

**Universität
Rostock**



Traditio et Innovatio

Universitätsfrauenklinik, Universitätsmedizin Rostock

(Direktor: Prof. Dr. med. Bernd Gerber)

**Vergleichende Untersuchungen zum Einfluss eines
Moringablattextraktes auf hormonrezeptorpositive und
hormonrezeptornegative Mammakarzinomzellen
(MCF-7 und MDA-MB-231)**

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt von

Inga Oelbe

geb. am 06.06.1995 in Gehrden

Rostock, März 2021

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

1. Gutachter: PD Dr. rer. nat. habil. Dagmar-Ulrike Richter, Universität Rostock,
Universitätsfrauenklinik im Klinikum Südstadt Rostock
2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Marek Zygmunt, Universität Greifswald,
Universitätsfrauenklinik Greifswald
3. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. habil. Udo Jeschke, Universität Augsburg,
Universitätsfrauenklinik Augsburg

Einreichung: März 2021

Verteidigung: November 2021

Inhaltsverzeichnis

Symbol- und Abkürzungsverzeichnis	I
Zusammenfassung	IV
1. Einleitung	1
1.1 Das Mammakarzinom der Frau	1
1.1.1 Definition und Klassifikation	1
1.1.2 Epidemiologie	3
1.1.3 Tumorgenese und -metabolismus	4
1.1.4 Risikofaktoren.....	6
1.1.5 Therapie.....	9
1.1.6 Die Rolle der Pflanzen in der Mammakarzinomtherapie.....	11
1.2 Phytoestrogene	13
1.2.1 Einteilung.....	13
1.2.2 Estrogenrezeptor.....	15
1.2.3 Exkurs: Estrogenrezeptoraktivierung durch SERMs.....	16
1.2.4 Estrogenrezeptoraktivierung durch Flavonoide und andere Wirkmechanismen...	17
1.2.5 Verfügbarkeit.....	19
1.3 Testsubstanzen.....	21
1.3.1 Moringa oleifera.....	21
1.3.2 Folsäure	23
1.3.3 Quercetin.....	24
1.3.4 Rutin	25
1.3.5 Kontrollen.....	26
1.4 Zielstellung	27
2. Material und Methoden	28
2.1 Herstellung der Testsubstanzen.....	28
2.1.1 Extrakterstellung	28
2.1.2 Herstellung der Referenzsubstanzen und Kontrollen	29
2.2 High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	30
2.3 Verwendete Zelllinien und Zellkultivierung	32
2.3.1 Estrogenrezeptorpositive Zelllinie MCF-7	32
2.3.2 Estrogenrezeptornegative Zelllinie MDA-MB-231	34
2.4 Vorbereitung der Zelltests.....	35
2.4.1 Bestimmung der Lebendzellzahl	35
2.4.2 Präparation der Wellplatten	37
2.5 Immunhistochemie	38
2.6 Zelltests	40
2.6.1 BrdU-Zellproliferationstest.....	40
2.6.2 Neutralrot-Zellviabilitätstest	42
2.6.3 CellTiter-Glo-Zellviabilitätstest.....	43
2.6.4 CytoTox-Glo-Zytotoxizitätstest.....	45

2.6.5 Messung der Glucose- und Lactatkonzentration und des pH-Wertes.....	46
2.7 Auswertung der Zelltests.....	47
3. Ergebnisse	49
3.1 High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	49
3.2 Immunhistochemie	51
3.3 Ergebnisse der Zelltests.....	53
3.3.1 BrdU-Zellproliferationstest.....	53
3.3.2 Neutralrot-Zellviabilitätstest	55
3.3.3 CellTiter-Glo-Zellviabilitätstest.....	56
3.3.4 CytoTox-Glo-Zytotoxizitätstest.....	57
3.3.5 Messung der Glucose- und Lactatkonzentration und des pH-Wertes.....	59
4. Diskussion	61
4.1 Diskussion der High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	61
4.2 Diskussion der Immunhistochemie	61
4.3 Diskussion der Zelltests	62
4.3.1 BrdU-Zellproliferationstest.....	62
4.3.2 Neutralrot-Zellviabilitätstest	63
4.3.3 CellTiter-Glo-Zellviabilitätstest.....	64
4.3.4 CytoTox-Glo-Zytotoxizitätstest.....	66
4.3.5 Messung der Glucose- und Lactatkonzentration und des pH-Wertes.....	66
4.4 Übersicht zur Wirkung des Moringablattextraktes.....	67
5. Methodenkritik	71
6. Ausblick.....	73
Thesen der Dissertation	75
Publikation.....	76
Lebenslauf.....	77
Literaturverzeichnis.....	78
Abbildungsverzeichnis.....	87
Tabellenverzeichnis.....	88
Danksagung	89
Selbstständigkeitserklärung	90
Appendix.....	91

Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
+	plus, und
<	kleiner als
>	größer als
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
AAF	Alanyl-alanyl-phenylalanyl-aminoluceferin
AF-1	Aktivierungsfunktion 1
AF-2	Aktivierungsfunktion 2
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
Akt	Proteinkinase B
AMP	Adenosinmonophosphat
Apaf-1	Apoptotic protease-activating factor 1
ATCC	American Type Culture Collection
ATLAS	„Adjuvant Tamoxifen: Longer Against Shorter“-Studie
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
AU	Absorbance Unit
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BASC	BRCA1-associated genome surveillance complex
Bcl-2-Protein	B-cell-lymphoma-2-Protein
BET	Brusterhaltende Therapie
BIRADS	Breast Imaging Report and Data System
BRCA1	Breast Cancer gene 1
BRCA2	Breast Cancer gene 2
BrdU	5-Brom-2-desoxyuridin
bzw.	beziehungsweise
C18	18-Kohlenstoff
ca.	circa
CDH1	Cadherin-1
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CYP	Cytochrom P450
DIN	duktale intraepitheliale Neoplasie
DCIS	duktales Carcinoma in situ
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferasen
ED ₅₀	Effektive Dosis, bei der 50 % der Individuen den erwünschten therapeutischen Effekt zeigen

EGCG	Epigallocatechingallat
EGF	epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	Estrogenrezeptor
ER -	estrogenrezeptornegativ
ER +	estrogenrezeptorpositiv
et alii	und andere
e.V.	eingetragener Verein
FDG	Fluordesoxyglucose
FKS	Fetales Kälberserum
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
h	Stunden
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ SO ₄	Dihydrogensulfat, Schwefelsäure
HDAC	Histon-Deacetylasen
HER2/neu	human epidermal growth factor receptor 2
HIF1	hypoxia-inducible factor 1
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
hTERT	human telomerase reverse transcriptase
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
l	Liter
lat.	lateinisch
LDL	Low-density Lipoprotein
LH	Luteinisierendes Hormon
LIN	lobuläre intraepitheliale Neoplasie
LucPpe2	Luciferase Photuris pennsylvanica 2
LucPpy	Luciferase Photinus pyralis
M	Molar
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7 (Mammakarzinomzelllinie)
MDA-MB-231	Monroe Dunaway Anderson-Mammary Breast-231 (Mammakarzinomzelllinie)
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium (2-fach positiv geladenes Ion)
min	Minuten
miRNA	Mikro Ribonukleinsäure
ml	Milliliter
mmol	Milimol
mTOR	mechanistic target of rapamycin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n	Anzahl der Testdurchgänge
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NGS	Next Generation Sequencing
nm	Nanometer

NST	No Special Type
O ₂	Sauerstoff (Molekül)
PALB2	Partner and localizer of BRCA2
PBS	Phosphate Buffered Saline
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
POD	Peroxidase
PR	Progesteronrezeptor
PR -	progesteronrezeptornegativ
PR +	progesteronrezeptorpositiv
PTEN	phosphatase and tensin homolog
p-Wert	Signifikanzwert
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	rounds per minute
RR	Relatives Risiko
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SERM	Selektiver Estrogen-Rezeptor-Modulator
SGLT1	sodium-glucose co-transporter 1
s. o.	siehe oben
sog.	sogenannt
STK11	Serin/Threonin Kinase 11
s. u.	siehe unten
TMB	Tetramethylbenzidin
TNM	Tumor, Nodus, Metastasen
TP53	für das Tumorsuppressorprotein p53 codierendes Gen
u. a.	unter anderem
UGT	Uridin-5'-diphospho-glucuronosyltransferase
USA	United States of America
UV	ultraviolett
z. B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

Brustkrebs stellt in den westlichen Ländern die häufigste maligne Tumorerkrankung der Frau dar. Zunehmende Resistenzentwicklungen sowie für Patientinnen schwer erträgliche Nebenwirkungen bereits etablierter Medikamente geben Anlass dazu, nach neuen potenziell antitumoralen Pharmaka zu suchen. Phytoestrogene aus der Natur zeigten sich sowohl durch ihre Bindung am Estrogenrezeptor-beta als auch über andere Wirkmechanismen zytotoxisch gegen Tumorzellen der Brust und anderer Ausgangsgewebe.

Diese Forschungsarbeit untersucht den Einfluss eines Extraktes der Blätter des Moringa oleifera-Baumes als Vielstoffgemisch auf eine hormonrezeptorpositive (MCF-7) und eine hormonrezeptornegative (MDA-MB-231) Mammakarzinomzelllinie. Nach der immunhistochemischen Bestätigung des Rezeptorstatus der Zellen wurde der Moringablattextrakt auf Ethanolbasis mittels Mikrowellenverfahren angesetzt. Mittels High Performance Liquid Chromatography gelang der qualitative Nachweis der im Extrakt enthaltenen Folsäure, sowie den Flavonoiden Quercetin und Rutin. Als Testsubstanzen für die Zelltests wurden nun der Moringablattextrakt in verschiedenen Verdünnungsgraden, die Referenzsubstanzen Folsäure, Quercetin und Rutin, sowie als Negativkontrolle Tamoxifen und der aktive Metabolit Endoxifen und als Positivkontrolle Estradiol mit entsprechenden Kontrollen der Lösungsmittel festgelegt.

Vier ausgewählte Zelltests sowie metabolische Untersuchungen konnten Zellproliferation und Zellviabilität nach jeweils 24-stündiger Inkubation der Testsubstanzen quantifizieren. Hierbei zeigte sich für den Moringablattextrakt insgesamt eine deutliche, dosisabhängige Wirkung auf beide Zellreihen. Diese war mal auf die eine, mal auf die andere Zellreihe etwas stärker ausgeprägt, weshalb nicht von einer rein estrogenrezeptorabhängigen Wirkung ausgegangen werden kann. Die Wirkung von Quercetin und Rutin war insgesamt weniger einflussreich, aber auf die MCF-7-Zelllinie im Vergleich zur anderen Zelllinie merklicher. Die proliferationsfördernde Tendenz von Folsäure war nur einmalig auf die MCF-7-Zellen signifikant.

Die Interpretation und Einordnung der Ergebnisse in das aktuelle Forschungsbild legen nahe, dass der zytotoxische Effekt des Moringablattextraktes nicht ausschließlich durch die drei definierten Referenzsubstanzen hervorgerufen wird, sondern auf einem oder mehreren der vielzähligen anderen Bestandteile beruht. Die Flavonoide mögen maßgeblich über die Bindung an den Estrogenrezeptor-beta wirken. Die für die Wirkung des Moringablattextraktes verantwortlichen Substanzen entfalten ihren Einfluss dagegen eher weniger über eine solche

Rezeptorbindung, wobei eine synergistische Wirkung als Vielstoffgemisch anzunehmen ist. Hier könnten weitere Untersuchungen anschließen und jene Bestandteile, die für die ausgeprägte Extraktwirkung ausschlaggebend sind, entschlüsseln.

Es wird deutlich, dass *Moringa oleifera* in Form des Ethanolextraktes zytotoxisch auf beide untersuchten Mammakarzinomzellreihen wirkt. Inwiefern im Xenograft Mausmodell oder letztlich klinisch eine subkutane Applikation antitumoral wirkt oder Nebenwirkungen von etablierten Zytostatika lindert, bleibt in weiterführenden Forschungen zu differenzieren.

1. Einleitung

Die im Rahmen dieser Dissertation angestellten Untersuchungen sind Teil einer Forschungsfrage im Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik Rostock, die sich damit beschäftigt, inwieweit Pflanzen als Vielstoffgemische aus der Natur der Wirkung auf Tumorzellen von in der Literatur beschriebenen Phytoestrogenen ähneln oder diese noch übertreffen.

Im Folgenden möchte ich das Mammakarzinom vorstellen und die Relevanz in der deutschen und internationalen Gesellschaft verdeutlichen. Anschließend werde ich die große Gruppe der Phytoestrogene einführen und antikanzerogene Prospektiven darlegen. Im Weiteren werden *Moringa oleifera* illustriert und ausgewählte darin enthaltene Bestandteile – zu denen auch genannte Phytoestrogene zählen – genauer beleuchtet, um die verwendeten Testsubstanzen darzulegen. Die benutzten Zellreihen unterscheiden sich in dem Vorhandensein des Estrogenrezeptors, wodurch die Beobachtung gelingen soll, ob oder inwiefern der selbst hergestellte Moringablattextrakt Einfluss auf das Zellwachstum anhand einer phytoestrogenen Wirkung entfaltet.

1.1 Das Mammakarzinom der Frau

1.1.1 Definition und Klassifikation

In der Medizin wird unter dem gemeinhin als Krebs bezeichneten Phänomen die unkontrollierte Zellvermehrung und das wuchernde Wachstum von Zellen verstanden, was zu Gewebsneubildungen und bei Malignität zu Metastasierung führt [43].

Unter den malignen Tumoren der Frau in den westlichen Ländern ist das Mammakarzinom das häufigste [28]. Es manifestiert sich im peripheren duktulo-lobulären Parenchym der Mamma und es werden Subtypen zunächst anhand des Ausgangsgewebes in solche ohne und mit speziellem Typ unterschieden: das invasive duktales Karzinom ohne speziellen Typ (engl. no special type, NST) geht von den Epithelzellen der Milchgänge aus und macht mit 65-80 % die größte Untergruppe aus. Zu den invasiven Karzinomen mit speziellem Typ zählt das invasive lobuläre Karzinom, welches aus den Drüsenläppchen entsteht und mit 10 % die nächstgrößere Untergruppe darstellt. Die anderen ca. 20 Subtypen wie u. a. papilläre, medulläre und adenoid-zystische Karzinome sind seltener [97].

Darüber hinaus kategorisiert man, wie bei anderen Tumorarten auch, nach der TNM-Klassifikation die Größe des Primärtumors nach Invasivität sowie das Ausmaß der Metastasierung nach dem Nodalstatus und dem Vorhandensein von Fernmetastasen [28, 97].

Betrachtet man prognostische Faktoren, so spielt der axilläre Lymphknotenstatus eine große Rolle, da dieser direkt mit der Größe des Tumors sowie der Rezidiv- und Überlebensrate korreliert. Die Exstirpation und pathologische Untersuchung des Sentinel-Lymphknoten hält dabei eine Indikatorfunktion inne, wobei bei einem negativen Befund eine ausgedehnte Axilladissektion nicht notwendig ist [97]. Das histologische Grading aller invasiven Karzinome soll laut der S3-Leitlinie anhand von Biopsien oder Operationspräparaten nach Elston und Ellis (Modifikation des Bloom und Richardson-Grading) erfolgen, bei dem semiquantitativ Kernpolymorphien, tubuläre Strukturen und Mitosen für die Einteilung in gut (G1, geringer Malignitätsgrad), mäßig (G2, mäßiger Malignitätsgrad) oder schlecht differenziert (G3, hoher Malignitätsgrad) berücksichtigt werden [32, 70, 97]. Der Proliferationsindex Ki-67 beruht auf dem Antikörpernachweis des in sich teilenden Zellen auftretenden nukleären Proteins Ki-67, welches eine prozentuale Angabe mitotischer Zellen möglich macht, wobei hohe Werte > 25 % für aggressive Malignität sprechen und genauso wie niedrige Werte < 10 % in die Therapieentscheidung mit einfließen sollten [28, 70, 82, 97]. Dieser Parameter geht zusammen mit dem Rezeptorstatus in die Klassifikation der intrinsischen Subtypen nach dem St. Gallen Konsensus von 2013 ein, welche ein Jahr später von der Mailändischen Forschergruppe um Maisonneuve et alii in Teilen modifiziert wurde (Tabelle 1) [39, 81, 82]. Die Bezeichnungen Luminal und Basal gehen auf Keratin-Expressionsmuster zurück [60].

	Luminal A	Luminal B		HER2/neu Überexpres- sion	Basal (triple- negative)
Häufigkeit	ca. 50 %	ca. 20 %		ca. 20 %	ca. 10 %
Hormonrezeptor	ER +, PR+	ER +, PR - / +		ER -, PR -	ER -, PR -
HER2/neu- Rezeptor	HER2 -	HER2 -	HER2 +	HER2 +	HER2 -
Ki-67 Proliferati- ons-index	Ki67 < 14 % <u>oder</u> Ki-67 14-19 % und PR > 20 %	Ki-67 > 20 % <u>oder</u> Ki-67 14-19 % und PR - / < 20 %	Ki-67 <u>und</u> PR belie- big		

Tabelle 1: Klassifikation der intrinsischen Subtypen des Mammakarzinoms modifiziert nach St. Gallen 2013, Maisonneuve et alii 2014 sowie Klöppel et alii 2013 [39, 60, 81].

Die immunhistochemische Charakterisierung anhand des Rezeptorstatus bildet die Grundlage für Therapieoptionen und ist prognoseentscheidend. Hierbei gilt die endokrine Sensitivität bei einem Anteil von $\geq 1\%$ estrogenrezeptorpositiven (ER +) und/oder progesteronrezeptorpositiven (PR +) Tumorzellen als nachgewiesen; diese gehen mit einer besseren Prognose einher als rezeptornegative (ER -, PR -), da der positive Rezeptorstatus ein prädiktiver Faktor für ein Ansprechen auf eine endokrine systemische Therapie darstellt [28, 97].

Eine Überexpression des human epidermal growth factor receptor 2 (HER2/neu, c-erb-b2), einem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), der in ca. 15-25 % aller Mammakarzinome positiv ist, ist mit einem aggressiven Krankheitsverlauf, aber auch dem Ansprechen auf eine Therapie mit dem spezifischen Antikörper Trastuzumab (Herceptin) assoziiert [97, 124]. Die triple-negativen Tumore, die weder ER oder PR noch den HER2/neu-Rezeptor exprimieren (Tabelle 1), bieten keinen Ansatz für eine rezeptorabhängige Therapie und gehen in ca. 20 % der Fälle mit einer genetischen Mutation im Breast-Cancer-Gen-1 (BRCA1) einher [40].

1.1.2 Epidemiologie

Den derzeit aktuellen statistischen Erhebungen des Robert-Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. ist zu entnehmen, dass Brustkrebs mit 29,5 % anteilig an allen Krebsneuerkrankungen der Frau den größten Stellenwert hat. Damit steht diese Tumorentität noch weit vor den darauffolgenden wie Darm- mit 11,1 % und Lungenkrebs mit 9,2 % [28, 145]. Im Jahr 2016 erkrankten 68.950 Patientinnen neu, wobei das mittlere Erkrankungsalter bei 64 Jahren lag. 18.570 Patientinnen erlagen den Folgen ihres Tumorleidens in diesem Jahr. Nach Eingliederung des Mammographie-Screenings 2005 war die Inzidenz der Brusttumore – typisch für die Etablierung einer solchen Maßnahme – erst angestiegen und danach langsam wieder gesunken. Die hohe Sensitivität der Diagnostik ermöglicht ein frühzeitiges Erkennen von Tumorstufen und eine Therapie dieser, bevor eine weitere Ausbreitung stattfindet. Dies zeigt sich darin, dass inzwischen weniger Frauen in entsprechender Altersgruppe an fortgeschrittenen Tumoren erkranken als noch vor Einführung des Screenings [145]. Das Lebenszeitrisiko einer Frau in Deutschland an Brustkrebs zu erkranken beträgt 12,8 %, jede achte Frau ist also im Laufe ihres Lebens von dieser Erkrankung betroffen [70].

Weltweit wurde 2018 die Zahl der Neudiagnosen von Brustkrebs bei Frauen auf 2,1 Millionen geschätzt. In der internationalen Übersicht wird beim Vergleich der Brustkrebsinzidenzen im

Jahr 2018 deutlich, dass in den USA und Nord- sowie West-Europa mit 84,8 bis 92,6 Fällen je 100.000 Frauen deutlich mehr Frauen an Brustkrebs erkranken als in asiatischen und afrikanischen Gegenden wie etwa in Ost-Asien mit 39,2 Fällen und Süd-Zentral-Asien mit 25,9 Fällen je 100.000 Frauen. Die Mortalität variiert hierbei dagegen nicht so stark und liegt insgesamt zwischen 12 und 16 Sterbefällen je 100.000 Frauen, lediglich Ost-Asien respektive Japan sticht mit 8,6 Sterbefällen je 100.000 Frauen heraus [15].

Anstoß für weitere Forschungsarbeiten gaben epidemiologische Untersuchungen, die zeigten, dass das Brustkrebsrisiko bei Töchtern asiatischer Einwanderer über die Generationen auf das Niveau der in den USA geborenen weißen Frauen anstieg [148]. Auch ist zu beobachten, dass in Schwellenländern die Brustkrebsinzidenz steigt [15]. In diesem Zusammenhang wurde unter anderem die phytoestrogenreiche Ernährung in asiatischen Ländern als protektives Element diskutiert [90, 119, 141, 148].

1.1.3 Tumorgenese und -metabolismus

Die Entstehung von Krebs ist ein mehrstufiger Prozess, bei dem die verschiedenen Schritte grob in Initiation, Promotion und Progression unterschieden werden können. Während der physiologischen DNA-Replikation entstehen kontinuierlich akzidentelle Basenfehler, die von DNA-Reparaturproteinen korrigiert werden [43]. Aufgrund exogener Faktoren (z. B. mutagene Umwelteinflüsse, ionisierende Strahlung, Ernährung) und endogener Faktoren (z. B. genetische Veränderungen von Tumorsuppressorgenen wie BRCA1 und BRCA2 sowie p53, Hormonhaushalt, Immunsuppression) kann dieses Gleichgewicht gestört werden, sodass DNA-Schäden in einer Zelle akkumulieren [43, 63]. Infolgedessen teilt sich die Zelle unkontrolliert und es entsteht malignes Zellwachstum [43]. Beim Mammakarzinom geschieht diese Entwicklung in Epithelzellen des Brustgewebes, spezifische Einflüsse hierauf werden im Kapitel 1.1.4 näher beleuchtet.

Mutierte Zellen verfügen über die Fähigkeit, unabhängig von Wachstumsfaktoren und unempfindlich gegenüber Wachstumsinhibitoren Gewebe zu invadieren und zu metastasieren, wobei das Potenzial zur Replikation unbegrenzt ist und anhaltend Angiogenese betrieben sowie Apoptose vermieden wird [63]. Die zugrundeliegenden Mechanismen, die die Zellen zu diesem Können befähigen, bieten Angriffspunkte in der Tumorthherapie.

Die maligne Transformation einer gesunden Zelle bringt auch verschiedene metabolische Veränderungen mit sich. Charakteristisch hierfür ist der sogenannte Warburg-Effekt, der einen

Wechsel der hauptsächlichen ATP-Synthese mittels oxidativer Phosphorylierung hin zur Glykolyse beschreibt [17]. Diese läuft in normalen Zellen als anaerobe Glykolyse unter sauerstoffdefizitären Zuständen ab, während sie in Tumorzellen unabhängig von Sauerstoffkonzentrationen und somit auch aerob zum Einsatz kommt. Das Resultat dieser Entwicklung ist die vermehrte Produktion von Lactat und aufgrund der geringeren Effizienz der ATP-Bildung mittels Glykolyse bei zeitgleich gesteigerter Zellteilung ein erhöhter Bedarf an Glucose [17, 22]. Die Glucoseaufnahme ist um das fünf- bis zehnfache erhöht und bietet so beispielsweise auch die Grundlage für die Detektionsmöglichkeit von Tumoren mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) anhand der Aufnahme von radioaktiv markierter Fluor-desoxyglucose (FDG) [22].

Der oben beschriebene Effekt sowie weitere metabolische Veränderungen, wie die vermehrte Synthese von Makromolekülen (Kohlenhydrate, Proteine, Fette, Nucleinsäuren) und die intensivierte Aufrechterhaltung des Redoxstatus werden über verschiedene Signalwege reguliert. Dazu gehört beispielsweise der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg, der unter anderem bei Mutation von Tumorsuppressorgenen wie PTEN (phosphatase and tensin homolog) aktiviert wird und Wachstums- und Überlebenssignale für Tumorzellen bereitstellt. So kann die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) über die Phosphorylierung von Membranlipiden die Proteinkinase B (Akt) aktivieren, welche als Protoonkogen nicht nur Apoptosemechanismen hemmt und Proliferation fördert [17]. Sie erhöht ebenso die Expression von Glucosetransportern und aktiviert verschiedene glykolytische Enzyme; über die Kinase mTOR (mechanistic target of rapamycin) wird neben anderem außerdem auch unter Normoxie der Transkriptionsfaktor HIF1 (hypoxia-inducible factor 1) aktiviert, welcher die glykolytischen Entwicklungen vorantreibt [17, 22].

Die vermehrte Bildung von Lactat und reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) geht mit einer sauren Mikroumgebung der Tumorzellen einher, vor der sie sich über komplexe Anpassungsmöglichkeiten wie eine vermehrte Produktion von NADPH und Glutathion schützen [17].

Die im Rahmen dieser Dissertation ausgewählten Zelltests machen sich diese Zustände zunutze und untersuchen Viabilität und Proliferation anhand verschiedener Marker wie der ATP-Menge, der Membranintegrität der Lysosomen, der DNA-Synthese und einer zytotoxischen Protease. Außerdem wird der Metabolismus anhand der Bestimmung von Glucose, Lactat und pH-Wert untersucht.

1.1.4 Risikofaktoren

Die Entstehung eines Mammakarzinoms ist ein Zusammenspiel komplexer Faktoren. Als wichtigster populationsbezogener Risikofaktor ist das fortgeschrittene Alter zu nennen. Die Altersgruppe 70-74 Jahre hat dabei ein 17-mal so hohes Risiko (Relatives Risiko = RR 17) für die Entstehung eines Mammakarzinoms wie die Altersgruppe 30-34 Jahre [71]. Weitere Faktoren lassen sich in die Kategorien genetisch, hormonell, toxisch sowie vorausgehende Gewebeeränderungen der Brust unterteilen. Diese werden im Folgenden näher erläutert.

- genetisch

Ca. 10-30 % der Mammakarzinome zeigen anamnestisch eine familiäre Häufung, aber nur 5-10 % können auf ein ursächlich vererbtes Gen zurückgeführt werden [3, 71]. Dabei gibt es autosomal dominant vererbte Gene mit hoher Penetranz ($RR > 10$), von denen BRCA1 und BRCA2 als wichtigste Vertreter zu nennen sind [3, 16]. BRCA1 codiert auf Chromosom 17q21.31 für ein zellzyklusregulierendes Protein, welches als Tumorsuppressor im Komplex mit anderen arbeitet (BRCA1-associated genome surveillance complex, BASC) [3]. Im Sinne der Zweischrithypothese ist es bei einer Mutation und dem gleichzeitigen Verlust des 2. normalen Allels (z. B. durch eine größere Deletion) mit einem Risiko von 57-65 %, vor dem 70. Lebensjahr an Brustkrebs zu erkranken, assoziiert [3, 16, 116]. Darüber hinaus ist das Risiko für weitere Karzinome erhöht. BRCA2 codiert auf Chromosom 13q13.1 für ein DNA-Reparatur-Protein, welches ebenfalls im Multiproteinkomplex fungiert (BRCA1-PALB2-BRCA2-complex) und bei einer Mutation mit einem Risiko von 45-55 %, vor dem 70. Lebensjahr an Brustkrebs zu erkranken, behaftet ist. Auch hierbei ist das Risiko für andere Karzinome erhöht. Außerdem sind die folgenden Gene für eine hohe Penetranz bekannt: TP53 (Li-Fraumeni-Syndrom, Lebenszeitrisko für Brustkrebs 25-79 %), PTEN (Cowden-Syndrom, Lebenszeitrisko für Brustkrebs 25-85 %), STK11 (Peutz-Jeghers Syndrom, Lebenszeitrisko für Brustkrebs 32-54 %) und CDH1 (Hereditary Diffuse Gastric Cancer, HDGC, Risiko 39-52 % für lobulären Brustkrebs bis zum 80. Lebensjahr). Auf die brustkrebsverursachenden Gene mittlerer bis niedriger Penetranz (RR 1-5) (PALB2, BRIP1, ATM, CHEK2, BARD1, RAD51C, NF1 u. a.) sei hier nicht näher eingegangen. Dank des zunehmenden Einsatzes des Next Generation Sequencing (NGS) als schnelle Technologie zur Sequenzierung des Genoms bleibt zu erwarten, dass immer mehr Genloci ursächlich für die familiären Mammakarzinome ins Licht der Forscher gelangen werden [3].

- hormonell

Zahlreiche Studien und Metaanalysen legen nahe, dass reproduktive Funktionen für die Ätiologie des Mammakarzinoms von zentraler Bedeutung sind, wobei die Gesamtdauer der Estrogenexposition von besonderer Relevanz ist. Bei Vorliegen von Adipositas ist bei postmenopausalen Frauen ein sicherer Zusammenhang nachgewiesen, der bei einem BMI > 30,7 ein relatives Risiko von 1,6 beschreibt. Ursächlich dabei ist die gesteigerte Aromatase-Aktivität im peripheren Fettgewebe, die die Vorstufen Testosteron und Androstendion in die Estrogene Estradiol und Estron umwandelt [69].

Die Sexualhormonsynthese findet bei prämenopausalen Frauen größtenteils in den Ovarien statt, sodass ebendiese bei langer Phase uneingeschränkter Ovarfunktion mit einem erhöhten Mammakarzinomrisiko assoziiert ist; postmenopausal dagegen werden diese Hormone hauptsächlich wie oben genannt im peripheren Fettgewebe synthetisiert [69]. So ist bei einer frühen Menarche vor dem 12. Lebensjahr, einer späten Menopause nach dem 55. Lebensjahr, einer späten Gravidität nach dem 30. Lebensjahr oder gar keiner Gravidität sowie ohne Laktationsphasen das relative Risiko jeweils um Werte zwischen 1,4 und 3,5 erhöht [69, 116]. Hinweise für eine risikobehaftete erhöhte Estradiolkonzentration im Serum können in Mammographieaufnahmen gefunden werden: diese korreliert dort nachweislich mit einer hohen Dichte (> 75 %), was mit einem 6-fach erhöhten Risiko (RR 6) im Vergleich zu einer 0 %-igen Dichte einhergeht [69].

Als weiteren Punkt der hormonellen Risikofaktoren für die Entstehung des Mammakarzinoms ist die Einnahme von Hormonen als Medikamente zu nennen. Hormonelle orale Kontrazeptiva steigern das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken, um RR 1,25-3,3 signifikant bei einem Einnahmebeginn vor dem 20. Lebensjahr. Außerdem ist eine zeitabhängige Risikosteigerung zu beobachten, die bei 10- bis 14-jähriger Anwendung am höchsten ausfällt [69].

Über postmenopausale Hormonersatztherapie lässt sich nach der Studie mehrerer Metaanalysen sagen, dass das Brustkrebsrisiko bei aktiven Einnehmerinnen von Estrogen-Progesteron-Präparaten erhöht ist, wobei auch hier eine zeitabhängige Risikosteigerung erkennbar ist [59, 69]. Ab einer Einnahmedauer von fünf Jahren ist das relative Risiko auf Werte von 1,3-2 erhöht. Bei reiner Estrogentherapie dagegen weniger, wobei auch hier eine Zeitabhängigkeit zur Diskussion steht [69]. Dies macht deutlich, dass auch das Steroidhormon Progesteron an der Mammakarzinogenese beteiligt sein muss, wenngleich hierbei noch Forschungsbedarf besteht. Bisherige Untersuchungen dazu zeigten, dass mit der malignen Transformation von

Brustkrebszellen ein Wechsel von parakrin zu autokrin Progesteron-vermittelter Aktion einhergeht, der die Proliferation der Zellen antreibt. Außerdem werden proliferationsfördernde Signalwege aktiviert, wie etwa der in dem Kapitel zur Tumorgenese erwähnte PI3K/Akt-Signalweg (Kapitel 1.1.3) [59].

Insgesamt lässt sich sagen, dass die Parameter Zeit und Dosis Einfluss auf das Ausmaß der Estrogen- und auch Progesteronwirkung nehmen und über mehrere Wege beeinflusst werden können.

- toxisch

Als gefährdende Noxe ist hier eine Strahlenexposition des Thorax im Kindes-, Jugend- und frühen Erwachsenenalter zu erwähnen [28]. In den westlichen Industrienationen können zwar ca. 30 % der Krebserkrankungen auf das Rauchen zurückgeführt werden, doch wird der Einfluss auf die Mammakarzinogenese noch kontrovers diskutiert [69]. Als dritten Risikofaktor sei hier der Alkoholkonsum aufgeführt: bei hohem Alkoholkonsum von > 45 g Alkohol/Tag ist das Risiko 1,46-mal so hoch ein Mammakarzinom zu bekommen wie ohne Konsum (RR 1,46); ab 30 g Alkohol/Tag sind bereits leichte Risikoanstiege nachweislich [28, 69].

- vorausgehende Gewebeveränderungen der Brust

Vor allem Risikoläsionen mit oder ohne Atypien, sowie ein kontralaterales Mammakarzinom erhöhen das Risiko für ein (weiteres) Mammakarzinom [28, 51]. Zu diesen Risikoläsionen gehört zum einen die lobuläre intraepitheliale Neoplasie (LIN), welches das Risiko für ein lobuläres Karzinom um den Faktor 8,0 erhöht (RR 8) und in der Regel exzidiert wird. Außerdem fällt darunter auch die duktale intraepitheliale Neoplasie (DIN) oder auch DCIS (duktales Carcinoma in situ) genannt, von dem alle Stufen 1-3 ein relatives Risiko von 10,0-12,0 für den Übergang in ein invasives duktales Karzinom aufweisen und mit operativer Entfernung und Nachbestrahlung behandelt werden [7, 60].

1.1.5 Therapie

In der Therapie von Mammakarzinomen gibt es im Wesentlichen drei Säulen: die Operation, die Bestrahlung sowie die medikamentöse Therapie. Anhand verschiedenster Kriterien wird heute die komplexe Therapie im Einzelfall interdisziplinär in einer Tumorkonferenz nach aktuellen Leitlinien angepasst. Vereinfacht betrachtet wird bei einem lokal begrenzten Stadium primär eine brusterhaltende Operation mit neoadjuvanter oder adjuvanter medikamentösen Therapie sowie adjuvanter Radiotherapie angestrebt. Handelt es sich bei der Diagnosestellung bereits um ein lokal fortgeschrittenes oder fernmetastasiertes Stadium, so steht eine neoadjuvante medikamentöse Therapie mit anschließender Operation (BET, Mastektomie mit ggf. Axilladisektion) bzw. eine alleinige systemische medikamentöse Therapie im Vordergrund [28].

Zur medikamentösen Therapie zählen die Chemotherapie, die Antikörper-Therapie und die hormonelle Therapie. Während bei adjuvanter Anwendung eine Fernmetastasierung verhindert werden soll, wird bei neoadjuvanter Therapie neben diesem Zweck außerdem die operative Aggressivität durch eine präoperative Tumorreduktion vermindert und es erfolgt gewissermaßen eine *in vivo*-Testung der verwendeten medikamentösen Therapie mit histologischer Evaluation im Anschluss [12].

Aus der Gruppe der Chemotherapeutika kommen Anthrazykline (z. B. Epirubicin), Taxane (z. B. Docetaxel) und Cisplatin zum Einsatz, welche beispielsweise bei triple-negativen Tumoren die einzige medikamentöse Therapieoption darstellen [7, 24].

Als Antikörper-Therapie werden Lapatinib, Bevacizumab und Trastuzumab bei Mammakarzinomen mit einer Überexpression des HER2/neu-Rezeptors verwendet [7].

Die Hormontherapie umfasst verschiedene Stoffgruppen und wird bei nachgewiesenen Estrogen- und Progesteronrezeptoren in den Tumorzellen adjuvant oder im metastasierten Stadium eingesetzt [7]. Ihre Vertreter verfolgen das gemeinsame Ziel der Senkung des Estrogenspiegels: die Aromatase-Inhibitoren (z. B. Anastrozol, Exemestan) hemmen die lokale Estrogensynthese, indem sie die Umwandlung von Androgenen in Estrogene vermindern [7, 69]. Gonadotropin-Releasing-Hormon-(GnRH-)Agonisten (z. B. Goserelin, Triptorelin) wirken insofern auf die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse, als dass sie bei kontinuierlicher Verabreichung über eine Desensibilisierung von GnRH-Rezeptoren in der Hypophyse und folglich Hemmung der Gonadotropinsekretion (LH, FSH) eine reduzierte Sexualhormonbildung bewirken [7, 36]. Ein weiteres Medikament der Hormontherapie ist Fulvestrant. Dies blockiert

direkt den zellulären Estrogenrezeptor und ist für postmenopausale Patientinnen zugelassen [7]. Der genaue Wirkmechanismus der selektiven Estrogenrezeptor-Modulatoren (SERMs) wie Tamoxifen wird später Gegenstand des Abschnitts über die Estrogenrezeptoraktivierung sein (Kapitel 1.2.3). Hier sei aber gesagt, dass sie über einen kompetitiven Antagonismus des Estrogenrezeptors die Proliferation von Brustkrebszellen hemmen und die Tumorgroße reduzieren [7, 53, 69]. Im Schnitt beträgt die Ansprechrate 30-35 %, bei für den Estrogenrezeptor hochpositiven Tumoren sogar bis zu ca. 70 % [69].

In der ATLAS (Adjuvant Tamoxifen: Longer Against Shorter)-Studie von 2013 wurde anhand von mehr als 15.000 Frauen mit ER-positiven Mammakarzinomen eine verringerte Rezidivrate und Mortalität festgestellt, wenn diese zehn Jahre lang adjuvant Tamoxifen einnahmen anstatt der bisher üblichen fünf Jahre mit anschließendem Wechsel auf eine Aromatasehemmer-Therapie [27, 69]. In der AWMF-Leitlinie von 2020 wird eine individuelle Nutzen-Risiko-Abwägung nach fünf Jahren über die Verlängerung je nach Menopausenstatus, Rezidivrisiko und Patientenwunsch empfohlen [70].

Von Bedeutung für diese Forschungsarbeit ist hierbei die Tatsache, dass eine solch langfristig angesetzte Einnahme von Tamoxifen auf eine mangelhafte Compliance der Patientinnen stößt. So zeigte eine deutsche Studie, dass bereits nach einem Jahr ein Drittel der Patientinnen die Tamoxifeneinnahme abbrachen, nach drei Jahren taten dies sogar mehr als die Hälfte [41]. Als Grund für diese fehlende Adhärenz werden die Lebensqualität einschränkenden postmenopausalen Nebenwirkungen angeführt; Hitzewallungen und Nachtschweiß treten bei 80 % der Patientinnen auf, aber auch Libidoverlust, Fatigue, Gewichtszunahme und vaginale Trockenheit sind sehr häufig [89]. Hieraus erwächst der Wunsch der Frauen nach weniger nebenwirkungsreichen Alternativen oder abmildernden Therapieergänzungen.

1.1.6 Die Rolle der Pflanzen in der Mammakarzinomtherapie

Seit Jahrtausenden werden pflanzliche Arzneimittel zur Bekämpfung von menschlichen Leiden verwendet. Schon 3000 vor Christi Geburt wurde die starke analgetische Wirkung eines Saftes aus Schlafmohn entdeckt und bis heute in Form von synthetisch hergestelltem Morphin genutzt. Auch das heute nicht mehr wegzudenkende Aspirin fand seinen Ursprung in einem Extrakt aus der Rinde der weißen Weide [52].

In der Mammakarzinomtherapie gehören ebenso Pharmaka zum Alltag, deren Wirkung erstmals in Pflanzenextrakten offenbar wurde. So gingen die Taxane (z. B. Docetaxel) als Chemotherapeutika aus Untersuchungen hervor, die in den 1960er Jahren in den USA an der Pazifischen Eibe durchgeführt wurden: Mittlerweile konnte genauer analysiert werden, dass sich die antikanzerogene Eigenschaft der aktiven Substanz Taxol im Zellzyklusarrest durch die Blockade der Mikrotubuli-Depolarisation äußert. Andere Mikrotubuli-Inhibitoren wie Vinblastin und Vincristin hemmen ebenfalls die Mitose von Tumorzellen und traten erstmals bei Untersuchungen des in Madagaskar vorkommenden Immergrüns *Vinca rosea* zu Tage. Seit Jahren wird das Phänomen beobachtet, dass Tumorzellen gegen einzelne oder mehrere Pharmaka Resistenzen ausbilden, sodass die Notwendigkeit besteht, neue Alternativen in der Tumorthherapie zu finden [73].

Ein großer anderer Bereich der pflanzlichen Heilmittelkomponente stellt die Komplementärmedizin dar. Zwar gibt es bis dato keine allgemeingültige Definition der komplementären Medizin, trotzdem wird sie zumeist als additiv zur klinischen Standardtherapie und ebenfalls evidenzbasierten Grundsätzen unterliegend verstanden [70]. Interessant zu wissen ist, dass je nach Literatur 50-90 % der Mammakarzinompatientinnen entsprechende Möglichkeiten aus diesem Spektrum nutzen [45, 47, 70, 87, 144]. Dabei spielen das Entwickeln von Eigeninitiative und das Gefühl der Selbstverantwortung und -kontrolle eine entscheidende Rolle, wobei die ärztliche Beratung diese Punkte verstärken und zusätzlich vor Schaden durch Nebenwirkungen oder Interaktionen sowie unseriösen Angeboten schützen sollte [70].

„Die besondere Problematik in der Evidenzbeurteilung komplementärer Verfahren liegt in deren häufig weniger gut definierten Wirkspektren, komplexen Wirkmechanismen und Interaktionsmöglichkeiten sowie dem Mangel an konventionell durchgeführten Heilmittelstudien, die klare Hinweise auf Wirksamkeit und Nutzen-Risiko-Relation ergeben.“ [70]

Diese Aussage aus der S3-Leitlinie zum Mammakarzinom, erstellt durch das Leitlinienprogramm Onkologie 2020, spiegelt das komplexe Bild dieses Forschungsgebietes wider, in dem es den dringenden Bedarf weiterer Studien gibt, um genau die angesprochene Evidenzbeurteilung zu erlangen und allgemeine Empfehlungen aussprechen zu können.

Eine bedeutende klinische Studie zu der komplementären Anwendung eines Mistelextraktes in Kombination mit der konventionellen adjuvanten onkologischen Therapie (Chemo-, Radio- oder hormonelle Therapie) bei knapp 1500 Frauen mit primärem nichtmetastatischem Brustkrebs in Deutschland und der Schweiz zeigte bereits richtungsgebende Ergebnisse. So konnte hier in der subkutanen Anwendung des Mistelextraktes nicht nur die Sicherheit dessen bestätigt werden, sondern auch eine signifikante Reduktion der unerwünschten Arzneimittelwirkungen der konventionellen Therapie sowie der Krankheits- und Therapie-assoziierten Symptome gezeigt werden und insgesamt ein verlängertes Überleben im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden [13].

Außerdem zeigten einige Studien eine synergistische Wirkverstärkung der konventionellen Medikamente bei der Kombination von pflanzlichen Zusätzen wie Flavonoiden, worauf im Detail noch in nachfolgenden Abschnitten (Kapitel 1.3.3 und 1.3.4) eingegangen wird.

1.2 Phytoestrogene

1.2.1 Einteilung

Bereits seit einigen Jahren gelangen Phytoestrogene und ihre Einsatzmöglichkeiten zunehmend in den Fokus der Wissenschaft. Sie gehören zu den sekundären Pflanzenstoffen, sind im Pflanzenreich weit verbreitet und ähneln in ihrer Struktur stark dem Sexualhormon Estrogen [123, 137]. Sekundäre Pflanzenstoffe sind im Gegensatz zu primären Pflanzenstoffen wie Kohlenhydraten, Proteinen und Fetten Metabolite, die in Pflanzen unter anderem das Wachstum regulieren, vor UV-Strahlung schützen, Schädlinge abwehren und als Farbstoff dienen [103, 136]. Phytoestrogene können eingeteilt werden in die Gruppen Chalkone, Flavonoide, Lignane und Stilbenoide [123]. Zu den Flavonoiden gehören die Flavone, Flavonole, Flavanone, Katechine, Anthocyanide und Isoflavonoide [113, 123]. Zu letztgenannten wiederum zählen die Isoflavone, Isoflavanone, Pterocarpane und Coumestane [86, 123]. *Moringa oleifera* wird als sehr reich an Phytoestrogenen beschrieben und im nachfolgend verwendeten Extrakt gelang der Nachweis der Flavonole Quercetin und Rutin [72]. Daher liegt hier der Fokus auf den Flavonoiden. Im Weiteren werden Quercetin und Rutin im Abschnitt über die Testsubstanzen (Kapitel 1.3.3 und 1.3.4) nochmals einzeln aufgeführt.

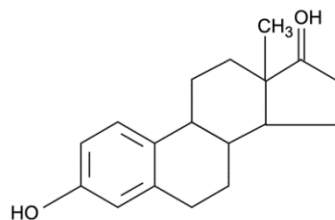
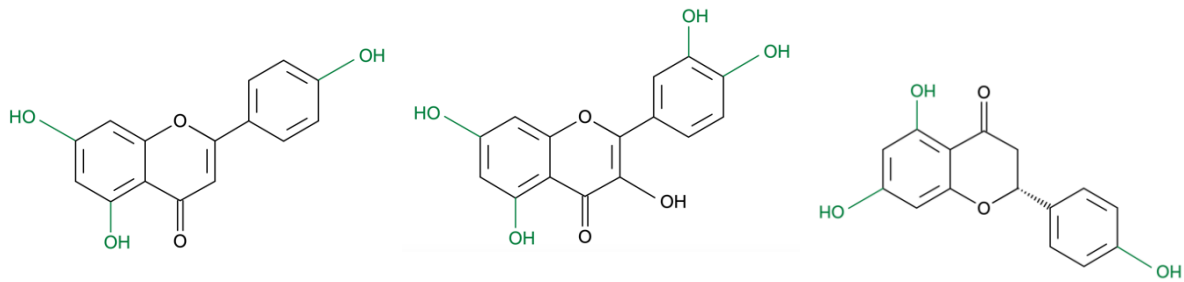
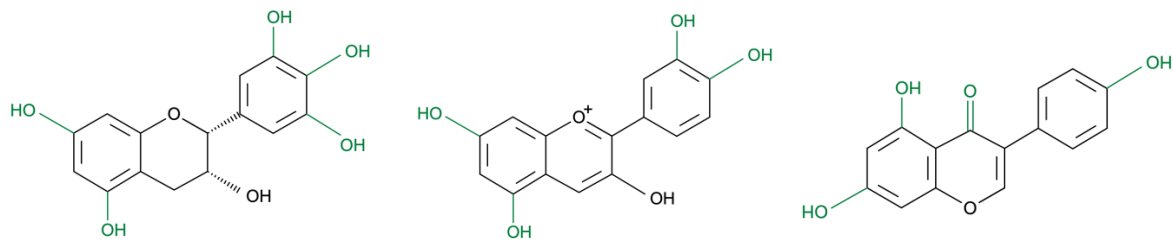


Abbildung 1: Strukturformel des Estradiol nach Leidenberger et alii 2014 [69].

Abbildung 1 und Abbildung 2 zeigen die Strukturformel des Estradiol sowie beispielhafter Vertreter der Untergruppen der Flavonoide. Hierbei ist die Grundstruktur in schwarz dargestellt, während die für den Vertreter charakteristischen angehängten Gruppen grün gefärbt sind.



Flavone	Flavonole	Flavanone
Hier: Apigenin	Hier: Quercetin	Hier: Naringenin
<u>Vorkommen:</u>	<u>Vorkommen:</u>	<u>Vorkommen:</u>
Sellerie, Kamille, Thymian, Oregano, Petersilie	Zahlreiche Früchte und Gemüse (s. u.)	Zitrusfrüchte



Flavanole	Anthocyanidine	Isoflavone
Hier: Epigallocatechin	Hier: Cyanidin	Hier: Genistein
<u>Vorkommen:</u>	<u>Vorkommen:</u>	<u>Vorkommen:</u>
Grüner Tee	Beeren, Kirschen, Trauben	Sojabohnen

Abbildung 2: Strukturformeln beispielhafter Flavonoide in Anlehnung an Kapustinskiene et alii 2020, sortiert nach ihren Untergruppen mit typischem Vorkommen [61, 119].

Das Grundgerüst einer jeden Untergruppe ist in schwarz dargestellt. Die angehängten Gruppen, die den dargestellten Vertreter ausmachen, sind in grün hervorgehoben [61, 119].

Wie erkennbar besteht das Grundgerüst aus einem sogenannten Flavan-Kern mit 15 Kohlenstoffatomen, die in drei Ringen arrangiert sind. Die Untergruppen werden durch Unterschiede am mittleren Kohlenstoffring gekennzeichnet, während die einzelnen Vertreter sich anhand Veränderungen der äußeren Kohlenstoffringe unterscheiden [99]. Von Relevanz für die Bindung an den Estrogenrezeptor ist der phenolische Ring A (Abbildung 2, jeweils links dargestellt) des Steroidmoleküls [36].

1.2.2 Estrogenrezeptor

Für das Verständnis der phytoestrogenen Wirkung im menschlichen Organismus soll hier der Estrogenrezeptor (ER) vorgestellt werden. Dieser ist ein nukleärer Rezeptor und somit ein estrogen-regulierter Transkriptionsfaktor, der in den beiden Formen ER-alpha und ER-beta vorkommt [36]. ER-alpha aktiviert die Transkription von Zielgenen in stärkerem Maße und wird neben anderen Geweben hauptsächlich in der Brustdrüse, im Uterus und in den Knochen exprimiert [36, 95]. ER-beta spielt eine größere Rolle vor allem im zentralen Nervensystem und Immunsystem, während er in Brust und Uterus eher als Gegenspieler zu ER-alpha agiert [95]. ER-alpha gilt als Zellproliferationsförderer, wohingegen ER-beta die Zellapoptose unterstützt [10, 95, 110, 123]. Letzteres geschieht nach aktuellem Forschungsstand vermutlich zum einen indirekt über eine Hemmung der Aktivierung des ER-alpha, zum anderen direkt über die intensiviertere Transkription Apoptose-relevanter Gene sowie die Hemmung der Transkription proliferationsrelevanter Gene [9].

Studien zeigten, dass der ER-alpha/ER-beta-Quotient im Rahmen der Mammakarzinogenese ansteigt, sich das Gleichgewicht also zu Gunsten der ER-alpha-Rezeptoren verschiebt, wodurch die proliferative Wirkung überwiegt [9, 10, 92]. Während Estradiol, eine Hormonersatztherapie und SERMs beide ER-Subtypen anspielen und so auch für unerwünschte Wirkungen sorgen, bieten Subtyp-selektive Liganden Potenzial zur Nutzung positiver Effekte ohne Auftreten negativer Aspekte [95].

Der Aufbau beider beinhaltet neben der DNA-Bindungsdomäne die Liganden-Bindungsdomäne, sowie zwei Domänen zuständig für die Aktivierungsfunktion (AF-1 und AF-2); AF-1 aktiviert ligandenunabhängig über eine Phosphorylierung verschiedener Kinasen, während AF-2 nach Bindung eines agonistischen Liganden aktiv wird. In Ruhe liegen die Rezeptoren als Komplex mit Hitzeschockproteinen im Kern oder Zytoplasma vor und wandern nach Ligandenbindung und anschließender Konformationsänderung mit Dissoziation des Komplexes in den Zellkern und interagieren mit Co-Regulatoren, um schließlich die Transkription durch den RNA-Polymerase-II-Komplex zu initiieren [36].

Der physiologische Ligand Estradiol ist als körpereigenes Sexualhormon zusammen mit den Gestagenen und Androgenen für die Differenzierung und Aufrechterhaltung der reproduktiven Funktionen zuständig. Gebildet wird er bei geschlechtsreifen Frauen hauptsächlich in den Ovarien unter dem Einfluss des luteinisierenden Hormons (LH) und des follikelstimulierenden Hormons (FSH) aus Cholesterin. So entsteht nach mehreren Zwischenschritten durch das

Enzym CYP 19, der Aromatase, ein aromatisierter Kohlenstoffring in A-Position, der die Bindung an den Rezeptor ermöglicht (Abbildung 1) [36]. Im Hinblick auf die zuvor beschriebenen Risikofaktoren kristallisiert sich zunehmend der Verdacht heraus, dass Estradiol in seinen proliferationsfördernden Eigenschaften an der Brustkrebsentstehung insbesondere bei postmenopausalen Frauen beteiligt ist [115].

1.2.3 Exkurs: Estrogenrezeptoraktivierung durch SERMs

Wenngleich die selektiven Estrogenrezeptormodulatoren (SERMs) nicht zu den Phytoestrogenen gehören, so soll an dieser Stelle anschließend an den Estrogenrezeptor diese wichtige Ligandengruppe erwähnt werden. Hierzu gehört das in der Mammakarzinomtherapie etablierte Tamoxifen, das eine 100- bis 1000-fach geringere Rezeptoraffinität als Estradiol aufweist [69, 107]. Der aktive Metabolit Endoxifen hat zwar eine höhere Affinität als Tamoxifen, dennoch werden relativ hohe Konzentrationen benötigt, um seinen wachstumshemmenden Effekt auf Brustkrebszellen zu erzielen [69]. Die selektive Eigenschaft beruht auf der ausschließlichen Stabilisierung der AF-2-Funktion, wohingegen AF-1 unbeeinflusst bleibt [36]; der AF-2-Bereich interagiert nach Ligandenbindung gewebespezifisch mit unterschiedlichen Co-Regulatoren, wodurch es zu einer antagonistischen wie auch agonistischen Wirkung kommen kann [36]. Durch den kompetitiven Antagonismus am ER wird die Proliferation von Brustkrebszellen gehemmt und die Tumorgröße reduziert [7, 69]. Agonistisch vermittelte ER-Effekte werden als unerwünschte Arzneimittelwirkung in Form von Endometriumhyperplasien, Hitzevallungen, gastrointestinalen Beschwerden sowie Flüssigkeitsretention beschrieben [36]. Neuere Untersuchungen kommen zu dem Ergebnis, dass Tamoxifen darüber hinaus auch auf estrogenrezeptornegative Tumorzellen toxisch wirkt, da es über eine selektive Erhöhung der Kalziumkonzentration in diesen Zellen mitochondrialen Stress verursacht, was eine Apoptoseinduktion zur Folge hat [104].

1.2.4 Estrogenrezeptoraktivierung durch Flavonoide und andere Wirkmechanismen

Phytoestrogene können aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu Estradiol ebenso an ER-alpha und ER-beta binden (Abbildung 1 und Abbildung 2), wobei trotz variierender Stärke innerhalb der Untergruppen im Allgemeinen eine höhere Affinität zum ER-beta besteht [64, 92, 95]. Dabei scheinen Position und Zahl der OH-Gruppen relevant für die Affinitätsunterschiede zu sein, da beispielsweise Genisteins Affinität für ER-beta 20-mal höher ist als für ER-alpha, jedoch nach Abspaltung von einer OH-Gruppe der Stoff Daidzein und nach Verlust von zwei OH-Gruppen der Stoff Formonetin wesentlich geringere Affinitäten aufweisen [10].

Die Affinität zum Estrogenrezeptor ist dabei generell geringer als die des Estradiol, so hat beispielsweise Genistein eine 1000-fach geringere Affinität zum ER-beta. Allerdings zeigte eine *in vitro*-Studie, dass die maximale ER-Induktion bei Quercetin und Genistein 2- bis 5-fach höher war als bei Estradiol [140]. Des Weiteren können Phytoestrogene *in vivo* Konzentrationen von 1000-facher Größe im Vergleich zu Estradiol erreichen und bei Kombinationen verschiedener Flavonoide (z. B. Genistein, Daidzein und Equol) wurden derart gesteigerte signifikante Effekte beschrieben, dass anzunehmen ist, dass eine synergistische Beziehung vorliegt, die nicht mit einer einfachen Addition zu erklären ist [95, 140].

Eine vornehmliche Stimulation des ER-beta bietet wie im vorherigen Abschnitt beschrieben das Potenzial antiproliferativ auf Brustgewebe zu wirken. Hierbei hervorzuheben ist, dass anders als bei Tamoxifen keine relevanten Effekte auf das Endometriumwachstum beobachtet wurden [95, 146]. Neben der bisher beschriebenen Wirkung über die Estrogenrezeptoraktivierung und die damit verbundene Beeinflussung der DNA-Transkription, zeigten sich Flavonoide ebenfalls als Inhibitoren der Aromatase und tragen so dazu bei, die körpereigene Estradiolkonzentration zu senken, worin ein weiterer potenziell protektiver Ansatz liegt [115, 138].

Zum anderen werden über estrogen-unabhängige Wirkmechanismen andere biologische Prozesse angespielt. Flavonoide liegen entweder als glykosilierte Formen oder Aglykone vor; biologische Wirkungen begründen sich vor allem auf den OH-Gruppen [61, 112]. Diese können beispielsweise durch deren Spaltung schädliche freie Radikale fangen, woraus sich eine antioxidative Wirkung ergibt [99]. Quercetin zeigte über diesen Effekt hinaus auch die Induktion des körpereigenen Antioxidans Glutathion [4, 25, 125]. Bei einem physiologischem pH-Wert existieren Flavonoide im Zytosol als Phenolat-Anione oder neutrale Phenole; diese schwachen

hydrophoben Säuren können zelluläre und mitochondriale Membranen überqueren und als Protonophoren fungieren [30, 61]. Dabei handelt es sich um Substanzen, die die Atmungskettenphosphorylierung entkoppeln, indem sie einen freien Protonenrückfluss ohne ATP-Synthese ermöglichen. So wird der Protonengradient durcheinander gebracht und die Membran depolarisiert; dieser Wirkmechanismus wurde bereits als Ursache zytotoxischer Effekte von neuartigen, in der Forschung untersuchten Antibiotika (wie Pyrrolomycin) auf grampositive Bakterien diskutiert [134].

Zahlreiche weitere Effekte wie etwa die Aktivierung serotoninerger Rezeptoren [42] und IGF-1 Rezeptoren [14], die Beeinflussung diverser Kinasen [14, 123], sowie epigenetische Modifikationen [110] wurden registriert.

Unter epigenetischen Modifikationen werden potenziell reversible Mechanismen verstanden, die die Aktivität von Genen modellieren, ohne dabei die Abfolge der DNA-Bausteine zu verändern. Hierzu gehören unter anderem DNA-Methylierungen, welche vergleichbar mit Methylgruppen (CH_3) als Vorhängeschlösser den Zugang von Abschreibe-Proteinen an die DNA-Sequenz versperren und so als Ablesehindernis den Genabschnitt inaktivieren. Ebenso beeinflussen Acetylierungen von Histonen, ob die DNA eng um diese spulenartigen Proteine gewickelt ist oder ob sie für das Abschreiben in RNA verfügbar bereitsteht; ein Anhängen einer Acetylgruppe ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}$) bewirkt das Öffnen der DNA-Spindel. Diese Effekte sind einerseits vollkommen physiologisch und ermöglichen durch ein An- und Abschalten bestimmter Gene ein Anpassen des Organismus an eine veränderte Umwelt [68]. Zum anderen bietet die Inaktivierung von beispielsweise Tumorsuppressorgenen die Möglichkeit zur Karzinogenese und so wurden vermehrt (Promotor-)Methylierungen und Chromatinmodifikationen in frühen Stadien der Brustkrebsentwicklung beobachtet [68, 119]. Auch in gesundem, dem Tumor angrenzenden Gewebe konnten frühe epigenetische Veränderungen festgestellt werden [119]. Das Flavanol Epigallocatechingallat (EGCG) ist ein nachgewiesener Inhibitor der DNA-Methyltransferasen (DNMT) und Histon-Deacetylasen (HDAC) und es wurde bereits in Studien gezeigt, dass oben beschriebene Effekte in MCF-7 und MDA-MB-231 in Form einer Downregulation u. a. des Enzyms hTERT (human telomerase reverse transcriptase) stattfinden [84, 119]. Das Flavonol Quercetin zeigte sich über die Histon-Acetylierung dazu in der Lage, die BRCA1-Expression in triple-negativen Brustkrebszellen (z. B. MDA-MB-231) zu erhöhen [65, 119].

Abseits von *in vitro*-Studien gelang anhand klinischer Untersuchungen bereits die Beobachtung, dass der Konsum von Flavonoiden das Brustkrebsrisiko senkt.

Eine Metaanalyse von zwölf epidemiologischen Studien aus europäischen Ländern sowie den USA, Mexiko und China konnte eine signifikante Risikoreduktion (RR 0,88 und RR 0,83) für Brustkrebs bei postmenopausalen Frauen unter erhöhter Aufnahme von Flavonolen (27,8 mg/Tag) und Flavonen (2,5 mg/Tag) feststellen. Dabei wurde das Risiko um je 12 % und 17 % gesenkt im Vergleich zu Frauen mit der in den Studien beobachteten geringsten Aufnahme von Flavonolen (9,8 mg/Tag) und Flavonen (0,13 mg/Tag) [48]. Eine weitere chinesische Studie sah den Effekt der Risikoreduktion unabhängig vom Menopausen- oder endokrinen Rezeptorstatus [119]. In asiatischen Studien war ein Konsum von 10 mg/Tag Soja-Isoflavonen mit einer um 9 % reduzierten Brustkrebsmortalität assoziiert, wobei dieser nicht-lineare Zusammenhang nur für estrogenrezeptornegative Frauen ersichtlich war [90]. Eine andere asiatische Metaanalyse beobachtete sogar ein um 30 % verringertes Brustkrebsrisiko bei hohem im Vergleich zu niedrigem Isoflavon-Konsum [141]. Festzustellen ist hier, dass mehrere Studien diese Zusammenhänge nur bei asiatischen Frauen, nicht jedoch bei denen westlicher Länder sehen; vermutet wird hierbei die Relevanz einer Langzeitexposition von Soja-Isoflavonen schon seit frühester Kindheit [19, 119, 141].

1.2.5 Verfügbarkeit

In unserer Nahrung liegen Flavonoide größtenteils in der glykosylierten Form vor, welche im Magen-Darm-Trakt durch verschiedene Enzyme des körpereigenen Mikrobioms über Hydrolyse zu Aglykonen reagieren [18, 61, 112]. Diese können dann aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften in die intestinalen Epithelzellen diffundieren, während weiterhin glykosyliert vorliegende Vertreter über Transporter wie den Natrium/Glucose-Cotransporter 1 (SGLT1) aufgenommen werden und intrazellulär der Zuckerrest abgespalten wird [61, 112]. Anschließend erfolgt die weitere metabolische Transformation durch Phase-I- und Phase-II-Reaktionen in der Leber, nach der die Mehrheit der Konjugate im Plasma als Glukoronide zirkulieren. Die hierbei involvierten Enzyme wie die Uridin-5'-diphospho-glucuronosyltransferase (UGT), Catechol-O-Methyltransferase (COMT) oder Sulphotransferase existieren im Menschen als zahlreiche genetische Isoformen, was neben anderen Aspekten eine interindividuelle Varianz der Verstoffwechslung annehmen lässt [18].

Die Exkretion der Flavonoide erfolgt vornehmlich über die Niere, wobei ein nicht unerheblicher Teil über die Galle in den Darminhalt ausgeschieden wird, welcher teilweise im Sinne des enterohepatischen Kreislaufs rezirkuliert. Über die Verteilung im Körper und die Aufnahme der Metabolite in Gewebe gibt es bisher kaum Erkenntnisse, allerdings zeigten *in vitro*-Studien, dass der Membrantransporter Bilitranslocase Flavonoide – nachgewiesen unter anderem für Quercetin – in endotheliale Gefäßzellen transportiert [18, 80, 147].

Darüber hinaus erhöht der gleichzeitige Verzehr von Fetten die Resorption, indem die Gallensalzsekretion stimuliert wird, welche wiederum die Aufnahme von Flavonoiden in Mizellen veranlasst [61, 112]. Proteine dagegen erniedrigen die Bioverfügbarkeit unter anderem durch die Bildung unverdaulicher Komplexe [61, 130].

1.3 Testsubstanzen

Auf der Suche nach erfolgversprechenden Pflanzen in der Natur, die als Vielstoffgemische möglicherweise potenter antikanzerogen wirken als bereits erforschte Einzelstoffe, geriet das Augenmerk auf *Moringa oleifera*. Um die Wirkung anhand estrogenrezeptorpositiver (MCF-7) und estrogenrezeptornegativer (MDA-MB-231) Mammakarzinomzellen zu untersuchen und einschätzen zu können, wurden daher ebenso drei Einzelbestandteile als Referenzsubstanzen getestet.

1.3.1 *Moringa oleifera*

Moringa oleifera, in Deutschland auch bekannt unter dem Namen Meerrettichbaum, gehört zur Pflanzenordnung der Kreuzblütler (lat. Brassicales) in der Familie der Benusgewächse (lat. Moringaceae). Er ist ein schnellwüchsiger, kleiner bis mittelgroßer Baum (bis ca. 10 m) mit weißen duftenden Blüten, der im März und April spargelähnliche Früchte trägt, sog. „drumsticks“ [118, 132]. Genügsam wächst er auf sandigem Boden auch in harschem Klima und ist kostengünstig und unkompliziert in Anpflanzung und Pflege [132].

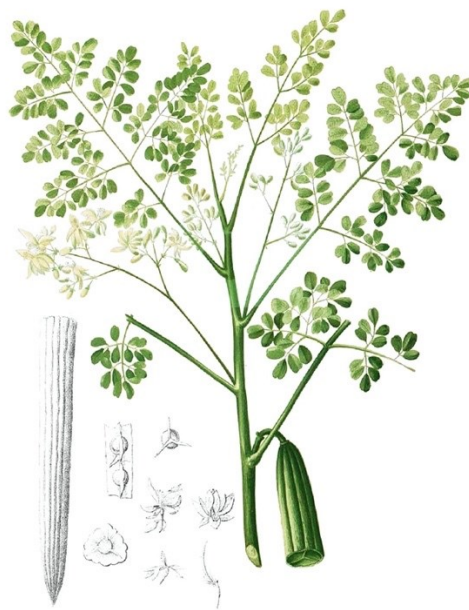


Abbildung 3: Botanische Zeichnung eines Astes des *Moringa oleifera*-Baumes von Blanco 1880 [11]. Sein Ursprung liegt im Subhimalaya-Gebiet und in der ayurvedischen Heilkunst wurde er schon vor über 5000 Jahren eingesetzt [37, 72]. Während der Kolonialzeit wurde er in Indien entdeckt und in andere britischen Kolonien verbreitet, andere Moringaspezies sind in vielen Ländern Afrikas indigen [37, 78]. Alle Bestandteile der auch als Wunderbaum beschriebenen Pflanze werden traditionell vom Menschen genutzt: vom Verzehr der Blätter und Früchte über

die Nutzung von Rinde, Samen und Wurzeln als Färbe-, Gerb- oder Düngemittel sowie der Herstellung von Biodiesel bis hin zur Wasseraufbereitung und Herstellung von Pflegeprodukten [72, 78, 93]. Der Verzehr der Blätter ist frisch, gekocht oder getrocknet möglich; in Pulverform können sie monatelang ohne Verlust von Inhaltsstoffen gelagert werden [93]. In der traditionellen Medizin werden die Blätter zur Behandlung vieler Leiden wie unter anderem Unterernährung, Hauterkrankungen, Malaria und andere parasitäre Erkrankungen, Bluthochdruck und Diabetes eingesetzt; außerdem werden sie zur Laktationsförderung bei Müttern sowie Immunsystemstärkung bei AIDS-Kranken herangezogen [72, 132].

Neben den langjährigen gebräuchlichen Anwendungen konnten inzwischen auch zahlreiche wissenschaftliche Studien den Reichtum der Blätter an bioaktiven Komponenten sowie die medizinische Wirksamkeit in vielen Bereichen belegen:

Es besteht eine Fülle an Proteinen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren und Mineralien wie Kalium, Calcium, Phosphor und Eisen, was Moringa als Nahrungsergänzungs- und -aufbaumittel interessant macht [93, 132]. Auch finden sich etliche Stoffe aus den Gruppen der Vitamine, Carotinoide, Polyphenole (Phenolsäuren und Flavonoide), Alkaloide, Glucosinolate, Isothiocyanate, Tannine, Saponine sowie Oxalate und Phytate in der Moringa-Pflanze. Dabei enthalten die Blätter mehr Vitamin A als Möhren, mehr Vitamin C als Orangen und mehr Vitamin E als Nüsse; auch Thiamin, Riboflavin, Niacin und Folsäure sind nachgewiesen [72, 93]. Der Flavonoidgehalt entspricht dem Gehalt in Früchten und Gemüsen oder übersteigt ihn, insbesondere Quercetin, Rutin, Kämpferol, Myricetin machen einen großen Anteil aus. Außerdem wurden Isorhamnetin, Apigenin, Daidzein und Genistein detektiert, allerdings noch nicht quantifiziert [72].

Hinsichtlich der pharmakologischen Eigenschaften wurden einige *in vitro*-Studien durchgeführt, aus denen unter anderem antipyretische, antiinflammatorische, analgetische, antimikrobielle, antioxidative und antitumorale Qualitäten hervorgingen [72, 93].

Antikarzinogene Fähigkeiten von alkoholischen und wasserbasierten Extrakten der Blätter zeigten sich bei unterschiedlichen Tumortypen, beispielsweise als Wachstumsinhibierung durch Apoptoseinduktion und DNA-Schädigung in menschlichen Epithelzellen des Zervixkarzinoms [72, 126]. Bei behandelten Lungenkarzinomzellen konnte ein Anstieg des Tumorsuppressorproteins p53 sowie der Caspaseaktivität beobachtet werden [72, 133]. Auch bei hepatozellulären und kolorektalen Karzinomzellen sowie estrogenrezeptorpositiven und -negativen Karzinomzellen der Brust (MCF-7 und MDA-MB-231) wurden zytotoxische Effekte

sowie eine Tumorreduktion beobachtet [2, 72]. Hierbei erfolgte auch die Testung gesunder Zellen, bei denen keine oder nur geringere toxische Veränderungen zu verzeichnen waren, woraus sich die Hoffnung auf das große Potenzial von Moringablättern für die antitumorale Therapie ergibt [54, 72]. Dieser Erkenntnis wurde im Rahmen eines in dieser Art einzigartigen Xenograft Mausmodells mit Insertation von MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen näher nachgegangen, wobei letztlich ein oral verabreichtes Extraktgemisch aus Blättern und Samen (1:9) von *Moringa oleifera* sich zwar zytotoxisch und tumorreduktiv zeigte, jedoch auch *in vitro* zytotoxisch auf benigne Mammazellen wirkte. Im Vergleich zum reinen Blattextrakt war im Samenextrakt hier der Anteil an Flavonoiden wesentlich geringer und im Gegenzug reich an Glucosinolaten und Saponinen [75]. Zur Wirkung auf Tumorzellen von reinen Moringablattextrakten – oral oder subkutan verabreicht – im Rahmen eines Xenograftmodells lassen sich bis dato keine Studien finden.

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit wurden mittels High Performance Liquid Chromatography (Kapitel 2.2) die Bestandteile Folsäure, Quercetin und Rutin im angefertigten Moringablattextrakt nachgewiesen und in den Zellversuchen zusätzlich in isolierter Form getestet.

1.3.2 Folsäure

Die Folsäure gehört zur Gruppe der B-Vitamine und ist ein wasserlösliches Vitamin, welches nur von Mikroorganismen oder Pflanzen synthetisiert werden kann. Wie die Namensherkunft „folium“ – lat. Blatt – vermuten lässt, ist sie insbesondere in Blattgemüse wie Spinat und Salat stark vertreten [107]. Untersuchungen zeigten, dass Folsäure in Form seiner in *Moringa oleifera* hauptsächlich auftretenden Derivate 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure und 5-Formyl-5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure mit 223,9-502,1 µg/100 g Trockengewicht der Blätter so umfangreich in *Moringa oleifera* enthalten ist, dass es selbst den Gehalt in Spinat von 145 µg/100 g Trockengewicht übersteigt [93, 114, 135]. Die aktive Form Tetrahydrofolsäure spielt in seiner Funktion als C1-Gruppen-Überträger als Coenzym in zahlreichen Reaktionen des menschlichen Stoffwechsels eine entscheidende Rolle [107]. Zum Beispiel senkt eine zusätzliche Substitution von 400 µg/Tag Folat in der Schwangerschaft die Inzidenz von Neuralrohrdefekten des Kindes um die Hälfte [36].

In der Zusammenschau mehrerer, teils widersprüchlicher Studien zum Einfluss auf das Krebsrisiko konnte differenziert werden, dass ein niedriger oder mangelhafter Folsäurespiegel mit

einem erhöhten Risiko für verschiedenste Tumorentitäten assoziiert ist. Für Brustkrebs ist das Risiko insbesondere dann erhöht, wenn zusätzlich viel Alkohol konsumiert wird [98]. Ein über die Norm erhöhter Serumspiegel durch Supplementation ist allerdings mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten eines Prostatakarzinom vergesellschaftet [36, 98]. Da Folsäure wie oben beschrieben in *Moringa oleifera* stark vertreten ist, wird ein möglicher proliferationsfördernder Effekt durch eine isolierte Testung untersucht.

1.3.3 Quercetin

Der Name Quercetin leitet sich vom lateinischen Wort „quercus“ ab, welches Eiche bedeutet [25]. Es zählt unter den Flavonoiden zur Untergruppe der Flavonole und ist in zahlreichen natürlichen Nahrungsmitteln anzutreffen: während etwa die rote Zwiebel je 100 g 39,21 mg Quercetin enthält, sind in gefriergetrockneten Moringablättern je 100 g je nach Studie mit 547-1664 mg Quercetin ein Vielfaches dessen dokumentiert worden [25, 72].

Quercetin ist in etlichen Forschungsarbeiten als starkes Antioxidans beschrieben, was sich nicht nur in seiner Fähigkeit, selbst freie Radikale zu fangen, zeigt, sondern darüber hinaus auch darin, dass es den Spiegel des körpereigenen Antioxidans Glutathion erhöht [4, 25, 125]. Oxidativer Stress ist mit entzündlichen Reaktionen und chronischen Erkrankungen wie Diabetes, der Koronaren Herzkrankheit sowie dem Schlaganfall assoziiert, sodass Quercetin hier protektiv ansetzt [25, 44]. Auch über andere komplexe Signalmechanismen wurden sowohl die letztgenannten Krankheitsgruppen positiv beeinflusst als auch weitere wie Allergien (über die Inhibierung von Mastzellen), entzündliche Prozesse (u. a. über die Hemmung der Cyclooxygenase und Lipoxygenase), endotheliale Umbauten sowie Immunität und Infektionen (antivirale und antibakterielle Wirkungen) [25, 58, 67, 121, 122]. Überdies gibt es Belege für antikarzinogene Wirkungen auf zahlreiche unterschiedliche Tumorentitäten: dazu gehören Karzinome des Kolon, des Pankreas, der Leber, der Lunge, der Prostata, der Blase, des Magens, der Knochen, des Blutes, des Gehirns, der Haut, der Schilddrüse, des Zervix und der Ovarien [108]. Hervorzuheben ist hier auch die proapoptotische Aktivität auf Brustkrebszellen. In MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen wird auf unterschiedlichen Wegen ein Zellzyklusarrest mit Reduktion des Tumolvolumen sowie der Metastasen erreicht: beispielsweise durch die Herunterregulation der Expression des EGF-Rezeptors (epidermal growth factor) und des P-Glycoprotein sowie die Aktivierung von Caspasen [79, 120, 127, 131]. Zudem wurde eine

erhöhte Chemosensitivität von Brustkrebszellen bei der gleichzeitigen Gabe von Doxorubicin beobachtet [74, 79, 108].

Trotz der Fülle an *in vitro*- und *in vivo*-Studien sind längst nicht alle Signalwege im Detail verstanden und es kann noch keine Empfehlung bezüglich einer idealen Verzehrmenge von Quercetin oder seinen Metaboliten ausgesprochen werden [25]. Insbesondere liegt weiterer Forschungsbedarf in der genauen Beobachtung von Arzneimittelinteraktionen, da Quercetin in *in vivo*-Studien eine Inhibition von CYP3A4, CYP1A2 und dem P-Glycoprotein sowie eine Induktion von CYP2A6 gezeigt hat [20, 21, 25].

1.3.4 Rutin

Die Bezeichnung Rutin lässt sich auf die ursprünglich untersuchte Pflanze – die Weinraute *Ruta graveolens* – zurückführen, die reichhaltig an Rutin ist [33]. Unter den Flavonoiden gehört Rutin zur Gruppe der Flavonole und ist in vielen Nutzpflanzen wie Buchweizen, Tomaten oder Tee zu finden [46]. Die Konzentrationen variieren und insbesondere nach UV-B-Exposition sind sie erhöht, da die Pflanze sich hierdurch vor Strahlung schützen kann [62, 91]. In *Moringa oleifera* zeigten sich pro Gramm gefriergetrockneter Blätter 1,674 mg Rutin [72]. Rutin ist auch unter dem Namen Quercetin-3-O-rutinosid (/rhamnoglucosid) bekannt und besteht als Glukosid aus Quercetin und einem Disaccharid (genauer: Rhamnose und Glucose) [46, 77]. So ist Quercetin ein oraler Metabolit von Rutin und kann schneller im Dünndarm resorbiert werden, da bei Rutin zunächst Bakterien mit Rhamnosidase-Aktivität den hydrophilen Zuckerrest abspalten müssen [46].

Rutin hat in zahlreichen Studien verschiedenste protektive Effekte offenbart. Neben der Fähigkeit den LDL-Spiegel zu senken und die Insulinsensibilität zu erhöhen und damit Diabetes mellitus sowie kardiovaskuläre Erkrankungen positiv zu beeinflussen, wurden außerdem neuro-, hepato- und nephroprotektive Aktivitäten beobachtet [29, 46, 91]. Beispielsweise können Entzündungsreaktionen und toxische Wirkungen (u. a. die Nephrotoxizität von Cisplatin und Vancomycin) abgemildert und oxidativer Stress reduziert werden [91, 102, 105]. Letztere Effekte zusammen mit Zellzyklusarrest- und Apoptoseinduktion, Modifikation der Angiogenese sowie Zellwachstumshemmung tragen maßgeblich zur Bekämpfung verschiedener Krebserkrankungen bei [91]. In ER-positiven Brustkrebszellen (MCF-7) zeigte sich eine Hochregulierung des Tumorsuppressorgens p53 sowie eine synergistische Wirkverstärkung mit Tamoxifen [1]. Hervorzuheben ist, dass insbesondere bei triple-negativen Mamma-

karzinomzellen (MDA-MB-231), die sonst wenig Ansatz für gezielte Therapien bieten, eine Tumorreduktion bei Mäusen im Rahmen eines orthotopischen Xenograftmodells festzustellen war [31, 91]. Sowohl in Zellen vom Typ MCF-7 als auch vom Typ MDA-MB-231 wurde nicht nur eine verminderte Resistenzentwicklung gegen Chemotherapeutika, sondern auch eine gesteigerte Chemosensitivität für Cyclophosphamid und Methotrexat registriert [26, 50, 91]. Insgesamt verfügt Rutin über großes Potenzial, sich in weiteren Studien als vielversprechender Kombinationspartner mit bereits etablierten Zytostatika zu präsentieren.

1.3.5 Kontrollen

Im Rahmen der Tests von Moringablattextrakt und Referenzsubstanzen wurden simultan stets Kontrolluntersuchungen angestellt. So sollten Tamoxifen und der aktive Metabolit Endoxifen als bereits etablierte Medikamente der Mammakarzinomtherapie ein Absterben der Zellen zeigen und als Negativkontrolle dienen. Estradiol als proliferationsfördernde Substanz repräsentiert die Positivkontrolle.

Außerdem wurden die Lösungsmittel der Testsubstanzen in Befürchtung möglicher eigener Wirkungen und somit Störeinflüsse parallel untersucht.

1.4 Zielstellung

Das Mammakarzinom ist der häufigste maligne Tumor der Frau in den westlichen Ländern. Zum einen ist die bereits etablierte Therapie insbesondere in der Langzeittherapie nebenwirkungsreich, bringt daher keine große Compliance mit sich und Patientinnen suchen zunehmend nach komplementärer Therapieergänzung. Zum anderen werden zunehmend Resistenzentwicklungen gegen existierende Pharmaka beobachtet und es besteht der Bedarf neuartiger therapeutischer Substanzen.

Phytoestrogene bieten sowohl in ihrer Funktion als Ligand für den ER-beta als auch über andere Wirkmechanismen Ansatzmöglichkeiten für eine antiproliferative Wirkung auf Tumorzellen. Als subkutane Applikation hat sich ein Extrakt aus Misteln bereits effektiv in der komplementären Behandlung von Brustkrebspatientinnen erwiesen.

Moringa oleifera ist mit seinem Reichtum an bioaktiven Bestandteilen in zahlreichen Studien zu einem Hoffnungsträger in der antitumoralen Therapie geworden. Als Vielstoffgemisch vermag die Pflanze wirkungsvoller zu sein, als seine einzelnen Bestandteile, zu denen die Flavonoide Quercetin und Rutin zählen.

Für diese Forschungsarbeit wurden die Zellreihen MCF-7 vom luminalen und MDA-MB-231 vom basalen Mammakarzinom-Subtyp ausgewählt, um jeweils eine estrogenrezeptorpositive und eine -negative Zellreihe zu untersuchen. Als Testsubstanzen werden zum einen der Moringablattextrakt in mehreren Verdünnungsgraden angesetzt, zum anderen kommen die mittels HPLC im Moringablattextrakt nachgewiesenen Referenzsubstanzen Folsäure, Quercetin und Rutin als synthetisch hergestellte Reinsubstanzen zum Einsatz. Als Positiv- und Negativkontrollen werden Estradiol und Tamoxifen sowie dessen aktivierte Form Endoxifen verwendet. Auch die jeweiligen Lösungsmittel werden stets zeitgleich geprüft, um etwaige Störeinflüsse zu detektieren.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Frage zu beantworten, inwiefern diese Stoffe die Proliferation und Viabilität beider Mammakarzinomzelllinien beeinflussen. Dies geschieht anhand verschiedener Marker mittels ausgewählter Zelltests. Somit sollen die Ergebnisse als Grundlage dienen und langfristig einen Ansatzpunkt für weitere klinische Forschungen bieten, um *Moringa oleifera* als potenzielles Arzneimittel auf den Prüfstand zu stellen.

2. Material und Methoden

2.1 Herstellung der Testsubstanzen

2.1.1 Extrakterstellung

Als Grundlage für die Herstellung des Moringablattextraktes wurde Bio-Moringablattpulver erworben. Der Anbau auf biologischen Grundlagen sollte die Gefahren eines Einflusses von Pestiziden möglichst gering halten. Es wurden zwei Extrakte auf Ethanolbasis in zwei unterschiedlichen Anfangskonzentrationen, sowie ein Extrakt jeweils auf Methanol- und Wasserbasis angefertigt. Derjenige Ansatz, der sich in der HPLC-Untersuchung mit den am deutlichsten abgrenzbaren Peaks zeigte, wurde dann in der weiteren Arbeit auf seine *in vitro*-Wirkung untersucht.



Abbildung 4: Pulver aus Blättern des Moringa oleifera-Baumes.

Für die Herstellung des höher konzentrierten Ethanolextraktes wurde zunächst 2 g des grünen Moringablattpulvers abgewogen und mit 20 ml 70 %-igem Ethanol vermengt. Nach Zugabe eines Magnetrührstäbchens und einer Abdeckung durch einen Silikondeckel wurde das Gemisch mithilfe der Mikrowelle 30 min lang bei 40 °C und bei maximaler Leistung von 80 W erwärmt. Nach Abpipettieren des flüssigen Überstandes in ein 50 ml Tube konnten mit der Zentrifuge (4030 rpm für 15 min; ohne Bremse) weitere feste Bestandteile zum Absinken gebracht werden. Die erneut entstandene flüssige Phase wurde in 1,5 ml Tubes aufgeteilt und zentrifugiert (13000 rpm für 5 min). Nun konnte die Flüssigkeit ohne sichtbare, feste Bestandteile unter dem sterilen Abzug mit dem Filter Minisart-Plus mit einer Porengröße von 0,45 µm gefiltert werden. Die Einengung – also der Entzug der Lösungsmittel und damit Aufkonzentration – erfolgte mittels Zentrifugal-Konzentrator bei 45 °C auf 1 ml Extrakt. Dieser entspricht

dem in den nachfolgenden Versuchen verwendeten, fertigen Extrakt. Der gesamte Herstellungsvorgang wurde 2-mal identisch durchgeführt, um ausreichend Extrakt (2 ml) für die nachfolgenden Tests zu haben.

Die anderen Extrakte unterschieden sich in Lösungsmittel, anfänglicher Pulvermenge und Mikrowelleneinstellungen, ansonsten geschah die Herstellung analog zum oben Beschriebenen.

2.1.2 Herstellung der Referenzsubstanzen und Kontrollen

Die Konzentrationen und Lösungsmittel der nachfolgenden Ansätze ergaben sich aus labor-internen Standards bzw. unterscheiden sich bewusst zu früheren Forschungsarbeiten, bei denen keine signifikante zellabtötende Wirkung nachgewiesen werden konnte. Die Testsubstanzen machten bei den Zelltests stets 1 % des gesamten Well-Inhaltes aus.

Die synthetisch hergestellten Reinstoffe (s. u.) wurden in Pulverform abgewogen und in 1,5 ml Tubes im jeweiligen Lösungsmittel durch Vortexen gelöst. Für Folsäure erfolgte zusätzlich ein fraktioniertes 30-minütiges Ultraschall-Bad zur vollständigen Auflösung.

So ergaben sich folgende Zusammensetzungen:

Referenzsubstanzen:

Folsäure 1 µg/µl	in Ethanol 99 %
Quercetin 0,15 µg/ml	in Ethanol 99 %/DMSO
Rutin 3,05 µg/µl	in Ethanol 99 %/DMSO
Kämpferol 1,43 µg/µl	in Ethanol 99 %/DMSO
Isorhamnetin 1,58 µg/µl	in DMSO
Daidzein 1,27 µg/µl	in Ethanol 99 %/DMSO
Genistein 1,35 µg/µl	in Ethanol 99 %/DMSO

Positivkontrolle:

Estradiol 0,027 µg/ml in Ethanol 99 %

Negativkontrollen:

Tamoxifen 5,6 µg/µl in Ethanol 99 %

Endoxifen 6,2 µg/µl in Ethanol 99 %

Außerdem wurden die Lösungsmittel einzeln und ohne Zusätze in 1,5 ml Tubes für die gleichzeitige Testung bei den Zelltests abgefüllt, wodurch ein proliferationshemmender Einfluss in der angewandten Menge 10^{-2} (1 µl zugegebene Testsubstanz bei 100 µl Zellsuspension im Well) ausgeschlossen werden sollte.

2.2 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Vor Beginn der Zelltests sollten chromatographische Untersuchungen des Moringablattextraktes dazu dienen, einen qualitativen Nachweis von in der Literatur beschriebenen Bestandteilen zu erbringen. Diese Einzelstoffe sollten dann als synthetisch hergestellte Referenzsubstanzen ebenfalls mittels Zelltests auf ihren Einfluss hin untersucht werden. Neben dem B-Vitamin Folsäure standen die Flavonoide Quercetin, Rutin, Kämpferol, Isorhamnetin, Daidzein und Genistein zur Prüfung [57, 72].

Prinzip

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gehört zu den analytischen Trennverfahren und ermöglicht eine Differenzierung flüssiger Stoffgemische anhand der unterschiedlichen Wechselwirkungen mit einer mobilen und einer stationären Phase. Die HPLC unterscheidet sich dabei von anderen Chromatographien insofern, als dass sie dank spezieller Säulenfülltechniken unter Hochdruck mittels pulsationsarmer Pumpen sowie einer stabilen Kieselgelsäule mit engem Durchmesser ein sauberes Trennen kleinster Substanzmengen im Nanogramm- und Picogramm-Bereich innerhalb von Minuten erzielt. Die Testsubstanzen weisen unterschiedliche Bindungsvermögen zu den Oberflächengruppen der stationären Phase sowie Affinitäten zur polaren mobilen Phase auf, sodass stationär vermehrt interagierende apolare Teile retardierter die Trennsäule verlassen (Abbildung 5) [38]. Es entsteht ein chronologisches Muster, welches im Abgleich mit unter identischen Bedingungen ebenfalls untersuchten Einzelstoffen bezüglich der Retentionszeiten Rückschlüsse auf enthaltene Inhaltsstoffe zulässt [38, 85].

Im Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik Rostock wurde in vorausgehenden Dissertationen die Umkehrphasen-HPLC etabliert. Dabei besteht die stationäre Phase aus einer C18-Kieselgelsäule und die mobile Phase aus zwei polaren Flüssigkeiten (Aqua dest./10 % Methanol und DMSO/10 % Aqua dest.), die sich fließend abwechseln, was eine Differenzierung von Stoffen mit geringen Polaritätsunterschieden ermöglichen sollte. Das starke organische Lösungsmittel DMSO verdrängt auch fest an der Säule adhärenente Moleküle [38].

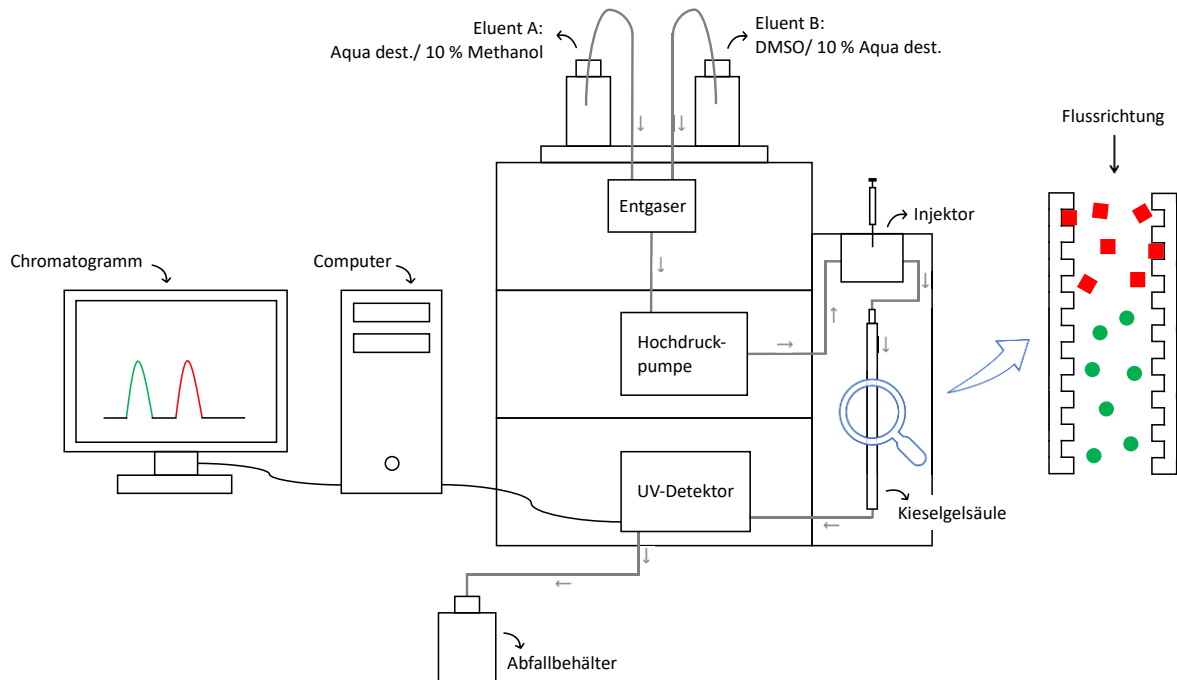


Abbildung 5: Schematischer Aufbau der HPLC in Anlehnung an Meyer 2010 [85].

Substanzen mit einer höheren Affinität zur mobilen Phase, die weniger mit der stationären Phase interagieren (symbolisiert durch grüne Kreise), verlassen die Säule schneller als jene Stoffe mit einer höheren Affinität zur stationären Phase (symbolisiert durch rote Vierecke). Letztere interagieren stärker mit der C18-Kieselgelsäule und benötigen daher mehr Zeit bis sie beim UV-Detektor ankommen. Daraus resultiert ein später auftretender Peak im Chromatogramm [38, 85].

Durchführung

Als erstes wird das Schlauchsystem, über welches die Hochdruckpumpe die Eluenten (Flüssigkeiten der mobilen Phase) ansaugt, mithilfe der Purge-Funktion von Gasblasen befreit. Dann erfolgt ein Leerlauf ohne einen zu analysierenden Stoff, um die Reinheit der Apparatur zu überprüfen und einen Ausgangswert zu generieren.

Für die Probenanalyse werden 20 µl über den Injektor zum Eluenten gegeben.

Mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min fließt die Flüssigkeit von der Mischkammer durch Metallkapillaren zu einer Vorsäule, die gröbere Partikel abfängt. Anschließend fließt das Gemisch weiter zur C18-Säule, wo die oben beschriebene Interaktion erfolgt. Der nachgeschaltete UV-Detektor misst unter niedrigem Druck die Extinktion bei einer Wellenlänge von 254 nm und leitet die Signale an einen Computer weiter. Zuletzt wird die Flüssigkeit in einen Abfallbehälter abgeleitet. Sämtliche Probendurchgänge werden 2- bis 3-mal wiederholt, um mögliche Unterschiede in den Graphen zu entdecken.

2.3 Verwendete Zelllinien und Zellkultivierung

2.3.1 Estrogenrezeptorpositive Zelllinie MCF-7

Als erste Zelllinie wurde die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 verwendet. Dabei handelt es sich histologisch um Zellen eines von einer kaukasischen Frau stammenden Adenokarzinoms vom Luminal A-Subtyp [5]. Diese ER-positiven Karzinomzellen exprimieren die ER-alpha und -beta sowie den Progesteronrezeptor [5, 128].

Im Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik Rostock waren die Zellen bei -188 °C im Stickstoff-Kühlbehälter eingefroren.

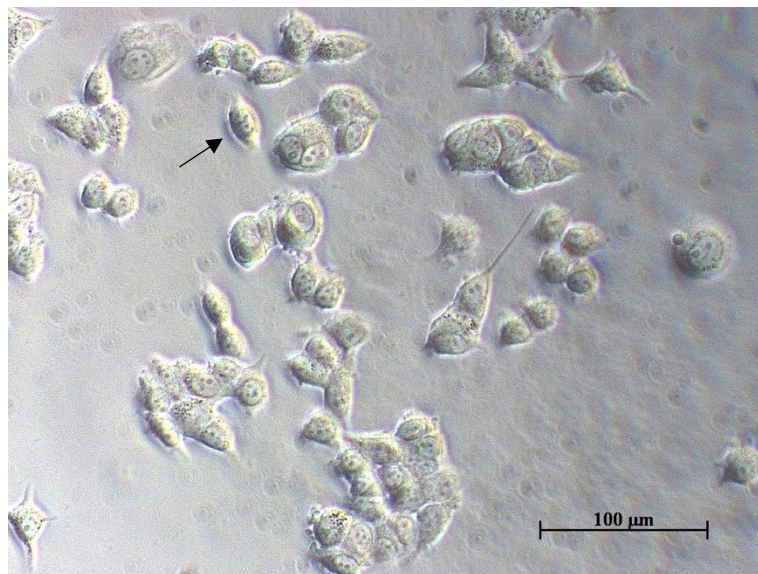


Abbildung 6: Lichtmikroskopische Fotografie von ausgesäten MCF-7-Zellen. 20-fache Vergrößerung. Der Pfeil markiert beispielhaft eine Zelle.

Für den Auftauvorgang wurden sie erst für einige Minuten in Crushed Ice überführt und dann im Wasserbad auf Zimmertemperatur gebracht. Die Trennung vom Einfriermedium (aus DMEM und DMSO) gelang nach Zugabe von 10 ml DMEM (+ 10 % FKS) in einem Tube und kurzem Vortexen durch die Zentrifuge (1200 rpm für 6 min; ohne Bremse). Nach Austausch der Flüssigkeit mit 6 ml DMEM (+ 10 % FKS) konnte das Zellpellet durch erneutes Vortexen aufgelöst und die vereinzelt Zellen in der 25 cm²-Zellkulturflasche mit Bakterienfilter ausgesät werden.

Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37 °C, einer Begasung von 5 % CO₂ und einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurde ausschließlich unter sterilen Kautelen unter der Laborabzugshaube gearbeitet. Alle zwei bis drei

Tage wurde das Medium gewechselt und die Zellen in eine neue Flasche überführt (5 ml bei 25 cm²-Zellkulturflasche, 10 ml bei 75 cm²-Zellkulturflasche, 15 ml bei 175 cm²-Zellkulturflasche), sobald eine 70-80 %-ige Konfluenz unter dem Mikroskop zu beobachten war.

So gelang innerhalb von zehn Tagen die Anzucht ausreichend vieler Zellen für eine große 175 cm²-Zellkulturflasche, die als Grundlage für das Aussäen der Testpopulationen dienten und mittels nachfolgendem Schema bei konstanter Menge gehalten wurden.

Beim Passagieren wurden nach Absaugen des verbrauchten Mediums zunächst 7,5 ml PBS zugegeben, um das im Kulturmedium vorhandene FKS von den Zellen abzuspülen. Dies sollte gewährleisten, dass das nachfolgend hinzugefügte Trypsin effektiver wirken kann. Mit der Protease Trypsin, zuvor im Verhältnis 1:10 mit PBS verdünnt, konnte die Zelladhärenz am Boden der Zellkulturflasche bei einer kurzen Inkubationszeit von maximal 5 min aufgelöst werden. Anschließend wurde die Reaktion mit der 1,5-fachen Menge an DMEM (+ 10 % FKS) gestoppt und die Zellen in der Zentrifuge (bei 1000 rpm für 5 min; ohne Bremse) zum Absinken gebracht. Darauf folgte die Resuspension des Zellpellets mit frischen 10 ml DMEM (+ 10 % FKS) mittels Vortex und die Aussaat von etwa einem Drittel der Suspension zur weiteren Proliferation. Die Zellen für die Tests im Rahmen dieser Studie wurden nach Zellzählung ebenfalls ausgesät.

2.3.2 Estrogenrezeptornegative Zelllinie MDA-MB-231

Als zweite Zelllinie wurde die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 verwendet. Dabei handelt es sich histologisch um Zellen einer Pleurametastase eines Adenokarzinoms vom basalen Subtyp einer kaukasischen Frau [6]. Im Gegensatz zur Zelllinie MCF-7 exprimiert diese ER-alpha und -beta, sowie den Progesteronrezeptor nicht [6, 128].

Auch diese Zellen waren im Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik Rostock bei -188 °C im Stickstoff-Kühlbehälter eingefroren.



Abbildung 7: Lichtmikroskopische Fotografie von ausgesäten MDA-MB-231-Zellen. 20-fache Vergrößerung. Der Pfeil markiert beispielhaft eine Zelle.

Zum schonenden Auftauen erfolgte zunächst die Überführung für einige Minuten in Crushed Ice und anschließend die allmähliche Temperaturerhöhung im Wasserbad. Um das DMSO aus dem Einfriermedium auszuwaschen, gelang nach Überführung der Suspension in ein Tube mit 10 ml DMEM (+ 10 % FKS) und anschließendem Vortexen sowie Zentrifugation (bei 1200 rpm für 6 min; ohne Bremse) das Absetzen eines Zellpellets. Nun konnte nach Dekantieren des flüssigen Überstandes und Zugabe von 6 ml DMEM (+ 10 % FKS) sowie erneutem Vortexen die fertige Suspension mit vereinzelt Zellen zum Aussäen in die 25 cm²-Zellkulturflasche mit Bakterienfilter hergestellt werden.

Die Heranzüchtung im Brutschrank und das sterile Hantieren erfolgten analog zur vorherigen Zellreihe mit folgenden Abweichungen: Sobald beim Wechseln des Mediums eine 70-80 %-ige Konfluenz der Zellen festzustellen war, konnte passagiert werden. So gelang innerhalb von fünf Tagen die Anzucht ausreichender Zellen für eine große 175 cm²-Zellkulturflasche, die als

Grundlage für das Aussäen der Testpopulationen dienten und mittels im Folgenden beschriebenen Schema bei konstanter Menge gehalten wurden.

Zum Passagieren wurden nach Absaugen des alten Mediums als erstes 7,5 ml PBS hinzugegeben, um den FKS-Anteil des Mediums von den Zellen zu spülen. Dadurch sollte das anschließend zugefügte Trypsin effektiver wirken. Letzteres wurde zuvor mit PBS im Verhältnis 1:10 verdünnt und konnte dann die Zellen bei einer Einwirkzeit von 2-3 min von dem Boden der Zellkulturflasche lösen. Daraufhin wurde die Reaktion mit der 1,5-fachen Menge an DMEM (+ 10 % FKS) gestoppt und die Zellen in einem Tube in der Zentrifuge (bei 1000 rpm für 5 min; ohne Bremse) zum Zellpellet geformt. Nach Entfernung des flüssigen Überstandes und Resuspension mit 10 ml DMEM (+ 10 % FKS) wurden die Zellen mittels Vortex gleichmäßig in der Suspension verteilt. Anschließend erfolgte die Aussaat von etwa einem Drittel der Zellen in eine neue Zellkulturflasche. Für die Zelltests wurden die Zellen nach Zellzählung in die 96-Wellplatte ausgesät (Kapitel 2.4.2).

2.4 Vorbereitung der Zelltests

2.4.1 Bestimmung der Lebendzellzahl

Bei allen Zelltests kam eine transparente 96-Well-Zellkultur-Testplatte zum Einsatz. Um für jedes Well gleiche Testbedingungen zu schaffen, musste für eine möglichst gleiche Anzahl lebender Zellen in den Wells gesorgt werden. Vorangegangene Untersuchungen im Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik Rostock haben für jeden Zelltest eine optimale Zellzahl pro Well ergeben, die von 300.000 bis 500.000 Zellen/ml pro Well reichte.

Für die Zellzählung wird zunächst eine 1:1:20-Zellverdünnung aus der Ausgangs-Zellsuspension mit Trypanblau angesetzt: 360 μ l DMEM + 20 μ l Zellsuspension + 20 μ l Trypanblau. Der Farbstoff Trypanblau dient zur Detektion abgestorbener Zellen. Dies geschieht auf der Grundlage, dass Trypanblau ein saurer Farbstoff ist, der als Anion sehr leicht eine Bindung zu Proteinen aufbauen kann [76]. Aufgrund der Membrandurchlässigkeit toter Zellen kann der Azofarbstoff ins Cytoplasma diffundieren und färbt diese unter dem Mikroskop sichtbar blau an, während intakte lebende Zellen keinen Farbstoff aufnehmen und somit hell erscheinen [117].

10 μ l dieses Gemisches werden möglichst luftblasenfrei auf die zuvor gereinigte und mit Deckglas versehene Bürker-Zählkammer aufgebracht. Eine Bürker-Zählkammer besitzt zwei Zählnetze (Abbildung 8), in denen eine Auszählung der vitalen Zellen in je 25 Quadraten

erfolgt. Welche Quadrate hierfür ausgewählt werden, kann zu Beginn selbst definiert werden, sollte aber bei jeder nachfolgenden Zellzählung identisch sein. Die Gesamtzellzahl lässt sich dann wie folgt berechnen:

$$\text{Zellen/ml} = \text{Zellzahl} \times 10 \times 10^4$$

Dabei werden die gezählten Zellen der 2×25 Quadrate, der Verdünnungsfaktor 10 sowie der Volumenfaktor 10^4 eingesetzt.

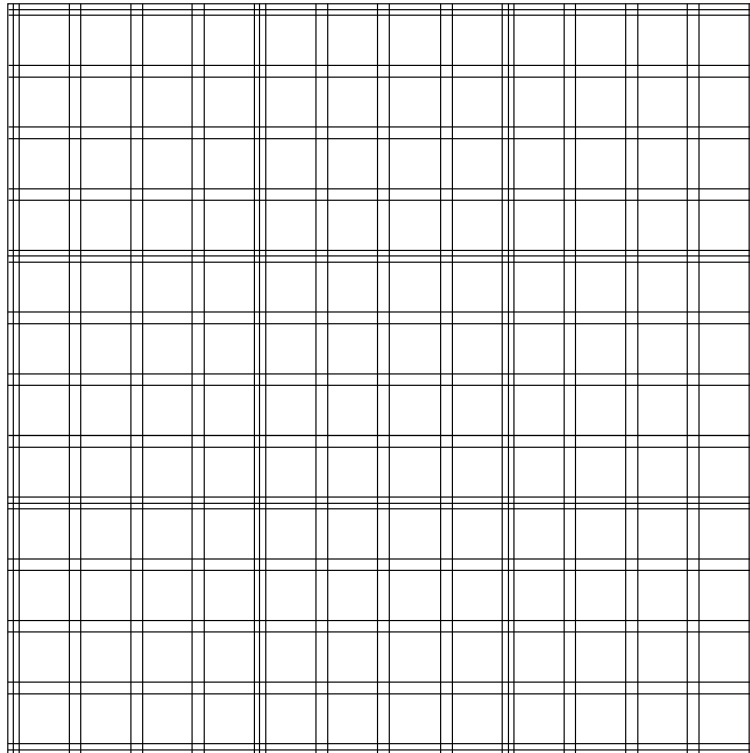


Abbildung 8: Zählnetz einer Bürker-Zählkammer unter mikroskopischer Sicht in Anlehnung an Paul Marienfeld 2021 [96].

Da Trypanblau bei zu langer Einwirkzeit zytotoxisch wirkt, wurden die lebenden Zellen innerhalb von fünf Minuten gezählt [117]. Die ermittelte Gesamtzahl zugrunde nehmend wurde die Ausgangs-Zellsuspension so mit Medium verdünnt, dass nach der Aussaat die festgelegte Endkonzentration an Zellen pro Well (Zielvolumen $100 \mu\text{l}$ pro Well) vorlag.

2.4.2 Präparation der Wellplatten

Die Durchführung eines jeden Zelltests umfasste drei Tage. Am ersten Tag wurden die Zellen nach der Zellzählung in die Wellplatten ausgesät und 24 Stunden im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂, wasserdampfgesättigte Atmosphäre) inkubiert. Nach morphologischer Kontrolle der Zellen unter dem Mikroskop am zweiten Tag wurden die Testsubstanzen in die Wells hinzugegeben und erneut für 24 Stunden inkubiert bis zur Durchführung des Tests am dritten Tag. Die Testsubstanzen machten stets 1 % des Well-Inhaltes aus.

Dabei erfolgte beim CellTiter-Glo-Zellviabilitätstest, CytoTox-Glo-Zytotoxizitätstest und Neutralrot-Zellviabilitätstest jeweils eine 3-fach-Bestimmung aller Testsubstanzen, beim BrdU-Zelltest eine 4-fach-Bestimmung (also 3 bzw. 4 Wells mit der gleichen Testsubstanz für jeden durchgeführten Zelltest). Zur besseren Vorstellung folgt ein exemplarisches Wellplattenschema in Abbildung 9.

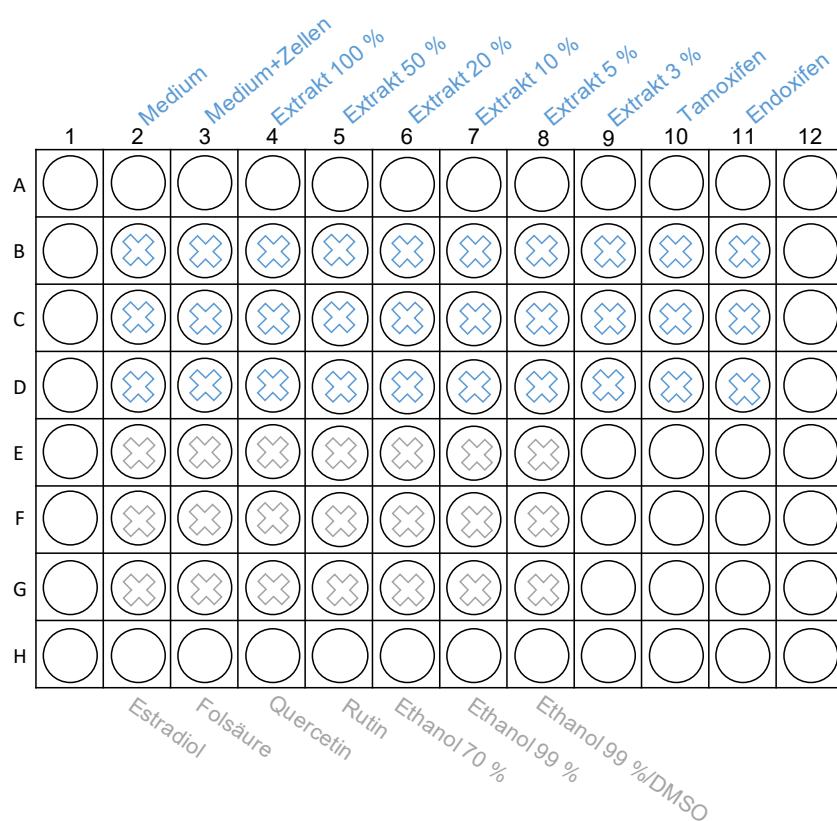


Abbildung 9: Schematische Darstellung einer beispielhaften 96-Wellplatte und ihrer Belegung mit Testsubstanzen.

Obwohl in den finalen Diagrammen nicht dargestellt, fanden ebenfalls Kontrollen der einzelnen Lösungsmittel ohne gelöste Probensubstanz statt, bei denen ein proliferationshemmender Einfluss in der angewandten Menge 10⁻² ausgeschlossen werden sollte (1 µl zugegebene Testsubstanz bei 100 µl Zellsuspension im Well).

2.5 Immunhistochemie

Als Grundlage für die Zelltests ist im Vorhinein der Rezeptorstatus der Zellreihen mittels immunhistochemischer Untersuchungen überprüft worden. Dies diente der Sicherstellung, dass auch in höheren Zellpassagen der vom Hersteller angegebene Rezeptorstatus nachweislich war. Für die MCF-7-Zellreihe vom Luminal A-Subtyp war eine Positivität für den ER-alpha und -beta sowie den Progesteronrezeptor angegeben, während die MDA-MB-231-Zellreihe vom basalen Subtyp negativ für diese drei Rezeptortypen sein sollte [5, 6]. Der HER2/neu-Rezeptor sollte bei beiden nicht exprimiert sein [128].

Die Prüfung geschah mit Hilfe des Untersuchungskits „ImmPRESS Universal Reagenz Anti Mouse/Rabbit Ig Kit“ und des „LinRed Substratkit für Peroxidase“.

Prinzip

Die indirekte Immunmarkierung beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion, bei der initial ein rezeptorspezifischer Primärantikörper an das äquivalente Rezeptorantigen anknüpft. Der Sekundärantikörper, der an diesen entstandenen Komplex bindet, besitzt das Enzym Peroxidase, welches bei Zugabe eines Substrats ein sichtbares, rotes Reaktionsprodukt entstehen lässt [117].

Durchführung

Schritt 1:	Zellaussaat auf eine 24-Wellplatte, 300 µl/Well Zellsuspension (Konzentration 300.000 Zellen/ml), Inkubation für 48 h im Brutschrank (37 °C, 5 % CO ₂ , wasserdampfgesättigte Atmosphäre)
Schritt 2:	Medium entfernen und 3-mal jedes Well mit 300 µl PBS spülen
Schritt 3:	Zugabe von 300 µl Formafix 4 % in jedes Well, Inkubation bei RT für 30 min
Schritt 4:	erneutes 3-maliges Spülen mit 300 µl PBS
Schritt 5:	Zugabe von 300 µl H ₂ O ₂ 0,3 % in jedes Well, Inkubation bei RT für 30 min
Schritt 6:	2-mal jedes Well mit 300 µl PBS Spülen, ein 3. Mal PBS bei RT für 5 min inkubieren, vorsichtig schwenken, dekantieren
Schritt 7:	Zugabe von 4 Tropfen Horse Serum (zur Blockade unspezifischer Bindungen) in jedes Well, Inkubation bei RT für 20 min, dekantieren (außer bei der Negativkontrolle)

Schritt 8:	Antikörper nach Beipackzettel mit PBS verdünnen (ER-alpha und PR: 1:200; ER-beta: 1:40); jeweils 100 µl in das dafür vorgesehene Well geben, Inkubation im Kühlschrank (+8 °C) für 24 h
Schritt 9:	Überstand entfernen und 3-mal jedes Well mit 300 µl PBS spülen
Schritt 10:	Zugabe von 4 Tropfen Mouse Serum (Sekundärantikörper) in jedes Well, Inkubation bei RT für 30 min
Schritt 11:	erneutes 3-maliges Spülen mit 300 µl PBS
Schritt 12:	Zugabe von 200 µl LinRed in jedes Well, Inkubation bei RT im Dunkeln für 15 min
Schritt 13:	Abstoppen der Farbreaktion mit 300 µl Leitungswasser je Well
Schritt 14:	Mikroskopische Analyse der Rezeptorexpression

2.6 Zelltests

2.6.1 BrdU-Zellproliferationstest

Prinzip

Dieser kolorimetrische Immunoassay erfasst das Ausmaß einer stattfindenden Zellproliferation durch den Einbau eines zugefügten Pyrimidinanalogons, dem 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU), anstelle von Thymidin in die DNA (Abbildung 10) [111].

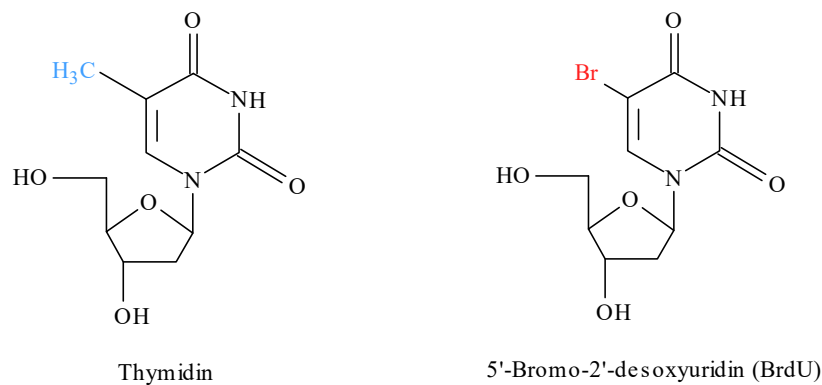


Abbildung 10: Strukturformeln von Thymidin und BrdU nach Iball et alii 1966 und Young et alii 1969 [49, 143].

Während in der Position, in der bei Thymidin eine Methylgruppe angehängt ist (blau), ist bei dem Pyrimidinanalogon BrdU Brom (rot) zu finden.

Nach dessen Zugabe und Einbau in die DNA werden die Zellen fixiert und denaturiert, um eine Bindung mit dem im Anschluss zugegebenen BrdU-Antikörper (anti-BrdU-POD) an das BrdU in der neusynthetisierten DNA zu ermöglichen. Der entstandene BrdU-Antikörper-Komplex besitzt eine Peroxidase (POD), die – nach der Bindung des Antikörpers an das in die DNA eingebaute BrdU – das anschließend zugefügte Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) umsetzt. Dies bewirkt einen blauen Farbumschlag. Die Absorptionswerte des farbigen Reaktionsproduktes werden mittels ELISA-Reader ausgemessen. Die Menge an entstandenen Komplexen bzw. die Intensität des Farbumschlags und somit der Absorptionswerte korreliert mit der Mitoserate der Zellen [111].

Durchführung

Die Durchführung erfolgte gemäß der Anleitung des Herstellers Roche [111].

Schritt 1: Zellaussaat auf eine 96-Wellplatte, 100 µl/Well Zellsuspension (Konzentration 300.000 Zellen/ml), Inkubation für 24 h im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂, wasserdampfgesättigte Atmosphäre)

Schritt 2:	Zugabe der Testsubstanzen, 1 μ l/Well, Inkubation für 24 h im Brutschrank (s. o.)
Schritt 3:	BrdU-Reagenz mit DMEM 1:100 ansetzen und 10 μ l in jedes Well hinzugeben (ausgenommen der Background-Reihe), 3 min auf den Plattenrüttler um gleichmäßiges Verteilen zu gewährleisten, Inkubation für 3 h im Brutschrank (s. o.)
Schritt 4:	Zellüberstand dekantieren, Zugabe von 200 μ l FixDenat in jedes Well, Inkubation bei RT für 30 min
Schritt 5:	Anti-BrdU-POD-Antikörper mit Antibody-dilution-solution 1:100 verdünnen, Zellüberstand dekantieren, je 100 μ l der Antikörpersuspension in jedes Well, Inkubation bei RT für 60 min
Schritt 6:	Waschlösung aus Waschpuffer und Aqua bidest. Wasser 1:10 ansetzen, Zellüberstand dekantieren und leicht auf einem Filterpapier ausklopfen, 3-mal jedes Well mit 200 μ l Waschlösung spülen und ausklopfen
Schritt 7:	Zugabe der Substratlösung (TMB), 100 μ l/Well, Inkubation bei RT für 10-15 min
Schritt 8:	Abstoppen der Reaktion mittels Zugabe von H ₂ SO ₄ 1 M, 25 μ l/Well
Schritt 9:	Messung mit dem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzlänge von 620 nm

2.6.2 Neutralrot-Zellviabilitätstest

Prinzip

Dieser Neutralrot-Aufnahme-Assay ermöglicht eine quantitative Einschätzung der lebenden Zellen in einer Zellkultur. Der Farbstoff gelangt durch passive Diffusion durch die Zellmembran der Zellen und reichert sich in ihren Lysosomen an [109]. Es kommt zu einer elektrostatischen Bindung an Phosphat- und/oder Carboxylgruppen in der lysosomalen Matrix [139]. Während bei physiologischem pH-Wert der Neutralrot-Farbstoff ungeladen vorliegt und passiv durch die Zellmembranen diffundieren kann, liegt er innerhalb von Lysosomen aufgrund des dort vorkommenden niedrigeren pH-Wertes geladen vor. Da der Farbstoff so die Lysosomenmembran nicht erneut überwinden kann, reichert er sich innerhalb der Lysosomen an. Sind die Zellen nicht in der Lage, den ATP-abhängigen pH-Gradienten zwischen Lysosomen und Zytoplasma aufrecht zu erhalten, z. B. aufgrund von ATP-Mangel bei Zellschaden oder -tod, kann das Neutralrot dementsprechend weniger angereichert werden [109]. Mikroskopisch ist dann eine diffuse Farbverteilung über Nukleus und Zytoplasma zu sehen, bei der die Konzentration auf beiden Seiten der Membran gleich ist [34].

Folglich erlaubt die Neutralrotbindungskapazität Rückschlüsse auf die Integrität der Zellmembran [34]. Die Fähigkeit der Zellen bei lysosomaler Integrität den Farbstoff Neutralrot anzureichern, gilt als hochsensitiver Marker für die Zellviabilität [109].

Durchführung

Die Durchführung orientiert sich an der Anleitung des Herstellers Sigma Aldrich und der Nature Publikation von Repetto 2008 [109]. Vorangegangene Promovenden etablierten diesen Zelltest als neue Methode im Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik Rostock und generierten nach zahlreichen Vorversuchen und Modifikationen eine optimale Vorgehensweise, die das Ausfallen von ergebnisverfälschenden Kristallpräzipitaten geringhalten sollte.

Schritt 1:	Zellaussaat auf eine 96-Wellplatte, 100 µl/Well Zellsuspension (Konzentration 500.000 Zellen/ml), Inkubation für 24 h im Brutschrank (37 °C, 5 % CO ₂ , wasserdampfgesättigte Atmosphäre)
Schritt 2:	Zugabe der Testsubstanzen, 1 µl/Well, Inkubation für 24 h im Brutschrank (s. o.)
Schritt 3:	pH-Wert des Mediums DMEM (ohne Phenolrot, ohne Zusätze) mithilfe von 1 M HCl auf einen pH-Wert von 7,2 titrieren, Zugabe von Neutralrotlösung (0,33 %) für eine Endkonzentration von 3 %

Schritt 4:	Medium aus den Wells entfernen, 100 µl der in Schritt 3 angesetzten Lösung in jedes Well geben, Inkubation für 30 min im Brutschrank (37 °C, 5 % CO ₂ , wasserdampfgesättigte Atmosphäre) mit regelmäßigen mikroskopischen Kontrollen auf Kristallpräzipitation
Schritt 5:	Medium aus den Wells entfernen, jedes Well mit 150 µl PBS spülen, absaugen
Schritt 6:	Zugabe von Neutralrot-Freisetzungslösung zum Lösen des Farbstoffes aus den Zellen, 100 µl/Well
Schritt 7:	Zellkulturplatte 14 min bei 200 Schwingungen/min bei RT auf den Plattenrüttler stellen
Schritt 8:	Messung mit dem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 570 nm und einer Referenzlänge von 655 nm

2.6.3 CellTiter-Glo-Zellviabilitätstest

Prinzip

Dieser Lumineszenz-Assay dient der quantitativen Bestimmung lebender Zellen in einer Zellkultur anhand der Quantifizierung des Adenosintriphosphats (ATP). ATP spielt insofern eine zentrale Rolle im Energiekreislauf biologischer Systeme, als dass es den wichtigsten Bereitsteller von unmittelbarer Energie darstellt und in allen metabolisch aktiven Zellen präsent ist [23]. Somit gilt ATP allgemein als gültiger Marker für lebende Zellen [83]. Das intrazelluläre ATP wird durch den im CellTiter-Glo-Reagenz enthaltenen lysierenden Buffer freigesetzt und steht somit bereit zur Reaktion mit dem ebenfalls darin enthaltenen Substrat. Letzteres enthält das Enzym Luciferase, welches unter Beisein von ATP, Sauerstoff und Magnesium das Luciferin zum Oxyluciferin, einem Lichtquant und Nebenprodukten reagieren lässt (Abbildung 11) [100]. Das thermostabile Enzym basiert auf den Genen des Glühwürmchens *Photuris pennsylvanica* (LucPpe2) und verhindert im Gegensatz zu seinem historischen Vorgänger *Photinus pyralis* (LucPpy), dass die endogene Freisetzung von ATPasen die Messung verfälscht. Das lumineszierende Signal kann mittels eines Luminometers gemessen werden und steht in linearem Bezug zur Anzahl der zuvor lebenden Zellen im Well [100].

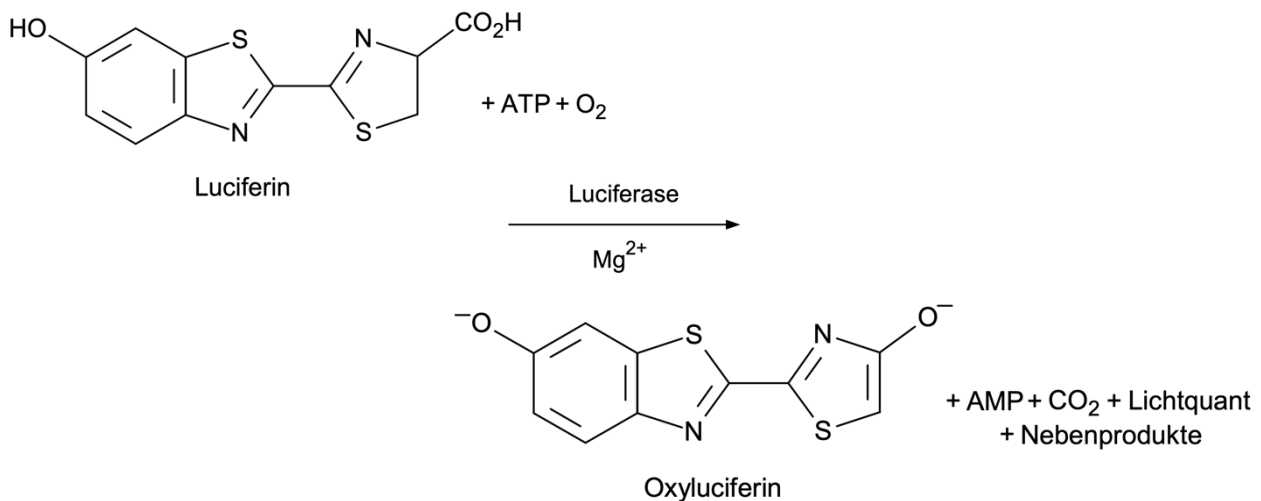


Abbildung 11: Die Luciferase-Reaktion nach Promega Corporation 2001 [100]. Monooxygenierung von Luciferin ist katalysiert durch die Luciferase in Anwesenheit von Mg²⁺, ATP und molekularem Sauerstoff [100].

Durchführung

Die Durchführung erfolgte entsprechend der Anleitung des Herstellers Promega mit der Modifikation der halbierten Mengenangaben aufgrund finanzieller Randbedingungen des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik Rostock [100].

Schritt 1:	Zellaussaat auf eine 96-Wellplatte, 50 µl/Well Zellsuspension (Konzentration 600.000 Zellen/ml), Inkubation für 24 h im Brutschrank (37 °C, 5 % CO ₂ , wasserdampfgesättigte Atmosphäre)
Schritt 2:	Zugabe der Testsubstanzen, 0,5 µl/Well, Inkubation für 24 h im Brutschrank (s. o.)
Schritt 3:	Ansetzen des CellTiter-Glo [®] -Reagenz aus CellTiter-Glo [®] Buffer und Substrat, Vermengung auf Rollenmaschine, 50 µl/Well verteilen, 3 min auf den Plattenrüttler, Inkubation bei RT für 30 min
Schritt 4:	Übertragung auf weiße, intransparente GloMax-Testplatte (zur Vermeidung von Lichtleitung in angrenzende Wells)
Schritt 5:	Lumineszenzmessung mittels GloMax Luminometer

2.6.4 CytoTox-Glo-Zytotoxizitätstest

Prinzip

Dieser Lumineszenz-Assay dient der quantitativen Bestimmung lebender Zellen in einer Zellkultur anhand einer Protease, die mit Zytotoxizität assoziiert ist [101]. Das zugegebene AAF-Glo™ Substrat (AAF: Alanyl-alanyl-phenylalanyl-aminoluceferin) wird durch die Proteasen, die bei verlorener Membranintegrität aus den toten Zellen heraus diffundieren, zu Aminoluceferin gespalten. Dies wird nun durch das ebenfalls im AAF-Glo™ Reagenz enthaltenen Enzym Luciferase unter Entstehung eines Lichtquants umgesetzt. So wird ein stabiles lumineszierendes Signal generiert, dass mittels eines Luminometers gemessen werden kann. Im zweiten Schritt kann mittels eines Lysis-Reagenz, welches Digitonin enthält, durch Abtöten der lebenden Zellen ein lumineszierendes Signal aller Zellen im Well erzielt werden [101]. Anhand Subtraktion des initialen Signals der toten Zellen vom zweiten Signal der Gesamtheit der Zellen kann auf die Anzahl der zu Testbeginn vitalen Zellen zurückgeschlossen werden:

$$\text{Signal lebender Zellen} = \text{Signal bei totaler Zytotoxizität} - \text{Signal initialer Zytotoxizität}$$

Durchführung

Die Durchführung erfolgte entsprechend der Anleitung des Herstellers Promega [101].

Schritt 1:	Zellaussaat auf eine 96-Wellplatte, 100 µl/Well Zellsuspension (Konzentration 300.000 Zellen/ml), Inkubation für 24 h im Brutschrank (37 °C, 5 % CO ₂ , wasserdampfgesättigte Atmosphäre)
Schritt 2:	Zugabe der Testsubstanzen, 1 µl/Well, Inkubation für 24 h im Brutschrank (s. o.)
Schritt 3:	Ansetzen des AAF-Glo™ Reagenz aus AAF-Glo™ Substrat und Buffer, Vermengung auf der Rollenmaschine, 50 µl/Well verteilen, 3 min auf den Plattenrüttler, Inkubation bei RT für 15 min
Schritt 4:	Übertragung auf GloMax-Testplatte
Schritt 5:	Lumineszenzmessung mittels GloMax Luminometer
Schritt 6:	Übertragung auf 96-Wellplatte
Schritt 7:	Ansetzen des Lysis Reagenz aus Assay Buffer und Digitonin, 50 µl/Well verteilen, 3 min auf den Plattenrüttler, Inkubation bei RT für 15 min
Schritt 8:	Übertragung auf weiße, intransparente GloMax-Testplatte (zur Vermeidung von Lichtleitung in angrenzende Wells)
Schritt 9:	Lumineszenzmessung mittels GloMax Luminometer

2.6.5 Messung der Glucose- und Lactatkonzentration und des pH-Wertes

Wie eingangs im Kapitel zu Tumorgenese und -metabolismus erläutert, charakterisiert den Metabolismus von Tumorzellen eine im Sinne des Warburg-Effekts veränderte Stoffwechsellage hin zur Glykolyse mit Lactatsynthese auch unter aeroben Bedingungen [22]. Um dem hierbei und aufgrund der intensivierten Zellteilung entstandenem gesteigerten ATP-Bedarf gerecht zu werden, wird die Glucoseaufnahme um ein Vielfaches im Verhältnis zu normalen Zellen erhöht. Das über diesen Weg der Energiegewinnung produzierte Lactat akkumuliert und bedingt eine saure Mikroumgebung der Zellen [17].

Die Parameter Glucose, Lactat und pH-Wert sollen als Indikator für den veränderten Stoffwechsel unter Einfluss der Testsubstanzen gemessen werden.

Prinzip

Die pH-Messungen wurden eigenständig mittels pH-Mess-Elektrode im Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik Rostock durchgeführt. Die Glucosemessung fand als enzymatischer UV-Test durch die Abteilung für Labordiagnostik des Klinikum Südstadt Rostock statt; die Lactatmessung als enzymatischer Farbttest ebenso (Prinzipien der Untersuchungsmethoden dazu im Appendix).

Durchführung

Schritt 1:	Zellaussaat auf eine 96-Wellplatte, 100 µl/Well Zellsuspension (Konzentration 300.000 Zellen/ml), Inkubation für 24 h im Brutschrank (37 °C, 5 % CO ₂ , wasserdampfgesättigte Atmosphäre)
Schritt 2:	Zugabe der Testsubstanzen, 1 µl/Well, Inkubation für 24 h im Brutschrank (s. o.)
Schritt 3:	Zusammenführung der Wellinhalte einer Testsubstanzreihe in ein Eppendorf-Tube
Schritt 4:	Zur Glucose- und Lactat-Bestimmung Übergabe an die Abteilung für Labordiagnostik des Klinikum Südstadt Rostock
Schritt 5:	pH-Wert-Messung mittels des pH-Meters

2.7 Auswertung der Zelltests

Bei allen Zelltests wurde von jeder Testsubstanz bzw. Kontrolle eine 3- bis 4-fach-Bestimmung angesetzt und jeder Test 3- bis 5-mal wiederholt (Abbildung 9). Die ermittelten Werte wurden stets zeitgleich am dritten Tag für die gesamte 96-Wellplatte erhoben. Bei der Auswertung der Rohdaten wurde im ersten Schritt der Mittelwert aus jeder Reihe strukturell gleicher, unabhängiger Wells gebildet und anschließend die Überlebensrate nach folgender Formel mit den Mittelwerten berechnet. Die Überlebensrate soll hier stellvertretend für Zellviabilität bzw. Zellproliferation je nach verwendetem Zelltest stehen.

$$\text{Überlebensrate [\%]} = 100 \times \frac{\text{Testsuspension} - \text{Medium}}{\text{Lösungsmittelsuspension} - \text{Medium}}$$

Testsuspension = Testsubstanz + Lösungsmittel + Medium + Zellen

Lösungsmittelsuspension = Lösungsmittel + Medium + Zellen

Hieraus ergibt sich nach Einsatz der Bestandteile wie folgt:

$$\begin{aligned} \text{Überlebensrate [\%]} &= 100 \times \frac{\text{Testsubstanz} + \text{Lösungsmittel} + \text{Medium} + \text{Zellen} - \text{Medium}}{\text{Lösungsmittel} + \text{Medium} + \text{Zellen} - \text{Medium}} \\ &= 100 \times \frac{\text{Testsubstanz} + \text{Lösungsmittel} + \text{Zellen}}{\text{Lösungsmittel} + \text{Zellen}} \end{aligned}$$

So wird deutlich, dass die im Kapitel 3.3 graphisch dargestellte Überlebensrate in % nur dann von 100 % abweicht, wenn die Testsubstanz eine Wirkung entfaltet.

Im Folgenden werden Medium und Zellen mit Zusatz des Lösungsmittels in 10^{-2} -facher Konzentration begrifflich ohne den Lösungsmittelanteil verwendet, da davon ausgegangen wird, dass der niedrigkonzentrierte Lösungsmittelanteil das Zellüberleben nicht entscheidend negativ beeinflusst. Diese Annahme ist mittels in dieser Arbeit nicht näher dargestellten parallel ablaufender Tests validiert worden.

Nun wurden mit den bereinigten Mittelwerten auch Standardabweichungen sowie Signifikanzen bestimmt, wobei das Signifikanzniveau auf $p < 0,05$ festgelegt wurde. So sind also

diejenigen Werte in den Diagrammen (Kapitel 3.3) mit einem Sternchen (*) markiert, die sich signifikant vom ungestörten Wachstum unterscheiden [106].

Es erfolgte eine statistische Beratung durch das Institut für Biostatistik und Informatik der Universität Rostock und daraufhin die Berechnung mittels T-Test für unabhängige Stichproben mit Microsoft Excel 2020, Version 16.37.

3. Ergebnisse

3.1 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Für jeden angefertigten Moringablattextrakt, ebenso wie für jede zu testende Referenzsubstanz, wurden zwei bis drei Messdurchgänge durchgeführt, um eventuelle Abweichungen in den Graphen zu detektieren. Bei Betrachtung des ersten Ethanolextraktes mit weniger Moringablattpulver im Ansatz, sowie dem Wasser- und Methanolextrakt zeigten sich die einzelnen Peaks als Hinweise für aufgetrennte Einzelstoffe so schwach ausgeprägt, dass davon ausgegangen werden musste, dass sich die Bestandteile nicht im bestmöglichen Ausmaß gelöst hatten. So wurde ein zweiter Ethanolextrakt mit größerer Menge an Moringablattpulver und schonenderer Zubereitung bei einem Mikrowellenprogramm mit niedrigerer Temperatur über einen längeren Zeitraum angesetzt, bei dem sich nun eindeutiger abgrenzbare Peaks abzeichneten.

Abbildung 12 und Abbildung 13 zeigen die HPLC-Ergebnisse von diesem Ethanolextrakt mit den synthetisch produzierten Reinsubstanzen. Ein Graph entspricht dabei jeweils einem Durchgang. Zur Verdeutlichung der übereinstimmenden Peaks wurden hier mehrere Graphen übereinandergelagert. Auf der y-Achse ist die UV-Absorbanz bei 254 nm Wellenlänge und auf der x-Achse die Zeit in Minuten dargestellt.

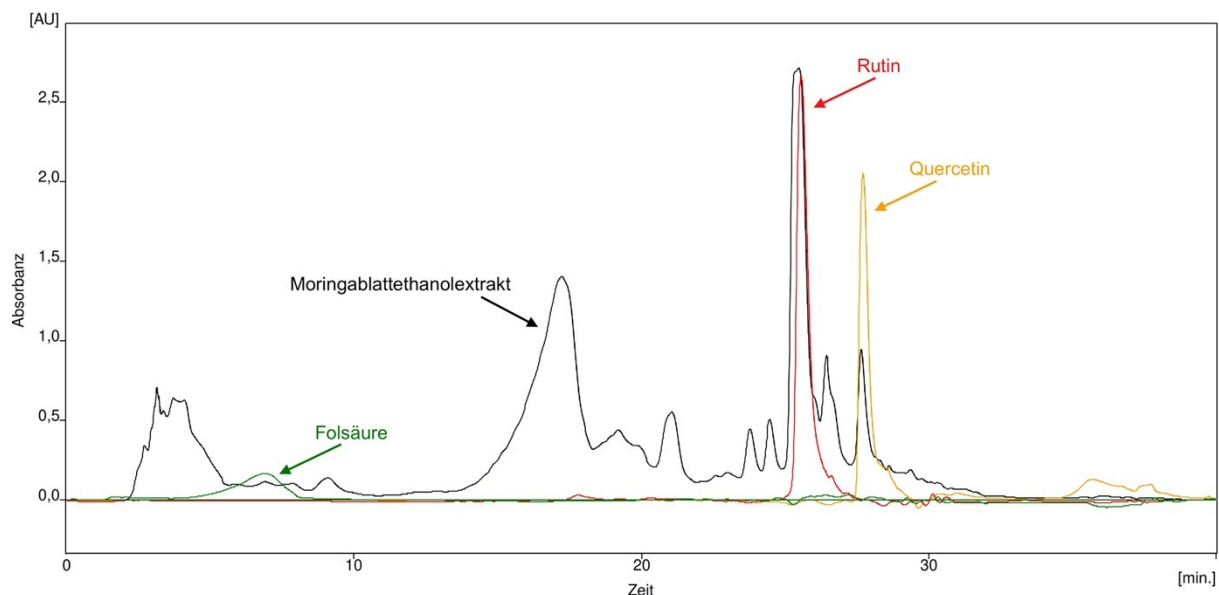


Abbildung 12: Chromatogramm eines HPLC-Durchlaufs mit dem Moringablattethanolextrakt sowie den qualitativ nachgewiesenen Referenzsubstanzen Folsäure, Rutin und Quercetin. Aufgetragen ist die UV-Absorbanz [AU] bei 254 nm Wellenlänge gegen die Zeit in Minuten [min]. Schwarz = Moringablattextrakt, grün = Folsäure, rot = Rutin, gelb = Quercetin.

Da die Retentionszeit eines Stoffes, also diejenige Zeit zwischen Injektion der Testsubstanz bis zum aufgezeichneten Maximum, unter identischen chromatographischen Bedingungen immer gleich ist, lässt ein Vergleich der Peaks die Identifikation der Substanzen im Extrakt zu [85]. Abbildung 12 zeigt eine Übereinstimmung der Referenzsubstanzen Folsäure bei 6,7 min, Rutin bei 25,5 min und Quercetin bei 27,6 min.

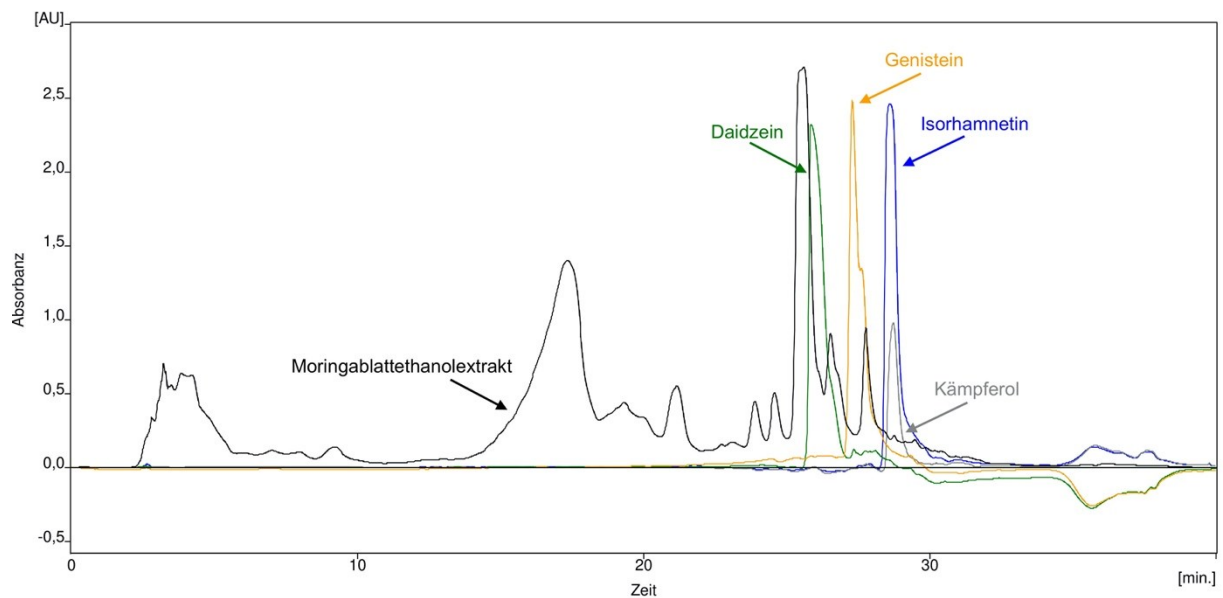


Abbildung 13: Chromatogramm eines HPLC-Durchlaufs mit dem Moringablattethanolextrakt sowie den qualitativ nicht sicher nachweisbaren Referenzsubstanzen Daidzein, Genistein, Isorhamnetin und Kämpferol.

Aufgetragen ist die UV-Absorbanz [AU] bei 254 nm Wellenlänge gegen die Zeit in Minuten [min].

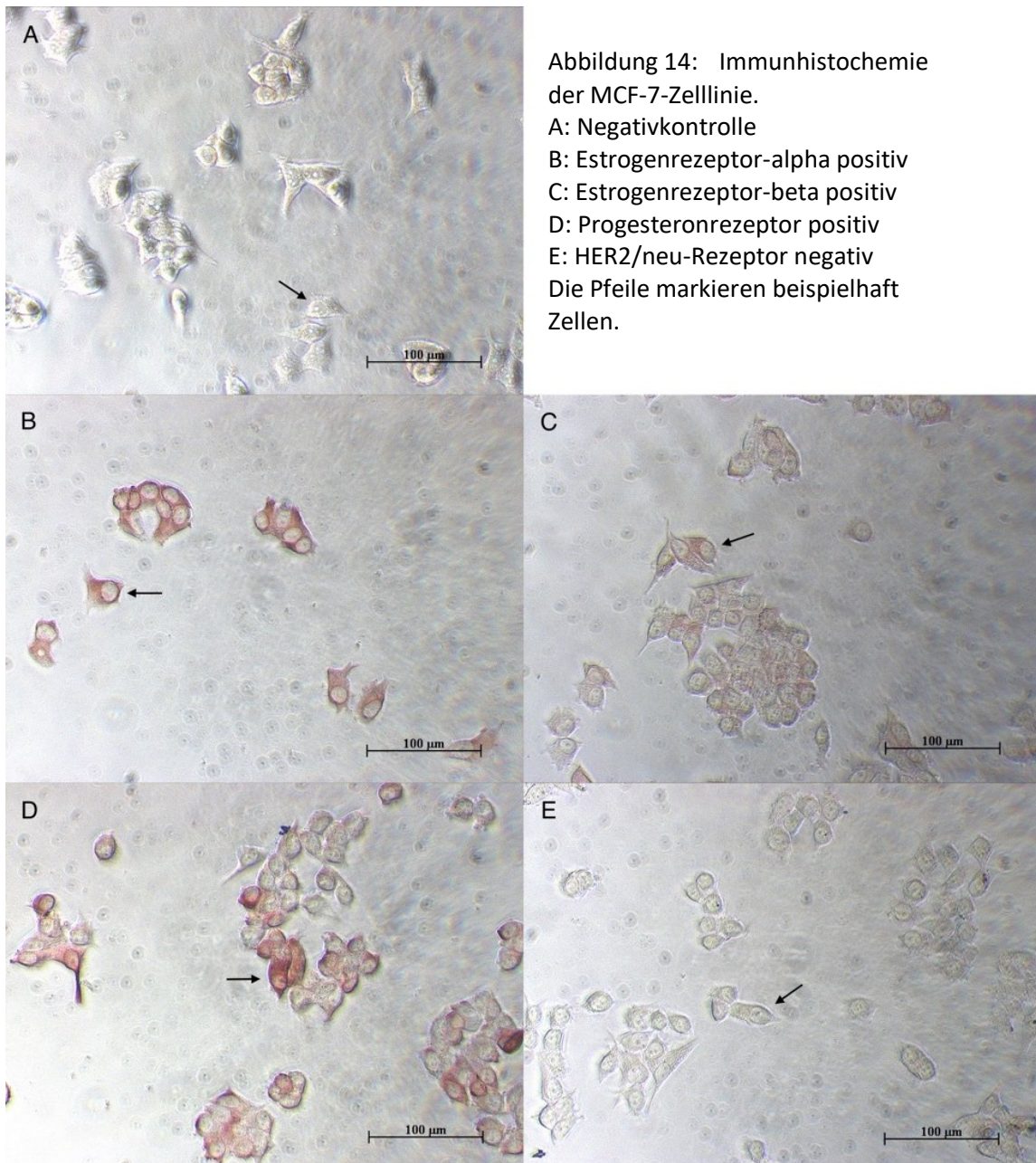
Schwarz = Moringablattextrakt, grün = Daidzein, gelb = Genistein, blau = Isorhamnetin, grau = Kämpferol.

Die anderen zur Prüfung stehenden Flavonoide Daidzein, Genistein, Kämpferol und Isorhamnetin konnten, wie in Abbildung 13 ersichtlich, anhand der typischen Peaks nicht sicher im Extrakt nachgewiesen werden.

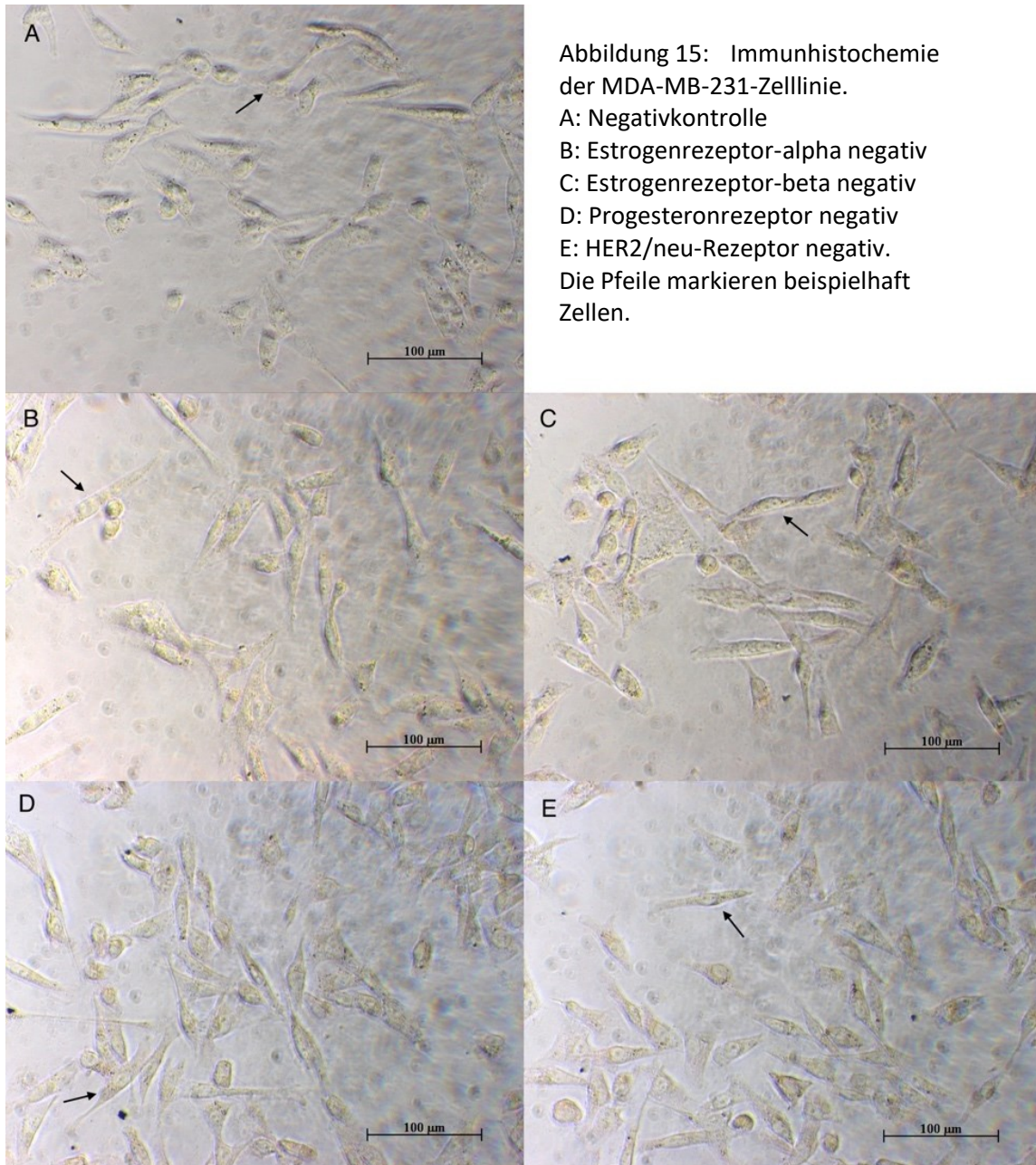
Die Auswertung dieser Ergebnisse erfolgte in enger Zusammenarbeit mit Professor Doktor rer. nat. habil. Udo Jeschke (Leiter des Forschungslabors der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Ludwig-Maximilians-Universität München).

3.2 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Untersuchungen sollten den Rezeptorstatus der beiden verwendeten Zellreihen bestätigen, da bei höheren Passagen zunehmende genomische Instabilität befürchtet wird. Das rote Reaktionsprodukt zeigt sich proportional zur Peroxidaseaktivität und entspricht einer Rezeptorexpression. Es akkumuliert wegen der intrazellulären Steroidrezeptoren im Zytoplasma und färbt dies rötlich an [117]. Auf diese Weise konnte für die Zellreihe MCF-7 die Anwesenheit der Estrogenrezeptoren-alpha und -beta sowie des Progesteronrezeptors (B, C und D in Abbildung 14) verifiziert werden, wohingegen sich beim HER2/neu-Rezeptor wie erwartet keine Reaktion zeigte (E in Abbildung 14).



In beiden Abbildungen stellt A die Negativkontrolle dar, bei der kein markierender Antikörper hinzugegeben wurde.



Bei der Zellreihe MDA-MB-231 fand kein farblich kennzeichnender Rezeptornachweis statt, es findet sich eine Negativität für jeden der geprüften Rezeptortypen (B bis E in Abbildung 15).

3.3 Ergebnisse der Zelltests

3.3.1 BrdU-Zellproliferationstest

Bei diesem Test wird das Ausmaß des Zellwachstums gemessen. Das Pyrimidinanalogon BrdU wird anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut und kann mittels indirekter Antikörperbindung im ELISA bestimmt werden. Die Proliferation ist umso größer, je höher die Messabsorbanz [111].

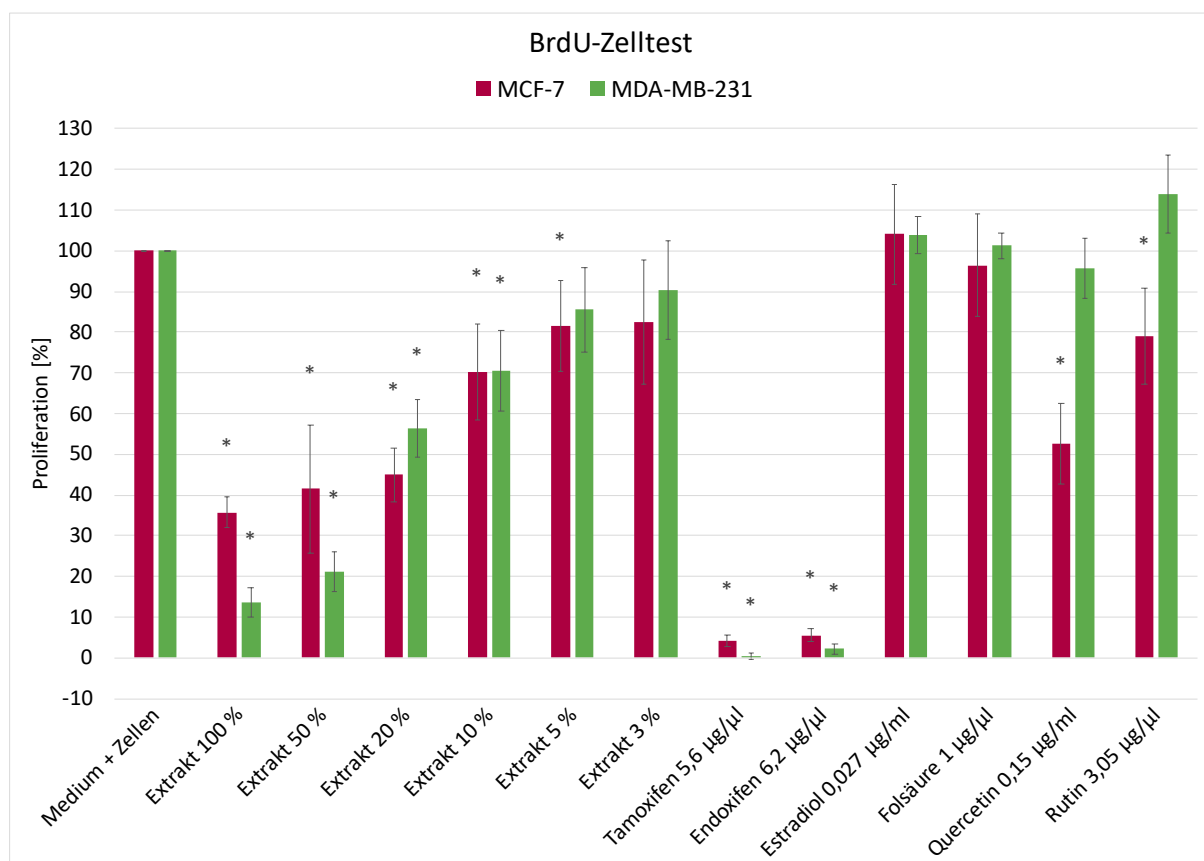


Abbildung 16: BrdU-Zellproliferationstest. Zellproliferation [%] von MCF-7 (n=5, 4-fach-Bestimmung) und MDA-MB-231 (n=4, 4-fach-Bestimmung).

Angegeben sind die Moringablattextrakt-Verdünnungen und Konzentrationen der zugegebenen Substanzen, die Zielkonzentration im Well beträgt davon den Faktor 10^{-2} .

Mittelwerte \pm Standardabweichung. * = signifikant ($p < 0,05$).

In dem Diagramm in Abbildung 16 ist die Proliferation in Prozent auf der y-Achse aufgetragen. Auf der x-Achse sind ganz links Medium und Zellen ohne hinzugefügte Testsubstanz als Vergleichsgröße (100 %) aufgetragen, dies entspricht ungestörtem Wachstum. Es folgt der Ethanolextrakt aus Moringablattpulver in absteigender Konzentration; dann Tamoxifen und Endoxifen als Negativkontrollen, sowie Estradiol als Positivkontrolle, anschließend die

Referenzsubstanzen. Die roten Säulen demonstrieren die Zellreihe MCF-7 und die grünen die Zellreihe MDA-MB-231.

Unter Einfluss des in der Mammakarzinomtherapie etablierten selektiven Estrogenrezeptor-modulators (SERM) Tamoxifen und des aktiven Metaboliten Endoxifen ist bei beiden Zelllinien eine Proliferation von 0,4 % bis 5,4 % festzustellen, was mit einem nahezu vollständigen Absterben der Zellen vereinbar ist. Bei Zugabe des Estradiol ist mit 104 % und 103,8 % Proliferation bei beiden Zelllinien ein leichtes Ansprechen auf das proliferationsfördernde Sexualhormon zu verzeichnen.

Der Ethanolextrakt zeigte insgesamt auf beide Zellreihen mit zunehmender Konzentration eine wachstumshemmende Wirkung. Bei den MCF-7-Zellen ließ sich unter Einfluss des 100 %-igen Ethanolextraktes eine signifikant verringerte Proliferation von 35,7 % nachweisen, auch bei 50 %-igem und 20 %-igem Extrakt war die ED₅₀ – also die effektive Dosis, bei der 50 % der Individuen (hier: Zellen) den erwünschten therapeutischen Effekt zeigen [36] – mit 41,5 % und 44,9 % Proliferation erreicht. Bei den MDA-MB-231-Zellen konnte diese Maßzahl nur bei 100 %-igem (mit 13,5 % Proliferation) und 50 %-igem (mit 21,25 %) Extrakt erreicht werden. In weiteren Verdünnungen zeigte sich die Proliferation mit zunehmender Extraktverdünnung proportional weniger stark eingeschränkt.

Beim Blick auf die im Moringablattextrakt enthaltenden Referenzsubstanzen zeigte Folsäure auf keine der beiden Zellreihen signifikanten proliferationsfördernden Einfluss. Die MCF-7-Zellreihe wurde unter Exposition von Quercetin auf 52,6 % Proliferation und von Rutin auf 79 % Proliferation signifikant im Wachstum gehemmt. Bei den MDA-MB-231-Zellen ließen sich keine signifikanten Ergebnisse erheben, unter dem Einfluss von Rutin zeigte sich eine gesteigerte Proliferation (113,9 %).

3.3.2 Neutralrot-Zellviabilitätstest

Dieser Neutralrot-Aufnahme-Assay ermöglicht eine quantitative Einschätzung der lebenden Zellen in einer Zellkultur. Der Farbstoff gelangt durch passive Diffusion durch die Zellmembran und reichert sich in ihren Lysosomen nur dann an, wenn die Integrität der Zellmembran erhalten ist. Daher ist die Anreicherung ein hochempfindlicher Marker für die Zellviabilität [109].

In dem Diagramm in Abbildung 17 ist auf der y-Achse die Viabilität in Prozent angegeben. Die x-Achse gleicht im Aufbau der BrdU-Grafik (Abbildung 16). Medium und Zellen sind als Bezugsgröße (100 %) gesetzt. Die Negativkontrollen Tamoxifen und Endoxifen sowie die Positivkontrolle Estradiol fallen erwartungsgemäß aus: Tamoxifen und Endoxifen führen zum vollständigen Zelltod, Estradiol regt das Zellwachstum an.

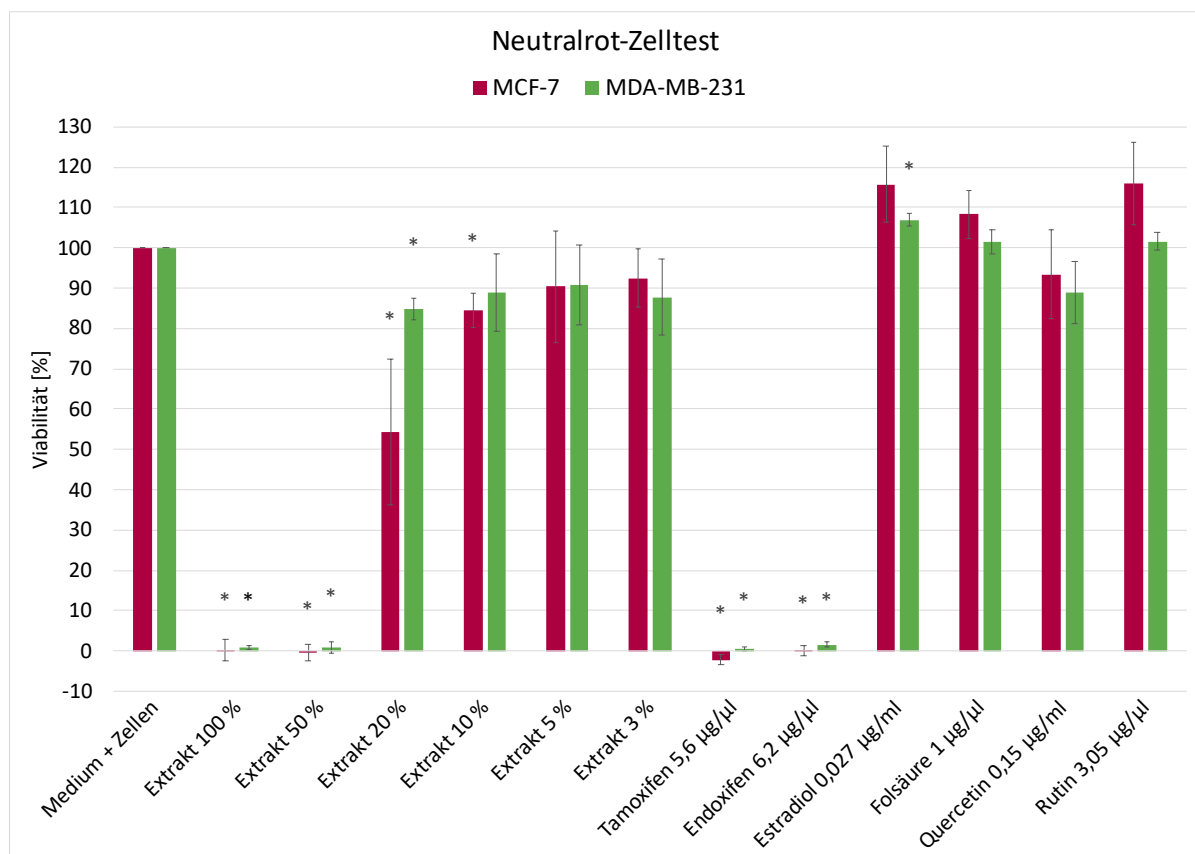


Abbildung 17: Neutralrot- Zellviabilitätstest. Zellviabilität [%] von MCF 7 (n=3, 3-fach-Bestimmung) und MDA-MB 231 (n=3, 3-fach-Bestimmung).

Angegeben sind die Moringablattextrakt-Verdünnungen und Konzentrationen der zugegebenen Substanzen, die Zielkonzentration im Well beträgt davon den Faktor 10^{-2} .

Mittelwerte \pm Standardabweichung. * = signifikant ($p < 0,05$).

Der Moringablattextrakt in 100 %-iger und 50 %-iger Konzentration führt bei beiden Zellreihen mit signifikanten Viabilitätsmessungen von unter 1 % ein vollständiges Absterben herbei. Bei allen weiteren Extraktverdünnungen ist bei beiden Zellreihen keine ED₅₀ mehr zu verzeichnen.

Die Referenzsubstanzen zeigen insgesamt keinen signifikanten Einfluss.

3.3.3 CellTiter-Glo-Zellviabilitätstest

Dieser Lumineszenz-Assay dient der quantitativen Bestimmung lebender Zellen in einer Zellkultur anhand der Quantifizierung des ATP. Das intrazelluläre ATP wird durch den Buffer freigesetzt und reagiert dann mit dem Enzym Luciferase unter anderem zu einem Lichtquant. Das lumineszierende Signal kann mittels eines Luminometers gemessen werden und steht in linearem Bezug zur Anzahl der lebenden Zellen im Well [100].

In dem Diagramm in Abbildung 18 ist auf der y-Achse die Viabilität in Prozent aufgetragen. Auf der x-Achse findet sich ganz links Medium und Zellen ohne Zusatz als Bezugsgröße; anschließend entspricht die Einteilung den vorangegangenen Zelltest-Diagrammen.

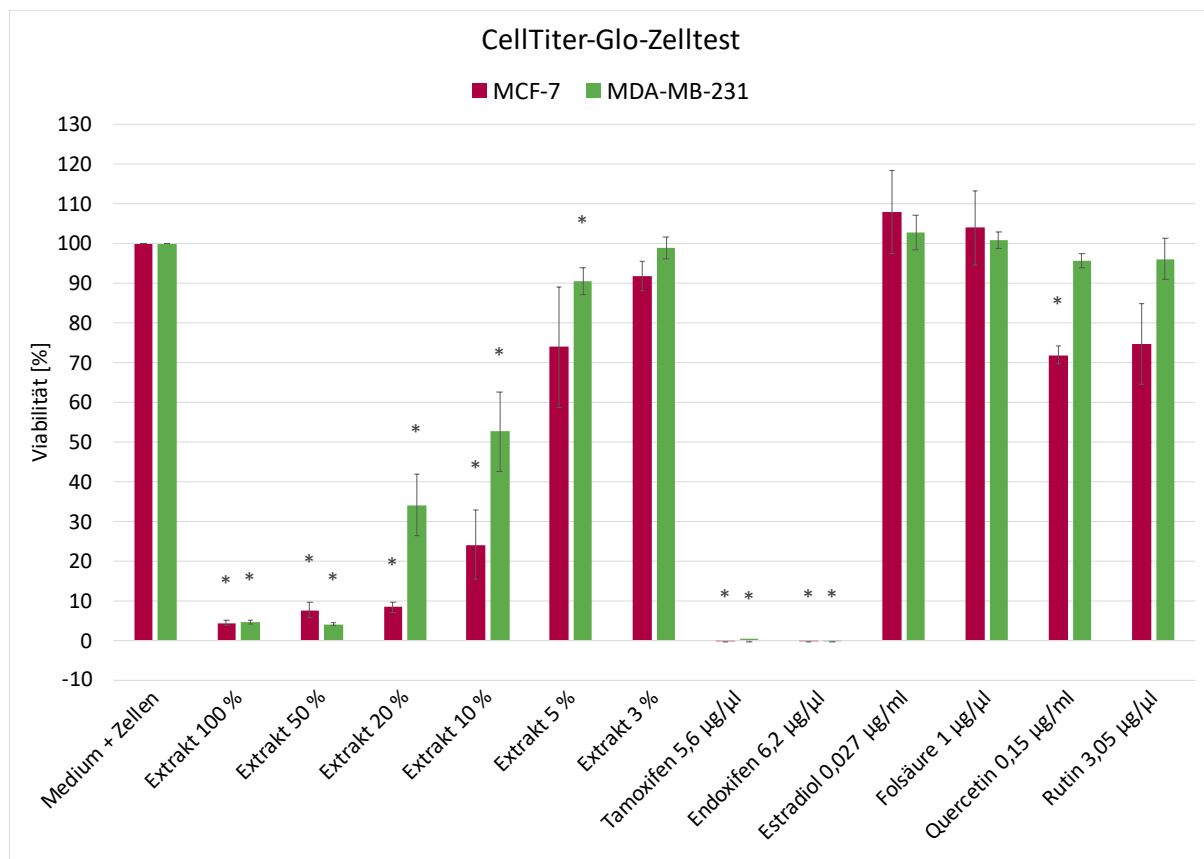


Abbildung 18: CellTiter-Glo-Zellviabilitätstest. Zellviabilität [%] von MCF 7 (n=3, 3-fach-Bestimmung) und MDA-MB 231 (n=3, 3-fach-Bestimmung).

Angegeben sind die Moringablattextrakt-Verdünnungen und Konzentrationen der zugegebenen Substanzen, die Zielkonzentration im Well beträgt davon den Faktor 10^{-2} .

Mittelwerte \pm Standardabweichung. * = signifikant ($p < 0,05$).

Bei der Extraktverdünnungsreihe zeigt sich ein stärkerer Einfluss auf die MCF-7-Zellreihe: bei 100 %-, 50 %-, 20 %- und 10 %-iger Verdünnung lassen sich signifikante Werte (zwischen

4,5 % und 24 %) für eine stark gehemmte Vitalität im Sinne der ED₅₀ erheben. Für die triple-negative MDA-MB-231-Zellreihe ergibt sich ebenfalls eine signifikante wachstumshemmende Wirkung, allerdings ist bei 10 %-iger Verdünnung mit 52,6 % Viabilität eine deutlich geringere Hemmung erkennbar als bei der ER- und PR-positiven Zelllinie (MC7-7).

Die Negativkontrollen (Tamoxifen und Endoxifen) zeigen Avitalität an und die Positivkontrolle Estradiol mit 108 % und 102,9 % bei beiden Zellreihen leichten viabilitätsfördernden Einfluss. Bei den Referenzsubstanzen zeigte nur Quercetin bei der MCF-7-Zellreihe eine signifikante vitalitätshemmende Wirkung mit 72 % Viabilität.

3.3.4 CytoTox-Glo-Zytotoxizitätstest

Dieser Zelltest dient als Lumineszenz-Assay der quantitativen Bestimmung lebender Zellen in einer Zellkultur anhand einer Protease, die mit Zytotoxizität assoziiert ist. In einer zweischrittigen Reaktion entsteht ein Lichtquant; ein lumineszierendes Signal kann gemessen werden. Anschließend kann mittels des Lysis-Reagenz durch Abtöten der lebenden Zellen ein lumineszierendes Signal aller Zellen im Well erzielt werden [101]. Anhand Subtraktion des initialen Signals der toten Zellen vom zweiten Signal der Gesamtheit der Zellen kann auf die Anzahl der zu Testbeginn vitalen Zellen rückgeschlossen werden:

$$\text{Signal lebender Zellen} = \text{Signal bei totaler Zytotoxizität} - \text{Signal initialer Zytotoxizität}$$

In dem Diagramm in Abbildung 19 ist auf der y-Achse die Viabilität in Prozent aufgetragen.

Die x-Achse ist mit der Aufreihung der Testsubstanzen identisch zu den vorherigen Diagrammen.

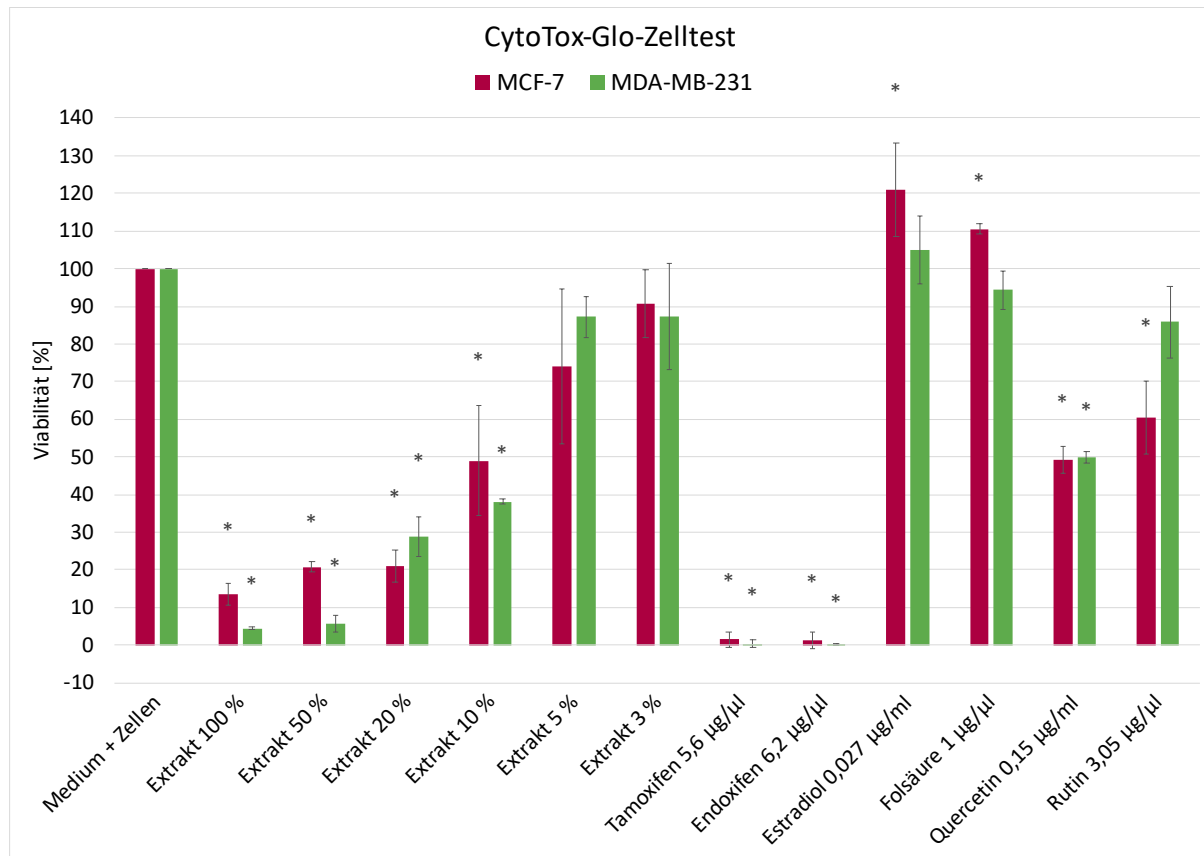


Abbildung 19: CytoTox-Glo-Zytotoxizitätstest. Zellviabilität [%] von MCF-7 (n=4, 3-fach-Bestimmung) und MDA-MB-231 (n=3, 3-fach-Bestimmung).

Angegeben sind die Moringablattextrakt-Verdünnungen und Konzentrationen der zugegebenen Substanzen, die Zielkonzentration im Well beträgt davon den Faktor 10^{-2} .

Mittelwerte \pm Standardabweichung. * = signifikant ($p < 0,05$).

Bei der MCF-7-Zellreihe sind signifikante Werte für eine wachstumshemmende Wirkung bis zur 10 %-igen Verdünnung ersichtlich, hier ist mit 49 % eine ED_{50} knapp erreicht. Bei der MDA-MB-231-Zelllinie zeigt sich bei 100 %-iger und 50 %-iger Verdünnung ein stärkerer Extrakteinfluss als auf die estrogenrezeptorpositive Zellreihe, wohingegen bei 20 %-iger und 5 %-iger Verdünnung die Hemmung geringer ausfällt; bei 10 %-iger Verdünnung liegt eine signifikante Hemmung von 38,1 % vor.

Unter Einfluss von Tamoxifen und Endoxifen erschien auch hier mit unter 1,5 % verschwindend geringe Viabilität; bei Zusatz von Estradiol lässt sich eine proliferationsfördernde Wirkung auf die MCF-7-Zellen bei einer Viabilität von 121 % beobachten, bei den MDA-MB-231-Zellen eine geringere Auswirkung von 104,9 %.

Bei den Referenzsubstanzen ist bei den MCF-7-Zellen unter Folsäure eine signifikante viabilitätsfördernde Wirkung mit 110,6 % zu erkennen, unter Quercetin eine signifikante Hemmung

auf 49,2 % Viabilität und unter Rutin eine signifikante Hemmung auf 60,3 %. Bei den MDA-MB-231-Zellen trat nur unter Quercetin ein signifikantes Ergebnis von 49,9 % Viabilität auf.

3.3.5 Messung der Glucose- und Lactatkonzentration und des pH-Wertes

Der Metabolismus von Tumorzellen ist charakterisiert durch eine auch unter aeroben Bedingungen ablaufende vermehrte Glykolyse mit Lactatsynthese [22]. Der dadurch bedingte erhöhte ATP-Bedarf wird durch gesteigerte Glucoseaufnahme gedeckt, während Lactat akkumuliert und ein saures Milieu um die Zelle herum schafft [17]. Unter dem Einfluss von störenden oder toxischen Substanzen ist anzunehmen, dass sich dieser Tumormetabolismus verändert.

Zur Darstellung dessen wurden im Folgenden für die beiden Zellreihen einzeln die Parameter Glucose und Lactat in mmol/l als Säulen und der pH-Wert als Graph dargestellt. Auf der x-Achse entspricht die Aufreihung der Testsubstanzen der in den anderen Diagrammen.

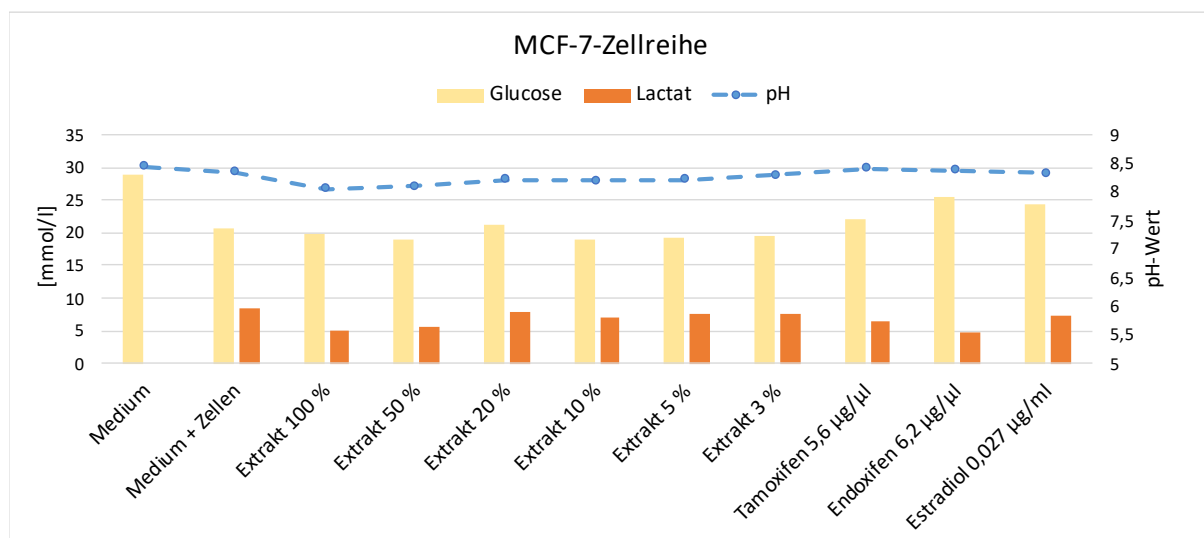


Abbildung 20: Glucose- und Lactatkonzentrationen [mmol/l] sowie pH-Werte von MCF-7 (n=2). Angegeben sind die Moringablattextrakt-Verdünnungen und Konzentrationen der zugegebenen Substanzen, die Zielkonzentration im Well beträgt davon den Faktor 10^{-2} .

Zunächst einmal kann die Aussage gemacht werden, dass beide Zelllinien Stoffwechsel betreiben. Unter ungestörten Bedingungen (als Medium und Zellen dargestellt) wird im Vergleich zum Ausgangsmedium ohne Zellen Glucose verbraucht und Lactat produziert, während der pH-Wert leicht absinkt.

Bei der MCF-7-Zellreihe wird Glucose bei allen Extraktverdünnungen verbraucht, jedoch bei höherprozentigen Extraktkonzentrationen weniger Lactat angehäuft als bei niedrigeren

(Abbildung 20). Unter der Exposition von Tamoxifen und Endoxifen ist ein geringerer Verbrauch von Glucose sowie eine geringe Anhäufung von Lactat zu verzeichnen, während der pH-Wert dem von Medium ohne Zellen entspricht. Unter Zugabe von Estradiol konnte hier kein gesteigerter Metabolismus in Form von vermehrtem Glucoseverbrauch und erhöhter Lactatproduktion beobachtet werden.

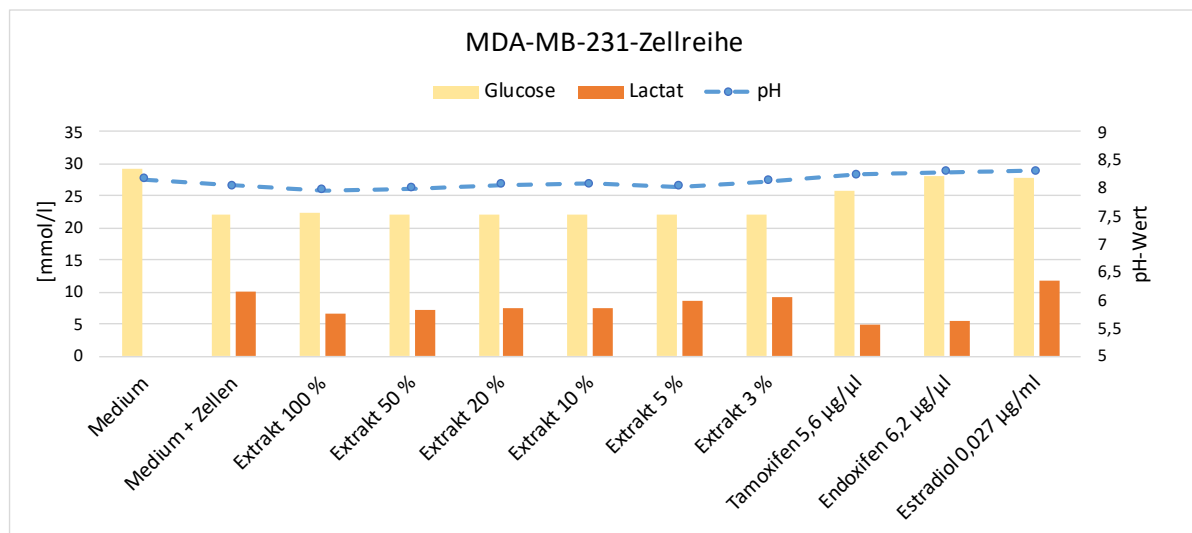


Abbildung 21: Glucose- und Lactatkonzentrationen [mmol/l] sowie pH-Werte von MDA-MB-231 (n=2).

Angegeben sind die Moringablattextrakt-Verdünnungen und Konzentrationen der zugegebenen Substanzen, die Zielkonzentration im Well beträgt davon den Faktor 10^{-2} .

Bei der MDA-MB-231-Zellreihe ist bei den Extraktverdünnungen die Tendenz zu erkennen, dass unter Exposition niedrigprozentiger Verdünnungen mehr Glucose verbraucht und Lactat produziert wird, wobei der pH-Wert teilweise kohärent mit absinkt, teilweise aber auch wie bei 3 %-iger Verdünnung etwas unerwartet ansteigt (Abbildung 21). Unter Exposition von Tamoxifen und Endoxifen wird deutlich, dass weniger Glucose umgesetzt wird und nicht so viel Lactat angehäuft wird, während der pH-Wert nicht absinkt. Bei der Positivkontrolle Estradiol ist eine gesteigerte Lactatsynthese ohne simultanen Glucoseverbrauch ersichtlich, auch der pH-Wert sinkt nicht ab.

4. Diskussion

4.1 Diskussion der High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Die chromatographischen Untersuchungen bestätigten das Vorkommen der in der Literatur zu findenden Inhaltsstoffe Folsäure, Quercetin und Rutin im angefertigten Moringablattextrakt. Dies gelang anhand der übereinstimmenden Retentionszeiten mit den als Referenzsubstanz dienenden synthetischen Reinstoffen, welche unter identischen chromatographischen Bedingungen immer konstant sind und so zur Identifikation von Substanzen in Vielstoffgemischen dienen [85]. Die Flavonoide Daidzein, Genistein, Kämpferol und Isorhamnetin wurden ebenfalls in der Literatur als Bestandteile des *Moringa oleifera* genannt, ließen sich hier jedoch nicht nachweisen [72].

Die Analysemethode HPLC wurde auch in zahlreichen anderen Studien zur Detektion von Bestandteilen in Moringablattextrakten genutzt [8, 72, 88]. Hier variierten die Inhaltsstoffe und Mengen der Flavonoide je nach Ursprungsland, Genpool, Reifegrad der Blätter, Erntezeit und Trockenmethode teilweise sehr stark, weshalb es durchaus möglich ist, dass im vorhandenen Moringablattextrakt diese Flavonoide nicht enthalten sind [72]. Bajpai et alii konnten in ihren Methanol-, Wasser- und Methanol-Wasser-Extrakten aus Moringablattpulver (Pflanze gewachsen in Indien) mittels HPLC Quercetin, Rutin und Kämpferol nachweisen, Genistein und Daidzein dagegen nicht [8]. Zhang et alii bestätigten in einem Ethanolextrakt aus *Moringa oleifera* (Pflanze gewachsen in Florida) neben Rutin auch Carotenoide, Epicatechin und Kumarinsäure [88].

Limitationen ergeben sich folglich aus der Auswahl der vergleichend geprüften Referenzsubstanzen. Hierbei hätte man noch weitere in der Literatur erwähnte Einzelstoffe in *Moringa oleifera* käuflich erwerben und deren Existenz im verwendeten Extrakt dieser Studie prüfen können. Beispielsweise die Polyphenole Gallus- und Chlorogensäure oder das Monosaccharid D-Allose (Näheres in Kapitel 4.3.3. und 4.4).

4.2 Diskussion der Immunhistochemie

Die Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 werden allgemein üblich in *in vitro*-Studien verwendet, um die Wirkung von Substanzen auf estrogen- und progesteronrezeptorpositive und -negative Mammakarzinomzellen zu überprüfen [2, 72, 79, 108, 131]. Die Immunhistochemie ist eine grundlegend etablierte Methode in der onkologischen Pathologie, die Aussagen über Tumorentitäten und histologische Subklassifikationen anhand spezifischer Protein-

expressionsmuster durch Antigen-Antikörper-Reaktionen zulässt. Insbesondere in der Brustkrebsdiagnostik hat sie einen herausragenden Stellenwert inne, da sie durch die Detektion von Hormon- und Wachstumsrezeptoren (ER, PR, HER2/neu) in eine Voraussage über die beste Wahl der Therapie und deren Erfolgsaussichten mit einfließt [66].

Mittels eigener immunhistochemischer Untersuchungen sollte der Rezeptorstatus bestätigt werden und Befürchtungen, dass bei höheren Passagen genomische Instabilität auftritt, ausgeräumt werden.

Die Untersuchungsergebnisse konnten den vom Hersteller deklarierten Rezeptorstatus auch in höheren Passagen bestätigen. In MCF-7-Zellen sammelte sich das rote Reaktionsprodukt bei Zusatz des Estrogenrezeptor-alpha- und -beta-Antikörpers sowie des Progesteron-Rezeptor-Antikörpers intrazellulär an, wohingegen die Zugabe des HER2/neu-Rezeptor-Antikörpers keine Farbreaktion auslöste. MDA-MB-231-Zellen zeigten bei keinem Rezeptor-Antikörper eine Farbreaktion, sodass deren Negativität für diese verifiziert werden konnte (Abbildung 14 und Abbildung 15).

4.3 Diskussion der Zelltests

4.3.1 BrdU-Zellproliferationstest

Der BrdU-Zelltest galt dem Nachweis des Proliferationsverhalten der verwendeten Mammakarzinomzellen unter Einfluss der Testsubstanzen. Eine Quantifizierung der DNA-Synthese war über den Einbau des Pyrimidinanalogons BrdU möglich [111]. Die Ergebnisse offenbarten auf beide Zellreihen eine signifikante Wirkung des Moringablattextraktes abfallend entlang der Verdünnungsreihe. Bei der MCF-7-Zellreihe wurde die Proliferation bei 100 %-igem, 50 %-igem und 20 %-igem Extrakt dabei auf unter 50 % reduziert – womit sich die ED₅₀ erreicht zeigt, während sich bei 10 %-igem und 5 %-igem Extrakt noch eine geringere und doch signifikante, bei 3 %-igem Extrakt hingegen keine signifikante Einschränkung der Proliferation ausmachen ließ (Abbildung 16). Bei der MDA-MB-231-Zellreihe fand bei 100 %-igem und 50 %-igem Extrakt zwar eine stärkere Proliferationsreduktion statt, doch ließ dieser Effekt in der folgenden Verdünnungsreihe insofern nach, als dass schon 20 %-iger Extrakt die ED₅₀ nicht mehr erreichte und 5 %-iger, sowie 3 %-iger Extrakt keine signifikante Wirkung mehr zeigte. Die Negativkontrollen Tamoxifen und Endoxifen sorgten erwartungsgemäß für ein signifikant fast vollständig eingeschränktes Wachstum, die Positivkontrolle Estradiol zeigte die Tendenz einer Proliferationsförderung. Die Referenzsubstanz Folsäure blieb ohne signifikant-

ten hemmenden oder fördernden Einfluss. Die anderen Referenzsubstanzen Quercetin und Rutin wirkten auf die rezeptornegative MDA-MB-231-Zelllinie nicht signifikant hemmend, während auf die MCF-7-Zellreihe eine signifikante Hemmung beider Flavonoide zu verzeichnen war.

Die Literaturrecherche ergab keine vergleichbaren Untersuchungen von Moringablattextrakten mittels BrdU. Antiproliferative Effekte von *Moringa oleifera* auf humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms, sogenannte KB-Zellen, wurden allerdings mittels eines anderen kolorimetrischen Assays präsentiert: ein MTT-Test wies eine um 15 % eingeschränkte Proliferation nach; allerdings nach 48-stündiger Inkubation eines wasserbasierten Extraktes [126]. Eine andere Studie, die ebenfalls den MTT-Test nutzte, zeichnete antiproliferative Effekte von Moringablattextrakten auf Methanol- und Dichlormethan-Basis bei MCF-7-Zellen auf. Hier stellte sich die Proliferation je nach Extraktkonzentration und dessen Lösungsmittel nach 48-stündiger Inkubation auf bis zu 40 % eingeschränkt dar, Dichlormethan zeigte sich dabei potenter als Methanol. Keine der getesteten Konzentrationsstufen der Extrakte wirkte in dieser Studie toxisch auf die ebenfalls untersuchten gesunden humanen Fibroblasten [129].

Die hier verwendete Dosis des Quercetin von 0,15 µg/ml zeigte bei der MCF-7-Zellreihe eine Proliferationsrate von 52,6 %. Bisherige vergleichbare Untersuchungen des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik Rostock wurden mit höheren Konzentrationen Quercetins von 3-30 µg/ml durchgeführt, wobei trotz höherer Konzentrationen keine stärker signifikanten Effekte auftraten.

Die hier gewählte niedrigere Konzentration und ihre eindeutige proliferationseinschränkende Fähigkeit ist als positives Ergebnis im Sinne einer besseren Abbildung des Konzentrationspektrums von Quercetin für eine Annäherung in Richtung minimalster signifikanter Wirkung zu bewerten und führt damit zur Empfehlung, in weiteren Forschungsarbeiten insbesondere die niedrigeren Quercetin-Dosen zu erforschen.

4.3.2 Neutralrot-Zellviabilitätstest

Dieser Zelltest fußt auf dem Prinzip, dass sich der Farbstoff Neutralrot nur dann in den Lysosomen der Zellen ansammelt, wenn die Integrität der Zellmembran erhalten und somit die Zelle vital ist [109]. Dadurch sollte eine quantitative Einschätzung über die Viabilität der Zellen unter Einfluss der Testsubstanzen getroffen werden.

Die Ergebnisse legten dar, dass beide Zellreihen unter Einfluss des 100 %-igen sowie 50 %-igen Moringablattextraktes ebenso signifikant vollständig zum Absterben gebracht wurden wie unter Zugabe von Tamoxifen und Endoxifen (Abbildung 17). Bei keiner der beiden Zellreihen konnte in den anderen Extraktverdünnungen eine ED_{50} erzielt werden. Die Referenzsubstanzen zeigten bei beiden Zellreihen weder signifikanten proliferationsfördernden noch -hemmenden Einfluss.

Eine polnische Forschergruppe um Kabala-Dzik untersuchte die Wirkung von Flavonoiden auf die gleichen Zellreihen mittels Neutralrottest. Hierbei hatte Quercetin in allen getesteten Konzentrationen nach 48 Stunden einen größeren zytotoxischen Effekt als nach 24 Stunden Inkubation und auf die estrogenrezeptorpositive MCF-7-Zellreihe mehr zytotoxischen Einfluss als auf die estrogenrezeptornegative MDA-MB-231-Zellreihe [55]. Die stärkere Wirkung auf die MCF-7-Zellen war in meinen Untersuchungen nicht zu beobachten, wengleich eine längere Inkubation in weiteren Tests eine andere Wirkung demaskieren könnte.

Parvathy et alii untersuchten die Wirkung verschiedener Moringablattextrakte mittels Neutralrot-Test auf menschliche Myelomzellen und verglichen sie mit der Wirkung eines Extraktes des Madagaskar-Immergrüns *Vinca rosea* – der Ursprungspflanze der heute in der Chemotherapie verwendeten Vincaalkaloide. Bei diesen Untersuchungen zeigte sich insbesondere der Methanolextrakt am potentesten und verursachte in allen Konzentrationen eine Viabilitätseinschränkung um 88-98 % und zeigte sich somit wirksamer als der Extrakt aus *Vinca rosea*. Die Ergebnisse decken sich insofern mit meinen Ergebnissen, als dass auch hier der 100 %-ige und 50 %-ige Extrakt eine so deutliche Viabilitätseinschränkung der Zellen ausüben konnte. Hieraus erwächst die Annahme, dass in *Moringa oleifera* Bestandteile mit ähnlicher Wirksamkeit wie Vincristin oder Vinblastin existieren und für den medizinischen Gebrauch zunutze gemacht werden könnten [94].

4.3.3 CellTiter-Glo-Zellviabilitätstest

Dieser Lumineszenz-Assay ermöglicht eine Quantifizierung lebender Zellen anhand der Messung des Adenosintriphosphats [100]. Die Ergebnisse zeigten, dass der Moringablattextrakt entlang der Verdünnungsreihe auf beide Zellreihen signifikant Einfluss nehmen konnte, wobei der umschriebene Effekt in niedriger prozentigen Verdünnungen auf die estrogenrezeptorpositive MCF-7-Zellreihe ausgeprägter war, als auf die estrogenrezeptornegative MDA-MB-231-Zellreihe (Abbildung 18). Von den Referenzsubstanzen zeigte lediglich Quercetin auf die

MCF-7-Zellen eine signifikante Viabilitätseinschränkung auf 72 %. Im Vergleich zum BrdU- und Neutralrot-Test ließ sich hier der zytotoxische Effekt entlang der Verdünnungsreihe feiner differenziert aufnehmen.

Eine südafrikanische Forschergruppe nutzte ebenfalls den CellTiter-Glo-Test zur Untersuchung des Effekts eines wasserbasierten Moringablattextraktes auf menschliche Ösophaguskarzinomzellen, wobei sich nach 24 Stunden Inkubation eine Reduktion des zellulären ATPs um knapp 40 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle manifestierte. Die gleiche Studie zeigte mittels weiterer Zelltests ein vermehrtes Auftreten von DNA-Schäden und die Anhäufung von Malondialdehyd, welches als Endprodukt der Lipidoxidation einen Biomarker für oxidativen Stress darstellt. Hierbei wurde diskutiert, dass *Moringa oleifera* über die enthaltenen Polyphenole wie die Gallus- und Chlorogensäure prooxidativ wirkt und in Kombination mit den zahlreichen DNA-Schäden über die Mitochondrien die Apoptose über den intrinsischen Signalweg induziert. Aus dem Mitochondrium wird Cytochrom C freigesetzt, welches mit ATP und dem Apoptotic protease-activating factor 1 (Apaf-1) ein Apoptosom formt, welches schließlich die Spaltung und Aktivierung von Caspase-9 veranlasst. Untermauert wird diese Annahme von der verringerten ATP- und gesteigerten Caspase-9-Konzentration im dortigen Testaufbau [133].

Die auch in diesem Zelltest offenbare antikanzerogene Wirkung Quercetins (sichtbar als Viabilität von 72 %) mag, wie beispielsweise durch Tao et alii demonstriert, unter anderem auf einer Hochregulation von mit Brustkrebs-assoziiierter Mikro-RNA (miRNA) beruhen. 50 % dieser miRNA-Gene sind in tumorassoziierten, fragilen Genabschnitten lokalisiert und zeigten sich in verschiedenen Tumortypen reduziert. Eine Hochregulation von miR-146a, wie sie durch Quercetin erfolgt, induziert Apoptose über verschiedene Signalwege; simultan erschienen Caspase-3 erhöht und die Expression des EGF-Rezeptors reduziert. Diese miRNA könnte demnach wie ein Tumorsuppressorgen agieren und auch die in meinen Untersuchungen auftretende Viabilitätseinschränkung der Zellen durch Quercetin erklären [131]. Die Fähigkeit von Flavonoiden als Protonophoren zu fungieren und so die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien zu entkoppeln (Kapitel 1.2.4), sei hier ebenfalls als zytotoxisches Potenzial genannt [61].

Die differenziertere Abstufung der Viabilität entlang der Verdünnungsreihe im Vergleich zum BrdU- und Neutralrot-Zelltest lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass der CellTiter-

Glo als ATP-Lumineszenztest als am sensitivsten gilt und somit im Stande ist, bereits feinste Einflüsse abzubilden (Kapitel 4.5).

4.3.4 CytoTox-Glo-Zytotoxizitätstest

Dieser Zelltest dient der Quantifizierung lebender Zellen mit Hilfe einer mit Zytotoxizität assoziierten Protease. Das lumineszierende Signal des Reaktionsproduktes kann vor und nach Gabe eines abtötenden Reagenz gemessen werden und lässt so die Berechnung der lebenden Zellen zu [100].

Die Ergebnisse in Abbildung 19 zeigten, dass beide Zellreihen abgestuft entlang der Extraktverdünnungsreihe bis zur 10 %-igen Verdünnung signifikant stärker hemmend wirken als im Sinne einer ED_{50} notwendig. Unter Einfluss von Tamoxifen, Endoxifen und Estradiol zeigte sich Zelltod beziehungsweise gefördertes Wachstum der Erwartung entsprechend. Folsäure wies auf MCF-7-Zellen einen signifikant viabilitätsfördernden Einfluss auf, Quercetin und Rutin traten in diesem Test mit Viabilitäten von 49,92 % und 60,3 % am einflussstärksten im Vergleich zu den anderen Zelltests auf. Bei der MDA-MB-231-Zelllinie wirkte unter den Referenzsubstanzen Quercetin signifikant proliferationshemmend mit 49,9 %; dieser Effekt präsentierte sich in den anderen Zelltests nicht.

Leider ließen sich keine vergleichbaren Studien zum CytoTox-Glo-Zytotoxizitätstest finden. Eine Verwendung wird – wie hier erfolgt – in Zusammenhang mit anderen Zelltests empfohlen, um einen auf Basis mehrerer Untersuchungen ruhenden Gesamttrend generieren zu können [83].

4.3.5 Messung der Glucose- und Lactatkonzentration und des pH-Wertes

Die metabolischen Untersuchungen zeigten, dass die Tumorzellen im Vergleich zum Medium ohne Zellen eine Abnahme der Glucosekonzentration sowie Produktion von Lactat herbeiführten (Abbildung 20 und Abbildung 21). Dieses für maligne Zellen charakteristische Merkmal des Warburg-Effekts, unabhängig der Sauerstoffzustände vermehrten Stoffwechsel im Sinne einer Glykolyse mit Lactatsynthese zu betreiben, erwies sich somit als bestätigt (Kapitel 1.1.3) [17, 22]. Bei beiden Zellreihen zeigte sich unter Einfluss der Negativkontrollen Tamoxifen und Endoxifen eine geringe Lactatproduktion einhergehend mit wenig Glucoseverbrauch, sodass von einem raschen Absterben der Zellen ausgegangen werden kann. Übereinstimmend hiermit beschrieben Kallio et alii 2005, dass schon 5-7 μM Tamoxifen bei den Zellreihen MCF-7 und

MDA-MB-231 innerhalb von 60 Minuten zum Zelltod führen [56]. Die leichten Schwankungen in den Glucose- und Lactatkonzentrationen entlang der Extraktverdünnungsreihe suggerieren ein schnelleres Absterben und damit verbundenen reduzierteren Metabolismus in 100 %-igem und 50 %-igem Extrakt im Vergleich zu den weiteren Verdünnungen.

Die pH-Wert-Bestimmung ergab ausschließlich pH-Werte im basischen Bereich. Dies könnte dadurch begründet sein, dass aus Kulturmedien bei längerem Aufenthalt außerhalb des Brutschranks Kohlendioxid entweicht und somit der pH-Wert ansteigt [76]. Wenngleich durch zügiges Arbeiten ein solcher Effekt minimiert werden sollte, ist er sicherlich nicht gänzlich auszuschließen. Nichtsdestotrotz zeigten die gemessenen Werte mit geringer Dynamik die Tendenz, dass bei vermehrter Bildung des sauren Lactats der pH-Wert folglich absinkt.

4.4 Übersicht zur Wirkung des Moringablattextraktes

Moringa oleifera hat sich in der traditionellen Medizin sowie in der modernen Wissenschaft als „Wunderbaum“ mit seinen zahlreichen bioaktiven Inhaltsstoffen einen Namen gemacht. Grund hierfür ist neben anderen Bestandteilen auch sein Reichtum an Phytoestrogenen, die über estrogenrezeptorabhängige aber auch -unabhängige Mechanismen antiproliferative Einflüsse auf Krebszellen gezeigt haben [61, 64, 65, 72, 92, 95].

In der Übersicht der Ergebnisse fällt auf, dass in allen Zelltests eine deutliche Tendenz einer dosisabhängigen Wirkung des Moringablattextraktes auf beide Zellreihen zu verzeichnen ist (Kapitel 3.3). Diese Tendenz variiert allerdings im Ausmaß und in der Abstufung unter den verschiedenen Zelltests. Außerdem lässt sich keine eindeutige Präferenz aus den Versuchen ableiten, auf welche Zellreihe die Extrakte einen ausgeprägteren Effekt entfalten, obwohl dies durch die unterschiedliche Rezeptorausprägung hätte vermutet werden können. Mal ist der Einfluss auf die rezeptornegative MDA-MB-231-Zellreihe größer, mal aber auch auf die rezeptorpositive MCF-7-Zellreihe. So schränkt beispielsweise der Moringablattextrakt in 100 %-iger und 50 %-iger Verdünnung die Proliferation der MDA-MB-231-Zellen im BrdU-Zelltest stärker ein als die der MCF-7-Zellen (Abbildung 16). Diese Beobachtung lässt sich auch mit Blick auf den CytoTox-Glo-Zelltest machen, wobei dann bei beiden Zelltests (BrdU- und CytoTox-Glo-Zelltest) entlang der Verdünnungsreihe die stärker eingeschränkte Zellreihe wechselt (Abbildung 16 und Abbildung 19). Beim CellTiter-Glo-Zelltest ist der Effekt des 100 %-igen und 50 %-igen Extrakt zunächst nahezu kongruent für beide Zellreihen, während sich erst in den anderen Verdünnungen eine stärkere Auswirkung auf die MCF-7-Zellreihe zeigt (Abbildung 18). Bei

dem Neutralrot-Zelltest reagieren beide Zellreihen auf 100 %-igen und 50 %-igen Extrakt mit vollständigem Absterben, während die anderen Verdünnungen kaum mehr eine Abstufung wie bei den anderen Zelltests zeigen (Abbildung 17).

Sicherlich unterscheiden sich die Zelltests allein durch ihre Ansatzpunkte und Nachweisprinzipien, was Unterschiede insbesondere im Ausmaß der stufenweisen Graduierung bedingen könnte. Der BrdU-Zelltest quantifiziert die DNA-Synthese, der Neutralrot-Test beruht auf Membranintaktheit und bestehendem Protonengradienten, während der CellTiter-Glo-Zelltest ATP nachweist und der CytoTox-Glo-Zelltest sich eine mit Zytotoxizität assoziierte Protease zunutze macht (Kapitel 2.6). Dem Abschnitt Methodenkritik sei an dieser Stelle bereits vorweggenommen, dass der CellTiter-Glo-Zelltest als am sensitivsten gilt und daher womöglich am feinsten den dosisabhängigen Effekt des Moringablattextraktes präsentieren kann (Kapitel 4.5).

Weiterhin ist es nicht möglich eine eindeutig ausgeprägtere Wirkung auf eine der beiden Zellreihen auszumachen. Dies lässt vermuten, dass estrogenrezeptorunabhängige Wirkmechanismen der Phytoestrogene und weiterer unbekannter Inhaltsstoffe des Extraktes maßgeblich verantwortlich für seine Wirkung sind. Zur Wirkung in Abhängigkeit des Estrogenrezeptors von *Moringa oleifera* lassen sich keine Studien finden. Allerdings wurde in einer Studie schon die Wirkung auf estrogenrezeptorpositive MCF-7-Zellen demonstriert und in einer anderen Studie unter gänzlich anderen Bedingungen (Lösungsmittel und Herstellung des Extraktes, verwendete Zelltests) die Wirkung auf estrogenrezeptornegative MDA-MB-231 Zellen [2, 129]. Dies spricht dafür, dass *Moringa oleifera* auf beide auch hier verwendete Zellreihen schon wirksam war, jedoch kein Fokus im möglichen Unterschied einer rezeptorabhängigen Wirkung lag.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der Referenzsubstanzen ist erkennbar, dass diese auf die MDA-MB-231-Zellreihe lediglich im CytoTox-Glo-Zelltest einmalig unter Exposition von Quercetin einen signifikanten Effekt in Form von herabgesetzter Viabilität zeigen (Abbildung 19). Bei der MCF-7-Zellreihe lässt sich im BrdU-Zelltest unter Exposition von Quercetin und Rutin eine deutliche signifikante Proliferationseinschränkung ausmachen, die im CytoTox-Glo-Zelltest noch deutlicher als Viabilitätseinschränkung sichtbar wird (Abbildung 16 und Abbildung 19). Im CellTiter-Glo-Zelltest ist die Viabilitätseinschränkung nur für Quercetin signifikant und weniger stark ausgeprägt (Abbildung 18). Im Neutralrot-Zelltest tritt gar kein signifikanter

Einfluss der Referenzsubstanzen hervor (Abbildung 17). Folsäure präsentierte nur ein einziges Mal signifikanten viabilitätsfördernden Einfluss auf die MCF-7-Zellreihe im CytoTox-Glo-Zelltest (Abbildung 19).

Diese Beobachtungen lassen die Tendenz erkennen, dass die Wirkung der Referenzsubstanzen zu großen Teilen estrogenrezeptorabhängig vonstatten gehen mag, da sich die MCF-7-Zellen so viel mehr beeinflusst zeigen. Dies deckt sich für Rutin und Quercetin mit der im einleitenden Teil beschriebenen antiproliferativen Wirkung der Flavonoide über eine Aktivierung und Induktion des ER-beta auf Brustkrebszellen (Kapitel 1.2.4). Die Ergebnisse zum Effekt der Folsäure legen nahe, dass die eingangs erwähnte Befürchtung einer Unterstützung von malignem Wachstum durch eine zusätzliche Supplementation über die Norm hinaus auch hier in Anfängen eintritt. Anzumerken ist allerdings, dass die gewählte Konzentration deutlich höher ist, als die mittels ergänzender klinisch chemischer Analyse ermittelte tatsächliche Konzentration im Moringablattextrakt. Diese lag bei 467,8 µg/l und liegt damit selbst bei einem Liter konsumierten Moringablattextrakt unterhalb des unbedenklichen maximalen täglichen Konsums, der mit 634 µg/Tag für Erwachsene beschrieben wurde [35]. Daher lässt sich aus diesem Ergebnis für die Wirkung des Moringablattextraktes soweit keine Gefahr ableiten.

Darüber hinaus führen die sehr variierenden Ergebnisse, auch da sie in der Einschränkung der Lebensfähigkeit der Zellen im Durchschnitt unter der des Moringablattextraktes bleiben, zu der These, dass die hauptsächliche Wirkung dessen auf anderen Bestandteilen im Moringablattextrakt als den nachgewiesenen Referenzsubstanzen beruht. Hierbei ist zu beachten, dass keine quantitative Aussage getroffen werden kann und soll, da die Referenzsubstanzen nur qualitativ im Extrakt nachgewiesen wurden und die getesteten Konzentrationen der synthetisch hergestellten Referenzsubstanzen daher sehr wahrscheinlich vom tatsächlichen Gehalt im Extrakt abweichen. Eine mögliche Erklärung für den starken Effekt des Moringablattextraktes ist, dass synergistische Effekte anderer, nicht selbst nachgewiesener und einzeln getesteter Phytoestrogene die ausgeprägte Wirkung hervorbringen könnten. Diesen Sachverhalt der synergistischen Wirkverstärkung haben bereits mehrere Forschergruppen beobachtet (Kapitel 1.2.4). Aufgrund des Reichtums an bioaktiven Komponenten in Moringa oleifera kommen für seine Wirkung letztlich zahlreiche Stoffe in Betracht.

Die Forschungsgruppe um Al-Asmari et alii registrierte in Zusammenhang mit ihren Ergebnissen zur zytotoxischen Wirkung eines Moringablattextraktes auf MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen, zu der auch eine Einschränkung der Zellmotilität und Koloniebildung gehörte,

mögliche verantwortliche Inhaltsstoffe [2]. Ihr Extrakt auf Ethanolbasis enthielt nachweislich das seltene Monosaccharid D-Allose, welches sich schon als Zellzyklusarrest-induzierend bei hepatozellulären Karzinomzellen erwies [2, 142]. Parallel wirkte die dort zusätzlich nachgewiesene Palmitinsäure *in vivo* selektiv zytotoxisch auf menschliche Leukämiezellen in Mäusen [2]. Um die bereits in der Diskussion der Zelltests angesprochenen Aspekte wieder aufzugreifen, soll außerdem auf die apoptoseinduzierende Wirkung der Gallus- und Chlorogensäure hingewiesen werden (Kapitel 4.3.3). Interessant für weitergehende Untersuchungen wäre daher die Detektion weiterer Bestandteile im gegebenen Moringablattextrakt und deren selektive Testung.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mithilfe dieser Forschungsarbeit die Aussage getroffen werden kann, dass *Moringa oleifera* in Form eines Ethanolextraktes *in vitro* dazu in der Lage ist, sowohl auf estrogenrezeptorpositive als auch auf estrogenrezeptornegative Mammakarzinomzellen proliferations- und viabilitätshemmend zu wirken. Außerdem scheint es, dass diese Wirkung sich nicht ausschließlich durch die ebenfalls getesteten Referenzsubstanzen begründet.

Weitergehende *in vitro*-Untersuchungen könnten eine Kombination des Moringablattextraktes mit niedrig dosierterem Tamoxifen prüfen, um mögliche synergistische Effekte zu registrieren wie sie in der Art schon bei einzelnen Flavonoiden beobachtet wurden (Kapitel 1.3.3 und 1.3.4). Auf diese Weise wäre eine Einsparung des nebenwirkungsreichen Tamoxifen denkbar.

Darüber hinaus ist es sinnvoll, *in vivo* zu überprüfen, ob eine vergleichbare Wirksamkeit besteht und auszuschließen, dass unerwünschte Effekte auftreten, um einen therapeutischen Nutzen in der Mammakarzinomtherapie zu differenzieren. Hierzu wäre in der Zukunft beispielsweise eine subkutane Injektion wie bei dem bereits untersuchten Mistelextrakt denkbar, um eine individuell unterschiedliche metabolische Transformation im Rahmen des First-Pass-Effektes zu vermeiden (Kapitel 1.2.5) [13, 18]. Zunächst bietet sich hierfür auch ein Xenograft Mausmodell an, in dem bisher kein reiner Moringablattextrakt auf den Prüfstand gestellt wurde (Kapitel 1.3.1) [75]. Außerdem könnte eine weitergehende Analyse der Inhaltsstoffe des Extraktes Rückschlüsse darauf geben, welche weiteren Bestandteile für die antikanzerogene Wirkung maßgeblich verantwortlich sind und gegebenenfalls auch als synthetisch produzierbare Reinsubstanz antitumorales Potenzial innehat.

5. Methodenkritik

Die Extrakterstellung beruhte auf laborinternen Standards und sollte ein möglichst schonendes Auflösen der Bestandteile gewährleisten. Das Filtrieren geschah vor dem Hintergrund, dass Schwebeteilchen die Säule in der HPLC obstruieren und Messergebnisse der Zelltests verfälschen. Die ursprüngliche Konzentration bei Herstellung des Extraktes von 2 g Moringablattpulver auf 20 ml Ethanol 70 % kann nicht als Konzentration für den bei der Messreihe verwendeten Extrakt herangezogen werden. Durch die Anwendung verschiedener Zubereitungsverfahren (Mikrowelle, Abpipettieren des flüssigen Überstandes, Filtrieren, Zentrifugal-Konzentrator) hat sich die Konzentration des Extraktansatzes aus *Moringa oleifera* notwendigerweise verändert, da zum Beispiel Ethanol, Wasser und die enthaltenen Wirkstoffe nicht in gleichen Teilen verdampfen bzw. reduziert werden. Für die durchgeführten Versuche ist somit bei einer Interpretation der Ergebnisse zu beachten, dass die tatsächliche Moringablattextrakt-Konzentration von der ursprünglichen abweicht, jedoch bei allen Versuchsreihen der reine Extrakt sowie die abgestufte Verdünnungsreihe identisch war. Da die Untersuchungen im Rahmen dieser Dissertation vor allem eine qualitative Aussage hinsichtlich einer Tendenz der Wirkung von *Moringa oleifera* treffen soll, ist die Konzentration in diesem ersten Schritt nicht von oberster Priorität. Außerdem wären die für eine korrekte Berechnung notwendigen Versuchsaufbauten nicht gegeben gewesen (Auffangapparaturen sowie Analyseverfahren für die flüchtigen Stoffe). Für weiterführende Aussagen zu Wirkstoffkonzentration und Überlebenseinschränkung der Zellen mit entsprechender klinischer Einordnung ist eine solche Berechnung allerdings von großem Wert.

Die HPLC ist ein international etabliertes Analyseverfahren zur Detektion von Bestandteilen in Stoffgemischen [38, 72]. Auch für Moringablattextrakte im Speziellen wurde es vielfach von anderen Forschergruppen verwendet. Limitationen ergeben sich hierbei zum einen aus der Varianz in Vorhandensein und Ausmaß der Inhaltsstoffe (z. B. Flavonoide) je nach Ursprungsland, Genpool, Reifegrad der Blätter, Erntezeit und Trockenmethode [72]. Zum anderen begrenzt die Auswahl der vergleichend geprüften Referenzsubstanzen die Untersuchungsergebnisse (Kapitel 4.1).

Der Einfluss des Moringablattextraktes wurde auf beide Zellreihen mittels verschiedener Zelltests untersucht. Diese charakterisierten die Wirkung anhand verschiedener Parameter für Zellviabilität und -proliferation. Der BrdU-Proliferationstest dient der Quantifizierung von Zellproliferation anhand des Einbaus eines messbaren Substrates anstelle von Thymidin bei der

DNA-Synthese. Seine Verwendung ist für die Feststellung von inhibitorischen oder stimulierenden Effekten von verschiedensten Verbindungen auf Zellen vorgesehen [111]. Der Neutralrot-Viabilitätstest quantifiziert lebende Zellen auf der Grundlage einer intakten Zellmembran und wird ebenfalls dazu verwendet, Einflüsse von Testsubstanzen auf das Überleben von Zellen zu messen [94, 109].

Der CellTiter-Glo-Zelltest ist ein Lumineszenztest aus der Gruppe der ATP-Quantifizierungszelltests und ist am weitesten verbreitet für die Bestimmung lebender Zellen im Rahmen von *in vitro*-Studien. Er gilt als schnellster und sensitivster Viabilitätstest und ist besonders wenig anfällig für Artefakte. Von Vorteil ist, dass keine Inkubation mit Umsetzung eines messbaren Substrates notwendig ist, wodurch etwaige Handhabungsfehler bei Zwischenschritten und erneuter Lagerung im Brutschrank minimiert werden [83]. Den Ergebnissen von diesem Zelltest vermag besondere Bedeutung beigemessen werden.

Der CytoTox-Glo-Zelltest ist ebenfalls ein Lumineszenztest, der lebende Zellen anhand der Aktivität einer mit Zytotoxizität assoziierten Protease quantifizieren kann, indem vor und nach vollständigem Abtöten gemessene Werte verrechnet werden [100].

Die Kombination von Zelltests, die auf unterschiedlichen Prinzipien beruhen, aber eine sehr ähnliche inhaltliche Aussage treffen können, ist wichtig, um einen validen Gesamttrend abzeichnen zu können [83].

6. Ausblick

Die Suche nach potenten Arzneimitteln im Kampf gegen Brustkrebs, die sich zeitgleich wenig schädlich gegenüber dem gesunden Körper zeigen, ist in der heutigen Zeit in einer immer älter werdenden Gesellschaft präsenter denn je. Denkt man beispielsweise an die Taxane und Vincaalkaloide, wird deutlich, dass die Entwicklung von Wirkstoffen aus Pflanzen und den in ihnen vorhandenen genuinen Leitsubstanzen in der modernen Medizin nach wie vor von großer Bedeutung ist (Kapitel 1.1.6). In der komplementären Therapie zur Linderung unerwünschter Arzneimittelwirkungen der Mammakarzinomtherapie zeigte sich ein Mistel-extrakt in der subkutanen Anwendung bereits vielversprechend. Gerade jene unerwünschte Arzneimittelwirkungen lassen Patientinnen während einer langjährigen Tamoxifen-Therapie nach komplementären Maßnahmen suchen (Kapitel 1.1.5).

Phytoestrogene stehen im Verdacht, über eine vorwiegende Bindung an den Estrogenrezeptor-beta sowie andere Wirkmechanismen eine antitumorale Wirkung gegen Brustkrebs entfalten zu können (Kapitel 1.2.4). *Moringa oleifera* – reich an Phytoestrogenen und anderen bioaktiven Komponenten – zeigte gegenüber zahlreichen Krankheiten einen protektiven Einfluss.

Diese Forschungsarbeit bestätigte den zytotoxischen Effekt der Moringablätter in Form eines Ethanolextraktes *in vitro* auf eine hormonrezeptorpositive und eine hormonrezeptornegative Mammakarzinomzelllinie. Es zeigte sich eine deutliche dosisabhängige Wirkung auf beide Zellreihen, wobei nicht von einer rein rezeptorabhängigen Wirkung ausgegangen werden kann, da sich kein ausgeprägter Effekt auf die hormonrezeptorpositive Zellreihe ausmachen ließ. Die einzelnen Referenzsubstanzen lagen in ihrer Wirkung weit hinter der des Moringablattextraktes.

Somit bleibt für weitere Forschungsarbeiten festzustellen, welche Bestandteile für die deutliche Wirkung des Moringablattextraktes verantwortlich sind. Hierfür kommen besonders das Monosaccharid D-Allose, die Palmitinsäure sowie die Gallus- und Chlorogensäure infrage (Kapitel 4.4). Auch wäre mittels entsprechender Auffangbehältnisse und Analyseverfahren für flüchtige Stoffe eine Berechnung der tatsächlichen Moringablattextrakt-Konzentration für eine verlässlich einheitliche Wirkdosis in weiteren Studien wichtig. Darüber hinaus wäre ein Vergleich unterschiedlicher *Moringa oleifera*-Pflanzen aus unterschiedlichen Ursprungsländern hilfreich, um den wirkungsreichsten Pflanzengenpool zu identifizieren, da hier offenbar Unterschiede in den enthaltenen Bestandteilen bestehen (Kapitel 4.1).

Studien wiesen auch auf synergistische Effekte von Flavonoiden und etablierten Zytostatika hin. Beispielsweise erhöhte Quercetin *in vitro* die Chemosensitivität von Brustkrebszellen für Doxorubicin (Kapitel 1.3.3) und unter Einfluss von Rutin trat eine verminderte Resistenzentwicklung gegen und eine erhöhte Chemosensitivität für Cyclophosphamid und Methotrexat in MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen auf (Kapitel 1.3.4). Insofern wäre eine *in vitro*-Testung von dem Moringablattextrakt (und seinen in dieser Studie nicht untersuchten einzelnen Bestandteilen) in Kombination mit Zytostatika wie Tamoxifen von Nutzen, um beispielsweise dank synergistischer Wirkverstärkung die Dosis des etablierten Medikaments reduzieren zu können. Auf diese Weise könnten weniger Nebenwirkungen resultieren, was wiederum die Compliance der Patientinnen erhöhen würde.

Darüber hinaus wäre eine *in vivo*-Testung des Moringablattextraktes im Rahmen eines Xenograft Mausmodells sinnvoll, um den erwünschten Effekt in einem vollständigen Organismus zu bestätigen und mögliche unerwünschte Wirkungen zu detektieren (Kapitel 1.3.1). Schließlich wäre eine klinische Studie zur subkutanen Applikation eines Moringablattextraktes ähnlich eines Mistelextraktes denkbar (Kapitel 1.1.6).

Bisherige Forschungen und auch die hier generierten Untersuchungsergebnisse zeigen, dass es aufgrund der deutlichen zytotoxischen Wirkung auf beide Brustkrebszelllinien medizinisch lohnenswert sein kann, die Wirkung von *Moringa oleifera* zukünftig weiter zu entschlüsseln.

Thesen der Dissertation

„Vergleichende Untersuchungen zum Einfluss eines Moringablattextraktes auf hormonrezeptorpositive und hormonrezeptornegative Mammakarzinomzellen (MCF-7 und MDA-MB-231)“

1. Das Mammakarzinom ist der häufigste maligne Tumor der Frau in den westlichen Ländern.
2. Die Zelllinie MCF-7 gehört zum Luminal A-Subtyp und exprimiert den Estrogen- sowie den Progesteronrezeptor; den HER2/neu-Rezeptor dagegen nicht.
3. Die Zelllinie MDA-MB-231 gehört zum basalen Subtyp und exprimiert weder den Estrogen- oder Progesteronrezeptor noch den HER2/neu-Rezeptor.
4. Phytoestrogene sind Pflanzenstoffe, die über estrogenrezeptorabhängige und -unabhängige Wirkmechanismen verfügen.
5. Phytoestrogene haben das Potenzial, Tumorwachstum einzuschränken.
6. *Moringa oleifera* enthält Phytoestrogene und andere bioaktive Bestandteile.
7. Anhand der Zelltests BrdU, Neutralrot, CellTiter-Glo und CytoTox-Glo können Proliferation und Viabilität von Zellen *in vitro* beurteilt werden.
8. Der Moringablattextrakt zeigt auf beide Zellreihen einen dosisabhängigen zellabtötenden Effekt.
9. Die Referenzsubstanzen Folsäure, Quercetin und Rutin beeinflussen beide Zellreihen deutlich weniger stark als das Vielstoffgemisch Moringablattextrakt.
10. Eine antitumorale Wirkung des Moringablattextraktes ist für weitere *in vivo*-Untersuchungen von großem Interesse.

Publikation

Posterpräsentation auf der 133. Tagung der Norddeutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (NGGG) in Lüneburg am 14. Juni 2019.



Vergleichende Untersuchungen zum Einfluss eines Moringablattextraktes auf hormonrezeptorpositive und hormonrezeptornegative Mammakarzinomzellen (MCF-7 und MDA-MB-231)

Oelbe I, Hlawka W, Gerber B, Reimer T, Richter D-U.

Universitätsmedizin Rostock, Universitätsfrauenklinik, Südring 81, 18059 Rostock

Einleitung

Schon vor 5000 Jahren wurde Moringa Oleifera in Indien in der traditionellen ayurvedischen Heilkunst eingesetzt. Ziel dieser Studie soll es sein, eine mögliche zytotoxische und antiproliferative Wirkung eines Moringablattextraktes auf zwei humane Mammakarzinomzelllinien in vitro zu untersuchen. Die gewonnenen Resultate mögen als Anhaltspunkt für eine potenzielle komplementäre Therapie des Mammakarzinoms dienen¹.

Material und Methoden

Die Herstellung des Ethanolextraktes aus Moringablattpulver erfolgte mit Hilfe eines Mikrowellenverfahrens. Dieser Extrakt wurde durch eine Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC) analysiert, ebenso wie verschiedene kommerziell erworbene synthetische Reinsubstanzen als Referenzen, sodass eine qualitative Aussage über deren Vorhandensein im Extrakt getroffen werden konnte². Der Hormonrezeptorstatus der beiden Zelllinien bestätigte sich in einer Immunhistochemie. Die Wirkungen des Extraktes, der Referenzen Quercetin, Rutin und Folsäure sowie der Positiv- und Negativkontrollen Estradiol, Tamoxifen und Endoxifen wurden durch Zellviabilitäts- (CellTiter-Glo®, Promega und Neutralrottest, Sigma Aldrich), Zellproliferations- (BrdU, Roche) und Zytotoxizitätsteste (CytoTox-Glo™, Promega) bestimmt. Außerdem ergaben die Bestimmungen von pH-Wert sowie Glukose- und Laktatkonzentration Hinweise auf den Zellmetabolismus.



Abb. 1: Herstellung des Moringablattextraktes: Der Moringa oleifera Baum (links), die Blätter (Mitte links) über das erworbene Moringa Blätterpulver (Mitte rechts) bis hin zum Extrakt (rechts).

Ergebnisse

Der Extrakt wirkte auf beide Zelllinien mit zunehmender Konzentration deutlich zytotoxisch sowie antiproliferativ. Im Extrakt wurden Quercetin, Rutin und Folsäure nachgewiesen. Von diesen Referenzstoffen zeigten bei der MCF 7-Zelllinie Quercetin und Rutin zytotoxische und antiproliferative Wirkungen, Folsäure eine proliferative. Bei der MDA-MB-231-Zelllinie waren diese Effekte schwächer ausgeprägt.

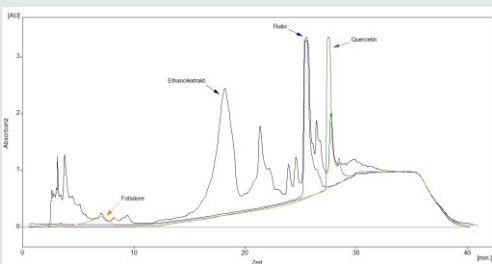


Abb. 2: HPLC: Aufgetragen ist das Chromatogramm des ethanolischen Moringablattextraktes und die verwendeten Referenzsubstanzen.

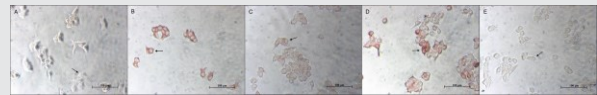


Abb. 3: Immunhistochemie der MCF-7-Zelllinie. A: Negativkontrolle, B: Estrogen-Rezeptor α (pos.), C: Estrogen-Rezeptor β (pos.), D: Progesteron-Rezeptor (pos.), E: *cerbB2*-Rezeptor (neg.) Die Pfeile markieren beispielhaft Zellen.



Abb. 4: Immunhistochemie der MDA-MB-231-Zelllinie. A: Negativkontrolle, B: Estrogen-Rezeptor α (neg.), C: Estrogen-Rezeptor β (neg.), D: Progesteron-Rezeptor (neg.), E: *cerbB2*-Rezeptor (neg.) Die Pfeile markieren beispielhaft Zellen.

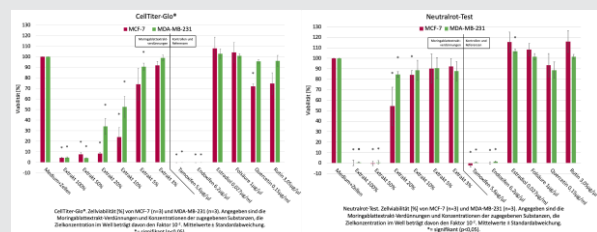


Abb. 5: CellTiter-Glo®. Zellviabilität [%]

Abb. 6: Neutralrot-Test. Zellviabilität [%]

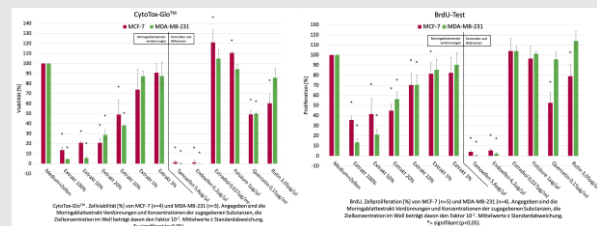


Abb. 7: CytoTox-Glo™. Zellviabilität [%]

Abb. 8: BrdU-Test. Zellproliferation [%]

Schlussfolgerung

Aus den Ergebnissen resultiert eine eindeutige Wirkung des Extraktes auf die beiden Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MDA-MB-231, die Rückschlüsse auf eine mögliche Relevanz in der Therapie des Mammakarzinoms zulässt. Gegenstand von weiteren Forschungsarbeiten könnte sein, Moringa Oleifera auf weitere Inhaltsstoffe zu prüfen, die für die nachgewiesene Wirkung möglicherweise eher verantwortlich sind als die hierfür selektierten Referenzen.

Literatur

- Hui C, Qi X, Qianying Z, Xiaoli P, Jundong Z, Mantian M (2013) Flavonoids, flavonoid subclasses and breast cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. *PLoS One* 8(1):e54318
- Leone A, Spada A, Battezzati A, Schiraldi A, Aristil J, Bertoli S (2015) Cultivation, Genetic, Ethnopharmacology, Phytochemistry and Pharmacology of Moringa oleifera Leaves: An Overview. *Int J Mol Sci* 16(12):12791–12835

Lebenslauf

Name Inga Oelbe
Geburtsdatum 06.06.1995
Geburtsort Gehrden
Familienstand ledig
Staatsangehörigkeit deutsch
Kontakt inga.oelbe@hotmail.de

Bildungsweg

10/2016 - 11/2020 Studium der Humanmedizin (Klinischer Abschnitt)
 Universität Rostock
 10/2014 - 09/2016 Studium der Humanmedizin (Vorklinischer Abschnitt)
 Philipps-Universität Marburg
 09/2013 - 07/2014 Freiwilliges Soziales Jahr
 Schul- und Therapiezentrum Raisdorf, Schwentinental
 2005 - 2013 Matthias-Claudius-Gymnasium Gehrden, Schulabschluss Abitur

Berufliche Tätigkeiten

ab 04/2021 Assistenzärztin in der Neurologischen Abteilung
 Klinikum Osnabrück
 06 - 10/2020 Neurologisches Tertial des Praktischen Jahres
 Klinikum Osnabrück
 03 - 06/2020 Internistisches Tertial des Praktischen Jahres
 Klinikum Osnabrück
 11/2019 - 03/2020 Chirurgisches Tertial des Praktischen Jahres
 Kantonsspital Luzern, Schweiz
 09 - 10/2018 Famulatur in der Inneren Medizin (Kardiologie und Nephrologie)
 Diakonissenkrankenhaus Flensburg
 07 - 08/2018 Famulatur in der Neurologie (Neuroimmunologie)
 Universitätsklinik Rostock
 08 - 09/2017 Famulatur bei Jurgen Craig-Muller, MD – Rheumatologie
 Cape Cod Healthcare Center, Hyannis MA (USA)
 02 - 03/2017 Famulatur bei Dr. med. Dorothea Mordeja
 Gemeinschaftspraxis für Allgemeinmedizin, Hildesheim

Literaturverzeichnis

1. Abdul Hamid Hasani N, Mohd Amin I, Kamaludin R, Nik Mohd Rosdyd NMM, Johari Ibahim M, Sheikh Abdul Kadir SH (2017) p53 and cyclin b1 mediate apoptotic effects of apigenin and rutin in ER+/- breast cancer MCF-7 cells. *J Teknol.* doi: 10.11113/jt.v80.10704
2. Al-Asmari AK, Albalawi SM, Athar MT, Khan AQ, Al-Shahrani H, Islam M (2015) *Moringa oleifera* as an Anti-Cancer Agent against Breast and Colorectal Cancer Cell Lines. *PLOS ONE* 10(8):e0135814
3. Angeli D, Salvi S, Tedaldi G (2020) Genetic Predisposition to Breast and Ovarian Cancers: How Many and Which Genes to Test? *Int J Mol Sci* 21(3):1128
4. Ansari MA, Abdul HM, Joshi G, Opii WO, Butterfield DA (2009) Protective effect of quercetin in primary neurons against A β (1–42): relevance to Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem* 20(4):269–275
5. ATCC®: MCF7 / HTB-22™. <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-22.aspx#generalinformation>. Aufgerufen am 20. Mai 2019.
6. ATCC®: MDA-MB-231 / HTB-26™. https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-26.aspx?geo_country=de#characteristics. Aufgerufen am 29. Mai 2019.
7. Axt-Fliedner R, Dormann A (2018) *Klinikleitfaden Gynäkologie, Geburtshilfe*, 10. Auflage. Elsevier, München
8. Bajpai M, Pande A, Tewari SK, Prakash D (2005) Phenolic contents and antioxidant activity of some food and medicinal plants. *Int J Food Sci Nutr* 56(4):287–291
9. Bardin A, Boulle N, Lazennec G, Vignon F, Pujol P (2004) Loss of ER β expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. *Endocr Relat Cancer* 11(3):537–551
10. Benassayag C, Perrot-Applanat M, Ferre F (2002) Phytoestrogens as modulators of steroid action in target cells. *J Chromatogr B* 777(1–2):233–248
11. Blanco FM (1880) *Moringa oleifera*.
12. Blohmer J-U, David M, Henrich W, Sehoul J, Charité - Universitätsmedizin Berlin (eds) (2018) *Charité-Compendium Gynäkologie*. Walter de Gruyter, Berlin Boston
13. Bock P, Friedel W, Hanisch J, Karasman M, Schneider B (2011) Wirksamkeit und Sicherheit der komplementären Langzeitbehandlung mit einem standardisierten Extrakt aus Europäischer Mistel (*Viscum album* L.) zusätzlich zur konventionellen adjuvanten onkologischen Therapie bei primärem, nicht metastasiertem Mammakarzinom. *Arzneimittelforschung* 54(08):456–466
14. Bourque M, Dluzen DE, Di Paolo T (2012) Signaling pathways mediating the neuroprotective effects of sex steroids and SERMs in Parkinson's disease. *Front Neuroendocrinol* 33(2):169–178
15. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68(6):394–424
16. Buselmaier W, Tariverdian G (2007) *Humangenetik: 4., neu bearb. Aufl.* Springer Medizin, Heidelberg
17. Cairns RA, Harris IS, Mak TW (2011) Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer* 11(2):85–95
18. Cassidy A, Minihane A-M (2017) The role of metabolism (and the microbiome) in defining the clinical efficacy of dietary flavonoids. *Am J Clin Nutr* 105(1):10–22

19. Chen M, Rao Y, Zheng Y, Wei S, Li Y, Guo T, Yin P (2014) Association between soy isoflavone intake and breast cancer risk for pre- and post-menopausal women: A meta-analysis of epidemiological studies. *PLoS ONE* 9(2):e89288
20. Chen Y, Xiao P, Ou-Yang D-S, et al (2009) Simultaneous action of the flavonoid quercetin on cytochrome P450 (CYP) 1A2, CYP2A6, *N*-acetyltransferase and xanthine oxidase activity in healthy volunteers. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 36(8):828–833
21. 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
22. Cramer T, A. Schmitt C (eds) (2016) *Metabolism in Cancer*. doi: 10.1007/978-3-319-42118-6
23. Crouch SPM, Kozlowski R, Slater KJ, Fletcher J (1993) The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Methods* 160(1):81–88
24. Curigliano G, Burstein HJ, Winer EP, et al (2017) De-escalating and escalating treatments for early-stage breast cancer: the St. Gallen international expert consensus conference on the primary therapy of early breast cancer 2017. *Ann Oncol* 28(8):1700–1712
25. D’Andrea G (2015) Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia* 106:256–271
26. Das M, Law S (2018) Role of tumor microenvironment in cancer stem cell chemoresistance and recurrence. *Int J Biochem Cell Biol* 103:115–124
27. Davies C, Pan H, Godwin J, et al (2013) Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *The Lancet* 381(9869):805–816
28. DGHO (ed) (2018) *Empfehlungen der Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen ICD-10: C50.0-50.9 Onkopedia Leitlinie Mammakarzinom der Frau*.
29. Domitrović R, Jakovac H, Vasiljev Marchesi V, Vladimir-Knežević S, Cvijanović O, Tadić Ž, Romić Ž, Rahelić D (2012) Differential hepatoprotective mechanisms of rutin and quercetin in CCl₄-intoxicated BALB/cN mice. *Acta Pharmacol Sin* 33(10):1260–1270
30. Dorta DJ, Pigoso AA, Mingatto FE, Rodrigues T, Prado IMR, Helena AFC, Uyemura SA, Santos AC, Curti C (2005) The interaction of flavonoids with mitochondria: effects on energetic processes. *Chem Biol Interact* 152(2–3):67–78
31. Elsayed HE, Ebrahim HY, Mohyeldin MM, Siddique AB, Kamal AM, Haggag EG, El Sayed KA (2017) Rutin as a novel c-met inhibitory lead for the control of triple negative breast malignancies. *Nutr Cancer* 69(8):1256–1271
32. Elston CW, Ellis IO (1991) Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up.
33. Enogieru AB, Haylett W, Hiss DC, Bardien S, Ekpo OE (2018) Rutin as a potent antioxidant: Implications for neurodegenerative disorders. *Oxid Med Cell Longev* 2018:1–17
34. Filman DJ, Brawn RJ, Dandliker WB (1975) Intracellular supravital stain delocalization as an assay for antibody-dependent complement-mediated cell damage. *J Immunol Methods* 6(3):189–207
35. Flynn A, Kehoe L, Hennessy Á, Walton J (2017) Estimating safe maximum levels of vitamins and minerals in fortified foods and food supplements. *Eur J Nutr* 56(8):2529–2539

36. Freissmuth M, Offermanns S, Böhm S (2020) *Pharmakologie und Toxikologie: Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie*. doi: 10.1007/978-3-662-58304-3
37. Gesundheitsinstitut Deutschland *Moringa Oleifera - Inhaltsstoffe, Anwendungen und Wirkung*.
38. Gey MH (2015) *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik*. doi: 10.1007/978-3-662-46255-3
39. 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
40. Greenup R, Buchanan A, Lorizio W, et al (2013) Prevalence of BRCA Mutations among women with triple-negative breast cancer (TNBC) in a genetic counseling cohort. *Ann Surg Oncol* 20(10):3254–3258
41. Hadji P, Ziller V, Kyvernitakis J, Bauer M, Haas G, Schmidt N, Kostev K (2013) Persistence in patients with breast cancer treated with tamoxifen or aromatase inhibitors: a retrospective database analysis. *Breast Cancer Res Treat* 138(1):185–191
42. Hajirahimkhan A, Dietz B, Bolton J (2013) Botanical modulation of menopausal symptoms: Mechanisms of action? *Planta Med* 79(07):538–553
43. Hiddemann W, Bartram CR (eds) (2010) *Die Onkologie*. doi: 10.1007/978-3-540-79725-8
44. Hollman PCH, Katan MB (1999) Dietary flavonoids: Intake, health effects and bioavailability. *Food Chem Toxicol* 37(9–10):937–942
45. 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
46. Hosseinzadeh H, Nassiri-Asl M (2014) Review of the protective effects of rutin on the metabolic function as an important dietary flavonoid. *J Endocrinol Invest* 37(9):783–788
47. Huebner J, Muenstedt K, Prott FJ, Stoll C, Micke O, Buentzel J, Muecke R, Senf B (2014) Online Survey of Patients with Breast Cancer on Complementary and Alternative Medicine. *Breast Care* 9(1):60–63
48. Hui C, Qi X, Qianyong Z, Xiaoli P, Jundong Z, Mantian M (2013) Flavonoids, flavonoid subclasses and breast cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. *PloS One* 8(1):e54318
49. Iball J, Morgan CH, Wilson HR (1966) Structures of 5-Bromodeoxyuridine and 5-Bromouridine. *Nature* 209(5029):1230–1232
50. Iriti M, Kubina R, Cochis A, Sorrentino R, Varoni EM, Kabala-Dzik A, Azzimonti B, Dziedzic A, Rimondini L, Wojtyczka RD (2017) Rutin, a quercetin glycoside, restores chemosensitivity in human breast cancer cells: Rutin restores chemosensitivity in breast cancer cells. *Phytother Res* 31(10):1529–1538
51. Janni W, Müller V (2019) *Brustkrebs - Patientenratgeber zu den AGO-Empfehlungen 2019*.
52. Jones AW (2011) Early drug discovery and the rise of pharmaceutical chemistry. *Drug Test Anal* 3(6):337–344
53. Jordan VC (2003) Tamoxifen: a most unlikely pioneering medicine. *Nat Rev Drug Discov* 2(3):205–213

54. Jung IL (2014) Soluble Extract from *Moringa oleifera* Leaves with a New Anticancer Activity. *PLoS ONE* 9(4):e95492
55. Kabała-Dzik A, Rzepecka-Stojko A, Kubina R, Iriti M, Wojtyczka RD, Buszman E, Stojko J (2018) Flavonoids, bioactive components of propolis, exhibit cytotoxic activity and induce cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells MDA-MB-231 and MCF-7 – a comparative study. *Cell Mol Biol* 64(8):1
56. Kallio A, Zheng A, Dahllund J, Heiskanen KM, Härkönen P (2005) Role of mitochondria in tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells. *Apoptosis* 10(6):1395–1410
57. Karthivashan G, Arulselvan P, Alimon AbdR, Safinar Ismail I, Fakurazi S (2015) Competing Role of Bioactive Constituents in *Moringa oleifera* Extract and Conventional Nutrition Feed on the Performance of Cobb 500 Broilers. *BioMed Res Int* 2015:1–13
58. Kaul TN, Middleton E, Ogra PL (1985) Antiviral effect of flavonoids on human viruses. *J Med Virol* 15(1):71–79
59. Kim JJ, Kurita T, Bulun SE (2013) Progesterone Action in Endometrial Cancer, Endometriosis, Uterine Fibroids, and Breast Cancer. *Endocr Rev* 34(1):130–162
60. Klöppel G, Kreipe H, Remmele W, Dietel M (eds) (2013) *Pathologie: Mamma, Weibliches Genitale, Schwangerschaft und Kindererkrankungen*. doi: 10.1007/978-3-642-04564-6
61. Kopustinskiene DM, Jakstas V, Savickas A, Bernatoniene J (2020) Flavonoids as Anti-cancer Agents. *Nutrients* 12(2):457
62. Kreft S (2002) Rutin in buckwheat herbs grown at different UV-B radiation levels: comparison of two UV spectrophotometric and an HPLC method. *J Exp Bot* 53(375):1801–1804
63. Kreienberg R (ed) (2010) *Mammakarzinom, interdisziplinär: mit 103 Tabellen*, 4. Aufl. Springer Medizin, Berlin
64. Kuiper GGJM, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson J-Å (1998) Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor β . *Endocrinology* 139(10):4252–4263
65. Kundur S, Prayag A, Selvakumar P, Nguyen H, McKee L, Cruz C, Srinivasan A, Shoyele S, Lakshmikuttyamma A (2019) Synergistic anticancer action of quercetin and curcumin against triple-negative breast cancer cell lines. *J Cell Physiol* 234(7):11103–11118
66. Lang G (2013) *Histotechnik: Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik*, 2., überarbeitete und aktualisierte Auflage. Springer, Wien New York
67. Lee KM, Hwang MK, Lee DE, Lee KW, Lee HJ (2010) Protective Effect of Quercetin against Arsenite-Induced COX-2 Expression by Targeting PI3K in Rat Liver Epithelial Cells. *J Agric Food Chem* 58(9):5815–5820
68. Lehnert H, Kirchner H, Kirmes IC, Dahm R (2018) *Epigenetik - Grundlagen und klinische Bedeutung: aus der Vortragsreihe der Medizinischen Gesellschaft Mainz e.V.* Springer, Berlin
69. Leidenberger FA, Strowitzki T, Ortmann O (eds) (2014) *Klinische Endokrinologie für Frauenärzte*. doi: 10.1007/978-3-642-38043-3
70. Leitlinienprogramm Onkologie (ed) (2020) *Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF: Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms*.
71. Leitlinienprogramm Onkologie (ed) (2020) *S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Version 4.3*

72. Leone A, Spada A, Battezzati A, Schiraldi A, Aristil J, Bertoli S (2015) Cultivation, Genetic, Ethnopharmacology, Phytochemistry and Pharmacology of *Moringa oleifera* Leaves: An Overview. *Int J Mol Sci* 16(12):12791–12835
73. Levitsky DO, Dembitsky VM (2015) Anti-breast Cancer Agents Derived from Plants. *Nat Prod Bioprospecting* 5(1):1–16
74. Li S, Qiao S, Zhang J, Li K (2015) Quercetin Increase the Chemosensitivity of Breast Cancer Cells to Doxorubicin Via PTEN/Akt Pathway. *Anticancer Agents Med Chem* 15(9):1185–1189
75. Lim WF, Mohamad Yusof MI, Teh LK, Salleh MZ (2020) Significant Decreased Expressions of CaN, VEGF, SLC39A6 and SFRP1 in MDA-MB-231 Xenograft Breast Tumor Mice Treated with *Moringa oleifera* Leaves and Seed Residue (MOLSr) Extracts. *Nutrients* 12(10):2993
76. Lindl T, Gstraunthaler G (2013) *Zell- und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen*, 7th ed. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
77. Liu H, Jiang Y, Guan H, Li F, Sun-Waterhouse D, Chen Y, Li D (2020) Enhancing the antioxidative effects of foods containing rutin and α -amino acids via the Maillard reaction: A model study focusing on rutin-lysine system. *J Food Biochem*. doi: 10.1111/jfbc.13086
78. Luqman S, Srivastava S, Kumar R, Maurya AK, Chanda D (2012) Experimental Assessment of *Moringa oleifera* Leaf and Fruit for Its Antistress, Antioxidant, and Scavenging Potential Using *In Vitro* and *In Vivo* Assays. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012:1–12
79. Lv L, Liu C, Chen C, Yu X, Chen G, Shi Y, Qin F, Ou J, Qiu K, Li G (2016) Quercetin and doxorubicin co-encapsulated biotin receptor-targeting nanoparticles for minimizing drug resistance in breast cancer. *Oncotarget* 7(22):32184–32199
80. Maestro A, Terdoslavich M, Vanzo A, Kuku A, Tramer F, Nicolin V, Micali F, Decorti G, Passamonti S (2010) Expression of bilirubin transporter in the vascular endothelium and its function as a flavonoid transporter. *Cardiovasc Res* 85(1):175–183
81. Maisonneuve P, Disalvatore D, Rotmensz N, et al (2014) Proposed new clinicopathological surrogate definitions of luminal A and luminal B (HER2-negative) intrinsic breast cancer subtypes. *Breast Cancer Res* 16(3):R65
82. Maranta AF, Broder S, Fritzsche C, Knauer M, Thürlimann B, Jochum W, Ruhstaller T (2020) Do YOU know the Ki-67 index of your breast cancer patients? Knowledge of your institution's Ki-67 index distribution and its robustness is essential for decision-making in early breast cancer. *The Breast* 51:120–126
83. Markossian S, Sittampalam GS, Grossmann A, et alii (2004) *Assay Guideline Manual*. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences
84. Meeran SM, Patel SN, Chan T-H, Tollefsbol TO (2011) A Novel Prodrug of Epigallocatechin-3-gallate: Differential Epigenetic hTERT Repression in Human Breast Cancer Cells. *Cancer Prev Res (Phila Pa)* 4(8):1243–1254
85. Meyer V (2010) *Practical high-performance liquid chromatography*, 5th ed. Wiley, Chichester, U.K
86. Michel T, Halabalaki M, Skaltsounis A-L (2013) New Concepts, Experimental Approaches, and Dereplication Strategies for the Discovery of Novel Phytoestrogens from Natural Sources. *Planta Med* 79(07):514–532

87. Micke O, Bruns F, Glatzel M, Schönekaes K, Micke P, Mücke R, Büntzel J (2009) Predictive factors for the use of complementary and alternative medicine (CAM) in radiation oncology. *Eur J Integr Med* 1(1):19–25
88. Min Zhang (2011) Phytochemicals, antioxidant and antimicrobial activity of *Hibiscus sabdariffa*, *Centella asiatica*, *Moringa oleifera* and *Murraya koenigii* leaves. *J Med Plants Res.* doi: 10.5897/JMPR11.621
89. Moon Z, Moss-Morris R, Hunter MS, Hughes LD (2017) Understanding tamoxifen adherence in women with breast cancer: A qualitative study. *Br J Health Psychol* 22(4):978–997
90. Nachvak SM, Moradi S, Anjom-shoae J, Rahmani J, Nasiri M, Maleki V, Sadeghi O (2019) Soy, Soy Isoflavones, and Protein Intake in Relation to Mortality from All Causes, Cancers, and Cardiovascular Diseases: A Systematic Review and Dose–Response Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. *J Acad Nutr Diet* 119(9):1483–1500.e17
91. Nouri Z, Fakhri S, Nouri K, Wallace CE, Farzaei MH, Bishayee A (2020) Targeting Multiple Signaling Pathways in Cancer: The Rutin Therapeutic Approach. *Cancers* 12(8):2276
92. Oseni T, Patel R, Pyle J, Jordan V (2008) Selective Estrogen Receptor Modulators and Phytoestrogens. *Planta Med* 74(13):1656–1665
93. Pandey A (2012) *Moringa Oleifera* Lam. (Sahijan) - A Plant with a Plethora of Diverse Therapeutic Benefits: An Updated Retrospection. *Med Aromat Plants.* doi: 10.4172/2167-0412.1000101
94. Parvathy MVS, Umamaheshwari A (2007) Cytotoxic Effect of *Moringa Oleifera* Leaf Extracts On Human Multiple Myeloma Cell Lines. *Trends Med Res* 2(1):44–50
95. Paterni I, Granchi C, Katzenellenbogen JA, Minutolo F (2014) Estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β): Subtype-selective ligands and clinical potential. *Steroids* 90:13–29
96. Paul Marienfeld GmbH & Co.KG (2021) Bürker Zählkammer.
97. Petru E, Fink D, Köchli OR, Loibl S (eds) (2019) *Praxisbuch Gynäkologische Onkologie*, 5., vollständig überarbeitete und aktualisierte Auflage. Springer, Berlin
98. Pieroth R, Paver S, Day S, Lammersfeld C (2018) Folate and Its Impact on Cancer Risk. *Curr Nutr Rep* 7(3):70–84
99. Pietta P-G (2000) Flavonoids as Antioxidants. *J Nat Prod* 63(7):1035–1042
100. Promega Corporation (2001) CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay.
101. Promega Corporation (2007) CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay. https://www.promega.de/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/cytotox_glo-cytotoxicity-assay/. Aufgerufen am 23. Mai 2019.
102. Qu S, Dai C, Lang F, Hu L, Tang Q, Wang H, Zhang Y, Hao Z (2018) Rutin Attenuates Vancomycin-Induced Nephrotoxicity by Ameliorating Oxidative Stress, Apoptosis, and Inflammation in Rats. *Antimicrob Agents Chemother* 63(1):e01545-18, /aac/63/1/AAC.01545-18.atom
103. Rabast U (2018) *Gesunde Ernährung, gesunder Lebensstil.* doi: 10.1007/978-3-662-56512-4
104. Radin DP, Patel P (2016) Delineating the molecular mechanisms of tamoxifen’s oncolytic actions in estrogen receptor-negative cancers. *Eur J Pharmacol* 781:173–180
105. Radwan RR, Abdel Fattah SM (2017) Mechanisms involved in the possible nephroprotective effect of rutin and low dose γ irradiation against cisplatin-induced nephropathy in rats. *J Photochem Photobiol B* 169:56–62

106. Rasch B, Friese M, Hofmann W, Naumann E (2014) Quantitative Methoden 1: Einführung in die Statistik für Psychologen und Sozialwissenschaftler. doi: 10.1007/978-3-662-43524-3
107. Rassow J (ed) (2012) Biochemie: 67 Tabellen ; [mit Stoffwechselweg-Animationen], 3., vollst. überarb. und erw. Aufl. Thieme, Stuttgart
108. Rauf A, Imran M, Khan IA, ur-Rehman M-, Gilani SA, Mehmood Z, Mubarak MS (2018) Anticancer potential of quercetin: A comprehensive review: Quercetin as an anti-cancer agent. *Phytother Res* 32(11):2109–2130
109. Repetto G, del Peso A, Zurita JL (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc* 3(7):1125–1131
110. Rietjens IMCM, Sotoca AM, Vervoort J, Louisse J (2013) Mechanisms underlying the dualistic mode of action of major soy isoflavones in relation to cell proliferation and cancer risks. *Mol Nutr Food Res* 57(1):100–113
111. Roche (2013) Cell proliferation ELISA, BrdU (colorimetric), Version 16.
112. Rodríguez-García C, Sánchez-Quesada C, Gaforio JJ (2019) Dietary Flavonoids as Cancer Chemopreventive Agents: An Updated Review of Human Studies. *Antioxidants* 8(5):137
113. Ross JA, Kasum CM (2002) Dietary Flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. *Annu Rev Nutr* 22(1):19–34
114. Saini RK, Manoj P, Shetty NP, Srinivasan K, Giridhar P (2016) Relative bioavailability of folate from the traditional food plant *Moringa oleifera* L. as evaluated in a rat model. *J Food Sci Technol* 53(1):511–520
115. Samavat H, Kurzer MS (2015) Estrogen metabolism and breast cancer. *Cancer Lett* 356(2):231–243
116. Schaaf CP, Zschocke J (2018) Basiswissen Humangenetik. doi: 10.1007/978-3-662-56147-8
117. Schmitz S, Desel C (2018) Der Experimentator Zellbiologie. Springer Spektrum, Berlin
118. Schrott E (2012) Heilpflanzen der ayurvedischen und der westlichen Medizin: eine Gegenüberstellung: mit 355 Abbildungen und 51 Tabellen. Springer Medizin, Berlin
119. Selvakumar P, Badgeley A, Murphy P, Anwar H, Sharma U, Lawrence K, Laksh-mikuttyamma A (2020) Flavonoids and Other Polyphenols Act as Epigenetic Modifiers in Breast Cancer. *Nutrients* 12(3):761
120. Seo H-S, Ku JM, Choi H-S, et al (2016) Quercetin induces caspase-dependent extrinsic apoptosis through inhibition of signal transducer and activator of transcription 3 signaling in HER2-overexpressing BT-474 breast cancer cells. *Oncol Rep* 36(1):31–42
121. Shaik YB, Castellani ML, Perrella A, et al (2006) Role of quercetin (a natural herbal compound) in allergy and inflammation. *J Biol Regul Homeost Agents* 20(3–4):47–52
122. Shin J-E, Kim J-M, Bae E-A, Hyun Y-J, Kim D-H (2005) *In Vitro* Inhibitory Effect of Flavonoids on Growth, Infection and Vacuolation of *Helicobacter pylori*. *Planta Med* 71(3):197–201
123. Sirotkin AV, Harrath AH (2014) Phytoestrogens and their effects. *Eur J Pharmacol* 741:230–236
124. Smith I, Procter M, Gelber RD, Guillaume S, Feyereislova A, Dowsett M (2007) 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial.
125. de Souza RFV, De Giovani WF (2004) Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. *Redox Rep Commun Free Radic Res* 9(2):97–104

126. Sreelatha S, Jeyachitra A, Padma PR (2011) Antiproliferation and induction of apoptosis by *Moringa oleifera* leaf extract on human cancer cells. *Food Chem Toxicol* 49(6):1270–1275
127. Steiner J, Davis J, McClellan J, et al (2014) Dose-dependent benefits of quercetin on tumorigenesis in the C3(1)/SV40Tag transgenic mouse model of breast cancer. *Cancer Biol Ther* 15(11):1456–1467
128. Subik K, Lee J-F, Baxter L, Strzepek T (2010) The expression patterns of eR, pR, Her2, cK5/6, eGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast cancer cell Lines. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research* (4):35–41
129. Suphachai C (2014) Antioxidant and anticancer activities of *Moringa oleifera* leaves. *J Med Plants Res* 8(7):318–325
130. Świeca M, Gawlik-Dziki U, Dziki D, Baraniak B, Czyż J (2013) The influence of protein–flavonoid interactions on protein digestibility in vitro and the antioxidant quality of breads enriched with onion skin. *Food Chem* 141(1):451–458
131. Tao S, He H, Chen Q (2015) Quercetin inhibits proliferation and invasion acts by up-regulating miR-146a in human breast cancer cells. *Mol Cell Biochem* 402(1–2):93–100
132. Thurber MD, Fahey JW (2009) Adoption of *Moringa oleifera* to Combat Under-Nutrition Viewed Through the Lens of the “Diffusion of Innovations” Theory. *Ecol Food Nutr* 48(3):212–225
133. Tiloke C, Phulukdaree A, Chuturgoon AA (2013) The antiproliferative effect of *Moringa oleifera* crude aqueous leaf extract on cancerous human alveolar epithelial cells. *BMC Complement Altern Med* 13(1):226
134. Valderrama K, Pradel E, Firsov AM, Drobecq H, Bauderlique-le Roy H, Villemagne B, Antonenko YN, Hartkoorn RC (2019) Pyrrolomycins Are Potent Natural Protonophores. *Antimicrob Agents Chemother* 63(10):e01450-19, /aac/63/10/AAC.01450-19.atom
135. Verbraucherzentrale Nordrhein-Westfalen (2007) Folsäure: Die Formel für deinen Körper.
136. Vogiatzoglou A, Mulligan AA, Lentjes MAH, Luben RN, Spencer JPE, Schroeter H, Khaw K-T, Kuhnle GGC (2015) Flavonoid Intake in European Adults (18 to 64 Years). *PLOS ONE* 10(5):e0128132
137. Wacker J, Sillem M, Bastert G, Beckmann MW (eds) (2020) *Therapiehandbuch Gynäkologie und Geburtshilfe*. doi: 10.1007/978-3-662-59809-2
138. Wang L-Q (2002) Mammalian phytoestrogens: enterodiol and enterolactone. *J Chromatogr B* 777(1–2):289–309
139. Winckler J (1974) Vitalfärbung von Lysosomen und anderen Zellorganellen der Ratte mit Neutralrot Vital Staining of Lysosomes and Other Cell Organelles of the Rat with Neutral Red. *Prog Histochem Cytochem* 6(3):III–89
140. 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
141. Xie Q, Chen M-L, Qin Y, Zhang Q-Y, Xu H-X, Zhou Y, Mi M-T, Zhu J-D (2013) Isoflavone consumption and risk of breast cancer: a dose-response meta-analysis of observational studies. *Asia Pac J Clin Nutr* 22(1):118–127
142. Yamaguchi F, Takata M, Kamitori K, Nonaka M, Dong Y, Sui L, Tokuda M (2008) Rare sugar D-allose induces specific up-regulation of TXNIP and subsequent G1 cell cycle arrest in hepatocellular carcinoma cells by stabilization of p27kip1. *Int J Oncol* 32(2):377–385

143. Young DW, Tollin P, Wilson HR (1969) The crystal and molecular structure of thymidine. *Acta Crystallogr B* 25(8):1423–1432
144. Zeller T, Muenstedt K, Stoll C, Schweder J, Senf B, Ruckhaeberle E, Becker S, Serve H, Huebner J (2013) Potential interactions of complementary and alternative medicine with cancer therapy in outpatients with gynecological cancer in a comprehensive cancer center. *J Cancer Res Clin Oncol* 139(3):357–365
145. Zentrum für Krebsregisterdaten (2019) Krebs in Deutschland für 2015/2016.
146. Zhao L, Mao Z, Brinton RD (2009) A Select Combination of Clinically Relevant Phytoestrogens Enhances Estrogen Receptor β -Binding Selectivity and Neuroprotective Activities *in Vitro* and *in Vivo*. *Endocrinology* 150(2):770–783
147. Ziberna L, Kim J-H, Auger C, Passamonti S, Schini-Kerth V (2013) Role of endothelial cell membrane transport in red wine polyphenols-induced coronary vasorelaxation: involvement of bilitranslocase. *Food Funct* 4(10):1452
148. Ziegler RG, Hoover RN, Pike MC, et al (1993) Migration Patterns and Breast Cancer Risk in Asian-American Women. *JNCI J Natl Cancer Inst* 85(22):1819–1827

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel des Estradiol nach Leidenberger et alii 2014 [69].	13
Abbildung 2: Strukturformeln beispielhafter Flavonoide in Anlehnung an Kapustinskiene et alii 2020, sortiert nach ihren Untergruppen mit typischem Vorkommen [61, 119].	14
Abbildung 3: Botanische Zeichnung eines Asts des Moringa oleifera-Baumes von Blanco 1880 [11].	21
Abbildung 4: Pulver aus Blättern des Moringa oleifera-Baumes.	28
Abbildung 5: Schematischer Aufbau der HPLC in Anlehnung an Meyer 2010 [85].	31
Abbildung 6: Lichtmikroskopische Fotografie von ausgesäten MCF-7-Zellen.	32
Abbildung 7: Lichtmikroskopische Fotografie von ausgesäten MDA-MB-231-Zellen.	34
Abbildung 8: Zählnetz einer Bürker-Zählkammer unter mikroskopischer Sicht in Anlehnung an Paul Marienfeld 2021 [96].	36
Abbildung 9: Schematische Darstellung einer beispielhaften 96-Wellplatte und ihrer Belegung mit Testsubstanzen.	37
Abbildung 10: Strukturformeln von Thymidin und BrdU nach Iball et alii 1966	40
Abbildung 11: Die Luciferase-Reaktion nach Promega Corporation 2001 [100].	44
Abbildung 12: Chromatogramm eines HPLC-Durchlaufs mit dem Moringablattethanolextrakt sowie den qualitativ nachgewiesenen Referenzsubstanzen Folsäure, Rutin und Quercetin.	49
Abbildung 13: Chromatogramm eines HPLC-Durchlaufs mit dem Moringablattethanolextrakt sowie den qualitativ nicht sicher nachweisbaren Referenzsubstanzen Daidzein, Genistein, Isorhamnetin und Kämpferol.	50
Abbildung 14: Immunhistochemie der MCF-7-Zelllinie.	51
Abbildung 15: Immunhistochemie der MDA-MB-231-Zelllinie.	52
Abbildung 16: BrdU-Zellproliferationstest. Zellproliferation [%] von MCF-7 (n=5, 4-fach-Bestimmung) und MDA-MB-231 (n=4, 4-fach-Bestimmung).	53
Abbildung 17: Neutralrot- Zellviabilitätstest. Zellviabilität [%] von MCF 7 (n=3, 3-fach-Bestimmung) und MDA-MB 231 (n=3, 3-fach-Bestimmung).	55
Abbildung 18: CellTiter-Glo-Zellviabilitätstest. Zellviabilität [%] von MCF 7 (n=3, 3-fach-Bestimmung) und MDA-MB 231 (n=3, 3-fach-Bestimmung).	56
Abbildung 19: CytoTox-Glo-Zytotoxizitätstest. Zellviabilität [%] von MCF-7 (n=4, 3-fach-Bestimmung) und MDA-MB-231 (n=3, 3-fach-Bestimmung).	58
Abbildung 20: Glucose- und Lactatkonzentrationen [mmol/l] sowie pH-Werte von MCF-7 (n=2).	59
Abbildung 21: Glucose- und Lactatkonzentrationen [mmol/l] sowie pH-Werte von MDA-MB-231 (n=2).	60

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Klassifikation der intrinsischen Subtypen des Mammakarzinoms modifiziert nach St. Gallen 2013, Maisonneuve et alii 2014 sowie Klöppel et alii 2013 [39, 60, 81].	2
Tabelle 2:	Verwendete Geräte und Software.	92
Tabelle 3:	Verwendete Chemikalien.	93

Danksagung

Mein herzliches Dankeschön gilt Frau PD Dr. rer. nat. Dagmar-Ulrike Richter für das Anvertrauen des Promotionsthemas und die fachkundige und zugewandte Betreuung sowie ihre stets ermutigenden Worte.

Mein Dank gilt außerdem dem ganzen Team des Forschungslabors, insbesondere der Medizinisch-technischen Assistentin Frau Bianca Gosch für ihren Einsatz.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Udo Jeschke für die Beratung im Rahmen der chromatographischen Untersuchungen.

Für die statistische Beratung möchte ich mich beim Institut für Biostatistik und Informatik der Universität Rostock bedanken.

Einen besonderen Dank möchte ich meiner Familie und meinen Freunden für ihren unentwegten Zuspruch und ihre Geduld aussprechen.

Selbstständigkeitserklärung

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.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Rostock

(Abgabedatum)

(Vollständige Unterschrift)

Appendix

- Verwendete Geräte, Materialien und Chemikalien
- Prinzipien von Lactat- und Glucose-Bestimmung

Es folgt eine Auflistung der Geräte und Software, die für die angestellten Untersuchungen verwendet wurden.

Tabelle 2: Verwendete Geräte und Software.

Geräte und Software	Firma	Land
High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Smartline Manager 5000 Smartline Pump 1000 Smartline UV-Detektor 2500 (254 nm) Smartline RI Detector Smartline Column Thermostat	Knauer	Deutschland
HPLC-Vertex-Säule 250 x 4 mm, Eurospher 100-5 C 18 mit integrierter Vorsäule	Knauer	Deutschland
HPLC-Software ClarityChrom V 2.6	Knauer	Deutschland
Microsoft Excel 2019	Microsoft	USA
Microsoft Word 2019	Microsoft	USA
Discover SP-Mikrowelle und Programmsoftware	CEM GmbH	Deutschland
Ultraschallbad Emmi-H22	EMAG Technologies	Deutschland
Handmörser		
Vakuum-Konzentrator-Zentrifuge, Concentrator 5301	Eppendorf	Deutschland
Waage Sartorius Basic	Sartorius AG	Deutschland
Zentrifuge Universal 320R; ohne Bremse	Hettich AG	Deutschland
Zentrifuge Biofuge Pico	Heraeus Instruments GmbH	Deutschland
Lichtmikroskop Axiovert 40C	Zeiss	Deutschland
Lichtmikroskop AxioStar Plus	Zeiss	Deutschland
Mikroskop-Kamera AxioCam MRC	Zeiss	Deutschland
Brutschrank Function Line (37 °C, 5 % Kohlenstoffdioxid)	Heraeus Instruments GmbH,	Deutschland
Gefrierschrank Herafreeze (-80°C)	Heraeus Instruments GmbH	Deutschland
Kühlschrank (+ 8 °C)	Liebherr Premium	Deutschland
K Series Cryostage Systems (Stickstoff-Kühlbehälter, -188°C)	Worthington Industries	USA
Sicherheitswerkbank Herasafe™	Heraeus Instruments GmbH	Deutschland
pH-Mess-Elektrode Orion 3 Star pH Benchtop	Thermo Scientific	USA
Vortex REAX 2000	Heidolph	Deutschland
Plattenrüttler TPM-2	Sarstedt	Deutschland
ELISA-Multiwell-Reader (Microplate Reader 680)	Bio-Rad Laboratories Inc.	USA
96-Well-Zellkultur-Testplatten (transparent)	Greiner bio-one	Deutschland
24-Well-Zellkultur-Testplatte (transparent)	TPP (Techno Plastic Products AG)	Schweiz
Zellkulturflasche 25 cm ² Corning Flask®	Greiner bio-one	Deutschland

Zellkulturflasche 75 cm ² TPP®	TPP (Techno Plastic Products AG)	Schweiz
Zellkulturflasche 175 cm ² Cellstar®	Greiner bio-one	Deutschland
Zentrifugenröhrchen (1,5 ml; 50 ml)	Grüner bio-one	Deutschland
Bürker-Zählkammer	Poly-Optik GmbH	Deutschland
Elektrische Pipette pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH	Deutschland
Pipetten	Eppendorf GmbH	Deutschland
Multipipette	Eppendorf GmbH	Deutschland
Pipettenspitzen 10-5000 µl	Eppendorf GmbH	Deutschland
Aufsätze Multipipette 3-200 µl	Eppendorf GmbH	Deutschland
Filter Minisart-Plus 0,45 µm Porengröße	Sigma Aldrich	Deutschland
Glasbehälter 35 ml mit Silikondeckel		
Magnetührstäbchen		

Anschließend folgt eine Auflistung der Chemikalien, die für die Untersuchungen benutzt wurden.

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien.

Chemikalien	Ergänzung	Hersteller	Land
Bio-Moringapulver (Moringa oleifera)		vitatrend®, denn's Biomarkt Rostock	Ursprung: Ägypten
Aquabidest steril			
Ethanol 70 %	EtOH	Eigenherstellung	
Methanol 99,5 %	MeOH	J.T. Baker, Deventer	Niederlande
Desinfektionsmittel Bacillol R plus		Bode	Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) - mit Phenolrot und 10 % FKS - ohne Phenolrot und 1 % FKS	Glucose (4,5 g/l), L-Glutamine (20 ml/l), modifiziert mit FKS (100 ml/l), 2 ml/l Penicillin/Streptomycin (100X), 5 ml/l Amphotericin B (250 µg/ml) und Phenolrot (15 mg/l) Antiinfektiöse Zusätze: 10000 U/ml Penicillin + 10 mg/ml Streptomycin + 250 µl/ml Amphotericin B	CC-Pro, Oberdorla	Deutschland
Fetales Kälberserum (FKS)		Sigma Aldrich, Steinheim	Deutschland
Amphotericin B	250 µl/ml	PAA, Cölbe	Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)		Carl Roth, Karlsruhe	Deutschland

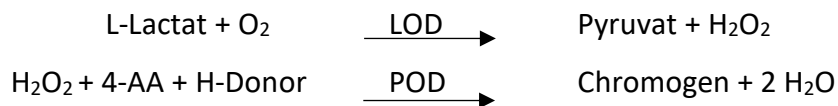
PBS (phosphate buffered saline)		Roth	Deutschland
Trypsin	Trypsin-EDTA 10x (5000 mg/l Trypsin, 2000 mg/l EDTA)	CC-Pro, Oberdoria	Deutschland
Trypanblau	0,4 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	Deutschland
1 M H ₂ SO ₄		Roth GmbH	Deutschland
0,1 M HCL		Roth GmbH	Deutschland
Tamoxifen citrate salt, (E/Z)-Endoxifen-Hydrochloride Hydrate, β -Estradiol		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	Deutschland
Folsäure, Quercetin, Rutin hydrate		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	Deutschland
Genistein, Kämpferol, Daidzein, Isorhamnetin		Carl Roth	Deutschland
LinRed-Lösung IHC		LINARIS Biologische Produkte, Dossenheim	Deutschland
ImmPRESS™ Reagent Kit Peroxidase (IHC)	Anti-Mouse/Rabbit Ig Peroxidase R.T.U. Normal Horse Blocking Serum (2,5 %)	Vectorlabs, Burlingame	USA
PR antibody	orb178489	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching	Deutschland
ER antibody	orb178430	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching	Deutschland
ER beta antibody	(PPG5/10)	GeneTex	USA
C-erbB-2 Onkoprotein antibody	orb233679	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching	Deutschland
Cell Proliferation Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), BrdU (colorimetric)	BrdU-Test-Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	Deutschland
<i>in vitro</i> toxicology assay kit neutral red based (TOX-4)	Neutralrot-Test-Kit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	Deutschland
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	CellTiter-Test-Kit	Promega Corporation	USA
CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay	CytoTox-Test-Kit	Promega Corporation	USA

Im Rahmen der metabolischen Untersuchungen wurden Lactat- und Glucosekonzentrationen gemessen. Dies geschah durch die Abteilung für Labordiagnostik des Klinikum Südost Rostock.

Prinzip der Lactat-Bestimmung

Enzymatischer Farbttest

L-Lactat wird durch Laktatoxidase (LOD) zu Pyruvat und Wasserstoffperoxid oxidiert. Durch die Reaktion von Peroxidase (POD), Wasserstoffperoxid, 4-Aminoantipyrin (4-AA) und einem Wasserstoffdonor (TOOS) entsteht ein farbiges Produkt. Die Farbzunahme ist der Lactatkonzentration proportional.



Prinzip der Glucose-Bestimmung

Enzymatischer UV-Test

Glucose wird in Gegenwart von Adenosintri-phosphat (ATP) und Magnesiumionen von Hexokinase (HK) phosphoryliert und bildet Glucose-6-Phosphat (G-6-P) sowie Adenosindiphosphat (ADP). Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) oxidiert spezifisch Glucose-6-Phosphat zu Glukonat-6-Phosphat bei gleichzeitiger Reduktion von NAD^+ zu NADH . Der Absorptionsanstieg bei 340 nm ist zur Glucosekonzentration in der Probe proportional.

