

Universitätsfrauenklinik Rostock  
(Direktor: Prof. Dr. med. habil. Bernd Gerber)

Der Einfluss der gelben Hauszwiebel (*Allium cepa*) im  
Vergleich zu den synthetischen Flavonoiden (Quercetin  
und Rutin) auf das Wachstumsverhalten der  
estrogenrezeptorpositiven Mammakarzinomzelllinie MCF-7

Inauguraldissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Lukas Franz Josef Hafer

geb. am 06.02.1992 in Osnabrück

Rostock, Februar 2018

**Dekan:** Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger, Universität Rostock

**Gutachter:**

PD Dr. rer. nat. Dagmar-Ulrike Richter, Gynäkologisches Forschungslabor der  
Universitätsfrauenklinik Rostock

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

Prof. Dr. med. Sherko Kümmel, Brustzentrum Kliniken Essen-Mitte, Universität  
Duisburg-Essen

Jahr der Einreichung: März 2018

Jahr der Verteidigung: November 2018

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Das Mammakarzinom der Frau .....	1
1.1.1 Allgemeines.....	1
1.1.2 Epidemiologie.....	2
1.1.3 Pathogenese .....	3
1.1.4 Pathohistologie.....	5
1.1.5 Risikofaktoren.....	6
1.1.6 Rezeptorstatus .....	6
1.1.7 Diagnostik und Therapie .....	7
1.1.8 Tamoxifen .....	9
1.1.9 Prävention .....	9
1.1.10 Komplementärer Therapieansatz.....	10
1.2 Die Zwiebel ( <i>Allium cepa</i> ) und ihre Bestandteile .....	11
1.3 Die Flavonoide.....	13
1.4 Quercetin .....	14
1.4.1 Wirkprofil .....	15
1.4.2 Resorption und Bioverfügbarkeit .....	15
1.5 Rutin .....	16
<b>2. Zielstellung .....</b>	<b>17</b>
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>18</b>
3.1 Extraktgewinnung .....	18
3.1.1 Ethanol-Verfahren .....	18
3.1.2 Wasser-Extraktionsverfahren .....	18
3.2 Zelllinie und Zellkultivierung.....	19
3.3 Vorbereitung der Zelltests.....	19
3.3.1 Bestimmung der Lebendzellzahl .....	19
3.3.2 Aufarbeitung der zu untersuchenden Substanzen.....	21
3.4 <i>In vitro</i> Zellteste .....	22

3.4.1 BrdU-Test.....	22
3.4.2 MTT-Test.....	23
3.4.3 Zytotoxizität-Test .....	24
3.4.4 Statistische Auswertung .....	26
3.5 Messung der Glukosekonzentration und des pH-Werts .....	27
3.6 Immunhistochemie .....	27
3.7 Pyrolyse-Feldionisations - Massenspektrometrie .....	29
3.8 High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	30
3.9 Geräte, Materialien und Chemikalien .....	33
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>36</b>
4.1 Pyrolyse-Feldionisations-Massenspektrometrie .....	36
4.2 High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	38
4.3 BrdU-Test .....	40
4.4 MTT-Test .....	41
4.5 Zytotoxizität-Test .....	43
4.6 Glukose- und pH-Wertmessung .....	45
4.7 Immunhistochemie .....	46
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>47</b>
5.1 Aussagen über genutzte Analysenmethoden im Vergleich zur Literatur .....	47
5.2 Zellteste .....	48
5.2.1 BrdU-Assay .....	48
5.2.2 MTT-Assay .....	49
5.2.3 Neutralrot-Assay.....	50
5.2.4 Glukosemessung.....	52
5.2.5 Wirkweise von Quercetin.....	52
5.3 Methodenkritik .....	54
5.4 Ausblick .....	55
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>57</b>
<b>7. Thesen.....</b>	<b>58</b>
<b>8. Publikation .....</b>	<b>59</b>
<b>9. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>61</b>
<b>10. Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>72</b>
<b>11. Curriculum vitae .....</b>	Fehler! Textmarke nicht definiert.
<b>12. Danksagung .....</b>	<b>73</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Inzidenzrate [%] der Malignomerkrankungen in 2012 in Deutschland. Übernommen aus dem Zentrum für Krebsregisterdaten [103].....	3
Abbildung 2:	Übersicht der Einflussfaktoren auf die Tumorgenese. Modifiziert nach Kreienberg et al. [66]. .....	4
Abbildung 3:	Übersicht der in der Natur vorkommenden Flavonoide mit ihren Subgruppen und Derivaten. Modifiziert nach Liu RH [71].....	13
Abbildung 4:	Mengenvergleich des Quercetingehalts unter den Gemüsesorten [49, 87, 88].....	14
Abbildung 5:	Grundgerüst des Quercetin-Moleküls ist links dargestellt. Der rechten Tabelle sind die Derivate mit den Substituenten von Quercetin zu entnehmen. Zusammengestellt nach Price et al. und Zu et al. [97, 135]. .....	14
Abbildung 6:	Bürker-Zellkammer unter mikroskopischer Sicht [113].....	20
Abbildung 7:	Prinzip des MTT-Tests (Fa. Roche): Umwandlung des gelben Tetrazolium-Salzes MTT in lilafarbenes Formazan [102].....	23
Abbildung 8:	Molekülstruktur des Farbstoffs Neutralrot, der nur von vitalen Zellen aufgenommen wird [116]. .....	25
Abbildung 9:	Schematische Darstellung der Massenspektrometrie. Modifiziert nach M. Gey.....	30
Abbildung 10:	Aufbau des Elutionsgradienten. Blau = Aquabidest; rot = DMSO. ..	31
Abbildung 11:	HPLC-Apparatur. Schema modifiziert nach M.Gey [42]. Über den Injektor wird die zu trennende Lösung der mobilen Phase hinzugeführt. In der Säule interagieren die Stoffe nach den Polaritätsunterschieden der Substituenten mit der stationären Phase.....	32
Abbildung 12:	Massenspekrogramm des Ethanol-Extrakts. Dargestellt sind die Intensitäten der einzelnen Verbindungen in Abhängigkeit zum Masse / Ladungs-Verhältnis. Das dazugehörige Thermogramm ist oben rechts abgebildet. ....	37
Abbildung 13:	Massenspektrometrische Untersuchung einer Probe aus der harten Zwiebelschale. Dargestellt ist die Signalintensität in Abhängigkeit zum Massen-zu-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ). Das dazugehörige Thermogram befindet sich oben rechts in der Abbildung. Quercetin-Aglycon befindet sich bei Peak 302 $m/z$ (blauer Pfeil) .....	37

---

Abbildung	14: Chromatogramm des Zwiebel-EtOH-Extrakts. Ordinate: Absorbanz in AU (Absorbance Units). Abszisse: Zeit in Minuten. Retentionszeit: Peak 1: 1,97 min; Peak 2: 10,83 min; Peak 3: 12,95 min; Peak 4: 13,48 min.	38
Abbildung	15: Chromatogramm des Zwiebel-H <sub>2</sub> O-Extrakts. Ordinate: Absorbanz in mAU (milli Absorbance Units); Abszisse: Zeit in min. Retentionszeit: Peak 1: 1,9min; Peak 2: 8,1min; Peak 3: 10,1min; Peak 4: 12,0min..	39
Abbildung	16: Repräsentatives Chromatogramm des Standards Quercetin-Aglycon. Ordinate: Absorbanz in AU (Absorbance Units). Abszisse in Zeit in Minuten. Retentionszeit: Peak 1: bei 13,4 min.....	39
Abbildung	17: BrdU-Test. Zellproliferation [%]. Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzen sind angegeben (Signifikanzniveau p<0,05). ZW-EtOH = Zwiebel-Ethanol-Extrakt, ZW-H <sub>2</sub> O = Zwiebel-Wasser-Extrakt.	40
Abbildung	18: MTT-Test nach 48h Inkubation. Dargestellt sind Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzen (Signifikanzniveau p < 0,05. ZW-EtOH = Zwiebel-Ethanol-Extrakt, ZW-H <sub>2</sub> O = Zwiebel-H <sub>2</sub> O-Extrakt	42
Abbildung	19: MTT-Test nach 72h Inkubation. Dargestellt sind Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzen (Signifikanzniveau p < 0,05). ZW-EtOH = Zwiebel-Ethanol-Extrakt, ZW-H <sub>2</sub> O = Zwiebel-H <sub>2</sub> O-Extrakt.	42
Abbildung	20: Neutralrot-Test. Die Aufnahme des Farbstoffs in Prozent zur Negativkontrolle spiegelt die Anzahl funktionsfähiger Tumorzellen wieder. Dargestellt sind Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzen (p < 0,05). ZW-EtOH = Zwiebel-Ethanol-Extrakt, ZW-H <sub>2</sub> O = Zwiebel-H <sub>2</sub> O-Extrakt .....	44
Abbildung	21: Kultivierte MCF-7-Zellen unter Aufnahme von Neutralrot in Anwesenheit des Zwiebel-EtOH-Extrakts 2250 ug / ml im Lichtmikroskop (10-fache Vergrößerung). Färbung 3-fach positiv. ....	44
Abbildung	22: Glukosekonzentration in mmol/l und in roten Balken präsentiert. pH-Wert als blaue Linie dargestellt. ZW-EtOH = Zwiebel-Ethanol-Extrakt, ZW- H <sub>2</sub> O = Zwiebel-Wasser-Extrakt .....	45
Abbildung	23: Immunhistochemie der MCF-7-Zelllinie. Bild A: Estrogenrezeptor alpha positiv. Bild: B Estrogenrezeptor beta positiv. Bild C: Progesteronrezeptor positiv. Bild D: Negativkontrolle.....	46

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Gesamtgehalt von Quercetin in der roten und gelben Zwiebel als Feuchtgewicht [mg / kg] (die mit * markierten Werte stellen das Trockengewicht [mg / kg] dar) .....	12
Tabelle 2: Endkonzentrationen der Zwiebel-Extrakte im Well [ $\mu\text{g} / \text{ml}$ ] .....	21
Tabelle 3: Endkonzentrationen der synthetischen Testsubstanzen im Well [ $\mu\text{g} / \text{ml}$ ]	
.....	21

## Abkürzungsverzeichnis

Aquabidest.	Aqua bidestillata
AU	Absorbance Units
BET	Brusterhaltende Therapie
BIRADS	Breast Imaging Report And Data System
BRCA	Breast Cancer (Gen)
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridine
COX	Cyclooxygenase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FKS	Fetales Kälberserum
GnRH	Gonadotropes-Releasing-Hormone
HER2/neu	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HRT	Hormonelle Ersatztherapie
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
MRM	Modified Radical Mastectomy
mTOR	Mechanistic target of rapamycin
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromid
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
NK	Natural Killer (Zellen)
OR	Odds Ratio
ER	Estrogenrezeptor
PAI-1	Plaminogen Aktivator Inhibitor 1
PBS	Phosphate Buffered Saline
PF-IM	Pyrolyse-Feldionisations-Massenspektrometrie
PR	Progesteronrezeptor
RNS	Reaktiv Nitrogen Species
ROS	Reaktive Oxygen Species
RPM	Rounds Per Minute
RR	Relative Ratio
RT	Raumtemperatur
SERM	Selektiver Estrogen Rezeptor Modulator
TNF	Tumornekrosefaktor
Qmg	Quercetin-4-monoglykosid
Qdg	Quercetin-3,4-diglykosid
Q3g	Quercetin-3-Glycosid
uPA	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator
VEGF	Vascular endothelial Growth Factor
ZW-EtOH	Zwiebel-Ethanol-Extrakt
ZW-Wasser	Zwiebel-Wasser-Extrakt

## 1. Einleitung

### 1.1 Das Mammakarzinom der Frau

#### 1.1.1 Allgemeines

Das Mammakarzinom der Frau besitzt in Deutschland die größte Prävalenz unter den malignen Tumorerkrankungen [31]. Durch die Verbesserung der diagnostischen und therapeutischen Mittel, konnte die Überlebenswahrscheinlichkeit über die letzten Jahre angehoben werden [103]. Multimodale Therapieansätze haben bei dieser Tumorentität einen hohen Stellenwert erlangt. Neben den etablierten Säulen des Therapiemanagements Operation, Strahlen- und systemische Chemotherapie werden auch phytotherapeutische Mittel in der Behandlung diskutiert.

Wegen der oftmals starken Nebenwirkungen herkömmlicher Therapieverfahren und dem Wunsch der Patientinnen selber an Therapieentscheidungen mitzuwirken, wird gerne auf eine komplementäre Behandlung zurückgegriffen. Nach einer Querschnittsstudie wünscht sich die Mehrheit der Brustkrebspatientinnen von ihrem behandelnden Krankhausarzt über die Angebote der Komplementärmedizin aufgeklärt zu werden [123]. 63 % der befragten Patientinnen nutzten bereits zusätzlich zur Standardtherapie ergänzende Therapieoptionen [123]. Unter vielen Tumorentitäten zeigte sich das Patientenkollektiv des Mammakarzinoms am meisten zugänglich für komplementäre Therapieanwendungen [80].

Demnach besteht ein eindeutiger Bedarf auf dem Forschungsgebiet der komplementären Onkologie weitere Naturstoffe zu identifizieren und deren mögliche Rolle als Ergänzung zur herkömmlichen Therapie zu überprüfen.

Die Zwiebel (*Allium cepa*) ist eine der ältesten Kulturpflanzen der Geschichte und wurde schon von den Ägyptern zur Vorbeugung von Krankheiten verzehrt. Dass sie bei der Bestattung des Königs Tutanchamun sogar Zwiebeln ins Grab legten, zeigt welche Bedeutung die Ägypter dieser Gemüsesorte beimaßen [13]. Aufgrund ihrer langen Haltbarkeit und einfachen Lagerbarkeit zählt sie seit Jahrhunderten zu den meist gehandelten Gemüsearten [47]. Bis heute ist die Zwiebel sehr beliebt und wird nicht nur in der Küche zubereitet, sondern auch in der Behandlung von Husten, Hals- und Ohrenschmerzen genutzt. Wegen ihrer antientzündlichen Wirkung steht sie schon seit langem im Mittelpunkt vieler Forschungsthemen. Im Zuge der Entwicklung chromatographischer Methoden konnten Phytoöstrogene, insbesondere das Flavonoid Quercetin schon 1960 in der Zwiebel identifiziert werden [64]. Mit Einführung der High Performance Liquid Chromatography (HPLC) hat sich die Studienlage vervielfältigt und zahlreiche Metaanalysen spiegeln den enormen Kenntniszuwachs wieder [48].

In der Übersichtsarbeit von Russo et al. aus dem Jahr 2011 wird Quercetin als mannigfaltiges Molekül mit antiinflammatorischen und antimalignen Wirkungen bewertet. Zusätzlich besitzt es einem günstigen Einfluss auf die Verhinderung

kardiovaskulärer Erkrankungen und dessen Metabolite auf die Genese von Arteriosklerose [107].

Das Wissen um die zahlreichen Wirkweisen von Quercetin auf zellulärer Basis ebnet eine Grundlage für epidemiologische Studien. Deren Ergebnisse sind allerdings uneinheitlich.

Schon seit längerem existieren Veröffentlichungen, die auf einen inversen Zusammenhang zwischen dem Verzehr von Phytoöstrogenen und dem Auftreten von Brustkrebs hindeuten. In einer Studienübersicht von Braakuis et al. ging aus mehreren Arbeiten eine vermehrte Aufnahme von Früchten und Gemüse, die nachweislich reich an Polyphenolen sind, mit einer niedrigeren Rezidiv- und Inzidenzrate beim Mammakarzinom einher [20]. In einer Fall-Kontroll-Studie wurde unter postmenopausalen Patientinnen mit hohem Flavonolkonsum ein verringertes Risiko gesehen [38]. Dementgegen entspricht das Ergebnis einer prospektiven Kohortenstudie, in der ein hoher Verzehr von Flavonolen bei prämenopausalen Frauen nicht mit einem geringeren Brustkrebsrisiko vergesellschaftet war [1].

### **1.1.2 Epidemiologie**

Das Mammakarzinom ist die häufigste Malignomerkrankung der Frau [31]. Im Jahr 2013 erkrankten in Deutschland ca. 68 000 Patientinnen neu am Mammakarzinom. Dabei liegt das mittlere Erkrankungsalter bei 64 Jahren [103]. Ungefähr 17 900 Frauen starben an den Folgen ihres Tumorleidens [136]. Laut der statistischen Erhebung des Robert-Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. liegt die Prävalenz der malignen Brusterkrankung der Frau mit 30,8 % auf Platz 1, weit vor Darm- und Lungentumoren (12,6 % bzw. 8,0 %) (Abbildung 1). Die Inzidenz der Brussttumore hatte durch Eingliederung des Mammographie-Screenings nach 2005 zugenommen, jedoch lässt sich nach 2009 ein leicht abnehmender Trend erkennen [103]. Erklärend hierfür ist die hohe Sensitivität der Diagnostik, wodurch Tumorvorstufen frühzeitig erkannt und vor weiterer Ausbreitung therapiert werden können. Die Überlebenswahrscheinlichkeit nach 5 Jahren liegt bei 79 % [103].

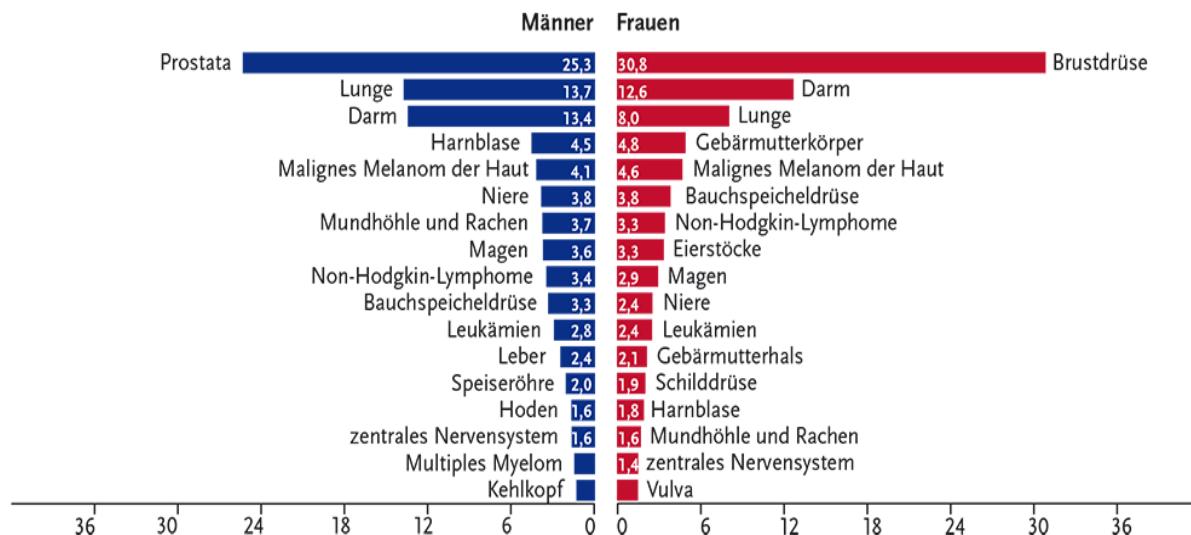


Abbildung 1: Inzidenzrate [%] der Malignomerkrankungen in 2012 in Deutschland. Übernommen aus dem Zentrum für Krebsregisterdaten [103].

### 1.1.3 Pathogenese

Beim Mammakarzinom handelt es sich um eine maligne Entartung von Epithelzellen der Brustdrüse. Topografisch gesehen tritt sie am häufigsten im axillären Quadranten der Brust auf [66]. Die Genese von Tumoren ist sehr komplex und von exogenen Faktoren (wie z.B. Ernährung, ionisierende Strahlung etc.) und zahlreichen endogenen Faktoren abhängig. Als endogen werden die Aspekte bezeichnet, die zu einer fehlgesteuerten Zellregulation ohne äußerliche Einwirkungen führen [66] (Abbildung 2).

Grundlage für eine Tumortransformation einer somatischen Zelle ist ein Zusammenspiel aus DNA-Schädigung, fehlenden Reparaturmechanismen und einer Reihe von Mutationen. Letztere erfolgen zufällig und haben je nach Locus differenzierte Auswirkungen auf das Genprodukt. In jeder Zelle finden pro Tag tausende Mutationen statt, die durch Reparaturproteine behoben werden können. Nehmen die Mutationen überhand oder mutieren Reparaturgene, können diese DNA-Veränderung akkumulieren, den Zellzyklus schädigen und an die Tochterzelle weitergegeben werden [72]. Grob lassen sich die Schritte der Transformation in Initiation, Promotion und Progression gliedern.

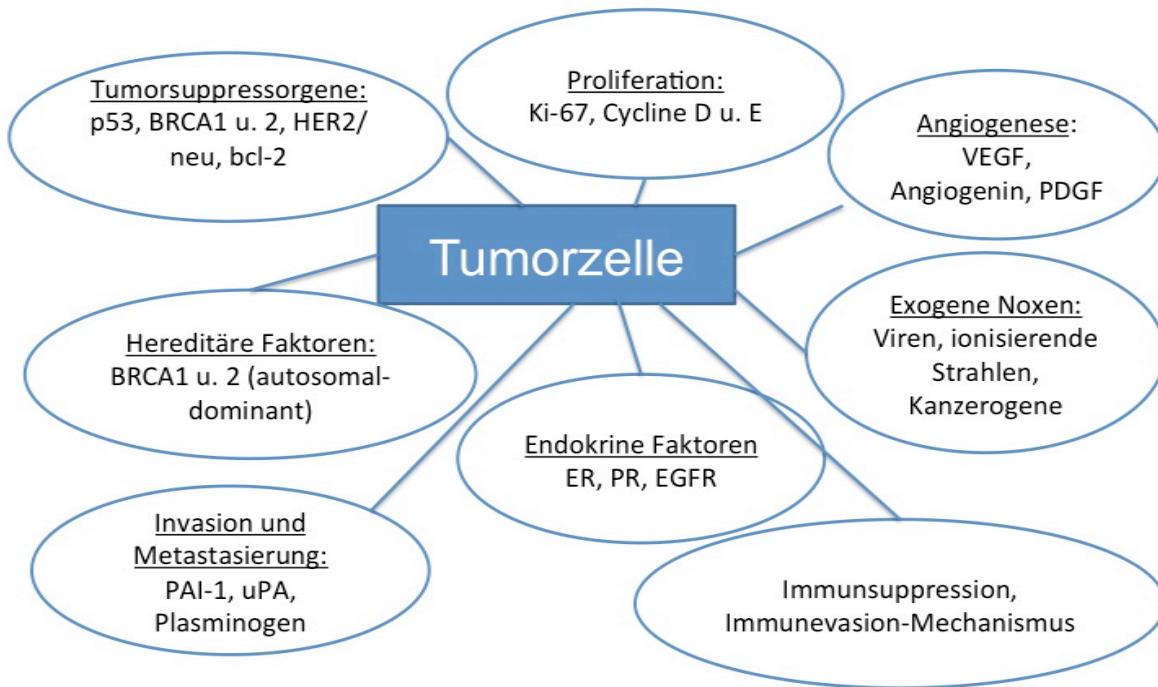


Abbildung 2: Übersicht der Einflussfaktoren auf die Tumorgenese. Modifiziert nach Kreienberg et al. [66].

Die Gene BRCA1/2, p53, und bcl-2 spielen eine besondere Rolle in der Progression. BRCA1 und 2 sind Tumorsuppressorgene, deren Mutation zu einem Funktionsverlust führt und eine Störung von DNA-Reparatur und Zellzyklus zur Folge haben [11].

Zellzyklusproteine wie Cycline sind in der Zellphasenregulation aktiv. In einer Gen-Microarray-Untersuchung konnte bei Brustkrebspatientinnen mit schlechter Prognose eine Hochregulation von Cyclinen und weiteren Zellproteinen erkannt werden [125]. Stark teilende Tumorzellen produzieren durch die Induktion von uPA (Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator) Plasmin, einer Protease, die bei der Zerstörung der Basalmembran und Tumoremigration beteiligt ist. Der Inhibitor des Plasminogen-Aktivators (PAI-1) scheint ebenfalls wie uPA einen prädiktiven Wert auf die Aggressivität und Ausbreitung zu haben [7, 66].

Bei der Tumorentstehung stellt das Immunsystem eine wesentliche Einflussgröße dar. Durch die Vielzahl an Mutationen im Genom maligner Zellen werden auch tumorassoziierte Antigene exprimiert, die von körpereigenen Immunzellen erkannt und durch T-Lymphozyten eliminiert werden können. Aufgrund zellulärer Umbauvorgänge wie z.B. einer veränderten HLA-Expression kommt es zu einer Immunevasion, bei der maligne Zellen sich den apoptoseauslösenden T-Zellen entziehen und ungehindert proliferieren [22]. Dieser Mechanismus scheint auch bei Mammakarzinomzellen ausgeprägt zu sein. Huang et al. fanden heraus, dass die Widerstandsfähigkeit der Tumorzellen gegenüber den zytotoxischen T-Zellen über einen Toll-like-Rezeptor vermittelt ist, dessen bisherige Funktion überwiegend in der

unspezifischen Immunabwehr gesehen wurde [55]. Eine andere Arbeit zeigte eine Assoziation zwischen der Karzinomprogression und einer verminderten Immunantwort der NK-Zellen, die dem angeborenen Immunsystem zugehörig sind und über die Ausschüttung zellulärer Bestanteile (z.B. Granulosin, Zytokine etc.) Tumorzellen beseitigen können [76].

Ein weiterer relevanter Gesichtspunkt liegt im endogenen Hormonhaushalt. Es ist bekannt, dass eine lange Östrogenexposition mit einer angehobenen Tumorinzidenz verknüpft ist [3, 137]. Steroidhormone wie Östrogene sind an der Tumorentwicklung durch Bildung genotoxischer und mutagenischer Metabolite sowie an der Wachstumsstimulation beteiligt [132]. Demgegenüber stimulieren Progesterone zwar die Proliferation von Mammakarzinomzellen [21], jedoch konnte kein Zusammenhang zwischen der endogenen Konzentration und dem Inzidenzrisiko gesehen werden [79]. Nicht alle Mammakarzinomzellen exprimieren die Steroidhormonrezeptoren für Östrogen und Progesteron, jedoch sind diese für die Therapie und Prognose überaus relevant.

Das von der Brustkrebskonferenz in St. Gallen entwickelte Konzept zur Einteilung der Karzinomformen berücksichtigt Rezeptorstatus, Grading und Proliferationsaktivität für die Therapie des jeweiligen Subtyps. Hier werden die rezeptorpositiven Tumore nach Ausmaß ihrer Proliferationsrate in Luminal A und B unterteilt [45]. Der Proliferationsmarker Ki-67 hat prognostische Bedeutung, da er nur von proliferierenden Zellen exprimiert wird [66, 96].

Weiterhin können die Subtypen nach ihrem HER2/neu-(human epidermal growth factor 2)-Rezeptor unterschieden werden [45]. Dieser Rezeptor wird durch ein Onkogen kodiert, das im Falle einer Aktivierung stark amplifiziert wird und die Zellproliferation, Migration und Invasion steigert. Therapeutisch kann die Aktivierung dieses Rezeptors durch eine antikörpervermittelte Blockierung unterbunden werden [12].

#### 1.1.4 Pathohistologie

Die Neoplasien entstehen häufig in der terminalen duktolobulären Einheit der Mamma. Nach WHO-Klassifikation werden invasive Tumore in lobulären oder duktalen Typus differenziert. Die Besonderheit der invasiven Form ist eine frühzeitige lymphogene und hämatogene Verbreitung [12]. Während duktale Tumore häufiger als invasive Tumore auftreten und sich meist aus Milchgangsepithel entwickeln, leiten sich lobuläre Malignome überwiegend vom Drüsenparenchym ab. Invasiv-lobuläre Tumore werden aufgrund ihrer milden Gewebedestruktion radiologisch erst in progressiven Stadien erfasst [66].

Außerdem sind Präkanzerosen geläufig, die initial die Basalmembran nicht durchbrechen, und häufig in ein invasives Karzinom übergehen. Analog den invasiven Tumoren sind das lobuläre und das duktale Carcinoma in situ (LCIS bzw. DCIS) zu unterscheiden. Letztere Tumorvorstufe tritt häufiger auf und imponiert in der Mammographie meist mit Mikrokalk. Die intralobulären Neoplasien wachsen häufig bilateral ohne Kalzifizierungen. Deutlich seltener manifestieren sich

histologisch tubuläre, papilläre, medulläre oder muzinöse Neoplasien. Eine Sonderform nimmt das inflammatorische Mammakarzinom ein, da es stark invasiv voranschreitet und unter Mitbeteiligung der kutanen Lymphgefäß sich klinisch als ödematöses Erythem manifestiert. Die Patientinnen dieser Tumore haben nur eine geringe Lebenserwartung [96].

### 1.1.5 Risikofaktoren

Die Exposition gegenüber endokrinologischer, toxischer und genetischer Faktoren ist für die Genese und Progression von Tumoren bedeutsam. Zu den endokrinologischen Risikofaktoren gehören die frühe Menarche und eine späte Menopause [31], denn hohe exogene oder endogene Östrogenspiegel korrelieren mit einer höheren Inzidenz [34]. Weitere Risikofaktoren sind eine hormonelle Ersatztherapie (HRT) in der Menopause, späte bzw. auch ausbleibende Gravidität, ein kontralaterales Erstmalignom und Adipositas [31]. Bei Fettleibigkeit werden vermehrt Östrogene durch die Adipozyten synthetisiert. Das Risiko perimenopausaler Frauen bei der Einnahme von oralen Kontrazeptiva an Brustkrebs zu erkranken wird bei zeitlich begrenzter Applikation als nicht erhöht gewertet [37].

Rauchen, Alkoholkonsum und Strahlenbelastung im Kindes – und Jugendalter gelten als toxische Risikofaktoren [31, 81]. Häufigster genetischer Risikofaktor ist eine positive Familienanamnese. Insbesondere ist die Erkrankungswahrscheinlichkeit umso höher, je näher der Verwandtschaftsgrad und je jünger das erkrankte Familienmitglied ist. Mutierte Gene, die mit einer starken Penetranz an die nächste Generation weitergegeben werden sind BRCA1 und BRCA2 (hereditäres Ovarial und Mammakarzinom), TP53 (Li-Fraumeni-Syndrom), PTEN (Cowden-Syndrom) und LKB1 (Peutz-Jeghers-Syndrom) [12]. Patientinnen mit einer BRCA1 und 2-Mutation erleiden in 80% ein Mammakarzinom, allerdings ist umgekehrt bei nur 5-10% der Brustkrebspatientinnen diese Mutation positiv [96].

### 1.1.6 Rezeptorstatus

Im menschlichen Organismus wirken Östrogene auf die mammären Drüsenepithelzellen wachstumsfördernd und sorgen für eine Zelldifferenzierung. Für Tumorzellen stellen sie einen besonderen Wachstumsreiz dar. Deshalb ist die Inhibierung der Östrogenwirkung in der Therapie von großer Bedeutung.

Der Estrogenrezeptor (ER) besteht aus zwei Isoformen (ER-alpha und beta) und liegt im Ruhezustand im Zytosol vor. Nach Bindung mit einem Agonisten, z.B. Estradiol, verändert dieser Rezeptor seine Konformation und wandert in den Nukleus, um an das Estradiol-Response-Element der DNA zu binden. Dadurch kann eine Transkription spezifischer Zielgene angestoßen werden. Es kann zusätzlich eine Genaktivierung über eine indirekte Bindung des Rezeptors mit weiteren Transkriptionsfaktoren initiiert werden [39]. Den beiden Rezeptor-Untereinheiten werden gegensätzlich Wirkungen zugeschrieben. Während ER-alpha die Zellteilung

fördert, kann über Induktion des ER-beta eine Beeinträchtigung der Proliferation gesehen werden [119, 127]. Der ER-beta kann eine Tumorinhibierung sowohl durch die Induktion spezieller Gene, als auch durch eine Heterodimerisierung mit der alpha-Untereinheit erzeugen [108].

### 1.1.7 Diagnostik und Therapie

Die diagnostischen Möglichkeiten beim Mammakarzinom haben sich in den letzten Jahrzehnten extrem verbessert. Neben der klinischen Untersuchung gilt als Mittel der Wahl nach wie vor bei Frauen über 50 Jahren die Mammographie. In der Sekundärprävention wird das deutschlandweite Mammographie-Screening-Programm für Frauen zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr im Zweijahresintervall empfohlen [138]. Bei unter 40-jährigen Patientinnen wird eine Sonographie der Mamma und Axilla empfohlen [31]. Die MRT der Brust zählt nicht zu den Standarduntersuchungen, kann jedoch in Einzelfällen (z.B. bei hohem genetischen Risiko oder hoher ACR-Dichte) erwogen werden [137]. Abhängig von den radiologischen Kriterien (BIRADS), die Auffälligkeiten in maligne und benigne charakterisieren, werden Verdachtsbefunde mittels Biopsie gesichert. Mit Einführung des Mammographie-Screenings konnte die Detektion höhergradiger Tumoren deutlich verbessert werden [137]. Ihre Strahlenbelastung bei einer beidseitigen Mamma-Untersuchung in 2 Ebenen beträgt 0,5 mSv und entspricht einer Dosis von 25 Röntgenthorax-Aufnahmen [115].

Die aktuellen Therapiesäulen, bestehend aus Operation, medikamentöser- und Strahlentherapie, bieten sogar bis zum lokal fortgeschrittenen oder lokal rezidierten Stadium immer noch eine kurative Perspektive. Bei Fernmetastasen bleibt nur eine palliative Vorgehensweise übrig. Die Auswahl der Therapie richtet sich nach Tumogröße, Ausbreitung, Hormonrezeptorstatus, Lymphknotenbefall und Fernmetastasen.

Die Operation, kann brusterhaltend (BET), modifiziert radikal (modified radical mastectomy = MRM) oder komplett mammaabladierend durchgeführt werden. Hinsichtlich des Outcomes ist die BET mit adjuvanter Radiatio und MRM gleichwertig [3]. Indikationen für eine modifizierte radikale Mastektomie können sein: multizentrische Ausbreitung, inflammatorisches Karzinom, ausbleibende R0-Resektion, diffuse ausgebreitete Kalzifikationen, Lymphangiosis carcinomatosa oder nicht zu ermöglichte postoperative Bestrahlung [96].

Seit kurzem hat sich die Empfehlung zur Detektion und histologischen Untersuchung des Wächter-Lymphknotens (Sentinel-LK) verändert. Nach dem Resümee der St.Gallen-Konferenz 2015 wird zu einer Distanzierung von der Sentinel-Lymphknoten-Biopsie im Falle invasiver Tumoren oder duktaler Karzinome-in-situ geraten [28]. Außerdem konnte nach positiver Sentinel-Lymphknoten-Biopsie kein Überlebensvorteil zwischen einer Axilla-Lymphknoten-Dissektion und der einfachen Sentinel-Lymphknoten-Exstirpation erbracht werden [44].

Die medikamentöse Behandlungsschiene teilt sich auf in antihormonellen, antikörpervermittelten, zytostatischen und knochenstoffwechselverändernden Therapieansatz.

Unter die Hormontherapie fallen die Aromatasehemmer (Anastrazol, Exemestan etc.), SERM (Tamoxifen) und GnRH-Analoga, deren Verwendung überwiegend bei positivem Hormonrezeptor primär, adjuvant und palliativ erfolgt. Aromatase-Inhibitoren hemmen die Estrogen-Synthese in der Peripherie (v.a. in Adipozyten) und werden in der Postmenopause eingesetzt [39]. Unter der antihormonellen Therapie kann der Östrogenspiegel gesenkt werden, oder im Falle von Tamoxifen die Estrogenwirkung blockiert werden (Siehe Abschnitt Tamoxifen). Somit wird der Proliferationsreiz für die Tumorzellen reduziert.

Zytostatika wie z.B. Taxane, Anthrazykline und mTOR-Inhibitoren können je nach intrinischen Subtyp des Tumors (St. Gallen Konferenz 2013) eingesetzt werden. Beispiele für eine Indikationsstellung können tripel-negative oder hormonrezeptorpositive und her2/neu-negative Tumore mit hohem Rezidivrisiko sein. Mithilfe von Multiexpressionsanalysen kann bei unklaren Fällen das Risiko abgeschätzt werden [3].

Eine neoadjuvante medikamentöse Therapie hat den Vorteil bei Inoperabilität (z.B. inflammatorisches Karzinom), da hier die Möglichkeit zum operativen Verfahren geschaffen werden kann. Bei Fernmetastasen wird eine Best-supportive-care-Therapie mit dem primären Ziel die Lebensqualität anzuheben angewendet. Ossäre Filiae können mit Bisphosphonaten und Denosumab behandelt werden [31]. Hierunter kann die bei Metastasierung stattfindende Knochenresorption inhibiert werden.

In 20 % der Fälle kann beim invasiv-duktalen Karzinom immunhistochemisch oder mittels FISH-Analyse eine Überexpression des HER2 / neu-Rezeptors nachgewiesen werden. Dieser Umstand ermöglicht eine Therapie mit dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab, der eine bessere Remissionsrate im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie erzielt. Kombinationen mit Chemotherapeutika optimieren diese Rate [31]. Die einschneidende CLEOPATRA-Studie aus dem Jahr 2013 demonstrierte ein längeres progressionsfreies Überleben unter der dualen Anti-HER2-Kombitherapie (Anti-HER2-Antikörpers Pertuzumab und Trastuzumab) mit einem Taxan im Vergleich zur Kontrolltherapie (Taxan und Trastuzumab) beim metastasierten Mammakarzinom [120].

Die Strahlentherapie wird üblicherweise nach BET, aber auch bei Tumorresten in der Axilla oder nach einer Mastektomie angewendet. Es hat sich ein hypofraktioniertes Strahlenprogramm etabliert, dessen Konzept auf einer verringerten Gesamtdosis mit höheren Einzeldosen und weniger Sitzungen beruht [28]. Dies ist zum Beispiel bei Patientinnen unter 50 Jahren indiziert [3].

### 1.1.8 Tamoxifen

Der Selektive-Estrogen-Modulator (SERM) Tamoxifen wirkt über Bindung des Estrogen-Rezeptors. Dabei kommt es zu gewebespezifischen Auswirkungen: In der Brustdrüse wirkt es auf die Rezeptoren antagonistisch und im Endometrium agonistisch. Gründe dafür liegen in der unterschiedlichen Aktivierung des Promotors [39].

Tamoxifen ist eine Vorstufe des stärker wirkenden Endoxifens und wird über die Leberenzyme CYP2D6 metabolisiert und damit aktiviert. Diese Umwandlung kann durch die Einnahme von CYP-Inhibitoren wie z.B. das Antidepressivum Fluoxetin verhindert werden und einen geringere Tamoxifen-Wirkung zur Folge haben [39]. Derzeit wird Tamoxifen in der adjuvanten Therapie bei prä – und perimenopausalen Frauen für fünf bis zehn Jahren empfohlen. Postmenopausale Patientinnen können bei starken Nebenwirkungen (wie z.B. Thromboembolien) auf einen Aromatase-Inhibitor umgestellt werden [3].

### 1.1.9 Prävention

Präventionsmaßnahmen besitzen beim Mammakarzinom einen ganz besonderen Stellenwert, da allein durch das Mammographie-Screening die Sterblichkeit altersabhängig um 20 - 40 % reduziert werden konnte [96]. Patientinnen mit hohem familiären Risiko (z.B. mindestens eine Verwandte im Erkrankungsalter unter 39 Jahre oder 3 Erkrankte in einer Verwandtschaftslinie) sollten 5 Jahre vor dem familiären Erkrankungsalter dem Screening zugeführt werden. Allerdings sollte vor dem 30. Lebensjahr die MRT den strahlenbelastenden Untersuchungen vorgezogen werden [96]. Bei Trägerinnen mit der BRCA1 und / oder 2-Mutationen kann nach abgeschlossener Familienplanung ab 35. – 40. Lebensjahren eine bilaterale Mastektomie und Ovarektomie mit plastischer Brustrekonstruktion angestrebt werden [96].

Zur allgemeinen Vorsorge gehört vor allem die Reduktion beeinflussbarer Risikofaktoren, wie z.B. Gewicht, Nikotin – und Alkoholkonsum. Die Steigerung körperlicher Aktivität ist förderlich. Ein frühzeitiges Erkennen und die Einstellung einer normoglykämischen Stoffwechsellage bei Diabetes Mellitus führt zur Reduktion der Mortalität und Inzidenz dieser malignen Erkrankung [3]. Durch den Verzehr von Sojaprodukten konnte laut einer Metaanalyse nur bei asiatischen Populationen das Inzidenzrisiko reduziert werden, nicht jedoch bei Westeuropäerinnen [32].

Auf der tertiären Ebene der Prävention wird bei postoperativen Patientinnen zu einer Chemoprävention geraten. Diese kann bei prämenopausalen Frauen mit einem hohen Erkrankungsrisiko und hormonrezeptorpositiven Tumoren mit Tamoxifen über 5 Jahre erfolgen. Postmenopausale Frauen mit erhöhtem Risiko haben ein Nutzen bei Einnahme von Aromatase-Inhibitoren oder eines SERM (Raloxifen) [31].

### 1.1.10 Komplementärer Therapieansatz

Weltweit werden im Mittel 40 % aller Tumorerkrankungen ergänzend zur konventionellen Therapie komplementär behandelt, und das mit einer über die Jahren steigenden Tendenz [54]. Dabei steht im Gegensatz zur herkömmlichen Therapie weniger die Heilung der Erkrankung, sondern vielmehr die Reduktion von Stress, Nebenwirkungen, Ängsten und Depression im Mittelpunkt [74]. Komplementäre Therapieansätze sind sehr facettenreich, darunter finden zum Beispiel Phyto-, Hydro-, Neural- und Bewegungstherapie Anwendung.

In einigen Studien konnte durch ausreichende Bewegung, ausgewogene Ernährung und durch die Anwendung von Mind-body-Medizin (Verbesserung der Selbstwahrnehmung) die Lebensqualität bedeutsam optimiert werden [74]. Ähnliches Verhalten konnte aus einer Studienübersicht abgeleitet werden, bei der Bewegungstechniken wie Yoga Depressionen, Angst und gastrointestinalen Symptome bei Mammakarzinom-Patientinnen verringern konnte [93]. Dass die Förderung der körperlichen Aktivität das eigene Wohlbefinden und die Lebensqualität bei Tumorpatienten anhebt, wird durch die gute Evidenz dieser Daten untermauert [3, 74, 93].

Anders verhält sich die Datenlage bei der Behandlung der durch Chemotherapie verursachten Nebenwirkungen mittels komplementärer Vorgehensweisen. Hier sprechen die Autoren der Leitlinie für „Arbeitsgemeinschaft gynäkologischen Onkologie e.V.“ eingeschränkt ihre Empfehlungen aus. Beispielsweise könne Akupunktur bei Fatigue, Übelkeit, Erbrechen und Aromatase-Hemmer induzierten Arthralgien Beschwerden begrenzt lindern [3].

Aktuell stehen viele Phytotherapeutika noch auf dem Prüfstand. Wissenschaftliche Zirkel wie die von der deutschen Gesellschaft für Hämatologie und medizinische Onkologie unterstützte Webseite, CAM-Cancer (Complementary And Alternative Medicine For Cancer), haben sich zur Aufgabe gemacht alternative Therapien und Pflanzenstoffe nach ihrer statischen Relevanz zu bewerten und Empfehlungen für Mediziner auszusprechen. So existiert für grünen Tee, Knoblauch und Granatapfel, die reich an Flavonoiden sind und in einigen in vitro-Analysen günstige Wirkungen hervufen, nur unzureichende Evidenz [139]. Das Sojaextrakt soll laut einer S3-Leitlinie zwar die Nebenwirkungen wie Hitzewallungen verbessern, jedoch schwächt es die antihormonelle Therapie *in vivo / in vitro* ab. Ein Nutzen der Misteltherapie ist in Augen der Autoren umstritten [137].

Der zunehmende Einzug komplementärer Therapien in die Leitlinien hebt den wissenschaftlichen Kenntniszuwachs in einem Gebiet hervor, das bisher als statistisch wenig relevant galt. Der phytotherapeutische Einsatz von Hauszwiebeln wurde noch nicht genügend untersucht, wohl aber sind den in der Zwiebel enthaltenden Flavonoiden viele gesundheitsfördernde Wirkungen zugeschrieben.

## 1.2 Die Zwiebel (*Allium cepa*) und ihre Bestandteile

Die Zwiebel (*Allium cepa*) ist eine der ältesten kultivierbaren Gemüsesorten [13] und wie Knoblauch und Porree der Gattung Lauch (*Allium*) zugehörig [114]. Aufgrund ihrer einfachen Kultivierbarkeit und guten Anpassungsfähigkeit an wechselhafte Umweltbedingungen wird sie in der ganzen Welt angebaut [47].

Neben dem Hauptbestandteil Wasser (80 - 90 %) enthält die Zwiebel Stoffgruppen wie Saccharide, Flavonoide und Organoschwefel-Verbindungen (Alkyl-cysteine-sulfoxide).

Letztere Verbindungen werden bei Beschädigungen der Zellwand (z.B. mit einem Messer beim Schneiden) durch das freiwerdende Enzym Alliinase katalysiert. Es entstehen Metabolite, die den zwiebeltypischen Geruch und die Tränensekretion hervorrufen [47]. Vermutlich kann dieser Mechanismus die Pflanze vor Herbivoren schützen [47].

Flavonoide sind sekundäre Pflanzenstoffe und kommen in der Zwiebel in Subgruppen als Anthocyanine und Flavonole vor. Anthocyanine sind nur in der roten Zwiebel enthalten und für die markante Farbe der Schalen verantwortlich [47, 95]. Ursache für die fehlende Rotfärbung ist vermutliche eine Inaktivierung des Gens für die Dihydroflavonol-4-Reduktase [60]. Den Anthocyaninen werden ebenfalls antioxidative Eigenschaften nachgesagt [95, 101].

In der gelben Hauszwiebel liegen die Flavonoide überwiegend in glykolytisierter Form vor. Hauptbestandteil sind Quercetin-3,4'-O-diglycosid und – 4'-O-monoglycosid, der Aglyconanteil ohne Zuckerreste macht nur einen kleinen Prozentsatz aus. Weitere in sehr geringen Mengen vorkommende Verbindungen sind Quercetin-3-O-glycosid, Isoharmnetin, Kaempferol [97]. Die Verknüpfung mit Glykosemolekülen erhöht die Wasserlöslichkeit und schützt die Pflanze vor zytoplasmatischen Schädigungen [48]. Die in Tabelle 1 aufgelisteten Mengenangaben von Quercetin schwanken je nach Publikation. Die variierenden Angaben sind vermutlich auf unterschiedliche Zwiebelsorten und Extrahierungswege zurückzuführen. Innerhalb der Studien fällt die unterschiedliche Quercetinmenge in der roten stets höher als in der gelben Zwiebel aus. Der Quercetin-Gehalt ist in den äußeren Zwiebelschale am höchsten und nimmt zur inneren Schicht ab [14, 88]. Die trockene Außenschale enthält eine Benzosäure mit antifungalnen Eigenschaften und verleiht der Zwiebel ihr bräunliches Aussehen. Bei der Bildung dieser Säure kommt es zu einer Deglykolisierung von Quercetin, die für den besonders hohen Anteil an Aglycon in dieser nicht essbaren Schale sorgt [122].

Die Zwiebel besitzt antibakterielle und antifungale Fähigkeiten: Gegenüber grampositiven Erregern, wie zum Beispiel *Staphylococcus Aureus*, und einem gramnegativen Bakterium zeigte das Zwiebelöl starke inhibitorische Wirkungen [134]. Auch gegenüber *Helicobacter pylorii* und MRSA sind Wachstumshemmungen in Anwesenheit des Flavonoids Quercetin beschrieben [99].

Zudem weist die Zwiebel ein antioxidatives Potential. In der Veröffentlichung von Nuutila et al. wurden antioxidative Fähigkeiten der gelben mit der roten Zwiebeln

anhand zweier Verfahren verglichen [88]. Darin wurden die Radikalfänger-(Scavenger)-Aktivität und das Ausmaß der Inhibierung der Lipid-Peroxidation, ein Prozess bei dem Membranlipide durch Radikale degradiert werden, in Anwesenheit der Zwiebelprobe analysiert. Die rote Zwiebel wies in beiden Tests ein stärkeres antioxidatives Verhalten auf. Zusätzlich zeichnete sich eine positive Korrelation zwischen Konzentration der phenolischen Inhaltsstoffe und der Radikalfänger-Aktivität ab [88].

Die Zwiebel und ihre Inhaltsstoffe sind im Hinblick auf einen gesundheitlichen Nutzen seit Jahren Gegenstand vieler Forschungen. In den Übersichtsarbeiten von Griffiths et al. und Sengutpa et al. werden auch antitumorale Eigenschaften der Organoschwefelverbindung Akyl-Cystein-Sulfoxid und ihren Metaboliten beschrieben [47, 114]. Ähnliche hemmende Effekte an Brustkrebszellen konnte der Verbindung Diallyl-Disulfid attestiert werden [84]. Somit sind nicht nur die Flavonoide für die Tumorabwehr von Bedeutung.

In einigen epidemiologischen Untersuchungen gab es einen statistischen Zusammenhang zwischen dem Zwiebelverzehr und einem verringerten Krebsrisiko. Eine Kohortenstudie von Dorant et al. zeigte eine Assoziation der Zwiebeleinnahme mit einem geringeren Magenkarzinomrisiko [33]. In der Fall-Kontrollstudie von Challier et al. stellte sich bei primären Mammakarzinom-Patientinnen der Konsum von Knoblauch und Zwiebel als hochsignifikanter Schutzfaktor heraus [23]. Nach einer Metaanalyse von Galeone et al. führt ein hoher Verzehr der Allium-Gemüsesorte zu einem protektivem Effekt [40]. Obwohl die Fall-Kontroll-Studien einen schützenden Nutzen proklamieren, ließ sich dieser Effekt zwischen dem Verzehr und dem Risiko in der großen Übersichtsarbeit von Gils et al., die prospektive Kohortenstudien in mehreren Ländern durchführten, nicht belegen. Die Autoren betonen die Anfälligkeit der Fallkontroll-Studien gegenüber der Erinnerungs- und Stichprobenverzerrung [43].

Tabelle 1: Gesamtgehalt von Quercetin in der roten und gelben Zwiebel als Feuchtgewicht [mg / kg] (die mit \* markierten Werte stellen das Trockengewicht [mg / kg] dar)

Rote Zwiebel [mg / kg]	Gelbe Zwiebel [mg / kg]	Literatur
338 ± 1,2	k.A.	Nutuulia AM et al. [87]
304,3 ± 81,2	k.A.	Perez Gregorio et al. [95]
1778	1516	Price et al. [97]
513,3 ± 37,3	253,6 ± 30,9 – 481,0 ± 30,7	Lombard et al. [73]
2075 ± 147 *	1550 ± 90,5 *	Nuutila AM et al. [88]
k.A.	55 ± 0	Bilyk et al. [14]
450 ± 210	340 ± 70	Justesen et al. [57]

### 1.3 Die Flavonoide

Sekundäre Pflanzenstoffe sind Molekülverbindungen, die im Sekundärmetabolismus von Pflanzen entstehen und nicht primär an Abläufen des Energiestoffwechsels beteiligt sind. Zu dieser großen Stoffgruppe lassen sich Alkaloide, Carotinoide, Phenole und Organoschwefelverbindungen zusammenfassen [71].

Phenole als Produkte des Sekundärstoffwechsels sind durch einen aromatischen Kohlenstoffring und eine Hydroxy-Gruppe charakterisiert [83]. Sie bieten den Pflanzen Schutz vor Licht und pathogenen Erregern und sind für die Fortpflanzung bedeutsam. Zusätzlich verleihen sie der Pflanze ihre typische Farbe [71]. Zu dieser Gruppe gehören die in der Zwiebel vorkommenden Flavonoide.

Diese unterscheiden sich wiederum in Abhängigkeit von ihrem Substituenten am Grundgerüst in Flavanole, Flavone, Isoflavonoide, Anthocyanidine und Flavonole (Abbildung 3) [71].

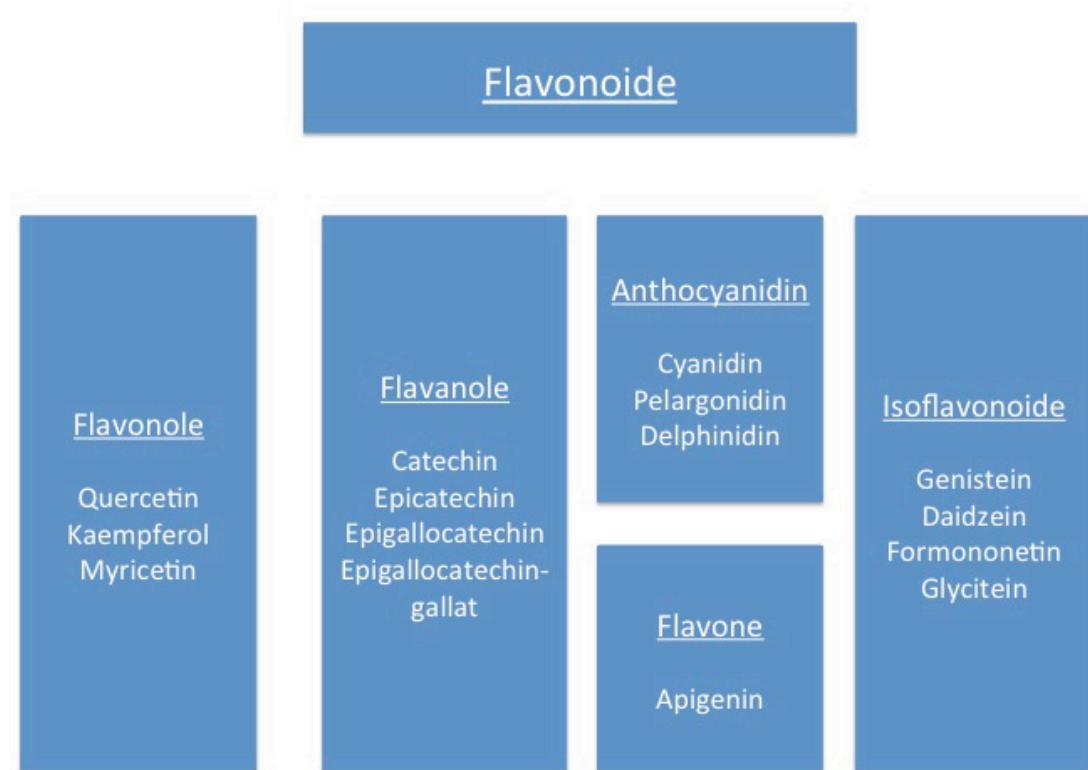


Abbildung 3: Übersicht der in der Natur vorkommenden Flavonoide mit ihren Subgruppen und Derivaten. Modifiziert nach Liu RH [71].

Isoflavonoide sind im Soja, Flavanole im grünen Tee und Flavone in der Petersilie in großer Fülle enthalten [20, 57, 117]. Quercetin als Vertreter der Flavonolen ist in Broccoli, Zwiebeln, Knoblauch, Grünkohl und Spinat in hohem Maße zu finden Abbildung 4 [49, 86, 87, 101].

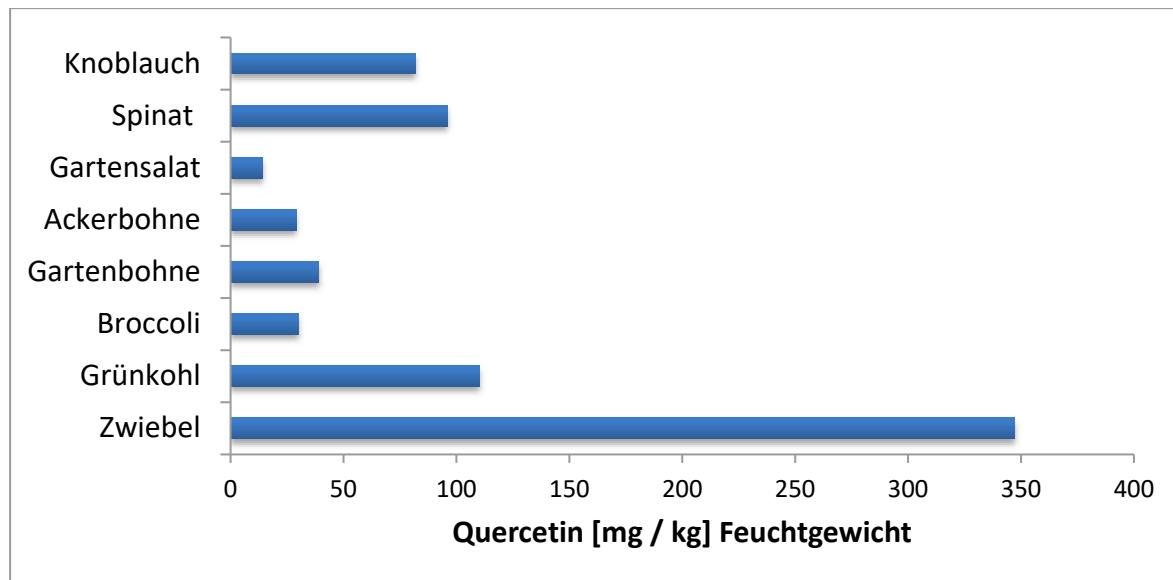


Abbildung 4: Mengenvergleich des Quercetingehalts unter den Gemüsesorten [49, 87, 88].

## 1.4 Quercetin

Das Flavonol Quercetin (5,7,3',4'-hydroxyflavanol [46]) und seine Abkömmlinge sind in einigen Review-Artikeln hinsichtlich Molekularstruktur und biologischer Aktivität weitreichend studiert worden. In der Grundstruktur besteht Quercetin aus zwei aromatischen Ringen, die über einen heterozyklischen Kohlenstoff-Ring kommunizieren (Abbildung 5). Je nach Lokalisation und Art des Substituenten werden verschiedene Derivate differenziert.

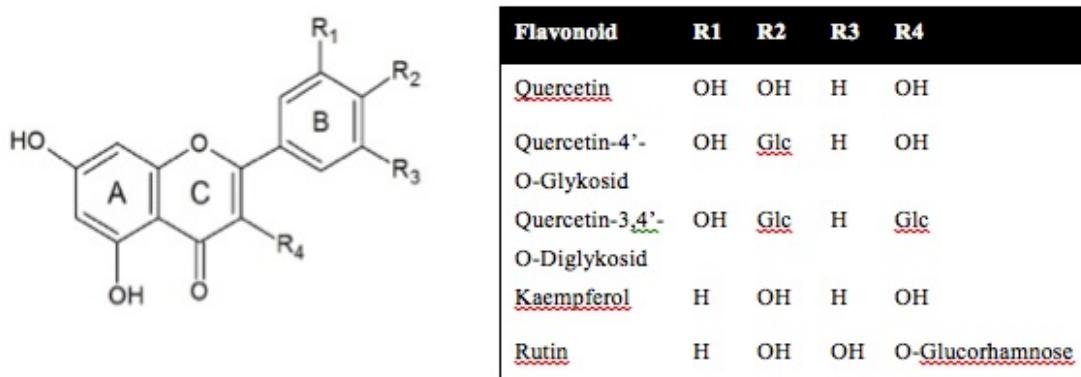


Abbildung 5: Grundgerüst des Quercetin-Moleküls ist links dargestellt. Aus der rechten Tabelle sind die Derivate mit den Substituenten von Quercetin zu entnehmen. Zusammengestellt nach Price et al. und Zu et al. [97, 135].

### 1.4.1 Wirkprofil

Obwohl sich *in vitro* ein günstiges Wirkprofil der Phytoöstrogene auf kardiovaskuläre, neurodegenerative und maligne Erkrankungen abzeichnet [61, 69], spiegeln epidemiologische Studien diesen Trend nicht wieder [1, 16].

*In vitro* werden jedoch gesundheitsfördernde Wirkmechanismen von Quercetin und seinen Derivaten beschrieben. Quercetin wirkt über die Hemmung von Thrombozytenaggregation und Eicosanoidsynthese kardioprotektiv [51, 91]. Antioxidative Fähigkeiten sind über die Förderung der Glutathion-Reduktase und als Fänger der freien Sauerstoffradikale (ROS) bzw. Stickstoffradikale (RNS) beobachtet [17, 106, 118, 131]. Über die Abschwächung der Genexpression von TNF-alpha, IL-6 und COX2 in Makrophagen wird die antiinflammatorische Wirkkomponente erzielt [90]. Quercetin senkt bei adipösen Patienten den Blutdruck und die Arteriosklerose fördernde Blutlipide [36], in Ratten wird ebenfalls eine Reduzierung von freien Fettsäuren und Triglyceride gesehen [98].

Die antitumorale Wirkungen des Quercetins liegen vor allem in Interaktionen mit den mitosefördernden Signalwegen. Aus der Übersichtsarbeit von Russo et al. geht hervor, dass Quercetin mit den Signalwegen (wie z.B. PI3K, WNT/beta-Catenin, MEK1, CK2, Telomerase und weiteren Kaskaden) interferiert und die Apoptose von Tumorzellen induzieren kann [107]. In der Brustkrebszelllinie MCF-7 konnte für Quercetin über Inhibierung von Proteasomen und der mTOR-Kaskade eine Induktion der Apoptose und Autophagolyse nachgewiesen werden [62]. Ebenso scheint das Flavonoid in Vorgängen wie z.B. der Tumorabsiedlung einen Effekt zu haben, indem es Angiogenese und Migration von Brustkrebszellen behindert [10].

Weitere Untersuchungen zeigen, dass MCF-7 Zellen durch Quercetin antiapoptische Proteine (wie z.B. Bcl-2) stärker exprimieren und eine Zellzyklusarretierung in G0/G1-Phase verursachen [30, 35].

Besonders günstig scheint in Adriamycin-resistenter Zelllinie (MCF-7) die Wirkung von Quercetin auf das P-Glykoprotein zu sein. Hier konnte der erworbene Refluxmechanismus, bei dem das Chemotherapeutikum ungewollt aus der Zelle geschleust wird, durch Inhibierung dieses Proteins unterbunden werden [111].

### 1.4.2 Resorption und Bioverfügbarkeit

Die durchschnittliche Aufnahme von Quercetin wird auf 5 - 40 mg / Tag geschätzt [51]. Die intestinale Resorption von Quercetinderivaten ist abhängig von der Hydrophilie der Verbindung, die durch die Glykosidgruppen zunimmt [41, 53]. Zu den Mechanismen des intestinalen Transports existieren verschiedene Ansichten. Ursächlich für die gesteigerte Absorption kann ein carrier-vermittelter Transport oder eine Deglykosylierung sein [17]. Walgren et al. entdeckten eine intrazelluläre Aufnahme von Quercetin-4-glycosid über den Natrium/Glukose-Cotransporter (SGLT1) [126]. Eine passive Diffusion der zuckerrestfreien Quercetinverbindung nach enzymatischer Freisetzung durch die beta-Glucosidase wurde ebenfalls beobachtet [85].

Im menschlichen Plasma konnten in einer Cross-over-Studie nach oraler Aufnahme einer Zwiebelsuspension ausschließlich Quercetin-Glucuronide und keine freien Quercetin-Verbindungen gemessen werden [46]. Ebenso entdeckten die Autoren Gee et al. eine Koppelung von Quercetin an Glucuroniden im Rattenplasma [41]. Dadurch wird die Hydrophilie der Moleküle erhöht und die Ausscheidung erleichtert. Die Isoformen der UDP-Glucuronosyltransferase unterscheiden sich in ihrer Aktivität Quercetin zu konjugieren. Die Enzymvarianten UGT1A1, UGT1A8 und UGT1A9 sind dabei effektiver in der Umwandlung als UGT1A4, UGT1A10 [15].

Obwohl es noch keine weiteren Studien zum UDP-Polymorphismen vorliegen, ist es denkbar, dass Genvarianten einen bedeutenden Einflussfaktor auf den Metabolismus haben [68].

Eine andere Untersuchungsgruppe konnte an Ratten darlegen, dass der Hauptbestandteil von Quercetin und seinen Derivaten schon im Darm zu Phenolsäuren metabolisiert wurden [82]. Ein ähnliche frühzeitige Umwandlung durch die Mikroflora im Kolon sehen die Autoren Olthoff et al. ebenfalls [89].

Die Plasmakonzentration liegt normalerweise im Nanomol-Bereich, kann aber durch eine höhere Zusatzzufuhr auf ein Micromolar-Level angehoben werden [77]. Die Halbwertszeit von Quercetin-Derivaten, abhängig von Bioverfügbarkeit und individuellem Polymorphismus, schwankt zwischen 11-18 Stunden [17, 77]. Diese Forschungsergebnisse demonstrieren inkonsistente Resultate und verdeutlichen dabei einen komplexen Sachverhalt der Flavonoid-Verbindung in Bezug auf Resorption, Metabolismus und Bioverfügbarkeit.

## 1.5 Rutin

Rutin oder auch Quercetin-3-O-rutinosid ist ein Derivat des Quercetin-Aglycons [29]. Es unterscheidet sich von Quercetin durch Bindung einer speziellen Disaccharid Gruppe (der Glucose-Rhamnose) [2]. Es konnte in einem Sandornblatt-Extrakt neben Quercetin und Kaempferol mittels HPLC registriert werden [135]. Ebenso ist Rutin in Preiselbeeren, Weinreben und Tomaten präsent [4, 78, 86]. Diesem Flavonoid werden antiproliferative, antioxidative, antithrombotische und kardioprotektive Effekte zugesprochen [6, 8, 25, 29]. Außerdem konnte es in der Arbeit von Iriti et al. über eine Hemmung des P-Glykoproteins MCF-7-Zellen empfindlicher gegenüber Zytostatika machen [56]. Rutin besitzt eine schlechtere Bioverfügbarkeit als Quercetin-Glykosid. Es konnte in einer humanen Studie eine langsamere Anflutung und eine geringere Plasmakonzentration im Vergleich zum Quercetin-Glykosid beobachtet werden [52]. Als Radikalfänger von ROS und Bildner von Eisen-Ionen-Chelatoren besitzt Rutin ähnliche antioxidative Wirkungen wie Quercetin [2, 29, 131]. Inhibitorische Effekte auf die eisen-abhängige Lipidperoxidation durch Rutin wurden ebenso festgestellt [2]. Aufgrund der vielfältigen Wirksamkeit und der chemischen Verwandtschaft zu Quercetin wurde es in diesen Untersuchungen mit einbezogen.

## 2. Zielstellung

Die Anwendung komplementärer Therapien beim Mammkarzinom hat in der vergangenen Zeit zunehmende Bedeutung erfahren. Ein hoher Obst – und Gemüseverzehr und die damit verbundene gesteigerte Aufnahme von Phytoöstrogenen scheint einen günstigen Einfluss auf Patientinnen mit Mammakarzinom zu haben. Jedoch existieren auch Veröffentlichungen, die diesen positiven Zusammenhang nicht bestätigen können.

Allgemein gilt das in hohem Maße in der Zwiebel enthaltende Flavonoid Quercetin als antikanzerogene, antiinflammatorische und antioxidative Verbindung. In zahlreichen Arbeiten konnten viele antitumorale Wirkmechanismen auf molekularer Ebene demonstriert werden. Quercetin ist in der Natur überwiegend an Glycoside gebunden. Die nicht verzuckerte Form, das Aglycon, macht nur einen geringen Prozentsatz aus.

Vor dem Hintergrund der gegensätzlichen Studienlage zu Verzehr-Nutzen-Relation von Flavonoiden und der antimalignen Kenntnisse über das Flavonoid Quercetin, ist das Ziel der vorliegenden Arbeit ein Zwiebelextrakt zu gewinnen und *in vitro* an Mammakarzinom-Zellen zu testen.

Aufgrund dieser Vorüberlegungen soll experimentell überprüft werden, ob ein Zwiebel-Extrakt (Alkohol- und Wasserbasis) mit nachgewiesenum Quercetin *in vitro* das Wachstumsverhalten von estrogenrezeptorpositiven MCF-7-Zellen inhibieren kann.

Zudem soll geklärt werden, ob das in anderen Früchten vorkommende Derivat Rutin ähnliche Auswirkungen hervorrufen kann. Vergleiche zwischen den Zwiebel-Extrakten und synthetischem Quercetin und Rutin werden ebenso angestellt. Dabei werden die Analysemethoden HPLC und Massenspektrometrie zur Anwendung kommen und in ihrer Bedeutung miteinander verglichen werden. Weiterhin soll die Frage geklärt werden, inwieweit mögliche Effekte von Quercetin und Rutin sich von den bekannten, die Zellteilung von MCF-7 hemmenden und stimulierenden Effekten Tamoxifens und Estradiols unterscheiden. In einer darauffolgenden Auswertung und Interpretation soll ein möglicher Einsatz in der Prävention und Therapie thematisiert werden.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Extraktgewinnung

Für die Herstellung des Zwiebelextraktes wurde die haushaltsübliche Zwiebel Allium cepa L. (Ursprungsort Neuseeland) aus dem Supermarkt (Ernte September – November 2015) verwendet und die Extraktion nach zwei unterschiedlichen Verfahren durchgeführt.

##### 3.1.1 Ethanol-Verfahren

Zu Beginn wurden die Schalen der Zwiebel abgelöst und mithilfe der Moulinex-Reibe zu einem groben Brei zerkleinert. Es wurden nur die äußereren zwei Schalen verwendet, da der Gehalt an biologisch aktiven Substanzen dort am höchsten ist [14]. In einem speziellen Reagenzglas ließen sich 4 g Zwiebelbrei abwiegen und mit 15 ml 70%-igem Ethanol vermengen.

Anschließend erfolgte die Erwärmung für 20 min bei 60 °C in der Discover CEM Mikrowelle (80 Watt). Danach konnten die festen von den flüssigen Zwiebelbestandteilen durch Zentrifugation (bei 4000 rpm für 5 min) getrennt werden. Im Anschluss gelang die sterile Filtration (0,2 µm Porengröße). Nach 5 weiteren Mikrowellen-Durchläufen wurden insgesamt 48 ml einer homogenen Suspension gewonnen, die anschließend in einer Vakuumzentrifuge (Eppendorf Concentrator 5301) bei 45 °C auf ein Zielvolumen von 2 ml eingeengt wurden. Dabei kam es zu einer Aufkonzentrierung des Extraktes.

##### 3.1.2 Wasser-Extraktionsverfahren

Dieses Verfahren basiert auf der Herstellungsmethode von Kumar et al. und wurde leicht modifiziert [67]. Wie beim EtOH-Verfahren konnten zu Beginn die zwei äußersten weichen Zwiebelschalen entnommen und in der Moulinex-Maschine zerkleinert werden.

Das zerkleinerte Gemisch konnte für 24 Stunden bei -24 °C zwischengelagert werden. Darauf folgte eine Gefriertrocknung mittels Mörser und flüssigem Stickstoff. 4 g dieser Zwiebelmasse wurden mit 25 ml Aquabidest. in einem 50 ml-Tube vermischt und auf einen pH-Wert von 6,25 mit 0,1 M NaOH eingestellt. In dem nächsten Schritt wurde das Gemisch auf 125 °C in der Discover CEM Mikrowelle für 125 Sekunden erhitzt. Laut Kumar et al. ist der Ertrag der Flavonoide bei diesem pH-Wert und Extraktionszeit am höchsten [67].

Dann erfolgte eine erneute Filtration (Filterporengröße = 0,4 µm) und im Anschluss eine Zentrifugation bei 6000 rpm für 6 min. Nach kurzem Abkühlen wurden die flüssigen Zwiebelbestandteile durch ein Filtersieb (Porengröße 0,4 µm) getrennt und in einem Zentrifugenröhrchen bei 6000 rpm für 6 min zentrifugiert. Insgesamt

standen 18 ml zur Verfügung, die dann mittels einer Vakuumlyophille auf ein Endvolumen von 2.0 ml eingeengt wurden.

Der Alkohol- und der Wasserextrakt wurde bis zur Nutzung in einem Tiefkühlschrank (-80 °C) eingelagert.

### **3.2 Zelllinie und Zellkultivierung**

Für alle durchgeführten Untersuchungen wurde die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 verwendet. Es handelt sich histologisch um Zellen eines von einer kauasischen Frau stammenden Adenokarzinoms. Diese Karzinomzellen expressieren die Östrogenrezeptoren alpha und beta [9].

Die MCF-7 Zellen wurden in Zellflaschen mit Bakterienfilter bei 37 °C, einer Begasung von 5 % CO<sub>2</sub> und einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre kultiviert. Das verwendete Kulturmedium bestand aus: DMEM mit Phenylrot, 10 % FKS, L-Glutamin, Streptomycin, Penicillin und Amphotericin B. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurde ausschließlich unter sterilen Kautelen unter der Laborabzugshaube gearbeitet. Der Mediumswechsel erfolgte alle 2-3 Tage und die Zellen wurden dann in eine neue Flasche überführt, sobald eine 70 - 80 %ige Konfluenz vorhanden war. Beim Passagieren konnte die Zelladhärenz mit der Protease Trypsin bei einer kurzen Inkubationzeit von 5 min abgelöst werden. Anschließend wurde die Reaktion mit DMEM (+ 10 % FKS) gestoppt und die Zellen von dem verbrauchten Medium in der Zentrifuge getrennt (5 Minuten bei 1000 rpm). Es folgte mittels Vortexer eine Resuspension des Zellpellets mit 10 ml DMEN (+ 10 % FKS). Nachfolgend wurden 1/5 dieser Suspension ausgesät und zur weiteren Proliferation in den begasten Inkubator gestellt. Regelmäßig fand eine mikroskopische Begutachtung der Zellentwicklung statt.

### **3.3 Vorbereitung der Zelltests**

#### **3.3.1 Bestimmung der Lebendzellzahl**

Die optimale Konfluenz des Zellrasens wird bei einer Zellkonzentration von 500.000 / ml pro Well erreicht [121]. Bei allen Tests kam eine transparente 96-Well-Zellkultur-Testplatte zur Anwendung. Die Lebendzellzahl wurde mithilfe der Bürker-Zellkammer ermittelt (Abbildung 6).

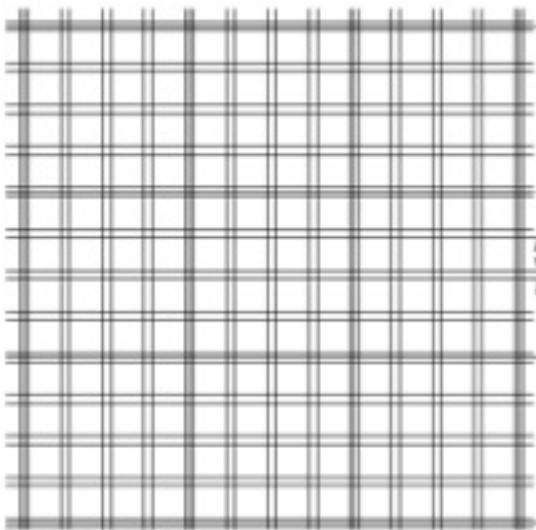


Abbildung 6: Bürker-Zellkammer unter mikroskopischer Sicht [113].

Dazu wurde eine Zell-Trypanblau-DMEM-Lösung im Verhältnis von 1:1:20 angesetzt (20 µl Trypanblau + 20 µl Zellsuspension + 360 µl DMEM-Medium). 20 µl dieser Lösung ließen sich luftblasenfrei in die Bürker-Zellkammer einbringen. Anschließend erfolgte die Auszählung der Zellen unter dem Lichtmikroskop bei einer 100-fachen Vergrößerung.

Während der Farbstoff Trypanblau durch geschädigte Zellmembranen diffundiert und für eine Blaufärbung der Zellen sorgt, nehmen intakte Zellen diesen nicht auf. Im Lichtmikroskop wurden ausschließlich vitale, nicht gefärbte Zellen erfasst. Da Trypanblau nach längerer Inkubation zytotoxisch wirkt, wurden die lebenden Zellen innerhalb von 5 min gezählt.

Die Zellzahl ließ sich wie folgt errechnen [113]:

$$Z \times VF \times V \times 10^4 = \text{Zellzahl / ml}$$

Z = Mittelwert der Zellzahl aus 5 Quadranten

VF = Verdünnungsfaktor (hier 20 s.o.)

V = 10 ml Volumen, in dem die Zellpellets resuspendiert wurden

$10^4$  = Kammerfaktor (ein Quadrat in der Zellkammer fasst  $0,1 \text{ mm}^3$ )

Die neue Stammlösung (Zellzahl / ml) wurde soweit verdünnt, dass nach der Aussaat mit phenylrotfreiem DMEM die Endkonzentration 50.000 Zellen pro Well betrug (ein Well erhielt 100 µl Zielvolumen). Um die Adhärenz am Boden zu fördern, wurden die Zellen im Brutschrank für 24 Stunden inkubiert.

### 3.3.2 Aufarbeitung der zu untersuchenden Substanzen

In der Vorbereitung der Zelltests wurden die zu untersuchenden Substanzen eigenständig angesetzt. Volumen und Gewicht der Zwiebelextrakte wurden ermittelt und in einer Verdünnung von 1:100 und 1:50 auf die Zellen gegeben (Tabelle 2). Quercetin (3,0 mg und 0,8 mg) und Rutin (6,1 mg und 2,7 mg) wurden in 1,0 ml DMSO (1:2 mit Aquabidest.) gelöst. Estradiol (2,7 mg) und Tamoxifen (5,6mg) ließen sich in 1,0 ml 90 %-igem Ethanol lösen. Außerdem wurde Quercetin (3,0mg) mit Rutin (2,7 mg) in 1,0 ml DMSO (1:2 mit Aquabidest.) gemischt. Ausgehend von diesen Stammlösungen wurden Verdünnungsreihen bis zur gewünschten Endkonzentration im Well angefertigt. Hierbei betrug das im Well vorherrschende Verhältnis aus Untersuchungssubstanz zu Medium 1:100 (Tabelle 3).

Tabelle 2: Endkonzentrationen der Zwiebel-Extrakte im Well [ $\mu\text{g} / \text{ml}$ ]

Untersuchungssubstanzen	1:100	1:50
Ethanol-Extrakt ZW-EtOH	2250 [ $\mu\text{g} / \text{ml}$ ]	4500 [ $\mu\text{g} / \text{ml}$ ]
Wasser-Extrakt ZW-H <sub>2</sub> O	250 [ $\mu\text{g} / \text{ml}$ ]	500 [ $\mu\text{g} / \text{ml}$ ]

Tabelle 3: Endkonzentrationen der synthetischen Testsubstanzen im Well [ $\mu\text{g} / \text{ml}$ ]

Synthetische Stoffe	1:100
Flavonol Quercetin	30 [ $\mu\text{g} / \text{ml}$ ] 8 [ $\mu\text{g} / \text{ml}$ ]
Quercetin-3-O-Rutinosid (Rutin)	61 [ $\mu\text{g} / \text{ml}$ ] 27 [ $\mu\text{g} / \text{ml}$ ]
Rutin + Quercetin	27 + 8 [ $\mu\text{g} / \text{ml}$ ]
Estradiol	0,027 [ $\mu\text{g} / \text{ml}$ ]
SERM Tamoxifen	56 [ $\mu\text{g} / \text{ml}$ ]

### 3.4 *In vitro* Zellteste

Mithilfe von Testkits wurde das Wachstumsverhalten der Mammakarzinomzelllinie unter dem Einfluss der Pflanzenextrakte und den synthetischen Flavonoiden *in vitro* untersucht. Dabei ließen sich Proliferation, Mitochondrienaktivität, Vitalität und Metabolismus der Zellen (pH-Wertanalysen und Glukosebestimmungen) während der Untersuchungen im Überstand der Zelllinie analysieren. Bei allen Tests wurde als Medium DMEM mit 10 %-igem Zusatz des Wachstumsfaktors FKS verwendet. Durch leichtes Erwärmen und zusätzliches Durchmischen mittels Vortexers konnte bei den synthetischen Flavonoiden vor der Testapplikation eine Kristallbildung vermieden werden.

#### 3.4.1 BrdU-Test

Das Ausmaß der Zellproliferation kann mithilfe des BrdU-Immunoassays quantitativ erfasst werden (Fa. Roche) [104]. Während der Replikationsphase vitaler Zellen wird das Pyrimidinanalogen BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) anstatt Thymidin in die DNA eingebaut und überschüssiges Basenreagenz entfernt. Im nächsten Schritt denaturiert das Reagenz Fixdent die DNA, sodass ein Antikörper (Anti-BrdU-POD-Antikörper) an das freigewordene BrdU binden kann. Dieser neu entstandene BrdU-Antikörper-Komplex besitzt eine Peroxidase, die nach Hinzugabe eines Substrates (Tetramethylbenzidin) einen blauen Farbumschlag bewirkt. Die Menge an entstandenen Komplexen bzw. Intensität des Farbumschlags kann mittels ELISA-Reader kolorimetrisch gemessen werden. Die entstandene Menge korreliert mit der Mitoserate in den Zellen.

#### Procedere:

**Schritt 1.:** Zellaussaat auf eine 96-Wellplatte und Inkubation für 24 h. Das Procedere verläuft während der Inkubationszeit immer im Inkubator unter physiologischen Bedingungen (37 °C, 5,0 % CO<sub>2</sub> und wasserdampfgesättigte Atmosphäre).

**Schritt 2.:** Hinzugabe der Extrakte (1:100 und 1:50 Verdünnung). Inkubation für 24 h unter physiologischen Bedingungen (s.o.).

**Schritt 3.:** BrdU-Reagenz 1:100 ansetzen und davon 10 µl in jedes Well geben. Inkubation für 3 h unter physiologischen Bedingungen (s.o.). Dann den Überstand der Wellplatte dekantieren. Anschließend 200 µl Fixdent hinzufügen und die Platte bei RT für 30 min inkubieren

**Schritt 4.:** Den in 1,1 ml Aquabidest. gelösten Anti-BrdU-POD-Antikörper mit Antibody-dilution-solution 1:100 verdünnen. Nach Abschütten des Fixdents 100 µl der Antikörpersuspension in jedes Well geben und diese für 60 min bei RT inkubieren.

**Schritt 5.:** Waschpuffer mit Aqua bidest. Wasser 1:10 verdünnen. Die Platten dekantieren und leicht auf einem Filterpapier ausklopfen. Im Anschluss wird mehrmals mit dem Waschpuffer gespült und der Überstand ausgeklopft. 100 µl Substratlösung pro Well hinzufügen. 15 min bei RT inkubieren.

**Schritt 6.:** Reaktionsstop mit 25 µl 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / Well.

**Schritt 7.:** Messung mit dem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 420 nm und einer Referenzlänge von 620 nm.

### 3.4.2 MTT-Test

Der MTT-Test der Fa. Roche dient der quantitativen Einschätzung von Stoffwechselaktivität und Proliferation von Zellen auf Basis kolorimetrischer Messungen [105]. Die biochemische Grundlage besteht aus der Umwandlung des hinzugegebenen Tetrazoliumsalzes MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromid) in Formazan durch das Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System (Abbildung 7).

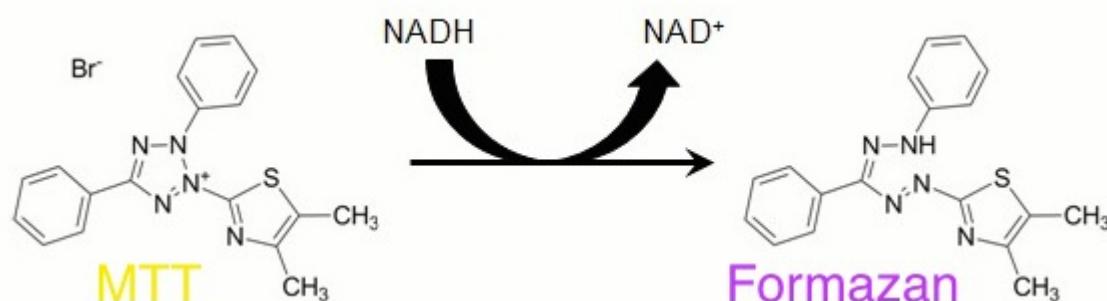


Abbildung 7: Prinzip des MTT-Tests (Fa. Roche): Umwandlung des gelben Tetrazolium-Salzes MTT in lilafarbenes Formazan [102].

Dieses Reduktase-System ist Teil der mitochondriellen Atmungskette und arbeitet nur in metabolisch aktiven Zellen effizient. Zugrundegehende Zellen sind nicht mehr in der Lage diese Atmungskette aufrecht zu erhalten und metabolisieren MTT nicht weiter. In Anwesenheit der Koenzyme NADH und NADPH kommt es bei der Spaltung des gelben Tetrazoliumsalzes zu einer Farbumwandlung in das lilafarbene Formazan. Dieses Stoffwechselprodukt kann spektrophotometrisch mit einem ELISA-Reader gemessen werden und steht in direktem Zusammenhang zur Zellviabilität.

**Procedere:**

- Schritt 1.:** Aussaat der Zellen in einer 96-Wellplatte und Inkubation für 24 h. Das Procedere verläuft während der Inkubationszeiten immer im Inkubator unter physiologischen Bedingungen (37 °C, 5,0 % CO<sub>2</sub> und wasserdampfgesättigte Atmosphäre).
- Schritt 2.:** Wechsel des Mediums und Hinzugabe der Extrakte (1:100 und 1:50). Die Inkubationsdauer bei 37 °C beträgt bei der ersten Dreifachserie 48 h und bei der zweiten 72 h unter physiologischen Bedingungen.
- Schritt 3.:** Erneuter Mediumswechsel. Hinzugabe von 10 µl / Well MTT-Reagenz. Inkubationsdauer für 4 h bei 37 °C. Anschließend wurde das Auflösungsreagenz hinzugegeben und die Wellplatte für 24 h bei 37 °C inkubiert.
- Schritt 4.:** Bei einer Wellenlänge von 550 nm und einem Referenzbereich von 650 nm wurde der Farbumschlag mit dem ELISA-Reader gemessen.

### 3.4.3 Zytotoxizität-Test

Zur Messung der Zytotoxizität fanden zwei unterschiedliche Teste Anwendung. Mit dem LDH-Test der Firma Roche können zugrunde gegangene Tumorzellen, deren Zellmembran geschädigt ist und das Enzym Lactatdehydrogenase freisetzen, registriert werden. Dabei reagieren Reagenzien des Testkits mit der Lactatdehydrogenase und bewirken einen Farbumschlag, der im ELISA-Reader gemessen werden kann. Es besteht ein indirekter Zusammenhang zwischen der Signalintensität und der Menge toter Zellen.

Als zweites wurde der Neutralrot-Assay eingesetzt, der auf dem Prinzip der aktiven Speicherung des Farbstoffs Neutralrots (3-Amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride) in vitale Zellen beruht und damit Aussagen über Zytotoxizität und Zellvitalität macht (Abbildung 8) [116]. Der Transport erfolgt dabei in den Lyosomen. Ist die Zellmembranintegrität gestört oder befindet sich die Zelle in einem Sterbeprozess, wird kein Neutralrot mehr in die Zelle transportiert oder gespeichert. Ein nachfolgender Waschschritt entfernt überschüssigen Farbstoff und die Zellen können dann durch ein leicht saures Ethanolgemisch lysiert werden. Der aus der Zelle freigesetzte Farbstoff wird mittels Spektrophotometer bestimmt und seine Farbintensität korreliert mit der Anzahl der vitalen Zellen.

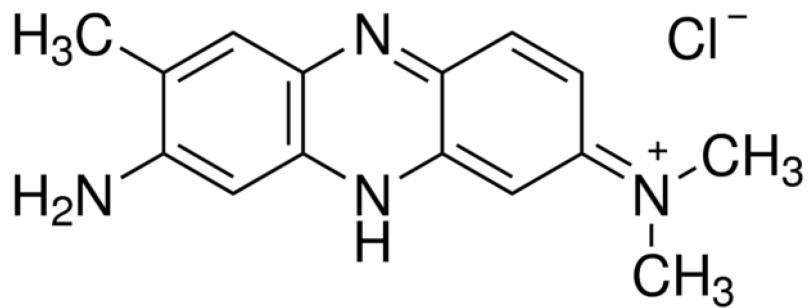


Abbildung 8: Molekülstruktur des Farbstoffs Neutralrot, der nur von vitalen Zellen aufgenommen wird [116].

Procedere:

**Schritt 1.:** Zellaussaat auf eine 96-Wellplatte und Inkubation für 24 h. Das Procedere verläuft während der Inkubationszeiten immer im Inkubator unter physiologischen Bedingungen (37 °C, 5,0 % CO<sub>2</sub> und wasser-dampfgesättigte Atmosphäre).

**Schritt 2.:** Hinzugabe der Extrakte (1:100 und 1:50 Verdünnung). Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 24 h.

**Schritt 3.:** Austausch des Mediums mit DMEM ohne Zusätze und pH = 7,2. Hinzugabe der Neutral-Rot-Lösung (4 % des Mediums). Inkubation im Brutschrank für 1 h.

**Schritt 4.:** Das Medium absaugen. Die Wells mit PDS vorsichtig spülen. Dann 100 µl pro Well Solubilisierungslösung hinzugeben. Die Wellplatte bei RT für 10 min auf einem Plattenschüttler inkubieren lassen.

**Schritt 5.:** Messung im ELISA-Reader bei 540 nm Wellenlänge und 690 nm Referenzlänge.

### 3.4.4 Statistische Auswertung

Bei allen Untersuchungen wurden jeweils 4 x 4-fach Ansätze bestimmt. Für jede Probe auf der 96-Wellplatte wurden 4 Wells (Quadruplikat) angelegt. Aus den resultierenden Mittelwerten konnte die Hintergrundabsorbanz, bestehend aus reinem Medium, subtrahiert werden. Diese experimentellen Extinktionswerte wurden dann ins Verhältnis zur Negativkontrolle gesetzt. Die Negativkontrolle entsprach bei dem Ethanol-Extrakt 70 %-igem EtOH, bei dem Wasserextrakt reines DMEM (+ 1 % FKS), bei Tamoxifen und Estradiol, 90 %-igem EtOH und bei den kommerziellen Flavonoiden, Quercetin und Rutin, 50 %-igem DMSO.

Formel zur Berechnung der Testergebnisse:

$$\text{Zytotoxizität [%]} = (EW - HA) / (NK - HA) \times 100$$

*EW*: Mittelwert aus den experimentellen Werten

*HA*: Hintergrundabsorbanz (nur Medium)

*NK*: Negativkontrolle

Die statistische Auswertung der Zellassays (BrdU-, MTT- und Neutralrot-Test) erfolgte mit Microsoft Excel 2011 und dem Statistikprogramm SPSS (Version 22). Zunächst wurde die Normalverteilung mit dem Kolgomorov-Smirnov-Test überprüft. Mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) und anschließendem bonferroni-korrigierten Post-Hoc-Test wurden Signifikanztestungen angestellt. Damit sollte geklärt werden, ob zwischen der Testsubstanz und der Negativkontrolle (bestehend aus dem jeweiligen Lösungsmittel) ein signifikanter Unterschied gesehen werden kann. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05\%$  festgelegt.

### 3.5 Messung der Glukosekonzentration und des pH-Wertes

Maligne Tumorzellen weisen einen erhöhten Metabolismus auf und haben einen größeren Energiebedarf. Um diesen ausreichend decken zu können, müssen die Zellen auf zwei unterschiedlichen Wegen Energielieferanten in Form von ATP bereitstellen. Die ATP-Moleküle werden entweder aerob durch die mitochondrielle Glykolyse oder anaerob durch die Umwandlung von Pyruvat in Lactat synthetisiert. Da geschädigte oder tote Zellen wenig bis gar keine Glukose aktiv über Transporter aufnehmen können, ist die extrazelluläre Glukoseakkumulation ein Indikator für Zellviabilität und Vitalität.

Ferner wird ergänzend zu den *in vitro* Assays die pH-Wert-Analyse zur Beurteilung der Stoffwechsellsage hinzugezogen. Toxische Einwirkungen auf die Zelle bzw. Zellorganellen oder hypoxische Zustände können durch anaerobe Glykolyse vermehrt Anhäufung saurer Metabolite wie z.B. Lactat zur Folge haben. Eine pH-Wertveränderung wird dann beobachtet.

Nachdem die Zellen unter Einwirkung der Testsubstanzen inkubieren, wurden je 20 µl Überstand für die Glukosemessung abpipettiert und dem Analysiergerät für Glucose der Firma Biosen zugeführt. Dieses detektiert einen Farbstoff, der während der enzymatischen Glukoseumwandlung freigesetzt wird [65].

Aus den restlichen Zellkulturüberständen der einzelnen Wells konnte der pH-Wert gemessen werden.

#### Procedere:

**Schritt 1.:** Zellaussaat auf eine 96-Wellplatte und Inkubation für 24 h. Das Procedere verläuft während der Inkubationszeit immer im Inkubator unter physiologischen Bedingungen (37 °C, 5,0 % CO<sub>2</sub> und wasserdampfgesättigte Atmosphäre).

**Schritt 2.:** Hinzugabe der Extrakte (1:100 und 2:100 Verdünnung). Inkubation für 48 h unter physiologischen Bedingungen.

**Schritt 3.:** 20 µl Überstand wurden zu 1 ml Pufferlösung (spezielle Lösung der Firma Biosen) hinzugegeben und im Biosen Glucose/Lactat-Analyzer untersucht.

**Schritt 4.:** Das 60 µl Restvolumen im Überstand der Wells wurden gesammelt und im pH-Meter (Orion 3 Star pH Benchtop Elektrode) analysiert.

### 3.6 Immunhistochemie

Der Östrogenrezeptor (ER) kommt in zwei Isoformen (alpha und beta) vor, die in der Zellreihe MCF-7 laut Hersteller ATCC synthetisiert werden [9]. Dem Flavonoid Quercetin werden ebenfalls Wirkweisen über den Östrogenrezeptor nachgewiesen [130]. Um das Vorhandensein dieser Rezeptoren in der Ausgangszelllinie und in den höheren Zellpassagen zu bestätigen, wurde eine immunhistochemische Reaktion

durchgeführt. Über eine indirekte Antikörperreaktion, bei der ein sekundärer Antikörper an den Komplex aus Rezeptorantigen und primären Antikörper bindet, können die Östrogenrezeptoren unter dem Lichtmikroskop sichtbar gemacht werden. Der sekundäre Antikörper besitzt ein Peroxidase-Enzym, das bei Zugabe eines Substrats eine Farbänderung im Reagenz hervorruft (Fa. Vector Laboratories, Burlingame USA). Zudem soll das Vorhandensein des Progesteronrezeptors geklärt werden.

**Procedere:**

**Schritt 1.:** Aussaat von 60 000 Zellen / Well auf einer 24 Wellplatte und Inkubation für 48 h. Das Procedere verläuft während der Inkubationszeit immer im Inkubator unter physiologischen Bedingungen (37 °C, 5,0 % CO<sub>2</sub> und wasserdampfgesättigte Atmosphäre).

**Schritt 2.:** Medium entfernen und Wells einmalig mit PBS spülen. Mit 300 µl 4%-igem Formafix die Zellen fixieren. Anschließend einmalig mit PBS spülen.

**Schritt 3.:** Inkubation mit 300 µl 0,3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 30 min. Mit PBS spülen. Dabei Platte vorsichtig schwenken.

**Schritt 4.:** Inkubation mit 4 Tropfen des Horse Serum für 20 min bei RT.

**Schritt 5.:** Horse Serum wird entfernt (außer bei Negativkontrolle) und dann 200 µl Antikörper hinzugeben: ER-α, ER-β (1:10 mit PBS) und Progesteron. Inkubation für 24 h im Kühlschrank (bei + 8° C).

**Schritt 6.:** Überstand entfernen und Wells einmalig mit 300 µl PBS spülen.

**Schritt 7.:** 200 µl sekundären Antikörper hinzufügen und 30 min bei RT inkubieren.

**Schritt 8.:** Überstand entfernen und einmalig mit 300 µl PBS spülen. 200 µl LinRed Farbstoff hinzugeben und im Dunkeln 5-10 min inkubieren.

**Schritt 9.:** Farbreaktion mit Aquabidest. stoppen.

**Schritt 10.:** Mikroskopische Analyse einschließlich Dokumentation.

### 3.7 Pyrolyse-Feldionisations - Massenspektrometrie

Die Pyrolyse-Feldionisations-Massenspektrometrie (PF-IM) ist ein analytisches Trennverfahren und wurde mit dem Ziel verwendet, die Inhaltsstoffe der Zwiebel nach ihren molekularen Anteilen zu qualifizieren. Das Wort Pyrolyse stammt aus dem griechischen und bedeutet „Auflösung durch Feuer“ [5]. Tatsächlich werden die zu untersuchenden Substanzen durch Einwirkung hoher Energie aufgetrennt und sind nach Messung nicht mehr verwertbar. Die Massenspektrometrie beruht auf dem Prinzip, dass durch die Erzeugung eines elektrischen Feldes einzelne Moleküle in der Probe in Ionen überführt werden und nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Diese Methode wurde in der Agrar – und Umweltwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock von Dipl.-Chem. K.U. Eckhardt durchgeführt.

In die Anlage wurde neben dem oben beschriebenen EtOH-Extrakt zum Vergleich aus der Schale feste Zwiebelstücke präpariert und appliziert. Diese wurden in der Vorbereitung aus der äußeren Schale entnommen, lyophilisiert und homogenisiert.

#### Ablauf:

Zu Beginn der Analyse werden 0,5 mg der Probe in den Massenspektrometer Finnigan MAT 95 über ein Einlasssystem gegeben (Abbildung 9). Von dort gelangen die Bestandteile über eine Schubstange in eine Ionenquelle, in der zwischen einem Emitter (Anode) und einer Kathode ein hochenergetisches elektrisches Feld erzeugt wird. Stoßen die Moleküle auf die Anode werden sie ionisiert und durch einen Spalt in der Kathode in Richtung Massenanalysator gelenkt. Dieser Pyrolyseprozess findet in der Ionenquelle im Vakuum (10<sup>-4</sup> Pa) unter steigender Temperatur von 50 °C bis zu 650 °C über 15 min statt. Durch das Vakuum wird eine Kollision der geladenen Moleküle verhindert [42].

In dem Analysator werden die ionisierten Moleküle nach ihrem Verhältnis von Molekülmasse zu Ladung ( $m/z$ ) aufgetrennt. Ein Detektor misst die auftreffenden Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis und übermittelt ein elektrisches Signal an einen Computer. Als Resultat erhält man ein Massenspekrogramm, in dem auf der Ordinate die relative Intensität des Ionenstroms und auf der Abszisse das  $m/z$ -Verhältnis angegeben ist. In der Regel entspricht der Molekülpeak der Massenzahl der Verbindung. Es kann auch zur Atomspaltung und damit zu fragmentierten Peaks kommen. Nach Ende des Durchlaufs ist die Probe aufgrund ihrer thermischen Zerlegung nicht mehr verwertbar [42].

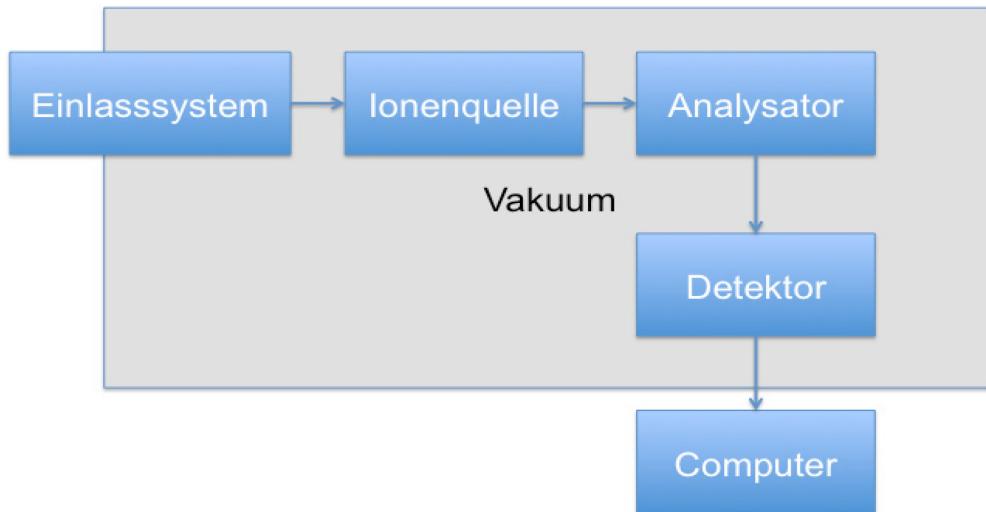


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Massenspektrometrie. Modifiziert nach M. Gey [42].

### 3.8 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Um die Menge von Quercetin in beiden Extrakten zu beschreiben, wurde eine Methode gewählt, die sich schon in der Literatur für den Nachweis von Flavonoiden in Pflanzenextrakten bewährt hat [73, 92].

Die HPLC gehört zu den analytischen Trennverfahren und ermöglicht Stoffgemische in flüssigen Aggregatzuständen nach ihrem physikalischen Bindungsverhalten aufzutrennen. Sie wird auch als Hochleistungsflüssigchromatographie bezeichnet, da hohe Drücke, pulsationsarme Pumpen und eine stabile Metallsäule mit engem Durchmesser ein sauberes Trennverhalten gestatten [42]. Das Resultat dieser Methode wird als Chromatogramm bezeichnet und stellt die Signalpeaks in Abhängigkeit zur Zeit (Retentionszeit) dar.

Das Grundprinzip besteht darin, dass der hinzugegebene Analyt durch die HPLC-Apparatur fließt und dabei in Wechselwirkung mit einer stationären und einer mobilen Phase tritt. Dabei werden die Stoffe nach ihrer Polarität aufgetrennt. Da es sich um eine Umkehrphasenchromatographie handelt, besteht die mobile Phase aus zwei polaren Flüssigkeiten, DMSO und Aquabidest., und die stationäre, feste Phase, aus einer hydrophoben Kohlenstoffsäule (C-18 Universalsäule). Unpolare Verbindungen im Eluenten bilden zur Säulenoberfläche Van-der-Waals-Kräfte aus und werden in der Säule retrahiert. Polare Stoffe bleiben nicht haften und fließen schneller durch die Säule hindurch. Ist das chemische Grundgerüst gleich, aber z.B. die Anzahl an Hydroxylverbindungen verschieden, so reichen diese Unterschiede aus, um diese

Verbindungen in der Säule unterschiedlich lang zurückzuhalten. Dies ermöglicht eine präzise Auftrennungen von strukturähnlicher Substanzen [92].

In Abbildung 11 ist der Aufbau der HPLC dargestellt. Die Eluenten werden über eine Hochdruckpumpe durch den Entgaser gesaugt. Gasblasen, die die spätere Detektion stören können, werden hier entfernt. Danach fließt die Flüssigkeit in eine Mischkammer der Pumpe, in der ein Gradient durch Zumischen von Aquabidest bzw. DMSO entsteht. Über kleine Metallkapillaren wird der Eluent mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml / min zur Säule geleitet. Über einen Injektor werden 20 µl der Probe zu dem Eluenten hinzugefügt. Bevor die Flüssigkeit mit der Säulenoberfläche in Interaktion tritt, filtert eine Vorsäule grobe Partikel heraus. Nachdem die Stoffe in Wechselwirkung mit der Säule und der flüssigen Phasen getreten sind, passieren sie unter niedrigerem Druck einen UV-Detektor, der die Extinktion misst und die Signale an einen Computer weiterleitet. Es wurde eine Wellenlänge von 254 nm gewählt, bei der sich Flavonoide gut messen lassen [73]. Ein Abfallgefäß fängt die Elutionsflüssigkeit auf.

Ein isokratischer Durchfluss, bei dem die Zusammensetzung der mobilen Phase gleich ist, würde dazu führen, dass Stoffe mit nur geringen Polaritätsunterschieden sehr gedrängt auf dem Chromatogramm erscheinen und nicht weiter differenziert werden können [42]. Aus diesem Grund wird ein bestimmter Elutionsgradient eingestellt, in dem nach einer initialen Hinzugabe von reinem Aquabidest., DMSO beigemischt wurde (Abbildung 10). DMSO, als stärkstes organisches Lösungsmittel, verdrängt an der Säule auch stark haftende Moleküle.

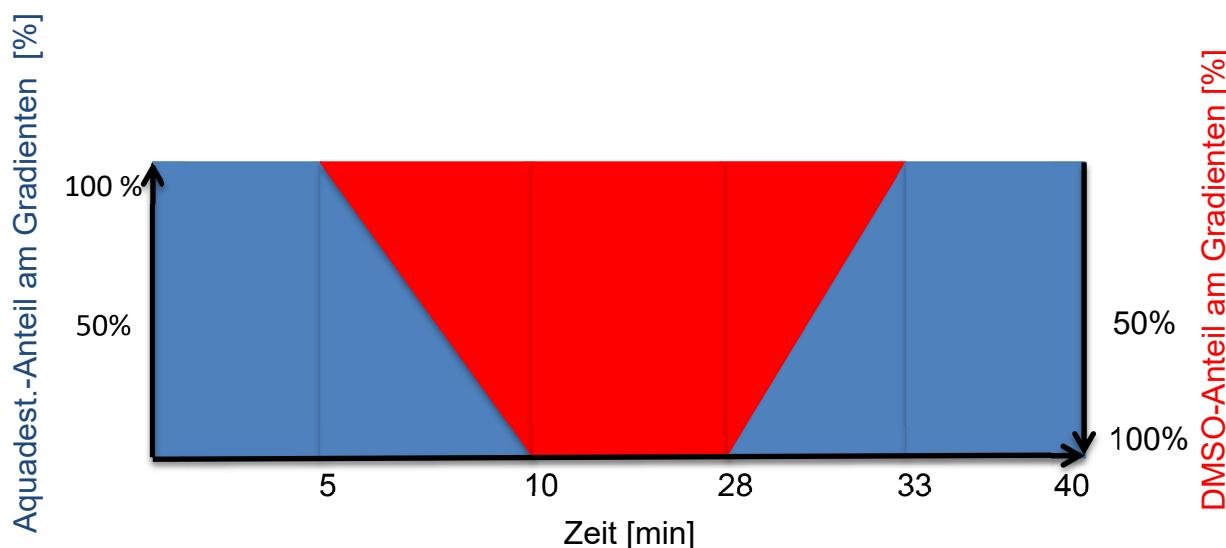


Abbildung 10: Aufbau des Elutionsgradienten. Blau = Aquabidest; rot = DMSO.

Im Chromatogramm entspricht die Peakhöhe der Menge in der enthaltenden Probe. Um eine Verbindung in einem Gemisch eindeutig identifizieren und quantifizieren zu können, wird als Standard synthetisches Quercetin in einer Konzentration von 30 µg / ml unter gleichen Messbedingungen getestet. Dieser ausschlagende Quercetin-Peak wird dann mit der Probe verglichen und kann bei identischer Retentionszeit zur

Quantifizierung herangezogen werden. Mittels der Software Clarity Chrome kann die Fläche unter der Kurve des Standards berechnet und mit der Fläche des Peaks in der Probe per Dreisatz ins Verhältnis gesetzt werden. Es können also sowohl qualitative als auch quantitative Aussagen über die Verbindung getroffen werden [42]. Alle Durchläufe wurden 3 x wiederholt.

Auf Empfehlung der Firma Knauer wird zum Schutz der sensiblen Stahlsäule die Eluenten, DMSO mit 10 % Aquabidest und Aquabidest mit 10% MeOH versetzt.

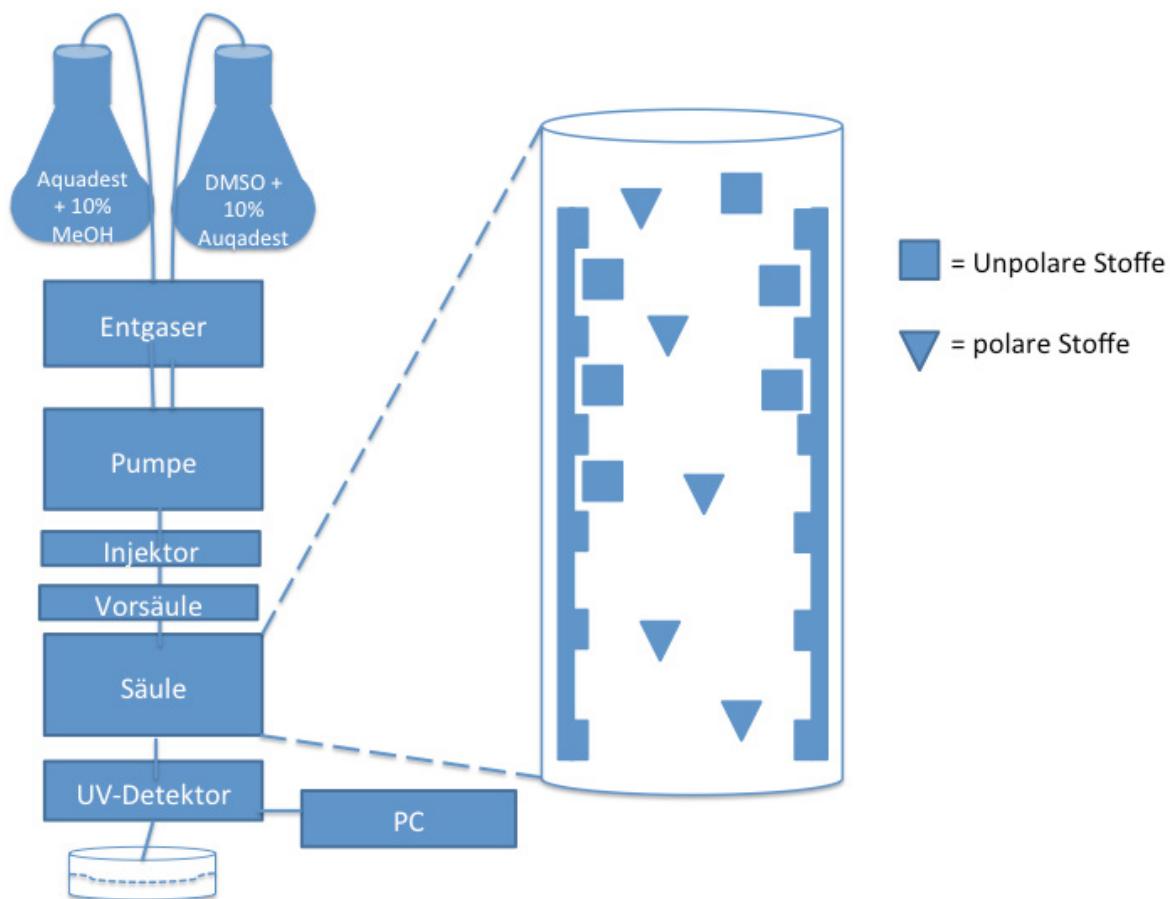


Abbildung 11: HPLC-Apparatur. Schema modifiziert nach M.Gey [42]. Über den Injektor wird die zu trennende Lösung der mobilen Phase hinzugeführt. In der Säule interagieren die Stoffe nach den Polaritätsunterschieden der Substituenten mit der stationären Phase.

### 3.9 Geräte, Materialien und Chemikalien

Geräte und Software	Firma	Land
<b>High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Smartline</b>	Knauer	Deutschland
<b>HPLC – Vertex-Säule 250 x 4 mm Eurospher 100-5 C 18 mit integrierter Vorsäule</b>	Knauer	Deutschland
<b>HPLC – Software ClarityChrom V 2.6.</b>	Knauer	Deutschland
<b>Pyrolyse-Feldionisations-Massenspektrometrie</b>	Finnigan MAT 95	
<b>SPSS Statistics</b>	IBM	USA
<b>Excel 2011</b>	Microsoft	USA
<b>Discover SP Mikrowelle</b>	CEM GmbH	Deutschland
<b>La moulinette Zerkleinerer</b>	Moulinex	Frankreich
<b>Vakuum-Konzentrator-Zentrifuge Concentrator 5301</b>	Eppendorf	Deutschland
<b>Waage Sartorius Basic</b>	Sartorius AG	Deutschland
<b>Zentrifuge Universal 320R</b>	Hettich	Deutschland
<b>Zentrifuge Biofuge pico</b>	Heraeus Instruments	Deutschland
<b>Mikroskop Axiostar Plus</b>	Zeiss	Deutschland
<b>Mikroskop-Kamera</b>	Zeiss	Deutschland
<b>pH-Mess-Elektrode Orion 3 Star pH Benchtop</b>	Thermo Scientific	USA
<b>Brutschrank Function Line</b>	Heraeus Instruments	Deutschland
<b>Gefrierschrank Herafreeze</b>	Heraeus Instruments	Deutschland
<b>Vortexer Reax 2000</b>	Heidolph	Deutschland
<b>Microplate Reader Model 680</b>	Bio Rad	USA
<b>Analysiergerät für Glukose (Biosen 5140)</b>	EKF - Diagnostic	Großbritannien
<b>96-Well-Zellkultur-Platte (transparent)</b>	Greiner bio-one	Deutschland

<b>24-Well Zellkultur Testplatte, transparent</b>	TPP (Techno Plastic Schweiz Products AG),
<b>Bürker-Zählkammer</b>	
<b>Zentrifugationsröhrchen, Zellkulturfälschen (50ml ,250ml, 500ml)</b>	Greiner bio-one Schweiz

Chemikalien	Ergänzung	Hersteller	Land
<b>Quercetin, Tamoxifen, Estradiol</b>		Sigma-Aldrich, Steinheim	Deutschland
<b>Dimethylsulfoxid (DMSO)</b>		Carl Roth, Karlsruhe	Deutschland
<b>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM):</b> <b>- Mit Phenolrot und 10 % FKS</b> <b>- Ohne Phenolrot und mit 1% FKS</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium: mit 4,5 g / L Glukose, mit 20 ml / L L-Glutamin, 100 ml / L FKS, 2,0 ml / L Penicillin / Streptomycin (100 x), 5 ml / L Amphotericin B (250 µg / ml), 15 mg / L Phenolrot <u>Antiinfektiose Zusätze:</u> 10000 U / ml Penicillin + 10 mg / ml Streptomycin Amphotericin B 250 µl / ml	CC-Pro, Oberdorla	Deutschland
<b>FKS</b>	Fetales Kälberserum	Sigma-Aldrich, Steinheim	USA
<b>Amphotericin B</b>	250 µl / ml	PAA, Cölbe	Deutschland
<b>Trypsin</b>		CC-Pro, Oberdorla	Deutschland
<b>Trypan Blau</b>	Trypan Blue Stain 0,4 %	Gibco	Neuseeland
<b>PBS (phosphate buffered saline)</b>	PBS (phosphatgepufferte NaCl-Lösung). 10 mM, pH=7,4 (8,0 g NaCl + 2,9 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O + 0,2 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 0,2 g KCl in 1L Aquabidest.)		
<b>Cell Proliferation Kit I (MTT)</b>		Roche GmbH	Schweiz

Chemikalien	Ergänzung	Hersteller	Land
<b>Cell Proliferation ELISA, BrdU (colometric)</b>		Roche GmbH	Schweiz
<b>Cytotoxicity Detection Kit (LDH)</b>		Roche GmbH	Schweiz
<b>Neutralrot-Test</b>		Sigma-Aldrich	USA
<b>Progesteron- Antikörper</b>	PR antibody, IgG, unconjugated, Rabbit, Monoclonal	Biorbyt, Cambridge	Großbritannien
<b>Estrogen Beta Anitikörper</b>	Mouse IgG2a	BioLegend, San Diego	USA
<b>Estrogen Alpha Antikörper</b>	Rabbit monoclonal IgG	Biorbyt, Cambridge	Großbritannien
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Wasserstoffperoxid 35 %	Carl Roth, Karlsruhe	Deutschland
<b>LinRed IHC</b>	Substratkit für Peroxidase	Linaris, Dossenheim	Deutschland
<b>Immpress Reagent Kit Peroxidase (IHC)</b>	Anti-Mouse/Rabbit Ig MP- 7500 (monoclonal) R.T.U. Normal Horse Serum (2,5 %)	Vector, Burlingame	USA
<b>pH-Puffer</b>		Thermo Scientific, Waltham	USA
<b>Ethanol 70%</b>	EtOH	Eigenherstellung	
<b>Methanol</b>	MeOH	J.T. Baker, Deventer	Niederlande

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Pyrolyse-Feldionisations-Massenspektrometrie

Mithilfe dieser Trennmethode können die einzelnen Inhaltsstoffe der gelben Zwiebel nach ihrem Verhältnis von Masse zu Ladung aufgeteilt und qualifiziert werden. Die Auswertung führte Herr Dipl.- Chem. Eckhardt von der Agrarwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock durch.

Im Massenspektrographie des EtOH-Extrakts konnte Quercetin nicht einwandfrei bestimmt werden, da Monosaccharid- und Disaccharidgruppen das Spektrum überlagerten (Abbildung 12). Monosaccharide wie z.B. Glucose befinden sich an der Stelle m/z 181, 163, 144, 126 und Disaccharide wie Saccharose an m/z 361, 343, 325 (Abbildung 12). Zusätzlich finden sich Milchsäure bei m/z 91 und Glukose-Laktat bei m/z 253. Quercetin machte nur einen sehr geringen Anteil aus (bei ungefähr 302 m/z).

Klare Ergebnisse lieferte die Untersuchung fester Zwiebelpartikel aus der äußeren Schale. Hier konnte in der lyophilisierten Probe das Quercetin-Aglycon bei einem bei m/z 302 eindeutig identifiziert werden (Abbildung 13). Weitere Elektrolyte und Verbindungen lassen sich bei folgenden Masse-zu-Ladung-Verhältnissen registrieren: Kalium (39), Zuckerverbindungen (96, 110 und 126), Palmitinsäure (256), Linolsäure (280), Stearinsäure (284), Sterolverbindungen (396), Vitamin E (420), beta-Sitoserin (414). Bei dem Peak 214 handelt es sich mit der Methode anhaftenden Wahrscheinlichkeit um das Molekül C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>, einem Flavonoid das mit diesem Verfahren nicht weiter qualifiziert werden kann.

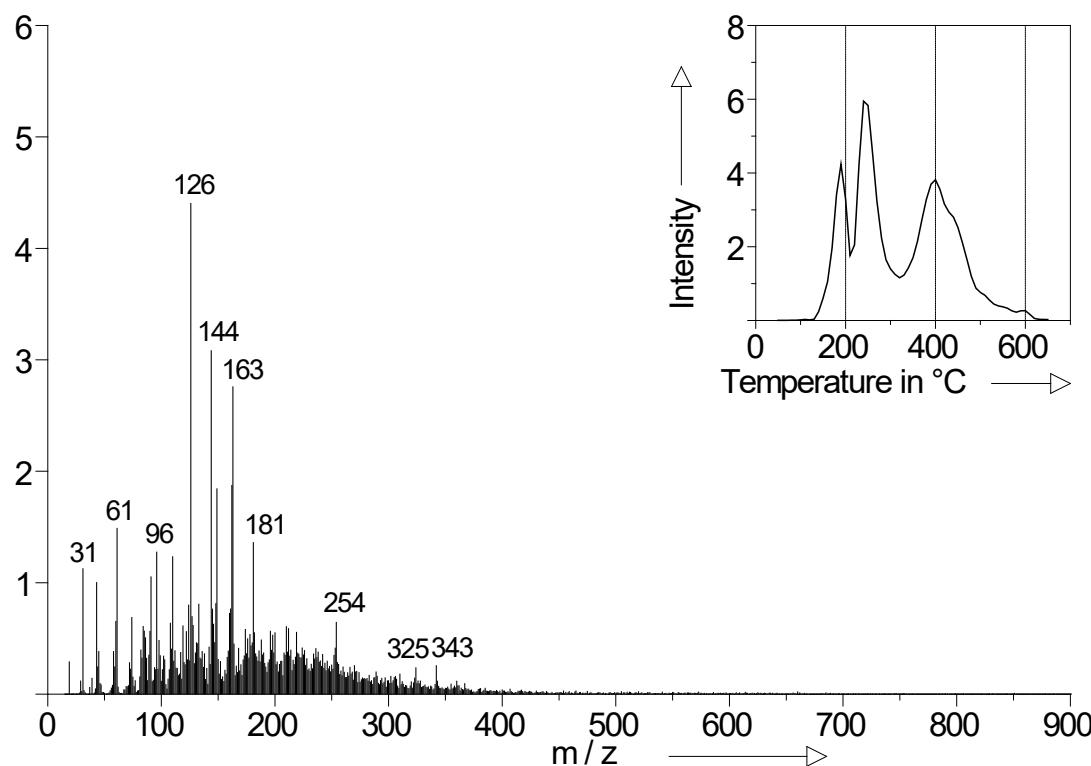


Abbildung 12: Massenspektrogramm des Ethanol-Extrakts. Dargestellt sind die Intensitäten der einzelnen Verbindungen in Abhängigkeit zum Masse / Ladungs-Verhältnis. Das dazugehörige Thermogramm ist oben rechts abgebildet.

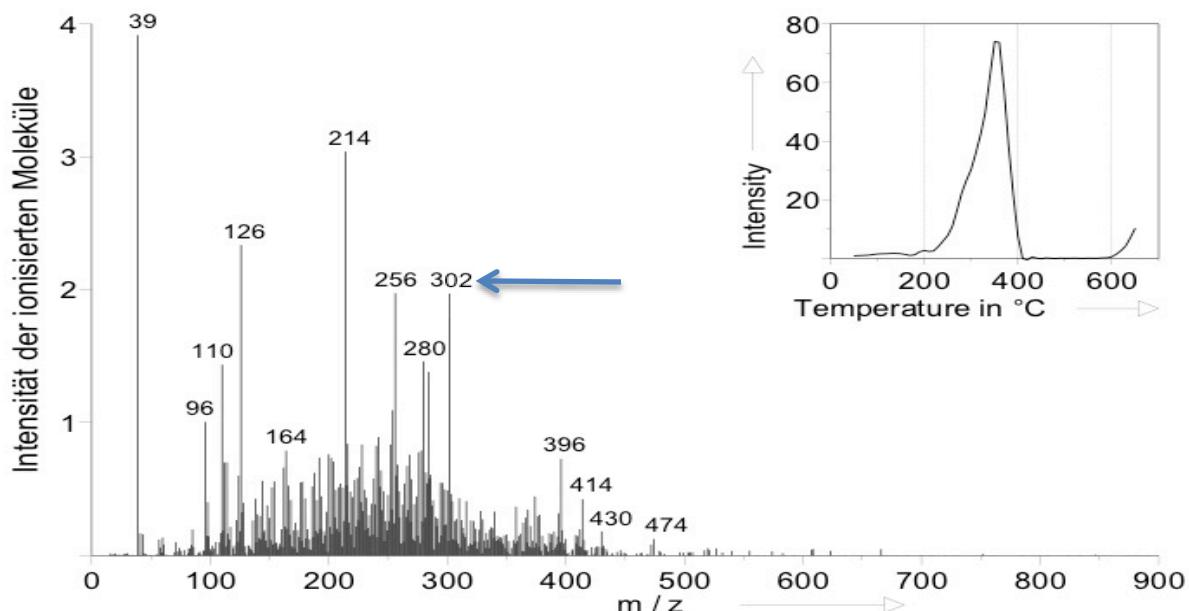


Abbildung 13: Massenspektrometrische Untersuchung einer Probe aus der harten Zwiebelschale. Dargestellt ist die Signalintensität in Abhängigkeit zum Massen-zu-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ). Das dazugehörige Thermogramm befindet sich oben rechts in der Abbildung. Quercetin-Aglycon befindet sich bei Peak 302  $m/z$  (blauer Pfeil).

## 4.2 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Im Chromatogramm ist die UV-Absorption (Absorption Units = AU) in Abhängigkeit zur Zeit aufgetragen.

Im Spektrum des Ethanol-Extrakts erscheinen 4 große Peaks (Abbildung 14). Peak 1 folgt nach 1,9 Minuten und entspricht aufgrund der reinen Aquabidest.-Elution einer sehr polaren Komponente mit wenig Affinität zur Säule. Im unpolaren Verlauf folgen zwei große Peaks, 3 und 4, nach 12,9 und 13,4 Minuten Retentionszeit mit einer Signalamplitude von 2,6 und 2,8 AU.

Die Signale im Spektrum des Wasserextrakts (Abbildung 15) differieren vom Ethanol-Extrakt durch eine geringere Intensität im mAU-Bereich. Eine Ähnlichkeit im Profil der Peaks ist bei beiden Chromatogrammen dennoch erkennbar. Die Signale 3 und 4 erscheinen nach 10 und 12 Minuten Retentionszeit und werden bei 700 und 800 mAU absorbiert. Allerdings erscheinen im H<sub>2</sub>O-Extrakt die Peaks 3 und 4 eine Minute früher. In der Messung des Standards unter denselben Messbedingungen erfolgt die Elution des synthetischen Flavonols Quercetin-Aglycon nach 13,4 Minuten mit einer Absorbanz von 2,6 AU (Abbildung 16).

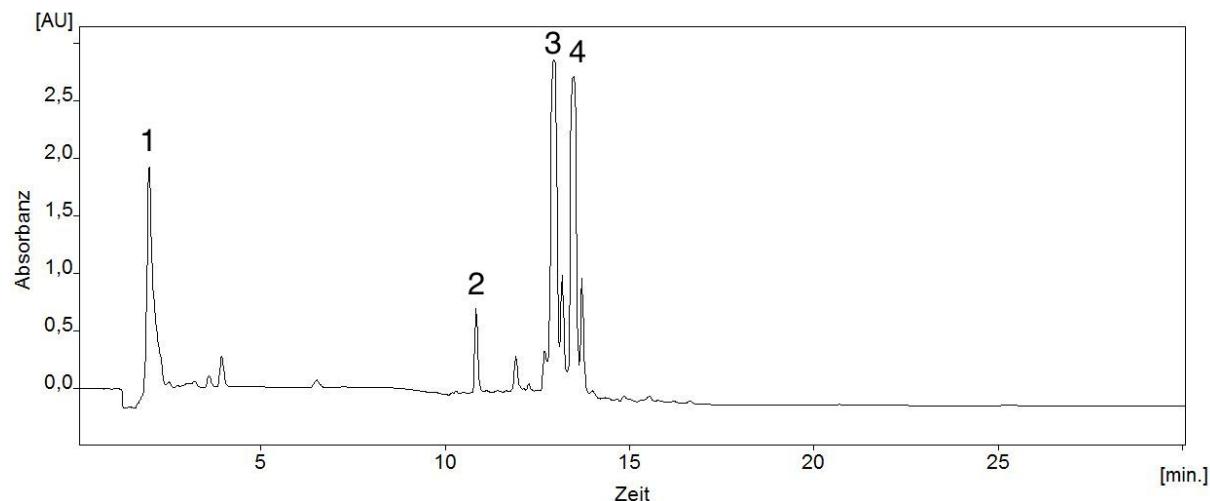


Abbildung 14: Chromatogramm des Zwiebel-EtOH-Extrakts. Ordinate: Absorbanz in AU (Absorbance Units). Abszisse: Zeit in Minuten. Retentionszeit: **Peak 1:** 1,97 min; **Peak 2:** 10,83 min; **Peak 3:** 12,95 min; **Peak 4:** 13,48 min.

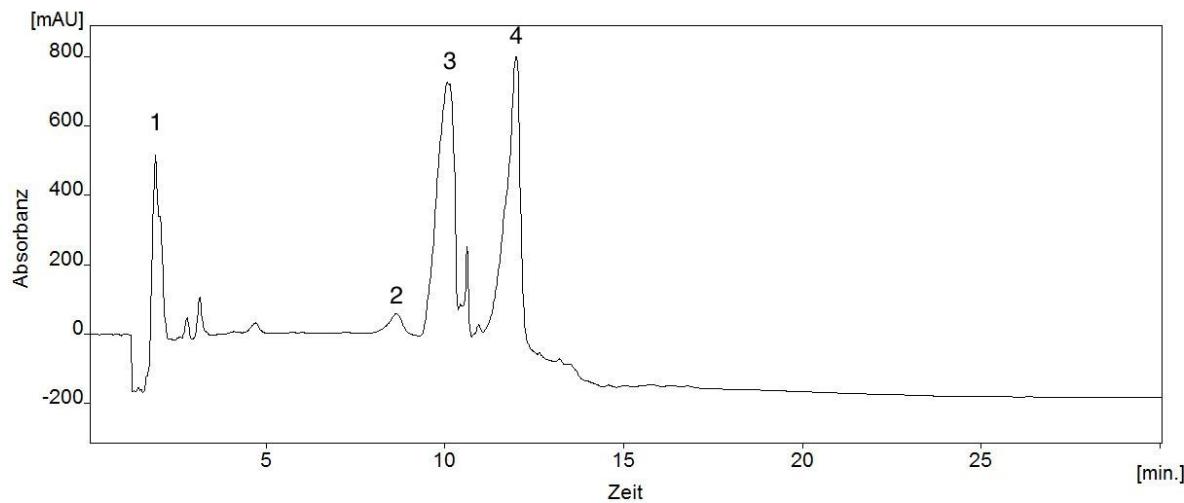


Abbildung 15: Chromatogramm des Zwiebel-H<sub>2</sub>O-Extrakts. Ordinate: Absorbanz in mAU (milli Absorbance Units); Abszisse: Zeit in min. Retentionszeit: **Peak 1**: 1,9 min; Peak 2: 8,1 min; **Peak 3**: 10,1 min; **Peak 4**: 12,0 min.

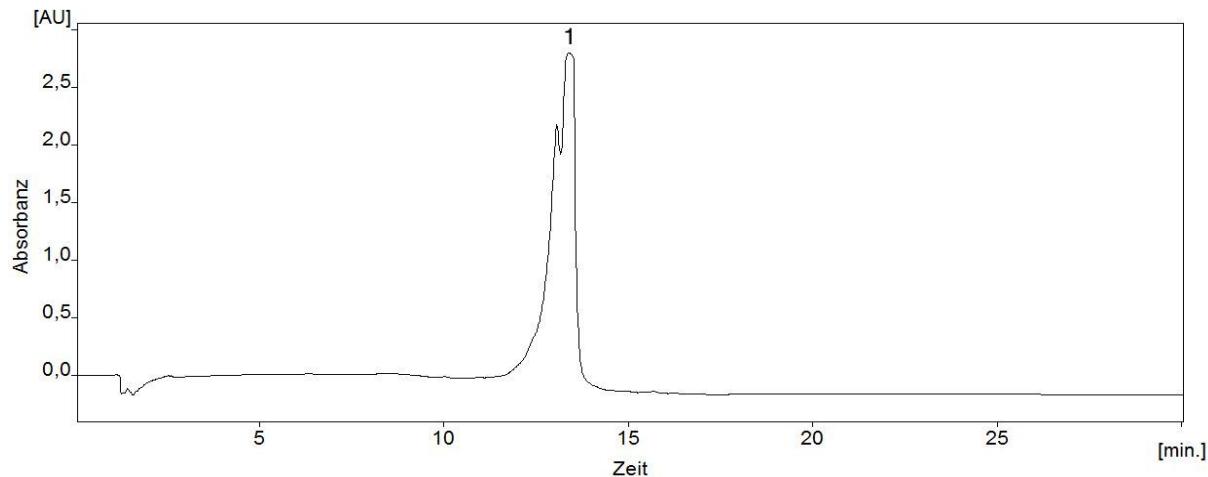


Abbildung 16: Repräsentatives Chromatogramm des Standards Quercetin-Aglycon. Ordinate: Absorbanz in AU (Absorbance Units). Abszisse in Zeit in Minuten. Retentionszeit: **Peak 1**: bei 13,4 min

### 4.3 BrdU-Test

Dieser Test macht Aussagen über das Wachstum von Tumorzellen. Die Menge an BrdU, die während der Zellteilung in die DNA eingebaut wird, kann mittels indirekter Antikörperbindung im ELISA gemessen werden. Je höher die Messabsorbanz in den Wells, umso größer ist die Proliferation.

Insgesamt zeichnet sich eine zur Konzentration zunehmende moderate Wachstumshemmung unter den Zwiebelextrakten ab. Der Zwiebel-Ethanol-Extrakt ZW-EtOH weist eine verringerte Proliferation von 69,1 % in einfacher und von 53,6 % in doppelter Dosis auf (Abbildung 17). Diese Durchschnittswerte sind im Vergleich zur Ethanol-Kontrolle signifikant in beiden Konzentrationen ( $p < 0,001$ ,  $SD \pm 9,0$  bzw.  $6,1$ ). Zwischen den beiden Konzentrationen konnte kein statisch signifikanter Zusammenhang erhoben werden.

Nach diesem Assay wirkt das Ethanol-Extrakt stärker antiproliferativ als das Wasser-Extrakt. Letzteres verursacht eine signifikante Proliferationshemmung auf 77 % bei einer Konzentration von  $250 \mu\text{g} / \text{ml}$  ( $p = 0,008$ ,  $SD \pm 4,96$ ). In der höheren Konzentration des Wasser-Extrakts kommt es zu einer etwas stärkeren Proliferationshemmung von 72,0 % ( $p < 0,001$ ,  $SD \pm 11,78$ ). Die synthetischen Flavonoide, sowohl einzeln als auch in Kombination, erzielen in allen Konzentrationen keine Hemmungen. Estradiol hebt im Vergleich zur Kontrolle das Zellwachstum um 8 % an und Tamoxifen vermindert es signifikant auf 6 % ( $p < 0,001$ ,  $SD \pm 4,8$ ).

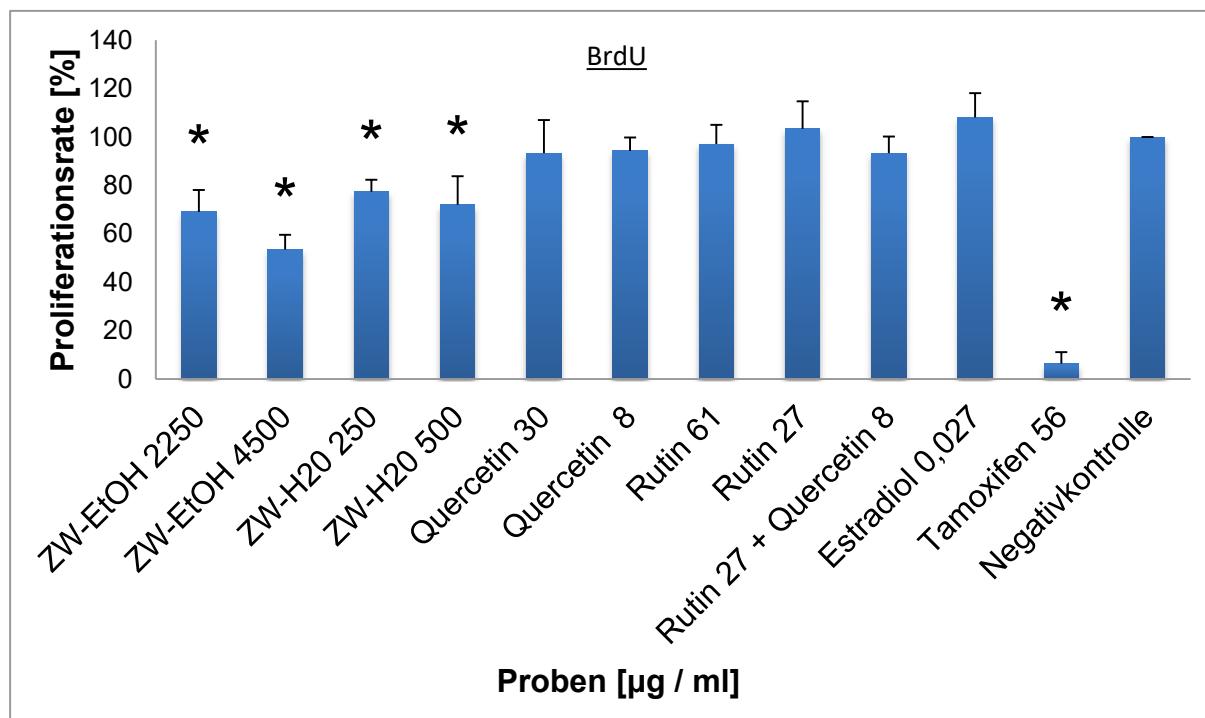


Abbildung 17: BrdU-Test. Zellproliferation [%]. Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzen sind angegeben (Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ). ZW-EtOH = Zwiebel-Ethanol-Extrakt, ZW-H<sub>2</sub>O = Zwiebel-Wasser-Extrakt.

#### 4.4 MTT-Test

Mit diesem Test werden die Effekte der Zwiebelextrakte und synthetischen Flavonoide auf die Proliferation und Viabilität von Brustkrebszellen registriert und quantifiziert. Um den Verlauf der Aktivität des mitochondrialen Reduktasesystems besser beurteilen zu können, wurde der Test mit zwei unterschiedlichen Einwirkzeiten durchgeführt. Die Umwandlung des MTT-Salzes in Formazan wurde spektrophotometrisch nach 48 und nach 72 h Inkubationsdauer gemessen.

Nach 48 h ließen sich in insgesamt weniger starke Unterschiede in der Zellviabilität zur Negativkontrolle nachweisen (Abbildung 18). Hier fällt auf, dass die einfache Ethanol-Extrakt-Konzentration den Metabolismus auf 132 % steigerte und die doppelte Konzentration diesen auf 32 % signifikant reduzierte ( $p = 0,002$  und  $SD \pm 5,6$ ).

Beide Konzentrationen des ZW-H<sub>2</sub>O-Extrakts weisen erhöhte Metabolismuswerte von 116 % und 125 % auf. Die Stoffwechselleistung unter dem Einfluss Quercetin 3 µg / ml ist unverändert, bei 30 µg / ml steigt sie schon um 10 % an. Unter Exposition des Hormontherapeutikums Tamoxifen findet signifikant kein Metabolismus statt ( $p < 0,001$  und  $SD \pm 0,2$ ).

Der MTT-72h-Assay liefert eindrucksvollere Ergebnisse als der den MTT-48h-Assay (Abbildung 19). Während beim Zwiebel-Ethanolextrakt 2250 µg / ml nach 48 Stunden positive Metabolismuswerte vorliegen, sind diese nach 72 Stunden auf 15,8% signifikant gesunken ( $p < 0,001$  und  $SD \pm 7,9$ ). Die doppelte Ethanolextraktgabe bewirkt ebenfalls eine signifikante Viabilitätsminderung um ungefähr die Hälfte der einfachen Konzentration auf 6,9 % ( $p < 0,001$  und  $SD \pm 3,2$ ).

Die beiden Wasserextrakte zeigen eine Stoffwechselsteigerung in der Konzentration 250 µg / ml auf 122 % und bei 500 µg / ml auf 135 %.

Ähnlich hohe Werte resultieren beim synthetischen Quercetin in der Konzentration 30 µg / ml auf 134 % und bei 8 µg / ml auf 128 %. Sowohl bei beiden Rutinkonzentrationen als auch bei dem Quercetin-Rutin-Gemisch ist keine gesteigerte Formazanumwandlung erkennbar.

Auch in der Anwesenheit von Estradiol ist der Metabolismus unverändert. Tamoxifen reduziert den Stoffwechselleistung auf 6 % signifikant im Verhältnis zur Negativkontrolle ( $p < 0,001$  und  $SD \pm 4,5$ ).

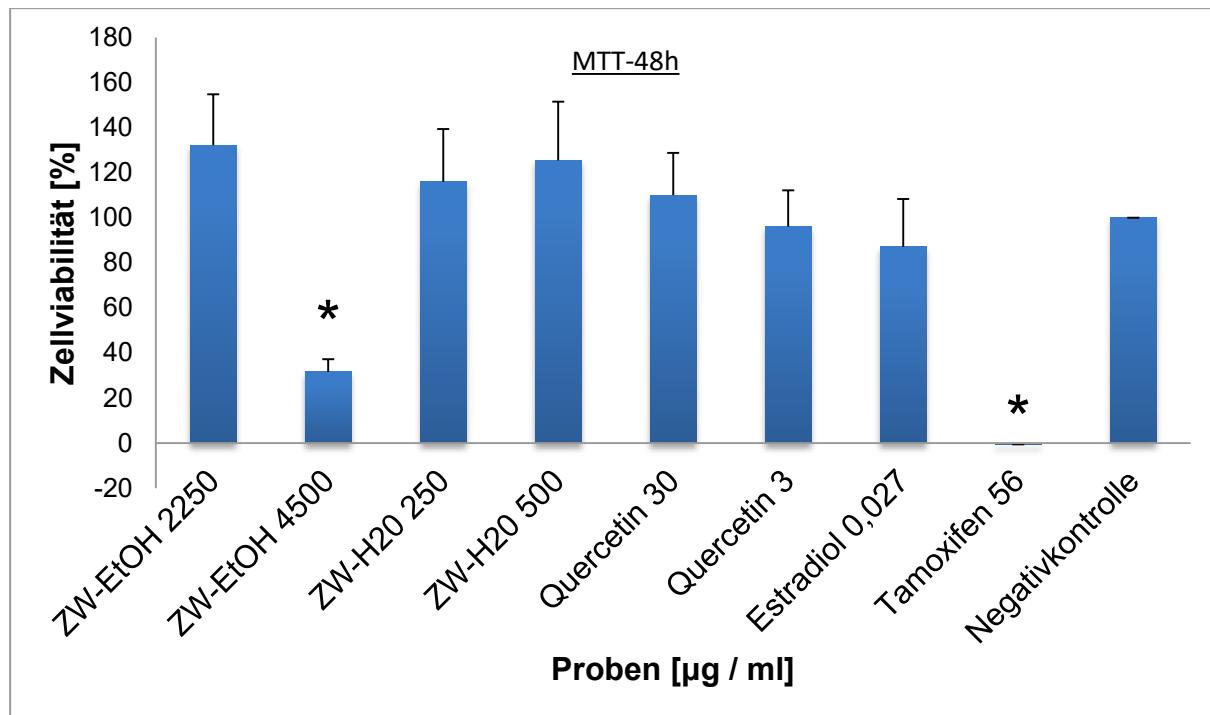


Abbildung 18: MTT-Test nach 48h Inkubation. Dargestellt sind Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzniveau ( $p < 0,05$ ). ZW-EtOH = Zwiebel-Ethanol-Extrakt, ZW-H<sub>2</sub>O = Zwiebel-H<sub>2</sub>O-Extrakt. Negativkontrolle siehe Abschnitt 3.4.4.

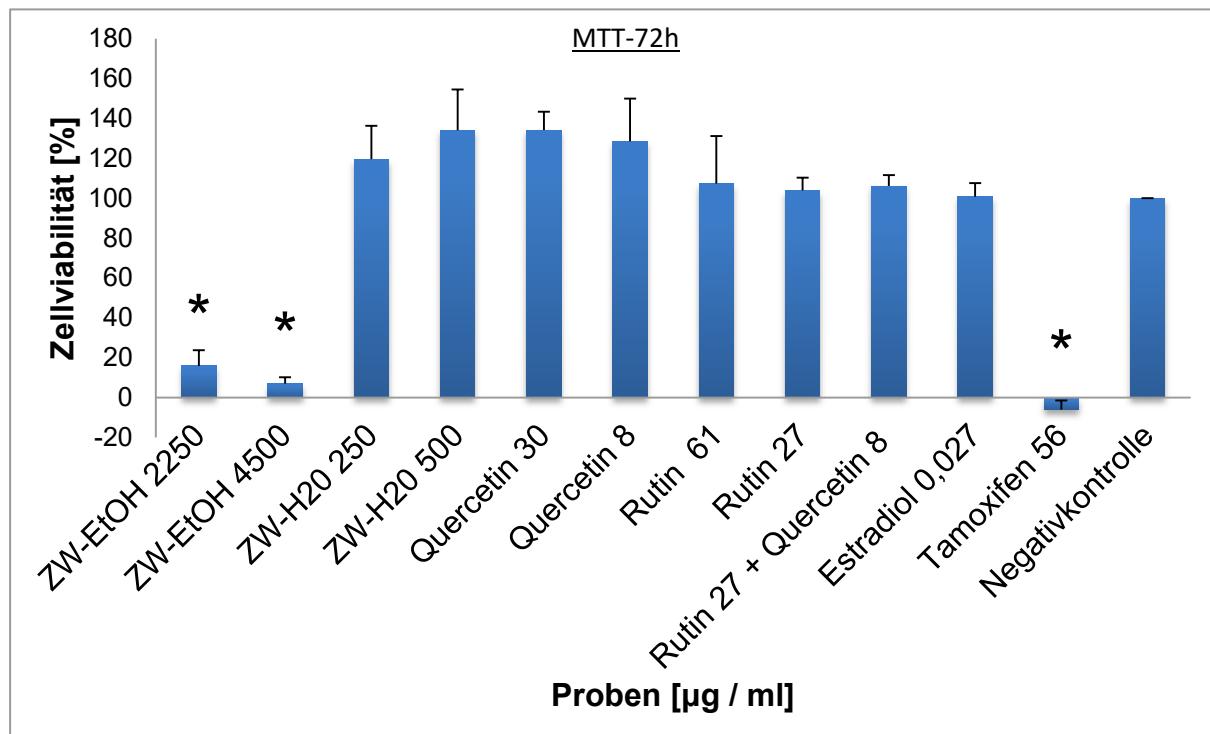


Abbildung 19: MTT-Test nach 72h Inkubation. Dargestellt sind Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzniveau ( $p < 0,05$ ). ZW-EtOH = Zwiebel-Ethanol-Extrakt, ZW-H<sub>2</sub>O = Zwiebel-H<sub>2</sub>O-Extrakt. Negativkontrolle siehe Abschnitt 3.4.4.

## 4.5 Zytotoxizität-Test

Mit einem Cytotoxicity Detection Kit (LDH) sollten zunächst die Extrakte an den MCF-7-Zellen untersucht werden. Gemessen wurde die Menge an Lactat-Dehydrogenase, die ein sensitiver Parameter für den Zelluntergang ist. Während des Durchlaufs reagierten die Substanzen des Testkits mit den Pflanzenextrakten und verursachten falsch-positive Ergebnisse im ELISA. Aus diesem Grund wurde alternativ zum LDH-Kit der Neutralrot-Test herangezogen. Der Vorteil ist, dass bevor die Testreagenzien hinzugegeben werden ein Mediumswechsel erfolgt, bei dem der Überstand mit dem Extrakt herausgewaschen wird.

Dieser registriert die Aufnahme des Vitalfarbstoffs aktiver Zellen und ist damit ein Parameter für die Viabilität bzw. die Zytotoxizität. Da nur intakte Zellen den Farbstoff inkorporieren, dient dieser als guter Indikator für Zellmembranstörungen und untergegangene Zellen. Je mehr Neutralrot aufgenommen wird, umso stärker ist die Absorbanz und umso größer ist das Vorhandensein vitaler Zellen. Es lassen sich mikroskopisch schon die Zellen, die den Farbstoff aufgenommen haben von den toten Zellen unterscheiden (Abbildung 21).

Während das Ethanol-Extrakt ZW-EtOH in der Konzentration 2250 µg / ml eine Aufnahme von fast 40 % im Vergleich zur Negativkontrolle erzielte, sank der Wert in der doppelten Konzentration der Wert auf 14 % (Abbildung 20). Diese Unterschiede sind signifikant zur Kontrolle (ZW-EtOH 2250 µg / ml mit  $p < 0,001$ ,  $SD \pm 10,94$  und ZW-EtOH 4500 µg / ml mit  $p < 0,001$ ,  $SD \pm 6,43$ ).

Unter Zugabe der Wasserextrakte konnten weniger toxische Werte als beim Ethanol-Extrakt nachgewiesen werden. Die Probe ZW- H<sub>2</sub>O 250 µg / ml reduzierte die Farbstoffaufnahme auf 64 % und die höhere Konzentration von ZW-H<sub>2</sub>O erbrachte eine signifikante Verminderung der Speicherung auf 57 % ( $p = 0,017$ ,  $SD \pm 11,2$ ). Damit wirkt das höher konzentrierte Gemisch auf fast 50 % der Zellen toxisch.

Auffallend sind die Ergebnisse des synthetischen Quercetins, da beide Konzentrationen (30 und 8 µg / ml) um ungefähr 35 % weniger Farbstoff einbehalten als die Kontrolle. Rutin konnte in beiden Konzentration keine Reduzierung aufzeigen, wohl aber eine Zunahme um 26 % in der Konzentration 27 µg / ml. Das Rutin-Quercetin-Gemisch zeigte ebenfalls eine gesteigerte Viabilität um 20 % und Estradiol eine um 29 %. In der Anwesenheit des SERM wird signifikant kein Neutralrot aufgenommen (0,4 %,  $p < 0,001$  und  $SD \pm 6,5$ ).

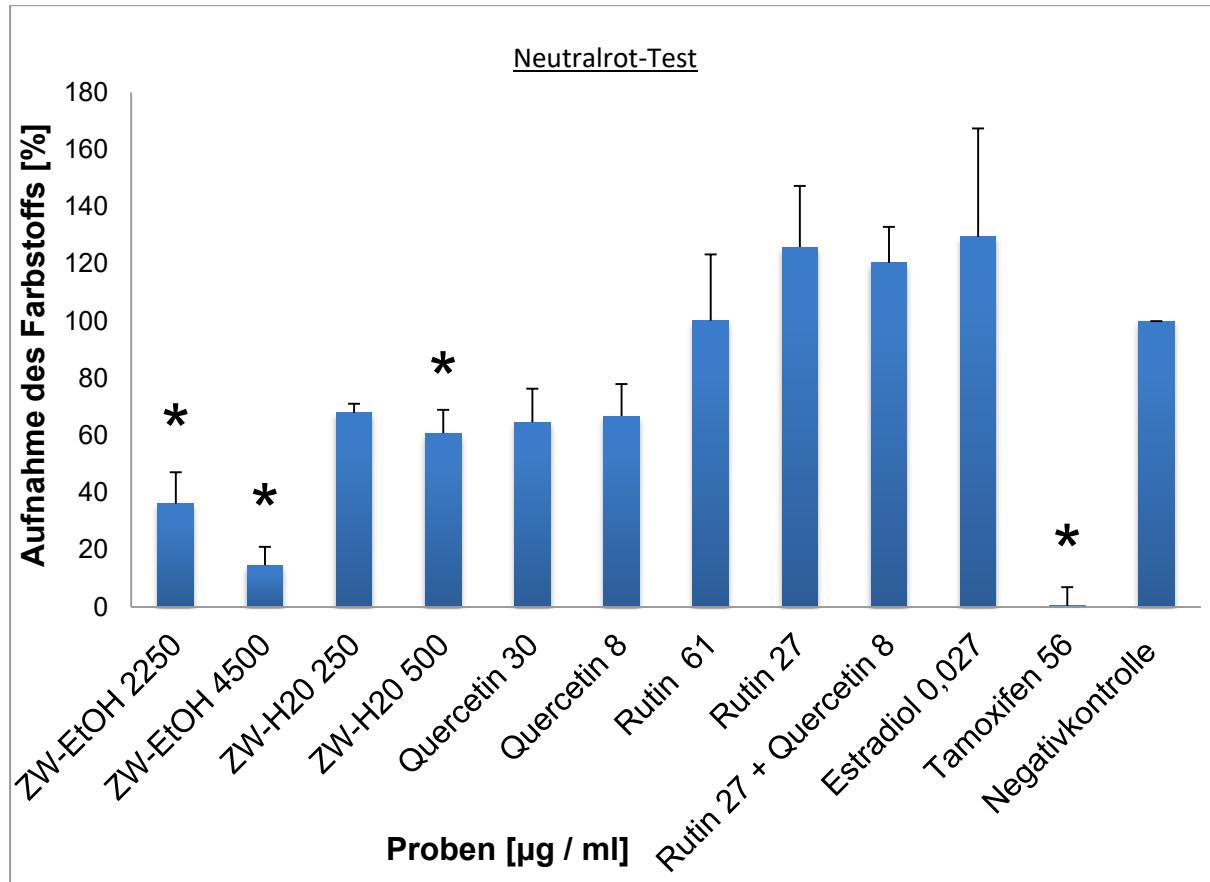


Abbildung 20: Neutralrot-Test. Die Aufnahme des Farbstoffs in Prozent zur Negativkontrolle spiegelt die Anzahl funktionsfähiger Tumorzellen wieder. Dargestellt sind Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzen ( $p < 0,05$ ). ZW-EtOH = Zwiebel-Ethanol-Extrakt, ZW- H<sub>2</sub>O = Zwiebel-H<sub>2</sub>O-Extrakt. Negativkontrolle siehe Abschnitt 3.4.4.

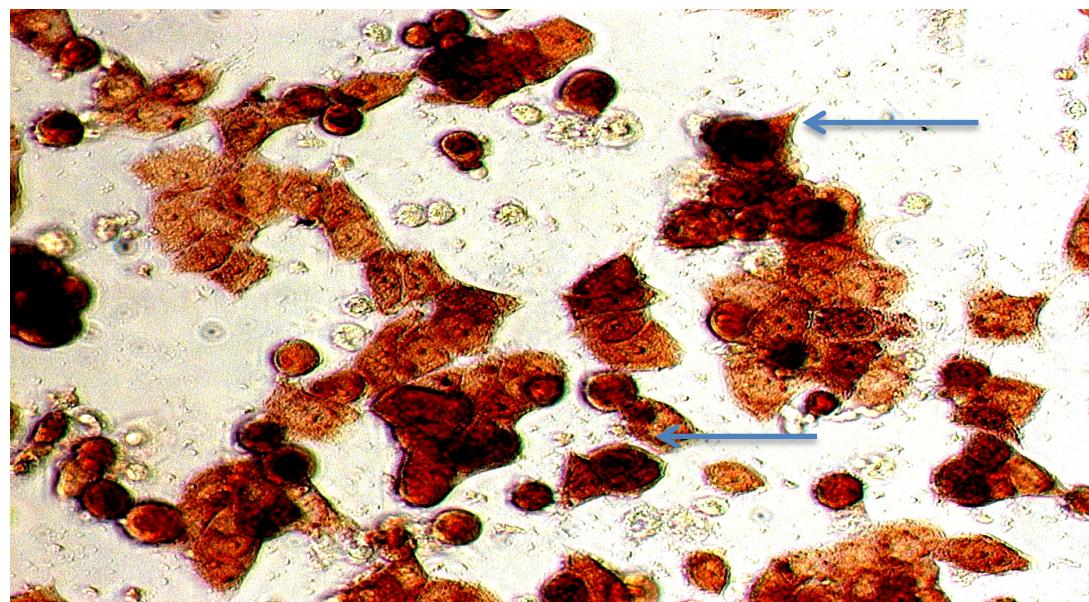


Abbildung 21: Kultivierte MCF-7-Zellen unter Aufnahme von Neutralrot in Anwesenheit des Zwiebel-EtOH-Extrakte 2250 µg / ml im Lichtmikroskop (10-fache Vergrößerung). Färbung 3-fach positiv.

## 4.6 Glukose- und pH-Wertmessung

Additiv zu dem Zellviabilitätstest MTT wurde mit der Glukosebestimmung und pH-Wertanalyse die Stoffwechsellsage der Tumorzellen unter Einwirkung der Testsubstanzen näher charakterisiert. Prinzipiell können untergegangene Zellen keine Glukose mittels Glykolyse verstoffwechseln und lassen eine erhöhte Zuckerkonzentration im Überstand zurück.

Abbildung 22 zeigt den Glukosegehalt im Überstand nach Inkubation von 24 h. Anhand des Konzentrationsunterschieds von 10 mmol / l zwischen der DMEM-Kontrolle (30 mmol / l), die keine Zellen enthielt, und der Zellsuspension (20 mmol / l) wird der normale Grundumsatz der Tumorzellen ersichtlich. Das Zytostatikum Tamoxifen, das in bisherigen Tests stark apoptische Wirkungen hervorgerufen hatte, liefert hier hohe Glukosewerte von 29 mmol / l. Ähnlich hohe Zuckerwerte können im Ethanol-Extrakt nachgewiesen werden: In einfacher Konzentration werden Konzentrationen von 27 mmol / l und in doppelter 34 mmol / l gemessen. Das Zwiebelwasserextrakt, die Quercetin-Konzentrationen und das Hormon Estradiol haben keine Auswirkungen auf die Glukosemenge, da sich ihr Glukosegehalt ähnlich wie in der Zellsuspension verhält.

Mit der pH-Messung konnte gezeigt werden, dass sich unter allen Proben der pH-Wert konstant bei 8,5 hält. Beide Zwiebelextrakte rufen im Vergleich zur Zellsuspension keine pH-Wertänderung hervor.

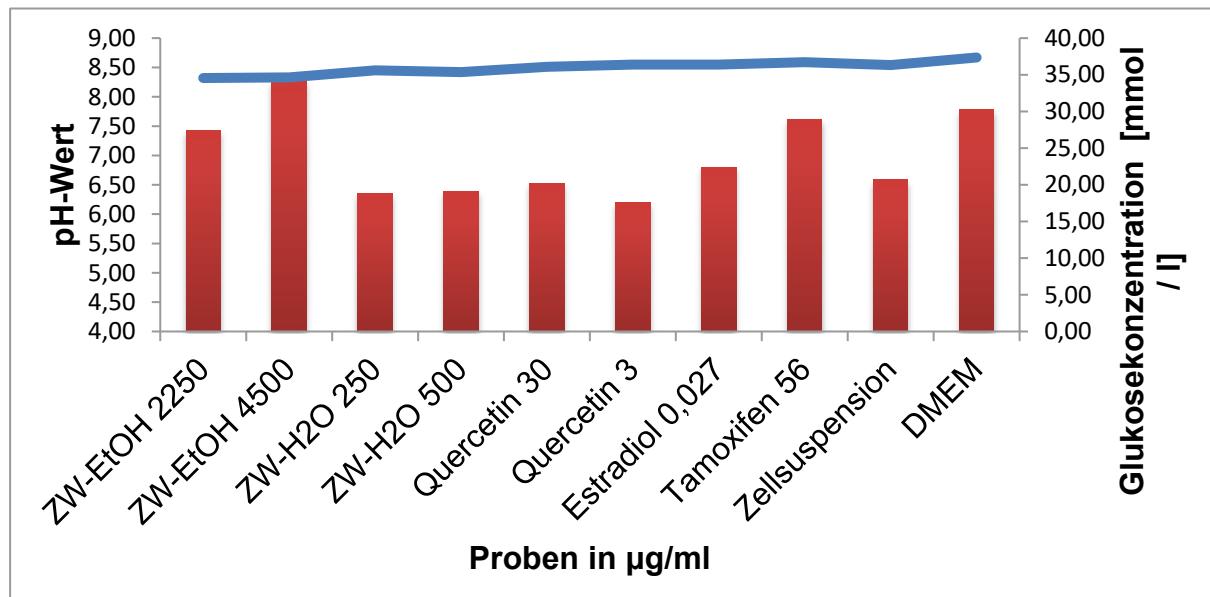


Abbildung 22: Glukosekonzentration in mmol/l und in roten Balken präsentiert. pH-Wert als blaue Linie dargestellt. ZW-EtOH = Zwiebel-Ethanol-Extrakt, ZW- H<sub>2</sub>O = Zwiebel-Wasser-Extrakt.

## 4.7 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie diente dem Qualitätsnachweis und sollte auch bei höheren Passagen aufgrund der zunehmenden genomischen Instabilität die Anwesenheit der Hormonrezeptoren bestätigen. Aus den antikörpervermittelten Reaktionen der MCF-7-Zellen konnte neben den Östrogenrezeptor alpha und beta auch der Progesteronrezeptor verifiziert werden (Abbildung 23). Die Steroidrezeptoren liegen intrazellulär und dementsprechend wird das Zytosol rötlich gefärbt.

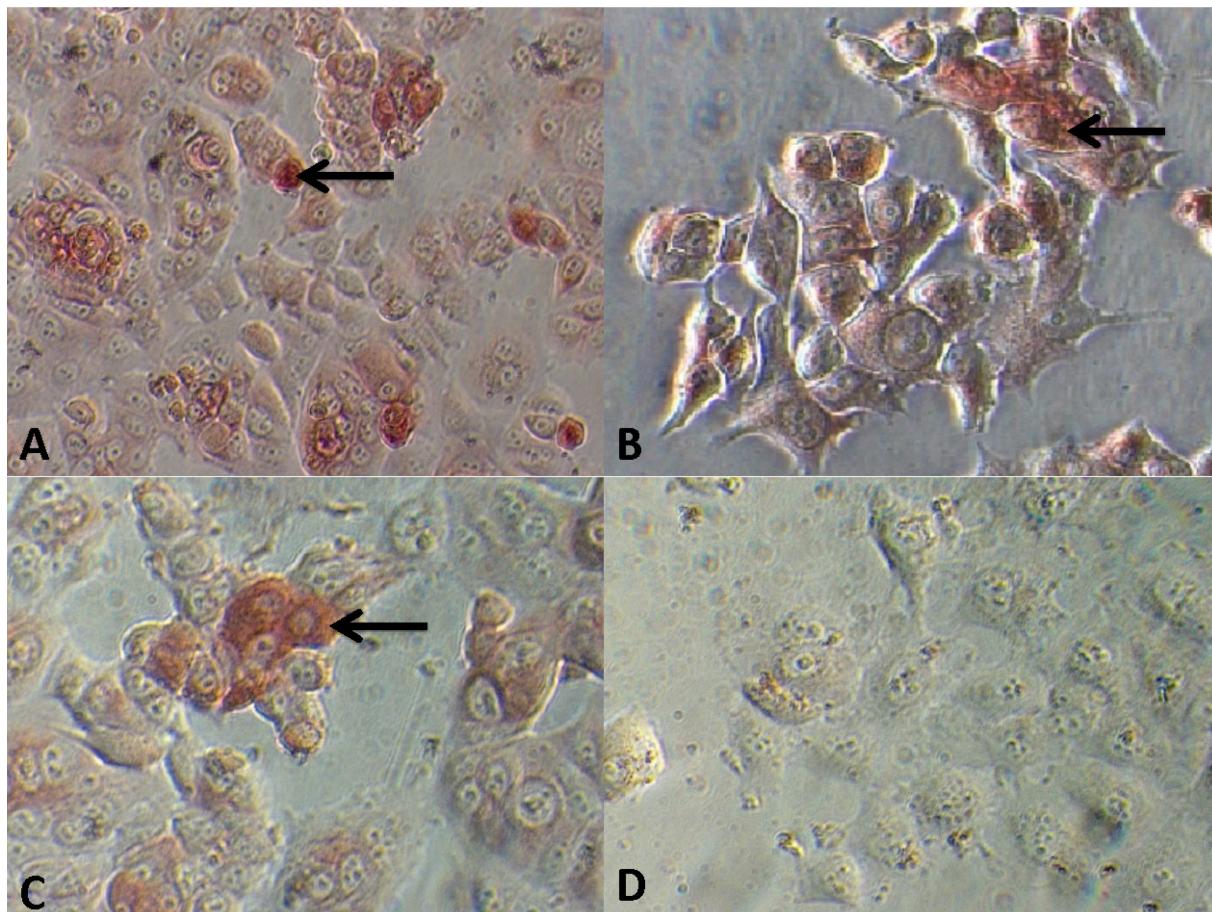


Abbildung 23: Immunhistochemie der MCF-7-Zelllinie. Bild **A**: Estrogenrezeptor alpha positiv. Bild: **B**: Estrogenrezeptor beta positiv. Bild **C**: Progesteronrezeptor positiv. Bild **D**: Negativkontrolle.

## 5. Diskussion

### 5.1 Aussagen über genutzte Analysenmethoden im Vergleich zur Literatur

Die Analyse des Ethanol-Extrakts in der Pyrolyse-Feldionisations-Massenpektrometrie ließ keine eindeutige Identifizierung von Quercetin zu, da die Signalintensität der Flavonoid-Gruppe durch den hohen Zuckeranteil überlagert war. Deshalb erfolgte massenspektrometrisch eine Vergleichsanalyse mit einer nicht konzentrierten Probe aus der äußeren Schale. Darin konnte Quercetin-Aglycon einwandfrei nachgewiesen. So erwies sich die Massenspektrometrie für die qualitative Bestimmung als ungeeignet und gab Anlass zum Wechsel zur HPLC, die in der Literatur als ein konventionelles Verfahren zur Analyse von Flavonoiden gilt [50, 73, 87, 95, 100].

Mittels dieser Chromatographie konnten die Zwiebelbestandteile erfolgreich nach ihren physikochemischen Eigenschaften differenziert werden. Durch das Übereinanderlegen der Standard- und Zwiebel-Chromatogramme konnte eindeutig ein gemeinsamer Peak gemessen werden. Die Retentionszeit des Quercetin-Standards (13,4 min) stimmt mit Peak 4 im EtOH-Extrakt überein und entspricht der Grundstruktur des Quercetin-Aglycons (Abbildung 14 und 16).

Ein Abgleich des Wasser-Extrakts mit dem Quercetin-Standard zeigte keine eindeutige Übereinstimmung. Zwar ähnelt das Peakprofil dem Zwiebel-Ethanol-Spektrum, jedoch erschien der gesuchte Peak eine Minute früher als der Standard. Somit kann über das Vorliegen von Quercetin-Aglycon in der wasserhaltigen Zwiebelsuspension keine sichere Aussage getroffen werden. Nähere Erklärungen werden im Verlauf vorgestellt. Die Absorbanzen des Spektrums liegen im mAU-Bereich und verdeutlichen den geringen Anteil an organischen Inhaltsstoffen im Wasser-Extrakt.

Flavonole sind in der Natur überwiegend an Glycoside gebunden [50, 73, 87]. Es ist daher anzunehmen, dass es sich bei dem gemessenen Peak 3 im Ethanol-Extrakt aufgrund seiner Nähe zu Peak 4 am ehesten ein Quercetin-Derivat handelt (Abbildung 14). In den Spektren der Zwiebel-Extrakte von Lombard et al. wurden die Peaks mit geringen zeitlichen Abständen nahe der Aglycon-Verbindung als Quercetin-Derivat identifiziert [73].

Die Menge in dem enthaltenen Peak 4 (Abbildung 14) konnte aufgrund der Kenntnis über Fläche und applizierter Quercetin-Menge im Standard per Dreisatz errechnet werden. Daraus resultierte eine zwiebeläquivalente Menge von 0,8 µg Quercetin-Aglycon pro µl Zwiebel-Ethanol-Suspension. Diese Quercetin-Konzentration wurde bei den Assays MTT-72h, BrdU und NRT an den Karzinomzellen untersucht.

Dass Zwiebeln unter den Gemüsearten mit den höchsten Gehalt an Quercetin bzw. an Quercetin-Derivaten besitzen, wurde bisher schon oft beobachtet [49, 95, 109]. Als Derivate bilden Quercetin-4-monoglykosid (Qmg) und Quercetin-3,4-diglykosid

(Qdg) die Mehrheit mit durchschnittlich 85 % der Gesamtflavonoide, wobei die letztere Verbindung Qdg den größeren Anteil ausmacht. Die restlichen 15 % bestehen laut Price et al. aus 17 verschiedenen, in sehr kleinen Mengen vorkommenden, Flavonoiden, worunter auch Kaempferol fällt. Die deglykolierte Form Quercetin-Aglycon ist mit weniger als 2% nur in geringer Menge vorhanden [97]. Setzt man die Aglyconfläche in Relation zur Gesamtfläche der Peaks resultiert ein hoher Anteil mit ca. 30 % der deglykolierten Verbindung und widerspricht der Entdeckung von Price et al. Möglich hierfür könnte die Extrahierungsmethode mit Methanol als Lösungsmittel sein [97].

Viel bedeutsamer scheint jedoch eine andere Ursache für den hohen Gehalt an Quercetin-Aglycon in der gelben Zwiebel zu sein. Price et al. beobachteten einen Autolyseprozess der Quercetin-Derivate, bei dem Zuckerreste mithilfe von hydrolytischen Enzymen sukzessiv abgespaltet werden [100]. Schon nach 24 Stunden ist bei einer Raumtemperatur von 25°C die Initialmenge des Diglycosids vollständig zu Quercetin-Monoglycosid und Aglycon umgesetzt worden [100].

Aus diesem Grund bedarf es vor der HPLC-Analyse einer Hydrolyse der Glycosidgruppen, um eine exakte quantitative Aussage zu treffen. In den Arbeiten von Hertog et al. und Nuutila et al. wurden die Glycoside zuerst in saurem Milieu hydrolysiert, um den reinen Quercetin-Gehalt zweifelslos bestimmen zu können [50, 87].

Bei der chromatographischen Bestimmung des Quercetingehalts in der Zwiebel werden in der Literatur (siehe Tabelle 1) schwankende Mengenangaben festgestellt. Diese Angaben können nicht als absolut gesehen werden, da einige Faktoren bei der Extraktion variieren und die Messung beeinflussen können. Darunter fallen: Temperatur, Druck und pH-Wert, Extraktionszeit, Zwiebelsorte und Lösungsmittel. Den Arbeiten von Kumar et al., Khiari et al. und Hertog et al. ist gemein, dass die Extrakte bei leicht saurem pH-Wert die höchsten Quercetin-Erträge erzielten [50, 59, 67]. Unter Hinzugabe von Ascorbinsäure konnte in der Veröffentlichung von Nuutila et al. die Ausbeute am Gesamtquercetin angehoben werden [87].

## 5.2 Zellteste

Nachdem der qualitative und semiquantitative Nachweis von Quercetin mittels HPLC erbracht werden konnte sollte das Wirkverhalten der Zwiebelsuspension und der synthetischen Flavonoide *in vitro* beleuchtet und interpretiert werden.

### 5.2.1 BrdU-Assay

Anhand des Einbaus des Pyrimidinanalogen BrdU konnte die DNA-Synthese der Mammakarzinomzellen quantifiziert werden. Das Ethanol-Extrakt reduzierte mit zunehmender Konzentration die Proliferation um 30 % und fast 50 % signifikant zur Negativkontrolle. Es konnte damit noch keine lineare Wirkungskurve festgestellt werden, hierzu sind weitere Verdünnungsversuche nötig. Bei den Wasser-Extrakten ließ sich eine leichte Wachstumshemmung registrieren, die insgesamt schwächer ausgeprägt als beim Alkohol-Extrakt war (Abbildung 17). Die Positivkontrollen

Estradiol und Tamoxifen bekräftigen die Ergebnisse aus vorherigen Arbeiten, in denen durch Estradiol die Proliferation zu und unter Tamoxifen abnahm [24]. Die Inhibition unter Tamoxifen war signifikant.

Weder in der zwiebeläquivalenten Quercetin-Konzentration (8 µg / ml) noch in der höheren Dosierung (30 µg / ml) konnten wachstumshemmende oder - stimulierende Effekte nachgewiesen werden.

Van der Woude et al. eruierten mit ihren BrdU-ELISA, dass Quercetin in Anwesenheit von Ascorbinsäure bei einer Konzentration (umgerechnet 30 µg / ml) nicht nur hemmend, sondern in der geringeren Konzentration (umgerechnet 6 µg / ml) auch stimulierend auf die Proliferation von MCF-7-Zellen wirkt [129].

Diese biphasischen Effekte des Quercetins können in dieser Arbeit nicht gesehen werden. Van-der-Woude et al. beschreiben zwei chemische Prozesse die relevant für den ausbleibende Hemmung sein können. Nicht nur die Löslichkeit von Quercetin in wässrigen Medien nimmt mit zunehmender Konzentration stark ab, sondern wird auch die Stabilität des Moleküls wird durch eine Autooxidation in wässriger Umgebung reduziert [129].

Außerdem könnte die Autooxidation dadurch vorangetrieben werden, dass im Medium befindliche Metall-Ionen die Bildung freier Radikale induzieren und die Struktur der Flavonole destabilisieren [75]. Beide Prozesse können erklärend für die fehlende Proliferationshemmung von synthetischem Quercetin sein.

Laut Van der Woude et al. kann durch die Applikation des Wachstumsfaktors FKS (10% im Zellkulturmedium) die Löslichkeit Quercetins verbessert werden [129]. Zwar erfolgte diese auch in der vorliegenden Arbeit, jedoch könnte durch die 24-stündige Inkubation zur Zelladhärenz – vor Quercetin Applikation - der Zusatz verbraucht und somit weniger Quercetin gelöst sein.

Ein weiterer Gesichtspunkt ist die Kristallisierung von Quercetin in den Wells. In mikroskopischen Kontrollen wurden in dieser Arbeit zwar keine Präzipitate in den Wells während der Versuche festgestellt, jedoch werden sensitivere Methoden benötigt, um kleine Kristallisierungen gut auszuschließen [129]. Löslichkeit und Stabilität von Quercetin kann durch Hinzugabe von 1 mM Ascorbinsäure verbessert werden [129].

### 5.2.2 MTT-Assay

Die MTT-Assays demonstrieren, dass eine längere Einwirkdauer der Proben stärkere Auswirkungen auf den Stoffwechsel ausüben und größere Messunterschiede offenbaren. Das Zwiebel-EtOH-Gemisch beeinträchtigte den Metabolismus in beiden Dosierungen stärker nach 72 h Inkubation als nach 48 (auf weniger als 20 % Zellviabilität). Es ist zu anzunehmen, dass sich die Tumorzellen bereits im Zelluntergang befanden und daher keine MTT-Umsetzung durch das mitochondrielle Reduktasesystem bewerkstelligt werden konnte.

Auffällig ist nach 48 h Inkubation der gesteigerte Stoffwechselumsatz des Ethanol-Extrakts bei 2250 µg / ml auf 132 %. Allerdings ist dieses Ergebnis statistisch nicht

signifikant. Das Zwiebel-Wasser-Extrakt zeigte eine leicht erhöhte Mitochondrienaktivität nach 72 Stunden auf.

Das synthetische Quercetin löste auch eine leichte Viabilitätssteigerung aus, die nicht mit den Werten von You et al. korrelieren. Diese fanden heraus, dass bei 100 µM (entspricht der Konzentration von 30 µg / ml in dieser Arbeit) eine Hemmung der Proliferation um 30 % nach 72 Stunden eintritt [133].

Dass Rutin in der Dosierung 61 und 27 µg / ml keinen Einfluss auf den mitochondriellen Stoffwechsel hat, wird von You et al. in den gleichen Konzentration bestätigt [133]. Mögliche synergetische Effekte von Rutin kombiniert mit Quercetin konnten nicht demonstriert werden. Anscheinend wirkt Rutin nur durch die enzymatische Umwandlung zu Quercetin-3-Glycosid und könnte eine Erklärung für die ausbleibenden antimalignen Wirkungen sein [8, 133].

Es ist bereits bekannt, dass der selektive Östrogenrezeptormodulator Tamoxifen über die Antagonisierung des Östrogenrezeptors alpha die Tumorprogression hemmt und innerhalb weniger Stunden die Apoptose auslöst [24]. In dieser Arbeit wurde dieses Antiöstrogen als Referenz appliziert, um die Aussagefähigkeit der Tests zu verdeutlichen. Laut Kallio et al. reicht sogar weniger als eine Stunde Inkubation mit Tamoxifen aus, um einen schnellen Zelltod zu induzieren. Somit ist die fehlende Mitochondrienaktivität nach beiden Inkubationszeiten zu erklären [58]. Unter dem Einfluss des Sexualhormons Estradiol mit 0,027 µg / ml ist der Zellmetabolismus im Vergleich zur Kontrolle nach 72 Stunden unverändert. Aus einer unpublizierten Studie von Szewczyk geht hervor, dass höhere Estradiolkonzentrationen notwendig sind, damit die Zellviabilität gesteigert wird [121].

### 5.2.3 Neutralrot-Assay

Die im Neutralrot-Test gemessene signifikante Zytotoxizität des EtOH-Extrakts korreliert mit den antimitochondriellen und antiproliferativen Wirkungen des MTT- und BrdU-Tests. Somit zeichnet sich in allen Tests ein eindeutiger antikanzerogener Trend in Anwesenheit des alkoholischen Zwiebelextrakts ab. Diese antitumorale Wirkung ist am ehesten dem Quercetin und seinen Glycosiden zuzuschreiben, da in Relation zur Gesamtmenge ein hoher Gehalt von Quercetin-Aglycon chromatografisch nachgewiesen werden konnte und die inhibitorischen Auswirkungen auf die MCF-7 Zellen in der Literatur belegt sind [27, 30, 35, 62, 106, 130].

Da es sich jedoch um ein stark konzentriertes Pflanzengemisch handelt und weitere verschiedene Substanzen (siehe Massenspektrometrie: Saccharide, Fettsäuren und Kalium) enthält, lässt sich nicht ausschließen, dass andere Stoffkomponenten zusätzlich zur antikanzerogenen Gesamtwirkungen beitragen. In der HPLC konnten nicht alle Peaks bestimmt werden. Außerdem wäre es denkbar, dass die in der Literatur beschriebenen Quercetin-Derivate und Organoschwefel-Verbindungen in der Zwiebel ebenfalls eine Wirkung haben und somit synergetisch mit dem Aglycon auf die Tumorzellen wirken [47].

In der Gegenüberstellung der beiden Zwiebel-Suspensionen geht aus allen Zelltests eine stärkere antimaligne Wirkweise des Ethanol-Extrakts hervor. Entgegen der Untersuchung von Kumar et al. ließ sich Quercetin im Wasser-Extrakt nicht einwandfrei identifizieren [67]. Mögliche Abweichungen in der Extrahierungsmethode kommen als Grund für die zweifelhafte Bestimmung in Betracht. Reduzierte Löslichkeit der Flavonoide in Wasser und eine verminderte Einengung in der Vakuumzentrifuge können die Wirkunterschiede in BrdU, MTT und Neutralrot erklären.

Während das Wasser-Extrakt in beiden Konzentrationen zytotoxisch im Neutralrot-Test wirkt, geben die MTT-48h und -72h-Assays keine viabilitätshemmende Wirkungen zu erkennen.

Ähnlich dazu rufen beide Quercetin-Konzentrationen im Neutralrot-Test eine gesteigerte Zytotoxizität hervor, wohingegen die MTT- und BrdU-Tests keine inhibitorischen Wirkungen hervorbringen. Es ist zu vermuten, dass der Neutralrot-Assay hier sensitiver ist. Gründe für die Unterschiede zwischen dem Toxizitäts – und Viabilitästest können in den verschiedenen Messprinzipien liegen. Ein Erklärungsansatz ist, dass das Reduktasesystem gemessen im MTT-Assay noch aktiv ist, während die Zellmembran geschädigt und die Aufnahmefähigkeit von Neutralrot herabgesetzt ist. So könnten die Zellen zwar weniger Farbstoff einlagern, während die mitochondrielle Atmungskette noch NADH bereitstellt.

Die sensitivere Detektion wird durch folgende Studien unterstützt. In der Arbeit von Bouallagui et al. wurde ein Olivenextrakt an MCF-7 Zellen getestet, mit dem Resultat, dass der Neutralrot-Test früher zytotoxische Ergebnisse detektierte als der MTT-Test [19]. Zu gleichem Ergebnis kamen Borenfreund et al., deren Untersuchungsergebnisse eine höhere Sensitivität des Neutralrot-Assays unterstützen. In den Analysen an verschiedenen Zelllinien registrierte der Neutralrot-Test früher toxische Werte als der MTT-Test [18].

Wie oben beschrieben hängt die Löslichkeit und die Stabilität Quercetins auch vom Medium und von der Temperatur ab [129]. Eine bessere Löslichkeit könnte sich ebenfalls in einer stärkeren Zytotoxizität niederschlagen. Andere mögliche Fehlerquellen wären Faktoren, die eine Präzipitations-Reaktion von Neutralrot beeinflussen und zu falsch positiven Ergebnissen führen. Dazu gehören Temperaturschwankungen zwischen Brustschrank und Box und variierende Expositionzeiten der Wellplatten in der kühlen Umgebung während der Applikation. Man kann davon ausgehen, dass diese Tests mit extremer Sorgfalt durchgeführt wurden (insbesondere der Waschvorgang). Repetitive mikroskopische Kontrollanalysen konnten die Kristallbildung ausschließen.

Eine höhere Aufnahme von Neutralrot und damit eine gesteigerte Zellvitalität konnte in den Substanzen Rutin und Rutin-Quercetin-Gemisch festgestellt werden. Dieser positive Einfluss bestätigt sich in den anderen beiden Zelltesten nicht. Vermutlich liegt dieser Effekt an der gesteigerten Sensitivität des Neutralrot-Tests.

### 5.2.4 Glukosemessung

Durch die Messung von Glukose im Überstand wurde zusätzlich zum MTT ein Parameter bestimmt, der die Stoffwechselleage weiter charakterisieren sollte. Hohe Glukose-Konzentrationen im Überstand sprechen für einen erhöhten Anteil zugrunde gegangener Zellen. Sowohl Tamoxifen als auch das Zwiebel-EtOH-Gemisch präsentierte einen stark reduzierten Stoffwechsel. Dieser stimmte mit der verminderten Reduktase-Leistung im MTT-Assay überein.

Das EtOH-Extrakt weist einen stärker verringerten Metabolismus in der Glukosemessung auf, als das bisher am stärksten antitumoral wirkende Tamoxifen. Die im Ethanol-Extrakt mittels Massenspektrometrie nachgewiesenen Saccharid-Gruppen könnten zu einer höheren Glukosemessung im Überstand führen und dieses Phänomen erklären.

Im Zwiebel-Wasser-Extrakt stellte sich keine Veränderung der extrazellulären Glukosekonzentration ein und zeigt damit einen fast unveränderten Metabolismus dar. Es wird angenommen, dass der geringe Anteil an organischen Verbindungen (u.a. der Phytoöstrogene) Grund für die geringe Wirkung ist.

Stark proliferierende Tumorzellen mit hoher Glukoseaufnahme nutzen neben der ATP-effizienten aeroben Glykolyse zusätzlich die anaerobe Laktatherstellung, um eine optimale Stoffwechselleistung zu gewährleisten [124]. Demnach verbrauchen lebende Karzinomzellen mehr Glucose und weisen einen verringerten Gehalt im Extrazellularraum auf. Dieses Verhalten konnte in den Proben Zwiebel-Wasser-Extrakt, Estradiol und Quercetin gesehen werden, die bei überwiegend aktivem Metabolismus niedrigere Glukosekonzentration aufwiesen, als im Ethanol-Extrakt. Die Aussage der höheren Glukosekonzentrationen im Überstand des Ethanol-Extrakts stimmt mit den toxischen Ergebnissen der Zellassays BrdU, MTT und Neutralrot überein.

### 5.2.5 Wirkweise von Quercetin

Bisher stellte sich ein hoher Anteil an Quercetin-Aglycon in der Ethanoluspension heraus. In BrdU-, MTT- und Neutralrot-Assay imponiert das Zwiebel-EtOH-Extrakt mit einer starken antitumoralen Wirkung. Nach mehreren frustranen Versuchen die einzelnen Peaks postanalytisch aufzufangen und separat an MCF-7 zu testen, blieb unklar ob das nachgewiesene Aglycon allein verantwortlich für die Wirkung ist oder ob die Glykosid-Verbindungen ebenfalls zu der Wirkung beitragen. In einigen Studien wurde demonstriert, dass durch verschiedene Zuckerreste die Bioaktivität des Quercetin-Moleküls variieren kann.

Quercetin-3-glycosid (Q3g) scheint eine biologisch sehr aktive Form des Aglycons zu sein [133]. You et al. ließ mithilfe der aus Aspergillus gewonnenen Enzyme Rutin zu Q3g katalysieren und verglich die Wirkung mit anderen Flavonoiden anhand eines MTT-Assays an MCF-7-Zellen. Daraus resultierte eine zunehmende Wirkstärke von Rutin über Quercetin zu Quercetin-3-glycosid [133]. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen de Araujo et al., die der Verbindung Q3g, nach vorhergegangener

Deglykolyse von Rutin, die stärkste antiproliferative und antioxidative Wirkweise attestierte [8].

Allerdings kommt die Verbindung Q3g in der Zwiebel jedoch nur zu einem sehr geringen Prozentanteil vor [97]. Ob dieses Derivat verantwortlich für die Hemmungen ist, müsste in weiteren Untersuchungen geprüft werden.

Der Zuckerrest am Aglycon scheint sich auf das antioxidative Verhalten der Verbindung auszuwirken. Es sind variierende antioxidative Wirkungen der Aglycon und der Glycosid-Verbindung beschrieben. Williamson et al. beobachtete an HCC-Zellen, dass Aglycon die effektivste antioxidative Fähigkeit besitzt [128]. Außerdem förderte der Abkömmling Quercetin-4-glycosid ebenfalls das antioxidative Enzym Quinone-Reductase [128]. Demnach ist die Annahme berechtigt, dass die Substituenten am Quercetinmolekül die Wirkung beeinflussen.

Ob dem hohen Aglycon-Anteil die alleinige Wirkung zuschreiben ist, zumal andere Arbeiten dieser deglykolyzierten Grundsubstanz ein erhebliches antikanzerogenes Potential beimaßen oder andere Stoffgruppen in der Zwiebel (wie z.B. die Flavonoid-Derivate oder Organoschwefelverbindungen) eine Teilwirkung haben, wäre ein sinnvolles Ziel weiterer Untersuchungen.

In den Veröffentlichungen zur Wirkweise von Quercetin sind bisher viele Interaktionen auf molekularer Ebene beschrieben. Van der Woude et al. fanden heraus, dass bei einer niedrigeren Quercetin-Konzentration eine Stimulation und bei einer höheren Dosierung eine Hemmung der Proliferation an Estrogenrezeptor-positiven (ER-positiv) Brustkrebszellen auftritt [130]. Diese biphasischen Effekte sind auf eine unterschiedlich starke Aktivierung von Estrogen-Rezeptoren zurückzuführen. Während die hemmende Wirkung durch Quercetin stärker über den ER-beta in Erscheinung tritt, ist die leichte Wachstumsstimulation über den ER-alpha vermittelt [130]. Erwähnt sei, dass die Aktivitätsmessung der Rezeptorexpression an Osteosarkomzellen durchgeführt wurde. In diesen Untersuchungen konnten die biphasischen Effekte von Quercetin nicht erwiesen werden.

Andere Veröffentlichungen bestätigen, dass der Estrogenrezeptor-beta sich als Gegenspieler zum alpha-Rezeptor verhält [94, 119]. In Mammakarzinomzellen, in denen der estrogenabhängige ER-alpha hochreguliert war, konnte durch eine Induktion der ER-beta-Expression die Zellproliferation gehemmt werden [94, 119].

Neben der rezeptorvermittelten Inhibierung, können auch Hemmungen an rezeptornegativen Zellen gezeigt werden [110, 112]. In der Studie von Scambia et al. hemmt Quercetin über eine Bindungsdomäne Type II Estrogen-binding-site an rezeptornegativen MCF-7 Zellen [112].

Weitere nicht estrogenrezeptor-vermittelte Signalwege sind bereits erforscht. Ein Wirkmechanismus wird von Chou et al. berichtet [27]. Hier fördert Quercetin die Zellzyklus-Arretierung und löst über den mitochondriellen Caspase-Signalweg die Apoptose aus [27]. Duo et al. liefern ebenfalls Hinweise für eine mitochondriell vermittelte Apoptose in Mammakarzinom-Zellen [35]. Quercetin stimuliert das pro-apoptotische Protein Bax und erniedrigt das anti-apoptotische Eiweiß Bcl-2 [35]. Laut Lee et al. sei die Apoptose durch Entstehung freier Radikale induziert [70]. Die

Autoren berichteten, dass die von Quercetin verursachten ROS (Reactive Oxygen Species) in MCF-7-Zellen Auslöser des pro-apoptischen Signalwegs (ASK-1 Apoptose signal-regulating kinase) seien [70]. Diese Veröffentlichungen demonstrieren die vielfältigen Wirkungen des Quercetins auf verschiedenen Ebenen und heben das antikanzerogene Potential hervor. Diese Hintergründe sind wichtig für das Verständnis der Wirkung von Quercetin, besonders im Hinblick auf die Auswirkungen des Zwiebel-Extrakts.

### 5.3 Methodenkritik

Über einen Standard konnte Quercetin-Aglycon im Ethanol-Extrakt der normalen Hauszwiebel mithilfe der HPLC identifiziert werden. Außerdem war es möglich, nachdem die Peakfläche des Extrakt-Spektrums ins Verhältnis zu der Standardfläche gesetzt wurde, die Menge von Quercetin-Aglycon in der Zwiebel zu errechnen.

Dabei kann es zu folgenden Messungenauigkeiten gekommen sein: der Graph schlägt, bevor er die Abszisse kreuzt, noch zu einem weiteren, kleineren Peak aus und vergrößert folglich die Peakfläche. Außerdem zeichnet die Software bei Peaks mit flacher Steigung gestrichelte Hilfslinien zur Abszisse ein, die dann für die Berechnung einbezogen werden. Daraus resultiert ein kleinerer Flächenanteil.

Es existieren unterschiedliche Versuchsbedingungen um eine höhere Flavonoid-Bilanz erzielen zu können. Hertog et al. gewann den größten Ertrag an Quercetin-Aglycon in einer Extraktionslösung von 50 %-Methanol mit 1,2 M HCL, die für 2 h bei 90 °C dem Rückflusskühler zugeführt wurde [50]. Ähnliche Versuchsbedingungen führten in der Arbeit von Nuutila zu den höchsten Aglycon-Erträgen und es konnte sogar durch den Zusatz von Ascorbinsäure der Gehalt gesteigert werden [87]. Um exakte Quercetin-Aglycon Bestimmungen durchzuführen, darf dieser Aspekt nicht außer Acht gelassen werden.

Außerdem könnte die Einstellung der Wellenlänge in der HPLC zu variierenden Absorbanzen führen und wird von Autoren unterschiedlich gewählt. Catherine et al. konnte zum Beispiel bei einer Wellenlänge von 371 nm die höchste Absorption von Quercetin erreichen [101]. Lombard et al. verwendeten eine Wellenlänge von 261 nm und betonten die Möglichkeit verschiedener Messbereiche zu Detektion der Flavonoide (unter anderem wie die in dieser Arbeit gewählte Wellenlänge von 254 nm) [73].

Aufgrund der Quercetin-Glykoside und fehlender Deglykosylierung konnten im Extrakt keine Aussagen über die Gesamtmenge des Aglycons getroffen werden. Um den genauen Anteil bestimmen zu können, müssen die Glycosid-Bindungen während der Extrahierung mit Salzsäure hydrolysiert werden [50]. Dies ist ein wesentlicher Schritt um eine präzise Quantifizierung zu ermöglichen [50, 87]. Zudem wäre die Hinzugabe von Antioxidantien wie z.B. Ascorbinsäure empfehlenswert, da die Aglycon-Ausbeute zusätzlich erhöht werden kann [129].

Der Neutralrot-Assay, der über die lysosomale Speicherung eines Vitalfarbstoffs die Membranintegrität misst, besitzt eine schon von Bouallagui et al. beschriebene

Störanfälligkeit [19]. Der repetitive Waschvorgang nach Hinzugabe des Farbstoffs kann zum Ablösen vitaler Zellen am Boden des Wells führen und für falsch positive Werte im ELISA sorgen. Um diesen Störfaktor gering zu halten, wurden mit besonderer Sorgfalt und unter mikroskopischer Kontrolle die Versuchsschritte durchgeführt.

#### 5.4 Ausblick

Obwohl epidemiologische Studien teils kontroverse Beziehungen zwischen dem Verzehr von Zwiebeln und dem Brustkrebsrisiko anzeigen, sind dennoch weitere präklinische und klinische Untersuchung eines Zwiebel-Extrakts in der Therapie und Prävention des Mammakarzinoms von großem Interesse. Das liegt zum einen an den zahlreichen Untersuchungen, die auf zellulärer Ebene dem synthetischen Quercetin antimaligne Wirkmechanismen beimessen und zum anderen an den antitumorale Effekten des Ethanol-Extrakts. Dieser sollte für eine pharmakologische Nutzbarmachung in weiteren Testungen analysiert werden.

Zunächst sollte eine Optimierung der Extrahierung angestrebt werden. Ko et. al entwickelten eine Methode, die einen 8- bzw. 4-fach höheren Ertrag an Quercetin im Vergleich zur Ethanol- bzw. Wasserextraktion hervorbrachte. Anscheinend lassen sich mit hohem Druck (90 bar), höherer Temperatur (165 °C) und einer kurzen Extraktionszeit (15 min) die Erträge erheblich steigern [63].

Außerdem sollten die Quercetin-Derivate im Ethanol-Extrakt differenziert werden. In diesen Versuchen ist es nicht gelungen die einzelnen Quercetin-Verbindungen mittels HPLC zu isolieren. Um zu eruieren, ob das Aglycon oder die Derivate eine höhere Effektivität haben, könnte das Zwiebelgemisch mithilfe eines HPLC-Fraktionsammlers aufgetrennt und in separaten *in vitro* Testungen analysiert werden. Weiterhin sollte den pharmakologischen Fragenstellungen nachgegangen werden:

- Wie hoch ist die mittlere effektive Dosis ( $ED_{50}$ ) bzw. letale Konzentration ( $LD_{50}$ ) des Ethanol-Extrakts?
- Gibt es Unterschiede in dem Wirkverhalten zwischen den Quercetin-Derivaten?
- Wie stellt sich eine Dosis-Wirkungs-Kurve des Ethanol-Extrakts dar? Könnte eine Dosissteigerung eine biphasische Wirkkurve (wie bei Van der Woude et al. [129]) hervorrufen oder ließe sich ein linearer Verlauf abzeichnen?

Um diese Fragen zu ergründen sind weitere Testungen von Verdünnungsreihen notwendig.

Außerdem hat der Hormonrezeptor eine besondere Relevanz. Van der Woude et al. beschreiben eine dosisabhängige Wirkung von Quercetin am Östrogenrezeptor an MCF-7-Zellen [130], andere Autoren wiederum beobachteten nicht-rezeptormittelte Hemmungen [27, 35]. Es müsste geklärt werden, ob oder inwieweit sich ein Ethanol-Extrakt vermittelter Wirkeffekt an rezeptornegativen Karzinomzellen zeigen ließe.

In dieser Arbeit war der wachstumshemmende Effekt an malignen Brustkrebszellen bedeutsam, zur weiteren Differenzierung ist es erforderlich wachstumsmodulierende Effekte an gesunden Mammazellen zu untersuchen.

Auf molekularer Ebene wäre zu erfragen, ob das aus vielen organischen Bestanteilen bestehende Extrakt ähnliche Wirkmechanismen besitzt, wie die Reinsubstanz Quercetin. Dazu wäre zum Beispiel die Verwendung einer Durchfluszytometrie (zur Bestimmung Zellzyklusphasen und Zellarretierung), eines Western-Blots (zur Registrierung anti-apoptischer Proteine) und die Messung von reaktiver Sauerstoffspezies (als Ausmaß des oxidativen Stresses) geeignet.

Die Interaktion mit Phytotherapeutika ist nicht geklärt. Um potentielle antagonisierende Reaktionen mit Chemotherapeutika oder Hormontherapeutika auszuschließen, ist es sinnvoll die in vorliegender Arbeit angewandten Untersuchungsreihen in Gegenwart eines Chemotherapeutikums durchzuführen. Im nächsten Schritt wären *in vivo* Studien angezeigt.

Klinische Studien wären viel komplexer und schwieriger, da viele weitere Einflussgrößen die Pharmakodynamik und -kinetik beeinträchtigen können. Wie im Abschnitt 1.4.2 Bioverfügbarkeit beschrieben hängt die Quercetin-Resorption u.a. von Glykosidsubstituenten, zellulären Transportmechanismen, bakterieller Darmflora und genetischer Disposition (wie z.B. dem Polymorphismus bei Stoffwechselenzymen) ab. Es gibt bereits Hinweise auf Interaktionen zwischen Zytostatika und Quercetin. Choi et al. untersuchten den Stoffwechsel dieses Flavonoids an Ratten. Dort wurde eine Inhibition der CYP3A4-Enzyme und des P-Glykoproteins durch Quercetin ermittelt, die für die Metabolisierung und den zellulären Reflux von Chemotherapeutika sorgen. Folglich konnte die Plasmakonzentration des Anthrazyklins Doxurubicin angehoben werden [26]. Zum einen veranschaulicht dieses Beispiel wie Pflanzenstoffe synergetisch mit einem Chemotherapeutikum wirken können, zum anderen zeigt es die nicht immer unbedenklichen Interaktionen der CYP-Enzyme.

## 6. Zusammenfassung

Phytoöstrogene in der Therapie und Prävention des Mammakarzinoms der Frau sind seit Jahren Gegenstand vieler Forschungen. Die gelbe Haushaltszwiebel enthält in hohen Mengen das Flavonoid Quercetin, dessen glykolierte Derivate den Hauptbestandteil ausmachen. Obwohl epidemiologische Studien teilweise widersprüchliche Verzehr-Nutzen-Korrelationen liefern, sind in einigen *in vitro* Studien antikanzerogene Eigenschaften des synthetischen Quercetins belegt worden.

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Extrakte (Ethanol und Wasser) aus der gelben Haushaltszwiebel gewonnen, um Proliferation-, Vitalitäts- und Zytotoxizitäts-Testungen an Mammakarzinomzellen durchzuführen.

Es erfolgte der qualitative Nachweis der deglykolierten Verbindung Quercetin-Aglycon mittels Massenspektrometrie und High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

Mithilfe der HPLC-Analyse konnte Quercetin-Aglycon unter Einbeziehung der Standardkonzentration quantitativ im Ethanol-Extrakt bestimmt und für nachfolgende Zelltests verwendet werden. Auffallend war im Vergleich zur Literatur ein relativ hoher Aglycon-Anteil in der Ethanol-Suspension.

In den Zellassays wurde das synthetische Quercetin-Aglycon, Rutin (ein Quercetin-Derivat) und die beiden Extrakte auf das Wachstumsverhalten der estrogenrezeptorpositiven Mammakarzinomzelllinie MCF-7 untersucht. Dabei erzielte der Zwiebel-Ethanol-Extrakt in den Zelltests Neutralrot-, MTT- und BrdU-Assay in zwei Konzentrationen signifikante Hemmungen über 50 %. Ein hoher Glukosegehalt nach Einwirkung des Zwiebel-EtOH-Extrakts weist auf einen eingestellten Metabolismus hin und unterstützt die Aussage des MTT-Tests.

Mit dem Wasser-Extrakt konnten die inhibitorischen Wirkungen in diesem Ausmaß nicht nachgewiesen werden - es ließen sich nur moderate Hemmungen in Proliferation und Zellvitalität messen.

Unter dem Einfluss der synthetischen Flavonoide (Quercetin in zwiebeläquivalenter Konzentration und in Kombination aus Rutin und Quercetin) konnten die MTT und BrdU-Assays keinen Anhalt für eine verminderte Stoffwechsel- und Proliferationsrate liefern und entsprechen nicht den Ergebnissen der Literatur. Unzureichende Molekülstabilisierung durch fehlende Ascorbinsäure und Autooxidation im Medium können als Ursache für die ausbleibenden Effekte der Flavonoide diskutiert werden. Lediglich der Neutral-Test detektierte bei dem synthetischen Quercetin eine mäßige Zytotoxizität, über dessen hohe Sensitivität ebenfalls andere Autoren berichten.

Die Referenzen Tamoxifen und Estradiol zeigten substanzspezifische Auswirkungen an der Karzinomzelllinie und verdeutlichen die Aussagekraft der *in vitro* Assays.

Da das Zwiebel-Ethanol-Extrakt als Stoffgemisch vorliegt, bleibt unklar ob der hohe Aglycon-Anteil allein oder andere Verbindungen (u.a. Quercetin-Derivate) für die antimaligne Wirkweise verantwortlich sind. Die starken antitumoralen Effekte des Ethanol-Extrakts sind für weitere Forschungen auf pharmakologischer Ebene von großem Interesse.

## 7. Thesen

### Thema:

Der Einfluss der gelben Hauszwiebel (*Allium cepa*) im Vergleich zu den synthetischen Flavonoiden (Quercetin und Rutin) auf das Wachstumsverhalten der estrogenrezeptorpositiven Mammakarzinomzelllinie MCF-7.

Verfasst von Lukas Hafer, geboren am 06.02.1992 in Osnabrück.

1. Die vorliegende wissenschaftliche Untersuchung befasst sich mit den Wirkungen zweier Zwiebelextrakte (in Ethanol und Wasser gelöst) im Vergleich zu den Flavonoiden Quercetin und Rutin an der hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomzelllinie MCF-7.
2. Der inhibitorische Effekt von Quercetin auf das Mammakarzinom ist in vielen Studien auf molekularer Ebene weitreichend untersucht worden.
3. Die gelbe Hauszwiebel enthält in hohem Maße das Flavonoid Quercetin und weitere seiner Derivate.
4. Mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatography) kann deglykoliertes Quercetin-Aglycon qualifiziert und quantifiziert werden. Demnach macht Quercetin-Aglycon im Ethanol-Extrakt einen großen Bestandteil aus.
5. Die Massenspektrometrie eignet sich wegen Signalüberlagerung der Saccharidgruppen nicht zur Analyse des Zwiebel-Extrakts.
6. Die Zellassays BrdU, MTT und Neutralrot werden zur Beurteilung von Proliferation, Zellviabilität und Zytotoxizität herangezogen.
7. Das Ethanol-Extrakt weist in allen drei Tests signifikant inhibitorische Wirkweisen auf.
8. Mit dem Wasser-Extrakt kann das Ausmaß der hemmenden Wirkung des Ethanol-Extrakts nicht nachgewiesen werden.
9. Synthetisches Quercetin in zwiebeläquivalenter Dosierung und das Quercetin-Derivat Rutin zeigen keinerlei hemmende Wirkungen.
10. Tamoxifen und Estradiol weisen ein substanzspezifisches Wirkverhalten an der MCF-7 Zelllinie auf.
11. Weitere Dosis-Wirkung-Relationen des Zwiebel-Ethanol-Extrakts auf Mammakarzinomzellen müssen nun untersucht werden.
12. Eine Antitumorale Wirkung des Zwiebel-Ethanol-Extrakts ist für weitere Untersuchungen *in vivo* von großem Interesse.

## 8. Publikation

Teile dieser Arbeit wurden publiziert in folgenden Abstracts:

**L Hafer, M Jung, P Marahrens, B Gerber, DU Richter.** Gelbe Hauszwiebel in der Sekundärprävention beim Mammakarzinom – in-vitro Studie.

Geburtshilfe & Frauenheilkunde 2017;77(08):904-916.

DOI: 10.1055/s-0037-1606159

**L Hafer, M Jung, P Marahrens, B Gerber, DU Richter.** Gelbe Hauszwiebel in der Sekundärprävention beim Mammakarzinom.

Senologie - Zeitschrift für Mammadiagnostik und -therapie 2017; 14(02): A1-A53.

DOI: 10.1055/s-0037-1602466



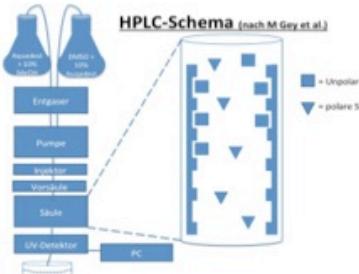
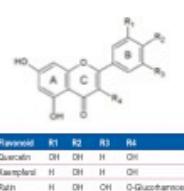
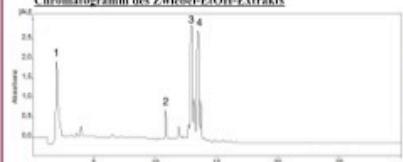
## Gelbe Hauszwiebel – mögliche Anwendung in der komplementären Therapie des Mammakarzinoms ?

L Hafer, P Marahrens, M Jung, V Briese, B Gerber, DU Richter.

### Fragestellung

Seit Jahrhunderten wird der Hauszwiebel eine heilende Wirkung zugesprochen. Sie hat im Vergleich zu vielen anderen Gemüsesorten den höchsten Gehalt an dem Phytoöstrogen Quercetin, das in stark glykolysester Form vorliegt. Es wurden verschiedene Zwiebelextrakte Konzentrationen angefertigt und ihre Inhaltsstoffe chromatographisch analysiert. Mögliche tumorenhemmende Auswirkungen der Extrakte auf maligne Mammarkulturen wurden *in-vitro* und im Vergleich zum synthetischen Quercetin untersucht. Dies ist ein interessanter Aspekt und soll klären, ob die Zwiebel in der komplementären Therapie des Mammakarzinoms Anwendung findet.

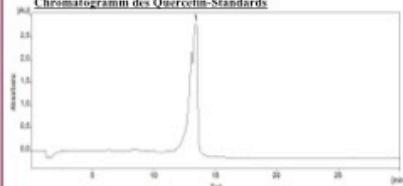
### Chromatogramm des Zwiebel-EtOH-Extrakts



### Methoden

Herstellung zweier Zwiebelextrakte (EtOH und H<sub>2</sub>O), Identifizierung und standardabhängige Semiquantifizierung von Quercetin mittels HPLC, immunhistochemische Bestätigung des Rezeptorstatus der MCF7-Zellen (ERα / ERβ; PR), Testing der Extrakte auf Zellproliferation, Zytotoxizität und Zellviabilität mittels kolormetrischer Assays (BrdU-, Neutralrot- und MTT-Assay).

### Chromatogramm des Quercetin-Standards

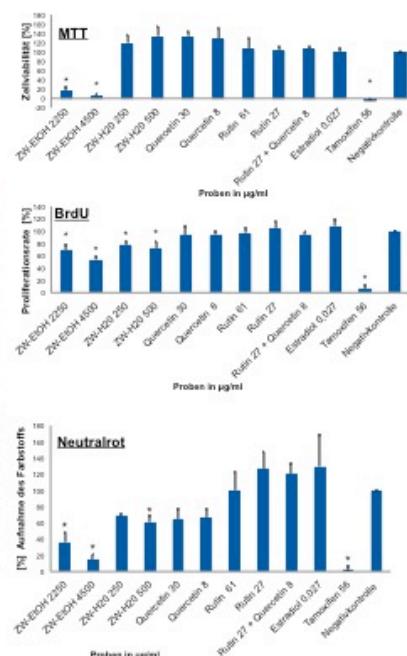
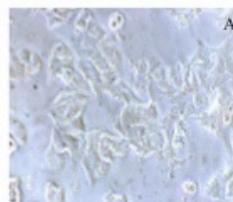


### Ergebnisse

In der HPLC konnte die zuckerfreie Verbindung Quercetin-Aglycon mithilfe eines Standards reproduzierbar im Ethanol-Extrakt identifiziert und semiquantifiziert werden. Das EtOH-Extrakt zeigte signifikante Hemmungen auf Metabolismus, Proliferation und Vitalität der MCF-7-Zellen. Ähnliche Auswirkungen, nur in geringerem Ausmaß, konnten beim H<sub>2</sub>O-Extrakt beobachtet werden. Eine leichte zytotoxische Wirkung des synthetischen Quercetins, in zwiebeläquivalenter Konzentration, konnte lediglich beim Neutralrot-Test gemessen werden. In den anderen Assays blieb eine inhibitorische Wirkung des synthetischen Quercetins aus.

### Schlussfolgerung

Quercetin gehört zu den Flavonoiden und kommt in der Natur größtenteils an Glykoside gebunden vor. Die antimimetischen Wirkungen der synthetischen Form wurde in vielen Arbeiten bisher bestätigt werden. Im Zwiebel-Ethanol-Extrakt konnte die Grundsubstanz Quercetin-Aglycon eindeutig identifiziert und semiquantifiziert werden. Ihr Aglycon-Anteil ist im Vergleich zur Literatur recht hoch. Als Erklärungen wird ein über die Zeit zunehmender Autolyseprozess für möglich gehalten, der für die Abspaltung der Zuckerkette sorgt. Die *in-vitro* Untersuchungen der Zwiebel-Extrakte auf die Zellen zeigen eine deutliche antimimetische Wirkung. Ursächlich dafür könnten die enthaltenen Quercetin-Derivate sein, die jedoch in synthetischer Form bei zwiebeläquivalenter Konzentration keine Wirkung hervorrufen. Möglich ist, dass dieser Effekt nur im Zusammenspiel der einzelnen Quercetin-Derivate auftritt. Die stärkeren Auswirkungen des Ethanol-Extrakts werden auf eine ausgehöhlte Einwirkung während der Herstellung zurückgeführt. Die aktuellen Resultate dieser Arbeit sind eine Grundlage für eine Diskussion zur Rolle der Zwiebel in der Komplementärmedizin.



MTT, BrdU und Neutralrot-Assay: dargestellt wurde der Einfluss der Testsubstanzen auf Zellmetabolismus, Proliferation und Zytotoxizität; angegeben sind Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanz (Signifikanzniveau p<0,05).

Universitätsfrauenklinik im Klinikum Südstadt | Universitätsmedizin Rostock | Südring 81 | 18059 Rostock, Germany

Posterpräsentation bei der XXV. Akademischen Tagung Deutschsprachiger Hochschullehrer der Gynäkologie und Geburtshilfe (Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe 2017).

## 9. Literaturverzeichnis

1. Adebamowo CA, Cho E, Sampson L, Katan MB, Spiegelman D, Willett WC, Holmes MD (2005) Dietary flavonols and flavonol-rich foods intake and the risk of breast cancer. *Int J Cancer* 114(4):628–633.
2. Afanas'ev IB, Dcrozhko AI, Brodskii AV, Kostyuk VA, Potapovitch AI (1989) Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 38(11):1763–1769.
3. AGO Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V. AGO Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V. [https://www.ago-online.de/fileadmin/downloads/leitlinien/mamma/Maerz2016/de/Alle\\_aktuellen\\_Empfehlungen\\_2016.pdf](https://www.ago-online.de/fileadmin/downloads/leitlinien/mamma/Maerz2016/de/Alle_aktuellen_Empfehlungen_2016.pdf). Accessed 23 May 2017.
4. Agustin-Salazar S, Medina-Juárez L a., Soto-Valdez H, Manzanares-López F, Gámez-Meza N (2014) Influence of the solvent system on the composition of phenolic substances and antioxidant capacity of extracts of grape (*Vitis vinifera* L.) marc. *Aust J Grape Wine Res* 20(2):208–213.
5. Aigner T, Wachter R (2007) Griechisch-deutsches Schul- und Handwörterbuch, 10., völlig neu bearb. Aufl., [Nachdr.]. Oldenbourg, München [u.a.].
6. Annapurna A, Reddy CS, Akondi RB, Rao SRC (2009) Cardioprotective actions of two bioflavonoids, quercetin and rutin, in experimental myocardial infarction in both normal and streptozotocin-induced type I diabetic rats. *J Pharm Pharmacol* 61(10):1365–1374.
7. Annecke K, Schmitt M, Euler U, Zerm M, Paepke D, von Minckwitz G, Thomssen C, Harbeck N (2008) uPA and PAI-1 in breast cancer: review of their clinical utility and current validation in the prospective NNBC-3 trial. *Adv Clin Chem* 45:31–45.
8. de Araújo MEMB, Moreira Franco YE, Alberto TG, Sobreiro MA, Conrado MA, Priolli DG, Frankland Sawaya ACH, Ruiz ALTG, de Carvalho JE, de Oliveira Carvalho P (2013) Enzymatic de-glycosylation of rutin improves its antioxidant and antiproliferative activities. *Food Chem* 141(1):266–273.
9. ATCC LCG Standards. <https://www.atcc.org> Accessed 17th May 2017.
10. Balakrishnan S, Bhat FA, Raja Singh P, Mukherjee S, Elumalai P, Das S, Patra CR, Arunakaran J (2016) Gold nanoparticle-conjugated quercetin inhibits epithelial-mesenchymal transition, angiogenesis and invasiveness via EGFR/VEGFR-2-mediated pathway in breast cancer. *Cell Prolif* 49(6):678–697.
11. Beckmann MW, Niederacher D, Schnürch H-G, Gusterson BA, Bender HG (1997) Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. *J Mol Med* 75(6):429–439.
12. Berek SJ, Hacker Jacob FN (2015) Berek & Hacker's Gynecologic Oncology Sixth Edition. Wolters Kluwer.

13. Berres I, Merlot J (2014) Mythos oder Medizin: Brauchen Wunden Luft oder Pflaster? Die spannendsten Fragen und Antworten aus der beliebten Kolumne bei SPIEGEL ONLINE. Heyne Verlag.
14. Bilyk A (1984) Varietal Differences in Distribution of Quercetin and Kaempferol in Onion (*Allium cepa* L.) Tissue. *J Agric Food Chem* (32):274–276.
15. Boersma MG, van der Woude H, Bogaards J, Boeren S, Vervoort J, Cnubben NHP, van Iersel MLPS, van Bladeren PJ, Rietjens IMCM (2002) Regioselectivity of Phase II Metabolism of Luteolin and Quercetin by UDP-Glucuronosyl Transferases. *Chem Res Toxicol* 15(5):662–670.
16. Boffetta P, Couto E, Wichmann J, et al (2010) Fruit and Vegetable Intake and Overall Cancer Risk in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC). *JNCI J Natl Cancer Inst* 102(8):529–537.
17. Boots AW, Haenen GRMM, Bast A (2008) Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *Eur J Pharmacol* 585(2–3):325–337.
18. Borenfreund E, Babich H, Martin-Alguacil N (1988) Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays—The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicol In Vitro* 2(1):1–6.
19. Bouallagui Z, Han J, Isoda H, Sayadi S (2011) Hydroxytyrosol rich extract from olive leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. *Food Chem Toxicol* 49(1):179–184.
20. Braakhuis AJ, Campion P, Bishop KS (2016) Reducing Breast Cancer Recurrence: The Role of Dietary Polyphenolics. *Nutrients* 8(9):547.
21. Bradlow HL, Sepkovic DW (2004) Steroids as Procarcinogenic Agents. *Ann N Y Acad Sci* 1028(1):216–232.
22. Campoli M, Ferrone S, Zea AH, Rodriguez PC, Ochoa AC (2005) Mechanisms of Tumor Evasion. In: Khleif SN (ed) *Tumor Immunol. Cancer Vaccines*. Springer US, pp 61–88.
23. Challier B, Perarnau J-M, Viel J-F (1998) Garlic, onion and cereal fibre as protective factors for breast cancer: A French case-control study. *Eur J Epidemiol* 14(8):737–747.
24. Chen H, Tritton TR, Kenny N, Absher M, Chiu J-F (1996) Tamoxifen induces TGF- $\beta$ 1 activity and apoptosis of human MCF-7 breast cancer cells in vitro. *J Cell Biochem* 61(1):9–17.
25. Choi J-H, Kim D-W, Park S-E, Lee H-J, Kim K-M, Kim K-J, Kim M-K, Kim S-J, Kim S (2015) Anti-thrombotic effect of rutin isolated from *Dendropanax morbifera* Leveille. *J Biosci Bioeng* 120(2):181–186.
26. Choi J-S, Piao Y-J, Kang KW (2011) Effects of quercetin on the bioavailability of doxorubicin in rats: Role of CYP3A4 and P-gp inhibition by quercetin. *Arch Pharm Res* 34(4):607–613.
27. Chou C-C, Yang J-S, Lu H-F, et al (2010) Quercetin-mediated cell cycle arrest and apoptosis involving activation of a caspase cascade through the mitochondrial pathway in human breast cancer MCF-7 cells. *Arch Pharm Res* 33(8):1181–1191.

28. Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, et al (2015) Tailoring therapies—improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann Oncol* 26(8):1533–1546.
29. Cruz-Zúñiga JM, Soto-Valdez H, Peralta E, Mendoza-Wilson AM, Robles-Burgueño MR, Auras R, Gámez-Meza N (2016) Development of an antioxidant biomaterial by promoting the deglycosylation of rutin to isoquercetin and quercetin. *Food Chem* 204:420–426.
30. Deng X-H, Song H-Y, Zhou Y-F, Yuan G-Y, Zheng F-J (2013) Effects of quercetin on the proliferation of breast cancer cells and expression of survivin in vitro. *Exp Ther Med* 6(5):1155–1158.
31. DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und, Medizinische Onkologie e.V., DGHO Empfehlungen der Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen ICD-10: C50.0 - 50.9 Onkopedia Leitlinie Mammakarzinom der Frau.
32. Dong J-Y, Qin L-Q (2011) Soy isoflavones consumption and risk of breast cancer incidence or recurrence: a meta-analysis of prospective studies. *Breast Cancer Res Treat* 125(2):315–323.
33. Dorant E, van den Brandt P, Goldbohm R, Sturmans F (1996) Consumption of onions and a reduced risk of stomach carcinoma. *Gastroenterology* 110(1):12–20.
34. Dunn BK, Wickerham DL, Ford LG (2005) Prevention of Hormone-Related Cancers: Breast Cancer. *J Clin Oncol* 23(2):357–367.
35. Duo J, Ying G-G, Wang G-W, Zhang L (2012) Quercetin inhibits human breast cancer cell proliferation and induces apoptosis via Bcl-2 and Bax regulation.
36. Egert S, Bosy-Westphal A, Seiberl J, et al (2009) Quercetin reduces systolic blood pressure and plasma oxidised low-density lipoprotein concentrations in overweight subjects with a high-cardiovascular disease risk phenotype: a double-blinded, placebo-controlled cross-over study. *Br J Nutr* 102(7):1065–1074.
37. Farquhar CM, Marjoribanks J, Lethaby A, Lamberts Q, Suckling JA, Cochrane HT Study Group (2005) Long term hormone therapy for perimenopausal and postmenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev* (3):CD004143.
38. Fink BN, Steck SE, Wolff MS, Britton JA, Kabat GC, Schroeder JC, Teitelbaum SL, Neugut AI, Gammon MD (2007) Dietary Flavonoid Intake and Breast Cancer Risk among Women on Long Island. *Am J Epidemiol* 165(5):514–523.
39. Freissmuth M, Böhm S (2012) Pharmakologie & Toxikologie: Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie. Springer Medizin Verlag Heidelberg, Berlin, Heidelberg.

40. Galeone C, Pelucchi C, Levi F, Negri E, Franceschi S, Talamini R, Giacosa A, Vecchia CL (2006) Onion and garlic use and human cancer. *Am J Clin Nutr* 84(5):1027–1032.
41. Gee JM, DuPont MS, Day AJ, Plumb GW, Williamson G, Johnson IT (2000) Intestinal Transport of Quercetin Glycosides in Rats Involves Both Deglycosylation and Interaction with the Hexose Transport Pathway. *J Nutr* 130(11):2765–2771.
42. Gey MH (2015) Instrumentelle Analytik und Bioanalytik. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
43. Gils CH van, Peeters PHM, Bueno-de-Mesquita HB, et al (2005) Consumption of Vegetables and Fruits and Risk of Breast Cancer. *JAMA* 293(2):183–193.
44. Giuliano AE, Hunt KK, Ballman KV, Beitsch PD, Whitworth PW, Blumencranz PW, Leitch AM, Saha S, McCall LM, Morrow M (2011) Axillary Dissection vs No Axillary Dissection in Women With Invasive Breast Cancer and Sentinel Node Metastasis: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 305(6):569–575.
45. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, et al (2013) Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol* 24(9):2206–2223.
46. Graefe EU, Wittig J, Mueller S, Riethling A-K, Uehleke B, Drewelow B, Pforte H, Jacobasch G, Derendorf H, Veit M (2001) Pharmacokinetics and Bioavailability of Quercetin Glycosides in Humans. *J Clin Pharmacol* 41(5):492–499.
47. Griffiths G, Trueman L, Crowther T, Thomas B, Smith B (2002) Onions—A global benefit to health. *Phytother Res* 16(7):603–615.
48. Harborne JB, Mabry TJ (1996) The Flavonoids: Advances in Research.
49. Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB (1992) Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J Agric Food Chem* 40(12):2379–2383.
50. Hertog MGL, Hollman PCH, Venema DP (1992) Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *J Agricuhural Food Chem* 40(9):1591–1598.
51. Hertog MGL, Kromhout D, Aravanis C, et al (1995) Flavonoid Intake and Long-term Risk of Coronary Heart Disease and Cancer in the Seven Countries Study. *Arch Intern Med* 155(4):381–386.
52. Hollman PCH, Bijlsma MNCP, Gameren Y van, Cnossen EPJ, Vries JHM de, Katan MB (1999) The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radic Res* 31(6):569–573.
53. Hollman PC, Vries JH de, Leeuwen SD van, Mengelers MJ, Katan MB (1995) Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr* 62(6):1276–1282.

54. Horneber M, Bueschel G, Dennert G, Less D, Ritter E, Zwahlen M (2012) How Many Cancer Patients Use Complementary and Alternative Medicine: A Systematic Review and Metaanalysis. *Integr Cancer Ther* 11(3):187–203.
55. Huang B, Zhao J, Li H, He K-L, Chen Y, Mayer L, Unkeless JC, Xiong H (2005) Toll-Like Receptors on Tumor Cells Facilitate Evasion of Immune Surveillance. *Cancer Res* 65(12):5009–5014.
56. Iriti M, Kubina R, Cochis A, Sorrentino R, Varoni EM, Kabała-Dzik A, Azzimonti B, Dziedzic A, Rimondini L, Wojtyczka RD (2017) Rutin, a Quercetin Glycoside, Restores Chemosensitivity in Human Breast Cancer Cells. *Phytother Res PTR*. doi: 10.1002/ptr.5878.
57. Justesen U, Knuthsen P, Leth T (1998) Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *J Chromatogr A* 799(1–2):101–110.
58. Kallio A, Zheng A, Dahllund J, Heiskanen KM, Häkkinen P (2005) Role of mitochondria in tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells. *Apoptosis* 10(6):1395–1410.
59. Khiari Z, Makris DP, Kefalas P (2008) Recovery of Bioactive Flavonols from Onion Solid Wastes Employing Water/Ethanol-Based Solvent Systems. <http://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/1082013208100707>. Accessed 14 Dec 2016.
60. Kim\* S, Binzel M, Park S, Yoo K-S, Pike L (2004) Inactivation of DFR (Dihydroflavonol 4-reductase) Gene Transcription Results in Blockage of Anthocyanin Production in Yellow Onions (*Allium cepa*). *HortScience* 39(4):889–889.
61. Kim J, Lee HJ, Lee KW (2010) Naturally occurring phytochemicals for the prevention of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 112(6):1415–1430.
62. Klappan AK, Hones S, Mylonas I, Brüning A (2012) Proteasome inhibition by quercetin triggers macroautophagy and blocks mTOR activity. *Histochem Cell Biol* 137(1):25–36.
63. Ko M-J, Cheigh C-I, Cho S-W, Chung M-S (2011) Subcritical water extraction of flavonol quercetin from onion skin. *J Food Eng* 102(4):327–333.
64. Koeppen BH (1960) Research note: The isolation and identification of quercetin from yellow-spotted picked onions. *South Afr J Agric Sci* 3(1):131–132.
65. Koolman J, Röhm KH (2003) Taschenatlas der Biochemie. Thieme flexibook., 3. Thieme.
66. Kreienberg R, Jonat W, Volm T, Möbius V, Alt D (2006) Management des Mammakarzinoms, 3. Springer.
67. Kumar B (2014) Microwave-Assisted Extraction and Solid-Phase Separation of Quercetin from Solid Onion (*Allium cepa L.*). *Sep Sci Technol* (49):2502–2509.

68. Lampe JW, Chang J-L (2007) Interindividual differences in phytochemical metabolism and disposition. *Semin Cancer Biol* 17(5):347–353.
69. Lee KW, Bode AM, Dong Z (2011) Molecular targets of phytochemicals for cancer prevention. *Nat Rev Cancer* 11(3):211–218.
70. Lee Y-K, Hwang J-T, Kwon DY, Surh Y-J, Park OJ (2010) Induction of apoptosis by quercetin is mediated through AMPK $\alpha$ 1/ASK1/p38 pathway. *Cancer Lett* 292(2):228–236.
71. Liu RH (2004) Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action. *J Nutr* 134(12):3479S–3485S.
72. Loeb LA (2001) A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res* 61(8):3230–3239.
73. Lombard KA (2002) Flavonoid Quantification in Onion by Spectrophotometric and High Performance Liquid Chromatography Analysis. *Postharvest Biology & Technology*, 4. HORTSCIENCE (37(4)):682–685.
74. Maass N, Janni W, Jonat, W. Lebensstilfaktoren und Komplementärmedizin beim Mammakarzinom. 15 Mai 2017 *Gynäkologe* 2017 · 50:525–532:.
75. Makris DP, Rossiter JT (2000) Heat-Induced, Metal-Catalyzed Oxidative Degradation of Quercetin and Rutin (Quercetin 3-O-Rhamnosylglucoside) in Aqueous Model Systems. *J Agric Food Chem* 48(9):3830–3838.
76. Mamessier E, Sylvain A, Thibult M-L, et al (2011) Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *J Clin Invest* 121(9):3609–3622.
77. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 81(1):230S–242S.
78. Minoggio M, Bramati L, Simonetti P, Gardana C, Iemoli L, Santangelo E, Mauri PL, Spigno P, Soressi GP, Pietta PG (2003) Polyphenol Pattern and Antioxidant Activity of Different Tomato Lines and Cultivars. *Ann Nutr Metab* 47(2):64–69.
79. Missmer SA, Eliassen AH, Barbieri RL, Hankinson SE (2004) Endogenous Estrogen, Androgen, and Progesterone Concentrations and Breast Cancer Risk Among Postmenopausal Women. *JNCI J Natl Cancer Inst* 96(24):1856–1865.
80. Morris KT, Johnson N, Homer L, Walts D (2000) A comparison of complementary therapy use between breast cancer patients and patients with other primary tumor sites. *Am J Surg* 179(5):407–411.
81. Moskowitz CS, Chou JF, Wolden SL, et al (2014) Breast cancer after chest radiation therapy for childhood cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 32(21):2217–2223.
82. Mullen W, Rouanet J-M, Auger C, Teissèdre P-L, Caldwell ST, Hartley RC, Lean MEJ, Edwards CA, Crozier A (2008) Bioavailability of [2-14C]Quercetin-4'-glucoside in Rats. *J Agric Food Chem* 56(24):12127–12137.

83. Müller U (2001) Chemie: das Basiswissen der Chemie ; 123 Tabellen, 7., korrigierte Aufl. Thieme, Stuttgart [u.a].
84. Nakagawa H, Tsuta K, Kiuchi K, Senzaki H, Tanaka K, Hioki K, Tsubura A (2001) Growth inhibitory effects of diallyl disulfide on human breast cancer cell lines. *Carcinogenesis* 22(6):891–897.
85. Németh K, Plumb GW, Berrin J-G, Juge N, Jacob R, Naim HY, Williamson G, Swallow DM, Kroon PA (2003) Deglycosylation by small intestinal epithelial cell  $\beta$ -glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur J Nutr* 42(1):29–42.
86. Nijveldt RJ, Nood E van, Hoorn DE van, Boelens PG, Norren K van, Leeuwen PA van (2001) Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 74(4):418–425.
87. Nuutila AM, Kammiovirta K, Oksman-Caldentey K-M (2002) Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. *Food Chem* 76(4):519–525.
88. Nuutila AM, Puupponen-Pimiä R, Aarni M, Oksman-Caldentey K-M (2003) Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. *Food Chem* 81(4):485–493.
89. Olthof MR, Hollman PCH, Buijsman MNCP, Amelsvoort JMM van, Katan MB (2003) Chlorogenic Acid, Quercetin-3-Rutinoside and Black Tea Phenols Are Extensively Metabolized in Humans. *J Nutr* 133(6):1806–1814.
90. Overman A, Chuang C-C, McIntosh M (2011) Quercetin attenuates inflammation in human macrophages and adipocytes exposed to macrophage-conditioned media. *Int J Obes* 35(9):1165–1172.
91. Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G, Goldberg DM (1995) The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: Implications for protection against coronary heart disease. *Clin Chim Acta* 235(2):207–219.
92. Packer L (2001) Methods in Enzymology Volume 335 Flavonoids and other Polyphenols. Academic Press.
93. Pan Y, Yang K, Wang Y, Zhang L, Liang H (2017) Could yoga practice improve treatment-related side effects and quality of life for women with breast cancer? A systematic review and meta-analysis. *Asia Pac J Clin Oncol* 13(2):e79–e95.
94. Paruthiyil S, Parmar H, Kerekatte V, Cunha GR, Firestone GL, Leitman DC (2004) Estrogen Receptor  $\beta$  Inhibits Human Breast Cancer Cell Proliferation and Tumor Formation by Causing a G2 Cell Cycle Arrest. *Cancer Res* 64(1):423–428.
95. Pérez-Gregorio RM, García-Falcón MS, Simal-Gándara J, Rodrigues AS, Almeida DPF (2010) Identification and quantification of flavonoids in traditional cultivars of red and white onions at harvest. *J Food Compos Anal* 23(6):592–598.

96. Petru E, Jonat W, Fink D, Köchli OR (2014) Praxisbuch Gynäkologische Onkologie, 4. Springer.
97. Price KR, Rhodes MJC (1997) Analysis of the Major Flavonol Glycosides Present in Four Varieties of Onion (*Allium cepa*) and Changes in Composition Resulting from Autolysis. *J Sci Food Agric* 74(3):331–339.
98. Prince PSM, Sathya B (2010) Pretreatment with quercetin ameliorates lipids, lipoproteins and marker enzymes of lipid metabolism in isoproterenol treated cardiotoxic male Wistar rats. *Eur J Pharmacol* 635(1–3):142–148.
99. Ramos FA, Takaishi Y, Shirotori M, Kawaguchi Y, Tsuchiya K, Shibata H, Higuti T, Tadokoro T, Takeuchi M (2006) Antibacterial and Antioxidant Activities of Quercetin Oxidation Products from Yellow Onion (*Allium cepa*) Skin. *J Agric Food Chem* 54(10):3551–3557.
100. Rhodes MJC, Price KR (1996) Analytical problems in the study of flavonoid compounds in onions. *Food Chem* 57(1):113–117.
101. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20(7):933–956.
102. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, Minor L (2016) Cell Viability Assays. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
103. Robert Koch Institut Zentrum für Krebsregisterdaten (2015) Krebs in Deutschland 2011/2012 Zentrum für Krebsregisterdaten CEKID. [http://www.gekid.de/Doc/krebs\\_in\\_deutschland\\_2015.pdf](http://www.gekid.de/Doc/krebs_in_deutschland_2015.pdf). Accessed 11 May 2017.
104. Roche Diagnostics GmbH (neu) Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) Roche, Version 16 January 2013. In: Wwwwroche-Appl.-Sci. <https://www.sigmadralich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Roche/Bulletin/1/11647229001bul.pdf>. Accessed 23 Jan 2018.
105. Roche Diagnostics GmbH Cell Proliferatoion Kit (MTT) Colorimetric assay (MTT based) for the non-radioactive quantificatoion of proliferation and viability. <https://www.sigmadralich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Roche/Bulletin/1/11465007001bul.pdf>. Accessed 24 Jan 2018.
106. Rodgers EH, Grant MH (1998) The effect of the flavonoids, quercetin, myricetin and epicatechin on the growth and enzyme activities of MCF7 human breast cancer cells. *Chem Biol Interact* 116(3):213–228.
107. Russo M, Spagnuolo C, Tedesco I, Bilotto S, Russo GL (2012) The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: Facts and fancies. *Biochem Pharmacol* 83(1):6–15.
108. Saji S, Hirose M, Toi M (2005) Clinical significance of estrogen receptor  $\beta$  in breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 56(1):21–26.
109. SAMPSON L, RIMM E, HOLLMAN PCH, de VRIES JHM, KATAN MB (2002) Flavonol and Flavone Intakes in US Health Professionals. *J Am Diet Assoc* 102(10):1414–1420.

110. Scambia G, Mancuso S, Panici PB, De Vincenzo R, Ferrandina G, Bonanno G, Ranelletti FO, Piantelli M, Capelli A (1993) Quercetin induces type-II estrogen-binding sites in estrogen-receptor-negative (MDA-MB231) and estrogen-receptor-positive (MCF-7) human breast-cancer cell lines. *Int J Cancer* 54(3):462–466.
111. Scambia G, Ranelletti FO, Panici PB, et al (1994) Quercetin potentiates the effect of adriamycin in a multidrug-resistant MCF-7 human breast-cancer cell line: P-glycoprotein as a possible target. *Cancer Chemother Pharmacol* 34(6):459–464.
112. Scambia G, Ranelletti FO, Panici PB, Piantelli M, Bonanno G, Vincenzo R de, Ferrandina G, Pierelli L, Capelli A, Mancuso S (1991) Quercetin inhibits the growth of a multidrug-resistant estrogen-receptor-negative MCF-7 human breast-cancer cell line expressing type II estrogen-binding sites. *Cancer Chemother Pharmacol* 28(4):255–258.
113. Schmitz S (2011) Der Experimentator: Zellkultur. Springer-Verlag.
114. Sengupta A, Ghosh S, Bhattacharjee S (2004) Allium Vegetables in Cancer Prevention: An Overview. *Asian Pac J Cancer Prev* 5 237–245.
115. Shannoun F, Blettner M, Schmidberger H, Zeeb H (2008) Strahlenschutz in der diagnostischen Radiologie. *Dtsch. Ärztebl. Jg.* 105 Heft 3.
116. Sigma Aldrich In Vitro Toxicology Assay Kit Neutral Red Based. In: Sigma-Aldrichcom. <https://www.sigmaaldrich.com> Accessed 24 Jan 2018.
117. Singh BN, Shankar S, Srivastava RK (2011) Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochem Pharmacol* 82(12):1807–1821.
118. Sorata Y, Takahama U, Kimura M (1984) Protective effect of quercetin and rutin on photosensitized lysis of human erythrocytes in the presence of hematoporphyrin. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj* 799(3):313–317.
119. Ström A, Hartman J, Foster JS, Kietz S, Wimalasena J, Gustafsson J-Å (2004) Estrogen receptor  $\beta$  inhibits 17 $\beta$ -estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(6):1566–1571.
120. Swain SM, Kim S-B, Cortés J, et al (2013) Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA study): overall survival results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol* 14(6):461–471.
121. Szewczyk M (2007) Untersuchungen zum Einfluss von Pflanzenextrakten aus der Leinpflanze Linum usitatissimum auf die Zellproliferation und Cytotoxizität humaner Karzinomzellen sowie Trophoblasten und Fibroblasten. Diplomarbeit angefertigt in der Universitätsfrauenklinik Rostock und dem Institut für Biowissenschaften, Abteilung Biochemie, Universität Rostock, vorgelegt Februar 2007.

122. Takahama U, Hirota S (2000) Deglucosidation of Quercetin Glucosides to the Aglycone and Formation of Antifungal Agents by Peroxidase-Dependent Oxidation of Quercetin on Browning of Onion Scales. *Plant Cell Physiol* 41(9):1021–1029.
123. Tautz E, Momm F, Hasenburg A, Guethlin C (2012) Use of Complementary and Alternative Medicine in breast cancer patients and their experiences: A cross-sectional study. *Eur J Cancer* 48(17):3133–3139.
124. Vazquez A, Liu J, Zhou Y, Oltvai ZN (2010) Catabolic efficiency of aerobic glycolysis: The Warburg effect revisited. *BMC Syst Biol* 4:58.
125. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al (2002) Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415(6871):530–536.
126. Walgren RA, Lin J-T, Kinne RK-H, Walle T (2000) Cellular Uptake of Dietary Flavonoid Quercetin 4'- $\beta$ -Glucoside by Sodium-Dependent Glucose Transporter SGLT1. *J Pharmacol Exp Ther* 294(3):837–843.
127. Williams C, Edvardsson K, Lewandowski SA, Ström A, Gustafsson J-Å (2007) A genome-wide study of the repressive effects of estrogen receptor beta on estrogen receptor alpha signaling in breast cancer cells. *Oncogene* 27(7):1019–1032.
128. Williamson G, Plumb GW, Uda Y, Price KR, Rhodes MJC (1996) Dietary quercetin glycosides: antioxidant activity and induction of the anticarcinogenic phase II marker enzyme quinone reductase in Hepalclc7 cells. *Carcinogenesis* 17(11):2385–2387.
129. van der Woude H, Gliszczynska-Świgło A, Struijs K, Smeets A, Alink GM, Rietjens IMCM (2003) Biphasic modulation of cell proliferation by quercetin at concentrations physiologically relevant in humans. *Cancer Lett* 200(1):41–47.
130. van der Woude H, ter Veld MGR, Jacobs N, van der Saag PT, Murk AJ, Rietjens IMCM (2005) The stimulation of cell proliferation by quercetin is mediated by the estrogen receptor. *Mol Nutr Food Res* 49(8):763–771.
131. Wuguo Deng, Xingwang Fang, Jilan Wu (1997) Flavonoids function as antioxidants: By scavenging reactive oxygen species or by chelating iron? *Radiat Phys Chem* 50(3):271–276.
132. Yager JD, Davidson NE (2006) Estrogen Carcinogenesis in Breast Cancer. *N Engl J Med* 354(3):270–282.
133. You HJ, Ahn HJ, Ji GE (2010) Transformation of Rutin to Antiproliferative Quercetin-3-glucoside by *Aspergillus niger*. *J Agric Food Chem* 58(20):10886–10892.
134. Zohri A-N, Abdel-Gawad K, Saber S (1995) Antibacterial, antidermatophytic and antitoxicogenic activities of onion (*Allium cepa* L.) oil. *Microbiol Res* 150(2):167–172.

135. Zu Y, Li C, Fu Y, Zhao C (2006) Simultaneous determination of catechin, rutin, quercetin kaempferol and isorhamnetin in the extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves by RP-HPLC with DAD. *J Pharm Biomed Anal* 41(3):714–719.
136. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID). <http://www.gekid.de/>. Accessed 11 May 2017.
137. Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. [http://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/032-045OL\\_I\\_S3\\_Brustkrebs\\_Mammakarzinom\\_Diagnostik\\_Therapie\\_Nachsorge\\_2012-07.pdf](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-045OL_I_S3_Brustkrebs_Mammakarzinom_Diagnostik_Therapie_Nachsorge_2012-07.pdf). Accessed 30 Apr 2017.
138. Das Mammographie Screening-Programm. <http://www.mammogramm.de/> Accessed 12 May 2017.
139. Welcome to the CAM-Cancer Website. <http://www.cam-cancer.org/>. Accessed 11 Dec 2017.

## 10. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Außerdem versichere ich weder die gegenwärtige Arbeit noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Ort, Datum

Unterschrift

## 11. Danksagung

Ich möchte ein herzliches Dankeschön folgenden Personen aussprechen, die mich während der Labortätigkeit und während der wissenschaftlichen Ausarbeitung unterstützt haben:

Meiner Betreuerin Frau Priv.-Doz. Dagmar-Ulrike Richter für ihre stets aufbauenden Worte, die kompetente und zugewandte Betreuung.

Bei Herrn Prof. Volker Briese für die Vergabe der Doktorarbeit, seine kreativen Ideen und Anregungen während der Laborarbeit.

Bei der gesamten Laborabteilung für die gute Unterstützung, insbesondere Frau Dipl.-Biol. Marlen Szewczyk für ihr offenes Ohr und ihre hilfreichen Ratschläge.

Herrn Prof. Udo Jeschke der LMU München für seine Unterstützung im Umgang mit der HPLC.

Herrn Prof. Bernd Gerber für die Realisierung der Teilnahme an zwei Kongressen.

Zuallerletzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden für die tolle Unterstützung.