LDH-Test bei den Fibroblasten. Bezugsgröße ist die Negativkontrolle 2 mit 0% Cytotoxizität.

Als Kontrollen wurden auch bei den Fibroblasten 17 β -Estradiol und Tamoxifen in den Konzentrationen 0,1 μ g/ml, 1 μ g/ml und 50 μ g/ml genutzt.

In der kleinsten Konzentration zeigen beide Kontrollsubstanzen im Durchschnitt nahezu keinen negativen Einfluss auf die Zellen. Einzelne ermittelte Werte schwanken zwischen 5% und einem negativen Wert. Dies ist an der Standardabweichung zu erkennen.

Bei 1 μ g/ml ist ein leichter Anstieg der cytotoxischen Wirkung des Tamoxifen zu erkennen, allerdings bleiben auch hier die Auswirkungen unter 3% und sind somit nicht signifikant. Erst in der Konzentration von 50 μ g/ml zeigt sich das hohe toxische Potential des Tamoxifens. Hier steigt die detektierte zelltötende Wirkung auf ca. 86% mit einer nur geringen Standardabweichung. Dieses Ergebnis ist signifikant.

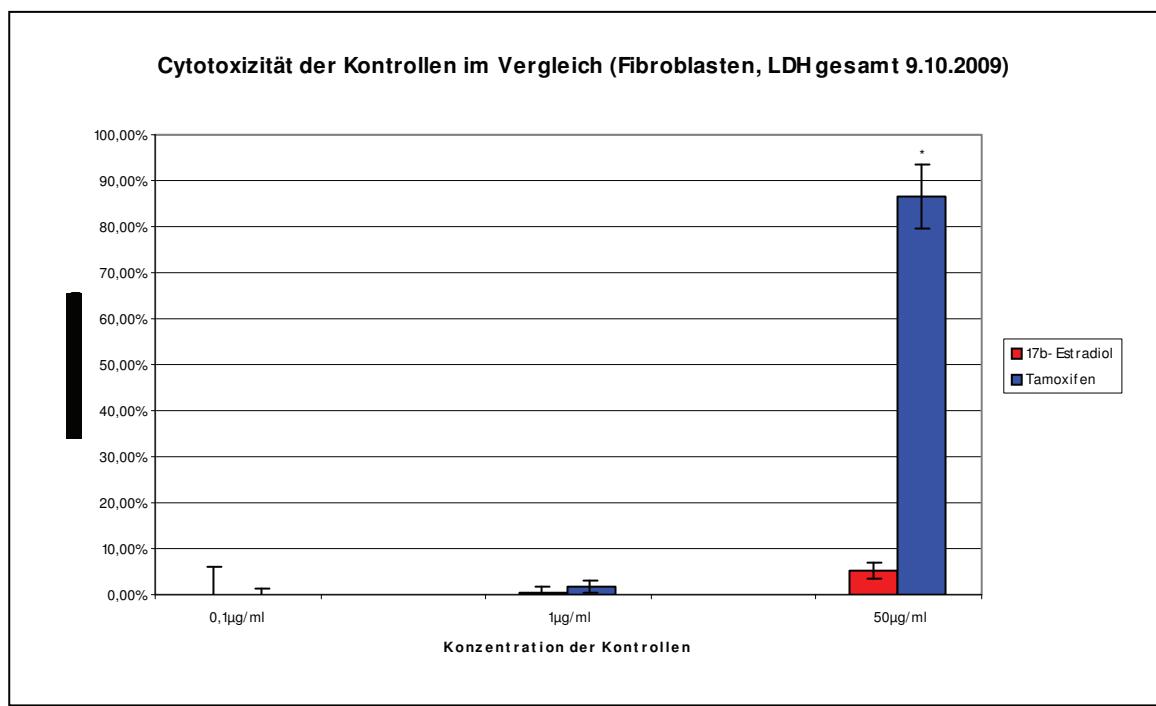


Abb. 27 LDH-Test bei den Kontrollen Tamoxifen und 17 β -Estradiol. Bezugsgröße ist die Negativkontrolle 2 mit 0% Cytotoxizität.

4.2.8 BrdU-Test bei den Fibroblasten

Der BrdU-Test wurde bei den Fibroblasten ebenfalls durchgeführt, um eine vorhandene vitalitätsmindernde Wirkung des Leinwurzelextraktes auf gesunde Körperzellen zu untersuchen.

Hier konnte in der höchsten Konzentration von 1000µg/ml der Extrakt der Jungen Wurzel nicht getestet werden, da die Ernte wenig ertragreich war.

Allerdings lässt sich in den Testungen mit dem Extrakt der Alten Wurzel ein deutlicher Vitalitätsrückgang auf ca. 22% mit einer minimalen Standardabweichung nachweisen. Dieses Ergebnis ist signifikant und lässt für diese Testungen den Schluss zu, dass nach Einsetzen des Extraktes die Zellteilung bzw. der nachzuweisende Einbau von BrdU in die sich neu bildende DNA eingebrochen ist.

In der Konzentration 500µg/ml bewegt sich die Vitalitätsrate in den Testreihen mit dem Alten und dem Mittleren Wurzelextrakt um 40%. Auch dies beschreibt einen Vitalitätsrückgang. In den folgenden Konzentrationen steigt die Vitalität der Zellen wieder an auf ca. 100%. Das heißt, dass die Extrakte hier annähernd keine Auswirkung auf die Entwicklungsfähigkeit und Vitalität der Fibroblasten haben.

Die hohen Standardabweichungen können daher röhren, dass die Testreihen in einem kleineren Umfang durchgeführt wurden als bei MCF7 und BT20, da mit der noch verbliebenen Menge des Extraktes in allen Altersstufen gearbeitet werden musste. Der limitierende Faktor ist hier der Ernteertrag der Leinpflanze.

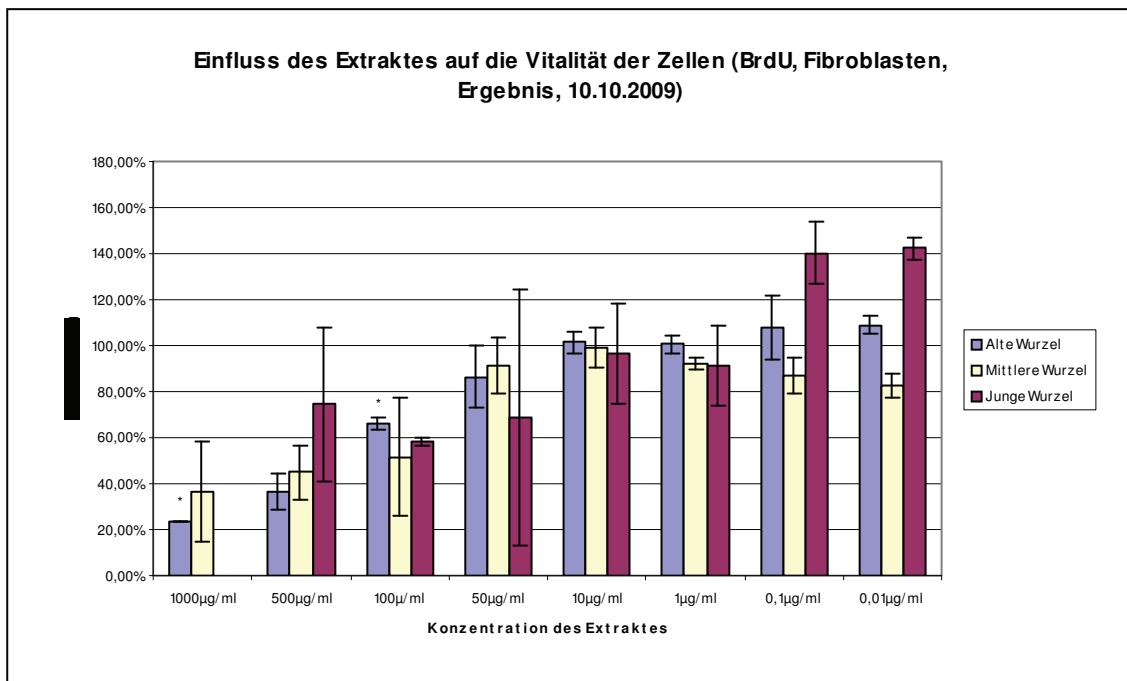


Abb. 28 BrdU-Test bei den Fibroblasten. Bezugsgröße ist die Negativkontrolle 2 mit 100% Vitalität.

Als Kontrollen bei dieser Testreihe dienten wieder 17 β -Estradiol und Tamoxifen in den Konzentrationen 0,1 μ g/ml, 1 μ g/ml und 50 μ g/ml.

In den ersten zwei Konzentrationsstufen kommt es zu keinen Vitalitätseinbußen, die Ergebnisse zeigen Vitalitätsraten von 100% bis 118%. Auch in der höchsten Konzentration (50 μ g/ml) liegt die Vitalitätsrate der Zellen, die mit 17 β -Estradiol behandelt wurden, bei 109%, also ohne negativen Einfluss.

Die Zellen, die mit Tamoxifen in der hohen Konzentration (50 μ g/ml) behandelt wurden, haben einen starken Vitalitätsrückgang auf 14% zu verzeichnen. Diese Beobachtung deckt sich mit der detektierten zelltoxischen Wirkung im LDH-Test bei den Fibroblasten.

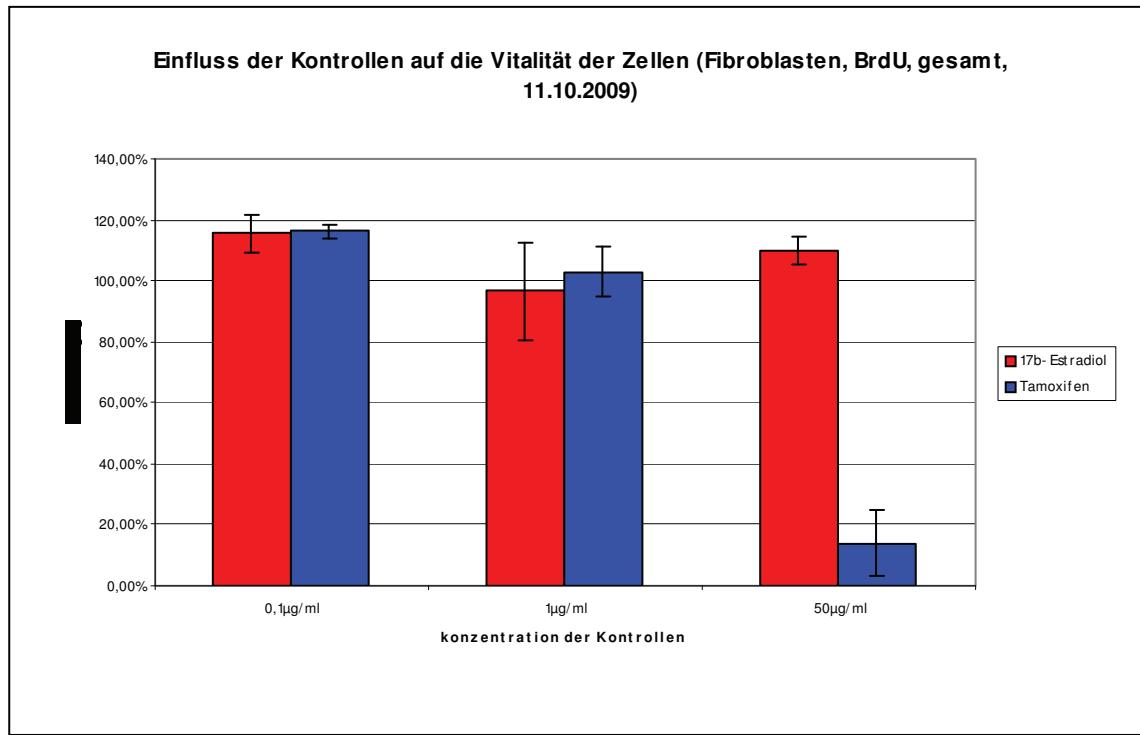


Abb. 29 BrdU-Test bei den Kontrollen Tamoxifen und 17 β -Estradiol. Bezugsgröße ist die Negativkontrolle 2 mit 100% Vitalität.

4.2.9 Ergebnis der Pyrolyse-Feldionisationsmassenspektroskopie

Die Durchführung dieser Analysemethode wird in Kapitel 3 erläutert. Sie wird benutzt, um die einzelnen Substanzgruppen, die sich in den einzelnen Extrakten finden, zu identifizieren und deren Gehalt vergleichbar zu machen. In den nach Luyengi *et al.* extrahierten Wurzeln finden sich in unterschiedlichen Anteilen folgende Verbindungen:

- Di- und Triglyceride
- Flavonoide
- Lignane (Phytoöstrogene)
- Isotopen 13C-Signale
- Niedermolekulare Verbindungen m/z 15 bis 56
- Freie gesättigte und ungesättigte Fettsäuren (n- C16 bis n-C 34)
- Suberine (Fettsäureester, bei Verkorkung schichtweise pflanzlichen Zellen aufgelagert, wasserabweisend)
- Peptide und Aminosäuren
- Sterole und Triterpene
- N-haltige Verbindungen
- Alkylaromaten
- Lipide, Alkane, Alkene, Fettsäuren, n-Alkylester
- Lignindimere
- Phenole und Lignin/Lignan- Monomere
- Kohlenhydrate

Die prozentualen Anteile dieser Verbindungen sind durch die Pyrolyse-Feldionisationsmassenspektroskopie ermittelt worden. Eine weitergehende Analyse der Inhaltstoffe, beispielsweise die genaue Bestimmung der Untergruppen der Aminosäuren, könnte Gegenstand einer folgenden Arbeit sein.

Die Abbildung zeigt die Komponenten der Extrakte im Vergleich. Auffallend ist der im Vergleich höchste Anteil an Lignanen in der Alten Wurzel (3,0%). Hier gibt es auch die höchste Anzahl an Suberinen (6,2%) und Lignindimeren (13,8%). Dies ist nicht verwunderlich, sind Lignindimere doch Stoffe, die zur Verholzung der Zellwand führen sollen. Suberine sind Fettsäureester, die bei der Verkorkung schichtweise in die pflanzlichen Zellen eingelagert werden.

Freie gesättigte und ungesättigte Fettsäuren sind in der Alten Pflanze weniger stark zu finden (24,3%) als in den Extrakten der Mittleren (28,6%) und Jungen Wurzel (32,6%).

In dem Extrakt der Mittleren Wurzel finden sich die höchsten Anteile von Di- und Triglyceriden (3,2%).

Suberine und Lignindimere finden sich hier ebenfalls in geringerer Ausprägung. Der Lignan-Anteil (2,2%) ist deutlich zu erkennen, jedoch geringer als im Alte-Wurzel-Extrakt. Die Fraktion der Phenole und Lignin/Lignan-Monomere ist um 1% geringer als in als im Alte-Wurzel-Extrakt (5,5%). In dem Extrakt der Jungen Wurzel liegt der Anteil bei 3,8%. Den höchsten Anteil des Extraktes macht hier die Gruppe der Sterole und Triterpene aus mit 35,7%. Darauf folgt die der freien gesättigten und ungesättigten Fettsäuren mit 32,6% und die der Kohlenhydrate mit 7,4%. Suberine und Lignindimere lassen sich mit einem Anteil von 1,0% und 2,2% nachweisen. Dies ist wohl dem Wachstumsalter von drei Wochen zuzuschreiben.

Der Lignan-Anteil ist mit 0,3% in dem Extrakt der Jungen Wurzel deutlich geringer als in den anderen Extrakten. Im Extrakt der Alten Wurzel beträgt er 3,0% und in dem der Jungen Wurzel 2,2%.

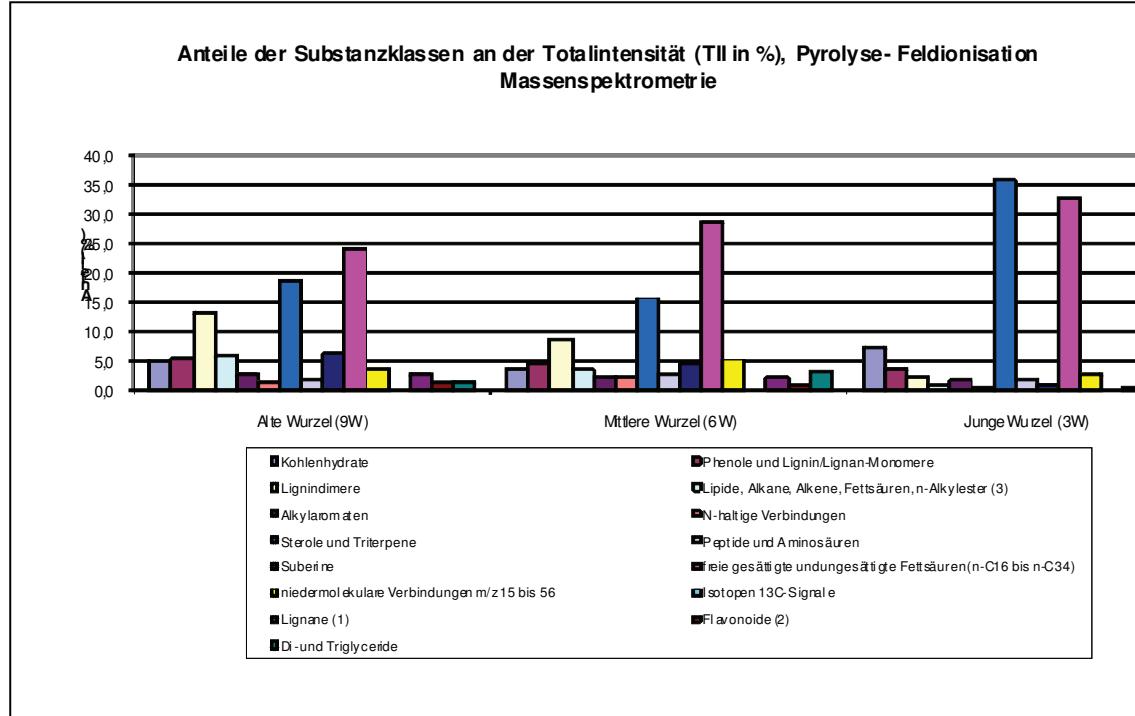


Abb. 30 Graphische Darstellung der Anteile der Substanzklassen der Extrakte (Pyrolyse-Feldionisationsmassenspektrometrie).

In der folgenden Tabelle sind die Substanzklassen der Reihe nach aufgeführt, so wie sie in der Analyse festgestellt werden konnten.

| | Alte Wurzel (9W) | Mittlere Wurzel (6W) | Junge Wurzel (3W) |
|---|------------------|----------------------|-------------------|
| Di-/Triglyceride | 1,5% | 3,2% | 0,3% |
| Flavonoide | 1,3% | 0,8% | 0,4% |
| Lignane | 3,0% | 2,2% | 0,3% |
| Isotopen ¹³ C-Signale | 0,0% | 0,0% | 0,0% |
| Niedermolekulare Verbindungen m/z 15 bis 56 | 3,8% | 5,2% | 3,0% |
| Freie gesättige, ungesättige FS (n-C16 bis n-C34) | 24,3% | 28,6% | 32,6% |
| Suberine | 6,2% | 4,4% | 1,0% |
| Peptide, AS | 1,8% | 2,6% | 1,7% |
| Sterole, Triterpene | 18,5% | 15,7% | 35,7% |
| N-Haltige Verbindung | 1,5% | 2,2% | 0,6% |
| Alkylaromaten | 2,8% | 2,2% | 1,7% |
| Lipide, Alkane, Alkene, FS, n-Alkylester | 6,0% | 3,6% | 1,1% |
| Lignindimere | 13,3% | 8,7% | 2,2% |
| Phenole, Lignin/Lignan-Monomere | 5,5% | 4,5% | 3,8% |
| Kohlenhydrate | 5,0% | 3,9% | 7,4% |

Tab.4: Tabellarische Auflistung der Anteile der Substanzklassen an der Totalintensität (TII in %).

Dazu lassen sich folgende Aussagen zusammenfassen:

Die hier dargestellten Ergebnisse stellen die Effekte auf die Zellen dar, die durch den Extrakt der Leinpflanze hervorgerufen worden sind. Diese Leinpflanze wurde im Jahr 2007 im Freiland der naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock auf dem Campus Albert-Einstein-Straße gezogenen.

Im Vergleich der verschiedenen Altersstufen Jung, Mittel und Alt zeigt sich die Alte Wurzel als die vielversprechendste Alterstufe für weitere Forschungsarbeiten.

Das Ergebnis im BrdU-Test verifiziert den starken Effekt der Alten Wurzel durch die hohe Proliferationshemmung der Mammakarzinomzellen in der hohen Konzentration.

Im Vergleich dazu konnten keine nennenswerten cytotoxischen Effekte bei den Fibroblasten nachgewiesen werden.

Ebenso negativ fiel die Testung auf eine cytotoxische Wirkung der Leinwurzelextrakte auf BT20-Zellen aus.

5. Diskussion

Nachfolgend interpretiere ich die wesentlichen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und vergleiche sie mit der Literatur. Dabei ist mir bewusst, dass die dortigen Angaben sehr heterogen sind.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass es richtig war, die Wirkungen der Leinpflanze in unterschiedlichen Wachstumsphasen zu prüfen, da sich deutliche Unterschiede herauskristallisierten.

Die Vorteile hinsichtlich Cytotoxizität und Proliferationshemmung liegen eindeutig auf Seiten der Alten Wurzel.

5.1 Cytotoxizität des Leinwurzeextraktes

Bei den Versuchen mit der estrogenrezeptorpositiven Zelllinie MCF7 und den Leinwurzeextrakten konnte ein deutlicher cytotoxischer Effekt festgestellt werden.

Ebenso war eine Konzentrationsabhängigkeit nachweisbar: Im Gegensatz zu den geringer konzentrierten Extrakten ab 100 µg/ml erwiesen sich die Konzentrationsstufen 1000µg/ml und 500µg/ml als cytotoxisch.

Hierbei stellte sich die Alte Wurzel (fortgeschrittenes Wachstumsalter mit 9 Wochen) als besonders wirksam (Signifikanz $p<0,01 \rightarrow$ Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha=1\%$) heraus.

Im Gegensatz dazu konnte ich bei der Mammakarzinomzelllinie BT20 (Estrogenrezeptornegativ) keinen vergleichbaren cytotoxischen Effekt detektieren.

In ihrer Diplomarbeit von 2007 konnte Szewczyk ebenfalls einen cytotoxischen Effekt durch die Leinwurzel nachweisen. Allerdings zeigt sich hier eine größere zelltötende Wirkung bei der ER negativen Zelllinie BT20 als bei der ER positiven Zelllinie MCF7.

Eine mögliche Erklärung könnte darin liegen, dass die geernteten Pflanzen in unterschiedlichen Jahren (hier vorliegend in 2007 gewachsen; bei Szewczyk in 2004) gezüchtet wurden. Die unterschiedlichen Witterungseinflüsse könnten dazu führen, dass sich Stoffe in verschiedenen Konzentrationen in der Pflanze entwickeln, die dann zu heterogenen Ergebnissen führen. Dies konnten schon Booth et al. 2006 in ihrer Arbeit zu Extrakten des Rotkleeps nachweisen.

Weitere Literaturangaben existieren in dieser Form lediglich zu Leinsamen. Saarinen et al. 2006 und Tan et al. 2004 konnten in ihren Arbeiten zeigen, dass Leinsamen einen hemmenden Effekt auf das Wachstum von ER positiven Mammakarzinomzellen, insbesondere auch der MCF7- Zellen haben. Andere Arbeiten, wie die von Patade et al. von 2008, konnten einen positiven Einfluss auf den Fettstoffwechsel postmenopausaler amerikanischer Ureinwohnerinnen durch den Konsum von Leinsamen feststellen.

5.2 Untersuchungen zur Zellproliferation mittels MTT-Test

Bei den durchgeführten MTT-Tests kann man die Proliferation und Vitalität metabolisch intakter Zellen nachweisen, da nur in lebenden Zellen die benötigten mitochondrialen Enzymsysteme für diesen Test vorhanden sind.

In der ER-positiven Zelllinie MCF7 wurde nur in den hohen Konzentrationen 1000 μ g/ml und 500 μ g/ml eine leichte Vitalitätssteigerung bei den Extrakten der Alten und der Mittleren Wurzel registriert.

Bei der ER-negativen Zelllinie BT20 konnte der Extrakt der Mittleren Wurzel eine deutlichere Vitalitätssteigerung hervorrufen.

Diese Ergebnisse der Vitalitätssteigerung entsprachen zunächst nicht den Erwartungen. Eine mögliche Ursache dieser detektierten Vitalitätssteigerung könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Zellen auf die gleichzeitig wirkende, aber diesmal nicht registrierte Cytotoxizität der Leinwurzelextrakte mit einer Steigerung der mitochondrialen Aktivität reagieren.

Ein weiteres Indiz, was dafür sprechen würde, ist die nahezu gleichbleibende Vitalitätsrate in den niedrigen Konzentrationen. Hier war bei beiden Zelllinien nahezu kein Effekt der Leinwurzelextrakte auf die Zellen nachzuweisen.

Zhou et al. konnten 1998 eine ähnliche Beobachtung beschreiben. In ihren Versuchen zeigte sich ein Anstieg der Apoptoserate um das Zwei- bis Dreifache, obwohl die Proliferation nach Gabe von Soja-Isoflavon nur gering zunahm und die Entwicklung von Blasentumoren in den untersuchten Mäusen ausblieb.

Moorghen et al. formulierten auch 1998 die Vermutung, dass die Zelle versucht, die steigende Apoptoserate mit einer gesteigerten Zellproliferation auszugleichen.

5.3 Untersuchungen zur Zellproliferation mittels BrdU-Test

Bei MCF7 konnten wir eine konzentrationsabhängige Hemmung der DNA-Replikation nachweisen. Insbesondere bei der Alten Wurzel zeigte sich eine signifikant starke Hemmung der Proliferation im Vergleich zur Mittleren und Jungen Wurzel.

Eine Proliferationshemmung bei Verwendung der BT20-Zelllinie konnte nur in den hohen Konzentrationen von 1000µg/ml und 500µg/ml gezeigt werden. Diese Hemmung war jedoch nicht so deutlich wie bei MCF7.

Den Wirkmechanismus dieser Phänomene können wir derzeit nicht erklären. Eine ausschließlich ER-vermittelte Proliferationshemmung scheidet aus. In vorangegangenen Arbeiten von Hostanska et al. konnte 2004 gezeigt werden, dass es zu einer Verringerung der Zellproliferation und Zunahme der Apoptose in unterschiedlichen Mammakarzinomzelllinien kommen kann, unabhängig vom Estrogenrezeptorstatus. Das untersuchte Agens war in dieser Arbeit ein Traubensilberkerzen-Extrakt (*Cimicifuga racemosa*).

1991 konnten Peterson et al. feststellen, dass Genistein, ein Isoflavon, das Zellwachstum sowohl ER-positiver als auch ER-negativer Zellen hemmen kann.

Ein möglicher Erklärungsansatz könnte sein, dass BT20-Zellen auch über einen Progesteron- und Androgenrezeptor verfügen wie MCF7. Dafür könnte das Ergebnis sprechen, zu dem Yeh et al. 2003 in ihrer Arbeit gekommen sind, nach der alle normalen Brustzellen einen Androgenrezeptor exprimieren und auch 85% aller Mammatumoren.

5.4 Fibroblasten

Unter Fibroblasten versteht man die spezifische ortständige Zelle des Bindegewebes. Sie ist für den Stoffwechsel der Matrix-Bestandteile, wie die Neusynthese und die Überwachung des Abbaus zuständig und zeichnet sich durch eine hohe Syntheseaktivität aus (Lüllmann-Rauch, 2003).

Allred et al. haben 2000 in ihrer Arbeit gezeigt, dass die in großen Mengen in der Sojapflanze vorkommenden Isoflavone Daidzein und Genistein die Tumorzellproliferation fördern. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Leinwurzelextrakt zytotoxisch auf ER-positive Mammakarzinomzellen wirkt. Allerdings muss geprüft werden, wie der Einfluss auf gesunde Zellen ist.

Hierzu eine kritische Anmerkung: Aufgrund nachgewiesener Schwierigkeiten (Vorarbeiten) zur Verifizierung einer primären Mammazelllinie verwendeten wir primär angezüchtete Fibroblasten. Vergleichende Literaturangaben existieren nicht. Bei diesen Fibroblasten konnte nur eine geringe Ausstattung mit Hormonrezeptoren detektiert werden (vgl. Kap. 3.7).

In den hier vorliegenden Ergebnissen konnten wir feststellen, dass eine cytotoxische Wirkung durch die Leinwurzelextrakte bei den Fibroblasten nahezu nicht feststellbar ist. Bei den Testungen zur Entwicklungsfähigkeit mittels BrdU-Test fällt eine starke Hemmung in den hohen Konzentrationen 1000 μ g/ml, 500 μ g/ml und 100 μ g/ml auf.

Diese Hemmung kann darauf hindeuten, dass die Zellen in eine Ruhephase übergehen, wenn sie dem Leinwurzelextrakt ausgesetzt sind und die weitere Entwicklung einstellen.

In den geringen Konzentrationen 0,1 μ g/ml und 0,01 μ g/ml konnte man bei dem Extrakt der Jungen Wurzel eine Steigerung der Fibroblastzellproliferation feststellen.

Dies deckt sich mit der Beobachtung von King et al. von 2006. In dieser Studie wurde eine Erhöhung der Zellproliferation bei Verwendung kleiner Extraktkonzentrationen beobachtet.

Allerdings bezieht sich diese Studie auf die ER-positive Zelllinie MCF7 und den Extrakt von Panax quinquefolium, dem amerikanischen Ginseng. Die Arbeitsgruppe kommt zu dem Schluss, dass die Ergebnisse durch eine Interaktion am Estrogenrezeptor entstehen.

Inwieweit sich dieses Ergebnis auf die vorliegenden Fibroblasten übertragen lässt, muss noch weitergehend untersucht werden, vor allem dann, wenn der Leinwurzelextrakt eine Anwendung im medizinsch-prophylaktischen Bereich finden soll.

5.5 Massenspektrometrische Analyse der Inhaltstoffe der Extrakte

Vorangegangene Arbeiten von Westcott und Muir 2003 und von Wiesenborn et al. 2003 konnten hohe Menge an Lignanen im Leinsamen bestätigen.

Dass der hier vorliegende Extrakt von der Leinwurzel antikanzerogene Effekte besitzt, zeigen die oben genannten Versuchsergebnisse.

Nun wurde die massenspektrometrische Analyse der Leinwurzelextrakte genutzt, um ein Vorkommen anderer, ebenfalls antikanzerogen wirkender Stoffe nachzuweisen und einen gegebenenfalls bestehenden Unterschied in der Stoffklassenverteilung in den einzelnen Altersstufen zu finden.

Zur massenspektrometrischen Analyse wurden die Extrakte der Alten, der Mittleren und der Jungen Wurzel gebracht.

Hierbei erfolgte die quantitative Bestimmung der Inhaltsstoffe in den Extrakten. Dabei konnten verschiedene Substanzen detektiert werden. Deren Anteile waren in den verschiedenen Altersstufen durchaus unterschiedlich.

Die Stoffe mit dem prozentual höchsten Anteil in der Alten Wurzel waren Flavonoide, Lignane, Suberine, Alkylaromaten, die Gruppe der Lipide, Alkane, Alkene, Fettsäuren und n-Alkylester und die Lignindimere.

In der Mittleren Wurzel waren folgende Stoffe am häufigsten vertreten: Di-/Triglyceride, niedermolekulare Verbindungen, Peptide und Aminosäuren, N-Haltige/Verbindungen. Flavonoide und Lignane wurden auch nachgewiesen, jedoch in einem geringeren Anteil als in der Alten Wurzel.

Die Stoffe, die in der Jungen Wurzel den höchsten Anteil hatten, waren die freien gesättigten und ungesättigten Fettsäuren, Sterole und Triterpene und die Kohlenhydrate. Flavonoide und Lignane waren ebenfalls zu detektieren, jedoch mit einem Anteil von unter 0,5% äußerst gering.

Die in allen drei Extrakten vorkommende, im Vergleich zu den Sterolen und freien Fettsäuren niedrige Menge an Kohlenhydraten und Peptiden, lässt sich durch die Extraktionsmethode nach Luyengi et al. erklären. Hierbei kommt es zu einer Anreicherung von freien Fettsäuren und Sterolen in den gewonnenen Extrakten.

In Voruntersuchungen (Szewzyk 2007) konnte festgestellt werden, dass es nur geringe Unterschiede zwischen den eingeengten Extrakten aus dem Kolben und den mit Ethanol

resuspendierten Extrakten gibt. Dies lässt den Schluss zu, dass sich Ethanol gut als Lösungsmittel eignet.

Auch in dieser Arbeit zeigte sich bei allen Testungen zur Cytotoxizität und Zellproliferation, dass Ethanol keinen toxischen Effekt auf die Zellen hat (Negativkontrolle 2 im Vergleich zu Negativkontrolle 1).

Bei der Suche nach möglichen antikanzerogenen wirkenden Stoffen in den vorliegenden Extrakten fallen die Lignane auf. Sie sind in allen drei Extrakten zu finden. Der höchste Anteil steckt im Extrakt der Alten Wurzel mit 3,0%.

Ebenso verhält es sich mit den Phenolen und Ligninmono- bzw. dimeren. Da Phytoestrogene zu den phenolischen Verbindungen gehören, könnte in diesen Stoffen die gezeigte antikanzerogene Wirkung begründet sein.

Dafür spricht, dass die stärkste cytotoxische Wirkung bei dem Extrakt der Alten Wurzel zu finden war, der auch die höchsten Stoffklassenanteile der oben genannten Stoffe hat, er liegt bei 18,8%. Im Extrakt der Mittleren Wurzel beträgt er 13,2% und im Extrakt der Jungen Wurzel 6 %.

Dieser Zusammenhang spricht dafür, dass der antikanzerogene Effekt durch Phytoestrogene vermittelt wird.

Nun gibt es noch weitere Stoffe, die nachgewiesenermaßen die Zellproliferation reduzieren: die Fettsäuren. Die Verteilung dieser Stoffgruppe liegt in den untersuchten Extrakten folgendermaßen vor: Alte Wurzel 24,3%; Mittlere Wurzel 28,6%; Junge Wurzel 32,6%.

Ein Angriffspunkt der Fettsäuren ist der PPAR α (peroxisomal proliferator-activated receptor gamma). Dabei handelt es sich um einen ligandenaktivierten Transkriptionsfaktor, der zu den Hormonrezeptoren zählt. Nachgewiesen werden konnte er in der Brust, in der Prostata und im Darmepithel (Rosen und Spiegelmann, 2001; Koeffler, 2003). Sie binden an ihn und aktivieren ihn (Forman et al., 1997; Xu et al., 1999; Thoennes et al., 2000).

Bei Untersuchungen an Mäusen konnte gezeigt werden, dass das Wachstum ER-negativer Brustkrebszellen durch die Gabe großer Mengen ungesättigter Fettsäuren, die sehr zahlreich in Leinsamen, Rapsöl und Fisch vorkommen, verringert wird (Rose et al., 1997).

Ricote et al. (1998), Mueller et al. (1998), Elstner et al. (1998) und Brockman et al. (1998) konnten zeigen, dass die Zellproliferation in Krebszellkulturen von Brust, Prostata und Darm gehemmt wird, wenn PPAR-Liganden hinzugegeben werden.

In den Mammakarzinomzellkulturen geschieht dies mittels Induktion der Apoptose, Hemmung der Zellproliferation und Inhibition der Tumorangiogenese durch PPAR α -Liganden (Lee et al., 2003, Fenner et al., 2005, Bonofiglio et al., 2006, Kim et al., 2006).

Weitere Studien mit anderen Pflanzenextrakten aus Kudzu (*Pueraria thomsonii*) und der Tragantwurzel (*Astragalus membranaceus*) von Shen et al. (2006) zeigten, dass PPAR α durch diese Extrakte signifikant aktiviert wurde. Als aktivierende Substanzen konnten die Isoflavone Formononetin und Daidzein identifiziert werden. Dang et al. (2003) und Mezei et al. (2003) konnten ebenso zeigen, dass auch das Isoflavon Genistein in hohen Konzentrationen über 1 μ mol/l als PPAR-Agonist wirkt.

Eine weitere möglicherweise vorhandene Stoffgruppe, die antikanzerogene Eigenschaften besitzt, ist die der Podophyllotoxine. Eingeordnet werden kann sie in die Gruppe der Lignane.

Pharmakologisch betrachtet, handelt es sich um ein starkes Spindelgift, zählt somit zu den Zytostatika. Zum Einsatz kommt es in der topischen Behandlung von Anogenitalwarzen.

Richter (1996) und Heldt (2003) konnten zeigen, dass eine Überdosierung zu Krämpfen, Gastroenteritiden und Atemlähmung führen kann.

Auch in *Linum flavum* und in *Linum capitatum* findet sich ein Anteil von 3,5% an 6-Methoxypodophyllotoxin (Windhövel et al., 2003). Abarzua et al. konnten 2007 in LC/MS-Untersuchungen 6-Methoxypodophyllotoxin in *Linum usitatissimum* nachweisen. Allerdings kann gegenwärtig nicht nachgewiesen werden, in welcher Konzentration dieser Stoff vorkommt und ob er einen zelltötenden Effekt hat. Auch der Einfluss des Stoffes auf gesunde Zellen muss noch weiter geklärt werden.

Den prozentual höchsten Anteil in der Substanzklassenverteilung in dem Extrakt der Jungen Wurzel hat die Gruppe der Sterole mit 35,7%. Im Extrakt der Alten Wurzel beträgt der Anteil 18,5% und in der Mittleren Wurzel 15,7%.

Sterole gehören zur Gruppe der Steroide, ebenso wie Cholesterin, Gallensäuren, Vitamin D und die Steriodhormone.

Weiterhin findet man sie als Membranbestandteil in der äußeren Mitochondrienmembran und der Plasmamembran.

Chemisch betrachtet sind Sterole Steroidalkohole, die eine β -ständige Hydroxygruppe am C-3-Atom und eine oder mehrere Doppelbindungen im Ring B und der Seitenkette haben.

Das wichtigste tierische Sterol ist das Cholesterin. Bei den Pflanzen ist es z. B. das Ergosterol, das β - Sitosterol und das Stigmasterol (Koolman und Röhm, 1998).

Da zu den Steroiden auch die Steroidhormone und damit auch das Estradiol gehören, liegt die Vermutung nahe, dass auch pflanzliche Sterole estrogene Aktivität besitzen können.

Somit könnte ein proliferationsfördernder Effekt eines Pflanzenextraktes, wie der der Jungen Wurzel, durch einen nachgewiesenermaßen hohen Anteil an Sterolen erklärt werden.

Des Weiteren lässt sich eine mögliche antikanzerogene Wirkung für folgende Stoffe festhalten:

Für Phenole und Phytoestrogene, Fettsäuren und Lignane. Welcher dieser Stoffe letztendlich und in welcher Konzentration verantwortlich ist und welche Hilfsstoffe eventuell benötigt werden, wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein müssen.

5.6 Weitere Einflüsse

Die hier vorliegenden Ergebnisse müssen in Abhängigkeit der Wachstumsbedingungen für die Pflanzen interpretiert werden.

Wie in Kapitel 3 beschrieben, sind die Pflanzen im Freiland im Sommer 2007 gesät, aufgewachsen und geerntet worden. Somit waren sie den Witterungsbedingungen vollständig ausgesetzt.

Booth et al. haben 2006 in ihrer Arbeit festgehalten, dass es eine saisonale Variabilität für die im Roten Klee (*Trifolium pratense*) gemessenen Inhaltstoffe gibt. Damit hängt der von den Inhaltstoffen vermittelte Effekt wesentlich von der Erntezeit der Pflanze ab. Man kann auch davon ausgehen, dass jahreszeitentypische Witterungs- und Lichtverhältnisse Einfluss auf die Entwicklung der Pflanzeninhaltstoffe haben, besonders in der hier untersuchten einjährigen Pflanze *Linum usitatissimum*.

Inwieweit eine Standardisierung der Wachstumsbedingung durch eine Kultivierung in einem Gewächshaus einen Einfluss auf die Entwicklung der Inhaltsstoffe der Pflanze hat und ob sich dadurch eine konstante Konzentration in allen Pflanzen erreichen lässt, ist zur Zeit Gegenstand einer weiteren Forschungsarbeit der Universitätsfrauenklinik Rostock.

6. Ausblick

Weiterführende Untersuchungen sind für die Erforschung der Wirkmechanismen und Benennung der Substanzen oder Substanzfraktionen, die eine Wirkung vermitteln, notwendig.

Auf die Frage nach der Anwendung der Leinwurzel im humanen System können gegenwärtig folgende Aussagen getroffen werden:

- Momentan ist eine Anwendung am Menschen nicht möglich.
- Ein Ausschluss von Toxinen ist abschließend noch nicht erfolgt.
- Untersuchungen zum Metabolismus (u. a. zum First Pass Effect) müssen einer Anwendung ebenfalls vorausgehen.
- Darüber hinaus könnte durch eine Kooperation, z. B. mit der Pharmaindustrie, geprüft werden, ob ein Nahrungsergänzungsmittel auf Basis eines Leinwurzelextraktes für die Anwendung am Menschen sinnvoll ist.
- Es wäre auch denkbar, die Leinwurzel nach dem Vorbild der Gingko-Wurzel als Extrakt zu verwenden.

7. Zusammenfassung

Diese Arbeit konnte zeigen, dass in der Leinwurzel durchaus ein Potential zur Hemmung hormonabhängig wachsender Karzinomzellen liegt.

Insbesondere zeigt sich eine Konzentrationsabhängigkeit.

Die hoch konzentrierten Extrakte wirken deutlich cytotoxischer als die gering konzentrierten. Ebenso zeigt sich, dass die Extrakte der Alten Wurzel einen wesentlich sichtbareren Effekt haben als die der Mittleren und die der Jungen Wurzel. Diese deutet darauf hin, dass man, um den vollen Effekt eines Leinwurzelextraktes ausschöpfen zu können, der Pflanze Zeit zum Reifen geben sollte, wenn sie im Freiland gezogen wird. Deutlich ist auch der geringere Effekt bei der estrogenrezeptornegativen Zelllinie. Das deutet auf einen über Estrogenrezeptor vermittelten Effekt hin.

Allerdings lässt sich Anhand dieser Ergebnisse keine Aussage darüber treffen, über welche Art Estrogenrezeptor die Wirkung vermittelt wird. Weitere Arbeiten sind nötig, um zu differenzieren, ob der Effekt über den zytoplasmatischen Estrogenrezeptor oder G-Protein-gekoppelten Rezeptor erfolgt.

Wie oben genannt, ist der Zeitpunkt der Ernte ein nicht zu unterschätzender Faktor für die Wirkung des Leinwurzelextraktes. Mit zunehmender Reife der Pflanze kommt es zur Ausbildung und Weiterentwicklung von Inhaltstoffen, die erst mit fortgeschrittenem Wachstum zum Tragen kommen und auch dann erst eine Wirkung entfalten können.

In der hier vorliegenden Arbeit werden die Extrakte an verschiedenen Zelllinien getestet. Zum Einsatz kommen, wie bereits erläutert, eine estrogenrezeptorpositive und -negative Zelllinie und eine primäre Zelllinie zur Kontrolle.

Damit soll ein möglicher Unterschied in der Wirkung und ein Hinweis auf den Wirkmechanismus des Extraktes auf die Zelle aufgezeigt werden.

Der größte cytotoxische Effekt ist bei der estrogenrezeptorpositiven Zelllinie zu detektieren. Bei der estrogenrezeptornegativen Zelllinie ist der Effekt bei Weitem nicht

so deutlich. Dies deutet darauf hin, dass die nachgewiesenen Effekte über einen Estrogenrezeptor vermittelt werden.

Deutlich ist auch ein ausbleibender Effekt auf die primäre Zelllinie der Fibroblasten. Das ist positiv zu werten, da man davon ausgehen kann, dass der Leinwurzelextrakt vermutlich keinen negativen Effekt auf gesunde Zellen hat, was für einen späteren Gebrauch von Vorteil wäre.

Abschließend bleibt festzustellen, dass die vorliegenden Ergebnisse die Leinwurzel als eine vielversprechende Pflanze in der Prävention und Bekämpfung von Mammakarzinomen zeigen. Allerdings sind die vorliegenden Daten Ergebnisse von *In-vitro*-Studien. Weiterführende Untersuchungen sind notwendig um das volle Potential der Leinwurzel *in vivo* zu belegen.

8. Literaturverzeichnis

Abarzua S., Szewczyk M., Gailus S., Richter D.-U., Ruth W., Briese V., Piechulla B.: Effects of phytoestrogen extracts from *Linum usitatissimum* on the Jeg3 human trophoblast tumour cell line, in: Anticancer Res 2007; 27 (4A): 2053-2058.

Adlercreutz H., Höckerstedt K., Bannwart C., Bloigu S., Hämäläinen E., Fotsis T., Ollus A.: Effect of dietary components, including lignans and phytoestrogens, on enterohepatic circulation and liver metabolism of estrogens and on sex hormone binding globuline SHGB, in: J Steroid Biochem 1987; 27(4-6): 1135-1144.

Adlercreutz H., Gorbach S., Goldin B.: Dietary phyto-estrogens and the menopause in Japan, in: Lancet 1992; 339 (8803): 1233.

Adlercreutz H., Bannwart C., Wahala K., Makela T., Brunow G., Hase T., Arosemena P.J., Kellis J.T. Jr., Vickery L.E.: Inhibition of human aromatase by mammalian lignans and isoflavanoid phytoestrogens, in: J Steroid Biochem Mol Biol 1993; 44(2): 147-153.

Adlercreutz H., Mazur W., Bartels P., Elomaa V.-V., Watanabe S., Wähälä K., Landström M., Lundin E., Bergh A., Damberg J.-E., Åman P., Widmark A., Johansson A., Zhang J.-X., Hallmans G.: Phytoestrogens and prostate disease, in: J Nutr 2000; 130(3): 658S-659S.

Adlercreutz H., Mazur W.: Phytoestrogens and western disease, in: Ann Med 1997; 29(2): 95-120.

Adlercreutz H., Heinonen S.M., Penalvo-Garcia J.: Phytoestrogens, cancer and coronary heart disease, in: BioFactors 2004; 22(1-4): 229-236.

Allred C.D., Yu Y.H., Allred K.F., Chang J., Helferich W.G.: Dietary Genistein stimulates growth of estrogen-dependent breast cancer tumors similar to that observed with genistein, in: Carcinogenesis 2001; 22(10): 1667-1673.

Begum A.N., Nicolle C., Mila I., Lapierre C., Nagano K., Fukushima K., Heinonen S.M., Adlercreutz H., Remesy C. and Scalbert A.: Dietary lignins are precursors of mammalian lignans in rats, in: *J Nutr* 2004; 134(1): 120-127.

Booth N.L., Overk C.R., Yao P., Totura S., Deng Y., Hedayat A.S., Bolton J.L., Pauli G.F., Farnsworth N.R.: Seasonal variation of red clover (*Trifolium pratense*, *L. Fabaceae*) isoflavones and estrogenic activity, in: *J Agric Food Chem* 2006; 54(4): 1277-1282.

Bonofiglio D., Aquila S., Catalano S., Gabriele S., Belmonte M., Middea E., Qi H., Morelli C., Gentile M., Maggiolini M., Ando S.: Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activates p53 gene promoter binding to the nuclear factor-kappaB sequence in human MCF7 breast cancer cells, in: *Mol Endocrinol* 2006; 20(12): 3083-3092.

Brockman J.A., Gupta R.A., Dubois R.N.: Activation of PPARgamma leads to inhibition of anchorage-independent growth of human colorectal cancer cells, in: *Gastroenterology* 1998; 115(5): 1283-1285.

Dang Z.C., Audinot V., Papapoulos S.E., Boutin J.A., Löwik C.W.: PPAR γ as a molecular target for the soy phytoestrogen genistein, in: *J Biol Chem* 2003; 278(2): 962-7.

Dambroth, M.; Seehuber, R.: *Flachs-Züchtung, Anbau, Verarbeitung*, Stuttgart 1988.

Diepenbrock, W. u. a.: *Spezieller Pflanzenbau*, Stuttgart 1999.

Elstner E., Muller C., Koshizuka K., Williamson E.A., Park D., Asou H., Shintaku P., Said J.W., Heber D., Koeffler H.P.: Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells *in vitro* and in BNX mice, in: *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(15): 8806-8811.

Fenner M.H., Elstner E.: Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands for the treatment of breast cancer, in: *Expert Opin Investig Drugs* 2005; 14(6): 557-568.

Forman B.M., Chen J., Evans R.M.: Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors α and γ , in: Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94(9): 4312-4317.

Foth D.: Alternativen zur Hormonsubstitutionstherapie, in: Journal für Menopause 2003; 10(4): 37-39.

Heinonen S., Nurmi T., Liukkonen K., Poutanen K., Rafaelli B., Wähälä K., Deyama T., Nishibe S., Adlercreutz H.: *In vitro* metabolism of plant lignans: new precursors of mammalian lignans enterolactone and enterodiol, in: J Agric Food Chem 2001; 49(7): 3178-3186.

Heldt H.: Pflanzenbiochemie, Heidelberg 2003.

Horn-Ross, P.L., Barnes, S., Lee, M., Coward L., Mandel J.E., Koo J., John E.M., Smith M.: Assessing phytoestrogen exposure in epidemiologic studies: development of a database (United States), in: Cancer Causes Control 2000; 11(4): 289-298.

Hostanska K., Nisslein T., Freudenstein J., Reichling J., Saller R.: *Cimicifuga racemosa* extract inhibits proliferation of estrogen receptor-positive and negative human breast carcinoma cell lines by induction of apoptosis, in: Breast Cancer Res Treat 2004; 84(2): 151-160.

Ignatov T., Eggemann H., Semczuk A., Smith B., Bischoff J., Roessner A., Costa SD., Kalinski T., Ignatov A.: Role of GPR30 in endometrial pathology after tamoxifen for breast cancer, in: Am J Obstet Gynecol 2010; 203(6): 595.e9-16. Epup 2010 Oct 20.

Instruction Manual BrdU, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim August 2007.

Instruction Manual MTT, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Juli 2005.

Instruction Manual LDH, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim September 2005.

Kim K.Y., Kim S.S., Cheon H.G.: Differential anti-proliferative actions of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists in MCF-7 breast cancer cells, in: Biochem Pharmacol 2006; 72(5): 530-540.

King M.L., Adler S.R., Murphy L.L.: Extraction-dependent effects of American ginseng (*Panax quinquefolium*) on human breast cancer cell proliferation and estrogen receptor activation, in: Integr Cancer Ther 2006; 5(3): 236-243.

Kleine-Gunk, B.: Phytoestrogene: Die sanfte Alternative während der Wechseljahre, Stuttgart 2000.

Kleine-Gunk, B.: Phytoestrogene und Brustkrebs: Sind Isoflavone Promotoren oder Protektoren? in: Gyne 2006; 27(2): 40.

Koolman, J.; Röhm, K.-H.: Taschenatlas der Biochemie, Stuttgart 1998.

Knasmüller S., Parzefall W., Schwab C.: Kanzerogene und gentoxische Substanzen in Lebensmitteln und natürliche Protektionsmechanismen, in: Journal für Ernährungsmedizin 2001; 3(1): 5-16.

Koeffler P.: Peroxisome proliferator-activated receptor γ and cancers, in: Clin Cancer Res 2003; 9(1): 1-9.

Kreutzig, T.: Kurzlehrbuch Biochemie, München 2002.

Kulling S., Watzl B.: Phytoöstrogene, in: Ernährungs-Umschau 2003; 50(6): 234-239.

Lamartiniere C.A., Moore J.B., Brown N.M., Thompson R., Hardin M.J., Barnes S.: Genistein suppresses mammary cancer in rats, in: Carcinogenesis 1995; 16(11): 2833-2840.

Lee C.H., Olson P., Evans R.M.: Lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferators activated receptors, in: Endocrinology 2003; 144(6): 2201-2207.

Löffler, G.; Petrides, P.: Biochemie und Pathobiochemie, Berlin 2003.

Lüllmann-Rauch, R.: Histologie Verstehen-Lernen-Nachschatzen, Stuttgart 2003.

Luyengi L., Suh N., Fong H., Pezzuto J., Konghorn D.: A lignan and four terpenoids from *Brucea javanica* that induce differentiation with cultured HL-60 promyelocytic leukemia cells, in: Phytochemistry 1996; 43(2): 409-412.

Mezei O., Banz W. J., Steger R.W., Peluso M.R., Winters T.A., Shay N.: Soy isoflavones exert antidiabetic and hypolipidemic effects through the PPAR pathways in obese Zucker rats and murine RAW 264.7 cells, in: J Nutr 2003; 133(5): 1238-1243.

Messina M., Barnes S.: The role of soy products in reducing risk cancer, in: J Natl Cancer Inst 1991; 83(8): 541-546.

Mueller E., Sarraf P., Tontonoz P., Evans R.M., Martin K.J., Zhang M., Fletcher C., Singer S., Spiegelman B.M.: Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR γ , in: Mol Cell 1998; 1(3): 465-470.

Moorghen M., Orde M., Finney K.J., Appelton D.R., Watson A.J.: Sulindac enhances the cell proliferation in DHM-treated mouse colonic mucosa, in: Cell Prolif 1998; 31(2): 59-70.

Paracelsus, T.: Septem Defensiones, Basel 1589.

Patade A., Devareddy L., Lucas E.A., Korlagunta K., Daggy B.P., Arjmandi B.H.: Flaxseed reduces total and ldl cholesterol concentrations in native american postmenopausal women, in: J womens health 2008; 17(3): 355-366.

Peterson G., Barnes S.: Genistein inhibition of the growth of human breast cancer cells: independence from estrogen receptors and the multi-drug resistance gene, in: Biochem Biophys Res Commun 1991; 179(1): 661-667.

Richter, G.: Biochemie der Pflanzen, Stuttgart 1996.

Ricote M., Huang J., Fajas L., Li A., Welch J., Najib J., Witztum J.L., Auwerx J., Palinski W., Glass C.K.: Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein, in: Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95(13): 7614-7619.

Rose D.P.: Dietary fatty acids and cancer, in: American Journal of Clinical Nutrition 1997; 66(4 suppl): 998S-1003S.

Rosen E.D., Spiegelman B.M.: PPAR γ : a nuclear regulator of metabolism, differentiation and cell growth, in: J Bio Chem 2001; 276(41): 37731-37734.

Ruß, A.; Endres, S.: Arzneimittel Pocket Plus, Grünwald 2007.

Saarinen N.M., Power K., Chen J., Thompson L.U.: Flaxseed attenuates the tumor growth stimulating effect of soy protein in ovariectomized athymic mice with MCF-7 human breast cancer xenografts, in: Int J Cancer 2006; 119(4): 925-931.

Sanden C., Broselid S., Cornmark L., Andersson K., Daszkiewicz-Nilsson J., Martensson U., Olde B., Leeb-Lundberg FL.: G Protein-Coupled Estrogen Receptor 1 (GPER1)/GPR30 localizes in the plasma membrane and traffics intracellularly on cytokeratin intermediate filaments, in: Mol Pharmacol 2010; 79(3): 400-410.

Setchell K., Adlercreutz H.: Mammalian lignans and phytoestrogens. Recent studies on their formation, metabolism and biological role in health and disease. In: Rowland I (ed). Role of the gut flora in toxicity and cancer, in: Academic Press 1988; London: 315-345.

Shen P., Liu M.H., Nq T.Y., Chan Y.H., Yong E.L.: Differential effects of isoflavones, from *Astragalus membranaceus* and *Pueraria thomsonii*, on the activation of PPAR α , PPAR γ , and adipocyte differentiation *in vitro*, in: J Nutr 2006; 136(4): 899-905.

Sitte, P. u. a.: Lehrbuch der Botanik, Heidelberg 1999.

Szewczyk, M.: Untersuchungen zum Einfluß von Pflanzenextrakten aus der Leinpflanze *Linum usitatissimum* auf die Zellproliferation und Cytotoxizität humaner Karzinomzellen sowie Trophoblasten und Fibroblasten, Rostock 2007.

Tan K.P., Chen J., Ward W.E., Thompson L.U.: Mammary gland morphogenesis is enhanced by exposure to flaxseed or its major lignan during suckling in rats, in: *Exp Biol Med (Maywood)* 2004; 229(2): 147-57.

Thoennes S.R., Tate P.L., Price T.M., Kilgore M.W.: Differential transcriptional activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ by N-3 and N-6 fatty acids in MCF-7 cells, in: *Mol Cell Endocrinol* 2000; 160(1-2): 67-73.

Westcott N., Muir A.: Flax seed lignan in disease prevention and health promotion, in: *Phytochem Rev* 2003; 2: 401-417.

Wiesenborn D., Tostenson K., Kangas N.: Continuous abrasive method for mechanically fractionating flaxseed, in: *J Am Oil Chem Soc* 2003; 80(3): 295-300.

Windhövel J., Krohn O., Mohagheghzadeh A., Godt D., Wink M., Alfermann A.W.: Lignan production in hairy root cultures of *Linum* species, in: *Proceedings of the International Meeting Phytochemistry and Biology of Lignans 2003*; 103: 56.

Xu H.E., Lambert M.H., Montana V.G., Parks D.J., Blanchard S.G., Brown P.J., Sternbach D.D., Lehmann J.M., Wisely G.B., Willson T.M., Kliewer S.A., Milburn M.V.: Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator activated receptors, in: *Mol Cell* 1999; 3(3): 397-403.

Yeh S., Hu Y.-C., Wang P.-H., Xie C., Xu Q., Tsai M.-Y., Dong Z., Wang R.-S., Lee T.-H., Chang C.: Abnormal mammary gland development and growth retardation in female mice and MCF7 breast cancer cells lacking androgen receptor, in: *J. Exp. Med* 2003; 198(12): 1899-1908.

Zhou J.R., Mukherjee P., Gugger E.T., Tanaka T., Blackburn G.L., Clinton S.K.: Inhibition of murine bladder tumorigenesis by soy isoflavones via alterations in the cell cycle, apoptosis and angiogenesis, in: *Cancer Res* 1998; 58(22): 5231-5238.

Internetressourcen

G-Protein-gekoppelter Rezeptor:
<<http://www.csuci.edu/alzheimer/images/gprotein.jpg>>, letzter Zugriff 28.02.2011.

Hupfeld, H.: Intrazellulärer Rezeptor, Abbildung 4:
<<http://www.zum.de/Faecher/Materialien/hupfeld/index.htm?/Faecher/Materialien/hupfeld/Cytologie/Prot-hel.htm>>, letzter Zugriff 28.02.2011.

Estrogenrezeptor:
<<http://de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/410707>>, letzter Zugriff 28.02.2011.

LGC Promochem: <<http://www.lgcpromotionchem-atcc.com>>: product discription, letzter Zugriff 28.02.2011.

9. Thesen

1. Das Mammakarzinom ist eine der 10 häufigsten Todesursachen bei Frauen und eine der häufigsten malignen Erkrankungen. Bis jetzt gibt es keine Evidenz für eine suffiziente Prävention in Form von Nahrungsergänzungsmitteln oder Medikamenten.
2. Die Therapie des Mammakarzinoms ist Gegenstand der Forschung und es existieren bereits eine Reihe wirksamer Chemotherapeutika. Als Beispiele seien hier die Gruppen der Antikörper (Trastuzumab), Immunmodulatoren und Chemotherapeutika genannt. Trotzdem ist es wichtig, neue Stoffe zu erschließen, um eine Prävention für diese Erkrankung möglich zu machen.
3. Die einheimische Leinpflanze (*Linum usitatissimum*) ist eine der ältesten Kulturpflanzen der Menschheit und ist äußerst vielseitig in der Anwendung. Die Geschichte der Nutzung ihrer Bestandteile beginnt in der Verwendung als Baumaterial und für die Kleidungsherstellung und ist jetzt in aller Munde als Bestandteil einer gesunden Ernährung.
4. In umfangreichen Studien zur Erkrankungshäufigkeit hat man festgestellt, dass Japanerinnen mit einem hohen Anteil an Soja in der Nahrung wesentlich seltener an Brustkrebs erkranken als Frauen, die sich ohne einen hohen Anteil an Soja ernähren. Dies deutet auf einen präventiven Effekt der Sojapflanze hin.
5. In der Sojapflanze ist der Anteil an Phytoestrogenen besonders hoch. Nun liegt es nahe, eine einheimische Pflanze mit hohem Phytoestrogengehalt zu suchen. Die Leinpflanze ist als einheimische Pflanze mit hohem Gehalt an Phytoestrogenen prädestiniert für weitere Untersuchungen.
6. Phytoestrogene sind sekundäre Pflanzenstoffe. Sie gleichen in Struktur und Wirkung zum Teil dem endogenen Estrogen. So werden Lignane oder Isoflavone nach der oralen Aufnahme umgewandelt. Man findet sie in der Peripherie dann als Aglykone oder Enterodiol bzw. Enterolacton.

7. Die Leinpflanze besteht aus verschiedenen Bestandteilen – Blatt, Stängel, Wurzel, Samen. Es wurde festgestellt, dass die Wurzel den höchsten Anteil an Lignanen enthält und auch den stärksten cytotoxischen Effekt hat.
8. Es ist wichtig herauszufinden, ob es einen Unterschied in der cytotoxischen Wirkung gibt, wenn man länger gewachsene Wurzeln gebraucht oder jüngere. Daher werden in dieser Arbeit verschiedene Wachstumsdauern miteinander verglichen.
9. Nach immunhistochemischer Analyse lässt sich für die verwendeten Zelllinien folgender Rezeptorstatus formulieren: MCF7 exprimiert den Estrogenrezeptor α und β , BT20 ist negativ für ER α und β , allerdings konnte hier der Nachweis für den Progesteron- und Androgenrezeptor gelingen.
10. Der nach Luyengi et al. (1996) hergestellte ethanolische Extrakt der Alten Wurzel wirkt in hohen Konzentrationen signifikant cytotoxisch auf MCF7-Zellen *in vitro*. Dieser Effekt ist bei BT20 wesentlich schwächer.
11. Das als Kontrolle mitgeführte Tamoxifen zeigt in der hohen Konzentration einen deutlichen cytotoxischen Effekt auf alle Zellen. Das kann eine Folge des allgemeinen toxischen Potentials des Tamoxifens sein.
12. Es lässt sich abschließend nicht klären, über welchen Estrogenrezeptor die Wirkung der Extrakte vermittelt wird. Überraschenderweise gibt es trotz nachgewiesener zelltötender Wirkung des Extraktes der Alten Wurzel bei MCF7 eine Vitalitätssteigerung im MTT-Test. Ob dies eine Folge einer mitochondrialen Aktivitätsteigerung verbleibender Zellen ist oder ein über andere Signalkaskaden ausgelöster Effekt ist, wird Gegenstand weiterer Arbeiten sein müssen.
13. Die Wuchsdauer der Pflanze spielt in der Ausprägung ihrer Inhaltstoffe eine große Rolle. Der Gehalt an Lignanen ist in der Alten Wurzel am höchsten. Somit sollte dieser Pflanze ausreichend Zeit zum Wachstum gegeben werden, damit sich die erforderlichen Inhaltstoffe entwickeln können.

14. Die Pflanzenbestandteile, die hier verarbeitet wurden, sind im Freiland kultiviert worden. Durch den Einfluss des Wetters und der Bodenverhältnisse kann es in anderen Jahren zu abweichenden Inhaltsstoffkonzentrationen kommen.

15. Die Wirkungen des Leinwurzelextraktes werden wahrscheinlich nur zu einem geringen Anteil durch die enthaltenen Phytoestrogene vermittelt. Wahrscheinlicher ist es, dass der Extrakt als pflanzliches Vielstoffgemisch wirkt und sich die Wirkung aus der Summe der Effekte der unterschiedlichen Inhaltsstoffe zusammensetzt. Es sind weitere Forschungen nötig, um die relevanten Inhaltstoffe und deren Wirkmechanismus zu enthüllen.

10. Veröffentlichungen

1. Posterpräsentation bei dem 14. Hamburger Symposium über Tumormarker 7.12.– 9.12.2008: Einfluss von Leinwurzeln unterschiedlicher Reifegrade auf Proliferation und Zytotoxizität estrogenrezeptorpositiver Mammakarzinomzellen.

The influence of flax root extracts of different stages of maturity on the proliferation and cytotoxicity of estrogen receptor positive breast cancer cells (Abstract)
Anticancer Research, ISSN: 0250-7005, Vol 28, Number 6b, pp. 4009 – 4090, 2008;
Abstracts of the 14th international Hamburg symposium on tumor markers.

2. Posterpräsentation bei der 126. Tagung der NGGG In Schwerin 18./19.06.2010: Einfluss von Leinwurzeln unterschiedlicher Reifegrade auf Proliferation und Zytotoxizität estrogenrezeptorpositiver Mammakarzinomzellen.

Danksagung

Bei folgenden Menschen möchte ich mich herzlich bedanken:

Herr Prof. Dr. med. V. Briese für die Bereitstellung des Themas.

Frau Dr. rer. nat. D.-U. Richter für ihre Hilfe und Unterstützung, die anregenden Gespräche und den unverwüstlichen Optimismus.

Dem gesamten Team des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik, in dem ich mich immer willkommen gefühlt und ein offenes Ohr gefunden habe. Besonders möchte ich Frau Greschkowitz danken, die immer ein Lächeln auf den Lippen hatte und deren Geduld unerschöpflich schien.

Frau Bauer für die geduldige und tatkräftige Unterstützung bei der Extraktion der Leinwurzeln.

Herrn Dr. A. Schlichting vom Steinbeis-Transfer-Zentrum Groß Lüsewitz für die massenspektrometrischen Analysen und die Erklärungen.

Marlen Szewczyk

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mir diesen Werdegang ermöglichten, immer an mich glaubten und an meiner Seite standen und stehen.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Rostock, den 25.03.2011

Nicole Strater



Einfluss von Leinwurzeln unterschiedlicher Reifegrade auf Proliferation und Zytotoxizität estrogenrezeptorpositiver Mammakarzinomzellen

Strater, N.; Schlichting, A.; Abarzua, S.; Briese, V.; Gerber, B.; Richter, DU.
 Universitätsfrauenklinik am Klinikum Südstadt der Hansestadt Rostock, Südring 81,
 18059 Rostock



Aufgrund hormonähnlicher Bestandteile in der Leinpflanze (Lignane) untersuchten wir *in vitro* den Einfluss unterschiedlicher Reifegrade der Leinwurzel auf Proliferation / Zytotoxizität estrogenrezeptorpositiver Mammakarzinomzellen (MCF7). Der Reifegrad wurde in drei Stufen eingeteilt:

Grad I: 9 Wochen alte Wurzel
 Grad II: 6 Wochen alte Wurzel
 Grad III: 3 Wochen alte Wurzel

Die Wurzeln wurden nach Luyengi et al. extrahiert und in verschiedene Konzentrationsstufen verdünnt. Nach Analyse der enthaltenen Substanzklassen mittels Pyrolyse- Feldionisationsmassenspektrometrie konnten die Tests zur Zytotoxizität und Proliferation durchgeführt werden. Zum Einsatz kamen die Testkits LDH, MTT und BrdU der Fa. Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland.

Einfluss der Extrakte auf die Vitalität der Zellen (BrdU- Test)

Cytotoxizität der Leinwurzel im Vergleich (LDH- Test)

Einfluss des Extraktes auf die Vitalität der Zellen (MTT- Test)

We could detect a cytotoxic and proliferation-inhibiting effect in the high concentration stages of 1000 µg / ml and 500 µg / ml of the extract from Grad I and III.

Diese Ergebnisse stimmen uns positiv, durch weitere Testreihen *in vitro* und vor allem *in vivo* das volle Potential der Leinwurzel zu finden und ausschöpfen zu können.

Literatur: Luyengi L., Suh N., Fong H., Pezzuto J., Konghorm D.; A lignan and four terpenoids from *Brucea javanica* that induce differentiation with cultured HL- 60 promyelotic leukemia cells; *Pytochem*, 43 (2): 409-412, 1996
 Carrizosa DR., Carey LA.; Adjuvant systemic therapy in young women. *Breast Dis*. 23: 67-71, 2005
 Dambroth, Seehuber, Flachs - Züchtung, Anbau, Verarbeitung, S. 15-19, Ulmer, 1. Auflage 1988