

Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe der Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. B. Gerber

**Der inhibitorische Effekt dreier Leinwurzelreifegrade
aus der Klimakammer auf
estrogenrezeptorpositive (MCF7) und
estrogenrezeptornegative (BT20) Mammakarzinomzellen**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von

Daniela Dörbecker
geboren am 24.03.1984
in Düsseldorf
aus Bonn

Rostock 2014

meinem Vater & Ulla, sowie meiner Mutter

DEKAN: Prof. Dr. med. Emil C. Reisinger

BETREUER: Prof. Dr. med. Volker Briese, Universitätsfrauenklinik,
Klinikum Südstadt Rostock
Südring 81, 18059 Rostock

1. GUTACHTER: Prof. Dr. med. Volker Briese, Universitätsfrauenklinik,
Klinikum Südstadt Rostock
Südring 81, 18059 Rostock

2. GUTACHTER: Prof. Dr. J.G. Barbara Nebe, Universitätsmedizin Rostock
Zentrum für Medizinische Forschung
Arbeitsbereich Zellbiologie
Schillingallee 69, 18057 Rostock

3. GUTACHTER: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Ioannis Mylonas
Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München
Campus Innenstadt
Maistraße 11, 80337 München

DATUM DER EINREICHUNG: 17.09.2014

DATUM DER VERTEIDIGUNG: 21.04.2015

gefördert

durch die

DR.-MILDRED-SCHEEL-STIFTUNG

FÜR KREBSFORSCHUNG

NR. 107820

Inhaltsverzeichnis

<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	VI
<i>Abbildungsverzeichnis</i>	VIII
<i>Tabellenverzeichnis</i>	X
1 Einleitung	- 1 -
1.1 DAS MAMMAKARZINOM	- 1 -
1.1.1 <i>Geographische Abhängigkeit</i>	- 2 -
1.1.2 <i>Ätiologie, Pathogenese und molekulare Mechanismen</i>	- 3 -
1.1.3 <i>Klassifikation</i>	- 4 -
1.1.4 <i>Prognosefaktoren</i>	- 5 -
1.1.5 <i>Hormonrezeptor und Hormonwirkung</i>	- 6 -
1.1.6 <i>Therapie</i>	- 8 -
1.2 LEINWURZEL – LINUM USITATISSIMUM UND PHYTOESTROGENE.....	- 11 -
1.2.1 <i>Phytoestrogene und deren Vorkommen</i>	- 13 -
1.2.2 <i>Stoffwechsel</i>	- 15 -
1.2.3 <i>Effekte und Bedeutung</i>	- 17 -
1.2.4 <i>Phytoestrogene und Brustkrebs</i>	- 18 -
2 Zielstellung	- 21 -
3 Material und Methoden	- 22 -
3.1 MATERIAL.....	- 22 -
3.1.1 <i>Materialien für die Leinwurzelextraktherstellung</i>	- 22 -
3.1.2 <i>Materialien für die Zellkultivierung-Laboraüstung</i>	- 23 -
3.1.3 <i>Materialien für die Zelllinien und Zellkulturen-Chemikalien/Zellkulturmedien</i> .	- 24 -
3.1.4 <i>Materialien für die Immunhistochemie</i>	- 24 -
3.1.5 <i>Materialien für die Testverfahren</i>	- 25 -
3.1.6 <i>Verwendete Zelllinien</i>	- 27 -
3.2 METHODEN	- 27 -
3.2.1 <i>Pflanzenextraktherstellung</i>	- 27 -
3.2.2 <i>Extraktion nach Luyengi</i>	- 27 -
3.2.3 <i>Zelllinien</i>	- 29 -
3.2.3.1 <i>Medium der Zellkulturen</i>	- 29 -
3.2.3.2 <i>Kultivierung der Zellen</i>	- 29 -
3.2.3.3 <i>Zellzählung - Bestimmung der Lebendzellzahl</i>	- 30 -
3.2.4 <i>Charakterisierung der Zellen – die Immunhistochemie</i>	- 32 -

3.2.5 Testverfahren	- 33 -
3.2.5.1 LDH - Test (Zytotoxizitätstest).....	- 34 -
3.2.5.2 MTT - Test (Viabilitätstest).....	- 36 -
3.2.5.3 BrdU - Test (Proliferationstest).....	- 38 -
3.2.5.4 CellTiter-Blue (Viabilitätstest)	- 40 -
3.2.5.5 Pyrolyse-Feldionisation-Massenspektrometrie.....	- 41 -
3.3 STATISTIK.....	- 42 -
4 Ergebnisse	- 43 -
4.1 IMMUNHISTOCHEMIE.....	- 43 -
4.2 TESTVERFAHREN	- 46 -
4.2.1 LDH - Test (Zytotoxizitätstest)	- 46 -
4.2.2 MTT - Test (Viabilitätstest).....	- 54 -
4.2.3 BrdU - Test (Proliferationstest).....	- 60 -
4.2.4 CellTiter-Blue (Viabilitätstest).....	- 66 -
4.2.5 Pyrolyse-Feldionisation-Massenspektrometrie	- 71 -
5 Diskussion.....	- 73 -
5.1 IMMUNHISTOCHEMIE.....	- 73 -
5.2 KONTROLLSUBSTANZEN – TAMOXIFEN UND ESTRADIOL	- 74 -
5.3 EXTRAKTWIRKUNGEN.....	- 77 -
5.3.1 Extraktwirkung: LDH – Test.....	- 77 -
5.3.2 Extraktwirkung: MTT – Test.....	- 80 -
5.3.3 Extraktwirkung: BrdU – Test.....	- 82 -
5.3.4 Extraktwirkung: CellTiter-Blue	- 85 -
5.4 STOFFKLASSIFIZIERUNG IN DER PYROLYSE-FELDIONISATION- MASSENSPEKTROMETRIE.....	- 86 -
6 Zusammenfassung	- 91 -
7 Ausblick	- 93 -
8 Literaturverzeichnis.....	- 95 -
9 Thesen.....	-107-
10 Anhang.....	-109-

Abkürzungsverzeichnis

AF1/2	Aktivierungsfunktion1/2
ATCC	American Type Culture Collection
ATM	menschliches Gen
BET	Brusterhaltende Therapie
BRCA1/2	menschliches Gen
BrdU	Bromdesoxyuridin
BT20	rezeptornegative Mammakarzinomzelllinie
bzw.	beziehungsweise
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid, chemische Formel
CYCD1	menschliches Gen
d	Tag
DMEM	Dulbecco´s modified eagle medium Zellmedium der MCF7-Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
d.h.	das heißt
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ELISA	Enzyme-linked-immunosorbend-assay
EREs	Estrogen-Response-Elements
ER	Estrogenrezeptor
EtOH	Ethanol (hier 96% unvergällt)
FasL	Fas Ligand, Transmembranprotein
FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm
HCl	Salzsäure, chemische Formel
HDL	high density lipoprotein
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure, chemische Formel
kg	Kilogramm
LDH	Laktatdehydrogenase
LDL	low density lipoprotein
mbar	Millibar

MCF7	rezeptorpositive Mammakarzinomzelllinie
MeOH	Methanol
min	Minuten
ml	Milliliter
MTT	3-(4,5 Dimethylthiazol-2-yl)-2,5 Diphenyltetrazoliumbromid
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
nm	Nanometer
o.g.	oben genannt
PBS	Phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PR	Progesteronrezeptor
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
P53	Tumorsuppressorgen
RPMI	nach „Roswell Park Memorial Institute“ Zellmedium der BT20-Zellen
SERM	Selektiver-Estrogen-Rezeptor-Modulator
SHBG	Sexualhormon-bindendes-Globulin
SLN	Sentinelnode/Sentinellymphknoten
s.o.	siehe oben
Std	Stunden
TII	Totalionenintensität
TNF	Tumornekrosefaktor
u.a.	unter anderem
vs.	versus
WHO	World Health Organisation Welt-Gesundheits-Organisation
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µM	Mikromol

Abbildungsverzeichnis

- Abb.1:** Anzahl verstorbener Patienten an den vier häufigsten Karzinomarten in Deutschland – Stand 2010 (Zahlen des Statistischen Bundesamtes)
- Abb.2:** Häufigkeitsverteilung des Mammakarzinoms in den Quadranten der Brust (*Petru et al. 2009*)
- Abb.3:** Wirkungsmechanismus von Estradiol, SERM und Antagonisten im Vergleich (*Aktories et al. 2009*)
- Abb.4:** Domänenstruktur der Estrogenrezeptoren ER α und ER β (*Aktories et al. 2009*)
- Abb.5:** Strukturformel von Tamoxifen (*Helferich et al. 2008*)
- Abb.6:** Leinpflanze schematisch (*Hiller und Melzig 2010*)
- Abb.7:** Leinpflanze in Blütezeit (*Dambroth und Seehuber 1988*)
- Abb.8:** Nutzungsbereiche des Leins (*Diepenbrock et al. 1999*)
- Abb.9:** Schnitt durch den Stängel der Leinpflanze – mikroskopische Aufnahme (*Dambroth und Seehuber 1988*)
- Abb.10:** Strukturelle Ähnlichkeit zwischen Estradiol und Equol (*Setchell and Cassidy 1999*)
- Abb.11:** Einteilung der Phytoestrogene (*Stürtz 2008*)
- Abb.12:** Metabolismus der Lignane im menschlichen Organismus (*Stürtz 2008*)
- Abb.13:** Bürker-Zählkammer (*Szewczyk 2007*)
- Abb.14:** Prinzip der immunhistochemischen Methode (*Mulisch 2014*)
- Abb.15:** Reaktionsschema des LDH-Tests (*Roche Applied Science, Testkitanleitung LDH, Version Juli 2005*)
- Abb.16:** Reaktionsschema des MTT-Tests (*Roche Applied Science Testkitanleitung MTT, Version September 2005*)
- Abb.17:** Reaktionsschema des CellTiter-Blue[®] Viabilityassays (*Promega Assaybeschreibung 2003*)
- Abb.18:** Nativaufnahme MCF7-Zellen
- Abb.19:** MCF7-Zellen, α -Estrogenrezeptor, LinRed positiv
- Abb.20:** MCF7-Zellen, β -Estrogenrezeptor; LinRed positiv
- Abb.21:** MCF7-Zellen, Progesteronrezeptor; LinRed positiv
- Abb.22:** Nativaufnahme der BT20-Zellen
- Abb.23:** BT20-Zellen, α -Estrogenrezeptor, LinRed negativ
- Abb.24:** BT20-Zellen, β -Estrogenrezeptor, LinRed negativ

- Abb.25:** BT20-Zellen, Progesteronrezeptor, Lin Red negativ
- Abb.26:** LDH - Test: MCF7-Zelllinie - Vergleich zwischen den drei Wurzelaltersstufen
- Abb.27:** LDH - Test: BT20-Zelllinie - Vergleich zwischen den drei Wurzelaltersstufen
- Abb.28:** LDH - Test: Junge Wurzel - Vergleich zwischen beiden Karzinomzelllinien
- Abb.29:** LDH - Test: Mittlere Wurzel - Vergleich zwischen beiden Karzinomzelllinien
- Abb.30:** LDH - Test: Alte Wurzel - Vergleich zwischen beiden Karzinomzelllinien
- Abb.31:** LDH - Test: MCF7-Zellen - Vergleich zwischen Tamoxifen und Estradiol
- Abb.32:** LDH - Test: BT20-Zellen - Vergleich zwischen Tamoxifen und Estradiol
- Abb.33:** MTT - Test: MCF7-Zelllinie - Vergleich zwischen den drei Wurzelaltersstufen
- Abb.34:** MTT - Test: BT20-Zelllinie - Vergleich zwischen den drei Wurzelaltersstufen
- Abb.35:** MTT - Test: Junge Wurzel - Vergleich zwischen beiden Karzinomzelllinien
- Abb.36:** MTT - Test: Mittlere Wurzel - Vergleich zwischen beiden Karzinomzelllinien
- Abb.37:** MTT - Test: Alte Wurzel - Vergleich zwischen beiden Karzinomzelllinien
- Abb.38:** MTT - Test: MCF7-Zellen - Vergleich zwischen Tamoxifen und Estradiol
- Abb.39:** MTT - Test: BT20-Zellen - Vergleich zwischen Tamoxifen und Estradiol
- Abb.40:** BrdU - Test: MCF7-Zelllinie - Vergleich zwischen den drei Wurzelaltersstufen
- Abb.41:** BrdU - Test: BT20-Zelllinie - Vergleich zwischen den drei Wurzelaltersstufen
- Abb.42:** BrdU - Test: Junge Wurzel - Vergleich zwischen beiden Karzinomzelllinien
- Abb.43:** BrdU - Test: Mittlere Wurzel - Vergleich zwischen beiden Karzinomzelllinien
- Abb.44:** BrdU - Test: Alte Wurzel - Vergleich zwischen beiden Karzinomzelllinien
- Abb.45:** BrdU - Test: MCF7-Zellen - Vergleich zwischen Tamoxifen und Estradiol
- Abb.46:** BrdU - Test: BT20-Zellen - Vergleich zwischen Tamoxifen und Estradiol
- Abb.47:** Viabilitätstest: MCF7-Zelllinie - Vergleich zwischen den drei Wurzelaltersstufen
- Abb.48:** Viabilitätstest: BT20-Zelllinie - Vergleich zwischen den drei Wurzelaltersstufen
- Abb.49:** Viabilitätstest: Junge Wurzel - Vergleich zwischen beiden Karzinomzelllinien
- Abb.50:** Viabilitätstest: Mittlere Wurzel - Vergleich zwischen beiden Karzinomzelllinien
- Abb.51:** Viabilitätstest: Alte Wurzel - Vergleich zwischen beiden Karzinomzelllinien
- Abb.52:** Wirkung der Liganden über die PPAR γ -Rezeptoren und über PPAR γ -unabhängige Mechanismen (nach *Mansure, Nassim et al. 2009*)

Tabellenverzeichnis

- Tab.1:** Risikofaktoren für das Auftreten eines Mammakarzinoms
(nach *Stauber und Weyerstahl 2007*)
- Tab.2:** TNM- Klassifikation des Mammakarzinoms
(nach *Bühling et al. 2004*)
- Tab.3:** Erwünschte und unerwünschte Wirkung von Tamoxifen und Estradiol im Vergleich (nach *Aktories et al. 2009*)
- Tab.4:** Hormonelle und nicht-hormonelle Mechanismen der Lignane und Isoflavone
(nach *Valentzis et al. 2008*)
- Tab.5:** Wurzelaltersstufen – Ausbeute im Vergleich
- Tab.6:** Bestückungsschema der 96er-Wellplatten
- Tab.7:** Inhalte einzelner Stoffklassen der verschiedenen Wurzelaltersstufen (in Prozent)

1 Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

Eine Pressemitteilung aus dem Jahr 2012 - Februar verkündete: Laut Statistischem Bundesamt verstarben im Jahr 2010 in der Bundesrepublik Deutschland 218889 Menschen an den Folgen einer bösartigen Neubildung unterschiedlichster Genese. 17573 Personen (Vergleich 2011: 17974, 2012: 17898) davon erlagen hierbei den Folgen des Mammakarzinoms. Es stellte 2010 in Deutschland somit insgesamt die zweithäufigste Todesursache (bezogen auf maligne Erkrankungen) nach dem Lungen- und Bronchialkarzinom dar; gefolgt von dem Colonkarzinom sowie dem Pankreaskarzinom an vierter Stelle (*Abb. 1*), (Statistisches Bundesamt, Gesundheitsberichterstattung des Bundes).

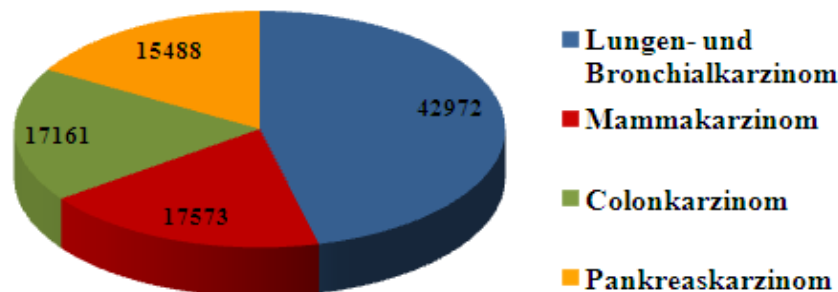


Abb.1: Anzahl verstorbenen Patienten an den vier häufigsten Karzinomarten in Deutschland – Stand 2010 (Zahlen des Statistischen Bundesamtes)

Statistisch wird jeder 8. Frau in Deutschland in ihrem Leben die Diagnose „Mammakarzinom“ gestellt (*Bühling et al. 2004*), wobei das Risiko der Erkrankung im mittleren Lebensalter ab dem 45. Lebensjahr stetig ansteigt (*Petru et al. 2009*).

Mehrere Autoren wie Schmidt-Matthiesen und Bastert 1995, Bühling et al. 2004 bzw. Petru et al. 2009 berichten, dass verschiedenste Ursachen für die Brustkrebsentstehung verantwortlich sind. Zum einen spielen zivilisatorische Einflüsse wie Diabetes, Adipositas oder Mangel an Selen oder Vitamin A eine maßgebliche Rolle, zum anderen stellen höheres Lebensalter, familiäre Karzinombelastung (Mamma- oder Ovarialkarzinom), ein kontralaterales Mammakarzinom oder eine frühe Menarche und/oder eine späte Menopause einen Risikofaktor dar. Auch Frauen, die in ihrem Leben keine Kinder geboren haben, diese erst nach dem 30. Lebensjahr zur Welt gebracht haben oder eine kurze Stillperiode zu verzeichnen haben, haben ein gesteigertes Risiko an einer bösartigen Neubildung der Brust zu erkranken (*Bühling et al. 2004; Petru et al. 2009; Schmidt-Matthiesen und Bastert 1995*). Eine

Zusammenfassung über die Risikofaktoren der Entstehung eines Mammakarzinoms zeigt hier **Tab.1.**

Tab. 1.: Risikofaktoren für das Auftreten eines Mammakarzinoms
(Quelle: nach Stauber und Weyerstahl 2007)

<u>Risikofaktor</u>	<u>Risikoerhöhung</u>
• Fleisch- und fettreiche Ernährung	
• Fettsucht, besonders in der Postmenopause	2 - 3
• Alkohol (>20g Ethanol/Tag)	1,5 - 2
• Rauchen (prämenopausal)	
• Genetische Disposition (BRCA1/BRCA2-Gen)	2 - 9
• Familiäre Belastung	
• Mammakarzinom der anderen Seite	>10
• Frühe Menarche, späte Menopause (langer Östrogeneinfluss)	1 - 2
• Gestörtes Östrogen-Gestagen-Verhältnis (Gestagenmangelhypothese)	
• Supraphysiologische Östrogenbehandlung in der Postmenopause	1 - 3
• höheres Alter bei ausgetragener Erstschwangerschaft (>30 Jahre)	ca. 3
• Nulliparität	1,5 – 2,3
• Mastopathie ohne Atypien	1 - 1,5
• Mastopathie mit Atypien	2 – 10
• höheres Alter	
• ionisierende Strahlen	
• Hyperprolaktinämie	
• ethnische Faktoren	
• Virusgenese (?)	
• Orale Kontrazeptiva (?)	

1.1.1 Geographische Abhängigkeit

Nicht nur unterschiedliche Gewohnheiten der Menschen, wie z.B. Rauchen als Risikofaktor, können die Entstehung von Mammakarzinomen beeinflussen, sondern auch die Besiedlung von verschiedenen Regionen bzw. Kontinenten scheint für die Auftretenshäufigkeit verantwortlich zu sein. In der Literatur ist schon in früheren Jahren beschrieben, dass Differenzen in der globalen Inzidenz des Karzinoms vorhanden sind (*Kelsey and Berkowitz 1988*). Dies ist unter anderem auf die unterschiedlichen Lebensräume zurückzuführen. Im internationalen Vergleich weisen Einwohner des asiatischen Kontinents (wie z.B. Japanerinnen) im Vergleich zu Frauen der westlichen Welt (wie Deutschland) ein deutlich niedrigeres Risiko auf, an Brustkrebs zu erkranken. Das Verhältnis liegt hier bei 1:6 (*Stauber und Weyerstahl 2007*).

Inwieweit die Migration auf einen anderen Kontinent Einfluss auf die Krankheitsentstehung hat, zeigt eine Studie, die im Jahre 2004 durchgeführt wurde. Ein Vergleich zwischen Japanerinnen in Japan und Japanerinnen lebend auf Hawaii zeigte eine erhöhte Inzidenz für Japanerinnen in den USA an einem hormonabhängigen Brustkrebs zu erkranken. Diese Tatsache lässt sich nicht nur am Beispiel des Brustkrebses verdeutlichen, sondern steht in dieser Arbeit nur als repräsentatives Beispiel dafür, dass eine regionale Abhängigkeit, die u.a. durch Lebensgewohnheiten beeinflusst wird, besteht. Auch Prostatakarzinome repräsentieren

zwar nicht in gleichem, aber tendenziell ähnlichem Umfang diese bedeutende Tatsache (*Maskarinec and Noh 2004*). Nicht nur Malignome, sondern auch andere Erkrankungen, die beispielsweise auf kardiovaskulärer Ebene generieren, können als Erkrankungen der „westlichen“ Welt bezeichnet werden (*Adlercreutz 1990; Adlercreutz and Mazur 1997*). Doch was sind die Hintergründe für diese Unterschiede zwischen der „westlichen“ Welt und der asiatischen Bevölkerung?

Seit einigen Jahren ist Gegenstand vieler Forschungsarbeiten, inwieweit Inhaltsstoffe von Früchten oder Gemüse oder auch andere Nahrungsbestandteile eine antikanzerogene Wirkung aufweisen. Forschungsarbeiten belegen, dass der asiatische Raum im Gegensatz zur westlichen Bevölkerung mehr sojahlaltige Produkte verzehrt und darin enthaltene Inhaltsstoffe eine prophylaktische Wirkung in Bezug auf die Krebsneubildung aufweisen können (*Adlercreutz et al. 1995; Briese et al. 2009*). Diese antikanzerogenen Inhaltsstoffe werden u.a. auch als Phytoestrogene bezeichnet, zu denen beispielsweise die Isoflavone und Lignane zu zählen sind, welche antiproliferativ wirken können (*Potter and Steinmetz 1996*), (*Steinmetz and Potter 1991*).

Auf diese Inhaltsstoffe wird im Kapitel 1.2 spezifischer eingegangen.

1.1.2 Ätiologie, Pathogenese und molekulare Mechanismen

Die Ursachen für die Entstehung eines Mammakarzinoms sind im Wesentlichen unbekannt (*Stauber und Weyerstahl 2007*). Wie bereits im Abschnitt 1.1 erwähnt, spielen genetische Belastung bzw. vorhandene Risikofaktoren eine bedeutende Rolle. Diese Risikofaktoren können hierbei in „beeinflussbar“ und in „unbeeinflussbar“ unterteilt werden (*Gerber et al. 2006*). Pathogenetisch lässt sich das Mammakarzinom in Subtypen einteilen. Eine Neoplasie, die histologisch die Milchgangsgrenzen nicht überschritten hat, wird als Carcinoma in situ bezeichnet. Ist diese Barriere bereits überschritten, so ist die Bezeichnung eines invasiven Karzinoms zutreffend. Dehnt sich das Karzinom auf die Milchgänge oder Drüsenläppchen aus, so wird es daraufhin als duktales bzw. lobuläres Karzinom bezeichnet. Pathogenetisch kommt es zu einer proliferativen Deregulierung mit Hyperplasie und in weiteren kaskadenartigen Schritten zu genetischer Instabilität bei Aktivierung von Onkogenen oder im Gegensatz dazu, zu einer Inhibierung von Suppressorgenen. Ein invasives Mammakarzinom ist die Folge von synthetisierten Angiogenesefaktoren und matrixauflösenden Proteasen (*Riede et al. 2009*). Auf genetischer Ebene spielen besonders zwei Gene eine Rolle. Zum einen das BRCA1-Gen (Lokus 17q21) und andererseits das BRCA2-Gen (Lokus 13q12). Bei beiden Genen handelt es sich um mutierte Mammakarzinomgene (Keimbahnmutationen, Tumorsuppressorgene), die das Erkrankungsrisiko auf 50-60% ansteigen lassen. Das BRCA1-

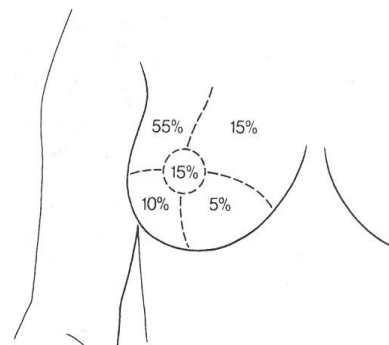
Gen dient vermutlich der DNA-Reparatur und ist bei Frauen mutiert, bei denen dieser Defekt durch einen autosomal-dominanten Erbgang weitergegeben wurde (zusätzliches Ovarialkarzinomrisiko 40%). Frauen mit einem BRCA2-Gendefekt weisen ebenfalls eine Störung in der DNA-Reparatur auf; zudem existiert bei dieser Störung ein gesteigertes Risiko von 70% ein Ovarialkarzinom zu bekommen. Im Zusammenhang mit diesem Gendefekt steht auch die erhöhte Auftretenswahrscheinlichkeit für Prostatakarziome bei Männern. Andere nachgewiesene Gendefekte betreffen beispielsweise das p53-Tumorsuppressorgen (Lokus 17p13.1, verhindert bei normaler Funktion die Entstehung unkontrolliert wachsender Tumorzellen, sorgt für Hemmung des Zellzyklus) oder können ein ATM-Gendefekt (Lokus 11q23.3, Defekt von Reparatursystemen der DNA mit Prädisposition zu bösartigen Neubildungen) sein (Riede 2004; Pschyrembel 2007). Als Beispiel eines Protoonkogens soll hier als Stellvertreter das CYCD1-Gen genannt werden. Diese Protoonkogene sind für den Verlust der Wachstumskontrolle verantwortlich und können so positiv auf die Karzinomentstehung wirken (Karp 2005).

Man geht davon aus, dass bei ca. 25% der familiären und ca. 5% aller Mammakarzinome eine BRCA1/2-Mutation vorliegt (Meindl et al. 2011). Hier hilft die Betrachtung der familiären Konstellationen weiter, um Träger(innen) erkennen, Mutationen erfassen und ggf. prophylaktische Maßnahmen (wie z.B. die prophylaktische Mastektomie) in Erwägung ziehen zu können (Rhiem und Schmutzler 2013).

1.1.3 Klassifikation

Wie oben bereits erläutert, werden Mammakarzinome histologisch in lobuläre und duktale Karzinome eingeteilt (das Carcinoma in situ wird hier nicht weiter erwähnt). Darüber hinaus gibt es Sonderformen, die die WHO u.a. als muzinöse, papilläre, tubuläre, medulläre oder metaplastische Karzinome klassifiziert (Pscyrembel 2011). Teilt man die Brust in Quadranten ein, so ist der äußere obere Quadrant mit 55% der statistisch häufigste Manifestationsort; gefolgt von der Mamille und dem inneren oberen Quadranten mit 15% (siehe auch **Abb.2**).

Abb.2: Häufigkeitsverteilung des Mammakarzinoms in den Quadranten der Brust
(Quelle: Petru et al. 2009)



Karzinome werden standardgemäß nach der TNM-Klassifikation eingeteilt, die in der aufgeführten **Tab. 2** in Auszügen aufgezeigt ist.

Tab. 2: TNM-Klassifikation des Mammakarzinoms, vereinfacht dargestellt
(Quelle: nach Bühling et al. 2004)

Stadium	Tumorgröße und Ausbreitung
Tis	Duktales oder lobuläres Carcinoma in situ
T1	< 2 cm
T1a	bis 0,5 cm (minimal breast cancer)
T1b	0,5 – 1 cm
T1c	1 – 2 cm
T2	2 – 5 cm
T3	> 5 cm
T4	jeder Tumor mit Ausdehnung auf Brustwand oder Haut, außer M. pectoralis
T4a	Brustwand
T4b	Ödem, Ulzerationen, Satellitenmetastasen der Haut der gleichen Brust
T4c	T4a und T4b
T4d	Inflammatorisches Karzinom
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Ipsilateral befallene, bewegliche Lymphknoten
N2	Ipsilateral befallene, verbackene Lymphknoten
N3	Ipsilaterale Metastasen entlang der Milchleiste
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

1.1.4 Prognosefaktoren

Viele Parameter werden herangezogen, um die Prognose des Mammakarzinoms einschätzen und weitere Therapieschritte planen zu können. Dabei gilt u.a. der Lymphknotenstatus als wichtiger prognostischer Marker. Die Detektierung des Sentinellymphknotens (SLN, auch Wächterlymphknoten) ist hierbei von besonderer Bedeutung, da dieser, falls eine lymphogene Metastasierung stattgefunden hat, der erste den Tumor drainierende axilläre Lymphknoten ist. Die SLN-Biopsie ist u.a. nur bei klinisch unauffälliger Axilla durchzuführen (Gerber et al. 2006). Darüber hinaus gehören zu den prognostischen Faktoren:

- Alter der Frauen < 35 Jahre ungünstig
- Malignitätsgrad
- Tumortyp
- Her-2-neu-/Rezeptorstatus
- Tumorausdehnung (auch Gefäß- u. Lymphbahninvasion)
- Grading
- Proliferationsrate

(nach Riede et al. 2009; Gerber et al. 2006)

Darüber hinaus gibt es eine Vielzahl weiterer neuerer Faktoren, die in ihrer Bedeutung und Wirksamkeit noch unzureichend untersucht sind. Zu diesen Prognosefaktoren zählen u.a. der Mitoseindex oder das Ki67, das die Proliferationsfähigkeit der Zelle ausdrückt oder auch die Bestimmung von Apoptosemarkern wie TNF und FasL. Auch nachgewiesene Onkogene bzw. Tumorsuppressorgene, wie BRCA1 oder P53 zählen zu diesen neueren Prognosefaktoren (*Gerber et al. 2006*).

1.1.5 Hormonrezeptor und Hormonwirkung

Hormonen und deren Rezeptoren soll in dieser Arbeit ein eigener Abschnitt gewidmet werden, da ihnen eine entscheidende Rolle in der Charakterisierung der Karzinome und somit auch in der Gestaltung der verschiedenen Therapiekonzepte zugesprochen wird. Es soll besonders auf drei Hormonrezeptoren und deren molekularen Wirkmechanismus eingegangen werden.

Weibliche Sexualsteroiden wie das Estrogen sind entscheidend an der Entstehung von Mammakarzinomen beteiligt. Estrogene werden nicht nur in den Ovarien und in der Nebennierenrinde, sondern auch im Leber-, Muskel- und Fettgewebe produziert, um die Steroidsynthese aufrecht erhalten zu können. Auch einige Mammakarzinome besitzen die Fähigkeit, aus androgenen Vorstufen diese Hormone herzustellen (*Kubista et al. 2008*). Die Biosynthese der Steroidhormone beginnt mit dem Cholesterin, läuft über verschiedene Zwischenstufen und endet mit dem Produkt Testosteron, das letztendlich durch die Aromatase, ein Enzym, in Estradiol umgewandelt wird. Zusätzlich zum Estradiol differenziert man das Estron, das nur ein Drittel der Aktivität des Estradiols aufweist (*Rassow et al. 2008*). Estrogene sind im Allgemeinen an unterschiedlichen Stoffwechselfvorgängen beteiligt. Sie beeinflussen die Ausprägung und Aufrechterhaltung der weiblichen Geschlechtsmerkmale (wie den Mammæ) und wirken in der Brust wachstumsstimulierend auf das Gangepithel oder das Bindegewebe. Im Knochenstoffwechsel hemmen Estrogene den Knochenabbau bzw. erhöhen die Knochendichte durch Produktion weiterer Hormone (z.B. IGF-1) - ein Grund dafür, dass postmenopausale Frauen (bei abnehmendem Estrogenspiegel) ein erhöhtes Risiko haben, an einer Osteoporose zu erkranken (*Löffler und Petrides 2002*). Auch andere Gewebe, wie das Fettgewebe, werden durch Hormone beeinflusst bzw. sind selbst befähigt Estrogen zu synthetisieren (*Pschyrembel 2011*).

Ein weiterer Vertreter dieser Hormone ist das Progesteron, welches zu der Klasse der Gestagene gezählt wird. Es wird im Corpus luteum des Ovars aus Cholesterin gebildet und bei einer bestehenden Schwangerschaft zusätzlich von der Plazenta synthetisiert. Dies

verdeutlicht, dass es eine wichtige Funktion in der Schwangerschaft übernehmen muss; es ist für ein Weiterbestehen der Schwangerschaft essentiell (Rassow et al. 2008).

Beide Hormone wirken über spezielle molekulare Mechanismen. Nach Diffusion durch die Plasmamembran, bei vorhandenen hydrophoben Eigenschaften, binden sich die Hormone an lösliche Rezeptorproteine (Berg et al. 2007). Nachdem sich das Hormon - in diesem Fall das Estradiol - und der Rezeptor vereinigt haben, bindet der Rezeptor-Hormon-Komplex nach Konformationsänderung an vorbestimmte Stellen der DNA, was wiederum eine Beeinflussung der Genexpression bedingt (Lehninger et al. 1998). Diese vorbestimmten Stellen werden auch als Estrogen-Response-Elemente (EREs) bezeichnet (Berg et al. 2007). Zusätzlich sind weitere Kofaktoren für die Funktion des Hormon-Rezeptor-Komplexes verantwortlich (Abb. 3). Sie wirken entweder als Koaktivatoren oder Korepressoren, die die weitere Transkription entweder zulassen oder inhibieren (Aktories et al. 2009).

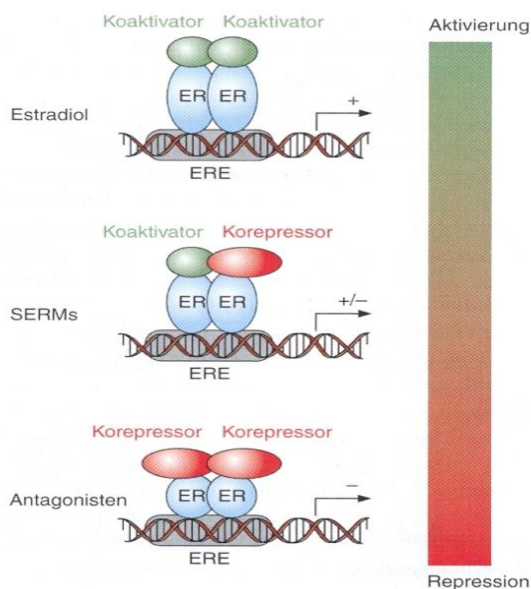


Abb. 3: Wirkungsmechanismus von Estradiol, SERMs und Antagonisten im Vergleich
(Quelle: Aktories et al. 2009)

Der Estrogenrezeptor wird in zwei Isoformen differenziert - der Estrogenrezeptor α (ER α) und der Estrogenrezeptor β (ER β). Ersterer von beiden besitzt 595 Aminosäuren, der ER β enthält dagegen nur 530 Aminosäuren. Welcher Rezeptor in welchem Gewebe als Hauptrezeptor vorkommt, hängt von der jeweiligen Gewebeart ab. Während u.a. in Knochen, Nieren und Darmmukosa vorwiegend der β -Rezeptor anzufinden ist, kommt der α -Rezeptor dabei eher in Mammatumorzellen oder Ovarienstroma vor und ist somit in weiblichen Geschlechtsorganen zu finden (Löffler und Petrides 2002).

Die Rezeptoren weisen sowohl eine N-terminale, variable Domäne mit Aktivierungsfunktion (AF-1, ligandenunabhängige Transkriptionsaktivierung), als auch eine C-terminale Domäne auf, die die DNA binden kann. Darüber hinaus existiert eine D-Domäne, die das

Kernlokalisierungssignal beinhaltet. Sie wird auch als Gelenkregion bezeichnet. Die AF-2-Region (ligandenabhängige Transkriptionsaktivierung, siehe auch *Abb. 4*) beherbergt die Abschnitte E und F (*Aktories et al. 2009*).

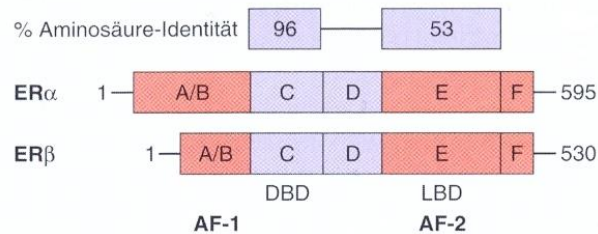


Abb. 4: Domänenstruktur der Estrogenrezeptoren ER α und ER β

A/B-Domäne (AF-1): regulatorische Aufgabe

C-Domäne: DNA-Bindungsdomäne

D-Domäne: „Gelenk“-Region mit Kernlokalisierungssignal

E/F-Domäne (AF-2): Ligandenbindung

(Quelle: *Aktories et al. 2009*)

Als letztes soll kurz der Progesteronrezeptor erwähnt werden, welcher mit 930 Aminosäuren der größte der drei Rezeptoren ist und ebenfalls große Ähnlichkeit mit beiden Estradiolrezeptoren aufweist (*Löffler und Petrides 2002*).

1.1.6 Therapie

Die Therapie des Mammakarzinoms richtet sich nach den dafür eigens angefertigten Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe. "Leitlinien sind systematisch entwickelte Feststellungen (Thesen) mit dem Ziel, die Entscheidung von Ärzten und Patienten über eine angemessene Gesundheitsversorgung (Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge) für spezifische klinische Situationen zu unterstützen" (*Lorenz et al. 2001*). Ob hier nun eine operative, medikamentöse oder strahlenmedizinische Therapie indiziert ist, ist individuell für jede Patientin und abhängig von deren Krankheitsbild, Ausbreitung der Tumorerkrankung, sowie Rezeptorstatus des Karzinoms abzuwägen. Operativ gilt die brusterhaltende Therapie (BET) heute als Standardmethode zur Behandlung des Mammakarzinoms. Dabei gilt die Voraussetzung, dass das Verhältnis von Tumor zu Brustgröße als günstig eingestuft wird. Bei großem Tumor wird eine zu kleine Brustgröße bei dieser Behandlungsmöglichkeit als Ausschlusskriterium gesehen. Um den Drüsenkörper liegende Schichten wie Muskulatur und Haut dürfen nicht infiltriert sein. Eine strahlentherapeutische oder medikamentöse adjuvante Option kann ggf. im Anschluss an eine Operation indiziert sein, wenn der Tumor bereits entfernt wurde, so dass die Option verbessert wird, noch vorhandene Tumorzellen bzw. Metastasen beseitigen zu können. Bei

der BET wird die strahlentherapeutische Nachbehandlung stets empfohlen (*Stauber und Weyerstahl 2007*).

Dieses Kapitel soll die medikamentöse Therapie mit Schwerpunkt auf die Selektiven-Estrogen-Rezeptor-Modulatoren (SERMS) beleuchten. Tamoxifen als Vertreter dieser Gruppe diente in dieser vorliegenden Arbeit als Kontrollsubstanz und vermittelt seine Wirkung im Zusammenhang mit den bereits oben erwähnten Rezeptoren der Tumorzellen. Die oben genannte Reaktionsabfolge in der Estradiolsynthese macht sich die Pharmaindustrie zudem zunutze, um das Tumorwachstum durch Inhibierung der Aromatase (Aromatasehemmer, z.B. Letrozol) zu unterbinden bzw. einzudämmen.

Mit Tamoxifen (**Abb. 5**) als kompetitivem Antagonist kann der Estrogenrezeptor blockiert und so die vermittelte Genexpression (u.a. die Expression für Wachstumsfaktoren) unterbunden werden (**Abb. 3**), (*Aktories et al. 2009*). Kompetitiv bedeutet in diesem Zusammenhang, dass sowohl das Arzneimittel Tamoxifen (Antagonist), als auch das körpereigene Estrogen (Agonist) um den identischen Rezeptor konkurrieren (*Lüllmann et al. 2006*).

Es folgt eine ligandenspezifische Konformationsänderung des Rezeptors, wobei die Interaktion mit der DNA (siehe auch Kapitel Hormonrezeptor) beeinflusst wird (*Graefe et al. 2011; Aktories et al. 2009*). Durch Tamoxifen kommt es zu keinem vollständigen Abbruch der Transkription, sondern lediglich zu einer Verlangsamung; es folgt ein Sistieren des hormonabhängigen Tumorwachstums durch Estrogen (*Theil 2010*). Die Ausstattung des spezifischen Gewebes mit Koaktivatoren und Korepressoren ist dafür verantwortlich, ob eine agonistische (estrogengleiche) oder antagonistische (estrogenverschiedene) Wirkung eintritt (*Aktories et al. 2009*).

Nichtsdestotrotz zeigt das Tamoxifen nicht nur estrogenantagonistische Wirkungen, sondern vermittelt auch eine Reihe an Reaktionen, die ebenso auf eine estrogenagonistische Wirkung schließen lassen (**Tab. 3**).

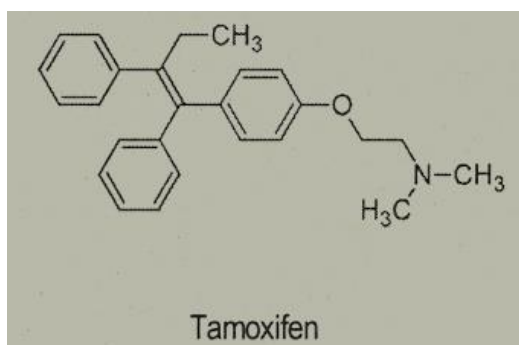


Abb. 5: Strukturformel Tamoxifen
(Quelle: *Helferich et al. 2008*)

Es verursacht eine Endometriumproliferation, wodurch eine Endometriumhyperplasie, aber auch Endometriumkarzinome unter Tamoxifentherapie zu erklären sind, weitere Wirkungen siehe **Tab. 3** (Aktories et al. 2009).

Tab. 3: Erwünschte und unerwünschte Wirkungen von Tamoxifen und Estradiol im Vergleich (Quelle: nach Aktories et al. 2009)

Effekt	Estradiol	Tamoxifen
Vasomotorische Effekte	↑↑↑	↑(↑)
Endometriumkarzinomrisiko	↑↑	↑
Antiresorptive Wirkung am Knochen	↑↑↑	↑
Brustkrebsrisiko	↑↑	↓↓
Cardiovaskuläres Risiko	↑↑↑	↑↑

Indikationen für eine Tamoxifentherapie sind ein bestehendes Mammakarzinom in der Prä- und Postmenopause (adjuvant), wobei diese Therapie das Auftreten von kontralateralen Karzinomen zusätzlich verringert (Graefe et al. 2011). Auch zur palliativen Therapie bei rezeptorpositiven Karzinomen wird das Tamoxifen eingesetzt (Aktories et al. 2009). Nach jahrelanger Einnahme von Tamoxifen wurde gelegentlich eine Resistenzentwicklung beobachtet - Tumorzellen können bei andauernder Einnahme ihre Teilung ankurbeln oder können gegen das Medikament unempfindlich werden (Herdegen 2010). Meist wird Tamoxifen in der Dosierung 20 mg/d für fünf Jahre eingesetzt (Stauber und Weyerstahl 2007). Um einen Überblick über die Therapiemöglichkeiten des Mammakarzinoms zu erhalten, werden nachfolgend zusammenfassend verschiedene Therapieansätze aufgeführt:

- (adjuvante) Chemotherapie mit FEC (5-Fluoruracil, Epirubicin, Cyclophosphamid), FAC (5-Fluoruracil, Doxorubicin, Cyclophosphamid), TAC (Docetaxel, Doxorubicin, Cyclophosphamid) oder AC/T (Doxorubicin/Epirubicin, Cyclophosphamid, danach Paclitaxel) oder palliative Chemotherapie als Mono- oder Polychemotherapie
- Trastuzumab (Herceptin®): bei Her-2-neu positiven Patientinnen
- Tamoxifen/GnRH-Analoga: bei positivem Rezeptorstatus auch prämenopausal
- Aromatasehemmer (AI) bzw. „Switch“-Therapie (2 Jahre Tamoxifen, 3 Jahre AI: bei Hormonsensibilität in der Postmenopause), (Aktories et al. 2009), ggf. kann eine antihormonelle Therapie über 10 Jahre sinnvoll sein (Lattrich 2013)

1.2 Leinwurzel – *Linum usitatissimum* und Phytoestrogene

Nicht umsonst wurde dem „gemeinen Lein“ (auch Flachs genannt) der Name *Linum usitatissimum* gegeben, was übersetzt so viel bedeutet wie der „äußerst nützliche Lein“, ein Name, der nur allzu gut die weit gefächerte Nutzbarkeit der Pflanze widerspiegelt. Seinen Namen gab ihm der schwedische Systematiker Linné. Die Pflanze zählt zur Familie der *Linaceae*, welche 22 Gattungen umfasst, wobei die Gattung *Linum* zusätzlich in ca. 200 Arten unterteilt werden kann. Himmelblaue, weiße oder auch rosa farbige, radiär angeordnete fünfteilige Blüten sind charakterisierend für die bis 150 cm hohe Leinpflanze (**Abb. 6 und 7**), (*Dambroth und Seehuber 1988*).



Abb. 6: Leinpflanze schematisch
(Quelle: *Hiller und Melzig 2010*)



Abb. 7: Leinpflanze in Blütezeit
(Quelle: *Dambroth und Seehuber 1988*)

Die Leinpflanze wird in Zonen gemäßigten Klimas angebaut (*Hiller und Melzig 2010*), stellt dabei aber keine allzu individuellen Ansprüche an die Bodenverhältnisse. Verschlammte/anmoorige oder staunasse Böden sind zum Anbau der Leinpflanze allerdings nicht geeignet. Im Freiland wird eine Aussaat im Frühjahr zwischen März und April empfohlen. Zwei Nutzungstypen des Leins werden unterschieden. Zum einen handelt es sich um den Faserlein, der hauptsächlich im Textilsektor benutzt wird. Der Öllein wird dagegen geerntet, um sein Leinsamenöl in die Lack- und Farbenherstellung einfließen zu lassen; der Samen selbst wird im Nahrungsmittelbereich verwendet. Auch Misch- bzw. Kombinationsleine sind vorhanden (**Abb. 8**), (*Diepenbrock et al. 1999; Diepenbrock et al. 2012*)

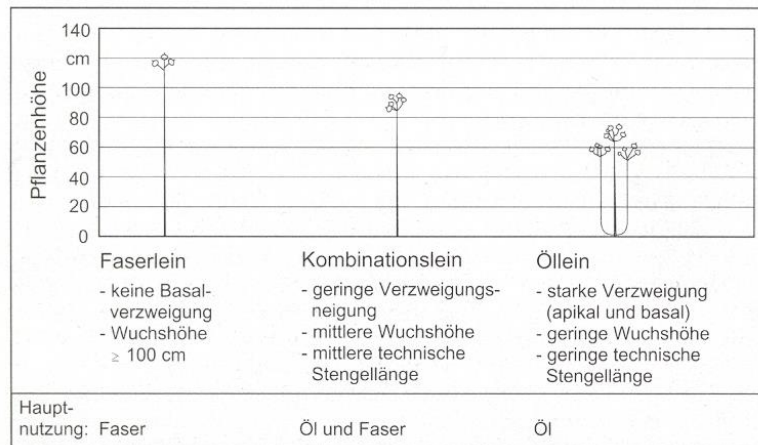
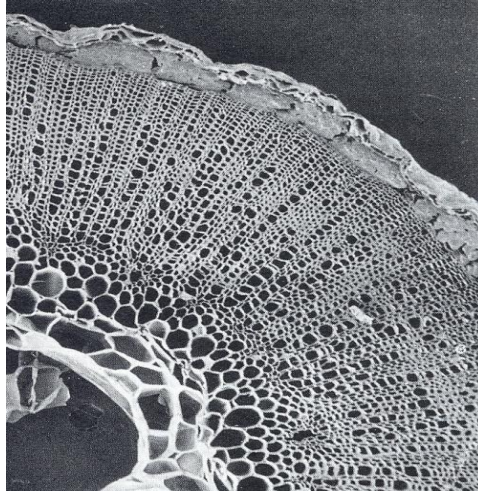


Abb. 8: Nutzungsbereiche des Leins
(Quelle: Diepenbrock et al. 1999)

Oberhalb der Oberfläche ist eine Pflanzenhöhe von über einem Meter möglich, auch unter der Erdoberfläche kann die Hauptwurzel eine nahezu ähnliche Länge wie der Spross erreichen. Der Öl- und der Faserlein unterscheiden sich äußerlich auch dadurch, dass Ersterer eine ausgeprägte Verzweigung vorweisen kann. Der Faserlein ist charakterisiert durch einen langen, dünnen Stängel bei schwacher Blütenstandsverzweigung (Diepenbrock et al. 1999). Im Allgemeinen besteht der Stängel der Leinpflanze aus verschiedenen Schichten, die von innen nach außen in Lumen, Mark, Holzzylinder, Bastfaserbündel und Rindengewebe unterteilt werden (Abb. 9). Als äußerste Schicht dient die Epidermis, die zusätzlich von einer Wachsschicht überzogen ist (Dambroth und Seehuber 1988). Die Samen der Pflanze - die Leinsamen - wurden schon seit jeher genutzt, um als Quellstoff-Abführmittel die Darmperistaltik bei Obstipationen anregen zu können (Wichtl 2005). Schon Hippokrates beschrieb rund 500 vor Christus die Wirkung des Leinsamens auf die Darmtätigkeit (Muir and Westcott 2003). Leinsamen können bei leichten und chronischen Obstipationen, Colon irritabile und Divertikulitis eingesetzt werden. Mit einer Latenz von einigen Tagen kommt es zu einer Regulierung der Darmtätigkeit, da die Samen das Stuhlvolumen erhöhen und ihn gleitfähiger machen. Wichtig bei der Einnahme von Leinsamen ist es jedoch, dass sie mit reichlich Flüssigkeit aufgenommen werden, um einem Darmverschluss vorzubeugen (Hänsel und Sticher 2009; Wichtl 2005; Frohne 2002).

In der Medizin konnte durch Leinpflanzenprodukte ebenfalls eine Senkung des Cholesterin- und Blutglucosespiegels beobachtet werden (Muir and Westcott 2003). Eine 18-prozentige Senkung des LDL-Cholesterins, sowie eine 9%ige Senkung des Gesamtcholesterins bei Leinsamengabe über mehrere Wochen konnte in klinischen Studien belegt werden (Hänsel und Sticher 2009).



**Abb. 9: Schnitt durch den Stängel
der Leinpflanze – mikroskopische Aufnahme**
(Quelle: *Dambroth und Seehuber 1988*)

Fakt ist, dass Inhaltsstoffen der Leinpflanze eine antikanzerogene Wirkung nachgesagt wird (*Theil et al. 2013, Teil et al. 2011*). Zu diesen Inhaltsstoffen gehören u.a. die Isoflavone und Lignane, die zusammenfassend als Phytoestrogene bezeichnet werden.

In der vorliegenden Arbeit liegt der Schwerpunkt in der Leinwurzelbetrachtung.

1.2.1 Phytoestrogene und deren Vorkommen

Das Augenmerk dieser Arbeit soll sich auf die Leinpflanzenkomponente „Wurzel“ richten, in welcher Inhaltsstoffe zu finden sind, die zu den Phytoestrogenen zu zählen sind. Hauptvertreter aller Phytoestrogene sind u.a. die Coumestane, Isoflavone (zusammen Flavonoide) und Lignane (*Kurzer and Xu 1997; Stürtz 2008*). Sie zählen zu den nonsteroidalen sekundären Pflanzenstoffen, werden von unterschiedlichsten Pflanzen und Gewächsen synthetisiert und sind durch estrogenähnliche Wirkung gekennzeichnet (*Abarzua et al. 2007*). Der Begriff sekundär wird hier verwendet, da diese Stoffe nicht zu den primären Pflanzenstoffen, wie Kohlenhydraten, Fetten oder Proteinen zu zählen sind. Sie sind Verbindungen, die im sekundären Stoffwechsel synthetisiert werden, unterschiedlicher chemischer Verbindung sein können und so pharmakologische Wirkungen ausüben können (*Watzl und Leitzmann 2005*).

Unter anderem sind Lignane und Isoflavone in beträchtlichen Konzentrationen in Klee, Nüssen, Soja, Tee, Kaffee, in der Kichererbse oder in Leinsamen zu finden (*Abarzua et al. 2007; Cotterchio et al. 2008*). Isoflavone sind dabei eher in Soja enthalten, Lignane kommen besonders im Lein vor (*Chen et al. 2007*). Als Inhaltsstoffe dieser Pflanzen sind sekundäre Pflanzenstoffe als Farbstoffe wirksam, gelten als Wachstumsregulatoren oder wirken in der Natur als Abwehrstoffe gegen Krankheiten und Schädlinge (*Watzl und Leitzmann 2005*). Als

Hauptvertreter der Isoflavone gelten u.a. Genistein, Daidzein, Formononetin und Biochanin-A; zu den Hauptlignanenen zählen das Secoisolariciresinol und das Matairesinol (*Richter et al. 2010*).

Eine estrogenrezeptorvermittelte Wirkung, die estrogen oder antiestrogen sein kann, ist naheliegend, da auch die strukturelle Ähnlichkeit zwischen dem Stoffwechselprodukt der Isoflavone (Equol) und dem körpereigenen Estradiol nicht zu verkennen ist (**Abb. 10**), (*Setchell and Cassidy 1999; Humfrey 1998*). Insgesamt ist die Affinität zu beiden Estrogenrezeptoren gegeben, die Affinität durch Phytoestrogene zum ER β ist jedoch stärker als die des Estradiols zum Rezeptor. Der physiologische Effekt, der nach Rezeptorbindung durch Signalwege vermittelt wird, fällt bei den Phytoestrogenen hingegen schwächer aus (*Richter et al. 2010*). Bei den Coumestanen (Bsp.: Coumestrol) kann nur wenigen Vertretern eine estrogene Aktivität nachgesagt werden; relativ zu den steroidalen Estrogenen gesehen, ist die Potenz unter den Phytoestrogenen jedoch u.a. bei Coumestrol am höchsten (*Humfrey 1998*).

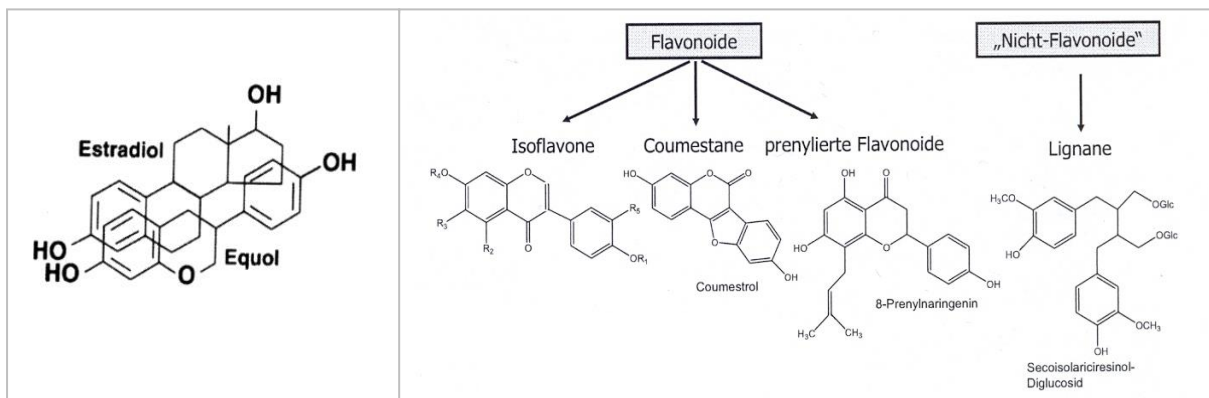


Abb. 10: Strukturelle Ähnlichkeit zwischen Estradiol und Equol
(Quelle: *Setchell and Cassidy 1999*)

Abb. 11: Einteilung der Phytoestrogene
(Quelle: *Stürtz 2008*)

Abb. 10 veranschaulicht die strukturelle Ähnlichkeit zwischen Estradiol und dem menschlichen Abbauprodukt der Isoflavone. Der Abstand zwischen den Hydroxylgruppen C3 und C17 des Estradiols ist beinahe ebenso groß wie der, der zwischen den aromatischen Hydroxylgruppen des Isoflavonoids zu erkennen ist (*Watzl und Leitzmann 2005*).

Die oben rechts dargestellte Abbildung (**Abb. 11**) verdeutlicht, dass chemisch strukturelle Unterschiede zwischen den Phytoestrogenen vorhanden sind. Die Flavonoide besitzen ein Grundgerüst aus drei Ringen C6-C3-C6, welche 15 Kohlenstoffatome beinhalten. Über den

Ring C werden die beiden benzolischen Ringe A und B heterozyklisch miteinander verbunden.

Die Lignane unterscheiden sich strukturell von den Flavonoiden. In der Pflanzenwelt kommen Lignane meist in glykosidischer Form vor, ihre chemische Struktur ist gekennzeichnet durch ein dimeres C6-C3-Gerüst (über die β -C-Atome der C3-Seitenkette verbunden), (*Stürtz 2008*).

1.2.2 Stoffwechsel

Pflanzliche Stoffe wie die Lignane Secoisolariciresinol und Matairesinol werden im menschlichen Organismus durch bakterielle Darmbesiedler in Enterodiol und Enterolakton umgewandelt (*Hallund et al. 2008; Adlercreutz et al. 1995*). Enterolakton (aus Matairesinol) und Enterodiol (aus Secoisolariciresinol) können im Urin des Menschen nachgewiesen werden (*Borriello et al. 1985*). Bowey et al. 2003 zeigten in ihren Untersuchungen, dass der Metabolismus dieser Stoffe von einer bakteriellen Besiedlung der Darmflora abhängig ist. Untersucht wurde die Verstoffwechslung von Isoflavonen und Lignanen an Ratten, wobei die eine Gruppe als „keimfrei“ eingestuft wurde, der Darm der anderen Untersuchungsgruppe hingegen nachgewiesen mit humanen Bakterien besiedelt war. Nach Verzehr sojahaltiger Produkte konnte im Urin der keimfreien Ratten kein erwähntes Stoffwechselendprodukt (Equol, O-desmethylangolensin, Enterolakton) nachgewiesen werden. Im Urin der bakterienbesiedelten Ratten hingegen fand man die Endprodukte, so dass man von einer Umsetzung durch benötigte Bakterien ausgehen konnte (*Bowey et al. 2003*).

Secoisolariciresinol-Diglucosid wird dekonjugiert, demethyliert und anschließend dehydroxyliert, so dass letztendlich Enterodiol synthetisiert wird. Dieses kann wiederum zu Enterolakton verstoffwechselt werden; dies geschieht durch eine Oxidation. Enterolakton kann zusätzlich aus Matairesinol durch Demethylierung und Dehydroxylierung synthetisiert werden (*Abb. 12*). Die Lignane werden darauffolgend über den enterohepatischen Kreislauf resorbiert. Dies bedeutet, dass umgesetzte Lignane über den Darm via Pfortader in die Leber gelangen, dort zu Glucuronsäure oder Sulfat umgesetzt werden (Phase-II-Konjugation) und folgend wieder in den Darm über die Galle abgegeben werden. Es erfolgt eine weitere Konjugierung durch bakterielle β -Glucuronidasen, die eine erneute Aufnahme der Lignane möglich macht, so dass sich der erwähnte Kreislauf schließt (*Stürtz 2008*).

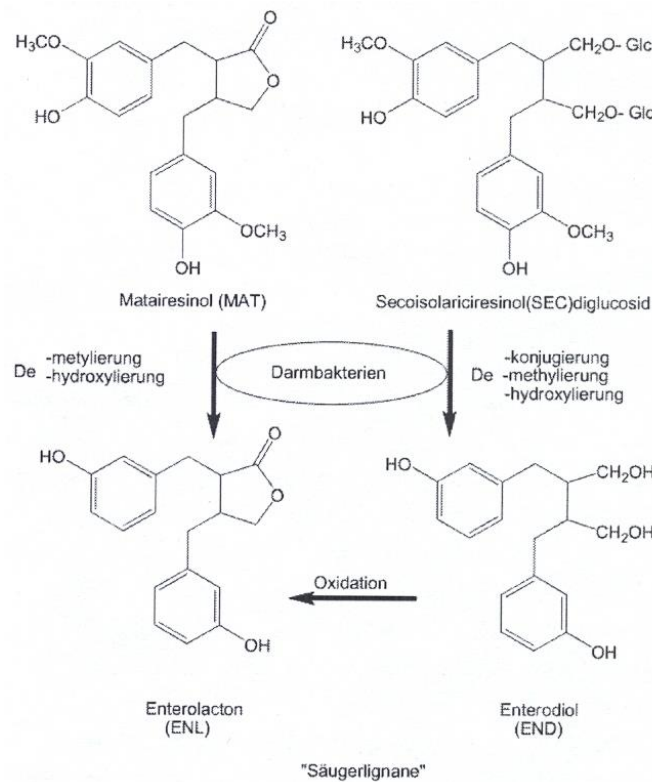


Abb. 12: Metabolismus der Lignane im menschlichen Organismus (Quelle: Stürtz 2008)

Auch die Isoflavone unterliegen dem genannten enterohepatischen Kreislauf. Aufgenommen u.a. als pflanzliches Genistein werden Isoflavone im Intestinaltrakt rasch resorbiert (*Sfakianos et al. 1997*). Im Intestinaltrakt ist die Resorption von Isoflavonen jedoch von ihrer chemischen Struktur abhängig. Es muss unterschieden werden, ob die Isoflavone in aglykoner oder glykosidischer Form vorkommen. Dabei ist zu erwähnen, dass Isoflavone in sojahaltigen Lebensmitteln meist in aglykoner Form vorkommen. In der ursprünglichen Sojabohne überwiegt jedoch die glykosidische Form. Aglykone können, bedingt durch ihre Lipophilie, durch die Darmwand diffundieren. Isoflavone, die nicht durch Diffusion aufgenommen werden können, werden durch Darmbakterien zerlegt und abgebaut. Aus Daidzein wird so bioaktives Equol synthetisiert, welches neben einem weiteren Reaktionsprodukt, dem O-desmethylangolensin über Dihydrodaidzein entstehen kann.

Genistein wird zu Dihydrogenistein abgebaut, welches u.a. weiter zu 6-Hydroxy-O-desmethylangolensin bzw. p-Ethylphenol abgebaut wird; zusätzlich entsteht 5-Hydroxyequol (*Matthies et al. 2012; Stürtz 2008*).

Equol als Syntheseprodukt kann nur von 30-50% der Bevölkerung der westlichen Welt hergestellt werden; sie werden aufgrund dessen als Equolproduzenten bezeichnet (*Shor et al. 2012*). In der Literatur wird erwähnt, dass solche Personen, die Isoflavone zu Equol umsetzen

können, einen gesundheitlichen Vorteil daraus ziehen (*Setchell and Clerici 2010*). Dieser Vorteil äußert sich bei näherer Betrachtung des Lipidprofils im Zusammenhang mit einer positiven Beeinflussung kardiovaskulärer Erkrankungen. Cai et al. konnten in ihrer Veröffentlichung 2012 zeigen, dass solche Personen, die Equol synthetisieren können, einen signifikant niedrigeren Triglyceridspiegel aufweisen als solche, die Equol nicht produzieren können. Auch ein sonographisch gemessener Intima-Media-Komplex, der in verbreiteter Form für eine vorhandene oder beginnende Arteriosklerose spricht, wird bei diesen Personen als geringer ausgeprägt eingestuft. Der Lipidstoffwechsel wird durch ein ansteigendes HDL-Cholesterin („gutes“ Cholesterin) zusätzlich positiv beeinflusst (*Cai et al. 2012*).

1.2.3 Effekte und Bedeutung

Wie Phytoestrogene positiv auf die Gesundheit des Menschen wirken, verdeutlicht nicht nur das Beispiel, welches oben genannt ist. Neben Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System sind positive Effekte durch Lignane, Isoflavone & Co auch in Bezug auf andere Krankheitsbilder, wie Osteoporose und menopausale Beschwerden, vorzufinden (*Clarke et al. 2004*). Es wird in der Fachliteratur erwähnt, dass Phytoestrogene eine wichtige Rolle in der Vorbeugung von Osteoporose einnehmen. Ein Risikofaktor für die Entstehung einer Osteoporose, besonders bei postmenopausalen Patientinnen, ist ein Mangel an Estrogenen. Um diesem Knochenverlust vorzubeugen, kann therapeutisch eine Hormon-Ersatz-Therapie genutzt werden (*Al-Anazi et al. 2011*). Solche Therapieoptionen sind jedoch mit Nebenwirkungen verbunden, wozu unter anderem ein erhöhtes Schlaganfall- oder Thromboserisiko zählt (*Lüllmann et al. 2006*). Isoflavone und andere Phytoestrogene können durch ihre strukturelle Ähnlichkeit zu den Estrogenen auch in diesen Mechanismus eingreifen. Sie können eine Alternative zu chemisch zugeführten Hormonen darstellen (*Al-Anazi et al. 2011*), da sie ihre Wirkung u.a. durch Beeinflussung der osteoklastären Tätigkeit vermitteln. Genistein konnte bei in-vivo und auch bei in-vitro Studien die Osteoklastentätigkeit und somit den vorzeitigen Abbau des Knochens unterdrücken (*Blair et al. 1996*).

Eine vorbeugende Wirkung durch Phytoestrogene in Bezug auf hormonabhängige Tumore (wie dem Prostatakarzinom) ist beschrieben (*Adlercreutz et al. 2004*).

Dennoch ist die antikanzerogene Wirkung auch von der Konzentration der besagten Stoffe abhängig. Zudem existieren zudem hier geographische Unterschiede (s.o.). So zeigen Einwohner Hong Kongs höhere Konzentrationen von Isoflavonen in Körpersekreten wie dem Prostatasekret, wohingegen dies bei Bewohnern Großbritanniens nicht zu finden ist (*Morton*

et al. 1997). Jedoch existieren auch hier Studien, die die These der antikanzerogenen Wirkung hoher zirkulierender Enterolaktone nicht belegen können (*Stattin et al. 2002*).

Der Zusammenhang zwischen der Aufnahme von Phytoestrogenen und der Beeinflussung des Mammakarzinoms soll in dem folgenden Abschnitt gesondert erläutert werden.

1.2.4 Phytoestrogene und Brustkrebs

Inwieweit die Aufnahme von Phytoestrogenen durch die Nahrung und das Auftreten des Mammakarzinoms zusammenhängen, zeigen diverse Studien, die von zahlreichen Arbeitsgruppen verfolgt wurden. Eine Aufnahme von Isoflavonen zeigte bei der asiatischen Bevölkerung eine Minimierung der Häufigkeit des Auftretens des Brustkrebses (*Velentzis et al. 2008*). Es stellt sich die Frage, wie Phytoestrogene ihre Wirkung vermitteln. Um diese Frage beantworten zu können, müssen Ergebnisse weiterer Studien hinzugezogen werden. So zeigten Touillaud et al. 2007 in ihrer Arbeit, dass die Einnahme von Lignan ein niedrigeres Risiko birgt, an einem estrogenrezeptor- und/oder einem progesteronrezeptorpositivem Mammakarzinom zu erkranken. Die Vergleichsgruppe stellte hier eine Gruppe von Frauen dar, die diese phytoestrogenreiche Diät nicht zu sich nahm (*Touillaud et al. 2007*). Aufgrund dieser Tatsache geht man davon aus, dass Phytoestrogene durch ihre strukturelle Ähnlichkeit zu den körpereigenen Estrogenen eine Wirkung über den Estrogenrezeptor vermitteln könnten (*Velentzis et al. 2008*). Dieser ist, wie bereits in vorherigen Abschnitten dieser Arbeit erwähnt, für die Krankheitsentwicklung von entscheidender Bedeutung. Auch Buck et al. 2011 dokumentierten bei Patientinnen, die hohe Enterolaktongehalte im Serum aufwiesen, eine höhere Überlebensrate (*Buck et al. 2011*). Nichtsdestotrotz existieren weitere Studienergebnisse, die konträr zu den oben dargestellten Studien stehen. So ist in der Literatur aufgeführt, dass sogar ein stimulierender Effekt durch Phytoestrogene zustande kommen kann. Dies ist von McMichael-Phillips et al. 1998 auf histologisch nicht verändertes Mammagewebe beobachtet worden. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass sojareiche Nahrung (über 14 Tage) einen stimulatorischen Effekt auf das Brustdrüsengewebe ausübte. Dabei ist nicht sicher, ob der Effekt durch eine estrogenagonistische Wirkung vermittelt wurde (*McMichael-Phillips et al. 1998*). Auch Hargreaves et al. 1999 detektierten einen schwachen estrogenvermittelten Effekt durch Sojazufuhr auf prämenopausales Brustdrüsengewebe. Zwar handelte es sich hier nur um eine Patientinnengruppe von 84 Personen, allerdings war trotz kleiner Untersuchungsgruppe und geringer Einnahmedauer von zwei Wochen kein antiestrogenen Effekt zu verzeichnen (*Hargreaves et al. 1999*). Gründe für diese widersprechenden Ergebnisse könnten die Gestaltung der individuellen Untersuchungen,

Modellaufbau, Größe der untersuchten Patientengruppe oder unterschiedliche Karzinomeigenschaften wie der Rezeptorstatus sein und so zu einem Auseinanderweichen der Ergebnisse beigetragen haben. Trotz existierender Studien, die die antikanzerogene Wirkung der Lignane&Co nicht belegen können, liegt der Schwerpunkt vieler Forschungs- und Arbeitsgruppen auch heute immer noch auf der Weiterverfolgung der antikanzerogenen Wirkungsweisen der Phytoestrogene.

Im Folgenden sollen nur einige der phytoestrogenvermittelten Effekte näher beleuchtet werden. Zum einen, um genauer auf wesentliche Aspekte hinsichtlich des Mammakarzinoms eingehen zu können, zum anderen, um den Rahmen dieser Arbeit nicht zu sprengen. Auch die rezeptorvermittelte estrogene und antiestrogene Wirkung soll in diesem Absatz vernachlässigt werden, da auch diese bereits in vorherigen Abschnitten ausführlich erläutert wurde. Freie Estrogene vermitteln ihre Wirkung über Reaktionsketten auf zellulärer Ebene. Die Anzahl freier Estrogene kann durch das Sexualhormon-Bindungs-Globulin (SHBG) verringert werden. Dieses ist dazu befähigt, freies Estradiol binden zu können und dient im menschlichen Körper dem Transport des Hormons. Durch Lignane und Isoflavone kann die Synthese des SHBG in der Leber gesteigert werden, so dass mehr Estrogene in gebundener Form vorliegen und die biologische Aktivität der freien Komponenten geschmälert wird (*Adlercreutz et al. 1987; Adlercreutz et al. 1995*).

Postmenopausale Frauen mit Brustkrebs zeigten in Untersuchungen eine niedrigere Konzentration dieses Transporters, was ebenso diese These untermauert, freies Estradiol spiele bei der Karzinomgenese eine entscheidende Rolle (*Adlercreutz et al. 1991*). Neben den chemisch hergestellten Medikamenten Anastrozol, Exemestan oder Letrozol können auch Phytoestrogene in die Synthese des Estradiols aus Androstendion oder Testosteron eingreifen. Als Inhibitoren der Aromataseaktivität können beide Gruppen den Estradiolspiegel senken (*Graefe et al. 2011; Wang et al. 1994*).

Als nicht-hormonabhängiger phytoestrogenvermittelter Effekt kann die Inhibition der Tyrosinkinase erwähnt werden. Darüber hinaus werden durch Genistein zusätzlich die Topoisomerase II und Protein-Histidin-Kinasen gehemmt. Durch Hemmung der Tyrosinkinaseaktivität, die für eine onkogene Expression bzw. Zelltransformationen und Zellproliferation verantwortlich ist, kann das Wachstum der Karzinomzelle vermindert werden (*Adlercreutz et al. 1995*).

Welche Phytoestrogene welchen antikanzerogenen Wirkmechanismus beeinflussen zeigt **Tab. 4.**

Tab. 4: Hormonelle und nicht-hormonelle Effekte der Lignane und Isoflavone (Quelle: nach *Valentzis et al. 2008*)

Mechanismus	Lignane	Isoflavone
<u>Hormoneller Effekt</u>		
5 α -Reduktase- Inhibitor	x	x
Änderung des Estrogenmetabolismus	x	x
17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Inhibitor		x
Aromataseinhibitor	x	x
Sulphatase- und Sulphotransferase-Inhibitoren		x
Erhöhung des SHBG	x	x
<u>Nicht-hormoneller Effekt</u>		
DNA-Topoisomerase-Inhibitor		x
Angiogeneseinhibitoren	x	x
Tyrosinkinaseinhibitoren		x
Hemmung von Tumormetastasen	x	
Stärkung des Immunsystems		x
Antioxidative Effekte	x	x
Zelladhäsionseffekte	x	x
Hemmung des invasiven Wachstums		x

Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) spielen in der Biochemie eine entscheidende Rolle, da sie einerseits als Rezeptoren agieren, andererseits als Tyrosinkinase wirken, indem sie Informationen über Signalwege an das Zellinnere vermitteln. Um ein Beispiel für eine solche RTK zu nennen, kann in diesem Zusammenhang auch der HER-2-Rezeptor erwähnt werden. Dieser ist in 30% der Fälle bei einem Mammakarzinom verstärkt exprimiert und steht bei übermäßiger Expression für einen eher ungünstigen prognostischen Verlauf. Eine verstärkte Expression bedeutet für die Zelle einen verstärkten Impuls für die Zellvermehrung. Als therapeutische Option steht heute Herceptin[®] (Trastuzumab) als HER2-Antikörper zur Verfügung (*Schartl et al. 2009; Bühling und Friedmann 2004*).

Auch die Arbeitsgruppe der Universitätsfrauenklinik Rostock ist bis dato auf der Suche nach Alternativen, um die Therapie des Mammakarzinoms weiter gestalten, Wirkungsweisen erforschen und ggf. in Zukunft zu alternativen Therapiemöglichkeiten verhelfen zu können.

2 Zielstellung

Phytoestrogene werden als antikanzerogen eingestuft. Diese Kernaussage soll bei der Zielstellung dieser Arbeit aufgegriffen und durch ergänzende Gedanken ausgebaut werden. Phytoestrogene, als bekannte Inhaltsstoffe des Sojas, sind für ein signifikant niedrigeres Auftreten von Karzinomerkkrankungen, wie dem Prostata- und dem Mammakarzinom mitverantwortlich. Isoflavone als Vertreter der Phytoestrogene sind in großen Mengen in der Sojabohne vertreten, wobei ihr Gehalt in der menschlichen Ernährung am bedeutendsten bzw. höchsten ist. Obwohl vielerlei Lebensmittel heutzutage Zusätze von Soja enthalten, ist der Konsum in Deutschland wohl dennoch als gering einzustufen.

Mit dem Lein wurde eine Pflanze gefunden, deren Kultivierung als Nutzpflanze in heimischen Gebieten seit Jahren nicht nur üblich, sondern auch, ohne großen Ansprüchen zu unterliegen, sehr praktikabel ist. Durch ihren hohen Gehalt an Phytoestrogenen könnte die Leinpflanze als heimisches Pendant zur Sojapflanze bezeichnet werden. Diese Tatsache war ein Grund dafür, dass die Frauenklinik der Universität Rostock den Inhaltsstoffen des Leins genauer auf den Grund ging. In der Vergangenheit wurden die Bestandteile der Leinpflanze auf ihre Wirksamkeit in Bezug auf Karzinomzelllinien getestet und erwiesen sich als potenziell antikanzerogen. Ziel einer vorherigen Untersuchung (*Strater 2011*) war, die Wirkung dreier Freilandleinwurzelextrakte auf zwei Mammakarzinomzelllinien zu untersuchen und deren Wirkung miteinander zu vergleichen.

Es stellte sich die Frage, ob Extrakte der Leinwurzel, wobei die Pflanze unter konstanten Bedingungen in der Klimakammer kultiviert wurde, Unterschiede zur Wirkung der bereits untersuchten Freilandpflanze aufweisen würden. Es soll zudem herausgearbeitet werden, inwieweit der Reifegrad der Wurzel das Wirkspektrum beeinflusst. Gibt es Unterschiede zwischen der 3, 6 und 12 Wochen alten Wurzel? Trifft der bekannte Satz von Paracelsus zu: „Dosis sola venenum facit – Allein die Menge macht das Gift“? Inwieweit nimmt die eingesetzte Konzentration der Wurzelaltersstufe Einfluss auf die Wirkung des Extraktes? Diese Fragestellung soll mithilfe verschiedener Testverfahren - Zytotoxizitäts-, Proliferations- und Viabilitätstests - unter Einsatz einer estrogenrezeptorpositiven MCF7-Zelllinie und einer estrogenrezeptornegativen BT20-Zelllinie beantwortet werden. Eine genauere Analyse der wirkungsverantwortlichen Substanzen in der Leinwurzel wird durch eine massenspektrometrische Charakterisierung durchgeführt und soll wirksame Inhaltsstoffe eingrenzen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Materialien für die Leinwurzelextrakterstellung (nach *Luyengi et al. 1996*)

Geräte/Verbrauchsmaterialien/Chemikalien	Hersteller
Erlenmeyerkolben, verschiedene Größen	Carl Roth GmbH&Co KG, Karlsruhe
Ethylacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Exsikkator	
Falkon-Röhrchen 50 ml	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Faltenfilter, Durchmesser 185 mm	Schleicher und Schüll, Dassel
Leinwurzel verschiedene Altersstufen: 3 Wochen, 6 Wochen, 12 Wochen (Pflanze in Blütezeit) <i>Linum usitatissimum</i> , Pflanze „Barbara“	Institut für Biowissenschaften, Abteilung Biochemie, Universität Rostock
Methanol	Carl Roth GmbH&Co KG, Karlsruhe
Mörser/Pistill	
Pasteurpipette/Pipettensauger	Carl Roth GmbH&Co KG, Karlsruhe
Rundkolben, 2 Liter	Schott AG, Mainz
Siedesteine	Carl Roth GmbH&Co KG, Karlsruhe
Ultraschallbad, Sonorex	Schalltec GmbH, Mörfelden-Walldorf
Vakuumrotationsverdampfer (VV2011)	Heidolph Instruments GmbH&Co KG, Schwabach
Wasserbad	Heidolph Instruments GmbH&Co KG, Schwabach

3.1.2 Materialien für die Zellkultivierung – Laborausrüstung

Geräte/Verbrauchsmaterialien/Chemikalien

Brutschrank (37°C, 5% CO₂)

Hersteller

Heraeus Instruments GmbH

Hanau

Bürker-Zählkammer/Deckglas (Tiefe 0,1 mm, 0,0025 m²)

Poly-Optik GmbH, Bad

Blankenburg

Eppendorf-Röhrchen

Eppendorf AG, Hamburg

Kühltruhe (-80°C)

Heraeus Instruments

GmbH, Hanau

Kulturflaschen 25 cm², 75 cm², 150 cm²

Techno Plastic Products

AG, Trasadingen, Schweiz

Mikroskop, Olympus CK-2 TR

Olympus Europa GmbH,

Hamburg

Pipetten verschiedener Größe

Eppendorf AG, Hamburg

Pipettenspitzen

Eppendorf AG, Hamburg

Präzisionswaage

Sartorius AG, Göttingen

Sterilbox

Heraeus Instruments

GmbH, Hanau

Vortexer Typ REAX 2000

Heidolph Instruments

GmbH, Hanau

Wellplatten verschiedener Größe (24er-, 96er- Platte)

Techno Plastic Products

AG, Trasadingen, Schweiz

Zentrifuge

Andreas Hettrich

GmbH&Co KG, Tuttlingen

Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml

Techno Plastic Products

AG, Trasadingen,

Schweiz

3.1.3 Materialien für die Zelllinien und Zellkulturen – Chemikalien/Zellkulturmedien

Geräte/Verbrauchsmaterialien/Chemikalien	Hersteller
Antibiotika/Antimykotica	
Amphotericin B 0,25 mg/ml	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Penicillin-Streptomycin-Solution (1000 E Penicillin; 10 mg Streptomycin/ml; 0,9% NaCl)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
DMEM (Dulbecco´s modified eagle medium)	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Deisenhofen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	G. Vogler B. V., Rotterdam, Niederlande
FKS (fetales Kälberserum)	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Deisenhofen
Flächendesinfektion z.B. Bacillol R plus	Bode Chemie GmbH&Co KG, Hamburg
PBS	Lonza Bio Whittaker, Wuppertal
RPMI (nach: Roswell Park Memorial Institute)	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Deisenhofen
Trypanblau (0,4%)	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Deisenhofen
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

3.1.4 Materialien für die Immunhistochemie

Geräte/Verbrauchsmaterialien/Chemikalien	Hersteller
Antikörper:	
Estrogenrezeptor α : Monoclonal Mouse Anti-Human, Clone: ID5 r.t.u.	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg
Estrogenrezeptor β : Monoclonal Mouse Anti-Oestrogen Receptor Beta 1, Clone: PPG5/10 (1:10 verdünnt mit PBS)	AbD Serotec Morpho Sys AbD GmbH, Düsseldorf
Progesteronrezeptor: Monoclonal Mouse Anti-Human,	DAKO Diagnostika GmbH,

PgR 636, r.t.u.	Hamburg
Formafix 4%, gepuffert	Grimm med. Recycling GmbH, Torgelow
Histoprime Lin Red	Linaris GmbH, Wertheim- Bettingen
Horseserum R.T.U. Normal Horse Serum	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
ImmPRESS Universal Reagent (anti-mouse/rabbit Ig, peroxidase)	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
Kamera: AxioCam MRc	Carl Zeiss AG, Oberkochen

3.1.5 Materialien für die Testverfahren

(oben schon genannte Materialien werden hier nicht erneut erwähnt)

Geräte/Verbrauchsutensilien/Chemikalien

Hersteller

BrdU-Test

Cell Proliferation ELISA, BrdU (calorimetric)

Roche Diagnostics GmbH,
Mannheim

Test-Kit bestehend aus:

Anti-BrdU-POD

Monoklonaler Antikörper von
Maus-Maus-Hybridzellen,
konjugiert mit Peroxidase

Antikörperlösung (Antibody dilution solution)

BrdU-Markierungslösung (labeling reagent)

Fix Denat

Substratlösung (Substratsolution)

Waschpuffer (Washing buffer)

H₂SO₄ (1 M)

Carl Roth GmbH&Co. KG,
Karlsruhe

LDH -Test

Cytotoxicity Detection Kit

Roche Diagnostics GmbH,
Mannheim

Test-Kit bestehend aus:

Katalysator (Diaphorase/NAD+ mixture)

Dye solution

HCl (1 M)

Carl Roth GmbH&Co. KG,
Karlsruhe

Triton X-100 (Octoxinol-9, auf 2% verdünnt),

Ferak Berlin GmbH, Berlin

MTT-Test

Cell Proliferation Kit

Roche Diagnostics GmbH,
Mannheim

Test-Kit bestehend aus:

MTT: 3-(4,5 Dimethylthiazol-2-yl)-2,5Diphenyl

Tetrazoliumbromid (Labelingreagenz)

Solubilisation Lösung (Natriumdodecylsulfat
in 1 M Salzsäure – 10%)

Viabilitätstest

CellTiter-Blue®

(20 ml Reagenz)

Promega GmbH,
Mannheim

Sonstige Utensilien für die Testverfahren:

ELISA-Reader

Bio-Rad Laboratories Inc.,
Kalifornien, USA

Ethanol (96% unvergällt)

Zentralapotheke, Rostock

Microplate Manager Software (Version 5.2.1)

Bio Rad Laboratories Inc,
Kalifornien, USA

Tamoxifen/Estradiol (in den jeweiligen Verdünnungsstufen)

Sigma-Aldrich-Chemie
GmbH, Deisenhofen

Massenspektrometrie

Finnigan MAT 900

Finnigan MAT, Bremen

3.1.6 Verwendete Zelllinien (American Type Culture Collection, ATCC®, Wesel)

Bei der MCF7-Zelle handelt es sich um eine estrogenrezeptorpositive (ER-positive) Mammakarzinomzelle eines duktales Karzinoms, die in den 70er Jahren aus dem Pleuraerguss einer 69-jährigen Frau mit einem metastasierten Mammakarzinom isoliert wurde (Nagamine *et al.* 2009). Schon in den 90er Jahren ging man davon aus, dass diese Zelle ein gutes Forschungsobjekt darstelle, welches bei der Weiterentwicklung von Präventionsmöglichkeiten bei Brustkrebs helfen könne (Levenson and Jordan 1997). Die estrogenrezeptornegative (ER-negative) BT20-Zelle wurde in dieser Arbeit verwendet, um einen Vergleich der Ergebnisse zwischen ER-positiven und ER-negativen Zellen herstellen zu können.

3.2 Methoden

3.2.1 Pflanzenextraktherstellung

Für die Extraktion wurde die Wurzel des gemeinen Leins – *Linum usitatissimum*, Sorte „Barbara“ verwendet, die im biochemischen Institut der Universität Rostock (Fachbereich Biowissenschaften) im Gewächshaus kultiviert und anschließend aufbereitet wurde.

Ausgesät wurde der Pflanzensamen am 12. Dezember 2007. Die Pflanze wurde anschließend im Abstand von 3 Wochen (Anfang Januar 2008), 6 Wochen (Ende Januar 2008), 9 Wochen (Ende Februar) und 12 Wochen (Mitte März 2008) geerntet. Bis zur Aufbereitung wurde die Wurzel bei -70°C eingefroren.

Die Ausbeute nach Extraktion der 9 Wochen alten Wurzel reichte für die Durchführung aller geplanten Versuche nicht raus, so dass diese nicht verwendet wurde und aufgrund dessen auch nicht weiter erwähnt wird.

3.2.2 Extraktion nach Luyengi (nach Luyengi *et al.* 1996)

Extrahiert wurde die Wurzel anhand der Lignanisolierung nach Luyengi *et al.* (1996). Nachdem Mörser und Pistill mit flüssigem Stickstoff vorgekühlt wurden, war es wichtig die Leinwurzel so feinpulvrig wie möglich zu zermörsern. Teilweise gab es Schwierigkeiten bei dem Zermörsern großer Wurzelanteile; es wurde jedoch darauf geachtet, die Pflanzenanteile so klein wie eben möglich zu zerstoßen.

Mithilfe eines Einführtrichters wurde die zermörserte Probe in einen zwei Liter Rundkolben überführt und eine definierte Menge an Methanol (MeOH) hinzugegeben. Bei einer Ausbeute von 40 Gramm Wurzelmaterial erfolgte eine Zugabe von 355 ml Methanol in den Rundkolben. Entsprechend der Ausbeute der einzelnen Wurzelstufen (s.o.) wurde eine

berechnete Menge des Alkohols genutzt. Um bei dem Aufkochen im Wasserbad einen Siedeverzug zu vermeiden, so dass leichtflüchtige Substanzen das Reaktionsgefäß verlassen konnten, wurden bereits vorher Siedesteine hinzugegeben. Die Probe wurde unter Rückfluss 15 Minuten bei einer Temperatur von 70°C im Wasserbad erhitzt.

Nach dem Abkühlen der einzelnen Proben wurde das aufgekochte Material mittels eines Faltenfilters filtriert, bis eine klare Lösung entstanden war. Die Probe mit der klaren Flüssigkeit wurde in einen Erlenmeyerkolben überführt und am Vakuumrotationsverdampfer bei 42°C eingedampft. Der rotierende Erlenmeyerkolben mit der Probe wurde hierzu in ein Heizbad eingetaucht und der Druck nachfolgend schrittweise von 300 mbar auf ca. 60 mbar gesenkt. Es war darauf zu achten, dass die Probe nicht vollständig bis zur Trocknung eingengt wurde. Die Rotation des Kolbens war dafür verantwortlich, dass das Methanol verdampfen und in den Kühler aufströmen konnte. Der Lösungsmitteldampf kondensierte an der Kühlfläche und tropfte anschließend in einen Auffangkolben. Übrig blieb ein feiner Film an der Innenwand des Kolbens. Die eingedampfte Probe wurde in acht Milliliter destilliertes Wasser (Aqua dest.) aufgenommen und im Ultraschallbad, so gut wie möglich, gelöst. Im Anschluss wurde die homogene Flüssigkeit in ein 50 Milliliter Falkonröhrchen überführt und fünfmal nach dem gleichen Prinzip mit acht Millilitern Ethylacetat ausgeschüttelt, wobei eine deutliche Phasentrennung beobachtet werden konnte. Die obere Phase wurde mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgesaugt und in einen 50 ml Rundkolben überführt. Das Leergewicht des Rundkolbens musste zuvor genau bestimmt werden, um das Gewicht der Ausbeute im Anschluss genau festlegen zu können. Ein erneutes Eindampfen der Probe im Vakuumrotationsverdampfer war vonnöten. Diesmal wurde allerdings mit einem höheren Druck begonnen, der dann von ca. 400 mbar auf 60 mbar gesenkt werden sollte.

Bis zum darauf folgenden Tag erfolgte die Nachtrocknung der Probe im Exsikkator. Dabei wurde versucht, die Probe stets dunkel zu lagern. Nach 24 Stunden wurde das Gewicht des Kolbens bestimmt und das Kolbennettogewicht, dessen Bestimmung zuvor stattfand, davon subtrahiert. Pro 100 mg Extrakt wurden 1000 µl Ethanol (EtOH) zugegeben und die Probe erneut in diesem Alkohol mittels Ultraschallbad gelöst.

Tab. 5: Wurzelaltersstufen – Ausbeute im Vergleich

Altersstufe	Erntedatum	Wurzelausbeute	Methanolzugabe	Rohextrakt
„junge“ Wurzel - 3 Wochen alt	Januar 2008	15 Gramm	124 ml Methanol	1416 µl
„mittlere“ Wurzel - 6 Wochen alt	Januar 2008	14 Gramm	133 ml Methanol	1190 µl
„alte“ Wurzel - 12 Wochen alt	März 2008	27 Gramm	239 ml Methanol	2120 µl

3.2.3 Zelllinien

Die MCF7-Zelllinie weist sowohl Estrogenrezeptoren vom Typ α , als auch vom Typ β auf, während die BT20-Zelllinie keine Estrogenrezeptoren besitzt. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff aufbewahrt und hierfür mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) und 20% fetalem Kälberserum (FKS) versetzt. Eine Lagerung war so bei $-187\text{ }^{\circ}\text{C}$ in flüssigem Stickstoff möglich.

3.2.3.1 Medium der Zellkulturen

Als Zellkulturmedium für die Zelllinie MCF7 wurde das DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) verwendet. Eine Kultivierung der estrogenrezeptornegativen BT20-Zelllinie fand in RPMI statt. Jedes Zellkulturmedium wurde mit 10% fetalem Kälberserum (FKS), (somit 50 ml FKS auf 500 ml Zellkulturmedium) und 2 ml Amphotericin und 2,5 ml Penicillin/Streptomycin versetzt. Das Amphotericin B bzw. das Antibiotikum sollte als Zusatz im Medium einen möglichen Pilz-/Bakterienbefall unterdrücken.

3.2.3.2 Kultivierung der Zellen

Die eingefrorenen Zellen (1,5 ml Eppendorfröhrchen), entnommen aus dem Stickstoff, überführte man in ein 50 ml Falkonröhrchen. Nach Zugabe von ca. 10 ml Medium (entsprechend der jeweiligen Zellreihe) wurde das Röhrchen bei 1000 Umdrehungen fünf Minuten in der Zentrifuge zentrifugiert. Hierbei war es wichtig, die "Soft"-Funktion der Zentrifuge zu aktivieren, um das abrupte Abstoppen der Zellsuspension zu vermeiden. Der Überstand des Falkonröhrchens wurde abdekantiert und das Pallet am Boden des Röhrchens in 5 ml frisches Medium aufgenommen und mithilfe des Vortexers resuspendiert. DMSO sollte aus der Zellsuspension entfernt werden, da es eine zytotoxische Wirkung auf die Zellen ausüben könnte.

Die Zellen wurden in den Kulturflaschen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Dreimal wöchentlich fand ein Mediumwechsel statt. Dabei wurden je nach Größe der Kulturflasche (25cm^2 , 75cm^2 , 150cm^2) 5 ml, 15 ml oder 25 ml abpipettiert bzw. verworfen und darauf folgend frisches Medium hinzugegeben. War die Fläche des Kulturflaschenbodens zu ca. 80% bewachsen, wurden die jeweiligen Zellen passagiert und in die nächst größere Kulturflasche überführt. Um die Zellen passagieren zu können, erfolgte ein Abpipettieren des Zellkulturmediums und die Zugabe von 5 ml Phosphate buffered saline (PBS). Bei dem Passagieren der Zellen hatte das PBS eine reinigende Wirkung, so dass das FKS ausgewaschen wurde. Anschließend wurde das PBS abpipettiert und ebenfalls verworfen.

Durch die weitere Zugabe von Trypsin wurden die adhärenen Zellen am Boden der Kulturflasche gelöst, da Trypsin die Peptidbindung der Zellen spaltete. Ein lang andauerndes Einwirken mit Trypsin war zu vermeiden, da die Zellen sonst durch die Trypsineinwirkung geschädigt werden konnten. Um die Wirkung von Trypsin zu verstärken, wurde die Flasche bei 37°C für 5-10 Minuten im Brutschrank inkubiert. Die BT20-Zelle benötigte insgesamt eine längere Zeit von ca. 15 Minuten, bis sich die Zellen vollständig vom Boden der Flasche gelöst hatten. Verschiedene Versuchsansätze hatten gezeigt, dass die Zugabe von Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA) zu dem Trypsin eine positivere Wirkung erzielte, da so ein Verklumpen der Zellen verringert wurde.

Hatten sich die Zellen vollständig vom Boden gelöst (eine Kontrolle mit dem Lichtmikroskop war möglich), wurden ca. 10 ml des jeweiligen Mediums hinzugegeben, um die Trypsinreaktion abzustoppen. Die Suspension konnte in ein Falconröhrchen überführt und anschließend erneut bei 1000 Umdrehungen für 5 Minuten zentrifugiert werden. Der Überstand konnte erneut vorsichtig verworfen werden; das Pallet am Boden des Röhrchens sollte im Röhrchen verbleiben. Dabei war darauf zu achten, das Pallet nicht mit dem Überstand zu entsorgen. Nach erneutem Aufnehmen in 20 ml Medium und vortexen der Suspension konnte die nächst größere Kulturflasche verwendet werden.

Die Flaschen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

3.2.3.3 Zellzählung - Bestimmung der Lebendzellzahl

Für die nachfolgenden Versuche wurde die Lebendzellzahl mithilfe der Bürker-Zählkammer (*Abb. 13*) auf 500.000 Zellen eingestellt. Für die Immunhistochemie benötigte man stattdessen jedoch 100.000-150.000 Zellen/ml.

Zur Zählung wurden 360 µl Medium und 20 µl Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau (Verdünnung 1:20) versetzt. Trypanblau, auch als 3,3'-Dimethyl-4,4'-bis(5-amino-4-hydroxy-2,7-disulfonaphtyl-3-azo)-[1,1'-biphenyl] bezeichnet, ist ein anionischer Diazofarbstoff. Diese Substanz konnte ausschließlich von toten Zellen aufgenommen werden, deren Zellmembran zerstört war. Die Zellen wurden so blau gefärbt. Vitale Zellen nahmen den Farbstoff nicht auf (*Theil 2010*).

Die Bürker-Zählkammer konnte mit 20 µl trypanblau-gefärbter Zellsuspension befüllt werden, nachdem Newton'sche Ringe beim Aufsetzen des Deckglases unter leicht ausgeübten Druck auf das Glas zu sehen waren. Auf beiden Seiten der Zählkammer wurden vitale Zellen in je 25 Quadraten ausgezählt; tote blaue Zellen wurden dabei vernachlässigt. Es war üblich bei der Auszählung eines Quadrates nur die Zellen auf zwei Grenzlinien (z. B. oben und links,

siehe **Abb. 13** rot markiert) mitzuzählen und die auf den anderen beiden Linien liegenden Zellen zu vernachlässigen.

Die Lebendzellzahl konnte so nach folgender Berechnung erfolgen:

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

Dementsprechend verdünnte man die Zellsuspension, um am Ende eine Zellzahl von 500.000 Zellen zu erreichen.

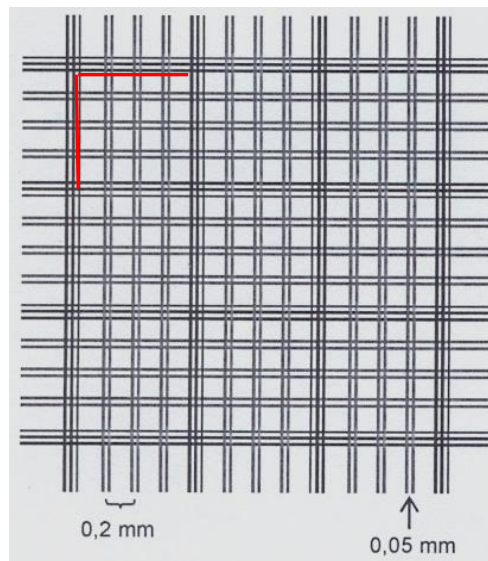
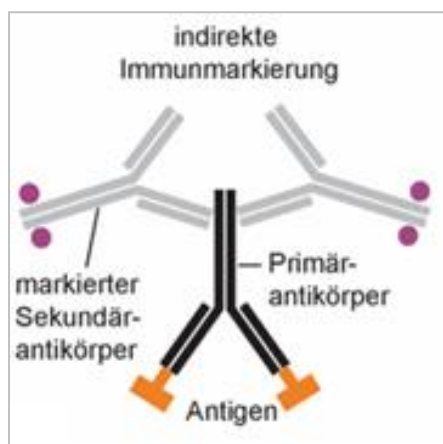


Abb. 13: Bürker-Zählkammer
(Quelle: Szewczyk 2007)

3.2.4 Charakterisierung der Zellen – die Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist eine Nachweismethode, um die Zellen anhand ihres Rezeptorstatus charakterisieren zu können. Durch diese Methode ist es möglich, das Vorhandensein von Hormonrezeptoren aufzuzeigen. In diesem Fall sollte die Immunhistochemie an den MCF7- und BT20-Zellen zeigen, mit welchen Rezeptoren die Mammakarzinomzellen bestückt waren. Diese Methode diente hierbei lediglich als Kontrolle, um die Zellbeschaffenheit auf estrogenrezeptorpositive und estrogenrezeptornegative Eigenschaften zu überprüfen. Zusätzlich wurde die Zelle auf das Vorhandensein eines Progesteronrezeptors untersucht. Das Prinzip der hier verwendeten Methode wird in **Abb. 14** dargestellt.



Primärantikörper:

Maus-Antikörper (ER α , β und PR)

Sekundärantikörper:

Anti-Maus/Anti-Hase (Peroxidase-gekoppelt)

Abb. 14: Prinzip der immunhistochemischen Methode
(Quelle: *Mulisch 2014*)

Durchführung

Wie schon unter 3.2.3.2 erläutert, wurden Zellen beider Zelllinien aus der Zellkulturflasche gelöst, abzentrifugiert, erneut in DMEM/RPMI aufgeschwemmt und wiederholt abzentrifugiert, um jegliche Trypsinbestandteile auswaschen zu können. Nach nochmaliger Zugabe von 10 ml DMEM bzw. RPMI erfolgte die Zählung der Zellen analog 3.2.3.3 und die Einstellung der Zellsuspension auf eine Zellzahl von 100.000 bis 150.000 Zellen/ml.

Auf einer 24er-Wellplatte wurden acht Wells mit je 300 μ l bestückt und über Nacht in einer PBS-befeuchteten Kammer im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Am Folgetag erfolgte unter dem Mikroskop eine Begutachtung, ob eine Adhäsion der Zellen an den Wellboden stattgefunden hatte. War dies der Fall, so konnte mit dem Experiment fortgefahren werden; andernfalls verweilten die Zellen eine weitere Nacht im Brutschrank, um eine Adhäsion der Zellen zu garantieren.

Das Medium in den Wells wurde abdekantiert und die Vertiefungen mit PBS gespült. Mittels

Formalin (Formafix 4%) wurden die Zellen am Boden der Wellplatte fixiert, wobei das Formalin für ca. 20 Minuten auf die Zellen einwirkte. Nachdem die Formalinflüssigkeit abdekantiert wurde, sollte jedes Well für fünf Minuten mit PBS gespült werden. Hierbei war es notwendig, die Platte gelegentlich zu schwenken, damit PBS seine Wirkung voll entfalten konnte. Für 30 Minuten wurden die Zellen mit 0,3% H₂O₂ bestückt, um die Peroxidaseaktivität der Zellen auszuschalten. Als Zwischenschritt erfolgte ein erneutes Waschen mit PBS. Anschließend wurden zwei bis vier Tropfen eines Pferdeserums (Normalserum, Horseserum) in jedes Well pipettiert, das nun für mindestens 20 Minuten auf den Zellen inkubieren sollte. Nach diesem Arbeitsschritt wurde der Überstand verworfen. 100 µl bzw. 2 Tropfen des jeweiligen Antikörpers (Primärantikörper, ER α/β und PR (Mausantikörper)) wurden in je zwei untereinanderliegende Wells geträufelt. Die verbliebenen zwei Wells wurden als Negativkontrolle mitgeführt und mit verdünntem Pferdeserum beschichtet. Hierbei war es wichtig, dass der Primärantikörper im Kühlschrank bei ca. 4°C über Nacht inkubierte.

Am dritten Versuchstag wurde der Überstand der Wells abgekippt und das Well anschließend dreimal hintereinander mit PBS gewaschen. In Folge wurde der sekundäre Antikörper aufgetragen (ImmPRESS reagent, Anti-Maus/Hase, jeweils 2-4 Tropfen pro Well), wobei es wichtig war, eine Inkubationszeit von 30-45 Minuten einzuhalten. Dieser sekundäre Antikörper, welcher mit einer Peroxidase gekoppelt ist, bindet sich an den Primär-Antikörper. Nach anschließendem dreimaligem Spülen mit PBS wurden je 3-5 Tropfen des Reagenzes „LinRed“ aufgetragen und 5-30 Minuten bei Raumtemperatur auf der Wellplatte belassen.

Die Färbereaktion, welche als rot-bräunlicher Farbumschlag sichtbar wird, entsteht durch die Reaktion von der Peroxidase mit der LinRed-Lösung. Unter dem Lichtmikroskop konnte die Farbänderung beobachtet und bei abgelaufener Reaktion mit Leitungswasser abgestoppt werden. Eine lichtmikroskopische Fotoaufnahme diente dazu, die Farbreaktion festhalten zu können.

3.2.5 Testverfahren

Mithilfe verschiedener Bioassays, die bei dieser Arbeit eingesetzt wurden, konnte die Zytotoxizität, die Viabilität bzw. die Proliferation der einzelnen Zelllinien ermittelt werden. Der LDH-Test (Laktatdehydrogenasetest) diente der Berechnung der Zytotoxizität, der MTT-Test wurde als Viabilitätstest und der BrdU-Test (Bromdesoxyuridintest) als Proliferationstest eingesetzt. Ein zusätzlich eingesetzter Viabilitätstest (CellTiter-Blue[®]) konnte hierbei unterstützend Ergebnisse untermauern.

3.2.5.1 LDH – Test (Zytotoxizitätstest)

Testprinzip

Das Schlüsselenzym in diesem Test stellt die Laktatdehydrogenase dar, die als zytoplasmatisches Enzym in jeder Zelle vorzufinden ist. Macht man sich das Austreten des Enzyms aus der Zelle bei einem Zellschaden zugute, so kann die Enzymquantität im Zellüberstand gemessen werden. Bei der Umwandlung von Laktat zu Pyruvat wird gleichzeitig das Coenzym NAD⁺ zu NADH/H⁺ reduziert. Im zweiten Teilschritt der Reaktion überträgt ein weiteres Enzym, die Diaphorase, H/H⁺ von NADH/H⁺ auf ein Tetrazoliums Salz, welches so zu Formazan reduziert wird. NADH/H⁺ wird dabei zu NAD⁺ oxidiert.

Das Reaktionsprodukt Formazan kann bei 492 nm (Referenzwert 620 nm) im ELISA-Reader gemessen werden. Die Menge an entstandenem Formazan ist proportional zu dem Zellschaden, d. h. zur LDH-Aktivität (*Roche Applied Science, Testkitanleitung LDH, 2005*), (*Abb. 15*).

Zur Veranschaulichung ist die ablaufende Reaktion noch einmal schematisch dargestellt:

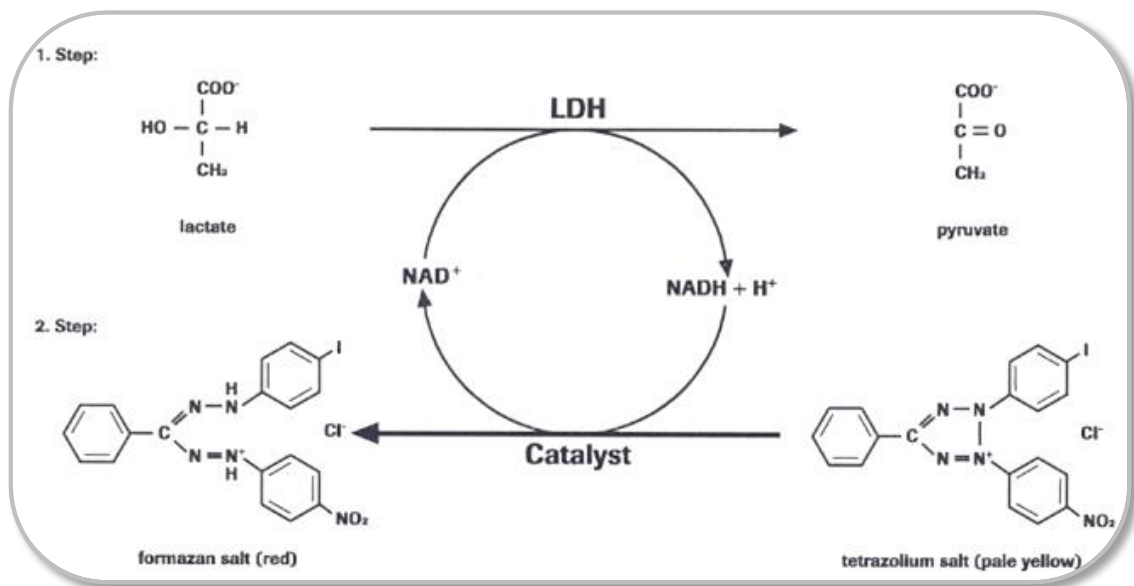


Abb. 15: Reaktionsschema des LDH-Tests
 (Quelle: *Roche Applied Science, Testkitanleitung LDH, 2005*)

Versuchsdurchführung (zwei Testdurchläufe wurden durchgeführt):

Eine 96er-Wellplatte wurde zum einen mit den Leinwurzelextraktkonzentrationen, zum anderen mit einer Tamoxifen-/Estradiolkonzentration bestückt. Tamoxifen in der Konzentration 10⁻² µg/ml und Estradiol in der Konzentration 10⁻⁷ µg/ml wurden mitgeführt, um die Leinwurzelextraktwirkung mit diesen synthetisierten Stoffen vergleichen zu können.

Triton X-100 diente dem LDH-Test als High control, da der gemessene Wert mit 100%

Zellschaden gleichgesetzt wurde und somit den maximal möglichen Zellschaden mit maximal gemessener LDH-Aktivität im Überstand verkörperte.

Tag 1

1. War unter dem Mikroskop eine ausreichende Anzahl an Zellen (Flasche sollte ca. zu 80% mit Zellen bedeckt sein) vorhanden, so wurde die Lebendzellzahl in der Kulturflasche analog 3.2.3.3 bestimmt, so dass die Zellzahl auf 5×10^5 Zellen/ml eingestellt werden konnte. Zur Verdünnung der Suspension wurden die MCF7-Zellen in DMEM aufgenommen, BT20-Zellen benötigen als Medium RPMI.
2. Jedes Well einer 96er-Platte wurde mit 100 µl der Zellsuspension bestückt.
3. Eine Inkubation für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ war nötig.

Tab. 6: Bestückungsschema der 96er-Well-Platten

Die Wellplatte wurde nach folgendem Prinzip bestückt (gilt nur für den LDH-Test und CellTiter-Blue, weitere Tests wurden ohne Tamoxifen/Estradiol in den genannten Konzentrationen durchgeführt):

--	E1	E 2	E3	E 4	E 5	E 6	E 7	E 8	9	10	--
--	0,01	0,1	1	10	50	100	500	1000	K1	K2	--
--	0,01	0,1	1	10	50	100	500	1000	K1	K2	--
--	0,01	0,1	1	10	50	100	500	1000	K1	K2	--
--	0,01	0,1	1	10	50	100	500	1000	K1	K2	--
--											--
--	M	M	M	M		T	T	T	T		--
--	Triton	Triton	Triton	Triton		E	E	E	E		--
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

E1-8: Extraktkonzentrationen in µg/ml

M: Medium

T: Tamoxifen: 10^{-2} µg/ml

E: Estradiol: 10^{-7} µg/ml

Triton: High control Triton X-100

(1% Triton in jeweiligem Medium)

K 1: Kontrolle 1: Zellen + Ethanol

(96% unvergällt)

K 2: Kontrolle 2: Zellen + Medium

Tag 2

1. Waren die Zellen adhärent zur Wellplatte geworden, fand ein Mediumwechsel statt. Hier kam das 1%ige FKS-Medium zum Einsatz (Reduzierung des FKS, da dieses selbst LDH-Aktivität hat), wobei die 100 µl durch 198 µl DMEM bzw. RPMI ersetzt wurden.
2. Die 198 µl wurden mit 2 µl der jeweiligen Extraktkonzentration (bzw. Tamoxifen- und Estradiolkonzentration) ergänzt.
3. Zugesezt wurden auch:

bei der High control: jeweils 2 µl Triton X-100, bei der Kontrolle 1: 2 µl Ethanol (96% unvergällt), bei Kontrolle 2: 2 µl des Mediums (Negativkontrollen)

4. Es folgte eine erneute Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ für 24 Std.

Tag 3

1. 100 µl des Überstandes wurden nach dem gleichen Auftragsprinzip in eine neue Wellplatte pipettiert.
2. Eine Zugabe von 100 µl Well Reaction Mixture erfolgte; bei Dunkelheit fand für ca. 10-30 Minuten eine Inkubation bei Raumtemperatur statt. Die Well Reaction Mixture wurde, wie in der Roche-Anleitung dargestellt, angesetzt.
3. Bei ausreichender Farbreaktion erfolgte ein Abstoppen der Reaktion mit 50 µl 1M HCL.
4. Eine Messung der Proben fand im ELISA-Reader (492 nm, Referenz 620 nm) statt.

Berechnung der Zytotoxizität:

$$\text{Zytotoxizität (\%)} = \frac{\text{Extinktion}_{\text{Probe}} - \text{Extinktion}_{\text{Kontrolle1}}}{\text{Extinktion}_{\text{High control}} - \text{Extinktion}_{\text{Kontrolle2}}} \times 100$$

3.2.5.2 MTT – Test (Viabilitätstest)

Testprinzip

Der MTT-Test beruht auf dem Prinzip, das ein gelbes, wasserlösliches 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in vitalen Zellen in einen wasserunlöslichen chemischen Stoff umgewandelt wird – das Formazan (**Abb. 16**). Dieser Farbstoff ist charakterisiert durch eine violette Färbung, wobei die Intensität der Färbung proportional zur Anzahl der vitalen Zellen ist. Die Absorption dieses Stoffes wird abschließend bei einer Wellenlänge von 560-600 nm im ELISA-Reader bestimmt. Die Reduktion des Tetrazoliumsalses findet nicht nur auf mitochondrialer Ebene statt, wobei Succinat als Substrat durch die Succinatdehydrogenase genutzt wird, sondern erfolgt ebenfalls extramitochondrial. Hierbei dienen NADH und NADPH den Enzymen in den Endosomen und Lysosomen als Cofaktoren (*Roche Applied Science, Testkitanleitung MTT, 2005; Berridge and Tan 1993; Berridge et al. 2005*).

Versuchsdurchführung:

Tag 1

1. Die Zellsuspension mit 500.000 Zellen/ml wurde auf der 96er-Wellplatte analog dem ähnlichen Prinzip, wie es bereits im LDH-Test beschrieben ist, ausgesät. Triton X-100

als Highcontrol war für den MTT-Test nicht vonnöten und wurde aus dem Schema gestrichen.

2. Pro Well wurden 100 µl der Zellsuspension (10% FKS) für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Tag 2

1. Es fand ein Mediumwechsel statt, die 100 µl Überstand wurden abpipettiert. Die Zellen, die bereits am Boden der Wellplatte adhärent geworden waren, sollten hierbei durch die Pipettenspitze nicht beschädigt werden. Erneut wurden 99 µl Medium (mit 10% FKS) hinzugeben und 1 µl des Extraktes hinzugefügt.
2. Unter gleichen Bedingungen fand eine Inkubation der Platten für 24 Stunden statt.

Tag 3

1. Nach 24-stündiger Inkubation wurden 10 µl MTT-Reagenz 1 pro Well hinzugeben und alles für weitere 4 Stunden inkubiert.
2. Anschließend erfolgte eine Zugabe von 100 µl MTT-Reagenz 2 pro Well und eine wiederholte Inkubation für 24 Stunden.

Tag 4

1. Die Messung der Zellkulturplatten erfolgte bei 570 nm (Referenz 620) im ELISA-Reader.

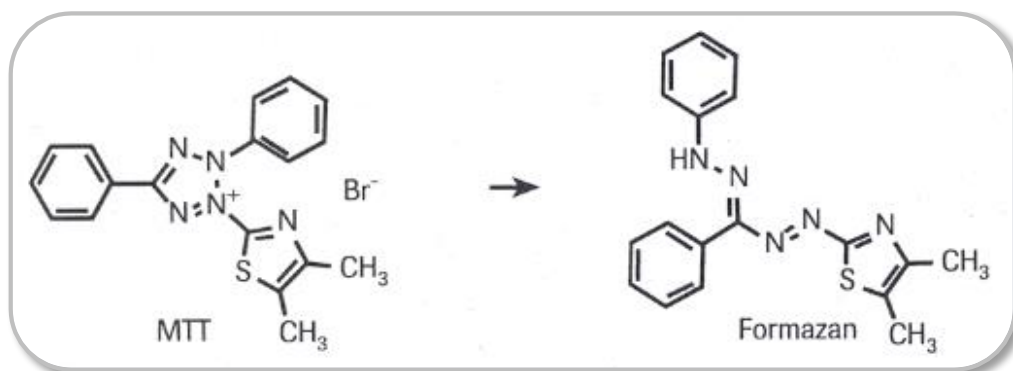


Abb. 16: Reaktionsschema des MTT-Tests
(Quelle: Roche Applied Science, Testkitanleitung MTT, 2005)

Berechnung der Zellviabilität:

$$\text{Zellviabilität (\%)}: \quad \frac{\text{Extinktion Probe}}{\text{Extinktion Kontrolle 1}} \times 100$$

3.2.5.3 BrdU-Test (Proliferationstest)

Testprinzip

Der Bromdesoxyuridintest dient in der Immunologie als Proliferationstest. Bei Bromdesoxyuridin handelt es sich um ein Thymidinanalogon, das anstelle von Thymidin in die DNA proliferierender Zellen während der S-Phase (Synthesephase) des Zellzyklus eingebaut werden kann. Das Testprinzip beruht auf der Fixation der Zellen und anschließender Denaturierung des DNA-Doppelstranges, um dann eine Bindung des Antikörpers (Anti-Bromdesoxyuridinantikörper) an das Bromdesoxyuridin zu ermöglichen. Es handelt sich um einen monoklonalen Antikörper von Maus-Maus-Hybridzellen, der mit einer Peroxidase konjugiert ist (Anti-BrdU-POD). Ein Substrat bindet an diesen Antikörper (Tetramethylbenzidin) und kann den Immunkomplex mittels einer Farbreaktion darstellen. Auch bei diesem Test wurde die Absorption im ELISA-Reader bei 450 nm (Referenz 620 nm) gemessen (*Roche Applied Science, Testkitanleitung BrdU, 2007*). Im Jahre 1985 wurde bereits dieser Immunoassay beschrieben, bei dem BrdU in die DNA eingebaut wurde, wobei dieses proportional zur Quantität neu synthetisierter DNA stand (*Porstmann et al. 1985*).

Versuchsdurchführung:

Tag 1

1. Pro Well wurden 100 µl Zellsuspension auf eine 96er-Wellplatte ausgesät, wobei man hier die Zellzahl auf 500.000 Zellen/ml einstellte. Zum Ansetzen der Zellsuspension diente DMEM bzw. RPMI versetzt mit 10% FKS.
2. Die Wellplatten wurden bei 37°C und 5% CO₂ für 24 Stunden inkubiert.

Tag 2

1. In jede Vertiefung der Wellplatte wurden 1 µl Extrakt hinzugegeben (nach dem oben angegebenen abgewandelten Schema). Es fand hierbei kein Mediumwechsel statt. Es erfolgte eine Inkubation für 24 Stunden.

Tag 3

1. Mithilfe des Testkits von Roche (Flasche 1) wurde die gewünschte Menge der Markierungslösung hergestellt. Zur erforderlichen Verdünnung von 1:100 nutzte man steriles Medium (je nach Zelllinie DMEM bzw. RPMI). Eine Zugabe von 10 µl BrdU-Markierungslösung erfolgte in jede Wellvertiefung.

2. Für MCF7- und BT20-Zellen wurde eine Inkubationszeit von 3 Stunden eingehalten.
3. Ein Entfernen des Mediums erfolgte nach 3 Stunden durch Abklopfen der Platte auf Zellstoff.
4. Als nächstes schloss sich die Zugabe von 200 µl Fix Denat (Roche Testkit Flasche 2) und eine erneute Inkubation von 30 Minuten bei Raumtemperatur an.
5. Nachdem das Fix Denat durch Abklopfen auf Zellstoff entfernt wurde, konnte die Antikörperlösung (Anti-BrdU-POD-Solution, Flasche 3) hergestellt werden. Auch hier war eine Verdünnung von 1:100 mit Flasche 4 nötig. 100 µl dieser hergestellten Lösung wurden in jedes Well gegeben und für 60 Minuten bei identischen Bedingungen (wie oben bereits beschrieben) inkubiert.
6. Nach Entfernen der Antikörperlösung wurde jede 96er-Wellplatte dreimal mit je 200-250 µl einer Waschlösung gespült (Flasche 5 in 1:10 Verdünnung mit destilliertem Wasser).
7. Nachdem die Waschschritte beendet waren, wurden 100 µl einer Substratsolution (Flasche 6) hinzugefügt. Eine erneute Inkubation von 15-30 Minuten bei Raumtemperatur war hierbei Bedingung. Es war wichtig, dass bei diesem Schritt auf die entstehende Färbung und deren Intensität geachtet wurde.
8. Abgestoppt wurde die Farbreaktion mit 25 µl 1 molarer H₂SO₄; ein Farbumschlag ins gelbe war zu beobachten.
9. Im ELISA-Reader fand eine Messung der Zellkulturplatten bei 450 nm (Referenz 620 nm) statt.

Berechnung der Zellproliferation:

$$\text{Zellproliferation (\%)}: \frac{\text{Extinktion Probe}}{\text{Extinktion Kontrolle 1}} \times 100$$

3.2.5.4 CellTiter-Blue (Viabilitätstest)

Der CellTiter-Blue[®] Viabilitätstest basiert auf der Umwandlung von Resazurin in Resorufin, welches von vitalen Zellen synthetisiert wird (*Abb. 17*). Resorufin kann mittels ELISA-Reader bestimmt werden und verhält sich proportional lebender Zellen, die sich in jedem Well der 96er-Platte befinden. Resorufin wird dabei durch eine pinkfarbene Fluoreszenz sichtbar. Eine Reduktion von Resazurin in der Zelle wird durch zytosolische, mikrosomale oder mitochondriale Enzyme ermöglicht (*Promega Assaybeschreibung 2003*).

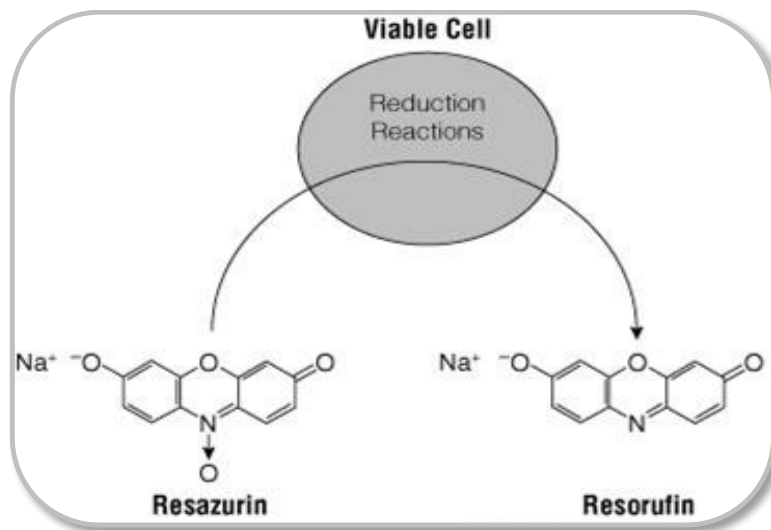


Abb. 17: Reaktionsschema des CellTiter-Blue[®] Viabilityassays
(Quelle: *Promega Assaybeschreibung 2003*)

Versuchsdurchführung

1. Tag

1. Wie auch zuvor in den übrigen Tests durchgeführt, wurden auch hier in jedes Well der ELISA-Platte (96er-Wellplatte) 100 µl der Zellsuspension (zum einen die mit MCF7-Zellen, zum anderen eine Zellsuspension, die BT20-Zellen beinhaltet) gegeben.
2. Eine Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ für 24 Stunden war nötig.

2. Tag

1. Am folgenden Tag, nachdem die Zellen am Boden jedes Wells adhärent geworden waren, wurde 1 µl des Extraktes in der jeweiligen Konzentration (s.o.) hinzupipettiert. Ebenfalls wurde Tamoxifen in der Konzentration 10⁻² µg/ml und Estradiol in der Konzentration 10⁻⁷ µg/ml mitgeführt.

2. Wiederum wurden die Zellen für 24 Stunden bei gleichen Bedingungen inkubiert.

3. Tag

1. Aus jedem Well wurden 38 µl des Überstandes herauspipettiert und verworfen, so dass letztendlich unter Berücksichtigung der stattfindenden Verdunstung im Brutschrank 50 µl in jedem Well verblieben.
2. Anschließend fand eine Zugabe von 10 µl Reagenz pro Well statt.
3. Nach 1 Std 45 min bzw. 2 Std 15 min fand eine Auswertung jeder Platte bei einer Wellenlänge von 570 nm bzw. 620 nm im ELISA-Reader statt.

Berechnung der Zellviabilität:

$$\text{Zellviabilität (\%)}: \quad \frac{\text{Extinktion}_{\text{Probe}}}{\text{Extinktion}_{\text{Kontrolle 1}}} \quad \times \quad 100$$

3.2.5.5 Pyrolyse-Feldionisation-Massenspektrometrie

Prinzip

Bei der Pyrolyse-Feldionisation-Massenspektrometrie (kurz: Py-FIMS) handelt es sich um ein Analyseverfahren, bei dem im Hochvakuum eine thermisch induzierte Freisetzung von Molekülen aus einem komplexen Stoffgemisch; hier die des Extraktes der verschiedenen Leinwurzelreifegrade, stattfindet. Hierbei wurden organische Bestandteile der Leinwurzel bei einer bestimmten Temperatur verflüchtigt (Schepler 2008). Ein bestimmtes Aliquot der Probenlösung (5 µl) wurde in einen Quarzziegel über eine Mikroliterspritze eingefüllt und bis zur Trocknung in einem Exsikkator gelagert. Anschließend wurde der Tiegel in den Mikroheizer der Probenschubstange transferiert und in die Ionenquelle des Finnigan MAT900 eingeführt. Nach der Positionierung der Probenschubstange in der Ionenquelle wurde der Tiegel mit der Probe schrittweise (10 K) von 50 bis 700°C erhitzt, wodurch die organischen Inhaltsstoffe thermisch desorbiert oder pyrolytisch gespalten und in die Ionenquelle freigesetzt wurden. Durch schonende Ionisierung in einem hohen elektrischen Feld (erzeugt zwischen FI Ermittler (+4,8 kV) und Gegenelektrode (-5,5 kV)), (Szewczyk 2007) wurden einfach positiv geladene Molekülonen generiert, die nach einer zielgerichteten Beschleunigung (Blenden in der Ionenquelle und Konversionsdynode) und Trennung (elektrostatisches und magnetisches Sektorfeld) an einem sekundären Elektronenvervielfältiger nach einer Signalverstärkung detektiert bzw. registriert wurden.

Pyrolyse-Feldionisation-Massenspektrometrie - Der Begriff Feldionisation beschreibt hier den Vorgang, dass einem Molekül ein Elektron entzogen wird (in einem hohen elektrischen Feld, Feldstärke $> 10^{10} \text{ Vx} \cdot \text{m}^{-1}$). Massenspektrometrie kennzeichnet ein Verfahren, welches dazu dient, die Masse eines Teilchens bestimmen zu können. Gemessen wurde hierbei auch das „Masse-zu-Ladung-Verhältnis“ der Moleküle (Schepler 2008).

Ziel des Verfahrens war es, Unterschiede in der molekular-chemischen Zusammensetzung der einzelnen Proben festzustellen. Dafür bietet sich insbesondere eine Zusammenfassung von Massensignalen (m/z -Signalen) zu Substanzklassen an. Durch dieses Verfahren kann bei bekannter Teilchenladung einerseits eine qualitative Bestimmung des jeweiligen Teilchens erfolgen, andererseits kann eine Bestimmung der Menge erfolgen (quantitative Bestimmung), (Schepler 2008). Möglicherweise lässt sich so auch ein Unterschied darstellen, welcher hervorbringen könnte, ob einzelne Substanzen der Leinwurzel jeweils in unterschiedlichen Reifegraden dominieren.

3.3 Statistik

Ein dreimaliger Ansatz jeglicher Testverfahren mit je vier Bestimmungen jeder Konzentration führte zur Ermittlung der dargestellten Ergebnisse. Aus den vier ermittelten Bestimmungen der Konzentrationen bzw. Kontrollen jeder Wellreihe wurde ein Mittelwert gebildet. Da jeder Test mindestens dreimal durchgeführt wurde, konnte so wiederum ein Mittelwert aller drei Einzeltestmittelwerte gebildet werden. Die Darstellung der Diagramme zeigt eine Standardabweichung auf, die durch diese Mittelwerte berechnet wurde. Es bestand bei dem CellTiter-Blue eine Ausnahme, dessen Durchführung sich auf drei Bestimmungen je Ansatz (insgesamt ebenfalls 3 Ansätze) beschränkte.

Bei dem Laktatdehydrogenasetest wurden zwei Testdurchläufe (siehe 3.2.5.1, ein Testdurchlauf mit Auftragen von Tamoxifen und Estradiol auf der Wellplatte) durchgeführt und die Ergebnisse im Nachhinein in einem Diagramm zusammengefasst.

Zur Bestimmung der Signifikanzen diente der Student's t-Test (Microsoft Excel), wobei ein berechneter Wert $p < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) als statistisch signifikant galt. Diese Signifikanz ist in dem jeweiligen Diagramm mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Ein möglicher signifikanter Wert wurde so zwischen den Mittelwerten jeder Extraktkonzentration (bzw. der Tamoxifen- oder Estradiolkonzentration) bezüglich der Kontrolle 1 (Negativkontrolle - Zellen mit Ethanol) ermittelt.

4 Ergebnisse

Der Ergebnisteil dieser Arbeit setzt sich aus den Ergebnissen der immunhistochemischen Untersuchung, den verschiedenen Bioassays LDH, MTT, BrdU, einem Viabilitätstest und der Pyrolyse-Feldionisation-Massenspektrometrie zusammen. Wie in dem Abschnitt „Material und Methoden“ bereits erwähnt, wurden abgesehen von Tamoxifen und Estradiol als Kontrollsubstanzen, verschiedene Konzentrationen des Leinwurzelextraktes auf ihre Wirkung hin untersucht. Zur besseren Veranschaulichung sollen hier noch einmal die verwendeten Leinwurzelextrakte genannt werden.

Leinwurzelextrakte:

3 Wochen alte Wurzel

6 Wochen alte Wurzel

12 Wochen alte Wurzel – Pflanze in Blütezeit

→ jeweils in den Konzentrationen 0,01µl, 0,1µl, 1µl, 10µl, 50µl, 100µl, 500µl, 1000µl

Als Synonyme für die 3, 6 und 12 Wochen alte Wurzel werden im weiteren Verlauf der Arbeit auch die Begriffe „junge“, „mittlere“ und „alte“ Wurzel verwendet.

4.1 Immunhistochemie

Die immunhistologischen Untersuchungen in dieser Versuchsreihe sollten zeigen, welchen Rezeptorstatus die zu untersuchenden Zelllinien aufwiesen. In der Onkologie ist dies von besonderer Bedeutung, da der Rezeptorstatus des Mammakarzinoms entscheidend für die Prognose und das weitere Vorgehen der Behandlung ist. Der Hormonrezeptorstatus entscheidet darüber, ob eine endokrine Therapie als Therapieoption in Frage kommen könnte. Für die Bioassays wurden hier zwei Zelllinien verwendet, zum einen die estrogenrezeptorpositive Mammakarzinomzelllinie MCF7, zum anderen die estrogenrezeptornegative Mammakarzinomzelllinie BT20. Die Immunhistochemie diente in diesem Fall lediglich dazu, den Hormonrezeptorstatus der Zellen zu überprüfen und zu bestätigen. Die Zelllinien wurden auf die Expression des Estrogenrezeptors alpha (α -ER) und beta (β -ER) bzw. auf die Expression eines Progesteronrezeptors (PR) überprüft.

Ein Pfeil (\longrightarrow) kennzeichnet die (z.T. LinRed markierte) Karzinomzelle

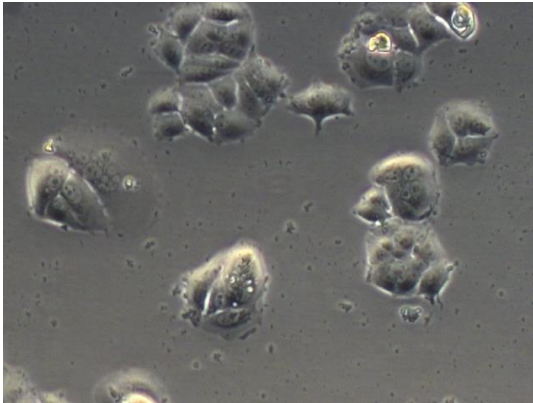


Abb. 18: Nativaufnahme MCF7-Zellen
(Vergrößerung 20x)

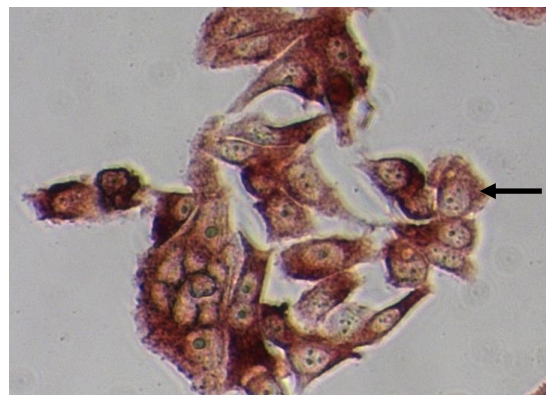


Abb. 19: MCF7-Zellen, α -ER, LinRed
positiv (Vergrößerung 20x)

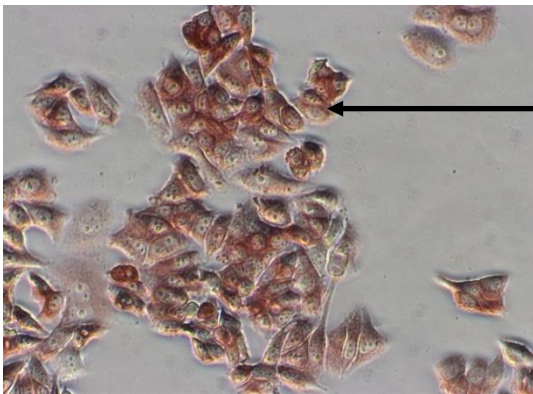


Abb. 20: MCF7-Zellen, β ER, LinRed
positiv (Vergrößerung 20x)

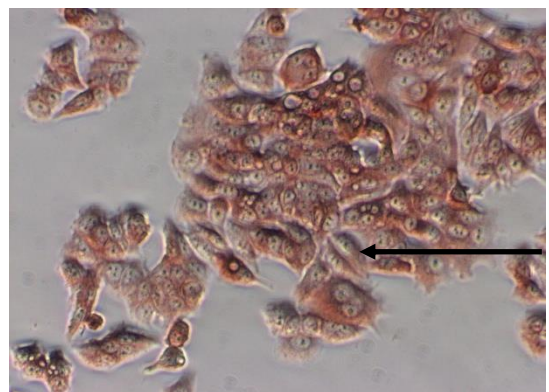


Abb. 21: MCF7-Zellen, PR, LinRed
positiv (Vergrößerung 20x)

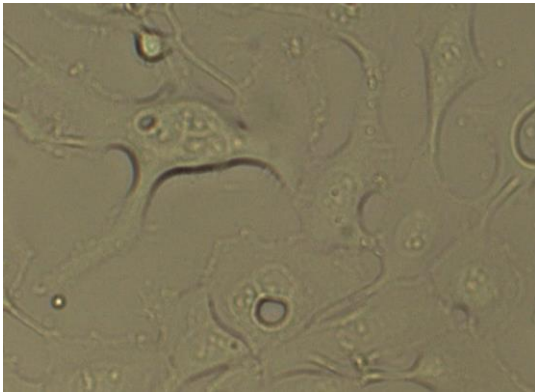


Abb. 22: Nativaufnahme BT20-Zellen
(Vergrößerung 32x)

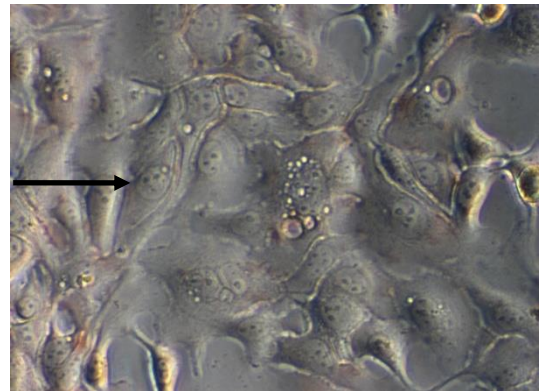


Abb. 23: BT20-Zellen: α ER, LinRed negativ (Vergrößerung 32x)

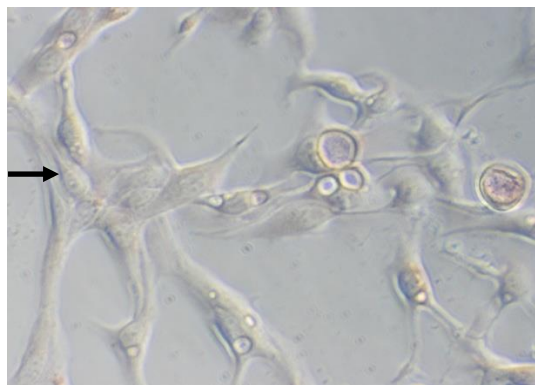


Abb. 24: BT20-Zellen: β ER, LinRed negativ (Vergrößerung 32x)

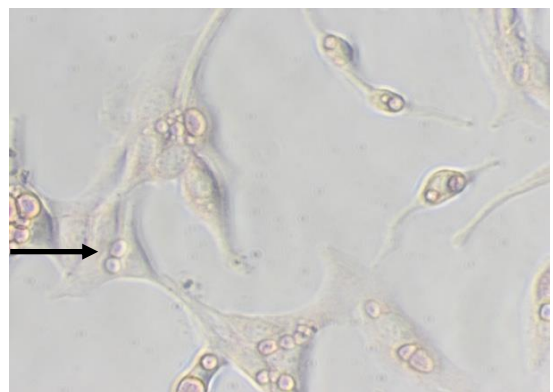


Abb. 25: BT20-Zellen, PR, Lin Red negativ (Vergrößerung 32x)

<p>Zusammenfassend: MCF7-Zellen: αER, βER, PR positiv BT20-Zellen: αER, βER, PR negativ</p>
--

Beide Zelllinien, schon ohne Anfärbung, deutlich in Morphologie und Koloniebildung different, wiesen einen unterschiedlichen Anfärbemechanismus auf. Morphologisch waren die MCF7-Zellen eher durch ein rundliches Aussehen und rasche Koloniebildung zu identifizieren, während die BT20-Zellen zu Zellausläufern und weniger rascher Koloniebildung neigten. Die MCF7-Zelllinie exprimierte sowohl einen α -, als auch einen β -Estrogenrezeptor, was in der immunhistochemischen Anfärbung durch eine deutliche braunrötliche Färbung der Zellen zu erkennen war. Sowohl der α -, der β -, als auch der Progesteronrezeptor waren durch die Rotfärbung der Zelle auf ihr Vorhandensein mit positiv zu bewerten.

Im Gegensatz dazu war der Rezeptorstatus der BT20-Zelllinie als estrogenrezeptornegativ zu bewerten. Rezeptoren, deren Vorkommen bei den Zellen untersucht wurde (α -ER, β -ER, Progesteronrezeptor), waren nicht nachweisbar; es war keine Rotfärbung in der Immunhistochemie zu beobachten. Eine leicht angedeutete rötliche Färbung war hier als negativ zu bewerten und erklärt sich durch ein unvollständiges Auswaschen des Farbstoffes.

4.2 Testverfahren

4.2.1 Laktatdehydrogenasetest (LDH-Test)

Wie in Abschnitt 3.2.5.1 bereits beschrieben, handelt es sich bei diesem Testmodell um einen Zytotoxizitätstest, bei dem als Reaktionsprodukt Formazan entsteht, welches proportional der Menge des Enzyms Laktatdehydrogenase gesetzt werden kann. Die Laktatdehydrogenase, welche als Maß für den bestehenden Zellschaden gilt, geht bei der Lyse der Zellen in den Zellüberstand bzw. das Medium über. Das Ausmaß der Schädigung bzw. der zytotoxischen Wirkung durch die Leinwurzelinhaltsstoffe konnte anhand dessen gut beurteilt und mit chemischen Substanzen, wie hier dem Tamoxifen (SERM), verglichen werden. Wie schon im oberen Kapitel genauer erläutert, spielt bei der Reaktion das Coenzym NAD bzw. NADH/H⁺ eine spezielle Rolle. Die gebildete Menge an dem Reaktionsprodukt Formazan wurde mit dem ELISA-Reader gemessen. Als Kontrollsubstanz diente Triton-X-100, welches 100% der möglichen Zytotoxizität angab. Durch Triton X-100 wurden die Mammakarzinomzellen lysiert, so dass anhand dessen die maximale LDH-Aktivität gemessen werden konnte (*Theil 2010*). Dargestellt in den Diagrammen Abb. 26 bis 32 werden die Unterschiede zwischen den beiden rezeptorverschiedenen Mammakarzinomzelllinien MCF7 und BT20 einerseits, aber auch die Ergebnisse der drei Leinwurzelsorten untereinander.

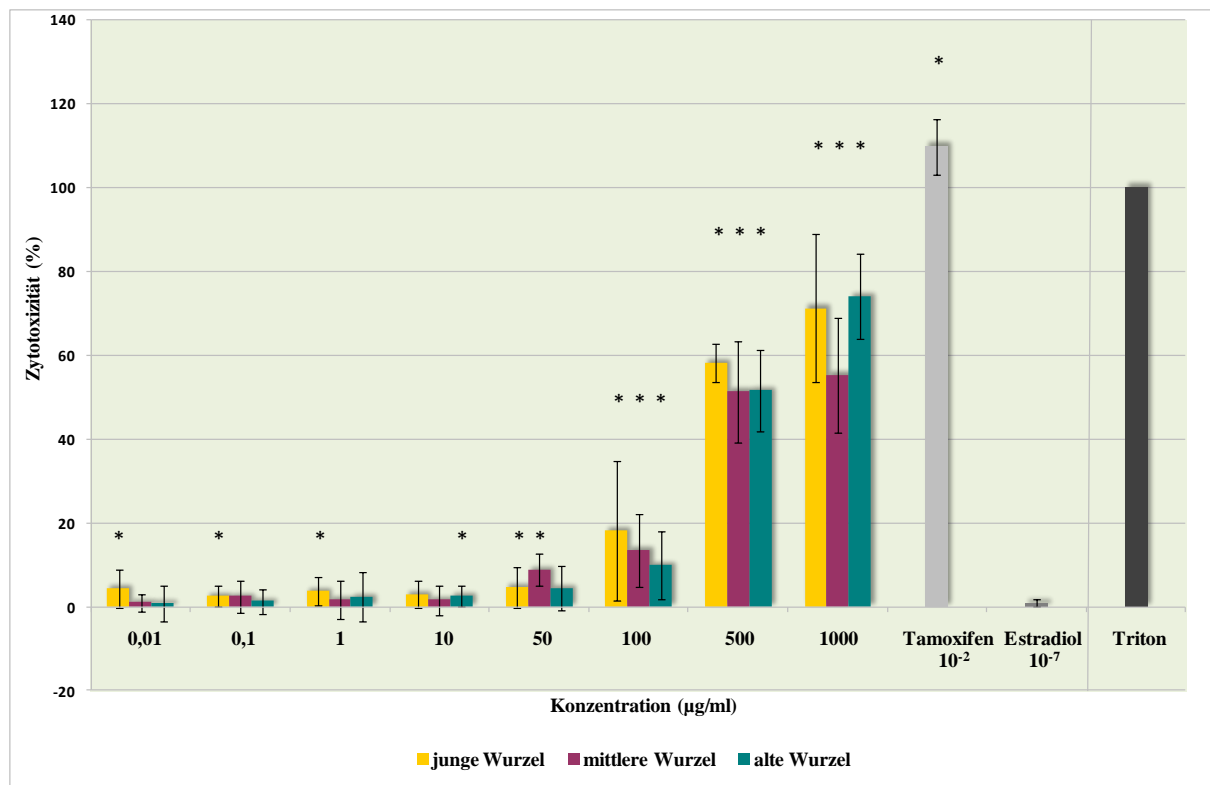


Abb. 26: LDH – Test: MCF7-Zelllinie - Vergleich zwischen den drei Wurzelaltersstufen
(Triton dient als Kontrollwert mit 100% Zytotoxizität, * = Signifikanz)

Diagramm Abb. 26 zeigt die zytotoxische Wirkung der verschiedenen Wurzelaltersstufen 3, 6 und 12 Wochen im Vergleich zur Wirkung des Triton-X-100. Triton wird in den folgenden Diagrammen zusätzlich aufgetragen, um die 100%-Maximalwirkung zu veranschaulichen. Es wird jedoch separat dargestellt, damit die Konzentrationsangabe µg/ml nicht irritiert. Analysiert wurde hier die Wirkung der verschiedenen Leinwurzelreifegrade anhand der estrogen- bzw. progesteronrezeptorpositiven Mammakarziomzelllinie MCF7. Die Ordinatenachse (beschriftet mit dem Begriff „Zytotoxizität“) steht für die Anzahl toter Zellen in Prozent. Aufgetragen auf der Abzisse sind u.a. die Konzentrationen der Leinwurzelextrakte in µg/ml. Wie oben in dem Diagramm dargestellt, wurde die Wirkung der Leinwurzel am Beispiel acht unterschiedlicher Konzentrationen getestet. Mit „Stern“ (*) gekennzeichnete Säulen im Diagramm sprechen für ein signifikantes Ergebnis in Bezug auf die Negativkontrolle 1 (Zellen mit Ethanol), das mittels des t-Tests (Microsoft Excel) statistisch berechnet wurde. Zusätzlich zu der High control Triton wurde die Wirkung des Selektiven-Estrogenrezeptor-Modulators Tamoxifen (10^{-2} µg/ml) und des Hormons Estradiol (10^{-7} µg/ml) getestet.

Bei den Konzentrationen 0,01µg/ml, 0,1µg/ml, 1µg/ml, 10µg/ml und 50µg/ml war keine bis nur geringe Zytotoxizität erkennbar. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den einzelnen

Altersstufen existierte hier ebenfalls nicht. Bei 100 µg/ml ist besonders durch die junge Wurzel ein geringer zytotoxischer Effekt ausgelöst worden.

Hohe Konzentrationen mit 500 µg/ml und 1000 µg/ml, im Diagramm ganz rechts erkennbar, visualisieren einen hohen zytotoxischen Effekt, der durch einen großen Anteil toter Zellen im Überstand charakterisiert wurde. Im Diagramm ist zwischen den niedrigeren Konzentrationen (100 µg/ml) und den höheren Konzentrationen ein „Sprung“ auf der Ordinatenachse sichtbar, da bei hohen Konzentrationen Prozentwerte von bis zu 70% erreicht wurden (bei 100 µg/ml dagegen nur ca. 20% Zytotoxizität bei jedoch relativ hoher Standardabweichung). Es wurden signifikante Werte bei allen Wurzelaltersstufen bei 500 µg/ml und 1000 µg/ml erreicht. Vergleicht man die Leinwurzelaltersstufen untereinander, so war ein markanter Unterschied zwischen den einzelnen Altersstufen zu sehen. Man kann festhalten, dass die junge Wurzel im Vergleich zur mittleren Wurzel eine höhere Zytotoxizität in den hohen Konzentrationen erreichte. Zusammenfassend ist zu sagen, dass vielversprechende Ergebnisse durch die junge Wurzel bei 500 µg/ml erzielt worden sind. Ebenso sind hohe Zytotoxizitäten bei der jungen und alten Wurzel in der höchsten Konzentration erreicht worden. Bei 1000 µg/ml war die geringste Wirkung durch das Extrakt der mittleren Wurzel zu verzeichnen.

Ein ganz anderes Ergebnis des Laktatdehydrogenasetests ist im Diagramm der BT20-Zelllinie (**Abb. 27**) zu beobachten. Achsenbeschriftungen und Aufmachung der Diagramme des LDH-Tests sind analog dem oben bereits erwähnten Diagramm gestaltet, aufgrund dessen wird im weiteren Verlauf der Erläuterung nicht erneut darauf eingegangen. Schon auf den ersten Blick ist zu sehen, dass besonders die junge Wurzelaltersstufe in Bezug auf die BT20-Zellen herausragte. Bei den hohen Konzentrationen wurden die höchsten zytotoxischen Werte durch die junge Leinwurzel erreicht. Signifikante Werte wurden hier bei der Konzentration 500 µg/ml und 1000 µg/ml erzielt (ca. 45% bzw. 55%). Im Vergleich dazu wurden bei 500 µg/ml durch die mittlere und alte Wurzel lediglich Werte unter 10% erzielt. Eine größere Differenz zeigten die drei Säulen bei 1000 µg/ml; diese lag zwischen der jungen Wurzel und den beiden anderen Wurzelaltersstufen bei über 40%. Insgesamt wurden vergleichsweise geringe Werte bei der 6 und 12 Wochen alten Leinwurzelaltersstufe ermittelt, wobei dabei noch die mittlere Wurzel eine geringfügig zytotoxischere Wirkung aufwies (500 µg/ml ca. 5%, 1000 µg/ml ca. 10%).

Bei beiden Zelllinien wurden gleich zu interpretierende Ergebnisse bei Tamoxifen und Estradiol erzielt. Die gemessene Zytotoxizität mit Tamoxifen als Zusatz war vergleichbar mit

der High control Triton und lag bei 85% bzw. 110%. Bei Estradiol wurde eine sehr geringe bzw. keine Zytotoxizität gemessen.

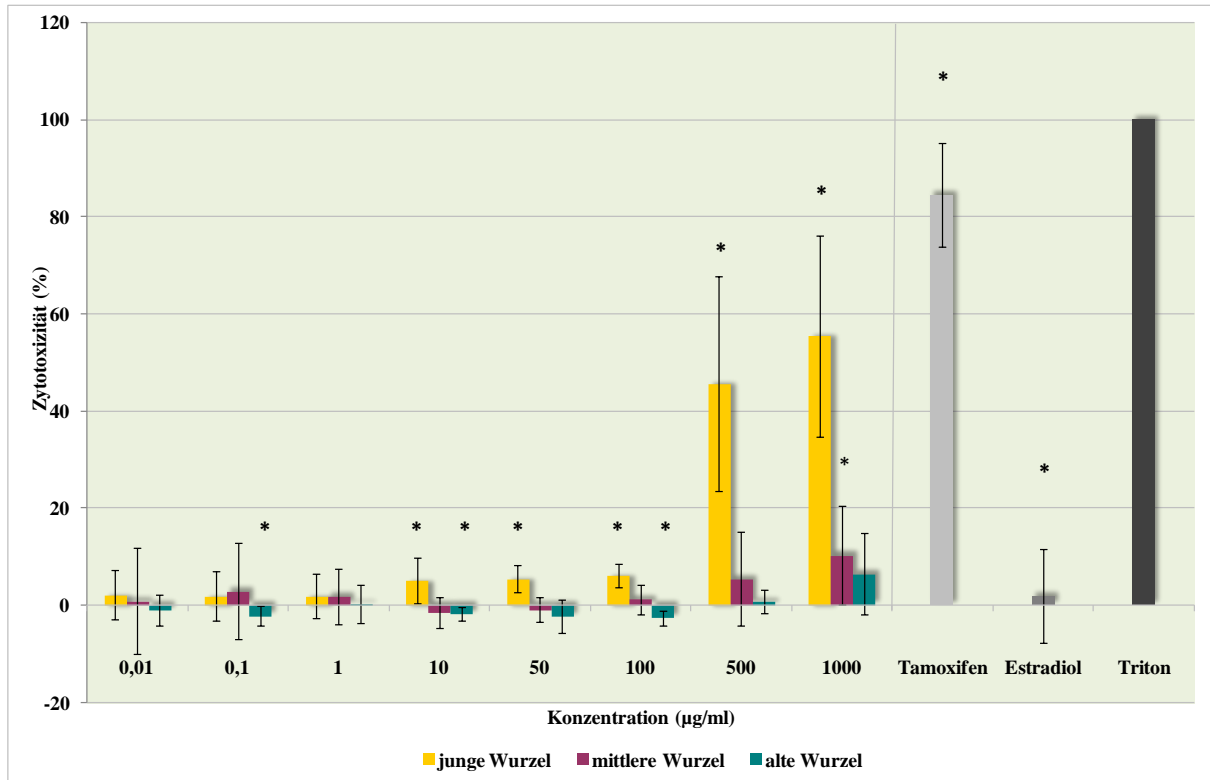


Abb. 27: LDH – Test: BT20-Zelllinie - Vergleich zwischen den drei Wurzelaltersstufen
(Triton dient als Kontrollwert mit 100% Zytotoxizität, * = Signifikanz)

Im Anschluss daran soll auch noch auf die Wirkung der Leinwurzelextrakte im Vergleich beider Zelllinien eingegangen werden.

Zytotoxische Aktivität gemessen durch den LDH-Test – Vergleich der MCF7- und BT20-Zellen

Junge Wurzel - 3 Wochen alt (Abb. 28)

Im Wesentlichen gab es in den niedrigen Konzentrationen keine gravierenden Unterschiede zwischen den Wirkungen auf die Karzinomzelllinien. Erst bei den hohen Konzentrationen von 500 µg/ml und 1000 µg/ml gab es Differenzen. Man erkennt, dass eher bei der estrogenrezeptorpositiven Mammakarzinomzelllinie MCF7 eine stärkere Zytotoxizität vorhanden war. Im Vergleich zu Triton (100% Zytotoxizität) - so kann es in dem unten dargestellten Diagramm aufgezeigt werden - waren bei 500 µg/ml bei der MCF7-Zelle 58% Zytotoxizität vorhanden, bei der BT20-Zelle dagegen nur um die 45%. Bei 1000 µg/ml konnte ein zytotoxischer Effekt auf beide Zellreihen von 70% (MCF7-Zellen) bzw. 55% bei den BT20-Zellen aufgezeigt werden.

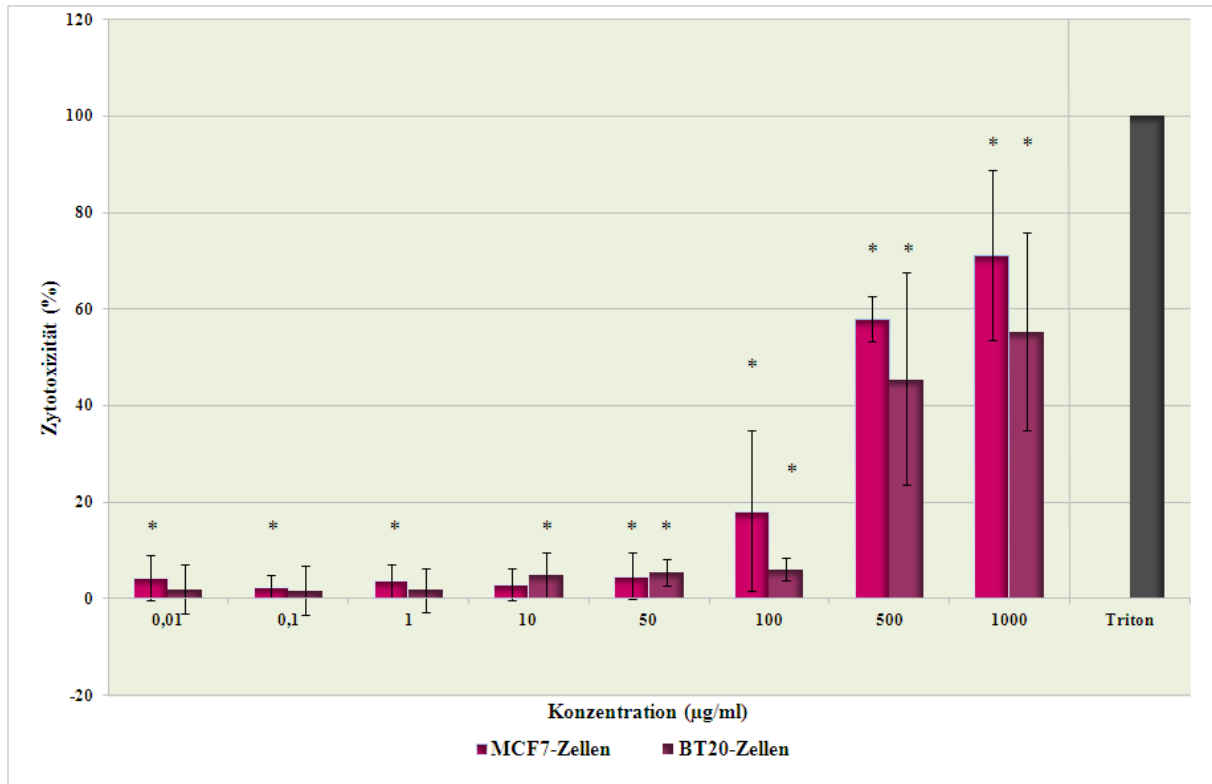


Abb. 28: LDH – Test: Junge Wurzel - Vergleich zwischen beiden Karzinomzelllinien
(Triton dient als Kontrollwert mit 100% Zytotoxizität, * = Signifikanz)

Mittlere Wurzel - 6 Wochen alt (Abb. 29)

Bei der mittleren Wurzel war gegenüber der jungen Pflanze ein großer Unterschied zu erkennen. Signifikante Werte wurden besonders in der hohen Konzentration erreicht. Die niedrigen Konzentrationen wurden hier bei der Verbalisierung des Diagramms vernachlässigt, da keine eindeutigen Unterschiede herausgearbeitet werden konnten. Es war zu sehen, dass bei der MCF7-Zelle mit einer höheren Zytotoxizität zu rechnen war. Die Zytotoxizität lag bei 500 µg/ml und 1000 µg/ml etwa bei 50%-55%. Dagegen zeigen die Säulen bei den BT20-Zellen nur eine Zytotoxizität bis 10% in der höchsten getesteten Konzentration. Eine Tendenz zugunsten der MCF7-Zelle konnte herausgearbeitet werden, die besagt, dass der Effekt der Extrakte auf die MCF7-Zelle wirkungsvoller war.

Alte Wurzel (Pflanze in Blütezeit) - 12 Wochen alt (Abb. 30)

Die beeindruckendste Differenz zwischen den Karzinomzelllinien wurde durch das Leinwurzelextrakt der alten Wurzel erreicht. Niedrige Zytotoxizitäten in den geringen Konzentrationen kennzeichnen das Diagramm. In den nächst höheren Konzentrationen wurden bei der estrogenrezeptorpositiven Zelle signifikante Werte von ca. 50% bzw. 70% erreicht. Die BT20-Zelle konnte nur eine geringe Zytotoxizität bis 6% vorweisen.

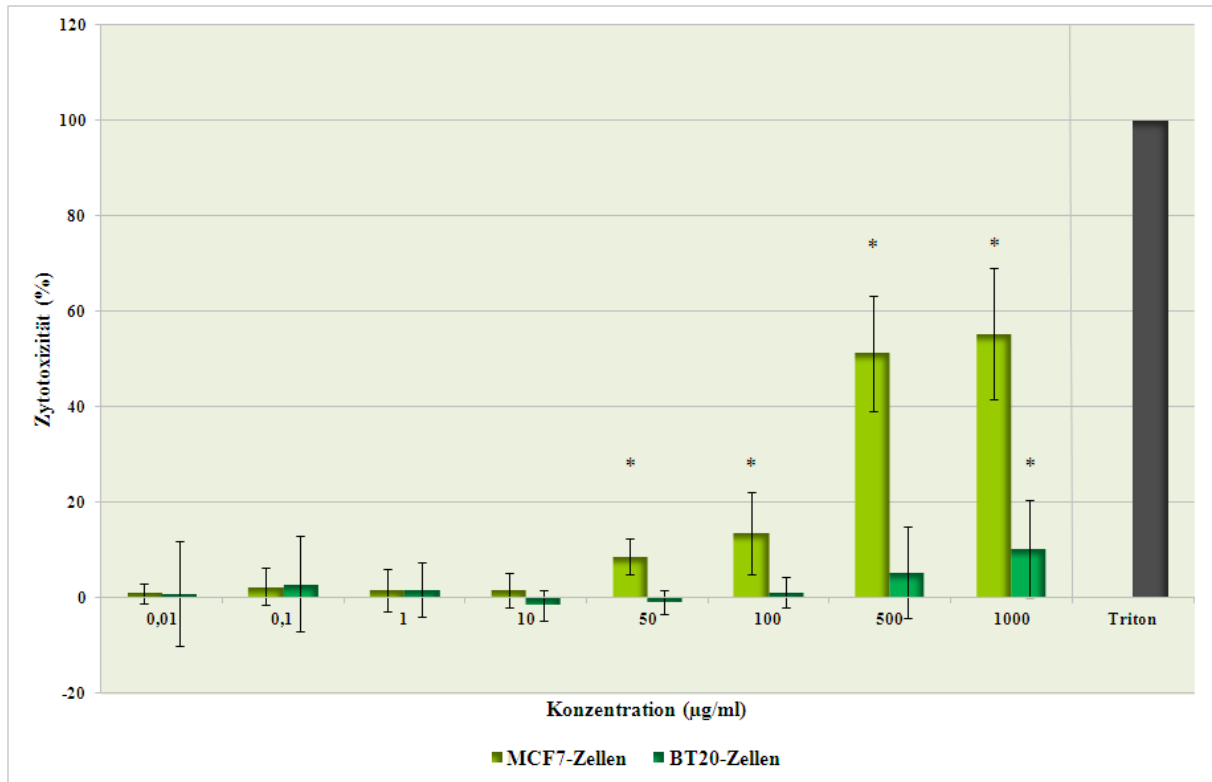


Abb. 29: LDH – Test: Mittlere Wurzel - Vergleich zwischen beiden Karzinomzelllinien
(Triton dient als Kontrollwert mit 100% Zytotoxizität, * = Signifikanz)

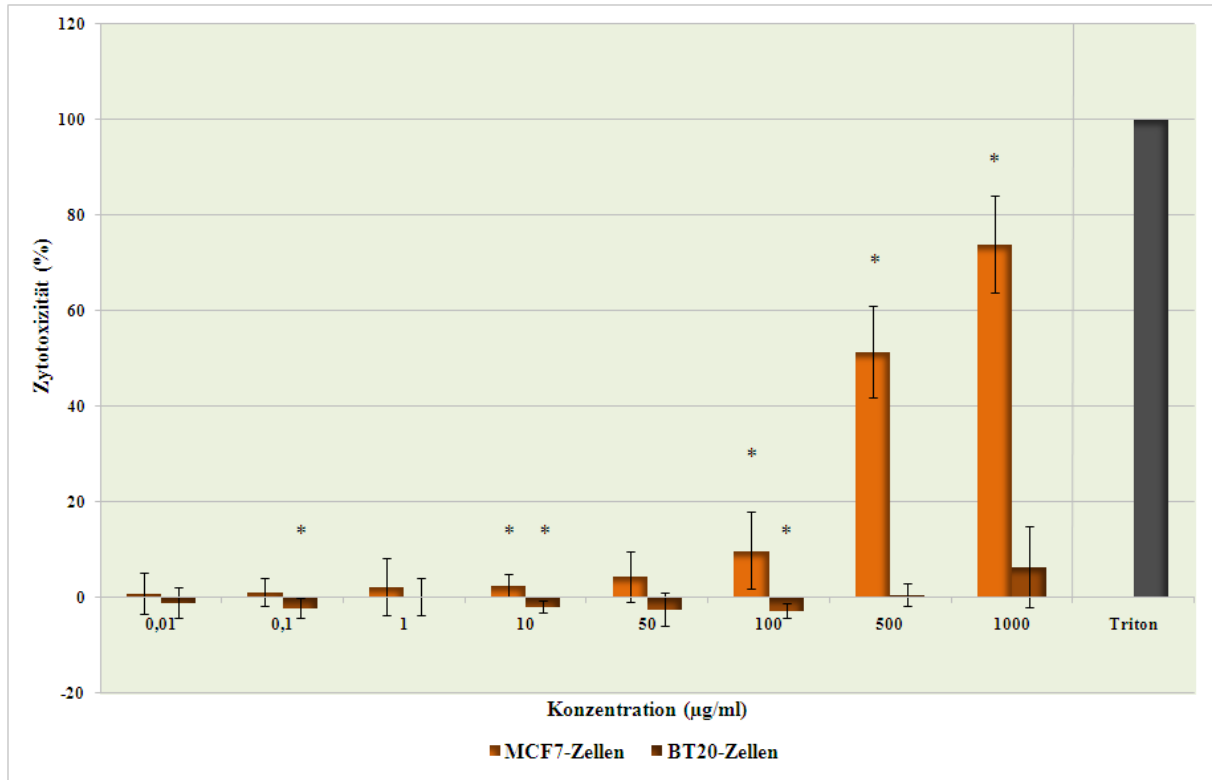


Abb. 30: LDH – Test: Alte Wurzel - Vergleich zwischen beiden Karzinomzelllinien
(Triton dient als Kontrollwert mit 100% Zytotoxizität, * = Signifikanz)

Abschließend ist zu sagen, dass günstigere Ergebnisse bei der estrogenrezeptorpositiven Karzinomzelllinie erzielt werden konnten. Lediglich bei der jungen Wurzel waren in den hohen Konzentrationen ebenfalls gute Ergebnisse über 50% mit der BT20-Zelle erzielt worden.

Um die vorhandenen Ergebnisse des Laktatdehydrogenasetests besser einordnen zu können, wurden ebenfalls Untersuchungen mit Tamoxifen und Estradiol durchgeführt. Tamoxifen als SERM dient in der Krebstherapie als Therapieoption und wird z.B. bei postmenopausalen Patientinnen über einen Zeitraum von 5 Jahren eingenommen (*Bühling und Friedmann 2004*), ggf. kann nach neuesten Leitlinien eine antihormonelle Therapie über 10 Jahre sinnvoll sein (*Lattrich 2013*). Tamoxifen wurde hier neben Estradiol als Kontrolle auf den ELISA-Platten mitgeführt.

Tamoxifen und Estradiol (Abb. 31 und 32)

Zusätzlich wurde die Wirkung des Hormons Estradiol und des Tamoxifen in verschiedenen Konzentrationen untersucht. Die Wirkung beider Stoffe ist in den Diagrammen dargestellt (Tamoxifen und Estradiol in verschiedenen Konzentrationen wurden nicht selbst in der Versuchsreihe mitgeführt; Messwerte sind durch das Labor der Frauenklinik, Universität Rostock, Klinikum Südstadt zur Verfügung gestellt worden).

Bei beiden Zelllinien war durch die Tamoxifenzugabe eine hohe Zytotoxizität in den Konzentrationen 5 µg/ml, 10 µg/ml und 50 µg/ml von ca. 65-85% erreicht worden. Bei der MCF7-Zelle waren eher steigende Tendenzen in den hohen Konzentrationen zu erkennen, während bei der BT20-Zelle eher fallende Tendenzen beschrieben werden konnten. Tamoxifen zur antihormonellen Therapie besetzt kompetitiv die Estrogenrezeptoren, so dass der Wachstumsreiz durch Estrogeneinfluss reduziert wird (*Bühling und Friedmann 2004; Aktories et al. 2009*).

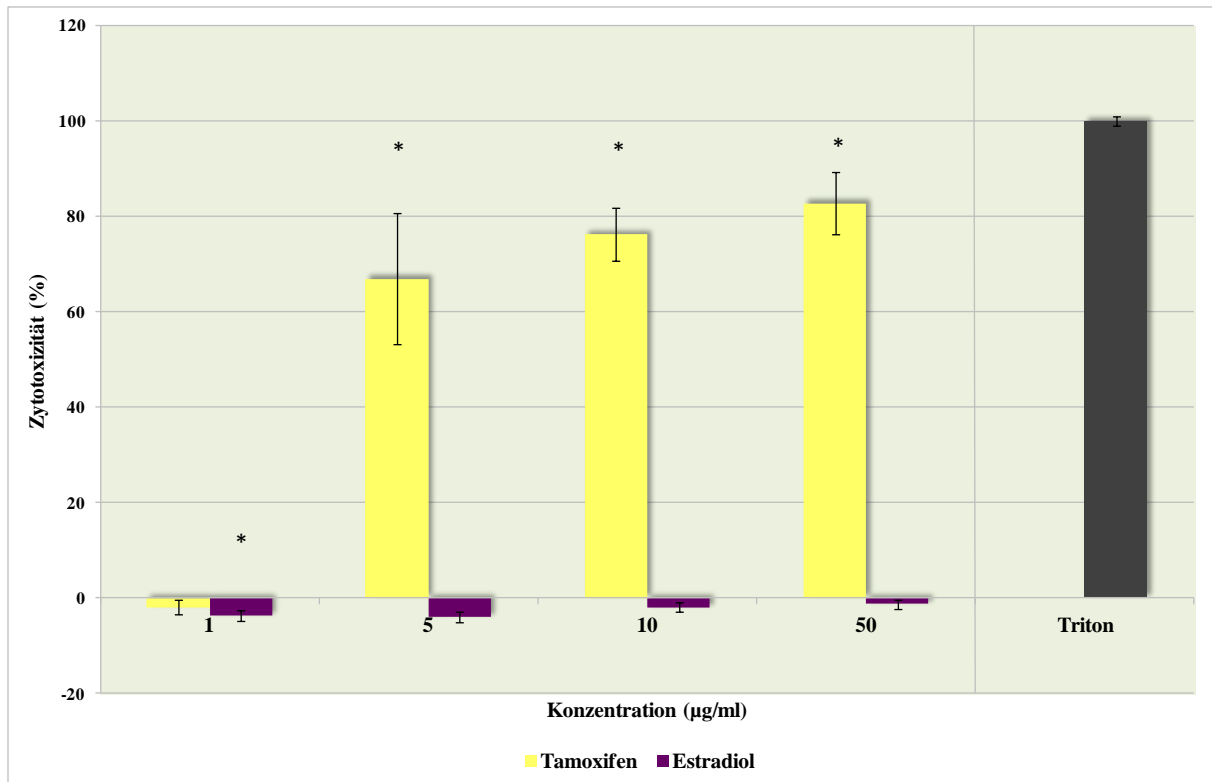


Abb. 31: LDH – Test: MCF7-Zellen – Vergleich zwischen Tamoxifen und Estradiol
(Triton dient als Kontrollwert mit 100% Zytotoxizität, * = Signifikanz)

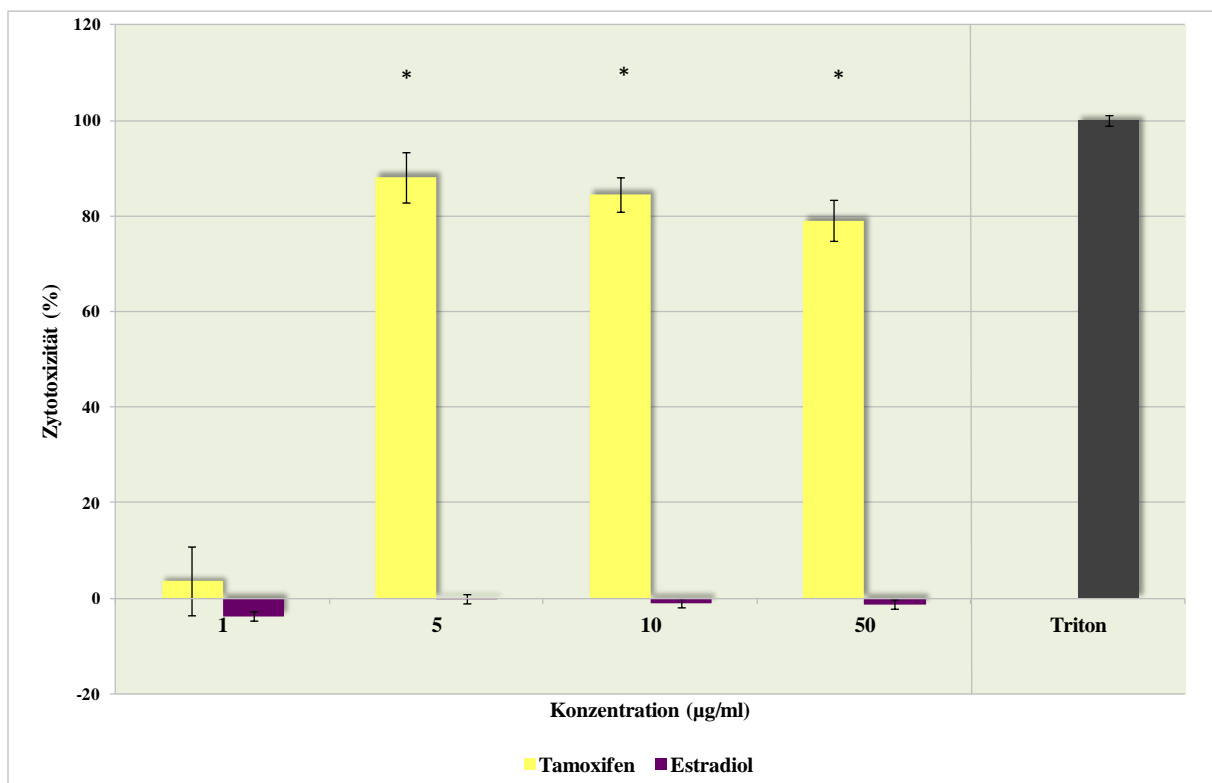


Abb. 32: LDH – Test: BT20-Zellen – Vergleich zwischen Tamoxifen und Estradiol
(Triton dient als Kontrollwert mit 100% Zytotoxizität, * = Signifikanz)

4.2.2 MTT - Test: Zellviabilitätstest

Durch den MTT-Test kann die Viabilität der Mammakarzinomzellen beurteilt werden. Wie schon in 3.2.5.2 beschrieben, wird durch die metabolisch aktiven, vitalen Zellen ein chemischer Stoff namens Tetrazoliumsalz MTT in Formazan umgewandelt.

Mit dem ELISA-Reader kann die vorhandene Menge an gelöstem Formazan nach einem Farbumschlag ins Violette gemessen werden. Aus einer erhöhten Anzahl lebender Zellen resultiert beispielsweise ein Anstieg der metabolischen Aktivität, welcher ebenfalls mit der Menge an Formazan korreliert (*Roche Applied Science, Testkitanleitung MTT, 2005*).

Signifikante Werte beziehen sich auch hier auf die Kontrolle 1 (Negativkontrolle, Zellen mit Ethanol). Diese diente auch als Maß für 100% Zellviabilität. Ethanol selbst erwies sich bereits bei anderen Untersuchungen der Arbeitsgruppe als tauglich, da es in der hier genutzten Konzentration keinen schädigenden Einfluss auf die Zellen hatte.

Das Auftragen der Konzentrationen im Diagramm wird analog des LDH-Tests durchgeführt; aufgetragen auf der Ordinate wurde hier die Zellviabilität in Prozent.

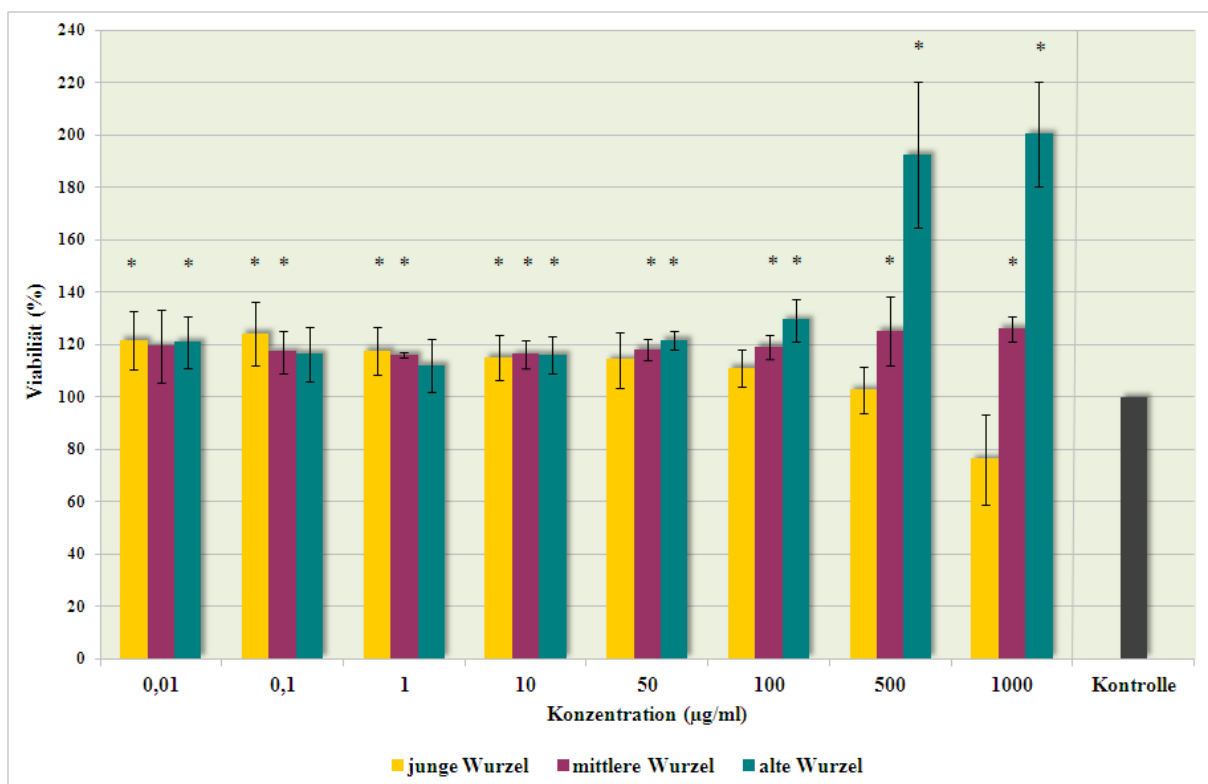


Abb. 33: MTT – Test: MCF7-Zelllinie – Vergleich zwischen den drei Wurzelaltersstufen
(Kontrolle mit 100% Viabilität = Negativkontrolle 1 (Zellen mit Ethanol), * = Signifikanz)

Dargestellt in Diagramm Abb. 33 ist die Wirkung der Leinwurzelextrakte der verschiedenen Wurzelaltersstufen auf die MCF7-Zelllinie. Die Ergebnisse der Leinwurzelextraktkonzentrationen 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml und 100 µg/ml stellten

sich nur geringfügig different dar. Es wurden signifikante Ergebnisse in Bezug auf die Negativkontrolle erreicht, diese Prozentwerte lagen meist um die 115% bis 125%. Die alte Wurzel erreichte bei 100 µg/ml ein geringfügig anderes Ergebnis. Hier lag der erreichte Wert bei ca. 130% und verhielt sich ebenfalls signifikant gegenüber der Kontrolle. Als wirksam mit ca. 75% Zellviabilität konnte die junge Wurzel bei 1000 µg/ml bewertet werden. Eine viabilitätssteigernde Wirkung mit signifikanten Werten von 190 bis 200% war bei der alten Wurzel ebenfalls in der hohen Konzentration von 1000 µg/ml, aber auch bei 500 µg/ml zu sehen.

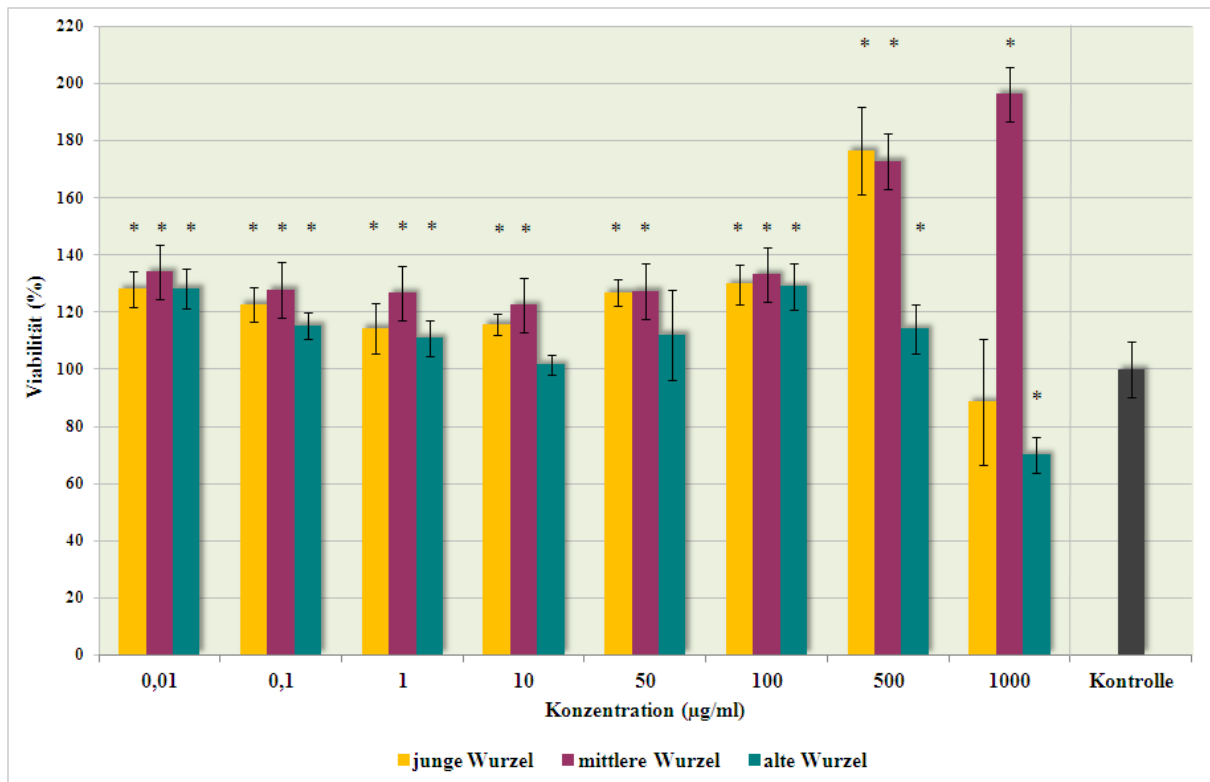


Abb. 34: MTT – Test: BT20-Zelllinie – Vergleich zwischen den drei Wurzelaltersstufen
(Kontrolle mit 100% Viabilität = Negativkontrolle 1 (Zellen mit Ethanol), * = Signifikanz)

Bei den BT20-Zellen zeigte das Leinwurzelextrakt eine andere Wirkung (*Abb. 34*). Zwar war in den niedrigen Konzentrationen bis 100 µg/ml eine proliferationssteigernde Tendenz zu erkennen, allerdings war diese bei der alten Wurzel am geringsten ausgeprägt.

Bei 500 µg/ml wich die Morphologie des Säulendiagramms stark von der der vorherigen Konzentrationen ab. Bei der jungen und mittleren Wurzel waren Viabilitätsprozentwerte von ca. 175% erkennbar, was für eine proliferierende Wirkung des Leinwurzelextraktes sprach. Lediglich die alte Wurzel zeigte eine Viabilität von ca. 115%. Wieder anders sah die Wirkung bei der höchsten Konzentration (1000 µg/ml) aus. Hier waren Höchstwerte bei der mittleren Wurzel von fast 200% zu sehen. Die Wirkung der anderen Extrakte lag unter der Wirkung der

Kontrolle; nämlich bei ca. 90% bei der jungen und ca. 70% bei der alten Wurzel.

Eine viabilitätshemmende Wirkung wurde somit nur in der hohen Konzentration bei der jungen und alten Wurzel (hier signifikant) beobachtet. Bei den übrigen Konzentrationen war somit keine oder sogar eine proliferationssteigernde Wirkung zu verzeichnen.

Auch hier soll im Nachhinein auf den Vergleich zwischen beiden Zelllinien direkt eingegangen werden.

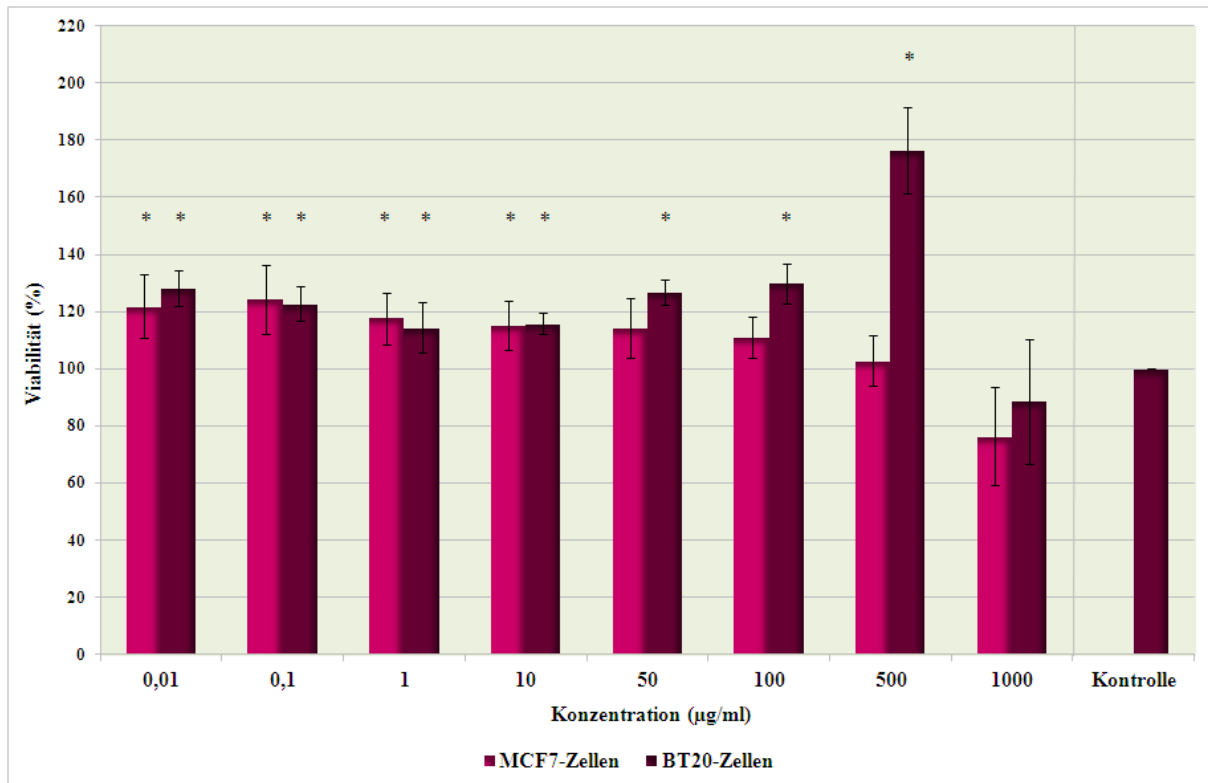


Abb. 35: MTT – Test: Junge Wurzel – Vergleich zwischen beiden Karzinomzelllinien
(Kontrolle mit 100% Viabilität = Negativkontrolle 1 (Zellen mit Ethanol), * = Signifikanz)

Junge Wurzel - 3 Wochen alt (Abb. 35)

Wesentliche Wirkungsunterschiede wurden hier nur in den Konzentrationen 50 µg/ml, 100 µg/ml, 500 µg/ml und 1000 µg/ml erreicht. Die Wirkung in den übrigen Konzentrationen ließ beinahe keine Unterschiede erkennen. Bei 50 µg/ml und 100 µg/ml war die Wirkung auf die BT20-Zelle signifikant leicht gesteigert gegenüber der estrogenrezeptorpositiven Karzinomzelle. Bei 500 µg/ml war zwischen beiden Karzinomarten ein Unterschied von ca. 70% zu deuten; der Wert der BT20-Zelle lag mit einem signifikanten Wert von 175% deutlich über der Wirkung auf die MCF7-Zelle. Die junge Wurzel wirkte hier fördernd auf die Viabilität der BT20-Zelle. Viabilitätshemmende Effekte waren nur bei der höchsten Konzentration und dies bei beiden Zelllinien zu verzeichnen.

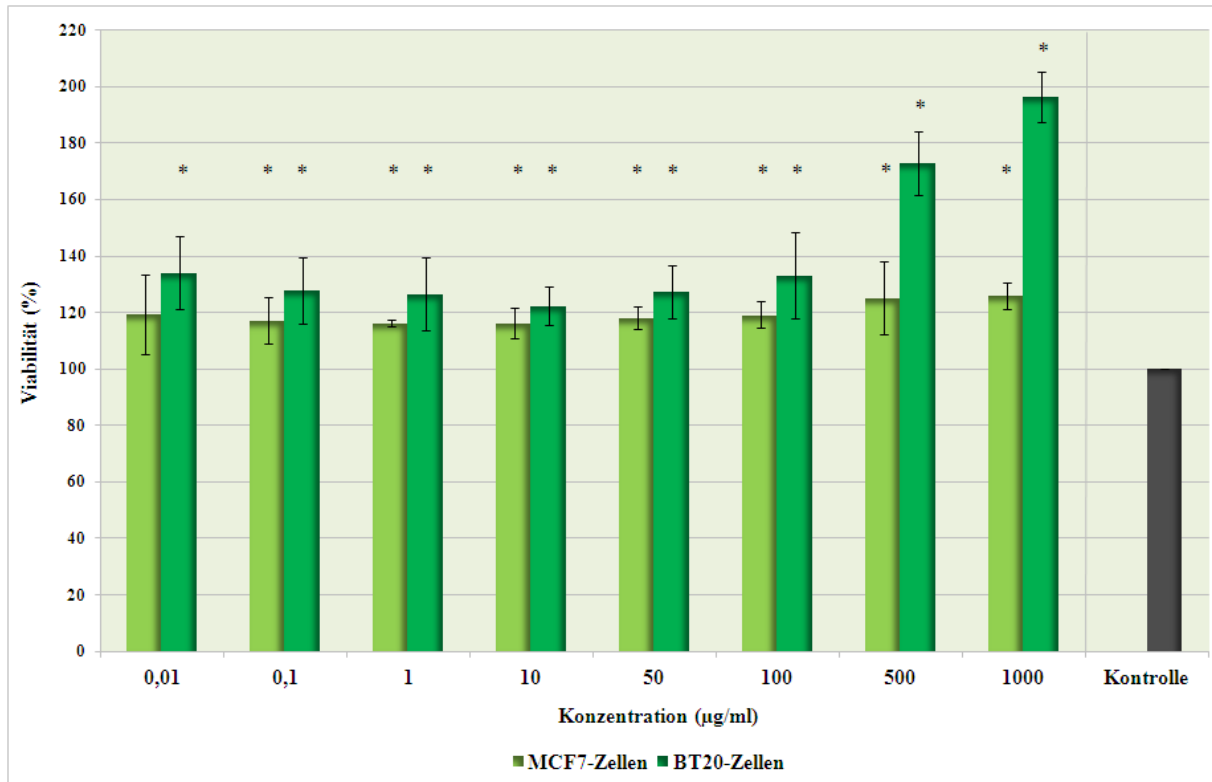


Abb. 36: MTT-Test: Mittlere Wurzel – Vergleich zwischen beiden Karzinomzelllinien
(Kontrolle mit 100% Viabilität = Negativkontrolle 1 (Zellen mit Ethanol), * = Signifikanz)

Mittlere Wurzel - 6 Wochen alt (Abb. 36)

Bei der mittleren Wurzel war keine viabilitätshemmende Wirkung auf beide Zelllinien zu erfassen. Die Wirkung der Extrakte auf die BT20-Zelllinie erschien signifikant; insgesamt äußerte sich die steigernde Wirkung jedoch etwas ausgeprägter auf die BT20-Zellen. Bei den beiden hohen Konzentrationen unterschied sich die Wirkung auf die MCF7-Zelle nicht wesentlich von den übrigen Konzentrationen. Werte von 175% bis nahezu 200% wurden bei der BT20-Zelllinie erzielt (signifikant).

Alte Wurzel - 12 Wochen alt (Abb. 37)

Im Vergleich zum Kontrollwert lagen die Ergebnisse bei den Leinwurzelextraktkonzentrationen 0,01 µg/ml bis 50 µg/ml der Pflanze mit Blüte leicht über dem als 100% festgelegten Wert. Die Ergebnisse der Extrakte schwankten zwischen ca. 100% und 130% und wiesen zwischen den beiden Mammakarzinomzelllinien keine wesentlichen Unterschiede auf. Bei 100 µg/ml lagen die Prozentwerte beider Karzinomzellen bei etwa 130% und lieferten somit zwar signifikante Werte gegenüber der Kontrolle, jedoch untereinander keinen wesentlichen Unterschied.

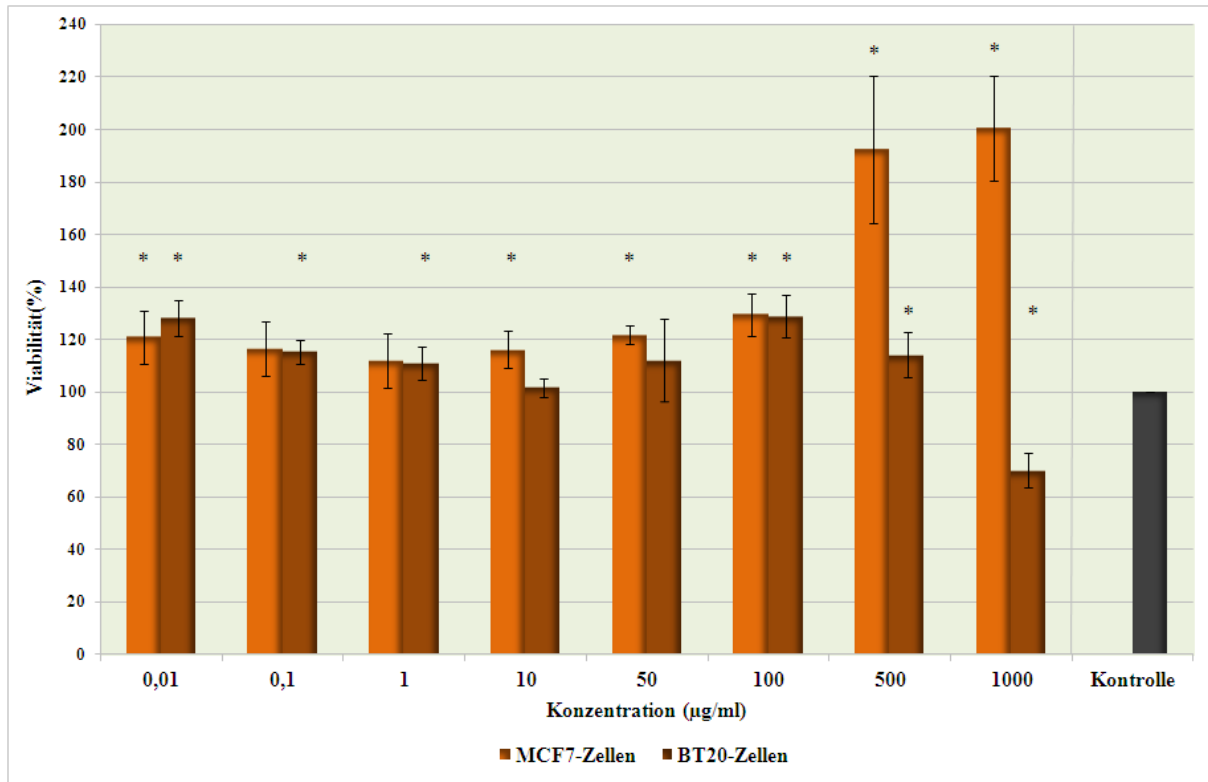


Abb. 37: MTT – Test: Alte Wurzel - Vergleich der beiden Karzinomzelllinien
(Kontrolle mit 100% Viabilität = Negativkontrolle 1 (Zellen mit Ethanol), * = Signifikanz)

Anders sah es bei den beiden höchsten Konzentrationen 500 µg/ml und 1000 µg/ml aus. Hier äußerte sich der deutliche Gegensatz zwischen der MCF7- und der BT20-Zelle, der ca. 80% (500 µg/ml) bzw. 130% (1000 µg/ml) voneinander abwich.

Die prozentualen Werte lagen bei der MCF7-Zelle bei der Konzentration 500 µg/ml bei ca. 190%, bei der BT20-Zelle dagegen bei ca. 110%. Bei 1000 µg/ml ist aufgezeigt, dass bei der BT20-Zelle eine signifikant niedrigere Viabilität gegenüber der Kontrolle vorhanden war. Die Viabilität lag hier bei ungefähr 70%. Eine Viabilität von signifikanten 200% erlangte dagegen die MCF7-Zelle, was somit eine Proliferationssteigerung der Zellen präsentierte.

Tamoxifen und Estradiol (Abb. 38 und 39)

Die Wirkung von Tamoxifen und Estradiol ist in den beiden unten aufgeführten Diagrammen aufgezeigt. Die Viabilität der MCF7-Zellen, die hier durch den MTT-Test gemessen wurde, nahm mit steigender Konzentration des Antiöstrogens ab. Die Zellproliferation reduzierte sich so von gut 90% bei 1 µg/ml auf knapp 10% bei 50 µg/ml. Signifikant war der aufgezeigte Wert von 80% bei 5 µg/ml. Eine tendenziell steigende Zellviabilität war bei dem Hormon Estradiol zu verzeichnen. Ein Maximum wurde bei 10 µg/ml erreicht (signifikant). Bei der höchsten getesteten Konzentration von 50 µg/ml ist aus dem Diagramm ein fallender Wert abzulesen, dieser lag bei mehr als 20% unter dem Kontrollwert.

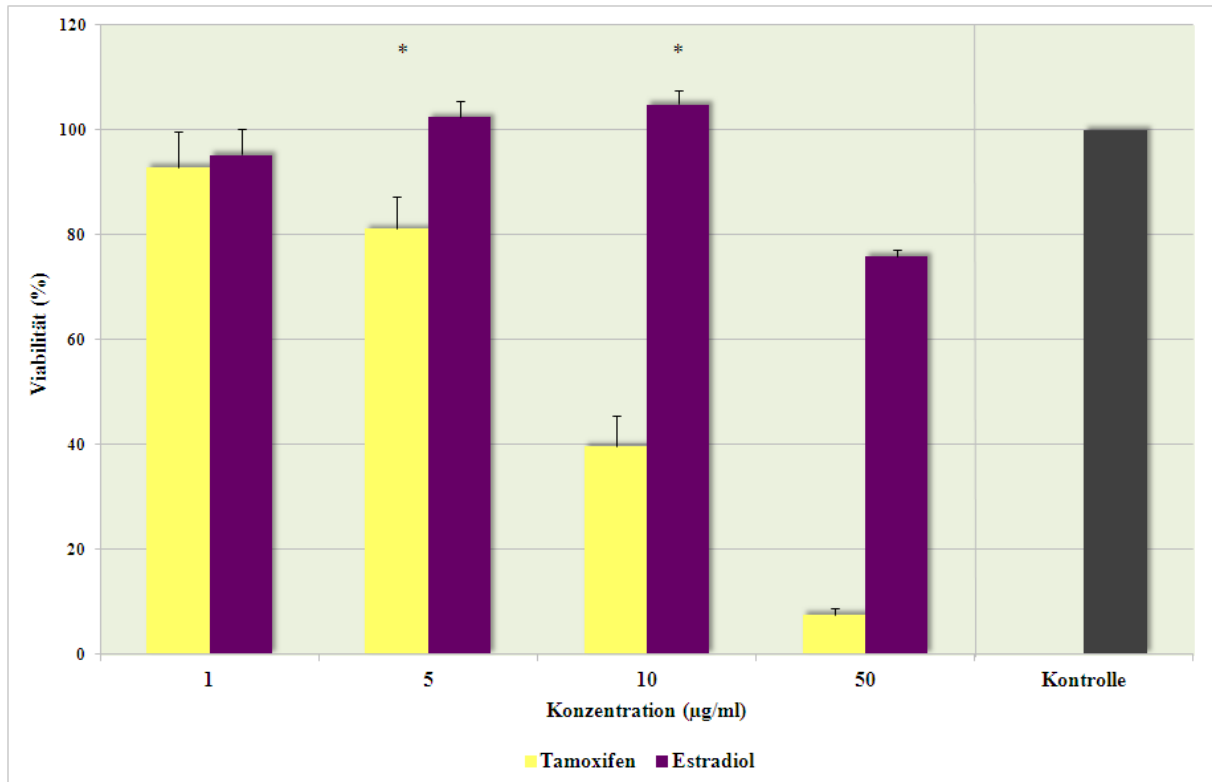


Abb. 38: MTT – Test: MCF7-Zellen – Vergleich zwischen Tamoxifen und Estradiol
 (Kontrolle mit 100% Viabilität = Negativkontrolle 1 (Zellen mit Ethanol), * = Signifikanz)

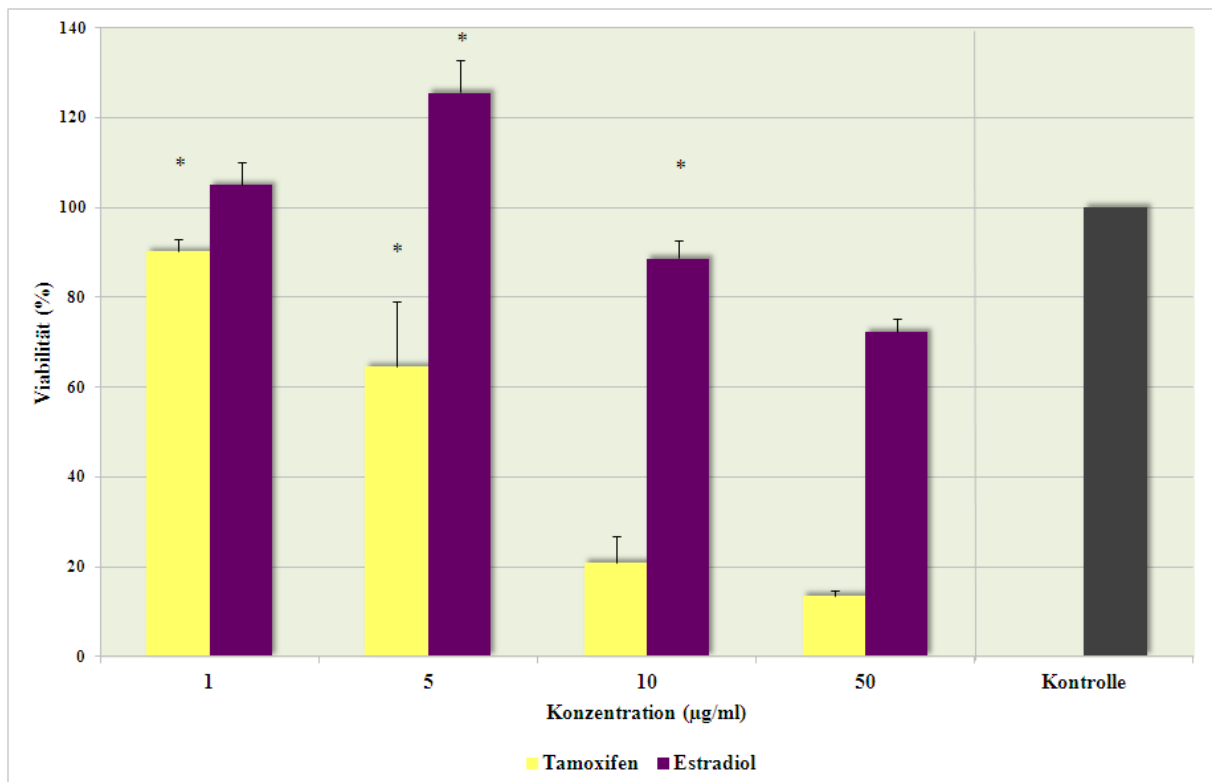


Abb. 39: MTT – Test: BT20-Zellen – Vergleich zwischen Tamoxifen und Estradiol
 (Kontrolle mit 100% Viabilität = Negativkontrolle 1 (Zellen mit Ethanol), * = Signifikanz)

Bei der Vergleichszelllinie BT20 waren auch hier fallende Prozentwerte durch Tamoxifen zu erkennen. Die gemessene Zellviabilität lag bei 5 µg/ml (signifikant) und 10 µg/ml niedriger als bei der estrogenrezeptorpositiven Mammakarzinomzelllinie. Durch Estradiol war schon bei der niedrigsten Konzentration von 1 µg/ml im Vergleich zur Kontrolle (Zellen mit Ethanol) ein Wert von knapp über 100% zu sehen. Bei 5 µg/ml stieg die Zellviabilität auf über 120% signifikant und fiel dann in den beiden höchsten getesteten Konzentrationen auf 90% bzw. 70% ab. Im Vergleich zu Tamoxifen war eine deutliche Differenz zwischen den erreichten Prozentzahlen zu erkennen.

4.2.3 BrdU - Test (Bromdesoxyuridintest)

Wie schon im oberen Kapitel erläutert, handelt es sich bei dem BrdU-Test um ein Testverfahren, durch welches sich die Proliferation der Zellen bestimmen lässt. Auch hier soll erneut kurz das Testprinzip erwähnt werden: Der BrdU-Test basiert auf dem Einbau von BrdU (Bromdesoxyuridin) in die DNA der sich teilenden Zellen. BrdU wird hier anstelle von Thymidin in die doppelsträngige DNA eingebaut. Durch antikörperabhängige Testschritte kann dieser Baustein detektiert und markiert und somit die Proliferation der Zellen bestimmt werden. Die untersuchten Materialien entsprachen im Wesentlichen denen des LDH- und MTT-Tests. Als Kontrolle (100% Proliferation) diente wie bereits im MTT-Tests auch hier eine Probe von Zellen mit Ethanol. Das Extrakt wurde in den gleichen Konzentrationen ausgetestet, so wie auch bei den vorherigen Tests angegeben.

Die Wirkung der Extrakte auf die MCF7-Zelllinie ist im Diagramm Abb. 40 dargestellt. In den niedrigen Konzentrationen ist hier erneut nur ein minimaler Unterschied zwischen den Konzentrationen aufgedeckt worden.

In den Konzentrationen 50 µg/ml und 100 µg/ml schien es eher die mittlere Wurzel zu sein, die die Proliferation der MCF7-Zellen förderte, allerdings waren die gemessenen Werte durch eine hohe Standardabweichung charakterisiert. Im Gegensatz dazu war eine geringe proliferationshemmende Wirkung bei der alten Wurzel in diesen beiden Konzentrationen zu erkennen. Diese bewegte sich bei Werten um die 90%. Erneut anders sah die Wirkung der Extrakte in den Konzentrationen 500 µg/ml und 1000 µg/ml aus.

Hier schienen eher die beiden jüngeren Extrakte eine Wirkung zu verursachen; die junge Wurzel rief dabei den stärkeren Effekt hervor (75%-80%) und entsprach somit einer ca. 20 bis 25 prozentigen Hemmung gegenüber der Kontrolle. Auch die mittlere Wurzel führte zu einer Proliferationshemmung von 5% in der Konzentration 500 µg/ml und zu einer ca. 20 prozentigen in der Konzentration 1000 µg/ml. Allerdings durch eine hohe

Standardabweichung gekennzeichnet, führten die Extrakte der alten Wurzel in den beiden höchsten Konzentrationen zu einer proliferationsfördernden Wirkung auf ca. 135% bei 500 µg/ml bzw. 105% in der höchsten Konzentration.

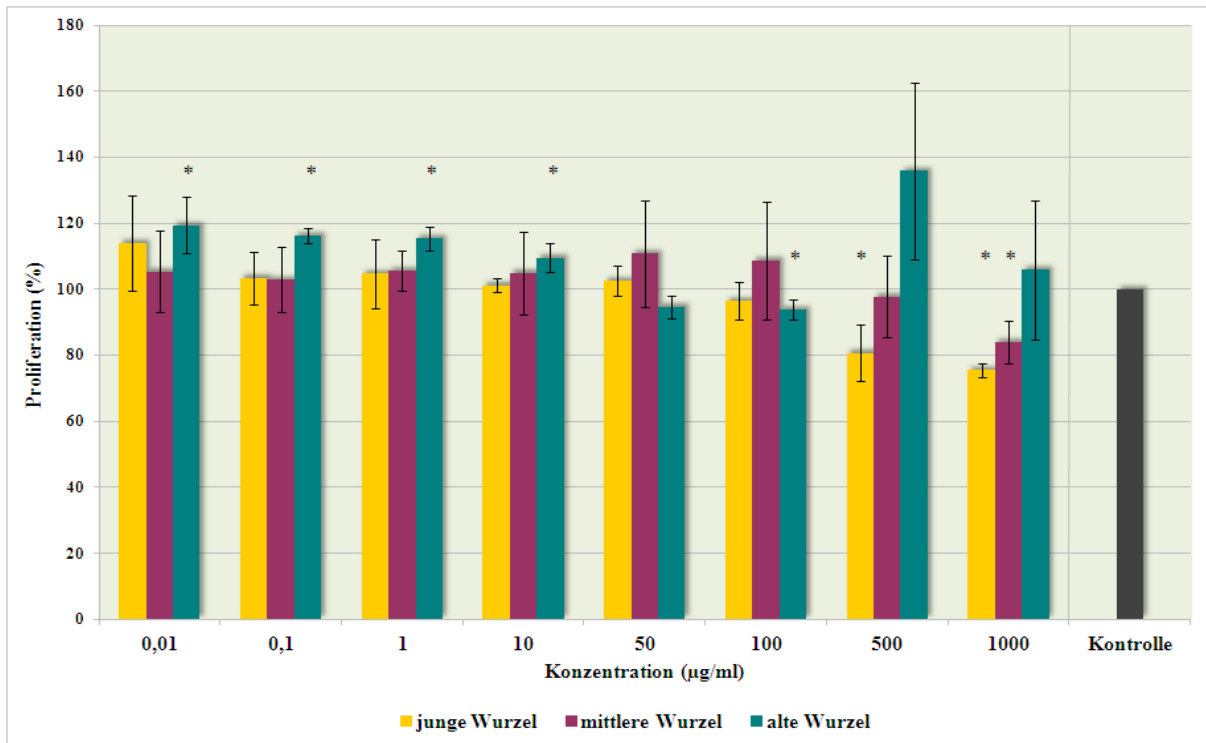


Abb. 40: BrdU – Test: MCF7-Zelllinie – Vergleich zwischen den drei Wurzelaltersstufen (Kontrolle mit 100% Proliferation = Negativkontrolle 1 (Zellen mit Ethanol), * = Signifikanz)

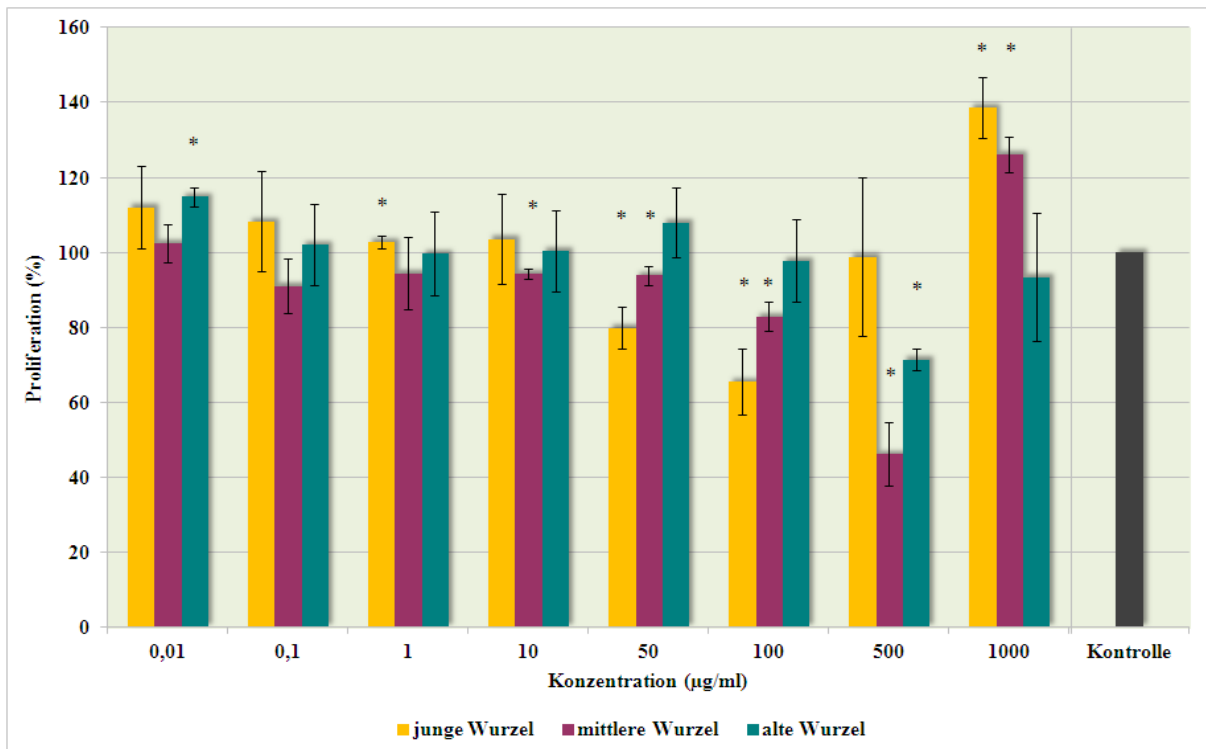


Abb. 41: BrdU – Test: BT20-Zelllinie – Vergleich zwischen den drei Wurzelaltersstufen (Kontrolle mit 100% Proliferation = Negativkontrolle 1 (Zellen mit Ethanol), * = Signifikanz)

Ein Blick auf das Diagramm, das die Werte der BT20-Zelle aufzeichnet veranschaulicht, dass die Wirkung der Leinwurzelextrakte auf diese Zelllinie (Vergleichszelllinie MCF7) anders verteilt war (*Abb. 41*). Bei 50 µg/ml, sowie 100 µg/ml konnte eine Hemmung der Proliferation durch die junge Wurzel erreicht werden. Während bei den niedrigen Konzentrationen dagegen bei der mittleren Wurzel kaum eine Proliferationshemmung zu sehen war, konnte beispielsweise bei 500 µg/ml durch die mittlere Wurzel eine signifikante Hemmung der Proliferation von knapp 50% registriert werden.

In den Konzentrationen 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml und 100 µg/ml war ein leicht hemmender Effekt durch das Extrakt der mittleren Wurzel erzielt worden.

Die junge Wurzel zeigte im Gegensatz zu den anderen beiden Wurzelaltersstufen bei 500 µg/ml keine hemmende Wirkung; allerdings war hier auch von einer hohen Standardabweichung auszugehen. Die alte Wurzel präsentierte sich nahezu ohne wesentlichen Effekt, außer bei den beiden höchsten Konzentrationen. Bei 500 µg/ml war eine Hemmung von ca. 30%, bei 1000 µg/ml eine Hemmung von ca. 10% zu sehen. Ein wesentlicher Unterschied zu der verglichenen Karzinomzelllinie war die Wirkung der Extrakte bei der höchsten Konzentration. Zu erkennen war eine enorme Proliferationssteigerung in den beiden jüngeren Wurzelstufen (bis fast 40%). Die berechneten Werte waren gegenüber der Kontrolle auch als signifikant anzusehen.

Eine kurze Erläuterung soll den Vergleich zwischen beiden Karzinomzelllinien näherbringen:

Junge Wurzel - 3 Wochen alt (*Abb. 42*)

Auffallend große Differenzen der Proliferation ließ die junge Wurzel u.a. in den Konzentrationen 50 µg/ml und 100 µg/ml erkennen. Die Wirkung auf die BT20-Zelle bei 50 µg/ml und 100 µg/ml war ca. 20% bis 35% stärker (proliferationshemmender) als auf die Vergleichskarzinomzelllinie (BT20-Zellen: bei 50 µg/ml ca. 80%, bei 100 µg/ml ca. 65%). Bei der MCF7-Zelllinie war eine proliferationshemmende Wirkung bei 500 µg/ml und 1000 µg/ml zu sehen; diese lag bei ca. 20% Proliferationseinbußen. Dagegen war das Wachstum der BT20-Zellen, das in den beiden vorherigen Konzentrationen deutlich gehemmt war, in der höchsten Konzentration gesteigert. Zwar ist der Wert durch eine hohe Standardabweichung charakterisiert, allerdings ist dieser in der hohen Konzentration signifikant gegenüber der Kontrolle mit Ethanol. In den niedrigen Konzentrationen war von keiner proliferationshemmenden Wirkung auszugehen.

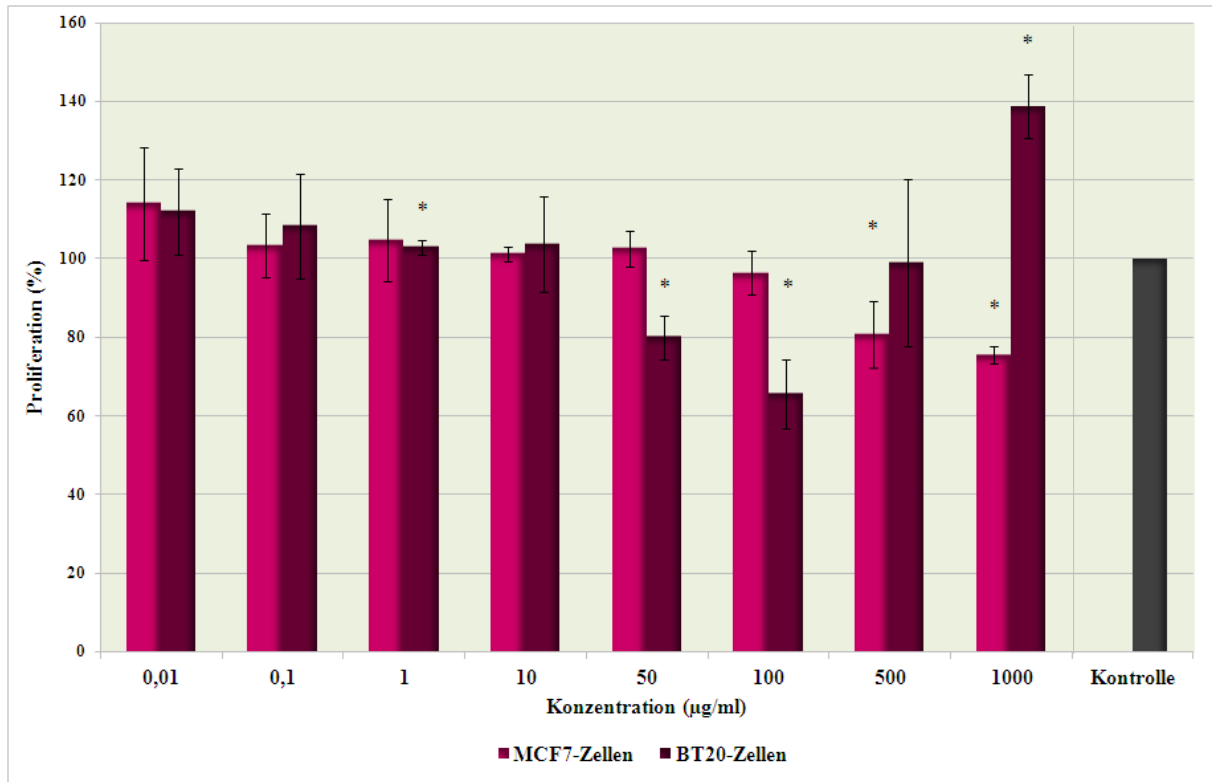


Abb. 42: BrdU – Test: Junge Wurzel – Vergleich zwischen beiden Karzinomzelllinien
(Kontrolle mit 100% Proliferation = Negativkontrolle 1 (Zellen mit Ethanol), * = Signifikanz)

Geringfügig anders sah es bei der mittleren (6 Wochen alten) Wurzel aus. Man konnte eine starke Wirkung auf die BT20-Zelllinie besonders bei 500 µg/ml beobachten. Die Wirkung in der höchsten Extraktkonzentration führte ebenfalls, wie auch bei der jüngeren Extrakstufe, zu einer Proliferationszunahme der BT20-Zellen. In der höchsten Konzentration lag der Abstand des Mittelwertes zwischen beiden Zelllinien bei über 40% und verdeutlicht, dass hier nur eine proliferationshemmende Wirkung auf die estrogenrezeptorpositive Mammakarzinomzelllinie aufgezeigt werden konnte (beide Werte signifikant).

Alte Wurzel - 12 Wochen alt (Abb. 44)

In den vier niedrigsten Konzentrationen war, wie auch bei allen anderen Wurzelaltersstufen, keine beträchtliche Wirkung des Extraktes auf die Karzinomzelllinien erzielt worden. Eine große Divergenz gab es bei 500 µg/ml; dort wurde eine stark steigernde Wirkung auf die Proliferation bei der MCF7-Zelle registriert. Diese lag bei einer hohen Standardabweichung bei ungefähr 135%, während die Vergleichszelle bei der gleichen Konzentration eine Proliferation von gut 70% zeigte. Die stärkste proliferationshemmende Wirkung war somit bei 500 µg/ml auf die BT20-Zelle erzielt worden.

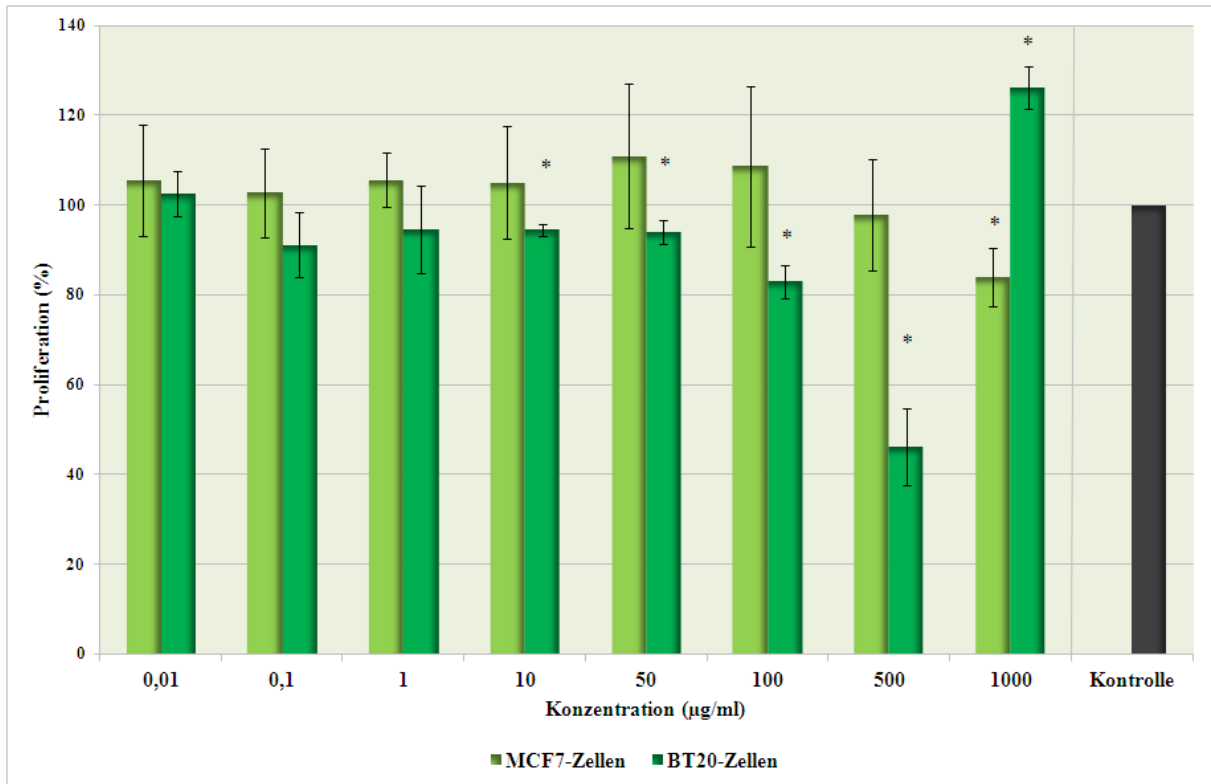


Abb. 43: BrdU – Test: Mittlere Wurzel – Vergleich zwischen beiden Karzinomzelllinien
(Kontrolle mit 100% Proliferation = Negativkontrolle 1 (Zellen mit Ethanol), * = Signifikanz)

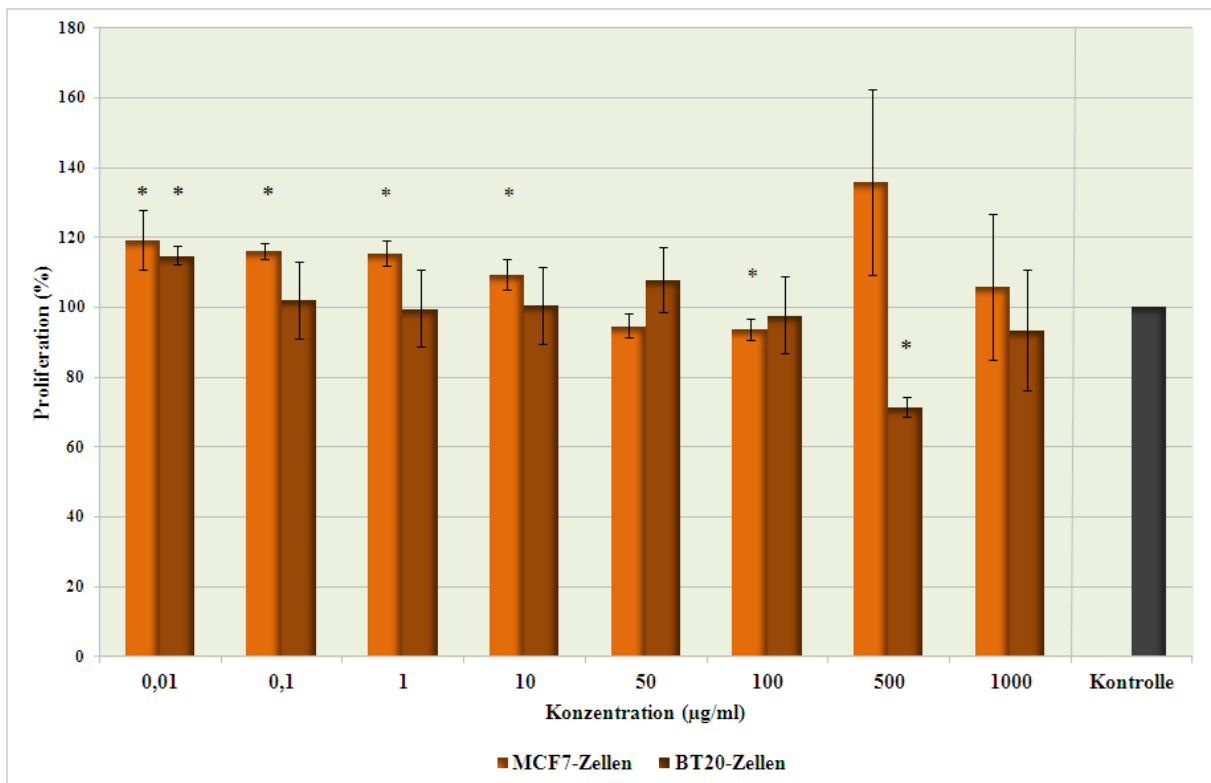


Abb. 44: BrdU – Test: Alte Wurzel – Vergleich zwischen beiden Karzinomzelllinien
(Kontrolle mit 100% Proliferation = Negativkontrolle 1 (Zellen mit Ethanol), * = Signifikanz)

Tamoxifen und Estradiol (Abb. 45 und 46)

Im Anschluss an die Testung der verschiedenen Wurzelaltersstufen wurde die Wirkung auf die Proliferation der MCF7-Zellen durch Tamoxifen und Estradiol geprüft. Durch Tamoxifen wurden bei steigenden Konzentrationen fallende Proliferationswerte wahrgenommen. Bei 1 µg/ml lag der erreichte Wert nahezu ähnlich wie bei der Kontrolle mit Ethanol (Tamoxifen hier bei 5 µg/ml und 10 µg/ml signifikant). Zwischen den Prozentwerten bei 1 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml, gemessen nach Zugabe des Estradiols, existierten keine wesentlichen Unterschiede. Lediglich bei 50 µg/ml lag die Proliferation bei ca. 65%.

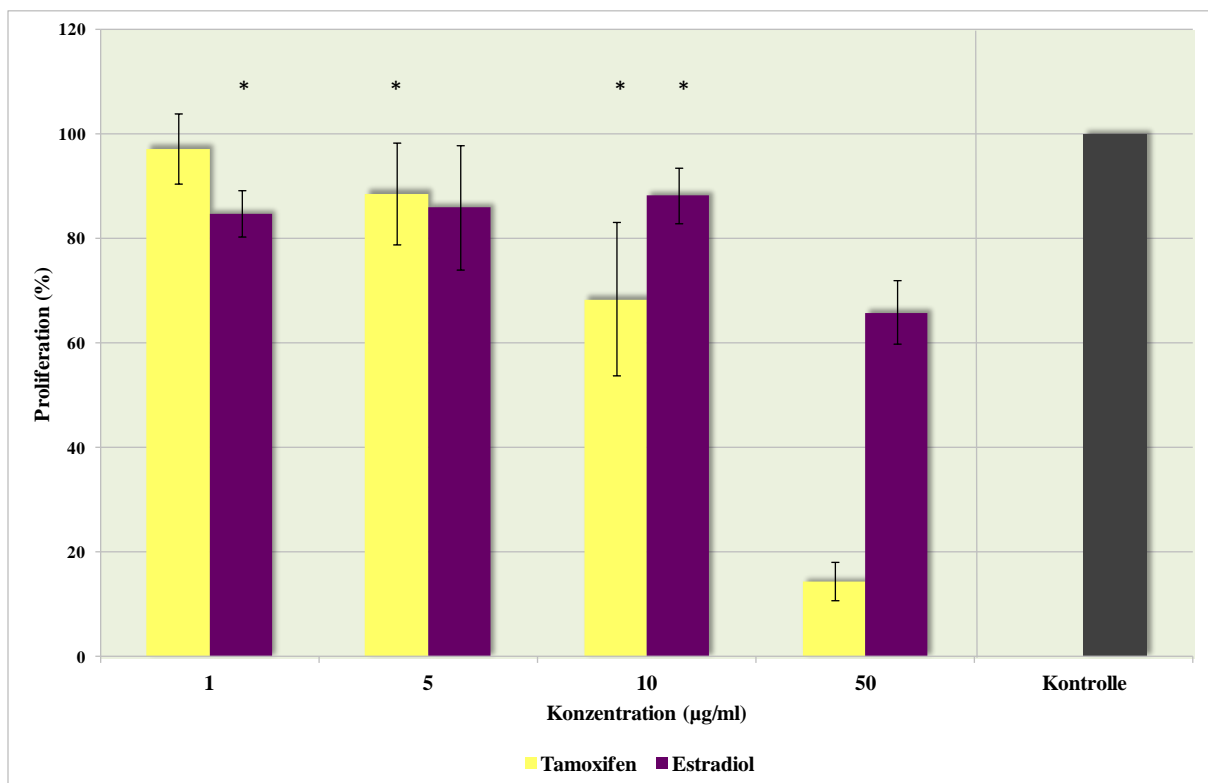


Abb. 45: BrdU – Test: MCF7-Zellen – Vergleich zwischen Tamoxifen und Estradiol
(Kontrolle mit 100% Proliferation = Negativkontrolle 1 (Zellen mit Ethanol), * = Signifikanz)

Auch bei der BT20-Zelllinie (Abb. 46) lagen die erreichten Proliferationswerte durch Estradiol bei ca. 80% und unterschieden sich so nur unwesentlich von den gemessenen Werten bei den MCF7-Zellen. Rasanter fielen die Proliferationsprozente bei den BT20-Zellen nach Zugabe von Tamoxifen und lagen bei der Konzentration 1 µg/ml bei ungefähr 90%, bei 5 µg/ml bei knapp 50% und bei 10 µg/ml und 50 µg/ml bei ungefähr 10-15%.

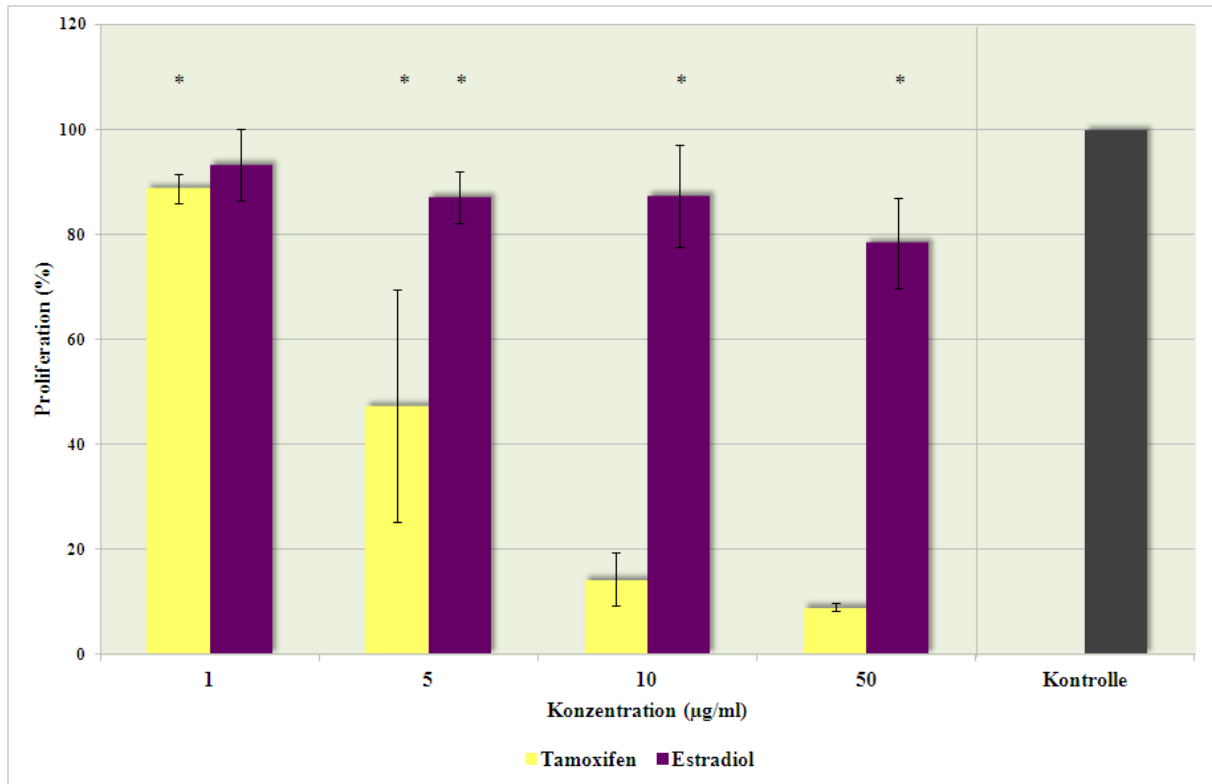


Abb. 46: BrdU – Test: BT20-Zellen – Vergleich zwischen Tamoxifen und Estradiol
 (Kontrolle mit 100% Proliferation = Negativkontrolle 1 (Zellen mit Ethanol), * = Signifikanz)

4.2.4 CellTiter-Blue - Viabilitätstest

Mittels ELISA-Reader wurde der durchgeführte Viabilitätstest zweimalig ausgewertet (wie bereits im Kapitel Material und Methoden beschrieben), zum einen nach 1 Std 45 min, zum anderen nach 2 Std 15 min. In der dargestellten Auswertung wurden zur Aufzeichnung der Diagramme die Werte der zweiten Messung verwendet. Im Vergleich zur ersten Messung waren keine wesentlichen Differenzen zu erkennen, so dass, wie in der Versuchsanleitung beschrieben, eine Inkubationszeit nach Zugabe des Extraktes von mindestens zwei Stunden zu bevorzugen war. Die Messung vor Ablauf der empfohlenen zwei Stunden Inkubation diente lediglich dazu festzustellen, ob bereits vorher eine Aktivität stattgefunden hatte bzw. ob diese sich wesentlich von der Aktivität bei empfohlener Einwirkdauer unterschied.

Das Diagramm, dargestellt als Abb. 47, zeigt die Wirkung des Leinwurzelextraktes bzw. die des Tamoxifens und des Estradiols, die mittels eines Viabilitätstests experimentell ermittelt wurde. 100% Zellviabilität wurde auch hier durch die Kontrolle mit Ethanol ermittelt.

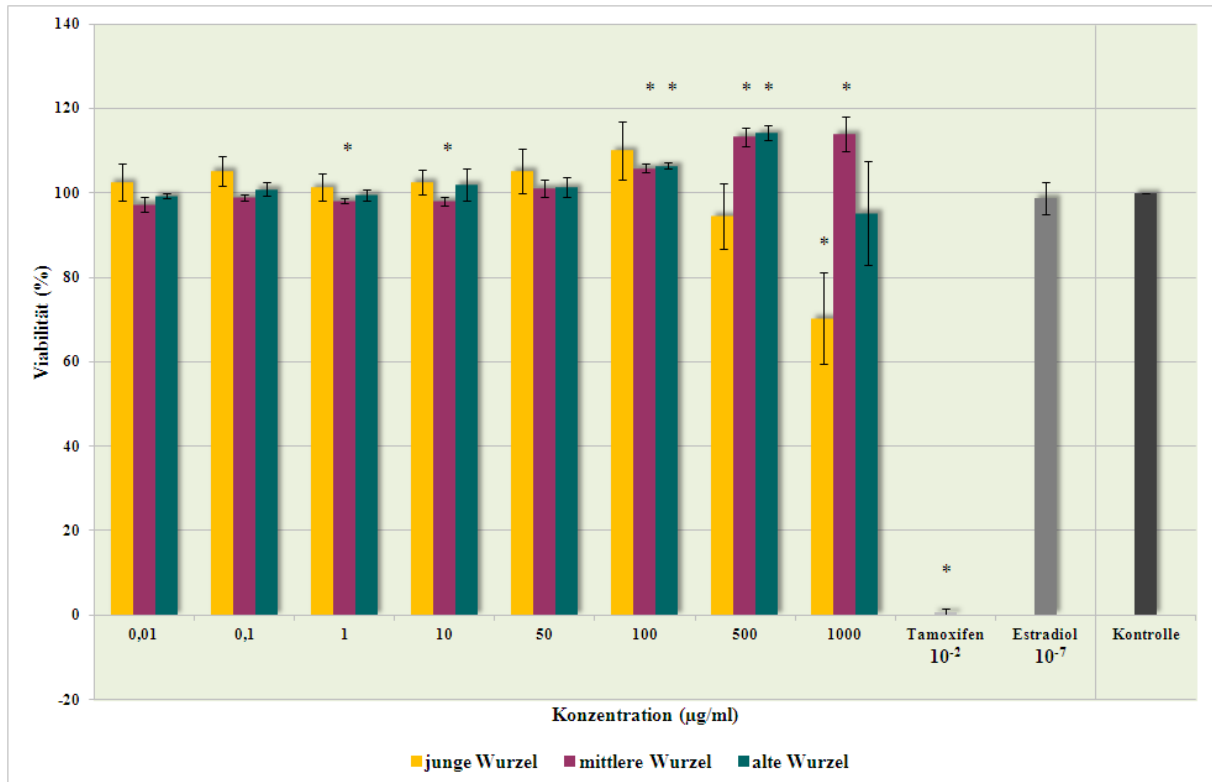


Abb. 47: Viabilitätstest: MCF7-Zelllinie - Vergleich zwischen den drei Wurzelaltersstufen
(Kontrolle mit 100% Viabilität = Negativkontrolle 1 (Zellen mit Ethanol), * = Signifikanz)

Wie auch bereits durch andere hier verwendete Testverfahren (z.B. durch den LDH-Test) zu ermitteln war, konnte in den geringen Konzentrationen keine bedeutende Wirkung durch das Extrakt der Wurzel verzeichnet werden. Erst ab einer Konzentration von 500 µg/ml war eine viabilitätshemmende Wirkung, besonders durch die 3 Wochen alte Wurzel, zu erkennen. Man kann erkennen, dass bei der mittleren und alten Wurzel hier teilweise sogar eine viabilitätsfördernde Wirkung notiert werden konnte, wobei die ermittelten Werte sogar als signifikant dargestellt werden konnten.

Bei 1000 µg/ml war insgesamt die stärkste Abnahme der Viabilität der Zellen zu erkennen, diese wurde durch die junge Wurzel ausgelöst und lag bei ca. 70% Viabilität. Eine nahezu gleiche Abnahme der Zellebensfähigkeit wie bei der jungen Wurzel in der Konzentration 500 µg/ml wurde durch die alte Wurzel in der Konzentration 1000 µg/ml erlangt. Die mittlere Wurzel spiegelte jedoch diese Viabilitätsabnahme nicht wieder; die Wirkung lag bei einer Viabilität von 113% und kennzeichnete somit eine leichte Zunahme dieser. Die Lebendzellzahl, wo Tamoxifen als Zusatz hinzugefügt wurde, lag bei ca. 0% und wies so auf eine Viabilitätsabnahme der Zellen hin. Ein gegenteiliges Ergebnis wurde durch Estradiol bewirkt, dieses hielt die Zellen nahezu stabil bei ca. 100%.

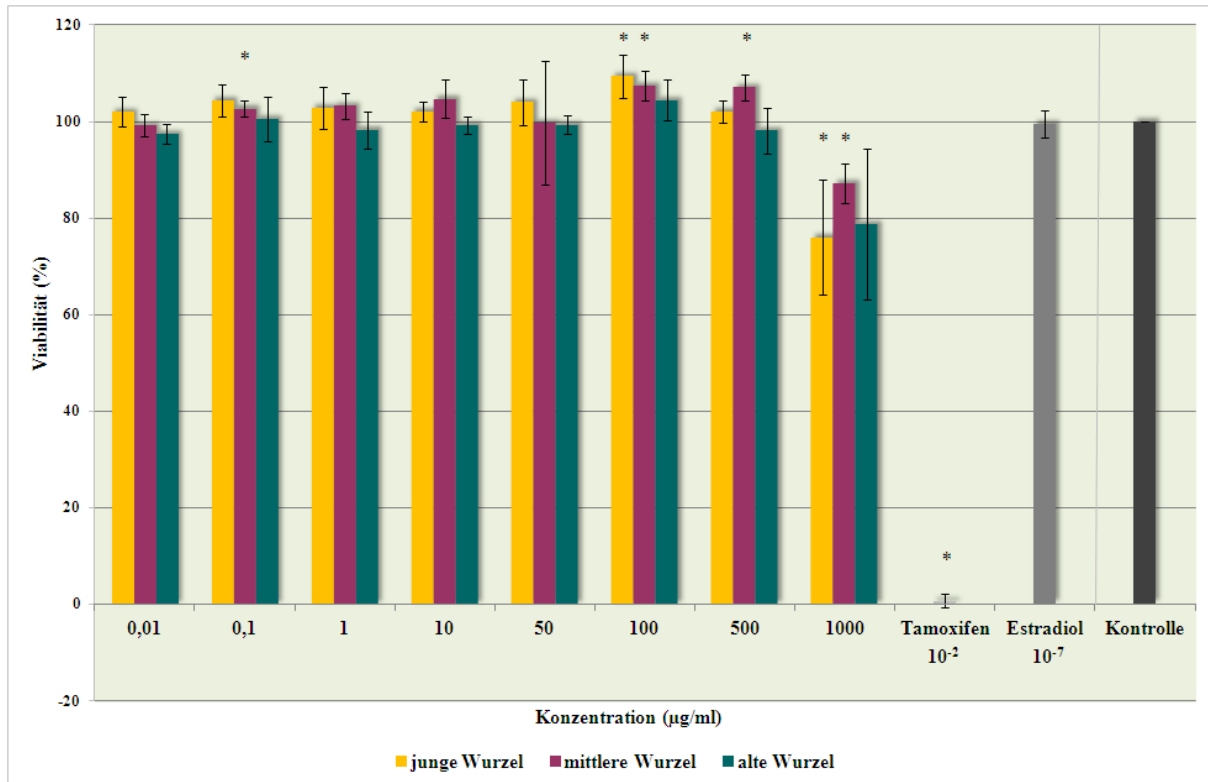


Abb. 48: Viabilitätstest: BT20-Zelllinie - Vergleich zwischen den drei Wurzelaltersstufen
(Kontrolle mit 100% Viabilität = Negativkontrolle 1 (Zellen mit Ethanol), * = Signifikanz)

Ähnlich wie bei den MCF7-Zellen verhielt sich die Wirkung in den ersten sechs Konzentrationen bei den BT20-Zellen. Die Karzinomzellen waren durch den Zusatz des Extraktes nahezu unbeeinflusst. In der Konzentration 500 µg/ml lag der erreichte Prozentwert bei der jungen Wurzel bei ca. 100%. Auch die beiden anderen Wurzelaltersstufen zeigten keine herausragenden Unterschiede hierzu. Die höchste Konzentration mit 1000 µg/ml zeigte Werte zwischen ca. 75%-90%, je nach Wurzelaltersstufe, wobei die höchste Viabilität jedoch bei der mittleren Wurzel zu erkennen war. Die junge und die alte Wurzel zeigten in dieser Konzentration somit den stärksten hemmenden Effekt im Vergleich zu den übrigen Konzentrationen.

Junge Wurzel - 3 Wochen alt (Abb. 49)

Das Leinextrakt der drei Wochen alten Wurzel äußerte seine Maximalwirkung auf die Zellviabilität in der Konzentration 1000 µg/ml. Die Viabilität der Zellen lag hier bei ca. 70% (MCF7-Zellen) bzw. 75% (BT20-Zellen). Eine wesentliche Wirkung dieser Wurzelaltersstufe war erst in der höchsten getesteten Konzentration zu erkennen, während in niedrigeren Konzentrationen lediglich bei 500 µg/ml eine Wirkung auf die MCF7-Zellen zu verzeichnen war. Die Wirkung von Tamoxifen und Estradiol wurde in diesem und in den folgenden Abschnitten nicht erneut erwähnt, da diese zuvor bereits ausführlich erläutert wurde.

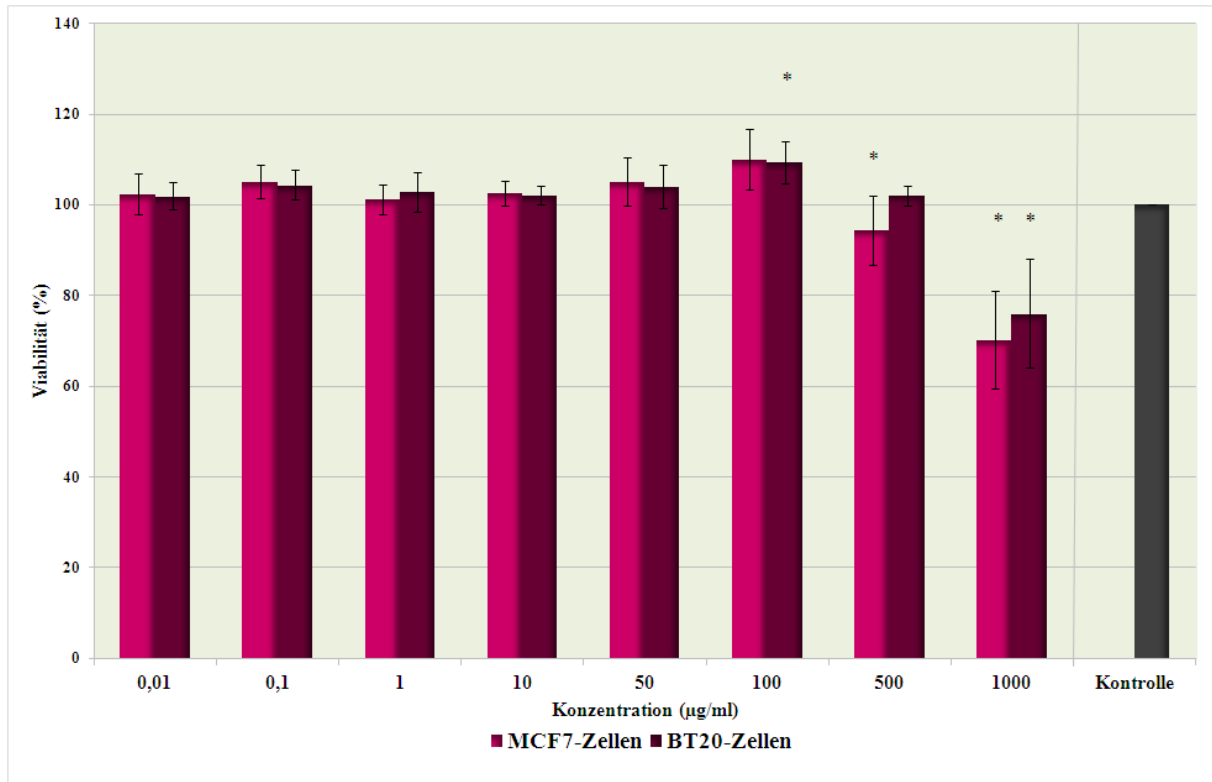


Abb. 49: Viabilitätstest: Junge Wurzel - Vergleich zwischen beiden Karzinomzelllinien
(Kontrolle mit 100% Viabilität = Negativkontrolle 1 (Zellen mit Ethanol), * = Signifikanz)

Mittlere Wurzel - 6 Wochen alt (Abb. 50)

Das Extrakt der 6 Wochen alten Wurzel der Pflanze *Linum usitatissimum* äußerte im Viabilitätstest in den niedrigen Konzentrationen keinerlei herausragende Wirkung. Bei den Konzentrationen 100 µg/ml und 500 µg/ml fielen sowohl in Bezug auf die MCF7-Zelllinie, als auch bei der BT20-Zelllinie eher steigende Prozentwerte der Viabilität auf (ca. 110%). Nur bei der BT20-Zelllinie war in der Konzentration 1000 µg/ml eine Einschränkung der Viabilität auf ca. 85% im Vergleich zur Kontrolle (Zellen mit Ethanol) auffallend.

Alte Wurzel - 12 Wochen alt (Abb. 51)

Auch hier, wie schon bei der jungen und mittleren Wurzel beobachtet, lag die Zellviabilität in den niedrigen Konzentrationen bei nahezu 100%. Bei 500 µg/ml lag die Zellviabilität der MCF7-Zelllinie bei ungefähr 115% und sank in der höchsten Konzentration auf ca. 95% ab. Im Vergleich dazu lag die der BT20-Zellen in der höchsten Konzentration bei knapp 80%.

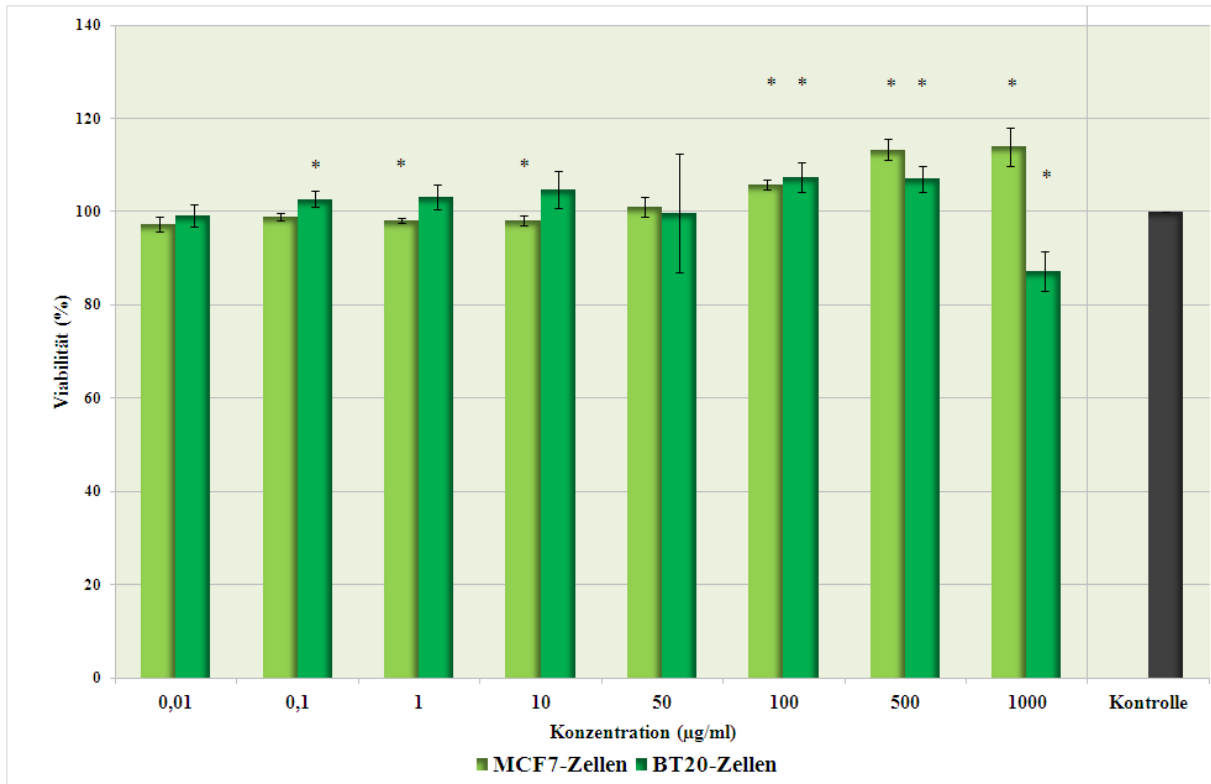


Abb. 50: Viabilitätstest: Mittlere Wurzel - Vergleich zwischen beiden Karzinomzelllinien
(Kontrolle mit 100% Viabilität = Negativkontrolle 1 (Zellen mit Ethanol), * = Signifikanz)

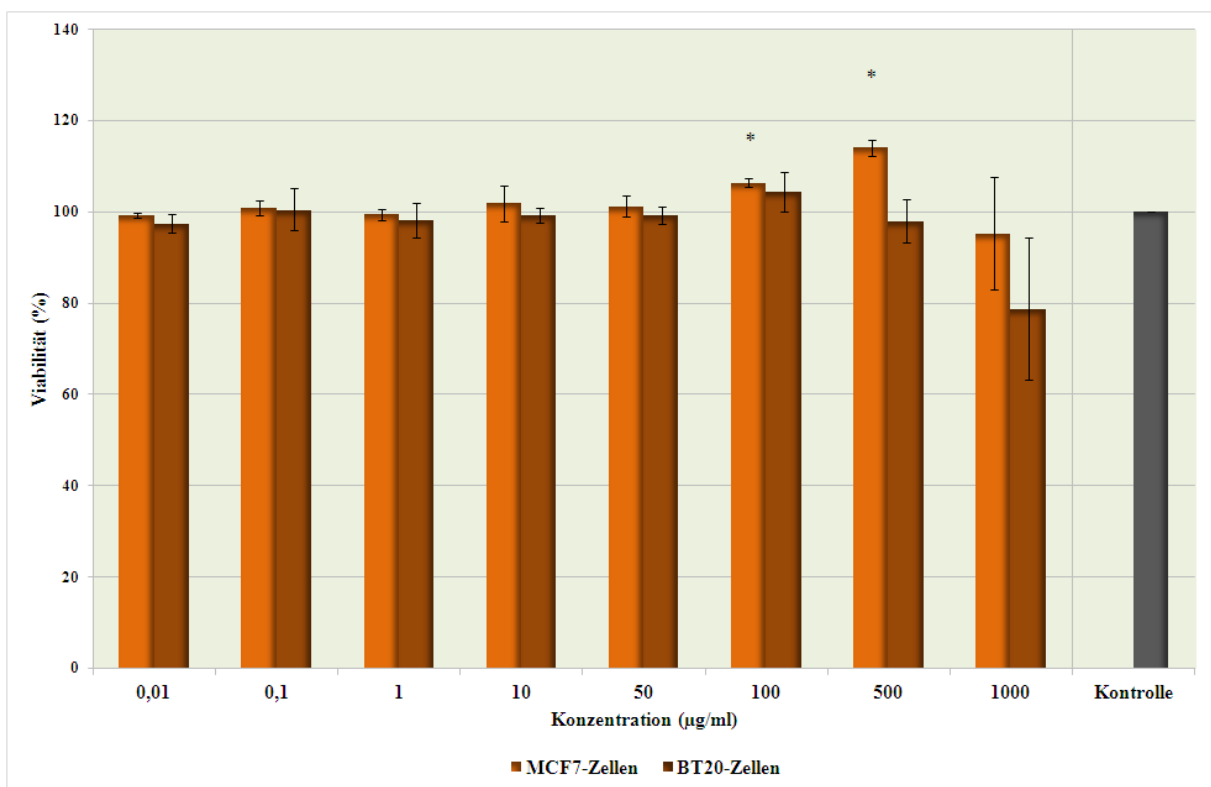


Abb. 51: Viabilitätstest: Alte Wurzel - Vergleich zwischen beiden Karzinomzelllinien
(Kontrolle mit 100% Viabilität = Negativkontrolle 1 (Zellen mit Ethanol), * = Signifikanz)

4.2.5 Pyrolyse-Feldionisation-Massenspektrometrie (Py-FIMS)

In der Agrar- und Umweltwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock wurden die verwendeten drei Leinwurzelextrakte der unterschiedlichen Wurzelaltersstufen massenspektrometrisch analysiert. Durch die Analyse mittels Py-FIMS konnten die einzelnen Proben in ihre Bestandteile aufgetrennt werden, so dass Markersignale zu verschiedenen Substanzklassen zusammengefasst werden konnten. Dadurch war es möglich, die relativen Anteile einzelner Verbindungsklassen (Angabe in Prozent) an der Totalionenintensität (TII) vergleichend zusammenzustellen (*Tab.7*).

Tab. 7: Inhalte einzelner Stoffklassen der verschiedenen Wurzelaltersstufen (in Prozent)

Stoffklassen	Junge Wurzel	Mittlere Wurzel	Alte Wurzel
Kohlenhydrate	1,1	1,8	1,6
Monolignone	1,3	2,3	2,6
Lignindimere	2,8	2,3	4,0
Alkane, Alkene, Aldehyde, Alkohole, Fettsäuren, n-Alkylester, Wachse, Fette	27,0	25,8	22,8
N-haltige Verbindungen	0,8	1,1	1,8
Isoprenoide Verbindungen (Sterole, Terpene, Carotinoide)	36,3	36,6	29,4
Peptide und freie Aminosäuren	3,0	2,3	1,6
niedermolekulare Verbindungen m/z 15 bis 56	13,3	11,5	2,7
Lignane	0,4	0,9	2,4
Flavone	0,3	0,1	0,1
Isoflavone	0,3	0,3	0,3
Sonstige Polyphenole (Suberin, Cutin, Stilbene, Tannine etc.)	2,9	4,4	9,5
Polyphenole	6,8	8,0	16,3

Wichtige Inhaltsstoffe, die auch für die vermittelte Wirkung der Leinwurzel verantwortlich sein können, waren die Lignane, Isoflavone, Flavone, Fettsäuren in freier gesättigter und ungesättigter Form, Kohlenhydrate, stickstoffhaltige Verbindungen (vorwiegend heterozyklisch bzw. heteroaromatisch), Monolignole, Glyceride, Peptide, (Poly)Phenole, Alkylaromaten, Lipide, Alkane, n-Alkylester, Alkene, Alkylaromaten, isoprenoide Verbindungen (Sterole, Terpene, Carotinoide) und Suberine.

Im Verlauf soll hier nur auf essentielle Unterschiede eingegangen werden, da die Tab. 7 selbstsprechend für alle prozentualen Unterschiede ist. Insgesamt den höchsten Anteil des

Extrakt machte die Gruppe der isoprenoiden Verbindungen aus; zwischen 29,4% und 36,6% waren im Extrakt enthalten. Die Alkane (mit Alkenen, Aldehyden, Alkoholen, Fettsäuren, n-Alkylester, Wachsen und Fetten) machten ebenfalls einen beachtlichen Anteil aus und waren in der jungen Wurzel mit 27% vertreten. Die Lignane und Isoflavone waren im Ganzen allerdings in geringen Anteilen vertreten.

5 Diskussion

In diesem Abschnitt sollen die wichtigsten Ergebnisse, die bei dieser Arbeit erzielt wurden, im Wesentlichen zusammengefasst und ein Vergleich mit vorliegender Literatur gezogen werden. Wichtige Unterschiede sollen herausgearbeitet und Gründe für die hier gewonnenen Ergebnisse abgeleitet werden.

5.1 Immunhistochemie

Schon im Kapitel „Einleitung“ wurde erwähnt, dass der immunhistochemische Status der Tumorzelle die Therapieentscheidung und somit auch die Prognose der Erkrankung wesentlich beeinflusst. Patientinnen mit hormonrezeptorpositivem (ER+, PR+) Status zeigen ein gutes Ansprechen auf eine versuchte Antihormontherapie (*Kiang et al. 1978; Bühling und Friedmann 2004*).

Nicht nur das Vorhandensein bzw. Nichtvorhandensein von besagten Rezeptoren soll ausschlaggebend für die mittlere Überlebenszeit der Patientinnen sein, auch das Erkrankungsalter der Mammakarzinompatientinnen ist essentiell. Es heißt, dass junge erkrankte Patientinnen, die nur aufgrund ihres Erkrankungsalters eingeteilt werden müssten, als Hochrisikopatientinnen angesehen werden können (*Kroman et al. 2000*). Häufig zeigt dieses Patientinnenkollektiv einen negativen Rezeptorstatus, wobei nicht nur Estrogenrezeptoren fehlen, sondern auch Progesteronrezeptoren nicht nachweisbar sind. Vielfach ist ebenfalls der HER-2-neu-Rezeptorstatus negativ, wobei betroffene Frauen häufig nicht älter als 40 Jahre alt sind. Insgesamt bedeutet dies für die Karzinompatientin eine schlechtere Prognose (*Keegan et al. 2012; Bauer et al. 2007*).

In der durchgeführten Immunhistochemie (**Abb. 18-25**) wurde geprüft, ob der existierende Rezeptorstatus der verwendeten MCF7- und BT20-Zellen mit den Angaben, die die Literatur liefert, übereinstimmt oder ob Differenzen zu erkennen waren. Bekanntlich weisen MCF7-Zellen einen Estrogenrezeptor auf, weshalb sie als estrogenrezeptorpositive Mammakarzinomzelllinie bezeichnet werden (*Brooks et al. 1973*). Es konnte bestätigt werden, dass auch die hier untersuchte Mammakarzinomzelle des Typs MCF7 u.a. die bereits in der Literatur erwähnten Estrogenrezeptoren aufwies (*Ryde et al. 1992*). Die Testung bestätigte vorhandene α -Estrogen-, β -Estrogenrezeptoren und Progesteronrezeptoren.

Im Gegensatz dazu wurde die BT20-Zelllinie divergent in der Immunhistochemie dargestellt. Auf der Zelloberfläche waren keine Estrogen- oder Progesteronrezeptoren vorhanden. Dies macht sie zu einer estrogenrezeptornegativen Karzinomzelle, was Angaben in der Literatur nur belegen (*Bignon et al. 1990*).

5.2 Kontrollsubstanzen – Tamoxifen und Estradiol

Tamoxifen als selektiver Estrogenrezeptormodulator nimmt in der Therapie des Mammakarzinoms einen hohen Stellenwert ein. Da das körpereigene Estradiol an der Entstehung oder Neubildung des Mammakarzinoms beteiligt ist, kann Tamoxifen als Antiestrogen als Therapieoption eingesetzt werden (*Bühling und Friedmann 2004*). Es zeigt zusätzliche Wirksamkeit in der Prophylaxe brustkrebsgefährdeter Patientinnen, bei denen ein Erkrankungsausbruch noch nicht stattgefunden hat (*Dhingra 2001*). Durch Bindung an den Estrogenrezeptor kann der estrogenabhängige Anreiz des Karzinomwachstums unterbunden werden, die Proliferation der Brustkrebszellen kann so aufgrund dieses Mechanismus gehemmt werden (*Howell et al. 2004*). Die zytotoxische Wirkung des Tamoxifens konnte durch die erzielten Ergebnisse im durchgeführten LDH-Test bestätigt werden. Zudem zeigte sich eine Konzentrationsabhängigkeit, wobei durch Tamoxifen in der niedrigsten verwendeten Konzentration von 1 µg/ml diese zytotoxische Wirkung nicht dargestellt werden konnte. In den hohen Konzentrationen äußerte sich diese Wirkung jedoch mit einer Zytotoxizität von bis zu 80% (**Abb. 31**). Die Proliferation (BrdU-Test) der estrogenrezeptorpositiven Karzinomzellen wurde mit steigender Konzentration als abnehmend beurteilt (**Abb. 45**). Auch die Viabilität der Zellen, die mittels MTT-Test beurteilt wurde, nahm mit steigender Konzentration ab (**Abb. 38**). In dem spezifischen Test, der ebenfalls die Viabilität der Zellen beurteilt (CellTiter-Blue), konnte herausgefiltert werden, dass Tamoxifen in der einzig getesteten Konzentration von 10^{-2} µg/ml die Viabilität der Zellen auf einem niedrigen Level hielt (**Abb. 47**). Die Wirkungen, die Tamoxifen auf die MCF7-Zelllinie ausübte, konnten durch die oben genannte Literatur untermauert werden. Andererseits gibt es Zellen des gleichen Typs MCF7, die eine Resistenz gegenüber diesem SERM erwerben können. Zhou et al. veröffentlichten 2012, dass die Resistenz der veränderten Brustkrebszellen des Typs MCF7 mit dem Protein S100P zusammenhängt. Dieses konnte ursprünglich im Rinderhirn nachgewiesen werden. Unter anderem wurde es aus Schwannschen Zellen und Gliazellen isoliert; es wurde auch in Nicht-Nervenzellen, wie dem Mammdrüsenewebe detektiert (Turusov 1990). Eine Herunterregulierung des Estrogenrezeptorsignalweges, sowie eine verbesserte Zellmotilität sind für diese Art von Karzinomzelle kennzeichnend. Die „resistenten“ MCF7-Zellen zeigen darüber hinaus eine Aktivierung alternativer Signalwege, die das Überleben der Zelle zusätzlich sicher stellen sollen (*Zhou et al. 2012*). In der Literatur ist beschrieben, dass die Expression von Genen, die für verschiedene Typen des Proteins S100 verantwortlich ist, in high-grade Tumoren höher zu sein scheint, als in low-grade Tumoren.

Andererseits ist die Expression in estrogenrezeptorpositiven Tumoren niedriger als in rezeptornegativen (*McKiernan et al. 2011*).

Tamoxifen wurde im LDH-Test in der Konzentration 10^{-2} µg/ml als Kontrollsubstanz mitlaufend getestet und wies eine Zytotoxizität bis 110% auf (**Abb. 26**). Zusätzlich und auch in den weiteren Tests (mit Ausnahme des Viabilitätstests CellTiter-Blue) wurden hier bereits veröffentlichte Daten durch das Forschungslabor der Frauenklinik Rostock erneut aufgegriffen und sollen hier nochmals in anderer Weise diskutiert werden (**Abb. 31, 32, 38, 39, 45, 46**). Die dargestellten Ergebnisse, die aus den verschiedenen Tests resultierten, zeigen, dass Tamoxifen nicht nur auf estrogenrezeptorpositive Zellen wirken kann, sondern eine Wirkung auch bei rezeptornegativen Zellen zu beobachten war. Schon Bardon et al. 1984 konnten in ihrem niedergeschriebenen Artikel über den „antiproliferativen Effekt von Tamoxifen“ zeigen, dass es ebenfalls auf estrogenrezeptornegative Zellen einen zytotoxischen Effekt ausüben konnte (*Bardon et al. 1984*). Taylor et al. 1984 verwiesen darauf, dass der Effekt von Tamoxifen auf BT20-Zellen in hohen Konzentrationen durch einen estrogenrezeptorunabhängigen Weg vermittelt wird. Bei Tamoxifenkonzentrationen über 10^{-6} M wurde eine zytotoxische Wirkung unabhängig vom Rezeptorstatus der Karzinomzelle (MCF7/T47D: ER-positiv, BT20/MDA-MB231: ER-negativ) aufgedeckt. Bei Konzentrationen kleiner 10^{-6} M wurde nur eine geringe Wirkung auf ER-negative Zellen aufgezeigt, was darauf schließt, dass in niedrigen Konzentrationen eher ER-vermittelte Mechanismen eine Rolle spielen (*Taylor et al. 1984*).

Die Hypothese der ER-unabhängigen Wirkung wurde dahingehend verstärkt, dass auch Estradiol als natürlicher „Besitzer“ der Rezeptoren die Tamoxifenwirkung nicht unterbinden konnte (*Bardon et al. 1984*).

Inwieweit Estradiol auf die Proliferation von Mammarkarzinomzellen wirkt, wurde ebenfalls bereits im Kapitel „Einleitung“ erörtert. Estrogenrezeptoren kommen in unterschiedlichen Geweben des menschlichen Körpers vor, sind dabei u.a. in Uterus- oder Brustdrüsengewebe zu finden; in hoher Anzahl kommen sie in maligne entartetem Gewebe wie dem Mammarkarzinom vor (*Treilleux et al. 1997*). Estradiol wirkt sich positiv auf die Proliferation der Zellen aus; seine Wirkung zeichnet sich jedoch auch auf die Morphologie der Zellen ab. Bei den MCF7-Zellen verursacht Estradiol eine Veränderung der Zelloberfläche und bewirkt eine Erhöhung der Anzahl und Länge der Mikrovilli, die der Oberflächenvergrößerung dienen. Spezialisierte Formen der Mikrovilli (die Stereozilien) sind denkbar an Resorptions- oder Sekretionsvorgängen beteiligt. Dieser Effekt wurde allerdings nur bei rezeptorpositiven Zellen nachgewiesen, bei BT20-Zellen war dieses Phänomen nicht aufzudecken. Man könnte

so die Oberflächenveränderungen bzw. den erhöhten Stoffaustausch (Resorption/Sekretion) für eine erhöhte Proliferationsrate mitverantwortlich machen (*Vic et al. 1982; Schiebler und Schmidt 2002*).

Wie erwartet war durch Estradiol kein zytotoxischer Effekt auf beide Zelllinien zu verzeichnen (**Abb. 31, 32**). Jedoch konnte nach Auswertung der weiteren Testverfahren ebenso kein proliferationsstimulierender Effekt, der möglicherweise bei den aufgedeckten proliferativen Eigenschaften des Estradiols zu erwarten wäre, aufgedeckt werden. Lediglich einmalig in einer Konzentration von 5 µg/ml konnte ein viabilitätssteigernder Effekt auf die BT20-Zelllinie erfasst werden (**Abb. 39**). Darüber hinaus lagen alle erzielten Ergebnisse teilweise bei knapp über 100%, so dass auch hier nicht von einer Steigerung der Viabilität bzw. Proliferation gesprochen werden kann. Gründe für die hier gewonnenen Ergebnisse können vielfältig sein. Zum einen könnte die Wirkung des Estradiols konzentrationsabhängig sein, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die hier getestete Konzentration die erwartete Wirkung nicht hervorrufen konnte. Schon Szewczyk prüfte 2007 Estradiolkonzentrationen in ihrer Forschungsarbeit, die die erwartete Wirkung nicht hervorriefen. Auch sie brachte die gewonnenen Ergebnisse mit der gewählten Konzentration in Verbindung und ordnete diese als eventuell zu hoch kalkuliert ein. Die dort gewählte Konzentration von 0,01 µg/ml wurde als zu hoch eingeordnet - eine Zellproliferation blieb aus. Verglichen mit dieser Konzentration lagen die weiteren hier erwähnten Konzentrationen von 1, 5, 10 und 50 µg/ml weit darüber, so dass die Theorie, die Szewczyk 2007 aufstellte, anhand dieser Ergebnisse belegt werden konnte (*Szewczyk 2007*). Dass hohe Konzentrationen an Estradiol ($\sim 10^{-6}$ M) einen hemmenden Effekt ausüben können, zeigten Howell et al. 2001 an MCF7-Zellen (wild type). Es besteht ebenso die Möglichkeit, dass sich Karzinomzellen an bestehende Estradiolkonzentrationen adaptieren und so auch bei vorhandenen niedrigen Estradiolkonzentrationen in in-vitro Experimenten proliferieren können. Physiologische Konzentrationen ($\sim 10^{-9}$ M) führten zu einer Maximalproliferation. Werden MCF7-Zellen in estradiolfreiem Medium bebrütet, stoppt die Proliferation. Diese kann jedoch nach Wochen unter konstanten Bedingungen wieder aufgenommen werden (*Howell et al. 2001*). Dies bestätigt wiederum, dass die Estradiolkonzentration entscheidenden Einfluss auf das Zellwachstum hat.

Eine andere Theorie äußert, dass eine gegenseitige Beeinflussung beider Estrogenrezeptoren existiert. In diesem Zusammenhang kann das Cyclin D1-Gen erwähnt werden, dessen Transkription durch den ER α induziert wird. Er ist, wie in der Literatur beschrieben, für die Proliferation der Zellen verantwortlich. Cyclin D1 gilt als Hauptregulator für den Eintritt in

die proliferative Phase des Zellzyklus. Es wurde die Möglichkeit geäußert, dass der β -Rezeptor eine Estrogen-induzierte Proliferation durch Inhibierung der ER α -Aktivierung und somit durch eine Hemmung der Aktivierung des Cyclin D1-Gen verhindern könnte. Eine estrogeninduzierte Proliferation der Zellen wird so unterbunden (*Liu et al. 2002*). Koehler et al. 2005 besagten in ihren Ergebnissen, dass der ER β nicht essentiell für die Proliferation (Bsp. Uterus) verantwortlich ist. Zellen, wo dieser Rezeptor inaktiviert ist, haben die Fähigkeit zu proliferieren. In Anwesenheit von Estrogenen sind α -ER positive Zellen zur Proliferation befähigt. Ist allerdings der β -Rezeptor in diesen Zellen vorhanden, so kann jedoch auch eine proliferationsinhibitorische Wirkung aufgedeckt werden (*Koehler et al. 2005*).

5.3 Extraktwirkungen

In vorhergehenden Untersuchungen, die die Frauenklinik der Universität Rostock durchgeführte, wurden die besten Ergebnisse durch die Wurzel der Leinpflanze erzielt. Diese konnte sich in Bezug auf ihre Wirkung von dem Blatt und dem Stängel der Pflanze abheben (*Szewczyk 2007*). Aufgrund der Ergebnisse, die Szewczyk 2007 in ihrer Diplomarbeit veröffentlichte, wurde für folgende Versuchsreihen weiterhin gezielt das Extrakt der Wurzel des *Linum usitatissimum* eingesetzt.

Ziel war es herausarbeiten zu können, ob sich die drei getesteten Wurzelaltersstufen, hier weiterhin mit „jung“, „mittel“ und „alt“ bezeichnet, in ihrer Wirkung unterscheiden und eines als am besten wirksamstes Extrakt charakterisiert werden konnte. Darüber hinaus sollten wichtige Unterschiede zu der Freilandpflanze bzw. deren Wurzel herausgearbeitet werden, deren überzeugende Wirksamkeit bereits untersucht und bestätigt wurde. Jedoch war dieser Vergleich bei der alten Wurzel nur eingeschränkt möglich, da die alte Pflanze der Klimakammer nach 12 und die des Freilands nach 9 Wochen geerntet wurde (*Strater 2011*). Die Ergebnisse wurden dennoch auch hierbei verglichen, um eine Wirkungstendenz zwischen beiden Kultivierungsorten herausarbeiten zu können.

5.3.1 Extraktwirkung: LDH – Test

Geringe zytotoxische Extraktwirkungen waren in den niedrigen Konzentrationen zu sehen, eine wesentliche zytotoxische Wirkung des Extraktes ist bis 100 $\mu\text{g/ml}$ nicht aufzudecken. Bei beiden Zelllinien zeigte sich eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit, wobei die zytotoxische Wirkung bei beiden Zelllinien mit steigender Konzentration tendenziell zunahm. Die Wirkung in den Extraktkonzentrationen 0,01 – 100 $\mu\text{g/ml}$ soll daher in dieser Diskussion

eher vernachlässigt werden. Ein Effekt bei 100 µg/ml ist nur durch die junge Wurzel bei der MCF7-Zelllinie zu sehen. Besonderes Augenmerk soll auf die Konzentrationen 500 µg/ml und 1000 µg/ml gerichtet werden, die sowohl bei der MCF7-Zelllinie, als auch bei der BT20-Zelllinie zytotoxische Effekte hervorriefen. Bei letzterer Zelllinie wurden zytotoxische Werte allerdings hauptsächlich durch die junge Wurzel erreicht; auf die MCF7-Zelllinie äußerten sich alle Extrakte mit zytotoxischer Wirkung, wobei hier durch die junge bzw. alte Wurzel die Maximalwerte erreicht wurden (**Abb. 26, 27**).

Diese zusammengefassten Ergebnisse zeigen, dass das Leinwurzelextrakt sowohl die estrogenrezeptorpositive, als auch die estrogenrezeptornegative Mammakarzinomzelllinie beeinflussen konnte. Eine mögliche Erklärung dafür könnte ein (estrogen-)rezeptorunabhängiger Wirkungsmechanismus sein, wobei die Wirkung des Extrakts durch andere, hier nicht weiter charakterisierbare Mechanismen vermittelt wurde. Auch Szewczyk 2007 konnte eine Wirkung des Extrakts auf die estrogenrezeptornegative Zelllinie BT20 aufdecken. Dieser Effekt war sogar bei besagter Zelllinie stärker ausgeprägt als die Wirkung, die auf die Vergleichszelllinie MCF7 ausgeübt wurde (*Szewczyk 2007*). Die drei getesteten Extrakte von Strater 2011 (Wurzelextrakt der Freilandpflanzen bei nahezu analoger Versuchsdurchführung) erwiesen sich in Bezug auf die BT20-Zelllinie als nicht zytotoxisch. Sie konnte keinen wesentlichen Effekt auf die BT20-Zelllinie beobachten. Insgesamt fand sie eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Extraktwirkung in dem Erntezeitpunkt der Pflanzen. Sowohl bei Strater 2011, als auch bei Szewczyk 2007 fand die Kultivierung der Pflanzen im Freiland statt. Strater 2011 vermutete eine Beeinflussung durch unberechenbare Witterungsumstände, die sich bei der Kultivierung im Freiland nicht vermeiden ließen. Womöglich könnte dies zu einer unterschiedlichen Stoffanreicherung in den beiden, ebenfalls in verschiedenen Jahren geernteten, Wurzeln führen (*Strater 2011*). In der vorliegenden Arbeit erwies sich die junge Wurzel bzw. die alte Wurzel im LDH-Test als am wirksamsten, wobei die Zytotoxizität durch die junge Wurzel bei der MCF7-Zelllinie in der Konzentration 1000 µg/ml bei 70% lag. Ein ähnlicher Prozentwert wurde durch die alte Wurzel erzielt. In der zweithöchsten Konzentration konnte jedoch die höchste Zytotoxizität durch die junge Wurzel erreicht werden (**Abb. 26**). Strater 2011 konnte im LDH-Test bei den MCF7-Zellen ebenfalls durch die junge und alte Wurzel die höchste Zytotoxizität (ca. 55%) erreichen, beurteilte jedoch insgesamt die alte Wurzel als am vielversprechendsten für weitere Untersuchungen. Bei den BT20-Zellen konnte nur durch die in dieser Arbeit getestete Klimakammerpflanze eine Zytotoxizität aufgedeckt werden (junge Wurzel bis ca. 55%). Bei

Strater 2011 war dies nicht zu beobachten und ist somit ein entscheidender Unterschied zwischen beiden Ergebnissen der Arbeiten.

Es könnte sich Straters genannte Theorie bestätigen und auf die hier bestehenden Umstände übertragen werden: Unterschiedliche Stoffe könnten in der Pflanzenwurzel angereichert sein, die zum einen durch unterschiedliche Kultivierungsumstände (Freiland vs. Klimakammer), als auch durch den unterschiedlichen Erntezeitpunkt bedingt sein könnten. Nicht nur die Erntejahre (Szewczyk 2004, Strater 2007, Dörbecker 2008), sondern auch die Reifegrade der Wurzel wurden nicht vereinheitlicht. Strater 2011 erntete ihre „alte“ Wurzel bereits im Alter von 9 Wochen, wobei die hier als „alt“ bezeichnete Wurzel erst nach 12 Wochen geerntet und extrahiert wurde. Ein Grund für die unterschiedliche Ausprägung der Zytotoxizität könnte die so beeinflusste Stoffzusammensetzung sein. Womöglich hat auch die Blütephase der Pflanze Einfluss auf die Stoffanreicherung des Extraktes (12 Wochen alte Wurzel).

Nicht nur die Leinpflanze als solche, sondern auch andere Pflanzen (wie der Rotklee) sind durch ein reiches Vorhandensein an Phytoestrogenen gekennzeichnet. Diese Phytoestrogene, zu denen auch die Isoflavone zählen, können eine antikanzerogene Aktivität durch eine Reihe verflochtener Prozesse vermitteln (*Liu et al. 2012*). Dass Inhaltsstoffe, die in der Leinpflanze vorkommen, durch eine zytotoxische Aktivität gekennzeichnet sind, zeigten auch Mohagheghzadeh et al. 2007 (*Mohagheghzadeh et al. 2007*). Stürtz veröffentlichte 2008 in ihrer Dissertation über die Analytik von Isoflavonen, dass die jeweilige Stoffzusammensetzung im Rotklee durch verschiedene Faktoren beeinflusst wird und untermauert somit die oben aufgestellte Hypothese der bestehenden Abhängigkeit von Kultivierungsbedingungen. Umwelteinflüsse wie klimatische Bedingungen und die Art der Kultivierung sind nur zwei Beispiele, die verdeutlichen sollen, dass die Kultivierungsumstände einen Einfluss auf die Stoffzusammensetzung bzw. das Wirkprofil der jeweiligen Pflanze haben können (*Stürtz 2008*).

Im Allgemeinen gestaltet es sich schwierig, einen Vergleich zwischen hier gewonnenen Ergebnissen und vorhandenen Angaben in der Literatur zu ziehen, da größtenteils andere Komponenten der Leinpflanze (wie die Leinsamen) auf ihre Wirkung hin untersucht wurden. Auch Leinsprossen sind laut Literatur in Bezug auf die Wachstumshemmung von MCF7-Zellen wirkungsvoll. Sie erhöhen die Apoptoserate der Zellen und erhöhen den Zelltod bei Transkriptionssteigerung des Faktors p53. Dieser ist als Tumorsuppressorgen verantwortlich für die Wachstumshemmung bei Tumorzellen. Nicht nur die MCF7-Zellen konnten durch diese Sprossen in ihrem Wachstum gehemmt werden, auch eine estrogenrezeptornegative Zelllinie sprach auf den Spross an. Lee und Cho 2012 konnten diese antikanzerogene

Wirkung bzw. die induzierte Apoptose auch bei MDA-MB-231-Zellen beobachten, die als estrogenrezeptornegative Zelllinie charakterisiert ist. Im Vergleich zur dort festgelegten Kontrolle konnte die p53-Gentranskription in MCF7-Zellen um 53% und die der MDA-MB-231-Zellen um 96% gesteigert werden. Dies zeigt, dass ein Anstieg der p53 vermittelten Apoptose durch Leinsprossen für ein reduziertes Karzinomwachstum verantwortlich ist (*Lee and Cho 2012*). Anhand der vorliegenden Ergebnisse des durchgeführten LDH-Tests ist auch aufgrund dieser Grundlage ein (estrogen-)rezeptorunabhängiger Effekt durch Wurzelinhaltsstoffe nicht auszuschließen.

5.3.2 Extraktwirkung: MTT – Test

Wie sich das Extrakt auf die Viabilität der beiden Karzinomzelllinien auswirkte, wurde im durchgeführten MTT-Test festgehalten. Dieser diente der quantitativen Bestimmung vitaler Zellen im Medium, wobei das mitochondriale Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System involviert ist - das Tetrazoliumsalz MTT wird zu Formazan reduziert. Dieses konnte detektiert werden und diente als Maßstab für die Bestimmung lebender Zellen (*Berridge and Tan 1993*). Der Test ist abhängig vom Aktivierungsgrad der überlebenden Zellen (*Mosmann 1983*). Abbildungen 33 und 34 zeigen die Wirkung der Leinwurzelextrakte auf beide untersuchten Zelllinien. Bei den MCF7-Zellen war beispielsweise bei 100 µg/ml eine geringgradige Steigerung der Viabilität auszumachen, diese lag um 110-120%. Lediglich in der hohen Konzentration war eine Abnahme der Viabilität bei der jungen Wurzel zu erkennen. Die alte Wurzel führte zu einer massiven Viabilitätssteigerung bis auf ca. 190-200% (**Abb. 33**). Auch Strater 2011 konnte eine Steigerung in ihren hohen getesteten Konzentrationen aufdecken; Wurzeln der Freilandpflanzen führten hier bei der mittleren Wurzel zu Werten bis knapp über 120%. Straters junge Wurzel konnte in der hohen Konzentration aufgrund mangelnder Ernteausbeute nicht getestet werden, so dass es nicht möglich war, einen Vergleich zwischen den Pflanzen der Freilandkultur und Klimakammer zu ziehen.

Während bei Strater 2011 die alte Wurzel in der Konzentration 500 µg/ml zu einer Vitalitätssteigerung auf ca. 120% führte, konnte in der hier vorliegenden Arbeit in der gleichen Konzentration bei selbiger Wurzelaltersstufe eine Steigerung bei den MCF7-Zellen bis ca. 190% registriert werden (**Abb. 33**). Bei 1000 µg/ml lag der Wert sogar bei knapp 200% (Vergleich Strater 2011 ca. 125%). Zwar führte bei beiden Arbeiten die alte Wurzel zu einer Steigerung der Viabilität, allerdings war das Ausmaß der Wirkung bei einer großen Differenz sehr unterschiedlich.

Die alte Wurzel der Klimakammerpflanze führte bei den BT20-Zellen im Vergleich zu der Freilandpflanze zu einer Viabilitätshemmung bis auf 70% in der höchsten Konzentration (**Abb. 34**), (Strater 2011 ca. 110%). Ob bei Strater 2011 ebenfalls die Möglichkeit bestand, dass auch Konzentrationen der jungen Wurzel zu herausstechenden Ergebnissen führen könnten, konnte jedoch aufgrund mangelnder Ernteausbeute leider nicht herauskristallisiert werden. Fakt ist jedoch, dass in dieser vorliegenden Arbeit auch bei der jungen Klimakammerwurzel (BT20-Zellen) in der Konzentration 500 µg/ml ein Wert zwischen 170% und 180% erreicht wurde, der jedoch bei 1000 µg/ml auf 90% abfällt. Wie lassen sich diese Tatsachen erklären?

Bei Betrachtung der Ergebnisse, die mit der Klimakammerpflanze im LDH-Test erzielt wurden, würde man bei den BT20-Zellen eher erwarten, dass auch hier der Schwerpunkt auf die junge Wurzel gelegt werden könnte. Doch wider Erwarten waren die Ergebnisse inhomogen und nicht eindeutig zu interpretieren. Obwohl es die alte Wurzelstufe war, die in ihrer hemmenden Wirkung im MTT-Test auf die BT20-Zellen herausstach und so bei beiden Kultivierungsorten identisch war, lässt sich das Ergebnis bei beiden Arbeiten nicht durch den LDH-Test belegen. In den Abbildungen 26 und 27 ist zu sehen, dass die junge Wurzel eine hohe Zytotoxizität (LDH-Test) auf beide Zelllinien ausübte. Im MTT-Test konnte der erwartete Viabilitätsverlust durch die junge Wurzel nur teilweise bestätigt werden. Ein möglicher Grund für die Inhomogenität der Ergebnisse könnte sein, dass sich die Zellen in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus befanden. Das Einsäen bzw. die Kultivierung der Zellen fand statt, ohne dass auf den Zyklus der Zelle Rücksicht genommen werden konnte, da ein einheitliches Aussäen unmöglich war. Es kann vermutet werden, dass die Zellen über Kompensationsmechanismen verfügen, die sie dazu befähigen, Abwehrmechanismen zu entwickeln, um ein weiteres Überleben trotz Zugabe zytotoxischer Substanzen zu garantieren. Die Zelle könnte durch Zugabe des Extrakts mit einer Zunahme der mitochondrialen Aktivität und somit auch der Zellebensfähigkeit reagieren. Andererseits könnte sich die Wirkung des Extraktes auch durch eine Abnahme der Viabilität äußern, wenn die Zelle sich in einer Phase des Zellzyklus befindet, die sie insgesamt anfälliger für das Extrakt macht.

Eine Therapie mit Chemotherapeutika kann allgemein bei rasant wachsenden proliferierenden Tumoren gut anschlagen, die momentan den Zellzyklus durchlaufen und generell eine kurze Verdopplungszeit aufweisen. Unterteilt man Tumorzellen in drei Populationen – proliferierende, ruhende und differenzierte Zellen, so ist eine Chemotherapie bei differenzierten Zellen bedeutungsloser, da diese nicht mehr befähigt sind in die Proliferationsphase übergehen zu können (Aulbert 2012). Dies verdeutlicht, dass die

durchlaufende Phase des Zellzyklus für das Anschlagen eines Chemotherapeutikums und möglicherweise auch für das Anschlagen des Extraktes entscheidend ist. Befinden sich Zellen in der G₀-Phase, der Ruhephase des Zyklus, so sind diese meist unempfindlich in Bezug auf diese Therapie (Aktories 2009). Ein Anstieg der Zellzahl ist auch während der Behandlung mit Chemotherapeutika beschrieben. Dies wird als sekundäre Resistenz bezeichnet, welche jedoch erst zeitversetzt eintritt (Aulbert et al. 2012). Zwar war die Wirkung des Extraktes nicht „chemotherapeutikagleich“, jedoch könnte auch das Extrakt dazu geführt haben, dass vor dem Zelltod ein Anstieg der Zellzahl ausgelöst wurde.

Den Inhaltsstoffen des Extraktes – u.a. den Isoflavonen wird eine antikanzerogene Wirkung zugeschrieben (s.o.). Auch bei anderen Karzinomzellen, wie den HeLa-Zellen (Zellen des Zervixkarzinoms) konnte eine Wirkung der Isoflavone beobachtet werden. Eine verminderte Überlebensrate der HeLa-Zellen wurde durch den MTT-Test als in vitro Testmethode aufgedeckt und verdeutlicht, dass eine Induzierung der Apoptose über den mitochondrialen Vermittlungsweg nicht auszuschließen ist (Xiao et al. 2011).

Fakt ist, dass die Wirkung der drei Extrakte auf beide Zelllinien eine estrogenrezeptorunabhängige Signalkaskade vermutet lässt, da durch das Extrakt auch ein Effekt auf die BT20-Zelllinie ausgeübt wurde. Die Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die (hemmende) Wirkung des Extraktes teilweise ebenfalls auf mitochondrialer bzw. endoplasmatischer Schiene ausgeübt wurde.

5.3.3 Extraktwirkung: BrdU – Test

Zur Beurteilung der Zellproliferation wurde der BrdU-Test herangezogen. Entsprechend den weiteren Tests wurden auch hier die drei Leinwurzelextrakte in jeweils acht verschiedenen Konzentrationen untersucht. Bromdesoxyuridin (BrdU) wird als Thymidinanalogon in die DNA sich teilender Zellen eingebaut und dient so als Maß für die Replikation der Tumorzellen (Wojtowicz and Kee 2006). Durch eine Antikörperbindung bzw. eine farbliche Darstellung des gebildeten Immunkomplexes kann das BrdU indirekt dargestellt werden.

Auch in diesem Fall wurde in den niedrigen Konzentrationen mit keiner wesentlichen Auswirkung auf die Proliferation gerechnet; diese Tatsache kann Abbildung 40 zumindest bei den MCF7-Zellen belegen. In den Konzentrationen 500 µg/ml und 1000 µg/ml war es besonders die junge Wurzel, die zu einer Proliferationshemmung der MCF7-Zellen führte. Die Proliferation lag bei 500 µg/ml mit 80% somit ähnlich wie bei Strater 2011 (ca. 85%). Leider konnte auch in diesem Fall der Vergleich in der hohen Konzentration nicht gezogen werden, da die Ausbeute bei der Extrakterstellung Straters nicht ausreichte, um alle

Konzentrationen austesten zu können. In dieser vorliegenden Arbeit wurde bei der mittleren Wurzel bei 1000 µg/ml ebenfalls eine Hemmung von ca. 20% erreicht. Die alte Wurzel führte in der zweithöchsten Konzentration zu einer Proliferationssteigerung auf über 130% (**Abb. 40**). Dieses Phänomen der Proliferationssteigerung war bei Strater 2011 in den beiden hohen Konzentrationen nicht zu beobachten. Sie konnte bei der mittleren und alten Wurzel eine Hemmung der Proliferation erreichen, die beispielsweise bei der alten Wurzel bei ca. 50-60% lag. Somit konnte dort die beste Wirkung auf die MCF7-Zellen durch die alte, gefolgt von der mittleren Wurzel erzielt werden. Während die Freilandpflanze so hauptsächlich durch die alte Wurzel eine Wirkung verübte, lag zudem auch die Stärke der Hemmung eher auf Seiten Straters 2011 (Dörbecker - junge Wurzel: Hemmung ca. 25% in Konzentration 1000 µg/ml vs. Strater 2011 - alte Wurzel: Hemmung ca. 60% in Konzentration 1000 µg/ml). Ob das gegenteilige Ergebnis der Proliferationssteigerung bei den Klimakammerpflanzen (im Vergleich zu der Freilandpflanze) an dem unterschiedlichen Erntezeitpunkt der alten Wurzel lag, kann hier nur gemutmaßt werden.

Abbildung 41 zeigt die Auswirkung auf die BT20-Zellen. Ferner wäre bei Berücksichtigung des LDH-Tests ein Rückgang der Proliferation lediglich bei der jungen Wurzel zu erwarten. Diese Tatsache konnte jedoch im BrdU-Test nicht bestätigt werden. In hohen Konzentrationen führte das Extrakt der jungen Wurzel eher zu einer Steigerung der Proliferation auf bis zu 140%. Jedoch konnten hier auch niedrigere Konzentrationen die Proliferation der Zellen beeinflussen (ca. 65% bei 100 µg/ml). Das mittlere Extrakt zeigte eine stark hemmende Wirkung bei 500 µg/ml (50%, signifikant); einen „Ausreißer“ (Proliferation über 120%) gab es in der hohen Konzentration. Strater 2011 konnte durch ihr mittleres Freilandextrakt die Proliferation der Zellen um maximal 55% senken. Auch bei der alten Wurzel ergab sich bei ihr eine Hemmung auf ca. 50% (Strater 2011). In den beiden hohen Konzentrationen konnte auch das hier getestete alte Extrakt der Pflanze aus der Klimakammer eine Hemmung von 30% bzw. 10% erreichen.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass auch hier eine stärkere Hemmung durch das Freilandextrakt erreicht werden konnte. Während die konzentrationsabhängige Hemmung bei Strater 2011 auf Seiten der alten Wurzel lag und bei den MCF7-Zellen als gering wirkungsvoller zu beurteilen war, war die effektivste Wurzel der Gewächshauskultur nicht einheitlich beurteilbar und schien in höherem Grad in den verschiedenen Konzentrationen zu variieren. Um den hohen Prozentwert der Proliferation bei der jungen Wurzel in der Konzentration 1000 µg/ml (BT20-Zellen) erklären zu können, kann die Theorie der bereits oben erwähnten Zellzyklusabhängigkeit herangezogen werden. Möglicherweise reagierten

auch diese Zellen mit einem Kompensationsmechanismus, so dass von einer Ankurbelung der Teilungsrate ausgegangen werden konnte, um dem extraktabhängigen Zelltod entgegen wirken zu können. 1998 wurde durch Moorghen et al. beschrieben, dass kompensatorische Mechanismen existieren, die zu einer Erhöhung der Zellproliferation bei steigender Apoptose führen können (Moorghen et al. 1998).

Wieder bestätigt sich die Annahme, dass das Extrakt seine Wirkung nicht ausschließlich über ER-abhängige Signalwege vermittelte, da sowohl bei den MCF7-, als auch bei den BT20-Zellen ein Effekt (sei es proliferationssteigernd oder –hemmend) erzielt wurde. In der Literatur ist wiederholt beschrieben, dass eine estrogenrezeptorunabhängige Wirkung durchaus belegt ist. Lee et al. konnten in ihrer Arbeit 2012 über getestete Leinsprossen zeigen, dass eine Hemmung des Zellwachstums bzw. eine Reduzierung der Zellproliferation durch Leinsprossen durchaus auch bei ER-negativen Zelllinien aufgedeckt werden konnte. Zwar wurde als ER-negative Zelllinie nicht die BT20-Zelle eingesetzt, aber auch die MDA-MB-231-Zelle diene sicherlich als gutes Beispiel für einen Vertreter einer solchen ER-negativen Zelle. Diese Hemmung der Proliferation konnte schon in der Konzentration 100 µg/ml erfasst werden. Darüber hinaus konnten sie anhand von MCF-10A-Zellen (Epithelzelle der Brustdrüse) zeigen, dass die proliferationshemmende Wirkung des Leins lediglich bei kanzerösen Zellen zu bemerken war. Non-kanzerogene Zellen blieben dagegen unbeeinflusst (Lee and Cho 2012). Dies sollte als Voraussetzung gesehen werden, falls das Extrakt der Leinwurzel zur Therapie maligner Erkrankungen eingesetzt werden würde. Da nur wenige Literaturangaben über die Wirkung des Leinwurzelextraktes existieren bzw. bereits vorhandene größtenteils aus dem Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik Rostock stammen, soll auf andere Komponenten der Leinpflanze, wie die Leinsamen, eingegangen werden. Dass auch der Leinsamen anteilig Inhaltsstoffe enthält, die sich auf das Zellwachstum von Mammakarzinomzellen auswirken können, zeigten auch Bergman Jungstrom et al. 2007 und Lehraiki et al. 2010. Erstere äußerten die Hypothese, dass sich der Einsatz von Phytoestrogenen in Zukunft in der Prävention von Brustkrebs bewähren könnte (Bergman Jungstrom et al. 2007; Lehraiki et al. 2010). Desweiteren kann sogar von einem verbesserten inhibitorischen Effekt durch Leinsamen gesprochen werden, der sich dahingehend äußert, dass in Kombination mit Tamoxifen die alleinige hemmende Tamoxifenwirkung verstärkt wurde (Chen et al. 2004). Nichtsdestotrotz existieren ebenso kontrovers lautende Resultate. So konnten Kulling und Watzl 2003 aufzeigen, dass durch Genistein, welches auch als Inhaltskomponente in der Leinwurzel zu finden ist, eine Zunahme der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen ausgelöst werden konnte. Beobachtet wurde dies an

Mäusen, die mit menschlichen estrogenabhängigen MCF7-Zellen bestückt wurden. Zudem erwähnten sie eine konzentrationsabhängige Auswirkung von Isoflavonen auf Karzinomzellen (MCF7). Während hohe Konzentrationen ($>10 \mu\text{M}$) die Zellen zu hemmen vermochten, wurde durch niedrige Konzentrationen ($<10 \mu\text{M}$) eine Steigerung der Proliferation aufgedeckt (*Kulling and Watzl 2003*). Die eingesetzte Konzentration schien ein bedeutender Faktor zu sein, inwieweit eine zellinhibitorische Wirkung ausgelöst wurde oder gar gegenteiliges geschah. Vermutlich spielt auch dies eine große Rolle bei der Interpretation der hier gewonnenen Ergebnisse.

5.3.4 Extraktwirkung: CellTiter-Blue

Leider kann die Wirkung der Klimakammerextrakte, ermittelt im Viabilitätstest, nicht mit der Beeinflussung der Zellen durch Freilandextrakte verglichen werden. Daten, die einen Vergleich bei identisch getesteten Konzentrationen zulassen, existieren zurzeit nicht.

Dennoch lieferte der Viabilitätstest Ergebnisse, die dazu dienen, die Resultate des LDH-Tests unterstützen zu können. Er soll Ergebnisse untermauern und zugleich als zweiter Viabilitätstest dienlich sein.

Bei Betrachtung der Extraktwirkung auf die MCF7-Zellen (*Abb. 47*) war zu erkennen, dass auch dort keine Wirkung der Extrakte in den niedrigen Konzentrationen ausgeübt wurde. Erst in den hohen Konzentrationen war ein deutlicher Extrakteffekt aufzudecken. Wie im LDH-Test konnte auch hier die junge Wurzel für eine überragende Wirkung verantwortlich gemacht werden. Sie konnte die Viabilität der Zellen in der höchsten Konzentration sogar um 30% einschränken. Die Wirkung war zwar nicht identisch ausgeprägt, wie sie im LDH-Test auszumachen war, jedoch war eine Tendenz zu erkennen, dass die junge Wurzel in Bezug auf die MCF7-Zellen als effektivste Wurzel charakterisiert werden kann. Die Ergebnisse lassen ebenso die Aussage zu, dass auch durch die alte Wurzel ein minimal hemmender Effekt ausgeübt wurde.

Auch in Bezug auf die BT20-Zellen stach die junge Wurzel im LDH-Test heraus. Während im LDH-Test bei $1000 \mu\text{g/ml}$ eine Zytotoxizität von ca. 55% zu sehen war, war die Abnahme der Viabilität im CellTiter-Blue in gleicher Konzentration mit ca. 25% zu belegen. Dass in der hohen Konzentration (*Abb. 48*) alle Extrakte, unabhängig von ihrer Altersstufe, einen viabilitätshemmenden Effekt auslösten, schien jedoch auf den ersten Blick verwunderlich, da im LDH-Test nur die junge Wurzel auf die BT20-Zellen eine Wirkung zu verursachen vermochte. Da es nicht praktikabel und in der Umsetzbarkeit utopisch war bei allen Testdurchläufen identische Zellpassagen zu verwenden, könnte es durchaus möglich sein, dass mit höherer Zellpassage die Wirkung der Extrakte auf die Zellen verändert war.

Manuelle Pipettiervorgänge, Messfehler und unvermeidliche differente Untersuchungsbedingungen führten möglicherweise zudem zu hohen Standardabweichungen. Auch die Lagerung der Extrakte könnte dies bedingen, da es durch die Dauer der Lagerung (trotz regelmäßiger Verdünnungsreihen mit dem Ursprungsextrakt) möglich war, dass sich das Ethanol als Verdünnungsflüssigkeit verflüchtigen konnte. Eine Konzentrierung des Extraktes wäre die Folge. Dennoch eignete sich das Ethanol sehr gut für die Verdünnung des Extraktes, da keine zytotoxische Wirkung durch die separat getestete Kontrolle alleine (Ethanol+Zellen) aufgedeckt werden konnte. Wenige Literaturangaben, die sich auf das Leinwurzelextrakt beziehen, können insgesamt zum Ergebnisvergleich herangezogen werden. Es existieren jedoch Angaben, wo der CellTiter-Blue bereits auf MCF7-Zellen angewendet wurde. Als getestete antikanzerogene Substanz wurde hier allerdings nicht die Leinpflanze genutzt, sondern das Catechinhydrat, welches als Antioxidanz in Pflanzen bzw. in Rotwein oder Grünem Tee zu finden ist. Tatsächlich konnte auch durch dieses Antioxidanz ein zytotoxischer Effekt u.a. durch Erhöhung von Apoptosevorgängen (erhöhte Genexpression von pro-apoptischen Genen wie Caspase-3 und 8) aufgedeckt werden (*Alshatwi 2010*). Dies verdeutlicht, dass nicht nur durch das pflanzliche Leinwurzelextrakt ein inhibierender Effekt auf Mammakarzinomzellen ausgelöst werden konnte, sondern dass die Schwerpunkte zahlreicher Forschungsarbeiten vielfach im phytomedizinischen Bereich zu finden sind.

5.4 Stoffklassifizierung in der Pyrolyse-Feldionisation-Massenspektrometrie

In der Pyrolyse-Feldionisation-Massenspektrometrie wurden die einzelnen Extrakte molekular-chemisch charakterisiert. Es soll herausgefiltert werden, ob die unterschiedliche Zusammensetzung der Extrakte Einfluss auf die (antikanzerogene) Wirksamkeit der einzelnen Wurzelstufen hatte und ob detektierte Massensignale und damit spezielle Substanzen für die vermittelte Wirkung verantwortlich gemacht werden können.

Zweistellige Prozentanteile u.a. an isoprenoiden Verbindungen, sowie Alkanen, Alkenen, Fettsäuren und niedermolekularen Verbindungen waren in den Extrakten zu finden (**Tab. 7**). Richtet man das Augenmerk auf die junge Wurzel, die sich in vorherigen Tests als sehr wirksam erwies, so fällt auf, dass sie mit 27% die höchsten Anteile an Alkanen, Alkenen, Aldehyden, Alkoholen, Fettsäuren, Wachsen und Fetten aufwies. Ebenfalls die niedermolekularen Verbindungen waren mit 13,3% bei der jungen Wurzel zum größten Teil vorhanden. Lignane, Flavone und Isoflavone nahmen prozentual gesehen nur einen geringen Stellenwert ein und zeigten bis auf den Prozentgehalt der Lignane, der bei der alten Wurzel am höchsten war, keine wesentlichen Unterschiede. Der Lignananteil und Lignindimeranteil

war bei der alten Wurzel am höchsten und könnte u.a. die antikanzerogene Wirkung dieser Wurzelaltersstufe auf die Karzinomzellen erklären.

Der Anteil an Lignindimeren lag bei Strater 2011 besonders bei der mittleren und alten Wurzel höher als bei den Extrakten der Klimakammer. Es war jedoch im Allgemeinen mit Schwierigkeiten verbunden, einen uneingeschränkten Vergleich der Stoffklassen durchzuführen, da auch die Einteilung der jeweiligen Stoffklassen mit Abweichungen vorgenommen wurde. Zudem ist (wie bereits erwähnt) der Vergleich zwischen den alten Wurzeln nicht eindeutig, da Straters Freilandpflanze nach 9 und die Klimakammerpflanze, die in dieser Arbeit verwendet wurde, nach 12 Wochen zur Ernte kam. Im Verlauf soll darauf eingegangen werden, ob jedoch im Vergleich zu Straters Ergebnissen 2011 Unterschiede herauskristallisiert werden können, die zeigen, ob der Schwerpunkt wirksamer Substanzen in ihrer alten Wurzel in der hier getesteten jungen und alten Wurzel wiederzufinden war. Sie bezeichnete die Lignane, die Phenole, Ligninmono- und -dimere und die Fettsäuren als essentielle Stoffe, durch die die antikanzerogene Wirkung begründet sein könnte. Mit 13,3% Lignindimeren lag der Anteil Straters alter Wurzel höher als bei ihrer mittleren und jungen Wurzel. Zudem waren die niedermolekularen Verbindungen am häufigsten in der mittleren Wurzel vertreten (*Strater 2011*). In allen drei Klimakammerwurzelaltersstufen sind Lignane, Flavone und Isoflavone vertreten, die auch bei Strater 2011 in allen Altersstufen zu finden waren. Wird diesen Stoffen eine antikanzerogene Wirkung nachgesagt, waren sie jedoch in relativ geringen detektierbaren Anteilen in den Extrakten vertreten. In Bezug auf die Lignindimere bzw. Phenole zeigte ebenso wie bei Strater 2011 die alte Wurzel die höchsten Prozentwerte. Dagegen äußerte jedoch die junge Wurzel aus der Klimakammer den höchsten Anteil der Gruppe, die die Fettsäuren (auch Alkane, Alkene, n-Alkylester) beinhaltet, während der Hauptanteil dieser Gruppe bei Strater 2011 bei der alten Wurzel zu sehen war. Dies lässt die Aussage zu, dass die vermittelte Wirkung der Extrakte nicht nur durch die Phytoestrogene alleine, sondern ebenfalls durch andere Stoffklassen vermittelt sein könnte. Dies erklärt möglicherweise den wirkungsvollen Effekt der jungen Wurzel aus der Klimakammer.

Der hohe Anteil u.a. an Fettsäuren könnte die in der Literatur beschriebene Theorie bestätigen, dass eine Fettsäuren-vermittelte Wirkung existiert, so dass diese auch auf das Ergebnis dieser Arbeit übertragen werden könnte. Bereits Erickson und Hubbard 2010 beschrieben eine reduzierte Tumorgenese, sowie eine reduzierte Proliferation von Brustkrebszellen durch spezifische Fettsäuren. Dabei erwähnten sie in diesem Zusammenhang die Fettsäure Linolsäure (*Erickson and Hubbard 2010*).

Hauptsächlich Leinsamen wurden in vergangenen Studien auf ihre Wirksamkeit untersucht. Auf MCF7-Zellen in ovariectomierten Mäusen führten die Inhaltsstoffe (u.a. Secoisolariciresinoldiglucosid) zu einer Hemmung des Tumorwachstums - am ehesten durch eine Reduzierung der Tumorphiliferation. Darüber hinaus kam es zu einer Beeinflussung des estrogenrezeptorvermittelten Signalweges (*Saggar et al. 2010*). Auch Leinsamenöl mit enthaltenen Omega-3-Fettsäuren hat potentiell antikanzerogene Wirkmechanismen. Es konnte sogar gezeigt werden, dass eine Kombination von Leinsamenöl mit Trastuzumab 2,5 mg/kg Körpergewicht zu einer geringeren Brusttumorzellproliferation führte. Nach Absetzen des Trastuzumab (bei Beibehalten der Ernährung mit Leinsamenöl) wurde die Tumorgröße dadurch - im Vergleich mit der Trastuzumabwirkung 2,5 mg als Alleingabe - um 87% reduziert. Es konnte durch die Gabe von Leinsamenöl + Trastuzumab 2,5 mg ein ähnlicher Effekt wie mit Trastuzumab in höherer Dosierung (5 mg) oder durch die Kombination von Trastuzumab 5 mg mit Leinsamenöl erzielt werden (*Mason et al. 2010*). Die Wirkung der α -Linolsäure wurde auch durch *Truan et al. 2010* erwähnt. Sie verdeutlichten deren Wirkung auf MCF7-Zellen bei bestehenden prämenopausalen Estrogenkonzentrationen. Mit Linolsäure gefütterte tumortragende Mäuse zeigten im Vergleich zur Kontrolle eine reduzierte Tumorphiliferation, eine gesteigerte Apoptoserate und einen Rückgang der Tumorgröße. Zudem wurde die Expression des epidermal growth factor (EGF) beeinflusst; eine Herabregulierung des Mechanismus konnte registriert werden (*Truan et al. 2010*). In der Tumorgenese nimmt der EGF eine besondere Stellung ein. Insgesamt hat er eine wachstumsstimulierende Aktivität auf Epithel- und Epidermiszellen (*Pschyrembel 2011*). Antikörper, als Beispiel das Cetuximab, können gegen den epidermal growth factor receptor (EGFR) gerichtet sein und u.a. in der Therapie des colorektalen Karzinoms angewandt werden (*Lüllmann et al. 2006*).

Der Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor (PPAR γ) spielt in diesem Zusammenhang ebenfalls eine bedeutende Rolle. Er dient als ligandenaktivierter intrazellulärer Transkriptionsfaktor und wird in einer Vielzahl von unterschiedlichen Tumorarten exprimiert. Unter anderem ist er in Prostata, Lunge, Colon und in der Brustdrüse zu finden (*Mansure et al. 2009*). Bestimmte Liganden (u.a. die Fettsäuren), die xenobiotischen oder endobiotischen Ursprungs abstammen, können an diesen Rezeptor binden und zu einer Aktivierung dessen führen (*Vanden Heuvel 1999*). Auch α -Elaeostearinsäure aktiviert den PPAR- γ -Rezeptor und kann die Proliferation von MCF7-Brustkrebszellen unterdrücken, wobei u.a. ein Anstieg der p53-Expression vorzufinden ist (*Moon et al. 2010*). PPAR γ unterdrückt zudem die Expression von NF κ B, welches als Transkriptionsfaktor die Rolle hat, die Tumorinvasion zu erhöhen

(Carter and Church 2009). Eine Hemmung der Zellproliferation und Angiogenese bzw. eine Apoptosesteigerung ist die Folge einer Ligandenbindung (Mansure et al. 2009; Carter and Church 2009; Elstner et al. 1998), **Abb. 52**.

Ein protektiver Effekt durch Aktivierung des PPAR γ wurde ebenfalls durch Skelhorne-Gross et al. in Bezug auf Brustkrebs aufgedeckt (Skelhorne-Gross et al. 2012).

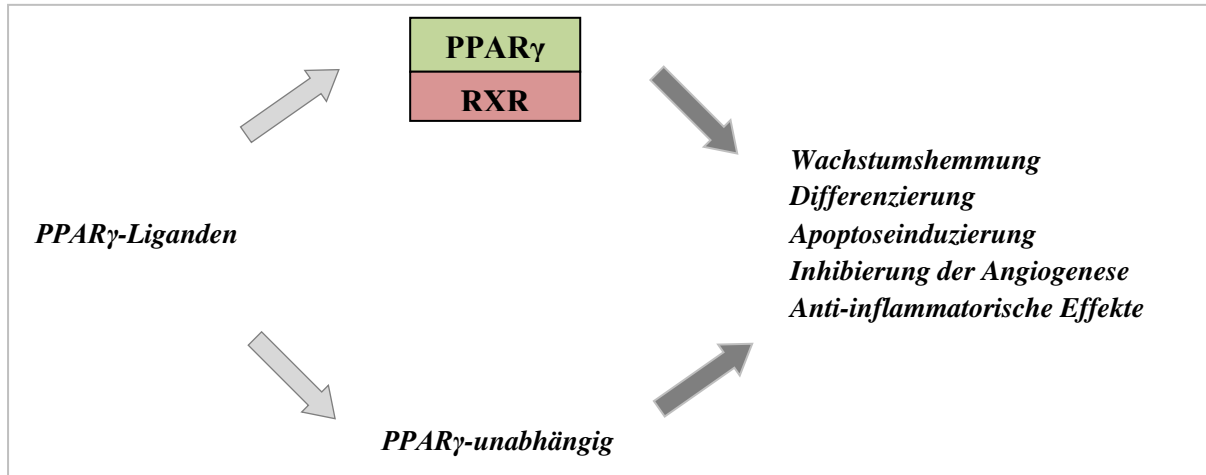


Abb. 52: Wirkung der Liganden über die PPAR-Rezeptoren und über PPAR γ -unabhängige Mechanismen (stark vereinfacht aufgezeigt)

(Quelle: nach Mansure et al. 2009)

Festzuhalten ist, dass viele Autoren von einem Zusammenhang zwischen Ernährung und Häufigkeit des Karzinomauftritts bzw. einer Beeinflussung des Krankheitsverlaufs überzeugt sind. So wird beispielsweise nach Rose 1997 eine mögliche Reduktion der Gesamtfettaufnahme erwähnt, wobei jedoch das Verhältnis von Omega-3- zu Omega-6-Fettsäuren zugunsten der Omega-3-Fettsäuren bei Patienten mit hohem Brust- oder Prostatakrebsrisiko verschoben werden könnte (Rose 1997). Auch durch die oben demonstrierten Ergebnisse wird veranschaulicht, dass das Leinwurzelextrakt einen Effekt verursacht, der sich auf das Wachstum der Mammakarzinomzellen niederschlägt. Obwohl genaue Mechanismen der vermittelten Wirkung nur vermutet werden können, liefern oben genannte Thesen und Ergebnisse anderer Untersuchungen mögliche Vermittlungswege, die auch hier eine Rolle spielen könnten.

Das Vorhandensein von Phytoestrogenen, wie den Lignanen oder Isoflavonen, konnte durch die Pyrolyse-Feldionisation-Massenspektrometrie nachgewiesen werden.

Ebenfalls in dieser Arbeit wurde bereits die in der Literatur beschriebene Wirkung dieser Phytoestrogene festgehalten. Die Aufnahme von Phytoestrogenen dient als Beispiel, um den Zusammenhang zwischen Ernährungsgewohnheiten und einer dadurch unter Umständen reduzierten Karzinomentstehung genauer zu beleuchten.

In Soja enthaltene Isoflavone können auch das Brustkrebsrisiko reduzieren. Vor allem in der asiatischen Bevölkerung ist das Risiko für das Auftreten des Mammakarzinoms geringer als in der westlichen Bevölkerung (*Magee and Rowland 2004*), wofür besonders die Isoflavonaufnahme verantwortlich gemacht wird (*Dong and Qin 2011*). Es ist nicht selten, dass in der japanischen Bevölkerung ein Sojakonsum von bis 200 mg/d möglich ist; dieser ist wesentlich höher als in westlichen Staaten, in denen die Aufnahme bei lediglich weniger als 5 mg/d liegt (*Knight and Eden 1996*). Obwohl der Mechanismus der Phytoestrogenwirkung in der Literatur noch kontrovers diskutiert wird, würden die Ergebnisse dieser Arbeit befürworten, dass ein rezeptorabhängiger Mechanismus (über den ER) möglich war, was nicht heißt, dass ein rezeptorunabhängiger Mechanismus nicht genauso eine Rolle spielen konnte. Möglicherweise sind es nicht nur die Phytoestrogene, sondern auch die Fettsäuren im Extrakt, die die Wirkung vermittelten. Ein Zusammenspiel aller Stoffklassen, welches diesen Effekt verursachte, wird vermutet.

An die Art des Bodens stellt die Pflanze nur geringe Ansprüche, jedoch werden lehmige Sande bzw. sandige Lehme bevorzugt - günstige klimatische Verhältnisse werden vorausgesetzt (*Dambroth und Seehuber 1988*). Die Leinpflanze als eine Pflanze, die in Deutschland weit verbreitet ist, würde sich aufgrund dieses geographischen regionalen Vorteils gut für die weitere Herstellung eines solchen Extraktes eignen.

Jedoch muss herausgefiltert werden, ob nicht nur unterschiedliche Witterungsbedingungen und Lichtverhältnisse Einfluss auf die Stoffzusammensetzung haben (*Strater 2011*), sondern ob auch unterschiedliche Bodenzusammensetzungen Einfluss auf dieses Stoffklassenverhältnis ausüben. Die Kultivierung in der Klimakammer könnte eine gute Möglichkeit sein, die Lebens- und Anzuchtumstände, die auf die Leinpflanze einwirken zu vereinheitlichen, ohne dass dabei auf saisonale Umstände Rücksicht genommen werden muss. Gleiche Licht-, Temperatur- und Bewässerungszustände könnten, vorausgesetzt dies spielt bei der Stoffzusammensetzung eine große Rolle, zu einer konstanten bzw. reproduzierbaren Zusammensetzung an Inhaltsstoffen führen. Zudem kann die junge Wurzel mit nur 3 Wochen Reifezeit und dabei herausstechender Wirkung auf beide Zelllinien (im Vergleich zu der 6 und 12 Wochen alten Wurzel) schnell gezüchtet werden, ohne dass lange Kultivierungszeiten dafür benötigt werden würden. Dass diese aufgeführten Lebensumstände die Anreicherung der Stoffklassen beeinflussen könnten, zeigen auch die Differenzen, die sich zu den Ergebnissen der Freilandpflanze ergaben. Weitere Untersuchungen könnten Hinweise darauf geben, ob eine erneute Kultivierung in der Klimakammer gleiche oder zumindest ähnliche Ergebnisse hervorbringt.

6 Zusammenfassung

Neben kardiovaskulären Erkrankungen gehören Krebserkrankungen wie das Mammakarzinom zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland. Um die standardisierte Therapie des Mammakarzinoms in Zukunft ergänzen zu können, ist der Hintergrund für das Zustandekommen dieser Arbeit die Tatsache, dass in der Leinpflanze bzw. in dem gewonnenen Wurzelextrakt Inhaltsstoffe vorhanden sind, die eine antikanzerogene Wirkung aufweisen. Diese Inhaltsstoffe, zu denen die Phytoestrogene zählen, kommen in beträchtlicher Menge in sojahlhaltigen Produkten vor, die besonders im asiatischen Raum verzehrt werden. Sie sind ein Grund dafür, dass einige Karzinomerkrankungen im asiatischen Raum weniger verbreitet sind. Bewährt hat sich die phytoestrogenhaltige Leinpflanze (*Linum usitatissimum*) bereits in früheren Untersuchungen, wobei besonders die Wurzel in unterschiedlichen in-vitro Testverfahren eine gute Wirkung gegen das Wachstum von Karzinomzelllinien aufwies. Phytoestrogene zeigen eine chemisch strukturelle Ähnlichkeit zu den Estrogenen, die jedoch einen körpereigenen Wachstumsstimulus für das Mammakarzinom darstellen.

Das Thema dieser Arbeit ist, dass drei Leinwurzelextrakte in jeweils 8 verschiedenen Konzentrationen, die durch unterschiedliche Reifegrade von 3, 6 und 12 Wochen gekennzeichnet sind, auf antikanzerogene Eigenschaften geprüft werden. Es sollen Differenzen herauskristallisiert werden, die Indizien dafür geben, ob ein Extrakt als besonders wirksam charakterisiert werden kann bzw. ob es Differenzen zwischen der hier verwendeten Klimakammerpflanze und den Pflanzen der Freilandkultivierung gibt. Als Kontrollsubstanzen dienten Tamoxifen und Estradiol. Festgemacht wurden die Ergebnisse anhand von vier Testverfahren, wobei ein Zytotoxizitätstest, zwei Viabilitätstests und ein Proliferationstest zur Wirksamkeitsbeurteilung des Extraktes dienten. Zur Charakterisierung der Zellen diente eine Immunhistochemie, die den Rezeptorstatus (Estrogenrezeptor α und β , Progesteronrezeptor) der MCF7-Zellen als positiv und den der BT20-Zelle als negativ bestätigte. Mittels einer massenspektrometrischen Analyse wurden die Inhaltsstoffe der Leinwurzel differenziert. Neben Phytoestrogenen konnten auch an anderen Stoffklassen wie die Fettsäuren nachgewiesen werden. Diese Stoffzusammensetzung variierte je nach Altersstufe der Leinwurzel.

Unter Berücksichtigung der o.g. Testverfahren stellte sich die 3 Wochen alte Wurzel als die mit dem besten Wirkpotenzial dar. Besonders im Laktatdehydrogenasetest überzeugte die junge Wurzel in ihrer Wirkung nicht nur in Bezug auf die estrogenrezeptorpositive Zelllinie MCF7, sondern erwies sich auch als antikanzerogen im Hinblick auf die estrogenrezeptornegative BT20-Zelllinie. Ebenfalls durch die alte Wurzel konnte ein guter

zytotoxischer Effekt auf die MCF7-Zellen beobachtet werden. Auch im Viabilitätstest (CellTiter-Blue) wurde in Bezug auf beide Zelllinien eine gute Wirkung durch das junge Leinwurzelextrakt erzielt, jedoch waren hier auch die beiden übrigen Extraktalterstufen wirksam.

Durch den MTT- (Viabilitätstest) und den BrdU-Test (Proliferationstest) wurden teilweise inhomogene Ergebnisse erzielt, die unter anderem durch den heterogenen Zellzyklus der Zellen und durch existente Kompensationsmechanismen erklärt werden können. Zusammenfassend ist zu sagen, dass bei der Klimakammerpflanze die junge Wurzel bei beiden Karzinomzelllinien überzeugte. Insgesamt zeigte sich ein deutliches konzentrationsabhängiges Verhältnis, wobei hauptsächlich erst ab einer Konzentration von 500 µg/ml eine Wirkung ausgelöst wurde. Nicht nur die Phytoestrogene mit den Lignanen oder Isoflavonen, sondern auch andere Inhaltsstoffe, wie die Fettsäuren, konnten für die Wirksamkeit des Extraktes mitverantwortlich gemacht werden. Anhand der ermittelten Ergebnisse konnte nicht nur ein estrogenrezeptorvermittelter Signalmechanismus, sondern auch ein rezeptorunabhängiger Mechanismus auf die BT20-Zellen detektiert werden.

7 Ausblick

Neben laufenden Untersuchungsreihen, die sich mit der Wirkung von Ulmenborkenextrakt auf Mammakarzinomzelllinien beschäftigen, wurde auch die Leinpflanze u. a. auf ihre antikanzerogene Wirkung untersucht. Neben Testungen, die die Wirkung zwischen Stängel, Blatt und Wurzel differenzieren sollten, wurde auch die Herstellung eines Teeaufgusses entwickelt, dessen Wirkung auf Mammakarzinomzelllinien ermittelt wurde. Das Extrakt der Leinwurzel, welches sich in vorherigen Testungen als besonders wirksam herauskristallisierte, wurde in dieser Versuchsreihe in verschiedene Wurzelaltersstufen eingeteilt. Erste Untersuchungen haben bereits zuvor gezeigt, dass die Leinwurzel potentiell antikanzerogene Wirkungen aufwies. Auch in dieser Arbeit konnte dieses Fazit durch die durchgeführten Zytotoxizitäts-, Proliferations- und Viabilitätstests bestätigt werden. Jedoch konnte durch diese Testverfahren nur demonstriert werden, dass eine Wirkung zwar vorhanden war, welche Wirkmechanismen genau für diese antikanzerogene Wirkung auf die estrogenrezeptornegative und estrogenrezeptorpositive Zelle verantwortlich waren, konnte durch diese Verfahren jedoch nicht ermittelt werden. Die Frage nach dem „Was passiert durch das Extrakt?“ wird zwar beantwortet, das „Warum?“ und „Wie?“ bleibt jedoch momentan noch weitestgehend ungeklärt. Vermutungen, die in der Literatur beschrieben sind, die Gründe für die vermittelte Wirkung äußern, können durch die oben aufgeführten Ergebnisse teilweise bestätigt werden. Eine Ausarbeitung und Verfeinerung der Testverfahren ist vonnöten, um mögliche Signalwege genauer charakterisieren zu können. Einzelne Substanzen, die hier als potenziell antikanzerogen eingestuft wurden, könnten separat auf ihr Wirkpotenzial überprüft werden. Neben bereits untersuchten Eigenschaften der Lignane und Isoflavone (Genistein, Daidzein, Secoisolariciresinol u.a.) könnte man auch die Eigenschaften der Fettsäuren, welche hier teilweise eine antikanzerogene Wirkung verursacht haben könnten, separieren. Eine verfeinerte Charakterisierung der Inhaltsstoffe könnte dazu dienen, nicht nur die Substanzklassen wie Kohlenhydrate oder Fettsäuren zu bezeichnen, sondern auch einzelne Klassen in ihre genaueren Bestandteile aufschlüsseln zu können.

Auch die Frage nach einer geeigneten einsetzbaren Konzentration sollte genauer beleuchtet werden. Wichtig ist es zu klären, ob die eingesetzten hohen Konzentrationen, deren Wirksamkeit durch die Tests belegt wurde, nicht nur in-vitro, sondern auch in-vivo gute Ergebnisse erzielen. Sind die Konzentrationen in diesem Maße für den Menschen verträglich? Wann ist der richtige Verabreichungszeitpunkt? Wie hoch muss die eingesetzte Konzentration sein, um auch im menschlichen Organismus eine antikanzerogene Wirkung erzielen zu können? Auch diese Fragen sollten weitere Untersuchungen lösen und beantworten.

Zudem ist es wichtig, das mögliche Nebenwirkungspotenzial der Substanzen genauer abschätzen zu können; dafür werden weitere Untersuchungen nötig sein.

Auch ein möglicher Interaktionsmechanismus zwischen Tamoxifen und dem Extrakt der Leinwurzel sollte genauer beleuchtet werden.

Zwar könnte ein Pflanzenwachstum in der Klimakammer eine standardisierte Kultivierung vereinfachen, jedoch ist es vonnöten zu klären, ob die Ergebnisse, die in dieser Arbeit ermittelt wurden, reproduzierbar sind.

Auch wenn erste Ergebnisse in Zukunft auf neue Möglichkeiten in der ergänzenden Karzinomtherapie hoffen lassen, kann eine einheitliche Empfehlung der Nahrungsergänzung zurzeit nicht gegeben werden. Es scheint noch ein weiter Weg zu sein, bis diese alternativen Konzepte tatsächlich angewandt werden können – jedoch scheint dieser Weg zumindest für den Anfang geebnet zu sein.

8 Literaturverzeichnis

- Abarzua S, Szewczyk M, Gailus S, Richter DU, Ruth W, Briese V, Piechulla B.* (2007). "Effects of phytoestrogen extracts from *Linum usitatissimum* on the Jeg3 human trophoblast tumor cell line". *Anticancer Res* 27(4A): 2053-2058
- Adlercreutz, H.,* (1990). "Western diet and Western diseases: some hormonal and biochemical mechanisms and associations." *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 201: 3-23
- Adlercreutz C.H., Goldin BR, Gorbach SL, Höckerstedt KA, Watanabe S, Hämäläinen EK, Markkanen MH, Mäkelä TH, Wähälä KT, Adlercreutz T.* (1995). "Soybean phytoestrogen intake and cancer risk." *J Nutr* 125(3 Suppl): 757S-770S
- Adlercreutz H., Heinonen SM., Penalvo-Garcia J.* (2004) "Phytoestrogens, cancer and coronary heart disease." *Biofactors.* 2004;22(1-4):229-36
- Adlercreutz H., Höckerstedt K., Bannwart C., Bloigu S., Hämäläinen E., Fotsis T., Ollus A.* (1987). "Effect of dietary components, including lignans and phytoestrogens, on enterohepatic circulation and liver metabolism of estrogens and on sex hormone binding globulin (SHBG)." *J Steroid Biochem* 27(4-6): 1135-1144
- Adlercreutz H., Honjo H., Higashi A., Fotsis T., Hämäläinen .E, Hasegawa T., Okada H.* (1991). "Urinary excretion of lignans and isoflavonoid phytoestrogens in Japanese men and women consuming a traditional Japanese diet." *Am J Clin Nutr* 54(6): 1093-1100
- Adlercreutz, H. and Mazur W.* (1997). "Phyto-oestrogens and Western diseases." *Ann Med* 29(2): 95-120
- Aktories K., Förstermann U., Hofmann F., Starke K.,* (2009). "Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie", Kapitel: "Sexualhormone" - T. Gudermann; "Mittel zur Behandlung von Tumoren - Tumorchemotherapie" - K. Aktories, C. Unger, 10. Auflage, Elsevier, München, S. 687-688, 695-696, 933-934, 968-969, 975-976
- Al-Anazi AF., Qureshi VF, Javaid K, Qureshi S* (2011). "Preventive effects of phytoestrogens against postmenopausal osteoporosis as compared to the available therapeutic choices: An overview." *J Nat Sci Biol Med* 2(2): 154-163
- Alshatwi, A. A.* (2010). "Catechin hydrate suppresses MCF-7 proliferation through TP53/Caspase-mediated apoptosis." *J Exp Clin Cancer Res* 29: 167
- Aulbert E., Nauck F., Radbruch L.* (2012). "Lehrbuch der Palliativmedizin", 3. Auflage, Schattauer, Stuttgart, S. 644, 645
- Bardon S., Vignon F., Derocq D., Rochefort H.* (1984). "The Antiproliferative Effect of Tamoxifen in Breast-Cancer Cells - Mediation by the Estrogen-Receptor." *Molecular and Cellular Endocrinology* 35(2-3): 89-96

- Barnes S., Prasain J., D'Alessandro T., Arabshahi A., Botting N., Lila MA., Jackson G., Janle EM., Weaver CM.* (2011). "The metabolism and analysis of isoflavones and other dietary polyphenols in foods and biological systems." *Food Funct* 2(5): 235-244
- Bauer KR., Brown M., Cress RD., Parise CA., Caggiano V.* (2007). "Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry." *Cancer* 109(9): 1721-1728
- Berg, J.M., Tymoczko JL., Stryer L.* (2007), "Stryer Biochemie", Kapitel: "Kontrolle der Genexpression", 6. Auflage, Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, S. 1015-1016
- Bergman Jungeström M., Thompson LU, Dabrosin C.* (2007). "Flaxseed and its lignans inhibit estradiol-induced growth, angiogenesis, and secretion of vascular endothelial growth factor in human breast cancer xenografts in vivo." *Clin Cancer Res* 13(3): 1061-1067
- Berridge MV., Herst PM, Tan AS.* (2005). "Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction." *Biotechnol Annu Rev* 11: 127-152
- Berridge, M. V. and Tan A.S.* (1993). "Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (Mtt) - Subcellular-Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron-Transport in Mtt Reduction." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 303(2): 474-482
- Bignon E., Ogita K., Kishimoto A., Nishizuka Y.* (1990). "Protein kinase C subspecies in estrogen receptor-positive and -negative human breast cancer cell lines." *Biochem Biophys Res Commun* 171(3): 1071-1078
- Blair HC., Jordan SE, Peterson TG, Barnes S.* (1996). "Variable effects of tyrosine kinase inhibitors on avian osteoclastic activity and reduction of bone loss in ovariectomized rats" *J Cell Biochem* 61:629-637
- Borriello SP., Setchell KD., Axelson M., Lawson AM.* (1985). "Production and metabolism of lignans by the human faecal flora." *J Appl Bacteriol* 58(1): 37-43
- Bowey E., Adlercreutz H., Rowland I.* (2003). "Metabolism of isoflavones and lignans by the gut microflora: a study in germ-free and human flora associated rats." *Food Chem Toxicol* 41(5): 631-636
- Briese, V., S. Abarzua S., Richter DU, Piechulla B., Nebe JB.* (2009), "Molecular and Cell Biological Investigations of the Mode of Action of established and potential Phytoestrogens for the Development of Strategies in the prevention and treatment of cancer" in *Estrogenes: Production, Functions and Applications*, ed. JR. Bartos, Page 1-53
- Brooks SC., Locke ER., Soule HD.* (1973). "Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma." *J Biol Chem* 248(17): 6251-6253

- Buck K., Vrieling A., Zaineddin AK., Becker S., Hüsing A., Kaaks R., Linseisen J., Flesch-Janys D., Chang-Claude J.* (2011). "Serum enterolactone and prognosis of postmenopausal breast cancer." *J Clin Oncol* 29(28): 3730-3738
- Bühling K.J. und Friedmann W.* (2004). "Intensivkurs: Gynäkologie und Geburtshilfe" Kapitel: "Tumorartige Läsionen und Tumoren der Fortpflanzungsorgane und der Brustdrüse, Tumorartige Läsionen und Tumoren der Brustdrüse" J. Sehouli, 1. Auflage, Urban&Fischer, München, S. 442-445
- Bühling K.J., Lepenies J., Witt K.* (2004). "Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pathologie" Kapitel: "Weibliche Geschlechtsorgane und Brustdrüse, Bösartige Tumoren der Mamma" K. J. Bühling, 3. Auflage, Elsevier Urban & Fischer, München/Jena, S. 399, 401
- Cai Y., Guo K., Chen C., Wang P., Zhang B., Zhou Q., Mei F., Su Y.* (2012). "Soya isoflavone consumption in relation to carotid intima-media thickness in Chinese equol excretors aged 40-65 years." *Br J Nutr*: 1-7
- Carter, J. C. and Church F. C.* (2009). "Obesity and Breast Cancer: The Roles of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma and Plasminogen Activator Inhibitor-1." *PPAR Res* 2009: 345320
- Chen J., Power K.A., Mann J., Cheng A., Thompson L.U.* (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(8): 1071-1080
- Clarke D.B., Barnes K.A, Lloyd A.S.* (2004). "Determination of unusual soya and non-soya phytoestrogen sources in beer, fish products and other foods." *Food Addit Contam* 21(10): 949-962
- Cotterchio M., Boucher B.A., Kreiger N., Mills C.A., Thompson L.U.* (2008). "Dietary phytoestrogen intake--lignans and isoflavones--and breast cancer risk (Canada)." *Cancer Causes Control* 19(3): 259-272
- Dambroth, M. und Seehuber R.* (1988). "Flachs – Züchtung, Anbau, Verarbeitung", Kapitel: " Herkunft und Systematik der Leinpflanze/Die Leinpflanze/Faserleinanbau", Ulmer, Stuttgart, S. 15, 17, 19, 20, 43, 51
- Dhingra, K.* (2001). "Selective estrogen receptor modulation: the search for an ideal hormonal therapy for breast cancer." *Cancer Invest* 19(6): 649-659
- Diepenbrock W., Ellmer F., Léon J.* (2012) "Ackerbau, Pflanzenbau, Pflanzenzüchtung - Grundwissen Bachelor" 3. Auflage, Ulmer, Stuttgart, S. 214
- Diepenbrock W., Fischbeck G., Heyland K.U., Knauer N.* (1999). "Spezieller Pflanzenbau", 3. Auflage, Ulmer, Stuttgart, S. 289-294

- Dong, J. Y. and Qin L.Q. (2011). "Soy isoflavones consumption and risk of breast cancer incidence or recurrence: a meta-analysis of prospective studies." *Breast Cancer Res Treat* 125(2): 315-323
- Elstner E., Müller C., Koshizuka K., Williamson EA., Park D., Asou H., Shintaku P., Said JW., Heber D., Koeffler HP. (1998). "Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor γ and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(15): 8806-8811
- Erickson, K. L. and Hubbard N.E. (2010). "Fatty acids and breast cancer: the role of stem cells." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 82(4-6): 237-241
- Frohne, D., (2002). *Heilpflanzenlexikon, "Ein Leitfaden auf wissenschaftlicher Grundlage"*, 7. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, S. 340
- Gerber B., Janni W., Friese K. (2006). "Gynäkologische Onkologie, Ein Taschenbuch zu Epidemiologie, Ätiologie, Diagnostik, Therapie und Nachsorge", Kapitel: "Mammakarzinom, Epidemiologie/Risikofaktoren, Diagnostik/Prognostische und prädiktive Faktoren, Operative Therapie/Sentinellymphnode-Biopsie" - B. Gerber, W. Janni, D. Kotsianos, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, S. 20, 51-52, 65
- Graefe, K.-H., Lutz W., Bönisch H. (2011). "Pharmakologie und Toxikologie", Kapitel "Hormonelle Systeme, Keimdrüsen, Pharmaka mit antiöstrogener Wirkung", K.H. Graefe, Thieme, Stuttgart, S. 391-393
- Hänsel, R., Sticher O. (2009) "Pharmakognosie, Phytopharmazie", Kapitel: "Kohlenhydrate II: Polysaccharide und Polysacchariddrogen", S. Alban, W. Blaschek, 9. Auflage, Springer, Heidelberg, S. 601-602
- Hallund J., Tetens I., Bügel S., Tholstrup T., Bruun JM. (2008). "The effect of a lignan complex isolated from flaxseed on inflammation markers in healthy postmenopausal women." *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 18(7): 497-502.
- Hargreaves DF., Potten CS., Harding C., Shaw LE., Morton MS., Roberts SA., Howell A., Bundred NJ. (1999). "Two-week dietary soy supplementation has an estrogenic effect on normal premenopausal breast." *J Clin Endocrinol Metab* 84(11): 4017-4024
- Helferich WG., Andrade JE., Hoagland MS. (2008). "Phytoestrogens and breast cancer: a complex story." *Inflammopharmacology* 16(5): 219-226
- Herdegen, T., (2010). "Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie", Kapitel: "Sexualhormone - Antiestrogene und Therapie von estrogensensitiven Tumoren" N. Cimin-Bredée, T. Herdegen, 2.Auflage, Thieme, Stuttgart, S. 219
- Hiller, K., Melzig M.F., (2010). "Lexikon der Arzneipflanzen und Drogen", 2. Auflage, Spektrum- Akademischer Verlag, Heidelberg, S. 354

- Howell A., Howell SJ., Clarke R., Anderson E. (2001). "Where do selective estrogen receptor modulators (SERMs) and aromatase inhibitors (AIs) now fit into breast cancer treatment algorithms?" *J Steroid Biochem Mol Biol* 79(1-5): 227-237
- Howell SJ., Johnston SR., Howell A. (2004). "The use of selective estrogen receptor modulators and selective estrogen receptor down-regulators in breast cancer." *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 18(1): 47-66
- Humfrey, C. D. (1998). "Phytoestrogens and human health effects: weighing up the current evidence." *Nat Toxins* 6(2): 51-59
- Karp, G. (2005). "Molekulare Zellbiologie", Kapitel: "Krebs, Zur Genetik von Krebserkrankungen", 1. Deutsche Auflage, Springer, Berlin/Heidelberg/New York, S. 851
- Keegan TH., DeRouen MC., Press DJ., Kurian AW., Clarke CA. (2012). "Occurrence of breast cancer subtypes in adolescent and young adult women." *Breast Cancer Res* 14(2): R55
- Kelsey JL., Berkowitz GS. (1988). "Breast cancer epidemiology", *Cancer Res.* 1988 Oct 15;48(20):5615-23
- Kiang DT., Frenning DH., Goldman AI., Ascensao VF., Kennedy BJ. (1978). "Estrogen receptors and responses to chemotherapy and hormonal therapy in advanced breast cancer." *N Engl J Med* 299(24): 1330-1334
- Knight, D. C. and Eden J.A. (1996). "A review of the clinical effects of phytoestrogens." *Obstet Gynecol* 87(5 Pt 2): 897-904
- Koehler KF., Helguero LA., Haldosén LA., Warner M., Gustafsson JA. (2005). "Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor beta." *Endocrine Reviews* 26(3): 465-478
- Köchli OR., Sevin BU., Benz J., Petru E., Haller U. (1998), "Gynäkologische Onkologie", 2. Auflage, Springer, Berlin/Heidelberg/New York, S.5
- Kroman NT., Jensen MB., Wohlfahrt J., Mouridsen H., Andersen PK., Melbye M. (2000). "[Should all younger patients with breast cancer be offered adjuvant cytotoxic chemotherapy?]." *Ugeskr Laeger* 162(22): 3184-3188
- Kubista, E., Seifert M., Singer C. (2008). "Aromatasehemmer in der endokrinen Therapie des Mammakarzinoms", 1. Auflage, UNI-MED Science, S. 10
- Kulling, S. und Watzl B. (2003). "Phytoöstrogene, Basiswissen aktualisiert", *Ernährungs-Umschau*, Heft 6, S. 234-239
- Kurzer, M. S. and Xu X. (1997). "Dietary phytoestrogens." *Annu Rev Nutr* 17: 353-381
- Lattrich, C. (2013). "Aktuelle adjuvante Therapiekonzepte bei Brusttumoren". *TumorDiagnostik&Therapie* 3/2013, 34. Jahrgang, Thieme, S. 136-139

- Lee, J. and 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* Apr;48(4):244-50
- Lehninger A. L., Nelson D.L., Cox M.M.* (1998). "Prinzipien der Biochemie", Kapitel: "Koordination und hormonelle Steuerung des Stoffwechsels bei Säugetieren, Molekulare Mechanismen der Signalübertragung", 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg [u.a], S. 889
- Lehraiki A., Attoumbré J., Bienaimé C., Matifat F., Bensaddek L., Nava-Saucedo E., Fliniaux MA., Ouadid-Ahidouch H., Baltora-Rosset S.* (2010). "Extraction of lignans from flaxseed and evaluation of their biological effects on breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines." *J Med Food* 13(4): 834-841
- Levenson, A. S. and Jordan V.C.* (1997). "MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line." *Cancer Res* 57(15): 3071-3078
- Liu MM., Albanese C., Anderson CM., Hilty K., Webb P., Uht RM., Price RH. Jr, Pestell RG., Kushner PJ.* (2002). "Opposing action of estrogen receptors alpha and beta on cyclin D1 gene expression." *J Biol Chem* 277(27): 24353-60
- Löffler G. und Petrides P.E.* (2002). "Biochemie und Pathobiochemie", Kapitel: "Endokrine Funktionen IV: Hypothalamisch-hypophysäres System und Zielgewebe, Molekularer Wirkungsmechanismus der Hormone/Zelluläre Wirkungen der Hormone", P.E. Petrides, 7. Auflage, Springer, Berlin [u.a.], S. 900
- Lorenz, W., Ollenschläger G., Geraedts M., Gerlach F., Gandjour A., Helou A., Kirchner H., Koller M., Lauterbach W., Reinauer H., Sitter H., Thomeczek C.* (2001), "Das Leitlinien Manual: Entwicklung und Implementierung von Leitlinien in der Medizin", 1. Auflage, ZaeFQ 95 Suppl 1: 1-84
- Lüllmann H, Mohr K., Hein L.* (2006). "Pharmakologie und Toxikologie, Arzneimittelwirkungen verstehen, Medikamente gezielt einsetzen" Kapitel: "Pharmakodynamik, Agonisten und Antagonisten/Hormonsystem, Estrogene/Maligne Neoplasien, Zytostatika, Gezielte antineoplastische Wirkprinzipien", 16. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart [u.a.], S. 12-13, 396, 428
- 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(2): 409-412.
- Magee, P. J. and Rowland I.R.* (2004). "Phyto-oestrogens, their mechanism of action: current evidence for a role in breast and prostate cancer." *Br J Nutr* 91(4): 513-531
- Mansure JJ., Nassim R., Kassouf W.* (2009). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in bladder cancer: a promising therapeutic target." *Cancer Biol Ther* 8(7): 6-15
- Maskarinec, G. and Noh J.J.* (2004). "The effect of migration on cancer incidence among Japanese in Hawaii." *Ethn Dis* 14(3): 431-439

- Mason JK., Chen J., Thompson LU. (2010). "Flaxseed oil-trastuzumab interaction in breast cancer." *Food Chem Toxicol* 48(8-9): 2223-2226
- Matthies A., Loh G., Blaut M., Braune A. (2012). "Daidzein and genistein are converted to equol and 5-hydroxy-equol by human intestinal *Slackia isoflavoniconvertens* in gnotobiotic rats." *J Nutr* 142(1): 40-46
- McKiernan E., McDermott EW., Evoy D., Crown J., Duffy MJ. (2011). "The role of S100 genes in breast cancer progression." *Tumour Biol* 32(3): 441-450
- McMichael-Phillips DF., Harding C., Morton M., Roberts SA., Howell A., Potten CS., Bundred NJ. (1998). "Effects of soy-protein supplementation on epithelial proliferation in the histologically normal human breast." *Am J Clin Nutr* 68(6 Suppl): 1431S-1435S
- Meindl, A., Ditsch N., Kast K., Rhiem K., Schmutzler RK. (2011). "Familiäres Mamma- und Ovarialkarzinom: Neue Gene, neue Therapien, neue Konzepte", *Dtsch Arztebl Int* 2011; 108(19): 323-30
- Mohagheghzadeh A., Gholami A., Hemmati S., Ardakani MR., Schmidt TJ., Alfermann AW. (2007). "Root cultures of linum species section *Syllinum* as rich sources of 6-methoxypodophyllotoxin." *Z Naturforsch C* 62(1-2): 43-49
- Moon HS., Guo DD., Lee HG., Choi YJ., Kang JS., Jo K., Eom JM., Yun CH., Cho CS. (2010). "Alpha-eleostearic acid suppresses proliferation of MCF-7 breast cancer cells via activation of PPARgamma and inhibition of ERK 1 / 2." *Cancer Sci* 101(2): 396-402
- Moorghen M., Orde M., Finney KJ., Appleton DR., Watson AJ. (1998). "Sulindac enhances cell proliferation in DMH-treated mouse colonic mucosa." *Cell Prolif* 31(2): 59-70
- Morton MS., Chan PS., Cheng C., Blacklock N., Matos-Ferreira A., Abranches-Monteiro L., Correia R., Lloyd S., Griffiths K. (1997). "Lignans and isoflavonoids in plasma and prostatic fluid in men: samples from Portugal, Hong Kong, and the United Kingdom." *Prostate* 32(2): 122-128
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *J Immunol Methods* 65(1-2): 55-63
- Muir, A.D and Westcott N.D. (2003) "Flax – The genus *Linum*", *Medicinal and aromatic plants- industrial profiles*, Kapitel: "Introduction: history of the cultivation and uses of flaxseed", M. Vaisey-Genser, D. H. Morris, Routledge, S. 8, 9
- Mulisch M. (2014) "Verfahren der Immunlokalisation - Ein Überblick", Springer Wiesbaden, S. 12
- Nagamine MK., da Silva TC., Matsuzaki P., Pinello KC., Cogliati B., Pizzo CR., Akisue G., Haraguchi M., Górniak SL., Sinhorini IL., Rao KV., Barbuto JA., Dagli ML. (2009). "Cytotoxic effects of butanolic extract from *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) on

- cultured human breast cancer cell line MCF-7." *Experimental and Toxicologic Pathology* 61(1): 75-82
- Petru E., Jonat W., Fink D., Köchli O.R.*, (2009). "Praxisbuch Gynäkologische Onkologie", Kapitel: "Maligne Tumoren der Mamma" - W. Jonat, C. Crohns, N. Maass, 2. Auflage, Springer, Berlin/Heidelberg, S. 3-4
- Porstmann T., Ternynck T., Avrameas S.* (1985). "Quantitation of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation into DNA: an enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response." *J Immunol Methods* 82(1): 169-179
- Potter, J. D. and Steinmetz K.* (1996). "Vegetables, fruit and phytoestrogens as preventive agents." *IARC Sci Publ*(139): 61-90
- Pschyrembel* (2007). "Klinisches Wörterbuch", 261. Auflage, De Gruyter, Berlin [u.a.], S. 166, 1417, 1974
- Pschyrembel* (2011). "Klinisches Wörterbuch", 262. Auflage, De Gruyter, Berlin [u.a.], S. 530-531, 1256-1257, 1485-1486
- Rassow, J., Hauser K., Netzker R., Deutzmann R.* (2008). "Duale Reihe Biochemie", Kapitel: "Hormone, Hormone der Gonaden - R. Deutzmann", 2. Auflage, Thieme, Stuttgart, S. 604-605
- Rhiem, K. und Schmutzler R.K.* (2013). "Familiäres Mamma- und Ovarialkarzinom", *TumorDiagnostik&Therapie* 3/2013, 34. Jahrgang, Thieme, S. 127-130
- Richter DU., Abarzua S., Chrobak M., Scholz C., Kuhn C., Schulze S., Kupka MS., Friese K., Briese V., Piechulla B., Jeschke U.* (2010). "Effects of phytoestrogen extracts isolated from flax on estradiol production and ER/PR expression in MCF7 breast cancer cells." *Anticancer Res* 30(5): 1695-1699
- Riede, U.-N., Werner M., Schaefer H-E.* (2004). "Allgemeine und spezielle Pathologie", Kapitel: "Epidermodermales System, Brustdrüse, Neoplastische Läsionen" U.-N. Riede, Ch. Wittekind, W. Sterry, 5. Auflage, Thieme, Stuttgart, S. 973, 974
- Riede, U.-N., Werner M., Freudenberg N.* (2009). "Basiswissen allgemeine und spezielle Pathologie", Kapitel "Hautorgan, Brustdrüse" - U.N. Riede, J.P. Baak, D. Mattern, Springer, Heidelberg, S. 525
- Roche Applied Science* (2007) Testkitanleitung, Cell Proliferation ELISA, BrdU (calorimetric), Version August 2007
- Roche Applied Science* (2005) Testkitanleitung, Cytotoxicity Detection Kit (LDH), Version July 2005
- Roche Applied Science* (2005) Testkitanleitung, Cell Proliferation Kit I (MTT), Version September 2005

- Rose, D. P. (1997). "Dietary fatty acids and prevention of hormone-responsive cancer." *Proc Soc Exp Biol Med* 216(2): 224-233
- Ryde CM., Nicholls JE., Dowsett M. (1992). "Steroid and growth factor modulation of aromatase activity in MCF7 and T47D breast carcinoma cell lines." *Cancer Res* 52(6): 1411-1415
- Saggar JK., Chen J., Corey P., Thompson LU. (2010). "The effect of secoisolariciresinol diglucoside and flaxseed oil, alone and in combination, on MCF-7 tumor growth and signaling pathways." *Nutr Cancer* 62(4): 533-542
- Schartl, M., Gessler M., von Eckardstein A. (2009). "Biochemie und Molekularbiologie des Menschen", Kapitel: "Zelluläre Signalprozesse, Rezeptor-Tyrosin-Kinasen", K.H. Friedrich, I.Behrmann, Elsevier, Urban&Fischer, München, S. 650-651
- Schepler C. (2008). "Molekular-chemische Charakterisierung von transgenem und nicht transgenem Kartoffelknollenmaterial mittels massenspektrometrischer Verfahren", Diplomarbeit, Institut für Chemie, Agrar- und Umweltwissenschaftliche Fakultät, Universität Rostock
- Schiebler T. H. und Schmidt W. (2002). "Anatomie" Kapitel: "Zytologie, Zytomorphologie", 8. Auflage, Springer Berlin/Heidelberg/New York, S. 19
- Schmidt-Matthiesen, H., Bastert G. (1995). "Gynäkologische Onkologie: Diagnostik, Therapie und Nachsorge der bösartigen Genitaltumoren und des Mammakarzinoms", Kapitel: "Mammakarzinom, Häufigkeit, Altersverteilung, Bedeutung", 5. Auflage, Schattauer, Stuttgart, S. 103
- Setchell, K. D. and Cassidy A. (1999). "Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health." *J Nutr* 129(3): 758S-767S
- Setchell, K. D. and Clerici C. (2010). "Equol: history, chemistry, and formation." *J Nutr* 140(7): 1355S-1362S
- Sfakianos J., Coward L., Kirk M., Barnes S. (1997). "Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats." *J Nutr* 127(7): 1260-1268
- Shor D., Sathyapalan T., Atkin SL., Thatcher NJ. (2012). "Does equol production determine soy endocrine effects?" *Eur J Nutr.* 2012 Jun;51(4):389-98
- Skelhorne-Gross G., Reid AL, Apostoli AJ, Di Lena MA, Rubino RE, Peterson NT, Schneider M, SenGupta SK, Gonzalez FJ, Nicol CJ. (2012). "Stromal adipocyte PPARgamma protects against breast tumorigenesis." *Carcinogenesis* 33(7): 1412-1420
- Stattin P., Adlercreutz H., Tenkanen L., Jellum E., Lumme S., Hallmans G., Harvei S., Teppo L., Stumpf K., Luostarinen T., Lehtinen M., Dillner J., Hakama M. (2002). "Circulating enterolactone and prostate cancer risk: a Nordic nested case-control study." *Int J Cancer* 99(1): 124-129

- Steinmetz, K. A. and Potter J.D.* (1991). "Vegetables, fruit and cancer. II. Mechanism." *Cancer Causes Control* Nov;2(6):427-42
- Strater, N.* (2011). "Der Einfluss von Leinwurzelextrakten der Pflanze *Linum usitatissimum* unterschiedlicher Altersstufen auf die Vitalität verschiedener Mammakarzinomzelllinien" - Dissertation Universitätsfrauenklinik, Universität Rostock
- Stauber M. und Weyerstahl T.* (2007). "Duale Reihe Gynäkologie und Geburtshilfe" Kapitel: "Erkrankungen der Mamma, Maligne Tumoren", 3. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, S. 371-372, 384-385, 389
- Stürtz, M.* (2008). "Analytik von Isoflavonen aus Soja, Rotklee und Iris sowie deren Quantifizierung in Nahrungsergänzungsmitteln" - Dissertation Universität Göttingen, Cuvillier Verlag Göttingen
- 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 Universitätsfrauenklinik, Universität Rostock
- Taylor CM., Blanchard B., Zava DT.* (1984). "Estrogen receptor-mediated and cytotoxic effects of the antiestrogens tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen." *Cancer Res* 44(4): 1409-1414
- Theil C.* (2010). "Untersuchungen zum Einfluss eines *Linum usitatissimum* - Wurzelextrakts auf zwei verschiedene Mammakarzinom-Zelllinien im Vergleich mit Genistein, Genistin, Daidzein, Daidzin, Secoisolariciresinol, Tamoxifen und 17 β -Estradiol", Dissertation Universitätsfrauenklinik, Universität Rostock
- 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.* 2011 Aug;284(2):459-65
- 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.* 2013 Jul;288(1):149-53
- Touillaud MS., Thiébaud AC., Fournier A., Niravong M., Boutron-Ruault MC., Clavel-Chapelon F.* (2007). "Dietary lignan intake and postmenopausal breast cancer risk by estrogen and progesterone receptor status." *J Natl Cancer Inst* 99(6): 475-486
- Treilleux, Peloux N., Brown M., Sergeant A.* (1997). "Human estrogen receptor (ER) gene promoter-P1: estradiol-independent activity and estradiol inducibility in ER+ and ER- cells." *Mol Endocrinol* 11(9): 1319-1331

- Truan JS., Chen JM., Thompson LU.* (2010). "Flaxseed oil reduces the growth of human breast tumors (MCF-7) at high levels of circulating estrogen." *Mol Nutr Food Res* 54(10): 1414-1421
- Turusov, V. S.* (1990). "[Protein S-100 in the histological diagnosis of tumors]." *Arkh Patol* 52(1): 71-78
- Vanden Heuvel, J. P.* (1999). "Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARS) and carcinogenesis." *Toxicol Sci* 47(1): 1-8
- Velentzis LS., Woodside JV., Cantwell MM., Leathem AJ., Keshtgar MR.* (2008). "Do phytoestrogens reduce the risk of breast cancer and breast cancer recurrence? What clinicians need to know." *Eur J Cancer* 44(13): 1799-1806
- Vic P, Vignon F., Derocq D., Rochefort H.* (1982). "Effect of estradiol on the ultrastructure of the MCF7 human breast cancer cells in culture." *Cancer Res* 42(2): 667-673
- Wang C., Mäkelä T., Hase T., Adlercreutz H., Kurzer MS.* (1994). "Lignans and flavonoids inhibit aromatase enzyme in human preadipocytes." *J Steroid Biochem Mol Biol* 50(3-4): 205-212
- Watzl, B., Leitzmann C.* (2005). "Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln", Kapitel: "Einführung - sekundäre Pflanzenstoffe/Sekundäre Pflanzenstoffe-Vorkommen und Eigenschaften, Phytoöstrogene", 3. Auflage, Hippokrates, Stuttgart, S. 15, 42
- Wichtl, M.* (2005). "Teedrogen und Phytopharmaka, Ein Handbuch für die Praxis auf wissenschaftlicher Grundlage", 5. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, S. 393-394
- Wojtowicz, J. M. and Kee N.* (2006). "BrdU assay for neurogenesis in rodents." *Nat Protoc* 1(3): 1399-1405
- Xiao JX., Huang GQ., Geng X., Qiu HW.* (2011). "Soy-derived isoflavones inhibit HeLa cell growth by inducing apoptosis." *Plant Foods Hum Nutr* 66(2): 122-128
- Zhou C., Zhong Q., Rhodes LV., Townley I., Bratton MR., Zhang Q., Martin EC., Elliott S., Collins-Burow BM., Burow ME., Wang G.* (2012). "Proteomic analysis of acquired tamoxifen resistance in MCF-7 cells reveals expression signatures associated with enhanced migration." *Breast Cancer Res* 14(2): R45

Internetrecherche:

Statistisches Bundesamt:

https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2012/02/PD12_041_232.html (letzter Abruf: 05.07.2014)

Gesundheitsberichterstattung des Bundes:

http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_start_neu/&p_aid=3&p_aid=1183508&nummer=516&p_sprache=D&p_indsp=4065&p_aid=49219396 (letzter Abruf: 05.07.2014)

Promega:

Promega Assaybeschreibung 2003:

Riss, T., Ph.D., R. Moravec, B.S., (2003), Promega Corporation, "Simplifying Cytotoxicity Screening, Introducing the CellTiter-Blue™ Cell Viability Assay", S. 10-13

[www.promega.com/~media/files/resources/promega notes/83/introducing the celltiter-blue cell viability assay.pdf?la=en](http://www.promega.com/~media/files/resources/promega%20notes/83/introducing%20the%20celltiter-blue%20cell%20viability%20assay.pdf?la=en) (letzter Abruf: 05.07.2014)

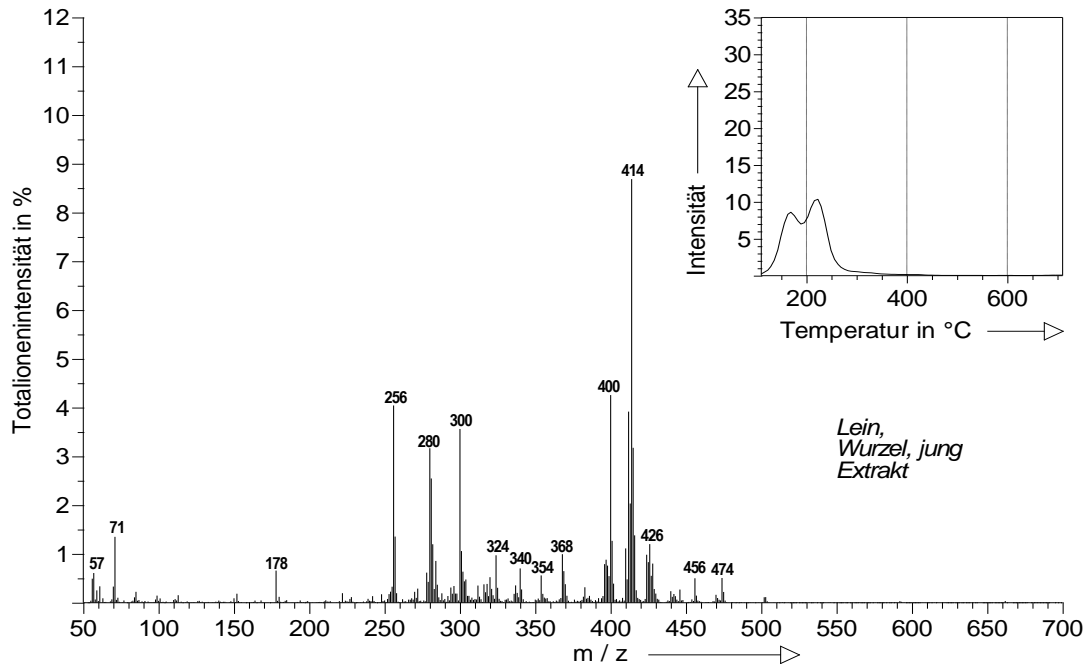
9 Thesen

1. 2012 verstarben 17898 Personen an den Folgen eines Mammakarzinoms.
2. Das Mammakarzinom ist die häufigste bösartige Erkrankung der Frau; jede 8. Frau erkrankt statistisch gesehen an dieser Karzinomart.
3. Im Gegensatz zur westlichen Welt erkranken Einwohner asiatischer Kontinente wesentlich seltener an einem Karzinom der Brust(drüse), mitbegründet wird dies durch die höhere Sojazufuhr im asiatischen Raum.
4. Risikofaktoren für die Entstehung eines Mammakarzinoms sind vielfältig, neben BRCA1- und -2-Mutationen ist u.a. die Estrogenhypothese bedeutend.
5. Der Estrogenrezeptor ist entscheidend an der Genese des Mammakarzinoms beteiligt. Eine Blockade des Rezeptors durch Tamoxifen, als Selektiver-Estrogen-Rezeptor-Modulator, wird bereits erfolgreich in der Therapie eingesetzt.
6. Die MCF7-Mammakarzinomzelle ist durch das Vorhandensein von Estrogenrezeptoren α und β bzw. einem Progesteronrezeptor gekennzeichnet. Die BT20-Zelle ist immunhistochemisch als rezeptornegative Zelllinie identifiziert worden.
7. Die Leinpflanze wird in heimischen Gebieten angebaut und kann vielfältig genutzt werden. Sie wird nicht nur im Textilsektor oder zur Farbenherstellung eingesetzt, sondern die Leinsamen werden auch als Nahrungsmittel genutzt.
8. Das Leinwurzelextrakt der Pflanze *Linum usitatissimum* beinhaltet Stoffe, die eine antikanzerogene Wirkung aufweisen – u.a. bedingt durch die Phytoestrogene. Bereits durch vorausgegangene Untersuchungen des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik Rostock konnte durch das Extrakt der Leinwurzel eine antikanzerogene Wirkung erzielt werden.
9. Phytoestrogene werden in Lignane, Isoflavone und Coumestane unterteilt und zählen zu den sekundären Pflanzenstoffen. Sie können ihre Wirkung über den Estrogenrezeptor vermitteln, aber auch (estrogen)rezeptorunabhängige Mechanismen spielen eine Rolle.
10. Die Untersuchungen dienten der Herausarbeitung der Unterschiede zwischen den einzelnen Wurzelextraktalterstufen. Andererseits sollte zwischen der hier eingesetzten Leinwurzepflanze aus der Klimakammer und der bereits untersuchten Freilandpflanze unterschieden werden.

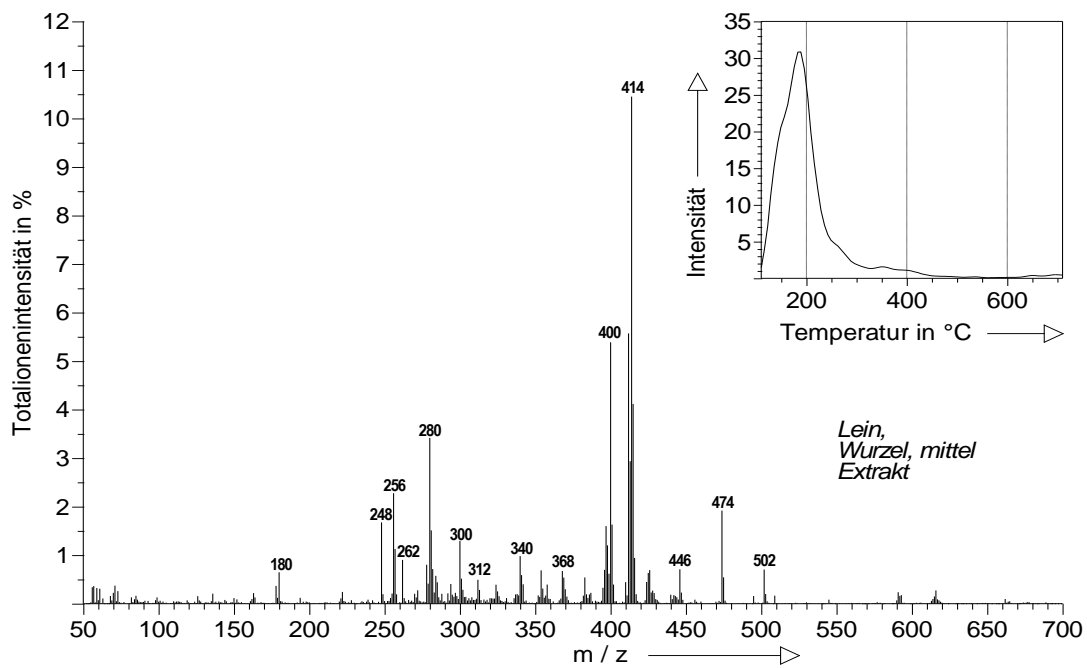
11. Die Leinwurzelextrakte dreier Altersstufen 3, 6 und 12 Wochen zeigten in den durchgeführten Testverfahren eine zytotoxische Wirkung, wobei die junge Wurzel auf beide Zelllinien eine gute Wirkung offenbarte. Sowohl bei der estrogenrezeptorpositiven MCF7-Zelllinie, als auch bei der estrogenrezeptornegativen Zelllinie BT20 war dieser Effekt durch die junge Wurzel zu erfassen. Auch eine viabilitätshemmende Wirkung konnte durch die junge Wurzel beobachtet werden.
12. Inhomogene Ergebnisse, die sich durch den MTT- und BrdU-Test ergaben, sprechen u.a. für Kompensationsmechanismen der Zelle, die mit Stoffwechselveränderungen reagiert.
13. In der Pyrolyse-Feldionisation-Massenspektrometrie wurden die Extrakte in ihre Stoffklassen aufgeschlüsselt. Nicht nur Phytoestrogene, sondern auch weitere Inhaltsstoffe der Leinwurzel, konnten womöglich für die antikanzerogene Wirkung verantwortlich gemacht werden; zu diesen Stoffen zählen u.a. die Fettsäuren. Vermutlich war es ein Gemisch aus Stoffklassen, welches die Wirkung vermittelte.
14. Die Aufschlüsselung der Substanzklassen variierte abhängig von der Altersstufe der Wurzel und könnte durch weitere Untersuchungen genauer differenziert werden.
15. Tamoxifen bewirkte eine konzentrationsabhängige Zytotoxizität bzw. Hemmung der Viabilität. Estradiol als weitere Kontrollsubstanz führte in dieser Arbeit trotz bekannter stimulierender Eigenschaften zu keiner wesentlichen Steigerung der Viabilität.
16. Während bei den Klimakammerpflanzen eher die junge Wurzel für weitere Forschungsarbeiten eingesetzt werden könnte, wurde die beste Wirkung bei der Freilandpflanze durch die alte Wurzel erzielt. Gründe dafür lagen möglicherweise an unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen, dem Erntezeitpunkt der Pflanzen, sowie konstanten Wachstumseinflüssen im Gewächshaus.
17. Das Leinwurzelextrakt, gewonnen aus der Klimakammerpflanze, könnte in ferner Zukunft in der Therapie bzw. zur Therapieergänzung angewandt werden. Folgende in-vivo Untersuchungen sind sinnvoll, um die gewonnenen Untersuchungsergebnisse untermauern zu können. Eine Empfehlung für den Einsatz in der Karzinomtherapie kann zurzeit jedoch nicht gegeben werden.

10 Anhang

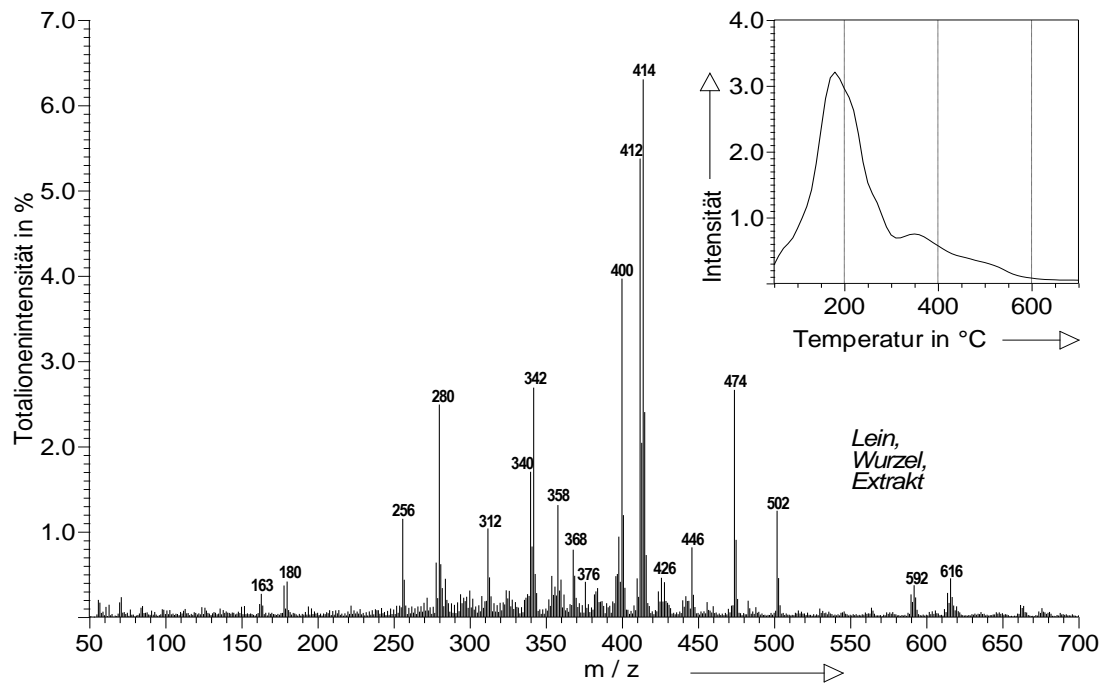
Massenspektren der Leinwurzelextrakte (graphisch dargestellt):



Analyse des jungen Leinwurzelextraktes - 3 Wochen alt



Analyse des mittleren Leinwurzelextraktes - 6 Wochen alt



Analyse des alten Leinwurzelextraktes – 12 Wochen alt

Posterveröffentlichung: Norddeutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (NGGG), 18./19.06.2010 in Schwerin



Der inhibitorische Effekt dreier Leinwurzelreifegrade aus der Klimakammer auf estrogenrezeptorpositive (MCF 7) und estrogenrezeptornegative (BT 20) Mammakarzinomzellen

Dörbecker D., Richter D.- U., Gerber B., Briese V.

Universitätsfrauenklinik Rostock im Klinikum Südstadt, Südring 81, 18059 Rostock



Fragestellung

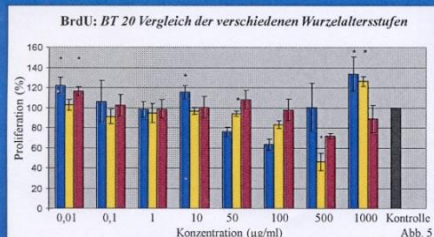
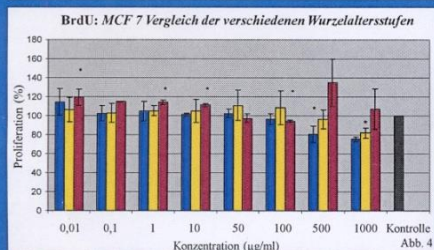
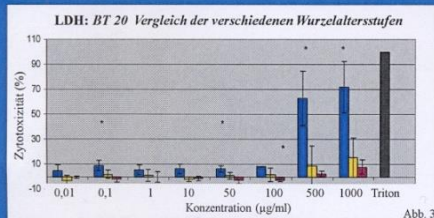
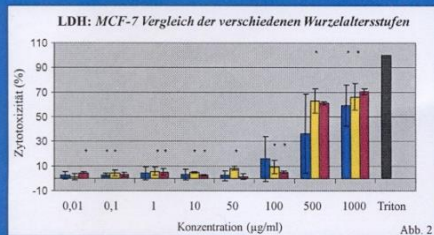
Als häufigstes Karzinom der Frau hat die Inzidenz des Mammakarzinoms deutlich zugenommen, sodass statistisch gesehen jede 8. Frau in ihrem Leben an diesem Karzinom erkrankt. Untersucht wurde die antikanzerogene Wirkung dreier Wurzelaltersstufen (3, 6 und 9 Wochen) der Pflanzensorte „Barbara“ des *gemeinen Lein* (Abb. 1) anhand von Zytotoxizitäts- und Proliferationstests. Es wurde herausgearbeitet, inwieweit der Reifegrad der Wurzel Einfluss auf die bereits erwiesene antikanzerogene Wirkung hat.



Abb. 1

Material und Methoden

Nach der Ernte der unter Klimakammerbedingungen kultivierten Pflanzen wurden die Wurzeln nach der Methode von Luyengi et al. aufbereitet und die Wirkung der Extrakte mittels des LDH-Tests (Zytotoxizitätstest) und des BrdU-Tests (Proliferationstest) untersucht. Verwendet wurden die Extrakte in den Konzentrationen 0,01; 0,1; 1; 10; 50; 100; 500 und 1000 µg/ml. Als Zelllinien dienten die Mammakarzinomzellen MCF 7 (estrogenrezeptorpositiv) und BT 20 (estrogenrezeptornegativ).



■ junge Wurzel - 3 Wochen alt ■ mittlere Wurzel - 6 Wochen alt
■ alte Wurzel - 12 Wochen alt * Signifikanz

Ergebnisse

Laktatdehydrogenase-Test (Abb. 2 und 3)

Die LDH-Testungen zeigen eine inhibitorische Wirkung, die sowohl bei MCF 7- als auch bei BT 20-Zellen zu verzeichnen ist.

Im Diagramm (Abb. 2) ist ein wesentlicher Dosis-Wirkungszusammenhang zu erkennen, wobei mit 500 und 1000 µg/ml eine hohe Zytotoxizität erfasst wird. In diesen Konzentrationen zeigt hier die mittlere Wurzel (6 Wochen) eine signifikante Wirkung von 60-70%.

Im Vergleich dazu sind bei der BT 20-Zelllinie (Abb. 3) lediglich mit der jungen Wurzel (3 Wochen) signifikante Werte (60-70%) in den höchsten Konzentrationen aufgetreten. Die weiteren Konzentrationen zeigen keine Zytotoxizität.

Bromdesoxyuridin-Test (Abb. 4 und 5)

Dieser Zellproliferationstest dokumentiert eine Proliferationsabnahme der MCF 7-Zellen (Abb. 4) bei der 3 und 6 Wochen alten Wurzelstufe. Im Gegensatz dazu ist diese Wirkung bei der 12 Wochen alten Wurzel nicht eindeutig zu belegen.

Bei der estrogenrezeptornegativen BT 20-Zelllinie (Abb. 5) wird mit steigender Konzentration bis 500 µg/ml eine wachstumshemmende Wirkung registriert. Die Leinwurzelkonzentration von 500 µg/ml zeigt eine 50 %-ige Signifikanz. In der Konzentration 1000 µg/ml ist diese Tendenz nicht zu erkennen.

Schlussfolgerung

Diese Arbeit zeigt, dass Pflanzenextrakte als alternative Therapiemöglichkeit in der Onkologie möglicherweise in Frage kommen. Es ist die Tendenz zu verzeichnen, dass im Zytotoxizitätstest hohe Konzentrationen der Extrakte inhibitorisch wirken. Der Proliferationstest demonstriert, dass die jüngeren Pflanzenextrakte eine Wirkungstendenz zeigen und dabei eher mittlere Konzentrationen eine Rolle spielen. Der proliferationshemmende Effekt ist deutlicher bei der ER-negativen Zelllinie zu erkennen.

Weitere Studien sollten hervorheben, welche Stoffklassen für die Wirkung verantwortlich sind und welche Konzentrationen der menschliche Körper bei der Zufuhr der Pflanzenstoffe toleriert. Als zweite Instanz sollte versucht werden, die hier ermittelte Wirkung der Extrakte unter *in vivo* Bedingungen zu bestätigen.

Literaturangabe:

Jianmin Chen, Jasjeep K. Siggar, Paul Corey and Lillian U. Thompson, Flavonoid and Pure Secoisolaricresinol Diglycoside, but Not Flavonoid Hdlc, Reduce Human Breast Tumor Growth (MCF-7) in Athymic Mice 2009 Nov;13(11):2061-6. Epub 2009 Sep 23

Jianmin Chen, Krista A. Power, Jashraj Muni, Astor Chang and Lillian U. Thompson, Flavonoid alone or in combination with tamoxifen inhibits MCF-7 breast tumor growth in ovariectomized athymic mice with high circulating levels of estrogen. Experimental biology and medicine [1535-3702] Chen yr2007 vol.232 iss.8 pg.1071-1080

Danksagung

Nach Fertigstellung dieser Arbeit möchte ich mich besonders bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. V. Briese für die Vergabe dieses interessanten Themas bedanken. Auch für die konstruktiven Hilfen und Verbesserungsvorschläge, trotz eingespannter Tätigkeit im Klinikalltag, möchte ich danke sagen.

In diesem Zusammenhang gilt mein besonderer Dank ebenfalls meiner Laborleiterin und Betreuerin Frau Dr. rer. nat. D.-U. Richter, durch die die Fertigstellung dieser Arbeit überhaupt erst möglich war. Auch während und nach der Durchführung der Versuche konnte sie einem immer durch wichtige, hilfreiche und aufmunternde Tipps, ob persönlich oder telefonisch, zur Seite stehen.

Für die Analyse der Extrakte, sowie für hilfreiche Emails und Telefonate, möchte ich mich bei Herrn Dr. A. Schlichting aus der Agrar- und Umweltwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock bedanken.

Für die gute und nette Einarbeitung im Labor danke ich Frau Greschkowitz, die immer beratend und helfend zur Seite stand.

Auch Marlen Szewczyk danke ich für die Beantwortung der unendlichen Fragen, die sich mir in der ganzen Zeit in und nach den Laborarbeiten stellten.

Frau Bauer aus dem Institut für Biowissenschaften in Rostock danke ich für die Unterstützung bei der Herstellung des Extraktes.

Die letzten Zeilen möchte ich meiner Familie und meinen Lieben widmen, die mich während des ganzen Studiums, sowie bei dieser Arbeit unterstützt haben und glücklicherweise weiterhin mein Leben begleiten. Speziell bedanken möchte ich mich bei Ulla und besonders meinem Vater, die mir das Studium überhaupt erst möglich gemacht haben und mir nicht nur durch ihre zahlreichen Besuche in den Norden den Rücken gestärkt haben.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel "Der inhibitorische Effekt dreier Leinwurzelreifegrade aus der Klimakammer auf estrogenrezeptorpositive (MCF7) und estrogenrezeptornegative (BT20) Mammakarzinomzellen" eigenständig angefertigt habe. Jegliche benutzten Quellen habe ich fachgemäß gekennzeichnet und im Literaturverzeichnis vermerkt. Weder diese noch eine andere Arbeit habe ich zuvor an einer Hochschule als Dissertation eingereicht.

Bonn, September 2014

Daniela Dörbecker