

Aus dem Zentrum für Innere Medizin (Lehrstuhl für Naturheilkunde)

Direktorin: Prof. Dr. med. habil. Karin Kraft

Funktionelle und zytotoxische Untersuchungen zur Wirkung eines phytoestrogenhaltigen Wasserextraktes aus der Wurzel von *Linum usitatissimum* auf humane estrogenrezeptorpositive, -negative Mammakarzinomzellen (MCF-7; BT-20) und humane Hepatozyten

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Marco Eczko

Dekan: Prof. Dr.med. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Frau Prof. Dr. med. habil. Karin Kraft, Universität Rostock, Zentrum für Innere Medizin, Lehrstuhl für Naturheilkunde, Ernst-Heydemann-Straße 6, 18057 Rostock

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. habil. Volker Briese, Universität Rostock, Universitätsfrauenklinik und Poliklinik, Südring 81, 18059 Rostock

3. Gutachter: Herr Prof. Dr. rer. nat. habil. Udo Jeschke, Ludwig Maximilians Universität München, Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe - Innenstadt, Maistraße 11, 80337 München

Datum der Einreichung: 24.11.2014

Datum der Verteidigung: 08.04.2015

# Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Abbildungsverzeichnis .....</b>                        | <b>5</b>  |
| <b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>                         | <b>6</b>  |
| <b>1. Einleitung.....</b>                                 | <b>8</b>  |
| 1.1    Brustkrebs .....                                   | 8         |
| 1.2    Der Estrogenrezeptor .....                         | 15        |
| 1.3    Phytoestrogene.....                                | 17        |
| 1.4    Humane Hepatozyten.....                            | 19        |
| 1.5    Zielstellung .....                                 | 21        |
| <b>2. Material und Methoden.....</b>                      | <b>22</b> |
| 2.1    Chemikalien und Materialien .....                  | 22        |
| 2.2    Pflanzenmaterial .....                             | 24        |
| 2.3    Herstellung der Leinwurzelextraktes .....          | 24        |
| 2.4    Massenspektrometrie .....                          | 24        |
| 2.6    Zellkulturmedium .....                             | 26        |
| 2.7    Zellkultivierung .....                             | 26        |
| 2.8    Ermittlung der Lebendzellzahl .....                | 27        |
| 2.9    Immunhistochemie .....                             | 28        |
| 2.10   LDH - Zytotoxizitätstest.....                      | 30        |
| 2.11   BrdU - Zellproliferationstest.....                 | 32        |
| 2.12   Stoffbestimmungen im Zellkulturüberstand .....     | 34        |
| 2.13   Statistische Auswertung.....                       | 35        |
| <b>3. Ergebnisse .....</b>                                | <b>36</b> |
| 3.1    Immunhistochemie .....                             | 36        |
| 3.2    Pyrolyse-Feldionisations-Massenspektrometrie ..... | 37        |
| 3.3    LDH-Zytotoxizitätstest .....                       | 39        |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 3.4       | BrdU-Zellproliferationstest.....   | 40        |
| 3.5       | Analysen der Zellkulturüberstände.....                                     | 42        |
| <b>4.</b> | <b>Diskussion .....</b>  | <b>47</b> |
| 4.1       | Lignanextraktion.....  | 47        |
| 4.2       | Zytotoxizität des Leinwurzelextraktes.....                                 | 48        |
| 4.3       | Veränderung der Zellproliferation durch den Leinwurzelextrakt.....         | 50        |
| 4.4       | Messung im Zellkulturüberstand .....                                       | 52        |
| 4.5       | Verbesserungsmöglichkeiten, Limitationen, weitere Untersuchungsschritte... | 55        |
| <b>5.</b> | <b>Zusammenfassung.....</b>  | <b>56</b> |
| <b>6.</b> | <b>Thesen .....</b>  | <b>58</b> |
| <b>7.</b> | <b>Literaturverzeichnis.....</b>   | <b>60</b> |
|           | <b>Selbstständigkeitserklärung .....</b>                                   | <b>70</b> |
|           | <b>Danksagung.....</b>   | <b>71</b> |

## Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abb. 1 Brustkrebs: Inzidenz und Mortalität weltweit .....                          | 8  |
| Abb. 2 Aromatase- Reaktion .....   | 10 |
| Abb. 3 Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Tumorsubtyp.....                        | 14 |
| Abb. 4 Vergleich zwischen ER $\alpha$ und ER $\beta$ .....                         | 15 |
| Abb. 5 Intrazelluläre ER-Signalwege.....   | 16 |
| Abb. 6 Strukturformeln ausgewählter Phytoestrogene.....                            | 18 |
| Abb. 7 Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und BT-20 und frische humane Hepatozyten..... | 25 |
| Abb. 8 Bürker-Zählkammer .....   | 27 |
| Abb. 9 Prinzip des LDH-Testes .....  | 31 |
| Abb. 10 Prinzip des BrdU-Testes.....   | 33 |
| Abb. 11 Immunhistochemische Untersuchung der MCF-7 Zelllinie.....                  | 36 |
| Abb. 12 Immunhistochemische Untersuchung der BT-20 Zelllinie .....                 | 37 |
| Abb. 13 Pyrolyse-Feldionisations-Massenspektrometrie.....                          | 38 |
| Abb. 14 LDH-Test: Extrakte.....  | 39 |
| Abb. 15 LDH-Test: Kontrollsubstanzen .....   | 40 |
| Abb. 16 BrdU-Test: Extrakte .....  | 41 |
| Abb. 17 BrdU-Test: Kontrollsubstanzen.....   | 42 |
| Abb. 18 $17\beta$ -Estradiolkonzentration im Zellkulturüberstand .....             | 43 |
| Abb. 19 Harnstoffkonzentration humaner Hepatozyten: Extrakte.....                  | 44 |
| Abb. 20 Harnstoffkonzentration humaner Hepatozyten: Kontrollsubstanzen .....       | 44 |
| Abb. 21 Albuminkonzentration humaner Hepatozyten: Extrakte .....                   | 45 |
| Abb. 22 Albuminkonzentration humaner Hepatozyten: Kontrollsubstanzen .....         | 46 |

## Abkürzungsverzeichnis

|                    |   |
|--------------------|---|
| ALAT/ GPT          | Alanin-Aminotransferase/ Glutamat-Pyruvat-Transaminase      |
| ASAT/ GOT          | Aspartat-Aminotransferase/ Glutamat-Oxalacetat-Transaminase |
| ASR                | altersstandardisierte Rate                                  |
| BMI                | Body Mass Index   |
| BRCA1              | Breast Cancer 1   |
| BRCA2              | Breast Cancer 2   |
| BrdU               | 5-Brom-2-desoxyuridin                                       |
| BT-20              | Mammakarzinomzelllinie                                      |
| DMEM               | Dulbecco's Modified Eagle Medium                            |
| DMSO               | Dimethylsulfoxid  |
| DNA                | Desoxyribonukleinsäure                                      |
| E                  | Extinktionswert   |
| EDL                | Enterodiol  |
| EDTA               | Ethylendiamintetraessigsäure                                |
| EFSA               | Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit              |
| EGFR               | Epithelial Growth Factor Receptor                           |
| ENL                | Enterolacton  |
| ER                 | Estrogenrezeptor  |
| ERE                | Estrogen Response Elements                                  |
| FKS                | Fetales Kälberserum   |
| $\gamma$ GT        | gamma-Glutamyltransferase                                   |
| GB                 | Großbritannien  |
| h                  | Stunde  |
| $\text{HCO}_3^-$   | Hydrogencarbonat-Ionen                                      |
| Hep3B              | Zelllinie eines hepatozellulären Karzinoms des Menschen     |
| HEPAC <sup>2</sup> | Langzeitkultursystem für primäre humane Hepatozyten         |
| Hepes              | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure       |
| HepG2              | Zelllinie eines hepatozellulären Karzinoms des Menschen     |
| HER2               | Human Epithelial Growth Factor Receptor 2                   |
| IARC               | International Agency For Research On Cancer                 |
| IGF-1              | Insuline Like Growth Factor 1                               |

|                              |   |
|------------------------------|---|
| LDH                          | Laktatdehydrogenase                         |
| M                            | molar                                       |
| MAT                          | Matairesinol                                |
| MCF-7                        | Mammakarzinomzelllinie                      |
| MDA-MB-231                   | Mammakarzinomzelllinie                      |
| min                          | Minute                                      |
| NaHCO <sub>3</sub>           | Natriumhydrogenkarbonat                     |
| NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> | Ammonium-Ionen                              |
| PBS                          | phosphatgepufferte Salzlösung               |
| PKC                          | Protein-Kinase C                            |
| POD                          | Peroxidase                                  |
| PyFIMS                       | Pyrolyse-Feldionisationsmassenspektrometrie |
| RNA                          | Ribonukleinsäure                            |
| rpm                          | rounds per minute                           |
| s                            | Sekunde                                     |
| SD                           | Standardabweichung                          |
| SEC                          | Secoisolariciresinol                        |
| Src                          | Tyrosinkinase                               |
| TNM                          | Tumor, Nodes/ Lymphknoten, Metastasen       |
| UICC                         | Union Internationale Contre le Cancer       |

# 1. Einleitung

## 1.1 Brustkrebs

Das Mammakarzinom ist nicht nur der häufigste bösartige Tumor, sondern auch die häufigste Todesursache der Frau zwischen dem 30. und 60. Lebensjahr in der westlichen Welt [1]. Auffallend dabei ist die geografische Verteilung der Inzidenzraten: Während das Mammakarzinom in den Industriestaaten sehr häufig auftritt, ist die Inzidenz in Asien und Afrika deutlich niedriger (Abb. 1) [2]. Betrachtet man den Verlauf in den letzten 40 Jahren, ist ein Trend deutlich erkennbar. Die Inzidenz des Mammakarzinoms in den Industrieländern hat sich fast verdoppelt, hingegen sinkt die Mortalität durch bessere Früherkennungsmaßnahmen und neue Therapieansätze stetig. Gegensätzlich dazu verhält es sich in den Schwellenländern, hier steigt die Mortalität durch die zunehmende Lebenserwartung der Menschen bei eingeschränkter medizinischer Versorgung [1].

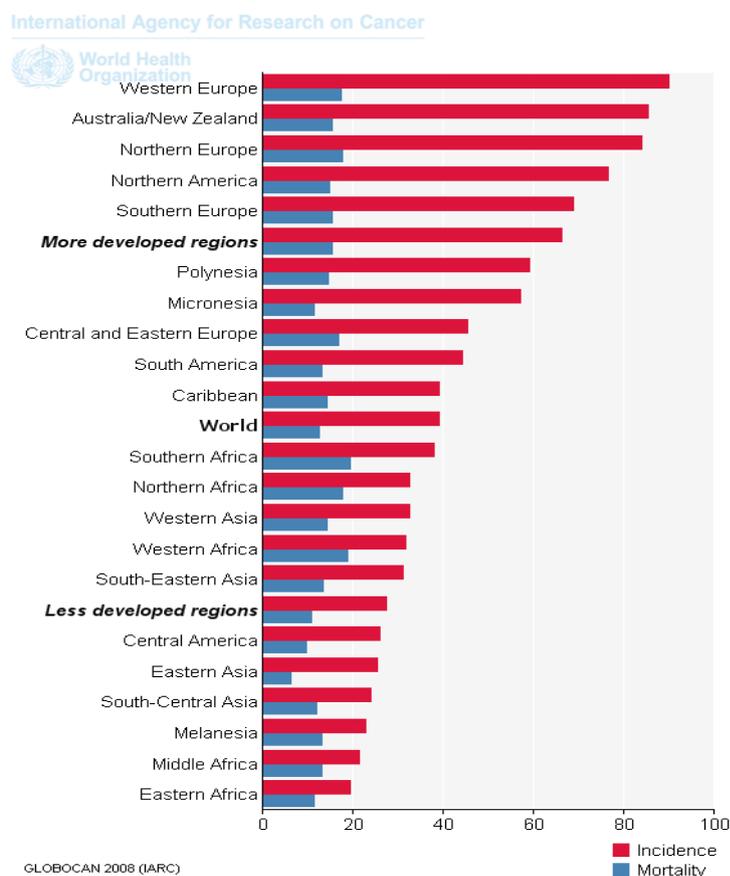


Abb. 1 Brustkrebs: Inzidenz und Mortalität weltweit (altersstandardisiert pro 100.000 Einwohner pro Jahr (ASR)) [2]

Das Mammakarzinom betrifft nicht nur Frauen, obgleich die Inzidenz bei Männern im Vergleich zu den Frauen wesentlich niedriger ist (1:100). In Bezug auf Diagnose und Therapie bestehen zwischen beiden Geschlechtern keine Unterschiede [3].

Durch intensive Forschung wurden zahlreiche Risikofaktoren aufgedeckt, die die Entstehung eines Mammakarzinoms begünstigen. Dazu zählen neben dem weiblichen Geschlecht und den zunehmenden Lebensalter genetische und hormonelle Risikofaktoren sowie Umwelteinflüsse und Ernährung.

### Genetische Risikofaktoren

Der bedeutendste genetische Risikofaktor ist die Mutation im Breast Cancer 1 (BRCA 1) oder Breast Cancer 2 Gen (BRCA 2). Etwa 5 % bis 10 % aller Brustkrebserkrankungen sind durch genetische Mutationen bedingt [4]. Das BRCA 1- und BRCA 2-Gen sind Tumorsuppressorgene, die autosomal-dominant vererbt werden. Tumorsuppressorgene codieren Proteine, die die Zellproliferation hemmen. Dazu zählen unter anderem:

- intrazelluläre Proteine wie der p16-cyclin kinase inhibitor, der den Übergang einer Zelle in die nächste Wachstumsphase hemmt
- Hormonrezeptoren z. B. für den transforming growth factor  $\beta$ , der bei Aktivierung die Zellproliferation hemmt
- Kontrollproteine, welche den Zellzyklus stoppen, falls die DNA beschädigt sein sollte
- Proteine, die die Apoptose induzieren
- DNA-Reparaturenzyme, z. B. BRCA 1 und BRCA 2 [5]

Die Wahrscheinlichkeit, im Laufe des Lebens an einem Mammakarzinom zu erkranken, liegt bei 60 % für Trägerinnen des BRCA 1 Gens und bei 40 % für Trägerinnen des BRCA 2 Gens [6,7]. Weitere genetische Faktoren mit geringerem Erkrankungsrisiko sind Mutationen in den Genen BRIP-1, p-53, CDH 1 und viele weitere [4].

## Hormonelle Risikofaktoren

Der menschliche Körper wird durch eine Vielzahl von Hormonen gesteuert und reguliert. Im Zusammenhang mit der Brustkrebsentstehung wird hier nur auf die Geschlechtshormone 17 $\beta$ -Estradiol und Progesteron eingegangen. Der Einfluss von Testosteron wird nicht dargestellt, da es durch die Aromatase in 17 $\beta$ -Estradiol umgewandelt werden kann (Abb. 2).

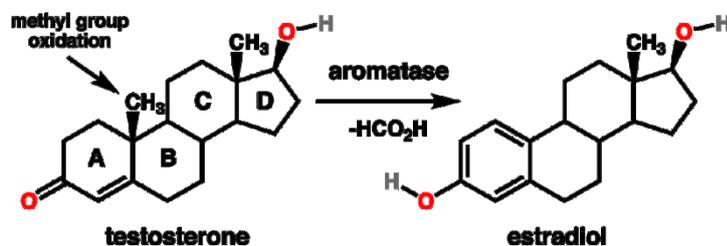


Abb. 2 Aromatase- Reaktion von Testosteron zu Estrogen [8]

Bei dauerhaft hohen Blutkonzentrationen von 17 $\beta$ -Estradiol ist das Risiko für die Entwicklung von Brustkrebs erhöht, dagegen sind hohe Blutkonzentrationen von Progesteron mit einer Risikominderung bei prämenopausalen Frauen assoziiert [9]. Verschiedene Lebensumstände führen zu einem erhöhten Brustkrebsrisiko, wie eine frühe Menarche (<12 Jahre), Kinderlosigkeit oder Spätschwangerschaft (>30 Jahre), Verzicht auf das Stillen und eine späte Menopause (>55 Jahre) [10-13].

Frauen haben während der Einnahme oraler Kontrazeptiva mit Estrogen-Gestagen-Kombinationen ein erhöhtes Risiko für die Entstehung eines Mammakarzinoms. Das relative Risiko beträgt während der Einnahme 1,24 und ist bis zu 10 Jahre nach deren Absetzen noch leicht erhöht [14,15].

Ein weiteres Einsatzgebiet für Kombinationspräparate aus Estrogenen und Gestagenen sind klimakterische Beschwerden. In klinischen Studien und Metaanalysen ergaben sich eine signifikante Erhöhung des relativen Risikos auf 1,12 für die Entstehung eines Mammakarzinoms unter Hormonersatztherapie [16,17].

## Umwelteinflüsse

Zu den exogenen Risikofaktoren für die Entstehung eines Mammakarzinoms zählen Xenoestrogene, Tabakrauch und ionisierende Strahlung.

Als Xenoestrogene werden natürlich vorkommende oder künstlich hergestellte Moleküle mit estrogen-ähnlichen Eigenschaften bezeichnet. Sie finden breite Anwendung in der industriellen Produktion z. B. von Pestiziden, Kosmetika oder Reinigungsmitteln. Zu diesen Verbindungen zählen z. B. Bisphenol A, aromatische Amine und Ethylenoxid.

Bisphenol A wird zur Herstellung von Plastik verwendet und lässt sich in PET-Flaschen, Laptopgehäusen und Nahrungsmittelverpackungen nachweisen [18]. Im Tierexperiment beschleunigt Bisphenol A die Entstehung und Metastasierung von Brustkrebs [19]. Die kanadische Gesundheitsbehörde stuft Bisphenol A als gefährlich ein [20]. Die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) sieht aktuell keine akute Gesundheitsgefährdung durch Bisphenol A, dennoch empfiehlt sie, die tolerierbare tägliche Aufnahmemenge von 50 µg/kg KG pro Tag auf 5 µg/kg KG pro Tag zu senken [21].

Aromatische Amine entstehen in gegrilltem und angebranntem Fleisch und beim Frittieren von Nahrungsmitteln [22].

Ethylenoxid findet Anwendung in der Sterilisation von Medizinprodukten und ist ein Zwischenprodukt bei der Herstellung von Ethylenglycol für Kühlmittel und Frostschutzmittel. Bei längerer Exposition ist das Risiko für die Entstehung eines Mammakarzinoms erhöht [23].

In Zusammenhang mit den Xenoestrogenen erfährt auch das Trinkwasser immer mehr Beachtung. In deutschem Trinkwasser lassen sich neben den oben genannten Xenoestrogenen 17β-Estradiol und weitere Estrogene nachweisen [24]. Die Quellen dieser Belastung sind ungenügend aufbereitetes Wasser aus Chemiefabriken und der Mensch selbst. Sowohl Frauen als auch Männer scheiden täglich Estrogene mit dem Urin aus, dies wird verstärkt durch die Einnahme oraler Kontrazeptiva oder einer Hormonersatztherapie. Mittels Kläranlagen können diese Stoffe bisher nicht vollständig aus dem Trinkwasser entfernt werden [25]. Die tägliche Belastung ist zwar gering, kumuliert aber im Laufe des Lebens. Im bayerischen Trinkwasser wurden Konzentrationen von bis zu 0,3 pg/ml 17β-Estradiol gemessen. Die Wasserpolitik der Europäischen Union trägt diesem Problem Rechnung und möchte 17β-Estradiol auf die Liste der prioritären Stoffe setzen. Hierbei handelt es sich um Chemikalien, welche ein erhebliches Risiko für aquatische Umwelt darstellen [26]. Zunächst wurde 17β-Estradiol auf die

Beobachtungsliste aufgenommen, ab dem 14. September 2015 beginnt ein 12 monatiger Überwachungszeitraum, um eine anschließende Risikobewertung durchzuführen [27].

Tabakrauch spielt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung des Bronchialkarzinoms, aber auch vieler anderer pulmonaler und extrapulmonaler Erkrankungen. Sowohl Passiv- als auch Aktivrauchen steigern das Brustkrebsrisiko um bis zu 40 % [28].

Ein weiterer Risikofaktor ist ionisierende Strahlung. Sie kommt in der Umwelt vor, wird aber auch zu Therapiezwecken angewandt. Frauen, deren Oberkörper hohen Dosen ionisierender Strahlung ausgesetzt war, haben ein erhöhtes relatives Risiko für die Entstehung von Brustkrebs. Das Risiko steigt mit steigender Strahlendosis und bei Bestrahlungen vor dem 30. Lebensjahr [29].

### Ernährung

Von großer Bedeutung für die Krebsentstehung sind auch Lebensstilfaktoren, wie die Ernährung oder der Konsum von Genussmitteln, insbesondere Ethanol.

Die International Agency For Research On Cancer (IARC) hat Ethanol in die Gruppe 1 der krebserregenden Stoffe für Brustkrebs eingestuft. Sie umfasst Substanzen mit wissenschaftlich belegter karzinogener Wirkung, wie z. B. auch Tabakrauch [30]. Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der täglich aufgenommenen Alkoholmenge und dem Brustkrebsrisiko: Selbst kleine Alkoholmengen von 5 g pro Tag erhöhen bereits das Risiko um 15 % [31].

Übergewicht (Body Mass Index (BMI) ab 25 kg/m<sup>2</sup>) ist eine enorme Belastung für alle Industriestaaten. In Europa nahm z. B. der prozentuale Anteil übergewichtiger Frauen und Männer an der Gesamtbevölkerung von 58,7 % im Jahr 2002 auf 62,1 % im Jahr 2010 zu [32]. Ein BMI ab 25 kg/m<sup>2</sup> ist bei postmenopausalen Frauen mit einem gesteigerten Brustkrebsrisiko von durchschnittlich 16 % assoziiert [33].

## Tumorklassifikation

Das Mammakarzinom ist kein einheitliches Krankheitsbild, so dass unterschiedliche Klassifikationen zur Einteilung existieren.

Die TNM-Klassifikation (T = Tumor, N = Nodes/ Lymphknoten, M = Metastasen) der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) beschreibt die Größe des Tumors, die Infiltration von Lymphknoten und das Vorhandensein von Fernmetastasen [34].

Ein anderer Ansatz ist die molekulare Tumorklassifikation. Dabei erfolgt eine Einteilung anhand der Expression des Estrogenrezeptors (ER) und des Progesteronrezeptors (PR), des HER2-Rezeptors und des Proliferationsindex Ki-67 in fünf Subtypen. Der Subtyp Luminal A exprimiert den ER und/ oder den PR, ist HER2-negativ und hat einen Ki-67  $< 14\%$ . Luminal B-Tumoren besitzen den gleichen Hormonrezeptorstatus wie die Luminal A-Tumoren, allerdings beträgt der Ki-67  $\geq 14\%$ . Sie werden anhand der Überexpression des HER2 in Luminal B1 (HER2-negativ) und Luminal B2 (HER2-positiv) Tumoren unterschieden. Bei negativem Hormonrezeptorstatus und Überexpression von HER2 spricht man vom HER2-positiv oder non luminal-Subtyp. Tumoren, die weder HER2 noch Hormonrezeptoren exprimieren, werden in der Gruppe Triple negative/ Basal-like zusammengefasst [35].

Die einzelnen Subtypen unterscheiden sich anhand ihrer Rate an Lokalrezidiven, der Lokalisation und Häufigkeit von Fernmetastasen und der Gesamtüberlebenszeit des Patienten [36].

Zelllinien des Mammakarzinoms

Der Mammakarzinomforschung stehen für jeden molekularen Tumorsubtyp Zelllinien zur Verfügung. Häufig verwendet werden die MCF-7 und die BT-20 Zelllinie. Die MCF-7 Zelllinie ist dem Luminal A-Subtyp zugeordnet, dem Mammakarzinom mit der höchsten Inzidenz und zugleich der günstigsten Prognose. Die BT-20 Zelllinie ist dem Subtyp Basal-like oder Triple negativ zugeordnet, dem Karzinom mit der ungünstigsten Prognose (Abb. 3) [37,38].

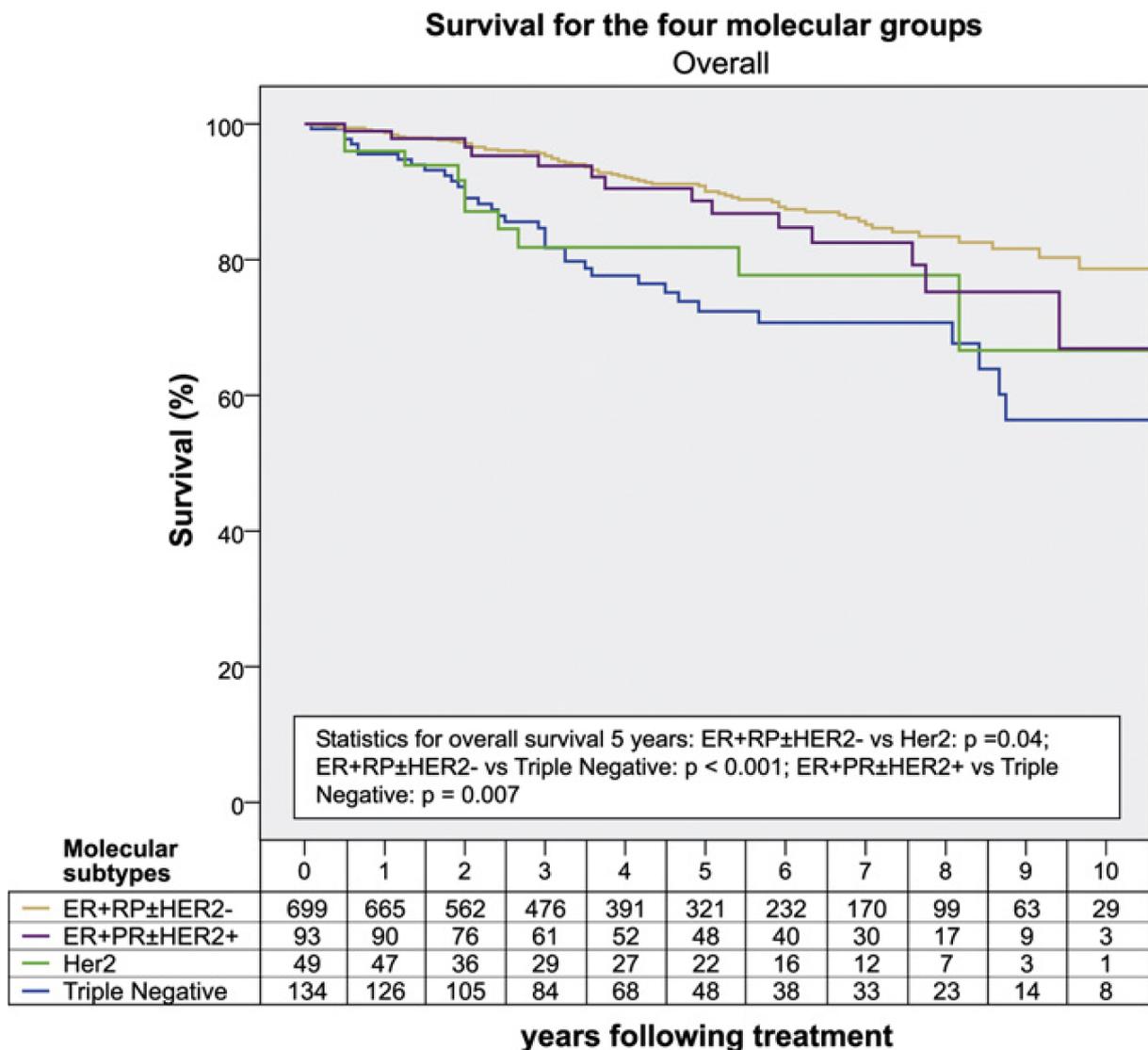


Abb. 3 Gesamtüberlebensrate bei Patienten mit Mammakarzinom in Abhängigkeit vom Tumorsubtyp: Luminal A und Luminal B1 (ER+PR±Her2-), Luminal B2 (ER+PR±Her2+), Her2 positive (Her2), Triple negativ/ Basal-like [38]

## 1.2 Der Estrogenrezeptor

Der Estrogenrezeptor ist ein zytoplasmatischer Rezeptor, der durch das Hormon 17 $\beta$ -Estradiol aktiviert wird und zur Klasse der nukleären Steroidrezeptoren zählt [39]. Nach Bindung von 17 $\beta$ -Estradiol erfolgen die Dimerisation des ER, die Translokation in den Zellkern und die Bindung an die DNA, d. h. die Beeinflussung der Genexpression [40]. Beim Menschen existieren zwei Formen des ER, der ER  $\alpha$  und  $\beta$ , die von unterschiedlichen Genen codiert werden. Bei Aktivierung dimerisiert der ER zu Homodimeren ( $\alpha\alpha$  und  $\beta\beta$ ), bei Koexpression beider ER-Formen in einer Zelle auch zu Heterodimeren ( $\alpha\beta$ ) [41].

Der Aufbau beider ER ist ähnlich, sie besteht aus fünf Domänen A-F vom N- zum C-terminalen Ende (Abb. 4). Die Domänen A und B befinden sich am N- terminalen Ende und können sich ohne Ligandenaktivierung an die DNA anlagern und die Genexpression beeinflussen. Diese direkte Aktivierung hat nur eine schwache Wirkung. Die C-Domäne enthält die Bindungsstelle an die DNA, das so genannte „Estrogen response element“ (ERE). Die D-Domäne dient als Verbindung zwischen C- und E-Domäne. In der E-Domäne befindet sich die Bindungsstelle für Ligand, Koaktivator und Korepressor, so dass die E-Domäne bei gebundenen Liganden die Genexpression aktiviert. Die F-Domäne beeinflusst das Liganden-Bindungsverhalten [42-44]. Alternatives Splicing der RNA ermöglicht unterschiedliche ER-Isoformen. Bisher sind für den ER  $\alpha$  drei und für den ER  $\beta$  fünf Isoformen bekannt. Die Isoformen des ER  $\beta$  können nur bei Heterodimerisierung mit dem ER  $\beta$ 1 die Genexpression beeinflussen [45].

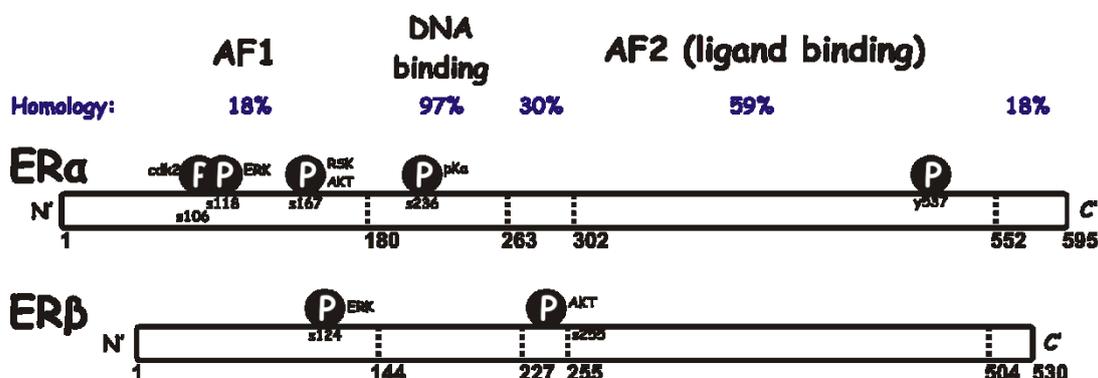


Abb. 4 Vergleich zwischen ER  $\alpha$  und ER  $\beta$ ; AF1 enthält Domäne A und B, AF2 enthält die E-Domäne; die Prozentangaben geben die Homologie der beiden Rezeptoren auf Ebene der Aminosäuren an; P signalisiert mögliche Phosphorylierungsstellen [46]

Der ER  $\alpha$  und  $\beta$  wurde in vielen Geweben des Menschen nachgewiesen. Im Gangepithel und den Lobuli der weiblichen Mamma sind beide Rezeptoren in gleich hohen Konzentrationen vertreten. Im Uterus dominiert der ER  $\alpha$ , in anderen Geweben eine bestimmte Isoform. Darüber hinaus existieren Gewebe, in denen beide Rezeptoren exprimiert werden, aber in unterschiedlichen Zellen. So weisen das Ovar ER  $\alpha$  in den Theka-Zellen und ER  $\beta$  in den Granulosa-Zellen, oder die Prostata ER  $\alpha$  in Stromazellen und ER  $\beta$  in den Epithelzellen auf [39].

Die ER-Effekte lassen sich in genomische und nicht-genomische unterteilen (Abb. 5). Unter genomischen Effekten versteht man die Modifikation der Zellfunktion durch die Synthese bestimmter Proteine. Nach Dimerisation und Anlagerung des ER an die ERE rekrutiert der ER-DNA-Komplex weitere Proteine, die für die Transkription verantwortlich sind. Diese synthetisieren mRNA als Vorlage für Proteine zur Beeinflussung der Zellfunktion [40]. Dieser Mechanismus lässt sich durch die Anwesenheit von Koaktivatoren oder Korepressoren entscheidend beeinflussen. So wirkt Tamoxifen im Brustgewebe als Antagonist am ER, aber als Agonist im Uterus [47]. Zu den nicht-genomischen Effekten zählen membranständige ER, die mit Tyrosin-Kinase-Rezeptoren Komplexe bilden wie z. B. dem IGF-1 oder EGFR oder die Komplexbildung mit nicht-Rezeptor Tyrosin-Kinasen wie z. B. Src [48,49].

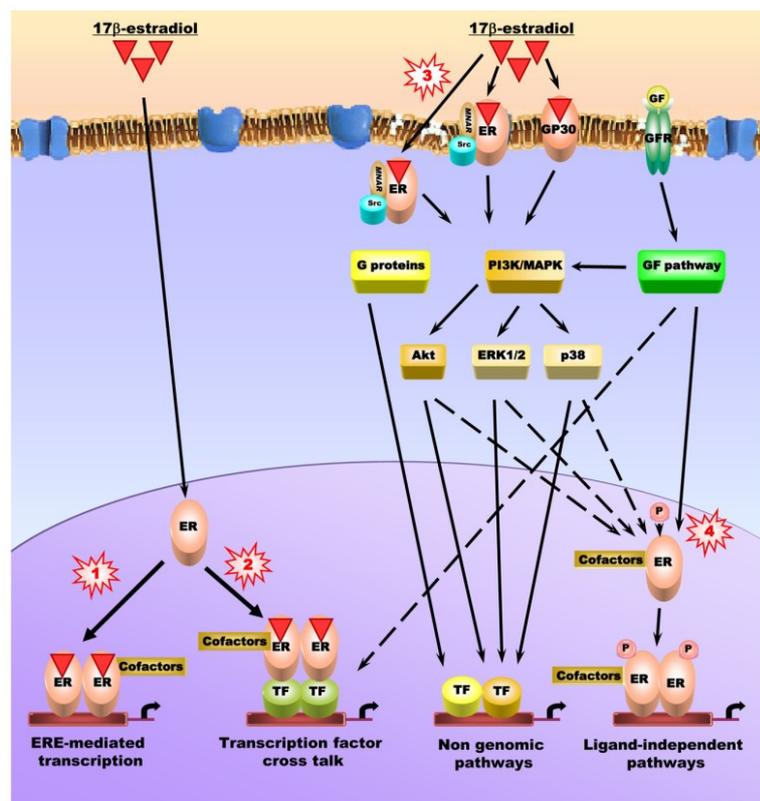


Abb. 5 Intrazelluläre ER-Signalwege: 1 ERE-abhängiger Signalweg; 2 ERE-unabhängiger Signalweg, 3 nicht-genomischer Signalweg, 4 Ligand-unabhängiger Signalweg [50]

### 1.3 Phytoestrogene

Seit vielen Jahren ist eine reziproke Assoziation zwischen der Inzidenz des Mammakarzinoms und dem Verzehr phytoestrogenhaltiger Nahrungsmittel bekannt. So ist in Japan die Mammakarzinominzidenz sehr niedrig (51,5 ASR [51]), gleichzeitig sind Phytoestrogene ein zentraler Nahrungsbestandteil (25-50 mg Isoflavone/Tag [52]). Im Vergleich dazu ist die Inzidenz in Deutschland (91,6 ASR [51]) und anderen europäischen Ländern hoch, und Phytoestrogene spielen nur eine untergeordnete Rolle in der Ernährung (~1 mg Isoflavone/Tag [53]). Eine aktuelle Studie an deutschen Frauen nach dem Klimakterium ergab, dass Frauen, die Sojabohnen, Sonnenblumen- und Kürbiskerne verzehren, ein signifikant niedrigeres Risiko für die Brustkrebsentstehung haben [53]. Retrospektiv ließ sich zeigen, dass Japanerinnen, die in die USA immigrieren und sich dem Lebensstil und der Ernährung anpassen, in den nachfolgenden Generationen die gleiche Inzidenz für Mammakarzinome aufweisen wie die amerikanische Gesamtbevölkerung [54]. Dies lässt den Rückschluss zu, dass Lebensstil und Ernährung entscheidende Einflussfaktoren bei der Mammakarzinomentstehung sind.

Phytoestrogene sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe mit struktureller Ähnlichkeit zu Estrogenen (Abb. 6). Sie zählen zu den Xenoestrogenen und wirken teils agonistisch, teils antagonistisch am ER. Dabei ist die Affinität von Enterodiol (END) und Enterolacton (ENL) zum ER  $\beta$  zwei bis drei Mal höher als die zum ER  $\alpha$ . Bei anderen Phytoestrogenen wie z. B. Genistein ist der Affinitätsunterschied zu Gunsten des ER  $\beta$  noch stärker ausgeprägt [55]. Zwar ist die Aktivität am ER um zwei bis drei Zehnerpotenzen geringer als die von 17 $\beta$ -Estradiol, aber ihre Konzentration im Blut ist bis zu 100 mal höher als die der endogenen Estrogene [56,57]. Die Phytoestrogene wirken als selektive ER-Modulatoren im menschlichen Körper. Nach Bindung an den ER kommt es zur Konformationsänderung und anschließenden Rekrutierung von Koaktivatoren oder Korepressoren. Die Kofaktoren unterscheiden sich je nach Geweben und Zellorganell [58]. Die Wirkung als Agonist oder Antagonist wird durch die jeweiligen Kofaktoren bestimmt und die höhere Affinität der Phytoestrogene zum ER  $\beta$  [59].

Die Gruppe der Isoflavone und Lignane stehen zurzeit im Mittelpunkt der Forschung. Darüber hinaus gibt es noch weitere Gruppen wie die Coumestane und Stilbene, diese spielen aber als Nahrungsinhaltsstoffe der europäischen Bevölkerung nur eine untergeordnete Rolle [60]. Da die Lignane für die nachstehende Arbeit von besonderer Bedeutung sind, werden sie ausführlicher vorgestellt.

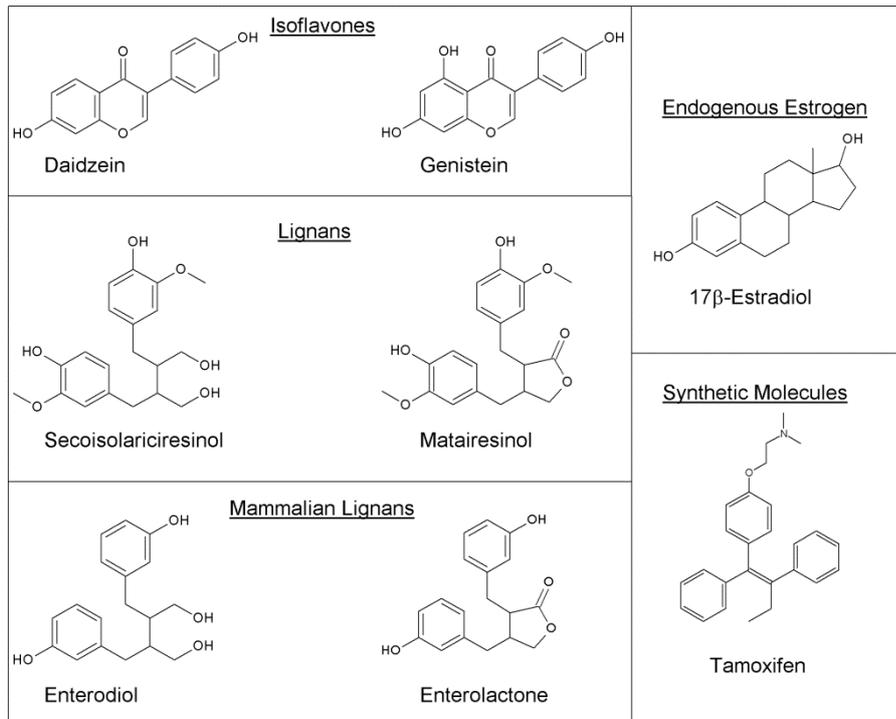


Abb. 6 Strukturformeln ausgewählter Lignane, Isoflavone und Säugerlignane, zum Vergleich 17β-Estradiol und Tamoxifen [61] (Abbildung: M. Eczko)

Lignane sind Bestandteile der pflanzlichen Zellwand und vor allem im Pflanzensamen enthalten [62]. Leinsamen stellt die reichhaltigste bekannte Quelle der Lignane dar. Andere Lebensmittel wie Sesamkerne, Kürbiskerne, Grünkohl, Brokkoli, Aprikosen, Erdbeeren und Schwarztee enthalten ebenfalls hohe Mengen an Lignanen und spielen in der täglichen Ernährung eine größere Rolle als der Leinsamen [63,64]. Isoflavone kommen in verschiedenen Pflanzen vor, besonders hohe Mengen sind in Sojabohnen enthalten [65]. Der Phytoestrogengehalt in Pflanzen bzw. Nahrungsmitteln schwankt je nach Wachstumsort, Erntezeit, Wachstumsbedingungen, Verarbeitung und Zubereitung [66,67]. Nicht nur der Gehalt, sondern auch die Wirkung der Phytoestrogene im Körper unterscheiden sich je nach dem verwendeten Extraktionsverfahren für das Ausgangsmaterial. So führen unterschiedliche Extraktionsverfahren zu unterschiedlichen Inhaltsstoffen und damit zu unterschiedlichen Wirkungen im menschlichen Körper [68].

Der Metabolismus der Lignane soll mittels der Vertreter Secoisolariciresinol (SEC) und Matairesinol (MAT) besprochen werden, die in der Nahrung meist an Zuckermoleküle gebunden sind. Die Nahrung wird im Magen und Dünndarm in die einzelnen Bestandteile aufgespalten, und die menschliche Dickdarmflora überführt SEC und MAT in die Säugerlignane END und ENL. END kann weiter in ENL umgewandelt werden. Die

Ausscheidung von ENL im Urin kann somit als Marker für die Phytoestrogenaufnahme mit der Nahrung verwendet werden [63]. Dieser Metabolismus unterliegt großen individuellen Schwankungen aufgrund einer unterschiedlich ausgeprägten Kolonmikrobiotika und genetischen Polymorphismen verschiedener Enzyme. Die Bioverfügbarkeit sinkt bei einer oralen Therapie mit Antibiotika bzw. einer langsamen Darmpassage [69,70].

#### **1.4 Humane Hepatozyten**

Die Leber ist das zentrale Stoffwechselorgan im menschlichen Körper [71]. Sie sammelt das Blut aller unpaarigen Bauchorgane und damit aller Stoffe, die über den Darm resorbiert werden [72].

Die vom Darm resorbierten Aminosäuren gelangen in die Leber und werden dort zur Biosynthese von Plasmaproteinen wie Albumin oder lebereigenen Enzymen verwendet. Albumin ist für die Aufrechterhaltung eines konstanten Plasmavolumens und den Transport wasserunlöslicher Substanzen wie Fettsäuren, Pharmaka oder Hormone verantwortlich. Der verbliebene Teil der Aminosäuren wird nach Abspaltung von Ammonium-Ionen ( $\text{NH}_4^+$ ) der Atmungskette oder der Glukoneogenese zugeführt.  $\text{NH}_4^+$  wirken in Konzentrationen ab  $80 \mu\text{mol/l}$  toxisch auf den menschlichen Körper. Aus  $\text{NH}_4^+$  und Hydrogencarbonat-Ionen ( $\text{HCO}_3^-$ ) synthetisiert die menschliche Leber Harnstoff. Leberzellen sind die einzigen Zellen im menschlichen Körper, die alle Enzyme der Harnstoffsynthese exprimieren. Die Harnstoffsynthese übernimmt eine Entgiftungsfunktion und reguliert den Säure-Basen-Haushalt durch die Elimination von  $\text{HCO}_3^-$ . [73]

Die Leber als zentrales Stoffwechselorgan spielt eine entscheidende Rolle in der Forschung zum Medikamentenmetabolismus und zur -toxizität. Tamoxifen, als selektiver Estrogenrezeptormodulator kann zur Therapie des Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinoms eingesetzt werden, als Nebenwirkung kann es zu einer Erhöhung der Leberenzyme und zur nicht-alkoholischen Steatosis hepatis führen [74].

Bei der Entwicklung oraler Chemotherapeutika muss deshalb auch immer eine mögliche Leberzellschädigung mit untersucht werden. Dafür stehen folgende Modelle zur Verfügung:

1. Frühere Ergebnisse stützen sich auf in-vivo Tiermodelle, insbesondere an Ratten oder Mäusen, allerdings sind Ergebnisse aus Tierversuchen nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragbar [75]. Die isoliert perfundierte Rattenleber ist ein geeignetes Mittel zur Untersuchung von Lebermetabolismus, Hämodynamik, Pharmakokinetik und Gallesekretion, da die strukturelle und funktionelle Leberarchitektur erhalten bleibt [76].
2. Etablierte sind auch standardisierte Leberschnitte von 100 µm bis 250 µm Dicke zur Untersuchung des Metabolismus und der Toxizität von Medikamenten und zur Erforschung von Pathomechanismen von Leber-spezifischer Erkrankungen. Sie lassen sich sowohl aus tierischen als auch aus menschlichen Spendern gewinnen, z. B. aus Operationspräparaten bei Leberteileresektionen oder aus Teilen von nicht transplantierbaren Spenderlebern [77].
3. In dieser Arbeit wurden primäre humane Hepatozyten verwendet, da sie das in-vitro Modell mit den meisten Übereinstimmungen zur menschlichen Leber darstellen [78]. Die Nachteile dieser Methode liegen in der schwierigen technischen Aufarbeitung, der kurzen Lebensdauer und der Qualität der Zellen, die entscheidend von der Vorbehandlung der Präparate und dem Lebensstil des Spenders abhängen [79].
4. Eine Alternative zu primären humanen Hepatozyten sind isolierte Zelllinien aus menschlichen Lebertumoren, wie die HepG2-, die Hep3B- oder die HepaRG-Zelllinie. Diese Zellen sind ausreichend verfügbar, technisch leicht zu handhaben und haben einen hohen Proliferationsindex. In diesen Punkten sind sie den primären humanen Hepatozyten überlegen, allerdings ist ihre Expression der Cytochrom P450-Enzyme und damit auch ihre metabolische Aktivität viel niedriger [80].
5. Die Leber enthält auch nicht-parenchymatöse Zellen wie die Ito-Zellen (Fettspeicherzellen) oder die Kupffer-Zellen (Teil des mononukleären Phagozytosesystems). Zum besseren Verständnis von Interaktionen der verschiedenen Zelltypen wurden Kokultursysteme aus Hepatozyten und den obengenannten Makrophagen entwickelt. Sie sollen Aufschluss über interzelluläre Signalwege dieser Zellen geben und ihre Rolle in der Regulation der Hepatozytenfunktion und -regeneration aufzeigen. Diese Kokulturen ermöglichen auch Untersuchungen zur Akute-Phase-Reaktion und des septischen Leberschadens [81].

## 1.5 Zielstellung

Das Mammakarzinom ist das häufigste Karzinom und die häufigste Todesursache der Frau zwischen dem 30. und 60. Lebensjahr in der westlichen Welt. Bei steigender Inzidenz, vor allem in den Entwicklungsländern, besteht nach wie vor Forschungsbedarf bei Prävention und vor allem bei der Therapie. Eine mögliche Therapieoption stellen die Phytoestrogene dar. Untersuchungen an heimischen Pflanzen zeigten, dass die Wurzel der Leinpflanze besonders reich an Phytoestrogenen ist. Die antikanzerogene Wirkung eines alkoholischen Extraktes aus der Leinwurzel konnte in-vitro bereits demonstriert werden. Da in diesem Extrakt nur einen Teil der Inhaltsstoffe der Leinwurzel enthalten ist, müssen auch Extrakte mit anderen Lösungsmitteln untersucht werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es zu prüfen, ob ein wässriger Extrakt der Leinwurzel zytotoxisch und antiproliferativ auf Mammakarzinomzellen wirkt, ohne dabei hepatotoxisch zu sein.

Folgende Untersuchungsschritte sind dafür nötig:

1. Der wässrige Leinwurzelextrakt wird hinsichtlich seines Spektrums an Inhaltsstoffen untersucht.
2. Die Zytotoxizität und Beeinflussung der Proliferation durch den wässrigen Leinwurzelextrakt werden am Modell von ER-positiven und ER-negativen Mammakarzinomzellen untersucht.
3. Untersuchungen zur Toxizität an primären humanen Hepatozyten sollen Aufschluss über eine mögliche Hepatotoxizität des Extraktes geben. Diese Nebenwirkung ist für viele Substanzen wie z. B. Tamoxifen bekannt.
4. Der Hepatozytenstoffwechsel soll unter den Einfluss des wässrigen Leinwurzelextraktes anhand der Stoffwechselprodukte Harnstoff und Albumin untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

Im folgenden Kapitel werden die verwendeten Materialien aufgelistet und die Methoden kurz erläutert.

### 2.1 Chemikalien und Materialien

|                   |   |
|-------------------|---|
| Extrakterstellung | <u>Material</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Faltentrichter Machery-Nagel, Durchmesser 185 mm, Typ 615: Carl Roth GmbH &amp; Co, Karlsruhe, Deutschland</li> <li>• Vakuumrotationsverdampfer: Heidolph VV2011, Deutschland</li> <li>• Exsikkator: Carl Roth GmbH &amp; Co, Karlsruhe, Deutschland</li> </ul>  |
| Extraktanalyse    | <u>Massenspektrometer</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Thermo Finnigan MAT95 Hochleistungs-Massenspektrometer: Thermo Finnigan MAT GmbH, Bremen, Deutschland</li> <li>• Hochtemperatur-Probenschubstange: IGT Instrumente- und Geräte-Technik GmbH, München, Deutschland</li> </ul>   |
| Zellkultivierung  | <u>Zelllinien</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• MCF-7: DSMZ GmbH, Braunschweig, Deutschland</li> <li>• BT-20: DSMZ GmbH, Braunschweig, Deutschland</li> <li>• frische humane Hepatozyten: Primacyt Cell Culture Technology GmbH, Deutschland</li> </ul> <u>Chemikalien</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• DMEM: Sigma-Aldrich-Chemie, Deisenhofen, Deutschland</li> <li>• Fetales Kälberserum: Biochrom AG, Berlin</li> <li>• Amphotericin B, 250µg/ml: PAA Laboratories GmbH, Deutschland</li> <li>• Penicillin/Streptomycin: PAA Laboratories GmbH, Deutschland</li> <li>• PBS (phosphatgepufferte NaCl-Lösung, salzfrei, pH 7,4): Invitrogen, England</li> <li>• Trypsin-EDTA (0,25 %): PAA Laboratories GmbH, Deutschland</li> <li>• Trypanblau (0,4 %): PAA Laboratories GmbH, Deutschland</li> </ul> |

|                                     |   |
|-------------------------------------|---|
|                                     | <p><u>Material</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sterilbox: Heraeus Instruments GmbH, Hanau</li> <li>• Lichtmikroskop, Olympus CK-2 TR: Olympus Europa GmbH, Hamburg</li> <li>• Zentrifuge: Andreas Hettich GmbH &amp; Co. KG, Tuttlingen</li> <li>• Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>): Heraeus Instruments GmbH, Hanau</li> <li>• Kühltruhe (-80 °C): Heraeus Instruments GmbH, Hanau</li> </ul>  |
| Zytotoxizität und Zellproliferation | <p><u>Detection- Kits</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cytotoxicity Detection-Kit (LDH) Version 06 (2011): Roche, Mannheim</li> <li>• Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric): Roche, Mannheim</li> </ul> <p><u>Chemikalien</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tamoxifen: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland</li> <li>• 17<math>\beta</math>-Estradiol: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland</li> <li>• Triton X-100: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland</li> <li>• H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 30 % rein: Carl Roth GmbH &amp; Co, Deutschland</li> <li>• HCl, 32 % reinst: Carl Roth GmbH &amp; Co, Deutschland</li> </ul>   |
| Immunhistochemie                    | <p><u>Antikörper</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Estrogenrezeptor <math>\alpha</math>, Monoclonal Mouse Anti-Human, Clone: 1D5: DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg</li> <li>• Estrogenrezeptor <math>\beta</math>, Monoclonal Mouse Anti-Estrogen Receptor <math>\beta</math>1, Clone: PPG5/10, (1:10 mit PBS verdünnt): AbD Serotec MorphoSys AbD GmbH, Düsseldorf</li> <li>• Progesteronrezeptor, Monoclonal Mouse Anti-Human, PgR 636: DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg</li> </ul> <p><u>Chemikalien</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• ImmPRESS™ Universal Reagent, Anti-Mouse/Rabbit Ig Peroxidase: Vector Laboratories, Inc., USA</li> <li>• LinRed ICH: LINARIS Biologische Produkte GmbH, Wertheim, Deutschland</li> <li>• Formafix, 4 % (gew.), gepuffert (pH 7,0): Grimm med. Recycling GmbH, Torgelow, Deutschland</li> <li>• H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Merck AG, Darmstadt, Deutschland</li> </ul> |

## 2.2 Pflanzenmaterial

Der gemeine Lein (*Linum usitatissimum*, Sorte Barbara) bildete das Ausgangsmaterial für die Extrakterstellung. Nach der Aussaat im Mai 2008 wuchs die Pflanze im Außenbereich auf dem Gelände des Institutes für Biowissenschaften der Universität Rostock bis zur Ernte nach der Blüte im August 2008. Im Anschluss an die Ernte wurde die Wurzel von den übrigen Pflanzenteilen getrennt, gereinigt und bei  $-80\text{ °C}$  tiefgefroren gelagert.

## 2.3 Herstellung der Leinwurzelextraktes

Die Herstellung des Leinwurzelextraktes erfolgte mit einem an die Zubereitung von Tees aus Arzneipflanzen angelehnten Verfahren. Deshalb wurde Leitungswasser als Lösungsmittel verwendet.

Im ersten Schritt wurde 16 g der gefrorenen Leinwurzel in flüssigem Stickstoff gemörsert. Das entstandene Pulver wurde in ein Gefäß mit 200 ml Leitungswasser überführt und mit Siedesteinen 15 min lang gekocht. Das Dekokt wurde anschließend zweimal filtriert (Porendurchmesser  $12\text{ }\mu\text{m}$ ) und der Filtrückstand verworfen.

Zur Herstellung einer Stammlösung mit definierter Konzentration wurde das Gewicht des gewonnenen Extraktes bestimmt. Dies geschah in zwei Schritten: Zunächst wurde die Suspension am Vakuumrotationsverdampfer bei  $40\text{ °C}$  eingeengt, danach die Restflüssigkeit durch eine 24-stündige Lagerung im Exsikkator entfernt. Nach der Massebestimmung erfolgten die Resuspension in Aqua bidest. zur Stammlösung von  $0,1\text{ g/ml}$  und die lichtgeschützte Lagerung bei  $-80\text{ °C}$  in Aliquots.

## 2.4 Massenspektrometrie

Für die quantitative und qualitative Analyse des wässrigen Leinwurzelextraktes und des Pulvers aus der rohen Leinwurzel wurde die Pyrolyse-Feldionisationsmassenspektrometrie (PyFIMS) verwendet. Das Prinzip beinhaltet die Pyrolyse des Extraktes, die Feldionisation der Spaltprodukte und deren anschließende Detektion im Massenspektrometer. Die Massenspektrometrie wurde am Institut für Bodenkunde der Fakultät für Agrar- und Umweltwissenschaften der Universität Rostock durchgeführt. Die Daten wurden mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Bei der Pyrolyse wurde die Probe im Quarztiigel unter Ausschluss von Sauerstoff erhitzt. Dabei zerfielen die Extraktbestandteile in kleinere Spaltprodukte und traten in den gasförmigen Aggregatzustand über. Die entstandenen Spaltprodukte wurden direkt der Feldionisation zugeführt. Bei der Feldionisation, einem schonenden Ionisierungsverfahren, wurde den Molekülen durch Anlage eines hohen elektrischen Feldes ( $> 10^8 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) je ein Elektron entzogen. Im Massenspektrometer erfolgte die Trennung nach dem Ladung/Masse-Verhältnis, dies erlaubte bei bekannter Ladung die Berechnung der Masse. Die Heizrate betrug 10 K je Scan, bei einer Scangeschwindigkeit von circa 20 s ergab sich eine Heizrate von 30 K/min. Das angelegte Potential in der Ionenquelle betrug 13,5 kV.

## 2.5 Zelllinien

Die Wirkungen des wässrigen Leinwurzelextraktes wurde an drei Zelllinien untersucht, den Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und BT-20 und an frischen humanen Hepatozyten.

Die Mammakarzinomzelllinien stammen aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Abteilung menschliche und tierische Zellkulturen: Braunschweig, Deutschland). Die MCF-7 Zelllinie wurde 1970 aus dem Pleuraerguss einer 69-jährigen kaukasischen Frau mit metastasiertem Mammakarzinom isoliert. Die Zellen exprimieren die ER  $\alpha$  und  $\beta$  und den PR [82]. Die BT-20 Zelllinie wurde 1958 aus dem Mammakarzinom einer 74-jährigen Kaukasierin isoliert. Die BT-20 Zellen exprimieren keinen Estrogenrezeptor, allerdings besitzen sie eine Estrogenrezeptor-mRNA mit einer Deletion des Exons 5 [83].

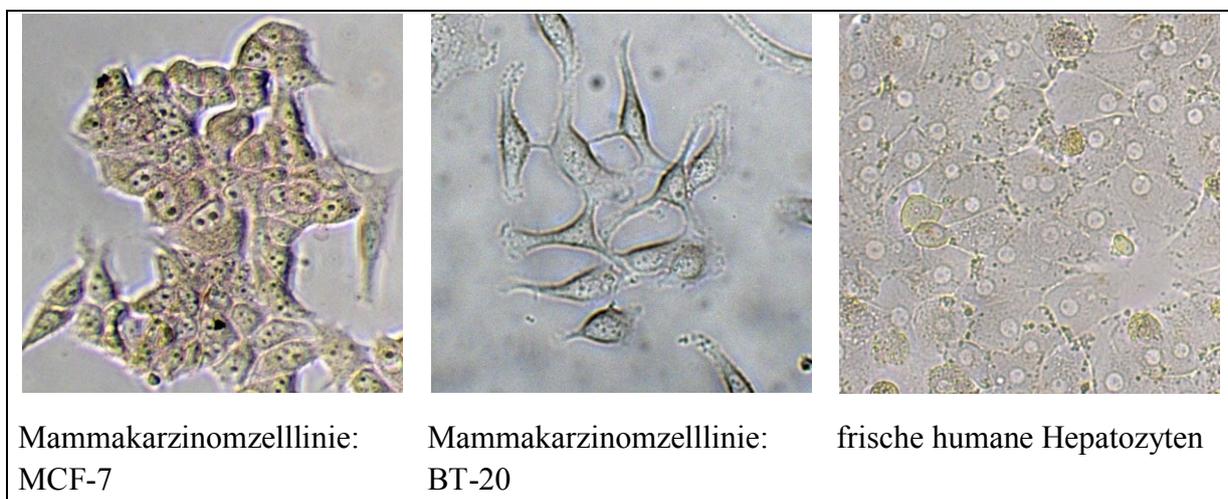


Abb. 7 Kultivierte Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und BT-20 und frische humane Hepatozyten; Vergrößerung: 20x

Die frischen humanen Hepatozyten stammen von der Firma Primacyt (Schwerin, Deutschland) und wurden aus Operationspräparaten gewonnen.

## 2.6 Zellkulturmedium

Als Zellkulturmedium diente Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), es wurde durch das Lösen von 26,89 g DMEM, 5,2 g HEPES und 6 g  $\text{NaHCO}_3$  in 2 l Aqua dest. hergestellt. Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt und das Medium anschließend steril filtriert. Die folgenden Zusätze verbesserten das Wachstum der Zellkulturen: 10,0 % fetales Kälberserum (FKS), 1,0 % Penicillin/Streptomycin (zur Hemmung des Bakterienwachstums) und 0,5 % Amphotericin B (zur Verhinderung eines Pilzbefalls).

## 2.7 Zellkultivierung

Die verwendeten Zelllinien waren bei  $-185\text{ °C}$  in DMSO kryokonserviert. Nach dem Auftauen erfolgte die Überführung der Zellsuspension in ein 50 ml Röhrchen und die Zugabe von 10 ml DMEM. Die Suspension wurde für 5 min bei 1000 rpm ohne Bremsvorgang zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment, d.h. die Tumorzellen, wurde in 5 ml DMEM resuspendiert und in einer Zellkulturflasche mit 25  $\text{cm}^2$  Oberfläche ausgesät.

Die Zellkultivierung erfolgte im Brutschrank bei  $37\text{ °C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  in Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre. Die Gewährleistung des Gasaustausches geschah durch einen Filter im Deckel der Zellkulturflaschen.

Dreimal wöchentlich wurde das Zellkulturmedium gewechselt. Ab einer Konfluenz von 60 bis 80 % wurden die Zellen in die nächstgrößere oder zwei gleich große Zellkulturflaschen passagiert. Dafür wurde das verbrauchte Medium entfernt und die Flasche einmal mit PBS gespült. Anschließend erfolgten die Zugabe von 5 bis 10 ml Trypsin-EDTA, je nach Flaschengröße, und die Inkubation im Brutschrank bei  $37\text{ °C}$  für 5 bis 10 min. Nach dem vollständigen Lösen der Zellen vom Flaschenboden und dem Stoppen der Reaktion durch die Zugabe von DMEM wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Röhrchen überführt. Der Überstand wurde nach 5 minütiger Zentrifugation bei 1000 rpm ohne Bremsvorgang verworfen. Das Sediment wurde in 5 ml DMEM resuspendiert und in eine neue Zellkulturflasche ausgesät. Die Lagerung erfolgte im Brutschrank bei  $37\text{ °C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$ . Zur Anwendung kamen Zellkulturflaschen mit den Oberflächen 25  $\text{cm}^2$ , 75  $\text{cm}^2$  und 150  $\text{cm}^2$ .

## 2.8 Ermittlung der Lebendzellzahl

### Prinzip

Um die Versuche standardisiert und reproduzierbar durchzuführen, wurden in einer Versuchsreihe als Ansatz stets konstante Zellkonzentrationen verwendet. Die verwendeten Zellkonzentrationen wurden durch Vorversuche optimiert und betragen für die Immunhistochemie  $1,25 \times 10^5$  Zellen/ml, für den LDH-Zytotoxizitätstest  $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml und für den BrdU-Zellproliferationstest  $5 \times 10^5$  Zellen/ml.

Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte mit Hilfe der Bürker-Zählkammer (Abb. 8). Eine Bürker-Zählkammer besteht aus neun Großquadraten auf jeder Seite, die wiederum aus 16 Gruppenquadraten bestehen. Die verdünnte Zellsuspension wurde mit Trypanblau versetzt und auf beide Seiten der Bürker-Zählkammer aufgetragen. Trypanblau ist ein anionischer Farbstoff, der an intrazelluläre Proteine bindet. Es penetriert nur bei einem Defekt der Zellmembran in das Zytosol und erlaubt damit die Differenzierung zwischen avitalen, lichtmikroskopisch blauen Zellen von vitalen, lichtmikroskopisch farblosen Zellen. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl/ml wurden die vitalen Zellen gezählt und das Ergebnis in die weiter unten stehende Formel eingesetzt.

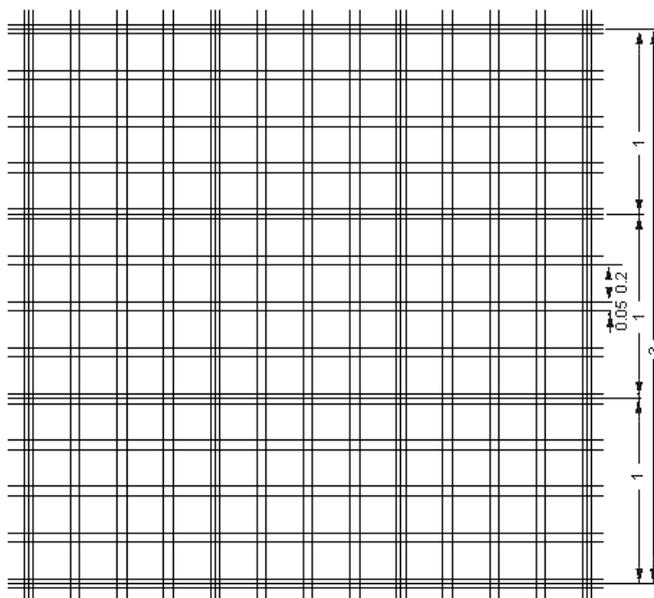


Abb. 8 Bürker-Zählkammer [84]

Durchführung

- Schritt 1      360 µl DMEM mit 20 µl Zellsuspension und 20 µl Trypanblau versetzen
- Schritt 2      10 µl der Lösung auf jede Seite der Bürker-Zählkammer auftragen
- Schritt 3      Auszählung der vitalen, farblosen Zellen in 2 Großquadraten der Bürker-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop bei 40-facher Vergrößerung
- Schritt 4      Ergebnis in die Formel (Lebendzellzahl) einsetzen
- Formel:      Lebendzellzahl [ $\text{ml}^{-1}$ ] = vitale Zellen  $\times 10^5$

**2.9 Immunhistochemie**Prinzip

In der Immunhistochemie werden Moleküle durch eine Antikörper-gekoppelte Farbreaktion sichtbar nachgewiesen. Darüber hinaus erlaubt die Immunhistochemie eine Lokalisationsbestimmung des nachgewiesenen Antigens. Diese Methode diente der Untersuchung der Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und BT-20 auf die Expression der ER  $\alpha$  und  $\beta$  und des PR.

Der Nachweis erfolgte über die indirekte Methode: Zunächst band ein primärer Antikörper an das nachzuweisende Antigen, anschließend ein biotinylierter sekundärer Antikörper an den primären Antikörper. Dann lagerte sich ein Enzymkomplex, bestehend aus Avidin, Biotin und Meerrettich-Peroxidase, an den biotinylierten sekundären Antikörper an. Das so entstandene Substrat- $\text{H}_2\text{O}_2$ -Gemisch reagierte nach Zugabe von LinRed IHC zu einem roten Farbstoff. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Leitungswasser gestoppt.

Vor der Zugabe des primären Antikörpers wurde durch Inkubation mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  die endogene Peroxidaseaktivität gehemmt. Die Inkubation mit Pferdeserum verhinderte eine unspezifische Bindung des Enzymkomplexes.

Durchführung

- Schritt 1 Zellkultivierung: 300 µl/Well Zellsuspension (mit DMEM 10 % FKS) in 24-Well-Platte und Inkubation für 48 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>
- Schritt 2 Waschen: Medium absaugen und 3-mal mit je 1 ml PBS/Well waschen
- Schritt 3 Zellfixation: 20 min Inkubation mit 1 ml/Well Formafix 4 % bei Raumtemperatur
- Schritt 4 Waschen: wie oben
- Schritt 5 Peroxidasehemmung: 30 min Inkubation mit 1 ml/Well H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3 % bei Raumtemperatur im Dunkeln
- Schritt 6 Waschen: wie oben
- Schritt 7 Inkubation mit 3 Tropfen/Well Pferdeserum für 30 min bei Raumtemperatur
- Schritt 8 Serum entfernen, 100 µl/Well primären Antikörper hinzufügen, Inkubation für 24 h im Kühlschrank
- Schritt 9 Waschen: wie oben
- Schritt 10 3 Tropfen/Well sekundären Antikörper zugeben, Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur
- Schritt 11 Waschen: wie oben
- Schritt 12 200 µl/Well LinRed IHC zugeben, Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln
- Schritt 13 Abstoppen der Farbreaktion mit 1 ml H<sub>2</sub>O/Well
- Schritt 14 Mikroskopie und Bilddokumentation (Abb. 11 und Abb. 12)

## 2.10 LDH - Zytotoxizitätstest

### Prinzip

Der Laktatdehydrogenase-Test (LDH-Test) ist ein in-vitro angewendeter kolorimetrischer Immunoassay zur quantitativen Bestimmung der Zellzytotoxizität, basierend auf der Bestimmung der LDH-Aktivität.

Die LDH ist ein essentieller Bestandteil des Intermediärstoffwechsels. Sie ist in jedem Gewebe des menschlichen Körpers und auch in den Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und BT-20 und den humanen Hepatozyten exprimiert. Bei einer Schädigung der Zellen durch zytotoxische Substanzen wird die Zellmembran angegriffen und dadurch die Schrankenfunktion gestört. Zellinhalt, z. B. die LDH, kann in den Extrazellularraum entweichen.

Das LDH-Reagenz enthält folgende Substanzen im Überschuss: Laktat,  $\text{NAD}^+$ , den Katalysator Diaphorase und das gelbe Tetrazolium-Salz INT (2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid). Die in den Extrazellularraum entwichene LDH oxidierte Laktat aus dem LDH-Reagenz zu Pyruvat, dabei wurde das Koenzym  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}/\text{H}^+$  reduziert.  $\text{NADH}/\text{H}^+$  diente als Koenzym für die katalytische Reaktion von INT zu dem roten Formazan-Salz (Abb. 9). Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch die Zugabe von 1 M HCl. Der niedrige pH-Wert führte zur Denaturierung der LDH und damit zum Sistieren ihrer Aktivität. Die Menge an gebildetem Formazan war direkt proportional zur LDH-Aktivität und damit zur Anzahl geschädigter Zellen und wurde photometrisch durch Absorption am ELISA-Reader bestimmt. Jeder Versuchsansatz wurde als Vierfachbestimmung durchgeführt.

Der Kontrollansatz bestand aus Triton X-100 (1 % im Zellkulturmedium). Es führte zu einer kompletten Zellyse und damit zur kompletten Substratumsetzung (Positivkontrolle). Für die Negativkontrolle wurden die Zellen nur mit Zellkulturmedium behandelt. Um die LDH-Aktivität des verwendeten Mediums zu erfassen, wurde ein Ansatz mit zellfreiem Medium mitgeführt (Leerwert). Darüber hinaus wurde  $17\beta$ -Estradiol in den Konzentrationen  $10^{-9}$  mol/l und  $10^{-11}$  mol/l als zellstimulierender Faktor mitgeführt sowie Tamoxifen in einer Konzentration von  $10^{-4}$  mol/l als selektiver ER-Antagonist. Die prozentuale Zytotoxizität berechnete sich nach der weiter unten stehenden Formel.

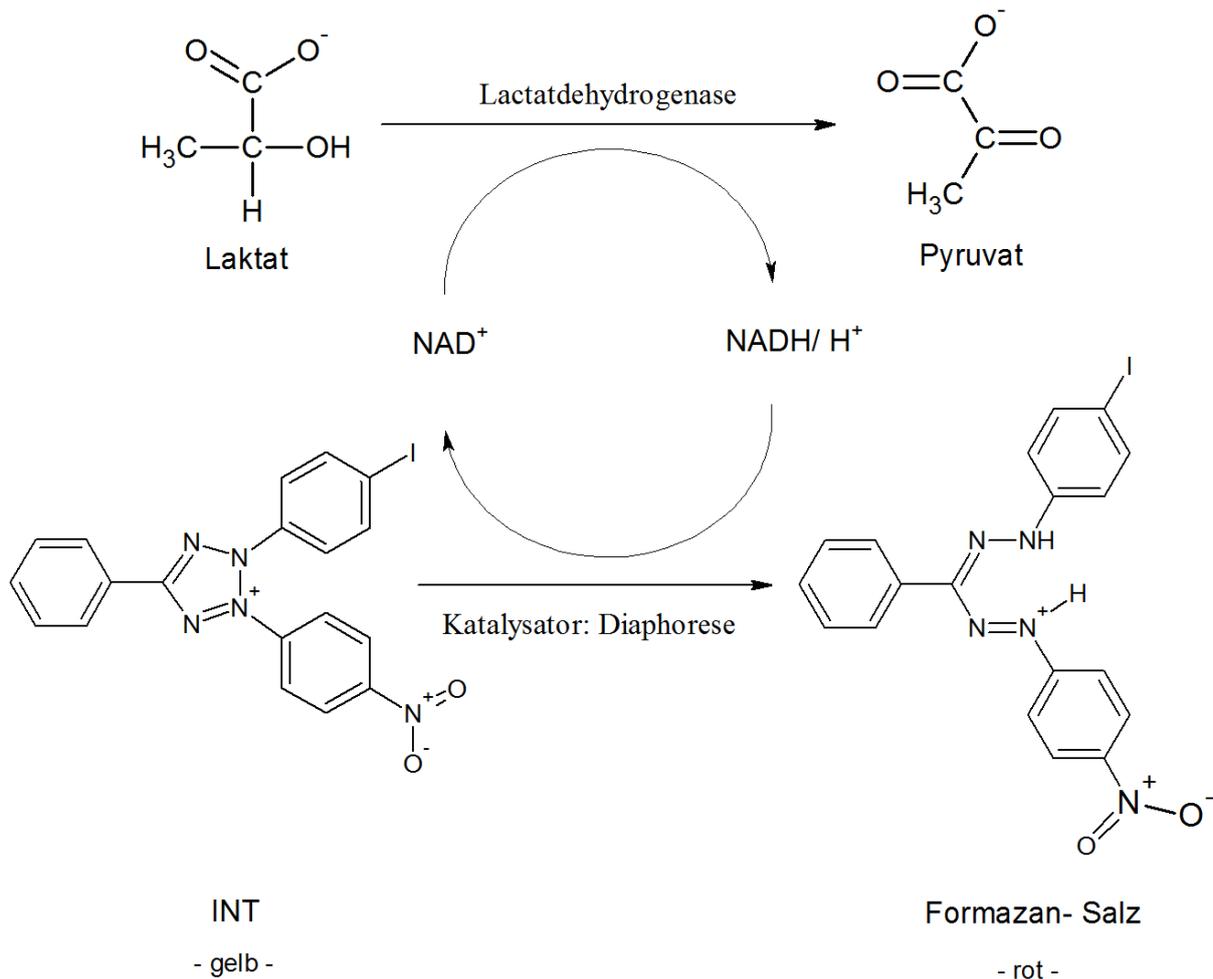


Abb. 9 Prinzip des LDH-Testes [85] (Abbildung: M. Eczko)

### Durchführung

- Schritt 1 Zellkultivierung: 1000  $\mu\text{l}$ /Well Zellsuspension (mit DMEM 10 % FKS) in 24-Well-Platte, Inkubation für 24 h bei 37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$
- Schritt 2 Mediumwechsel: 990  $\mu\text{l}$ /Well DMEM 1 % FKS/ Human Hepatocyte Maintenance Medium und 10  $\mu\text{l}$ /Well Extrakt bzw. Kontrollsubstanzen, Inkubation für 24 h bei 37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$
- Schritt 3 4 x 100  $\mu\text{l}$ /Well in eine neue 96-Well-Platte pipettieren
- Schritt 4 100  $\mu\text{l}$ /Well LDH-Reagenz zugeben, 5 bis 15 min Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur
- Schritt 5 Abstoppen der Reaktion mit 50  $\mu\text{l}$ /Well 1 M HCl

Schritt 6 Messung am ELISA-Reader bei 490 nm (Referenzwellenlänge 620 nm)

Schritt 7 Extinktionswerte (E) in Formel (Zytotoxizität) einsetzen

Formel:

$$\text{Zytotoxizität[\%]} = \left[ \frac{E(\text{Probe}) - E(\text{Negativkontrolle})}{E(\text{Positivkontrolle}) - E(\text{Negativkontrolle})} - E(\text{Leerwert}) \right] \times 100$$

## 2.11 BrdU - Zellproliferationstest

### Prinzip

Der BrdU-Test ist ein in-vitro angewendeter kolorimetrischer Immunoassay zur quantitativen Bestimmung der Zellproliferation. Er basiert auf dem Einbau von 5-Bromo-2-desoxyuridin (BrdU) während der DNA-Synthese.

Nach der Zellkultivierung erfolgte die Zugabe von BrdU in das Zellkulturmedium. In der darauf folgenden Inkubationszeit wurde das Pyrimidinanalogon BrdU während der Replikation anstelle von Thymidin kompetitiv in die DNA eingebaut (Abb. 10). Danach erfolgten die Fixation und Denaturierung der Zellen. Der Anti-BrdU Antikörper war mit einer Peroxidase (POD) konjugiert und band nach Zugabe an BrdU. Als Substrat fand Tetramethylbenzidin Anwendung, das durch die POD in einen blauen Farbstoff überführt wurde. Das Abstoppen der Reaktion mit Schwefelsäure führte zur Bildung eines stabilen gelben Farbstoffs. Dessen Absorption wurde am ELISA-Reader ermittelt und korreliert mit der Menge an neu synthetisierter DNA. Die Kontrollen bestanden aus einem Leerwert, einer Negativkontrolle und einer Hintergrundkontrolle. Der Leerwert war ein zellfreier Versuchsansatz. Die Negativkontrolle stand für eine ungehinderte Zellproliferation, da sie weder Extrakt noch Kontrollsubstanz enthielt. Die Hintergrundkontrolle war ein Maß für die unspezifische Bindung vom Anti-BrdU-POD-AK an die DNA in Abwesenheit von BrdU und sollte eine Extinktionswert von 0,1 nicht überschreiten, um eine ausreichende Genauigkeit der Methode zu gewährleisten. Für die beiden Tumorzelllinien wurde jeder Versuchsansatz als Vierfachbestimmung durchgeführt.

Der BrdU-Test wurde mit den frischen humanen Hepatozyten aufgrund ihrer geringen Proliferationsrate nicht durchgeführt [86].

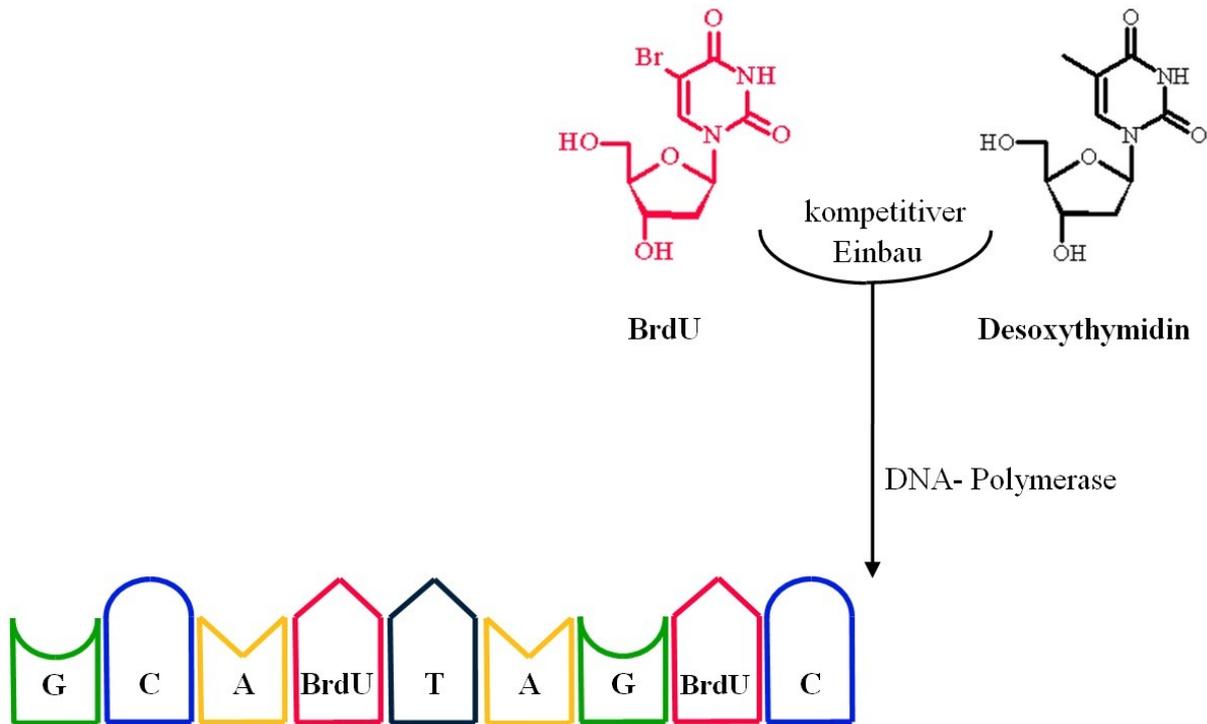


Abb. 10 kompetitiver Einbau von BrdU in die DNA; G Guanin; C Cytosin; T Thymin; A Adenin (Abbildung: M. Eczko)

### Durchführung

- Schritt 1 Zellkultivierung: 100 µl/Well Zellsuspension (mit DMEM 5 % FKS, hormonfrei) in 96-Well-Platte, Inkubation bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>
- Schritt 2 Extrakt- und Kontrollzugabe: 1 µl/Well Extrakt bzw. Kontrollen zugeben, Inkubation für 24 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>
- Schritt 3 Markierung mit BrdU: 10 µl/Well BrdU Lösung zugeben (nicht bei der Hintergrundkontrolle), Inkubation für 3 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>
- Schritt 4 Inkubation mit FixDenat-Lösung: Medium entfernen, 200 µl/Well FixDenat-Lösung zugeben, Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur, FixDenat-Lösung entfernen
- Schritt 5 Inkubation mit Anti-BrdU-POD AK: 100 µl/Well Anti-BrdU-POD-AK-Lösung zugeben, Inkubation für 60 min bei Raumtemperatur, Anti-BrdU-POD-AK-Lösung entfernen
- Schritt 6 Waschung: 3x Waschen mit Waschpuffer (PBS : Aqua dest., 1:10)

- Schritt 7 Substratreaktion: 100 µl/Well Substratlösung zugeben, Inkubation für 10 bis 20 min bei Raumtemperatur
- Schritt 8 Abstoppreaktion: 25 µl/Well 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zugeben
- Schritt 9 Messung am ELISA-Reader bei 450 nm (Referenzwellenlänge 620 nm)
- Schritt 10 Extinktionswerte in Formel (Zellproliferation) einsetzen

Formel: 
$$\text{Zellproliferation}[\%] = \left[ \frac{E(\text{Probe})}{E(\text{Negativkontrolle})} - E(\text{Leerwert}) \right] \times 100$$

## 2.12 Stoffbestimmungen im Zellkulturüberstand

Im Zellkulturüberstand der Mammakarzinomzellen wurden die Konzentrationen von 17β-Estradiol und Progesteron bestimmt. Nach 24-stündiger Kontrollen- bzw. Extraktinkubation wurden 500 µl Medium zur Hormonbestimmung aliquotiert und für 15 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Tube überführt und tiefgefroren an Primacyt Cell Culture Technology GmbH versandt. Im Zellkulturüberstand der Hepatozyten wurden Harnstoff und Albumin bestimmt. Die Gewinnung der Proben erfolgte nach 24-, 48- und 72-stündiger Kontrollen- bzw. Extraktinkubation. Der Versand der Proben erfolgte in gleicher Weise.

Die 17β-Estradiol- und Progesteronkonzentrationen wurden bei Primacyt mittels Chemielumineszenz-Mikropartikelimmunoassay bestimmt, die Harnstoffkonzentration mit der Urease/Glutamatdehydrogenase-Methode und die Albuminkonzentrationen durch ein ELISA.

Die Referenzbereiche betragen für 17β-Estradiol 7,6 - 42,6 pg/ml, für Progesteron 0,20 - 3,37 ng/ml.

### **2.13 Statistische Auswertung**

Der LDH-Test und der BrdU-Test wurden jeweils vier Mal mit jeweiliger Vierfachbestimmung durchgeführt und die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Mit den kostenintensiven frischen humanen Hepatozyten fand nur ein Versuchsansatz mit Vierfachbestimmung statt.

Zum Vergleich der Statistik wurde der Student's t-test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt.

Die grafische Darstellung der Messdaten erfolgte mit Microsoft Excel 2007 und die statistischen Berechnungen mit IBM SPSS Statistics 20.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Immunhistochemie

Die Charakterisierung der MCF-7 und BT-20 Zelllinien bezüglich der Expression des ER  $\alpha$  und  $\beta$  und des PR erfolgte mittels Immunhistochemie. Diese Rezeptoren gehören zur Klasse der Steroidhormonrezeptoren und sind zytoplasmatisch lokalisiert, eine Rotfärbung des Zytoplasmas ist als positiver Rezeptornachweis zu werten. Eine mitgeführte Negativkontrolle (Ansatz ohne Zugabe des primären Antikörpers) diente der Differenzierung zwischen positivem Rezeptornachweis und Trübung des Mediums durch abgelagertes Farbpigment.

Bei der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 konnten sowohl die ER  $\alpha$  und  $\beta$  als auch der PR nachgewiesen werden (Abb. 11). Bei der Mammakarzinomzelllinie BT-20 konnten diese Rezeptoren nicht nachgewiesen werden (Abb. 12).

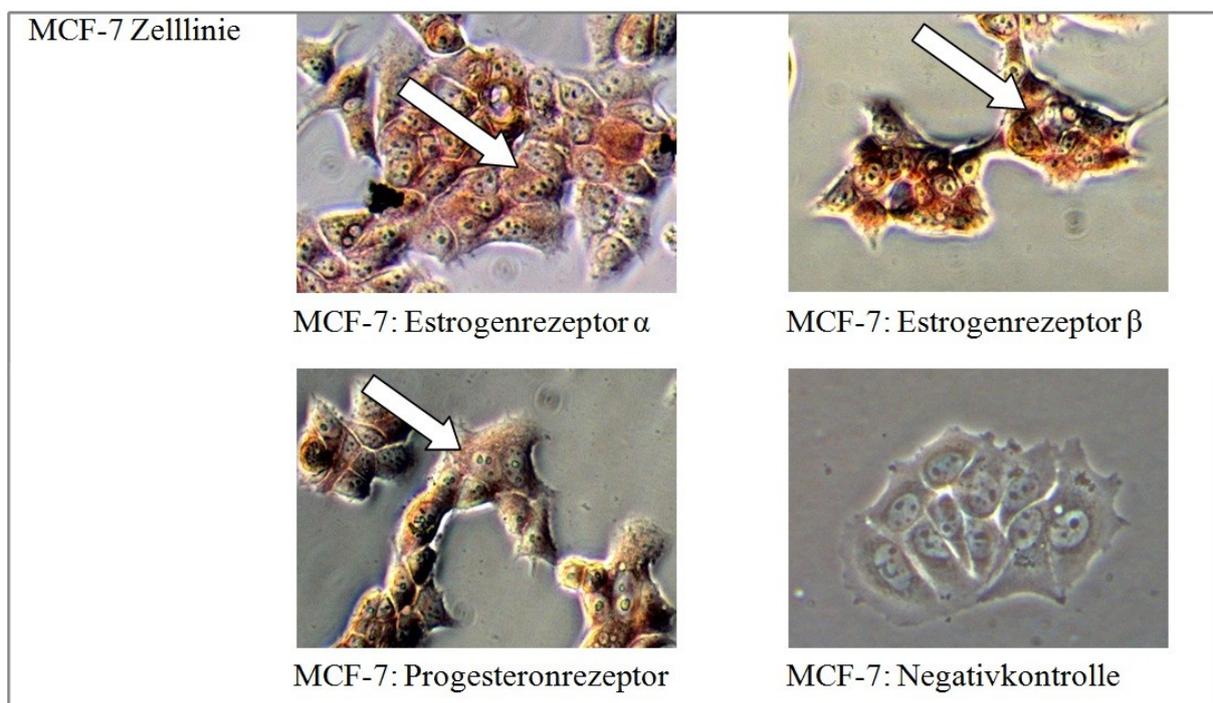


Abb. 11 Immunhistochemische Untersuchung auf Expression des ER  $\alpha$ , ER  $\beta$  und des PR für die MCF-7 Zelllinie: Rotfärbung entspricht Expression, Rezeptoren mit Pfeilen markiert

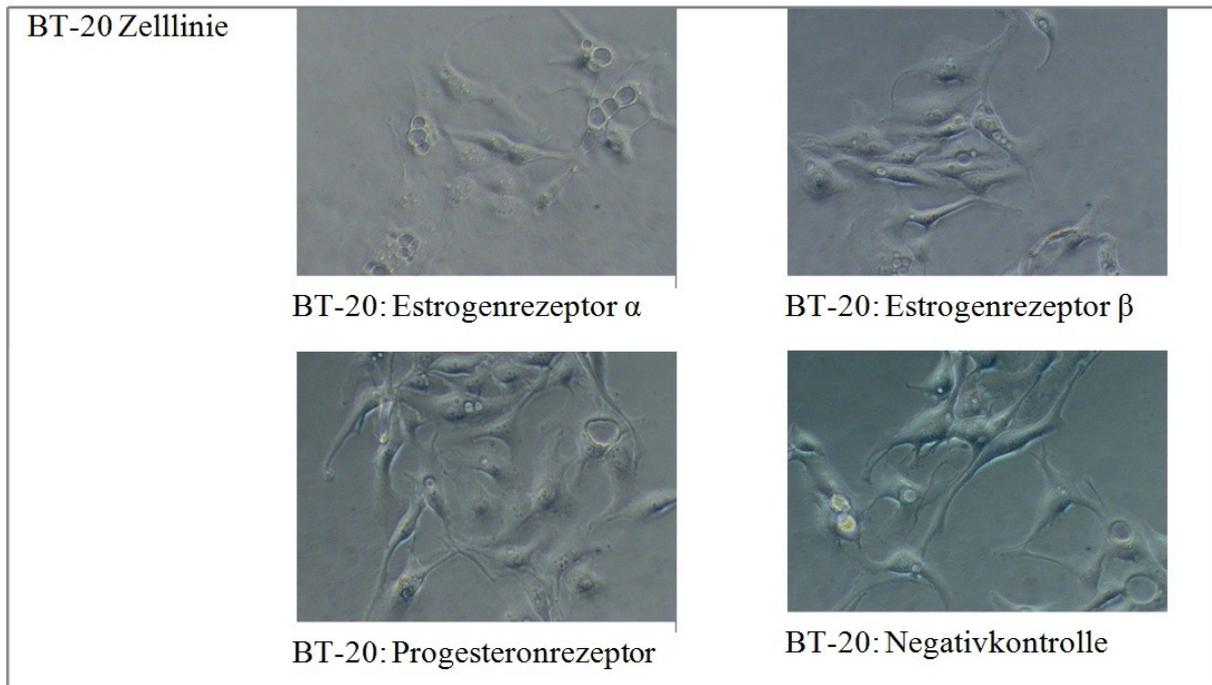


Abb. 12 Immunhistochemische Untersuchung auf Expression des ER  $\alpha$ , ER  $\beta$  und des PR für die BT-20 Zelllinie: Rotfärbung entspricht Expression

### 3.2 Pyrolyse-Feldionisations-Massenspektrometrie

Die Pyrolyse-Feldionisations-Massenspektrometrie gibt Aufschluss über die Zusammensetzung eines Stoffgemisches, z. B. eines Extraktes, durch die Erfassung der enthaltenen unterschiedlichen Stoffklassen. Jedoch sind exakte Angaben über einzelne Inhaltsstoffe nicht möglich. Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analysen des Pulvers der rohen Leinwurzel aus dem Jahre 2008 und des daraus gewonnenen wässrigen Extraktes sind in Abb. 13 als prozentuale Massenanteile dargestellt. Es wurden jeweils drei Proben analysiert.

Bei der Analyse wurde zwischen den folgenden Stoffklassen unterschieden: Kohlenhydrate, Monolignole, Lignindimere, Alkane, Alkene, Aldehyde, Alkohole, Fettsäuren, n-Alkylester, Wachse und Fette, N-haltige Verbindungen, isoprenoide Verbindungen, Peptide und freie Aminosäuren, niedermolekulare Verbindungen mit Masse/Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ) von 15 bis 56, Lignane, Flavone, Isoflavone, sonstige Polyphenole und sonstige Verbindungen. Die rohe Leinwurzel und der daraus gewonnene wässrige Extrakt wurden bezüglich dieser Stoffklassen verglichen. Beim wässrigen Extrakt ergab sich eine deutliche Zunahme der Fraktionen der Alkane, Alkene, Aldehyde, Alkohole, Fettsäuren, n-Alkylester, Wachse und Fette, isoprenoiden Verbindungen und sonstigen Polyphenole im Vergleich zur nativen

Leinwurzel. Die Fraktion der Lignane und der sonstigen Phenole nahm deutlich zu. Der prozentuale Massenanteil fast aller anderen Fraktionen nahm durch die Extraktion ab.

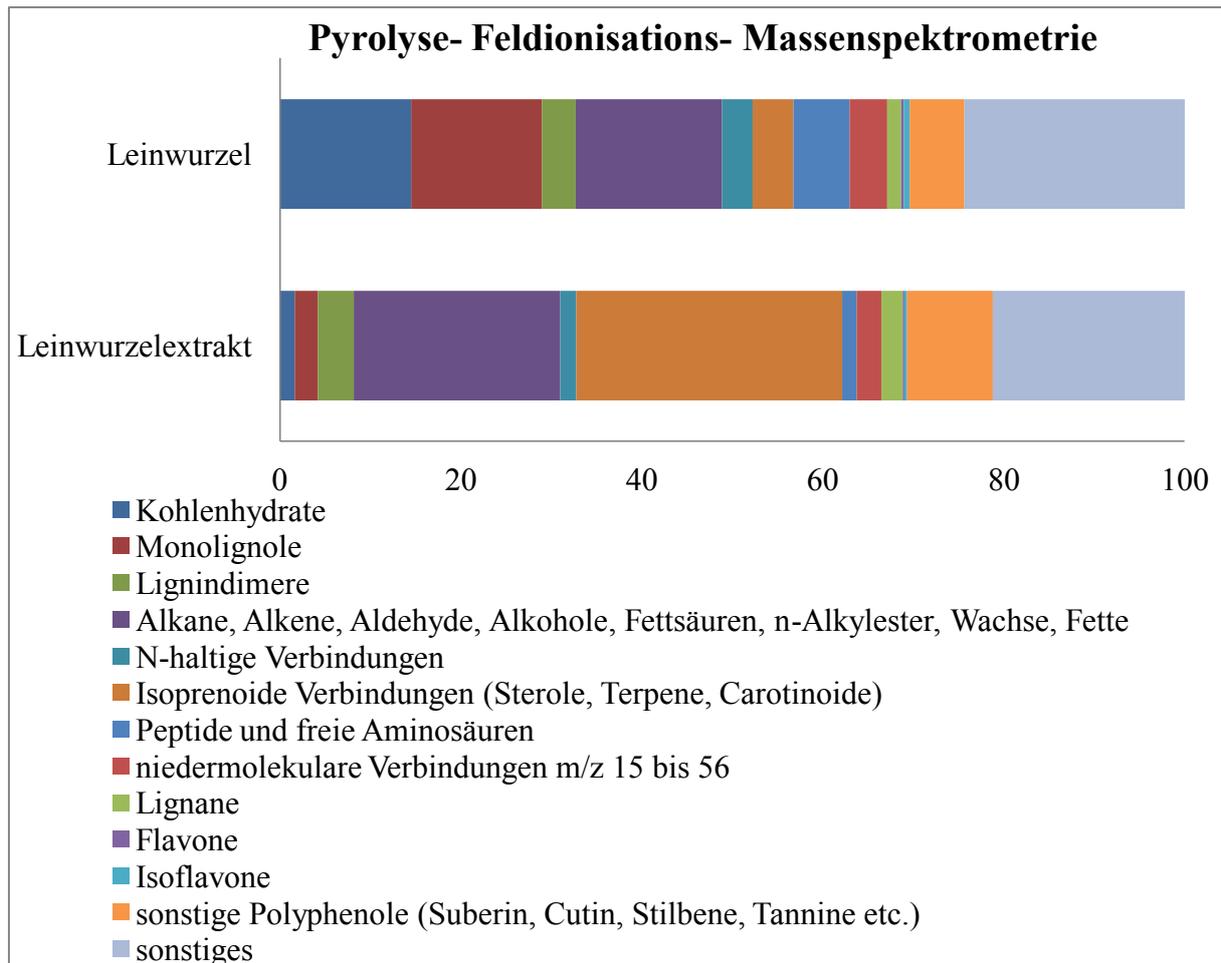


Abb. 13 Pyrolyse-Feldionisations-Massenspektrometrie: Prozentuale Verteilung der unterschiedlichen Stoffklassen in der nativen Leinwurzel und eines wässrigen Leinwurzelextraktes; Mittelwerte (n=3)

So nahm durch die Extraktion die Fraktion der Isoflavone von 0,6 % auf 0,3 % ab, gleichzeitig reicherte sich die Fraktion der Lignane von 1,5 % in der Wurzel auf 2,4 % im Extrakt an. Die wässrige Extraktion der Leinwurzel ist somit zur Anreicherung von Lignanen geeignet. Der Extrakt war jedoch keine homogene Flüssigkeit, sondern bestand aus gelösten und suspendierten Pflanzenbestandteilen. Das Vorhandensein ungelöster Pflanzenstoffe erklärt den Nachweis wasserunlöslicher Stoffe bei der PyFIMS, wie z. B. Wachse und Fette.

Die Stoffgruppe der Stilbene gehört auch zu den Phytoestrogenen. Sie ließ sich durch das verwendete Analyseverfahren nicht isoliert darstellen und wurde in der Fraktion der sonstigen Polyphenole zusammengefasst.

### 3.3 LDH-Zytotoxizitätstest

Die Untersuchung zur Zytotoxizität des Leinwurzelextraktes erfolgte mit dem LDH-Test. Die Kontrollen bestanden aus  $17\beta$ -Estradiol in den Konzentrationen  $10^{-9}$  und  $10^{-11}$  mol/l als zellstimulierender Faktor und Tamoxifen in der Konzentration  $10^{-4}$  mol/l als selektiver ER-Antagonisten. Die Ergebnisse des LDH-Testes mit dem Leinwurzelextrakt sind in der Abb. 14 dargestellt, die Ergebnisse mit  $17\beta$ -Estradiol und Tamoxifen in Abb. 15.

Der Leinwurzelextrakt zeigte in den Konzentrationen von 1000  $\mu$ g/ml und 500  $\mu$ g/ml einen signifikanten leicht zytotoxischen Effekt auf die MCF-7 Zelllinie. Alle anderen verwendeten Konzentrationen hatten keine zytotoxische Wirkung.

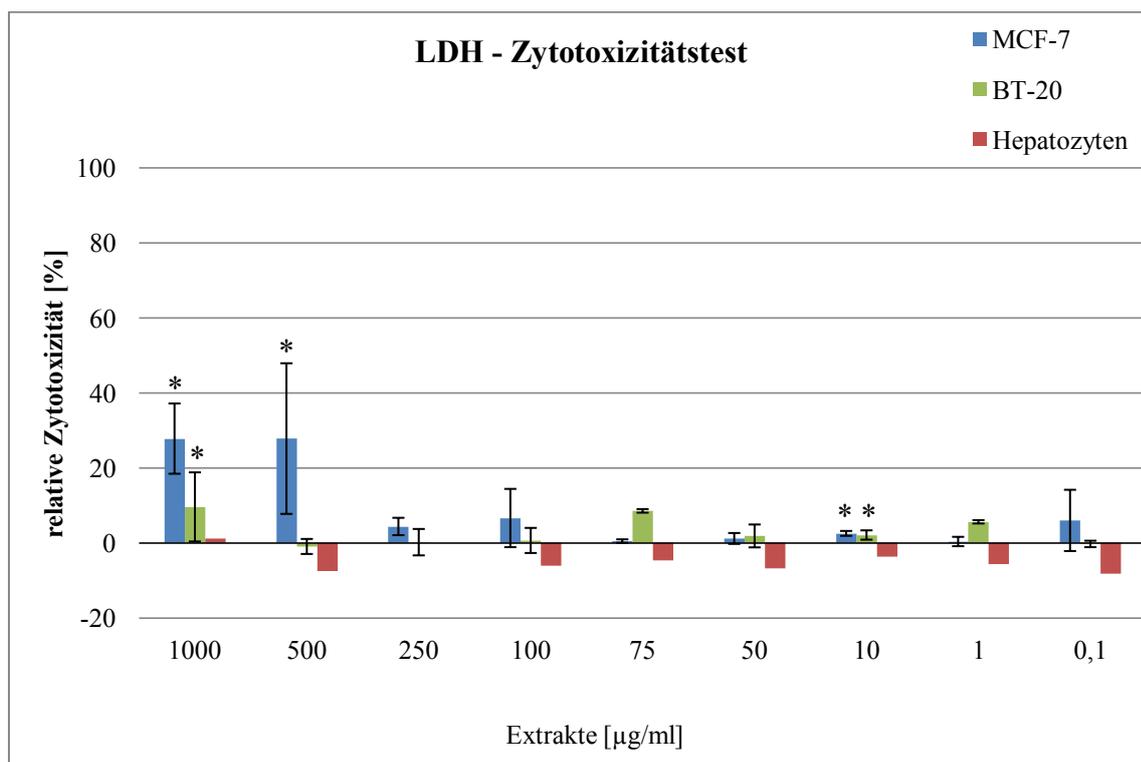


Abb. 14 LDH-Test bei der MCF-7 und BT-20 Zelllinie und bei humanen Hepatozyten: Relative Zytotoxizität des Leinwurzelextraktes in verschiedenen Konzentrationen zur Positivkontrolle (1 % Triton X-100); Mittelwerte  $\pm$  SD (n=4), für Hepatozyten Einzelwerte; \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$

Bei der BT-20 Zelllinie und den humanen Hepatozyten wurden für keine der verwendeten Extraktkonzentrationen ein zytotoxischer Effekt nachgewiesen. Die gemessenen Einzelwerte schwanken um  $\pm 10$  % um den Null-Wert. Für die Hepatozyten erbrachte der Versuch negative Werte, d.h. dass ohne Extrakt mehr Zellen abstarben als mit dem Extrakt, hierbei handelt es sich jedoch um Einzelwerte.

Die Kontrollsubstanzen hatten auf alle drei Zelllinien die gleiche Wirkung (Abb. 15). 17 $\beta$ -Estradiol wirkte nicht zytotoxisch, Tamoxifen dagegen stark zytotoxisch.

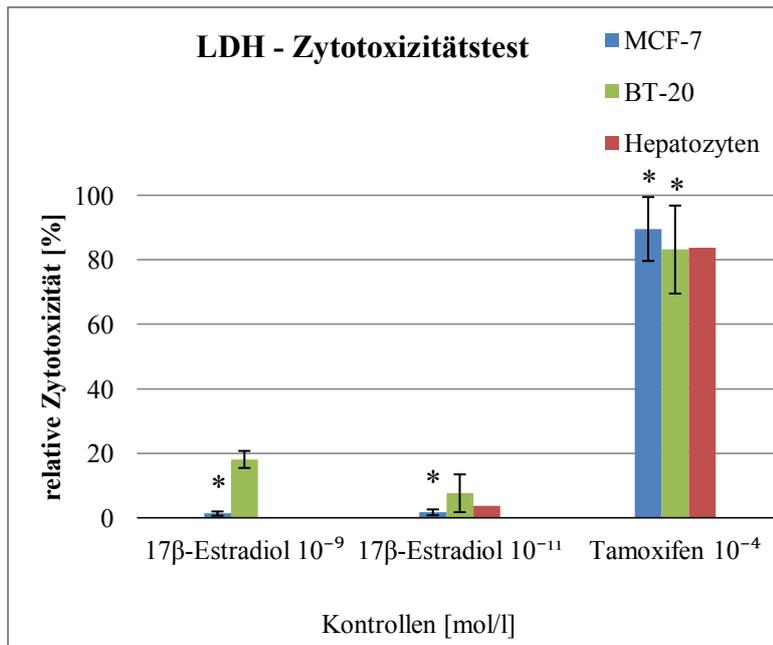


Abb. 15 LDH-Test bei der MCF-7 und BT-20 Zelllinie und bei humanen Hepatozyten: Relative Zytotoxizität der Kontrollsubstanzen zur Positivkontrolle (1 % Triton X-100); Mittelwerte  $\pm$  SD (n=4); für Hepatozyten Einzelwerte; \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$

### 3.4 BrdU-Zellproliferationstest

Mit dem BrdU-Test sollte das Proliferationsverhalten der Mammakarzinomzellen MCF-7 und BT-20 in Abhängigkeit von den zugegebenen Substanzen geprüft werden. Die Negativkontrolle diente als Referenzwert (100 % Zellproliferation). Kontrollsubstanzen waren 17 $\beta$ -Estradiol in den Konzentrationen 10<sup>-9</sup> und 10<sup>-11</sup> mol/l als zellstimulierender Faktor und Tamoxifen in der Konzentration 10<sup>-4</sup> mol/l als selektiver ER-Antagonist. Der BrdU-Test wurde nicht bei den humanen Hepatozyten durchgeführt, da deren Proliferationsrate sehr niedrig ist. Die Ergebnisse sind in den Abb. 16 und Abb. 17 dargestellt.

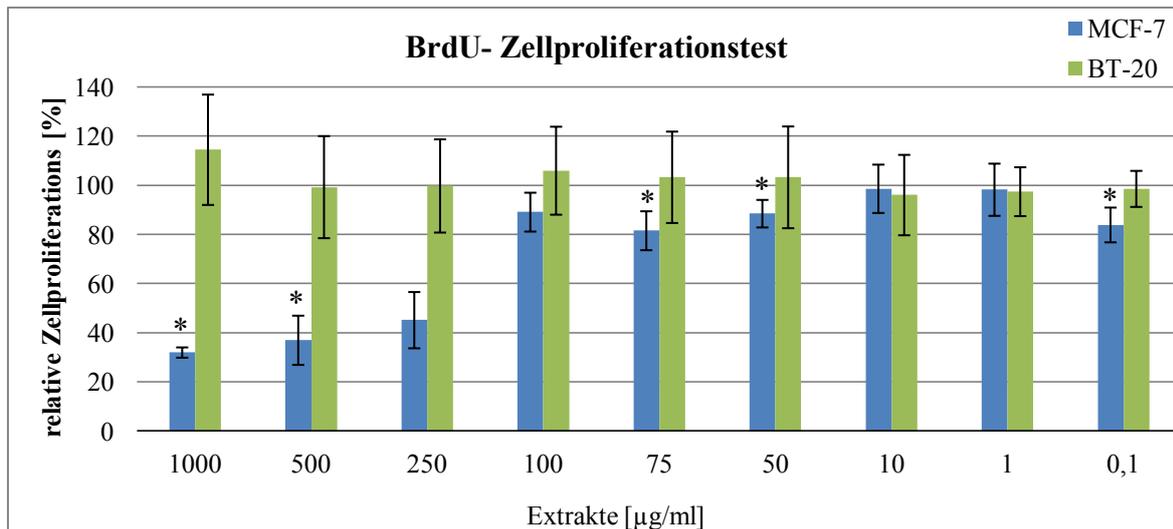


Abb. 16 BrdU-Test bei der MCF-7 und BT-20 Zelllinie: Relative Zellproliferation in Abhängigkeit des Leinwurzelextraktes in verschiedenen Konzentrationen zur Negativkontrolle (DMEM, 5 % FKS); Mittelwerte  $\pm$  SD (n=4); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$

Die Exposition gegenüber dem wässrigen Leinwurzelextrakt in den Konzentrationen 1000  $\mu\text{g/ml}$  und 500  $\mu\text{g/ml}$  hatte einen deutlichen und signifikanten antiproliferativen Effekt auf die MCF-7 Zelllinie. In den Konzentrationen 75  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$  und 0,1  $\mu\text{g/ml}$  ergab sich eine nur leichte, aber signifikante antiproliferative Wirkung. Alle anderen Extraktkonzentrationen beeinflussten die Zellproliferation der MCF-7 Zelllinie nicht.

Bei der BT-20 Zelllinie zeigte keine der verwendeten Leinwurzelkonzentrationen einen signifikanten antiproliferativen Effekt.

Beide Mammakarzinomzelllinien reagierten in gleicher Weise auf die Anwendung der Kontrollsubstanzen (Abb. 17): Beide Konzentrationen von  $17\beta$ -Estradiol beeinflussten das Zellwachstum nicht, Tamoxifen wirkte sehr stark antiproliferativ.

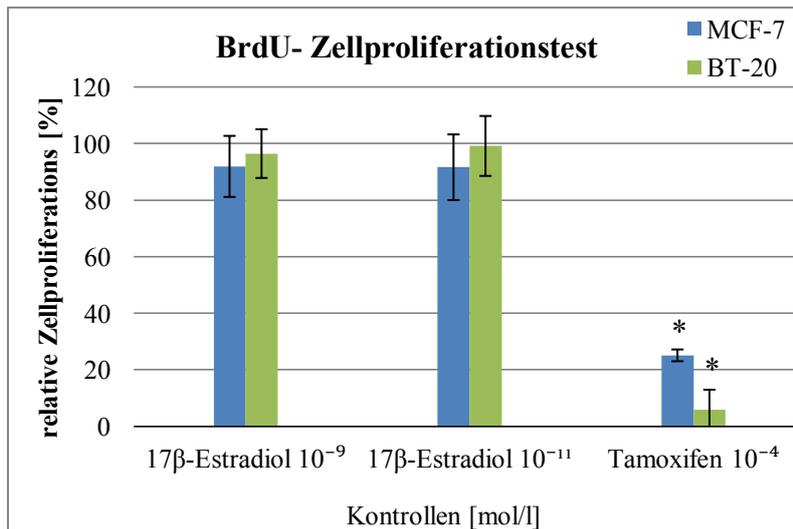


Abb. 17 BrdU-Test bei der MCF-7 und BT-20 Zelllinie: Relative Zellproliferation in Abhängigkeit der Kontrollsubstanzen zur Negativkontrolle (DMEM, 5 % FKS); Mittelwerte  $\pm$  SD (n=4); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$

### 3.5 Analysen der Zellkulturüberstände

#### MCF-7 und BT-20 Zelllinien

Von den Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und BT-20 wurden nach 24-stündiger Inkubation mit dem wässrigen Leinwurzelextrakt 500  $\mu$ l des Zellkulturüberstandes entnommen und sein Gehalt an 17 $\beta$ -Estradiol und Progesteron analysiert.

Die Progesteronkonzentration war in allen Analysen etwa gleich hoch und befand sich mit Werten kleiner als 0,1 ng/ml an der unteren Nachweisgrenze der Analysemethode und weit unterhalb des Referenzbereiches von 0,20 – 3,37 ng/ml. Deshalb wurde sie nicht grafisch dargestellt.

Die 17 $\beta$ -Estradiolkonzentration für beide Zelllinien zeigt Abb. 18. Alle Ergebnisse sind nach Abzug des Leerwertes (DMEM mit 5 % hormonfreiem FKS) dargestellt, der ca. 30 pg/ml betrug.

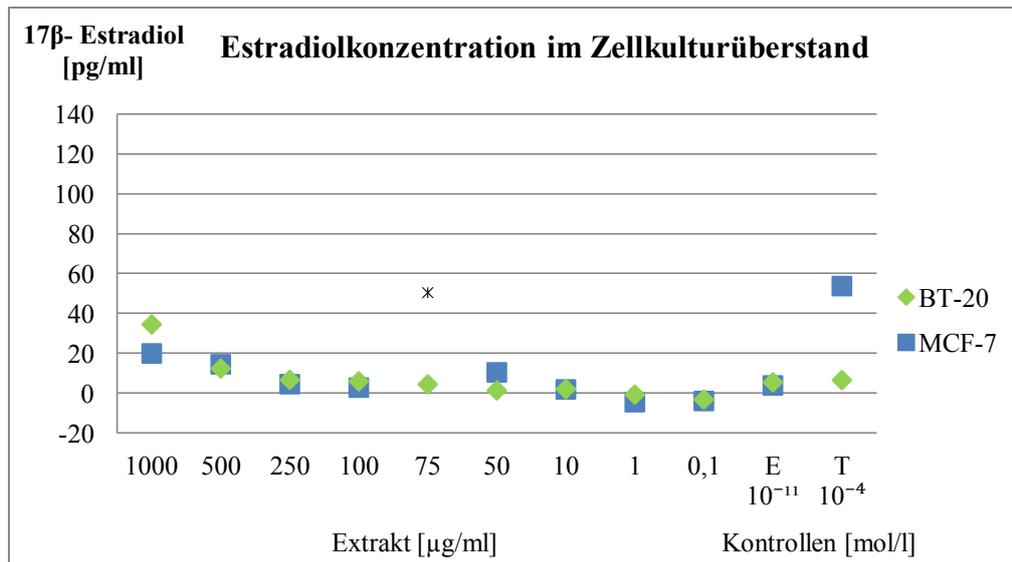


Abb. 18 17β-Estradiolkonzentration im Zellkulturüberstand nach 24-stündiger Inkubation mit dem Leinwurzelextrakt in verschiedenen Konzentrationen bzw. den Kontrollsubstanzen 17β-Estradiol (E) und Tamoxifen (T) für die Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und BT-20; Mittelwerte (n=2); \* Ausreißer

Die Konzentrationsverläufe zeigten für beide Zelllinien einen ähnlichen Verlauf, bei Extraktkonzentrationen von 1000 μg/ml und 500 μg/ml ließen sich erhöhte 17β-Estradiolkonzentrationen nachweisen. Bei allen anderen Extraktkonzentrationen und Kontrollsubstanzen lagen die Werte um 0 pg/ml. Eine Ausnahme bildeten die MCF-7 Zellen unter Tamoxifenbehandlung, hier wurden die höchsten Werte für 17β-Estradiol in der Versuchsreihe gemessen. Die Referenzbereiche der Messmethode lagen für Progesteron bei 0,20 – 3,37 ng/ml und für 17β-Estradiol bei 7,6 – 42,6 pg/ml.

### Humane Hepatozyten

Die Harnstoffkonzentrationen im Medium wurden nach 24-, 48- und 72-stündiger Inkubation mit dem wässrigen Leinwurzelextrakt bzw. den Kontrollsubstanzen bestimmt.

Der Zellkulturansatz mit Hepatozyten und Medium ohne Zugabe weiterer Substanzen diente als Negativkontrolle (100 % Syntheseleistung). Wie Abb. 19 zeigt, kann ein leichter inhibitorischer Einfluss ab einer Extraktkonzentration von 75 μg/ml auf die Syntheseleistung nicht ausgeschlossen werden. Unter Inkubation mit 1000 μg/ml kommt es nach 48 h zu einem starken Anstieg der Harnstoffsynthese, die danach wieder auf das Ausgangsniveau fällt.

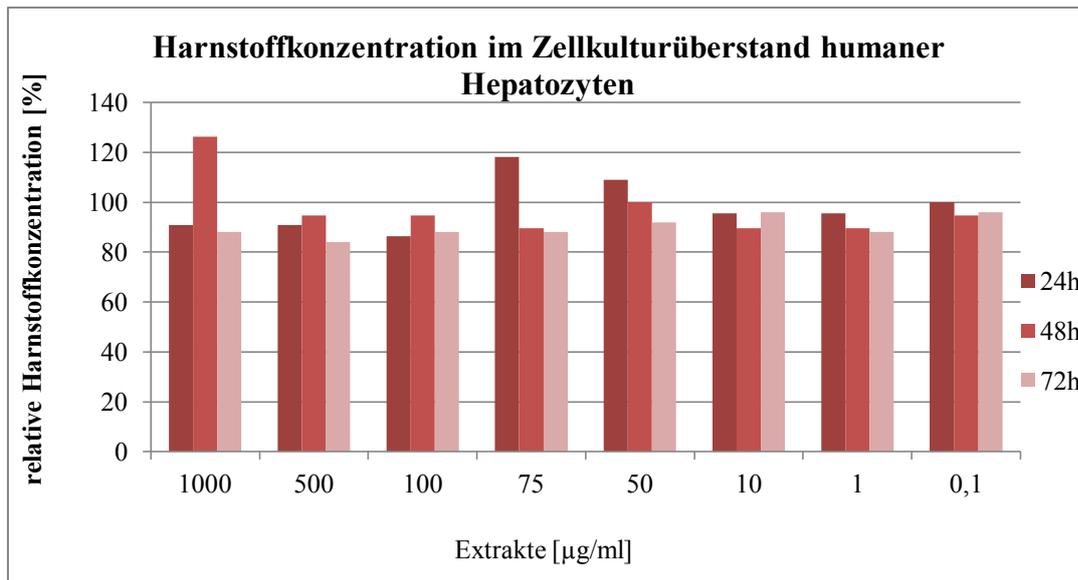


Abb. 19 Relative Harnstoffkonzentration im Zellkulturüberstand humaner Hepatozyten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit dem wässrigen Leinwurzelextrakt in verschiedenen Konzentrationen zur Negativkontrolle (Hepatozyten nur mit Medium  $\hat{=}$  100 %); Einzelwerte

Die Wirkung der Kontrollsubstanzen auf die humanen Hepatozyten ist in Abb. 20 dargestellt. Die Harnstoffsynthese wurde durch die Zugabe von  $17\beta$ -Estradiol nicht beeinträchtigt, dagegen hemmt Tamoxifen und Triton X-100 die Syntheseleistung mit zunehmender Inkubationszeit, wobei Triton X-100 einen stärkeren Effekt hat.

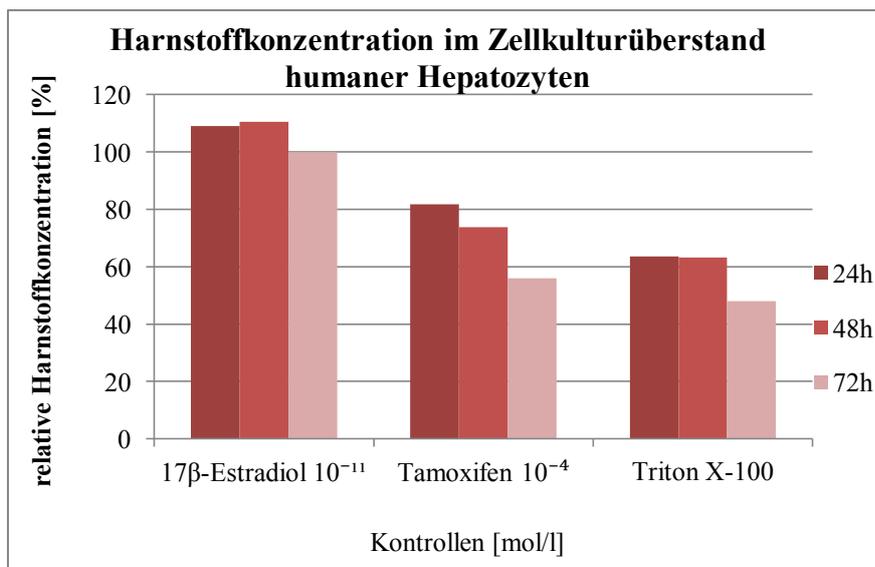


Abb. 20 Relative Harnstoffkonzentration im Zellkulturüberstand humaner Hepatozyten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit den Kontrollsubstanzen  $17\beta$ -Estradiol, Tamoxifen, Triton X-100 zur Negativkontrolle (Hepatozyten nur mit Medium  $\hat{=}$  100 %); Einzelwerte

Die Albuminkonzentration wurde nach 24-, 48- und 72-stündiger Inkubation mit dem wässrigen Leinwurzelextrakt bzw. den Kontrollsubstanzen bestimmt.

Unter Einwirkung des Leinwurzelextraktes zeigten die Hepatozyten bei allen Extraktkonzentrationen eine ähnliche Dynamik: Nach 24 h war die Albuminkonzentration im Überstand, als Hinweis auf die Syntheseleistung, unverändert oder leicht gestiegen (bis max. 144 %), außer bei einer Konzentration von 1000  $\mu\text{g/ml}$ . Sie fiel nach 48 h Einwirkzeit ab und stieg nach 72 h wieder auf das Ausgangsniveau an (Abb. 21).

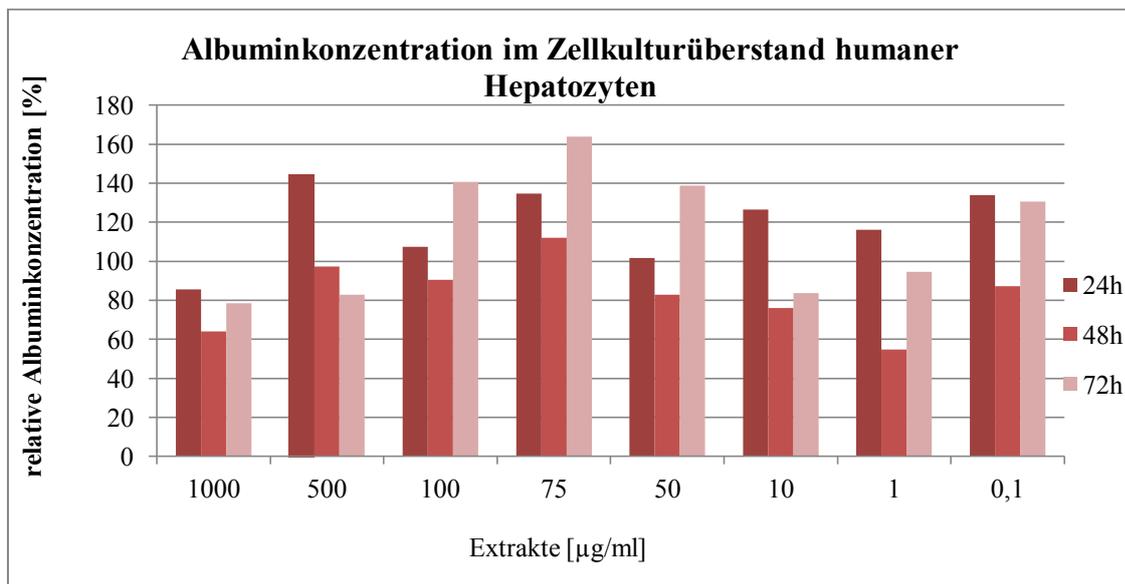


Abb. 21 Relative Albuminkonzentration im Zellkulturüberstand humaner Hepatozyten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit dem wässrigen Leinwurzelextrakt in verschiedenen Konzentrationen zur Negativkontrolle (Hepatozyten nur mit Medium  $\hat{=}$  100 %); Einzelwerte

Die Wirkungsdynamik von  $17\beta$ -Estradiol war ähnlich wie die der Extrakte, d.h. die Albuminkonzentration stieg nach 24 h Inkubation, fiel nach 48 h ab und stieg nach 72 h wieder auf das Ausgangsniveau an. Tamoxifen und Triton X-100 führten zu einer kompletten Hemmung der Albuminsynthese relativ zur Negativkontrolle (Abb. 22).

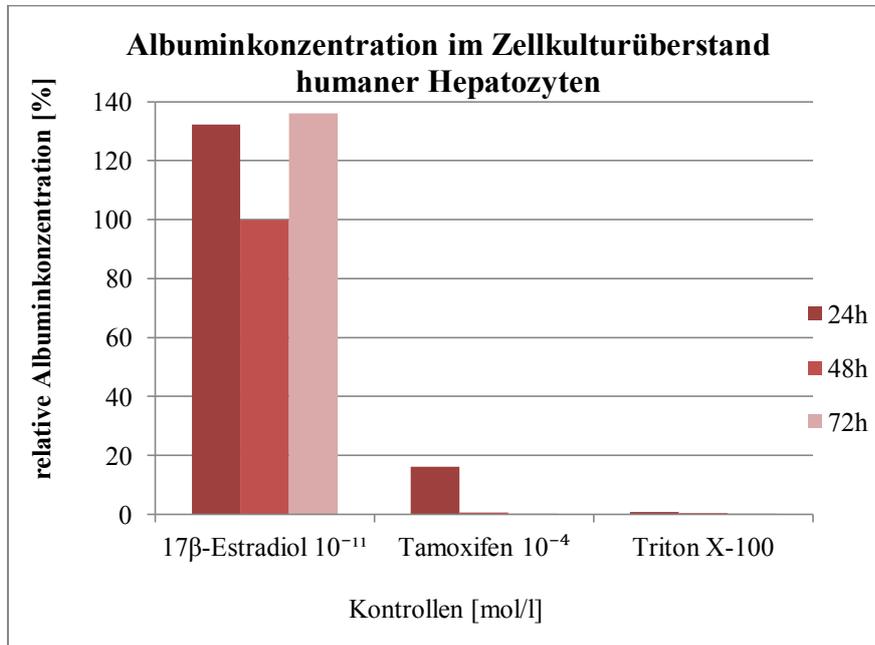


Abb. 22 Relative Albuminkonzentration im Zellkulturüberstand humaner Hepatozyten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit den Kontrollsubstanzen  $17\beta$ -Estradiol, Tamoxifen, Triton X-100 zur Negativkontrolle (Hepatozyten nur mit Medium  $\hat{=}$  100 %); Einzelwerte

## 4. Diskussion

Viele Pflanzen und Pflanzenbestandteile wurden in den letzten Jahren intensiv auf ihren Phytoestrogengehalt und Einfluss auf verschiedene Krankheiten, insbesondere auch Tumoren untersucht. So ist ein regelmäßiger Konsum von Produkten aus Sojabohnen mit einem niedrigeren Lungenkrebsrisiko assoziiert [87]. In anderen Studien wurden Risikoreduktionen für Prostatakrebs beim Männern und Brustkrebs und postmenopausale Osteoporose bei Frauen beschrieben [88-90]. Neben der Sojabohne stehen Leinsamen, Kürbiskerne und Rotklee im Fokus der Forschung. Sojabohnen sind besonders reich an Isoflavonen, Leinsamen besonders reich an Lignan. Auch für Leinsamen wurden positive Einflüsse auf viele Erkrankungen beschrieben, wie z. B. das Metabolische Syndrom oder die koronare Herzkrankheit [91,92]. In der Wurzel des Leins wurden ebenfalls Lignane gefunden, dieser Pflanzenbestandteil wurde bisher aber therapeutisch nicht genutzt.

Ziel dieser Arbeit war, zu prüfen, ob der wässrige Extrakt der Leinwurzel ein Potenzial zur adjuvanten Therapie des Mammakarzinoms haben könnte.

### 4.1 Lignanextraktion

In Leinsamenextrakten kann die Lignanfraktion je nach Extraktionsverfahren auf 0,8 % bis 7 % angereichert werden [93]. Die vorliegende Arbeit nutzt jedoch die Wurzel des Leins (*Linum usitatissimum*, Sorte Babara) als Ausgangsstoff. Die massenspektrometrischen Analysen der Blätter, Stängel und Wurzel der Leinpflanze zeigten, dass die Wurzel hinsichtlich des Lignangehaltes die reichhaltigste Quelle ist [94]. Bislang wurde die Extraktion nach Luyengi et al (1996) durchgeführt, welche Methanol als Lösungsmittel nutzt. Damit ließ sich die Lignanfraktion im Wurzelextrakt von 1,5 % (nativ) auf Werte zwischen 1,9 % und 3,0 % anreichern [95,96].

Die in dieser Arbeit durchgeführte wässrige Extraktion wurde in unserer Arbeitsgruppe entwickelt und ist in der Literatur bisher noch nicht beschrieben. Durch dieses Verfahren konnte der Lignangehalt von 1,5 % (nativ) auf 2,4 % (im Extrakt) gesteigert werden, es ist diesbezüglich dem Extraktionsverfahren nach Luyengi et al. (1996) etwa gleichwertig. 1000 µg/ml wässriger Leinwurzelextrakt enthält ca. 24 µg/ml Lignane.

Der Wirkstoff eines Phytopharmakons ist der Extrakt in seiner Gesamtheit, da unterschiedliche Extraktionsverfahren führen zu unterschiedlichen Spektren von Inhaltsstoffen und damit zu unterschiedlichen Wirkstoffen [68]. Auch Wachstumsort, Erntezeit, Wachstumsbedingungen, Verarbeitung und Zubereitung beeinflussen die Zusammensetzung der Inhaltsstoffe [66]. Im wässrigen Extrakt liegen ganz überwiegend hydrophile Inhaltsstoffe und kaum lipophile Inhaltsstoffe vor, bei der methanolischen Extraktion nach Luyengi et al. (1996) werden auch lipophile Stoffe gelöst. Dem entsprechend können unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich Zytotoxizität und Proliferationshemmung vermutet werden.

## **4.2 Zytotoxizität des Leinwurzelextraktes**

### MCF-7 und BT-20 Zelllinie

Die zytotoxische Wirkung eines nach Luyengi et al. (1996) hergestellten Leinwurzelextraktes auf Tumorzelllinien wurde bereits mehrfach nachgewiesen [94,96,97]. In zwei Untersuchungen wurde eine zytotoxische Wirkung auf die MCF-7 und die BT-20 Zelllinie gezeigt [94,97], in einer weiteren wurde ein zytotoxischer Effekt nur bei der MCF-7 Zelllinie nachgewiesen [96]. Eine Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse kann Ethanol (96 %) darstellen, das zum Herstellen der Stammlösung im Anschluss an die methanolische Extraktion nach Luyengi et al (1996) verwendet wurde [98]. Bereits eine 24-stündige Inkubation mit 8 mmol/l Ethanol lässt 50 % einer HepG2 Zellkultur absterben, Konzentrationen von 0,15 mmol/l bis 0,7 mmol/l reduzieren die Zellproliferation auf die Hälfte [99]. Bei Rattenhepatozyten stellt sich die zytotoxische und antiproliferative Wirkung erst bei höheren Ethanolkonzentrationen ein [99]. In Konzentrationen von < 50 mmol/l wird in Hep2G Zellen die Apoptose induziert, in höheren Konzentrationen führt er zur Nekrose [100]. Der Unterschied in der Wirkung der Extrakte kann aber auch den unterschiedlichen Witterungsbedingungen geschuldet sein. Für Rotkleeextrakt ist dieser Effekt bereits bekannt [101]. Auch die native Leinwurzel aus dem Jahr 2004 hat einen um 25 % höheren Lignangehalt als die in der aktuellen Arbeit verwendete aus dem Jahr 2008 [94]. Aber auch andere Inhaltsstoffe können bezüglich ihres Gehaltes witterungsbedingt abweichen.

Das in dieser Arbeit genutzte Extraktionsverfahren wurde 2009 erstmals angewendet. Der damalige wässrige Leinwurzelextrakt wirkte weder auf die MCF-7 noch auf die BT-20

Zelllinie zytotoxisch [102]. In der vorliegenden Arbeit wurde dagegen eine zytotoxische Wirkung des Leinwurzelextraktes auf die MCF-7 Zelllinie, nicht aber auf die BT-20 Zelllinie nachgewiesen. Dies legt einen ER-abhängigen Wirkmechanismus nahe. Der Effekt ist mit ca. 30 % in den hohen Konzentrationsstufen von 1000 µg/ml und 500 µg/ml im Vergleich zum methanolischen Leinwurzelextrakt mit 30 % - 80 % allerdings geringer ausgeprägt.

Die Wirkung der Kontrollsubstanzen in dieser Arbeit stimmte mit der in der Literatur beschriebenen überein. 17β-Estradiol wirkt bei beiden Zelllinien nicht zytotoxisch, Tamoxifen zeigt einen starken zytotoxischen Effekt bei den Zelllinien, dieser hormonunabhängige zytotoxische Effekt wurde 2004 bereits beschrieben [103,104]. Er lässt sich mit den multiplen Wirkungsmechanismen von Tamoxifen erklären: In-vitro wirkt Tamoxifen in niedriger Dosierung als Agonist, in hoher Dosierung jedoch als Antagonist am ER und damit antiproliferativ auf MCF-7 Zellen [105]. Darüber hinaus wirkt es noch als Antagonist der Protein Kinase C, interagiert mit dem Transforming Growth-Factor β und aktiviert die Caspase-3 [106].

### Humane Hepatozyten

In einigen Publikationen wurde die Wirkung einer mit Leinsamen angereicherten Ernährung auf die Leber dokumentiert. Leinsamen wirkte in Tierexperimenten hepatoprotektiv. Es wurde ein lipophiler Extrakt aus Leinsamen hergestellt und Ratten drei Tage lang intragastral (1,6 g/kg Körpergewicht) verabreicht. Am vierten Tag erfolgte die intraperitoneale Injektion von Tetrachlormethan. Die Kontrollgruppe zeigte eine ausgeprägte Lebernekrose von 27,6 %, während in der Leinölextrakt-Gruppe die Nekrose mit 6,4 % deutlich weniger ausgedehnt war [107]. In einer weiteren Arbeit mit diesem Modell stieg die ALAT als Zeichen der Leberschädigung in der Kontrollgruppe stark an. Bei den mit Leinölextrakt vorbehandelten Ratten war der Anstieg 1,2 - 3,7-fach geringer. Bei den männlichen Tieren war der Effekt stärker ausgeprägt als bei den weiblichen. Die Aktivität der γGT stieg in der Leinölextrakt-Gruppe an; dies wurde als Hinweis auf eine protektive Wirkung gewertet [108]. Nahrung, die 10 % Leinsamenextrakt enthält (ein Teil gemörserte Leinsamen mit neun Teilen regulärer Rattennahrung), wirkt nicht toxisch und hat keine Auswirkungen auf Wachstum, Entwicklung und Verhalten von Ratten in den ersten 86 Tagen nach Fütterungsbeginn. Lediglich die Aktivität der γGT im Blut der mit leinsamenhaltiger Kost gefütterten Ratten war

im Vergleich zur Kontrolle bei den männlichen Ratten 4-fach und bei den Weiblichen 1,4-fach erhöht [109,110].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein wässriger Extrakt aus der Leinwurzel auch in höheren Konzentrationen keine toxische Wirkung auf humane Hepatozyten hat. Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass auch in-vivo die Toxizität allenfalls gering sein dürfte.

Als Kontrollsubstanzen wurden Tamoxifen und  $17\beta$ -Estradiol verwendet. Die zytotoxische Wirkung von Tamoxifen auf humane Hepatozyten wurde kürzlich beschrieben, sie beruht auf oxidativen Stress [111]. Darüber hinaus wirkt Tamoxifen in-vivo genotoxisch und führt bei Ratten zur Entstehung von Leberzellkarzinomen. Auf Zellen eines hepatozellulären Karzinoms wirkt es ebenfalls zytotoxisch [112,113]. Im Gegensatz dazu konnte für  $17\beta$ -Estradiol gezeigt werden, dass es z. B. bei HepG2 Zellen die zytotoxische Wirkung von hydrophoben Gallensäuren in-vitro abschwächt und damit zytoprotektiv wirken kann [114].

In dieser Arbeit hatte Tamoxifen eine starke zytotoxische Wirkung auf humane Hepatozyten. Für  $17\beta$ -Estradiol konnte in einer Konzentration von  $10^{-11}$  mol/l weder ein zytotoxischer noch ein -protektiver Effekt nachgewiesen werden. Die Kontrollsubstanzen wirkten damit vergleichbar auf die humanen Hepatozyten und die Mammakarzinomzellen.

#### **4.3 Veränderung der Zellproliferation durch den Leinwurzelextrakt**

Zu Leinsamen, nicht zu Leinwurzelextrakt wurden mehrere in-vivo Studien durchgeführt. Im Jahr 2007 wurde die Wirkung von Tamoxifen bzw. Leinsamen beim MCF-7 Mammakarzinom der ovariectomierten Nacktmaus (BALB/c nu/nu athymische Maus) in Gegenwart hoher Estrogen-Plasma-Spiegel untersucht, die durch subkutane Implantation von  $17\beta$ -Estradiol erreicht wurden. Frisch gemörserter Leinsamen wurde für acht Wochen zu 5 % oder 10 % dem Futter zugesetzt und u. a. Tumorgroße, Tumorgewicht, Zellproliferations- und Apoptoserate der MCF-7 Zellen analysiert. Das Futter mit 10 % Leinsamen erzielte vergleichbare Ergebnisse wie die alleinige Behandlung mit Tamoxifen: Es halbierte das Tumolvolumen und erhöhte die Apoptoserate der Zellen um 50 %. Die Kombination aus 5 % Leinsamen im Futter und Tamoxifen konnte diesen antikanzerogenen Effekt noch steigern [115]. Bei ovariectomierten athymischen Mäusen mit niedrigem Estrogen-Plasma-Spiegel beschleunigte Tamoxifen das Zellwachstum und hemmte die Apoptose des MCF-7 Mammakarzinoms im Vergleich zu unbehandelten ovariectomierten

Nacktmäusen (Negativkontrolle). Die Fütterung mit Leinsamen bewirkte vergleichbare Ergebnisse wie bei der Negativkontrolle und konnte in der Kombination mit Tamoxifen dessen prokarzinogenen Effekt um die Hälfte reduzieren [116]. Power et al. untersuchten die Wirkung einer mit Sojaproteinen oder Leinsamen angereicherten Nahrung auf das Zellwachstum des MCF-7 Mammakarzinoms in ovariectomierten Nacktmäusen. Bei kurzzeitiger Deprivation von Estrogen bewirkten weder Leinsamen noch Sojaproteine eine Zunahme der Zellproliferationsrate. Nach einer Deprivationszeit von 25 Wochen stieg die Proliferationsrate im Vergleich zur Negativkontrolle unter Nahrungsergänzung mit Sojaprotein an, jedoch nicht unter der mit Leinsamen angereicherten Nahrung [117].

Andere Arbeitsgruppen erhielten in in-vitro Untersuchungen vergleichbare Ergebnisse. So zeigten Lee et al., dass ein lyophilisierter, gemörserter und in Ethanol aufgenommener Extrakt aus Leinsamensprossen die Zellproliferation hemmt und die Apoptoserate erhöht. Der Effekt war bei der ER-negativen Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 stärker ausgeprägt als bei der MCF-7 Zelllinie [118]. Ein methanolischer Extrakt der Leinwurzel hemmte die Zellproliferation sowohl der ER-positiven MCF-7 Zelllinie als auch der ER-negativen BT-20 Zelllinie in den Konzentrationen 100 µg/ml, 500 µg/ml und 1000 µg/ml [95]. Die Wirkung auf ER-negative Zellen kann der, bereits weiter oben angeführten, Verwendung von Ethanol als Lösungsmittel für den Trockenextrakt geschuldet sein.

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete wässrige Leinwurzelextrakt zeigte ebenfalls eine signifikante antiproliferative Wirkung auf die MCF-7 Zellen in den Konzentrationen von 500 µg/ml und 1000 µg/ml. Das Wachstum der BT-20 Zelllinie wurde dagegen nicht beeinträchtigt. Da der Extrakt sowohl zytotoxisch als auch antiproliferativ auf die ER-positiven Tumorzellen wirkte ohne die Proliferationsrate der ER-negativen Tumorzellen zu verändern ist anzunehmen, dass die Wirkung über ER-abhängige Mechanismen vermittelt wird.

Der proliferationssteigernde und prokarzinogene Effekt von über einen längeren Zeitraum erhöhten  $17\beta$ -Estradiolkonzentrationen im Serum auf Brustkrebszellen der Frau wurde klinisch bereits in den 90er Jahren nachgewiesen [119,120]. In-vitro Studien zeigen gleichermaßen diesen Zusammenhang für die MCF-7 Zellen nach sechstägiger Inkubation mit  $17\beta$ -Estradiolkonzentrationen von  $10^{-12}$  mol/l bis  $10^{-8}$  mol/l [121]. Im Gegensatz dazu wurde in anderen Arbeitsgruppen die Proliferation durch  $17\beta$ -Estradiol in den Konzentrationen von  $10^{-11}$  mol/l und  $10^{-13}$  mol/l nicht gesteigert [122]. Diese Ergebnisse deuten auf einen langfristigen Effekt von  $17\beta$ -Estradiol hin, der erst nach mehrtägiger Inkubation zu

beobachtet ist. Auch in den hier durchgeführten Versuchen hat  $17\beta$ -Estradiol in den Konzentrationen von  $10^{-9}$  mol/l und  $10^{-11}$  mol/l nach 24-stündiger Inkubation keine proliferationssteigernde Wirkung auf MCF-7 und BT-20 Zellen.

#### **4.4 Messung im Zellkulturüberstand**

##### BT-20 und MCF-7 Zelllinie

Gesundes Brustdrüsengewebe und einige Tumorzellen besitzen die Enzymausstattung, z. B. die Aromatase, um aus Vorläufermolekülen  $17\beta$ -Estradiol zu synthetisieren [123]. In der Literatur gibt es Hinweise auf eine lokale  $17\beta$ -Estradiolproduktion im Brustkrebsgewebe [124], für die MCF-7 und BT-20 Zellen konnte dieser Effekt allerdings noch nicht nachgewiesen werden.

Die aktuelle Analyse der Zellkulturüberstände zeigte bei den BT-20 Zellen, dass nach 24-stündiger Inkubation mit  $17\beta$ -Estradiol oder den niedrigeren Extraktkonzentrationen nur sehr niedrige Konzentrationen von  $17\beta$ -Estradiol nachweisbar waren (Abb. 18). Bei den Extraktkonzentrationen 500  $\mu\text{g/ml}$  und 1000  $\mu\text{g/ml}$  ergaben sich jedoch nach Abzug des Leerwertes Konzentrationen von 12,4  $\text{pg/ml}$  und 34,5  $\text{pg/ml}$   $17\beta$ -Estradiol. Da der Extrakt bei den BT-20 Zellen, bei diesen Konzentrationen, nicht zytotoxisch wirkt handelte es sich offenbar um einen unspezifischen Effekt: Einige Inhaltsstoffe des Leinwurzelextraktes scheinen falsch positive Ergebnisse hervor zu rufen. Vor allem die Lignane könnten auf Grund ihrer Strukturähnlichkeit mit  $17\beta$ -Estradiol dafür verantwortlich sein. Die mangelnde Spezifität des Messverfahrens zeigte sich auch darin, dass  $17\beta$ -Estradiol in Höhe von circa 30  $\text{pg/ml}$  im Leerwert (Medium mit hormonfreiem FKS) nachgewiesen wurde. Auch der wässrige Leinwurzelextrakt ist nicht frei von  $17\beta$ -Estradiol, da das Dekokt mit Leitungswasser hergestellt wurde. Im Ablauf deutscher Kläranlagen wurden bis zu 21  $\text{pg/ml}$   $17\beta$ -Estradiol gemessen, davon gelangen bis zu 0,3  $\text{pg/ml}$  in das Trinkwasser und damit auch in den aktuellen Extrakt [125]. Anfänglich befanden sich im Dekokt mit 200 ml Leitungswasser 60  $\text{pg}$   $17\beta$ -Estradiol. Nach Herstellung der Stammlösung gelangten bei der höchsten Extraktkonzentration von 1000  $\mu\text{g/ml}$  die vernachlässigbar kleine Menge von 8,98  $\text{pg/ml}$   $17\beta$ -Estradiol in das Medium.

Die Messungen von  $17\beta$ -Estradiol im Überstand der MCF-7 Zellen zeigten vergleichbare Ergebnisse wie bei den BT-20 Zellen: Die Inkubation mit  $17\beta$ -Estradiol oder niedrigen

Konzentrationen des Leinwurzelextraktes führten nicht zur Freisetzung von 17 $\beta$ -Estradiol. Auch hier ergaben sich bei 500  $\mu\text{g/ml}$  und 1000  $\mu\text{g/ml}$  Leinwurzelextrakt erhöhte 17 $\beta$ -Estradiolkonzentrationen im Überstand, die Höhe war vergleichbar zum Experiment mit den BT-20 Zellen. Damit könnten auch vergleichbare Gründe vermutet werden. Die geringe Zytotoxizität bei hohen Leinwurzelextrakt-Konzentrationen dürfte, so weit dies aufgrund von Einzelbestimmungen überhaupt beurteilt werden kann, keinen wesentlichen Einfluss auf die Höhe der gemessenen 17 $\beta$ -Estradiolkonzentrationen haben. Die hohen Werte im Überstand der MCF-7 Zellkultur nach der Inkubation mit Tamoxifen lassen auf große Mengen an intrazellulärem 17 $\beta$ -Estradiol oder auch Moleküle mit Estrogen-ähnlicher Struktur schließen, die infolge der Zytotoxizität von Tamoxifen freigesetzt wurden und falsch positive Ergebnisse erzeugten. Dabei hat auch Tamoxifen selbst eine Estrogen-ähnliche Struktur.

Die Messwerte für Progesteron waren in allen Proben an der unteren Nachweisgrenze des Messverfahrens. Eine relevante 17 $\beta$ -Estradiol- oder Progesteronfreisetzung ist nach diesen Ergebnissen nicht anzunehmen.

### Humane Hepatozyten

Das patentierte HEPAC<sup>2</sup> Zellkultursystem, entwickelt von der Firma Primacyt, ermöglicht Untersuchungen zur Metabolisierung verschiedener Pharmaka oder Toxine in der Leber. Es ist ein Langzeitkultursystem aus primären humanen Hepatozyten. Die Produktion von Harnstoff und Albumin dienen dabei als Vitalparameter [126]. Die Überlegenheit dieses Verfahrens gegenüber der in-vivo Testung an Ratten in Bezug auf Toxizitätsuntersuchungen ist in der Literatur belegt. Der Leberstoffwechsel in Ratten unterscheidet sich von dem im Menschen: Beispielweise wirkte die Behandlung mit cis-4-Hydroxy-L-Prolin bei Ratten toxisch auf die Leberzellen, während im HEPAC<sup>2</sup> System und in klinischen Studien am Menschen keine Hepatotoxizität feststellbar ist [75]. Die in-vitro Untersuchung an primären humanen Hepatozyten ist somit hinsichtlich des Leberstoffwechsels eine geeignete Methode zur Simulation von pharmakologischen Effekten auf den Menschen. Die Messung von Harnstoff und Albumin im Zellkulturüberstand der Hepatozyten als Vitalparameter ist in der Literatur etabliert [127-129].

In dieser Arbeit wird erstmals der Einfluss eines wässrigen Leinwurzelextraktes auf die Synthese von Harnstoff und Albumin in primären humanen Hepatozyten untersucht. Da der Untersuchungszeitraum 72 h beträgt wurden frische humane Hepatozyten verwendet, nicht

das HEPAC<sup>2</sup> Zellkultursystem. Die Harnstoffsynthese wurde unter Inkubation mit hohen Konzentrationen des wässrigen Leinwurzelextraktes leicht gehemmt (10 - 20 %). Die Albuminsynthese wurde erst nach 48-stündiger Inkubation leicht gehemmt (20 %), anschließend stieg sie wieder auf mindestens das Ausgangsniveau an. Da die Albuminsynthese komplexere Schritte in verschiedenen Zellkompartimenten benötigt als die Harnstoffsynthese ist dies ein sensiblerer und langfristigerer Parameter der Hepatotoxizität. Es ist anzunehmen, dass dies auch der Grund für den leichten Abfall der Syntheseleistung erst nach 48 h Einwirkzeit ist, der sich bei allen Extraktkonzentrationen zeigte.

17 $\beta$ -Estradiol hat eine vergleichbare Wirkung auf die Albuminsynthese wie die verschiedenen Extraktkonzentrationen, aber keinen Einfluss auf die Harnstoffsynthese. Dies Ergebnis könnte dafür sprechen, dass neben einer estrogenartigen Aktivität auch noch andere Inhaltsstoffe des Leinwurzelextraktes die Albumin- und Harnstoffsynthese beeinflussen könnten. Die hepatotoxischen Stoffe Tamoxifen und Triton X-100 hemmten die Harnstoffsynthese erheblich und die Albuminsynthese vollständig, damit stimmen die experimentellen Ergebnisse mit den Beobachtungen am Menschen überein [130]. Der Messwert der Albuminkonzentration nach 24-stündiger Inkubation mit 500  $\mu$ g/ml Extrakt weichen von der oben beschriebenen Dynamik ab, möglicherweise handelt es sich um einen Messfehler. Diese Ergebnisse sind jedoch kritisch zu bewerten, da es sich nur um Einzelmessungen mit Vierfachbestimmungen handelte und keine Vergleiche mit der Literatur möglich sind. Sie lassen jedoch die Annahme zu, dass der wässrige Leinwurzelextrakt eine allenfalls geringe toxische Wirkung auf humane Leberzellen hat.

Zusammenfassend hat der wässrige Leinwurzelextrakt somit in höheren Konzentrationen möglicherweise eine geringe Zytotoxizität bei MCF-7 Zellen, aber nicht bei BT-20 Zellen. Bei humanen Hepatozyten ergaben sich keine Hinweise auf eine Hepatotoxizität. Der für die 17 $\beta$ -Estradiolbestimmung verwendete Radioimmunoassay ist für weitere Aussagen nicht ausreichend spezifisch, der Radioimmunoassay für Progesteron nicht ausreichend empfindlich.

#### 4.5 Verbesserungsmöglichkeiten, Limitationen und weitere Untersuchungsschritte

Folgende Untersuchungen können weitere Erkenntnisse über die Zusammensetzung und die Wirkung des wässrigen Leinwurzelextraktes geben:

Das antikanzerogene Wirkprofil der Leinwurzel lässt sich mit den durchgeführten Untersuchungen nicht vollständig klären. Eine Analyse der Lignanfraktion, aber auch aller anderen Fraktionen, z. B. mittels HPLC-Massenspektrometrie, kann Aufschluss über die einzelnen Inhaltsstoffe liefern. In weiteren Schritten ließe sich untersuchen, ob die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Wirkungen des Gesamtextraktes auch durch einzelne Fraktionen bzw. Inhaltsstoffe hervorgerufen werden können.

Wegen der großen witterungsbedingten Schwankungen der Pflanzeninhaltsstoffe sollte ein Vergleich der Leinwurzeln aus unterschiedlichen Jahrgängen bezüglich ihres Lignangehaltes und der Wirkung des aus ihr gewonnenen Extraktes durchgeführt werden.

Eine Hepatotoxizität des Leinwurzelextraktes kann abschließend weder bestätigt noch ausgeschlossen werden. Die Bestimmung der ALAT und  $\gamma$ GT kann in nachfolgenden Versuchen weiteren Aufschluss über eine mögliche Hepatotoxizität liefern. Eine Untersuchung mit geschlechtsspezifischen Hepatozyten könnte mögliche Geschlechtsunterschiede in der Wirkung auf die hepatischen Metabolisation herausstellen, wie sie im Tiermodell bereits beschrieben ist [108-110].

Um eine exakte Messung von  $17\beta$ -Estradiol und Progesteron im Zellkulturüberstand durchzuführen, ist es notwendig, eine Methode zu wählen, die nicht mit den Extraktinhaltsstoffen bzw. Zellbestandteilen interferiert.

Langzeituntersuchungen sind nötig, um den Mechanismus zwischen erhöhter  $17\beta$ -Estradiol Serumkonzentration und deren prokarzinogenem Effekt auf das Mammakarzinom bei Frauen zu klären.

## 5. Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung und die häufigste Todesursache der Frau zwischen dem 30. und 60. Lebensjahr. Trotz intensiver Forschung und Entwicklung neuer Therapieansätze steigt die Inzidenz in Deutschland jährlich weiter an. Phytoestrogene sind nach den bisherigen Untersuchungen vermutlich sowohl für die Prävention als auch für die Therapie geeignet.

Die Zielstellung dieser Arbeit war es darzustellen, ob ein wässriger Extrakt aus der phytoestrogenhaltigen Leinwurzel hemmend auf das Wachstum von Mammakarzinomzellen wirkt, dabei aber die Vitalfunktionen humaner Hepatozyten nicht beeinträchtigt.

Der Extrakt wurde als Dekokt hergestellt. Er wurde mittels Pyrolyse-Feldionisationsmassenspektrometrie auf seine Inhaltsstoffe untersucht und an den Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und BT-20 bzw. an primären humanen Hepatozyten getestet. MCF-7 Zellen exprimieren die Estrogenrezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$  und den Progesteronrezeptor, die BT-20 Zellen exprimieren keinen dieser Hormonrezeptoren. Die Untersuchungen zur Zytotoxizität erfolgten mit dem LDH-Test, die zur Proliferationshemmung mit dem BrdU-Test. Neben einer absteigenden Konzentrationsreihe des Leinwurzelextraktes wurden Tamoxifen und  $17\beta$ -Estradiol als Kontrollsubstanzen mitgeführt. Unter Einwirkung des Extraktes wurden im Zellkulturüberstand  $17\beta$ -Estradiol und Progesteron bei den Mammakarzinomzellen und die Vitalitätsparameter Harnstoff und Albumin bei den Hepatozyten analysiert.

Die PyFIMS zeigte, dass die wässrige Extraktion zur Anreicherung von Lignanen geeignet ist. Bei den MCF-7 Zellen wurde mit hohen Extraktkonzentrationen eine zytotoxische und antiproliferative Wirkung erzielt, aber nicht bei der BT-20 Zelllinie oder den Hepatozyten. Da ausschließlich bei den Estrogenrezeptor-positiven Zellen ein Effekt beobachtet wurde, legt dies einen Estrogenrezeptor-abhängigen Wirkmechanismus des Leinwurzelextraktes nahe.

Die exokrine Funktion der Mammakarzinomzelllinien hinsichtlich  $17\beta$ -Estradiol- und Progesteronsekretion blieben unter der Extrakteinwirkung unverändert. Die Syntheseleistung der humanen Hepatozyten für Harnstoff und Albumin wurde kurzzeitig und reversibel gehemmt.  $17\beta$ -Estradiol beeinflusste in keiner Versuchsanordnung die Eigenschaften der

verwendeten Zelllinien, wo hingegen Tamoxifen auf alle Zelllinien zytotoxisch wirkte und zusätzlich antiproliferativ auf die Mammakarzinomzelllinien.

Der wässrige Extrakt aus der Leinwurzel scheint damit ein Potenzial bei der Therapie Hormonrezeptor-positiver Mammakarzinome zu haben ohne hepatotoxisch zu sein. Weitere Untersuchungen sollten daher folgen.

Zusammenfassend ist das wasserbasierte Extraktionsverfahren zur Lignanreicherung aus der Leinwurzel geeignet. Ein so hergestellter Leinwurzelextrakt hat eine antiproliferative und zytotoxische Wirkung auf MCF-7 Mammakarzinomzellen, dabei aber keine zytotoxische Wirkung auf humane Hepatozyten und beeinflusst deren Syntheseleistung nicht dauerhaft.

## 6. Thesen

1. Vergleicht man die Inzidenz und die Ernährungsgewohnheiten weltweit, liegt die Inzidenz in asiatischen Ländern auf einem wesentlich niedrigeren Niveau als in Europa, gleichzeitig stellen Sojaprodukte einen zentralen Nahrungsbestandteil dar, während sie in Europa kaum verzehrt werden.
2. Die Phytoestrogene besitzen Strukturähnlichkeit zu den endogenen Estrogenen und rufen sowohl agonistische als auch antagonistische Effekte am Estrogenrezeptor hervor.
3. Die Leinpflanze ist in unserem Kulturkreis als Nahrungsmittel und Nutzpflanze bekannt und ist die reichhaltigste bekannte Quelle der Lignane, einer Hauptklasse der Phytoestrogene.
4. Eine mit geschrotetem Leinsamen angereicherte Nahrung reduziert das Brustkrebswachstum im Tierexperiment.
5. Das wasserbasierte Extraktionsverfahren der Leinwurzel ist zur Lignanreicherung geeignet und in Bezug darauf mit anderen Extraktionsverfahren, z. B. dem nach Luyengi et. al. (1996), vergleichbar.
6. Ein wasserbasierter Leinwurzelextrakt wirkt dosisabhängig antiproliferativ auf Estrogenrezeptor-positive MCF-7 Zellen, nicht aber auf Hormonrezeptor-negative BT-20 Zellen.
7. Eine Extraktexposition führt nicht zur Estrogen- oder Progesteronfreisetzung durch die Brustkrebszellen.

8. Der Extrakt wirkt in hohen Konzentrationen auf die Estrogenrezeptor-positiven MCF-7 Zellen zytotoxisch, auf die BT-20 Zellen jedoch nicht.
  
9. Der Leinwurzelextrakt hat weder eine zytotoxische Wirkung auf primäre humane Hepatozyten noch wird deren Harnstoff- und Albuminsynthese dauerhaft beeinträchtigt.
  
10. Wässriger Leinwurzelextrakt sollte aufgrund seiner bisher bekannten Eigenschaften weiter im Hinblick auf seine potenzielle Verwendbarkeit bei der Prävention oder Therapie des Mammakarzinoms untersucht werden.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J and others. 2009. Cancer Statistics 2009.225–49.
2. GLOBOCAN. 2008. database. <http://globocan.iarc.fr>.
3. Gomez-Raposo C, Zambrana Tevar F, Sereno Moyano M, Lopez Gomez M, Casado E. 2010. Male breast cancer. *Cancer Treat Rev*: Elsevier Ltd. p 451-7.
4. Gage M, Wattendorf D, Henry LR. 2012. Translational advances regarding hereditary breast cancer syndromes. *Journal of Surgical Oncology* 105:444-51.
5. Lodish H BA, Zipursky SL, et al. 2000. *Molecular Cell Biology*: New York: W. H. Freeman.
6. Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE and others. 2003. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet.* p 1117-30.
7. Chen S, Parmigiani G. 2007. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *J Clin Oncol.* p 1329-33.
8. Boghog2. 2009. Conversion of testosterone to estradiol by aromatase. Wikimedia Commons.
9. Yager JD, Davidson NE. 2006. Estrogen Carcinogenesis in Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* 354:270-82.
10. Society AC. 2012. *Cancer Facts and Figures 2012*. <http://www.cancer.org>: Atlanta, Ga: American Cancer Society.
11. McTiernan A, Thomas DB. 1986. Evidence for a protective effect of lactation on risk of breast cancer in young women. Results from a case-control study. *Am J Epidemiol* 124:353-8.
12. Mesko TW, Dunlap JN, Sutherland CM. 1990. Risk factors for breast cancer. *Compr Ther* 16:3-9.
13. Aguilar Cordero MJ, Neri Sanchez M, Padilla Lopez CA, Pimentel Ramirez ML, Garcia Rillo A and others. 2012. Risk factors in the development of breast cancer, state of Mexico. *Nutr Hosp* 27:1631-6.
14. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer ICEU, Radcliffe Infirmary, Oxford, UK. 1996. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *The Lancet* 347:1713-27.

15. Johnson KH, Millard PS. 1996. Oral contraceptives and breast cancer. *J Fam Pract* 43:340-1.
16. Heiss G WRAGL, et al. 2008. Health Risks and Benefits 3 Years After Stopping Randomized Treatment With Estrogen and Progestin. *JAMA* 299(9):1036-45.
17. Shah NR, Borenstein J, Dubois RW. 2005. Postmenopausal hormone therapy and breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Menopause*. p 668-78.
18. Guart A, Bono-Blay F, Borrell A, Lacorte S. 2011. Migration of plasticizers phthalates, bisphenol A and alkylphenols from plastic containers and evaluation of risk. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. p 676-85.
19. Jenkins S, Wang J, Eltoum I, Desmond R, Lamartiniere CA. 2011. Chronic oral exposure to bisphenol A results in a nonmonotonic dose response in mammary carcinogenesis and metastasis in MMTV-erbB2 mice. *Environ Health Perspect* 119:1604-9.
20. Vogel SA. 2009. The politics of plastics: the making and unmaking of bisphenol a "safety". *Am J Public Health* 99 Suppl 3:S559-66.
21. Beckman Sundh U, Binderup M-L, Bolognesi C, Brimer L, Castle L. 2014. Draft Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs. *EFSA Journal: European Food Safety Authority (EFSA)*.
22. Gray J, Evans N, Taylor B, Rizzo J, Walker M. 2009. State of the evidence: the connection between breast cancer and the environment. *Int J Occup Environ Health* 15:43-78.
23. Steenland K, Whelan E, Deddens J, Stayner L, Ward E. 2003. Ethylene oxide and breast cancer incidence in a cohort study of 7576 women (United States). *Cancer Causes & Control* 14:531-9.
24. Kuch HM, Ballschmiter K. 2001. Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range. *Environ Sci Technol* 35:3201-6.
25. Wise A, O'Brien K, Woodruff T. 2011. Are oral contraceptives a significant contributor to the estrogenicity of drinking water? *Environ Sci Technol* 45:51-60.
26. Kommission E. 2012. Vorschlag für eine Richtlinie des europäischen Parlaments und des Rates zur Änderung der Richtlinien 2000/60/EG und 2008/105/EG in Bezug auf prioritäre Stoffe im Bereich der Wasserpolitik. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2011:0876:FIN:DE:PDF>: EUR-Lex.europa.eu.
27. Kommission E. 2013. Vorschlag für eine Richtlinie des europäischen Parlaments und des Rates vom 12. August 2013 zur Änderung der Richtlinien 2000/60/EG und 2008/105/EG in Bezug auf prioritäre Stoffe im Bereich der Wasserpolitik. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:226:0001:0017:DE:PDF>: EUR-lex.europa.eu.

28. Johnson KC, Miller AB, Collishaw NE, Palmer JR, Hammond SK and others. 2011. Active smoking and secondhand smoke increase breast cancer risk: the report of the Canadian Expert Panel on Tobacco Smoke and Breast Cancer Risk (2009). *Tob Control*. p e2.
29. Barcellos-Hoff MH. 2013. New Biological Insights on the Link Between Radiation Exposure and Breast Cancer Risk. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*.
30. Humans IWGotEoCRt. 2012. Personal habits and indoor combustions: A review of human carcinogens. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 100:1-538.
31. Chen WY, Rosner B, Hankinson SE, Colditz GA, Willett WC. 2011. Moderate alcohol consumption during adult life, drinking patterns, and breast cancer risk. *JAMA*. p 1884-90.
32. Infobase WG. 2011. Data For Saving Lives. <https://apps.who.int/infobase/Indicators.aspx>.
33. Cheraghi Z, Poorolajal J, Hashem T, Esmailnasab N, Doosti Irani A. 2012. Effect of Body Mass Index on Breast Cancer during Premenopausal and Postmenopausal Periods: A Meta-Analysis. *PLoS One*. p e51446.
34. Uehiro N, Horii R, Iwase T, Tanabe M, Sakai T and others. 2013. Validation study of the UICC TNM classification of malignant tumors, seventh edition, in breast cancer. *Breast Cancer*.
35. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B and others. 2011. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol*. p 1736-47.
36. Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MC, Voduc D and others. 2010. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol* 28:3271-7.
37. Subik K, Lee JF, Baxter L, Strzepak T, Costello D and others. 2010. The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research* 4:35-41.
38. Garcia Fernandez A, Gimenez N, Fraile M, Gonzalez S, Chabrera C and others. 2012. Survival and clinicopathological characteristics of breast cancer patient according to different tumour subtypes as determined by hormone receptor and Her2 immunohistochemistry. a single institution survey spanning 1998 to 2010. *Breast* 21:366-73.
39. Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA, Jordan VC, Katzenellenbogen JA and others. 2006. International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacol Rev*. p 773-81.
40. Levin ER. 2005. Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol*. p 1951-9.

41. Li X, Huang J, Yi P, Bambara RA, Hilf R and others. 2004. Single-chain estrogen receptors (ERs) reveal that the ERalpha/beta heterodimer emulates functions of the ERalpha dimer in genomic estrogen signaling pathways. *Mol Cell Biol*: 2004 American Society for Microbiology. p 7681-94.
42. Delaunay F, Pettersson K, Tujague M, Gustafsson JA. 2000. Functional differences between the amino-terminal domains of estrogen receptors alpha and beta. *Mol Pharmacol* 58:584-90.
43. Xu L, Glass CK, Rosenfeld MG. 1999. Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr Opin Genet Dev*. p 140-7.
44. Williams CC, Basu A, El-Gharbawy A, Carrier LM, Smith CL and others. 2009. Identification of four novel phosphorylation sites in estrogen receptor alpha: impact on receptor-dependent gene expression and phosphorylation by protein kinase CK2. *BMC Biochem*. p 36.
45. Leung YK, Mak P, Hassan S, Ho SM. 2006. Estrogen receptor (ER)-beta isoforms: a key to understanding ER-beta signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. p 13162-7.
46. Steinsky. 2007. Estrogen receptor domains. Wikimedia Commons.
47. Jordan VC, Phelps E, Lindgren JU. 1987. Effects of anti-estrogens on bone in castrated and intact female rats. *Breast Cancer Res Treat* 10:31-5.
48. Zivadinovic D, Watson CS. 2005. Membrane estrogen receptor-alpha levels predict estrogen-induced ERK1/2 activation in MCF-7 cells. *Breast Cancer Res*. p R130-44.
49. Zivadinovic D, Gametchu B, Watson CS. 2005. Membrane estrogen receptor-alpha levels in MCF-7 breast cancer cells predict cAMP and proliferation responses. *Breast Cancer Res*. p R101-12.
50. Roman-Blas JA, Castaneda S, Largo R, Herrero-Beaumont G. 2009. Osteoarthritis associated with estrogen deficiency. *Arthritis Res Ther*. p 241.
51. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S and others. 2013. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. <http://globocan.iarc.fr>: International Agency for Research on Cancer.
52. Messina M, Nagata C, Wu AH. 2006. Estimated Asian adult soy protein and isoflavone intakes. *Nutr Cancer* 55:1-12.
53. Zaineddin AK, Buck K, Vrieling A, Heinz J, Flesch-Janys D and others. 2012. The association between dietary lignans, phytoestrogen-rich foods, and fiber intake and postmenopausal breast cancer risk: a German case-control study. *Nutr Cancer* 64:652-65.
54. Dunn JE, Jr. 1977. Breast cancer among American Japanese in the San Francisco Bay area. *Natl Cancer Inst Monogr* 47:157-60.

55. Takeuchi S, Takahashi T, Sawada Y, Iida M, Matsuda T and others. 2009. Comparative study on the nuclear hormone receptor activity of various phytochemicals and their metabolites by reporter gene assays using Chinese hamster ovary cells. *Biol Pharm Bull* 32:195-202.
56. Miksicek RJ. 1994. Interaction of naturally occurring nonsteroidal estrogens with expressed recombinant human estrogen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol*. p 153-60.
57. Adlercreutz H, Markkanen H, Watanabe S. 1993. Plasma concentrations of phytoestrogens in Japanese men. *The Lancet* 342:1209-10.
58. Freissmuth M, Böhm S, Offermanns S. 2012. *Pharmakologie und Toxikologie: Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie*: Springer. 557-61 p.
59. Oseni T, Patel R, Pyle J, Jordan VC. 2008. Selective Estrogen Receptor Modulators and Phytoestrogens. *Planta Med* 74:1656-65.
60. Setchell KD, Zimmer-Nechemias L, Cai J, Heubi JE. 1998. Isoflavone content of infant formulas and the metabolic fate of these phytoestrogens in early life. *Am J Clin Nutr* 68:1453S-61S.
61. Kanehisa M, Goto S. 2000. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 28:27-30.
62. Tham DM, Gardner CD, Haskell WL. 1998. Clinical review 97: Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence. *J Clin Endocrinol Metab* 83:2223-35.
63. Webb AL, McCullough ML. 2005. Dietary lignans: potential role in cancer prevention. *Nutr Cancer* 51:117-31.
64. Milder IE, Arts IC, van de Putte B, Venema DP, Hollman PC. 2005. Lignan contents of Dutch plant foods: a database including lariciresinol, pinoresinol, secoisolariciresinol and matairesinol. *Br J Nutr* 93:393-402.
65. Dixon RA. 2004. Phytoestrogens. *Annu Rev Plant Biol* 55:225-61.
66. Wang H, Murphy PA. 1994. Isoflavone Composition of American and Japanese Soybeans in Iowa: Effects of Variety, Crop Year, and Location. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42:1674-7.
67. Liggins J, Bluck LJ, Runswick S, Atkinson C, Coward WA and others. 2000. Daidzein and genistein contents of vegetables. *Br J Nutr*. p 717-25.
68. Kraft K, Stange R. 2010. *Lehrbuch Naturheilverfahren: 106 Tabellen*: Hippokrates-Verlag.

69. Hendrich S, Wang GJ, Xu X, Tew BY, Wang HJ and others. 1998. Human Bioavailability of Soy Bean Isoflavones: Influences of Diet, Dose, Time, and Gut Microflora. *Functional Foods for Disease Prevention I: American Chemical Society*. p 150-6.
70. Kilkkinen A, Pietinen P, Klaukka T, Virtamo J, Korhonen P and others. 2002. Use of oral antimicrobials decreases serum enterolactone concentration. *Am J Epidemiol* 155:472-7.
71. Meier PJ, Knoblauch M. 1989. *Leber und Galle. Pathophysiologie: Springer Berlin Heidelberg*. p 397-449.
72. Lüllmann-Rauch R, Paulsen F. 2012. *Taschenlehrbuch Histologie: Thieme*.
73. Georg L, Peter CH, Petro EP. 2007. *Biochemie und Pathobiochemie: Springer London, Limited*.
74. Osman KA, Osman MM, Ahmed MH. 2007. Tamoxifen-induced non-alcoholic steatohepatitis: where are we now and where are we going? *Expert Opin Drug Saf* 6:1-4.
75. Dickens H, Ullrich A, Runge D, Mueller B, Olszewski U and others. 2008. Anticancer drug cis-4-hydroxy-L-proline: Correlation of preclinical toxicology with clinical parameters of liver function. *Mol Med Report* 1:459-64.
76. Bessems M, t Hart NA, Tolba R, Doorschodt BM, Leuvenink HG and others. 2006. The isolated perfused rat liver: standardization of a time-honoured model. *Lab Anim* 40:236-46.
77. Vickers AE, Fisher RL. 2005. Precision-cut organ slices to investigate target organ injury. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 1:687-99.
78. Gomez-Lechon MJ, Donato MT, Castell JV, Jover R. 2003. Human hepatocytes as a tool for studying toxicity and drug metabolism. *Curr Drug Metab* 4:292-312.
79. Knobloch D, Ehnert S, Schyschka L, Buchler P, Schoenberg M and others. 2012. Human hepatocytes: isolation, culture, and quality procedures. *Methods Mol Biol* 806:99-120.
80. Donato MT, Lahoz A, Castell JV, Gomez-Lechon MJ. 2008. Cell lines: a tool for in vitro drug metabolism studies. *Curr Drug Metab* 9:1-11.
81. Godoy P, Hewitt NJ, Albrecht U, Andersen ME, Ansari N and others. 2013. Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch Toxicol* 87:1315-530.
82. DSMZ. 2014. Cell Culture Data: MCF-7. <http://www.dsmz.de>.
83. CLS. 2014. Cell Culture Data: BT-20. <http://www.cell-lines-service.de>.

84. Ltd L-L. 2013. Bürker-Zählkammer. [www.lo-laboroptik.de](http://www.lo-laboroptik.de).
85. Roche. 2012. Cytotoxicity Detection-Kit (LDH). Roche Applied Science. <https://cssportal.roche.com>: Roche Diagnostics GmbH.
86. Dancygier H. 2003. Klinische Hepatologie: Grundlagen, Diagnostik und Therapie hepatobiliärer Erkrankungen ; mit 257 Tabellen: Springer.
87. Yang WS, Va P, Wong MY, Zhang HL, Xiang YB. 2011. Soy intake is associated with lower lung cancer risk: results from a meta-analysis of epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr.* p 1575-83.
88. Yan L, Spitznagel EL. 2009. Soy consumption and prostate cancer risk in men: a revisit of a meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* p 1155-63.
89. Dong JY, Qin LQ. 2011. Soy isoflavones consumption and risk of breast cancer incidence or recurrence: a meta-analysis of prospective studies. *Breast Cancer Res Treat* 125:315-23.
90. Miao Q, Li JG, Miao S, Hu N, Zhang J and others. 2012. The Bone-Protective Effect of Genistein in the Animal Model of Bilateral Ovariectomy: Roles of Phytoestrogens and PTH/PTHr1 Against Post-Menopausal Osteoporosis. *Int J Mol Sci.* p 56-70.
91. Brant LH, Cardozo LF, Velarde LG, Boaventura GT. 2012. Impact of flaxseed intake upon metabolic syndrome indicators in female Wistar rats. *Acta Cir Bras* 27:537-43.
92. Bassett CM, Rodriguez-Leyva D, Pierce GN. 2009. Experimental and clinical research findings on the cardiovascular benefits of consuming flaxseed. *Appl Physiol Nutr Metab.* p 965-74.
93. Hosseinian FS, Beta T. 2009. Patented techniques for the extraction and isolation of secoisolaricresinol diglucoside from flaxseed. *Recent Pat Food Nutr Agric* 1:25-31.
94. Szewczyk M. 2007. Untersuchungen zum Einfluss von Pflanzenextrakten aus der Leinpflanze *Linum usitatissimum* auf die Zellproliferation und Cytotoxizität humaner Karzinomzellen sowie Trophoblasten und Fibroblasten. Diplomarbeit: Institut für Biowissenschaften, Abteilung Biochemie, Universität Rostock, Universitätsfrauenklinik Rostock. p 1-109.
95. Theil C, Briese V, Richter DU, Jeschke U, Friese K. 2013. An ethanolic extract of *Linum usitatissimum* caused cell lethality and inhibition of cell vitality/ - proliferation of MCF-7 and BT20 mamma carcinoma cells in vitro. *Arch Gynecol Obstet.*
96. Strater N. 2011. Der Einfluss von Leinwurzelextrakten der Pflanze *Linum usitatissimum* unterschiedlicher Alterstufen auf die Vitalität verschiedener Mammakarzinomzelllinien. Promotionsschrift.
97. Theil C. 2010. Untersuchungen zum Einfluss eines *Linum usitatissimum*-Wurzelextrakts auf zwei verschiedene Mammakarzinom-Zelllinien im Vergleich mit Genistein, Genistin, Daidzein, Daidzin, Secoisolaricresinol, Tamoxifen und 17 Beta-Estradiol. Promotionsschrift.

98. Luyengi L, Suh N, Fong HH, Pezzuto JM, Kinghorn AD. 1996. A lignan and four terpenoids from *Brucea javanica* that induce differentiation with cultured HL-60 promyelocytic leukemia cells. *Phytochemistry* 43:409-12.
99. Castaneda F, Kinne RK. 2000. Cytotoxicity of millimolar concentrations of ethanol on HepG2 human tumor cell line compared to normal rat hepatocytes in vitro. *J Cancer Res Clin Oncol* 126:503-10.
100. Castaneda F, Kinne RK. 2004. Ethanol treatment of hepatocellular carcinoma: high potentials of low concentrations. *Cancer Biol Ther.* p 430-3.
101. Booth NL, Overk CR, Yao P, Totura S, Deng Y and others. 2006. Seasonal variation of red clover (*Trifolium pratense* L., Fabaceae) isoflavones and estrogenic activity. *J Agric Food Chem* 54:1277-82.
102. Knüppel K. 2009. Funktionelle und zytotoxische Untersuchungen zur Wirkung eines phytoestrogenhaltigen Extraktes aus der Wurzel von *Linum usitatissimum* auf humane estrogenrezeptorpositive und -negative Mammakarzinomzellen (MCF7; BT20). Bachelorarbeit.
103. Theil C, Briese V, Gerber B, Richter DU. 2011. The effects of different lignans and isoflavones, tested as aglycones and glycosides, on hormone receptor-positive and -negative breast carcinoma cells in vitro. *Arch Gynecol Obstet* 284:459-65.
104. Petinari L, Kohn LK, de Carvalho JE, Genari SC. 2004. Cytotoxicity of tamoxifen in normal and tumoral cell lines and its ability to induce cellular transformation in vitro. *Cell Biol Int.* p 531-9.
105. Wang LJ, Han SX, Bai E, Zhou X, Li M and others. 2013. Dose-dependent effect of tamoxifen in tamoxifen-resistant breast cancer cells via stimulation by the ERK1/2 and AKT signaling pathways. *Oncol Rep.*
106. Mandlekar S, Kong AN. 2001. Mechanisms of tamoxifen-induced apoptosis. *Apoptosis* 6:469-77.
107. Endoh D, Okui T, Ozawa S, Yamato O, Kon Y and others. 2002. Protective effect of a lignan-containing flaxseed extract against CCl(4)-induced hepatic injury. *J Vet Med Sci* 64:761-5.
108. Hemmings SJ, Song X. 2005. The effects of dietary flaxseed on the Fischer 344 rat. III. Protection against CCl(4)-induced liver injury. *Cell Biochem Funct* 23:389-98.
109. Hemmings SJ, Barker L. 2004. The effects of dietary flaxseed on the Fischer 344 rat: I. Development, behaviour, toxicity and the activity of liver gamma-glutamyltranspeptidase. *Cell Biochem Funct* 22:113-21.
110. Hemmings SJ, Westcott N, Muir A, Czechowicz D. 2004. The effects of dietary flaxseed on the Fischer 344 rat: II. Liver gamma-glutamyltranspeptidase activity. *Cell Biochem Funct* 22:225-31.

111. Moeller TA, Shukla SJ, Xia M. 2012. Assessment of compound hepatotoxicity using human plateable cryopreserved hepatocytes in a 1536-well-plate format. *Assay Drug Dev Technol* 10:78-87.
112. Pogribny IP, Bagnyukova TV, Tryndyak VP, Muskhelishvili L, Rodriguez-Juarez R and others. 2007. Gene expression profiling reveals underlying molecular mechanisms of the early stages of tamoxifen-induced rat hepatocarcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 225:61-9.
113. Huang EJ, Wu CC, Huang HP, Liu JY, Lin CS and others. 2006. Apoptotic and anti-proliferative effects of 17beta-estradiol and 17beta-estradiol-like compounds in the Hep3B cell line. *Mol Cell Biochem* 290:1-7.
114. Ricchi M, Bertolotti M, Anzivino C, Carulli L, Canedi I and others. 2006. 17 Beta-estradiol prevents cytotoxicity from hydrophobic bile acids in HepG2 and WRL-68 cell cultures. *J Gastroenterol Hepatol* 21:894-901.
115. Chen J, Power KA, Mann J, Cheng A, Thompson LU. 2007. Flaxseed alone or in combination with tamoxifen inhibits MCF-7 breast tumor growth in ovariectomized athymic mice with high circulating levels of estrogen. *Exp Biol Med (Maywood)* 232:1071-80.
116. Chen J, Power KA, Mann J, Cheng A, Thompson LU. 2007. Dietary flaxseed interaction with tamoxifen induced tumor regression in athymic mice with MCF-7 xenografts by downregulating the expression of estrogen related gene products and signal transduction pathways. *Nutr Cancer* 58:162-70.
117. Power KA, Chen JM, Saarinen NM, Thompson LU. 2008. Changes in biomarkers of estrogen receptor and growth factor signaling pathways in MCF-7 tumors after short- and long-term treatment with soy and flaxseed. *J Steroid Biochem Mol Biol* 112:13-9.
118. Lee J, Cho K. 2012. Flaxseed sprouts induce apoptosis and inhibit growth in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 48:244-50.
119. Tamimi RM, Byrne C, Colditz GA, Hankinson SE. 2007. Endogenous hormone levels, mammographic density, and subsequent risk of breast cancer in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst.* p 1178-87.
120. Cauley JA, Lucas FL, Kuller LH, Stone K, Browner W and others. 1999. Elevated serum estradiol and testosterone concentrations are associated with a high risk for breast cancer. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Ann Intern Med.* p 270-7.
121. Martin LA, Pancholi S, Chan CM, Farmer I, Kimberley C and others. 2005. The anti-oestrogen ICI 182,780, but not tamoxifen, inhibits the growth of MCF-7 breast cancer cells refractory to long-term oestrogen deprivation through down-regulation of oestrogen receptor and IGF signalling. *Endocr Relat Cancer* 12:1017-36.

122. Abarzua S, Serikawa T, Szewczyk M, Richter DU, Piechulla B and others. 2012. Antiproliferative activity of lignans against the breast carcinoma cell lines MCF 7 and BT 20. *Arch Gynecol Obstet* 285:1145-51.
123. Stute P, Kiesel L. 2006. Molekulare Endokrinologie. *Gynäkologische Endokrinologie* 4:154-60.
124. Simpson ER, Davis SR. 2001. Minireview: Aromatase and the Regulation of Estrogen Biosynthesis—Some New Perspectives. *Endocrinology* 142:4589-94.
125. Kalbfus W. 1998. Hormonaktive Substanzen in (bayerischen) Gewässern – Herkunft und Gefährdungspotential. *GSF-Bericht* 16/98:25-30.
126. Ullrich A, Stolz DB, Ellis EC, Strom SC, Michalopoulos GK and others. 2009. Long term cultures of primary human hepatocytes as an alternative to drug testing in animals. *ALTEX* 26:295-302.
127. Khetani SR, Kanchagar C, Ukairo O, Krzyzewski S, Moore A and others. 2012. The Use of Micropatterned Co-cultures to Detect Compounds that Cause Drug induced Liver Injury in Humans. *Toxicol Sci*.
128. Lubberstedt M, Muller-Vieira U, Biemel KM, Darnell M, Hoffmann SA and others. 2012. Serum-free culture of primary human hepatocytes in a miniaturized hollow-fibre membrane bioreactor for pharmacological in vitro studies. *J Tissue Eng Regen Med*.
129. No da Y, Lee SA, Choi YY, Park D, Jang JY and others. 2012. Functional 3D human primary hepatocyte spheroids made by co-culturing hepatocytes from partial hepatectomy specimens and human adipose-derived stem cells. *PLoS One*. p e50723.
130. Grey AB, Evans MC, Kyle C, Reid IR. 1997. The anti-oestrogen tamoxifen produces haemodilution in normal postmenopausal women. *J Intern Med* 242:383-8.

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die Stellen meiner Arbeit, die dem Wortlaut oder dem Sinne nach anderen Werken und Quellen entnommen sind, habe ich in jedem Fall unter Angabe der Quelle deutlich als Zitat kenntlich gemacht.

Rostock, April 2015

*Marco Esdo*

## **Danksagung**

Folgenden Personen möchte ich meinen persönlichen Dank aussprechen:

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

Frau Dr. D.-U. Richter für die Betreuung, Anleitung und Unterstützung meiner Versuche und mit ihr natürlich auch dem gesamten Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik Rostock.

Frau C. Bauer vom Institut für Biowissenschaften der Universität Rostock für die Hilfe bei der Extraktherstellung.

Herrn Dr. A. Schlichting vom Institut für Bodenkunde der Universität Rostock für die massenspektrometrischen Analysen.

Besonders hervorheben möchte ich meine Partnerin Julia, die mir bei meiner Arbeit kreativ, aber auch kritisch zur Seite stand und mich zu jeder Zeit unterstützte.