

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universitätsmedizin Rostock
Stiftungsprofessur Naturheilkunde
Frau Prof. Dr. med. K. Kraft

**Wirkung phytoestrogenhaltiger Leinwurzelextrakte
(*Linum usitatissimum*) auf maligne und benigne Zelllinien der Mamma**



vorgelegt von
Sandra Weu- Domschke
geb. am 02.10.1985 in Stralsund

Rostock

Dekan: Herr Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger

Gutachter:

1. Gutachter:

Frau Prof. Dr. med. habil. Karin Kraft
Zentrum für Innere Medizin, Lehrstuhl für Naturheilkunde,
Universität Rostock

2. Gutachter:

Frau PD Dr. rer. nat. et med. habil. Kirsten Peters
Universitätsmedizin Rostock, Arbeitsbereich Zellbiologie,
Universität Rostock

3. Gutachter:

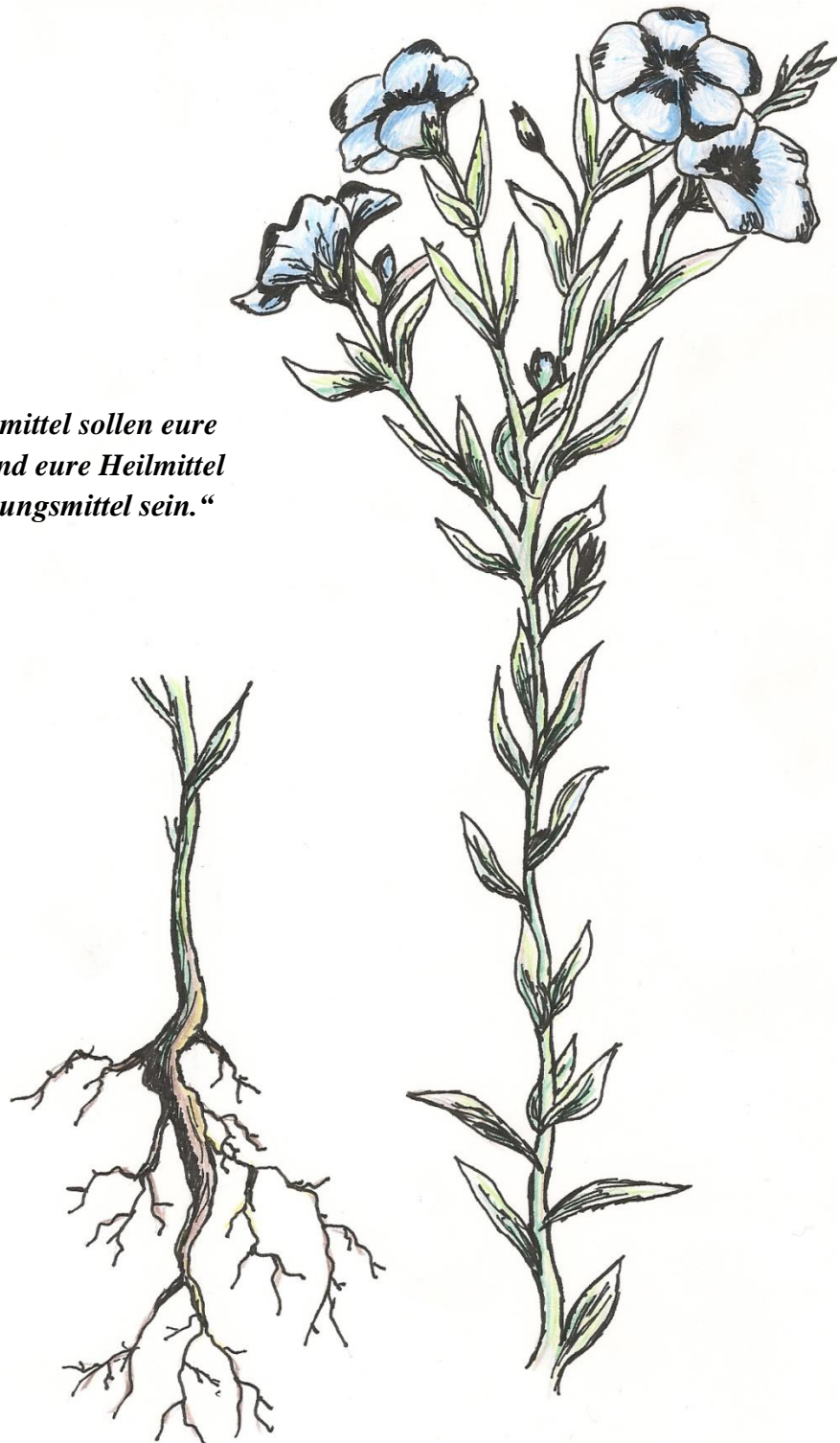
Herr Prof. Dr. rer. nat. habil. Udo Jeschke
Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe - Innenstadt,
Ludwig-Maximilians-Universität München

Datum der Einreichung: 15.06.2017

Datum der Verteidigung: 11.04.2018

***„Eure Nahrungsmittel sollen eure
Heilmittel sein und eure Heilmittel
sollen eure Nahrungsmittel sein.“***

Hippokrates



Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Mammakarzinom.....	1
1.1.1	Definition und Einteilung.....	1
1.1.2	Epidemiologie	1
1.1.3	Ätiologie und Pathogenese.....	3
1.1.4	Estrogene als Karzinogene	5
1.1.4.1	Der Estrogenrezeptor	6
1.1.5	Therapie.....	8
1.1.5.1	Antihormonelle Therapie.....	9
1.2	Mastopathie	10
1.2.1	Fibrozystische Mastopathie.....	10
1.2.1.1	Definition.....	10
1.2.1.2	Epidemiologie.....	10
1.2.1.3	Ätiologie und Pathogenese	10
1.2.1.4	Klinik und Klassifikation.....	11
1.2.1.5	Therapie	12
1.3	Linum usitatissimum	13
1.3.1	Biologie und Kultivierung.....	13
1.3.2	Therapeutische Anwendung	13
1.4	Phytoestrogene.....	14
1.4.1	Überblick und Einteilung	14
1.4.1.1	Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe.....	15
1.4.2	Isoflavone	15
1.4.3	Lignane.....	16
1.4.4	Coumestane	18

1.4.5	Wirkprofil der Phytoestrogene	18
2	Zielstellung der Arbeit	21
3	Material und Methoden.....	23
3.1	Pflanzliche Extrakte.....	23
3.1.1	Pflanzenmaterial	23
3.1.2	Extraktion nach Luyengi et al. (1996).....	23
3.1.3	Extraktion mit Mikrowellen	24
3.1.4	Aufbereitung der Extrakte und Kontrollsubstanzen.....	25
3.1.4.1	Extrakte.....	25
3.1.4.2	Kontrollsubstanzen	26
3.2	Zellkultur	26
3.2.1	Zellkulturlinien.....	26
3.2.2	Zellkulturmedien	28
3.2.3	Zellkultivierung.....	29
3.2.4	Ermittlung der Lebendzellzahl	30
3.3	Testverfahren	31
3.3.1	Testvorbereitungen.....	31
3.3.2	BrdU- Zellproliferationstest	32
3.3.3	MTT- Zellvitalitätstest	34
3.3.4	LDH- Zytotoxizitätstest.....	35
3.3.5	Statistik und Diagramme (BrdU,- MTT- und LDH- Test).....	37
3.4	Immunzytochemische Untersuchung	38
3.5	Chromatographie und Massenspektrometrie (LC/MS)	40
3.6	Materialien und Chemikalien (Auflistung).....	41
4	Ergebnisse	45
4.1	Immunzytochemische Bestimmung des Hormonrezeptorstatus.....	45
4.1.1	BT- 20	45
4.1.2	MCF- 7	46

4.1.3	MCF- 10A	46
4.1.4	MCF- 12A	47
4.1.5	HMEC	47
4.2	Kolorimetrische Tests	48
4.2.1	BT-20	49
4.2.2	MCF-7	53
4.2.3	MCF-10A	57
4.2.4	MCF-12A	61
4.2.5	HMEC	64
4.3	Extraktanalysen mit massenspektrometrischen Methoden (LC/MS)	67
5	Diskussion.....	69
5.1	Extrakte im Vergleich.....	70
5.1.1	Extraktionsmethoden.....	70
5.1.2	Zusammensetzung der Extrakte	71
5.2	Ergebnisse der kolorimetrischen Tests	74
5.2.1	Einflüsse von Tamoxifen und 17 β - Estradiol auf Mamma- Zelllinien	74
5.2.1.1	Tamoxifen.....	74
5.2.1.2	17 β - Estradiol	75
5.2.2	Einfluss der Leinwurzelextrakte auf Mamma- Zelllinien	76
5.2.2.1	Einfluss auf maligne Zellen	76
5.2.2.2	Einfluss auf benigne Zellen	79
5.3	Methodenkritik: Limitierende Faktoren und weiterführende Ansätze	82
5.3.1	Zelllinien	82
5.3.2	Kolorimetrische Testverfahren.....	84
5.3.3	Extrakte (Extraktionsmethoden, Lagerungsstabilität und Extraktanalytik)	85
5.4	Weitere potentielle Einflüsse auf hormonabhängige Erkrankungen	87
5.5	Phytoestrogenhaltige Leinwurzelextrakte – ein Ansatz in der Prävention und Behandlung hormonabhängiger Erkrankungen der Mamma?.....	89

6	Zusammenfassung und Ausblick	92
7	Thesen	94
8	Literaturverzeichnis	96
9	Anhang	111
10	Selbstständigkeitserklärung	138
11	Danksagung.....	139

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Mammakarzinom.....	1
Abb. 2	Prozentual häufigste Krebsneuerkrankungen der Frau in Deutschland	2
Abb. 3	Schematischer Überblick über karzinogene Mechanismen des 17 β - Estradiols	6
Abb. 4	Schematischer Aufbau des Estrogenrezeptors mit Darstellung der Domänen.....	7
Abb. 5	vereinfachte schematische Darstellung der ER- vermittelten Signalwege.....	8
Abb. 6	Fibrozystische Mastopathie	10
Abb. 7	Strukturelle Ähnlichkeit des 17 β - Estradiols zu ausgewählten Phytoestrogenen .	15
Abb. 8	Darstellung der Struktur und der Digestion wichtiger Lignane	17
Abb. 9	Molekulare, zelluläre, hormonelle Wirkungen der Phytoestrogene im Überblick .	19
Abb. 10	MarsExpress von CEM und Membranfiltrationsanlage von Millipore.....	25
Abb. 11	Zelllinien	27
Abb. 12	Einbau von BrdU statt Thymidin in die DNA	32
Abb. 13	Metabolisation von MTT zu Formazan	34
Abb. 14	Testprinzip des LDH- Test	36
Abb. 15	Prinzip der indirekten Methode der Immunzytochemie.....	39
Abb. 16	Immunzytochemie der Zelllinie BT20	46
Abb. 17	Immunzytochemie der Ziellinie MCF- 7.....	46
Abb. 18	Immunzytochemie der Zelllinie MCF- 10A.....	46
Abb. 19	Immunzytochemie der Zelllinie MCF- 12A.....	47
Abb. 20	Immunzytochemie der Zelllinie HMEC.....	47
Abb. 21	BT-20-Zellen-BrdU-Test mit Extrakt nach Luyengi.....	49
Abb. 22	BT-20-Zellen-BrdU-Test mit Mikrowellenextrakt.....	50
Abb. 23	BT-20-Zellen-MTT-Test mit Extrakt nach Luyengi.....	50
Abb. 24	BT-20-Zellen-MTT-Test mit Mikrowellenextrakt	51
Abb. 25	BT-20-Zellen-LDH-Test mit Extrakt nach Luyengi	51
Abb. 26	BT-20-Zellen-LDH-Test mit Mikrowellenextrakt	52
Abb. 27	MCF-7-Zellen-BrdU-Test mit Extrakt nach Luyengi	53
Abb. 28	MCF-7-Zellen-BrdU-Test mit Mikrowellenextrakt	54
Abb. 29	MCF-7-Zellen-MTT-Test mit Extrakt nach Luyengi.....	54
Abb. 30	MCF-7-Zellen-MTT-Test mit Mikrowellenextrakt.....	55

Abb. 31	MCF-7-Zellen-LDH-Test mit Extrakt nach Luyengi	55
Abb. 32	MCF-7-Zellen-LDH-Test mit Mikrowellenextrakt.....	56
Abb. 33	MCF-10A-Zellen-BrdU-Test mit Extrakt nach Luyengi	57
Abb. 34	MCF-10A-Zellen-BrdU-Test mit Mikrowellenextrakt	58
Abb. 35	MCF-10A-Zellen-MTT-Test mit Extrakt nach Luyengi.....	58
Abb. 36	MCF-10A-Zellen-MTT-Test mit Mikrowellenextrakt.....	59
Abb. 37	MCF-10A-Zellen-LDH-Test mit Extrakt nach Luyengi	60
Abb. 38	MCF-10A-Zellen-LDH-Test mit Mikrowellenextrakt.....	60
Abb. 39	MCF-12A-Zellen-BrdU-Test mit Extrakt nach Luyengi	61
Abb. 40	MCF-12A-Zellen-BrdU-Test mit Mikrowellenextrakt	62
Abb. 41	MCF-12A-Zellen-MTT-Test mit Extrakt nach Luyengi	62
Abb. 42	MCF-12A-Zellen-MTT-Test mit Mikrowellenextrakt.....	63
Abb. 43	MCF-12A-Zellen-LDH-Test mit Extrakt nach Luyengi	63
Abb. 44	MCF-12A-Zellen-LDH-Test mit Mikrowellenextrakt.....	64
Abb. 45	HMEC-Zellen-BrdU-Test mit Extrakt nach Luyengi und Mikrowellenextrakt.....	65
Abb. 46	HMEC-Zellen-MTT-Test mit Extrakt nach Luyengi und Mikrowellenextrakt	66
Abb. 47	Chromatogramm (basepeak); Leinwurzelextrakt nach Luyengi	67
Abb. 48	Chromatogramm (basepeak); Leinwurzel Mikrowellenextrakt	68
Abb. 49	Wärmeverteilung durch Mikrowellen und Wärmezuleitung durch Konduktion ...	70

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Risikofaktoren für die Entwicklung eines Mammakarzinoms.....	5
Tab. 2	Klassifikation der Mastopathie nach Prechtel und korrelierendes Karzinomrisiko..	12
Tab. 3	Gehalt der Isoflavone in Nahrungsmitteln	16
Tab. 4	Gehalt der Lignane in Nahrungsmitteln.....	18
Tab. 5	Konzentrationen der Extraktverdünnungsreihen	26
Tab. 6	Testkonzentrationen von Tamoxifen und 17β - Estradiol in mol/l	26
Tab. 7	Endkonzentrationen der Supplement- Inhaltsstoffe nach Zugabe zum Medium	28
Tab. 8	Inhaltsstoffe und Medium zugeführte Menge in ml des MEGM® SingleQuots®	29
Tab. 9	Endkonzentrationen der Extrakte im Test in $\mu\text{g/ml}$	31
Tab. 10	Endkonzentration der Kontrollsubstanzen im Test in mol/l	31
Tab. 11	technische Daten und Parameter zur Messung an der LTQ.....	41
Tab. 12	Massenspektrometrisch nachgewiesene phytoestrogene Einzelsubstanzen	72

Abkürzungsverzeichnis

AG	Antigen
AK	Antikörper
ATM- Gen	Ataxia-Teleangiectasia Mutated Gen
ATP	Adenosintriphosphat
BRCA 1- und 2	breast cancer susceptibility gene 1- und 2
BrdU	5-Brom-2-desoxyuridin
B-raf	B-rapidly accelerated fibrosarcoma, Proteinkinase
BT 20	Estrogenrezeptor- negative Mammakarzinom- Zelllinie
c-erbB2/neu	Her2/neu- Rezeptor
c-myc	c-myc Onkogen
c-ras	c-ras- Onkogen
DCIS	duktales Carcinoma in situ
DHA	Docosahexaensäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E1	Estron
E2	17 β - Estradiol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid- Synthase
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EPA	Eicosapentaensäure
ER	Estrogenrezeptor
ER α	Estrogenrezeptor α
ER β	Estrogenrezeptor β
ERE	Estrogen Response Element
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
ESI	Electrospray Ionisation
Ext.	Extinktion

FKS	fetales Kälberserum
FLT	[(18)F]-3'-Deoxy-3'Fluorothymidin
FSH	follikelstimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotropin- Releasing- Hormon
GP1R	G- protein coupled estrogen receptor 1
HMEC	Human Mammary Epithelial Cells
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
ID-GC-MS-SIM	Isotope Dilution Gas Chromatography Mass Spectrometry Single oder Selected Ion monitoring Mode
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
INT	2- [4- iodophenyl] -3-[a-nitrophenyl] -5- phenyltetrazoliumchlorid (Tetrazoliumsals)
int-2	int- 2 Onkogen
IP3K	Inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase
IQR	Interquartile Range
Ki67	Protein zur Markierung von sich teilenden Zellen
LC	liquid chromatography
LC/MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
LCIS	lobuläres Carcinoma in situ
LDH	Laktatdehydrogenase
LDL	low density lipoproteine
LH	luteinisierendes Hormon
LTQ	Linear Trap Quadrupole
LW	Leinwurzel
MCF-10A	Estrogenrezeptor- negative benigne Zelllinie (Mastopathie)
MCF-12A	Estrogenrezeptor- positive benigne Zelllinie (Mastopathie)
MCF-7	Estrogenrezeptor- positive Mammakarzinom- Zelllinie
MDA-MB-231	Estrogenrezeptor- unabhängige Mammakarzinomzelllinie
MEBM	Mammary Epithelium Basal Medium
MEGM	Mammary Epithelial Growth Medium
MECGM	Mammary Epithelial Cell Growth Medium
mER	membranöser Estrogenrezeptor
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie

MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
n.b.	nicht bestimmt
NK- Zellen	natürliche Killerzellen
NL	Normalisations- Level
NM23	NM23- Tumorsupressorgen
n.n.	nicht nachgewiesen
NRU- Test	Neutralrot- Test
NR3	nuclear receptor subfamily 3
NSI	Nanospray- Ionisation
Ω -3-FS	Omega-3-Fettsäuren
PBS	Phosphat Buffered Saline
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PR	Progesteronrezeptor
PTEN- Gen	Phosphatase and tensin homolog- Gen
Py- FIMS	Pyrolyse- Feldionisation Massenspektrometrie
RB1	Retinoblastom Protein 1/ Tumorsupressorgen
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute- Medium
SDG	Secoisolariciresinol- Diglucosid
SERM	selektive Estrogenrezeptormodulatoren
SHBG	Sexualhormon- bindendes Globulin
SHE	Syrische- Hamster- Embryonen- (Zellen)
TDLE	terminale duktulo-lobuläre Einheit
TGF α	Tumor Growth Factor α
TIC	Total Ion Current
TMB	Tetramethylbenzidin
TP53	Tumorprotein 53
WHO	World Health Organization
XTT	(2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide)
2 OHE	2-Hydroxyestrogen

1 Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

1.1.1 Definition und Einteilung

Der Begriff des Mammakarzinoms umfasst eine Vielzahl maligner epithelialer Tumoren der Brustdrüse, welche morphologisch, phänotypisch und auch bezüglich ihres malignen Potentials ausgeprägte Unterschiede aufweisen. Im Wesentlichen werden präinvasive (in situ) Karzinome (z. B. duktales und lobuläres Carcinoma in situ DCIS/LCIS) von den invasiven Karzinomen unterschieden.

Die aktuelle WHO- Klassifikation aus dem Jahre 2012 unterscheidet allein innerhalb der Gruppe der invasiven Mammakarzinome 21 Varianten und weitere 28 Differenzierungsmuster (Lakhani, 2012).

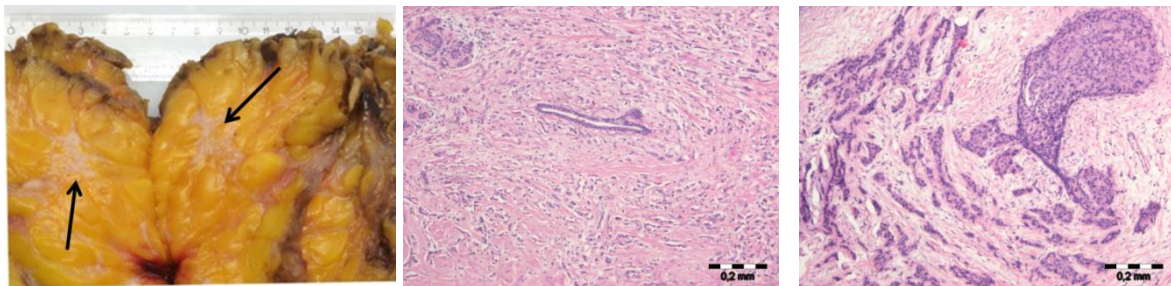


Abb. 1 Mammakarzinom Links: makroskopischer Aspekt – grauweißer fester Tumorknoten mit unscharfer Begrenzung; Mitte: Histologie - invasiv lobuläres Mammakarzinom mit typischem "Gänsemarschmuster" der Tumorzellen; Rechts: Histologie - Mammakarzinom vom nicht speziellen Typ neben Anteilen eines duktales Carcinoma in situ

1.1.2 Epidemiologie

Nach Angaben des Robert-Koch- Instituts beträgt die Jahresinzidenz für das Mammakarzinom in Deutschland ca. 70 000 Neuerkrankungen (Stand 2010). Damit ist es mit Abstand die häufigste Krebserkrankung der Frau, gefolgt von den Krebserkrankungen des Darms, mit etwa 28 000 Neuerkrankungen pro Jahr. Nach aktueller Datenlage erkrankt etwa jede achte Frau in Deutschland im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs (Robert-Koch-Institut, 2013).

Betroffen sind, im Vergleich zu anderen Krebserkrankungen, häufig auch junge Frauen. Das mittlere Erkrankungsalter liegt derzeit bei 64 Jahren und jede zehnte Patientin mit einem Mammakarzinom ist unter 45 Jahre alt.

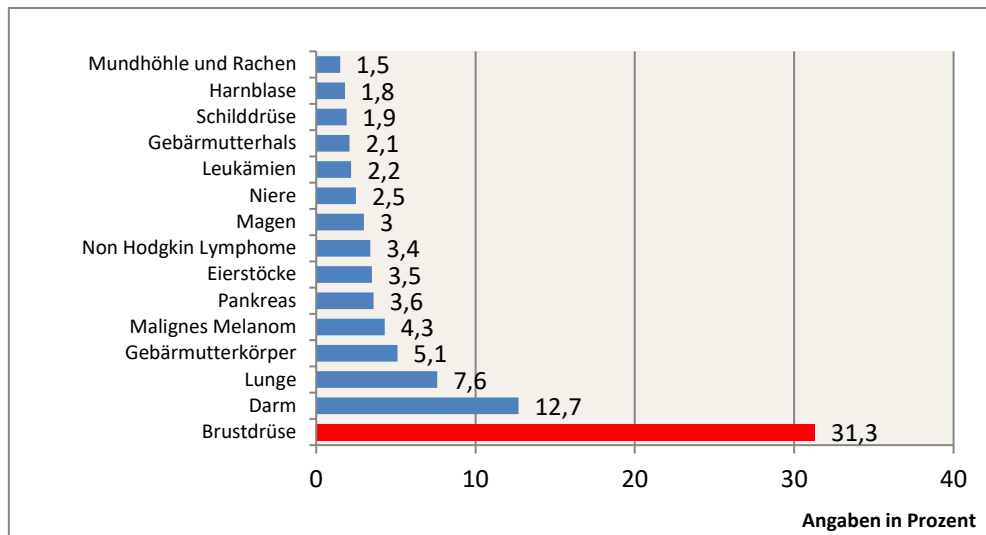


Abb. 2 Prozentualer Anteil der häufigsten Krebsneuerkrankungen der Frau in Deutschland 2010 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs), nach (Robert-Koch-Institut, 2013)

Geografisch- epidemiologische Unterschiede

Nicht nur in Deutschland stellt das Mammakarzinom ein gravierendes gesundheitliches Problem dar. Jedes Jahr erkranken weltweit über 1,3 Millionen Frauen an Brustkrebs, pro Jahr versterben 465 000 Betroffene daran (Kunze, 2011).

Im Vergleich internationaler epidemiologischer Statistiken fallen allerdings beträchtliche Unterschiede hinsichtlich der Inzidenz- und Mortalitätsraten auf. Frauen in asiatischen Ländern haben ein bedeutend geringeres Risiko an Brustkrebs zu erkranken und zu versterben als beispielsweise Europäerinnen (Korde et al., 2009). So haben Frauen in China oder Japan ein vier- bis siebenfach reduziertes Mammakarzinom-Risiko im Vergleich zu Frauen aus diesen Ethnien, die in den USA geboren und aufgewachsen sind (Ziegler et al., 1993; Deapen et al., 2002). Aber auch andere Tumoren, wie zum Beispiel das Prostatakarzinom oder kolorektale Karzinome, treten in der westlichen Kultur im Vergleich mit signifikant höheren Inzidenzen auf (Adlercreutz, 2002). Zahlreiche Ursachen und Einflussfaktoren wurden im Hinblick auf diese Ungleichgewichte diskutiert. Einerseits wurden populationsgenetische und kulturelle Unterschiede in die Betrachtung einbezogen. Zu diesen gehören z. B. das regional unterschiedliche Menarchealter, traditionsbedingte ethnische Unterschiede in Parität und anschließender Stilldauer sowie die jeweils vorliegenden gesundheitspolitischen Faktoren.

Ergebnisse weiterer epidemiologischer Studien zeigten jedoch auch, dass sich die Erkrankungshäufigkeit für Brustkrebs nach Migration aus einer Region mit niedriger Inzidenz in ein Land mit hoher Inzidenz innerhalb von ein bis zwei Generationen an die Erkrankungshäufigkeit der neuen Umgebung anpasst (Wu et al., 1998).

So weisen in den USA geborene Asiatinnen im Gegensatz zu den in Asien geborenen Immigrantinnen ein um 60% gesteigertes Morbiditätsrisiko für Mammakarzinome auf. Weiterhin zeigt sich eine Korrelation zwischen der Aufenthaltsdauer in den USA und der steigenden Morbiditätsrate (Ziegler et al., 1993). Parallel dazu findet sich aktuell eine stetig steigende Rate der Brustkrebsneuerkrankungen in Japan, Singapur und in städtischen Regionen Chinas, die mit einem zunehmend "westlich" beeinflussten Lebensstil assoziiert ist, (Wu et al., 1998; Lakhani, 2012). Diese Befunde gaben einen entscheidenden Hinweis darauf, dass sich die epidemiologischen Unterschiede nicht allein durch populationsgenetische Faktoren begründen ließen. Zahlreiche Umweltfaktoren, insbesondere diätetische Einflüsse, wurden diskutiert. Im Vergleich der traditionellen Ernährungsmuster basiert in Asien ein großer Anteil der Speisen traditionell auf Soja und Sojaprodukten (Sirtori et al., 2005).

Sojabohnen bzw. die aus ihnen gewonnenen Produkte gelten weithin als wichtigste Nahrungsquelle für die Zufuhr von Phytoestrogenen, insbesondere der Isoflavone (Morito et al., 2001; Kulling and Watzl, 2003).

Für diese wurden in zahlreichen Studien estrogene und antiestrogene Wirkungen auf hormonabhängige Zellverbände, z. B. bei Mammazellen nachgewiesen.

1.1.3 Ätiologie und Pathogenese

Die genauen Mechanismen, die zur Entstehung eines Mammakarzinoms führen, sind noch nicht vollständig geklärt. Klar ist jedoch, dass dessen Karzinogenese ein multifaktorielles Geschehen darstellt. Sie setzt sich aus genetischen, hormonellen, reproduktiven und diätetischen Einflüssen zusammen. Die karzinogenen bzw. -präventiven Faktoren nehmen bereits in utero Einfluss auf das Lebenszeitrisiko und modulieren dieses im Verlauf des Lebens über vielfältige Mechanismen.

Formalpathogenetisch zeigen sich die ersten fassbaren Veränderungen in einer Regulationsstörung der Zellzahl mit konsekutiver Ausbildung einer Epithelhyperplasie.

Die Progression zum invasiven Karzinom ist bisher nur in Ansätzen verstanden und erfolgt im Rahmen einer kaskadenartigen Abfolge genetischer Störungen. Diese umfasst eine vermehrte Expression wachstumssteigernder Onkogene (z. B. c-erb-B2/neu, int-2, c-ras, c-myc) und eine verminderte Expression bzw. einen Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen (RB1, NM23). Auch Vorgänge im Rahmen der Zellzykluskontrolle (Cyclin-D1), der integrinvermittelten Zell-Zell-Adhäsion und der Angiogeneese werden durch multiple genetische Defekte beeinflusst (Bianchi and Riede, 2004).

Weiterhin spielt die genetische Prädisposition in der Karzinogenese des Mammakarzinoms eine bedeutende Rolle. Erkrankten Verwandte ersten Grades (Mutter, Geschwister) an einem Mammakarzinom, erhöht sich das relative Risiko mindestens um das Zwei- bis Dreifache (Senn et al., 2001).

Es sind zahlreiche Keimbahnmutationen bekannt, die die Entstehung des Mammakarzinoms begünstigen bzw. beschleunigen sollen. Besonders hervorzuheben sind hierbei die Mutationen in den „Brustkrebsgenen“ BRCA 1- und 2 (breast cancer susceptibility gene), die für etwa 20-50% der familiären Mammakarzinome und für etwa 5% der gesamten Mammakarzinome verantwortlich sind (Klöppel et al., 2012). Seltener lassen sich auch Mutationen im TP₅₃-Gen (Li- Fraumeni- Syndrom), ATM- Gen (Ataxia teleangiectatica) und im PTEN- Gen (Cowden-Syndrom mit Ausbildung multipler Hamartome) nachweisen (Haag et al., 2009).

Auch externe Risikofaktoren führen zu einem moderaten Anstieg des relativen Erkrankungsrisikos. Als wichtige Beispiele sind hier das Zigarettenrauchen (besonders in der Adoleszenz), ein gesteigerter Alkoholkonsum, ionisierende Strahlung und auch Xenoestrogene zu nennen.

Xenoestrogene sind synthetisch hergestellte Verbindungen aus der Gruppe der landwirtschaftlich genutzten Herbizide, Fungizide, Insektizide bzw. industriell verwendeten Chemikalien. Vertreter sind z. B. Atrazine, Benomyl, Dicofol und Phtalate. Als hormonaktive Substanzen nehmen sie Einfluss auf das endokrine System (Colborn et al., 1993).

Weitere determinierende Faktoren für die Ausbildung eines invasiven Karzinoms sind ein kontralaterales Mammakarzinom in der Anamnese, Mastopathien Grad II und III nach Prechtel (siehe unten) sowie bestehende lobuläre bzw. duktale Carcinoma in situ- Läsionen (Klöppel et al., 2012; Gätje et al., 2011; Tice et al., 2013).

Eine Besonderheit in der Karzinogenese des Mammakarzinoms liegt darin, dass Umstände, welche die Lebenszeitexposition gegenüber Estrogenen erhöhen, einen erheblichen Anteil der determinierenden Faktoren ausmachen (Nagata et al., 1997).

Zu diesen Faktoren zählen eine frühe Menarche (vor dem 12. Lebensjahr), eine späte Menopause (nach dem 55. Lebensjahr), Nulliparität, eine späte Erstschwangerschaft und eine langjährige Hormonersatztherapie in der Menopause (Emons et al., 2003). Dass das Mammakarzinom häufiger in einem Kollektiv mit hohem sozioökonomischen Status (Nullipara bzw. späte Gravidität) diagnostiziert wird und weitläufig auch die Bezeichnung "Nonnenkarzinom" trägt, erscheint passend zu dem genannten hormonellen Risikoprofil.

Diese Faktoren rückten die Estrogene im Hinblick auf ein mögliches karzinogenes Potential in den Fokus des wissenschaftlichen und klinischen Interesses.

Tab. 1 Auswahl von Risikofaktoren für die Entwicklung eines Mammakarzinoms mit Darstellung des relativen Risikos, hormonabhängige Faktoren rot markiert, nach (Kuhl, 2004)

Risikofaktor	Relatives Risiko		Zunahme der Inzidenz (%)
Geschlecht	männlich: weiblich	1:100	
Alter	25 Jahre: 45 Jahre	1:20	
Körpergewicht	Normalgewicht: Adipositas	1:2,5	+150
Menopausenalter	42 Jahre: 52 Jahre	1:2,0	+100
Menarchealter	14 Jahre: 11 Jahre	1:1,3	+30
Zahl der Geburten	mehrere: keine	1:1,3	+30
Alter bei erster Geburt	20 Jahre: 35 Jahre	1:1,4	+40
Gesamtdauer des Stillens	5 Jahre: nie	1:1,2	+20
Orale Kontrazeptiva	nie: Einnahme	1:1,1	+10
Hormonsubstitution	nie: 5 oder mehr Jahre	1:1,3	+30

1.1.4 Estrogene als Karzinogene

Zahlreiche Studien beschreiben eine Korrelation zwischen einer (erhöhten) Estrogenexposition und dem Auftreten verschiedener hormonabhängiger Karzinome (Tsutsui and Barrett, 1997; Fuhrman et al., 2012).

Beispielsweise wurde nachgewiesen, dass ein Hyperestrogenismus bei gleichzeitigem relativem bzw. absolutem Gestagenmangel das Auftreten von Endometriumkarzinomen begünstigt. Bei nicht-hysterektomierten Patientinnen ist eine reine Estrogen-Substitutionstherapie daher heute obsolet (Emons et al., 2000).

Im Jahr 2000 schlug eine Expertengruppe des National Toxicology Program des National Institute of Environmental Health Sciences in den USA vor, die steroidalen Estrogene in die Liste der Karzinogene aufzunehmen (Emons et al., 2003). Mittlerweile finden sich Estradiol und Estron in der Auflistung der krebserzeugenden Stoffe unter der R-Satz- Nummer R45 ("kann Krebs erzeugen").

Estron (E1) und 17 β -Estradiol (E2) entfalten über verschiedene Mechanismen ihre karzinogenen Wirkungen. Zum einen wirken Estrogene an Estrogenrezeptoren als klassische Tumorpromotoren, indem sie eine Steigerung der Zellproliferation induzieren. Daraus resultiert eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für Replikationsfehler, bei gleichzeitiger Einschränkung der DNA- Reparaturmechanismen (Henderson and Feigelson, 2000). Weiterhin wirken die im Körper durch Orthohydroxylierung aus 17 β -Estradiol bzw. Estron gebildeten Katecholestrogene (2- und 4-Hydroxyestrogene) mutagen. Diese werden in vivo zu Chinonen metabolisiert, welche direkt mit der DNA interagieren. Die instabilen Addukte der 4-Hydroxyestrogene bedingen Adenosin- und Guanin-Verluste und konsekutive

Einzelstrangbrüche (Liehr, 2001). In in vitro-Versuchen an Syrischen-Hamster-Embryonenzellen (SHE- Zellen) wurde die DNA-Adduktbildung mit folgender Ausbildung numerischer Chromosomenaberrationen (Aneuploidie) nachgewiesen (Tsutsui and Barrett, 1997).

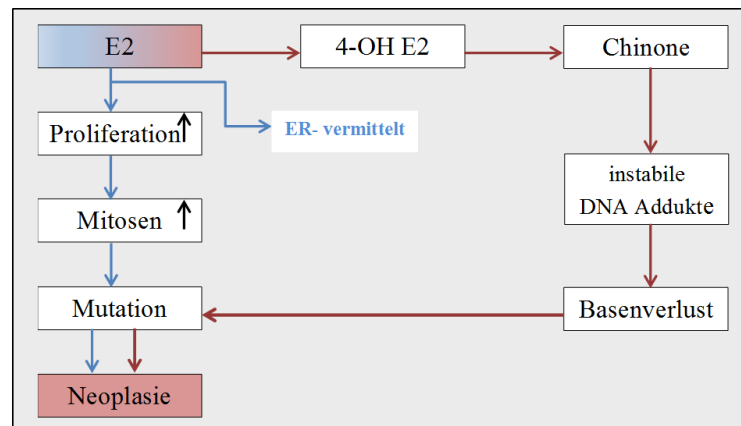


Abb. 3 Schematischer Überblick über karzinogene Mechanismen des 17β-Estradiols (E2), nach (Emons et al., 2003)

1.1.4.1 *Der Estrogenrezeptor*

Estrogenrezeptoren (ER) sind liganden- aktivierte Transkriptionsfaktoren und gehören in die Gruppe der Steroidhormonrezeptoren.

Steroidhormonrezeptoren zählen zur Unterfamilie 3 der Superfamilie der nukleären Rezeptoren (NR3 nuclear receptor subfamily 3). Sie liegen vor allem im Zytosol eukaryotischer Zellen vor und nehmen nach Aktivierung, Dimerisierung und Translokation in den Zellkern als Transkriptionsfaktoren auf genomischer Ebene Einfluss auf das Zellwachstums- und Differenzierungsverhalten, die Zellspezialisierung, die Tumorgenese sowie das Überleben und Wachstum von Tumorzellen. Im Gegensatz zu G- Protein gekoppelten Rezeptoren vermitteln die steroidalen Rezeptoren im Allgemeinen also keine schnellen Signalkaskaden, sondern wirken über langsame Mechanismen auf genomischer Ebene.

Die zwei bisher bekannten humanen Estrogenrezeptorsubtypen sind die Estrogenrezeptoren α - und β (ER α / β). Sie besitzen eine gleichartige Grundstruktur und setzen sich jeweils aus 6 Domänen (A-F) zusammen. Über die A/B-Domäne (N-terminale Domäne) erfolgt die ligandenunabhängige transkriptionelle Aktivierung (AF-1). Die C-Domäne vermittelt über zwei stabilisierende Zinkfinger motive die DNA-Bindung und über die D-Domäne kann die Dimerisierung zweier Rezeptormoleküle erfolgen. Im Rahmen der Dimerisierung können neben Homodimeren (ER $\alpha\alpha$ bzw. ER $\beta\beta$) auch Heterodimere (ER $\alpha\beta$) ausgebildet werden.

Die E/F-Domäne (C-terminale Domäne) enthält den Ligandenbindungsbereich und beherbergt somit die Bindestelle für die niedermolekularen Liganden. Sie trägt weiterhin die Transaktivierungsregion (AF-2) als regulatorisches Element zur Erkennung von Coaktivatoren und anderen Transkriptionsfaktoren (Klebe, 2009). Beide Rezeptoren zeigen ausgeprägte strukturelle Homologien, welche jedoch domänenspezifische Unterschiede aufweisen. In der DNA-bindenden Domäne zeigen beide Subtypen eine identische Aminosäuresequenz von etwa 97%, während diese in der Liganden-bindenden Domäne nur zu 56% und in der N-terminalen Domäne lediglich zu 24% identisch ist (Dahlman-Wright et al., 2006).

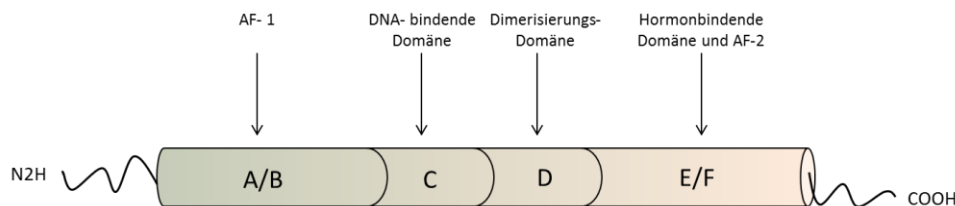


Abb. 4 Schematischer Aufbau des Estrogenrezeptors mit Darstellung der einzelnen Domänen, nach (Löffler et al., 2007)

Hinsichtlich der Affinität zu den Rezeptor-Isoformen zeigen sich für die Liganden signifikante Unterschiede. Diese werden vor allem auf die strukturellen Unterschiede in der Liganden-bindenden Domäne zurückgeführt. Beispielsweise weist der ER α eine höhere Affinität für 17 β -Estradiol auf, während zahlreiche Phytoestrogene, wie beispielsweise Genistein, stärker an den ER β binden (Förster and Kietz, 2006).

ER α und - β konnten bereits in zahlreichen Geweben und Organen nachgewiesen werden, wobei häufig ein gewebsspezifisches Verteilungsmuster der Rezeptorsubtypen vorliegt.

Der ER α wird beispielsweise hauptsächlich im Uterus, den duktalem und lobulären Epithelien der Brust, den Thekazellen des Ovars und den Leydigzellen des Hodens exprimiert. Der ER β kommt hingegen vorzugsweise im Kolon, den duktalem - und lobulären Epithelien sowie Stromazellen der Brust und Granulosazellen des Ovars vor (Dahlman-Wright et al., 2006).

Mittlerweile weiß man, dass Estrogenrezeptoren ihre Wirkungen nicht nur - wie lange vermutet - ausschließlich auf genomischer Ebene vermitteln.

Studien der letzten Jahre zeigen, dass zusätzlich ein kleiner Pool von ERs mit Lokalisation in der Plasmamembran existiert, welcher seine Wirkungen z. T. über G Protein-gekoppelte Signaltransduktionskaskaden (G protein coupled estrogen receptor 1 - GPER1) vermittelt (Vrtačnik et al., 2014).

Untersuchungen an unterschiedlichen Geweben, beispielsweise an neuronalen Zellen, haben gezeigt, dass diese Membranrezeptoren (mER) zum Beispiel Ca²⁺-Kanal-, Phospholipase C- und

Adenylatzyklase-vermittelte Signalwege mit nachfolgender Aktivierung zahlreicher weiterer Kinasen (B-RAF, IP3K, ERK etc.) initiieren. Diese greifen wiederum auf genomischer und nicht genomischer Ebene an (Levin, 2005; Bean et al., 2014).

Eine Forschergruppe um Tommaso Simoncini fand heraus, dass eine estrogene Stimulation vaskulärer Endothelzellen zu einer $ER\alpha$ -vermittelten Aktivitätssteigerung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und folgend zu einer erhöhten Aktivität der Proteinkinasen B und der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) führt (Simoncini et al., 2000). Diese "schnell- vermittelten" Signalwege außerhalb des klassischen Signalweges sind bisher nur in ihren Ansätzen verstanden und sind, natürlich auch im Hinblick auf therapeutische Ansätze, Gegenstand der aktuellen Forschung.

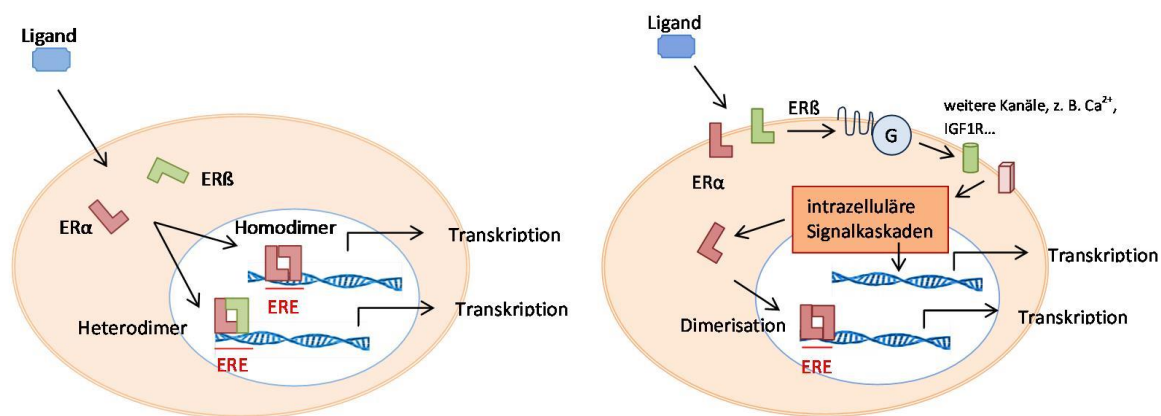


Abb. 5 vereinfachte schematische Darstellung der ER- vermittelten Signalwege; links - "klassischer"/ genomischer ER-Signalweg; rechts - "schnelle" Signalkaskade über mER und G- Proteine (ERE: estrogen response element), adaptiert nach (Bean et al., 2014)

In Bezug auf das Mammakarzinom ist der Estrogenrezeptor ein wichtiger prognostischer und prädiktiver Biomarker, denn er stellt den entscheidenden Indikator für die Wirksamkeit der antihormonellen Therapie dar. Die immunhistochemische Bestimmung des Expressionsmusters in Kombination mit der des Progesteronrezeptors ist mittlerweile ein unverzichtbarer Bestandteil in der individualisierten Therapieplanung (Honma et al., 2014).

1.1.5 Therapie

Die Therapie des Mammakarzinoms entspricht einem multimodalen Konzept, bestehend aus operativen, strahlentherapeutischen und systemischen Therapieansätzen.

Diese Ansätze bestehen nicht nur nebeneinander, sondern werden in Abhängigkeit tumordefinierter bzw. individueller Faktoren in Kombination und ergänzend eingesetzt. Prinzipiell unterscheidet man die operative Therapie, die neoadjuvante Systemtherapie und die adjuvante Radio- oder Systemtherapie.

Die operative Therapie beinhaltet als primäres Ziel die Sicherung der lokalen Tumorkontrolle (R0- Resektion) und der lokoregionären Lymphabflusswege (Kreienberg et al., 2010).

Zur Senkung des Lokalrezidivrisikos (von 30% auf 5%) schließt sich den brusterhaltenden operativen Verfahren obligat die adjuvante Radiatio an (Gätje et al., 2011).

Die systemische Therapie beinhaltet neben chemotherapeutischen Verfahren und Antikörpertherapien auch endokrine/ antihormonelle Therapieoptionen.

1.1.5.1 Antihormonelle Therapie

Eine antihormonelle Therapie stellt einen wichtigen systemischen Therapiepfeiler bei nachgewiesener Hormonempfindlichkeit des Tumors dar. Sie erfolgt nach Abschluss der Chemotherapie, kann jedoch auch simultan zur Radiatio durchgeführt werden.

Die ablativen Verfahren (Entfernung eines Bestandteils aus dem Hormonregelkreis) umfassen die Aromatasehemmer (Bsp. Anastrozol), GnRH-Analoga (Bsp. Goserelin), eine Estrogenrezeptor-Down-Regulation (Bsp. Fulvestrant) und eventuell Bromocriptin bei erhöhtem Prolaktinspiegel. Die additive Hormontherapie umfasst die Gabe hoch dosierter Gestagene und eventuell Androgenen und die Behandlung mit Tamoxifen (Haag et al., 2009). Tamoxifen wird seit Jahren singulär bzw. im Rahmen kombinierter Regimes erfolgreich in der adjuvanten Therapie bzw. bei metastasiertem Mammakarzinom eingesetzt.

Als selektiver Estrogenrezeptormodulator (SERM) bindet es an Estrogenrezeptoren. In diesem Rahmen induziert es gewebsspezifische agonistische und antagonistische Estrogenwirkungen. Als kompetitiver Antagonist verdrängt Tamoxifen den körpereigenen Agonisten Estradiol aus der Rezeptor-Ligandenbindung. Es besitzt am Brustdrüsengewebe eine antiestrogene Wirkung, während es am Endometrium eine agonistische Wirkung entfaltet (Lemmer and Brune, 2007). Die Bindung der SERM's induziert eine Konformationsänderung des entsprechenden Rezeptors und setzt somit die jeweilige Signalkaskade in Gang. Weiterhin kommt es durch die Konformationsänderung des Rezeptors zur Rekrutierung von Co- Aktivatoren, welche die partialagonistischen- bzw. antagonistischen Wirkungen am jeweiligen Zielort modulieren (Lüllmann et al., 2006; Oseni et al., 2008).

1.2 Mastopathie

Die Mastopathie bezeichnet eine Vielzahl regressiver und proliferativer Veränderungen des Brustdrüsenparenchyms, denen ursächlich eine hormonelle Dysfunktion zugrunde liegt. Der Begriff stellt eine Zusammenfassung unterschiedlichster Veränderungen des Brustdrüsenparenchyms, beispielsweise fibrozystischer Veränderungen, Hyalinosen bzw. der sklerosierenden Adenose dar.

1.2.1 Fibrozystische Mastopathie

1.2.1.1 Definition

Die fibrozystische Mastopathie beschreibt eine Konstellation benigner Brustdrüsenveränderungen, die mit einer zystischen Transformation der terminalen duktulo-lobulären Einheiten (TDLE) und einer Fibrose des angrenzenden Stromas einhergehen (Bubendorf et al., 2010).

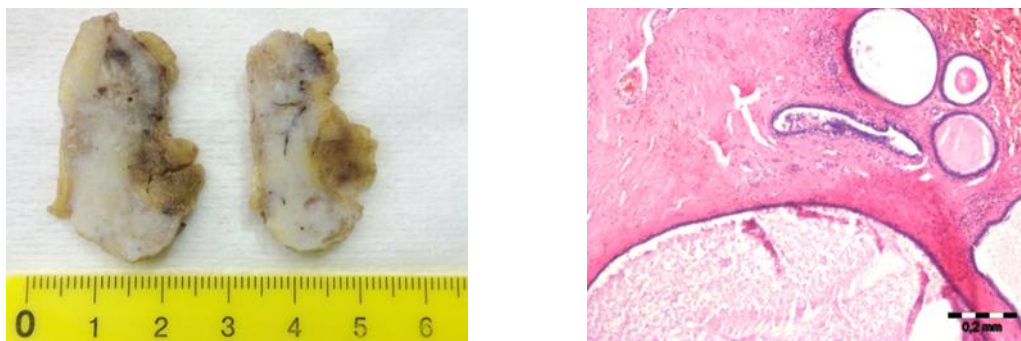


Abb. 6 Fibrozystische Mastopathie Links - typische Makroskopie mit Fibrose und Zysten, Rechts - Histologie. Es zeigen sich zystisch dilatierte Gangstrukturen mit Sekretretention und angrenzender Stromafibrose

1.2.1.2 Epidemiologie

Bei Frauen im gebärfähigen Alter stellt die fibrozystische Mastopathie einen sehr häufigen Befund in der gynäkologischen Praxis dar. Etwa 30- 50% der Frauen jenseits des 30. Lebensjahres bis hin zur Menopause beklagen die typischen Symptome, sie kann aber grundsätzlich in jedem Alter auftreten (Klöppel et al., 2012). In Obduktionsserien ließen sich in bis zu 60% der makroskopisch unauffälligen Mammae histologische Veränderungen im Sinne der fibrozystischen Mastopathie nachweisen (O'Malley et al., 2011).

1.2.1.3 Ätiologie und Pathogenese

Die Pathogenese sowie die ätiologisch relevanten Faktoren der fibrozystischen Mastopathie sind bisher noch nicht im Detail geklärt. Sicher ist allerdings die Tatsache, dass Estrogene eine entscheidende Rolle in der Pathogenese spielen.

Eine hormonelle Dysregulation, die einen chronischen Hyperestrogenismus und einen dysbalancierten Hypoprogesteronismus einschließt, wird als ein bedeutender ätiologischer Faktor angesehen (Bianchi and Riede, 2004; Janni, 2008). Der Estrogenstimulus kann zum einen bedingt sein durch eine erhöhte Konzentration des Gesamtöstrogens oder durch einen erhöhten Anteil freier, nicht SHBG-gebundener (Sexualhormon- bindendes Globulin) Östrogene.

Die Assoziation zwischen der Einnahme oraler Kontrazeptiva als Quelle einer balancierten Östrogen- und Progesteronzufuhr und einer geringeren Inzidenz fibrozystischer Veränderungen stützt die Theorie der ursächlichen hormonellen Imbalance (Ory et al., 1976).

Weitere pathogenetisch relevante Faktoren sind eine Hyperprolaktinämie, Hyperandrogenämie bzw. ein Mangel an Schilddrüsenhormonen (Weyerstahl and Stauber, 2013).

Im Rahmen des hormonellen Ungleichgewichtes kommt es zu einer gesteigerten sekretorischen Aktivität, einer Hyperplasie der Epithelien mit Verlegung der großen und kleinen Gänge und folglich einer Sekretretention mit zystischer Dilatation der terminalen duktulo-lobulären Einheit (TDLE). Häufig sind sekundär- entzündliche Veränderungen mit Ausbildung von Narbengewebe und Hyalinosen zu beobachten (Bubendorf et al., 2010).

1.2.1.4 Klinik und Klassifikation

Klinisch zeigen die Patientinnen eine teils homogene, teils inhomogene Konsistenzvermehrung des Brustdrüsengewebes mit Einschluss zahlreicher Zysten (Janni, 2008).

Palpatorisch zeigen sich multiple, zumeist diffus nachweisbare Verdichtungen (Schrottkugelbrust), die vor allem im oberen äußeren Quadranten lokalisiert sind. Die häufig bilateral auftretenden Zysten zeigen eine prämenstruelle Größenzunahme mit erhöhter Schmerzempfindlichkeit und einem Spannungsgefühl der Brust. Teilweise könne einzelne Zysten stark dilatieren und klinisch als solitärer, palpatorisch fluktuierender Herdbefund imponieren. Bei derartigen lokalisierten Befunden muss von klinischer Seite differentialdiagnostisch das Vorliegen eines Mammakarzinoms in Betracht gezogen und eventuell bioptisch ausgeschlossen werden (Kaufmann et al., 2013).

Eine Zystenruptur kann mit plötzlich eintretenden heftigsten Schmerzen einhergehen. Entsprechend der ursächlichen hormonellen Dysregulation wird postmenstruell ein Rückgang der Beschwerden beobachtet.

Unterschiede in der Dichte des Brustdrüsengewebes sowie der unterschiedliche Gehalt an epithelialem, fibrösem und lipogenem Gewebe einer jeden Brust erklären die Unterschiede in der Symptomausprägung, im Rahmen der hormonellen Schwankungen (Love et al., 1982).

Die Klassifikation der Mastopathien nach Prechtel wird klinisch zur Bestimmung der Prognose verwandt und umfasst drei Ausprägungsgrade (Prechtel, 1991).

Zur Erfassung des Entartungsrisikos werden die proliferative Aktivität sowie der Atypiegrad der Epithelien der TDLE bewertet. Die Einteilung entsprechend der genannten Kriterien sowie das abgeleitete „Karzinomrisiko“ ist der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Tab. 2 Klassifikation der Mastopathie nach Prechtel mit Darstellung des korrelierenden Karzinomrisikos

Grad	Häufigkeit aller Mastopathien	Epithelproliferation	Atypien	Karzinomrisiko
I	70%	-	-	Nicht erhöht
II	20%	+	-	Gering erhöht (bis 2-fach)
III	10%	+	+	2,5- bis 4-fach erhöht

Neben Prechtel weisen auch andere Autoren einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von benignen proliferativen Erkrankungen (z. B. einfache duktale Hyperplasie, Fibroadenome, sklerosierende Adenose) bzw. Atypien (Bsp.: atypische duktale/ lobuläre Hyperplasie) und einem erhöhten Karzinomrisiko auf. Eine im Jahr 2010 veröffentlichte multizentrische prospektive Kohortenstudie bestätigte ebenfalls ein gering gesteigertes Risiko im Patientengut mit Proliferationssteigerung und ein erheblich gesteigertes Risiko im Zusammenhang mit nachgewiesenen Zellatypien (Kabat et al., 2010).

Das alleinige Vorliegen fibrozystischer Veränderungen ohne Einschluss der genannten Kriterien führt nicht zu einer gesteigerten Inzidenz des Mammakarzinoms.

1.2.1.5 Therapie

Es besteht eine allgemeine Uneinigkeit, ob es sich bei der fibrozystischen Mastopathie ohne Nachweis von Atypien um eine „Pathie“ im eigentlichen Sinne oder um einen physiologischen Prozess im Rahmen des hormonellen Zyklus handelt. Ebenso weit streuen auch die Meinungen zur eigentlichen Therapiebedürftigkeit bzw. zu den therapeutischen Ansätzen. Sicher ist jedoch, dass viele Patientinnen einen enormen Leidensdruck verspüren und Therapieoptionen wahrnehmen möchten.

Neben physikalischen Maßnahmen, wie kühlenden Umschlägen und Massagen werden auch Phytotherapeutika zur Behandlung der Mastodyn timer eingesetzt.

Diese beinhalten häufig Mönchspfeffer bzw. Nachtkerzenöl.

Auch Phytoestrogene sollen sich positiv auf die typischen zyklischen Beschwerden der fibrozystischen Mastopathie (Mastodyn timer) auswirken (Murshid, 2011).

Erst bei hohem subjektivem Leidensdruck finden gestagenhaltige Präparate, Estrogen-Gestagen-Kombinationen bzw. lokale Gestagenapplikationen (z. B. Progesteron-Gel) und selten auch Danazol bzw. Tamoxifen Anwendung in der Therapie (Rosolowich et al., 2006; Janni, 2008; Weyerstahl and Stauber, 2013).

1.3 *Linum usitatissimum*

1.3.1 Biologie und Kultivierung

Der Lein, auch Faserlein (Flachs) genannt, gehört zur Pflanzenfamilie der Leingewächse (Linaceae). Die Pflanze wird bis 1,20 Meter hoch und trägt auf dem feinen Stängel mit unbehaarten Blättern mehrere fünfzählige blau- violette Blüten. Hellbraune, aus fünf Kammern bestehende Kapseln stellen die Fruchtform dar und enthalten mehrere Samen (Wichtl, 2002). Das Wurzelwerk besteht aus der Pfahlwurzel, von der die feineren Seitenwurzeln abzweigen, und erreicht etwa die gleiche Länge wie der gesamte Spross.

Je nach Hauptnutzung werden drei Nutzungstypen unterschieden, welche sich wiederum in zahlreiche Untergruppen aufteilen. Man unterscheidet den Faserlein vom Kombinations- und reinen Öllein (Diepenbrock, 1999). Der Faserlein ist eine wenig verzweigte langstielige Pflanze mit einer Wuchshöhe bis zu 1,40 Meter mit geringer Fruchtproduktion. Der Öllein zeigt ein stark verzweigtes Wachstumsmuster und damit auch einen ausgedehnten Blütenstand. Der Kombinationslein, der sowohl für die Öl- als auch für die Fasergewinnung genutzt werden kann, nimmt eine Zwischenstellung ein.

Die Aussaat des Leins erfolgt zwischen Ende März und Anfang April unter Beachtung eines Anbauabstandes von mindestens 6 Jahren aufgrund einer selbstunverträglichen Fruchtfolge.

1.3.2 Therapeutische Anwendung

Im Jahr 2005 wurde der gemeine Lein durch den Verein NHV-Theophrastus zur Heilpflanze des Jahres ernannt. Besonders die Samen und das aus ihnen gewonnene Öl dienen seit Jahrtausenden der Behandlung verschiedener Erkrankungen. Bis heute ist das Haupteinsatzgebiet die Verwendung gemahlener Leinsamen in Verbindung mit Flüssigkeit als Abführmittel bei habitueller Obstipation oder Divertikulitis. Die laxierende Wirkung entsteht durch den hohen Schleimstoffgehalt der Samenschale, der mit einer hohen Wasserbindungskapazität (1600- 3000g/100g) einhergeht.

Aber auch die Verwendung gemahlener Samen bei Atemwegsbeschwerden oder Entzündungen des Urogenitaltraktes werden beschrieben (Basch et al., 2007).

Das Öl der Leinsamen hat einen hohen Anteil an kardio- und vasoprotektiv wirkenden Ω -3-Fettsäuren, vor allem an Linolensäure (Basch et al., 2007). Studien zeigen einen positiven Einfluss von Leinsamen auf die Zusammensetzung der Blutlipide, welcher mit einer Reduktion des Gesamtcholesterins sowie mit einem Rückgang der LDL- Fraktion einhergeht. Weiterhin enthalten Leinsamen zahlreiche Antioxidantien, hochwertige Proteine und reichlich Ballaststoffe (Goyal et al., 2014).

Im Verlauf der letzten Jahre ist zunehmend eine weitere Eigenschaft des Leins in den Fokus der Forschung gerückt. Tierexperimentell wurde eine Leinsamen-assoziierte Wachstumsminde rung sowie ein gesenktes Metastasierungsrisiko von Mammakarzinomen nachgewiesen (Chen et al., 2002). Leinsamen stellen in unseren Breitengraden eine Hauptquelle für Phytoestrogene dar (Kilkinen et al., 2001; Peterson et al., 2010). Speziell für die Lignane, wie z. B. Secoisolariciresinol, Shonanin, Matairesinol und Pinoresinol ist Lein eine wichtige Bezugsquelle (Obermeyer et al., 1995; Liggins et al., 2000; Kilkinen et al., 2001; Peterson et al., 2010).

Für verschiedene Phytoestrogene, insbesondere für die Untergruppe der Sojaisoflavone, wurden bereits antikanzerogene Effekte, besonders beim Mammakarzinom beschrieben (Fotsis et al., 1998; Wu et al., 1998; Adlercreutz, 2003).

1.4 Phytoestrogene

1.4.1 Überblick und Einteilung

Phytoestrogene sind biologisch aktive Phenolverbindungen pflanzlichen Ursprungs, die eine strukturelle Ähnlichkeit zum Steroidhormon 17 β - Estradiol aufweisen (Sirtori et al., 2005). Die strukturelle Ähnlichkeit begründet sich zum einen in der gemeinsamen Ausbildung eines Phenolrings und zum anderen im Vorhandensein eines Hydroxylgruppenpaares.

Zwar besitzen sie nahezu identische strukturelle Merkmale und werden ähnlich wie körpereigene Steroide metabolisiert, zeigen jedoch z. T. andere bzw. entgegengesetzte molekulare und klinische Wirkungen (Adlercreutz, 1995). Im Wesentlichen werden drei Strukturklassen, nämlich die Isoflavone, Lignane und Coumestane, unterschieden.

Die Phytoestrogene gehören zur vielfältigen Gruppe der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe.

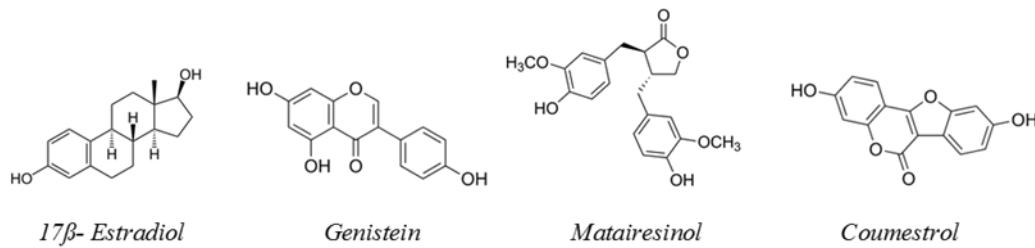


Abb. 7 Strukturelle Ähnlichkeit des 17β- Estradiols zu ausgewählten Phytoestrogenen der drei Untergruppen

1.4.1.1 Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe

Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe sind bioaktive Substanzen und spielen als Abwehrstoffe bzw. Wachstumsregulatoren im Sekundärstoffwechsel der Pflanzen eine bedeutende Rolle (Kreis, 2009). Ihnen gegenüber stehen die primären Pflanzeninhaltsstoffe, d. h. Kohlenhydrate, Fette und Proteine.

In der Vergangenheit wurde das Augenmerk hauptsächlich auf die toxisch wirkenden Vertreter der sekundären pflanzlichen Inhaltsstoffe, wie z.B. Blausäure und Solanin gelegt, sodass sie lange Zeit unter der Bezeichnung der "antinutritiven Inhaltsstoffe" geführt wurden. Mit Entdeckung der protektiven und gesundheitsfördernden Eigenschaften vieler Vertreter wurde dieser Terminus verlassen und die wertfreie Bezeichnung der "sekundären Pflanzenstoffe" bzw. der "phytochemicals" eingeführt (Leitzmann, 2010).

Entsprechend der chemischen Struktur bzw. den funktionellen Aspekten werden zahlreiche Gruppen, z. B. die Carotinoide, Phytosterine, Saponine, Glukosinolate, Phytoestrogene unterschieden. Neben den antikanzerogenen, antimikrobiellen und antioxidativen Eigenschaften vieler Vertreter sind mittlerweile auch immunmodulierende, blutdruckregulierende, analgetische und verdauungsfördernde Funktionen bekannt.

Als Beispiel seien die analgetischen und antiinflammatorischen Wirkungen der aus den Blättern des Drachenbaumes (*Dracanea ombet*) gewonnenen, steroidal Saponine genannt (Moharram and El-Shenawy, 2007).

1.4.2 *Isoflavone*

Die Isoflavone sind direkte Abkömmlinge der Flavone und unterscheiden sich von diesen strukturell lediglich durch die Verknüfungsposition von Chromon- und Phenylring (Kulling and Watzl, 2003; Dixon, 2004). Sie sind nur in wenigen Pflanzenarten enthalten, vor allem aber in der Unterfamilie der Papilionoideae der Leguminosen (Hülsenfrüchte).

Bei den von Menschen konsumierten Nahrungsmitteln enthalten Sojabohnen bzw. Sojaprodukte die höchsten Isoflavon-Konzentrationen und stellen somit die wichtigste Nahrungsquelle dar (Adlercreutz, 1995; Morito et al., 2001; Thompson et al., 2006).

In der pflanzlichen Nahrung liegen die Isoflavone im Allgemeinen konjugiert an Zucker, beispielsweise an 6-O-Manoyl-7- β -Glucoside, vor. Eine Ausnahme bilden die fermentierten Sojaprodukte wie Miso oder Tempeh, in welchen der Zuckerrest im Rahmen der Fermentation bereits enzymatisch abgespalten ist (Kulling and Watzl, 2003).

Die wichtigsten Vertreter der Isoflavone sind Genistein, Daidzein, Glycetin, Biochanin A und Formononetin. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über den Gehalt verschiedener Isoflavone in ausgewählten Lebensmitteln.

Tab. 3 Gehalt der Isoflavone Genistein, Daidzein, Glycetin, Biochanin A und Formononetin in ausgewählten Lebensmitteln, in mg/100g, (n.n. = nicht nachgewiesen, n.b. = nicht bestimmt), nach (Horn-Ross et al., 2000; Kulling and Watzl, 2003; Leitzmann, 2010)

Lebensmittel	Genistein mg/100g	Daidzein mg/100g	Glycetin mg/100g	Biochanin A mg/100g	Formononetin mg/100g
Sojabohnen	19,7-92	27,1-54,6	10-14	0,01	0,07
Sojamilch	3-17	1-13	0-2	n.n.	n.n.
Tofu	8-20	7-11	0-5	n.n.	n.n.
Sojasprossen	1,9-23	1,3-13,8	n.b.	n.n.	0-0,02
Tempeh	32	19	n.b.	n.b.	n.b.
Misopaste	37,6	19	n.b.	n.b.	n.b.
Kleesprossen	0,1-0,4	0-0,1	n.b.	0,4-0,8	2,3-4,0
Vollkornbrot	0-0,014	0-0,015	n.b.	n.b.	n.b.

Werden Isoflavone in Form von Aglykonen aufgenommen, erfolgt die Resorption im Rahmen der passiven Diffusion im Dünndarm. Über die Resorptionswege der Glucosidformen herrscht in der Literatur Uneinigkeit. Bekannt ist jedoch, dass das enteral nicht resorbierte Daidzein im Colon reduktiv zum Isoflavon Equol metabolisiert wird (Setchell et al., 2013). Dieser Stoffwechselvorgang unterliegt ausgeprägten interindividuellen Unterschieden (Adlercreutz, 1995).

Während lediglich 30 bis 33% der westlichen Bevölkerung aus Daidzein Equol bilden können, sind 50 bis 55% der asiatischen Bevölkerung dazu in der Lage (Adlercreutz, 2002; Setchell and Cole, 2006). Als ursächlich werden Unterschiede in Zusammensetzung der Darmbakterien und diätetische Faktoren angesehen (Setchell et al., 2013; Hees, 2015).

1.4.3 Lignane

Lignane sind eine Gruppe weit verbreiteter, strukturell vielfältiger pflanzlicher Bestandteile, die ihre primäre Funktion vor allem in der pflanzlichen Abwehr erfüllen. Chemisch stellen sie

Dimere bzw. Oligomere von Phenyl- C3- Verbindungen, z. B. des 3,4- Dihydroxy-1-propenylbenzols dar und werden, aufgrund der zunehmenden Hydrophilie, in Form von Glykosiden in den Vakuolen der Pflanzenzelle gespeichert (Ebermann and Elmadfa, 2008).

Bis dato bekannte pflanzliche Lignane sind Secoisolariciresinol, Matairesinol, Pinoresinol, Syringaresinol, Arctigenin, 7- Hydroxymatairesinol, Isolariciresinol und Lariciresinol (Adlercreutz, 2002).

Von den pflanzlichen Lignanenen sind die tierischen Lignane mit den Hauptvertretern Enterodiol und Enterolacton abzugrenzen (Dixon, 2004). Sie weisen eine bedeutend höhere estrogene Aktivität auf und entstehen als mikrobielle Abbauprodukte der pflanzlichen Vorstufen während der Digestion im proximalen Kolon (siehe Abb.9).

Bisher konnten zwei Bakterienstämme, die den Abbau von Secoisolariciresinol zu Enterodiol bewirken, identifiziert werden, nämlich *Peptostreptococcus* sp. und *Eubacterium* sp. (Li-Quan et al., 2000).

Lange Zeit ging man davon aus, dass Secoisolariciresinol und Matairesinol die einzigen pflanzlichen Vorstufen für die Synthese der tierischen Lignane darstellen. Eine neuere Studie zeigte allerdings, dass auch weitere Vertreter, mit Ausnahme von Isolariciresinol, direkt oder über Vorstufen zu Enterodiol bzw. Enterolacton abgebaut werden (Heinonen et al., 2001).

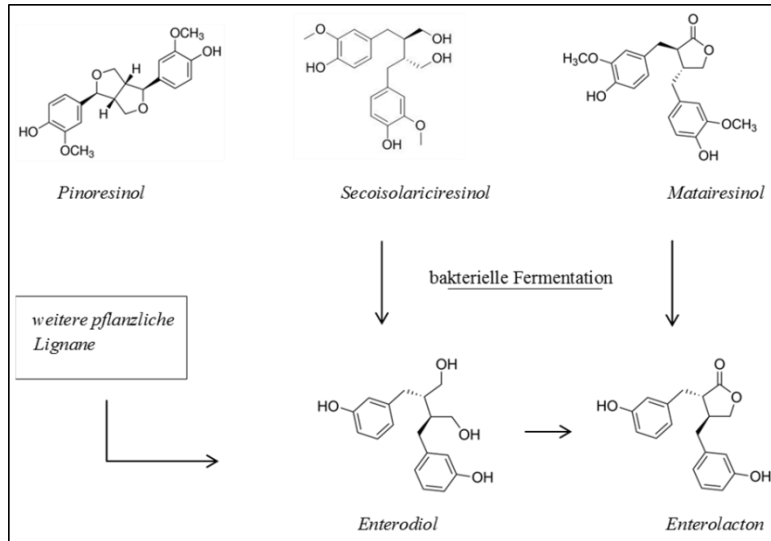


Abb. 8 Darstellung der Struktur und der Digestion (bakteriellen Fermentation) wichtiger Lignane, nach (Heinonen et al., 2001)

Die Vielfalt der glycosidischen Bindungsmöglichkeiten erschwert die Identifikation und Quantifizierung der pflanzlichen Lignane in Nahrungsmitteln, sodass die Analyse auf Basis der Aglycone nach enzymatischer Hydrolyse erfolgt (Liggins et al., 2000).

Die Hauptnahrungsquellen der Lignane sind Vollkornprodukte und Ölsaaten (insbesondere Leinsamen), aber auch Sojaprodukte, Beeren, Nüsse und Knoblauch enthalten nicht unbeträchtliche Mengen (Liggins et al., 2000; Kulling and Watzl, 2003; Dixon, 2004).

Vor allem die äußeren Faserschichten des Getreides (Aleuronschicht) sind reich an Lignan (Adlercreutz, 1995). Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über den Gehalt ausgewählter pflanzlicher Lignane in unterschiedlichen Nahrungsmitteln. Die Werte sind verschiedenen Studien entnommen, was die Schwankungsbreite der Messwerte erklärt.

Tab. 4 Gehalt der Lignane Secoisolariciresinol, Lariciresinol, Pinoresinol und Matairesinol in ausgewählten Nahrungsmitteln, in µg/100g, (n.n. = nicht nachgewiesen, n.b. = nicht bestimmt), nach (Horn-Ross et al., 2000; Kulling and Watzl, 2003; Ebermann and Elmadfa, 2008)

Nahrungsmittel	Secoisolariciresinol µg/100g	Lariciresinol µg/100g	Pinoresinol µg/100g	Matairesinol µg/100g
Leinsamen	294,21-370000	3041	3324	553-1100
Roggen	47-720	n.b.	n.b.	65
Erdnuss	53	n.b.	41	n.n.
Sesamsamen	66	9470	481	481
Knoblauch	26,6-50	286	200	37,4
Karotte	93-192	60	19	3
Erdbeeren	5	117	212	n.n.

1.4.4 Coumestane

Coumestane haben in der menschlichen Ernährung eine nur geringe Bedeutung, da nur wenige pflanzliche Lebensmittel, beispielweise Alfalfa-, Klee- und Sojasprossen signifikante Mengen enthalten (Anderson et al., 1999). Den wichtigsten Vertreter stellt das Coumestrol. Dieses ist der Phytoestrogenvertreter mit der höchsten bekannten estrogenen Aktivität (Kulling and Watzl, 2003).

1.4.5 Wirkprofil der Phytoestrogene

Studien beschreiben einen Zusammenhang zwischen einer veränderten Inzidenz, Letalität und Morbidität verschiedener (Tumor)-Erkrankungen in Assoziation mit der Aufnahme phytoestrogenreicher Nahrungsmittel (Adlercreutz, 1995; Dixon, 2004; Caan et al., 2011). Phytoestrogene haben einen positiven Einfluss auf die Zusammensetzung der Plasmalipide und wirken über verschiedene Mechanismen kardio- und vaskuloprotektiv. Weiterhin finden sich Angaben zu positiven Einflüssen auf das muskuloskelettale System, insbesondere die Knochendichte (Anderson et al., 1999).

Ein Großteil der Studien befasst sich mit Einflüssen phytoestrogenen Substanzen auf Tumorleiden, insbesondere auf hormonabhängige Erkrankungen, beispielsweise das Prostata- und Mammakarzinom (Anderson et al., 1999; Adlercreutz et al., 2000).

Es wird ein Zusammenhang zwischen der Aufnahme einer phytoestrogenreichen Kost und einem reduzierten Risiko an Brustkrebs zu erkranken bzw. zu versterben beschrieben (Messina and Barnes, 1991; Adlercreutz, 2002; Caan et al., 2011; Zhang et al., 2012; Bilal et al., 2014).

Phytoestrogene sind Estrogenrezeptor-modulierende Substanzen, für die sowohl antiestrogene- als auch estrogene Effekte nachgewiesen wurden (Dixon, 2004). Daher werden sie häufig auch unter der Bezeichnung der pflanzlichen selektiven Estrogenrezeptormodulatoren ("PhytoSERMS") geführt.

Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zum 17 β - Estradiol haben sie die Fähigkeit als Liganden an die Estrogenrezeptoren α - und β zu binden (Anderson et al., 1999, 1999; Bilal et al., 2014). Die relative Bindungsaffinität ist jedoch im Vergleich zum 17 β -Estradiol mindestens um den Faktor 1000 erniedrigt. Einige Vertreter, insbesondere Genistein und Daidzein zeigen eine 9- bis 10fach höhere Affinität für den ER β als für den ER α (Kuiper, George G. J. M. et al., 1998).

Über die bereits bekannten Estrogenrezeptor-vermittelten Wirkungen hinaus wurden ihre Wirkungen auf zellulärer, molekularer und klinischer Ebene weiter untersucht.

So konnten noch weitere Funktionen im Zellstoffwechsel bzw. im Rahmen (patho)-physiologischer Vorgänge identifiziert werden. Die folgende Abbildung bietet einen Überblick über verschiedene Wirkmechanismen der Phytoestrogene.

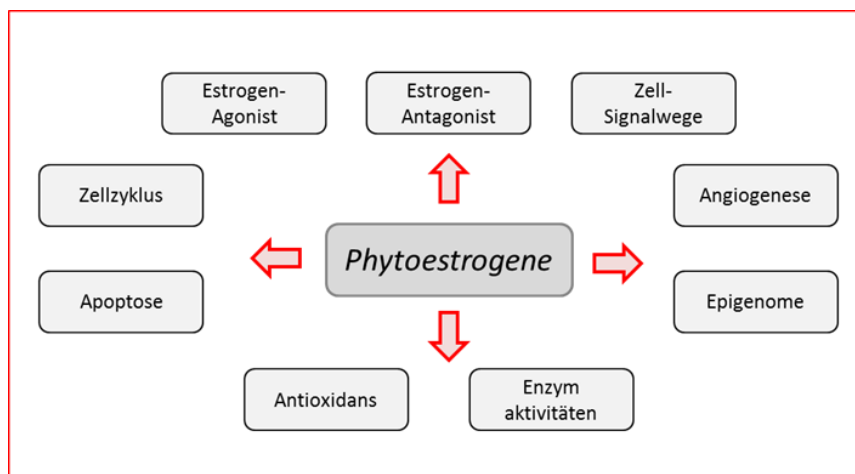


Abb. 9 Molekulare, zelluläre und hormonelle Wirkungen der Phytoestrogene im Überblick, nach (Bilal et al., 2014)

Untersuchungen mit Genistein zeigen in vitro eine signifikante Abnahme der Zellproliferation Estrogen-unabhängiger Mammakarzinom-Zellen (MDA-MB-231) um ~50%. Nach Zugabe von 40- 80 μ mol/L sistiert hierbei der Zellzyklus in der G2- bzw. M- Phase (Santell et al., 2000).

Weiterhin stellt das, während der Digestion gebildete Lignan Enterolacton einen schwachen Inhibitor des Enzyms Aromatase dar. Die Aromatase katalysiert die Umsetzung von Testosteron zu Estradiol und von Androstendion zu Estron (Aromatisierung) als letzten Reaktionsschritt bei der Biosynthese der Estrogene. Die resultierenden erniedrigten Estrogen-Level werden als ein möglicher protektiver Faktor in Bezug auf hormonabhängige Tumoren angesehen (Adlercreutz et al., 1993).

Studien deuten auf eine Phytoestrogen-induzierte Steigerung der Synthese des SHGB (Sexualhormon bindendes Globulin) in der Leber mit konsekutiver Minderung der ungebundenen Plasma-Estrogene hin (Adlercreutz et al., 1987).

In einer Arbeit von Nagata et al. wird ebenfalls eine Soja- bzw. Phytoestrogen-assoziierte Abnahme der Serumestradiolkonzentration beschrieben, wobei Änderungen des SHGB in dieser Arbeit nicht verzeichnet werden. Als ursächlich werden hier Veränderungen in der Liberation von LH und FSH angesehen (Nagata et al., 1997).

Auch über hormonunabhängige Mechanismen entfalten Phytoestrogene ihre Wirkungen. So zeigen sich insbesondere für das Isoflavon Genistein in in vitro-Studien antiproliferative und antiangiogenetische Wirkungen in soliden malignen Tumoren (Fotsis et al., 1998).

Weiterhin stellt Genistein in vitro einen Inhibitor der DNA-Topoisomerase II dar und stimuliert verschiedene antioxidative Enzyme, zum Beispiel die Superoxid-Dismutase bzw. die Gluthation-Peroxidase (Markovits et al., 1989; Adlercreutz, 2003).

Auch verschiedene Proteinkinasen, vor allem EGF-Rezeptor-assoziierte Tyrosinkinasen, werden in Versuchsreihen durch Genistein inhibiert (Akiyama et al., 1987; Markovits et al., 1989).

Diese stellen wichtige Akteure in der Zellproliferation und (malignen) Transformation dar und sind heute in zunehmendem Maße das Ziel individualisierter Tumorthérapien.

2 Zielstellung der Arbeit

In zahlreichen Arbeiten stehen die Phytoestrogene und deren Wirkungen auf hormonabhängige Erkrankungen im Mittelpunkt des Interesses. Dabei liegt der Fokus deutlich auf den sojabasierten Phytoestrogenen, also vor allem den Isoflavonen.

Aber auch in unseren Breitengraden lassen sich phytoestrogenhaltige Pflanzen kultivieren, welche durchaus eine Bedeutung in unserer Ernährung haben.

Ein wichtiger Vertreter ist die Leinpflanze (*Linum usitatissimum*), welche als Hauptnahrungsquelle für Lignane gilt. Sie stellt somit auch einen wichtigen Lieferanten der Phytoestrogene im Allgemeinen dar (Liggins et al., 2000; Sicilia et al., 2003).

In vorangegangenen Untersuchungen der Arbeitsgemeinschaft des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik Rostock erfolgte bereits der Nachweis vitalitäts- bzw. proliferationshemmender Wirkungen verschiedener Leinwurzelextrakte auf Mammakarzinom-, Chorionkarzinom- und Trophoblasttumorzellen. Die Extrakte wurden aus Wurzeln, Stängeln und Blättern der Leinpflanze gewonnen (Abarzua et al.; Szewczyk, 2007). Dabei zeichnete sich eine besonders potente Wirkung der Wurzelextrakte ab.

Das Wirkspektrum zweier ethanolischer Extrakte aus der Wurzel von *Linum usitatissimum* steht, in Bezug auf Mamma-Zelllinien unterschiedlicher Dignität, im Zentrum des Interesses dieser Arbeit.

Ein Wurzelextrakt nach Luyengi (Luyengi et al., 1996) und ein Mikrowellenextrakt wurden in unterschiedlichen Testverfahren vergleichend an zwei malignen (MCF-7, BT20) und drei benignen Zelllinien (MCF-12A, MCF-10A, HMEC) der Mamma getestet.

Die Parameter Zellproliferation- und Vitalität sowie Zytotoxizität wurden nach Zugabe der Extrakte in unterschiedlichen Konzentrationen von 17 β -Estradiol sowie Tamoxifen durch drei kolorimetrische Testverfahren (ELISA) erfasst, quantifiziert und vergleichend analysiert.

Zwei der benignen Zelllinien (MCF-12A, MCF-10A) entstammen Brustdrüsenparenchym mit einer fibrozystischen Mastopathie, einer der häufigsten gutartigen "Veränderungen" der weiblichen Brust.

Sowohl die malignen als auch fibrozystischen Zelllinien schließen jeweils einen Hormonrezeptor-positiven (MCF-7, MCF-12A) und einen Hormonrezeptor-negativen (BT20, MCF-10A) Vertreter mit ein.

Die dritte untersuchte benigne Zelllinie stellt eine Hormonrezeptor-positive epitheliale Primärkultur der Mamma (HMEC) ohne "pathologisches Korrelat" dar.

Die zentralen Fragestellungen dieser Arbeit sind:

1. Zeigen die phytoestrogenhaltigen Extrakte Auswirkungen auf die Proliferation und Vitalität der Zelllinien? Wenn ja, gibt es Unterschiede in der Wirkung auf maligne und benigne Zelllinien?
2. Welche Wirkungen üben die Leinwurzelextrakte speziell auf die Zelllinien aus der fibrozystischen Mastopathie aus, und lassen sich daraus Hinweise auf mögliche therapeutische Optionen ableiten?
3. Welche extraktinduzierten Veränderungen werden in der Primärkultur (HMEC) nachgewiesen? Unterscheiden diese sich von denen der anderen Zelllinien?
4. Welche Unterschiede zeigen sich im Verhalten der Hormonrezeptorpositiven- und negativen Zelllinien?
5. Welche Unterschiede bestehen im Extraktionsverfahren und der Zusammensetzung beider Vollextrakte, und inwieweit sind standardisierte Aussagen zu Qualität und Quantität möglich?
6. Lassen sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit Rückschlüsse auf karzinopräventive bzw. therapeutische Ansätze phytoestrogenhaltiger Extrakte der Leinpflanze ziehen?

3 Material und Methoden

3.1 Pflanzliche Extrakte

3.1.1 Pflanzenmaterial

Bei dem verwendeten pflanzlichen Material handelt es sich um die Wurzeln der Pflanze *Linum usitatissimum* (auch: Gemeiner Lein, Flachs).

Die Aussaat des Faserleins erfolgte im Juni 2010 auf dem Freilandgelände der Versuchsstation der Phytomedizin in Rostock. Im August 2010 wurde das Pflanzenmaterial geerntet, die einzelnen Bestandteile wurden direkt weiterverarbeitet oder eingelagert.

3.1.2 Extraktion nach Luyengi et al. (1996)

Die Extraktion nach Luyengi (Luyengi et al., 1996) stellt ein modifiziertes Extraktionsverfahren zur Isolierung von Lignanen aus Pflanzenmaterialien dar.

Das bei -70° C tiefgefrorene Wurzelmaterial der Leinpflanze wurde gewogen und anschließend unter flüssigem Stickstoff feinpulvrig gemörsert. Einzelne Anteile der Hauptwurzel ließen sich nicht komplett zerkleinern und wurden entfernt.

Über einen Einführtrichter wurde die gemörserte Probe in einen 2 Liter- Rundkolben überführt und mit 266 ml Methanol aufgegossen. Die Zugabe von Siedesteinen erfolgte, um einen Siedeverzug zu vermeiden. Anschließend wurde die Probe unter einem Abzug im Wasserbad 15 Minuten bei 70° C unter Rückfluss gekocht. Der Rückflussmechanismus verhindert das Austreten von leicht flüchtigen Substanzen aus dem Kolben.

Nach dem Abkühlen wurde die Probe durch einen Faltenrichter filtriert, bis sie nahezu klar war. Das entstandene Filtrat konnte nun in einen Rundkolben mit 100 ml Fassungsvermögen überführt und anschließend am Rotationsverdampfer eingedampft werden.

Bei diesem Vorgang verdampft das Methanol langsam, während der Glaskolben in einem 42° C warmen Wasserbad rotiert. Die langsame Senkung des Innendrucks von 300 auf 60 mbar dient dabei der Verbesserung der Destillationsleistung bei sinkender Siedetemperatur.

Die eingedampfte Probe wurde in 6 ml Aqua dest. aufgenommen und die festen Bestandteile im Ultraschallbad im Glaskolben gelöst. Anschließend erfolgte das Überführen der Lösung in ein 50 ml Falcon-Röhrchen. Durch fünfmaliges Ausschütteln in 12 ml Ethylacetat zeigte sich eine deutliche Phasentrennung. Die obere Ethylacetat-Phase, in der sich die gelösten Bestandteile befinden, wurde von der unteren wässrigen Phase mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgesaugt und in einen Rundkolben mit 50 ml Fassungsvermögen überführt. Zuvor

fand eine Bestimmung des Leergewichts des Kolbens statt. Anschließend fand die Eindampfung bis zur vollständigen Trocknung bei 42° C am Rotationsverdampfer statt, wobei wieder eine Senkung des Innendrucks von 400 auf 60 mbar erfolgte. Es schloss sich die Nachtrocknung im Exsikkator mit Trockenmittel (Silikagel) über Nacht an.

Am nächsten Tag wurde der Kolben gewogen und das Nettogewicht der Probe bestimmt. Entsprechend des Nettogewichtes von 227 mg erfolgte die Verdünnung mit 2270 µl unvergälltem Ethanol 96%, so dass eine Stammlösung mit einer Konzentration 100 mg/ml entstand. Die Lagerung der Stammlösung erfolgte lichtgeschützt bei -83° C.

3.1.3 Extraktion mit Mikrowellen

Die Extraktionsmethode mit Mikrowellen stellt in der Forschung ein relativ modernes Verfahren zur Extrakterstellung dar.

In den späten 1970er Jahren wurde diese Technik erstmals im Labor zur Spurenanalyse von Metallen in biologischen Proben angewandt. Erst mehr als zehn Jahre danach erschienen die ersten Publikationen über Extraktionsversuche mit Mikrowellen (Sparr Eskilsson and Björklund, 2000). Mikrowellen sind elektromagnetische Wellen in einem Frequenzbereich von 0,3 bis 3 GHz. In Experimentallabors verwendete Geräte nutzen, genau wie Haushaltsmikrowellen, eine Frequenz von 2,45 GHz. Die Erwärmung der Probe beruht auf der Schwingungsanregung dipolarer Moleküle. Durch die entstehenden Oszillationen kommt es zu Kollisionen der Moleküle und daher zur Freisetzung von thermischer Energie in das Medium (Tatke and Jaiswal, 2011). Die resultierende Wärmeentwicklung erfolgt, im Gegensatz zur klassischen Erwärmung durch Konduktion sehr rasch und gleichmäßig in der gesamten Probe (Kaufmann and Christen, 2002).

Die Herstellung des Mikrowellenextraktes aus der Leinwurzel für diese Arbeit, erfolgte im April 2011 durch die Abteilung für analytische und technische Chemie am Institut für Chemie, der Universität Rostock. Verwendet wurde eine Labormikrowelle des Typs Mars Xpress der Firma CEM. 0,280g des zerkleinerten Pflanzenmaterials wurden in 5 ml absolutem Ethanol als Lösungsmittel suspendiert und anschließend in ein Teflongefäß überführt.

Im Anschluss wurde die Lösung während der Mikrowellenextraktion über einen Zeitraum von zehn Minuten bei 800 W Leistung gleichmäßig auf 60°C erhitzt und daraufhin über zehn Minuten bei 60° C gehalten. Während dieses Vorganges wurde die Leistung durch das Gerät automatisch prozentual geregelt. Anschließend erfolgte ein manueller Schüttelvorgang über eine Minute, um die Freisetzung der Inhaltsstoffe zu fördern. Der Vorgang wurde zweimal wiederholt, woraus eine Gesamtextraktionszeit von 30 Minuten resultiert.

Es schloss sich der obligatorische Reinigungsvorgang mit einer Membran-Filtrationsanlage zur Trennung von überschüssigen Schwebeteilchen und Probenmaterial an. (Oppermann, 2012)
Der so entstandene klare Extrakt (Feststoffgehalt 2,5 mg/ml) stand nun für die LC/MS-Messung zur Verfügung.



Abb. 10 links - MarsExpress von CEM; rechts - Membranfiltrationsanlage von Millipore, (mit freundlicher Genehmigung durch C. Oppermann)

3.1.4 Aufbereitung der Extrakte und Kontrollsubstanzen

3.1.4.1 Extrakte

Aus dem Extrakt nach Luyengi und dem Mikrowellenextrakt wurden unter Zugabe von unvergälltem Ethanol 96% zunächst eine Stammlösung, mit einer Konzentration von 100 mg/ml hergestellt. Ausgehend von dieser Stammlösung wurden die zu testenden Verdünnungsstufen (siehe Tabelle 5), unter weiterer Zugabe von Ethanol 96% hergestellt. Die Lagerung der Stammlösungen erfolgte lichtgeschützt bei -83°C , während die Verdünnungsreihen lichtgeschützt bei -20°C lagerten und lediglich zu Testzwecken kurzzeitig entnommen wurden. Die Anfertigung der verdünnten Testlösungen erfolgte immer in kleinen Mengen und wurde bei Bedarf wiederholt, um einen Verlust an Wirkstoffen sowie Änderung der Zusammensetzung durch Verdunstungsvorgänge zu minimieren. Weiterhin erfolgte vor den Testungen eine gründliche Durchmischung der Extrakte mittels Vortexmischer, um konstante Testserien zu gewährleisten.

Tab. 5 Konzentrationen der Extraktverdünnungen (absteigend) in $\mu\text{g/ml}$

Verdünnungsstufen des Rohextraktes (Luyengi et al., Mikrowelle)
100 000 $\mu\text{g/ml}$
50 000 $\mu\text{g/ml}$
10 000 $\mu\text{g/ml}$
5000 $\mu\text{g/ml}$
1000 $\mu\text{g/ml}$
100 $\mu\text{g/ml}$
10 $\mu\text{g/ml}$
1 $\mu\text{g/ml}$

3.1.4.2 Kontrollsubstanzen

Neben den Wirkungen der hergestellten Extrakte soll in dieser Arbeit auch der Einfluss der Kontrollsubstanzen Tamoxifen und 17 β - Estradiol auf die Zellkulturlinien untersucht werden. Beide Substanzen wurden vom Forschungslabor kommerziell in Pulverform erworben. Die Verdünnung zur gewünschten Endkonzentration erfolgte in 96 %igem Ethanol.

Tab. 6 Ausgangskonzentrationen von Tamoxifen und 17 β - Estradiol in mol/l

Ausgangskonzentration Tamoxifen	Ausgangskonzentration 17β- Estradiol
10^{-2}mol/l	10^{-7}mol/l

3.2 Zellkultur

3.2.1 Zellkulturlinien

Die Extrakte und Kontrollsubstanzen wurden an zwei immortalisierten Mammakarzinomzelllinien (BT-20, MCF-7), an zwei benignen immortalisierten Mammazelllinien der fibrozystischen Mastopathie (MCF-10A, MCF-12A) und an einer mammaepithelialen Primärkultur (HMEC) vergleichend getestet.

Alle Zellkulturreihen wurden vom Forschungslabor kommerziell erworben. Die Lagerung des Zellmaterials erfolgte bis zur Aussaat in flüssigem Stickstoff bei -180°C .

BT-20

Diese Mammakarzinomzelllinie wurde im Jahr 1958 aus dem Tumorgewebe einer 74-jährigen kaukasischen Frau isoliert. Immunzytochemisch ist sie negativ für den Estrogenrezeptor. Zwar exprimieren die Zellen eine ER-mRNA, sie weist jedoch eine Deletion auf Exon 5 auf und wird nicht transkribiert (ATCC- BT20; Castles et al., 1993).

MCF-7

MCF-7 ist eine ER-positive Zelllinie, die im Jahr 1970 aus dem Primärtumor eines metastasierten Mammakarzinoms einer 69-jährigen kaukasischen Patientin isoliert wurde. Die Zellen können Estradiol verarbeiten und haben die Fähigkeit, kuppelförmige Zellcluster zu bilden. Die Verdopplungszeit der Zellpopulation liegt bei etwa 29 Stunden (ATCC- MCF-7).

MCF-10A

Diese nicht-malignen, epithelialen Zellen stammen aus dem fibrozystisch veränderten Brustdrüsengewebe einer 36-jährigen kaukasischen Frau und wurden im Jahr 1984 isoliert. Elektronenmikroskopisch zeigen sie charakteristische Merkmale duktaler-luminaler Zellverbände (Soule et al., 1990; Tait et al., 1990).

MCF-12A

Es handelt sich um eine spontan immortalisierte, epitheliale Zelllinie, die aus dem Brustdrüsenparenchym einer 60-jährigen kaukasischen Frau isoliert wurde. Die Entnahme des Gewebes erfolgte im Rahmen einer Mammareduktionsplastik. Histologisch konnte am Reduktionsmaterial eine fibrozystische Mastopathie mit eingeschlossenen intraduktalen Hyperplasien verifiziert werden. Die Populationsverdopplungszeit wird mit 19 Stunden angegeben (ATCC- MCF-12A; Paine et al., 1992).

HMEC

Die verwendete Zelllinie HMEC (Human Mammary Epithelial Cells) beinhaltet "normale", das heißt benigne und nicht immortalisierte Epithelzellen aus dem Mammagewebe. Es handelt sich um eine Primärkultur, die nur etwa 15 Populationsverdopplungen durchläuft und anschließend in die Seneszenz eintritt (Lonza- HMEC). Die Auslieferung des Zellmaterials an Laboratorien erfolgt im kryokonservierten Zustand in der siebenten Passage.

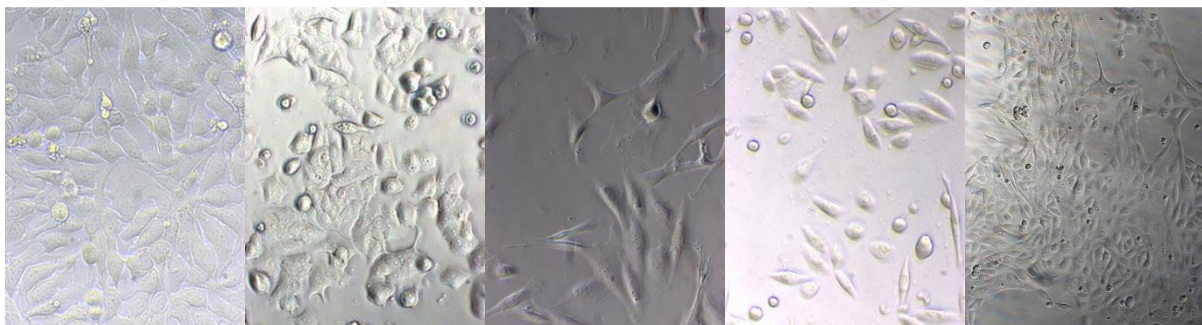


Abb. 11 Zelllinien; von links nach rechts: BT-20, MCF-7, MCF-10A, MCF-12A (20x) und HMEC (10x)

3.2.2 Zellkulturmedien

Zur Gewährleistung des bestmöglichen Zellwachstums wurden speziell auf das Wachstumsverhalten der Zellen abgestimmte Nährmedien verwendet. Die verwendeten spezifischen Zusätze schaffen aseptische Bedingungen und ermöglichen ein optimales Kulturmilieu.

DMEM

Die Kultivierung der Zelllinie MCF- 7 erfolgte in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit L- Glutamin ohne Phenolrotzusatz. Dem Medium wurden anteilig 10% fetales Kälberserum (FKS), 1%ige Penicillin/Streptomycin-Lösung und 0,5% Amphotericin B zugesetzt. FKS dient der Versorgung der Zellen mit essentiellen Wachstumsfaktoren und Nährstoffen und somit einer Optimierung des Wachstumsverhaltens. Der Antibiotika- und Antimykotikazusatz hilft bei der Erhaltung eines aseptischen Milieus.

RPMI

Mit dem Roswell Park Memorial Institute-Medium (RPMI) wurde die Zellreihe BT-20 kultiviert. Die Zugabe von FKS und Antibiotika sowie Amphotericin B ist identisch der Zugabe zum DMEM.

MECGM

Die Zelllinien MCF-10A und MCF-12A wurden in Mammary Epithelial Cell Growth Medium (MECGM) kultiviert. Dieses wird zusammen mit einem Supplement, speziell für Mammaepithelien geliefert, welches vor Verwendung dem Medium zugegen werden muss. Die Inhaltsstoffe des Supplements sowie die Endkonzentrationen der Inhaltsstoffe nach Zugabe zum Medium sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Tab. 7 Endkonzentrationen der Supplement- Inhaltsstoffe nach Zugabe zum Medium

<i>Inhaltsstoffe</i>	<i>Endkonzentration im Medium</i>
Rinderhypophysenextrakt	0,004 ml/ml
Epidermal Growth factor	10 ng/ml
Insulin	5 µg/ml
Hydrokortison	0,5 µg/ml

Außerdem erfolgte der Zusatz von 10% Horseserum, um die Zellen mit ausreichend Nährstoffen und Wachstumsfaktoren zu versorgen. Um das Wachstum von Bakterien und

Pilzen zu hemmen, ist die Zugabe von 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung sowie Amphotericin B erforderlich.

MEBM[®]

Das Mammary Epithelium Basal Medium (MEBM[®]) beinhaltet keine Wachstumsfaktoren und wurde vor Gebrauch mit einem speziell zusammengesetzten Supplement (MEGM[®] SingleQuots[®]) versetzt, um eine optimale Versorgung mit Nährstoffen zu ermöglichen. Die einzelnen Inhaltsstoffe sowie Mengenangaben sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Tab. 8 Inhaltsstoffe und dem Medium zugeführte Menge in ml MEGM[®] SingleQuots[®]

<i>Inhaltsstoffe</i>	<i>Zugesetzte Menge</i>
Rinderhypophysenextrakt	2 ml/500 ml
Epidermal Growth factor	0,5 ml/500ml
Insulin	0,5 ml/500ml
Hydrokortison	0,5 ml/500ml
Gentamycin- Sulfat/ Amphotericin B	0,5 ml/500ml

3.2.3 Zellkultivierung

Die Kryokonservierung der Zellen in flüssigem Stickstoff bei -180°C erfolgte im jeweiligen Nährmedium unter Zugabe von 5-10% Dimethylsulfoxid (DMSO) als Gefrierschutzmittel sowie 20% FKS (RPMI, MCF- 7) bzw. Horseserum (MCF-10A, MCF-12A).

Nach dem vorsichtigen Auftauen erfolgte die sofortige Weiterverarbeitung des Materials.

Zunächst mussten die Zellen vom DMSO befreit werden, um eine zytotoxische Wirkung des Gefriermediums zu vermeiden. Hierfür wurden sie in ein Zentrifugenröhrchen mit 50 ml Fassungsvermögen überführt und mit 15 ml des jeweiligen Kulturmediums versetzt.

Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 1000 Umdrehungen pro Minute ohne Bremse, über einen Zeitraum von 5 Minuten. Der Überstand wurde abgegossen und das entstandene Zellpellet wurde in 5ml des jeweiligen Nährmediums resuspendiert.

Danach wurde das Gemisch aus Medium und Zellen in eine kleine Zellkulturflasche überführt und im Inkubationsschrank bei 37°C und 5% CO₂ gelagert. Bei allen verwendeten Zelllinien handelt es sich um adhärente Zellen, deren Proliferation am Flaschenboden stattfindet. Die Kulturflaschen verfügen über einen Bakterienfilter im Flaschendeckel, der den Gasaustausch gewährleistet und vor eindringenden Mikroorganismen schützt.

Ein Mediumwechsel erfolgte je nach Wachstumsverhalten etwa drei- bis viermal pro Woche.

Bei Besiedlung von ca. 80% des Flaschenbodens erfolgte die Passage der Zelllinie in die nächstgrößere Kulturflasche.

Hierzu wurde das Nährmedium komplett abpipettiert, es schloss sich ein Waschvorgang mit 5-7 ml PBS an. Dieser diente dem Auswaschen des FKS aus den Zellen, um eine Anlagerung des Trypsin-EDTAs zu verhindern. Durch Zugabe von 5 ml Trypsin- EDTA und 5 Minuten Inkubation bei 37°C lösten sich die Peptidbindungen der adhären Zellen zum Flaschenboden enzymatisch. Um die enzymatische Reaktion zu stoppen und so Zellschäden zu verhindern, erfolgte die Zugabe von 8-15 ml Nährmedium. Die Zellsuspension wurde im Anschluss in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1000 Umdrehungen pro Minute über einen Zeitraum von 5 Minuten zentrifugiert. Nun erfolgte die erneute Resuspension in das entsprechende Nährmedium. Nach Bedarf konnte anschließend die gewünschte Zellmenge in die neue Zellkulturflasche überführt und/oder ein Teil der Suspension für die verschiedenen Testverfahren verwendet werden.

3.2.4 Ermittlung der Lebendzellzahl

Um auch bei der Durchführung vieler Einzeltests möglichst standardisierte Bedingungen zu erhalten, ist eine Bestimmung der Lebendzellzahl in der Suspension unerlässlich.

Hierfür wurden 20 µl der hergestellten Zellsuspension mit 360 µl des entsprechenden Nährmediums und 20 µl Trypanblau vermengt. Es ergab sich dadurch eine Verdünnung von 1:20. Trypanblau ist ein anionischer Diazofarbstoff, der in abgestorbene Zellen mit perforierter Zellmembran diffundiert und diese dunkelblau anfärbt. Lebende Zellen, mit intakter Zellmembran, nehmen den Farbstoff nicht auf und erscheinen lichtmikroskopisch farblos und leuchtend hell, sodass sie ausgezählt werden können.

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl bietet sich die Verwendung einer Bürker-Zählkammer an. Jeweils 10 µl der Zelllösung wurden beidseits auf die Kammer aufgetragen und anschließend erfolgte die lichtmikroskopische Auszählung von jeweils 25 kleinen Quadraten, beider Seiten der Zählkammer.

Zur Berechnung der Lebendzellzahl auf einen Milliliter wurde die folgende Formel verwendet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Zellzahl gezählt aus } 2 \times 25 \text{ Quadraten} \times 10 \times 10^4$$

Auf dieser Grundlage erfolgte die Verdünnung der Suspension auf die gewünschte Zellzahl von 500 000 Zellen/ ml.

3.3 Testverfahren

3.3.1 Testvorbereitungen

Um die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der einzelnen Testreihen untereinander zu gewährleisten, ist eine möglichst standardisierte Durchführung erforderlich. Hierzu gehört auch die Einhaltung einer möglichst gleichbleibenden Zellzahl in den Testplatten.

Die optimale Zellzahl von 500 000 Zellen/ml wurde in vorangegangenen Untersuchungen des Forschungslabors eruiert. Dabei war das Ziel, nach 24 Stunden Inkubation eine Konfluenz von etwa 80% zu erreichen. Dies ermöglicht Zell-Zellinteraktionen und eine weitere proliferative Aktivität, ohne bereits kontakthemmende Vorgänge zu verzeichnen.

Die Verdünnungsreihen und Kontrollsubstanzen wurden in einem Verhältnis von 1:100 auf die Wells gegeben, sodass die in den folgenden Tabellen angegebenen Endkonzentration entstanden.

Tab. 9 Endkonzentrationen der Extrakte im Test in µg/ml

Endkonzentrationen der Extrakte in den Testreihen (Luyengi et al., Mikrowelle)
1000 µg/ml
500 µg/ml
100 µg/ml
50 µg/ml
10 µg/ml
1 µg/ml
0,1 µg/ml
0,01 µg/ml

Tab. 10 Endkonzentration der Kontrollsubstanzen im Test in mol/l

Endkonzentration Tamoxifen	Endkonzentration 17β- Estradiol
10 ⁻⁴ mol/l	10 ⁻⁹ mol/l

Um eine Grundlage für die späteren Berechnungen zu erhalten und die Gültigkeit des Tests zu erfassen, wurden auf jeder Testplatte Kontrollreihen angelegt. Der Blindwert enthält ausschließlich das jeweilige Nährmedium ohne Zellmaterial. Die Negativkontrolle 1 besteht aus den Zellen und dem entsprechenden Medium. In der Negativkontrolle 2 ist der Suspension aus Zellen und Medium das Lösungsmittel Ethanol zugesetzt. Damit sollten Einflüsse des in Extrakten enthaltenen Ethanols auf die Zellen ausgeschlossen werden.

Die LDH-Zytotoxizitätstests setzen zusätzlich eine Triton X-Kontrolle voraus, sodass das Zellgift Triton X in einer Konzentration von 1% zugegeben wurde.

3.3.2 BrdU- Zellproliferationstest

Dieser Test dient der kolorimetrischen Bestimmung der Proliferationsaktivität von Zellen.

Testprinzip

Das Testprinzip basiert auf dem Einbau des Thymidinanalogons Bromodesoxyuridin (BrdU) in die DNA, anstelle des regulären Nukleosids Thymidin.

Nach Zugabe und Einbau von BrdU werden die Zellen fixiert und es erfolgt die Denaturierung der DNA. Anschließend kann durch Zugabe von Antikörpern, die spezifisch an das eingebaute BrdU binden, die Menge der neu synthetisierten DNA erfasst werden. Dies geschieht, indem am Immunkomplex mit einer Substratreaktion (verwendetes Substrat: Tetramethylbenzidin TMB) ein Farbumschlag erzeugt und gemessen wird.

Das Ausmessen des Farbumschlags erfolgt mit dem ELISA- Reader, wobei die Farbintensität mit der Menge der neu synthetisierten DNA und daher auch mit der Proliferationsaktivität korreliert.

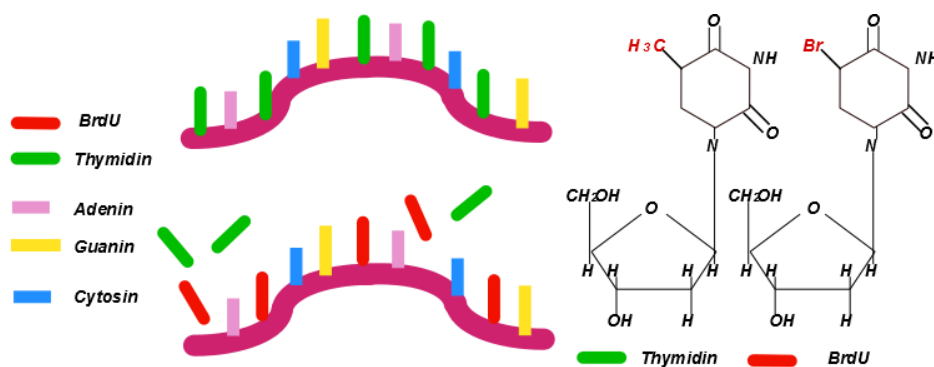


Abb. 12 (links) Einbau von BrdU statt Thymidin in die DNA; (rechts) Strukturelle Ähnlichkeit von Thymidin und BrdU

Durchführung (Arbeitsschritte zusammengefasst)

1. Kultivierung der Zellen: Gabe von 100µl/Well Zellsuspension (500 000 Zellen/ml) in eine 96er Wellplatte – anschließend 24 h Inkubationszeit im Brutschrank (37°C, 5% CO₂)
2. Zugabe von jeweils 1µl/Well Kontrollsubstanzen und Extrakte (Ethanol, Estradiol, Tamoxifen, Verdünnungsreihen des Mikrowellenextraktes sowie des Extraktes nach Luyengi) – anschließend 24 h Inkubationszeit im Brutschrank (37°C, 5% CO₂)

3. Zugabe von 10 µl/Well der BrdU-Lösung unter Auslassen einer Kontrollreihe – anschließend 3 h Inkubationszeit im Brutschrank (37°C, 5% CO₂)
4. Abklopfen der BrdU-Lösung und 200 µl/Well Fix-Denat-Lösung hinzugeben, anschließend 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur, Entfernung der Fix-Denat-Lösung
5. 100 µl/Well Anti-BrdU-POD (Arbeitslösung) hinzu pipettieren, nach 60 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur Entfernen der Arbeitslösung
6. Dreimaliger Waschvorgang mit Waschpuffer (1:10 verdünnt in Aqua Bidest.), anschließend Waschlösung entfernen
7. Zugabe von 100 µl/Well Substrate Solution, etwa 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur, Farbentwicklung wird sichtbar
8. Abstoppen der Farbreaktion mit 25 µl/Well 1M H₂SO₄, Vermengen durch leichtes Beklopfen
9. Auslesen der Farbreaktion am ELISA- Reader bei 450 nm, Referenz 620 nm

Auswertung

Zur Auswertung und Darstellung der ermittelten photometrischen Messwerte wurde die Negativkontrolle, bestehend aus der Zellsuspension (Medium und Zellen) und Ethanol, gleich 100% gesetzt. Zuvor erfolgte der Nachweis, dass das enthaltene Ethanol in der verwendeten Konzentration keine Effekte auf die Zellen hat. Außerdem wurde eine Backgroundkontrolle durchgeführt, um eine unspezifische Bindung des Anti-BrdU-POD an die Zellen in Abwesenheit von BrdU auszuschließen. In Voruntersuchungen wurde bereits eine unspezifische Bindung der BrdU- Lösung und des Anti-BrdU-POD an die Oberfläche der Wellplatte ausgeschlossen. Um Einflüsse des Nährmediums auf die Ergebnisse zu vermeiden, wurde von allen Absorptionswerten die Hintergrundkontrolle (Blindwert) abgezogen. Zur Bestimmung der prozentualen Zellvitalität der behandelten Zellen setzte der Autor die Messwerte der mit Extrakt- und Kontrollsubstanzen versetzten Zellen unter Verwendung der folgenden Formel in Bezug zur Negativkontrolle.

$$\textbf{Proliferation} (\%) = \frac{\text{Ext. der Probe} - \text{Ext. des Blindwertes}}{\text{Ext. der Negativkontrolle} - \text{Ext. des Blindwertes}} \times 100$$

3.3.3 MTT- Zellvitalitätstest

Mit diesem Test wird die Vitalität und Proliferation metabolisch aktiver Zellen kolorimetrisch quantifiziert.

Testprinzip

Das Prinzip beruht auf der Spaltung des gelben Tetrazoliumsalses MTT (3- (4,5- Dimethyl-2-thiazolyl) - 2,5- diphenyl- 2H- tetrazoliumbromid) in blau-violette Formazankristalle durch metabolisch aktive Zellen. Diese Reaktion wird durch mitochondriale Dehydrogenasen des Succinat-Tetrazolium-Reduktase-Systems katalysiert. Diese Enzyme sind ausschließlich in lebenden Zellen aktiv, sodass die Umwandlung von MTT zu Formazan als Maß für die Zellvitalität dient. Die Intensität der Färbänderung ist proportional zur Anzahl der stoffwechselaktiven Zellen (Roche Diagnostics, MTT-Instruction manual). Die Absorption des entstanden Formazansalzes kann photometrisch mit Hilfe eines ELISA-Readers bei einer Wellenlänge von 560- 600 nm bestimmt werden. Das Substrat MTT besitzt ein anderes Absorptionsspektrum und wird daher mit der Messung nicht erfasst. Vor der Messung erfolgt die Zugabe von Lösungsmitteln, damit sich das in wässriger Lösung kristallisierte Formazan vollständig löst.

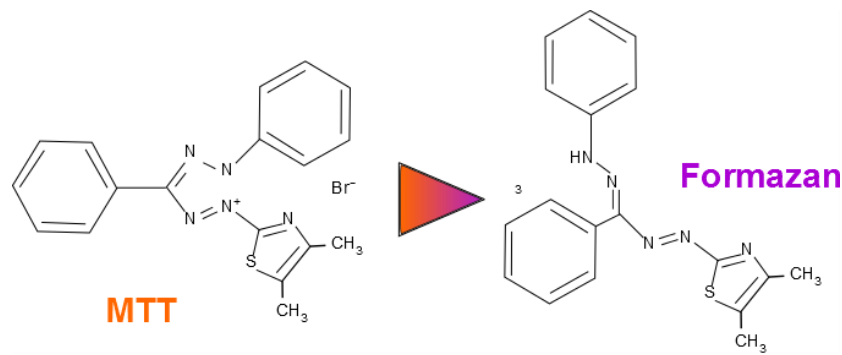


Abb. 13 Metabolisation von MTT zu Formazan, nach (Roche Diagnostics, MTT-Instruction manual)

Durchführung (Arbeitsschritte zusammengefasst)

1. Kultivierung der Zellen: Gabe von 100µl/Well Zellsuspension (500 000 Zellen/ml) in eine 96er Wellplatte – anschließend 24 h Inkubationszeit im Brutschrank (37°C, 5% CO₂)
2. Zugabe von jeweils 1µl/Well Kontrollsubstanzen und Extrakte (Ethanol, Estradiol, Tamoxifen, Verdünnungsreihen des Mikrowellenextraktes sowie des Extraktes nach Luyengi) – anschließend 24 h Inkubationszeit im Brutschrank (37°C, 5% CO₂)

3. Zugabe von 10 µl/Well MTT- Reagenz – 4 h Inkubationszeit im Brutschrank (37°C, 5% CO₂)
4. 100µl/Well Solubilisierungslösung (Lösen der Kristalle) hinzu pipettieren – Inkubation über Nacht im Brutschrank (37°C, 5% CO₂)
5. Photometrische Messung der Extinktion am ELISA- Reader

Auswertung

Die Auswertung und Darstellung der ermittelten photometrischen Messwerte erfolgte analog der Vorgehensweise beim BrdU-Test. Es wurde die Negativkontrolle, bestehend aus der Zellsuspension (Medium und Zellen) und Ethanol, gleich 100% gesetzt. Zuvor erfolgte auch hier der Nachweis, dass das beinhaltete Ethanol in der verwendeten Konzentration keine Effekte auf die Zellen hat. Um Einflüsse des Nährmediums auf die Ergebnisse zu vermeiden wurde von allen Absorptionswerten die Hintergrundkontrolle (Blindwert) abgezogen. Zur Bestimmung der prozentualen Zellvitalität der behandelten Zellen setzte der Autor die Messwerte der mit Extrakt- und Kontrollsubstanzen versetzten Zellen unter Verwendung der folgenden Formel, in Bezug zur Negativkontrolle.

$$\text{Vitalität (\%)} = \frac{\text{Ext. der Probe} - \text{Ext. des Blindwertes}}{\text{Ext. der Negativkontrolle} - \text{Ext. des Blindwertes}} \times 100$$

3.3.4 LDH- Zytotoxizitätstest

Mit Hilfe dieses Assays können die Zelllyse und damit der Zelltod kolorimetrisch quantitativ erfasst werden.

Testprinzip

Der Test basiert auf der Messung der Laktatdehydrogenase-Aktivität (LDH) im Überstand der Zellen. Die LDH ist ein in allen Zellen stabil vorkommendes zytoplasmatisches Enzym, welches bei Verletzungen der Zellmembran in den Überstand austritt. Im Kulturmedium liegt das Enzym stabil vor und ist gegen den Abbau durch Proteasen resistent.

Die LDH katalysiert den Abbau von Laktat zu Pyruvat, wobei NAD⁺ zu NADH/ H⁺ reduziert wird. Der Katalysator Diaphorase und das gelbe Tetrazoliumsalz INT (2- [4- iodophenyl] -3- [a-nitrophenyl] -5-phenyltetrazoliumchlorid) werden der Probe hinzugegeben. Die Diaphorase überträgt nun H/H⁺ vom NADH/H⁺ auf das INT, welches durch diesen Vorgang zum Formazan reduziert wird. Das entstandene Formazan ist proportional zur Anzahl der abgestorbenen Zellen und kann photometrisch vom ELISA- Reader quantifiziert werden. Verbliebenes INT besitzt ein anderes Absorptionsspektrum und beeinflusst die Messung nicht.

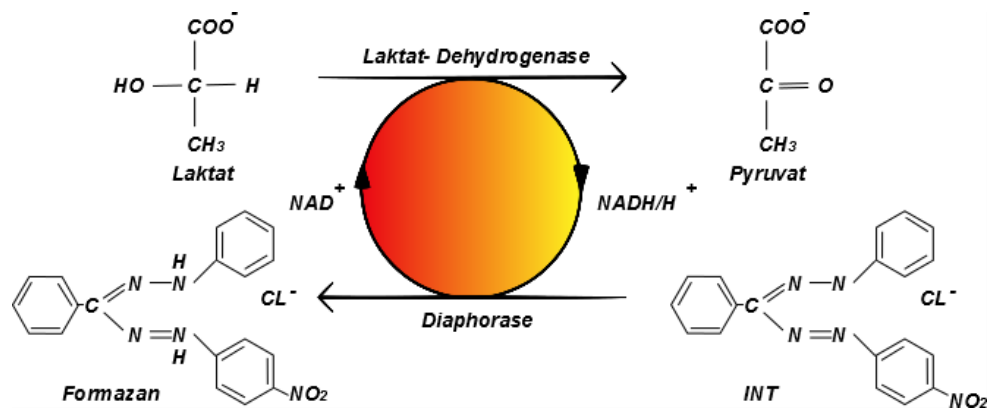


Abb. 14 Testprinzip des LDH- Test, nach (Roche Applied Science Cytotoxicity Detection Kit (LDH))

Durchführung (Arbeitsschritte zusammengefasst)

1. Kultivierung der Zellen: 100µl Zellsuspension pro Well (500 000 Zellen/ml) in eine 96 Well Zellkulturplatte - anschließend 24 h Inkubationszeit im Brutschrank (37°C, 5% CO₂)
2. Abpipettieren des Mediums aus den Wells und Zugabe von 198µl Medium mit 5 % FKS- hormonfrei
3. Zugabe von jeweils 2 µl/Well Kontrollsubstanzen und Extrakten (Ethanol, Triton X Estradiol, Tamoxifen, Verdünnungsreihen des Mikrowellenextraktes sowie des Extraktes nach Luyengi) – anschließend 24 h Inkubationszeit im Brutschrank (37°C, 5% CO₂)
4. Überführen von 100 µl Überstand in eine neue 96 Well Zellkulturplatte
5. 100 µl der Testlösung, bestehend aus Diaphorase und NAD⁺, auf jedes Well der neuen Testplatte geben
6. Dunkel stellen und bei Raumtemperatur etwa 10 Minuten inkubieren
7. Reaktion mit 50 µl 1 N HCL pro Well abstoppen
8. Photometrische Messung der Extinktion am ELISA- Reader bei 490 nm, Referenz: 620 nm

Auswertung

Als Referenzwert mit einer Zytotoxizität von 100% steht die Triton X- Kontrolle (High control). Triton X (Octoxinol 9) wirkt als potentes Zellgift, indem es Zellmembranen permeabilisiert. Auch in diesem Test wurde ein Einfluss von Ethanol vorher ausgeschlossen und der Blindwert von allen anderen Werten abgezogen. Mit folgender Formel konnte nun der prozentuale Anteil an abgestorbenen Zellen berechnet werden.

$$\text{Zytotoxizität (\%)} = \frac{\text{Ext. der Probe} - \text{Ext. der Negativkontrolle 2}}{\text{Ext. der High control} - \text{Ext. der Negativkontrolle 2}} \times 100$$

3.3.5 Statistik und Diagramme (BrdU-, MTT- und LDH- Test)

Die Testverfahren zur Bestimmung von Proliferation, Vitalität und Zytotoxizität wurden für jede Zelllinie mindestens dreimal wiederholt. Bei Bedarf wurden mehr Wiederholungen durchgeführt. Bei Darstellung von 4 Einzelwerten pro Testplatte ergab sich also eine Mindestanzahl von 12 Einzelwerten pro zu testender Substanz, Kontrollsubstanz und Zellreihe. Die Formeln zur prozentualen Berechnung der Proliferation, Vitalität und Toxizität wurden bereits im Rahmen der Einzelbeschreibungen (siehe oben) aufgeführt.

Diese Berechnungen wurden mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel für die jeweiligen Einzelwerte durchgeführt.

Die weitere statistische Aufarbeitung und grafische Darstellung der Daten erfolgte mit der Statistik- und Analysesoftware IBM SPSS Statistics 22.

Die Ergebnisse sind in Boxplot-Diagrammen grafisch dargestellt. Diese eignen sich insbesondere bei kleinen Einzelfallzahlen ($n < 30$) zur übersichtlichen Darstellung des Verteilungsbereiches.

Weiterhin zeigen zwar zahlreiche, jedoch nicht alle gewonnenen Werte eine Normalverteilung. Die diesbezüglichen Testungen erfolgten nach Kolmogorow-Smirnow bzw. Shapiro Wilk (Normalverteilung - $p > 0,05$). Die Ergebnisse finden sich in tabellarischer Form im Anhang.

Die Darstellung des Medians und der Spannweite bietet einen guten Überblick über die gewonnenen Ergebnisse.

Die Box des Boxplot-Diagramms entspricht dem Bereich, in dem die mittleren 50% der Daten liegen, sie wird durch das obere und untere Quartil begrenzt (Interquartile Range IQR; p25; p75). In der Box findet sich als horizontal verlaufender Strich der Median.

Die Whisker (Antennen) stellen die Werte außerhalb der Box in einem Bereich dar, der auf das 1,5- fache des IQR beschränkt ist. Weiterhin kommen außerhalb dieses Datenbereichs liegende Werte als Ausreißer zur Darstellung. Das Symbol ° bezeichnet die „milden“ Ausreißer (zwischen $1,5 \times \text{IQR}$ und $3 \times \text{IQR}$), während das Symbol * extremen Ausreißer ($> 3 \times \text{IQR}$) kennzeichnet.

Statistisch signifikante Ergebnisse werden mit dem * Symbol gekennzeichnet. Sie ergeben sich aus den Berechnungen des Einstichproben t- Tests, wobei das Signifikanzniveau bei $p < 0,05$ festgesetzt wurde. Als Bezugswert gilt in den BrdU- und MTT-Testserien 100% Proliferation bzw. Vitalität. Der LDH- Test bezieht sich hingegen auf eine nullprozentige Zytotoxizität. Zu beachten ist hierbei, dass sowohl in den positiven als auch in den negativen

Bereich abweichende Ergebnisse eine statistische Signifikanz aufweisen können, obwohl methodentechnisch zum Teil nur Abweichungen in eine Richtung relevant erscheinen.

In diesem Fall (LDH- Tests) wird die Signifikanz lediglich in den positiven Bereich grafisch aufgetragen.

Die in den Testreihen variierende Fallzahl (n) wird unter jeder Grafik angegeben. Jeder Test (mit Ausnahme der Testreihen an der Primärkultur HMEC) schließt eine Mindestanzahl von $n \geq 12$ Versuchen ein.

Aufgrund der großen Datenmenge finden sich die numerischen Angaben zu den gewonnenen Ergebnissen (Testanzahl [n], Median, Interquartile Range [p25; p75], Signifikanz [p] entsprechend des Einstichproben t- Test) tabellarisch zusammengefasst im Anhang.

Um einen vollständigen Überblick zu gewährleisten finden sich dort, gerade auch im Hinblick auf die zahlreichen normalverteilten Ergebnisse, Angaben zu Mittelwerten, Standardabweichungen und zum Standardfehler.

Zum Erhalt der Übersichtlichkeit werden die prozentualen Angaben in den Erläuterungen auf ganze Zahlen gerundet. Die genauen numerischen Werte lassen sich jedoch im Anhang einsehen. Zur besseren grafischen Darstellung der Ergebnisse erfolgte eine Anpassung des Layouts an die Zelllinien (Bildhintergrund) sowie die Testsubstanzen (farbliche Darstellung der Box).

3.4 Immunzytochemische Untersuchung

Testprinzip

Zur Bestimmung des Hormonrezeptorstatus (ER α , ER β , PR) der einzelnen Zelllinien wurde jeweils eine immunzytochemische Untersuchung durchgeführt. Das Prinzip beruht auf der indirekten Methode der Immunmarkierung. Hierbei bindet ein spezifischer Antikörper (AK) an ein Antigen (AG), in diesem Fall an den entsprechenden Hormonrezeptor. Ein zweiter, enzymgekoppelter AK (Sekundär-AK), der gegen den ersten AK gerichtet ist, wird der Probe zugegeben und bindet spezifisch. Das anschließend zugeführte Substrat reagiert mit dem gekoppelten Enzym des Sekundär-AKs und verursacht die Immunreaktion mit Farbumschlag. Dieser kann anschließend lichtmikroskopisch ausgewertet werden.

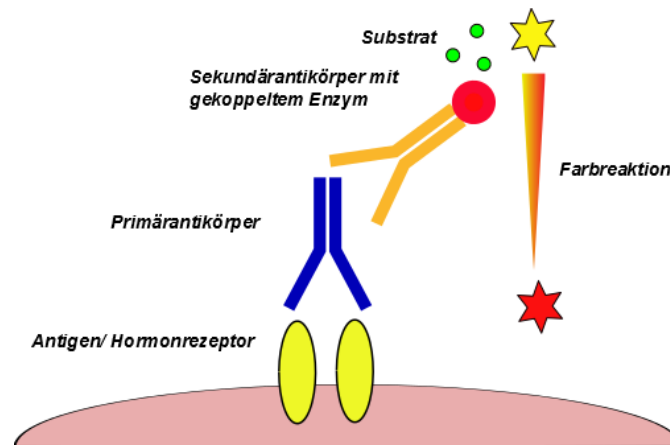


Abb. 15 Prinzip der indirekten Methode der Immunzytochemie, adaptiert nach (Löffler et al., 2007)

Durchführung

1. Bestimmung der Lebendzellzahl (siehe oben), anschließend Aussaat der Zellsuspension auf eine 24 Well Zellkulturplatte (Konzentration von 500 000 Zellen/ml), 300µl Suspension pro Well
2. 48- stündige Inkubation im Brutschrank (37° C und 5% CO₂) um ein vollständiges Anwachsen der adhärennten Zellen am Plattenboden zu gewährleisten
3. Abpipettieren des Mediums und ein dreimaliger Waschvorgang mit PBS
4. 20- minütige Fixierung mit Formafix 4 %, danach erneut dreimaliger Waschvorgang mit PBS um überschüssiges Formafix 4% auszuwaschen
5. Zugabe von 0,3% H₂O₂ zur Ausschaltung der endogenen Peroxidase-Aktivität der Zellen, anschließend zweimaliger Waschvorgang mit PBS bei fünfminütiger Einwirkzeit
6. 4 Tropfen Horse Serum zuführen um spätere unspezifische Hintergrundreaktionen zu vermeiden, 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur
7. Horse Serum aus allen Wells außer der Negativkontrolle entfernen
8. 200 µl (entspricht 4 Tropfen) der spezifischen AK-Lösungen hinzugeben (ERα, Erβ, PR), Inkubation über Nacht im Kühlschrank bei etwa 4°C
9. Entfernen der AK-Lösungen und dreimaliges Waschen mit PBS
10. Zugabe des sekundären AKs (4 Tropfen), Inkubation über einen Zeitraum von 30 Minuten bei Raumtemperatur, anschließend dreimaliger Waschvorgang mit PBS
11. Zugabe des Farbsubstrates LinRed, für 30 Minuten im Dunkeln inkubieren
12. LinRed abkippen und die Reaktion mit Leitungswasser abstoppen
13. Lagerung des Materials kann unter Zugabe von PBS im Kühlschrank erfolgen

Auswertung

Die Auswertung des Rezeptorstatus erfolgte lichtmikroskopisch. Eine rötliche Farbreaktion spricht für einen positiven Status im jeweiligen Testfeld. Im Bereich der Felder für die Negativkontrolle darf keine Farbgebung stattfinden.

3.5 Chromatographie und Massenspektrometrie (LC/MS)

Die LC/MS stellt ein gekoppeltes Verfahren, bestehend aus der analytischen HPLC (High Performance Liquid Chromatographie) und der Massenspektrometrie (MS) dar. Ganz allgemein dient sie der Trennung und Bestimmung von Molekülen. Die Chromatographie stellt einen Trennprozess dar, bei dem das Probengemisch zwischen zwei Phasen im chromatographischen Bett (Trennsäule oder Ebene) verteilt wird. Die stationäre Phase ruht, während die mobile Phase an dieser im chromatographischen Bett vorbeiströmt. Die stationäre Phase setzt sich aus kleinen Teilchen poröser und oberflächenaktiver Materialien, welche z. T. mit einem chemisch bzw. physikalisch gebundenen Flüssigkeitsfilm bedeckt sind, zusammen. In der Flüssigkeitschromatographie werden Flüssigkeiten als mobile Phasen eingesetzt (Gey, 2008). Die Wechselwirkungen zwischen der Probe, der stationären- und der mobilen Phase führen zu Unterschieden in der Transportgeschwindigkeit und folglich zu einer Auftrennung der Einzelsubstanzen. Die Einzelsubstanzen werden anschließend massenspektrometrisch analysiert. Dazu trennt das Massenspektrometer die Teilchen nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis auf. Der entstehende Total-Ionenstrom wird elektrisch detektiert (Ionenfalle), sodass im Ergebnis für jeden Punkt im Chromatogramm ein Massenspektrum vorhanden ist. Für die Kopplung beider Vorgänge (Interface) müssen überschüssige Analyten und das Lösungsmittel entfernt werden. Hierzu stehen verschiedene Interfacetechniken zur Verfügung, z. B. das Thermospray-Verfahren, die Nanospray- Ionisation (NSI) oder die Electrospray Ionisation (ESI) (Bathke, 2008). Die chromatographische und massenspektrometrische Analytik (LC/MS) der Leinwurzelextrakte für diese Arbeit erfolgte durch die Abteilung für analytische und technische Chemie am Institut für Chemie der Universität Rostock. Die Messungen wurden mit jeweils 3 µl des Extraktes an der LTQ (Linear Trap Quadrupole) des Herstellers Thermo Finnigan durchgeführt. Als Ionenquelle wurde die Elektronenspray-Ionisierung (ESI) verwendet. Die anschließende Detektion erfolgt in einer Ionenfalle. Die entstandenen Daten wurden mit der Software XCalibur ausgewertet und dargestellt. Die genauen technischen Daten und Parameter der Messung sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Tab. 11 technische Daten und Parameter zur Messung an der LTQ (Thermo Finnigan) (Oppermann C., 2012)

Säule	Kinetex 150x4,6mm; 2,6 μ ; C18; 100 Å von Phenomenex
Säulentemperatur	35°C
Autosamplertemperatur	15°C
Waschvolumen vor und nach der Injektion	Jeweils 5000 μ l Methanol
Messdauer	40 min
Fluss	200 μ l/min
Laufmittel	Methanol mit 0,1% Ameisensäure (A) und Wasser mit 0,1% Ameisensäure (B)
Lösungsmittel	Von FLUKA mit Reinheitsgrad LC-MS Chromasolv
Massenbereich	90.00-2000.00 m/z
Ionenquelle	Elektronenspray- Ionisierung
Source Fragmentation	On
Modus	Full scan
Scan Event 1	Positive mode; Energie von 35
Scan event 2	Negative mode; Energie von 95

3.6 Materialien und Chemikalien (Auflistung)

Extraktionsverfahren nach Luyengi et al. (1996)

- Leinwurzel (Linum usitatissimum), Faserlein, Wachstum Juni-August 2010, Phytomedizin Rostock
- Faltentrichter, Durchmesser 185 mm Schleicher und Schuell GmbH, Dassel
- Vakuum Rotationsverdampfer VV2011, Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach
- Ultraschallbad Sonorex, SCHALLTEC GmbH, Mörfelden- Walldorf
- Methanol, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
- Ethylacetat, Merck KGaA, Darmstadt

Mikrowellenextraktionsverfahren

- Labormikrowelle, MarsExpress, CEM GmbH, Kamp-Lintfort
- Ethanol absolut, Merck Pro Analysis, Merck Chemicals GmbH, Schwalbach

Extraktaufarbeitung und Kontrollsubstanzen

Chemikalien

- 96 % Ethanol unvergällt, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
- Tamoxifen, Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
- 17 β - Estradiol, Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Materialien

- Präzisionswaage, Sartorius AG, Göttingen
- Pipetten, Eppendorf AG, Hamburg
- Eppendorf- Tubes, 1,5 ml, Eppendorf AG, Hamburg
- Kryoröhrchen, 1,5 ml, Eppendorf AG, Hamburg
- Gefrierschrank Liebherr GmbH, Ochsenhausen

Zelllinien

- MCF-7, DSMZ GmbH, Braunschweig,
- BT-20, DSMZ GmbH, Braunschweig,
- MCF-12A, ATCC-LCG Standards GmbH, Wesel
- MCF-10A, ATCC-LCG Standards GmbH, Wesel
- HMEC, LONZA, Walkersville, MD USA

Zellkultivierung

Chemikalien

- DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle Medium): Sigma- Aldrich- Chemie, Deisenhofen
- RPMI: Sigma- Aldrich- Chemie, Deisenhofen
- MECGM (Mammary Epithelial Cell Growth Medium), Promocell, Heidelberg
- MEBM (Mammary Epithelium Basal Medium), LONZA, Walkersville, MD USA
- DMSO, G. Vogler B.V., Rotterdam, Niederlande
- Supplement für MECGM, Promocell, Heidelberg
- Supplement für MEBM, LONZA, Walkersville, MD USA
- FKS (Fetales Kälberserum), Sigma- Aldrich- Chemie, Deisenhofen
- Horse Serum 10 %, Biochrom - part of Merck Chemicals GmbH, Schwalbach
- Amphotericin B, PAA Laboratories GmbH, Kölbe
- Penicillin/ Streptomycin, PAA Laboratories GmbH, Kölbe
- PBS (phosphatgepufferte NaCl- Lösung), pH 7,4; (8,0 g Natriumchlorid + 2,9 g Natriumhydrogenphosphat x 2 H₂O + 0,2 g Natriumhydrogenphosphat + 0,2 g Kaliumchlorid auf 1,0 Liter destilliertes Wasser), GIBCO - Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien
- Trypsin-EDTA, PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
- Trypanblau 0,4 %, Sigma-Aldrich-Chemie, Deisenhofen

Materialien

- Bacillol AF Oberflächendesinfektion, BODE Chemie GmbH und Co. KG, Hamburg
- Kulturflaschen, Biochrom - part of Merck Chemicals GmbH, Schwalbach

- Zentrifuge: Hettrich, Andreas Hettrich GmbH & Co.KG, Tuttlingen
- Sterilbox: Heraeus Instruments GmbH, Hanau
- Brutschrank (37°C, 5% CO₂), Heraeus Instruments GmbH, Hanau
- Zentrifugenröhrchen 50 ml, Biochrom - part of Merck Chemicals GmbH, Schwalbach
- automatische Pipette, Pipetus, Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
- Sterile Pipettenaufsätze 5, 10, 25ml, Biochrom - part of Merck Chemicals GmbH, Schwalbach

Immunzytochemie

Chemikalien

- Formafix 4%, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
- Horse Serum, Sigma- Aldrich- Chemie, Deisenhofen
- Lin Red, ICH Linaris GmbH, Dossenheim
- PBS (phosphatgepufferte NaCl-Lösung), pH 7,4; (8,0 g Natriumchlorid + 2,9 g Natriumhydrogenphosphat x 2 H₂O + 0,2 g Natriumhydrogenphosphat + 0,2 g Kaliumchlorid auf 1,0 Liter destilliertes Wasser), GIBCO - Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien

Antikörper

- Estrogenrezeptor α : Monoclonal Mouse Anti human, 1:10 verdünnt mit PBS, DAKO Diagnostika GmbH Hamburg
- Estrogenrezeptor β : Monoclonal Mouse Anti- Estrogen Receptor Beta1, 1:10 verdünnt mit PBS, AbD Serotec 82178 Puchheim, Germany
- Progesteronrezeptor: Monoclonal Mouse Anti human Serotec, ready to use, AbD Serotec 82178 Puchheim, Germany

Materialien

- 24 Well Zellkulturplatte, Biochrom - part of Merck Chemicals GmbH, Schwalbach
- Kamera: AxioCam MRc, Carl Zeiss AG, Oberkochen

Testverfahren

Detection- Kits:

- Cytotoxicity Detection Kit (LDH), Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- Cell proliferation ELISA, BrdU (colorimetric), Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- Cell Proliferation Kit I (MTT), Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Chemikalien

- Triton X- 100 (Octoxinol- 9), Ferak Berlin GmbH, Berlin

- 1 N HCL, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
- 1 M H₂SO₄, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Materialien

- Bürker- Kammer (Tiefe 0,1mm; 0,0025 m²), Poly- Optik GmbH, Bad Blankenburg
- Lichtmikroskop Olympus CK2, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
- 96 Well Zellkulturplatte, Biochrom - part of Merck Chemicals GmbH, Schwalbach
- ELISA- Reader, Bio- RAD Model 680 Microplate- Reader, Bio-Rad Laboratories GmbH, München
- Microplate Manager Software, Bio-Rad Laboratories GmbH, München
- Vortexer, Mano- Mixer, Sarstedt
- Pipetten, Eppendorf AG, Hamburg
- Pipettenspitzen, Eppendorf AG, Hamburg
- Händedesinfektion, Sterilium gebrauchsfertig, BODE Chemie GmbH und Co. KG, Hamburg

LC/MS

- LC-MS Baujahr 2005, LTQ, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
- Pumpen MS Pump Plus, Finnigan Surveyor, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
- Autosampler Plus, Finnigan Surveyor, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
- UV-Detektor PDA Plus – Finnigan Surveyor, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
- MS-Detektor Finnigan LTQ, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
- Säulen:
 - Discovery® HS-C18, 15 cm x 2.1 cm, 3µm, Supelco, Sigma-Aldrich Group, München
 - Kinetex 150 x 4.6 mm, 2,6 µm, C18, 100 Å, Phenomenex, Aschaffenburg
- Software Xcalibur (Version 2.0, SR2), Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
- Membranfiltrationsanlage Millipore Glass 47 mm, Filter Holder, Merck Chemicals GmbH, Schwalbach

Software

- IBM SPSS- Software Statistics 22, IBM Deutschland GmbH, Ehningen
- Microsoft Office Student 2016, Microsoft Corporation, Redmond, USA
- Citavi 5, Literaturverwaltung, © Swiss Academic Software, Wädenswil, Schweiz

4 Ergebnisse

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen dargestellt. Zunächst werden die Ergebnisse der immunzytochemischen Untersuchungen dokumentiert und die entsprechenden Bildnachweise angeführt.

Im Anschluss daran erfolgen die grafische Darstellung sowie die Erläuterung der Resultate der kolorimetrischen Testverfahren.

Den Abschluss bildet die Darstellung der Ergebnisse aus den Extraktanalysen mit massenspektrometrischen Methoden.

4.1 Immunzytochemische Bestimmung des Hormonrezeptorstatus

Der Estrogen- und Progesteronrezeptorstatus zählt mittlerweile nicht nur zu einem der wichtigsten prognostischen Parameter des Mammakarzinoms, sondern stellt auch einen entscheidenden prädiktiven Faktor für die Planung der endokrinen Therapie mit Tamoxifen und Aromatase-Inhibitoren dar. Eine Bestimmung des Expressionsmusters dieser Rezeptoren ist in der diagnostischen Routine daher mittlerweile unerlässlich (Honma et al., 2014).

Im Rahmen dieser Arbeit ist die Bestimmung des Rezeptorstatus der eingesetzten Zelllinien eine grundlegende Voraussetzung für die korrekte Interpretation der Ergebnisse der kolorimetrischen Tests und die anschließende Diskussion.

Alle verwendeten Zelllinien wurden auf das Vorhandensein der Estrogenrezeptoren α und β (ER α , ER β), sowie des Progesteronrezeptors (PR) getestet. Durch den lichtmikroskopisch sichtbaren roten Farbumschlag (Immunreaktion) wird der Nachweis der Rezeptoren erbracht. Die stets mitgeführte Negativkontrolle darf keine farbgebende Reaktion aufweisen.

Die Ergebnisse werden nachstehend für jede Zellkultur gesondert angegeben.

4.1.1 *BT-20*

Die Zelllinie BT-20 zeigt keine farbgebende Immunreaktion für die drei getesteten Rezeptoren. Somit handelt es sich um eine Rezeptor-triple-negative Zelllinie.

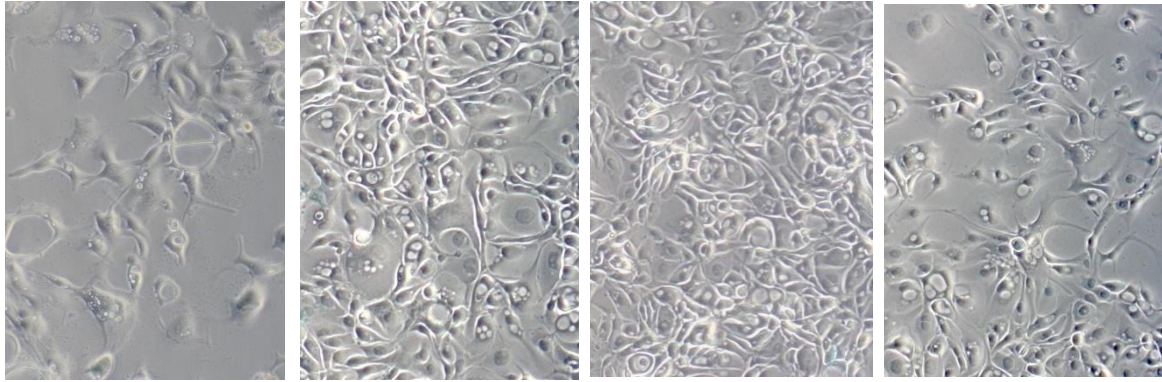


Abb. 16 Immunzytochemie der Zelllinie BT20; von links nach rechts: Negativkontrolle, PR, ER α , ER β (20x)

4.1.2 MCF- 7

Diese Zelllinie ist für beide Estrogenrezeptorsubtypen und den Progesteronrezeptor positiv. Es zeigt sich eine lichtmikroskopisch deutlich erkennbare rötliche zytoplasmatische und membranöse Immunreaktion in den Testfeldern für die getesteten Rezeptorsubtypen.

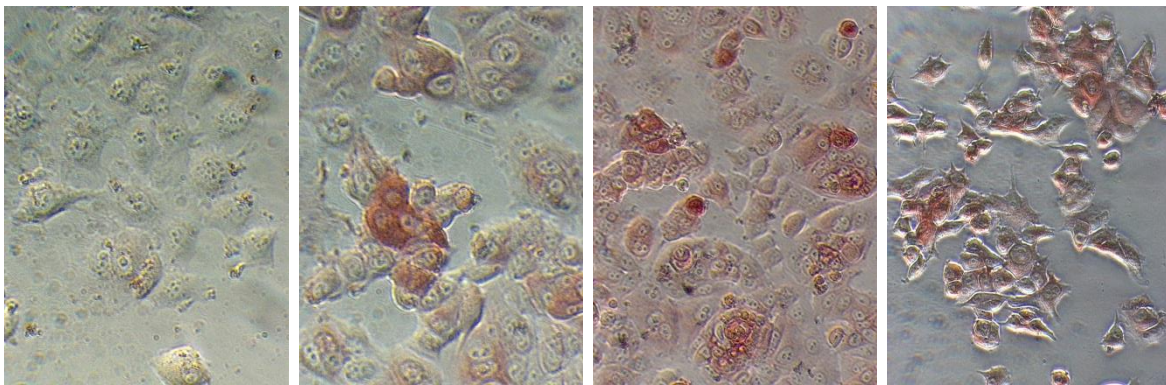


Abb. 17 Immunzytochemie der Zelllinie MCF- 7; von links nach rechts: Negativkontrolle, PR, ER α , ER β (20x)

4.1.3 MCF- 10A

Die Zellkulturlinie MCF- 10A ist für alle getesteten Rezeptoren negativ. Eine lichtoptisch als positiv zu wertende Immunreaktion findet nicht statt.

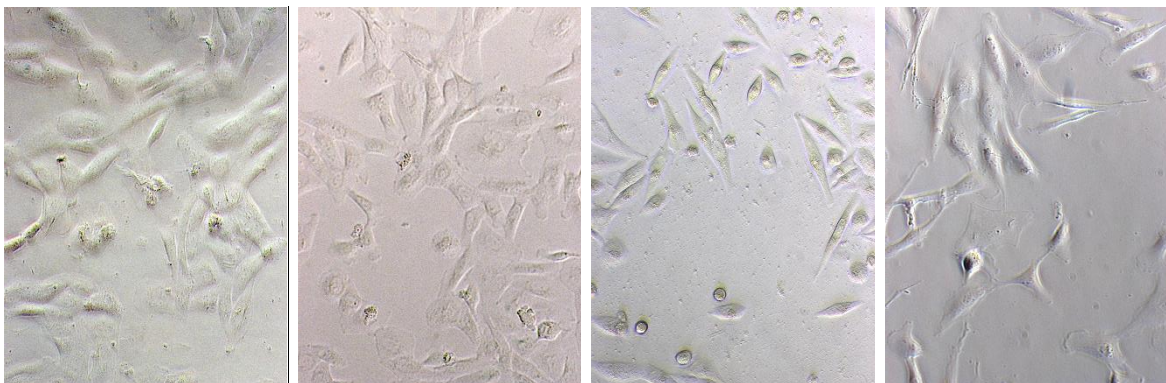


Abb. 18 Immunzytochemie der Zelllinie MCF- 10A; von links nach rechts: Negativkontrolle, PR, ER α , ER β (20x)

4.1.4 MCF-12A

In dieser Testserie besteht eine positive zytoplasmatische Immunreaktion für die beiden Estrogenrezeptorsubtypen und den Progesteronrezeptor. Lediglich im Testfeld der Negativkontrolle findet keine Immunreaktion statt.

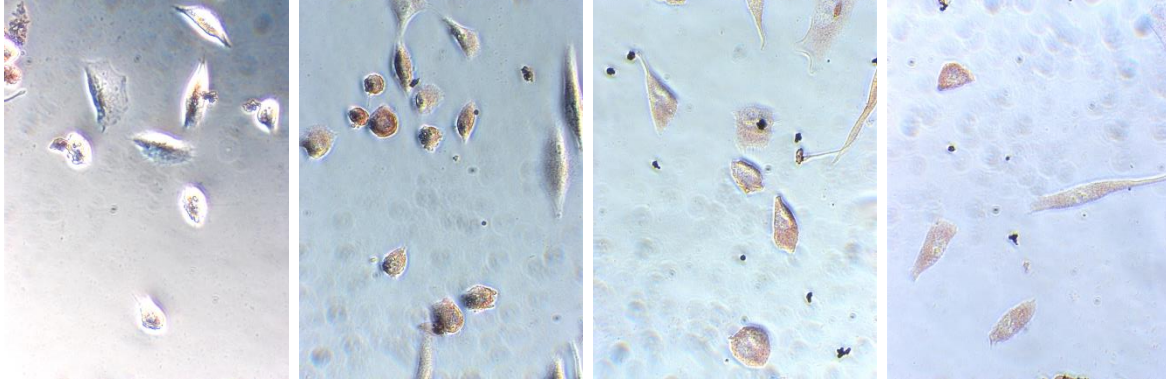


Abb. 19 Immunzytochemie der Zelllinie MCF-12A; von links nach rechts: Negativkontrolle, PR, ER α , ER β (20x)

4.1.5 HMEC

Die Mammaepithelien der Primärkulturlinie HMEC sind immunzytochemisch positiv für die drei getesteten Rezeptoren. Es zeigt sich eine deutliche farbgebende Reaktion des Zytoplasmas und der Zellmembranen in den drei Testfeldern.

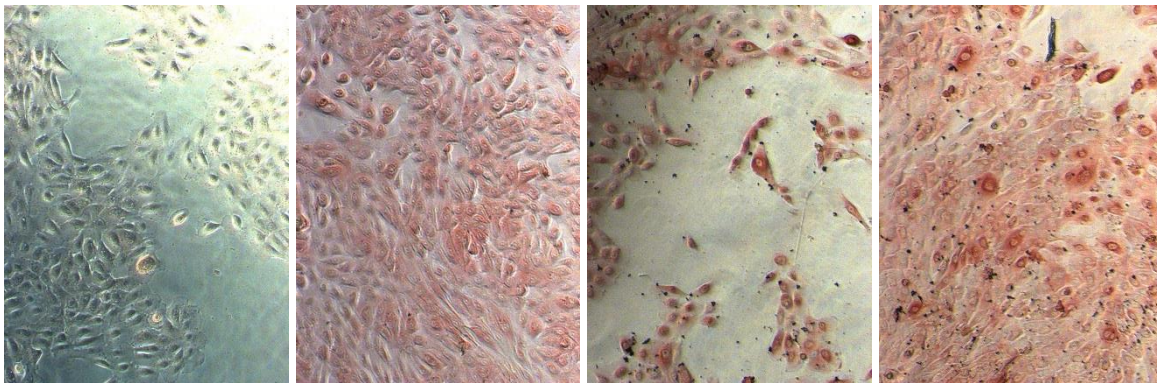


Abb. 20 Immunzytochemie der Zelllinie HMEC; von links nach rechts: Negativkontrolle, PR, ER α , ER β (10x)

4.2 Kolorimetrische Tests

Die Ergebnisse der kolorimetrischen Tests (BrdU-, MTT- und LDH-Test) werden im Folgenden aufgeführt. Den fünf Zelllinien (BT-20, MCF-7, MCF-10A, MCF-12A, HMEC) wurden jeweils die Kontrollsubstanzen 17 β -Estradiol (10^{-9} mol/l) und Tamoxifen (10^{-4} mol/l) sowie aufsteigende Konzentrationen der Leinwurzelextrakte (Extrakt nach Luyengi, Mikrowellenextrakt) zugegeben. Anschließend erfolgten BrdU-, MTT- und LDH-Testserien um die Proliferation, Zellvitalität und zytotoxische Effekte zu erfassen.

Die durchgeführten Untersuchungen zu den Negativkontrollen 1 (Zellen + Medium) und 2 (Zellen + Medium + Ethanol) zeigten keine signifikanten Unterschiede in ihren Absorptionsspektren, sodass sich aus der Zugabe von Ethanol kein Effekt auf das Proliferations- bzw. Vitalitätsverhalten der Zellen ableiten lässt.

Die Negativkontrolle (bzw. die Positivkontrolle im LDH- Test) gilt generell als Bezugswert für die unten aufgeführten Ergebnisse und wird nicht gesondert aufgeführt.

4.2.1 BT-20

BrdU- Zellproliferationstest mit Extrakt nach Luyengi

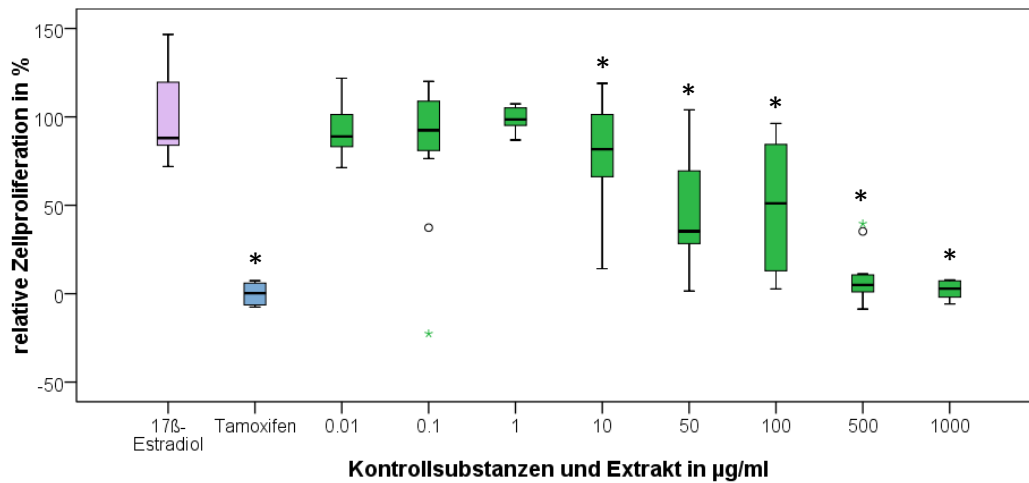


Abb. 21 BT-20-Zellen, BrdU-Test mit Extrakt nach Luyengi: Relative Zellproliferation nach Zugabe der Kontrollsubstanzen (17β-Estradiol 10^{-9} mol/l, Tamoxifen 10^{-4} mol/l) und Extraktkonzentrationen (Bezug zur Negativkontrolle); - Median; [] 25-75%; T 1,5x IQR; ° milde Ausreißer; * extreme Ausreißer; * Signifikanz (Einstichproben t- Test; $p < 0,05$); $n = 12-16$

Der Extrakt nach Luyengi induziert bei der Zelllinie BT-20 ab einer Konzentration von 10 µg/ml eine statistisch signifikante proliferationshemmende und konzentrationsabhängige Wirkung. Dabei reicht der Median von 82% (10 µg/ml) bis zu 3% (1000 µg/ml), bezogen auf die Negativkontrolle. Besonders antiproliferativ wirkt der Extrakt bei den Konzentrationen 500 und 1000 µg/ml (Median bei 5% und 3%).

Im Bereich mittlerer Extraktkonzentrationen (10-100 µg/ml) zeigen sich größere Spannweiten bzw. Interquartilsabstände (IQR- Interquartile Range).

Auch Tamoxifen bewirkt an der hormonrezeptornegativen Zelllinie eine signifikante Hemmung der proliferativen Aktivität auf 3%. (Abb. 21).

BrdU- Zellproliferationstest mit Mikrowellenextrakt

In hohen Konzentrationen (500 µg/ml und 1000 µg/ml) bewirkt auch der Mikrowellenextrakt eine signifikante Senkung der Proliferation der Zellen der Zelllinie BT-20 (Median 71% und 30%). Tamoxifen wirkt wiederum stark antiproliferativ (Median 2%).

17β- Estradiol induziert in dieser Testserie eine mäßige antiproliferative Wirkung in der malignen Zelllinie (Median 85,85%).

Die statistisch signifikanten Ergebnisse weisen relativ kleine Spannweiten bzw. Interquartilsabstände auf (Abb. 22).

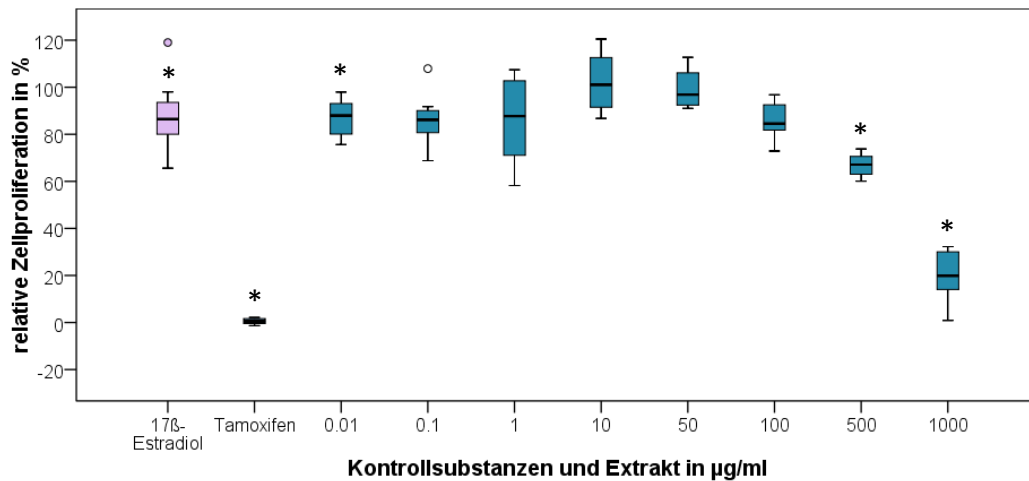


Abb. 22 BT-20-Zellen, BrdU-Test mit Mikrowellenextrakt: Relative Zellproliferation nach Zugabe der Kontrollsubstanzen (17β-Estradiol 10^{-9} mol/l, Tamoxifen 10^{-4} mol/l) und Extraktkonzentrationen (Bezug zur Negativkontrolle); - Median; [] 25-75%; T 1,5x IQR; ° milde Ausreißer; *extreme Ausreißer; * Signifikanz (Einstichproben t- Test; $p < 0,05$); $n=12-16$

MTT- Zellvitalitätstest mit Extrakt nach Luyengi

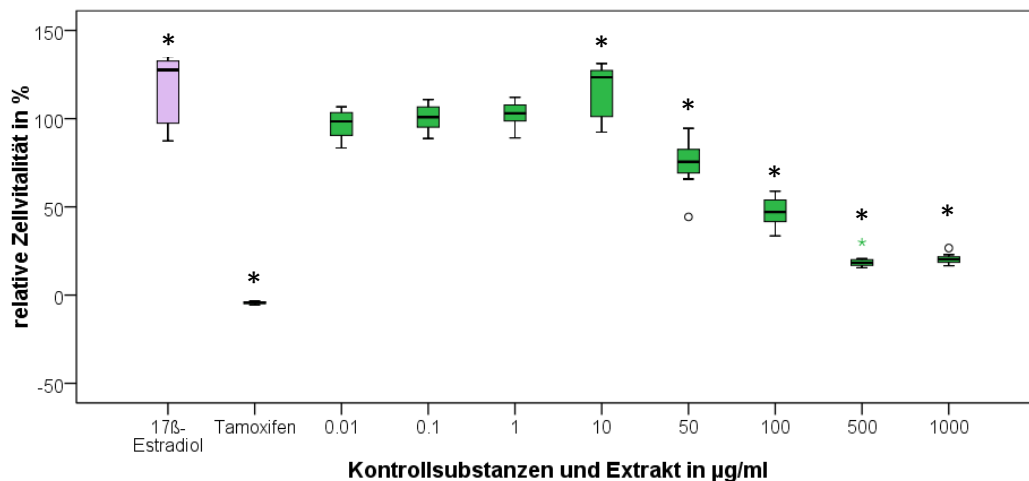


Abb. 23 BT-20-Zellen, MTT-Test mit Extrakt nach Luyengi: Relative Zellvitalität nach Zugabe der Kontrollsubstanzen (17β-Estradiol 10^{-9} mol/l, Tamoxifen 10^{-4} mol/l) und Extraktkonzentrationen (Bezug zur Negativkontrolle); - Median; [] 25-75%; T 1,5x IQR; ° milde Ausreißer; *extreme Ausreißer; * Signifikanz (Einstichproben t- Test; $p < 0,05$); $n=12$

Der Leinwurzelextrakt nach Luyengi induziert in Konzentrationen von 50- 1000 µg/ml eine signifikante, konzentrationsabhängige Reduktion stoffwechselaktiver Tumorzellen (Median 76- 20%), bezogen auf die Negativkontrolle. Besonders ausgeprägt sind die vitalitätshemmenden Effekte durch Extraktkonzentrationen von 500 und 1000 µg/ml (Median 18% und 20%).

In einer Konzentration von 10 µg/ml induziert der Leinwurzelextrakt dagegen eine Zunahme der Zellvitalität (Median 124%).

Auch Tamoxifen wirkt deutlich vitalitätssenkend auf den Zellverband.

17β- Estradiol induziert eine Zunahme der Zellvitalität auf über 128% (Abb. 23).

MTT- Zellvitalitätstest mit Mikrowellenextrakt

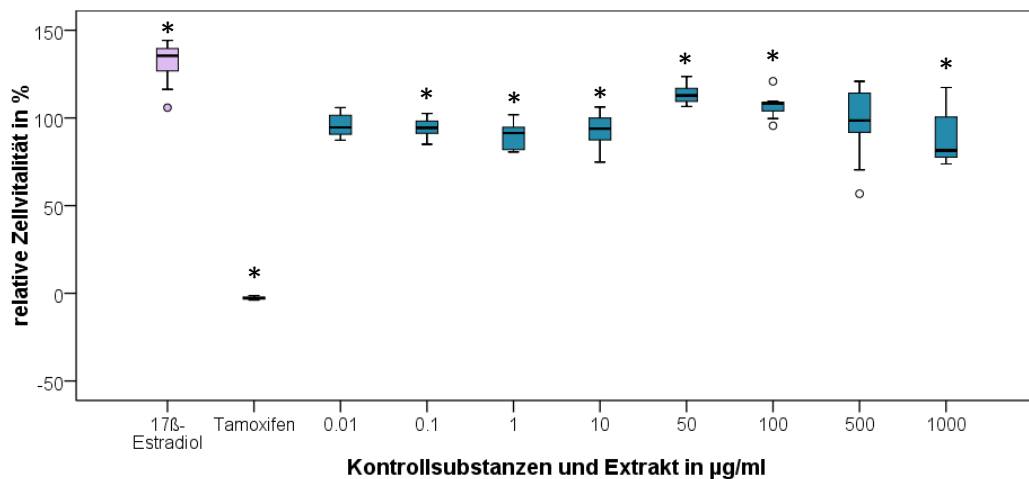


Abb. 24 BT-20-Zellen, MTT-Test mit Mikrowellenextrakt: Relative Zellvitalität nach Zugabe der Kontrollsubstanzen (17β-Estradiol 10^{-9} mol/l, Tamoxifen 10^{-4} mol/l) und Extraktkonzentrationen (Bezug zur Negativkontrolle); - Median; [] 25-75%; T 1,5x IQR; ° milde Ausreißer; * extreme Ausreißer; * Signifikanz (Einstichproben t- Test; $p < 0,05$); $n=12$

Der Mikrowellenextrakt induziert in Konzentrationen zwischen 0,1 und 100 µg/ml Vitalitätsspektren zwischen 91% und 113% im Bezug zur Negativkontrolle.

Statistisch stellen sich diese Daten, bei bestehenden kleinen Interquartilsabständen bzw. Spannweiten der Ergebnisse als signifikant dar. Abweichungen von 100% bestehen hier sowohl in den positiven als auch negativen Bereich. In einer Konzentration von 1000 µg/ml zeigt sich eine relative Reduktion der Vitalität auf 81%.

Tamoxifen wirkt korrelierend zu den vorherigen Ergebnissen stark vitalitätshemmend.

17β- Estradiol steigert die Zellvitalität der BT-20 Zelllinie auf 136%, bezogen auf die Negativkontrolle. (Abb. 24).

LDH- Zytotoxizitätstest mit Extrakt nach Luyengi

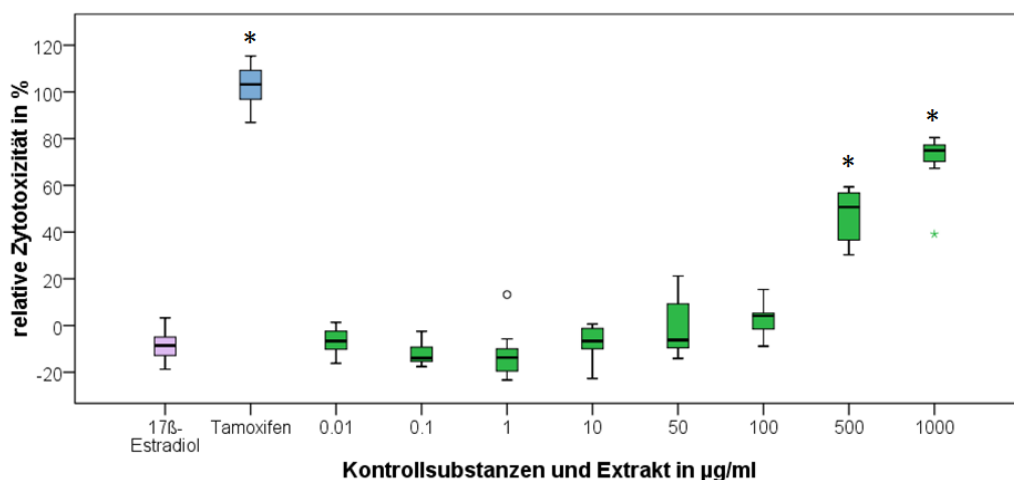


Abb. 25 BT-20-Zellen, LDH-Test mit Extrakt nach Luyengi: Relative Zytotoxizität nach Zugabe der Kontrollsubstanzen (17β-Estradiol 10^{-9} mol/l, Tamoxifen 10^{-4} mol/l) und Extraktkonzentrationen (Bezug zur Positivkontrolle); - Median; [] 25-75%; T 1,5x IQR; ° milde Ausreißer; * extreme Ausreißer; * Signifikanz (Einstichproben t- Test; $p < 0,05$); $n=12$

In hohen Konzentrationen (500 und 1000 $\mu\text{g/ml}$) wirkt der Leinwurzelextrakt nach Luyengi deutlich zytotoxisch auf die BT-20 Zellen mit einer 50- 74%igen Zytotoxizität, bezogen auf die Negativkontrolle.

Die Testergebnisse zeichnen sich durch kleine Streuweiten aus.

Tamoxifen induziert eine deutliche zytotoxische Reaktion in der Zellkultur, ähnlich der Positivkontrolle (Triton X) (Abb. 25).

LDH- Zytotoxizitätstest mit Mikrowellenextrakt

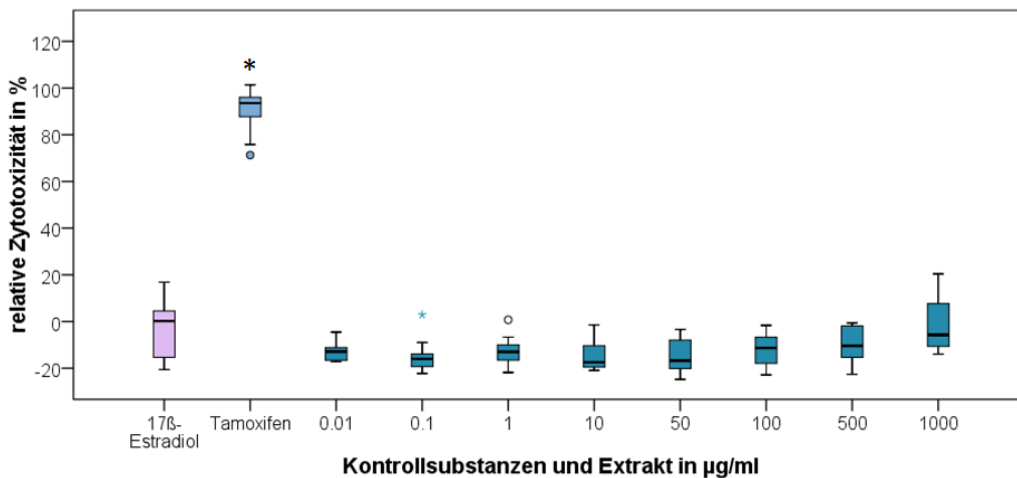


Abb. 26 BT-20-Zellen, LDH-Test mit Mikrowellenextrakt: Relative Zytotoxizität nach Zugabe der Kontrollsubstanzen (17 β -Estradiol 10^{-9}mol/l , Tamoxifen 10^{-4}mol/l) und Extraktkonzentrationen (Bezug zur Positivkontrolle); - Median; \square 25-75%; T 1,5x IQR; \circ milde Ausreißer; \ast extreme Ausreißer; \ast Signifikanz (Einstichproben t- Test; $p < 0,05$); $n=12$

Der Mikrowellenextrakt induziert in keiner der getesteten Konzentrationen eine deutliche zytotoxische Reaktion in BT-20-Tumorzellen.

Die Ergebnisse sind insgesamt durch eine geringe Spannweite bzw. Interquartilsabstände gekennzeichnet.

Ausreißer sind nur vereinzelt in den Konzentrationen von 0,01 $\mu\text{g/ml}$ und 0,1 $\mu\text{g/ml}$ zu verzeichnen.

Tamoxifen induziert eine Zytotoxizität von 93%, bezogen auf die Kontrolle (Abb. 26).

4.2.2 MCF-7

BrdU- Zellproliferationstest mit Extrakt nach Luyengi

In den gering konzentrierten Versuchsreihen (0,01 µg/ml - 10 µg/ml) bewirkt der Extrakt nach Luyengi lediglich schwach- antiproliferative Effekte auf die MCF-7-Tumorzellen (Median 94% - 84%).

Mit den hohen Extraktkonzentrationen (50 µg/ml – 1000 µg/ml) lässt sich jedoch eine ausgeprägte Hemmung der Zellproliferation (Median 30% - 8%) induzieren.

Auch Tamoxifen wirkt deutlich antiproliferativ auf die hormonrezeptorpositive MCF-7-Zelllinie (Abb. 27).

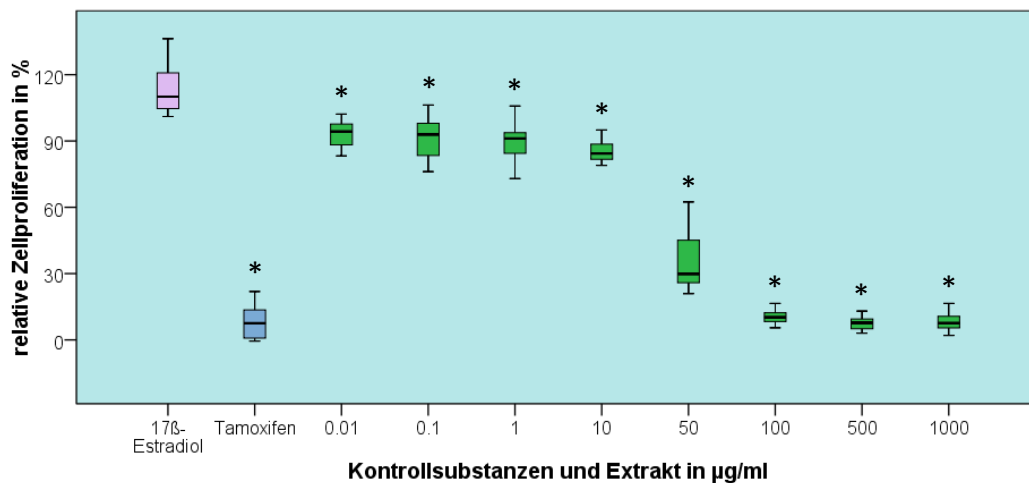


Abb. 27 MCF-7-Zellen, BrdU-Test mit Extrakt nach Luyengi: Relative Zellproliferation nach Zugabe der Kontrollsubstanzen (17β-Estradiol 10^{-9} mol/l, Tamoxifen 10^{-4} mol/l) und Extraktkonzentrationen (Bezug zur Negativkontrolle); - Median; [] 25-75%; T 1,5x IQR; ° milde Ausreißer; * extreme Ausreißer; * Signifikanz (Einstichproben t-Test; $p < 0,05$); $n=12$

BrdU- Zellproliferationstest mit Mikrowellenextrakt

Der Mikrowellenextrakt induziert im BrdU- Test an der Zelllinie MCF-7 keine deutliche antiproliferative Wirkung.

Hingegen lassen sich nach Zugabe von hohen Extraktkonzentrationen (500 µg/ml und 1000 µg/ml) Ergebnisse mit einem Median über 100%, bezogen auf die Negativkontrolle verzeichnen (Median 125% und 122%). Dies kann als signifikante proliferationssteigernde Wirkung auf die Tumorzellen gewertet werden. Jedoch zeichnet sich diese Testreihe insgesamt, auch bei größeren Einzelfallzahlen ($n=20$), durch eine große Spannweite der Ergebnisse aus.

Tamoxifen wirkt wiederum deutlich antiproliferativ.

17 β - Estradiol induziert eine schwach- antiproliferative Wirkung (Median 82%), bezogen auf die Negativkontrolle (Abb. 28).

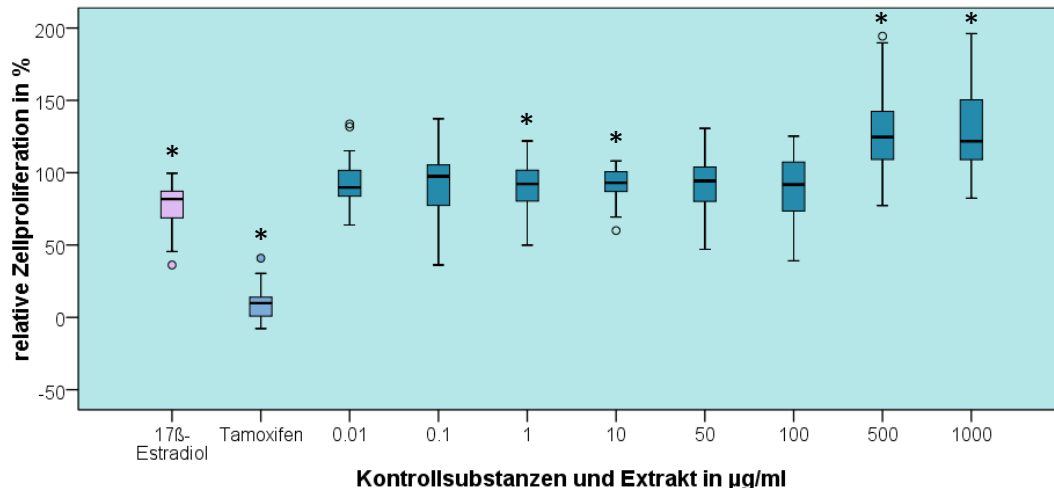


Abb. 28 MCF-7-Zellen, BrdU-Test mit Mikrowellenextrakt: Relative Zellproliferation nach Zugabe der Kontrollsubstanzen (17 β -Estradiol 10⁻⁹ mol/l, Tamoxifen 10⁻⁴mol/l) und Extraktkonzentrationen (Bezug zur Negativkontrolle); - Median; [] 25-75%; T 1,5x IQR; ° milde Ausreißer; * extreme Ausreißer; * Signifikanz (Einstichproben t- Test; p<0,05); n=20

MTT- Zellvitalitätstest mit Extrakt nach Luyengi

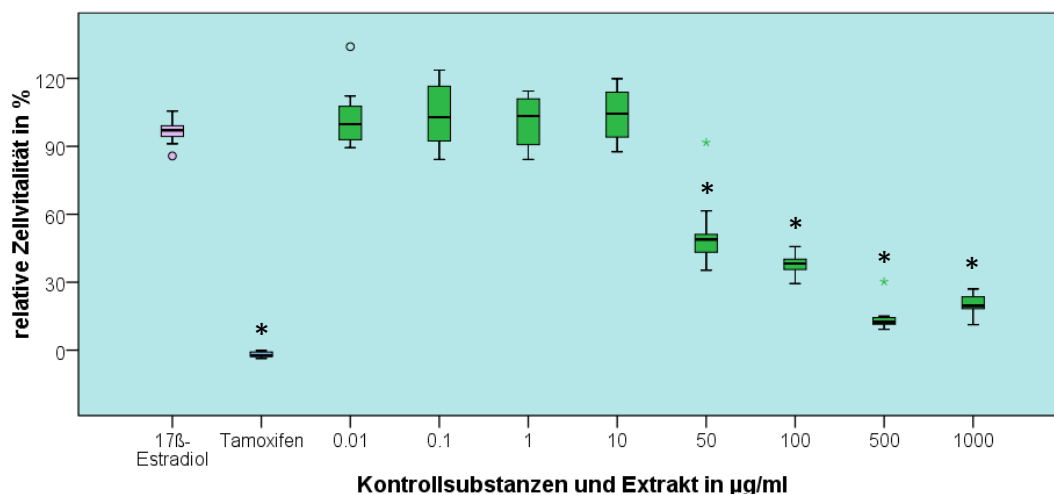


Abb. 29 MCF-7-Zellen, MTT-Test mit Extrakt nach Luyengi: Relative Zellvitalität nach Zugabe der Kontrollsubstanzen (17 β -Estradiol 10⁻⁹ mol/l, Tamoxifen 10⁻⁴mol/l) und Extraktkonzentrationen (Bezug zur Negativkontrolle); - Median; [] 25-75%; T 1,5x IQR; ° milde Ausreißer; * extreme Ausreißer; * Signifikanz (Einstichproben t- Test; p<0,05); n=16

Die Vitalität der Zelllinie MCF-7 wird vor allem durch höhere Konzentrationen (ab 50 μ g/ml) des Leinwurzelextrakts nach Luyengi statistisch signifikant reduziert (Median zwischen 49% und 12%).

Auch Tamoxifen induziert eine vollständige Reduktion stoffwechselaktiver MCF-7-Tumorzellen (Abb. 29).

MTT- Zellvitalitätstest mit Mikrowellenextrakt

Vergleichbar zum Ergebnis des Proliferationstests zeigt die Zelllinie MCF-7 nach Zugabe hoher Konzentrationen des Mikrowellenextraktes (500 µg/ml und 1000 µg/ml) eine gesteigerte Zellvitalität (Median 162% und 174%). Allerdings besteht auch hier trotz hoher Einzelfallzahlen (n=24) eine große Spannweite bzw. ausgedehnte Interquartilsabstände. Eine derart ausgedehnte Streuweite der Einzelwerte ist mit den niedrigen Extraktkonzentrationen nicht zu verzeichnen.

Tamoxifen bewirkt eine deutliche Senkung der Tumorzell-Vitalität (Abb. 30).

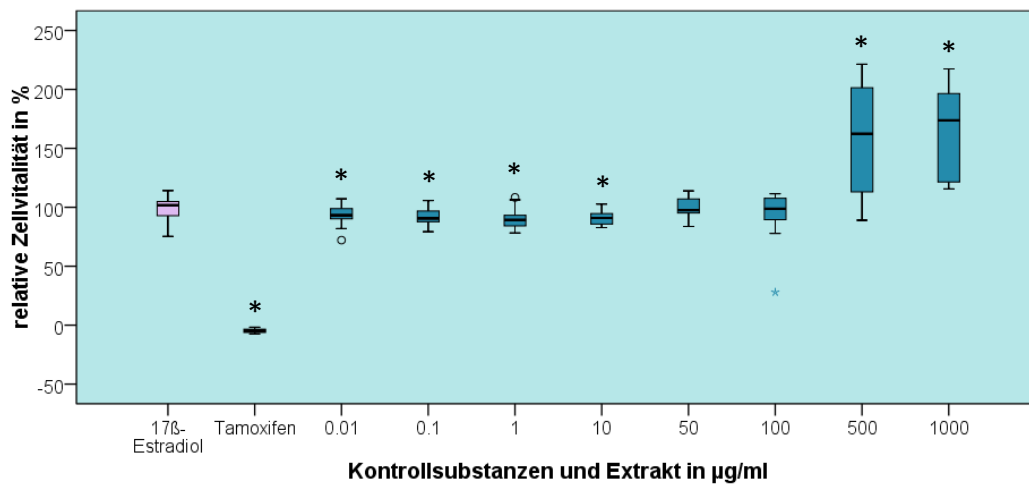


Abb. 30 MCF-7-Zellen, MTT-Test mit Mikrowellenextrakt: Relative Zellvitalität nach Zugabe der Kontrollsubstanzen (17β-Estradiol 10⁻⁹ mol/l, Tamoxifen 10⁻⁴ mol/l) und Extraktkonzentrationen (Bezug zur Negativkontrolle); - Median; [] 25-75%; T 1,5x IQR; ° milde Ausreißer; *extreme Ausreißer; * Signifikanz (Einstichproben t- Test; p<0,05); n=24

LDH- Zytotoxizitätstest mit Extrakt nach Luyengi

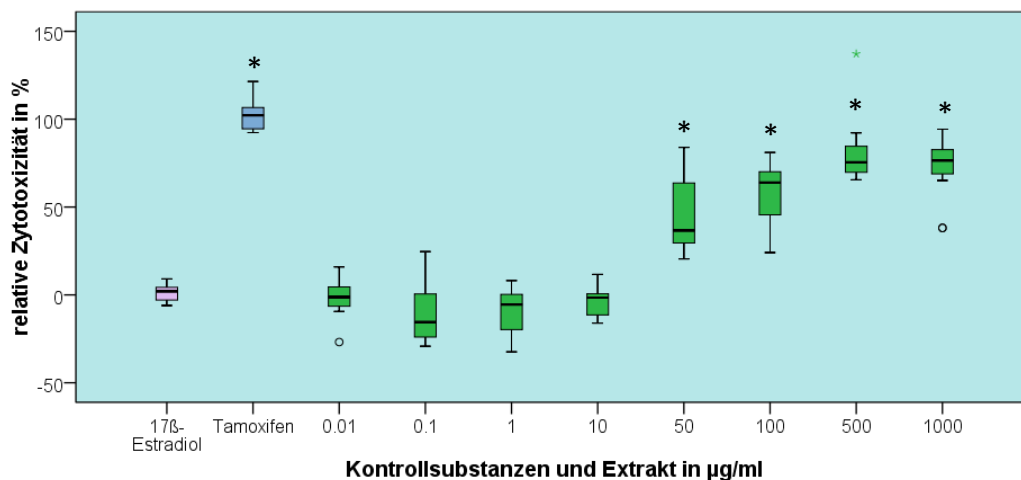


Abb. 31 MCF-7-Zellen, LDH-Test mit Extrakt nach Luyengi: Relative Zytotoxizität nach Zugabe der Kontrollsubstanzen (17β-Estradiol 10⁻⁹ mol/l, Tamoxifen 10⁻⁴ mol/l) und Extraktkonzentrationen (Bezug zur Positivkontrolle); - Median; [] 25-75%; T 1,5x IQR; ° milde Ausreißer; *extreme Ausreißer; * Signifikanz (Einstichproben t- Test; p<0,05); n=16-20

In einer Konzentration von 50 µg/ml bewirkt der Extrakt nach Luyengi in der Tumorzelllinie MCF-7 eine mediane zytotoxische Wirkung von 35%, bezogen auf die Negativkontrolle.

In den darauffolgenden Konzentrationsstufen (100 µg/ml - 1000 µg/ml) zeigen sich sogar relative Zytotoxizitätswerte im Bereich zwischen 64% und 77%.

Ausreißer zeigen sich in dieser Testserie nur vereinzelt in Konzentrationen von 0,01 µg/ml und 1000 µg/ml.

Tamoxifen induziert zytotoxische Wirkungen ähnlich der Positivkontrolle (Triton X) (Abb. 31).

LDH- Zytotoxizitätstest mit Mikrowellenextrakt

Im Rahmen der durchgeführten LDH-Zytotoxizitätstests an der Zelllinie MCF-7 ist unter Zugabe des Mikrowellenextraktes keine signifikante zytotoxische Wirkung auf die Tumorzellen nachweisbar.

Auch hier wurden, bei größerer Spannweite der Ergebnisse, einzelne Testreihen wiederholt. Es bestätigten sich jedoch die gemessenen Extinktionen.

Lediglich Tamoxifen induziert eine relative Zytotoxizität von 88%, bezogen auf die Kontrolle (Abb. 32).

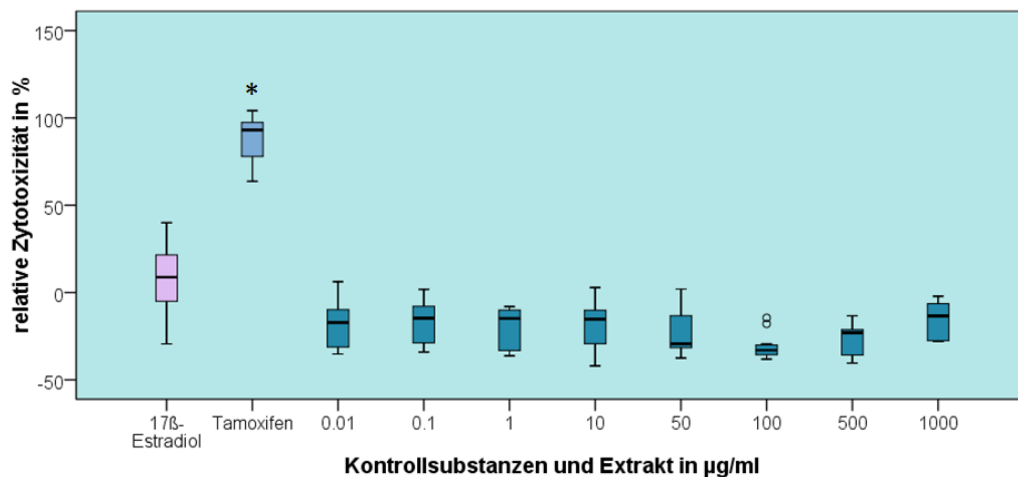


Abb. 32 MCF-7-Zellen, LDH-Test mit Mikrowellenextrakt: Relative Zytotoxizität nach Zugabe der Kontrollsubstanzen (17β-Estradiol 10⁻⁹ mol/l, Tamoxifen 10⁻⁴ mol/l) und Extraktkonzentrationen (Bezug zur Positivkontrolle); - Median; [] 25-75%; T 1,5x IQR; ° milde Ausreißer; *extreme Ausreißer; * Signifikanz (Einstichproben t- Test; p<0,05); n=12-16

4.2.3 MCF-10A

BrdU- Zellproliferationstest mit Extrakt nach Luyengi

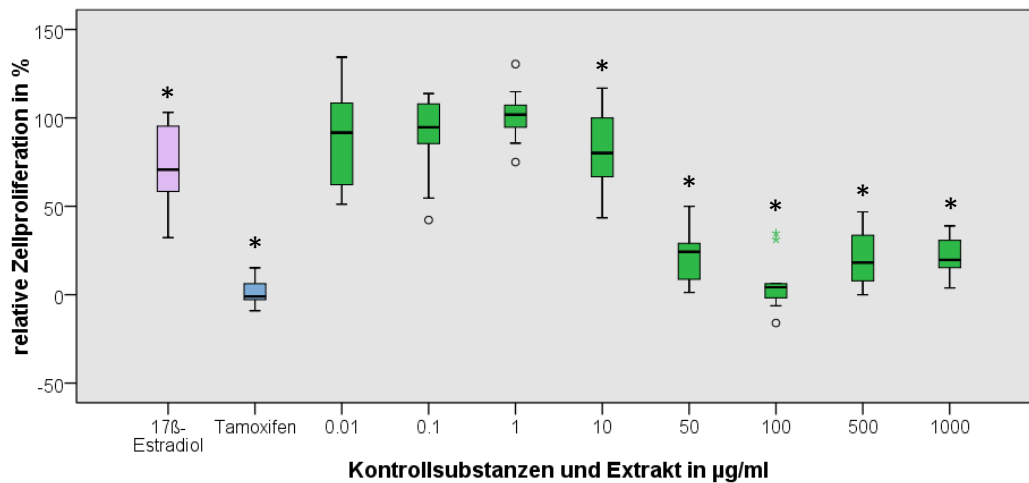


Abb. 33 MCF-10A-Zellen, BrdU-Test mit Extrakt nach Luyengi: Relative Zellproliferation nach Zugabe der Kontrollsubstanzen (17β-Estradiol 10^{-9} mol/l, Tamoxifen 10^{-4} mol/l) und Extraktkonzentrationen (Bezug zur Negativkontrolle); - Median; [] 25-75%; T 1,5x IQR; ° milde Ausreißer; * extreme Ausreißer; * Signifikanz (Einstichproben t-Test; $p < 0,05$); $n=12$

In der benignen Zelllinie MCF-10A hat der Extrakt nach Luyengi in Konzentrationen ab 10 µg/ml eine signifikante proliferationshemmende Wirkung. Der stärkste Effekt wird hier jedoch nicht durch die höchsten Extraktkonzentrationen, sondern durch eine Extraktkonzentration von 100 µg/ml erzielt (lediglich 4% relative Zellproliferation bezogen auf die Negativkontrolle).

Tamoxifen führt auch bei der hormonrezeptornegativen Zelllinie zu einem Stopp der proliferativen Aktivität.

Die Zugabe von 17β-Estradiol bewirkt eine Abnahme der Zellproliferation auf 71% (Abb. 33).

BrdU- Zellproliferationstest mit Mikrowellenextrakt

Im vorliegenden BrdU- Test zeigt sich ein undulierendes Wirkprofil des Mikrowellenextraktes auf die Zelllinie MCF-10A. Während in den niedrigen Konzentrationen von 0,01 µg/ml bis 10 µg/ml eine antiproliferative Wirkung (Median 40% - 63%) zu verzeichnen ist, zeigt sich im Konzentrationsbereich von 50 µg/ml und 100 µg/ml kein signifikanter Effekt auf die Zellproliferation.

Die hohen Extraktkonzentrationen (500 µg/ml und 1000 µg/ml) induzieren jedoch wieder eine statistisch signifikante antiproliferative Wirkung (bis 15% ige relative Proliferation).

Allerdings bestehen für diese Konzentrationen auch relativ große Streuweiten bzw. Interquartilsabstände.

Tamoxifen wirkt wiederum deutlich antiproliferativ. 17 β -Estradiol hat einen mäßigen antiproliferativen Effekt (Median 73%) (Abb. 34).

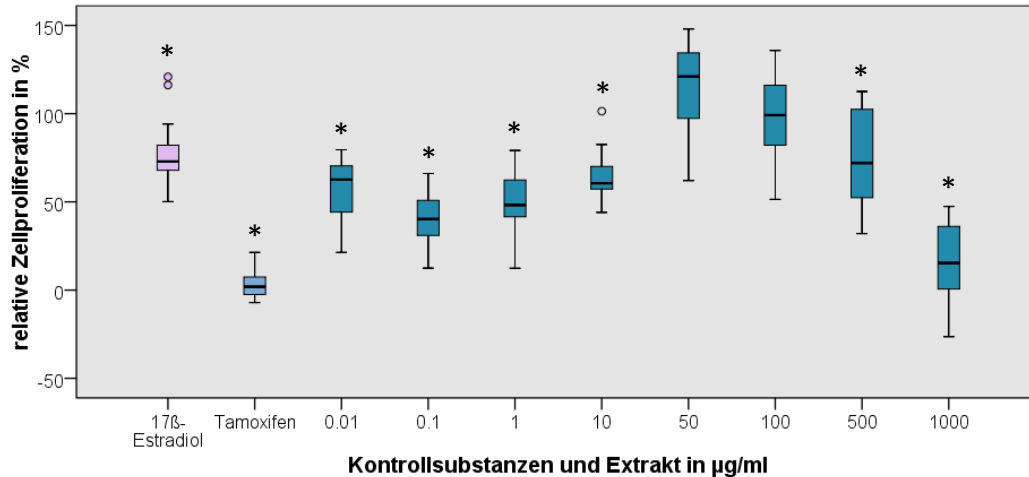


Abb. 34 MCF-10A-Zellen, BrdU-Test mit Mikrowellenextrakt: Relative Zellproliferation nach Zugabe der Kontrollsubstanzen (17 β -Estradiol 10⁻⁹ mol/l, Tamoxifen 10⁻⁴ mol/l) und Extraktkonzentrationen (Bezug zur Negativkontrolle); - Median; [] 25-75%; T 1,5x IQR; ° milde Ausreißer; * extreme Ausreißer; * Signifikanz (Einstichproben t- Test; p<0,05); n=16

MTT- Zellvitalitätstest mit Extrakt nach Luyengi

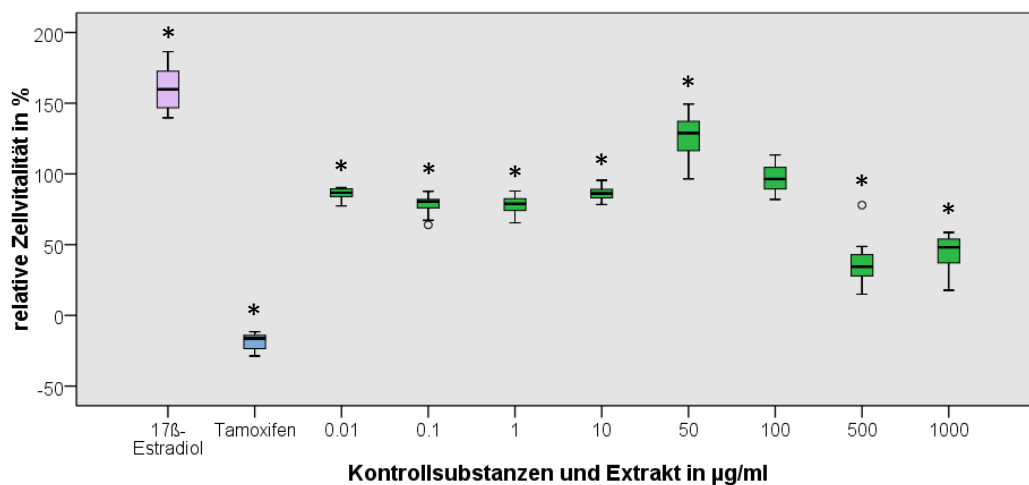


Abb. 35 MCF-10A-Zellen, MTT-Test mit Extrakt nach Luyengi: Relative Zellvitalität nach Zugabe der Kontrollsubstanzen (17 β -Estradiol 10⁻⁹ mol/l, Tamoxifen 10⁻⁴ mol/l) und Extraktkonzentrationen (Bezug zur Negativkontrolle); - Median; [] 25-75%; T 1,5x IQR; ° milde Ausreißer; * extreme Ausreißer; * Signifikanz (Einstichproben t- Test; p<0,05); n=16

Auch in dieser Testserie zeigt sich eine undulierende Wirkung des Extraktes nach Luyengi auf die Stoffwechselaktivität der benignen MCF-10A- Zellen.

Erst in hohen Konzentrationen von 500 µg/ml und 1000 µg/ml besteht eine deutliche Reduktion der Zellvitalität auf relative Werte von 34% und 48%.

Die niedrigeren Konzentrationen induzieren zunächst eine geringe Reduktion der Stoffwechselaktivität (Median 79%- 87%) und anschließend eine umschriebene Steigerung der Zellvitalität (Median 129% bei einer Testkonzentration von 50 µg/ml).

Tamoxifen bewirkt eine deutliche Reduktion der Zellvitalität, während 17β-Estradiol die Stoffwechselaktivität der Zellen steigert (relative Zellvitalität im Median 160%).

Ausreißer zeigen sich nur vereinzelt, und insgesamt ist die Spannweite der erhobenen Daten gering (Abb. 35).

MTT- Zellvitalitätstest mit Mikrowellenextrakt

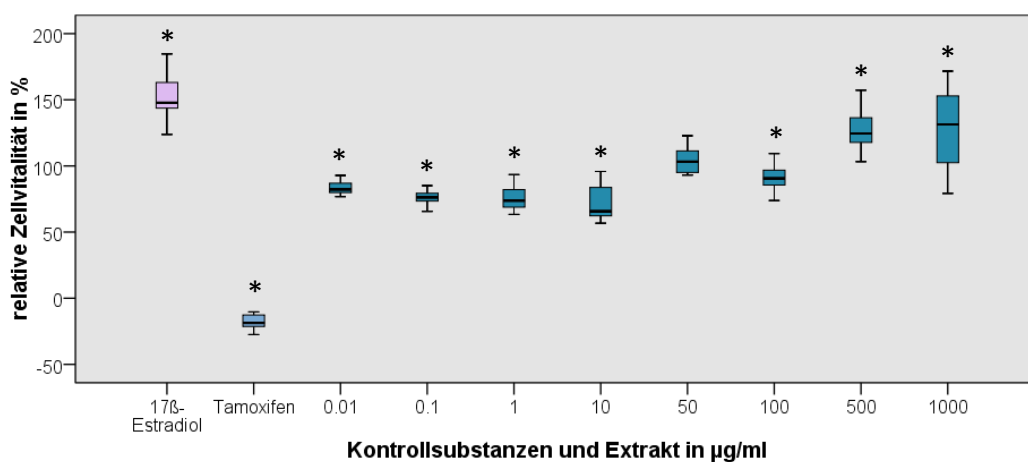


Abb. 36 MCF-10A-Zellen, MTT-Test mit Mikrowellenextrakt: Relative Zellvitalität nach Zugabe der Kontrollsubstanzen (17β-Estradiol 10^{-9} mol/l, Tamoxifen 10^{-4} mol/l) und Extraktkonzentrationen (Bezug zur Negativkontrolle); - Median; [] 25-75%; T 1,5x IQR; ° milde Ausreißer; * extreme Ausreißer; * Signifikanz (Einstichproben t- Test; $p < 0,05$); $n = 16$

Während der Mikrowellenextrakt in den niedrigen Testkonzentrationen von 0,01 µg/ml bis 10 µg/ml einen negativen Einfluss auf die Zellvitalität mit einer Reduktion auf relative Werte von 82% bis 66% zeigt, besteht eine Steigerung der Anzahl stoffwechselaktiver Zellen durch Zugabe hoher Extraktkonzentrationen von 500 µg/ml und 1000 µg/ml (Median 125% und 131%).

Wie im vorangegangenen Test zeigt sich auch hier eine deutliche Reduktion der Zellvitalität durch Tamoxifen.

17β- Estradiol induziert eine Steigerung der Stoffwechselaktivität (Median 148%) (Abb. 36).

LDH- Zytotoxizitätstest mit Extrakt nach Luyengi

Der Extrakt nach Luyengi wirkt in Konzentrationen von 500 µg/ml und 1000 µg/ml stark zytotoxisch auf die MCF-10A-Zelllinie.

Die relativen Zytotoxizitäten für die Testkonzentrationen liegen bei 81% und 73%.

Tamoxifen induziert in der benignen Zelllinie eine relative Zytotoxizität von 93% nahe der Positivkontrolle (Triton X) (Abb.37).

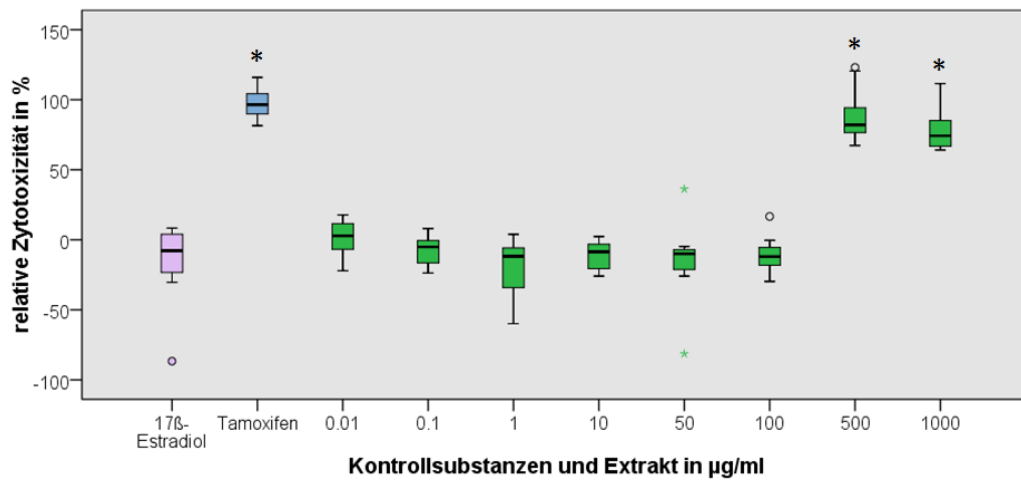


Abb. 37 MCF-10A-Zellen, LDH-Test mit Extrakt nach Luyengi: Relative Zytotoxizität nach Zugabe der Kontrollsubstanzen (17β-Estradiol 10^{-9} mol/l, Tamoxifen 10^{-4} mol/l) und Extraktkonzentrationen (Bezug zur Positivkontrolle); - Median; [] 25-75%; T 1,5x IQR; ° milde Ausreißer; *extreme Ausreißer; * Signifikanz (Einstichproben t- Test; $p < 0,05$); $n=16$

LDH- Zytotoxizitätstest mit Mikrowellenextrakt

Der Mikrowellenextrakt hat in keiner der getesteten Konzentrationen einen deutlichen zytotoxischen Effekt auf die MCF-10A Zelllinie.

Tamoxifen induziert hingegen eine starke zytotoxische Wirkung (Median 94%) (Abb. 38).

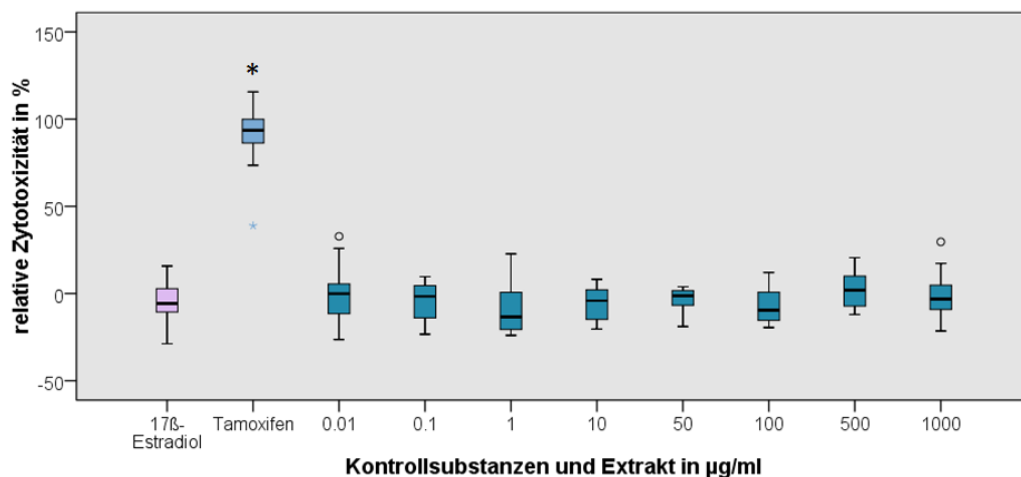


Abb. 38 MCF-10A-Zellen, LDH-Test mit Mikrowellenextrakt: Relative Zytotoxizität nach Zugabe der Kontrollsubstanzen (17β-Estradiol 10^{-9} mol/l, Tamoxifen 10^{-4} mol/l) und Extraktkonzentrationen (Bezug zur Positivkontrolle); - Median; [] 25-75%; T 1,5x IQR; ° milde Ausreißer; *extreme Ausreißer; * Signifikanz (Einstichproben t- Test; $p < 0,05$); $n=16$

4.2.4 MCF-12A

BrdU- Zellproliferationstest mit Extrakt nach Luyengi

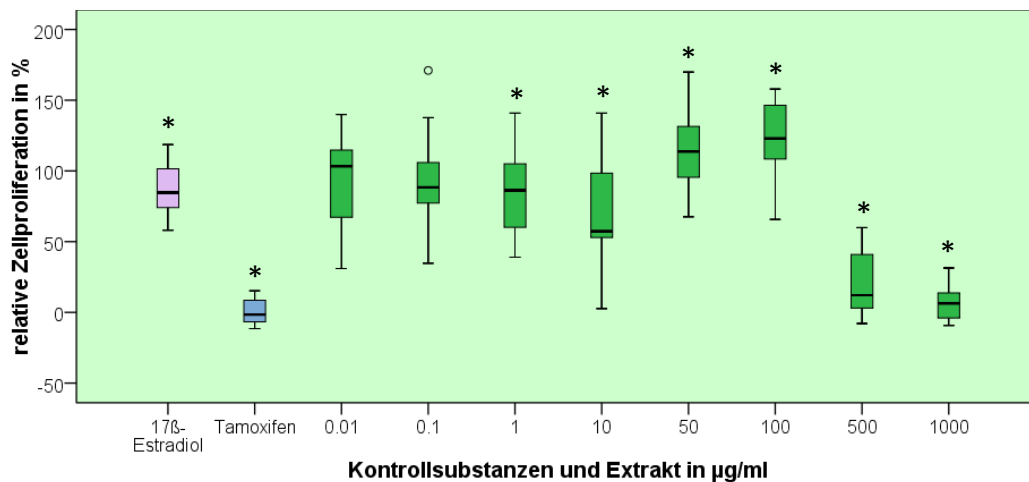


Abb. 39 MCF-12A-Zellen, BrdU-Test mit Extrakt nach Luyengi: Relative Zellproliferation nach Zugabe der Kontrollsubstanzen (17β-Estradiol 10^{-9} mol/l, Tamoxifen 10^{-4} mol/l) und Extraktkonzentrationen (Bezug zur Negativkontrolle); - Median; [] 25-75%; T 1,5x IQR; ° milde Ausreißer; * extreme Ausreißer; * Signifikanz (Einstichproben t- Test; $p < 0,05$); $n = 20$

In der hormonrezeptorpositiven Zelllinie MCF-12A induziert der Leinwurzelextrakt nach Luyengi in Testkonzentrationen von 500 µg/ml und 1000 µg/ml eine deutliche antiproliferative Wirkung (Median 12% und 6%). In den niedrigeren Konzentrationen zeigen sich teils geringe antiproliferative Effekte (1/10 µg/ml), teils schwach proliferative Wirkungen (50/100 µg/ml). Auch nach Steigerung der Einzeltestzahl ($n = 20$) bestehen für diese Testserie ausgedehnte Interquartilsabstände bzw. Spannweiten.

Tamoxifen wirkt auch hier signifikant antiproliferativ, während 17β- Estradiol die relative Zellproliferation leicht reduziert (Median 85%) (Abb. 39).

BrdU- Zellproliferationstest mit Mikrowellenextrakt

Der Mikrowellenextrakt aus der Leinwurzel induziert auch in hohen Konzentrationen keine ausgeprägten antiproliferativen Effekte in der MCF-12A Zelllinie. Die getesteten Extraktkonzentrationen modulieren die Zellproliferation in einem Bereich zwischen 80% und 120%, bezogen auf die Negativkontrolle und zeigen einen undulierenden Verlauf.

Auch in dieser Testreihe an der MCF-12A-Zelllinie bestehen zum Teil ausgedehnte Spannweiten bzw. Interquartilsabstände. Tamoxifen induziert eine deutliche antiproliferative Wirkung, bei kleiner Spannweite der Einzelwerte.

17β- Estradiol übt eine proliferative Wirkung auf die Zelllinie (Median 123%) aus (Abb. 40).

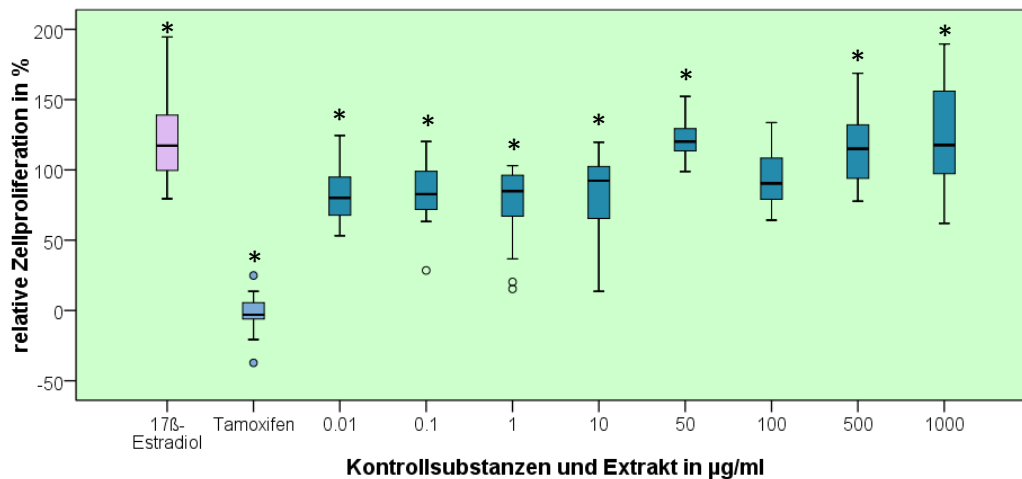


Abb. 40 MCF-12A-Zellen, BrdU-Test mit Mikrowellenextrakt: Relative Zellproliferation nach Zugabe der Kontrollsubstanzen (17β-Estradiol 10^{-9} mol/l, Tamoxifen 10^{-4} mol/l) und Extraktkonzentrationen (Bezug zur Negativkontrolle); - Median; [] 25-75%; T 1,5x IQR; ° milde Ausreißer; * extreme Ausreißer; * Signifikanz (Einstichproben t- Test; $p < 0,05$); $n = 16$

MTT- Zellvitalitätstest mit Extrakt nach Luyengi

Die Zellvitalität der MCF-12A- Zelllinie wird vor allem durch hohe Konzentrationen des Luyengi- Extrakts (500/1000 µg/ml) negativ beeinflusst. Diese induzieren eine Reduktion der Zellvitalität auf relative Werte von 34% und 20%.

Die Ergebnisse der übrigen Testkonzentrationen finden sich im Bereich zwischen 91% und 101%, zeigen jedoch nur kleine Spannweiten.

Tamoxifen bewirkt eine ausgeprägte Reduktion der Zellvitalität.

17β- Estradiol führt zu einer leichten Steigerung der Vitalität der benignen Zellen (Abb. 41).

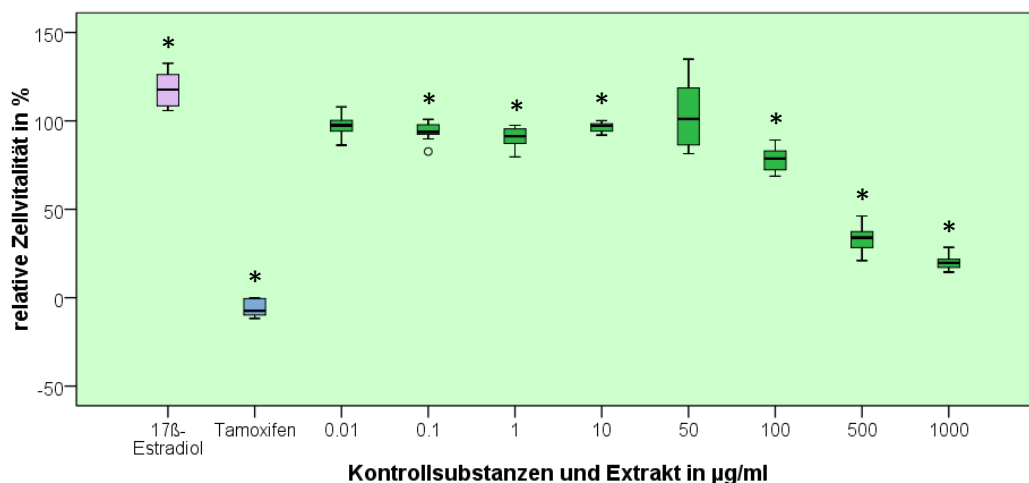


Abb. 41 MCF-12A-Zellen, MTT-Test mit Extrakt nach Luyengi: Relative Zellvitalität nach Zugabe der Kontrollsubstanzen (17β-Estradiol 10^{-9} mol/l, Tamoxifen 10^{-4} mol/l) und Extraktkonzentrationen (Bezug zur Negativkontrolle); - Median; [] 25-75%; T 1,5x IQR; ° milde Ausreißer; * extreme Ausreißer; * Signifikanz (Einstichproben t- Test; $p < 0,05$); $n = 12$

MTT- Zellvitalitätstest mit Mikrowellenextrakt

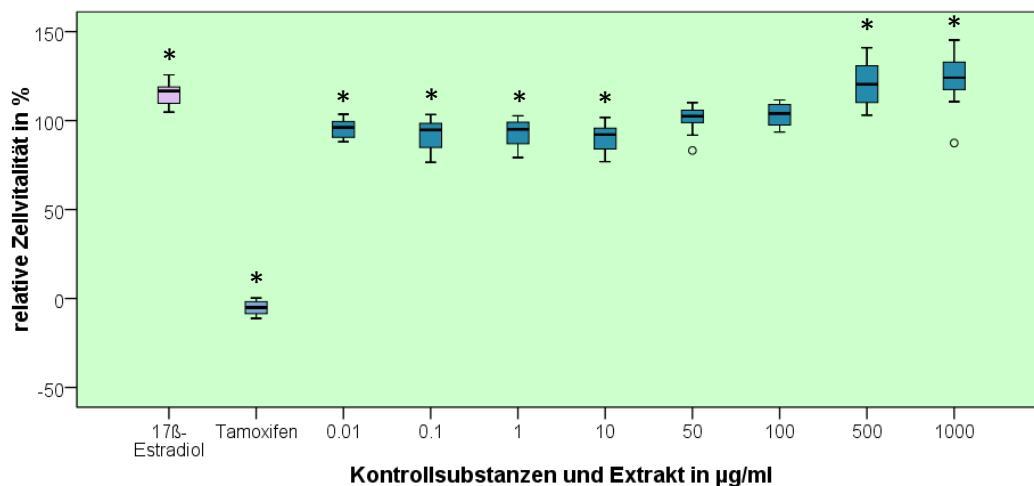


Abb. 42 MCF-12A-Zellen, MTT-Test mit Mikrowellenextrakt: Relative Zellvitalität nach Zugabe der Kontrollsubstanzen (17β-Estradiol 10^{-9} mol/l, Tamoxifen 10^{-4} mol/l) und Extraktkonzentrationen (Bezug zur Negativkontrolle); - Median; [] 25-75%; T 1,5x IQR; ° milde Ausreißer; * extreme Ausreißer; * Signifikanz (Einstichproben t- Test; $p < 0,05$); $n = 16$

Der Mikrowellenextrakt zeigt in der Zelllinie MCF-12A keine ausgeprägten vitalitätssenkenden Effekte. Es finden sich im Gegenteil eher schwach vitalitätssteigernde Effekte durch Testkonzentrationen von 500 µg/ml und 1000 µg/ml (Median 120% und 124%). Diesen Effekt erzielt auch 17β- Estradiol mit einer relativen Zellvitalität von 117%.

Tamoxifen induziert eine deutliche Reduktion stoffwechselaktiver Zellen (Abb. 42).

LDH- Zytotoxizitätstest mit Extrakt nach Luyengi

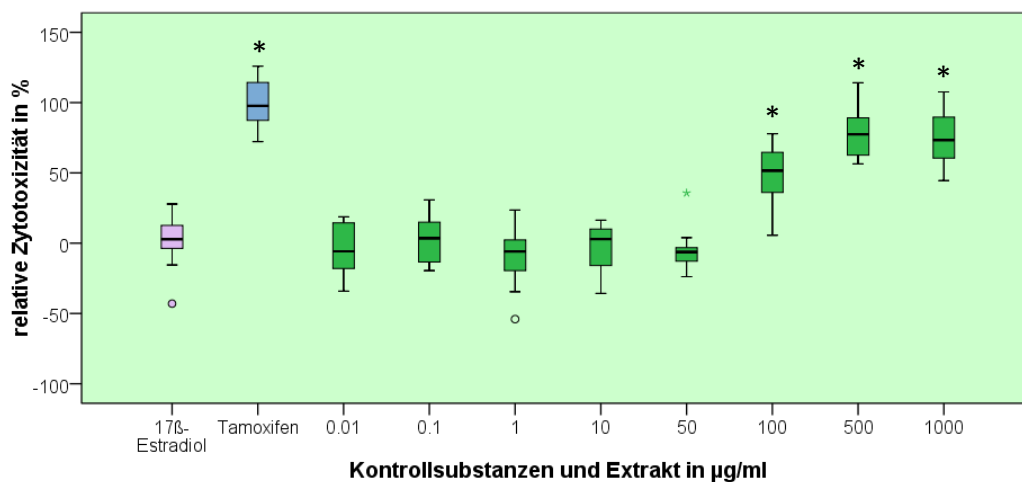


Abb. 43 MCF-12A-Zellen, LDH-Test mit Extrakt nach Luyengi: Relative Zytotoxizität nach Zugabe der Kontrollsubstanzen (17β-Estradiol 10^{-9} mol/l, Tamoxifen 10^{-4} mol/l) und Extraktkonzentrationen (Bezug zur Positivkontrolle); - Median; [] 25-75%; T 1,5x IQR; ° milde Ausreißer; * extreme Ausreißer; * Signifikanz (Einstichproben t- Test; $p < 0,05$); $n = 16$

In Testkonzentration ab 100 µg/ml wirkt der Extrakt nach Luyengi mit medianen Zytotoxizitätswerten zwischen 52% und 77% stark zytotoxisch auf die MCF-12A Zellen.

Auch Tamoxifen zeigt eine deutliche Zytotoxizität der Zellen, während 17β-Estradiol und die niedrig dosierten Testkonzentrationen keine Wirkungen zeigen (Abb. 43).

LDH- Zytotoxizitätstest mit Mikrowellenextrakt

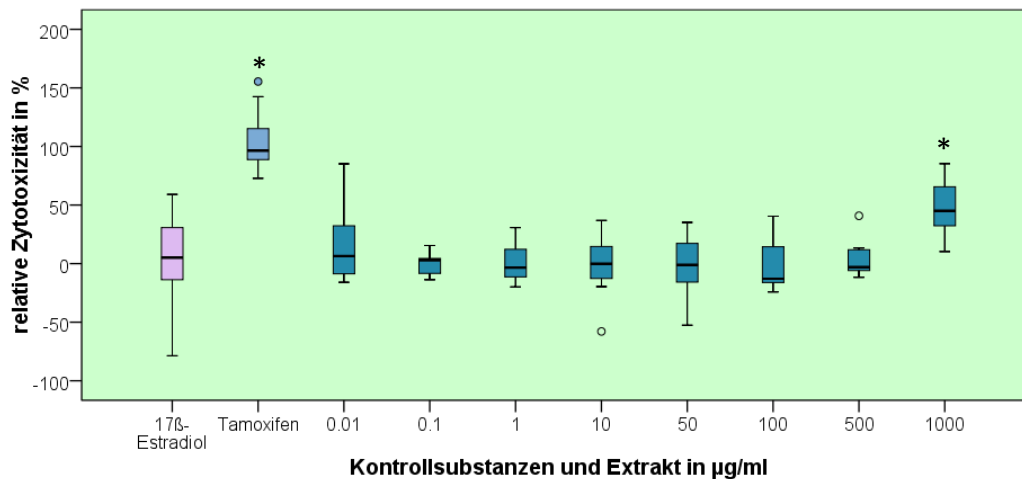


Abb. 44 MCF-12A-Zellen, LDH-Test mit Mikrowellenextrakt: Relative Zytotoxizität nach Zugabe der Kontrollsubstanzen (17β-Estradiol 10^{-9} mol/l, Tamoxifen 10^{-4} mol/l) und Extraktkonzentrationen (Bezug zur Positivkontrolle); - Median; [] 25-75%; T 1,5x IQR; ° milde Ausreißer; *extreme Ausreißer; * Signifikanz (Einstichproben t- Test; $p < 0,05$); $n=16$

In einer Konzentration von 1000 µg/ml bewirkt der Mikrowellenextrakt in der Zelllinie MCF-12A eine relative Zytotoxizität von 45%, bezogen auf Positivkontrolle (Triton X). Die weiteren getesteten Konzentrationen induzieren keine ausgeprägten zytotoxischen Effekte. In dieser Testserie zeigen sich trotz Steigerung der Einzelfallzahl teils große Spannweiten. Tamoxifen induziert in den Zellen eine relative 96%ige Zytotoxizität, nahe der Positivkontrolle (Abb. 44).

4.2.5 HMEC

Die Zelllinie HMEC (Human Mammary Epithelial Cells) stellt eine Primärkultur benignen epithelialer Zellen dar. Diese durchläuft nur etwa 15 Populationsverdopplungen und tritt anschließend in die Seneszenz ein. Dies begründet die limitierte Durchführbarkeit von Testserien ($n=8$) am Zellmaterial. Daher wurden die Wirkungen des Leinwurzelextrakts nach Luyengi als auch des Mikrowellenextrakts lediglich in Konzentrationen ab 50 µg/ml gemeinsam auf einer Well-Platte vergleichend getestet. Die folgenden Grafiken entsprechen der geänderten Testanordnung (Abb. 45 und 46).

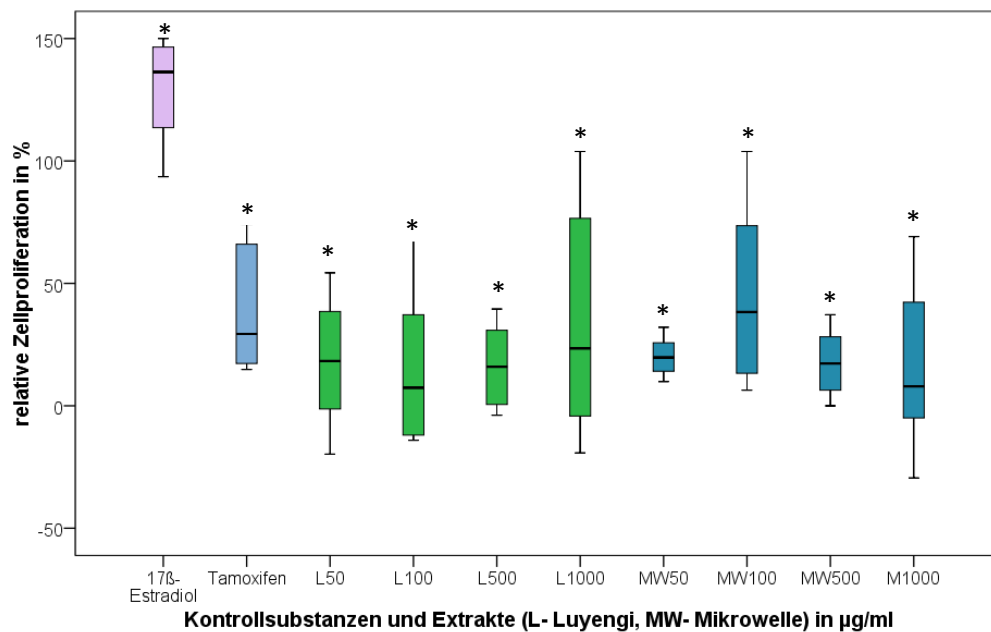
BrdU- Zellproliferationstest mit Extrakt nach Luyengi und Mikrowellenextrakt

Abb. 45 HMEC-Zellen, BrdU-Test mit Extrakt nach Luyengi und Mikrowellenextrakt: Relative Zellproliferation nach Zugabe der Kontrollsubstanzen (17β-Estradiol 10^{-9} mol/l, Tamoxifen 10^{-4} mol/l) und Extraktkonzentrationen (Bezug zur Negativkontrolle); - Median; [] 25-75%; T 1,5x IQR; ° milde Ausreißer; *extreme Ausreißer; * Signifikanz (Einstichproben t- Test; $p < 0,05$); $n=8$

Sämtliche getesteten Konzentrationen des Leinwurzelextrakts nach Luyengi (50 µg/ml – 1000 µg/ml) induzieren in der benignen Mamma-Zelllinie HMEC im Median deutliche antiproliferative Effekte (Median zwischen 7% und 35%). Es besteht jedoch keine konzentrationsabhängige Zunahme der antiproliferativen Aktivität, sondern ein undulierender Verlauf mit einer maximalen antiproliferativen Wirkung durch eine Testkonzentration von 100 µg/ml (Median 7%).

Auch der Mikrowellenextrakt induziert in allen getesteten Konzentrationen (50 µg/ml – 1000 µg/ml) signifikante antiproliferative Effekte (Median zwischen 8% und 38%). Der stärkste antiproliferative Effekt (Median 8%) wird hier jedoch durch die höchste Testkonzentration von 1000 µg/ml erzielt. Für beide Extrakte bestehen in den BrdU-Testserien ausgedehnte Spannweiten und Interquartilsabstände. Eine Erhöhung der Einzeltests zur Verifizierung der Ergebnisse war jedoch bei eingeschränkter Anzahl der Populationsverdopplungen nicht möglich.

Tamoxifen induziert ebenfalls einen signifikanten antiproliferativen Effekt (Median 29%). 17β-Estradiol stimuliert die proliferative Aktivität der HMEC- Zelllinie (Median 136%) (Abb. 45).

MTT- Zellvitalitätstest mit Extrakt nach Luyengi und Mikrowellenextrakt

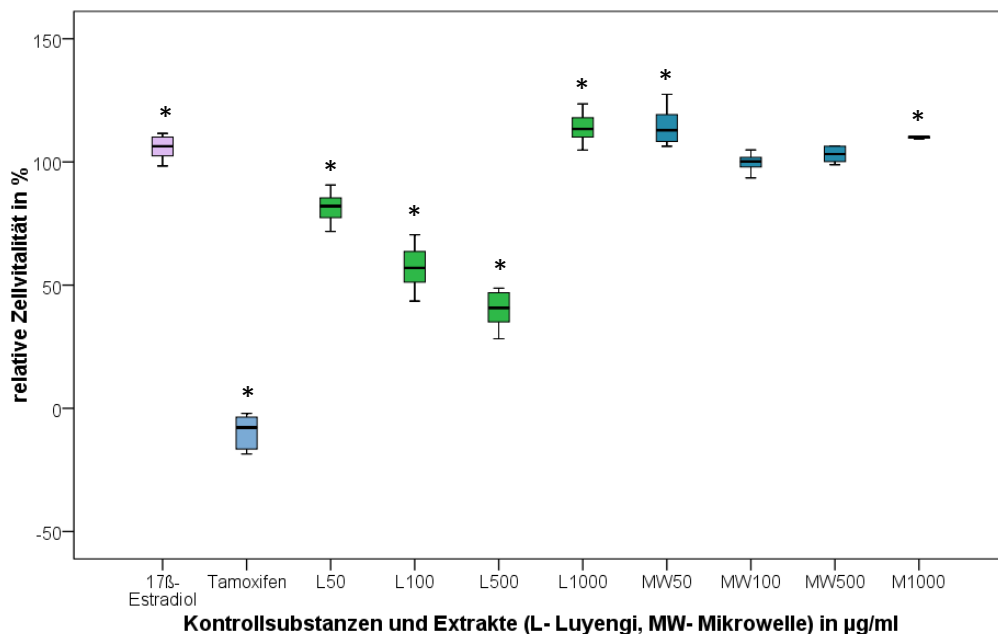


Abb. 46 HMEC-Zellen, MTT-Test mit Extrakt nach Luyengi und Mikrowellenextrakt.: Relative Zellvitalität nach Zugabe der Kontrollsubstanzen (17β-Estradiol 10^{-9} mol/l, Tamoxifen 10^{-4} mol/l) und Extraktkonzentrationen (Bezug zur Negativkontrolle); - Median; [] 25-75%; T 1,5x IQR; ° milde Ausreißer; *extreme Ausreißer; * Signifikanz (Einstichproben t- Test; $p < 0,05$); $n=8$

In der vorliegenden Testserie zeigt sich, dass der Leinwurzelextrakt nach Luyengi lediglich in Konzentrationen von 50 µg/ml – 500 µg/ml einen negativen Einfluss auf die Vitalität der Zelllinie HMEC ausübt (Median zwischen 82% und 41%). In einer Konzentration von 1000 µg/ml hat er einen gering vitalitätssteigernden Effekt (Median 113%).

Der Mikrowellenextrakt erzielt keine oder nur schwach vitalitätssteigernde Effekte (Median zwischen 100% und 113%).

Diese Testserie weist nur kleine Interquartilsabstände bzw. Spannweiten der Einzelwerte auf.

Tamoxifen induziert eine deutliche Reduktion benigner stoffwechselaktiver Zellen.

17β- Estradiol erzielt einen schwachen vitalitätssteigenden Effekt (Median 106%) in den Zellen (Abb. 46).

4.3 Extraktanalysen mit massenspektrometrischen Methoden (LC/MS)

In vorangegangenen Arbeiten des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik zu Rostock erfolgten bereits analytische Untersuchungen verschiedener Bestandteile des Leins. Hierbei wurden sowohl wässrige als auch ethanolische Pflanzenextrakte hergestellt und mittels verschiedener massenspektrometrischer Analysemethoden auf ihre Inhaltsstoffe untersucht. Zum Einsatz kamen die Pyrolyse-Feldionisation Massenspektrometrie (Py-FIMS) und die Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS).

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden sowohl quantitative als auch qualitative Analysen zu den beinhalteten Substanzklassen gemacht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden im Diskussionsteil in Zusammenhang mit den analytischen Ergebnissen dieser Arbeit interpretiert.

Für die vorliegende Arbeit wurden die analytischen Untersuchungen der Extrakte durch die Abteilung für Analytische und Technische Chemie am Institut für Chemie, der Universität Rostock durchgeführt. Diese erfolgten durch LC/MS. Die nachfolgenden Chromatogramme wurden mir durch Frau Dr. rer. nat. C. Oppermann zur Verfügung gestellt.

In den folgenden Abbildungen sind die LC-Chromatogramme des Wurzelextraktes nach Luyengi (Luyengi et al., 1996) und des Mikrowellenextraktes (Oppermann, 2012) dargestellt.

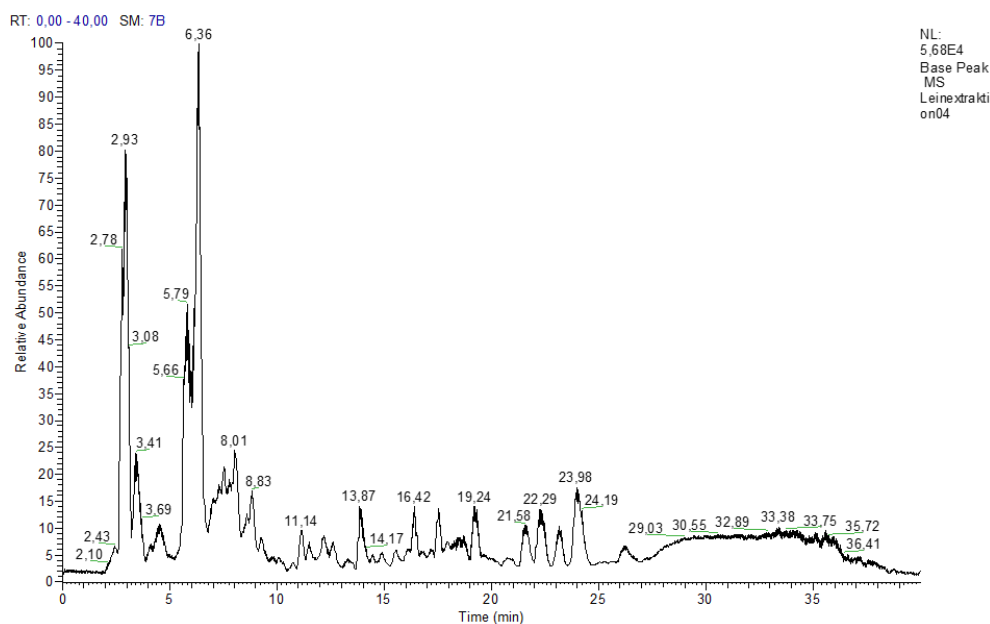


Abb. 47 Chromatogramm (basepeak); Leinwurzelextrakt nach Luyengi; Messung 2010; LW Freiland Agrarökologie (20 g Pflanzenmaterial mit 177,75 mL MeOH unter Rückfluss 15 min bei 70°C gekocht), mit freundlicher Genehmigung durch C. Oppermann

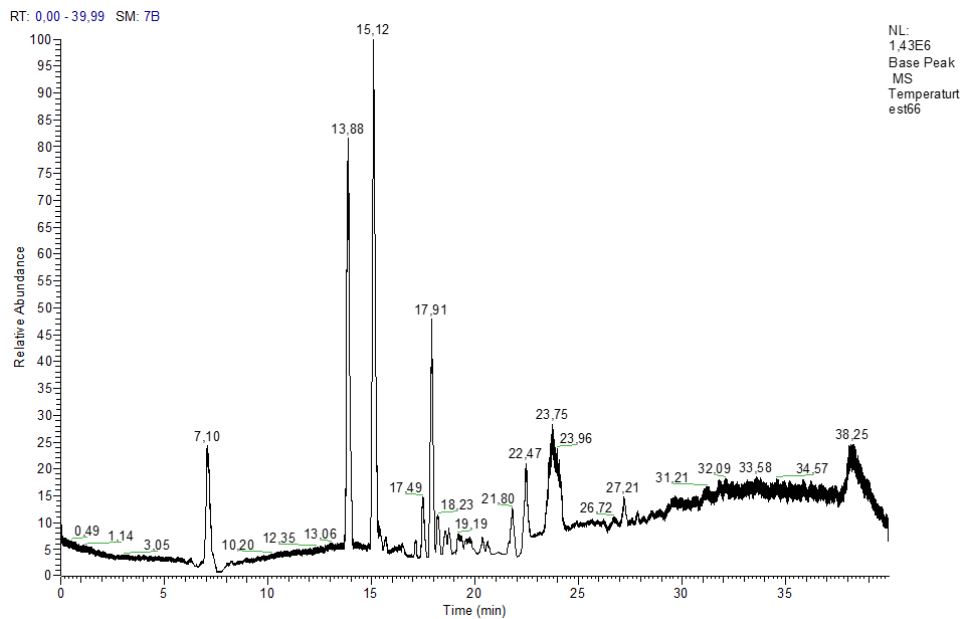


Abb. 48 Chromatogramm (basepeak); Leinwurzel Mikrowellenextrakt; Messung April 2011; neue LW/ Freiland Agrarökologie (0,280 g eingewogen, mit 5 ml EtOH extrahiert), mit freundlicher Genehmigung durch C. Oppermann

Dargestellt wird jeweils der Verlauf der Inhaltsstoffe, die im jeweiligen Wurzelextrakt gelöst sind und mit dem Massenspektrometer (MS) detektiert werden. Im Total Ion Current (TIC) werden beide Ionenströme, also der positive und negative Ionenstrom (positive and negative ion mode), erfasst.

Der höchste Peak im Chromatogramm ist auf 100% normiert (Base Peak). Die Höhe dieses Peaks (Intensität) ist dem Normalisations-Level (NL) rechts oben im Diagramm zu entnehmen. Der Vergleich beider Chromatogramme weist deutliche Unterschiede nicht nur im Peakverlauf, sondern auch in den Intensitäten auf.

In beiden Fällen ist zu erkennen, dass es sich um Vielstoffgemische mit zahlreichen, in unterschiedlicher Intensität abgrenzbaren Einzelsubstanzen handelt.

Ein Vergleich der Intensitäten zeigt, dass der Wurzelextrakt nach Luyengi mit einem NL- Wert von 5,68E04 um den Faktor 3,97 geringer konzentriert ist als der durch Mikrowellenextraktion erhaltene Wurzelextrakt (NL- Wert: 1,43E06).

Weiterhin ist zu erkennen, dass der nach Luyengi extrahierte Wurzelextrakt sehr viele früh eluierende Inhaltsstoffe enthält, da sich im vorderen Zeitniveau (0-10 min) zahlreiche Peaks mit ausgeprägter Intensität abgrenzen lassen, während das Chromatogramm des Mikrowellenextraktes vor allem spät eluierende Inhaltsstoffe aufzeigt, welche erst nach einer Durchlaufzeit von ca. 12 Minuten auftreten.

Folglich sind unterschiedliche Substanzklassen in den jeweiligen Extrakten vertreten.

5 Diskussion

Bereits im Jahr 1981 postulierten die britischen Epidemiologen Doll und Peto einen Zusammenhang zwischen der Ernährung und der Inzidenz von Krebserkrankungen. Sie sprachen diätetischen Faktoren einen Einfluss auf ein Drittel aller Krebserkrankungen zu (Doll and Peto, 1981). Danach wurden zahlreiche Studien durchgeführt, die sich mit den Zusammenhängen zwischen der Ernährung und der Inzidenz diverser Erkrankungen befassten. Bis heute sind Experten der Meinung, dass diätetische Faktoren in 30-35% der Fälle mitverantwortlich für die Entstehung maligner Tumoren sind (Jenik and van Leendert, 2002; Kreis, 2009; Imoberdorf et al., 2015).

Phytoestrogenen, wie sie beispielsweise in Sojaprodukten vorkommen, werden protektive Eigenschaften auf hormonabhängige Erkrankungen der Mamma zugeschrieben (Adlercreutz, 2003; Rosolowich et al., 2006; Bilal et al., 2014). Ein Großteil der Arbeiten befasst sich jedoch mit den Wirkungen der isolierten Phytoestrogene aus Soja, vor allem den Isoflavonen (Messina and Barnes, 1991; Wu et al., 1998; Korde et al., 2009; Nagata, 2010; Caan et al., 2011; Zhang et al., 2012).

Soja und die daraus gewonnenen Produkte stellen im asiatischen Raum einen wichtigen Part der landestypischen Ernährung dar. In unseren Breiten spielen sojabasierte Lebensmittel dagegen eher eine untergeordnete Rolle. Doch auch in der nord- bis mitteleuropäischen Flora gibt es viele phytoestrogenhaltige Pflanzen. Einen bedeutsamen Vertreter stellt die Leinpflanze (*Linum usitatissimum*) dar. Sie enthält größere Mengen an Phytoestrogenen, insbesondere Lignane (Liggins et al., 2000b; Kilkkinen et al., 2001; Peterson et al., 2010).

In sehr vielen Publikationen zu Wirkungen der Phytoestrogene werden hormonabhängige maligne Erkrankungen untersucht (Adlercreutz, 1995; Wu et al., 1998; Korde et al., 2009; Caan et al., 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurden phytoestrogenhaltige Extrakte aus der Leinwurzel jedoch nicht nur an malignen Zellen getestet, sondern auch im Hinblick auf ihre Wirkung auf benigne Mamma- Zelllinien untersucht. Einen wichtigen Anteil machen dabei Zelllinien aus Mammae mit benigner fibrozystischer Mastopathie, einer häufigen hormonabhängigen Erkrankung der weiblichen Brust, aus.

5.1 Extrakte im Vergleich

Für die vorliegende Arbeit wurden phytoestrogenhaltige Extrakte aus der Leinwurzel durch zwei verschiedene Verfahren hergestellt. Zum einen wurde die auf Mikrowellen basierende Extraktionstechnik eingesetzt (Oppermann, 2012). Mit dieser werden sowohl Lignane als auch Isoflavone aus dem Pflanzenmaterial isoliert. Zum anderen erfolgte eine Kochextraktion des Wurzelmaterials nach Luyengi (Luyengi et al., 1996). Mit diesem Verfahren werden insbesondere Lignane extrahiert.

5.1.1 Extraktionsmethoden

Die Extraktion nach Luyengi stellt ein klassisches Extraktionsverfahren unter Nutzung der Koch-Rückfluss-Methode dar. Es basiert auf einer schrittweisen Herauslösung der Inhaltsstoffe durch Permeation aus destruierten Zellen und auf der Extraktion mittels Lösungsmittel aus verbliebenen intakten Pflanzenzellen. Im Gegensatz dazu basiert die Mikrowellen-Extraktion auf der Freisetzung der Pflanzeninhaltsstoffe in das Lösungsmittel durch Ruptur der Zellwand. Während in konventionellen Extraktionsmethoden durch eine höhere Lösungsmittelmenge bessere Extraktionsergebnisse erzielt werden, ergibt sich in der Mikrowellen-basierten Extraktion keine vermehrte Ausbeute bei Erhöhung der Lösungsmittelmenge (Tatke and Jaiswal, 2011).

Die Wärmeverteilung erfolgt bei der Extraktion nach Luyengi durch Konduktion über ein ausgedehntes Zeitintervall. Auch die angeschlossenen Arbeitsschritte und die Trocknung sind sehr zeitintensiv. Der Mikrowellen-Extraktion liegt eine gleichmäßige Wärmeverteilung im Lösungsmittel zugrunde. Zeit- und Temperatureinstellungen lassen sich standardisieren und auch der Trocknungsvorgang über Nacht entfällt für dieses Verfahren (Kaufmann and Christen, 2002; Chemat and Cravotto, 2013).

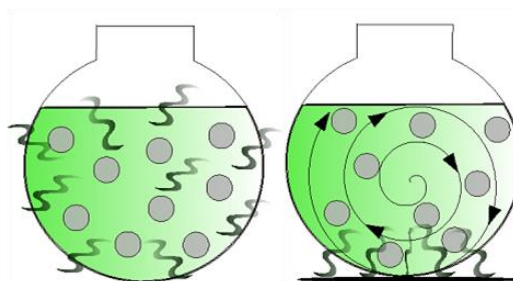


Abb. 49: (links) gleichmäßige Wärmeverteilung im Medium durch Mikrowellen; (rechts) Wärmezuleitung von außen und ungleichmäßige Verteilung der Wärme durch Konduktion, nach (Kaufmann and Christen, 2002)

In der Literatur werden beide Verfahren als geeignet zur Extraktion sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe beschrieben (Luyengi et al., 1996; Tatke and Jaiswal, 2011; Chemat and Cravotto, 2013).

Bisherige Untersuchungen ergaben, dass die erhaltene Feststoffmenge bei der Extraktion durch Mikrowellentechnik annähernd zehnfach höher ist als der Feststoffgehalt nach Luyengi-Extraktion.

Mit der Mikrowellentechnik lassen sich somit Extrakte zeit- und kostensparend ohne hohen Lösungsmittelverbrauch unter reproduzierbaren Bedingungen herstellen (Tatke and Jaiswal, 2011). Nachteilig ist, dass nur Lösungsmittel, die fähig sind, Mikrowellen zu absorbieren, verwendet werden können, und dass für jede Probe ein zusätzlicher Reinigungsschritt erforderlich ist (Sparr Eskilsson and Björklund, 2000). Die Extraktionszeit ist im Gegensatz zu anderen Extraktionsverfahren deutlich reduziert, und es liegen weitgehend standardisierte Aufschlussbedingungen vor.

5.1.2 Zusammensetzung der Extrakte

In vorangegangenen Arbeiten des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik zu Rostock und der Kooperationspartner erfolgten bereits qualitative und quantitative Analysen verschiedener Leinpflanzenbestandteile bzw. verschiedener Extrakte aus der Leinpflanze.

Im Rahmen der Pyrolyse-Feldionisation Massenspektrometrie (Py-FIMS) wurden im Pflanzenmaterial bzw. in den Extrakten nach Luyengi folgende 12 Substanzklassen identifiziert:

Kohlehydrate; Monolignole; Lignidimere; die Substanzgruppe der Lipide (Alkane, Alkene, Aldehyde, Alkohole, Fettsäuren, Wachse und Fette); N- haltige Verbindungen; Isoprenoide Verbindungen (Sterole, Terpene, Carotinoide); Peptide und freie Aminosäuren; niedermolekulare Verbindungen; Alkylaromate; Lignane; Flavone; Isoflavone und sonstige Polyphenole

Diese Substanzklassen zeigen in den einzelnen Testserien unterschiedliche Intensitäten. In jedem Fall liegen Vielstoffgemische unter Einschluss dominierender lipidhaltiger bzw. isoprenoider Bestandteile vor (Theil, 2010; Dünow, 2012; Szewczyk et al., 2014).

Besonders hinsichtlich des Lignan-Gehaltes gilt die Wurzel als reichhaltigste Quelle (Szewczyk, 2007; Szewczyk et al., 2014). Der Lignananteil (Extrakte nach Luyengi) beträgt laut Voruntersuchungen zwischen 1,9% und 2,4% (Theil, 2010; Dünow, 2012).

Im Rahmen massenspektrometrischer Analysen diverser Pflanzenbestandteile bzw. Extrakte (HPLC/LC-MS) erfolgte die beginnende Aufschlüsselung von Einzelsubstanzen innerhalb der Phytoestrogen- Untergruppen.

In methanolischen Extrakten, darunter auch die Extraktionsmethode nach Luyengi, konnten zum einen Genistein, Daidzein und Biochanin A innerhalb der Gruppe der Isoflavone, zum anderen Secoisolariciresinol, Matairesinol, Pinoresinol, Lariciresinol, Isolariciresinol, Arctigenin und 6- Methoxypodophyllotoxin (zytotoxisches Lignan) innerhalb der Gruppe der Lignane nachgewiesen werden (Abarzua et al.,2007).

Vergleichend dazu finden sich auch massenspektrometrische Untersuchungen zu ethanolischen Extrakten aus der Leinwurzel, die mit Hilfe der Mikrowellentechnik erstellt wurden. Innerhalb der Gruppe der Lignane werden in dieser Arbeit die Einzelsubstanzen Secoisolariciresinol, Matairesinol, Pinoresinol, Lariciresinol, Isolariciresinol und Arctigenin beschrieben. Außerdem werden weitere Einzelsubstanzen, wie Biochanin A, Genistein, Daidzein, Fisetin und Glycetin, als Vertreter der Flavonoide identifiziert (Oppermann, 2012).

Im Folgenden findet sich eine vergleichende tabellarische Übersicht zu den bisher nachgewiesenen Einzelsubstanzen innerhalb der Extraktionsverfahren.

Tab. 12 Übersicht über massenspektrometrisch nachgewiesene Einzelsubstanzen im methanolischen und ethanolischen Extrakt, nach (Abarzua et al.; Oppermann, 2012)

Substanzklasse	Methanolischer Extrakt (u.a. Luyengi et al.)	Ethanolischer Extrakt (Mikrowellenmethode)
Flavonoide/ Isoflavone	<i>Genistein</i> <i>Daidzein</i> <i>Biochanin A</i>	<i>Biochanin A</i> <i>Genistein</i> <i>Daidzein</i> <i>Fisetin</i> <i>Glycetin</i>
Lignane	<i>Secoisolariciresinol</i> <i>Matairesinol</i> <i>Pinoresinol</i> <i>Lariciresinol</i> <i>Isolariciresinol</i> <i>Arctigenin</i> <i>6- Methoxypodophyllotoxin</i>	<i>Secoisolariciresinol</i> <i>Matairesinol</i> <i>Pinoresinol</i> <i>Lariciresinol</i> <i>Isolariciresinol</i> <i>Arctigenin</i>

Die Isoflavone stellen im Luyengi- Extrakt einen bedeutend geringeren Anteil als die Fraktion der Lignane (0,3% : 2,4%) (Dünnow, 2012).

Vorhergehende Untersuchungen des Forschungslabors wiesen für Mikrowellen- basierte Extrakte eine höhere Fraktion an Flavonoiden auf, während eine höhere Fraktion der Lignane in Extrakten nach Luyengi zu verzeichnen waren.

Die im Ergebnisteil dieser Arbeit dargestellten Chromatogramme lassen ebenfalls das Vorliegen eines Vielstoffgemisches mit zahlreichen gelösten Einzelsubstanzen erkennen. Diese Chromatogramme werden im Hinblick auf bereits bestehende Nachweise interpretiert, da sich die Analysen der Einzelsubstanzen sehr aufwendig gestalten. Um einzelne Inhaltsstoffe zu bestimmen müssen die einzelnen Massenspektren jeweils mit Ergebnissen aus Datenbanken bzw. der Literatur abgeglichen werden. Das Vorliegen der Substanzen in Form von Glykosiden und die Vielfalt der Bindungsmöglichkeiten, insbesondere in der Untergruppe der Lignane erschweren die Charakterisierung (Liggins et al., 2000).

Es ist davon auszugehen, dass die in der Tabelle genannten Phytoestrogen- Vertreter auch in verwendeten Extrakten enthalten sind. Die unterschiedlichen Verläufe und Intensitäten in den Chromatogrammen bedingen sich durch eine unterschiedliche Zusammensetzung der Einzelsubstanzen im Rahmen der Extraktionsverfahren.

Weiterhin ist anzunehmen, dass das Verfahren nach Luyengi höhere Intensitäten in der Gruppe der Lignane aufweist und der mikrowellen- basierte Extrakt höhere Intensitäten / Peakverläufe in der Untergruppe der Flavonoide/ Isoflavone.

Da für beide Extrakte Wurzelmaterial derselben Sorte verwendet wurde, schließen sich sortenspezifische Unterschiede aus. Jedoch können bereits verschiedene Erntezeitpunkte einen deutlichen Einfluss auf die Zusammensetzung des Materials ausüben. So steigt beispielsweise der Lignangehalt der Leinwurzel mit zunehmender Wuchsdauer von 0,3% auf 3% (3 Wochen : 9 Wochen), während der Anteil der freien gesättigten und ungesättigten Fettsäuren abnimmt (Strater, 2011).

Einen wichtigen limitierenden Faktor in der Vergleichbarkeit der Chromatogramme und auch in Bezug auf die Auswertung der kolorimetrischen Tests stellt die deutliche Trübung des Luyengi- Extraktes dar. Diese bedingt aufgrund der ungelösten Feststoffbestandteile grundsätzlich eine Filtration des Extraktes vor der chromatographischen Messung. Das Filtrieren erübrigt sich jedoch für die Mikrowellenextrakte, da diese im Rahmen der Herstellung bereits frei von Schwebeteilchen sind. Die kolorimetrischen Tests wurden jedoch mit dem ungefilterten, feststoffhaltigen Extrakt nach Luyengi durchgeführt.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass sich beide Verfahren, sowohl die Extraktion nach Luyengi als auch die Mikrowellenextraktion, zur Isolierung sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe, einschließlich der Phytoestrogene eignen. Die Unterschiede in der Zusammensetzung der Extrakte werden unterstrichen durch die Differenzen in den Verläufen und Intensitäten in den LC- Chromatogrammen. Weiterhin korrelieren diese mit den zum Teil entgegengesetzten

Wirkungen auf die Zellproliferation und Vitalität sowie Zytotoxizität in den durchgeführten In-Vitro- Testverfahren.

Im Hinblick auf eine standardisierte Herstellung, im Rahmen der nutritiven Prävention ist verfahrenstechnisch sicherlich die Mikrowellenextraktion zu präferieren, da diese das ökonomisch effizientere (Kosten- und Zeiteffizienz) Verfahren darstellt.

Jedoch müssen diese Aspekte immer im Hinblick auf ihre karzinopräventive bzw. zytotoxische Wirkung, in den durchgeführten Untersuchungen betrachtet werden.

Diese werden in den folgenden Kapiteln zusammengefasst und unter den genannten Aspekten interpretiert.

5.2 Ergebnisse der kolorimetrischen Tests

5.2.1 Einflüsse von Tamoxifen und 17 β - Estradiol auf Mamma- Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden die in vitro- Effekte von Tamoxifen (10^{-4} mol/l) und 17 β -Estradiol (10^{-9} mol/l) auf Proliferation, Vitalität und Toxizität in verschiedenen Mamma-Zelllinien untersucht.

5.2.1.1 Tamoxifen

Tamoxifen findet als selektiver Estrogenrezeptormodulator (SERM) Anwendung in der Therapie hormonrezeptorpositiver Mammakarzinome. Es interferiert mit dem wachstumsstimulierenden Effekt der Estrogene und inhibiert so das Tumorwachstum (Baral et al., 1995; Gätje et al., 2011). Es bindet an beide Estrogenrezeptorsubtypen (ER α/β) und zeigt zu diesen die gleiche Bindungsaffinität wie 17 β -Estradiol (Morito et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit induziert es sowohl in den hormonrezeptorpositiven (MCF-7, MCF-12A, HMEC), als auch in den rezeptornegativen Zelllinien (BT-20, MCF-10A) ausgeprägte antiproliferative und vitalitätsinhibierende Effekte. Gleichzeitig wirkt es auf sämtliche Zelllinien stark zytotoxisch, es bestehen diesbezüglich keine ausgeprägten Unterschiede zwischen benignen und malignen Zelllinien.

Bereits vorangegangene Untersuchungen ermittelten antiproliferative bzw. zytotoxische Tamoxifen-Wirkungen, auch auf rezeptornegative (Mamma)-Zelllinien (Theil, 2010; Strater, 2011; Eczko, 2015).

In der Literatur finden sich zudem Hinweise auf rezeptorunabhängige zytotoxische Tamoxifen-Wirkungen in verschiedenen Zellsystemen, wie sie auch in dieser Arbeit nachgewiesen wurden (Reddel et al., 1985; Baral et al., 1995; Li et al., 2004; Abbasalipourkabir R. et al., 2013; Yaacob

N.S. and Ismail N. F., 2014, 2014). So induzierte Tamoxifen signifikante DNA- Schäden mit konsekutiver Zytotoxizität in MCF-7 und MCF- 10A Zellen, wobei es in der benignen MCF-10A- Zelllinie aggressiver wirkte (Yaacob N.S. and Ismail N. F., 2014). MCF-7-Zellen zeigen in vitro eine Tamoxifen-induzierte Abnahme der Cathepsin D- Aufnahme, wobei dieses als proliferativer Faktor bzw. Mitogen, insbesondere in Mammakarzinomen, gilt (Dhiman et al., 2005). Auch Interaktionen von Tamoxifen mit dem mitochondrialen Energiestoffwechsel der Zellen und konsekutive Veränderungen der oxidativen Aktivität, der Phosphorylierungsvorgänge und der Membranintegrität werden beschrieben (Custodio et al., 1998; Cardoso et al., 2001). Weitere Studien weisen Wachstumsfaktor-assoziierte Mechanismen (EGFR) mit zytotoxischem Potential nach (Zheng et al., 2007). Auch eine Tamoxifen- induzierte Modulation der Zytotoxizität durch NK- Zellen (natürliche Killerzellen) kann rezeptorunabhängige Wirkungen bedingen (Baral et al., 1995).

5.2.1.2 17- Estradiol

Estrogene, insbesondere 17 β -Estradiol, werden in der Literatur als schwache Karzinogene beschrieben (Henderson and Feigelson, 2000; Liehr, 2001; Emons et al., 2003; Fuhrman et al., 2012). Es führt als potentes Mitogen an rezeptorpositiven Mammazellen zu einer Steigerung der proliferativen Aktivität (Henderson and Feigelson, 2000; Emons et al., 2003; Eigéliené et al., 2006). Dies passt zu der proliferativen Wirkung auf die Primärkultur benigner Mammaepithelien (HMEC) bei nahezu unveränderter Zellvitalität in der vorliegenden Arbeit. Auch die vitalitätssteigernden Effekte von 17 β - Estradiol auf die Zelllinien BT-20, MCF-10A und MCF-12A lassen sich unter diesem Aspekt betrachten.

Vor diesem Hintergrund überrascht es jedoch, dass die Zellproliferation der getesteten Rezeptor- positiven immortalisierten Zellen (MCF-7, MCF-12A) nahezu unbeeinflusst bleibt und sich zum Teil sogar antiproliferative Wirkungen verzeichnen lassen. Auch für BT-20- und MCF-10A zeigen sich antiproliferative Wirkungen nach Zugabe von 17 β - Estradiol.

Bereits Seegers et al. beschrieben 17 β -Estradiol-assoziierte zytotoxische Effekte auf in Teilung befindliche MCF-7-Zellen nach Inkubation mit hohen Estradiol- Konzentrationen (1×10^{-6} M) (Seegers et al., 1989).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte keine deutliche 17 β -Estradiol-induzierte Zytotoxizität bei den getesteten benignen bzw. malignen Zelllinien nachgewiesen werden. Denkbar wäre aber, dass die gewählte niedrigere Testkonzentration zwar kein volles zytotoxisches Potential entfaltet, jedoch beginnende antiproliferative Effekte induziert.

17 β -Estradiol verändert das Zellteilungsverhalten und die Stoffwechselaktivität unabhängig vom Hormonrezeptorstatus der Zelllinien. Insbesondere bei Vorliegen eines negativen Estrogenrezeptorstatus sind Estradiol-vermittelte Signalkaskaden außerhalb des „klassischen Signalweges“ wahrscheinlich. Denkbar wäre beispielsweise das Vorhandensein G- Protein-gekoppelter Rezeptoren (GPER1) (Vrtačnik et al., 2014).

Die diskordanten Ergebnisse bzw. undulierenden Wirkspektren der rezeptorpositiven immortalisierten Zellen sollen auch im Rahmen methodenspezifischer limitierender Faktoren bewertet werden. Dies erfolgt im Abschnitt Methodenkritik.

5.2.2 Einfluss der Leinwurzelextrakte auf Mamma- Zelllinien

5.2.2.1 Einfluss auf maligne Zellen

Zahlreiche Studien beschreiben antikarzinogene Effekte der Phytoestrogene auf hormonabhängige Tumoren, insbesondere auf das Mammakarzinom (Akiyama et al., 1987; Markovits et al., 1989; Fotsis et al., 1998; Santell et al., 2000). Brown et al. fanden im Tierversuch eine Genistein-assoziierte Stimulation von TGF α und EGFR mit konsekutiver Steigerung der Differenzierung des Brustdrüsengewebes. Bei den differenzierten Zellen zeigte sich eine Downregulation des EGF-Signalwegs als mögliches karzinopräventives Potential (Brown et al., 1998).

Für Leinsamen bzw. Lignane werden ähnliche Effekte auf das Brustdrüsengewebe vermutet, wie sie durch Isoflavone bekannt sind (Adlercreutz, 2003; Basch et al., 2007). Die Stoffwechselprodukte der Hauptlignane in Leinsamen sollen präventive bzw. kurative Effekte auf hormonabhängige Krebsarten ausüben (Kreis, 2009). Bei Ratten führte die Gabe von Leinsamen bzw. Secoisolariciresinol-Diglucosid (SDG) zu endokrinen Veränderungen, die in einer gesteigerten Differenzierung des Brustdrüsenparenchyms resultierten (Tou and Thompson, 1999). Im Menschen sollen Leinsamen die Serumkonzentration von 17 β -Estradiol und Estron signifikant senken und gleichzeitig den Serumprolaktinspiegel steigern (Basch et al., 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Auswirkungen der beiden phytoestrogenhaltigen Leinwurzelextrakte auf die Proliferation und Vitalität von Mammakarzinomzellen getestet. Zytotoxische Effekte wurden im Rahmen der LDH-Testserien erfasst. Als Testmodelle dienten die tripelnegative Zelllinie BT-20 und die rezeptorexprimierende Zelllinie MCF-7. Hohe

Testkonzentrationen des Extrakts nach Luyengi induzierten zytotoxische Effekte in beiden Zelllinien.

Zytotoxische Wirkungen nach Luyengi hergestellter Extrakte auf Mammakarzinom-Zelllinien wurden bereits in früheren Arbeiten beschrieben und decken sich somit mit den aktuellen Ergebnissen (Theil, 2010; Strater, 2011; Szewczyk et al., 2014). Auch in diesen Arbeiten wirkten insbesondere hohe Extraktkonzentrationen bei malignen Zellen zytotoxisch. Für den Mikrowellenextrakt konnte dagegen keine signifikante Zytotoxizität bei den Karzinomzellen nachgewiesen werden.

Antiproliferative Wirkungen des Leins auf Mammatumoren, wie sie im Rahmen dieser Arbeit auf zellulärer Ebene nachgewiesen wurden, werden ebenfalls in der Literatur beschrieben (Santell et al., 2000; Foth, 2003). Bei Ratten hemmen Leinsamen sowie reines SDG das Wachstum von Mammatumoren sowohl in der initialen als auch in der fortgeschrittenen Erkrankungsphase (Adlercreutz, 2003).

In der aktuellen Arbeit wirkten hohe Konzentrationen des Extrakts nach Luyengi in beiden Karzinomzelllinien antiproliferativ und vitalitätsinhibierend. Der Mikrowellen-Leinwurzelextrakt wirkte ab einer Konzentration von 500 µg/ml hingegen nur in den BT-20-Tumorzellen antiproliferativ. In den MCF-7-Zellen hatte er dagegen in den hohen Konzentrationen proliferative und vitalitätssteigernde Effekte.

Diese Proliferationssteigerung ist mit Ergebnissen aus der Arbeitsgruppe um Ju et al. vereinbar. Athymischen, ovariectomierten Nacktmäusen wurden MCF-7-Zellen implantiert, im Anschluss wurden sie mit Sojaproteinisolat gefüttert. Die Plasmakonzentration des Gesamtgenisteins erreichte Werte von 1-2 µM. Die Autoren beschreiben eine Phytoestrogen-induzierte Proliferationssteigerung des Mammakarzinoms (Ju et al., 2001). Zudem gibt es Hinweise auf eine proliferative Wirkung des Leinwurzelmikrowellenextrakts in Karzinomzellverbänden in Abhängigkeit vom Lagerungszeitraum (Oppermann, 2012).

Bekannt ist, dass Phytoestrogene sowohl estrogen als auch antiestrogen wirken können (Adlercreutz, 1995; Mense et al., 2008; Kreis, 2009). Somit können sie durchaus in gegensätzlicher Weise die Proliferation bzw. Vitalität hormonabhängiger Zellen beeinflussen. Diese konträren Wirkungen werden unter anderem im Zusammenhang mit der vorliegenden Estrogenkonzentration diskutiert. So sollen Isoflavone in einer estrogenarmen Umgebung eine estrogenische Wirkung entfalten, während sie zusammen mit hochdosierten Estrogenen antiestrogenische Effekte erzielen (Messina and Barnes, 1991). Eine Interaktion zwischen dem Lignanderivat Enterolakton und 17β-Estradiol wurde auf zellulärer Ebene beschrieben. In

Testserien an MCF-7 Zellen hob Enterolakton die durch 17 β -Estradiol induzierten proliferativen Effekte auf Karzinomzellen auf (Mousavi and Adlercreutz, 1992).

Im Rahmen meiner Arbeit zeigten sich deutliche dosisabhängige Unterschiede in der Wirkung der Phytoestrogene. Während niedrige Extraktkonzentrationen auch proliferative bzw. vitalitätssteigernde Effekte induzierten, zeigten sich antiproliferative, vitalitätsinhibierende und zytotoxische Effekte häufig erst nach Zugabe hoher Extraktkonzentrationen.

Auch in der Literatur finden sich Angaben zu dosisabhängigen Unterschieden in der Wirkung der Phytoestrogene (Hsieh et al., 1998; Dixon, 2004; Bilal et al., 2014). So sollen niedrigdosierte Phytoestrogene das in vitro- Wachstum von Mammakarzinomzellen stimulieren und hohe, teils supraphysiologische Dosen das Tumorwachstum inhibieren (Bilal et al., 2014). Hsieh et al. beschrieben dosisabhängige Effekte des Genisteins bei MCF-7- Zellen. Niedrig dosiertes Genistein (<10nM) induzierte eine Steigerung der Proliferation, in hohen Konzentrationen (20 μ M) inhibierte es hingegen das Zellwachstum (Hsieh et al., 1998).

Richter et al. testeten den Einfluss phytoestrogenhaltiger Lein-Extrakte auf das Expressionsmuster von Hormonrezeptoren in MCF-7- Zellen. Korrelierend zu den vorgenannten Ergebnissen fanden sich konzentrationsabhängige Unterschiede in der Expression sowohl des ER α als auch des ER β (Richter et al., 2010). Derartige Änderungen der Rezeptorexpression bedeuten wiederum eine veränderte Sensitivität der Zellen auf rezeptormodulierende Substanzen wie Phytoestrogene. Dies wäre ein möglicher Erklärungsansatz für die Differenzen zwischen Kurz- und Langzeitwirkungen der Phytoestrogene in ER-positiven Zellen.

Die hier verwendeten Leinwurzelextrakte wirken sowohl in der hormonrezeptorpositiven Zelllinie MCF-7 als auch in der rezeptornegativen Zelllinie BT-20. Auch in früheren Arbeiten werden Phytoestrogen-induzierte antiproliferative Effekte auf Mammakarzinomzellen beschrieben, und zwar unabhängig vom ER- Status (Peterson and Barnes, 1996; Shao et al., 1998). ER-unabhängige Signalwege, wie die Beeinflussung antioxidativer Enzyme, der DNA-Topoisomerase oder von Rezeptortyrosinkinasen können auch in tripelnegativen Zellen potentiell wirksam sein (Akiyama et al., 1987; Markovits et al., 1989; Adlercreutz, 2003).

Die Samen der Leinpflanze sind ein wichtiger Lieferant für Ω -3-Fettsäuren (Obermeyer et al., 1995; Liggins et al., 2000; Kilkkinen et al., 2001; Peterson et al., 2010).

Vorangegangene Analysen der Leinwurzel bzw. ethanolischer Extrakte mit der Pyrolyse-Feldionisation-Massenspektrometrie aus der Arbeitsgruppe des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik zu Rostock erbrachten ebenfalls den Nachweis von Fettsäuren.

In zwei Arbeiten finden sich diese (nicht näher quantifiziert) in der Untergruppe der lipidhaltigen Bestandteile, welche zwischen 7,7% und 22,8% der ethanolischen Extrakte ausmachen (Theil, 2010; Dünow, 2012). In den nach Luyengi extrahierten Extrakten der Leinwurzel unterschiedlichen Alters machen freie gesättigte und ungesättigte Fettsäuren (n-C16 bis n-C34) anteilig zwischen 24,3% und 32,6% aus. In der Bewertung der Extraktwirkungen sind die enthaltenen Ω -3-Fettsäuren als potentielle wirksame Komponenten zu berücksichtigen.

Bei ovariectomierten immunkompetenten Mäusen reduzierte eine mit Ω -3-Fettsäuren angereicherte Diät die Tumorprogression von postmenopausalen Mammakarzinomen (Py230 Mammatumor-Zellen). Ω -3-Fettsäuren interagieren in vitro direkt mit Tumorzellen, indem sie die Zellproliferation inhibieren und gleichzeitig die Apoptose induzieren (Chung et al., 2015). Ein Review von Fabian et al. fasst Ergebnisse aus 95 Arbeiten zu Wirkungen der Ω -3-Fettsäuren zusammen. Insbesondere die Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) wurden als exzellente Kandidaten für die Primär- und Sekundärprävention von Mammakarzinomen bei Risikogruppen beschrieben (Fabian et al., 2015).

5.2.2.2 Einfluss auf benigne Zellen

Neben den Einflüssen phytoestrogenhaltiger Leinwurzelextrakte auf maligne Zellen stehen insbesondere die Wirkungen auf benigne Epithelien der Mamma im Fokus dieser Arbeit. Ein besonderes Augenmerk liegt hierbei auf Zellen, welche aus Brustdrüsengewebe mit fibrozystischer Mastopathie gewonnen wurden. Hierbei handelt es sich zwar um eine benigne Erkrankung der Brustdrüse, sie stellt jedoch eine sehr häufige prämenopausale Veränderung dar und ist für viele Frauen mit einem großen Leidensdruck verbunden (Klöppel et al., 2012). Weiterhin besteht bei eingeschlossenen proliferativen Veränderungen bzw. Atypien (Grad II/III nach Prechtel) ein gering gesteigertes Entartungsrisiko (Prechtel, 1991; Kabat et al., 2010).

Korrelierend zu epidemiologischen Daten für Mammakarzinome ist auch die Prävalenz der Mastalgie im asiatischen Raum signifikant niedriger (Rosolowich et al., 2006). Studien zu den Wirkungen der Phytoestrogene auf benigne Veränderungen der Brustdrüse wurden größtenteils mit Isoflavonen durchgeführt (Hargreaves et al., 1999; Wu et al., 2004; Lampe et al., 2007) und schließen häufig klinische Parameter ein.

In vitro-Studien, welche die Wirkungen der Phytoestrogene des Leins, also insbesondere der Lignane auf benigne Mammazellen untersuchen, sind in der Literatur bisher nicht verfügbar. Im Folgenden werden die Ergebnisse der jetzigen Arbeit im Kontext mit Daten aus der Literatur diskutiert und interpretiert.

Es wurden die Wirkungen der hergestellten Leinwurzelextrakte hinsichtlich Proliferation, Vitalität und zytotoxischem Potential bei drei benignen Mamma-Zelllinien getestet. Zwei Zelllinien entstammen einer Mamma mit histologisch nachgewiesener fibrozystischer Mastopathie: MCF-10A – ohne Nachweis proliferativer Veränderungen bzw. Atypien, MCF-12A – mit Nachweis proliferativer Veränderungen/ intraduktalen Hyperplasien. Die dritte Zelllinie (HMEC) ist eine Primärkultur benigner epithelialer Mammazellen ohne nachgewiesenes pathologisches Korrelat.

Der Leinwurzelextrakt nach Luyengi induzierte bei MCF-10A sowie bei den HMEC antiproliferative und vitalitätsinhibierende Wirkungen, vor allem durch Extraktkonzentrationen ab 500µg/ml .

Passend zu diesen Ergebnissen bestätigen Langzeituntersuchungen bei Patienten objektive und subjektive Phytoestrogen-assoziierte Effekte bei fibrozystischer Mastopathie. Diese gehen mit einem Rückgang der typischen Beschwerden und der Nodularität, aber auch mit szintigraphisch nachweisbaren Aktivitätsminderungen einher (Fleming, 2003).

Für die zyklische Mastalgie, die häufig mit der fibrozystischen Mastopathie assoziiert ist, gibt es Therapieempfehlungen, die eine vermehrte Aufnahme von Isoflavonen bzw. Leinsamen einschließen (Rosolowich et al., 2006).

Eine zunehmende Isoflavon-Zufuhr mit steigenden Plasmakonzentrationen von Genistein und Daidzein reduziert proliferative und nicht-proliferative fibrozystische Veränderungen der Brustdrüse (Lampe et al., 2007).

Die Arbeit von Wu et al. beschreibt einen direkten Zusammenhang zwischen der Aufnahme pflanzlicher Kost und einem verminderten Risiko für fibrozystische Erkrankungen der Brust, wobei hier Fälle mit und ohne Epithelproliferation bzw. Atypien eingeschlossen wurden. Sojabasierte Nahrungsmittel sind mit einem tendenziell sinkenden Morbiditätsrisiko assoziiert, vor allem für fibrozystische Mastopathien mit eingeschlossenen Atypien (Wu et al., 2004). Weiterhin erbrachten Fabian et al. den Nachweis einer mit Lignanenen assoziierten Reduktion des Ki-67- Proliferationsindex in benignen Brustdrüsengewebe von Risikopatientinnen (Fabian et al., 2010).

Besonders die durch den Luyengi-Extrakt induzierte antiproliferative Wirkung auf MCF-12A Zellen erscheint interessant, da diese aus einer Mamma mit fibrozystischer Mastopathie und eingeschlossenen intraduktalen Hyperplasien isoliert wurden (ATCC- MCF-12A). Bei diesem Zelltyp besteht ein gering erhöhtes Mammakarzinom- Risiko (bis 2-fach bei Klassifikation

Grad II nach Prechtel) (Prechtel, 1991). Deshalb könnte der Extrakt theoretisch sowohl mastopathische Veränderungen positiv beeinflussen als auch karzinopräventiv wirken.

Allerdings bleibt gerade in der rezeptorpositiven MCF-12A-Zelllinie die antiproliferative Wirkung des Mikrowellenextraktes aus. Möglicherweise treten die antiproliferativen Effekte im hyperplastischen Gewebe erst bei einer Langzeitapplikation auf. Für diese Vermutung spricht, dass sich die Reduktion des Ki-67- Proliferationsindex bei Hochrisikopatientinnen erst im Rahmen einer zwölfmonatigen Einnahme des Lignans SGD zeigt (Fabian et al., 2010). Zusätzlich ist auch die stoffwechselaktivierende Wirkung des Mikrowellenextraktes in den immortalisierten Zellen im Hinblick auf ein mögliches karzinogenes Potential kritisch zu hinterfragen.

Aufgrund der Wirkungen in den immortalisierten Zelllinien und der Primärkultur ist zu vermuten, dass auch in benignen Mammaepithelien die Wirkungen der Phytoestrogene nicht ausschließlich über Rezeptor-abhängige Wege vermittelt werden, denn viele der bereits beschriebenen Rezeptor-unabhängigen Signalwege sind auch in diesen Zelllinien prinzipiell zu vermuten (Simoncini et al., 2000; Bean et al., 2014; Vrtačnik et al., 2014).

Hohe Konzentrationen des Extrakts nach Luyengi induzierten in den immortalisierten Zelllinien (MCF-10A, MCF-12A) zytotoxische Effekte. Hingegen wirkte der Mikrowellenextrakt lediglich in der MCF-12A- Zelllinie schwach zytotoxisch. Das ist besonders im Hinblick darauf, dass es sich um benigne Zellen handelt, kritisch zu betrachten. In der Literatur finden sich ebenfalls in vitro-Untersuchungen, die durch Phytoestrogene induzierte zelltoxische Effekte zeigen. Genistein und Coumestrol wurden als wirksame Induktoren von DNA-Strangbrüchen unter Ausbildung von Mikronuklei mit azentrischen Fragmenten beschrieben, und zwar auch in benignen Zellen (kultivierte V79-Lungenfibroblasten chinesischer Hamster) (Kulling and Metzler, 1997). Die Übertragbarkeit einer in vitro erfassten Zytotoxizität auf in vivo-Vorgänge ist jedoch fraglich. Bei weiblichen C57BL6J-Mäusen wurden unter Behandlung mit Genistein im Vergleich zur Kontrollgruppe keine vermehrten Mikronuklei ausgebildet, d.h. es ergab sich kein Hinweis auf eine mögliche Zytotoxizität (Record et al., 1995). Auch in weiteren in vivo- Modellen mit oraler Phytoestrogenzufuhr wurden keine signifikanten toxischen Effekte bei den Versuchstieren beschrieben (Munro et al., 2003). Ob die in in vitro nachgewiesene Zytotoxizität methodenassoziiert ist bzw. ob sie auch bei einem größeren Gewebeverband nachweisbar wäre, ist schwer einzuschätzen. Die Identifizierung zytotoxizitätsmodulierender Faktoren in vivo und in vitro könnte jedoch Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

Die antiproliferative Wirkung beider Extrakte auf die Primärkultur benigner Mammaepithelien (HMEC) könnte einen potentiellen Ansatz in der Prävention des Mammakarzinoms darstellen. Es zeigte sich eine antagonistische Wirkung zum Tumorpromotor 17 β -Estradiol. Die sinkende Wahrscheinlichkeit für Replikationsfehler mit konsekutiver Steigerung der DNA-Reparaturmechanismen kann potentiell karzinoprotektiv wirken (Henderson and Feigelson, 2000).

Andere Arbeiten zeigen jedoch auch gegenteilige, schwach estrogene Effekte von Phytoestrogenen auf normales Brustdrüsengewebe (McMichael-Phillips et al., 1998; Hargreaves et al., 1999). So wies die Arbeitsgruppe um McMichael-Phillips eine gesteigerte Proliferation von Mammaepithelien sowie eine erhöhte Expression des Progesteron-Rezeptors nach 14-tägiger Isoflavon-Zufuhr nach (McMichael-Phillips et al., 1998).

Die Extrakt-induzierten Wirkungen auf benigne Zellen können jedoch auch durch andere bioaktive Substanzen in den Extrakten wie z.B. Ω -3-Fettsäuren moduliert werden (vergl. Kapitel 5.2.2.1).

5.3 Methodenkritik: Limitierende Faktoren und weiterführende Ansätze

Nach der Darstellung und Diskussion der Ergebnisse erfolgt nun die kritische Betrachtung der verwendeten Methoden bzw. Testverfahren. Mögliche Fehlerquellen und limitierende Faktoren innerhalb der Arbeitsschritte sollen aufgedeckt werden und so eine sachgerechte Interpretation der Ergebnisse ermöglichen. Aufbauend auf den Kritikpunkten wird auf mögliche weiterführende Ansätze bzw. alternative Methoden hingewiesen.

5.3.1 Zelllinien

Bei allen verwendeten Zelllinien (BT-20, MCF-7, MCF-10A, MCF-12A und HMEC) handelt es sich um adhärente epitheliale Monolayerkulturen. Die Zelllinie HMEC stellt dabei eine aus der Mamma gewonnene Primärkultur dar (Lonza- HMEC). Die weiteren verwendeten Zelllinien sind immortalisiert. Derartige Zelllinien werden über das Aussetzen von Mechanismen etabliert, die das Replikationspotential begrenzen, beispielsweise durch spontane Mutationen von Tumorsuppressoren, durch Gentransfektion oder durch das Einbringen viraler Proteine (Linder and Marshall, 1990; Katakura et al., 1998). Tumorzellen bzw. transformierte Zellen haben die Fähigkeit zur unbegrenzten Teilung über diese Mechanismen erworben (Schmitz, 2011). Die Vorteile immortalisierter Zelllinien bestehen in der nahezu unbegrenzten Verfügbarkeit und den vergleichsweise konstanten Eigenschaften. Jedoch führen die

Mechanismen, welche die Immortalisierung bedingen, zu erheblichen Änderungen in der Zellphysiologie, sodass sich teils deutliche Unterschiede im Vergleich zu den Primärzellen finden (May, 2005). Auch für die von mir genutzten immortalisierten Zellen ist dies zu berücksichtigen. Insbesondere gilt dies für die benignen Zelllinien (MCF-10A, MCF-12A), da die Primärzellen kein uneingeschränktes Replikationspotential haben.

Primärkulturen werden direkt aus dem Organismus entnommenen Zellen, Geweben oder Organen angelegt (Schmitz, 2011). Sie sind vergleichsweise leicht zu gewinnen und haben in vitro nahezu gleiche Eigenschaften wie in vivo, jedoch ergeben sich Unterschiede zwischen den Zellen verschiedener Passagen. Zudem haben sie sehr komplexe Ansprüche z. B. bei den Kulturmedien. Ein weiterer Nachteil primärer Zellkulturen ist das begrenzte Replikationspotential mit konsekutiver kurzer Lebensdauer in vitro. Diese Eigenschaften sind die Begründung dafür, dass mit der Primärkultur HMEC nur wenige Testansätze durchgeführt wurden. Die Wiederholung der fehlerhaften LDH- Zytotoxizitätstests war aufgrund der eingeschränkten Verfügbarkeit des Zellmaterials nicht möglich.

Die den Testserien vorausgehende optische Zellzählung in der Zählkammer stellt einen Versuch der Standardisierung der Zellzahl dar, kann jedoch als potentielle Fehlerquelle (Variationskoeffizient >10%) Auswirkungen auf alle weiteren Arbeitsschritte haben (Gstraunthaler and Lindl, 2013). So führt beispielsweise eine ungenügende Durchmischung der Zellsuspension zu Fehlern in der Quantifizierung. Daraus resultierende Abweichungen in der Zellkonfluenz können das Teilungsverhalten, insbesondere nach Zugabe der Testsubstanzen, beeinflussen und so Ergebnisse verzerren. Eine exaktere Alternative wäre die Zellzählung mit elektronischen Zählgeräten. Diese Messungen basieren überwiegend auf dem Erfassen elektrischer Widerstandsänderungen oder erfolgen durch eine digitale Bildanalyse des Zellmaterials (Müller and Müller, 2002).

Mit in vitro-Arbeiten an Zelllinien ist ein guter Überblick über Auswirkungen verschiedener Wirkstoffe auf die getesteten Zellen möglich. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf das Ursprungsgewebe ist jedoch häufig erheblich eingeschränkt. Beispielsweise stellen die Zellverbände des Stroma wichtige Regulatoren in der Entwicklung und Differenzierung des Mammaepithels dar (Howard and Lu, 2014). Weiterhin sind diese Zellsysteme ein wichtiger Faktor in der Pathogenese der fibrozystischen Mastopathie. Die Stromafibrose mit konsekutiver Sekretretention und Dilatation der Drüsenlumina ist ein entscheidender pathomorphologischer Befund, auf dem auch die klinische Symptomatik beruht (Bubendorf et al., 2010). Auch in der Pathogenese des Mammakarzinoms spielen stroma-epitheliale Interaktionen eine entscheidende Rolle (Oh et al., 2015). Dreidimensionale Zellkulturen könnten als

weiterführender Untersuchungsansatz diese Problematik auffangen. Sie zeigen eine höhere Analogie zu ihrem Ursprungsgewebe, auch Kokulturen zur Untersuchung von Interaktionen sind denkbar (Breslin and O'Driscoll, 2013).

Wie bereits erwähnt, wurden in in vitro- und in vivo-Studien teils divergierende Effekte der Phytoestrogene beschrieben. In vitro ergaben sich dosisabhängige, entgegengesetzte Wirkungen, teilweise auch stimulierende Effekte auf Karzinomzellen (Hsieh et al., 1998; Dixon, 2004; Bilal et al., 2014). Hingegen zeigen sich in Tierversuchen karzinoprotektive Effekte, insbesondere hinsichtlich Mammatumoren (Santell et al., 2000; Adlercreutz, 2003). Die direkte Applikation von Vielstoffgemischen auf Zellsysteme umgeht den wichtigen Faktor der Bioverfügbarkeit einzelner Substanzen und deren Metabolisierung in vivo. Ausblickend wären daher weitergehende Untersuchungen zu den Wirkungen der Vielstoffgemische aus der Leinwurzel auf komplexere Systeme notwendig.

5.3.2 Kolorimetrische Testverfahren

Die verwendeten photometrischen Testverfahren (BrdU, MTT, LDH) dienen der Beurteilung der Zellfunktion bzw. Zellpermeabilität und geben somit Hinweise auf Parameter wie Integrität der Zellmembran, Energiestoffwechsel und proliferative Aktivität. Mit der Durchführung auf 96 Well-Platten ermöglichen sie die Bewältigung großer Testserien, insbesondere für adhärente Zellen. Somit wird ein guter Überblick über verschiedene Parameter des Zellmetabolismus zugelassen und es lassen sich die Effekte verschiedener Testsubstanzen auf die Zelllinien vergleichen. Im Rahmen des Testverlaufs können jedoch methodische Fehler die Testergebnisse beeinflussen. So können verschiedene Faktoren eine zum Teil hohe Schwankungsbreite der Ergebnisse begünstigen.

- Für die Testreihen wurde eine möglichst homogene Aussaat der Zellen in den Wells angestrebt. Dennoch können qualitative Unterschiede in der Durchmischung der Zellsuspension nicht endgültig ausgeschlossen werden. Eine unregelmäßige Aussaat der Zellen in 96 Well-Platten führt wiederum zu einer vermehrten Streuung der Testergebnisse, wie sie insbesondere in den MCF-7-Testreihen zu verzeichnen waren. Auch eine ungenügende Durchmischung der Extrakte, mit konsekutiver Änderung des Feststoffgehaltes im Testfeld kann größere Streuweiten der Ergebnisse bedingen.
- Unterschiede im Pipettivorgang, Variationen der Inkubationszeit und Zellschäden durch die Trypsinierung können größere Schwankungsbreiten verursachen.

Da insbesondere die Versuchsreihen mit dem Mikrowellenextrakt ausgeprägte Schwankungsbreiten zeigen, ist davon auszugehen, dass auch Verteilungsunterschiede der Extrakte im Lösungsmittel bestehen.

Weiterhin können objektive limitierende Faktoren, die nicht dem Einfluss des Experimentators unterliegen, beschrieben werden.

Die im LDH- Zytotoxizitätstest nachgewiesene Lactatdehydrogenase ist ein hochmolekulares Enzym mit einem Molekulargewicht von ca. 140 kDa. Damit kann es erst im extrazellulären Milieu gemessen werden, wenn eine deutliche Schädigung der Membranintegrität eingetreten ist (Schmitz, 2011). Eine initiale Fragilität der Zellmembran ist mit dem Verfahren nicht nachzuweisen.

Kolorimetrische Tests beurteilen zudem lediglich den Zustand der Zellen zum Zeitpunkt der Messung. Eine Einschätzung metabolischer Vorgänge über ein zeitliches Intervall ist nicht möglich (Gstraunthaler and Lindl, 2013).

Insbesondere für den MTT- Test sind Einschränkungen in der Testdurchführung bzw. Auswertung bekannt. Diese schließen Mängel in der Testsensitivität, ausgeprägte Streuweiten der Ergebnisse und chemische Interferenzen ein. Als alternative Verfahren werden beispielsweise XTT- Tests (Tetrazoliumsalz, das in Anwesenheit eines Elektronenüberträgers zu einem farbigen Formazan reduziert wird), der Neutralrotest (NRU- Test) und ATP- Testserien angeführt (Riss, 2014; van Tonder et al., 2015). Alternativ kann die proliferative Aktivität von Zellen im Rahmen immunoreaktiver Verfahren erfolgen. Beispielsweise ist der Ki-67 Proliferationsindex ein häufig verwendeter immunhistochemischer Marker und findet auch im Rahmen der Immunzytochemie Anwendung (Scott et al., 1991; Inwald et al., 2013). Weiterführend lässt sich die Zellproliferation auch in vivo erfassen. Möglich wäre dies im Rahmen der (F-18)FLT-Positronenemissionstomografie (Shields et al., 1998).

Phytoestrogene konkurrieren mit den Estrogenen an den Hormonrezeptoren (Anderson et al., 1999; Bilal et al., 2014). Neben den eigenen induzierten Wirkungen modulieren sie somit auch die Wirkungen der Estrogene. Für weiterführende Arbeiten wäre es deshalb interessant, Interaktionen bei den Wirkungen beider Substanzgruppen zu erfassen.

5.3.3 Extrakte (*Extraktionsmethoden, Lagerungsstabilität und Extraktanalytik*)

Die beiden verwendeten Leinwurzelextrakte weisen sowohl im Extraktionsverfahren als auch in der Zusammensetzung deutliche Unterschiede auf. Die bereits im Kapitel „5.1 Extrakte im Vergleich“ angeführten Vergleiche und Kritikpunkte werden in diesem Kapitel lediglich kurz angeführt und zusammenfassend diskutiert. Ergänzend werden bisher noch nicht aufgegriffene

Kritikpunkte und die Ergebnisse der kolorimetrischen Testverfahren in die Diskussion mit einbezogen.

Sowohl die Extraktion nach Luyengi als auch die Mikrowellenextraktionstechnik werden in der Literatur als geeignete Verfahren zur Extraktion sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe beschrieben (Luyengi et al., 1996; Tatke and Jaiswal, 2011; Chemat and Cravotto, 2013). Betrachtet man allein das Herstellungsverfahren, sprechen zahlreiche Faktoren für eine Präferenz der Extraktion mit Mikrowellen. Sie stellt ein zeit- und kostensparendes Verfahren dar und erlaubt Extraktionen unter standardisierten Bedingungen. Zeit- und Temperatureinstellungen lassen sich normieren, und auch der niedrige Lösungsmittelverbrauch sprechen für dieses Verfahren (Kaufmann and Christen, 2002; Tatke and Jaiswal, 2011; Chemat and Cravotto, 2013).

Die Koch-Rückfluss-Methode nach Luyengi ist dagegen durch einen hohen Arbeitsaufwand und eine vergleichsweise lange Herstellungsphase gekennzeichnet, die u.a. durch die ausgedehnten Trockenzeiten bedingt ist. Weiterhin ist der Verbrauch an Lösungsmitteln hoch. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der photometrischen Tests ist der Mikrowellenextrakt jedoch nicht uneingeschränkt zu präferieren. Die mit hohen Testkonzentrationen des Mikrowellenextraktes induzierte Steigerung der Stoffwechselaktivität in MCF-12A-Zellen und insbesondere die Proliferationssteigerung in MCF-7-Tumorzellen sind kritisch zu hinterfragen. Eine Steigerung der Zellproliferation in der MCF-7-Zelllinie durch diesen Extrakt konnte bereits in vorhergehenden Untersuchungen nachgewiesen werden, wobei sich ein Zusammenhang mit einer langen Lagerung (11 Monate) des Extraktes darstellte (Oppermann, 2012).

Die LC-MS-Analysen zeigen, dass es sich bei beiden Extrakten um Vielstoffgemische mit zahlreichen, in unterschiedlicher Intensität abgrenzbaren Einzelsubstanzen handelt. Wie im Kapitel 4.3 beschrieben, ist der Wurzelextrakt nach Luyengi dabei um den Faktor 3,97 geringer konzentriert als der Mikrowellenextrakt. Dieses Ergebnis ist jedoch methodisch zu hinterfragen. Es ist davon auszugehen, dass der gemessene NL-Wert für den Wurzelextrakt nach Luyengi aufgrund des messtechnisch bedingten Filtrivorganges deutlich unter dem Wert des eigentlichen Testextraktes liegt.

Die genaue Beurteilung der Extraktwirkungen setzt qualitative und quantitative Kenntnisse der Inhaltsstoffe voraus. Identifizierung und Quantifizierung der Einzelsubstanzen sowie deren Schwankungsbreite im jeweiligen Vielstoffgemisch stellen eine große Herausforderung dar. Damit sind in Zukunft weitere Extraktanalysen mit massenspektrometrischen Methoden (z. B. LC/MS) erforderlich. Auch eine Erweiterung der analytischen Methoden wäre denkbar, da sich unter Anwendung anderer Verfahren (ID-GC-MS-SIM), im Rahmen der vergleichenden

Phytoestrogenanalyse getrockneter Lebensmittelproben, bis zu fünffach höhere Messwerte einzelner Phytoestrogene ergeben. (Adlercreutz, 1999).

Sinnvoll wäre weiterhin die Untersuchung von Leinwurzel-Mikrowellenextrakten mit der Pyrolyse-Feldionisation Massenspektrometrie (Py-FIMS). Die Ergebnisse könnten quantitative Unterschiede zu den bereits im Luyengi- Wurzelextrakt nachgewiesenen Substanzklassen erfassen.

Bei Betrachtung der Zelltests finden sich teils ausgeprägte Spannweiten der Ergebnisse. Für diese gibt es verschiedene potentielle Erklärungsansätze. Eine mögliche Ursache liegt im zeitlichen Intervall der Testserien. Für Mikrowellenextrakte ergeben sich Hinweise auf eine Lagerungsinstabilität, wobei Substanzen mit großen Massen in kleinere Fragmente zerfallen. Korrelierend dazu konnten auch Veränderungen der Extraktwirkungen auf MCF-7-Zellen in Abhängigkeit vom Alter des Extraktes nachgewiesen werden (Oppermann, 2012). Es ist anzunehmen, dass derartige Vorgänge auch im Extrakt nach Luyengi stattfinden. Zwar wurden die Verdünnungsserien in regelmäßigen Abständen neu angesetzt, endgültig ausschließen lassen sich Zerfallsprozesse jedoch dadurch nicht.

Neben den von mir verwendeten Extraktionsverfahren gibt es zahlreiche weitere Möglichkeiten, Inhaltsstoffe aus Pflanzenmaterialien zu lösen. Zum Beispiel stellt die Herstellung eines wässrigen Extraktes eine vergleichsweise einfache Extraktionsmethode dar. In einer vorhergehenden Untersuchung wurde die Herstellung eines wässrigen Extraktes als effektives Verfahren zum Lösen von Phytoestrogenen beschrieben. Der mit diesem Verfahren hergestellte Extrakt enthielt eine Lignanfraktion (Py-FIMS) von 2,4% (Eczko, 2015). Dies entspricht in etwa der Lignanfraktion von Leinwurzel-Luyengi-Extrakten früherer Untersuchungen (Theil, 2010; Dünow, 2012). Mazur et al. beschreiben Tee (vor allem schwarze und grüne Teesorten), d.h. wässrige Extrakte, als relativ reiche Quelle für Lignane (Mazur et al., 1998).

5.4 Weitere potentielle Einflüsse auf hormonabhängige Erkrankungen

Neben dem Hinterfragen der Methodik und dem Aufdecken praktischer Fehler ist es wichtig, sich mit den grundlegenden theoretischen Aspekten einer wissenschaftlichen Arbeit kritisch auseinanderzusetzen.

In der Medizin gibt es nur selten einen problemorientierten Lösungsansatz. Viel häufiger wirken zahlreiche Faktoren gemeinsam und beeinträchtigen bzw. potenzieren sich in ihrer Wirkung.

Im Folgenden wird deshalb die theoretische Grundlage, auf der meine Arbeit beruht, hinterfragt und weitere mögliche Lösungsansätze diskutiert. Dies soll einen umfassenderen Blick auf die Problematik zulassen und die Möglichkeit geben, die Erkenntnisse im Kontext zu betrachten.

Das wissenschaftliche Interesse an Phytoestrogenen beruht in großen Teilen auf epidemiologischen Erkenntnissen. Nachweislich besteht eine ungleiche Verteilung verschiedener hormonabhängiger Erkrankungen (insbesondere des Mammakarzinoms) zwischen dem asiatischen Raum und den westlichen industrialisierten Ländern (Ziegler et al., 1993; Ferlay et al., 2001). Dieses Ungleichgewicht wird in vielen Arbeiten auf die sojareiche/phytoestrogenhaltige Ernährung in asiatischen Ländern zurückgeführt (Nagata et al., 1997; Wu et al., 1998). Es werden jedoch auch weitere Faktoren in Bezug auf das epidemiologische Ungleichgewicht hormonabhängiger Erkrankungen diskutiert.

Diätetische Erklärungsansätze stehen in diesen Arbeiten ebenfalls häufig im Mittelpunkt. Asiatische Diäten beruhen nicht nur auf einem hohen Anteil sojabasierter Lebensmittel. Auch das sogenannte „Seafood“ nimmt in der Ernährung dieser Länder einen großen Stellenwert ein. So gehören in Japan, aber auch in Südkorea und China Algen traditionell zur täglichen Ernährung, d.h. 45%- 75% der Lebensmittel enthalten dort Algen. Studien weisen für Algen in Kombination mit sojabasierten Nahrungsmitteln synergistische Tumor-protective Wirkungen auf (Yang et al., 2010; Hees, 2015). Diese werden beispielsweise durch eine gesteigerte Metabolisierung der Estrogene über den 2-Hydroxyestrogen-Weg (2 OHE) oder eine deutlichere Reduktion des IGF-1, eines Wachstumshormons, erzielt (Hees, 2015).

Die fisch- und meeresfrüchtereiche Diät Asiens liefert zusätzlich große Mengen Vitamin D (Adlercreutz, 2002). Zahlreiche Studien belegen eine Korrelation zwischen einer bedarfsgerechten Vitamin-D-Aufnahme und einem geringeren allgemeinen Krebsrisiko (Garland et al., 2006; Walentowicz-Sadlecka et al., 2013).

Auch Ω -3-Fettsäuren können die epidemiologischen Unterschiede in der Inzidenz verschiedener Tumorerkrankungen mitbedingen. Die fischreiche Ernährung der Japaner bildet eine wichtige Nahrungsquelle für Ω -3-Fettsäuren, insbesondere für die Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA). Beide werden als wirksame Komponenten in der Primär- und Sekundärprävention des Mammakarzinoms diskutiert (Fabian et al., 2015).

Neben ernährungsassoziierten Aspekten werden weitere modulierende Faktoren bezüglich hormonabhängiger Erkrankungen diskutiert. So nimmt auch das Körpergewicht Einfluss auf die Pathogenese hormonabhängiger Erkrankungen. Eine Adipositas weiblicher Probandinnen

ist mit niedrigeren Plasma-Enterolaktongspiegeln assoziiert, ebenso ein Nikotinabusus (Kilkinen et al., 2001).

Die Prävalenz der Adipositas ist in großen Teilen Asiens signifikant geringer als in Europa oder den USA (Ahima, 2011).

Im HALE-Projekt wurden Daten aus 2 europäischen Kohortenstudien zusammengefasst. Dabei wurde über einen Zeitraum von 10 Jahren der Einfluss einer Mittelmeerdiät, des Nichtrauchens, eines mäßigen Alkoholgenusses und einer täglichen 30-minütigen Bewegungseinheit auf die Überlebensrate und Karzinogenese 70- bis 90-Jähriger Probanden untersucht. Alle genannten Faktoren waren mit einer signifikant niedrigeren Mortalität assoziiert, wobei sich bei gleichzeitigem Vorliegen aller protektiven Faktoren der günstigste Einfluss auf die Karzinogenese (Reduktion bis 60% der Tumorerkrankungen) ergab (Knoops et al., 2004).

Es wird zudem schon länger diskutiert, dass sich kanzeroprotektive Wirkungen pflanzlicher Nahrungsmittel kaum auf einzelne Inhaltsstoffe zurückführen lassen. Vielmehr dürften sich positive Effekte einzelner Bestandteile addieren oder sogar potenzieren und so das Krebsrisiko modulieren (Jenik and van Leendert, 2002).

5.5 Phytoestrogenhaltige Leinwurzelextrakte – ein Ansatz in der Prävention und Behandlung hormonabhängiger Erkrankungen der Mamma?

Primärprävention soll das Auftreten von Krankheiten vor ihrem Ausbruch verhindern. Sie schließt Konzepte, Programme und Maßnahmen zur Sicherung der Gesundheit und Verhütung von Krankheiten ein (Buser et al., 2003). Dies erfolgt beispielsweise im Rahmen der Ernährung. Pflanzen, Pflanzenteile und deren Inhaltsstoffe mit möglicher z. B. antikanzero gener bzw. gesundheitsfördernder Wirkung werden unter dem Begriff der „dietary phytochemicals“ zusammengefasst. Sie können als Nahrung, Nahrungsergänzungsmittel oder auch als Grundlage für Medikamente genutzt werden und so als Instrument der Primärprävention und der Therapie dienen (Kreis, 2009).

Isoflavon-haltige Präparate auf der Basis von Soja oder Rotklee finden sich bereits auf dem Markt, werden jedoch kontrovers diskutiert. Sie werden als Nahrungsergänzungsmittel oder diätetische Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke angeboten und richten sich insbesondere an die Zielgruppe (post)menopausaler Frauen (Dixon, 2004; Eisenbrand, 2006).

Auch die Leinpflanze enthält zahlreiche potentiell gesundheitsfördernde Inhaltsstoffe, insbesondere die Lignane, und könnte somit als mögliche Grundlage für präventive bzw. therapeutische Diätetika betrachtet werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen antiproliferativen Effekte der Leinwurzelextrakte auf Mammarkarzinomzellen und Zellen der fibrozystischen Mastopathie lassen durchaus an therapeutische Ansätze denken. Dies gilt insbesondere für den Luyengi- Extrakt, der in allen Zelllinien antiproliferative Eigenschaften zeigte. Insbesondere die antiproliferative Wirkung auf die Primärzellen (HMEC) und die MCF-12A- Zelllinie können potentielle Akteure im Rahmen der Primärprävention darstellen.

Da die Leinwurzel keine diätetische Bedeutung besitzt, können die Extrakte jedoch lediglich als mögliche Basis für Nahrungsergänzungsmittel bzw. Phytopharmaka diskutiert werden. Isolierte Lignane bzw. lignanangereicherte Produkte sind derzeit noch nicht auf dem Markt vertreten (Eisenbrand, 2006).

Für eine derartige Verabreichung wäre jedoch zu bedenken, dass jeder Effekt eines Wirkstoffes in vivo starken interindividuellen Unterschieden unterliegt. Weiterhin wirken auf den Organismus zahlreiche äußere Einflüsse, welche potentielle Wirkungen modulieren. Wie bereits im Abschnitt Methodenkritik erwähnt, ist eine Beurteilung dieser Faktoren im Rahmen von in vitro-Versuchen nur sehr begrenzt möglich. Daher wird im Folgenden kurz auf modulierende Faktoren eingegangen und so für mögliche Probleme in der Umsetzbarkeit sensibilisiert.

Nutritive Faktoren können im Organismus Einfluss auf den Stoffwechsel von Phytoestrogenen nehmen. Dies wurde im Rahmen verschiedener Studien nachgewiesen (Musey et al., 1995; Ha et al., 2006). Bei Schimpansen wurde der Einfluss verschiedener Diäten auf die renale Ausscheidung von Phytoestrogenen und deren Derivaten geprüft. Eine fettreiche Diät reduziert die Ausscheidung der Phytoestrogene um mehr als 90% (Musey et al., 1995).

Es ist weitgehend unklar, welche Plasma- und Gewebespiegel nach Aufnahme phytoestrogenhaltiger Nahrungsergänzungsmittel erreicht werden. Auch die Beeinflussung der Gewebespiegel durch die Zusammensetzung der einzelnen Komponenten ist nicht abschließend geklärt (Eisenbrand, 2006). Bei Ratten applizierten Coldham et al. radioaktiv markiertes Genistein und verglichen die Fraktionen im Plasma und verschiedenen Geweben. In Geweben, beispielsweise der Brustdrüse, fand sich ein signifikant höherer Anteil an freiem Genistein als im Plasma (49% : 5%) (Coldham et al., 2002).

Repräsentative Studien zur Metabolitenverteilung in Geweben und potentiellen Zielorganen von Menschen existieren derzeit nicht. Die Diskrepanz zwischen den gemessenen Plasmaspiegeln und der möglichen Aufsättigung in verschiedenen Geweben stellt eine große Hürde in der Beurteilbarkeit der Sicherheit möglicher phytoestrogenhaltiger Diätetika oder Therapeutika dar.

Ein großes Problem in der Beurteilbarkeit nutritiver Phytoestrogen-Wirkungen besteht zudem in der interindividuell abweichenden Fähigkeit zur Metabolisierung der Phytoestrogene. Japanische Erwachsene und Vegetarier sind deutlich häufiger in der Lage, aus pflanzlichen Isoflavonen Equol zu produzieren. Ursächlich dafür soll die Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms sein (Setchell and Cole, 2006). Die enterale Aufnahme der Lignane und deren Metabolisierung im Organismus unterliegen ebenfalls großen interindividuellen Unterschieden. Auch diese Unterschiede werden durch die individuell spezifische Zusammensetzung der intestinalen Mikroflora begründet (Adlercreutz, 2002).

6 Zusammenfassung und Ausblick

Hormonabhängige Erkrankungen der Mamma sind in Deutschland häufige Befunde in der gynäkologischen Praxis. So ist die fibrozystische Mastopathie mit einer Prävalenz von 30-50% jenseits des 30. Lebensjahres eine sehr häufige Veränderung der Brustdrüse prämenopausaler Frauen. Das Mammakarzinom ist mit Abstand die häufigste Krebserkrankung deutscher Frauen, jährlich sterben daran etwa 19 000 Frauen.

Phytoestrogenen, welche reichlich in Sojaprodukten vorkommen, werden protektive Wirkungen auf hormonabhängige Erkrankungen der Mamma zugeschrieben. In unseren Breiten stellt die Leinpflanze eine Hauptnahrungsquelle für Phytoestrogene, insbesondere die Lignane, dar.

Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung phytoestrogenhaltiger Leinwurzelextrakte auf das Teilungsverhalten, die Vitalität und Toxizität von Zelllinien der Mamma unterschiedlicher Dignität zu erfassen, um Rückschlüsse auf potentielle (karzino)präventive bzw. therapeutische Ansätze ziehen zu können. Weiterhin sollten die verwendeten Extrakte im Hinblick auf die Extraktionsverfahren, die Zusammensetzung und ihre zellbiologischen Wirkungen vergleichend betrachtet werden.

Die Herstellung der Extrakte erfolgte im Rahmen zweier unterschiedlicher Verfahren, der Mikrowellenextraktion und der Koch-Rückflussmethode nach Luyengi, die Analyse der Extraktzusammensetzung durch eine Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS).

Verwendet wurden zwei Mammakarzinomzelllinien (BT-20, MCF-7), zwei Zelllinien aus der fibrozystischen Mastopathie (MCF-12A, MCF-10A) und eine benigne Primärkultur epithelialer Zellen aus der Mamma (HMEC).

Die Proliferation, Vitalität und zytotoxische Effekte wurden im Rahmen von BrdU-, MTT- und LDH Testserien, jeweils nach Zugabe der Extrakte in aufsteigenden Konzentrationsreihen und der Kontrollsubstanzen (Tamoxifen, 17 β -Estradiol) erfasst.

Sowohl die Mikrowellenextraktion als auch die Extraktion nach Luyengi sind geeignete Verfahren zur Extraktion von Phytoestrogenen. Rein verfahrenstechnisch ist die Mikrowellenextraktion zu präferieren, da diese das ökonomisch effizientere Verfahren darstellt. Die Ergebnisse der LC/MS zeigen, dass es sich bei beiden Extrakten um Vielstoffgemische mit

zahlreichen Einzelsubstanzen handelt. Um standardisierte Aussagen zur genauen Zusammensetzung der Extrakte treffen zu können, sind jedoch weitere Analysen notwendig. Beide Leinwurzelextrakte induzieren Änderungen im Zellteilungsverhalten und der Zellvitalität, sowohl in benignen als auch malignen Zellen. Diese Wirkungen lassen sich unabhängig vom Hormonrezeptorstatus der jeweiligen Zelllinie nachweisen, sodass für die bioaktiven Inhaltsstoffe auch rezeptorunabhängige Signalwege zu erwarten sind.

Insbesondere der Extrakt nach Luyengi zeigt in hohen Testkonzentrationen zytotoxische Effekte in den benignen und malignen immortalisierten Mammazellen. Eine Übertragbarkeit der *in vitro* erfassten Zytotoxizität auf *in vivo*- Vorgänge muss in weiterführenden (tierexperimentellen) Studien geprüft werden. Hohe Testkonzentrationen des Luyengi-Leinwurzelextrakts induzieren in den immortalisierten Zellen unterschiedlicher Dignität antiproliferative und vitalitätsinhibierende Effekte. Er scheint daher ein therapeutisches bzw. protektives Potential für hormonabhängige Erkrankungen der Mamma zu besitzen. Da er auch in der benignen Primärkultur von Mammaepithelzellen antiproliferativ wirkt und gleichzeitig nur wenig Einfluss auf die Zellvitalität nimmt, können auch primärpräventive Effekte bezüglich des Mammakarzinoms angenommen werden.

Der Mikrowellenextrakt induziert in der benignen Primärkultur und in den rezeptornegativen immortalisierten Zellen ähnliche positive Effekte wie der Leinwurzelextrakt nach Luyengi. Jedoch wurden nach Zugabe hoher Extraktkonzentrationen eine gesteigerte Zellproliferation in ER-positiven Mammakarzinom-Zellen und stoffwechselaktivierende Wirkungen in Zellen der fibrozystischen Mastopathie nachgewiesen. Diese Wirkungen sind in Bezug auf ein mögliches karzinogenes Potential kritisch zu hinterfragen und machen weiterführende Untersuchungen, beispielsweise *in vivo*-Proliferationsassays, erforderlich.

In der Zusammenschau scheint vor allem der Extrakt nach Luyengi ein protektives Potential für hormonabhängige Erkrankungen der Mamma zu besitzen. Insbesondere die möglichen karzinopräventiven Eigenschaften machen ihn für weiterführende Untersuchungen interessant. Diese sollten auch einen Fokus auf die Interaktionen der Extrakte mit 17 β -Estradiol als potentem Karzinogen legen.

7 Thesen

1. Hormonabhängige Erkrankungen der Mamma, wie das Mammakarzinom oder die fibrozystische Mastopathie, stellen in Deutschland häufige Befunde in der gynäkologischen Praxis dar.
2. Sowohl für das Mammakarzinom als auch für die fibrozystische Mastopathie besteht in asiatischen Ländern eine weitaus geringere Prävalenz, dieses Phänomen wird auf die sojahaltige und somit phytoestrogenreiche Kost Asiens zurückgeführt.
3. Für zahlreiche Phytoestrogene werden antikanzerogene Effekte bzw. protektive Wirkungen auf hormonabhängige Erkrankungen der Mamma beschrieben.
4. Phytoestrogene haben aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu 17β -Estradiol die Fähigkeit, als Liganden an Estrogenrezeptoren α - und β zu binden und anschließend als Estrogenrezeptor-modulierende Substanzen zu agieren.
5. In unseren Breiten ist die Leinpflanze (*Linum usitatissimum*) die reichhaltigste Nahrungsquelle für Phytoestrogene, insbesondere für die Untergruppe der Lignane.
6. Sowohl die Mikrowellenextraktion als auch die Extraktion nach Luyengi sind geeignete Verfahren zur Extraktion von Phytoestrogenen aus der Leinwurzel.
7. Die LC/MS Analysen zeigen, dass es sich bei beiden Extrakten um Vielstoffgemische mit zahlreichen, in unterschiedlicher Intensität abgrenzbaren Einzelsubstanzen handelt.
8. Die Extrakte wirken in benignen und malignen Mamma- Zelllinien unabhängig vom Hormonrezeptorstatus.

9. Insbesondere der Extrakt nach Luyengi hat in hohen Testkonzentrationen zytotoxische Effekte in benignen und malignen immortalisierten Mammazellen.
10. In Zellen der fibrozystischen Mastopathie und in Mammakarzinom-Zellen induzieren hohe Testkonzentrationen des Luyengi- Leinwurzelextrakts antiproliferative und vitalitätsinhibierende Effekte, während in der benignen Primärkultur hauptsächlich antiproliferative Wirkungen zu verzeichnen sind
11. In der Primärkultur und in den Rezeptor- negativen Zelllinien hat der Mikrowellenextrakt ähnlich positive Wirkungen wie der Extrakt nach Luyengi, jedoch lassen sich teils proliferative Effekte in ER- positiven Mammakarzinom-Zellen nachweisen, und auch die Stoffwechselaktivität immortalisierter ER-positiver Zellen aus der fibrozystischen Mastopathie wird partiell gesteigert. Das proliferative Wirkspektrum des Mikrowellenextraktes in Rezeptor- positiven immortalisierten Zelllinien unterschiedlicher Dignität, macht im Hinblick auf ein mögliches karzinogenes Potential weiterführende Untersuchungen, beispielsweise in vivo- Proliferationsassays, erforderlich.
12. Insbesondere der Leinwurzelextrakt nach Luyengi sollte aufgrund seiner möglichen protektiven Eigenschaften weiter auf ein präventives und auch therapeutisches Potential untersucht werden, wobei künftige Testserien auch metabolische Interaktionen und Interaktionen mit den Estrogenen berücksichtigen sollten.

8 Literaturverzeichnis

Abarzua, S., Szewczyk, M., Gailus, S., Richter, D.-U., Ruth, W., Briese, V., and Piechulla, B. (2007). Effects of Phytoestrogen Extracts from *Linum usitatissimum* on the Jeg3 Human Trophoblast Tumour Cell Line. *Anticancer Research* 27: 2053-2058 (2007), 2053-2058.

Abbasalipourkabir R., Salehzadeh A., and Abdullah R. (2013). In vitro investigations on the toxicity induced by tamoxifen and tamoxifen- loaded solid lipid nanoparticles on two breast cancer cell types. *Avicenna Journal of Medical Biochemistry* 1, 36-40.

Adlercreutz, H. (1995). Phytoestrogens: epidemiology and a possible role in cancer protection. *Environ. Health Perspect.* 103 Suppl 7, 103-112.

Adlercreutz, H. (2002). Phyto-oestrogens and cancer. *Lancet Oncol.* 3, 364-373.

Adlercreutz, H. (2003). Phytoestrogens and breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 83, 113-118.

Adlercreutz, H., Bannwart, C., Wähälä, K., Mäkelä, T., Brunow, G., Hase, T., Arosemena, P.J., Kellis, J.T., and Vickery, L.E. (1993). Inhibition of human aromatase by mammalian lignans and isoflavonoid phytoestrogens. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 44, 147-153.

Adlercreutz, H., Höckerstedt, K., Bannwart, C., Bloigu, S., Hämäläinen, E., Fotsis, T., and Ollus, A. (1987). Effect of dietary components, including lignans and phytoestrogens, on enterohepatic circulation and liver metabolism of estrogens and on sex hormone binding globulin (SHBG). *Journal of Steroid Biochemistry* 27, 1135-1144.

Adlercreutz, H., Mazur, W., Bartels, P., Elomaa, V., Watanabe, S., Wähälä, K., Landström, M., Lundin, E., Bergh, A., and Damber, J.E., et al. (2000). Phytoestrogens and prostate disease. *J. Nutr.* 130, 658-659.

Ahima, R.S. (2011). Digging deeper into obesity. *The Journal of clinical investigation* 121, 2076-2079.

Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M., and Fukami, Y. (1987). Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *The Journal of biological chemistry* 262, 5592-5595.

Anderson, J.J., Anthony, M., Messina, M., and Garne, S.C. (1999). Effects of phyto-oestrogens on tissues. *Nutrition research reviews* 12, 75-116.

ATCC- BT20. BT-20 ATCC ® HTB-19™ Homo sapiens mammary gland/breast carc.
http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-19.aspx?geo_country=de#generalinformation. 11.02.2014.

ATCC- MCF-12A. MCF-12A ATCC ® CRL-10782™ Homo sapiens mammary gland; breas.
<http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-10782.aspx#specifications>. 11.02.2014.

ATCC- MCF-7. MCF7 ATCC ® HTB-22™ Homo sapiens mammary gland/breast; deriv.
http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-22.aspx?geo_country=de. 11.02.2014.

Baral, E., Nagy, E., and Berczi, I. (1995). Modulation of natural killer cell-mediated cytotoxicity by tamoxifen and estradiol. *Cancer* 75, 591-599.

Basch, E., Bent, S., Collins, J., Dacey, C., Hammerness, P., Harrison, M., Smith, M., Szapary, P., Ulbricht, C., and Vora, M., et al. (2007). Flax and flaxseed oil (*Linum usitatissimum*): a review by the Natural Standard Research Collaboration. *Journal of the Society for Integrative Oncology* 5, 92-105.

Bathke, C. (2008). Vergleichende Analytik von freien Aminosäuren in transgenen und konventionellen Pflanzen mittels Flüssigkeitschromatographie/ Massenspektrometrie. Diplomarbeit (Rostock).

Bean, L.A., Ianov, L., and Foster, T.C. (2014). Estrogen receptors, the hippocampus, and memory. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 20, 534-545.

Bianchi, L., and Riede, U.-N. (2004). Allgemeine und spezielle Pathologie. 168 Tabellen (Stuttgart: Thieme).

Bilal, I., Chowdhury, A., Davidson, J., and Whitehead, S. (2014). Phytoestrogens and prevention of breast cancer: The contentious debate. *World journal of clinical oncology* 5, 705-712.

Breslin, S., and O'Driscoll, L. (2013). Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug discovery today* 18, 240-249.

Brown, N.M., Wang, J., Cotroneo, M.S., Zhao, Y.X., and Lamartiniere, C.A. (1998). Prepubertal genistein treatment modulates TGF- α , EGF and EGF-receptor mRNAs and proteins in the rat mammary gland. *Molecular and cellular endocrinology* 144, 149-165.

Bubendorf, L., Klöppel, G., Kreipe, H.H., and Remmele, W. (2010). Pathologie (Philadelphia, PA: Springer).

Buser, K., Schneller, T., Wildgrube, K., and Kaul-Hecker, U. (2003). Medizinische Psychologie - Medizinische Soziologie. Kurzlehrbuch zum Gegenstandskatalog ; [neuer GK, GK 1] (München: Urban & Fischer).

Caan, B.J., Natarajan, L., Parker, B., Gold, E.B., Thomson, C., Newman, V., Rock, C.L., Pu, M., Al-Delaimy, W., and Pierce, J.P. (2011). Soy food consumption and breast cancer prognosis. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 20, 854-858.

Cardoso, C.M., Custódio, J.B., Almeida, L.M., and Moreno, A.J. (2001). Mechanisms of the deleterious effects of tamoxifen on mitochondrial respiration rate and phosphorylation efficiency. *Toxicology and applied pharmacology* 176, 145-152.

Castles, C.G., Fuqua, S.A., Klotz, D.M., and Hill, S.M. (1993). Expression of a constitutively active estrogen receptor variant in the estrogen receptor-negative BT-20 human breast cancer cell line. *Cancer Res.* 53, 5934-5939.

Chemat, F. and Cravotto, G. (2013). Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds. Theory and Practice (Boston, MA: Springer).

Chen, J., Stavro, P.M., and Thompson, L.U. (2002). Dietary flaxseed inhibits human breast cancer growth and metastasis and downregulates expression of insulin-like growth factor and epidermal growth factor receptor. *Nutrition and Cancer* 43, 187-192.

Chung, H., Lee, Y.S., Mayoral, R., Oh, D.Y., Siu, J.T., Webster, N.J., Sears, D.D., Olefsky, J.M., and Ellies, L.G. (2015). Omega-3 fatty acids reduce obesity-induced tumor progression independent of GPR120 in a mouse model of postmenopausal breast cancer. *Oncogene* 34, 3504-3513.

Colborn, T., Vom Saal, F.S., and Soto, A.M. (1993). Developmental Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals in Wildlife and Humans. *Environmental health perspectives*, S. 378-384.

Coldham, N.G., Zhang, A.-Q., Key, P., and Sauer, M.J. (2002). Absolute bioavailability of ¹⁴C genistein in the rat; plasma pharmacokinetics of parent compound, genistein glucuronide and total radioactivity. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics* 27, 249-258.

Custodio, J.B., Moreno, A.J., and Wallace, K.B. (1998). Tamoxifen inhibits induction of the mitochondrial permeability transition by Ca²⁺ and inorganic phosphate. *Toxicology and applied pharmacology* 152, 10-17.

Dahlman-Wright, K., Cavailles, V., Fuqua, S.A., Jordan, V.C., Katzenellenbogen, J.A., Korach, K.S., Maggi, A., Muramatsu, M., Parker, M.G., and Gustafsson, J.-A. (2006). International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacological reviews* 58, 773-781.

Deapen, D., Liu, L., Perkins, C., Bernstein, L., and Ross, R.K. (2002). Rapidly rising breast cancer incidence rates among Asian-American women. *Int. J. Cancer* 99, 747-750.

Dhiman, H.K., Ray, A.R., and Panda, A.K. (2005). Three-dimensional chitosan scaffold-based MCF-7 cell culture for the determination of the cytotoxicity of tamoxifen. *Biomaterials* 26, 979-986.

Diepenbrock, W. (1999). *Spezieller Pflanzenbau*. 92 Tabellen (Stuttgart u.a.: Ulmer [u.a.]).
Dixon, R.A. (2004). Phytoestrogens. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 225-261.

Doll, R., and Peto, R. (1981). The causes of cancer. Quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the united states today. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1191-1308.

Dünow, A. (2012). Die kumulative Wirkung von Leinwurzelextrakt der Pflanze *Linum usitatissimum* und Tamoxifen auf östrogenpositive Mammakarzinomzellen. Inauguraldissertation (Rostock).

Ebermann, R., and Elmadfa, I. (2008). *Lehrbuch Lebensmittelchemie und Ernährung* (Vienna: Springer-Verlag/Wien).

Eczko, M. (2015). Funktionelle und zytotoxische Untersuchungen zur Wirkung eines phytoestrogenhaltigen Wasserextraktes aus der Wurzel von *Linum usitatissimum* auf humane estrogenrezeptorpositive, -negative Mammakarzinomzellen (MCF-7; BT-20) und humane Hepatozyten. Inauguraldissertation (Rostock).

Eigélénè, N., Härkönen, P., and Erkkola, R. (2006). Effects of estradiol and medroxyprogesterone acetate on morphology, proliferation and apoptosis of human breast tissue in organ cultures. *BMC Cancer* 6, 246.

Eisenbrand, G. (2006). Isoflavone als Phytoestrogene in Nahrungsergänzungsmitteln und diätetischen Lebensmitteln für besondere medizinische Zwecke. DFG- Senatskommission zur Beurteilung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von Lebensmitteln.

Emons, G., Fleckenstein, G., Hinney, B., Huschmand, A., and Heyl, W. (2000). Hormonal interactions in endometrial cancer. *Endocrine-related cancer* 7, 227-242.

Emons, G., Gründker, C., and Hanf, V. (2003). Sind Östrogene Karzinogene? - SpringerMedizin. *Der Gynäkologe* 2003, 182-189.

Fabian, C.J., Kimler, B.F., and Hursting, S.D. (2015). Omega-3 fatty acids for breast cancer prevention and survivorship. *Breast cancer research : BCR* 17, 62.

- Fabian, C.J., Kimler, B.F., Zalles, C.M., Klemp, J.R., Petroff, B.K., Khan, Q.J., Sharma, P., Setchell, K.D.R., Zhao, X., and Phillips, T.A., et al. (2010). Reduction in Ki-67 in benign breast tissue of high-risk women with the lignan secoisolariciresinol diglycoside. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)* 3, 1342-1350.
- Ferlay, J., Bray, F., Pisani, P., and Parkin, D.M. (2001). *Globocan 2000. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide* (Lyon Cedex: International Agency for Research Cancer).
- Fleming, R.M. (2003). What effect, if any, does soy protein have on breast tissue? *Integrative cancer therapies* 2, 225-228.
- Förster, K., and Kietz, S. (2006). Östrogenrezeptor beta (ER β) vermittelt zelluläre Differenzierungsprozesse. *BIOspektrum · 2/06 · 12. Jahrgang* 12, 162-164.
- Foth, D. (2003). Alternativen zur Hormonsubstitutionstherapie. *Journal für die Menopause*, 37-39.
- Fotsis, T., Pepper, M.S., Montesano, R., Aktas, E., Breit, S., Schweigerer, L., Rasku, S., Wähälä, K., and Adlercreutz, H. (1998). Phytoestrogens and inhibition of angiogenesis. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* 12, 649-666.
- Fuhrman, B.J., Schairer, C., Gail, M.H., Boyd-Morin, J., Xu, X., Sue, L.Y., Buys, S.S., Isaacs, C., Keefer, L.K., and Veenstra, T.D., et al. (2012). Estrogen metabolism and risk of breast cancer in postmenopausal women. *Journal of the National Cancer Institute* 104, 326-339.
- Garland, C.F., Garland, F.C., Gorham, E.D., Lipkin, M., Newmark, H., Mohr, S.B., and Holick, M.F. (2006). The role of vitamin D in cancer prevention. *American journal of public health* 96, 252-261.
- Gätje, R., Eberle, C., Scholz, C., Debus, G., Kissler, S., Lübke, M., Muschel, K., Sängler, N., Schuhmacher, I., and Siedentopf, F., et al. (2011). *Kurzlehrbuch Gynäkologie und Geburtshilfe. 158 Tabellen* (Stuttgart, New York: Thieme).
- Gey, M.H. (2008). *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik. Biosubstanzen, Trennmethoden, Strukturanalytik, Applikationen* (Berlin/Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg).
- Goyal, A., Sharma, V., Upadhyay, N., Gill, S., and Sihag, M. (2014). Flax and flaxseed oil: an ancient medicine & modern functional food. *Journal of food science and technology* 51, 1633-1653.
- Gstraunthaler, G., and Lindl, T. (2013). *Zell- und Gewebekultur. Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen* (Berlin, Heidelberg, s.l.: Springer Berlin Heidelberg).

Ha, T.C., Lyons-Wall, P.M., Moore, D.E., Tattam, B.N., Boyages, J., Ung, O.A., and Taylor, R.J. (2006). Phytoestrogens and indicators of breast cancer prognosis. *Nutrition and Cancer* 56, 3-10.

Haag, P., Hanhart, N., and Müller, M. (2009). Gynäkologie und Urologie. Für Studium und Praxis 2010/11 ; inkl. Geburtshilfe, Reproduktionsmedizin, Sexualmedizin, Andrologie u. Venerologie ; unter Berücks. d. GK u. d.mündl. Examina in d. Ärztl. Prüfungen (Breisach am Rhein: Mediz. Verl.- u. Inform.-Dienste).

Hargreaves, D.F., Potten, C.S., Harding, C., Shaw, L.E., Morton, M.S., Roberts, S.A., Howell, A., and Bundred, N.J. (1999). Two-week dietary soy supplementation has an estrogenic effect on normal premenopausal breast. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 84, 4017-4024.

Hees, B. (2015). Meeresalgen in der Prävention von Brustkrebs. *DZO* 47, 13-19.

Heinonen, S., Nurmi, T., Liukkonen, K., Poutanen, K., Wähälä, K., Deyama, T., Nishibe, S., and Adlercreutz, H. (2001). In vitro metabolism of plant lignans: new precursors of mammalian lignans enterolactone and enterodiols. *Journal of agricultural and food chemistry* 49, 3178-3186.

Henderson, B.E., and Feigelson, H.S. (2000). Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21, 427-433.

Honma, N., Horii, R., Iwase, T., Saji, S., Younes, M., Ito, Y., and Akiyama, F. (2014). Proportion of estrogen or progesterone receptor expressing cells in breast cancers and response to endocrine therapy. *Breast (Edinburgh, Scotland)* 23, 754-762.

Horn-Ross, P.L., Barnes, S., Lee, M., Coward, L., Mandel, J.E., and Koo, J. John EM, Smith M. (2000). Assessing phytoestrogen exposure in epidemiologic studies: development of a database (United States). *Cancer Causes Control*. 2000 Apr;11(4):289-98 11, 289-298.

Howard, B.A., and Lu, P. (2014). Stromal regulation of embryonic and postnatal mammary epithelial development and differentiation. *Seminars in cell & developmental biology* 25-26, 43-51.

Hsieh, C.Y., Santell, R.C., Haslam, S.Z., and Helferich, W.G. (1998). Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells in vitro and in vivo. *Cancer research* 58, 3833-3838.

Imoberdorf, R., Rühlin, M., and Ballmer, P.E. (2015). Krebs und Ernährung – ein Paradigmenwechsel. *Aktuelle Ernährungsmedizin*, 143-146.

- Inwald, E.C., Klinkhammer-Schalke, M., Hofstadter, F., Zeman, F., Koller, M., Gerstenhauer, M., and Ortmann, O. (2013). Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast cancer research and treatment* 139, 539-552.
- Janni, W. (2008). *Facharzt Gynäkologie* (München: Urban & Fischer in Elsevier).
- Jenik, H., and van Leendert, R. (2002). Krebs und Ernährung. *Deutsche Zeitschrift für Onkologie*, 2002, 34:91-96, 91-96.
- Ju, Y.H., Allred, C.D., Allred, K.F., Karko, K.L., Doerge, D.R., and Helferich, W.G. (2001). Physiological concentrations of dietary genistein dose-dependently stimulate growth of estrogen-dependent human breast cancer (MCF-7) tumors implanted in athymic nude mice. *The Journal of nutrition* 131, 2957-2962.
- Kabat, G.C., Jones, J.G., Olson, N., Negassa, A., Duggan, C., Ginsberg, M., Kandel, R.A., Glass, A.G., and Rohan, T.E. (2010). A multi-center prospective cohort study of benign breast disease and risk of subsequent breast cancer. *Cancer causes & control : CCC* 21, 821-828.
- Katakura, Y., Alam, S., and Shirahata, S. (1998). Immortalization by gene transfection. *Methods in cell biology* 57, 69-91.
- Kaufmann, B., and Christen, P. (2002). Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochem. Anal.* 13, 105-113.
- Kaufmann, M., Costa, S.D., and Canaris, T. (2013). *Die Gynäkologie* (Berlin: Springer).
- Kilkkinen, A., Stumpf, K., Pietinen, P., Valsta, L.M., Tapanainen, H., and Adlercreutz, H. (2001). Determinants of serum enterolactone concentration. *The American journal of clinical nutrition* 73, 1094-1100.
- Klebe, G. (2009). *Wirkstoffdesign. Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen* (Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag).
- Klöppel, G., Kreipe, H.H. and Remmele, W. (2012). *Pathologie. Mamma, Weibliches Genitale, Schwangerschaft und Kindererkrankungen*.
- Knoops, K.T., Groot, L.C., Kromhout, D., Perrin, A.-E., Moreiras-Varela, O., Menotti, A., and van Staveren, W.A. (2004). Mediterranean diet, lifestyle factors, and 10-year mortality in elderly European men and women: the HALE project. *JAMA* 292, 1433-1439.
- Korde, L.A., Wu, A.H., Fears, T., Nomura, A.M., West, D.W., Kolonel, L.N., Pike, M.C., Hoover, R.N., and Ziegler, R.G. (2009). Childhood soy intake and breast cancer risk in Asian American women. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 18, 1050-1059.

Kreienberg, R., Möbus, V., Jonat, W., and Kühn, T. (2010). Mammakarzinom Interdisziplinär. 4. Auflage.

Kreis, W. (2009). Sekundäre Pflanzenstoffe und Krebs. Deutsche Zeitschrift für Onkologie, 100-108.

Kuhl, H. (2004). HRT und Mammakarzinom-Risiko. HRT und Brustdrüse.

Kuiper, G.G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., van der Saag, P.T., van der Burg, B., and Gustafsson, J.-Å. (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor β . *Endocrinology* 139, 4552.

Kulling, S.E., and Metzler, M. (1997). Induction of micronuclei, DNA strand breaks and HPRT mutations in cultured Chinese hamster V79 cells by the phytoestrogen coumestrol. *Food and Chemical Toxicology* 35, 605-613.

Kulling, S.E., and Watzl, B. (2003). Phytoöstrogene. Basiswissen aktualisiert. *Ernährungs-Umschau* 50 (2003) Heft 6, 234-239.

Kunze, U. (2011). Mammakarzinom: Epidemiologie und Risikofaktoren. *Journal für gastroenterologische und hepatologische Erkrankungen*, 38-40.

Lakhani, S.R. (2012). WHO classification of tumours of the breast (Lyon: International Agency for Research on Cancer).

Lampe, J.W., Nishino, Y., Ray, R.M., Wu, C., Li, W., Lin, M.-G., Gao, D.L., Hu, Y., Shannon, J., and Stalsberg, H., et al. (2007). Plasma isoflavones and fibrocystic breast conditions and breast cancer among women in Shanghai, China. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 16, 2579-2586.

Leitzmann, C. (2010). Ernährung und Fasten als Therapie. Mit 35 Abbildungen (Springer-Verlag Berlin Heidelberg).

Lemmer, B. and Brune, K. (2007). Pharmakotherapie. Klinische Pharmakologie (Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg).

Levin, E.R. (2005). Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md.) 19, 1951-1959.

Li, A.P., Bode, C., and Sakai, Y. (2004). A novel in vitro system, the integrated discrete multiple organ cell culture (IdMOC) system, for the evaluation of human drug toxicity: comparative cytotoxicity of tamoxifen towards normal human cells from five major organs and MCF-7 adenocarcinoma breast cancer cells. *Chemico-biological interactions* 150, 129-136.

- Liehr, J.G. (2001). Genotoxicity of the steroidal oestrogens oestrone and oestradiol: possible mechanism of uterine and mammary cancer development. *Human reproduction update* 7, 273-281.
- Liggins, J., Grimwood, R., and Bingham, S.A. (2000). Extraction and quantification of lignan phytoestrogens in food and human samples. *Anal. Biochem.* 287, 102-109.
- Linder, S., and Marshall, H. (1990). immortalization of primary cells by DNA tumor viruses. *Experimental cell research* 191, 1-7.
- Li-Quan, W., Meselhy, R., Yan, L., Guo-Wei, Q., and Masao, H. (2000). Human Intestinal Bacteria Capable of Transforming Secoisolariciresinol Diglucoside to Mammalian Lignans, Enterodiols and Enterolactone. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 48, 1606-1610.
- Löffler, G., Petrides, P.E. and Heinrich, P.C. (2007). *Biochemie und Pathobiochemie*.
- Lonza- HMEC. Mammary-TS-HMEC-TS-CC-29-7.
- Love, S.M., Gelman, R.S., and Silen, W. (1982). Sounding board. Fibrocystic "disease" of the breast--a nondisease? *The New England journal of medicine* 307, 1010-1014.
- Lüllmann, H., Mohr, K., and Hein, L. (2006). *Pharmakologie und Toxikologie. [Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen ; ein Lehrbuch für Studierende der Medizin, der Pharmazie und der Biowissenschaften, eine Informationsquelle für Ärzte, Apotheker und Gesundheitspolitiker]* (Stuttgart: Thieme).
- Luyengi, L., Suh, N., Fong, H.H., Pezzuto, J.M., and Kinghorn, A.D. (1996). A lignan and four terpenoids from *Brucea javanica* that induce differentiation with cultured HL-60 promyelocytic leukemia cells. *Phytochemistry* 43, 409-412.
- Markovits, J., Linassier, C., Fossé, P., Couprie, J., Pierre, J., Jacquemin-Sablon, A., Saucier, J.M., Le Pecq, J.B., and Larsen, A.K. (1989). Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II. *Cancer research* 49, 5111-5117.
- May, T. (2005). Entwicklung eines transkriptionell regulierten Systems zur konditionalen Immortalisierung. Dissertation (Braunschweig).
- Mazur, W.M., Wahala, K., Rasku, S., Salakka, A., Hase, T., and Adlercreutz, H. (1998). Lignan and isoflavonoid concentrations in tea and coffee. *The British journal of nutrition* 79, 37-45.
- McMichael-Phillips, D.F., Harding, C., Morton, M., Roberts, S.A., Howell, A., Potten, C.S., and Bundred, N.J. (1998). Effects of soy-protein supplementation on epithelial proliferation in the histologically normal human breast. *The American journal of clinical nutrition* 68, 1431-1435.

- Mense, S.M., Hei, T.K., Ganju, R.K., and Bhat, H.K. (2008). Phytoestrogens and breast cancer prevention: possible mechanisms of action. *Environmental health perspectives* 116, 426-433.
- Messina, M., and Barnes, S. (1991). The role of soy products in reducing risk of cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 83, 541-546.
- Moharram, F.A., and El-Shenawy, S.M. (2007). Antinociceptive and anti-inflammatory steroidal saponins from *Dracaena ombet*. *Planta medica* 73, 1101-1106.
- Morito, K., Aomori, T., Hirose, T., Kinjo, J., Hasegawa, J., Ogawa, S., Inoue, S., Muramatsu, M., and Masamune, Y. (2002). Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta (II). *Biological & pharmaceutical bulletin* 25, 48-52.
- Morito, K., Hirose, T., Kinjo, J., Hirakawa, T., Okawa, M., Nohara, T., Ogawa, S., Inoue, S., Muramatsu, M., and Masamune, Y. (2001). Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta. *Biological & pharmaceutical bulletin* 24, 351-356.
- Mousavi, Y., and Adlercreutz, H. (1992). Enterolactone and estradiol inhibit each other's proliferative effect on MCF-7 breast cancer cells in culture. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 41, 615-619.
- Müller, K., and Müller, S. (2002). *Klinische Chemie* (Stuttgart: Thieme).
- Munro, I.C., Harwood, M., Hlywka, J.J., Stephen, A.M., Doull, J., Flamm, W.G., and Adlercreutz, H. (2003). Soy isoflavones: a safety review. *Nutr. Rev.* 61, 1-33.
- Murshid, K.R. (2011). A Review of Mastalgia in Patients with Fibrocystic Breast Changes and the Non-Surgical Treatment Options. *Journal of Taibah University Medical Sciences* 6, 1-18.
- Musey, P.I., Adlercreutz, H., Gould, K.G., Collins, D.C., Fotsis, T., Bannwart, C., Mäkelä, T., Wähälä, K., Brunow, G., and Hase, T. (1995). Effect of diet on lignans and isoflavonoid phytoestrogens in chimpanzees. *Life Sci.* 57, 655-664.
- Nagata, C. (2010). Factors to Consider in the Association Between Soy Isoflavone Intake and Breast Cancer Risk. *Journal of Epidemiology* 20, 83-89.
- Nagata, C., Kabuto, M., Kurisu, Y., and Shimizu, H. (1997). Decreased serum estradiol concentration associated with high dietary intake of soy products in premenopausal Japanese women. *Nutrition and Cancer* 29, 228-233.
- Obermeyer, W.R., Musser, S.M., Betz, J.M., Casey, R.E., Pohland, A.E., and Page, S.W. (1995). Chemical studies of phytoestrogens and related compounds in dietary supplements: flax and chaparral. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 208, 6-12.

Oh, E.-Y., Christensen, S.M., Ghanta, S., Jeong, J.C., Bucur, O., Glass, B., Montaser-Kouhsari, L., Knoblauch, N.W., Bertos, N., and Saleh, S.M., et al. (2015). Extensive rewiring of epithelial-stromal co-expression networks in breast cancer. *Genome biology* 16, 128.

O'Malley, F.P., Pinder, S.E., and Mulligan, A.M. (2011). *Breast pathology* (Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders).

Oppermann, C. (2012). *Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe für die Krebsprävention und -therapie*. Dissertation (Rostock).

Ory, H., Cole, P., MacMahon, B., and Hoover, R. (1976). Oral contraceptives and reduced risk of benign breast diseases. *The New England journal of medicine* 294, 419-422.

Oseni, T., Patel, R., Pyle, J., and Jordan, V.C. (2008). Selective estrogen receptor modulators and phytoestrogens. *Planta medica* 74, 1656-1665.

Paine, T.M., Soule, H.D., Pauley, R.J., and Dawson, P.J. (1992). Characterization of epithelial phenotypes in mortal and immortal human breast cells. *Int. J. Cancer* 50, 463-473.

Peterson, G., and Barnes, S. (1996). Genistein inhibits both estrogen and growth factor-stimulated proliferation of human breast cancer cells. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* 7, 1345-1351.

Peterson, J., Dwyer, J., Adlercreutz, H., Scalbert, A., Jacques, P., and McCullough, M.L. (2010). Dietary lignans: physiology and potential for cardiovascular disease risk reduction. *Nutrition reviews* 68, 571-603.

Prechtel, K. (1991). Mastopathy. Histological forms and long-term observations. *Zentralbl Pathol*, 210-219.

Record, I.R., Jannes, M., Dreosti, I.E., and King, R.A. (1995). Induction of micronucleus formation in mouse splenocytes by the soy isoflavone genistein in vitro but not in vivo. *Food and Chemical Toxicology* 33, 919-922.

Reddel, R.R., Murphy, L.C., Hall, R.E., and Sutherland, R.L. (1985). Differential sensitivity of human breast cancer cell lines to the growth-inhibitory effects of tamoxifen. *Cancer research* 45, 1525-1531.

Richter, D.-U., Abarzua, S., Chrobak, M., Scholz, C., Kuhn, C., Schulze, S., Kupka, M.S., Friese, K., Briese, V., and Piechulla, B., et al. (2010). Effects of phytoestrogen extracts isolated from flax on estradiol production and ER/PR expression in MCF7 breast cancer cells. *Anticancer research* 30, 1695-1699.

Riss, T. (2014). *Is Your MTT Assay Really the Best Choice?*

Robert-Koch-Institut (2013). Krebs in Deutschland 2009/2010. 3. Ausgabe.

Roche Applied Science Cytotoxicity Detection Kit (LDH). A non-radioactive alternative to the [3H]-thymidine release assay and the [51Cr]-release assay. Colorimetric assay for the quantification of cell death and cell lysis based on the measurement of lactate dehydrogenase (LDH) activity released from the cytosol of damaged cells into the supernatant.

Roche Diagnostics, MTT-Instruction manual. Cell Proliferation Kit I (MTT). Colorimetric assay (MTT based) for the non- radioactive quantification of cell proliferation and viability. 20.02.2014.

Rosolowich, V., Saettler, E., Szuck, B., Lea, R.H., Levesque, P., Weisberg, F., Graham, J., and McLeod, L. (2006). Mastalgia. Journal of obstetrics and gynaecology Canada : JOGC = Journal d'obstétrique et gynécologie du Canada : JOGC 28, 49-71; quiz 58-60, 72-4.

Santell, R.C., Kieu, N., and Helferich, W.G. (2000). Genistein inhibits growth of estrogen-independent human breast cancer cells in culture but not in athymic mice. The Journal of nutrition 130, 1665-1669.

Schmitz, S. (2011). Der Experimentator: Zellkultur (Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag).

Scott, R.J., Hall, P.A., Haldane, J.S., van Noorden, S., Price, Y., Lane, D.P., and Wright, N.A. (1991). A comparison of immunohistochemical markers of cell proliferation with experimentally determined growth fraction. The Journal of pathology 165, 173-178.

Seegers, J.C., Aveling, M.L., van Aswegen, C.H., Cross, M., Koch, F., and Joubert, W.S. (1989). The cytotoxic effects of estradiol-17 beta, catecholestradiols and methoxyestradiols on dividing MCF-7 and HeLa cells. Journal of Steroid Biochemistry 32, 797-809.

Senn, H.-J., Drings, P., Glaus, A., Jungi, W.F., Pralle, H.B., Sauer, R., and Schlag, P.M. (2001). Checkliste Onkologie.

Setchell, K.D., Brown, N.M., Summer, S., King, E.C., Heubi, J.E., Cole, S., Guy, T., and Hokin, B. (2013). Dietary factors influence production of the soy isoflavone metabolite s-(-)equol in healthy adults. The Journal of nutrition 143, 1950-1958.

Setchell, K.D., and Cole, S.J. (2006). Method of defining equol-producer status and its frequency among vegetarians. The Journal of nutrition 136, 2188-2193.

Shao, Z.M., Alpaugh, M.L., Fontana, J.A., and Barsky, S.H. (1998). Genistein inhibits proliferation similarly in estrogen receptor-positive and negative human breast carcinoma cell lines characterized by P21WAF1/CIP1 induction, G2/M arrest, and apoptosis. Journal of cellular biochemistry 69, 44-54.

Shields, A.F., Grierson, J.R., Dohmen, B.M., Machulla, H.J., Stayanoff, J.C., Lawhorn-Crews, J.M., Obradovich, J.E., Muzik, O., and Mangner, T.J. (1998). Imaging proliferation in vivo with F-18FLT and positron emission tomography. *Nature medicine* 4, 1334-1336.

Sicilia, T., Niemeyer, H.B., Honig, D.M., and Metzler, M. (2003). Identification and stereochemical characterization of lignans in flaxseed and pumpkin seeds. *J. Agric. Food Chem.* 51, 1181-1188.

Simoncini, T., Hafezi-Moghadam, A., Brazil, D.P., Ley, K., Chin, W.W., and Liao, J.K. (2000). Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 407, 538-541.

Sirtori, C.R., Arnoldi, A., and Johnson, S.K. (2005). Phytoestrogens: end of a tale? *Annals of medicine* 37, 423-438.

Soule, H.D., Maloney, T.M., Wolman, S.R., Peterson, W.D., Brenz, R., McGrath, C.M., Russo, J., Pauley, R.J., Jones, R.F., and Brooks, S.C. (1990). Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res.* 50, 6075-6086.

Sparr Eskilsson, C., and Björklund, E. (2000). Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A* 902, 227-250.

Strater, N. (2011). Der Einfluss von Leinwurzelextrakten der Pflanze *Linum usitatissimum* unterschiedlicher Altersstufen auf die Vitalität verschiedener Mammakarzinomzelllinien. Inauguraldissertation (Rostock).

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

Szewczyk, M., Abarzua, S., Schlichting, A., Nebe, B., Piechulla, B., Briese, V., and Richter, D.U. (2014). Effects of extracts from *Linum usitatissimum* on cell vitality, proliferation and cytotoxicity in human breast cancer cell lines. *J. Med. Plants Res.* 8, 237-245.

Tait, L., Soule, H.D., and Russo, J. (1990). Ultrastructural and immunocytochemical characterization of an immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res.* 50, 6087-6094.

Tatke, P., and Jaiswal, Y. (2011). An Overview of Microwave Assisted Extraction and its Applications in Herbal Drug Research. *Research J. of Medicinal Plant* 5, 21-31.

Theil, C.A. (2010). Untersuchungen zum Einfluss eines *Linum usitatissimum*- Wurzelextrakts auf zwei verschiedene Mammakarzinom- Zelllinien im Vergleich mit Genistein, Genestin, Daidzein, Daidzin, Secoisolariciresinol, Tamoxifen und 17 β - Estradiol. Inauguraldissertation (Rostock).

Thompson, L.U., Boucher, B.A., Liu, Z., Cotterchio, M., and Kreiger, N. (2006). Phytoestrogen content of foods consumed in Canada, including isoflavones, lignans, and coumestan. *Nutrition and Cancer* 54, 184-201.

Tice, J.A., O'Meara, E.S., Weaver, D.L., Vachon, C., Ballard-Barbash, R., and Kerlikowske, K. (2013). Benign breast disease, mammographic breast density, and the risk of breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 105, 1043-1049.

Tou, J.C., and Thompson, L.U. (1999). Exposure to flaxseed or its lignan component during different developmental stages influences rat mammary gland structures. *Carcinogenesis* 20, 1831-1835.

Tsutsui, T., and Barrett, J.C. (1997). Neoplastic transformation of cultured mammalian cells by estrogens and estrogenlike chemicals. *Environmental health perspectives* 105 Suppl 3, 619-624.

van Tonder, A., Joubert, A.M., and Cromarty, A.D. (2015). Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC research notes* 8, 47.

Vrtačnik, P., Ostanek, B., Mencej-Bedrač, S., and Marc, J. (2014). The many faces of estrogen signaling. *Biochemia medica* 24, 329-342.

Walentowicz-Sadlecka, M., Sadlecki, P., Walentowicz, P., and Grabiec, M. (2013). The role of vitamin D in the carcinogenesis of breast and ovarian cancer. *Ginekologia polska* 84, 305-308.

Weyerstahl, T., and Stauber, M. (2013). *Gynäkologie und Geburtshilfe* (Stuttgart: Thieme).
Wichtl, M. (2002). *Teedrogen und Phytopharmaka. Ein Handbuch für die Praxis auf wissenschaftlicher Grundlage* (Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges).

Wu, A.H., Ziegler, R.G., Nomura, A.M., West, D.W., Kolonel, L.N., Horn-Ross, P.L., Hoover, R.N., and Pike, M.C. (1998). Soy intake and risk of breast cancer in Asians and Asian Americans. *Am. J. Clin. Nutr.* 68, 1437-1443.

Wu, C., Ray, R.M., Lin, M.G., Gao, D.L., Horner, N.K., Nelson, Z.C., Lampe, J.W., Hu, Y.W., Shannon, J., and Stalsberg, H., et al. (2004). A case-control study of risk factors for fibrocystic breast conditions: Shanghai Nutrition and Breast Disease Study, China, 1995-2000. *American journal of epidemiology* 160, 945-960.

Yaacob N.S., and Ismail N. F. (2014). Comparison of cytotoxicity and genotoxicity of 4-hydroxytamoxifen in combination with Tualang honey in MCF-7 and MCF-10A cells. *BMC complementary and alternative medicine*, 106.

Yang, Y.J., Nam, S.-J., Kong, G., and Kim, M.K. (2010). A case-control study on seaweed consumption and the risk of breast cancer. *The British journal of nutrition* 103, 1345-1353.

Zhang, Y.-F., Kang, H.-B., Li, B.-L., and Zhang, R.-M. (2012). Positive effects of soy isoflavone food on survival of breast cancer patients in China. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 13, 479-482.

Zheng, A., Kallio, A., and Härkönen, P. (2007). Tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells is mediated via extracellularly signal-regulated kinase signaling and can be abrogated by estrogen. *Endocrinology* 148, 2764-2777.

Ziegler, R.G., Hoover, R.N., Pike, M.C., Hildesheim, A., Nomura, A.M., West, D.W., Wu-Williams, A.H., Kolonel, L.N., Horn-Ross, P.L., and Rosenthal, J.F., et al. (1993). Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. *J. Natl. Cancer Inst.* 85, 1819-1827.

9 Anhang

Zusammenstellung wichtiger statistischer Parameter im tabellarischen Überblick

In den folgenden Tabellen finden sich die numerischen Ergebnisse aus den statistischen Berechnungen. Diese sind, wie auch die Grafiken im Ergebnisteil, nach Zelllinien, Testreihen und verwendetem Extrakt geordnet.

In den ersten Tabellen lassen sich die in den Boxplot- Diagrammen dargestellten statistischen Werte einsehen.

Dies sind die jeweilige Fallzahl (n), der Median, der interquartile Range (IQR p25; p75) sowie die statistische Signifikanz aus den Berechnungen des Einstichproben t- Tests (Signifikanz $p < 0,05$).

Die Mittelwerte, Standardabweichungen und Standardfehler lassen sich in den folgenden Tabellen einsehen.

Die jeweils letzte Tabelle enthält die Ergebnisse aus den Berechnungen der Tests auf Normalverteilung nach Kolmogorow- Smirnow (einschließlich Signifikanzkorrektur nach Lilliefors) bzw. Shapiro Wilk. Hierbei besteht eine Normalverteilung der Ergebnisse bei $p > 0,05$.

BT-20 BrdU- Test mit Extrakt nach Luyengi

Kontrollsubstanz	n	Median	Interquartile Range (IQR) <i>p25; p75</i>	Signifikanz <i>p</i>
17β- Estradiol	16	88,48	83,85; 121,53	0,578
Tamoxifen	16	2,98	-6,48; 6,09	< 0,001
0.01	12	88,91	82,63; 102,74	0,061
0.1	16	95,56	78,73; 109,41	0,192
1	12	98,57	94,81; 105,38	0,680
10	12	81,69	65,42; 102,11	0,035
50	16	44,09	27,39; 69,79	< 0,001
100	16	38,55	12,76; 88,25	< 0,001
500	12	4,92	0,66; 10,89	< 0,001
1000	12	2,84	-3,24; 7,43	< 0,001

Kontrollsubstanz	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler Mittelwert
17β- Estradiol	96,9119	21,69876	5,42469
Tamoxifen	1,5129	5,71056	1,42764
0.01	91,2460	14,53051	4,19460
0.1	88,0171	35,07988	8,76997
1	99,2349	6,24738	1,80346
10	80,4468	28,12238	8,11823
50	50,4553	29,19503	7,29876
100	43,8338	31,87623	7,96906
500	8,7329	14,53100	4,19474
1000	2,5407	5,09150	1,46979

Versuch	Testsubstanz	p nach Kolmogorow - Smirnow	p nach Shapiro Wilk
BT-20 BrdU Luyengi	17β-Estradiol	0,041	0,054
-"-	Tamoxifen	0,200*	0,082
-"-	0,01 µg/ml	0,200*	0,669
-"-	0,1 µg/ml	0,020	0,004
-"-	1 µg/ml	0,200*	0,420
-"-	10 µg/ml	0,200*	0,189
-"-	50 µg/ml	0,061	0,345
-"-	100 µg/ml	0,200*	0,141
-"-	500 µg/ml	0,018	0,020
-"-	1000 µg/ml	0,200*	0,046

*dies ist eine Untergrenze der tatsächlichen Signifikanz

BT-20 BrdU- Test mit Mikrowellenextrakt

Kontrollsubstanz	n	Median	Interquartile Range (IQR) <i>p25; p75</i>	Signifikanz <i>p</i>
17β- Estradiol	16	85,85	77,27; 95,77	< 0,001
Tamoxifen	16	1,82	-0,61; 1,75	< 0,001
0.01	12	91,62	78,23; 94,55	0,034
0.1	12	90,09	79,36; 90,91	0,234
1	16	99,70	70,32; 103,62	0,196
10	12	105,82	89,32; 114,86	0,192
50	16	102,52	92,23; 107,85	0,118
100	16	95,95	81,31; 93,82	0,479
500	16	70,59	62,77; 70,89	< 0,001
1000	12	30,01	13,59; 30,07	< 0,001

Kontrollsubstanz	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler Mittelwert
17β- Estradiol	85,4096	12,63907	3,15977
Tamoxifen	2,1335	2,67670	0,66917
0.01	92,3826	10,89404	3,14484
0.1	94,3464	15,54805	4,48834
1	94,2156	17,09735	4,27434
10	105,1761	12,89526	3,72254
50	104,0722	9,83266	2,45816
100	97,4093	14,26119	3,56530
500	77,1001	15,15782	3,78945
1000	25,5563	11,71536	3,38193

Versuch	Testsubstanz	p nach Kolmogorow - Smirnow	p nach Shapiro Wilk
BT-20 BrdU Mikrowelle	17β-Estradiol	0,200*	0,501
-"-	Tamoxifen	0,200*	0,817
-"-	0,01 µg/ml	0,200*	0,588
-"-	0,1 µg/ml	0,200*	0,667
-"-	1 µg/ml	0,173	0,233
-"-	10 µg/ml	0,200*	0,602
-"-	50 µg/ml	0,090	0,136
-"-	100 µg/ml	0,200*	0,826
-"-	500 µg/ml	0,200*	0,719
-"-	1000 µg/ml	0,200*	0,482

*dies ist eine Untergrenze der tatsächlichen Signifikanz

BT-20 MTT- Test mit Extrakt nach Luyengi

Kontrollsubstanz	n	Median	Interquartile Range (IQR) <i>p25; p75</i>	Signifikanz <i>p</i>
17β- Estradiol	12	127,61	97,38; 133,24	0,017
Tamoxifen	12	-4,23	-4,93; -3,68	< 0,001
0.01	12	98,42	90,01; 103,53	0,195
0.1	12	100,82	95,09; 106,70	0,839
1	12	103,01	98,39; 107,79	0,167
10	12	123,46	99,40; 127,67	0,003
50	12	75,52	69,20; 84,12	< 0,001
100	12	47,07	40,21; 54,80	< 0,001
500	12	18,29	16,51; 20,15	< 0,001
1000	12	20,27	18,47; 21,67	< 0,001

Kontrollsubstanz	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler Mittelwert
17β- Estradiol	115,9511	19,75921	5,70399
Tamoxifen	-4,3296	0,72225	0,20849
0.01	96,8408	7,93622	2,29099
0.1	100,4567	7,62235	2,20038
1	102,7428	6,42151	1,85373
10	116,0481	14,42443	4,16397
50	74,7383	12,59455	3,63573
100	47,3042	8,32320	2,40270
500	19,1349	3,80665	1,09889
1000	20,4564	2,68270	0,77443

Versuch	Testsubstanz	p nach Kolmogorow - Smirnow	p nach Shapiro Wilk
BT-20 MTT Luyengi	17β-Estradiol	0,015	0,008
-"-	Tamoxifen	0,200*	0,347
-"-	0,01 µg/ml	0,200*	0,247
-"-	0,1 µg/ml	0,089	0,168
-"-	1 µg/ml	0,200*	0,837
-"-	10 µg/ml	0,014	0,020
-"-	50 µg/ml	0,200*	0,343
-"-	100 µg/ml	0,200*	0,744
-"-	500 µg/ml	0,026	0,003
-"-	1000 µg/ml	0,200*	0,613

*dies ist eine Untergrenze der tatsächlichen Signifikanz

BT-20 MTT- Test mit Mikrowellenextrakt

Kontrollsubstanz	n	Median	Interquartile Range (IQR) <i>p25; p75</i>	Signifikanz <i>p</i>
17β- Estradiol	12	135,48	124,88; 140,43	< 0,001
Tamoxifen	12	-2,80	-3,39; -1,98	< 0,001
0.01	12	94,58	90,25; 101,53	0,051
0.1	12	94,40	90,72; 98,85	0,002
1	12	91,40	81,66; 95,31	< 0,001
10	12	93,88	86,28; 100,03	0,027
50	12	112,77	109,36; 116,89	< 0,001
100	12	108,05	103,34; 109,14	0,003
500	12	98,49	88,83; 115,57	0,735
1000	12	81,43	76,72; 103,54	0,031

Kontrollsubstanz	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler Mittelwert
17β- Estradiol	131,8635	11,55924	3,33687
Tamoxifen	-2,7001	0,79697	0,23007
0.01	95,9700	6,38678	1,84370
0.1	94,3683	4,87787	1,40812
1	89,6395	7,12341	2,05635
10	93,2566	9,16225	2,64491
50	113,2232	5,12050	1,47816
100	106,8815	6,19412	1,78809
500	98,0687	19,27269	5,56355
1000	88,6014	15,99046	4,61605

Versuch	Testsubstanz	p nach Kolmogorow - Smirnow	p nach Shapiro Wilk
BT-20 MTT Mikrowelle	17β-Estradiol	0,139	0,104
-"-	Tamoxifen	0,200*	0,759
-"-	0,01 µg/ml	0,200*	0,321
-"-	0,1 µg/ml	0,200*	0,983
-"-	1 µg/ml	0,200*	0,295
-"-	10 µg/ml	0,200*	0,893
-"-	50 µg/ml	0,200*	0,661
-"-	100 µg/ml	0,032	0,191
-"-	500 µg/ml	0,052	0,177
-"-	1000 µg/ml	0,001	0,009

*dies ist eine Untergrenze der tatsächlichen Signifikanz

BT-20 LDH- Test mit Extrakt nach Luyengi

Kontrollsubstanz	n	Median	Interquartile Range (IQR) <i>p25; p75</i>	Signifikanz <i>p</i>
17β- Estradiol	12	-8,56	-12,90; -4,14	< 0,001
Tamoxifen	12	103,25	94,90; 110,06	< 0,001
0.01	12	-6,61	-11,18; -2,19	0,001
0.1	12	-13,99	-15,64; -9,11	< 0,001
1	12	-13,75	-20,13; -8,74	0,001
10	12	-6,65	-10,24; -0,84	0,005
50	12	-6,24	-9,95; 10,60	0,656
100	12	4,12	-2,41; 5,38	0,192
500	12	50,70	36,48; 56,72	< 0,001
1000	12	74,93	69,63; 77,29	< 0,001

Kontrollsubstanz	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler Mittelwert
17β- Estradiol	-8,9484	6,27111	1,81031
Tamoxifen	102,3013	9,08508	2,62264
0.01	-6,9384	5,59822	1,61607
0.1	-12,5182	4,32105	1,24738
1	-12,9498	9,94743	2,87158
10	-6,8504	6,74214	1,94629
50	-1,5402	11,64640	3,36203
100	2,5219	6,28505	1,81434
500	47,3644	10,42979	3,01082
1000	71,4807	10,89462	3,14501

Versuch	Testsubstanz	p nach Kolmogorow - Smirnow	p nach Shapiro Wilk
BT-20 LDH Luyengi	17β-Estradiol	0,200*	0,823
-"-	Tamoxifen	0,200*	0,560
-"-	0,01 µg/ml	0,200*	0,638
-"-	0,1 µg/ml	0,200*	0,139
-"-	1 µg/ml	0,104	0,030
-"-	10 µg/ml	0,200*	0,108
-"-	50 µg/ml	0,050	0,083
-"-	100 µg/ml	0,070	0,226
-"-	500 µg/ml	0,029	0,062
-"-	1000 µg/ml	0,018	0,000

*dies ist eine Untergrenze der tatsächlichen Signifikanz

BT-20 LDH- Test mit Mikrowellenextrakt

Kontrollsubstanz	n	Median	Interquartile Range (IQR) <i>p25; p75</i>	Signifikanz <i>p</i>
17β- Estradiol	12	0,10	-16,69; 4,75	0,531
Tamoxifen	12	93,28	83,10; 96,07	< 0,001
0.01	12	-12,66	-16,65; -10,80	< 0,001
0.1	12	-15,72	-20,15; -10,06	< 0,001
1	12	-13,96	-18,48; -9,85	< 0,001
10	12	-15,67	-19,95; -8,96	< 0,001
50	12	-15,60	-20,65; -7,85	< 0,001
100	12	-12,68	-19,37; -6,43	< 0,001
500	12	-11,90	-15,76; -1,82	0,001
1000	12	-2,07	-11,09; 8,83	0,891

Kontrollsubstanz	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler Mittelwert
17β- Estradiol	-2,3685	12,61102	3,64049
Tamoxifen	89,6728	9,18694	2,65204
0.01	-12,7208	3,79126	1,09444
0.1	-13,6917	8,20371	2,36821
1	-13,2467	6,31158	1,82200
10	-14,0603	6,71142	1,93742
50	-14,5118	7,05299	2,03602
100	-12,3659	7,23563	2,08875
500	-10,2584	7,31962	2,11299
1000	-,4573	11,25165	3,24807

Versuch	Testsubstanz	p nach Kolmogorow - Smirnow	p nach Shapiro Wilk
BT-20 LDH Mikrowelle	17β-Estradiol	0,171	0,260
-"-	Tamoxifen	0,094	0,181
-"-	0,01 µg/ml	0,200*	0,198
-"-	0,1 µg/ml	0,086	0,041
-"-	1 µg/ml	0,200*	0,692
-"-	10 µg/ml	0,200*	0,089
-"-	50 µg/ml	0,200*	0,534
-"-	100 µg/ml	0,200*	0,442
-"-	500 µg/ml	0,175	0,205
-"-	1000 µg/ml	0,200*	0,179

* dies ist eine Untergrenze der tatsächlichen Signifikanz

MCF-7 BrdU- Test mit Extrakt nach Luyengi

Kontrollsubstanz	n	Median	Interquartile Range (IQR) <i>p25; p75</i>	Signifikanz <i>p</i>
17β- Estradiol	12	110,06	104,40; 123,03	0,002
Tamoxifen	12	7,56	0,50; 14,03	< 0,001
0.01	12	94,25	87,28; 98,71	0,003
0.1	12	92,91	82,33; 98,48	0,006
1	12	91,12	83,82; 94,75	0,001
10	12	84,31	81,58; 88,61	< 0,001
50	12	29,82	25,58; 47,43	< 0,001
100	12	10,23	7,71; 13,02	< 0,001
500	12	7,72	4,73; 9,64	< 0,001
1000	12	7,62	5,00; 11,05	< 0,001

Kontrollsubstanz	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler Mittelwert
17β- Estradiol	113,3406	11,06400	3,19390
Tamoxifen	7,8943	7,60897	2,19652
0.01	93,2331	6,20934	1,79248
0.1	90,8811	9,19563	2,65455
1	89,6059	8,58273	2,47762
10	85,3856	5,11720	1,47721
50	36,4757	14,38916	4,15379
100	10,5331	3,46677	1,00077
500	7,6363	3,11866	0,90028
1000	8,2335	4,01013	1,15763

Versuch	Testsubstanz	p nach Kolmogorow - Smirnow	p nach Shapiro Wilk
MCF-7 BrdU Luyengi	17β-Estradiol	0,195	0,182
-"-	Tamoxifen	0,200*	0,294
-"-	0,01 µg/ml	0,200*	0,671
-"-	0,1 µg/ml	0,200*	0,884
-"-	1 µg/ml	0,200*	0,995
-"-	10 µg/ml	0,200*	0,353
-"-	50 µg/ml	0,095	0,041
-"-	100 µg/ml	0,119	0,306
-"-	500 µg/ml	0,200*	0,852
-"-	1000 µg/ml	0,200*	0,963

*dies ist eine Untergrenze der tatsächlichen Signifikanz

MCF-7 BrdU- Test mit Mikrowellenextrakt

Kontrollsubstanz	n	Median	Interquartile Range (IQR) <i>p25; p75</i>	Signifikanz <i>p</i>
17β- Estradiol	20	81,74	68,31; 87,44	< 0,001
Tamoxifen	20	9,90	0,51; 14,10	< 0,001
0.01	20	89,78	83,71; 102,71	0,137
0.1	20	97,53	77,29; 105,82	0,113
1	20	92,18	80,16; 101,71	0,022
10	20	93,03	85,76; 100,98	0,010
50	20	94,32	77,42; 104,87	0,058
100	20	91,81	72,91; 107,53	0,069
500	20	124,65	109,09; 144,81	0,001
1000	20	121,79	109,00; 151,33	0,001

Kontrollsubstanz	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler Mittelwert
17β- Estradiol	76,1786	16,52420	3,69492
Tamoxifen	10,5584	12,42479	2,77827
0.01	93,8846	17,63133	3,94248
0.1	90,5354	25,49598	5,70107
1	89,7758	18,38136	4,11020
10	91,6901	12,95742	2,89737
50	91,5987	18,59979	4,15904
100	89,7331	23,78621	5,31876
500	128,4384	31,14299	6,96378
1000	128,3519	31,40398	7,02214

Versuch	Testsubstanz	p nach Kolmogorow - Smirnow	p nach Shapiro Wilk
MCF-7BrdU Mikrowelle	17β-Estradiol	0,060	0,018
-"-	Tamoxifen	0,077	0,149
-"-	0,01 µg/ml	0,105	0,080
-"-	0,1 µg/ml	0,026	0,419
-"-	1 µg/ml	0,200*	0,683
-"-	10 µg/ml	0,099	0,129
-"-	50 µg/ml	0,057	0,435
-"-	100 µg/ml	0,200*	0,296
-"-	500 µg/ml	0,200*	0,412
-"-	1000 µg/ml	0,148	0,462

*dies ist eine Untergrenze der tatsächlichen Signifikanz

MCF-7 MTT- Test mit Extrakt nach Luyengi

Kontrollsubstanz	n	Median	Interquartile Range (IQR) <i>p25; p75</i>	Signifikanz <i>p</i>
17β- Estradiol	16	97,12	93,25; 99,62	0,035
Tamoxifen	16	-2,40	-2,79; -0,70	< 0,001
0.01	16	99,82	92,86; 108,52	0,555
0.1	16	102,88	92,18; 116,51	0,217
1	16	103,35	89,15; 111,40	0,742
10	16	104,40	93,75; 116,19	0,121
50	16	48,87	42,74; 51,21	< 0,001
100	16	38,26	35,57; 40,60	< 0,001
500	16	12,33	11,30; 14,44	< 0,001
1000	16	19,60	18,18; 23,70	< 0,001

Kontrollsubstanz	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler Mittelwert
17β- Estradiol	96,9799	5,20897	1,30224
Tamoxifen	-1,9467	1,12823	0,28206
0.01	101,7501	11,58454	2,89613
0.1	104,1877	13,00687	3,25172
1	100,9218	10,98687	2,74672
10	104,4429	10,80703	2,70176
50	49,9212	13,03549	3,25887
100	38,0020	4,62502	1,15626
500	13,5471	4,75146	1,18787
1000	20,4699	3,97636	0,99409

Versuch	Testsubstanz	p nach Kolmogorow - Smirnow	p nach Shapiro Wilk
MCF-7 MTT Luyengi	17β-Estradiol	0,061	0,350
-"-	Tamoxifen	0,085	0,082
-"-	0,01 µg/ml	0,200*	0,019
-"-	0,1 µg/ml	0,191	0,112
-"-	1 µg/ml	0,097	0,044
-"-	10 µg/ml	0,200*	0,211
-"-	50 µg/ml	0,003	0,001
-"-	100 µg/ml	0,200*	0,621
-"-	500 µg/ml	0,000	0,000
-"-	1000 µg/ml	0,200*	0,580

*dies ist eine Untergrenze der tatsächlichen Signifikanz

MCF-7 MTT- Test mit Mikrowellenextrakt

Kontrollsubstanz	n	Median	Interquartile Range (IQR) <i>p25; p75</i>	Signifikanz <i>p</i>
17β- Estradiol	24	101,78	92,63; 105,21	0,510
Tamoxifen	24	-4,76	-6,24; -3,33	< 0,001
0.01	24	93,21	90,18; 98,94	0,001
0.1	24	90,62	87,64; 97,29	< 0,001
1	24	89,23	83,99; 93,25	< 0,001
10	24	90,95	85,69; 94,68	< 0,001
50	24	97,51	94,91; 107,33	0,620
100	24	98,75	89,30; 107,72	0,174
500	24	162,40	112,72; 202,47	< 0,001
1000	24	173,79	121,27; 196,54	< 0,001

Kontrollsubstanz	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler Mittelwert
17β- Estradiol	98,8099	8,71761	1,77947
Tamoxifen	-4,8089	1,72562	0,35224
0.01	93,6299	7,89769	1,61211
0.1	91,7544	6,57511	1,34214
1	90,3536	7,49796	1,53051
10	91,2090	6,03816	1,23254
50	99,1567	8,22989	1,67992
100	95,0649	17,24821	3,52078
500	157,6026	42,21431	8,61696
1000	165,2138	36,09421	7,36770

Versuch	Testsubstanz	p nach Kolmogorow - Smirnow	p nach Shapiro Wilk
MCF-7MTT Mikrowelle	17β-Estradiol	0,008	0,249
-''-	Tamoxifen	0,200*	0,364
-''-	0,01 µg/ml	0,200*	0,481
-''-	0,1 µg/ml	0,200*	0,800
-''-	1 µg/ml	0,200*	0,039
-''-	10 µg/ml	0,200*	0,140
-''-	50 µg/ml	0,170	0,464
-''-	100 µg/ml	0,068	0,000
-''-	500 µg/ml	0,072	0,043
-''-	1000 µg/ml	0,005	0,003

*dies ist eine Untergrenze der tatsächlichen Signifikanz

MCF-7 LDH- Test mit Extrakt nach Luyengi

Kontrollsubstanz	n	Median	Interquartile Range (IQR) <i>p25; p75</i>	Signifikanz <i>p</i>
17β- Estradiol	16	2,05	-3,40; 4,67	0,348
Tamoxifen	16	102,25	93,78; 106,83	< 0,000
0.01	16	-1,24	-6,44; 6,27	0,648
0.1	20	-3,09	-24,63; 0,80	0,030
1	20	-5,62	-21,38; 0,70	0,006
10	16	-1,55	-12,24; 1,03	0,058
50	20	35,08	29,52; 63,88	< 0,001
100	16	63,88	40,94; 70,21	< 0,001
500	16	75,42	69,73; 84,89	< 0,001
1000	16	76,51	66,98; 82,67	< 0,001

Kontrollsubstanzen	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler Mittelwert
17β- Estradiol	1,1769	4,85528	1,21382
Tamoxifen	103,0434	9,80081	2,45020
0.01	-1,1929	10,23610	2,55903
0.1	-8,2569	15,69827	3,51024
1	-8,6758	12,50717	2,79669
10	-4,1396	8,06844	2,01711
50	43,6944	18,45556	4,12679
100	58,1954	18,76413	4,69103
500	80,2340	17,28064	4,32016
1000	73,9192	16,26527	4,06632

Versuch	Testsubstanz	p nach Kolmogorow - Smirnow	p nach Shapiro Wilk
MCF-7 LDH Luyengi	17β-Estradiol	0,200*	0,451
-''-	Tamoxifen	0,200*	0,029
-''-	0,01 µg/ml	0,200*	0,286
-''-	0,1 µg/ml	0,013	0,066
-''-	1 µg/ml	0,065	0,142
-''-	10 µg/ml	0,153	0,341
-''-	50 µg/ml	0,008	0,036
-''-	100 µg/ml	0,186	0,066
-''-	500 µg/ml	0,086	0,000
-''-	1000 µg/ml	0,039	0,015

*dies ist eine Untergrenze der tatsächlichen Signifikanz

MCF-7 LDH- Test mit Mikrowellenextrakt

Kontrollsubstanz	n	Median	Interquartile Range (IQR) <i>p25; p75</i>	Signifikanz <i>p</i>
17β- Estradiol	16	8,76	-8,54; 23,58	0,139
Tamoxifen	16	88,32	75,65; 97,93	< 0,001
0.01	12	-17,20	-31,30; -9,35	0,001
0.1	12	-14,71	-28,88; -7,66	< 0,001
1	12	-14,88	-34,23; -9,71	< 0,001
10	12	-15,25	-33,09; -9,54	0,001
50	12	-29,39	-31,82; -11,48	< 0,001
100	12	-33,06	-36,23; -29,69	< 0,001
500	12	-23,03	-36,29; -20,73	< 0,001
1000	16	-7,18	-27,61; -6,26	0,254

Kontrollsubstanz	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler Mittelwert
17β- Estradiol	7,1547	18,29258	4,57314
Tamoxifen	87,7796	14,78483	3,69621
0.01	-18,7550	13,37241	3,86028
0.1	-17,6323	11,87289	3,42741
1	-19,8295	11,47779	3,31335
10	-18,7810	14,28722	4,12437
50	-22,5059	12,83214	3,70432
100	-30,9611	7,38890	2,13299
500	-27,2686	9,00101	2,59837
1000	-5,9537	20,09702	5,02426

Versuch	Testsubstanz	p nach Kolmogorow - Smirnow	p nach ShapiroWilk
MCF-7LDH Mikrowelle	17β-Estradiol	0,200*	0,979
-"-	Tamoxifen	0,092	0,092
-"-	0,01 µg/ml	0,096	0,264
-"-	0,1 µg/ml	0,082	0,182
-"-	1 µg/ml	0,154	0,019
-"-	10 µg/ml	0,200*	0,205
-"-	50 µg/ml	0,008	0,107
-"-	100 µg/ml	0,041	0,008
-"-	500 µg/ml	0,026	0,150
-"-	1000 µg/ml	0,130	0,046

*dies ist eine Untergrenze der tatsächlichen Signifikanz

MCF-10A BrdU- Test mit Extrakt nach Luyengi

Kontrollsubstanz	n	Median	Interquartile Range (IQR) <i>p25; p75</i>	Signifikanz <i>p</i>
17β- Estradiol	12	70,72	56,27; 97,66	0,02
Tamoxifen	12	-1,00	-2,96; 6,83	< 0,001
0.01	12	91,60	60,94; 110,46	0,214
0.1	12	94,66	84,37; 109,31	0,179
1	12	101,84	91,98; 108,28	0,744
10	12	80,12	62,54; 101,56	0,018
50	12	24,25	8,07; 30,17	< 0,001
100	12	4,23	-2,03; 6,24	< 0,001
500	12	18,15	7,00; 34,84	< 0,001
1000	12	19,68	15,09; 32,09	< 0,001

Kontrollsubstanz	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler Mittelwert
17β- Estradiol	71,8006	23,95789	6,91605
Tamoxifen	1,2811	7,41140	2,13949
0.01	89,0781	28,70955	8,28773
0.1	90,7631	22,27486	6,43020
1	101,3689	14,13777	4,08122
10	82,0293	22,48216	6,49004
50	21,1836	14,17453	4,09183
100	5,6446	14,31128	4,13131
500	21,0651	15,24775	4,40165
1000	22,0907	10,30268	2,97413

Versuch	Testsubstanz	p nach Kolmogorow -Smirnow	p nach ShapiroWilk
MCF-10ABrdU Luyengi	17β-Estradiol	0,200*	0,389
-"-	Tamoxifen	0,065	0,277
-"-	0,01 µg/ml	0,200*	0,517
-"-	0,1 µg/ml	0,195	0,055
-"-	1 µg/ml	0,145	0,748
-"-	10 µg/ml	0,200*	0,886
-"-	50 µg/ml	0,200*	0,590
-"-	100 µg/ml	0,002	0,044
-"-	500 µg/ml	0,200*	0,616
-"-	1000 µg/ml	0,200*	0,776

*dies ist eine Untergrenze der tatsächlichen Signifikanz

MCF-10A BrdU- Test mit Mikrowellenextrakt

Kontrollsubstanz	n	Median	Interquartile Range (IQR) <i>p25; p75</i>	Signifikanz <i>p</i>
17β- Estradiol	16	72,89	67,91; 82,13	< 0,001
Tamoxifen	16	1,86	-2,59; 8,45	< 0,001
0.01	16	62,64	41,94; 71,64	< 0,001
0.1	16	40,25	30,09; 51,41	< 0,001
1	16	48,25	41,59; 63,00	< 0,001
10	16	60,55	56,17; 70,46	< 0,001
50	16	121,08	96,68; 135,11	0,014
100	16	99,21	81,95; 116,16	0,619
500	16	72,00	51,88; 103,20	0,001
1000	16	15,33	-1,79; 36,41	< 0,001

Kontrollsubstanz	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler Mittelwert
17β- Estradiol	77,5989	18,74577	4,68644
Tamoxifen	3,1259	8,21681	2,05420
0.01	57,7638	18,14299	4,53575
0.1	39,5350	14,60904	3,65226
1	50,7533	17,18105	4,29526
10	64,5391	13,61408	3,40352
50	116,9661	24,29031	6,07258
100	96,8150	25,11318	6,27830
500	73,4360	26,63556	6,65889
1000	15,7870	22,66953	5,66738

Versuch	Testsubstanz	p nach Kolmogorow -Smirnow	p nach ShapiroWilk
MCF-10ABrdUMikrowelle	17β-Estradiol	0,045	0,020
-''-	Tamoxifen	0,200*	0,110
-''-	0,01 µg/ml	0,200*	0,180
-''-	0,1 µg/ml	0,200*	0,949
-''-	1 µg/ml	0,200*	0,764
-''-	10 µg/ml	0,137	0,073
-''-	50 µg/ml	0,089	0,225
-''-	100 µg/ml	0,082	0,308
-''-	500 µg/ml	0,200*	0,215
-''-	1000 µg/ml	0,200*	0,396

*dies ist eine Untergrenze der tatsächlichen Signifikanz

MCF-10A MTT- Test mit Extrakt nach Luyengi

Kontrollsubstanz	n	Median	Interquartile Range (IQR) <i>p25; p75</i>	Signifikanz <i>p</i>
17β- Estradiol	16	159,84	146,69; 172,78	< 0,001
Tamoxifen	16	-16,32	-24,69; -13,78	< 0,001
0.01	16	86,73	83,91; 89,52	< 0,001
0.1	16	80,52	75,84; 82,01	< 0,001
1	16	78,88	74,13; 82,51	< 0,001
10	16	86,23	82,95; 89,34	< 0,001
50	16	128,86	115,79; 137,94	< 0,001
100	16	96,40	89,31; 104,92	0,308
500	16	34,40	27,28; 43,56	< 0,001
1000	16	48,13	35,98; 54,09	< 0,001

Kontrollsubstanz	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler Mittelwert
17β- Estradiol	160,6782	15,80520	3,95130
Tamoxifen	-18,6678	5,80174	1,45043
0.01	85,9728	4,00452	1,00113
0.1	78,0468	6,58216	1,64554
1	77,7308	6,49571	1,62393
10	86,4173	5,02519	1,25630
50	126,7168	15,28971	3,82243
100	97,3642	9,99906	2,49977
500	36,7031	14,10803	3,52701
1000	44,3457	13,17459	3,29365

Versuch	Testsubstanz	p nach Kolmogorow - Smirnow	p nach Shapiro Wilk
MCF-10A MTTLuyengi	17β-Estradiol	0,075	0,064
-"-	Tamoxifen	0,119	0,026
-"-	0,01 µg/ml	0,200*	0,055
-"-	0,1 µg/ml	0,064	0,106
-"-	1 µg/ml	0,200*	0,451
-"-	10 µg/ml	0,200*	0,648
-"-	50 µg/ml	0,200*	0,735
-"-	100 µg/ml	0,200*	0,607
-"-	500 µg/ml	0,200*	0,041
-"-	1000 µg/ml	0,184	0,047

*dies ist eine Untergrenze der tatsächlichen Signifikanz

MCF-10A MTT- Test mit Mikrowellenextrakt

Kontrollsubstanz	n	Median	Interquartile Range (IQR) <i>p25; p75</i>	Signifikanz <i>p</i>
17β- Estradiol	16	147,81	142,80; 163,30	< 0,001
Tamoxifen	16	-18,64	-21,50; -11,70	< 0,001
0.01	16	82,26	79,26; 87,29	< 0,001
0.1	16	76,26	72,75; 79,45	< 0,001
1	16	73,78	68,61; 83,43	< 0,001
10	16	65,68	62,02; 85,82	< 0,001
50	16	103,23	95,03; 113,14	0,116
100	16	90,61	85,09; 97,71	0,001
500	16	124,53	117,15; 138,66	< 0,001
1000	16	131,37	100,93; 153,06	0,002

Kontrollsubstanz	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler Mittelwert
17β- Estradiol	151,9885	16,76712	4,19178
Tamoxifen	-17,7164	5,23427	1,30857
0.01	83,4316	4,57237	1,14309
0.1	76,0731	4,93868	1,23467
1	75,8342	9,17399	2,29350
10	70,9271	13,11034	3,27758
50	104,4125	10,56500	2,64125
100	90,6161	9,42280	2,35570
500	127,5154	15,14964	3,78741
1000	128,6726	29,82671	7,45668

Versuch	Testsubstanz	p nach Kolmogorow - Smirnow	p nach Shapiro Wilk
MCF-10A MTT Mikrowelle	17β-Estradiol	0,200*	0,915
–"	Tamoxifen	0,200*	0,332
–"	0,01 µg/ml	0,200*	0,650
–"	0,1 µg/ml	0,200*	0,911
–"	1 µg/ml	0,132	0,314
–"	10 µg/ml	0,001	0,010
–"	50 µg/ml	0,130	0,029
–"	100 µg/ml	0,200*	0,997
–"	500 µg/ml	0,090	0,245
–"	1000 µg/ml	0,059	0,116

*dies ist eine Untergrenze der tatsächlichen Signifikanz

MCF-10A LDH- Test mit Extrakt nach Luyengi

Kontrollsubstanz	n	Median	Interquartile Range (IQR) <i>p25; p75</i>	Signifikanz <i>p</i>
17β- Estradiol	16	-11,68	-24,54; 4,56	0,022
Tamoxifen	16	92,95	88,97; 104,82	< 0,001
0.01	16	1,41	-7,52; 11,96	0,639
0.1	16	-7,85	-17,25; -0,29	0,007
1	16	-11,79	-37,61; -4,86	0,001
10	15	-9,88	-21,16; -2,59	0,001
50	15	-11,92	-22,13; -6,98	0,029
100	16	-11,96	-18,81; -4,83	0,001
500	16	80,70	75,49; 100,00	< 0,001
1000	16	72,81	66,79; 87,10	< 0,001

Kontrollsubstanz	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler Mittelwert
17β- Estradiol	-14,7639	23,17962	5,79490
Tamoxifen	94,2299	11,30634	2,82658
0.01	-1,6839	14,07518	3,51879
0.1	-9,9462	12,74808	3,18702
1	-20,0093	20,20577	5,05144
10	-11,0026	9,78737	2,52709
50	-14,7278	23,44576	6,05367
100	-10,3529	10,56670	2,64168
500	86,1498	18,96365	4,74091
1000	74,7676	16,38384	4,09596

Versuch	Testsubstanz	p nach Kolmogorow - Smirnow	p nach Shapiro Wilk
MCF-10A LDH Luyengi	17β-Estradiol	0,200*	0,003
-"-	Tamoxifen	0,200*	0,845
-"-	0,01 µg/ml	0,200*	0,557
-"-	0,1 µg/ml	0,200*	0,437
-"-	1 µg/ml	0,022	0,044
-"-	10 µg/ml	0,200*	0,156
-"-	50 µg/ml	0,006	0,003
-"-	100 µg/ml	0,200*	0,554
-"-	500 µg/ml	0,102	0,028
-"-	1000 µg/ml	0,118	0,063

*dies ist eine Untergrenze der tatsächlichen Signifikanz

MCF- 10A LDH- Test mit Mikrowellenextrakt

Kontrollsubstanz	n	Median	Interquartile Range (IQR) <i>p25; p75</i>	Signifikanz <i>p</i>
17β- Estradiol	16	-5,72	-10,76; 3,10	0,054
Tamoxifen	16	93,54	85,65; 101,14	< 0,001
0.01	16	-0,12	-11,92; 6,03	0,827
0.1	16	-1,66	-17,34; 4,58	0,173
1	16	-13,42	-20,97; 1,49	0,019
10	16	-4,13	-15,48; 2,66	0,021
50	16	-1,30	-6,89; 2,20	0,051
100	16	-9,57	-15,49; 1,64	0,008
500	16	1,88	-8,25; 10,30	0,380
1000	16	-3,12	-9,67; 5,89	0,767

Kontrollsubstanz	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler Mittelwert
17β- Estradiol	-6,0773	11,64181	2,91045
Tamoxifen	91,1967	17,82742	4,45686
0.01	-0,8597	15,48570	3,87143
0.1	-4,2261	11,81592	2,95398
1	-8,9248	13,60553	3,40138
10	-5,8808	9,13369	2,28342
50	-4,1174	7,74824	1,93706
100	-7,2558	9,48243	2,37061
500	2,4472	10,82849	2,70712
1000	-0,9674	12,84901	3,21225

Versuch	Testsubstanz	p nach Kolmogorow - Smirnow	p nach Shapiro Wilk
MCF-10A LDH Mikrowelle	17β-Estradiol	0,200*	0,709
-"-	Tamoxifen	0,160	0,021
-"-	0,01 µg/ml	0,200*	0,604
-"-	0,1 µg/ml	0,200*	0,027
-"-	1 µg/ml	0,185	0,094
-"-	10 µg/ml	0,200*	0,196
-"-	50 µg/ml	0,195	0,013
-"-	100 µg/ml	0,200*	0,326
-"-	500 µg/ml	0,200*	0,355
-"-	1000 µg/ml	0,200*	0,464

*dies ist eine Untergrenze der tatsächlichen Signifikanz

MCF-12A BrdU- Test mit Extrakt nach Luyengi

Kontrollsubstanz	n	Median	Interquartile Range (IQR) <i>p25; p75</i>	Signifikanz <i>p</i>
17β- Estradiol	20	84,67	73,75; 101,57	0,007
Tamoxifen	20	-1,57	-6,73; 9,62	< 0,001
0.01	20	103,32	66,06; 116,30	0,336
0.1	20	88,37	76,74; 105,95	0,221
1	20	86,31	59,29; 106,09	0,024
10	20	57,29	52,43; 99,78	0,001
50	20	113,74	94,76; 133,18	0,044
100	20	122,98	108,11; 146,73	0,001
500	20	12,15	1,69; 45,64	< 0,001
1000	20	6,37	-3,92; 13,75	< 0,001

Kontrollsubstanz	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler Mittelwert
17β- Estradiol	86,7546	19,49948	4,36022
Tamoxifen	0,4187	8,48613	1,89756
0.01	92,5517	33,75565	7,54799
0.1	91,0691	31,56951	7,05916
1	84,1305	28,88675	6,45927
10	70,2824	33,10533	7,40258
50	112,9680	26,89786	6,01455
100	123,4759	26,07940	5,83153
500	19,4377	22,84840	5,10906
1000	6,3958	10,08600	2,25530

Versuch	Testsubstanz	p nach Kolmogorow - Smirnow	p nach Shapiro Wilk
MCF-12A BrdU Luyengi	17β-Estradiol	0,200*	0,283
-"-	Tamoxifen	0,038	0,068
-"-	0,01 µg/ml	0,194	0,122
-"-	0,1 µg/ml	0,192	0,390
-"-	1 µg/ml	0,200*	0,676
-"-	10 µg/ml	0,026	0,329
-"-	50 µg/ml	0,200*	0,926
-"-	100 µg/ml	0,200*	0,115
-"-	500 µg/ml	0,119	0,018
-"-	1000 µg/ml	0,200*	0,355

*dies ist eine Untergrenze der tatsächlichen Signifikanz

MCF-12A BrdU- Test mit Mikrowellenextrakt

Kontrollsubstanz	n	Median	Interquartile Range (IQR) <i>p25; p75</i>	Signifikanz <i>p</i>
17β- Estradiol	16	117,22	97,99; 141,37	0,014
Tamoxifen	16	-3,09	-6,16; 5,98	< 0,001
0.01	16	80,12	66,32; 97,24	0,006
0.1	16	82,74	71,56; 99,77	0,008
1	16	84,92	64,07; 96,53	0,003
10	16	92,30	57,68; 104,22	0,030
50	16	120,16	112,92; 129,94	< 0,001
100	16	90,35	78,41; 109,67	0,251
500	16	115,07	92,48; 132,30	0,035
1000	16	117,59	95,43; 159,51	0,019

Kontrollsubstanz	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler Mittelwert
17β- Estradiol	123,2140	33,43588	8,35897
Tamoxifen	-2,3570	14,02843	3,50711
0.01	83,0894	21,13994	5,28499
0.1	83,0883	21,96698	5,49175
1	75,5631	28,21788	7,05447
10	80,0974	33,18374	8,29594
50	122,6965	16,38614	4,09654
100	93,8234	20,68077	5,17019
500	115,7746	27,26524	6,81631
1000	124,1333	36,73160	9,18290

Versuch	Testsubstanz	p nach Kolmogorow - Smirnow	p nach Shapiro Wilk
MCF-12A BrdU Mikrowelle	17β-Estradiol	0,200*	0,207
-"-	Tamoxifen	0,074	0,307
-"-	0,01 µg/ml	0,200*	0,481
-"-	0,1 µg/ml	0,200*	0,569
-"-	1 µg/ml	0,053	0,007
-"-	10 µg/ml	0,004	0,013
-"-	50 µg/ml	0,200*	0,178
-"-	100 µg/ml	0,200*	0,788
-"-	500 µg/ml	0,200*	0,695
-"-	1000 µg/ml	0,200*	0,898

*dies ist eine Untergrenze der tatsächlichen Signifikanz

MCF-12A MTT- Test mit Extrakt nach Luyengi

Kontrollsubstanz	n	Median	Interquartile Range (IQR) <i>p25; p75</i>	Signifikanz <i>p</i>
17β- Estradiol	12	117,66	107,81; 127,30	< 0,001
Tamoxifen	12	-7,42	-9,97; -0,41	< 0,001
0.01	12	97,51	93,66; 101,18	0,125
0.1	12	93,76	92,18; 97,86	0,002
1	12	91,32	86,67; 95,69	< 0,001
10	16	96,10	94,21; 98,41	0,001
50	12	101,09	86,19; 119,28	0,498
100	12	78,68	72,07; 83,48	< 0,001
500	12	33,95	27,83; 37,45	< 0,001
1000	12	19,69	16,49; 21,89	< 0,001

Kontrollsubstanz	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler Mittelwert
17β- Estradiol	118,1191	9,98822	2,88335
Tamoxifen	-6,1218	4,47531	1,29191
0.01	97,3732	5,48444	1,58322
0.1	94,1203	4,90791	1,41679
1	90,9257	5,22102	1,50718
10	94,8611	4,85340	1,21335
50	103,6104	17,86774	5,15797
100	78,1238	6,34452	1,83151
500	33,1345	6,81309	1,96677
1000	19,7726	3,83570	1,10727

Versuch	Testsubstanz	p nach Kolmogorow - Smirnow	p nach Shapiro Wilk
MCF-12A MTT Luyengi	17β-Estradiol	0,200*	0,190
-"-	Tamoxifen	0,131	0,029
-"-	0,01 µg/ml	0,200*	0,903
-"-	0,1 µg/ml	0,200*	0,380
-"-	1 µg/ml	0,200*	0,454
-"-	10 µg/ml	0,200*	0,590
-"-	50 µg/ml	0,200*	0,387
-"-	100 µg/ml	0,200*	0,751
-"-	500 µg/ml	0,200*	0,981
-"-	1000 µg/ml	0,200*	0,486

*dies ist eine Untergrenze der tatsächlichen Signifikanz

MCF-12A MTT- Test mit Mikrowellenextrakt

Kontrollsubstanz	n	Median	Interquartile Range (IQR) <i>p25; p75</i>	Signifikanz <i>p</i>
17β- Estradiol	16	116,68	109,07; 119,05	< 0,001
Tamoxifen	16	-5,06	-8,80; -1,04	< 0,001
0.01	16	96,11	90,57; 99,72	0,004
0.1	16	94,76	84,39; 98,76	0,003
1	16	95,13	86,37; 99,12	0,002
10	16	92,11	83,75; 96,23	< 0,001
50	16	102,49	97,99; 106,20	0,455
100	16	103,98	97,14; 109,09	0,063
500	16	120,41	109,89; 131,33	< 0,001
1000	16	124,08	117,21; 133,85	< 0,001

Kontrollsubstanz	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler Mittelwert
17β- Estradiol	115,4686	6,02975	1,50744
Tamoxifen	-5,1654	4,01724	1,00431
0.01	95,4473	5,27065	1,31766
0.1	91,6786	9,32777	2,33194
1	92,7965	7,81896	1,95474
10	90,4014	7,32030	1,83008
50	101,2711	6,63306	1,65827
100	103,0314	6,05047	1,51262
500	120,8635	11,92010	2,98002
1000	123,4787	13,57313	3,39328

Versuch	Testsubstanz	p nach Kolmogorow - Smirnow	p nach Shapiro Wilk
MCF-12A MTT Mikrowelle	17β-Estradiol	0,200*	0,602
-"-	Tamoxifen	0,200*	0,179
-"-	0,01 µg/ml	0,119	0,137
-"-	0,1 µg/ml	0,200*	0,087
-"-	1 µg/ml	0,174	0,214
-"-	10 µg/ml	0,200*	0,455
-"-	50 µg/ml	0,079	0,047
-"-	100 µg/ml	0,200*	0,234
-"-	500 µg/ml	0,200*	0,312
-"-	1000 µg/ml	0,200*	0,320

*dies ist eine Untergrenze der tatsächlichen Signifikanz

MCF-12A LDH- Test mit Extrakt nach Luyengi

Kontrollsubstanz	n	Median	Interquartile Range (IQR) <i>p25; p75</i>	Signifikanz <i>p</i>
17β- Estradiol	16	2,84	-3,69; 13,64	0,666
Tamoxifen	16	97,69	87,30; 116,03	< 0,001
0.01	16	-5,77	-18,67; 15,68	0,451
0.1	16	3,56	-14,16; 17,12	0,682
1	16	-5,87	-20,57; 3,37	0,119
10	16	2,98	-18,48; 10,14	0,456
50	16	-6,25	-13,31; -2,71	0,111
100	16	51,58	34,90; 65,79	< 0,001
500	16	77,42	62,15; 89,58	< 0,001
1000	16	73,30	60,27; 90,52	< 0,001

Kontrollsubstanz	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler Mittelwert
17β- Estradiol	1,8190	16,51764	4,12941
Tamoxifen	99,7479	16,69323	4,17331
0.01	-3,3802	17,48858	4,37214
0.1	1,6917	16,18499	4,04625
1	-7,9656	19,29294	4,82324
10	-3,2877	17,17120	4,29280
50	-5,6506	13,33599	3,33400
100	47,9421	21,86285	5,46571
500	78,7689	17,56599	4,39150
1000	75,1072	18,24475	4,56119

Versuch	Testsubstanz	p nach Kolmogorow - Smirnow	p nach Shapiro Wilk
MCF-12A LDH Luyengi	17β-Estradiol	0,168	0,202
-"-	Tamoxifen	0,200*	0,432
-"-	0,01 µg/ml	0,200*	0,108
-"-	0,1 µg/ml	0,200*	0,298
-"-	1 µg/ml	0,200*	0,676
-"-	10 µg/ml	0,080	0,047
-"-	50 µg/ml	0,051	0,005
-"-	100 µg/ml	0,200*	0,467
-"-	500 µg/ml	0,200*	0,302
-"-	1000 µg/ml	0,200*	0,602

*dies ist eine Untergrenze der tatsächlichen Signifikanz

MCF-12A LDH- Test mit Mikrowellenextrakt

Kontrollsubstanz	n	Median	Interquartile Range (IQR) <i>p25; p75</i>	Signifikanz <i>p</i>
17β- Estradiol	16	5,07	-15,65; 32,07	0,646
Tamoxifen	16	96,42	88,23; 116,89	< 0,001
0.01	16	6,46	-8,75; 34,52	0,075
0.1	16	3,05	-8,51; 4,77	0,983
1	16	-3,35	-11,33; 13,25	0,726
10	16	-0,18	-13,65; 16,81	0,917
50	16	-1,14	-16,25; 17,80	0,871
100	16	-12,91	-16,41; 14,71	0,736
500	16	-3,08	-6,75; 12,45	0,386
1000	16	45,03	29,64; 67,37	< 0,001

Kontrollsubstanz	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler Mittelwert
17β- Estradiol	4,1721	35,55873	8,88968
Tamoxifen	103,9270	22,01665	5,50416
0.01	13,2209	27,68118	6,92029
0.1	-,0439	8,18952	2,04738
1	1,4459	16,22254	4,05563
10	,6263	23,68646	5,92162
50	-,9075	21,89617	5,47404
100	-1,7849	20,82356	5,20589
500	2,9754	13,33058	3,33265
1000	47,5661	22,32452	5,58113

Versuch	Testsubstanz	p nach Kolmogorow - Smirnow	p nach Shapiro Wilk
MCF-12A LDH Mikrowelle	17β-Estradiol	0,200*	0,819
-"-	Tamoxifen	0,133	0,141
-"-	0,01 µg/ml	0,095	0,049
-"-	0,1 µg/ml	0,064	0,160
-"-	1 µg/ml	0,200*	0,311
-"-	10 µg/ml	0,200*	0,362
-"-	50 µg/ml	0,200*	0,570
-"-	100 µg/ml	0,001	0,008
-"-	500 µg/ml	0,017	0,007
-"-	1000 µg/ml	0,200*	0,568

*dies ist eine Untergrenze der tatsächlichen Signifikanz

HMEC BrdU- Test mit Extrakt nach Luyengi und Mikrowellenextrakt

Kontrollsubstanz	n	Median	Interquartile Range (IQR) <i>p25; p75</i>	Signifikanz <i>p</i>
17β- Estradiol	8	136,3485	113,5802; 146,5100	0,007
Tamoxifen	8	29,3352	17,2717; 65,9782	< 0,001
L 50	8	18,3048	-1,2821; 38,5328	< 0,001
L 100	8	7,4074	-11,9896; 37,1795	< 0,001
L 500	8	15,9307	0,5461; 30,8405	< 0,001
L 1000	8	23,4330	-4,2023; 76,5432	0,006
MW 50	8	19,7531	14,1026; 25,7123	< 0,001
MW 100	8	38,3088	13,2716; 73,5755	0,003
MW 500	8	17,2840	6,4103; 28,1814	< 0,001
MW 1000	8	7,9535	-4,9383; 42,3077	< 0,001

Kontrollsubstanz	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler Mittelwert
17β- Estradiol	129,5584	22,12823	7,82351
Tamoxifen	39,2574	25,45490	8,99967
L 50	18,2099	26,30250	9,29934
L 100	15,0285	31,96081	11,29985
L 500	16,2868	17,51354	6,19197
L 1000	34,5204	47,55942	16,81479
MW 50	20,1330	7,80438	2,75926
MW 100	45,0710	35,58139	12,57992
MW 500	17,6163	13,70105	4,84405
MW 1000	16,2868	34,64588	12,24917

Versuch	Testsubstanz	p nach Kolmogorow - Smirnow
HMEC BrdU Luyengi/Mikrowelle	17β-Estradiol	0,200
-''-	Tamoxifen	0,139
-''-	L 50 µg/ml	0,200
-''-	L 100 µg/ml	0,060
-''-	L 500 µg/ml	0,189
-''-	L 1000 µg/ml	0,200
-''-	MW 50 µg/ml	0,200
-''-	MW 100 µg/ml	0,200
-''-	MW 500 µg/ml	0,200
-''-	MW 1000 µg/ml	0,200

HMEC MTT-Vitalitätstest mit Extrakt nach Luyengi und Mikrowellenextrakt

Kontrollsubstanz	n	Median	Interquartile Range (IQR) p25; p75	Signifikanz p
17β- Estradiol	8	106,3551	102,4887; 110,0806	0,010
Tamoxifen	8	-7,7947	-16,5323; -3,5514	< 0,001
L 50	8	82,0561	77,4194; 85,4228	< 0,001
L 100	8	57,0093	51,2097; 63,6358	< 0,001
L 500	8	40,7567	35,0806; 46,9159	< 0,001
L 1000	8	113,3969	110,0806; 117,9439	< 0,001
MW 50	8	112,8761	108,3313; 119,2101	0,001
MW 100	8	100,1869	97,9839; 101,8692	0,879
MW 500	8	103,2258	100,1575; 106,3551	0,031
MW 1000	8	110,0935	109,6774; 110,2887	< 0,001

Kontrollsubstanz	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler Mittelwert
17β- Estradiol	105,9781	4,80957	1,70044
Tamoxifen	-9,5451	6,97063	2,46449
L 50	81,5281	6,29049	2,22403
L 100	57,2157	8,74616	3,09223
L 500	40,3147	7,47876	2,64414
L 1000	113,9041	5,91792	2,09230
MW 50	114,3262	7,36210	2,60290
MW 100	99,8110	3,39195	1,19924
MW 500	103,1009	3,26574	1,15462
MW 1000	109,9936	0,40182	0,14207

Versuch	Testsubstanz	p nach Kolmogorow - Smirnow
HMEC MTT Luyengi/Mikrowelle	17β-Estradiol	0,200
- "-	Tamoxifen	0,078
- "-	L 50 µg/ml	0,172
- "-	L 100 µg/ml	0,200
- "-	L 500 µg/ml	0,200
- "-	L 1000 µg/ml	0,200
- "-	MW 50 µg/ml	0,200
- "-	MW 100 µg/ml	0,200
- "-	MW 500 µg/ml	0,200
- "-	MW 1000 µg/ml	0,200

10 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit bisher von mir weder an der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock noch einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde.

Weiterhin versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Alle Zitate oder Stellen, die dem Wortlaut nach anderen Werken entnommen sind, habe ich in jedem einzelnen Fall unter genauer Angabe der Quelle als Entlehnung kenntlich gemacht.

Erfurt, Juni 2017

Sandra Weu- Domschke

11 Danksagung

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person, daher möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich bei der Erstellung meiner Dissertation in so vielfältiger Weise unterstützt haben.

Mein Dank gilt:

Meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. K. Kraft für die Vergabe des hochinteressanten Themas, für ihre zielführende wissenschaftliche und methodische Unterstützung, und die zahlreichen konstruktiven Ideen während der gesamten Bearbeitungsphase meiner Dissertation.

Frau PD Dr. D.- U. Richter für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die großartige Betreuung und Anleitung meiner praktischen Arbeit im Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik zu Rostock.

Dem gesamten Team des Forschungslabors, in dem ich mich immer sehr wohl gefühlt habe. Insbesondere danke ich Frau E. Greschkowitz, deren fundierte praktische Fähigkeiten mir bei der Laborarbeit eine große Hilfe waren, und Frau Dipl.-Biol. M. Szewczyk für die zahlreichen interessanten Gespräche und den fachlichen Diskurs.

Frau C. Bauer vom Institut für Biowissenschaften in Rostock für die versierte Anleitung und Hilfe bei der Herstellung des Leinwurzelextraktes nach Luyengi.

Frau Dr. C. Oppermann aus der Abteilung für analytische und technische Chemie am Institut für Chemie der Universität Rostock für die Herstellung des Mikrowellenextraktes und die chromatographischen Messungen sowie die zahlreichen fachlichen Anregungen und Erläuterungen.

Frau Dr. K. Kromeyer- Hauschild vom Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Jena für die hilfreiche Unterstützung bei der statistischen Aufarbeitung meiner Daten.

Frau Dr. C. Grieger aus dem Institut für Pathologie des Helios Klinikums Erfurt für die differenzierten Anregungen und fachkundigen methodischen Erläuterungen.

Ein besonderer Dank gilt meinem Mann, für die großartige Unterstützung, für die Geduld und das Verständnis, das er mir während der gesamten Schaffenszeit entgegengebracht hat.

