

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

Die Wirkung von grünem Tee und seinen Bestandteilen  
Epigallocatechingallat (EGCG), Quercetin und Rutin  
im Vergleich sowie in Kombination mit Endoxifen  
auf maligne Mammakarzinomzelllinien (MCF-7 und MDA-MB-231)

---

**Inauguraldissertation**

zur

Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der Medizin (Dr. med.)**

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

**Wenke Hlawa**

geb. am 16.01.1995 in Ribnitz-Damgarten

Rostock, März 2021

[https://doi.org/10.18453/rosdok\\_id00003539](https://doi.org/10.18453/rosdok_id00003539)

---

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

1. Gutachterin: PD Dr. rer. nat. habil. Dagmar-Ulrike Richter, Universität Rostock,  
Universitätsfrauenklinik im Klinikum Südstadt
2. Gutachterin: Prof. Dr. habil. J. Barbara Nebe, Universität Rostock,  
Arbeitsbereich Zellbiologie im Zentrum für Medizinische Forschung
3. Gutachterin: Prof. Dr. med. Isabell Witzel, Universität Hamburg,  
Brustzentrum am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Einreichung: März 2021

Verteidigung: Februar 2022

---

Medizin war der Tee zuerst, Getränk wurde er danach.

*Kakuzō Okakura [123]*

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	12
1.1	Das Mammakarzinom der Frau.....	12
1.1.1	Einführung .....	12
1.1.2	Definition .....	13
1.1.3	Epidemiologie.....	13
1.1.4	Pathogenese .....	15
1.1.5	Risikofaktoren.....	16
1.1.6	Rezeptorstatus .....	17
1.1.7	Diagnostik und Therapie.....	19
1.2	Wirkprofil der Flavonoide .....	23
1.3	Testsubstanzen .....	24
1.3.1	Grüner Tee .....	24
1.3.2	Epigallocatechingallat (EGCG) .....	26
1.3.3	Quercetin und sein Derivat Rutin .....	26
1.3.4	Estradiol .....	26
1.3.5	Tamoxifen und sein Metabolit Endoxifen .....	27
2	Zielstellung .....	28
3	Material und Methoden .....	29
3.1	Pflanzenmaterial.....	29
3.2	Extraktgewinnung mittels Mikrowellenextraktion .....	29
3.2.1	Prozedere.....	29
3.3	Herstellung der Zellkulturen .....	30
3.3.1	Zellkulturlinien.....	30
3.3.2	Lagerung und Auftauen der Zellen.....	30
3.3.3	Zellkulturmedium .....	31
3.3.4	Kulturbedingungen .....	31
3.3.5	Passagieren der Zellen.....	31
3.4	Vorbereitung der Zelltests.....	32
3.4.1	Ermittlung der Lebendzellzahl.....	32
3.4.2	Herstellung der Testsubstanzen .....	33
3.5	High Performance Liquid Chromatography (HPLC) .....	34
3.5.1	Prinzip .....	34
3.5.2	Messbedingungen und Vorgehensweise .....	35

3.6	Immunhistochemie.....	36
3.7	<i>In-vitro</i> -Zelltests.....	37
3.7.1	CellTiter-Glo®-Zellviabilitätstest.....	37
3.7.2	CytoTox-Glo™-Zytotoxizitätstest.....	38
3.7.3	BrdU-Immunoassay.....	39
3.8	Stoffwechselanalyse (Bestimmung Glukose-, Laktat- und pH-Wert).....	41
3.9	Statistische Auswertung.....	42
3.10	Geräte, Materialien und Chemikalien.....	42
3.10.1	Liste der verbrauchten Materialien.....	42
3.10.2	Liste der verwendeten Chemikalien.....	44
3.10.3	Liste der verwendeten Geräte.....	45
4	Ergebnisse.....	47
4.1	HPLC-Analyse.....	47
4.1.1	Chromatogramm des Grüntee-Extrakts.....	47
4.1.2	Vergleich mit den Referenzsubstanzen EGCG, Quercetin, Rutin.....	48
4.2	Immunhistochemie.....	50
4.2.1	MCF-7-Zellen.....	50
4.2.2	MDA-MB-231-Zellen.....	51
4.3	CellTiter-Glo®-Zellviabilitätstest.....	52
4.3.1	MCF-7-Zelllinie.....	52
4.3.2	MDA-MB-231-Zelllinie.....	54
4.4	CytoTox-Glo™ - Zytotoxizitätstest.....	56
4.4.1	MCF-7-Zelllinie.....	56
4.4.2	MDA-MB-231-Zelllinie.....	58
4.5	BrdU-Immunoassay.....	60
4.5.1	MCF-7-Zelllinie.....	60
4.5.2	MDA-MB-231-Zelllinie.....	62
4.6	Stoffwechselanalyse.....	64
5	Diskussion.....	66
5.1	Diskussion der Untersuchungsergebnisse.....	66
5.1.1	HPLC – Analyse.....	66
5.1.2	Immunhistochemie.....	67
5.1.3	Diskussion der Testergebnisse.....	68
5.1.4	Stoffwechselanalyse.....	75
6	Methodenkritik.....	76
7	Ausblick.....	77

8	Zusammenfassung .....	78
9	Thesen .....	79
10	Posterbeitrag .....	81
11	Selbstständigkeitserklärung.....	82
12	Lebenslauf .....	83
13	Danksagung .....	84
14	Literaturverzeichnis .....	85

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Geschätzte Brustkrebsinzidenz der WHO (weltweit); altersstandardisierte Rate von 2020; Frauen in allen Gruppen [75]. ....	12
Abbildung 2:	Krebsinzidenzen in Deutschland 2016 mit prozentualem Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs) [191]. ....	13
Abbildung 3:	Darstellung der Flavonoid-Untergruppen mit wichtigen Vertretern und chemischer Struktur modifiziert nach Panche et al. [125]. ....	22
Abbildung 4:	Teeaufguss mit Bancha-Teeblättern. ....	24
Abbildung 5:	Strukturformel des EGCG [84]. ....	25
Abbildung 6:	Modifiziert nach Maximov et al.: Metabolisierung von Tamoxifen zur plasmawirksamen Substanz Endoxifen (4-Hydroxy-N-desmethyltamoxifen) [116]. ....	26
Abbildung 7:	Mikroskopische Betrachtung der humanen Mammakarzinomzelllinien MCF-7 (a) mit sternförmiger Zellmorphologie und MDA-MB-231 (b) mit spindelförmigen Zellen als Monolayer, 20x Vergrößerung, der Maßstab beträgt 100 µm. ....	29
Abbildung 8:	Das Liniennetz einer Bürker-Zählkammer: 9 Großquadrate mit je einer Seitenlänge von 1 mm werden einzeln jeweils in 16 Unterquadrate eingeteilt. Für die Bestimmung der Zellzahl werden pro Kammer insgesamt 25 dieser Kleinstquadrate ausgezählt [106]. ....	31
Abbildung 9:	Vereinfachtes Schema einer HPLC-Anlage zur Trennung von Stoffgemischen, hauptsächlich bestehend aus dem Eluentenvorrat, einer Hochdruckpumpe, dem Einspritzsystem sowie einer Trennsäule und dem Detektor mit einer Auswerteeinheit [154]. ....	34
Abbildung 10:	Stattfindende Luciferase-Reaktion im CellTiter-Glo®-Assay mit der Umsetzung von Luciferin zu dem lumineszierenden Reaktionsprodukt Oxyluciferin [133]. ....	37
Abbildung 11:	Ähnliche Strukturformel der Nucleosid - Moleküle. Die Methylgruppe am 5'-Ende des Thymidins wird beim BrdU (5-Bromo-2'-desoxyuridin) ersetzt durch das Halogen Brom. Das Prinzip des BrdU-Tests basiert auf dem ersatzweisen Einbau des zugegebenen Pyrimidin-Analogons BrdU anstelle von Thymidin in die DNA der Zellen [14]. ....	39
Abbildung 12:	Chromatogramm des Grüntee-Extrakts (grüne Kurve). Auf den Achsen ist die UV-Absorption [AU] gegen die Zeit [min] aufgetragen. ....	46

- Abbildung 13: Vergleich des Chromatogramms des Grüntee-Extrakts (grüne Kurve) mit dem Chromatogramm der Referenzsubstanz EGCG (violette Kurve). Aufgetragen ist die UV-Absorption [AU] gegen die Zeit [min]. Die Retentionszeit für EGCG beträgt 21,0 min nach Injektion. ....47
- Abbildung 14: Vergleich des Chromatogramms des Grüntee-Extrakts (grüne Kurve) mit dem Chromatogramm der Referenzsubstanz Quercetin (blaue Kurve). Aufgetragen ist die UV-Absorption [AU] gegen die Zeit [min]. Die Retentionszeit für Quercetin beträgt 27,7 min nach Injektion. ....48
- Abbildung 15: Vergleich des Chromatogramms des Grüntee-Extrakts (grüne Kurve) mit dem Chromatogramm der Referenzsubstanz Rutin (blassrosa Kurve). Aufgetragen ist die UV-Absorption [AU] gegen die Zeit [min]. Die Retentionszeit für Rutin beträgt 24,7 min nach Injektion. ....48
- Abbildung 16: Immunhistochemie zur Prüfung des Rezeptorstatus der MCF-7-Zelllinie. A: ER $\alpha$  positiv; B: ER $\beta$  positiv; C: PR positiv; D: Negativkontrolle. Vergrößerung 10x. Skalierungsbalken = 100  $\mu$ m. Pfeile zeigen beispielhaft auf einzelne Karzinomzellen. ....49
- Abbildung 17: Immunhistochemie zur Prüfung des Rezeptorstatus der MDA-MB-231-Zelllinie. A: ER $\alpha$  negativ; B: ER $\beta$  negativ; C: PR negativ; D: Negativkontrolle. Vergrößerung 10x. Skalierungsbalken = 100  $\mu$ m. Pfeile zeigen beispielhaft auf einzelne Karzinomzellen. ....50
- Abbildung 18: CellTiter-Glo®-Test: Darstellung der Zellviabilität [%] von MCF-7 nach 24 h Einwirkung des Grüntee-Extrakts und seiner Verdünnungsstufen, Estradiol und Endoxifen sowie der Kombination aus Extrakt bzw. seiner Verdünnungen mit Endoxifen bezogen auf die Negativkontrolle (NK = 100 %, bestehend aus dem jeweils angewendeten Lösungsmittel in Zellsuspension); angegeben sind die Mittelwerte aus drei Messungen sowie die Standardabweichungen und Signifikanzen (\*p < 0,05) bezogen auf die Negativkontrolle; Ext = Grüntee-Extrakt in den angegebenen Verdünnungsstufen; End = Endoxifen; NK = Negativkontrolle (Abschnitt 3.9). ....51
- Abbildung 19: CellTiter-Glo®-Test: Darstellung der Zellviabilität [%] von MCF-7 nach 24 h Einwirkung der Referenzsubstanzen Quercetin, EGCG und Rutin in jeweils 2 Konzentrationen, Estradiol und Endoxifen sowie der Kombination aus Referenzen mit Endoxifen bezogen auf die Negativkontrolle (NK = 100 %, bestehend aus dem jeweils angewendeten Lösungsmittel in Zellsuspension); angegeben sind die Mittelwerte aus drei Messungen sowie die Standardabweichungen und Signifikanzen (\*p < 0,05) bezogen auf die Negativkontrolle; Quer = Quercetin; EGCG = Epigallocatechingallat; Ru = Rutin; End = Endoxifen; NK = Negativkontrolle (Abschnitt 3.9). ....52

- Abbildung 20: CellTiter-Glo®-Test: Darstellung der Zellviabilität [%] von MDA-MB-231 nach 24 h Einwirkung des Grüntee-Extrakts, seiner Verdünnungsstufen, Estradiol und Endoxifen sowie der Kombination aus Extrakt bzw. seiner Verdünnungen mit Endoxifen bezogen auf die Negativkontrolle (NK = 100 %, bestehend aus dem jeweils angewendeten Lösungsmittel in Zellsuspension); angegeben sind die Mittelwerte aus drei Messungen, sowie die Standardabweichungen und Signifikanzen (\*p < 0,05) bezogen auf die NK; Ext = Grüntee-Extrakt in den angegebenen Verdünnungen; End = Endoxifen; NK = Negativkontrolle (Abschnitt 3.9). .....53
- Abbildung 21: CellTiter-Glo®-Test: Darstellung der Zellviabilität [%] von MDA-MB-231 nach 24 h Einwirkung der Referenzsubstanzen Quercetin, EGCG und Rutin in jeweils 2 Konzentrationen, Estradiol und Endoxifen sowie der Kombination aus Referenzen mit Endoxifen bezogen auf die Negativkontrolle (NK = 100 %); angegeben sind die Mittelwerte aus drei Messungen sowie die Standardabweichungen und Signifikanzen (\*p < 0,05) bezogen auf die NK; Quer = Quercetin; Ru = Rutin; End = Endoxifen; NK = Negativkontrolle (Abschnitt 3.9). .....54
- Abbildung 22: CytoTox-Glo™-Test: Darstellung der Zellviabilität [%] von MCF-7 nach 24 h Einwirkung des Grüntee-Extrakts und seiner Verdünnungsstufen, Estradiol und Endoxifen sowie der Kombination aus Extrakt bzw. seiner Verdünnungen mit Endoxifen bezogen auf die Negativkontrolle (NK = 100 %, bestehend aus dem jeweils angewendeten Lösungsmittel in Zellsuspension); angegeben sind die Mittelwerte aus drei Messungen sowie die Standardabweichungen und Signifikanzen (\*p < 0,05) bezogen auf die Negativkontrolle; Ext = Grüntee-Extrakt in den angegebenen Verdünnungsstufen; End = Endoxifen; NK = Negativkontrolle (Abschnitt 3.9). .....55
- Abbildung 23: CytoTox-Glo™-Test: Darstellung der Zellviabilität [%] von MCF-7 nach 24 h Einwirkung der Referenzsubstanzen Quercetin, EGCG und Rutin in jeweils 2 Konzentrationen, Estradiol und Endoxifen sowie der Kombination aus Referenzen mit Endoxifen bezogen auf die Negativkontrolle (NK = 100 %, bestehend aus dem jeweils angewendeten Lösungsmittel in Zellsuspension); angegeben sind die Mittelwerte aus drei Messungen sowie die Standardabweichungen und Signifikanzen (\*p < 0,05) bezogen auf die Negativkontrolle; Quer = Quercetin; EGCG = Epigallocatechingallat; Ru = Rutin; End = Endoxifen; NK = Negativkontrolle (Abschnitt 3.9). .....56

- Abbildung 24: CytoTox-Glo™-Test: Darstellung der Zellviabilität [%] von MDA-MB-231 nach 24 h Einwirkung des Grüntee-Extrakts und seiner Verdünnungsstufen, Estradiol und Endoxifen sowie der Kombination aus Extrakt bzw. seiner Verdünnungen mit Endoxifen bezogen auf die Negativkontrolle (NK = 100 %, bestehend aus dem jeweils angewendeten Lösungsmittel in Zellsuspension); angegeben sind die Mittelwerte aus drei Messungen sowie die Standardabweichungen und Signifikanzen (\*p < 0,05) bezogen auf die Negativkontrolle; Ext = Grüntee-Extrakt in den angegebenen Verdünnungsstufen; End = Endoxifen; NK = Negativkontrolle (Abschnitt 3.9). .....57
- Abbildung 25: CytoTox-Glo™-Test: Darstellung der Zellviabilität [%] von MDA-MB-231 nach 24 h Einwirkung der Referenzen Quercetin, EGCG und Rutin in jeweils 2 Konzentrationen, Estradiol und Endoxifen sowie der Kombination aus Referenzen mit Endoxifen bezogen auf die Negativkontrolle (NK = 100 %); angegeben sind die Mittelwerte aus drei Messungen sowie die Standardabweichungen und Signifikanzen (\*p < 0,05) bezogen auf die Negativkontrolle; Quer = Quercetin; EGCG = Epigallocatechingallat; Ru = Rutin; End = Endoxifen; NK = Negativkontrolle (Abschnitt 3.9). .....58
- Abbildung 26: BrdU-Test: Darstellung der Zellproliferation [%] von MCF-7 nach 24 h Einwirkung des Grüntee-Extrakts und Verdünnungsstufen, Estradiol und Endoxifen sowie der Kombination aus Extrakt bzw. seiner Verdünnungen mit Endoxifen bezogen auf die Negativkontrolle (= 100 %); angegeben sind die Mittelwerte aus drei Messungen mit Standardabweichungen und Signifikanzen (\*p < 0,05) bezogen auf die Negativkontrolle; Ext = Grüntee-Extrakt in den Verdünnungsstufen; End = Endoxifen; NK = Negativkontrolle (Abschnitt 3.9). .....59
- Abbildung 27: BrdU-Test: Darstellung der Zellproliferation [%] von MCF-7 nach 24 h Einwirkung der Referenzsubstanzen Quercetin, EGCG und Rutin in jeweils 2 Konzentrationen, Estradiol und Endoxifen sowie der Kombination aus Referenzen mit Endoxifen bezogen auf die Negativkontrolle (NK = 100 %, bestehend aus dem jeweils angewendeten Lösungsmittel in Zellsuspension); angegeben sind die Mittelwerte aus drei Messungen sowie die Standardabweichungen und Signifikanzen (\*p < 0,05) bezogen auf die Negativkontrolle; Quer = Quercetin; EGCG = Epigallocatechingallat; Ru = Rutin; End = Endoxifen; NK = Negativkontrolle (Abschnitt 3.9). .....60

- Abbildung 28: BrdU-Test: Darstellung der Zellproliferation [%] von MDA-MB-231 nach 24 h Einwirkung des Grüntee-Extrakts und seiner Verdünnungsstufen, Estradiol und Endoxifen sowie der Kombination aus Extrakt bzw. seiner Verdünnungen mit Endoxifen bezogen auf die Negativkontrolle (= 100 %, bestehend aus dem jeweils angewendeten Lösungsmittel in Zellsuspension); angegeben sind die Mittelwerte aus drei Messungen sowie die Standardabweichungen und Signifikanzen (\*p < 0,05) bezogen auf die Negativkontrolle; Ext = Grüntee-Extrakt in den angegebenen Verdünnungsstufen; End = Endoxifen; NK = Negativkontrolle (Abschnitt 3.9). .....61
- Abbildung 29: BrdU-Test: Darstellung der Zellproliferation [%] von MDA-MB-231 nach 24 h Einwirkung der Referenzsubstanzen Quercetin, EGCG und Rutin in jeweils 2 Konzentrationen, Estradiol und Endoxifen sowie der Kombination aus Referenzen mit Endoxifen bezogen auf die Negativkontrolle (NK = 100 %, bestehend aus dem jeweils angewendeten Lösungsmittel in Zellsuspension); angegeben sind die Mittelwerte aus drei Messungen sowie die Standardabweichungen und Signifikanzen (\*p < 0,05) bezogen auf die Negativkontrolle; Quer = Quercetin; EGCG = Epigallocatechingallat; Ru = Rutin; End = Endoxifen; NK = Negativkontrolle (Abschnitt 3.9). .....62
- Abbildung 30: Glukosebestimmung (in mmol/l) im Überstand der MCF-7-Zellen (blau) und MDA-MB-231-Zellen (rot) nach 24 h Inkubation mit den Testsubstanzen [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]; Quer = Quercetin; EGCG = Epigallocatechingallat; Ru = Rutin; End = Endoxifen, Ext = Grüntee-Extrakt in den angegebenen Verdünnungsstufen. ....63
- Abbildung 31: Bestimmung des pH-Werts im Überstand der MCF-7-Zellen (blau) und MDA-MB-231-Zellen (rot) nach 24 h Inkubation mit den Testsubstanzen [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]; Quer = Quercetin; EGCG = Epigallocatechingallat; Ru = Rutin; End = Endoxifen, Ext = Grüntee-Extrakt in den angegebenen Verdünnungsstufen. ....64
- Abbildung 32: Laktat-Bestimmung [mmol/l] im Überstand der MCF-7-Zellen (blau) und MDA-MB-231-Zellen (rot) nach 24 h Inkubation mit den Testsubstanzen [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]; Quer = Quercetin; EGCG = Epigallocatechingallat; Ru = Rutin; End = Endoxifen, Ext = Grüntee-Extrakt in den angegebenen Verdünnungsstufen. ....64

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Wichtige Risikofaktoren für das Mammakarzinom [93, 129, 158, 190] ....	16
Tabelle 2:	Entsprechend der St. Gallen Konsensus-Empfehlungen modifizierte Einteilung der molekularen Subtypen des Mammakarzinoms [64] .....	17
Tabelle 3:	Prognostische und prädiktive Faktoren für die Therapie des Mammakarzinoms [79, 120, 167] .....	19
Tabelle 4:	Optionen für die Antihormontherapie des Mammakarzinoms [69, 141] ...	20
Tabelle 5:	Eingesetzte Volumina an Nährmedium für die Zellkultivierung .....	30
Tabelle 6:	Angaben für die Herstellung der Referenz- und Kontrollsubstanzen .....	32

**Abkürzungsverzeichnis**

$\alpha$	alpha
AAF	Alanyl-Alanylphenylalanyl-Aminoluciferin
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
AK	Antikörper
ANOVA	Varianzanalyse
AU	Absorbance Unit
ATP	Adenosintriphosphat
$\beta$	beta
BET	Brusterhaltende Therapie
bzw.	beziehungsweise
BRCA	Breast Cancer gene
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CTC	zirkulierende Tumorzellen
CVD	Cardiovascular disease
CYP	Enzym aus der Gruppe Cytochrom-P450
DCIS	Duktales Carcinoma in situ
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC	Epicatechin
ECG	Epicatechingallat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGC	Epigallocatechin
EGCG	Epigallocatechingallat
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	Estrogenrezeptor
et al.	und andere
Fa.	Firma
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GnRH	Gonadotropes-Releasing-Hormone
h	Stunde
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Dihydrogensulfat (Schwefelsäure)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	horseradish peroxidase
IgG	Immunglobulin G

LC-MS	Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
LCIS	Lobuläres Carcinoma in situ
LK	Lymphknoten
M	Molar
Mg	Magnesium
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol / l	Millimol pro Liter
min	Minuten
MRM	Modifiziert Radikale Mastektomie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NGGG	Norddeutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe
nm	Nanometer
NK	Negativkontrolle
OFS	Suppression der Ovarfunktion
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
Pa	Pascal
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Thrombozyten-Wachstumsfaktor
POD	Peroxidase
PR	Progesteronrezeptor
p-Wert	Signifikanzwert
RKI	Robert-Koch-Institut
SERM	Selektiver Estrogen Rezeptor Modulator
SLNB	Sentinel-Lymphknoten-Biopsie
TNBC	Triple-negatives Mammakarzinom
u.a.	unter anderem
UFK	Universitätsfrauenklinik
U / min	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Mammakarzinom der Frau

### 1.1.1 Einführung

Brustkrebs zählt zu den erstdokumentierten Tumorleiden und animierte bereits unsere Vorfahren in der Antike zur Forschung am Menschen [130]. Der griechische Arzt Hippokrates (um 460 bis 370 v. Chr.) beschrieb geschwürige Neubildungen an der weiblichen Brust und prägte den altgriechischen Begriffs „καρκίνοϛ“ (karkinos). Die Bezeichnung „Krebs“ stand für eine progrediente Schwellung ohne Neigung zur spontanen Heilung. Mit seinen Schülern forschte Hippokrates auf der griechischen Insel Kos an Geschwüren und verglich die bizarren Hauterscheinungen mit der Gestalt eines Krestieres. Er prognostizierte resultierend aus seinen sorgfältigen Untersuchungen eine schwierige bis unmögliche Heilung des Leidens [89, 164].

In den letzten Jahrhunderten gab es kontinuierlich Bemühungen, Krebserkrankungen des Menschen zu therapieren und Mittel zur Verlängerung der Lebenszeit zu finden. Besonders Brustkrebs rückte dabei aufgrund steigender Inzidenz und schwerer Therapierbarkeit als weltweites Gesundheitsproblem in den Fokus der Forschung.

Heutzutage ist das Mammakarzinom in Deutschland und weltweit die häufigste maligne Tumorerkrankung bei Frauen [178, 190]. Trotz wichtiger Fortschritte im Verständnis und beim Umgang mit der Erkrankung steigt jährlich die Krankheitsrate [37, 190]. Es bestehen multimodale Therapieansätze, bei denen die operative Entfernung des Tumors die größte Bedeutung erhält.

Ergänzend wird je nach Befund eine Strahlen- und/oder systemische Therapie (Chemotherapie, Antihormontherapie, Antikörpertherapie) empfohlen für eine Optimierung des Therapieerfolgs [11].

Bei vielen Betroffenen besteht zusätzlich das Interesse, eine komplementäre Therapie in Anspruch zu nehmen, in der Hoffnung, Symptome zu lindern und die Lebensqualität zu steigern [119, 24, 107]. Die Komplementärmedizin umfasst ergänzende Maßnahmen zur Schulmedizin, z.B. den Einsatz von Akupunktur, Phytotherapeutika, Yoga oder Homöopathie. Aufgrund einer bisher geringen Studienlage besteht für diese Anwendungen kein ausreichend objektiver Wirksamkeitsnachweis. Kennzeichnend sind für einen Großteil der eingesetzten Präparate die gute Verträglichkeit sowie das limitierte Auftreten von Nebenwirkungen [24, 52, 129].

Der Einsatz von komplementärer Medizin variiert stark innerhalb Europas und ist in Deutschland in der ergänzenden Anwendung zu konventionellen Therapieverfahren mit fast 40 % der Betroffenen verhältnismäßig sehr hoch [90]. Das Patientenkollektiv des Mammakarzinoms nutzt verbreitet biologisch-basierte ergänzende Mittel [44, 107, 119]. Einer Querschnittsstudie der Technischen Universität München zufolge nehmen 74,1 % der Frauen mit gynäkologischer Tumorerkrankung während einer systemischen Therapie die Unterstützung von Phytotherapeutika und Nahrungsergänzungsmitteln in Anspruch [44]. Neben der Einnahme verschiedener Vitamine, Mineralstoffe und Kräuterzubereitungen besitzt besonders grüner Tee aufgrund seiner wertvollen Inhaltsstoffe einen wachsenden Stellenwert in der Komplementärmedizin, sowohl prophylaktisch als auch therapeutisch bei onkologischen Krankheitsbildern [157, 180].

### 1.1.2 Definition

Das Mammakarzinom ist eine chronisch maligne Erkrankung des Brustdrüsengewebes. Dem Manifestationsort entsprechend werden duktale von lobulären Tumoranteilen differenziert. Duktale Karzinome treten mit 80 % Vorkommen häufiger auf und haben ihren Ursprung in den Epithelzellen der Milchgänge [129, 189]. Lobuläre Entartungen (ca. 10 %) hingegen entstehen in den Drüsenläppchen der Brust. Andere spezielle Subtypen wie papilläre, medulläre, adenoid-zystische, tubuläre oder muzinöse Tumore kommen selten vor [129]. Die primäre Einteilung der histologisch stark voneinander abweichenden Typen erfolgt in präinvasive Läsionen (Carcinoma in situ) und invasive Karzinome [39, 56].

### 1.1.3 Epidemiologie

Weltweit zählt Brustkrebs zu den häufigsten Krebserkrankungen und weist bei Frauen mit etwa 2,2 Millionen Neuerkrankungen pro Jahr die höchste Inzidenz unter den Tumorentitäten auf [74]. Im Ländervergleich wird deutlich, dass westliche Industrienationen wie die USA, Australien oder viele europäische Staaten stärkere Erkrankungsraten dokumentieren als Länder des asiatischen oder afrikanischen Kontinents (Abbildung 1).

Laut statistischer Erhebungen der Weltgesundheitsorganisation starben im Jahre 2020 global mehr als 680.000 Frauen an Brustkrebs, dies entspricht prozentual dem höchsten Anteil an krebsbedingten Todesfällen bei Frauen [74, 178].

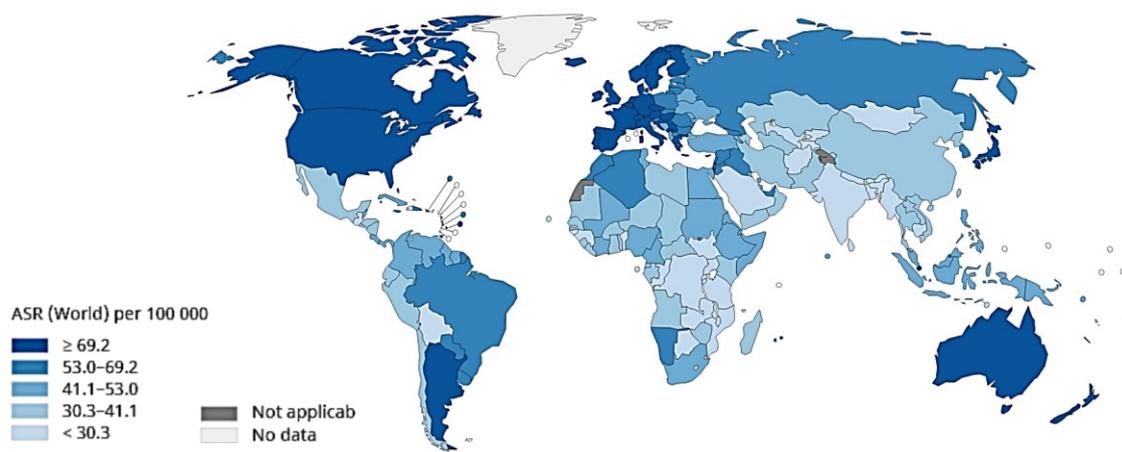


Abbildung 1: Geschätzte Brustkrebsinzidenz der WHO (weltweit); altersstandardisierte Rate von 2020; Frauen in allen Gruppen [75].

In Deutschland wird im Durchschnitt bei einer von acht Frauen ein Brusttumor diagnostiziert. Basierend auf den Schätzungen der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e.V. (GEKID) und des Zentrums für Krebsregisterdaten (ZfKD) im Robert Koch-Institut wurden im Jahre 2016 rund 69.000 Brustkrebserkrankte in der Bundesrepublik neu erkannt und etwa 18.500 Sterbefälle verzeichnet [190].

Die maligne Brustdrüsenerkrankung ist in Deutschland mit einem prozentualen Anteil von 29,5 % (Stand 2016) unter den gesamten Krebsneuerkrankungen mit Abstand die häufigste Tumorlokalisation bei Frauen (Abbildung 2). Dabei beträgt das mittlere Erkrankungsalter für das Mammakarzinom beim weiblichen Geschlecht circa 64 Jahre. Dieses liegt deutlich niedriger als der für alle Tumorerkrankungen berechnete Durchschnitt von 69 Jahren für Frauen [39, 190].

Im dokumentierten Verlauf ist die Neuerkrankungsrate für Brustkrebs bis zum Beginn des 21. Jahrhunderts in der Bundesrepublik fortlaufend angestiegen [37]. Besonders in der Altersgruppe der 50- bis 69-Jährigen traten mit der Einführung des Mammographie-Screenings als Präventionsmaßnahme (je nach Region in den Jahren 2005 bis 2009) signifikant erhöhte Inzidenzzahlen auf. Ab dem Jahre 2010 verringerte sich diese Anzahl und ist in der Tendenz abfallend [39, 189, 190].

Entwicklungen in der Diagnostik und bei Therapieverfahren haben in den letzten Jahren die Prognose und die Heilungschancen bei Brustkrebs verbessert und zu sinkenden Sterberaten geführt [37, 190]. Die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate aller Brustkrebserkrankten nach Erstdiagnose betrug im Jahre 2016 in Deutschland circa 87 %. In den kommenden Jahren wird zu beurteilen sein, ob und welchen förderlichen Einfluss die Früherkennungsmaßnahmen für die Mortalität und Überlebenszeit von Brustkrebspatienten haben [190].

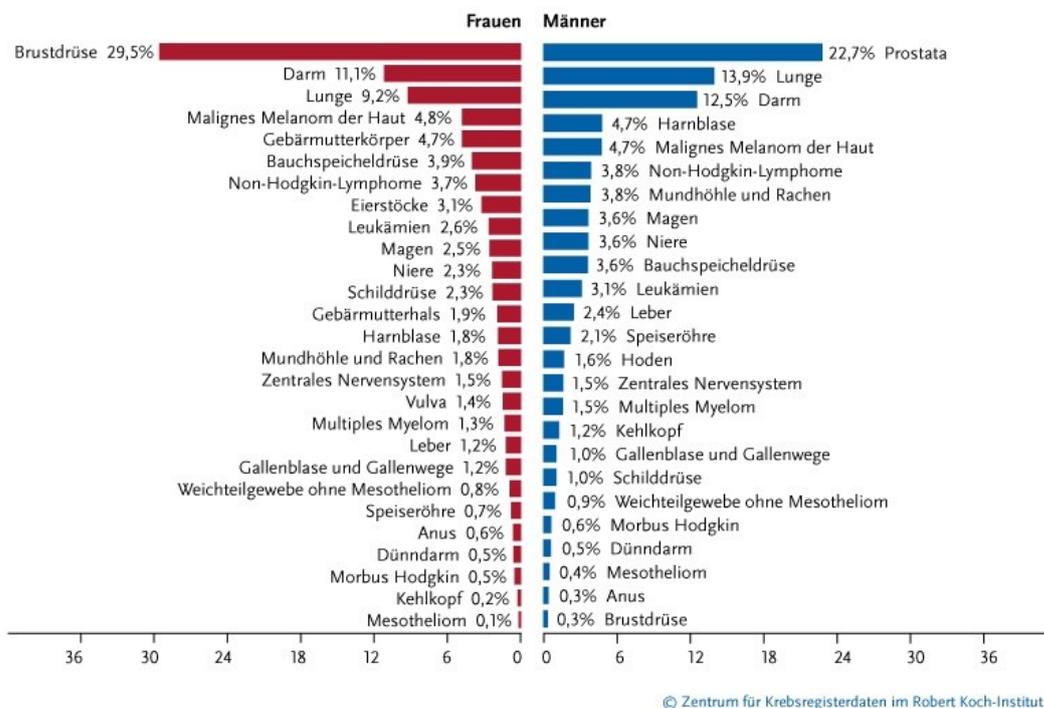


Abbildung 2: Krebsinzidenzen in Deutschland 2016 mit prozentualen Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs) [191].

### 1.1.4 Pathogenese

Mammakarzinome wachsen in den Gängen oder Läppchen der Brustdrüse. Der Primärtumor ist in 55 % der Fälle im oberen äußeren Quadranten der Brust, häufig einseitig und vermehrt auf der linken Körperseite angesiedelt [56, 129].

Die Grundlage der Tumorentstehung in Organismen lässt sich im Allgemeinen zurückführen auf eine Dysbalance zwischen Proliferation und Apoptose von Zellen in einem bestimmten Gewebe. Die Regulation der zellulären Vorgänge erfolgt normalerweise mithilfe von spezifischen Proteinen, Wachstumsfaktoren und anderen Mediatoren. Maligne Zellen weisen aufgrund genetischer Veränderungen im Erbgut eine Störung dieser Kontrollmechanismen auf, was zu einer ungehemmten Zellteilung im betroffenen Gewebe führt. Ursache für die DNA-Schäden im Genom sind spontane Mutationen oder auf die Zelle einwirkende Toxine [17, 35, 151].

Unter dem Einfluss verschiedener Risikofaktoren entstehen maligne Brustkrebstumoren häufig lokal aus Vorläuferläsionen und unterliegen im progredienten Krankheitsverlauf einer systemischen Ausbreitung [35].

#### 1.1.4.1 Schritte der Karzinogenese

Die Entwicklung eines Tumors vollzieht sich stufenweise und kann Jahre andauern.

Bei der Initiation entsteht in der Mutterzelle durch spontane Mutationen oder einwirkende Toxine (z.B. chemische Substanzen, Viren) ein DNA-Schaden, der durch zellinterne Reparaturmechanismen nicht behoben werden kann und auf Tochterzellen übertragen wird. Dabei kommt es im Genom zur Aktivierung von Onkogenen sowie zur Unterdrückung von Tumorsuppressorgenen [35, 148].

Stark prädisponiert für das Auftreten von Brustkrebs sind Frauen mit einem erblich bedingten Mutationsnachweis in den Tumorsuppressorgenen BRCA-1 und BRCA-2. Andere relevante Gene sind HER2, EGFR, c-Myc und Ras [158]. Das sogenannte familiäre Mammakarzinom macht insgesamt etwa 5-10 % der malignen Brusttumore aus. Bei etwa der Hälfte aller Patientinnen ist der genetische Hintergrund noch nicht geklärt [56, 95].

Die Promotion als nächste Stufe der Karzinogenese bezeichnet zusätzliche Veränderungen sowie die Vermehrung der mutierten Ausgangszelle. Diese sind durch die Deregulierung zellulärer Prozesse sowie durch den Einfluss weiterer Wachstumsreize (z.B. Hormone, chemische Stoffe) bedingt. Das Resultat ist eine reversible, gutartige Gewebevermehrung [35, 148].

Eine Neoplasie der Epithelzellen innerhalb der Brustdrüsengänge bei intakter Basalmembran wird als Duktales Carcinoma in situ (DCIS) bezeichnet. Es macht einen Großteil der Krebsvorstufen aus und entartet unbehandelt in 30 - 50 % der Fälle. In den Lobuli der Milchdrüsen können sich ebenfalls atypische Hyperplasien des Epithels ausbilden, die, wie beispielsweise das Lobuläre Carcinoma in situ (LCIS), aufgrund des Entartungspotenzials als Risikomarker gelten [56, 129].

Das sich anschließende Stadium der Progression ist gekennzeichnet durch die irreversible Entdifferenzierung und maligne Transformation des geschädigten Erbguts. Hierbei spielen weitere aktivierte Tumorgene und angiogenetische Faktoren (AK, Angiogenin, PDGF) eine Rolle [35, 148].

Invasion und Metastasierung markieren die letzte und gleichzeitig die Prognose bestimmende Stufe der Karzinogenese. Dabei kommt es zur Absiedelung von Zellen des Primärtumors über den Blut- und Lymphstrom und zur Bildung histologisch gleichartiger Tochtergeschwülste in einem anderen Gewebe [35].

Charakteristisch für das Mammakarzinom ist eine frühe Metastasierung. Die hämatogene Streuung erfolgt am häufigsten ossär (v.a. in Wirbelkörper), pulmonal oder hepatisch. Über Lymphbahnen werden die Lymphknoten der Axilla, je nach Lage des Primärtumors, entlang der A. mammaria interna oder im Bereich der Klavikula infiltriert [35, 56, 95]. Der axilläre Lymphknotenstatus korreliert mit dem Rezidivrisiko und gilt als relevanter Prognosefaktor für das Gesamtüberleben bei Brustkrebs [129].

### **1.1.5 Risikofaktoren**

Die S3-Leitlinie für das Mammakarzinom hebt das fortgeschrittene Lebensalter (ab dem 50. Lebensjahr) als den bedeutendsten Risikofaktor für die Brustkrebsentstehung in der Bevölkerung hervor [11]. Auch die Familiengeschichte, endokrine Faktoren sowie der individuelle Lebensstil besitzen eine hohe Bedeutung [158]. Weitere Determinanten sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Eine besondere Rolle spielt der Einfluss von Sexualhormonen. Östrogene, die physiologisch die Entwicklung der Brustdrüse stimulieren, potenzieren wissenschaftlichen Studien zufolge bei Patientinnen mit langjähriger sowohl endogener als auch exogener Exposition das Erkrankungsrisiko für Brustkrebs [46, 69, 118, 185]. Ebenso werden die Zufuhr und der Einfluss von Gestagenen besonders im Zusammenspiel mit Östrogenen (z.B. bei einer postmenopausalen Hormonersatztherapie) als Risikofaktor diskutiert [11, 35, 165].

Die Vorgänge auf molekularer Ebene sind noch nicht eindeutig geklärt. Eine allgemein anerkannte Hypothese geht davon aus, dass Östrogene ihre karzinogene Wirkung über geeignete Rezeptoren in Form vermehrter Transkription von Proliferationsgenen und folglich indirekt über verminderte DNA-Reparaturmöglichkeiten entfalten [78, 95, 185]. Alternativ besteht die Annahme, dass Östrogene rezeptorunabhängig zu genotoxischen Metaboliten mutieren. Diese schädigen direkt über Einzelstrangbrüche und Punktmutationen die DNA und ermöglichen unkontrolliertes Wachstum von Tumorzellen [95, 182, 185].

In Abhängigkeit von bestehenden Risikofaktoren ist die Einleitung individueller Früherkennungsmaßnahmen für einen Ausschluss oder eine möglichst frühe Diagnosestellung des Mammakarzinoms indiziert.

Tabelle 1: Wichtige Risikofaktoren für das Mammakarzinom [93, 129, 158, 190]

<b>Risikofaktoren für das Mammakarzinom</b>	
hormonell	<ul style="list-style-type: none"> <li>- frühe Menarche, späte Menopause</li> <li>- keine/wenige Schwangerschaften/Stillzeiten</li> <li>- späte Erstparität</li> <li>- Einnahme oraler Kontrazeptiva</li> <li>- Hormonersatztherapie (v.a. bei Einnahmedauer &gt; 5 Jahre)</li> <li>- Adipositas in der Postmenopause (Adipozyten synthetisieren Östrogene)</li> </ul>
hereditär	<ul style="list-style-type: none"> <li>- genetische Disposition (Mutationsnachweis im BRCA1- und BRCA2-Gen)</li> <li>- familiäre Belastung (Mamma- oder Ovarialkarzinom)</li> </ul>
histologisch	<ul style="list-style-type: none"> <li>- sehr dichtes Brustdrüsengewebe</li> <li>- Vorläuferläsionen: <ul style="list-style-type: none"> <li>• duktales Carcinoma in situ (DCIS)</li> <li>• lobuläres Carcinoma in situ (LCIS)</li> <li>• atypische duktale oder lobuläre Hyperplasie</li> <li>• radiäre Narbe</li> <li>• sklerosierende Adenose</li> <li>• fibrozystische Mastopathie</li> </ul> </li> </ul>
sonstige	<ul style="list-style-type: none"> <li>- hohes Lebensalter</li> <li>- Geschlecht (Frauen &gt; Männer)</li> <li>- Mammakarzinom in der Eigenanamnese</li> <li>- Lebensstil (Adipositas, Alkohol- / Tabakkonsum, Bewegungsmangel)</li> <li>- Z. n. Radiatio des Thorax im Kindes- oder Jugendalter</li> </ul>

### 1.1.6 Rezeptorstatus

Unter histologischer Begutachtung von entnommenem Tumorgewebe ist der Rezeptorstatus von Brustkrebszellen evaluierbar und beim invasiven Mammakarzinom bereits in der Primärdiagnostik etabliert [11]. Die Bestimmung des Östrogenrezeptors (ER) und des Progesteronrezeptors (PR) sowie einer vermehrten Expression des Humanen Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (HER2) erfolgen mittels Immunhistochemie bereits präoperativ aus dem Biopsat einer ultraschallgesteuerten Stanze. Dabei werden der Prozentsatz positiver Tumorzellkerne sowie deren durchschnittliche Färbeintensität angegeben. Der Rezeptornachweis spiegelt bestimmte Tumoreigenschaften wider, ermöglicht eine prognostische Einschätzung der Krankheit und dient als prädiktiver Marker [2, 129].

Im Rahmen der St. Gallen Brustkrebskonferenz entwickelten internationale Experten im Jahre 2011 ein Konzept zur Einteilung des Mammakarzinoms in molekulare Subtypen (Tabelle 2). Häufig sind histopathologische Charakteristika von Tumorzellen mit bestimmten Krankheitsverläufen assoziiert und implizieren entsprechende Therapieempfehlungen [64].

Unter Beachtung der neuesten Studiendaten erfolgt regelmäßig eine Anpassung der Therapieoptionen. Diskutiert wird in Expertengremien u.a. über den indizierten Einsatz einer adjuvanten Chemotherapie unter Abwägung des Nutzens und des Risikos für die jeweiligen Patientinnen [11, 120]. Eine besondere Stellung nimmt das etwa bei einem Fünftel aller Patientinnen auftretende triple-negative Mammakarzinom (TNBC) ein, das aufgrund einer verminderten bis fehlenden Expression der ER-, PR- sowie HER2-Rezeptoren weniger therapeutische Ansatzpunkte aufweist und dadurch mit einer schlechten Prognose einhergeht [5].

Tabelle 2: Entsprechend der St. Gallen Konsensus-Empfehlungen modifizierte Einteilung der molekularen Subtypen des Mammakarzinoms [64]

Subtyp	Erläuterung	Therapie
<b>Luminal A</b>	ER und/oder PR positiv HER2 negativ, Ki-67 niedrig	Endokrine Therapie
<b>Luminal B</b> HER2 negativ	ER und /oder PR positiv HER2 negativ, Ki-67 hoch	Endokrine Therapie +/- Chemotherapie
HER2 positiv	ER und/oder PR positiv HER2 positiv, jedes Ki-67	Endokrine Therapie + Chemotherapie + Anti-HER2-Therapie
<b>HER2 positiv</b>	ER und PR negativ HER2 positiv	Chemotherapie + Anti-HER2-Therapie
<b>Triple-negativ</b>	ER und PR negativ HER2 negativ	Chemotherapie

### Hormonrezeptoren

Etwa zwei Drittel aller Mammakarzinome reagieren auf einen hormonell bedingten Wachstumsreiz. Sie exprimieren Östrogen- und/ oder Progesteronrezeptoren und werden durch die Bindung der weiblichen Sexualhormone in ihrer Differenzierung stimuliert [37]. Der im Zytosol entstandene Hormon-Rezeptor-Komplex wandert in den Zellkern. Er dockt an eine spezifische Stelle der DNA an und beeinflusst als Transkriptionsfaktor das Genexpressionsmuster bestimmter Zielgene, welche beispielsweise die Zellteilung fördern [69]. In der immunhistochemischen Analyse gelten mehr als 1 % angefärbte Tumorzellen im Schnittbild als positiver Rezeptorbefund, mehr als 10 % als sensitiv für eine endokrine Systemtherapie. Adjuvant erfolgt die Blockade der Hormonrezeptoren mit Antiöstrogenen, um okkulte Tumorzellen zu vernichten und das Rezidivrisiko zu senken [11].

## HER2-Rezeptor

Onkogene induzieren eine vererbare Störung der Genregulation und bewirken über ein pathologisches Wachstumsverhalten die maligne Transformation von Zellen [69]. Das HER2-Onkogen kodiert für den Humanen Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor 2. Etwa 15 bis 20 % aller invasiven Brusttumoren zeigen eine Überexpression des membranständigen Rezeptors, welcher bei Aktivierung einen Wachstumsreiz in der Zelle auslöst. Für den Nachweis des HER2-Rezeptors eignet sich neben der Immunhistochemie auch die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung. Die unkontrollierte Zellproliferation bei positivem HER2-Status ist mit progredientem Krankheitsverlauf und Tendenz zur Metastasenbildung assoziiert [10, 129]. Laut aktueller S3-Leitlinie besteht bei vermehrtem HER2-Rezeptornachweis ein hoher Empfehlungsgrad für eine Anti-HER2-Therapie mit Trastuzumab [11].

## Ki-67-Status

Zusätzlich wird als relevanter Parameter zur Therapieentscheidung das Vorhandensein des Proliferationsmarkers Ki-67 untersucht, der nur in Zellen mit aktiven Zyklusphasen exprimiert wird [37]. Aufgrund der Inhomogenität von Studienergebnissen, resultierend aus hoher Variabilität des Markers, besteht bisher kein Konsens über praxisrelevante Grenzwerte für eine Prognose- und Prädiktionseinschätzung. In der aktuellen S3-Leitlinie werden lediglich Empfehlungen für eine möglichst reproduktive Ermittlung des Index aufgestellt [11]. Eine starke Expression des Ki-67 steht im Zusammenhang mit einer ungünstigen Prognose [37].

### **1.1.7 Diagnostik und Therapie**

Risikoläsionen und Frühstadien des Mammakarzinoms sind in den meisten Fällen klinisch inapparent [129]. Für Risikogruppen und Frauen ab einem bestimmten Alter lässt sich eine hohe Bedeutung der Früherkennungsdiagnostik ableiten. Sie umfasst zusätzlich zum klinischen Untersuchungsbefund die apparative Diagnostik und histologische Beurteilung des Tumors. Eine zentrale Rolle spielt bei Frauen ab dem 40. Lebensjahr die Mammographie, welche nachweislich zu einer Senkung der Mortalität bei Brustkrebs führt [11, 16, 76]. Dabei handelt es sich um eine Röntgenuntersuchung der weiblichen Brust [135]. Im Rahmen des europaweiten Mammographie-Screening-Programms besteht für alle Frauen zwischen 50 und 69 Jahren die Empfehlung, alle zwei Jahre das bestehende Angebot zur Früherkennung von Brustkrebs in Anspruch zu nehmen [47]. Für Frauen unter 40 Jahren wird zur Abklärung möglicher Auffälligkeiten primär die Sonografie der Brust und der Achselhöhlen empfohlen. Bei Hochrisikopatientinnen kommt bei unklarer Diagnose vereinzelt die MRT zum Einsatz. Verdachtsdiagnosen bei auffälligen Befunden werden mittels einer Stanz- oder Vakuumbiopsie und histologischer Aufarbeitung der Probe abgeklärt [37].

Die Therapie des Mammakarzinoms umfasst neben dem operativen Verfahren zur Entfernung des Tumors die adjuvante Behandlung zum Schutz vor Rezidiven. Hierfür kommen Strahlen-, Chemo-, und Antihormon- sowie zielgerichtete Antikörpertherapie zum Einsatz [129]. Basierend auf der deutschen S3-Leitlinie wird zur optimalen Behandlung der Patientin ein individuell zugeschnittener Therapieansatz verfolgt, bei dem die partizipative Entscheidungsfindung mit Einbeziehung der Patientenwünsche einen hohen Stellenwert einnimmt [11].

Die Wahl der Therapie richtet sich nach dem Malignitätsgrad und den Subtypen des Karzinoms. Dies erfolgt unter Berücksichtigung prognostischer und prädiktiver Faktoren mithilfe von zusätzlichen mikroskopischen Untersuchungen und Testverfahren (Tabelle 3) [79, 167]. Eine neuere Möglichkeit stellen Genexpressionsanalysen dar, welche die Aktivität bestimmter Gene auswerten und unterstützend zur Risikoeinschätzung einer Therapie dienen [37]. Zur Abwägung des Nutzens einer adjuvanten Chemotherapie finden Tests wie der OncotypeDX®, Endopredict®, Prosigna® und Mammaprint® zunehmend ergänzende Anwendung, die durch laufende Studien weiterhin klinisch validiert werden müssen [11, 120]. Aussagekräftige Forschungsergebnisse stammen aus der seit 2006 laufenden TAILORx-Studie. Demnach können im frühen Brustkrebsstadium mithilfe des OncotypeDX® evidenzbasiert Patientinnen identifiziert werden, die aus einer zusätzlich zur endokrinen Therapie angewandten Chemotherapie keinen Benefit bezüglich des erkrankungsfreien Überlebens ziehen. In diesen Fällen kann auf die Einnahme toxischer Chemotherapeutika verzichtet werden [58, 153].

Tabelle 3: Prognostische und prädiktive Faktoren für die Therapie des Mammakarzinoms [79, 120, 167]

Prognostische Faktoren	Prädiktive Faktoren
<p>= Voraussage des wahrscheinlichen Krankheitsverlaufs des Mammakarzinoms</p> <p><b>Ungünstig:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Alter &lt;35 Jahren</li> <li>-Tumorstadium, Metastasierung</li> <li>-Multifokalität / Multizentrität</li> <li>-Zahl der befallenen Lymphknoten</li> <li>-undifferenziertes Gewebe (Grading)</li> <li>-Adipositas (BMI &gt; 30 kg/m<sup>2</sup>)</li> <li>-erhöhtes Ki-67 (Proliferationsmarker)</li> <li>-zirkulierende Tumorzellen (CTC) im Blut</li> <li>-zirkulierende Tumor-DNA (ctDNA)</li> </ul> <p><b>Günstig:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-R0-Status</li> <li>-keine Gefäßinvasion</li> <li>-positiver ER- / PgR-Status</li> <li>-frühes Ansprechen auf Therapie</li> <li>-tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL)</li> </ul>	<p>=Einschätzung der Wirksamkeit einer Therapie beim Mammakarzinom</p> <p><b>Positiver ER-/ PgR-Status:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ansprechen einer ET</li> </ul> <p><b>Postmenopausenstatus:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Einsatz von Aromatasehemmern</li> </ul> <p><b>Positiver HER-2-Status:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ansprechen einer Antikörpertherapie</li> </ul> <p><b>Erhöhtes Ki-67:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Einsatz einer NACT</li> </ul> <p><b>Genexpressionstest Oncotype DX®:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Nutzen einer Chemotherapie</li> </ul> <p><b>BRCA-Mutation:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Einsatz von Platin in NACT</li> </ul> <p><b>CTC-Reduktion nach Therapiebeginn</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ansprechen der jeweiligen Therapie</li> </ul> <p>Zukünftig: PD-L1-Status b. TNBC [51, 120]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ansprechen einer Immuntherapie (Checkpoint-Inhibitoren)</li> </ul>

Grundsätzlich wird bei der Behandlung des primären Mammakarzinoms nach Möglichkeit operativ verfahren. Nach bioptischer Diagnosesicherung gelingt bei 60 bis 70 % der Patientinnen eine brusterhaltende Therapie (BET) unter Exzision des Karzinoms mit tumorfreiem Resektionsrand und anschließender Radiatio [37, 79]. Fortgeschrittene Befunde und das inflammatorische Mammakarzinom verlangen eine Mastektomie, bei der die vollständige Entfernung der Brust erfolgt. Die modifiziert radikale Mastektomie (MRM) ist mit einer ausgedehnten axillären Lymphonodektomie verbunden. Dabei treten häufig Komplikationen durch angestaute Flüssigkeit auf, wie z.B. Schmerzen im Schulter-Arm-Bereich oder ein sekundäres Lymphödem. Verzichtet werden kann auf die Axilladisektion, wenn mithilfe der Sentinel-Lymphknoten-Biopsie (SLNB) im Rahmen des operativen Tumormanagements der Ausschluss einer Metastasierung nachfolgender Lymphknotenstationen erfolgt [18, 129]. Bei bis zu zwei auffälligen Wächterlymphknoten kann abhängig vom Befund der Patientin anstatt einer Axilladisektion auch eine Sentinel-LK-Dissektion unter BET und systemischer Therapie durchgeführt werden [61]. Zur Rekonstruktion der Brust werden Silikonimplantate oder körpereigene Gewebestücke genutzt [2]. Postoperativ ist eine Bestrahlung indiziert, die laut aktueller Studienlage eine Senkung der Rezidivrate sowie der Brustkrebssterblichkeit beobachten lässt [11, 35, 167].

Die systemische Therapie des Mammakarzinoms umfasst nach histologischer Sicherung alle Formen medikamentöser Behandlung, die vor oder nach einer Operation durchgeführt werden können. Die Intention ist eine Steigerung der Überlebensrate, häufig unter Tolerierung einschränkender Nebenwirkungen [129].

Der chemotherapeutische Ansatz verfolgt die Applikation von Zytostatika. Adjuvant wird momentan in der Erstlinientherapie die Kombination eines Anthrazyklins mit einem Taxan (z.B. Epirubicin und Paclitaxel) empfohlen [2]. Die Wahl der eingesetzten Substanzen basiert auf der körperlichen Verfassung der Patientin und einer möglichen Vorbehandlung unter Beachtung kumulativer Effekte und Kreuzresistenzen [79]. Eine Überdosierung von Anthrazyklinen ist assoziiert mit kardiotoxischen Nebenwirkungen und Effluvium. Taxane schädigen das Nervensystem und führen häufig zu Myelosuppression mit Panzytopenie [35].

Die endokrine Therapie erfolgt bei hormonempfindlichen Tumoren nach Abschluss einer Chemotherapie und gegebenenfalls parallel zu einer Strahlentherapie. Zurzeit werden drei wirksame Substanzklassen eingesetzt (Tabelle 4) [129].

Tabelle 4: Optionen für die Antihormontherapie des Mammakarzinoms [69, 141]

Substanzklasse	Wirkungsweise	Wirkstoffe
1) SERMs	Blockade der Östrogen-rezeptoren in der Brustdrüse	Tamoxifen (prä- und postmenopausal)
2) GnRH-Analoga	Ovarsuppression durch Überstimulation der Hypophyse	Buserelin, Leuprorelin, Goserelin (prämenopausal)
3) Aromatasehemmer	Unterbindung der Sexualhormon-Produktion	Anastrozol, Letrozol, Exemestan (postmenopausal)

Die Dauer der endokrinen Therapie beträgt mindestens 5 Jahre und kann in Abhängigkeit von Rezidivrisiko und Toleranz auch auf bis zu 10 Jahre verlängert werden [129]. Die Nebenwirkungen gestalten sich individuell, am häufigsten kommen Hitzewallungen, Übelkeit, Schwindel, Kopf- und Gliederschmerzen sowie Antriebsschwäche vor. Für Tamoxifen besteht zusätzlich ein erhöhtes Risiko für das Auftreten eines Endometriumkarzinoms [35]. Im Rahmen der randomisierten Studien SOFT und TEXT wurde der mögliche Nutzen einer Ausschaltung der Ovarialfunktion (OFS) zusätzlich zu der endokrinen Therapie eruiert. Es ergab sich unter OFS eine signifikant höhere 8-Jahres-Rate der Rezidivfreiheit und des Gesamtüberlebens im Vergleich zur alleinigen Therapie mit Tamoxifen. Ebenso konnten Patientinnen mit Einnahme von Exemestan unter einer zusätzlichen OFS profitieren [53, 100, 120].

Im Gegensatz dazu setzt die Immuntherapie über die Gabe eines bestimmten Antikörpers an ausgewählten Zielstrukturen im Tumorgewebe an. Beim Mammakarzinom mit positivem HER2-Status wird der monoklonale Antikörper Trastuzumab (Herceptin) angewendet, welcher durch Blockade des humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors die Zellproliferation unterdrückt [35]. Laut Analyse der im Jahre 2008 bis 2010 durchgeführten randomisierten Phase-3-Studie CLEOPATRA steigert die Gabe von Pertuzumab zusätzlich zu Trastuzumab bei fortgeschrittenem Mammakarzinom die Gesamtüberlebensrate auf 37 % bei 8-jähriger Nachbeobachtungszeit. Der Einsatz dieser dualen Blockade des HER2-Rezeptors erfolgt in Kombination mit dem Chemotherapeutikum Doxetaxel [159].

Neue Möglichkeiten in der antikörperbasierten Tumorbehandlung bezüglich des progressionsfreien Überlebens von Brustkrebs stellen Checkpoint-Inhibitoren dar. Getestet und teilweise bereits bei Patientinnen mit bestimmten Voraussetzungen empfohlen werden v.a. PD-L1-Inhibitoren wie z.B. Atezolizumab [85, 146].

Insgesamt wird bis zum Stadium des lokal fortgeschrittenen Mammakarzinoms ein primär kurativer Therapieansatz verfolgt. Regelmäßige Kontrollen in der Nachsorge sind streng zu beachten, da lokale Rezidive bei 5 - 10 % der Patientinnen nach einer BET innerhalb von 10 Jahren auftreten [37]. Eine neoadjuvante Systemtherapie ist indiziert bei fortgeschrittenen Karzinomen, um bei gezielter Verkleinerung des Tumors eine Operabilität überhaupt zu ermöglichen oder in bestimmten Fällen anstelle einer Mastektomie eine brusterhaltende Therapie durchführen zu können. Es besteht kein Unterschied bezüglich der Überlebensrate nach präoperativer im Vergleich zu der nach postoperativer Systemtherapie [2]. Mit dem Auftreten von Fernmetastasen verschlechtert sich die Prognose deutlich. In diesem Fall stehen je nach Zustand der Patientin und Lokalisation der Metastasen besonders palliative Maßnahmen mit dem Ziel der Symptomkontrolle im Vordergrund [129, 79].

Die Bewahrung der Lebensqualität der Patientinnen besitzt in allen Stadien einen hohen Stellenwert [11]. Im Rahmen der supportiven Therapie erfolgt eine Behandlung von Nebenwirkungen wie Emesis, Neutropenie, Anämie, Schmerzen, Osteoporose und kognitiven Störungen sowohl in der kurativen als auch palliativen Situation [11, 35].

## 1.2 Wirkprofil der Flavonoide

Flavonoide sind natürlich vorkommende Polyphenole, die im Sekundärstoffwechsel von Pflanzen entstehen. Als wasserlösliche Farbstoffe verleihen sie Blüten, Früchten und anderen nicht-grünen Pflanzenteilen ihre Pigmentierung. Sie befinden sich v.a. in den Randschichten und äußeren Blättern der Pflanze. Bisher sind etwa 6500 verschiedene Flavonoide bekannt [125, 175]. Die chemische Kernstruktur umfasst ein C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-Grundgerüst, das aus zwei aromatischen Kohlenstoffringen (A; B) und einem heterozyklischen Ring (C) besteht. Die Substitution funktioneller Gruppen sowie die Anzahl der an Ring A und B gebundenen Hydroxygruppen beeinflussen die biologische Aktivität (Abbildung 3). Aufgrund variabler chemischer Modifikation ermöglicht der zentrale Ring C die Differenzierung der Flavonoide in mehrere Untergruppen. Hauptsächlich unterschieden werden Flavone, Flavonole, Chalkone, Anthocyane, Flavanone und Isoflavonoide. Eine weitere Untergruppe stellen die Flavanole dar, zu denen u.a. die Catechine Epicatechin, Epigallocatechin und Epigallocatechingallat (EGCG) zählen [26, 96, 125, 175].

Bevorzugt liegen Flavonoide an Zuckermoleküle gebunden als Glykoside vor [175].

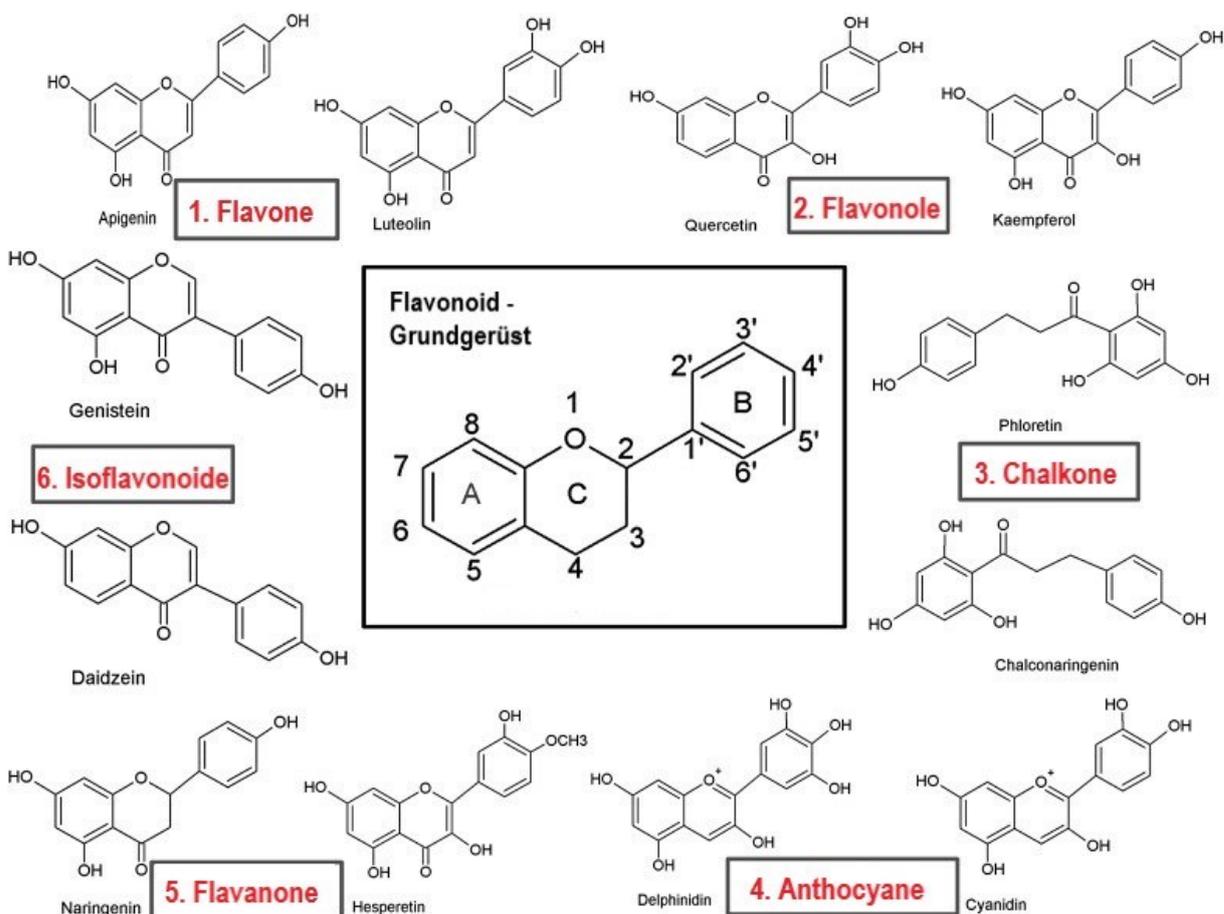


Abbildung 3: Darstellung der Flavonoid-Untergruppen mit wichtigen Vertretern und chemischer Struktur modifiziert nach Panche et al. [125].

Zu den natürlichen Quellen der Flavonoide zählen hauptsächlich Nahrungsmittel wie Obst, Gemüse, Getreide und Samen sowie Tee, Wein und einige Gewürze. Schätzungen zufolge nehmen Westeuropäer täglich zwischen 100 und 1000 mg Flavonoide über Lebensmittel auf [94].

In verschiedenen epidemiologischen Studien der letzten Jahre konnte beobachtet werden, dass sich Flavonoide bei langjähriger Einnahme vorteilhaft auf die Gesundheit des Menschen auswirken. Besonders in Bezug auf kardiovaskuläre, neurodegenerative sowie maligne Erkrankungen erzeugen sie protektive Effekte, welche u.a. auf ihren antioxidativen, antiinflammatorischen und Enzym-modulierenden Eigenschaften beruhen [34, 94, 125, 141].

Für den Einsatz der Flavonoide in der Brustkrebstherapie und als mögliche Chemoprävention existieren bereits wissenschaftliche Ansätze [15, 111, 126].

Eine Problematik stellt die geringe Bioverfügbarkeit von Flavonoiden nach Aufnahme und Umsetzung im Körper dar [65, 162]. Ein aktueller Forschungsschwerpunkt liegt daher auf der Untersuchung des Flavonoid-Stoffwechsels, um breitere Erkenntnisse für die Verwendung in Form von Phytotherapeutika zu gewinnen.

## 1.3 Testsubstanzen

Für diese Arbeit erfolgte die *in-vitro* Untersuchung eines selbst hergestellten Grüntee-Extrakts sowie seiner als Inhaltsstoffe bekannten, kommerziell erworbenen Flavonoide EGCG, Quercetin und Rutin bezüglich der Wirkung auf ausgewählte, etablierte Brustkrebszelllinien (MCF-7 und MDA-MB-231). Zusätzlich diente die Testung der synthetischen Stoffe Estradiol und Endoxifen hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Brustkrebszellen als Kontrolle. Im Folgenden werden die ausgewählten Testsubstanzen genauer dargestellt.

### 1.3.1 Grüner Tee

Die Teepflanze *Camellia sinensis* (O. Kuntze) zählt zu der Familie der Teestrauchgewächse (*Theaceae*) aus der Gattung der Kamelien (*Camellia*) und ist durch die Kultivierung auf den drei Kontinenten Asien, Afrika und Südamerika weit verbreitet. *Camellia sinensis* wird überwiegend für die Verarbeitung zum herkömmlichen Tee-Aufgussgetränk genutzt und weist u.a. Inhaltsstoffe wie Catechine, Theanin und Koffein auf [172].

Aufgebrühter Tee stellt nach Wasser das meist konsumierte Getränk in der globalen Bevölkerung dar. In Deutschland wurden im Jahr 2019 durchschnittlich 28 Liter Grün- oder Schwarztee pro Kopf getrunken. Tendenziell steigt aufgrund zunehmender Nachfrage die weltweite Tee-Herstellung [36, 174].

In Abhängigkeit von Herstellungsprozess und Oxidationsstufe kann aus *Camellia sinensis* neben Weiß-, Oolong- und Schwarzteesorten auch Grüner Tee produziert werden. Die Verarbeitung der Teeblätter, Knospen und Triebe nach der Ernte dient einerseits der Konservierung, maßgeblich jedoch der Aromaentfaltung und Geschmacksgebung des Getränks. Etwa 4 - 6 kg frische Teeblätter werden für 1 kg Trockenprodukt benötigt [3].

Der Grüne Tee wird mithilfe einer milden Dampfmethode hergestellt, die auf jahrtausendalter ostasiatischer Tradition basiert. Dabei werden die Blätter zunächst für den Entzug von Flüssigkeit getrocknet und im weiteren Schritt der sogenannten Fixierung kurzzeitig gedämpft (japanische Methode) oder geröstet (chinesische Methode). Das Erhitzen bedingt eine Enzym-Inaktivierung, die eine Reaktion mit Sauerstoff (Oxidation) sowie die damit einhergehende biochemische Umwandlung sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe verhindert. Dadurch bleiben ein Großteil an Catechinen und die grüne Farbe der Teeblätter erhalten. Dies steht im Gegensatz zum Schwarzen Tee, bei dessen Herstellung eine Belüftung und Fermentierung der Teeblätter erfolgt und der Catechin-Gehalt durch die Umwandlung der Catechine zu Theaflavinen um ca. 85 % reduziert wird [3, 84, 127, 149].

Das Vorhandensein zahlreicher Grünteesorten resultiert aus regional unterschiedlichen Anbaubedingungen von *Camellia sinensis* sowie der Entwicklung verschiedener Zubereitungsverfahren. Die Zusammensetzung und Qualität des Tees ist u.a. von Anbau- und Ernteverfahren, Alter und Größe sowie vom Mineralien- und Polyphenolgehalt der Blätter und Sprossen abhängig [3, 42]. Für diese Arbeit wurde die japanische Grüntee-Sorte Bancha verwendet, welche aus größeren Blättern hergestellt und in Asien als Alltagsgetränk geschätzt wird [41].

Die Hauptbestandteile des Grünen Tees stellen Literaturangaben zufolge Polyphenole (ca. 90 %), Aminosäuren (ca. 7 %), Koffein (ca. 3 %) sowie Vitamine und Mineralien dar. Diese Anteile variieren je nach Grünteesorte und Verarbeitung der Blätter [91, 131]. Flavonoide machen den größten Anteil der Polyphenole in Grünteeblättern aus, die Flavonoid-Untergruppen Flavonole (Catechine) und Flavonole (u.a. Quercetin) sind dabei quantitativ am stärksten vertreten. Unter den Catechinen kommen mit einem Anteil von circa 80 % vorrangig EGCG (Epigallocatechingallat), EGC (Epigallocatechin), ECG (Epicatechingallat) und EC (Epicatechin) vor [3, 99, 131]. Die in verschiedenen Studien nachgewiesenen antioxidativen und gesundheitsfördernden Eigenschaften des Grünen Tees werden hauptsächlich diesen Catechinen zugeschrieben (Abschnitt 1.2). Hervorzuheben sind besonders die Risikoreduzierung und die Wirkung in Bezug auf verschiedene neurodegenerative, kardiovaskuläre sowie maligne Erkrankungen, einschließlich Brustkrebs [84, 91, 108, 131, 157].



Abbildung 4: Teeaufguss mit Bancha-Teeblättern.

### 1.3.2 Epigallocatechingallat (EGCG)

Epigallocatechingallat (EGCG) zählt zur Flavonoid-Subgruppe der Flavane (Catechine) und stellt im Grünen Tee die Hauptkomponente der enthaltenen Catechine dar [125, 40]. In verschiedenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass EGCG unter den Tee-Polyphenolen in Bezug auf antiproliferative und antioxidative Effekte die stärkste Wirksamkeit aufweist [45, 99]. Der molekulare Mechanismus des EGCG beruht auf der Modifizierung der Genexpression sowie mehrerer Signalübertragungswege, die einerseits das Wachstum von Tumorzellen supprimieren und andererseits protektive Mechanismen in Körperzellen stimulieren [28, 38]. Auch bei synthetisch hergestellten EGCG-Analoga und Prodrugs wurde eine wirksame Antitumoraktivität festgestellt [4, 40].

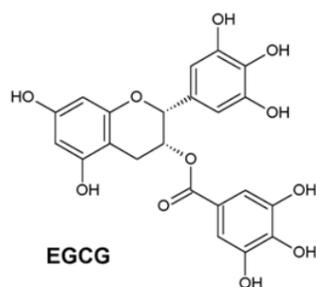


Abbildung 5: Strukturformel des EGCG [84].

### 1.3.3 Quercetin und sein Derivat Rutin

Das Flavonoid Quercetin und sein glykosylierter Abkömmling Rutin (Quercetin-3-O-Rutinosid) gehören zu der Untergruppe der Flavonole. In der Natur kommt Quercetin nicht ungebunden, sondern in Form zahlreicher Glykoside vor. Als hellgelbe Farbstoffe sind diese u.a. in Nahrungsbestandteilen wie Gemüse (Zwiebel, Grünkohl) und Obst (Quitten, Äpfel) sowie in der Teepflanze *Camellia sinensis* vorzufinden [132, 162, 175]. Das Wirkprofil von Quercetin und seinem Derivat Rutin zeigt langfristig günstige Auswirkungen in Bezug auf karzinogene und chronische Erkrankungen des Menschen, wobei neben der antitumorösen besonders die vaskuläre Schutzwirkung zur Prävention von Bluthochdruck und Herz-Kreislauf-Erkrankungen eine hohe Bedeutung erlangt [34, 94, 114, 141].

### 1.3.4 Estradiol

Als Hauptvertreter der Östrogene stellt das Estradiol ein natürlich vorkommendes Steroidhormon dar, welches v.a. in der Nebennierenrinde und in den Keimdrüsen produziert wird. Es hat Einfluss auf den körperlichen Stoffwechsel und wirkt durch Östrogenrezeptoren u.a. proliferativ auf Uterus und Brustdrüse [69]. Östrogene gelten als Risikofaktoren für Brustkrebs (Abschnitt 1.1.5). In dieser Arbeit wurde Estradiol als proliferationsfördernde Kontrolle auf Brustkrebszellen getestet.

### 1.3.5 Tamoxifen und sein Metabolit Endoxifen

Der selektive Estrogenrezeptor-Modulator (SERM) Tamoxifen supprimiert durch die kompetitive Hemmung des Hormonrezeptors die Zellproliferation im Gewebe der Brustdrüse [69]. Das Medikament wird bei Patientinnen mit Risiko oder einer vorhandenen, hormonsensiblen Brustkrebskrankung in Form einer endokrinen Therapie sowohl in präventiver, adjuvanter als auch in palliativer Situation in Abhängigkeit von dem individuellen pathologischen Befund empfohlen [2].

Im Körper ist Tamoxifen erst wirksam nach Umwandlung in seine aktive Form Endoxifen durch die Enzyme des Cytochrom P450-Systems CYP3A4/A5 und CYP2D6 (Abbildung 6). Es gilt zu beachten, dass CYP2D6 einem genetischen Polymorphismus unterliegt und bei Teilen der Bevölkerung in Genvarianten mit nur geringer oder gar keiner Aktivität auftritt. Dies hat zur Folge, dass bei etwa 20 % der Patientinnen das verabreichte Tamoxifen aufgrund fehlender Metabolisierung eine unzureichende Wirkung mit signifikant erhöhtem Risiko für das Auftreten eines Brustkrebsrezidivs hat [68, 92].

Es gibt Ansätze auf Forschungsebene, welche für eine CYP2D6-Genotypisierung als Entscheidungshilfe für den Einsatz von Tamoxifen plädieren, allerdings besteht dafür bisher keine ausreichende Evidenz [43, 109].

Aufgrund des unbeständigen Ansprechens vieler Patientinnen auf Tamoxifen und einschränkender Nebenwirkungen bei der Therapie untersuchen Experten seit einigen Jahren gezielt die pharmakologischen Eigenschaften des Derivats Endoxifen hinsichtlich einer möglichen therapeutischen Tamoxifen-Alternative bei hormonsensitivem Brustkrebs. Laborstudien zeigen, dass Endoxifen *in-vitro* im Vergleich zu Tamoxifen eine stärkere antiöstrogene sowie antiproliferative Wirkung auf entartete Brustzellen aufweist. Der Metabolit besitzt eine vielfach höhere Affinität zum Östrogenrezeptor als Tamoxifen und ist Voraussetzung für eine vollständige Blockade dieses Rezeptors [69, 116, 179].

Es gibt Studien, die festgestellt haben, dass Tamoxifen seine Wirkung in Brustkrebszellen nicht ausschließlich über Estrogenrezeptoren entfaltet, sondern zusätzlich über andere molekulare Signalwege einen Untergang der Brustkrebszelle induzieren kann [87, 104]. Daraus eröffnen sich ebenfalls für den aktiven Metaboliten Endoxifen perspektivisch Möglichkeiten hinsichtlich der medikamentösen Behandlung von Patientinnen mit schwer therapierbaren hormonrezeptornegativen Brustkrebstumoren.

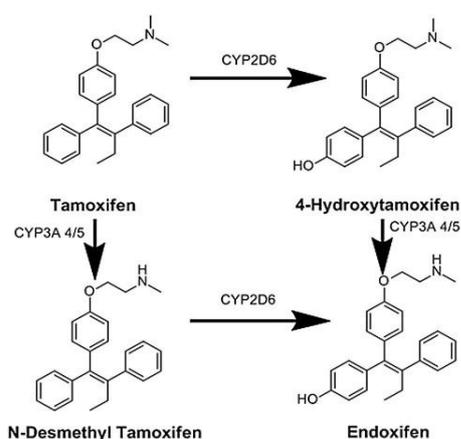


Abbildung 6: Modifiziert nach Maximov et al.: Metabolisierung von Tamoxifen zur plasmawirksamen Substanz Endoxifen (4-Hydroxy-N-desmethyltamoxifen) [116].

## 2 Zielstellung

Auf der Therapie des Mammakarzinoms liegt seit vielen Jahren ein onkologischer Forschungsschwerpunkt. Trotz mittlerweile etablierter Früherkennungsmaßnahmen und ständiger Weiterentwicklung therapeutischer Konzepte steigen sowohl die Inzidenzzahlen als auch die krebsbedingten Todesfälle bei Frauen global kontinuierlich an und erreichen im Vergleich unter den Tumorerkrankungen Höchstwerte.

Einen wachsenden Stellenwert in modernen Therapiestrategien des Mammakarzinoms nehmen komplementäre Heilmethoden ein, die sich durch eine geringe Nebenwirkungsrate und Studien zufolge durch ein großes therapeutisches Potenzial in Ergänzung zur Schulmedizin auszeichnen.

Im Rahmen dieser Arbeit liegt der Fokus auf der Untersuchung von grünem Tee sowie seinen Inhaltsstoffen EGCG, Quercetin und Rutin, für welche sich in der Literatur zahlreiche Veröffentlichungen hinsichtlich präventiver und heilender Eigenschaften besonders in Bezug auf Krebserkrankungen finden.

Ziel der Untersuchungen soll sein, die antiproliferative und zytotoxische Wirkung eines Grüntee-Extrakts und seiner Bestandteilen EGCG, Quercetin und Rutin auf zwei humane Mammakarzinomzelllinien *in-vitro* mithilfe von Zelltests zu untersuchen. Die Herstellung des Extrakts erfolgt aus handelsüblichen Teeblättern der Sorte Bancha, die in Ethanol gelöst und mittels Mikrowellenverfahren aufbereitet werden. Das Vorhandensein hochwertiger Inhaltsstoffe im Tee-Extrakt wird durch eine HPLC-Analyse geprüft. Die ausgewählten Flavonoide EGCG, Quercetin und Rutin werden für die Zelltests in Form von synthetischen Reinstoffen kommerziell erworben.

Zusätzlich soll die Wirkung von Endoxifen vergleichend und vor allem in Kombination mit den Testsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen gemessen werden. Endoxifen ist die verstoffwechselte, bioaktive Form des Brustkrebsmedikaments Tamoxifen.

Vor dem Hintergrund vieler Nebenwirkungen unter Tamoxifen-Gabe soll untersucht werden, ob ein möglicher synergistischer Wirkeffekt zwischen dem Metaboliten Endoxifen und den ausgewählten Testsubstanzen besteht. Es könnte perspektivisch neue Behandlungsmöglichkeiten öffnen, wenn z.B. eine Reduktion der eingesetzten Tamoxifen-Dosis bei gleichzeitiger Gabe von Grüntee-Extrakt zu adäquaten therapeutischen Erfolgen mit geringerer Nebenwirkungsrate führt. Auf die Patientinnen würde sich dies vorteilhaft in Form einer verbesserten Lebensqualität und erhöhter Compliance während der Medikamenteneinnahme auswirken.

Tamoxifen wirkt primär über die Blockade von Estrogenrezeptoren und wird eingesetzt, um das Wachstum hormonempfindlicher Tumorzellen zu verhindern. Studien liefern Hinweise, dass Tamoxifen nicht nur Estrogenrezeptor-abhängige Wirkungen entfaltet. Daher soll in dieser Arbeit neben einer Hormonrezeptor-positiven Zelllinie vergleichend auch eine Zelllinie ohne Expression der Rezeptoren getestet werden.

Von Interesse ist dabei ebenfalls, ob es im Vergleich der Zelllinien Unterschiede in der Wirkweise von grünem Tee und seinen Bestandteilen gibt.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die antikarzinogene Wirkung von Flavonoiden zu unterstreichen und durch den Einsatz von Grüntee-Extrakt einen möglichen Ansatz für die Optimierung der Brustkrebstherapie zu entwickeln.

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Pflanzenmaterial**

Für die Herstellung des Extraktes wurde ein Grüner Tee (Bancha) aus losen, großen Blättern der Marke Ronnefeldt® mit dem Ursprungsort China verwendet. Die Verarbeitung und Herstellung des Tees erfolgte laut Angaben des Herstellers nach japanischer Art mithilfe der Dampfmethode [142].

### **3.2 Extraktgewinnung mittels Mikrowellenextraktion**

Es gibt verschiedene Methoden, um aus einem pflanzlichen Ausgangsstoff für die Herstellung eines Extrakts die gewünschten Inhaltsstoffe herauszulösen. In dieser Arbeit wurde das mikrowellenbasierte Trennverfahren für die Extraktion angewendet. Dabei erfolgt durch Mikrowellenenergie eine Erhitzung von Probe und Lösungsmittel, indem die elektromagnetischen Wellen die Rotation von Dipolen anregen und zu intermolekularer Reibung führen. Die daraus freigesetzte Wärme hat eine destruiierende Wirkung auf die Pflanzenzellen und bewirkt den Aufschluss ihrer Inhaltsstoffe [22]. Für die Herstellung des Grüntee-Extrakts wurde die Labormikrowelle Discover SP der Firma CEM genutzt.

#### **3.2.1 Prozedere**

Zu Beginn wurden die getrockneten Grüntee-Blätter mit einem Mörser zu einem Pulver zerkleinert, um bereits mechanisch eine größere Angriffsfläche für das Extraktionsmittel zu schaffen. Nach dem Abwiegen von 1 g Teepulver erfolgte in einem Reagenzglas die Lösung in 10 ml 70 %-igem Ethanol. Die Ausgangskonzentration für den Grüntee-Extrakt betrug somit 1 g / 10 ml 70 %-igem Ethanol.

Im Anschluss erfolgte in der Mikrowelle bei einer Leistung von 80 Watt das Erhitzen des Extrakts für 20 min bei 60 °C. Für die weitere Verwendung wurde der klare Überstand mit den gelösten Komponenten der Teeblätter genutzt, der feste Absatz mit unbrauchbaren Zellbestandteilen dagegen verworfen. Die darauf folgenden Zentrifugationen (4030 U/min über 15 min, danach 13000 U/min für 5 min) ermöglichten die noch präzisere Separation der verwendbaren flüssigen von den festen Teebestandteilen. Anschließend wurden der Grüntee-Extrakt filtriert (Porengröße 0,45 µm) und die homogene Suspension mittels eines Vakuumkonzentrators bei 45 °C auf ein Zielvolumen von 1 ml eingengt (Eppendorf Concentrators 5301).

Die Aufbewahrung erfolgte im Mikroreaktionsgefäß bei - 80 °C im Tiefkühlschrank. Vor jeder Anwendung wurde der Extrakt nach dem Auftauen erneut zentrifugiert.

### 3.3 Herstellung der Zellkulturen

#### 3.3.1 Zellkulturlinien

Im Rahmen dieser Arbeit fanden die Untersuchungen des Grüntee-Extraktes an zwei humanen Mammakarzinomzelllinien statt. Zunächst wurden die Zellen der malignen Kulturlinie MCF-7 (ATCC<sup>®</sup> HTB-22<sup>™</sup>) getestet, welche laut Herstellerangaben Hormonrezeptoren (ER, PR) exprimieren. Diese Brustkrebs-Zelllinie stammt histologisch von Adenokarzinomzellen einer 69-jährigen Kaukasierin [7].

Im Vergleich dazu erfolgten die Versuche an der hormonrezeptor-negativen Tumorzelllinie MDA-MB-231 (ATCC<sup>®</sup> HTB-26<sup>™</sup>). Diese Zellen wurden ursprünglich aus dem Pleurarguss einer 51-jährigen kaukasischen Frau mit metastasiertem Adenokarzinom isoliert [8].

Beide Zellkulturen weisen Merkmale des Mamma-Epithels auf und sind aufgrund ihrer relativ einfachen Kultivierung in der Krebsforschung etabliert [6].

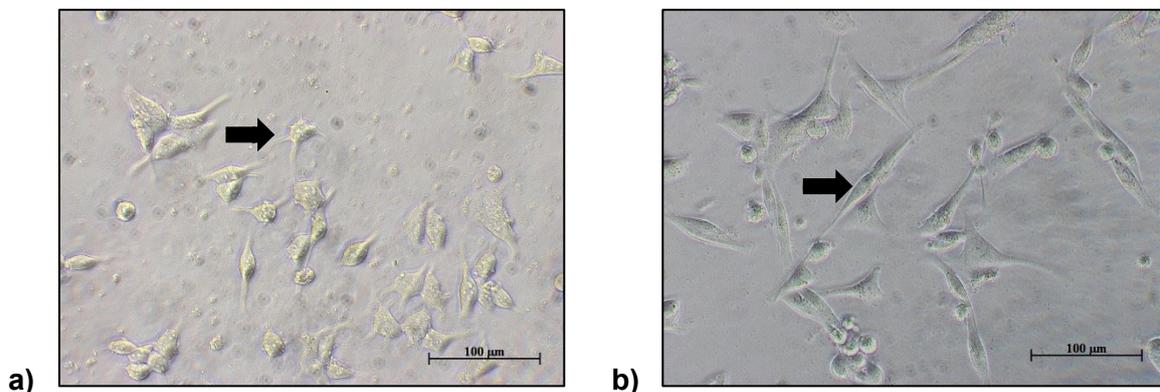


Abbildung 7: Mikroskopische Betrachtung der humanen Mammakarzinomzelllinien MCF-7 (a) mit sternförmiger Zellmorphologie und MDA-MB-231 (b) mit spindelförmigen Zellen als Monolayer, 20x Vergrößerung, der Maßstab beträgt 100 µm.

#### 3.3.2 Lagerung und Auftauen der Zellen

Vor Versuchsbeginn lagerten die Zellen mit einem DMSO-haltigen Einfriermedium in flüssigem Stickstoff bei -188 °C. DMSO dient als Frostschutzmittel, indem es die Bildung von Eiskristallen innerhalb und außerhalb der Zellen verhindert [66]. Das sukzessive Auftauen geschah zunächst auf Eis und anschließend bei Raumtemperatur. Vor der Nutzung der Zellen musste das bei Raumtemperatur zytotoxisch wirkende DMSO möglichst schnell ausgewaschen werden [70].

Für die Eliminierung des DMSO wurden die Zellen in 10 ml DMEM-Medium (+ 10 % FKS) in einem 50 ml-Röhrchen suspendiert, gevortext und für 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Nach Abgießen des flüssigen Überstands erfolgte das Resuspendieren des Pellets mit 6 ml frischem Zellkulturmedium. Die Zellsuspension wurde anschließend in eine 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt.

### 3.3.3 Zellkulturmedium

Zur Kultivierung beider Mammakarzinomzelllinien wurde das Basismedium Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit zusätzlich Penicillin-Streptomycin (0,2 %) und Amphotericin B (0,5 %) verwendet. Fetales Kälberserum (10 % FKS) diente als Zusatz zur Bereitstellung von Proteinen und Wachstumsfaktoren [66]. Der Wechsel des Nährmediums erfolgte alle 2-3 Tage. Es wurde zur Vermeidung von Kontaminationen ausschließlich unter keimfreien Bedingungen an einer Sterilbank gearbeitet.

### 3.3.4 Kulturbedingungen

Die Inkubation der Zellkulturen erfolgte unter sterilen physiologischen Bedingungen in Zellkulturflaschen mit Bakterienfilter zum Gasaustausch bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-angereicherter sowie wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Brutschrank.

Die Kultivierung der Mammakarzinomzellen fand anfänglich in 25 cm<sup>2</sup>- und 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen statt. Ab dem Erreichen einer Konfluenz von 80 % wurden 175 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen genutzt. Die verwendete Menge an Nährmedium war dem Fassungsvermögen der Zellkulturflaschen angepasst (Tabelle 5).

Tabelle 5: Eingesetzte Volumina an Nährmedium für die Zellkultivierung

Größe der Zellkulturflasche	Volumen an Nährmedium
25 cm <sup>2</sup>	7 - 8 ml
75 cm <sup>2</sup>	15 ml
175 cm <sup>2</sup>	25 ml

### 3.3.5 Passagieren der Zellen

Regelmäßig fand eine lichtmikroskopische Begutachtung der Zellentwicklung statt. Sobald eine Konfluenz von 70 % - 90 % am Boden der Zellkulturflasche erreicht war, erfolgte die Subkultivierung der Zellen. Zunächst wurde das verbrauchte Medium dekantiert und der Zellrasen mit 10 ml sterilem PBS gespült. Letzte Rückstände des Mediums sowie vom Boden abgelöste Zellbestandteile konnten dadurch entfernt werden. Im weiteren Vorgehen wurde unter der Zugabe von 10 ml proteolytischer Trypsin-Lösung (1 ml Trypsin-EDTA mit 9 ml PBS) und 5-minütiger Inkubation im Brutschrank die Adhäsion der Zellen am Flaschenboden aufgehoben. Längere Einwirkzeiten sollten vermieden werden, da Trypsin eine irreversible Zellschädigung hervorrufen kann [66]. Nach der Überprüfung mittels Mikroskop folgte die Überführung der abgetrennten Zellen in ein 50 ml Röhrchen, um anschließend den Vorgang der Trypsinierung mit der 1,5-fachen Menge an Nährmedium mit 10 % FKS abzustoppen. Die Zellsuspension wurde bei 1000 U/min für 5 min zentrifugiert und der flüssige Überstand verworfen. Danach erfolgte die Resuspension des Zellpellets mit 10 ml frischem Medium und abschließendem Vortexen. Entsprechend der Zellzahl wurde eine definierte Menge der Zellsuspension (3 - 7 ml) in eine neue 175 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche überführt und mit DMEM-Nährmedium auf ein Endvolumen von insgesamt 25 ml aufgefüllt.

### 3.4 Vorbereitung der Zelltests

#### 3.4.1 Ermittlung der Lebendzellzahl

Für die adäquate und vergleichbare Durchführung wurde vor jedem Zelltest die Anzahl der lebenden Zellen mithilfe der Bürker-Zählkammer auf einer dünnen Glasplatte unter dem Mikroskop bestimmt (Abbildung 8). Zur Anwendung kam der Azofarbstoff Trypanblau, um tote von vitalen Zellen zu differenzieren. Trypanblau durchdringt nur geschädigte Zellmembranen und bindet an zytosolische Proteine, welche unter dem Lichtmikroskop blau erscheinen und von der Zählung ausgeschlossen werden können. Aufgrund einer zytotoxischen Wirkung des Trypanblaus bei längerer Inkubationszeit wurde die Lebendzellzählung sofort nach Zugabe des Farbstoffs durchgeführt [66, 147]. Hierfür wurden 20 µl verdünnte Zellsuspension, 360 µl DMEM-Medium und 20 µl Trypanblau-Lösung (0,4 %) mithilfe einer Pipette unter Vermeidung von Luftblasenbildung vermischt (Verdünnungsfaktor 1:20) und je 20 µl dieser Suspension vorsichtig in die beiden Zählkammern einer Glasplatte gegeben. Die anschließende Zellauszählung in je 25 Kleinstquadraten pro Kammer erfolgte bei 100-facher Vergrößerung am Mikroskop.

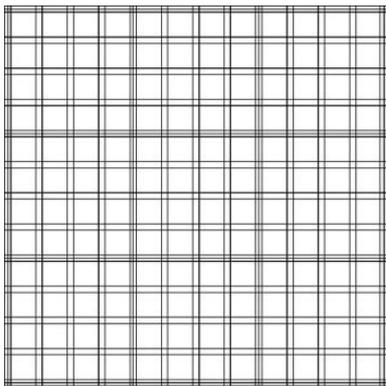


Abbildung 8: Das Liniennetz einer Bürker-Zählkammer: 9 Großquadrate mit je einer Seitenlänge von 1 mm werden einzeln jeweils in 16 Unterquadrate eingeteilt. Für die Bestimmung der Zellzahl werden pro Kammer insgesamt 25 dieser Kleinstquadrate ausgezählt [106].

Nach folgender Formel wurde die Lebendzellzahl / ml berechnet:

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

Zellzahl = aus 2 × 25 Kleinstquadraten

VF = Verdünnungsfaktor (entspricht hier der Zahl 10)

$10^4$  = Kammerfaktor (bei einem Volumen von  $0,1 \text{ mm}^3$  eines Zellkammer-Quadrats)

Die Zellsuspension mit bekannter Zellzahl / ml wurde für die weiteren Versuche mit dem DMEM-Kulturmedium für eine Aussaat auf einer 96-Well-Zellkultur-Testplatte auf die festgelegte Endkonzentration von 300.000 Zellen / ml verdünnt.

### 3.4.2 Herstellung der Testsubstanzen

Um eine Aussage über die Wirkung in Abhängigkeit von der Konzentration machen zu können, wurde eine Verdünnungsreihe des Grüntee-Extrakts angesetzt. Gewählt wurden die Verdünnungsstufen 10 %, 20 %, 50 % und 100 % als Wirkprofil des Extrakts. Dabei diente eine 70 %-ige Ethanol-Lösung als Verdünnungsmittel.

Das Ansetzen der Referenzen EGCG, Quercetin und Rutin mit ihren jeweiligen Lösungsmitteln erfolgte nach den Angaben in Tabelle 6. Gewählt wurden die Substanzkonzentrationen und Lösungsmittel in Anlehnung an eine Vorarbeit im UFK-Forschungslabor, bei der verschiedene Konzentrationen von Grünem Tee und seine Bestandteile an Brustkrebszelllinien getestet wurden und die als Grundlage für diese Arbeit dienen [113]. Es gilt zu beachten, dass sich die Konzentration der angesetzten Substanzen durch die Gabe von 100 µl Zellsuspension unterscheidet von der Endkonzentration in der Zellkultur (Verdünnung 1:100). Angegeben werden im Folgenden die Konzentrationen der angesetzten Testsubstanzen im Röhrchen.

Die kommerziell erworbenen Phytoestrogene lagen als Feststoffe vor und mussten zunächst vollständig in Lösung gebracht werden. Dafür wurde die entstandene Suspension in einem Wasserbad erhitzt oder mittels eines Ultraschallbads homogenisiert. Die Lagerung der Suspensionen erfolgte bei -80 °C im Tiefkühlschrank. Nach dem Auftauen und vor der Verwendung erfolgte stets eine zusätzliche Homogenisierung der Suspensionen mithilfe eines Vortexers.

Tabelle 6: Angaben für die Herstellung der Referenz- und Kontrollsubstanzen

Wirkstoff	Einwaage	Lösungsmittel	Konzentration
EGCG	0,18 g	10 ml Aqua dest.	18 µg / µl
	0,01 g	10 ml Aqua dest.	1 µg / µl
Quercetin	0,0151 g	5 ml Ethanol 99 % / 5 ml DMSO	1,51 µg / µl
	0,005 g	5 ml Ethanol 99 % / 5 ml DMSO	0,5 µg / µl
Rutin	0,0305 g	5 ml Ethanol 99 % / 5 ml DMSO	3,05 µg / µl
	0,01 g	5 ml Ethanol 99 % / 5 ml DMSO	1 µg / µl
Endoxifen	0,062 g	10 ml Ethanol 70 %	6,2 µg / µl
	0,01 g	10 ml Ethanol 70 %	1 µg / µl
Estradiol	0,0027 g	1 ml Ethanol 70 %	0,000027 µg / µl

## 3.5 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

### 3.5.1 Prinzip

Chromatografische Methoden stellen eine Möglichkeit für die effektive Trennung von Stoffgemischen und die Identifizierung ihrer Bestandteile dar. Für diese Arbeit wurde mithilfe der HPLC eine qualitative Analyse des Grüntee-Extrakts durchgeführt mit dem Ziel, die Flavonoide Epigallocatechingallat, Quercetin und Rutin nachzuweisen.

Das Prinzip der HPLC beruht auf der Verteilung der Probe zwischen zwei nicht mischbaren Phasen als Resultat physikalischer Wechselwirkung und unterschiedlicher Bewegung der Teilchen. Dabei wird die Probe in der mobilen Phase (Eluent) gelöst und in definierter Richtung über eine stationäre Phase bewegt, die sich in einer Säule befindet. Elution bezeichnet den Vorgang des Herauslösens der Stoffe aus der stationären Phase. In Abhängigkeit von der Polarität der Teilchen wirken Trennmechanismen wie Adsorption durch Van-der-Waals-Kräfte, Ionenaustausch und Verteilung [124]. Dies hat Mobilitätsunterschiede und verschiedene Durchlaufzeiten (Retentionszeit) der einzelnen Probenkomponenten zur Folge. In der Hochleistungsflüssigkeitschromatografie wird mithilfe pulsationsfreier Pumpen unter Druckaufbau und mit hoher Effizienz gearbeitet [152].

### 3.5.2 Aufbau der HPLC-Anlage

Die Hauptbestandteile eines HPLC-Geräts umfassen den Eluentenvorrat, eine Hochdruckpumpe, das Einspritzsystem sowie eine Trennsäule und den Detektor mit Auswerteeinheit (Abbildung 9). Häufig erfolgt die Anwendung der Gradientenelution. Dabei wird die Zusammensetzung des Eluenten während eines Durchlaufs so verändert, dass sich optimale Bedingungen für eine Stofftrennung unter minimalem Zeitaufwand einstellen [152]. Bei einem Druck von ca. 2 bis 20 MPa erfolgt die Beförderung der mobilen Phase durch die Pumpe zum Einspritzsystem. Nach Injektion der Probe durch eine Spritze durchläuft das Gemisch zunächst eine Vorsäule, um mögliche Probenkontaminationen zur Schonung der dahinter gelegenen Hauptsäule zurückzuhalten. Die Trennsäulen bestehen vorzugsweise aus Edelstahl [59]. Im Rahmen dieser Arbeit findet die Umkehrphasenchromatografie Anwendung. Dabei wird für die stationäre Phase als Trägermaterial Kieselgel verwendet, das mit C18-Alkylketten modifiziert wurde und eine unpolare Oberfläche bietet [124]. Als mobile Phase wird ein polares Lösemittel (z.B. Wasser, Methanol) eingesetzt. Im Trennvorgang erfolgt die Elution der polaren vor den unpolaren Bestandteilen der Probe [152]. Am Säulenausgang werden die einzelnen Probenkomponenten mit unterschiedlichen Retentionszeiten von einem Detektor registriert und im Auswertesystem graphisch in Form eines Chromatogramms dargestellt. Es bieten sich besonders UV-Detektoren an, welche die Lichtabsorption des Eluenten am Säulenausgang messen [124]. Im Chromatogramm entspricht die Anzahl der Signalpeaks auf der Zeitachse der Anzahl der aufgetrennten Probenkomponenten. Die qualitative Information lässt sich ableiten aus der Messung der Retentionszeit der Probe sowie einer gesondert gemessenen Standardsubstanz. Durch den Vergleich der Chromatogramme erfolgen der Nachweis der An- oder Abwesenheit eines Stoffes sowie dessen Identifizierung in einer Probe [59].

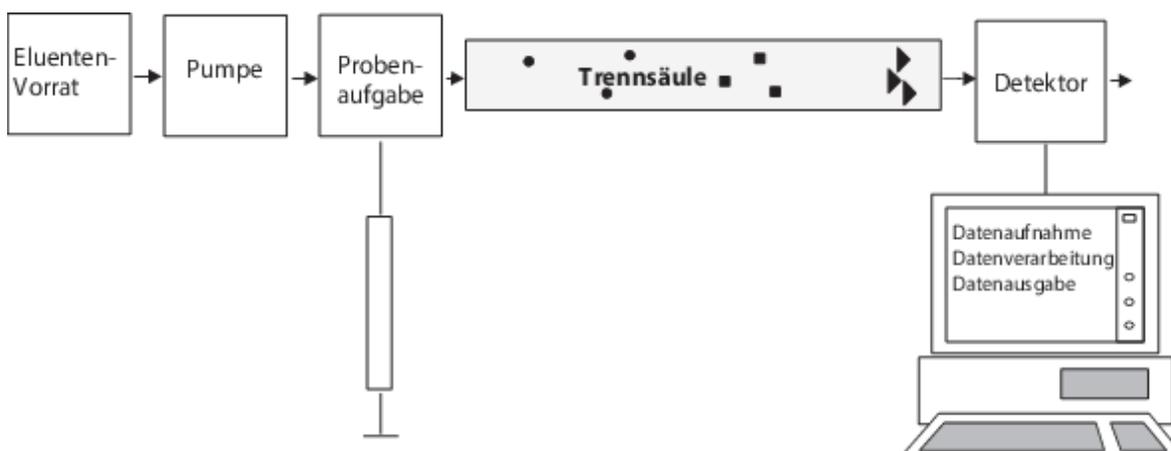


Abbildung 9: Vereinfachtes Schema einer HPLC-Anlage zur Trennung von Stoffgemischen, hauptsächlich bestehend aus dem Eluentenvorrat, einer Hochdruckpumpe, dem Einspritzsystem sowie einer Trennsäule und dem Detektor mit einer Auswerteeinheit [154].

### 3.5.2 Messbedingungen und Vorgehensweise

In dieser Arbeit wurden die Messungen zum Nachweis der Inhaltsstoffe des Grüntee-Extrakts und der entsprechenden Referenzsubstanzen an einer Smartline-HPLC-Anlage der Firma Knauer durchgeführt. Für den Effekt der Gradientenelution kamen zwei mobile Phasen zum Einsatz. Das Laufmittel A (500 ml) bestand aus 450 ml DMSO und 50 ml Aqua destillata. Das Laufmittel B (1000 ml) wurde aus 900 ml Aqua destillata und 100 ml Methanol hergestellt. Bei einer Flussrate von 1 ml/min lag die Temperatur konstant bei 30 °C. Verwendet wurde eine C18-Säule, bei der Kieselgel mit C18-Alkylketten modifiziert ist. Als zu testende Referenzen wurden die kommerziell erworbenen Phytoestrogene EGCG, Quercetin und Rutin vor Messbeginn als Suspension angesetzt und im Tiefkühlschrank gelagert (Abschnitt 3.4.2).

#### Durchführung des Messvorgangs an einer HPLC-Anlage:

- 1) Auftauen und Vortexen der Referenzen Quercetin, Rutin, EGCG.
- 2) Anschalten der HPLC-Anlage, Spülen der Schläuche (Luftblasen eliminieren).
- 3) Erster Durchlauf als Blank-Messung zur Reinigung der Säule.
- 4) Starten der Analyse (Laufzeit: 40 min), Aufziehen und Aufgabe der Probe mit Injektionsspritze (20 µl).
- 5) Messung der UV-Absorptionen durch UV-Detektor (Wellenlänge 245 nm).
- 6) Auswertung / Speicherung der Daten mithilfe der Software Clarity Chrom.

Insgesamt erfolgten für jede Probe mindestens drei Messungen.

### 3.6 Immunhistochemie

Durch gezielte immunhistochemische Reaktionen lassen sich Rückschlüsse auf die Hormonrezeptor-Expression einer Zelllinie ziehen. Die kultivierten MCF-7-Zellen synthetisieren den Östrogenrezeptor in zwei Isoformen (ER $\alpha$  und ER $\beta$ ) sowie den Progesteronrezeptor, während MDA-MB-231-Zellen durch einen negativen Hormonrezeptorstatus charakterisiert sind [6-8, 150, 156].

Das Nachweisprinzip beruht auf der Visualisierung der Rezeptoren im Zuge einer indirekten Antikörperreaktion. Eingesetzt wird zunächst ein antigenspezifischer Antikörper, der an das gewünschte Rezeptorprotein bindet. Im nächsten Schritt verursachen die Zugabe eines enzymgekoppelten Sekundärantikörpers sowie einer Substratlösung an dem entstandenen Antigen-Antikörper-Komplex eine Reaktion mit lokaler Aktivierung eines Farbstoffes, der den Rezeptor unter dem Lichtmikroskop rotbraun markiert [69].

Verwendung findet bei dieser Arbeit der Testansatz ImmPress® HRP Universal Antibody Polymer Detection Kit“ (Fa. Vector Laboratories, Burlingame USA), der monoklonale IgG-AK des Kaninchens (ER $\alpha$  und PR) und der Maus (ER $\beta$ ) sowie das Enzym Peroxidase enthält [171]. Als Negativkontrolle wurde ein Leerwert jeder Zelllinie mitgeführt.

#### Durchführung der Immunhistochemie:

1. Zellaussaat auf eine 24-Well-Platte (300  $\mu$ l Zellsuspension/Well bei einer Konzentration von  $3 \times 10^5$  Zellen/ml Medium), anschließend Inkubation im Brutschrank für 24 h (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> in wasserdampfgesättigter Atmosphäre).
2. Abpipettieren des Mediums und dreifaches Waschen mit PBS (300  $\mu$ l / Well).
3. Zugabe von Formafix 4 % (300  $\mu$ l / Well), Inkubation bei RT für 30 min.
4. Entfernen des Formafix und dreifaches Waschen mit PBS (300  $\mu$ l / Well).
5. Zugabe von leitungswasserverdünntem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3 % (300  $\mu$ l / Well) zur Inaktivierung endogener Peroxidasen, Inkubation bei RT für 30 min.
6. Entfernen des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und zweifaches Waschen mit PBS (300  $\mu$ l / Well) mit 5-minütiger Einwirkung und unter leichtem Schwenken der Platte.
7. Zugabe von je 4 Tropfen Horse-Serum 2,5 % ( $\cong$  200  $\mu$ l / Well) zur Hemmung unspezifischer Proteininteraktionen, Inkubation bei RT für 20 min.
8. Entfernen des Horse-Serums mit Ausnahme der Negativkontrolle, Zugabe der entsprechend mit PBS-verdünnten Primär-AK-Lösungen (200  $\mu$ l / Well): Anti-ER $\alpha$ -AK (Verdünnung 1:200), Anti-ER $\beta$ -AK (1:40), Anti-PR (1:200), Inkubation im Kühlschrank bei 8 °C für 24 h.
9. Abpipettieren der AK-Lösung und dreifaches Waschen mit PBS (300  $\mu$ l / Well).
10. Zugabe von je 4 Tropfen ( $\cong$  200  $\mu$ l / Well) ImmPRESS- Universal Anti-Mouse/Rabbit-Antikörper (peroxidasegekoppelter, sekundärer AK), Inkubation bei RT für 30 min.
11. Abpipettieren der AK-Lösung und dreifaches Waschen mit PBS (300  $\mu$ l / Well).
12. Zugabe von je 4 Tropfen ( $\cong$  200  $\mu$ l / Well) LinRed-Lösung als Peroxidase-Substrat, Inkubation 5-10 min im Dunkeln (Reaktion beobachten)
13. Entfernen der LinRed-Lösung und Abstoppen der Farbreaktion mit Leitungswasser (300  $\mu$ l / Well).
14. Mikroskopische Beurteilung und Dokumentation des Färbeergebnisses.

### 3.7 In-vitro-Zelltests

In dieser Arbeit wurde das Wachstumsverhalten zweier Mammakarzinomzelllinien unter der Einwirkung eines Grüntee-Extraktes und synthetisch hergestellter Flavonoide sowie von Kombinationen dieser Substanzen mit Endoxifen unter künstlichen Bedingungen untersucht. Mithilfe der in diesem Abschnitt beschriebenen Assays fand die Analyse der Viabilität, Zytotoxizität und Proliferation sowie die Überprüfung des Metabolismus der Zellen statt. Im UFK-Forschungslabor wurde für die Zellaussaat im Rahmen der Testkits eine Standardkonzentration von 300.000 Zellen / ml Medium pro Well definiert. Vor Applikation der Testsubstanzen wurden die Zellen zum Anwachsen am Boden der Wellplatten für 24 h im Brutschrank bei 37 °C und in 5 % CO<sub>2</sub>-angereicherter und wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert.

#### 3.7.1 CellTiter-Glo®-Zellviabilitätstest

Dieser Test dient der auf Biolumineszenz basierenden Bestimmung des in metabolisch aktiven Zellen generierten ATPs, um die Anzahl lebender Zellen in einer Zellkultur beurteilen zu können. In der dafür erforderlichen chemischen Reaktion werden lumineszierende Signale detektiert und quantifiziert.

Dieses Assay verwendet ein CellTiter-Glo®-Reagenz, das sowohl das Substrat Luciferin als auch eine thermostabile, rekombinante Luciferase enthält. Dieses Enzym stammt ursprünglich von der amerikanischen Glühwürmchen-Art *Photuris pennsylvanica* ab und katalysiert in Abhängigkeit von Mg<sup>2+</sup>-Ionen und molekularem O<sub>2</sub> die Reaktion des Luciferins zum lumineszierenden Reaktionsprodukt Oxyluciferin (Abbildung 10). Voraussetzung für die Umsetzung des Substrats ist ATP, das bei Zugabe des CellTiter-Glo®-Reagenz auf die Zellkultur durch direkt stattfindende Zelllyse aus vorher funktionsfähigen Zellen freigesetzt wird und die nötige Energie für den Reaktionsablauf zur Verfügung stellt.

Ebenfalls bei der Zelllyse entbundene ATP-asen, die durch Eingriff in den ATP-Stoffwechsel Störfaktoren für den Test darstellen, werden gleichzeitig durch die Luciferase gehemmt. Die Stärke des erzeugten, lumineszierenden Signals wird mit einem Lumineszenz-Reader gemessen und korreliert mit der Menge des vorhandenen ATP [133].

#### Durchführung des CellTiter-Glo®:

- 1) Zellaussaat auf eine 96-Well-Platte (100 µl Zellsuspension/Well bei einer Konzentration von 3 x 10<sup>5</sup> Zellen/ml Medium), anschließend Inkubation im Brutschrank für 24 h (37 °C; 5 % CO<sub>2</sub> in wasserdampfgesättigter Atmosphäre).
- 2) Zugabe der Testsubstanzen (in toto 1 µl / Well),
  - Grüntee-Extrakt (in den Verdünnungsstufen 100 %, 50 %, 20 %, 10 %).
  - Referenzsubstanzen EGCG, Quercetin, Rutin und Kontrollsubstanzen Estradiol und Endoxifen in jeweils zwei Konzentrationen (Tabelle 6).
  - Kombinationen des Extrakts / der Referenzsubstanzen in den verschiedenen Konzentrationen je mit Endoxifen in zwei Konzentrationen (je 0,5 µl / Well).Inkubation für 24 h im Brutschrank.

- 3) Vermischen des CellTiter-Glo<sup>®</sup>-Puffers mit dem CellTiter-Glo<sup>®</sup>-Substrat.
- 4) Zugabe dieses CellTiter Glo<sup>®</sup>-Reagenz auf die Well-Platten (100 µl / Well), Vermischen mithilfe Plattenschüttlers für 2 min (Zell-Lyse), Inkubation für 30 min bei RT.
- 5) Umpipettieren der Well-Inhalte ohne Luftblasen unter deckungsgleicher Anordnung in weiße, lichtundurchlässige 96-Well-Platten zur Messung der Lumineszenz mit dem GloMax<sup>®</sup>-Luminometer.

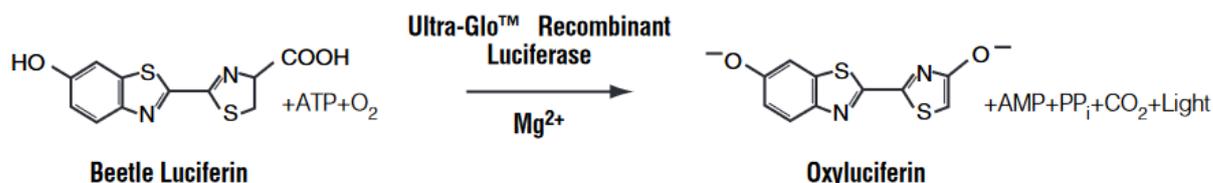


Abbildung 10: Stattfindende Luciferase-Reaktion im CellTiter-Glo<sup>®</sup>-Assay mit der Umsetzung von Luciferin zu dem lumineszierenden Reaktionsprodukt Oxyluciferin [133].

### 3.7.2 CytoTox-Glo<sup>™</sup>-Zytotoxizitätstest

Dieser Lumineszenz-Assay bietet die Möglichkeit, durch die Aktivitätsmessung einer Protease die Anzahl toter Zellen in Zellkulturen zu bestimmen. Die Dead-Cell-Protease tritt bei geschädigter Zellmembran aus dem Zellinnern aus. Im Rahmen des Tests wird durch Zugabe eines AAF-Glo-Reagenz eine Reaktionskette ausgelöst. Ein im Reagenz enthaltenes AAF-Glo-Substrat wird von der Dead-Cell-Protease unter Entstehung von Aminoluciferin gespalten. Eine ebenfalls im Test-Reagenz befindliche, hitzebeständige Ultra-Glo-Luciferase setzt im weiteren Schritt das Aminoluciferin um. Dabei wird Licht ausgesendet, das mittels Luminometers als Signal gemessen wird. Proportional zum ausgestrahlten Licht ist die Menge der in der Zellkultur ausgetretenen Dead-Cell-Protease, woraus sich die Anzahl avitaler Zellen ableiten lässt (Step 1).

In einem zweiten Schritt erfolgt die quantitative Ermittlung der Gesamtzellzahl des Testansatzes. Dazu wird nach Zugabe eines Lyse-Reagenz und dem daraus resultierenden Absterben aller Zellen die totale Lumineszenz gemessen (Step 2). Optional kann nun durch Subtraktion des gemessenen primären von dem totalen Lumineszenz-Wert die Anzahl der sich im Testansatz befindenden lebenden Zellen hergeleitet werden [134].

Formel zur Berechnung der Zellviabilität im Testansatz:

$$\text{Lumineszenz viabler Zellen} = \text{Totale Lumineszenz} - \text{Lumineszenz toter Zellen}$$

(Step 2)
(Step 1)

### Durchführung des CytoTox-Glo™:

- 1) Zellaussaat auf eine 96-Well-Platte (100 µl Zellsuspension/Well bei einer Konzentration von  $3 \times 10^5$  Zellen/ml Medium), anschließend Inkubation im Brutschrank für 24 h (37 °C; 5 % CO<sub>2</sub> in wasserdampfgesättigter Atmosphäre).
- 2) Zugabe der Testsubstanzen (in toto 1 µl / Well),
  - Grüntee-Extrakt (in den Verdünnungsstufen 100 %, 50 %, 20 %, 10 %)
  - Referenzsubstanzen EGCG, Quercetin, Rutin und Kontrollsubstanzen Estradiol und Endoxifen in jeweils zwei Konzentrationen (Tabelle 6).
  - Kombinationen des Extrakts / der Referenzsubstanzen in den verschiedenen Konzentrationen jeweils mit Endoxifen in zwei Konzentrationen (je 0,5 µl / Well).Inkubation für 24 h im Brutschrank.
- 3) Vermischen des CytoTox-Glo™-Puffers mit dem AAF-Glo™-Substrat.
- 4) Zugabe dieses CytoTox-Glo™-Reagenz auf die Well-Platten (50 µl / Well), Vermischen mithilfe eines Plattenschüttlers für 2 min, Inkubation für 15 min bei RT.
- 5) Umpipettieren der Well-Inhalte ohne Luftblasen unter deckungsgleicher Anordnung in neue weiße, lichtundurchlässige 96-Well-Platten zur Messung der Lumineszenz mit dem GloMax®-Luminometer (Step 1), anschließendes Pipettieren der Well-Inhalte zurück in die anfangs genutzten 96-Well-Platten.
- 6) Vermischen von 33 µl Digitonin und 5 ml Puffer (Herstellung Lyse-Reagenz).
- 7) Zugabe dieses Lyse-Reagenz auf die Well-Platten (50 µl / Well), Vermischen mithilfe Plattenschüttlers für 2 min, Inkubation für 15 min bei RT.
- 8) Umpipettieren der Well-Inhalte ohne Luftblasen unter deckungsgleicher Anordnung in neue weiße, lichtundurchlässige 96-Well-Platten zur Messung der Lumineszenz mit dem GloMax®-Luminometer (Step 2).

### **3.7.3 BrdU-Immunoassay**

Dieses kolorimetrische Verfahren wird für die Bestimmung der Proliferation vitaler Zellen *in-vitro* verwendet und basiert auf dem ersatzweisen Einbau des zugegebenen Pyrimidin-Analogons 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU) anstelle von Thymidin in die DNA der Zellen (Abbildung 11). Nach einer Inkubationszeit wird die neusynthetisierte, modifizierte DNA mithilfe von FixDenat aufgebrochen und auf diese Weise für den zugefügten monoklonalen Antikörper (Anti-BrdU-POD-Ak) zugänglich gemacht, welcher direkt an das freigelegte BrdU bindet. Eine an dem entstandenen Antikörper-Komplex haftende Peroxidase ruft im nächsten Schritt unter Zugabe des Substrats Tetramethylbenzidin (TMB) reaktiv einen blauen Farbumschlag hervor. Ein ELISA-Reader detektiert spektrophotometrisch bei entsprechender Wellenlänge die Farbreaktionsintensität der Zellproben. Die Stärke des gemessenen Signals korreliert mit der Menge neu gebildeter Komplexe an der modifizierten DNA und dient als Maß für eine stattfindende Zellproliferation. Die Testdurchführung basiert auf der Anleitung der Firma Roche [140].

Durchführung des BrdU-Immunoassay:

- 1) Zellaussaat auf eine 96-Well-Platte (100 µl Zellsuspension/Well bei einer Konzentration von  $3 \times 10^5$  Zellen/ml Medium), anschließend Inkubation im Brutschrank für 24 h (37 °C; 5 % CO<sub>2</sub> in wasserdampfgesättigter Atmosphäre).
- 2) Zugabe der Testsubstanzen (in toto 1 µl / Well),
  - Grüntee-Extrakt (in den Verdünnungsstufen 100 %, 50 %, 20 %, 10 %).
  - Referenzsubstanzen EGCG, Quercetin, Rutin und Kontrollsubstanzen Estradiol und Endoxifen in jeweils zwei Konzentrationen (Tabelle 6).
  - Kombinationen des Extrakts / der Referenzsubstanzen in den verschiedenen Konzentrationen jeweils mit Endoxifen in zwei Konzentrationen (je 0,5 µl / Well).
 Inkubation für 24 h im Brutschrank.
- 3) Zugabe von BrdU-Reagenz (10 µl / Well), Inkubation für 3 h im Brutschrank.
- 4) Entfernen des Zellüberstands, Zugabe von FixDenat (200 µl /Well), Inkubation für 30 min bei RT.
- 5) Entfernen des FixDenat, Zugabe von Anti-BrdU-POD-Lösung (100 µl /Well), (Herstellung der Arbeitslösung durch Lösen des Ak in 1,1 ml Aqua bidest. und Verdünnen mit Antibody-Dilution-Solution im Verhältnis 1:100), Inkubation für 60 min bei RT.
- 6) Entfernen der Anti-BrdU-POD-Lösung, Herstellung Waschlösung durch Mischen von Waschpuffer und Aqua bidest. (im Verhältnis 1:10) und dreifaches Spülen der Wells (200 µl / Well) mit Waschlösung.
- 7) Entfernen der Waschlösung durch leichtes Ausklopfen der Platten, Zugabe von TMB-Substratlösung (100 µl /Well), Inkubation für 10 min bei RT.
- 8) Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (25 µl / Well).
- 9) Messung der Absorption mit ELISA-Reader (bei 450 nm, Referenz 620 nm).

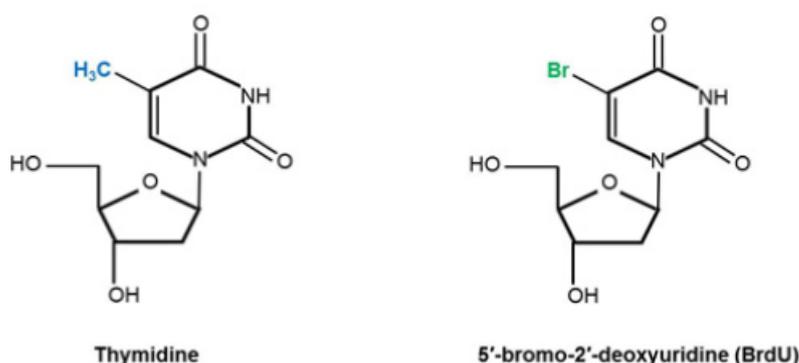


Abbildung 11: Ähnliche Strukturformel der Nucleosid - Moleküle. Die Methylgruppe am 5'-Ende des Thymidins wird beim BrdU (5-Bromo-2'-desoxyuridin) ersetzt durch das Halogen Brom. Das Prinzip des BrdU-Tests basiert auf dem ersatzweisen Einbau des zugegebenen Pyrimidin-Analogons BrdU anstelle von Thymidin in die DNA der Zellen [14].

### 3.8 Stoffwechselanalyse (Bestimmung Glukose-, Laktat- und pH-Wert)

Tumorzellen sind im Vergleich zu nicht-malignen Zellen gekennzeichnet durch einen veränderten Stoffwechsel mit erhöhtem Energiebedarf aufgrund des progressiven Wachstums. Besonders der Glukoseabbau dient zur Gewinnung von Energie. Eine Besonderheit im Tumorgewebe wird durch den sogenannten „Warburg-Effekt“ beschrieben: In Tumorzellen ist vermehrt die Glykolyse mit Bildung und Anreicherung von Laktat auch bei guter Sauerstoffversorgung zu beobachten, anstelle des im Normalgewebe nachweisbaren oxidativen Glukosestoffwechsels mit Einschleusung des entstehenden Pyruvats in den Citratzyklus zur effektiven ATP-Generierung. Die Erhöhung des Laktatwertes infolge der nicht-oxidativen Glykolyse bei Tumorzellen geht einher mit einer resultierenden pH-Wert-Erniedrigung im Gewebe. Auch Veränderungen in den Umgebungsbedingungen von Zellen beeinflussen die Stoffwechsellaage [9, 69, 77].

Zur Überprüfung des Metabolismus der beiden in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurde nach Inkubation mit den dafür vorgesehenen Stimulantien der Glukose- und Laktatgehalt im zentrifugierten Überstand des Testansatzes vollautomatisch mithilfe eines Biosensors (Biosen 5140 der Firma EKF-Diagnostic) bestimmt. Das Messprinzip basiert auf der enzymatischen Oxidation von  $\beta$ -D Glukose / L-Laktat zu Gluconsäure / Pyruvat und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ). Letzteres wird über eine sich im Gerät befindende Elektrode registriert und in Form eines generierten Stromflusses weitergegeben. Das aufgezeichnete Stromsignal ist proportional zur vorhandenen Glukose- bzw. Laktatkonzentration in der Probe [48]. Erniedrigte extrazelluläre Glukosewerte deuten auf eine stattgefundene Glykolyse in den Tumorzellen hin. Die pH-Messwerte in den einzelnen Zellüberständen wurden mithilfe einer Glaselektrode ermittelt, die vor jeder Messreihe kalibriert wurde.

#### Durchführung der Stoffwechselanalyse:

- 1) Zellaussaat auf eine 96-Well-Platte (100  $\mu$ l Zellsuspension/Well bei einer Konzentration von  $3 \times 10^5$  Zellen/ml Medium); anschließend Inkubation im Brutschrank für 24 h (37 °C; 5 %  $CO_2$  in wasserdampfgesättigter Atmosphäre).
- 2) Zugabe der Testsubstanzen (in toto 1  $\mu$ l / Well), jeweils Dreifachbestimmung
  - Grüntee-Extrakt (in den Verdünnungsstufen 100 %, 50 %, 20 %, 10 %).
  - Referenzsubstanzen EGCG, Quercetin, Rutin und Kontrollsubstanzen Estradiol und Endoxifen in jeweils zwei Konzentrationen (Tabelle 6).
  - Kombinationen des Extrakts / der Referenzsubstanzen in den verschiedenen Konzentrationen jeweils mit Endoxifen in zwei Konzentrationen (je 0,5  $\mu$ l / Well). Inkubation für 24 h im Brutschrank.
- 3) Zusammenführen der Zellüberstände einer Proben-Dreifachbestimmung
- 4) Entnahme von je 20  $\mu$ l des Überstands einer Probe und Überführung in Eppendorf-Tube mit enthaltener Reaktionslösung (1 ml).
- 5) Messung des Glukose- und Laktatgehalts mithilfe eines Biosensors (Biosen 5140) im zentrifugierten Überstand.
- 6) Messung des pH-Werts im restlichen/extrazellulären Überstand mithilfe einer pH-Glaselektrode.

### 3.9 Statistische Auswertung

Die Untersuchungen zur Messung der Zellviabilität (CellTiter-Glo<sup>®</sup>-Test), Zytotoxizität (CytoTox-Glo<sup>™</sup>-Test) sowie der Zellproliferation (BrdU-Immunoassay) wurden pro Versuch jeweils dreimal an den Zelllinien MCF-7- und MDA-MB-231 durchgeführt. Pro Ansatz erfolgte eine Dreifachbestimmung, aus der jeweils ein Mittelwert errechnet wurde. Zusätzlich wurden auch alle Ansätze mit Zellen in reinem Medium untersucht und gemessen. Diese Werte wurden von den obigen Mittelwerten subtrahiert, der reine Mediumwert auf Zellen bestimmt, der von den Mittelwerten subtrahiert wurde, um Beeinflussungen durch das Nährmedium auszuschließen. Die errechneten Mittelwerte wurden ins Verhältnis zur Negativkontrolle gesetzt, welche sich für die einzelnen Testsubstanzen aus den Werten der jeweils verwendeten Lösungsmittel in Zellsuspension zusammensetzte (Tabelle 6) und als Maß für 100 % Zellviabilität diente. In den Diagrammen wurden die Mittelwerte der getesteten Substanzen somit in Prozent der Negativkontrolle mit entsprechender Standardabweichung dargestellt. Nach Rücksprache mit dem Institut für Biostatistik der Universität Rostock erfolgte die Berechnung der statistischen Signifikanz der Testergebnisse mit dem t-Test mit Microsoft Office Excel 2010. Dabei wurden signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Testsubstanzen und der Negativkontrolle im t-Test berechnet. Das Signifikanzniveau wurde auf 5 % festgelegt ( $p < 0,05$ ).

### 3.10 Geräte, Materialien und Chemikalien

Nachfolgend werden in tabellarischer Form die für die Zellkultur und für die experimentellen Untersuchungen sowie für die deren Vor- und Nachbereitung genutzten Materialien, Chemikalien und Geräte aufgelistet, welche für das Anfertigen dieser Forschungsarbeit erforderlich waren.

#### 3.10.1 Liste der verbrauchten Materialien

Bezeichnung	Hersteller, Land / Stadt
Einweghandschuhe Vasco <sup>®</sup> Nitril blue	B. Braun Melsungen AG, Deutschland/Melsungen
Einwegspritze (10 ml) Discardit 2	Becton Dickinson GmbH, Deutschland/Heidelberg
Pipetten Eppendorf Research (0,5 µl - 10 µl)	Eppendorf GmbH, Deutschland/Wesseling Berzdorf
Pipetten Eppendorf Research (10 µl - 100 µl)	Eppendorf GmbH, Deutschland/Wesseling Berzdorf
Pipetten Eppendorf Research (20 µl - 200 µl)	Eppendorf GmbH, Deutschland/Wesseling Berzdorf
Pipetten Eppendorf Research (100 µl - 1000 µl)	Eppendorf GmbH, Deutschland/Wesseling Berzdorf

Pipetten Eppendorf Research (500 µl - 5000 µl)	Eppendorf GmbH, Deutschland/Wesseling Berzdorf
Pipettenspitzen 10 µl (farblos)	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland/Nümbrecht
Pipettenspitzen 200 µl Ultratip	Greiner bio-one GmbH, Deutschland/Frickenhausen
Pipettenspitzen 1000 µl	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland/Nümbrecht
Pipettenspitzen 5000 µl	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Deutschland/Steinfurt
Pipettierhilfe Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Deutschland/Eberstadt
Serologische Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner bio-one GmbH, Deutschland (Frickenhausen)
Filter (Porengröße 0,45 µm)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland/Karlsruhe
Bürker-Zählkammer	Poly-Optik GmbH, Deutschland/Bad Blankenburg
HPLC – Injektionsspritze 100 µl	KNAUER Wissenschaftliche Geräte GmbH, Deutschland/Berlin
Reaktionsgefäße 1,5 ml; 2ml	Greiner bio-one GmbH, Deutschland/Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen 15 ml	TPP Techno Plastic Products AG, Schweiz/Trasadingen
Zentrifugenröhrchen 50 ml CELLSTAR®	Greiner bio-one GmbH, Deutschland/Frickenhausen
Zellkulturplatte (24 Wells)	TPP Techno Plastic Products AG, Schweiz/Trasadingen
Zellkulturplatte (96 Wells)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland/Karlsruhe
Parafilm® PM-992	Bemis Company, Inc., USA/Neenah
Glasflaschen 500 ml, 1000 ml	SCHOTT AG, Deutschland/Mainz
Mikrowellenreagenzglas	CEM GmbH, Deutschland/ Kamp-Lintfort
Glucose Standard Cups	CARE diagnostica, Deutschland
Messzylinder 250 ml, 500 ml	
wasserfester Stift	
Metallspatel	
Rührfisch	
Bechergläser	
Pasteurpipetten	
Röhrchenständer	

## 3.10.2 Liste der verwendeten Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller, Land / Stadt
Handdesinfektion Sterilium ® Classic pure	BODE Chemie GmbH, Deutschland/Hamburg
Flächendesinfektion Bacillol® AF	BODE Chemie GmbH, Deutschland/Hamburg
Ethanol 99 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland/Karlsruhe
Ethanol 70 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland/Karlsruhe
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland/Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland/Karlsruhe
Estradiol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland/München
Epigallocatechingallat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland/München
Quercetin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland/München
Rutin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland/München
Endoxifen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland/München
Grüner Tee Bancha, lose Teeblätter	J.T. Ronnefeldt KG, China
DMEM-FM-58-L	c.c. Pro GmbH, Deutschland/Oberdorla
Fetales Kälberserum 500 ml	c.c. Pro GmbH, Deutschland/Oberdorla
Amphotericin B	c.c. Pro GmbH, Deutschland/Oberdorla
Penicillin-Streptomycin	PAN-Biotech GmbH, Deutschland/Aidenbach
Trypsin-EDTA 10x	c.c. Pro GmbH, Deutschland/Oberdorla
Trypanblau Lösung (0,4 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland/München
Formafix 4% gepuffert	Grimm MED Recycling GmbH, Deutschland/Torgelow
Wasserstoffperoxid 5%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland/Karlsruhe
LinRed IHC (HRP-Substrat) REF: E201UK	LINARIS Biologische Produkte GmbH, Deutschland/Dossenheim
PBS	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland/Karlsruhe
Aqua dest.	Eigenherstellung

<b>Antikörper</b>	
Anti- $\alpha$ -ER-Antikörper (orb178430)	Biorbyt, Großbritannien/Cambridge
Anti- $\beta$ -ER-Antikörper (GTX47720)	GeneTex, Inc., USA/Irvine
Anti-PR-Antikörper (orb178489)	Biorbyt, Großbritannien/Cambridge

<b>Test - Kits</b>	
ImmPRESS™ HRP Universal Antibody (Anti-Mouse IgG/Anti-Rabbit IgG, Peroxidase) Polymer Detection Kit, made in Horse (MP-7500)	Vector Laboratories, USA/Burlingame
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Promega, USA/ Madison
CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay	Promega, USA/ Madison
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colometric)	Roche GmbH, Schweiz / Basel

### 3.10.3 Liste der verwendeten Geräte

<b>Gerätebezeichnung</b>	<b>Hersteller, Land / Stadt</b>
Waage BA610 Basic	Sartorius AG Göttingen, Deutschland
Feinwaage Sartorius BP210 S-OCE	Sartorius AG Göttingen, Deutschland
Vortexer Heidolph Reax2000	Heidolph Instruments GmbH, Deutschland/Schwabach
Vortex-Genie®1 Touchmixer	Scientific Industries, Inc., USA/Bohemia
Zentrifuge Hettich Universal 320R	Hettich Zentrifuge, Deutschland/Tuttlingen
Zentrifuge Heraeus Biofuge Pico	Heraeus Instruments, Deutschland/Hanau
Zentrifuge Galaxy MiniStar	VWR International, USA/Radnor
Labormikrowelle CEM Discover SP	CEM GmbH, Deutschland/ Kamp-Lintfort
Ultraschallbad Emmi®-H22 2,2l	Emag AG, Deutschland/ Mörfelden-Walldorf
Rotationsverdampfer Eppendorf Concentrator 5301	Eppendorf GmbH, Deutschland/Wesseling-Berzdorf
Inkubator Heraeus Function Line BB16	Heraeus Instruments, Deutschland/Hanau
Gefrierschrank (-80°C) Herafreeze HFU586 PLUS-V14	Heraeus Instruments, Deutschland/Hanau
Kühlschrank Liebherr Premium	Liebherr-International Deutschland GmbH, Deutschland/Biberach an der Riß
Gefrierschrank (-20°C) Premium	Liebherr-International Deutschland GmbH, Deutschland/Biberach an der Riß
Stickstoffbehälter (-188°C) Cryostorage System K Series	tec-lab GmbH, Deutschland/Taunusstein
Stickstoff-Tank	tec-lab GmbH, Deutschland/Taunusstein

harsco cryogenic products	
Eismaschine AF80	Scotsman Ice, Italy/Mailand
Sterilbank Heraeus Herasafe HS12	Heraeus Instruments, Deutschland/Hanau
Schüttler TPM-2	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland/Nümbrecht
Schüttler RM5	Karl Hecht GmbH & Co. KG, Deutschland/Sondheim vor der Rhön
Mikroskop Axiovert 40C	Carl Zeiss AG, Deutschland/Oberkochen
Mikroskop AxioStar Plus	Carl Zeiss AG, Deutschland/Oberkochen
Mikroskop-Kamera Axio Cam MRC	Carl Zeiss AG, Deutschland/Oberkochen
ELISA-Photometer BioRad Modell 680	BioRad Laboratories GmbH, Deutschland/München
pH-Messelektrode Orion ROSS	Thermo Fisher Scientific Inc., USA/Waltham
pH-Benchtop Orion 3 Star	Thermo Fisher Scientific Inc., USA/Waltham
Multipipette Plus	Eppendorf, Deutschland
Glucoseautomat Biosen 5140	EKF – Diagnostic, Deutschland
Handmörser	

<b>HPLC-Anlage</b>	
Smartline Manager 5000	KNAUER Wissenschaftliche Geräte GmbH, Deutschland/Berlin
Smartline Pump 1000	KNAUER Wissenschaftliche Geräte GmbH, Deutschland/Berlin
Smartline UV Detector	KNAUER Wissenschaftliche Geräte GmbH, Deutschland/Berlin
ClarityChrom Chromatografie Software	KNAUER Wissenschaftliche Geräte GmbH, Deutschland/Berlin
Column- Thermostat Jetstream 2 Plus	KNAUER Wissenschaftliche Geräte GmbH, Deutschland/Berlin
C18-Säule Eurospher 100-5 C18, Vertex Plus Column 250 x 4 mm	KNAUER Wissenschaftliche Geräte GmbH, Deutschland/Berlin

## 4 Ergebnisse

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse dieser Forschungsarbeit präsentiert, welche die HPLC-Analyse des Grüntee-Extrakts, die immunhistochemische Charakterisierung der untersuchten Zelllinien sowie die Zelltests für Zellviabilität und -proliferation und die Stoffwechselanalyse der Brustkrebszellen umfassen.

### 4.1 HPLC-Analyse

Mithilfe der HPLC-Analyse wurde die Zusammensetzung des hergestellten Grüntee-Extrakts geprüft, wobei der Fokus auf dem Nachweis der Inhaltsstoffe Epigallocatechingallat (EGCG), Quercetin und Rutin lag.

In jeweils drei Messdurchläufen unter gleichbleibenden Bedingungen erfolgte die Untersuchung des Grüntee-Extrakts sowie der kommerziell erworbenen Reinstoffe EGCG, Quercetin und Rutin, welche als Referenzsubstanzen für die qualitative Analyse dienten. Durch die wiederholten Durchläufe wurde eine Reproduzierbarkeit der einzelnen Ergebnisse sichergestellt. Das Chromatogramm bildet auf der Horizontalen den Zeitverlauf [min] und auf der vertikalen Achse die UV-Absorption [AU] ab.

#### 4.1.1 Chromatogramm des Grüntee-Extrakts

In der grafischen Darstellung der Grüntee-Extrakt-Analyse (Abbildung 12) lassen sich mehrere Peaks erkennen, welche die aufgetrennten Probenkomponenten des Stoffgemischs mit jeweils charakteristischer Retentionszeit abbilden. Das Messen der Retentionszeit eines Stoffes erfolgt im Chromatogramm an der entsprechenden Peakspitze [154].

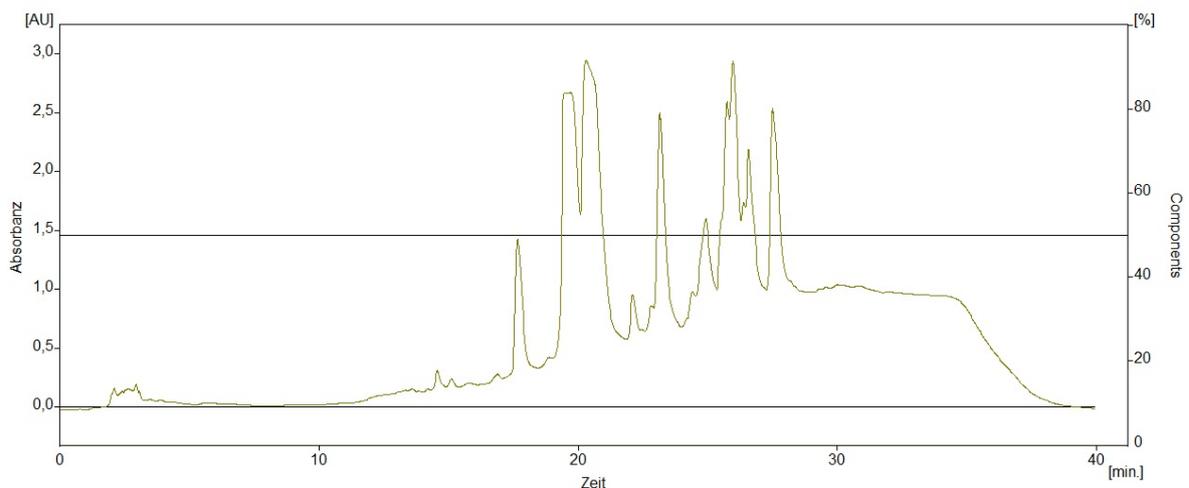


Abbildung 12: Chromatogramm des Grüntee-Extrakts (grüne Kurve). Auf den Achsen ist die UV-Absorption [AU] gegen die Zeit [min] aufgetragen.

#### 4.1.2 Vergleich mit den Referenzsubstanzen EGCG, Quercetin, Rutin

Zur Visualisierung und Differenzierung der einzelnen Komponenten zeigen die folgenden Abbildungen übereinandergelegte Chromatogramme. Für eine qualitative Aussage zu bestimmten Inhaltsstoffen des Grünen Tees können so die als Standard dienenden Graphen der Reinsubstanzen hinsichtlich der charakteristischen Retentionszeiten mit dem Kurvenverlauf des Grüntee-Extrakts verglichen werden. Zwei übereinanderliegende Signalpeaks entsprechen einer identischen Durchlaufzeit und damit dem Nachweis eines definierten Stoffes.

In dem Grüntee-Extrakt konnten mithilfe der durchgeführten HPLC-Analyse die Stoffe EGCG, Quercetin und Rutin als vorkommende Inhaltsstoffe nachgewiesen werden. Die gemessenen Retentionszeiten liegen für EGCG bei 21,0 min, für Quercetin bei 27,7 min und für Rutin bei 24,7 min (Abbildungen 13 - 15).

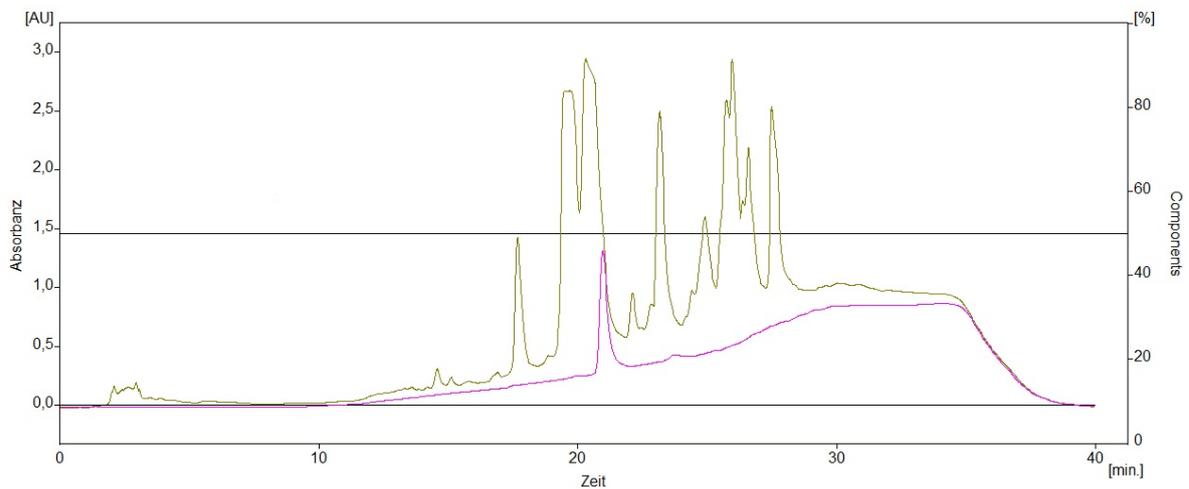


Abbildung 13: Vergleich des Chromatogramms des Grüntee-Extrakts (grüne Kurve) mit dem Chromatogramm der Referenzsubstanz EGCG (violette Kurve). Aufgetragen ist die UV-Absorption [AU] gegen die Zeit [min]. Die Retentionszeit für EGCG beträgt 21,0 min nach Injektion.

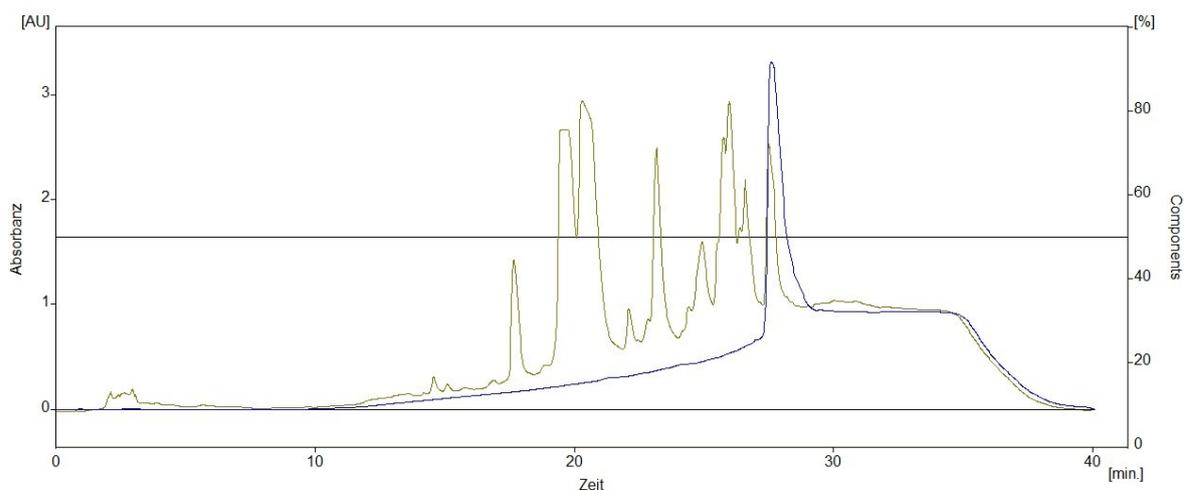


Abbildung 14: Vergleich des Chromatogramms des Grüntee-Extrakts (grüne Kurve) mit dem Chromatogramm der Referenzsubstanz Quercetin (blaue Kurve). Aufgetragen ist die UV-Absorption [AU] gegen die Zeit [min]. Die Retentionszeit für Quercetin beträgt 27,7 min nach Injektion.

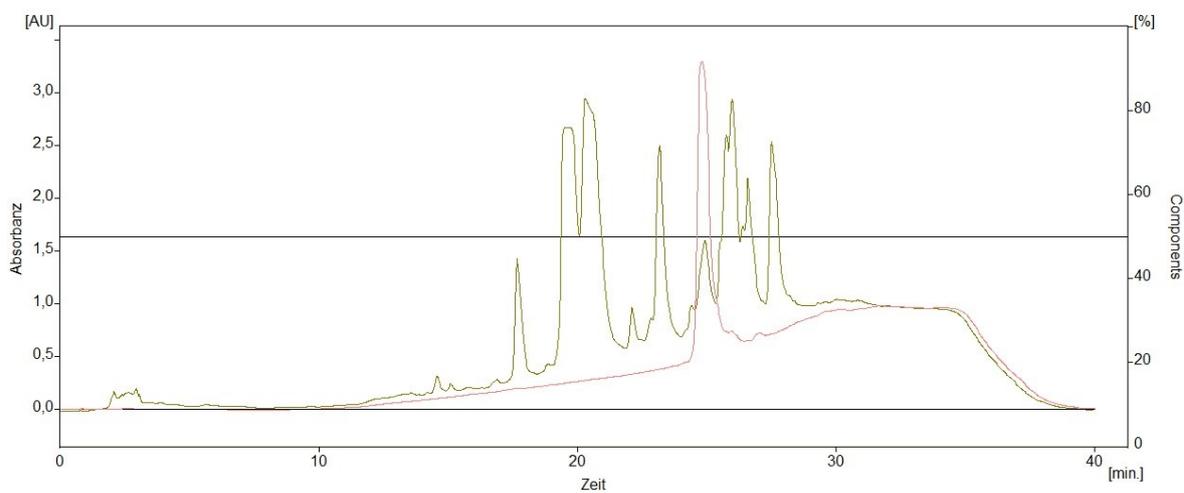


Abbildung 15: Vergleich des Chromatogramms des Grüntee-Extrakts (grüne Kurve) mit dem Chromatogramm der Referenzsubstanz Rutin (blassrosa Kurve). Aufgetragen ist die UV-Absorption [AU] gegen die Zeit [min]. Die Retentionszeit für Rutin beträgt 24,7 min nach Injektion.

## 4.2 Immunhistochemie

Mithilfe der immunhistochemischen Untersuchung erfolgte im Rahmen dieser Arbeit die Überprüfung des Hormonrezeptorstatus der verwendeten humanen Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MDA-MB-231. Getestet wurde die Expression der Estrogenrezeptoren ( $ER\alpha$ ,  $ER\beta$ ) sowie des Progesteronrezeptors (PR).

### 4.2.1 MCF-7-Zellen

Bei den MCF-7-Zellen bestätigte eine positive Farbreaktion nach Antikörpergabe bei mikroskopischer Betrachtung der Zellen das Vorhandensein der Rezeptoren. Durch die intrazelluläre Lage der Steroidrezeptoren erscheint das Zytoplasma rötlich gefärbt (Abbildung 16).

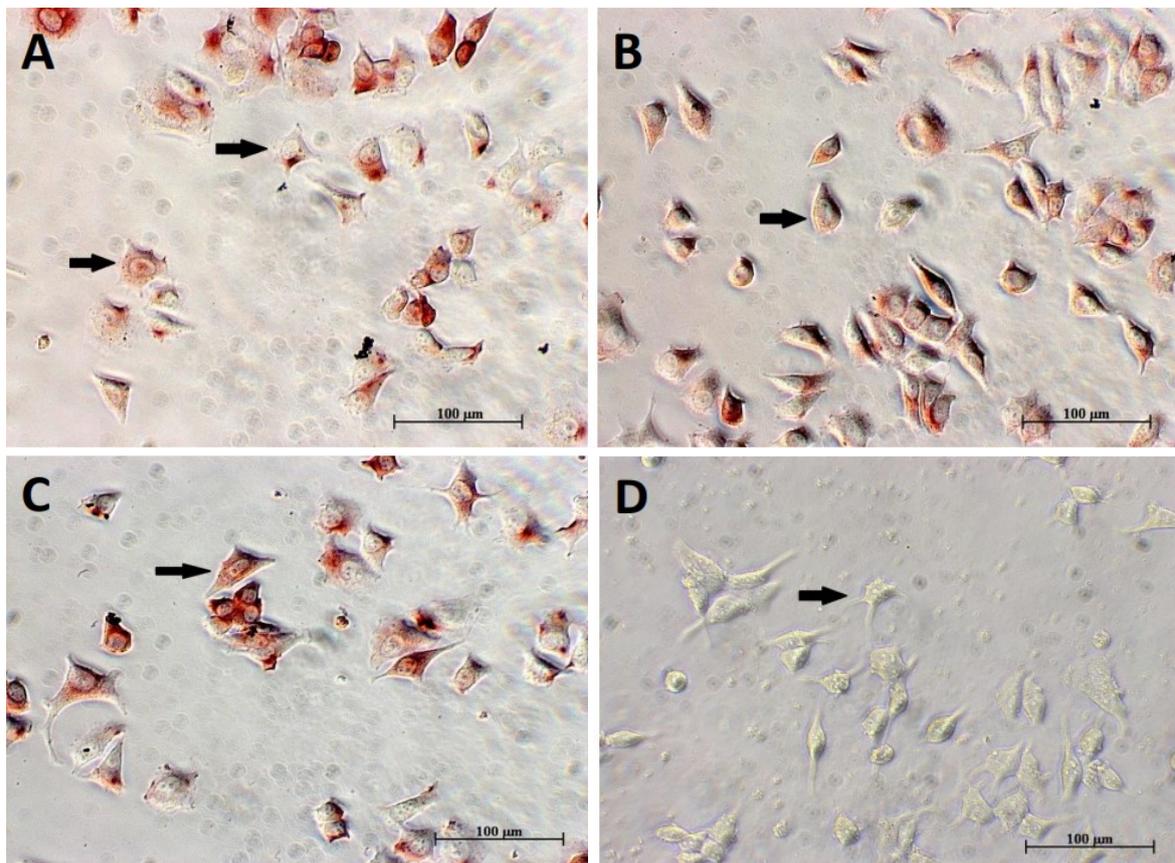


Abbildung 16: Immunhistochemie zur Prüfung des Rezeptorstatus der MCF-7-Zelllinie. A:  $ER\alpha$  positiv; B:  $ER\beta$  positiv; C: PR positiv; D: Negativkontrolle. Vergrößerung 10x. Skalierungsbalken = 100  $\mu\text{m}$ . Pfeile zeigen beispielhaft auf einzelne Karzinomzellen.

#### 4.2.2 MDA-MB-231-Zellen

Im Vergleich dazu konnte bei den MDA-MB-231-Zellen aufgrund eines fehlenden Farbumschlags nachgewiesen werden, dass bei der Zelllinie keine Expression der Rezeptoren ER $\alpha$ , ER $\beta$  und PR stattfand (Abbildung 17).

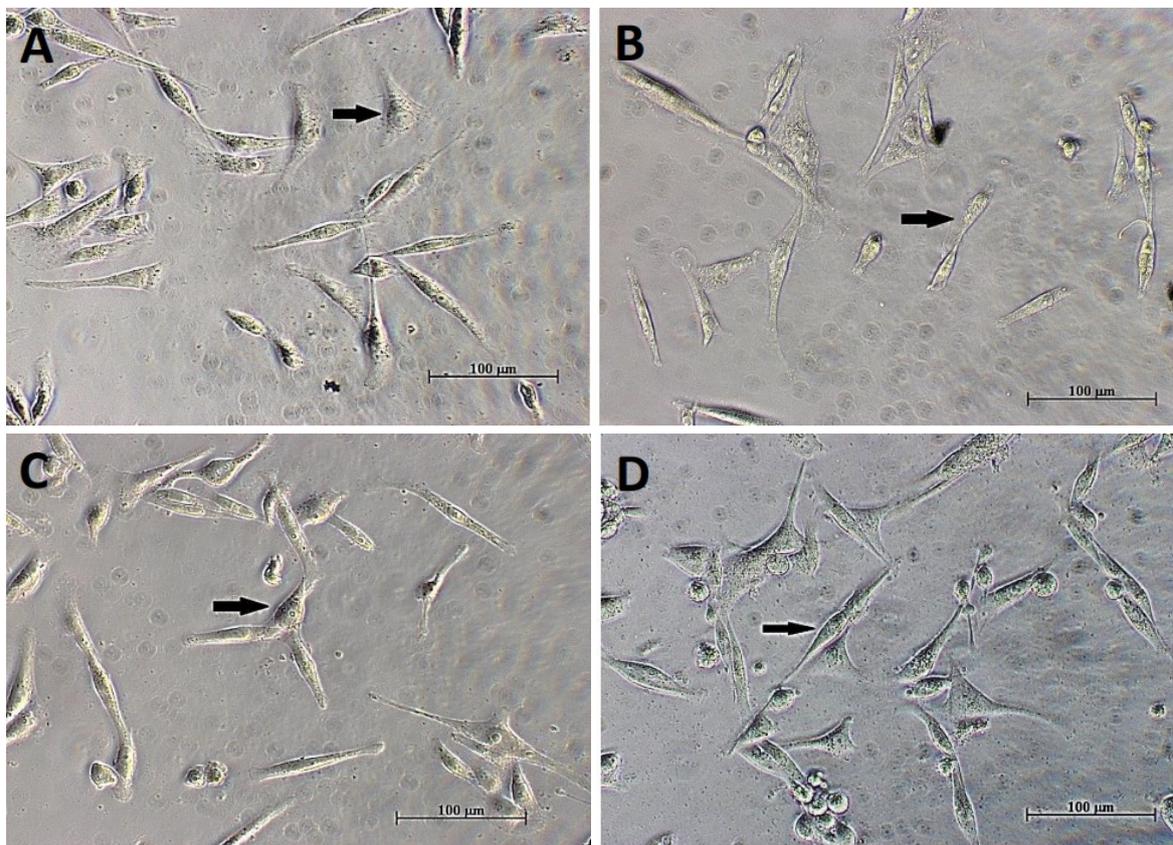


Abbildung 17: Immunhistochemie zur Prüfung des Rezeptorstatus der MDA-MB-231-Zelllinie. A: ER $\alpha$  negativ; B: ER $\beta$  negativ; C: PR negativ; D: Negativkontrolle. Vergrößerung 10x. Skalierungsbalken = 100  $\mu$ m. Pfeile zeigen beispielhaft auf einzelne Karzinomzellen.

### 4.3 CellTiter-Glo®-Zellviabilitätstest

Um die Wirkung des Grüntee-Extrakts und der beschriebenen Testsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen und Kombinationen auf die Viabilität der Mammakarzinomzellen *in-vitro* zu beurteilen, wurde in diesem Test der ATP-Gehalt indirekt in Form eines detektierten Lumineszenz-Signals im Zellüberstand gemessen. Daraus folgte die Ableitung des prozentualen Anteils metabolisch aktiver Zellen nach 24-stündiger Substrateinwirkung (Zellviabilität [%]), welcher in den folgenden Balkendiagrammen dargestellt wird. Signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ) sind mit einem schwarzen Sternchen (\*) gekennzeichnet. Der CellTiter-Glo®-Test wurde unter möglichst gleichbleibenden Bedingungen pro Zellreihe jeweils dreimal durchgeführt.

#### 4.3.1 MCF-7-Zelllinie

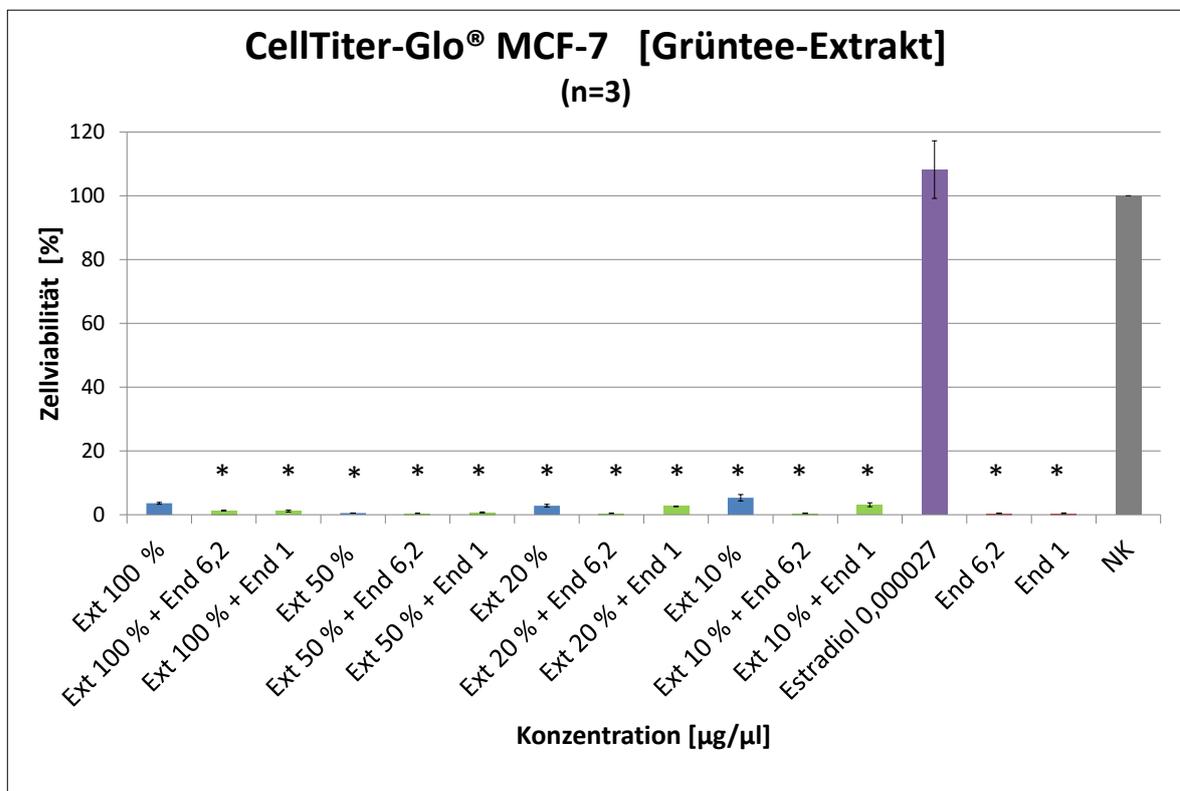


Abbildung 18: CellTiter-Glo®-Test: Darstellung der Zellviabilität [%] von MCF-7 nach 24 h Einwirkung des Grüntee-Extrakts und seiner Verdünnungsstufen, Estradiol und Endoxifen sowie der Kombination aus Extrakt bzw. seiner Verdünnungen mit Endoxifen bezogen auf die Negativkontrolle (NK = 100 %, bestehend aus dem jeweils angewendeten Lösungsmittel in Zellsuspension); angegeben sind die Mittelwerte aus drei Messungen sowie die Standardabweichungen und Signifikanzen (\* $p < 0,05$ ) bezogen auf die Negativkontrolle; Ext = Grüntee-Extrakt in den angegebenen Verdünnungsstufen; End = Endoxifen; NK = Negativkontrolle (Abschnitt 3.9).

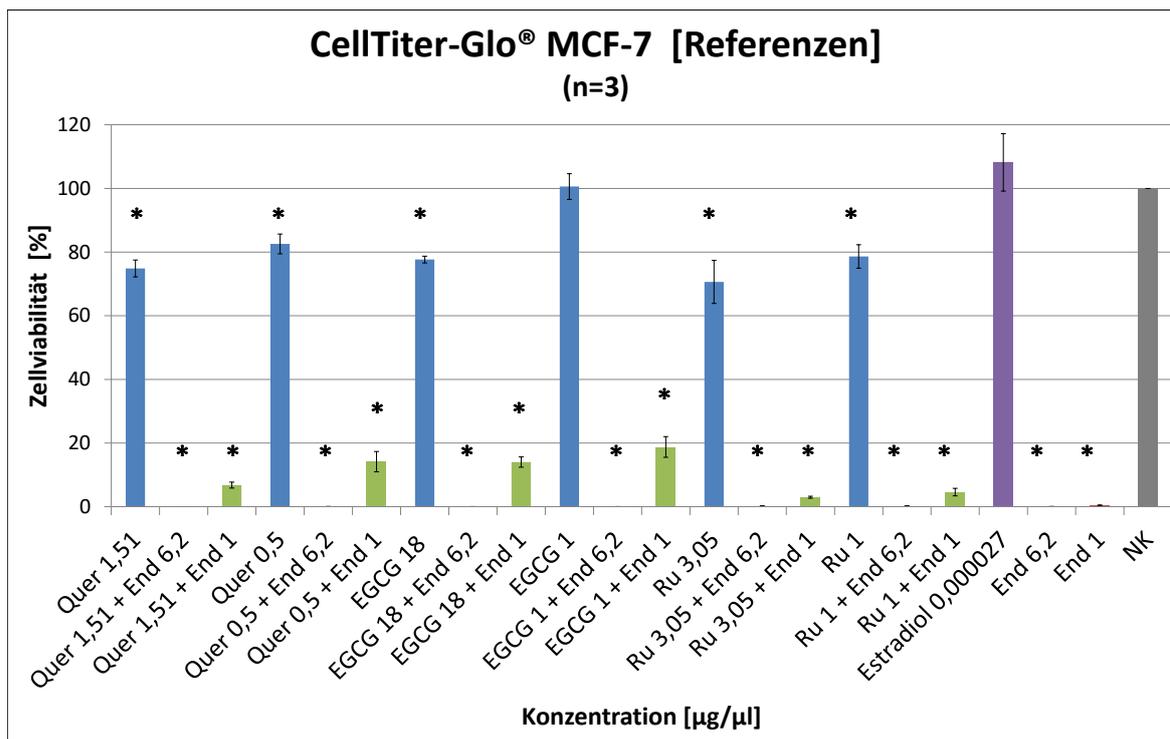


Abbildung 19: CellTiter-Glo®-Test: Darstellung der Zellviabilität [%] von MCF-7 nach 24 h Einwirkung der Referenzsubstanzen Quercetin, EGCG und Rutin in jeweils 2 Konzentrationen, Estradiol und Endoxifen sowie der Kombination aus Referenzen mit Endoxifen bezogen auf die Negativkontrolle (NK = 100 %, bestehend aus dem jeweils angewendeten Lösungsmittel in Zellsuspension); angegeben sind die Mittelwerte aus drei Messungen sowie die Standardabweichungen und Signifikanzen (\* $p < 0,05$ ) bezogen auf die Negativkontrolle; Quer = Quercetin; EGCG = Epigallocatechingallat; Ru = Rutin; End = Endoxifen; NK = Negativkontrolle (Abschnitt 3.9).

Aus der Messung der Zellviabilität mithilfe des CellTiter-Glo®-Tests geht hervor, dass sich nach 24-stündiger Inkubation der MCF-7-Zellen mit dem Grüntee-Extrakt und seinen Verdünnungsstufen eine signifikante Reduktion des Lebendzellanteils auf unter 10 % im Vergleich zur Negativkontrolle (Abschnitt 3.9) einstellte. Dabei hatte der halbverdünnte Grüntee-Extrakt (50%) im Vergleich der verschiedenen Verdünnungsstufen den stärksten Wirkeffekt.

Während Endoxifen in beiden getesteten Konzentrationen zu einer maximalen Hemmung der Zellviabilität führte, konnte bei Estradiol hingegen eine leichte Steigerung des ATP-Gehalts und damit der Aktivität lebender Zellen gemessen werden (Abbildung 18).

Die als Reinsubstanzen getesteten Grünteebestandteile Quercetin, EGCG und Rutin zeigten in den gewählten Konzentrationen keine stark viabilitätshemmende Wirkung auf die MCF-7-Zellen (Abbildung 19). Alle getesteten Konzentrationen der Flavonoide lagen signifikant unter der ED 50, d.h. es wurde unter den gegebenen Bedingungen bei weniger als 50 % der Brustkrebszellen mit den ausgewählten Konzentrationen ein hemmender Effekt erreicht. Festgestellt werden konnte allerdings, dass jeweils bei der höheren Konzentration des Stoffes auch die Hemmung der Zellviabilität stieg. So lag bei Quercetin 0,5 µg / µl eine Lebendzellzahl von 82,5 % vor, während im Vergleich dazu die Konzentration 1,51 µg / µl nur noch 75 % lebende Zellen aufwies.

Die Reinsubstanz EGCG zeigte in der niedrigeren Konzentration 1  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$  keine zellreduzierende Wirkung, wohingegen bei 18  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$  eine Viabilitätshemmung von 22 % der Zellen zu beobachten war. Auch Rutin verzeichnete bei stärkerer Konzentration einen signifikant größeren Wirkeffekt.

Die zu testenden Substanzen jeweils kombiniert mit Endoxifen erzielten insgesamt eine sehr starke Wirkung auf die MCF-7-Zellen. Sowohl der Grüntee-Extrakt und seine Verdünnungen als auch die Referenzen in den verschiedenen Konzentrationen zeigten jeweils in Kombination mit beiden Endoxifen-Konzentrationen hinsichtlich der Zellviabilität signifikante Werte unterhalb von 20 %. Die kombinierte Gabe mit Endoxifen in der Konzentration 6,2  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$  hatte bei allen Messungen sogar einen maximalen Wirkeffekt (Zellviabilität < 1 %).

#### 4.3.2 MDA-MB-231-Zelllinie

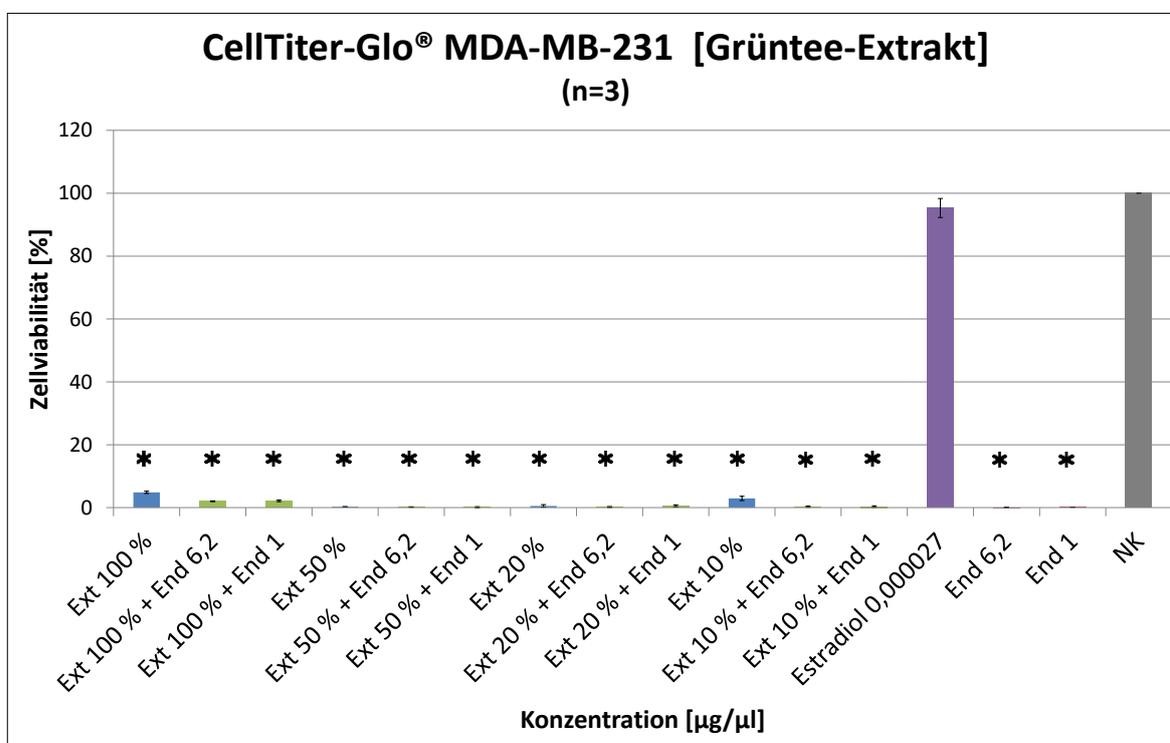


Abbildung 20: CellTiter-Glo®-Test: Darstellung der Zellviabilität [%] von MDA-MB-231 nach 24 h Einwirkung des Grüntee-Extrakts, seiner Verdünnungsstufen, Estradiol und Endoxifen sowie der Kombination aus Extrakt bzw. seiner Verdünnungen mit Endoxifen bezogen auf die Negativkontrolle (NK = 100 %, bestehend aus dem jeweils angewendeten Lösungsmittel in Zellsuspension); angegeben sind die Mittelwerte aus drei Messungen, sowie die Standardabweichungen und Signifikanzen (\* $p < 0,05$ ) bezogen auf die NK; Ext = Grüntee-Extrakt in den angegebenen Verdünnungen; End = Endoxifen; NK = Negativkontrolle (Abschnitt 3.9).

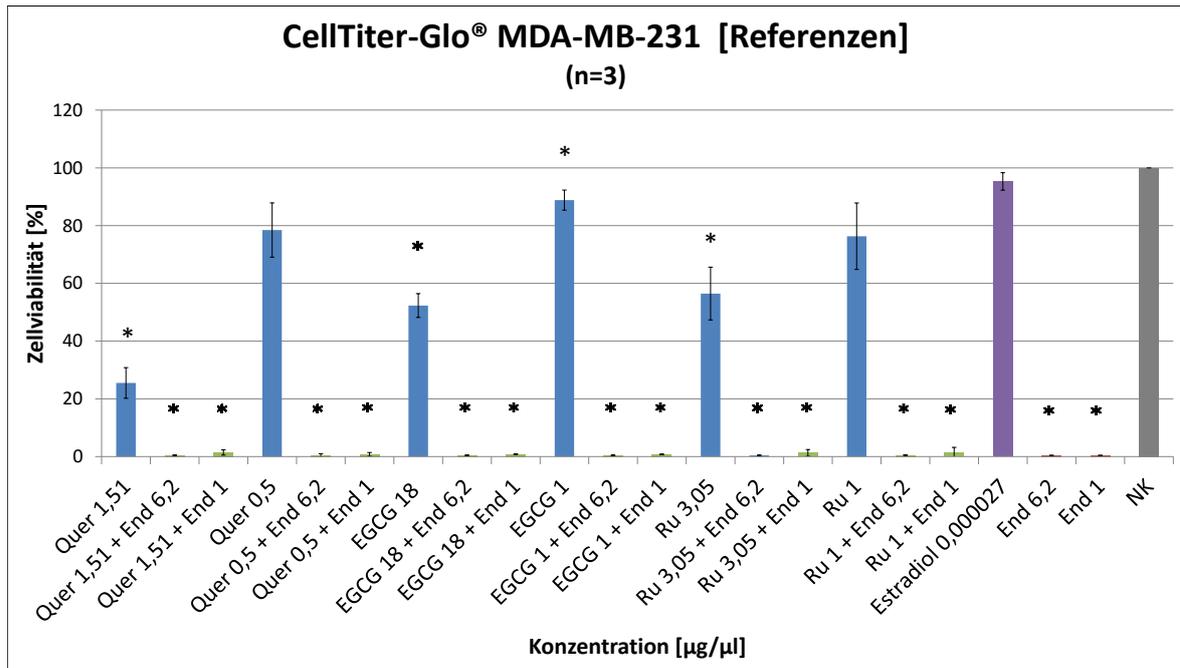


Abbildung 21: CellTiter-Glo®-Test: Darstellung der Zellviabilität [%] von MDA-MB-231 nach 24 h Einwirkung der Referenzsubstanzen Quercetin, EGCG und Rutin in jeweils 2 Konzentrationen, Estradiol und Endoxifen sowie der Kombination aus Referenzen mit Endoxifen bezogen auf die Negativkontrolle (NK = 100 %); angegeben sind die Mittelwerte aus drei Messungen sowie die Standardabweichungen und Signifikanzen (\* $p < 0,05$ ) bezogen auf die NK; Quer = Quercetin; Ru = Rutin; End = Endoxifen; NK = Negativkontrolle (Abschnitt 3.9).

Die Ergebnisse der Zelllinie MDA-MB-231 zeigten bei dem unter gleichen Bedingungen durchgeführten CellTiter-Glo®-Test ähnliche Ergebnisse wie bei den MCF-7-Zellen. Endoxifen als Reinsubstanz führte zu einer starken Reduktion der Lebendzellzahl mit Zellviabilitätswerten  $< 1\%$  in beiden getesteten Konzentrationen, Estradiol hatte keine signifikante Wirkung auf die Zellen. Bei dem Grüntee-Extrakt und seinen Verdünnungsstufen sowie bei deren Kombination mit Endoxifen in zwei Konzentrationen überwog insgesamt eine starke Hemmung der Zellviabilität, welche in allen Fällen  $< 5\%$  lag (Abbildung 20). Im Vergleich zu den MCF-7 Zellen fiel ebenfalls auf, dass der Grüntee-Extrakt 100 % eine signifikant leicht geringere Wirkung auf die MDA-MB-231-Zellen aufwies als der 50 % -ige Extrakt.

Die Referenzen EGCG und Rutin hatten als Reinstoffe auf die MDA-MB-231-Zellen einen eher geringen Wirkeffekt, bei dem mehr als 50 % der Zellen vital blieben (Abbildung 21). Lediglich Quercetin in der Konzentration 1,51 µg / µl bewirkte einen signifikanten Hemmeffekt auf 25,5 % Zellviabilität im Vergleich zur Negativkontrolle. Die Kombinationen der Referenzen Quercetin, EGCG und Rutin jeweils mit Endoxifen in den festgelegten Konzentrationen zeigten eine maximale Wirkung auf die MDA-MB-231-Zellen mit weniger als 2 % Zellviabilität in allen Messungen.

Insgesamt verzeichneten die Ergebnisse des CellTiter-Glo®-Tests eine starke Hemmung der Zellviabilität, v.a. bei Testung des Grüntee-Extrakts und seiner Verdünnungsstufen sowie dieser Stoffe in der Kombination mit Endoxifen. Die reinen Referenzstoffe zeigten erst in der Kombination mit Endoxifen einen starken Wirkeffekt.

#### 4.4 CytoTox-Glo™ - Zytotoxizitätstest

Dieser Test wurde angewandt, um eine Aussage über die zytotoxische Wirkung des Grüntee-Extrakts und der angewandten Testsubstanzen auf die Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 zu treffen. Als Parameter für den Zelltod diente dabei eine Protease, die nach Austritt aus geschädigten Zellen mithilfe des Testkits eine messbare Lumineszenz-Reaktion auslöst. Durch ein anschließend herbeigeführtes Absterben aller Zellen konnte der prozentuale Anteil vitaler Zellen ausgerechnet werden.

In den folgenden Diagrammen wird die Zellviabilität [%] nach Inkubation der Brustkrebszellen mit den Testsubstanzen dargestellt. Signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ) sind mit einem schwarzen Sternchen (\*) gekennzeichnet. Der CytoTox-Glo™-Test wurde unter möglichst gleichbleibenden Bedingungen pro Zellreihe jeweils dreimal durchgeführt.

##### 4.4.1 MCF-7-Zelllinie

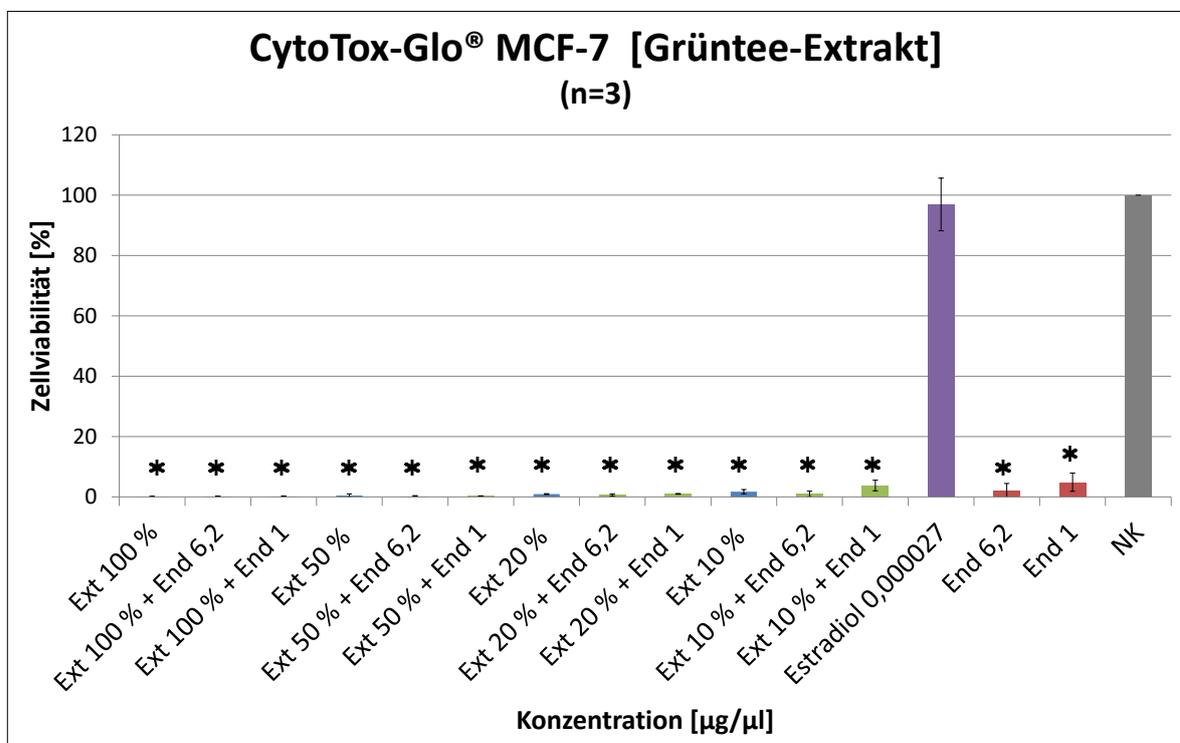


Abbildung 22: CytoTox-Glo™-Test: Darstellung der Zellviabilität [%] von MCF-7 nach 24 h Einwirkung des Grüntee-Extrakts und seiner Verdünnungsstufen, Estradiol und Endoxifen sowie der Kombination aus Extrakt bzw. seiner Verdünnungen mit Endoxifen bezogen auf die Negativkontrolle (NK = 100 %, bestehend aus dem jeweils angewendeten Lösungsmittel in Zellsuspension); angegeben sind die Mittelwerte aus drei Messungen sowie die Standardabweichungen und Signifikanzen (\* $p < 0,05$ ) bezogen auf die Negativkontrolle; Ext = Grüntee-Extrakt in den angegebenen Verdünnungsstufen; End = Endoxifen; NK = Negativkontrolle (Abschnitt 3.9).

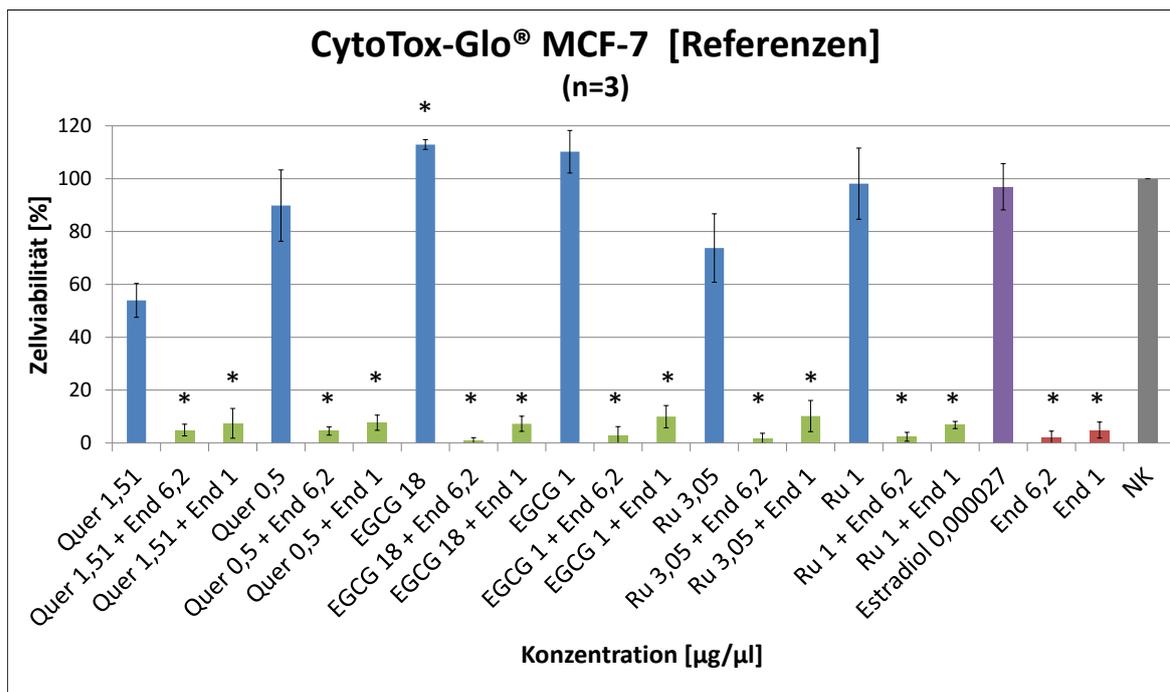


Abbildung 23: CytoTox-Glo™-Test: Darstellung der Zellviabilität [%] von MCF-7 nach 24 h Einwirkung der Referenzsubstanzen Quercetin, EGCG und Rutin in jeweils 2 Konzentrationen, Estradiol und Endoxifen sowie der Kombination aus Referenzen mit Endoxifen bezogen auf die Negativkontrolle (NK = 100 %, bestehend aus dem jeweils angewendeten Lösungsmittel in Zellsuspension); angegeben sind die Mittelwerte aus drei Messungen sowie die Standardabweichungen und Signifikanzen (\* $p < 0,05$ ) bezogen auf die Negativkontrolle; Quer = Quercetin; EGCG = Epigallocatechingallat; Ru = Rutin; End = Endoxifen; NK = Negativkontrolle (Abschnitt 3.9).

In Abbildung 22 ist deutlich zu erkennen, dass die 24-stündige Inkubation der MCF-7-Zellen mit dem Grüntee-Extrakt und seinen Verdünnungsstufen einen stark zytotoxischen Effekt hervorrief und der Lebendzellanteil signifikant weniger als 2 % im Vergleich zur Negativkontrolle betrug. Auch Endoxifen in beiden getesteten Konzentrationen hatte nach Zugabe auf die Zellen eine maximale Zellreduktion zur Folge. Im Gegensatz dazu zeigte Estradiol keine Hemmung der Zellviabilität. Die Kopplung des Grüntee-Extrakts und der Verdünnungen jeweils mit Endoxifen in zwei Konzentrationen ergab in allen Messungen signifikant eine maximal zytotoxische Wirkung (Zellviabilität < 1 %). Lediglich der auf 10 % in Ethanol verdünnte Extrakt in der Kombination mit Endoxifen in der geringeren Konzentration (1 µg/µl) zeigte eine Zellviabilität unter 4 %.

Abbildung 23 zeigt, dass die getesteten Reinstoffe Quercetin und Rutin in den jeweils höheren Konzentrationen verstärkt toxisch auf die MCF-7-Zellen wirkten. EGCG hatte in den Konzentrationen 1 µg / µl und 18 µg / µl keinen hemmenden Effekt auf die Zellen. Die kombinierte Gabe der Reinstoffe mit Endoxifen hingegen zeigte einen starken Effekt auf die Zellviabilität. Dabei wurde bei der Verwendung der höheren Konzentration von Endoxifen (6,2 µg / µl) jeweils in Kombination mit EGCG, Quercetin und Rutin eine stärkere zytotoxische Wirkung festgestellt (Restüberleben < 5 % der Zellen) im Vergleich zur Kombination mit Endoxifen 1 µg / µl (Zellviabilität < 11 %).

Auffällig zeigte sich ein maximal viabilitätshemmender Effekt bei EGCG 18 µg / µl in Kombination mit Endoxifen 6,2 µg / µl.

#### 4.4.2 MDA-MB-231-Zelllinie

Bezugnehmend auf die Ergebnisse des CytoTox-Glo™-Tests an den MCF-7-Zellen weisen die MDA-MB-231-Zellen unter gleichen Bedingungen kommensurable Testergebnisse auf.

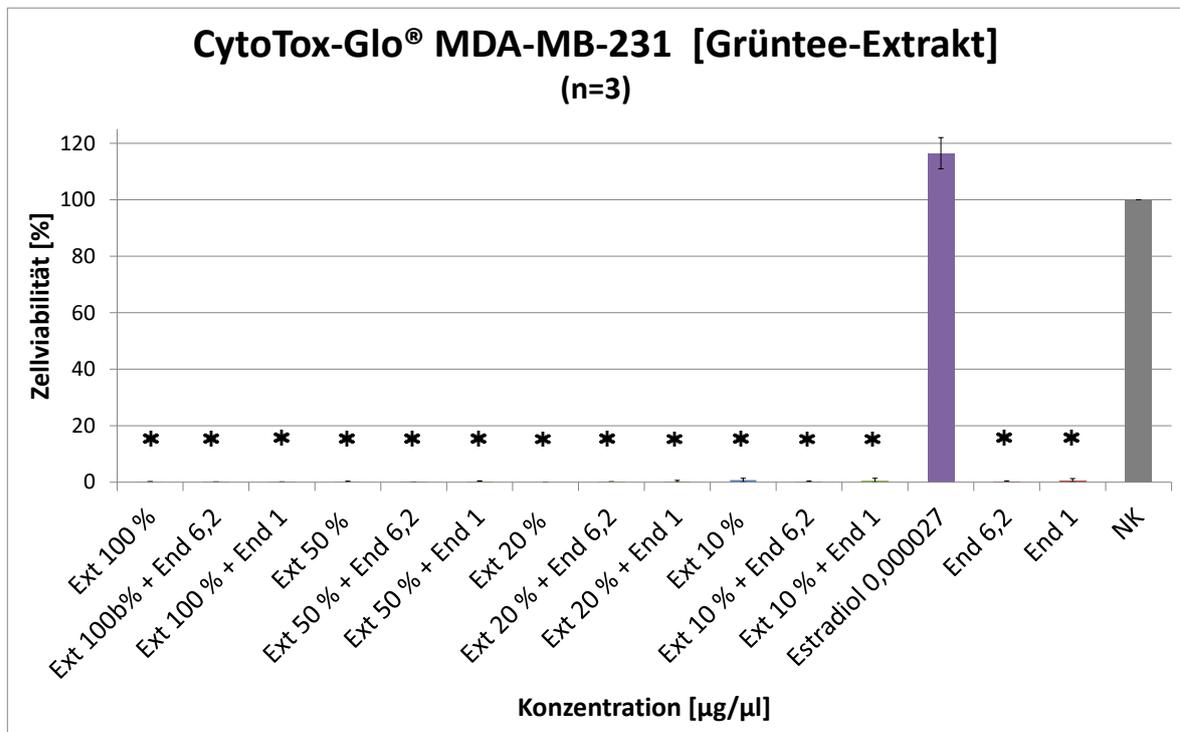


Abbildung 24: CytoTox-Glo™-Test: Darstellung der Zellviabilität [%] von MDA-MB-231 nach 24h Einwirkung des Grüntee-Extrakts und seiner Verdünnungsstufen, Estradiol und Endoxifen sowie der Kombination aus Extrakt bzw. seiner Verdünnungen mit Endoxifen bezogen auf die Negativkontrolle (NK = 100 %, bestehend aus dem jeweils angewendeten Lösungsmittel in Zellsuspension); angegeben sind die Mittelwerte aus drei Messungen sowie die Standardabweichungen und Signifikanzen (\*p < 0,05) bezogen auf die Negativkontrolle; Ext = Grüntee-Extrakt in den angegebenen Verdünnungsstufen; End = Endoxifen; NK = Negativkontrolle (Abschnitt 3.9).

In Abbildung 24 ist erkenntlich, dass der Grüntee-Extrakt, seine Verdünnungen, Endoxifen in zwei getesteten Konzentrationen und die jeweils kombinierten Ansätze signifikant zytotoxisch auf die MDA-MB-231-Zellen wirkten. Dabei überlebten weniger als 1 % der Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle nach 24-stündiger Inkubation mit den Testsubstanzen. Estradiol zeigt keinen viabilitätshemmenden Effekt.

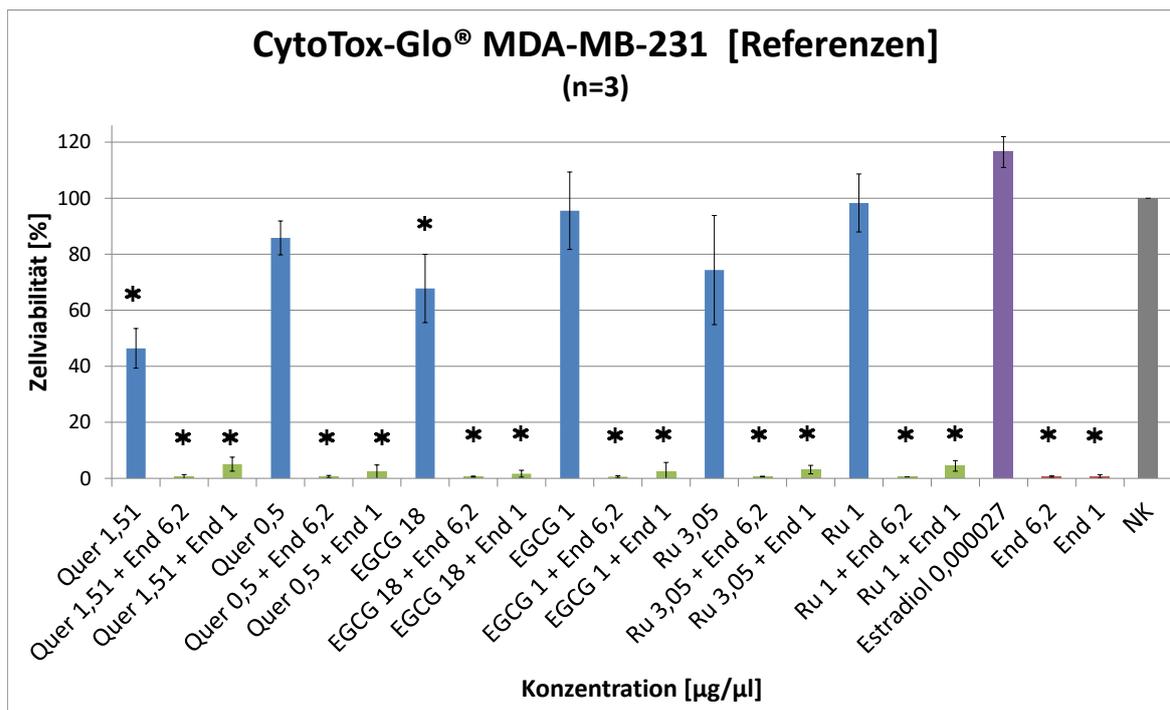


Abbildung 25: CytoTox-Glo™-Test: Darstellung der Zellviabilität [%] von MDA-MB-231 nach 24 h Einwirkung der Referenzen Quercetin, EGCG und Rutin in jeweils 2 Konzentrationen, Estradiol und Endoxifen sowie der Kombination aus Referenzen mit Endoxifen bezogen auf die Negativkontrolle (NK = 100 %); angegeben sind die Mittelwerte aus drei Messungen sowie die Standardabweichungen und Signifikanzen (\* $p < 0,05$ ) bezogen auf die Negativkontrolle; Quer = Quercetin; EGCG = Epigallocatechingallat; Ru = Rutin; End = Endoxifen; NK = Negativkontrolle (Abschnitt 3.9).

Die Flavonoide Quercetin, EGCG und Rutin hatten in den Messergebnissen des CytoTox-Glo™-Tests geringe bis gar keine zytotoxischen Effekte auf die MDA-MB-231-Zellen (Abbildung 25). Es zeigte sich jedoch, dass bei den Reinstoffen in Abhängigkeit von der Konzentration Wirkunterschiede zu verzeichnen waren. So zeigte die höhere Konzentration von Quercetin (1,51 µg / µl) im Ergebnis eine Zellreduktion um mehr als 50 % der Zellen, während diese im Vergleich bei der geringeren Quercetin-Konzentration (0,5 µg / µl) nur 15 % betrug. Auch bei EGCG und Rutin differierte die Zellviabilität korrelierend mit der Stärke der verwendeten Konzentrationen. Im Vergleich zu den MCF-7-Zellen konnte bei der Zelllinie MDA-MB-231 bei der Testung von EGCG 18 µg / µl ein gering zytotoxischer Effekt beobachtet werden (Zellviabilität 67,8 %).

Die Referenzsubstanzen jeweils kombiniert mit Endoxifen erzielten insgesamt eine sehr starke Wirkung auf die MDA-MB-231-Zellen, dabei zeigten die verschiedenen Konzentrationen hinsichtlich der Zellviabilität bei allen Messungen signifikante Werte unterhalb von 6 %. Die kombinierte Gabe mit Endoxifen 6,2 µg / µl hatte bei den Referenzen sogar jeweils einen maximalen Wirkeffekt (Zellviabilität < 1 %).

Insgesamt verzeichneten die Ergebnisse des CytoTox-Glo™-Tests einen zytotoxischen Effekt auf die verwendeten Zelllinien, v.a. bei den Messungen des Grüntee-Extrakts und seiner Verdünnungen sowie dieser Substanzen in Kombination mit Endoxifen. Die Referenzstoffe zeigten ausschließlich in der Kombination mit Endoxifen einen Wirkeffekt.

## 4.5 BrdU-Immunoassay

Um das Wachstumsverhalten der Mammakarzinomzelllinien unter dem Einfluss des Grüntee-Extrakts und der ausgewählten Flavonoide sowie Endoxifen festzustellen, wurde der BrdU-Test angewendet. Dabei erfolgte auf Zellebene der Einbau des Pyrimidin-Analogons BrdU anstelle von Thymidin in die DNA, das über einen bindenden Antikörper nachgewiesen und photometrisch erfasst wurde. Rückschließend diente die Menge der entstandenen Antikörper-Komplexe als Maß für die Mitoserate der Zellen.

In den nachfolgenden Diagrammen wird der prozentuale Anteil proliferierender Zellen dargestellt. Signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ) sind mit einem schwarzen Sternchen (\*) gekennzeichnet. Der BrdU-Immunoassay wurde unter möglichst gleichbleibenden Bedingungen pro Zellreihe jeweils dreimal durchgeführt.

### 4.5.1 MCF-7-Zelllinie

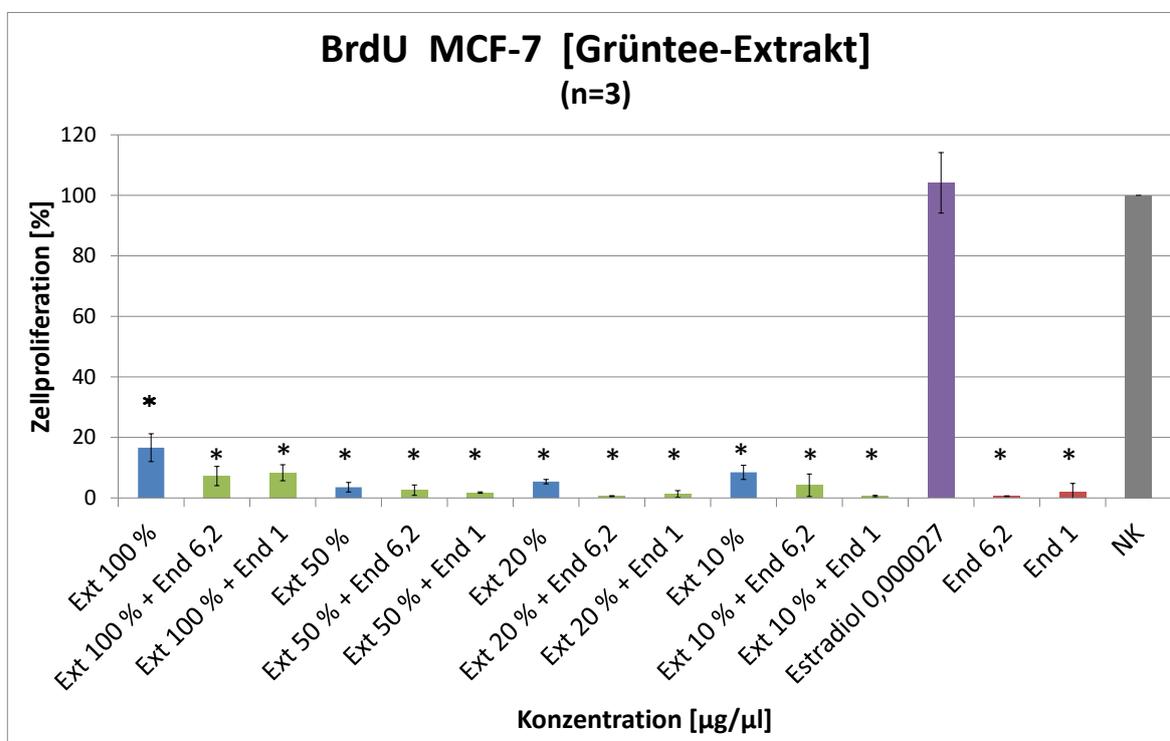


Abbildung 26: BrdU-Test: Darstellung der Zellproliferation [%] von MCF-7 nach 24 h Einwirkung des Grüntee-Extrakts und Verdünnungsstufen, Estradiol und Endoxifen sowie der Kombination aus Extrakt bzw. seiner Verdünnungen mit Endoxifen bezogen auf die Negativkontrolle (= 100 %); angegeben sind die Mittelwerte aus drei Messungen mit Standardabweichungen und Signifikanzen (\* $p < 0,05$ ) bezogen auf die Negativkontrolle; Ext = Grüntee-Extrakt in den Verdünnungsstufen; End = Endoxifen; NK = Negativkontrolle (Abschnitt 3.9).

Der Grüntee-Extrakt und die Verdünnungen zeigten signifikant stark verringerte Zellproliferationsraten im Vergleich zur Negativkontrolle. Die Ergebnisse in Abbildung 26 zeigen, dass der Grüntee-Extrakt 50 % die stärkste wachstumshemmende Wirkung hatte (Zellproliferation  $< 4$  %). Das Zellwachstum des unverdünnten Extrakts betrug knapp 17 % und verzeichnete damit einen leicht höheren Proliferationswert als seine Verdünnungen.

Endoxifen zeigte in den getesteten Konzentrationen signifikant einen maximalen Hemmeffekt auf die Zellproliferation. Estradiol steigerte im Vergleich zur Negativkontrolle das Zellwachstum gering um 4 %.

Die Kombinationen der Testsubstanzen mit Endoxifen in zwei Konzentrationen zeigten jeweils eine signifikant stärkere Reduktion der Zellproliferation als die einzelnen Substanzen. Dabei wirkten die Verdünnungen des Grüntee-Extrakts kombiniert mit Endoxifen antiproliferativer als die Kombination des 100 %-igen Extrakts mit Endoxifen.

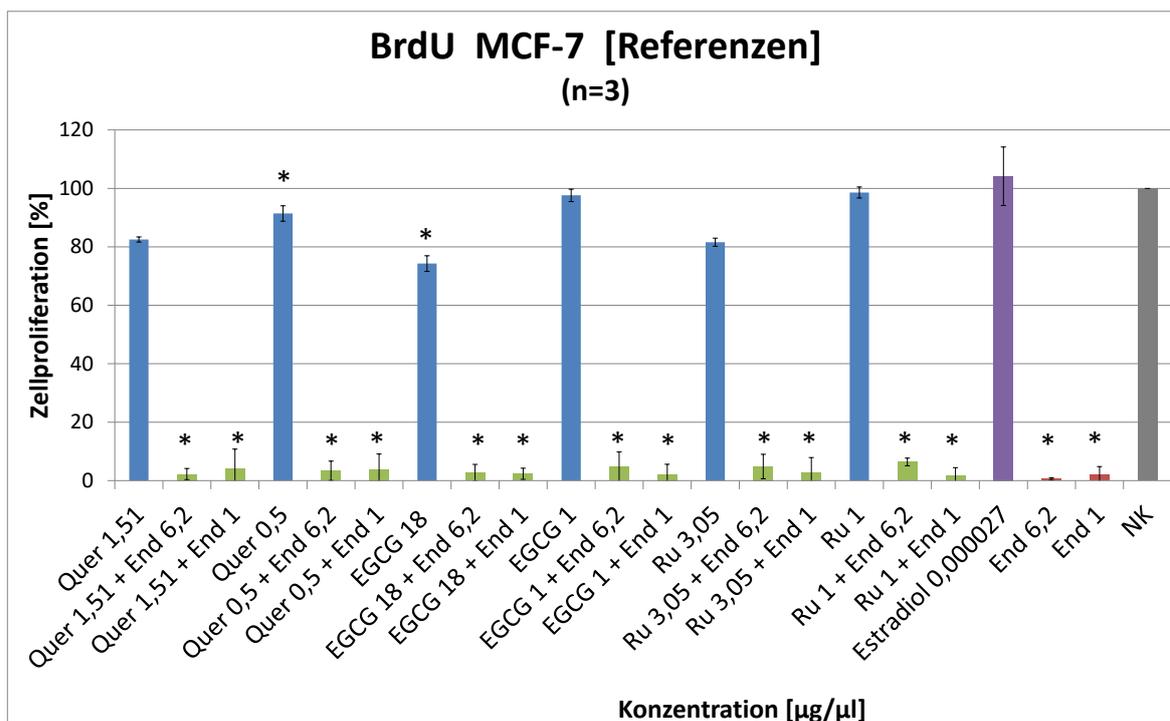


Abbildung 27: BrdU-Test: Darstellung der Zellproliferation [%] von MCF-7 nach 24 h Einwirkung der Referenzsubstanzen Quercetin, EGCG und Rutin in jeweils 2 Konzentrationen, Estradiol und Endoxifen sowie der Kombination aus Referenzen mit Endoxifen bezogen auf die Negativkontrolle (NK = 100 %, bestehend aus dem jeweils angewendeten Lösungsmittel in Zellsuspension); angegeben sind die Mittelwerte aus drei Messungen sowie die Standardabweichungen und Signifikanzen (\* $p < 0,05$ ) bezogen auf die Negativkontrolle; Quer = Quercetin; EGCG = Epigallocatechingallat; Ru = Rutin; End = Endoxifen; NK = Negativkontrolle (Abschnitt 3.9).

Bei den Referenzsubstanzen EGCG, Quercetin und Rutin zeichnete sich in den getesteten Konzentrationen eine geringe bis gar keine Wachstumshemmung der MCF-7-Zellen ab (Abbildung 27). Die Zellproliferation der höher konzentrierten Flavonoide war im Vergleich zur Negativkontrolle bei Quercetin (1,51 µg / µl) um 17 %, bei EGCG (18 µg / µl) um 26 % und bei Rutin (3,05 µg / µl) um 18 % vermindert, wohingegen in der jeweils geringeren Konzentration der Referenzen keine antiproliferative Wirkung zu erkennen war. Im Gegensatz dazu war eine starke Proliferationshemmung bei den Kombinationen der aufbereiteten Flavonoide mit Endoxifen zu beobachten, wobei die Wachstumsrate der Zellen in allen Fällen signifikant unter 7 % betrug.

#### 4.5.2 MDA-MB-231-Zelllinie

Die Ergebnisse des an der Zelllinie MDA-MB-231 durchgeführten BrdU-Immunoassays zeigten eine hohe Ähnlichkeit zu den unter gleichen Bedingungen ermittelten Messergebnissen der MCF-7-Zellen.

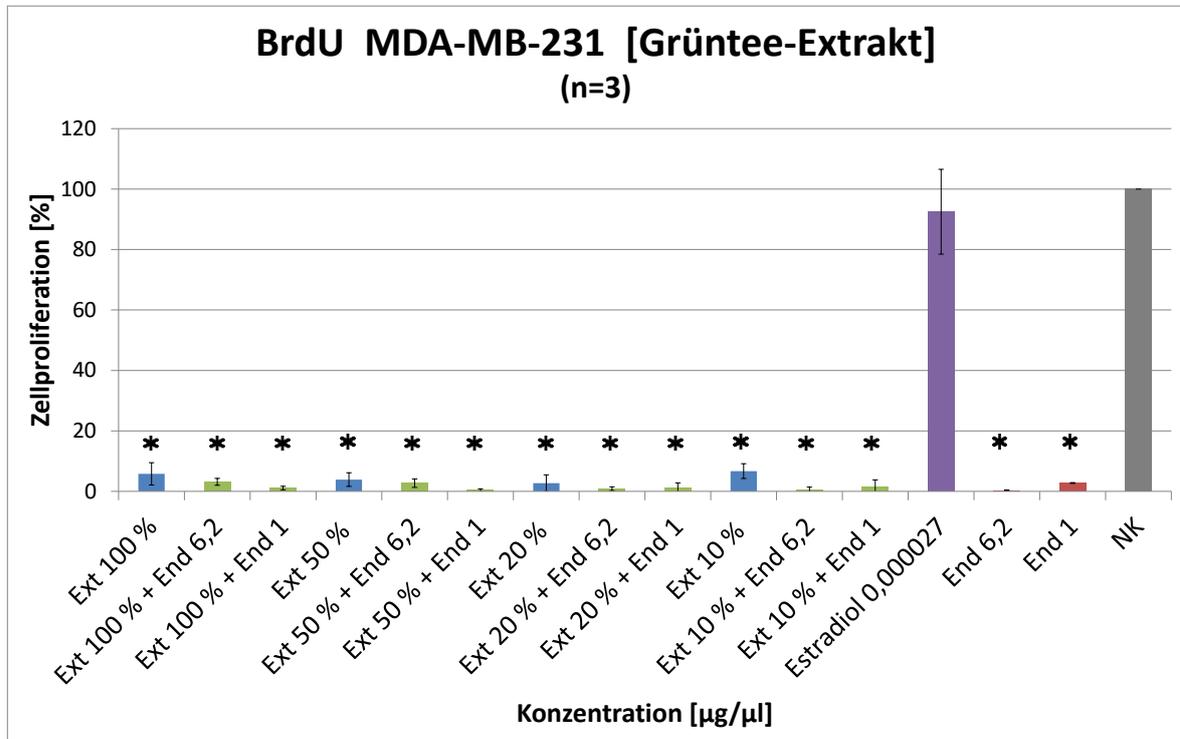


Abbildung 28: BrdU-Test: Darstellung der Zellproliferation [%] von MDA-MB-231 nach 24 h Einwirkung des Grüntee-Extrakts und seiner Verdünnungsstufen, Estradiol und Endoxifen sowie der Kombination aus Extrakt bzw. seiner Verdünnungen mit Endoxifen bezogen auf die Negativkontrolle (= 100 %, bestehend aus dem jeweils angewendeten Lösungsmittel in Zellsuspension); angegeben sind die Mittelwerte aus drei Messungen sowie die Standardabweichungen und Signifikanzen (\* $p < 0,05$ ) bezogen auf die Negativkontrolle; Ext = Grüntee-Extrakt in den angegebenen Verdünnungsstufen; End = Endoxifen; NK = Negativkontrolle (Abschnitt 3.9).

Abbildung 28 zeigt, dass der Grüntee-Extrakt und die daraus hergestellten Verdünnungen (50 %, 20 %, 10 %) in den durchgeführten BrdU-Tests eine stark antiproliferative Wirkung auf die MDA-MB-231-Zellen besaßen. Die Proliferationshemmung führte zu einer signifikanten Zellproliferation unter 7 %. Auch Endoxifen besaß einen starken wachstumsreduzierenden Effekt, der in der Konzentration 6,2  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$  sogar maximal war. Estradiol hatte keine starken Auswirkungen auf die Wachstumsrate der MDA-MB-231-Zellen. Die Messergebnisse des BrdU-Tests mit der Kombination aus Grüntee-Extrakt und seinen Verdünnungen jeweils mit Endoxifen in zwei Konzentrationen zeigten signifikant eine starke bis vollständige Hemmung der Zellproliferation (< 3 %).

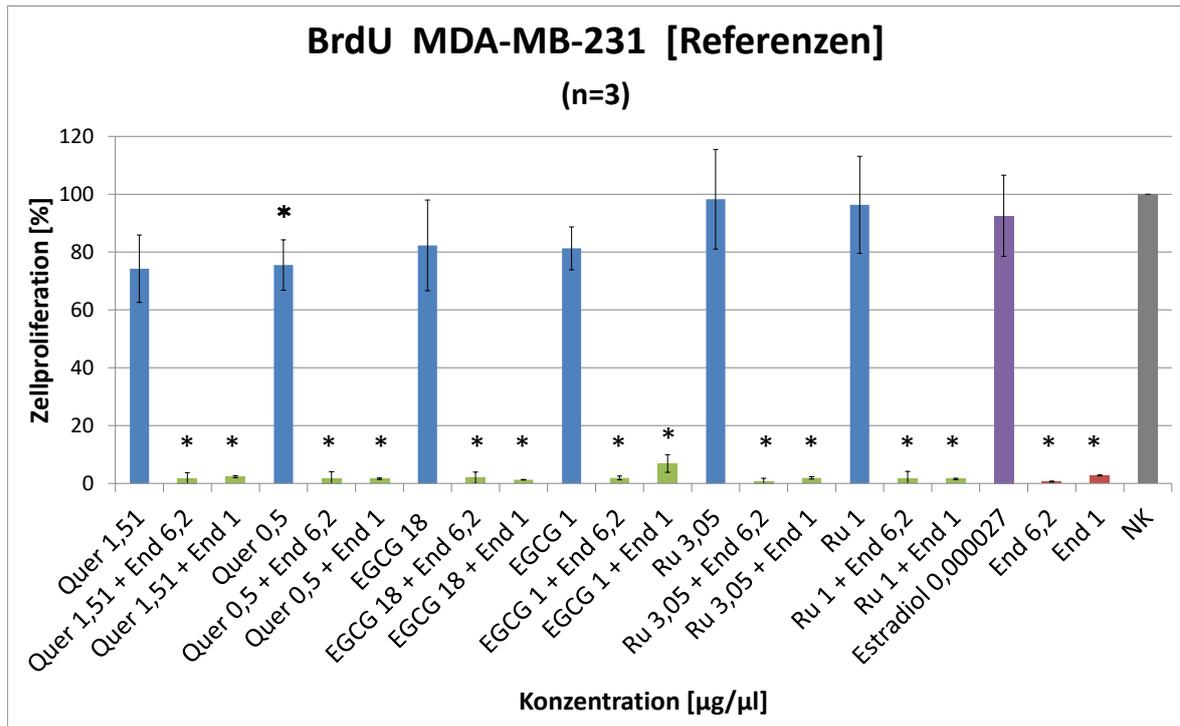


Abbildung 29: BrdU-Test: Darstellung der Zellproliferation [%] von MDA-MB-231 nach 24 h Einwirkung der Referenzsubstanzen Quercetin, EGCG und Rutin in jeweils 2 Konzentrationen, Estradiol und Endoxifen sowie der Kombination aus Referenzen mit Endoxifen bezogen auf die Negativkontrolle (NK = 100 %, bestehend aus dem jeweils angewendeten Lösungsmittel in Zellsuspension); angegeben sind die Mittelwerte aus drei Messungen sowie die Standardabweichungen und Signifikanzen (\* $p < 0,05$ ) bezogen auf die Negativkontrolle; Quer = Quercetin; EGCG = Epigallocatechingallat; Ru = Rutin; End = Endoxifen; NK = Negativkontrolle (Abschnitt 3.9).

Bei Zugabe der synthetisch hergestellten Flavonoide auf die MDA-MB-231-Zellen konnte wie bei den zuvor getesteten MCF-7-Zellen nach der Inkubationszeit nur eine geringe hemmende Wirkung auf die Zellproliferation festgestellt werden (Abbildung 29). Bei Quercetin reduzierte sich das Zellwachstum im Vergleich zur Negativkontrolle um etwa ein Viertel in beiden Konzentrationen. Auch EGCG verringerte in beiden Konzentrationen die Zellproliferation um rund 20 % gegenüber dem korrespondierenden Lösungsmittel. Rutin zeigte in beiden getesteten Konzentrationen gar keine Auswirkungen auf die Wachstumsrate der MDA-MB-231-Zellen.

Die Kombinationen der Referenzsubstanzen mit Endoxifen hatten hingegen durchweg einen signifikant starken antiproliferativen Effekt auf die Zellen. Die Werte betragen weniger als 8 % Zellwachstum im Vergleich zur Negativkontrolle. Bei der Kombination mit Endoxifen 6,2 µg / µl konnte in allen Fällen fast gar keine Zellproliferation mehr gemessen werden (< 3 %).

Insgesamt wiesen die Ergebnisse des BrdU-Tests eine antiproliferative Wirkung auf die verwendeten Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 auf, v.a. bei den Messungen des Grüntee-Extrakts und seiner Verdünnungen sowie dieser Substanzen in Kombination mit Endoxifen. Die Referenzstoffe EGCG, Quercetin und Rutin zeigten ausschließlich in der Kombination mit Endoxifen einen wachstumshemmenden Effekt auf die Zellen.

## 4.6 Stoffwechselanalyse

Um den Metabolismus der Tumorzellen (MCF-7 und MDA-MB-231) unter 24-stündiger Einwirkung des Tee-Extrakts und der Testsubstanzen beurteilen zu können, erfolgte die einmalige Bestimmung des Glukose-, Laktat- und pH-Werts im Überstand der Zellen.

In der Abbildung 30 ist ersichtlich, dass bei beiden Zellreihen in allen Messungen die extrazelluläre Glukose-Konzentration jeweils im Vergleich zum reinen Medium abfiel. Eine Ausnahme bildeten der unverdünnte Grüntee-Extrakt und seine Kombination mit Endoxifen, bei denen erhöhte Glukosewerte im Zellüberstand gemessen wurden.

Die gemessenen pH-Werte im Überstand beider Zelllinien befanden sich im leicht basischen Bereich und unterschieden sich nicht wesentlich von dem pH-Wert des reinen Mediums (Abbildung 31). Die extrazellulären Werte auf der pH-Skala lagen bei den MCF-7-Zellen im Bereich von 7,9 - 8,26 und bei MDA-MB-231-Zellen zwischen 8,1 – 8,48.

Die Laktat-Konzentration im Zellüberstand variierte stark bei den verschiedenen Testsubstanzen (Abbildung 32). In beiden Zellreihen ist zu erkennen, dass der unverdünnte Extrakt im Vergleich zum Medium (2 mmol / l) unveränderte Werte aufweist, wohingegen mit zunehmender Verdünnung des Extrakts der Laktatgehalt anstieg. Die extrazellulären Laktat-Werte im Zellüberstand nach Gabe von Estradiol sowie bei den Referenzen in Reinform waren jeweils im Vergleich zum Medium deutlich erhöht. Im Gegensatz dazu stiegen die Laktat-Konzentrationen von Endoxifen einzeln aber auch in Kombination mit den Testsubstanzen im Vergleich zum Medium jeweils nur gering an.

Die Ergebnisse der Stoffwechselanalysen werden im Folgenden graphisch dargestellt.

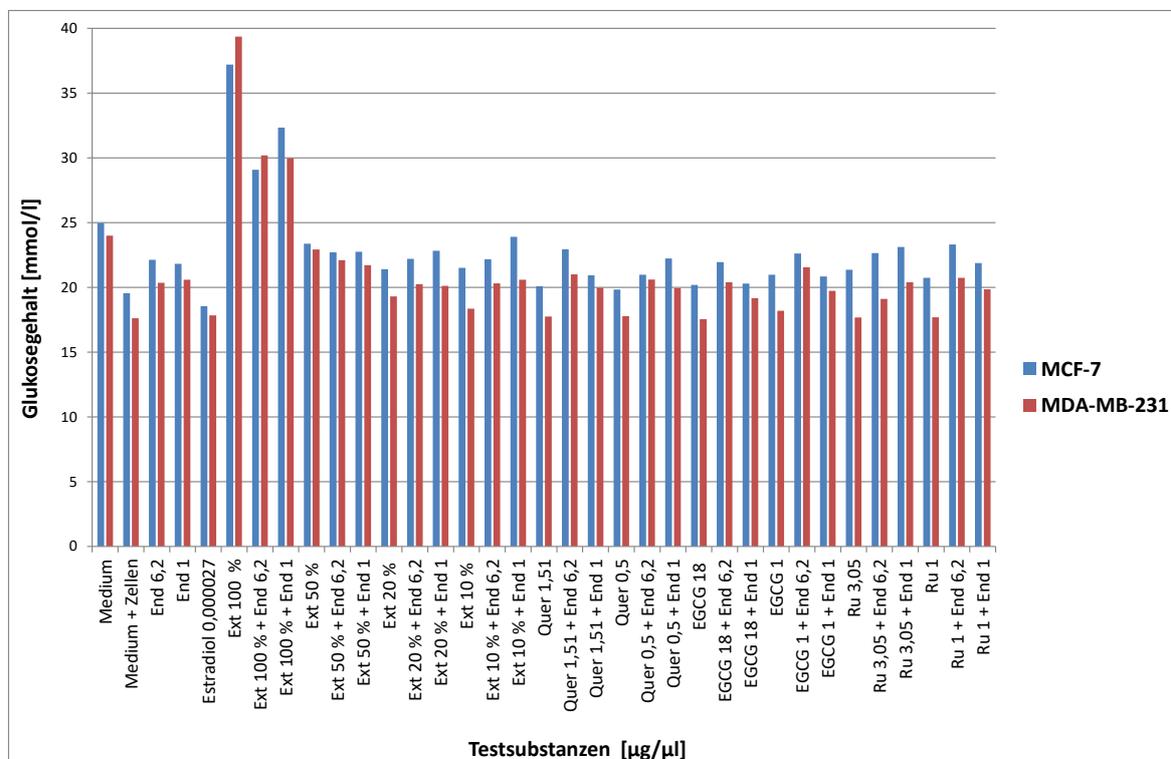


Abbildung 30: Glukosebestimmung (in mmol/l) im Überstand der MCF-7-Zellen (blau) und MDA-MB-231-Zellen (rot) nach 24 h Inkubation mit den Testsubstanzen [µg/µl]; Quer = Quercetin; EGCG = Epigallocatechingallat; Ru = Rutin; End = Endoxifen, Ext = Grüntee-Extrakt in den angegebenen Verdünnungsstufen.

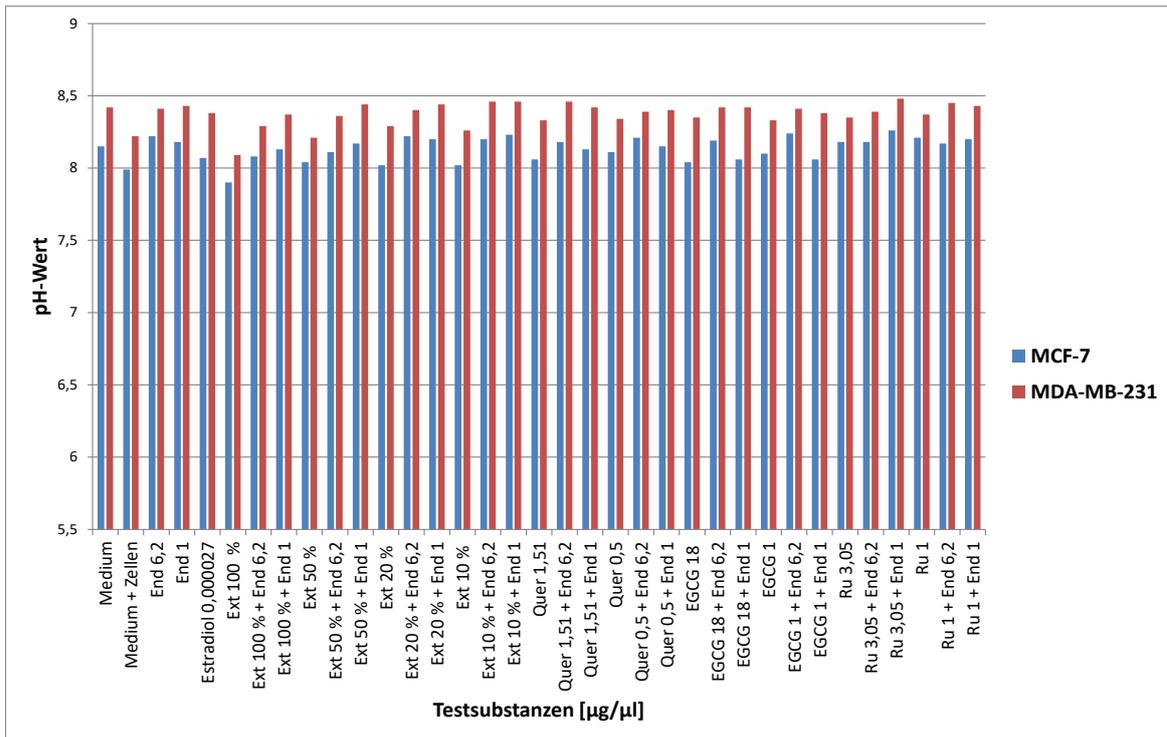


Abbildung 31: Bestimmung des pH-Werts im Überstand der MCF-7-Zellen (blau) und MDA-MB-231-Zellen (rot) nach 24 h Inkubation mit den Testsubstanzen [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]. Quer = Quercetin; EGCG = Epigallocatechingallat; Ru = Rutin; End = Endoxifen, Ext = Grüntee-Extrakt in den angegebenen Verdünnungsstufen.

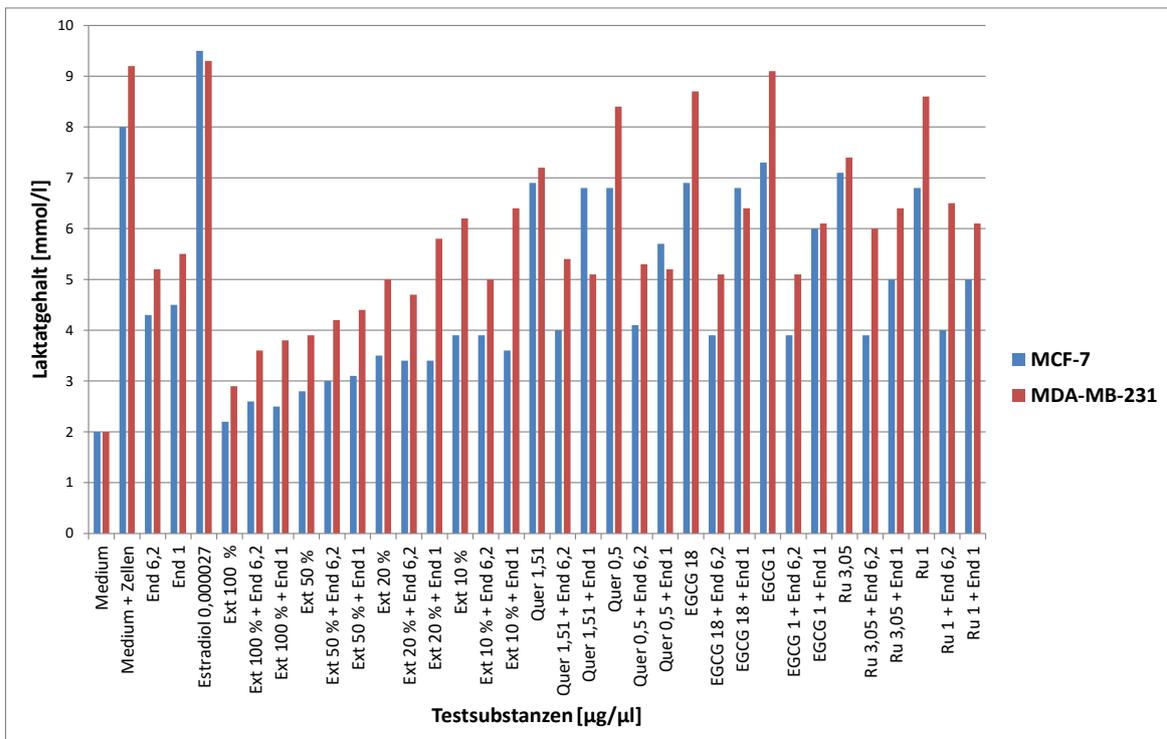


Abbildung 32: Laktat-Bestimmung [mmol/l] im Überstand der MCF-7-Zellen (blau) und MDA-MB-231-Zellen (rot) nach 24 h Inkubation mit den Testsubstanzen [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]; Quer = Quercetin; EGCG = Epigallocatechingallat; Ru = Rutin; End = Endoxifen, Ext = Grüntee-Extrakt in den angegebenen Verdünnungsstufen.

## 5 Diskussion

Im folgenden Abschnitt werden die Untersuchungsergebnisse dieser Arbeit diskutiert, mit der Fachliteratur verglichen und unter Berücksichtigung kritischer Anmerkungen bezüglich der angewandten Methoden interpretiert.

### 5.1 Diskussion der Untersuchungsergebnisse

#### 5.1.1 HPLC – Analyse

Bereits Anfang des 20. Jahrhunderts wurden Farbstoffe aus Pflanzenmaterial isoliert und Stoffgemische zum Nachweis ihrer Inhaltsstoffe aufgetrennt. Heutzutage ist die Hochleistungsflüssigkeitschromatografie als anerkanntes Analyseverfahren für die Differenzierung und Bestimmung sekundärer Pflanzenstoffe etabliert und findet im Rahmen dieser Arbeit Anwendung [59, 84, 152].

Aus Grünteeblättern der Sorte Bancha wurden die Inhaltsstoffe in 70 % - igem Ethanol gelöst, mikrowellengestützt extrahiert und mit der Umkehrphasenchromatografie qualitativ identifiziert. In diesem Grüntee-Extrakt konnten die Stoffe Epigallocatechingallat, Quercetin und Rutin mit jeweils spezifischen Durchlaufgeschwindigkeiten nachgewiesen werden. Dies gelang anhand des Vergleichs mit den zusätzlich einzeln gemessenen Retentionszeiten der entsprechenden Referenzsubstanzen, die in Form kommerziell erworbener Reinstoffe zur Verfügung standen.

Die Resultate stimmen sowohl mit den vorherigen Erwartungen, basierend auf den HPLC-Ergebnissen einer im UFK-Forschungslabor angefertigten Vorarbeit, als auch mit den verfügbaren Angaben in der Fachliteratur überein [1, 82, 113].

El-Shahawi et al. verglichen 29 zufällig ausgewählte, handelsübliche Grüntee-Proben aus verschiedenen Anbauländern miteinander und bestimmten den Gehalt an Catechinen mittels HPLC-Methode. Trotz quantitativ variierender Catechin-Zusammensetzungen der einzelnen Grünteesorten konnte EGCG durchschnittlich mit dem höchsten prozentualen Anteil nachgewiesen werden [50]. Andere durchgeführte Studien mit Grüntee-Proben bestätigten diese Ergebnisse [1, 136].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich eine qualitative Analyse des Grüntee-Extrakts durchgeführt. Das Vielstoffgemisch bot unter den gegebenen Voraussetzungen keine ausreichende Auflösung der einzelnen Peaks, um die genaue Konzentration der einzelnen Tee-Inhaltsstoffe berechnen zu können. Eine Optimierung der HPLC-Trennbedingungen könnte erreicht werden durch Beeinflussung der Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Komponenten. Diese hängt u.a. von äußeren Faktoren wie Temperatur und Art der mobilen / stationären Phase sowie daraus resultierender Löslichkeit und Wechselwirkung der zu untersuchenden Komponenten ab [59, 152].

Es werden fortlaufend schnellere und spezifischere Verfahren für den Nachweis und die Quantifizierung der Komponenten u.a. auch in Teeblättern entwickelt. Der grüne Tee weist im Vergleich zu anderen Aufbereitungsformen der Teepflanze *Camellia sinensis* einen deutlich höheren Catechin-Gehalt aufweist, woraus sein präventives und therapeutisches Potenzial erwächst [84, 136].

In der Anwendung von Tee als Heilmittel ist die genaue Prüfung der Inhaltsstoffe im Zusammenhang mit der Qualitätsstufe unerlässlich [25]. Für die Differenzierung und Klassifizierung der Hauptkomponenten des Tees wurden Konzepte geprüft, die chromatografische und spektroskopische Elemente effizient koppeln und mithilfe chemometrischer Analyse auswerten. So verglichen Yi et al. die Daten von 74 Teesorten in sieben Aufbereitungsformen hinsichtlich ihrer stofflichen Zusammensetzung und ordneten diese überschaubar in vier Kategorien ein [183]. Darauf aufbauend bestätigten Aboudafwad et al mit ihren Untersuchungen an verschiedenen Grüntees den kombinierten Einsatz von UV-spektroskopischen und chemometrischen Verfahren als geeignete Methode für eine präzise Qualitätsbeurteilung von Teeblättern [1].

Die zu Beginn dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse der HPLC-Analyse und damit der Nachweis der im Grüntee-Extrakt enthaltenen Inhaltsstoffe waren Grundlage und Voraussetzung für die experimentell durchgeführten Untersuchungen.

### **5.1.2 Immunhistochemie**

Die Charakterisierung des Rezeptorstatus durch immunhistochemische Färbung von Tumorgewebe wird für die Primärdiagnostik des Mammakarzinoms in der S3-Leitlinie empfohlen und trägt essentiell zur Entscheidung bezüglich eines geeigneten Therapieverfahrens bei. Während rezeptorpositive Brustkarzinome häufig mit einem günstigen Ansprechen auf endokrine und antikörperbasierte Therapiemöglichkeiten verbunden sind, geht eine fehlende Expression des ER-, PR- und HER2-Rezeptors einher mit eingeschränkten Behandlungsoptionen und oftmals schlechter Prognose für die Patientinnen [11, 33]. Besonders für das triple-negative Mammakarzinom besteht eine dringende Notwendigkeit, die Forschung voranzutreiben und rezeptorunabhängige Therapieansätze alternativ zur derzeit ausschließlich eingesetzten Chemotherapie zu finden [97].

Die Phytotherapie birgt Potenzial für diverse antikanzerogene Forschungsansätze. Wissenschaftliche Studien deuten darauf hin, dass Grüner Tee und seine enthaltenen Flavonoide unabhängig von einer Hormonrezeptor-Expression eine hemmende Wirkung auf Mammakarzinomzellen und die Progression von Brusttumoren zeigen [81, 168].

Für die Versuche dieser Arbeit wurden daher sowohl eine hormonrezeptorpositive Zelllinie (MCF-7) als auch eine -negative Zelllinie (MDA-MB-231) ausgewählt, um vergleichsweise die Wirkung von grünem Tee und seinen Bestandteilen zu testen. Unter Anwendung der indirekten Immunhistochemie konnte der Rezeptorstatus der Zellreihen jeweils überprüft und im Vergleich mit den Hersteller- und Literaturangaben bestätigt werden [7, 8, 113, 156].

### 5.1.3 Diskussion der Testergebnisse

In dieser Forschungsarbeit fanden verschiedene Zelltests Anwendung, um das Verhalten der Brustkrebszellen unter Einwirkung des Grüntee-Extrakts sowie der ausgewählten Testsubstanzen *in-vitro* beurteilen zu können. Dabei lag der Fokus der Untersuchungen auf Viabilität, Zytotoxizität und Proliferation der MCF-7- bzw. MDA-MB-231-Zellen. Mithilfe des CellTiter-Glo<sup>®</sup>-Tests wurde die Anzahl lebender Zellen über die Stärke eines Lumineszenz-Signals ermittelt, welches direkt proportional zu der vorhandenen ATP-Menge nach der Inkubationszeit mit den Testsubstanzen war. Der ebenfalls auf Lumineszenz basierende CytoTox-Glo<sup>™</sup>-Test visualisierte durch die Aktivitätsmessung einer Dead-Cell-Protease die Anzahl avitaler Zellen. Der BrdU-Test hingegen stellt ein kolorimetrisches Verfahren dar, in dem die Menge neu synthetisierter DNA als Maß für eine stattgefundene Zellproliferation detektiert wurde.

Insgesamt zeigten die Untersuchungsergebnisse dieser Arbeit tendenziell eine Hemmung der Zellviabilität beider Zellreihen nach Inkubation mit den Testsubstanzen. Insbesondere beim Grüntee-Extrakt und bei Endoxifen sowie bei der Kombination des Grüntee-Extrakts und ausgewählter Flavonoide (EGCG, Quercetin, Rutin) mit Endoxifen wurde ein starker zytotoxischer Effekt verzeichnet.

Nachfolgend werden die Einflüsse der Testsubstanzen auf die Brustkrebszellen im Einzelnen betrachtet und im Vergleich mit Literaturangaben diskutiert.

#### 5.1.3.1 Estradiol

Das Östrogen Estradiol besitzt eine sehr hohe Affinität zu den Rezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  und zeigt eine proliferationsfördernde Wirkung auf Mamma- und Uterusgewebe [69]. Das Hormon wurde im Rahmen dieser Arbeit bei den Zelltests als Kontrolle eingesetzt.

In der Literatur wird beschrieben, dass Estradiol einen fördernden Einfluss auf Mammakarzinomzellen und die Entstehung von Brustkrebs hat [32, 88, 186].

Die in dieser Arbeit verwendete Estradiolkonzentration zeigte diesbezüglich keine eindeutige Tendenz, es konnte in den Versuchen beider Zellreihen weder eine signifikante Steigerung der Zellviabilität noch eine induzierte Proliferation durch Estradiol auf die Zellen festgestellt werden. Grund dafür könnte eine zu gering gewählte Konzentration sein. Karam et al. stellten fest, dass das Wachstumsverhalten von MCF-7-Zellen u.a. abhängig ist von der eingesetzten Estradiol-Dosis [88]. Weiterhin hat auch die längere Einwirkzeit von Estradiol einen entscheidenden Einfluss hinsichtlich der Wirkung auf Zellen. Die molekularen Mechanismen sowie die Folgen einer langfristigen Exposition gegenüber Estradiol sind Bestandteile der laufenden Forschung [32].

### 5.1.3.2 Endoxifen

Endoxifen ist der bioaktive Metabolit des etablierten Brustkrebsmedikaments Tamoxifen [69]. Es diente in dieser Arbeit einerseits als Kontrollsubstanz und weiterhin in reduzierter Dosis als Mittel für die Kombination mit den Testsubstanzen, um eine Aussage über Wirkung und mögliche synergistische Effekte der kombinierten Stoffe (Abschnitt 5.1.3.7) tätigen zu können.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten einen stark zytotoxischen Effekt des reinen Endoxifens auf die Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MDA-MB-231. Es konnte in beiden getesteten Endoxifen-Konzentrationen sowie auch bei der Kombination aus Endoxifen mit ausgewählten Testsubstanzen unabhängig vom Rezeptorstatus eine signifikante Reduktion von Zellviabilität und -proliferation festgestellt werden.

Diese Resultate stimmen überein mit Angaben aus der Literatur, welche ebenfalls eine Hemmung des Zellwachstums durch die Gabe von Endoxifen beschreiben [116, 163]. Wu et al. stellten fest, dass Endoxifen u.a. über den Abbau von Proteinen des ER $\alpha$ -Rezeptors seine antiöstrogene Wirkung erreichte. Diese trat allerdings erst ab einer bestimmten Konzentration ( $> 1$  nmol/l) auf [179].

Im Vergleich zu Tamoxifen lassen sich bestimmte Vorteile hinsichtlich der direkten Gabe von Endoxifen erkennen. Jayaraman et al. zeigten, dass Endoxifen eine stärkere inhibierende Wirkung als Tamoxifen v.a. bei hormonempfindlichen Brustkrebszellen besaß [80]. Weiterhin gilt zu beachten, dass Tamoxifen bezüglich seiner Aktivierung dem CYP2D6-Metabolismus und damit auch dem genetischen Polymorphismus in der Bevölkerung unterliegt [179]. Im Gegensatz dazu besteht Endoxifen bereits als bioaktiver Stoff.

Die Verstoffwechslung von Tamoxifen kann ebenfalls eingeschränkt sein durch auftretende Wechselwirkungen bei gleichzeitiger Einnahme von CYP2D6-hemmenden Medikamenten. Hervorzuheben sind bestimmte Antidepressiva (z.B. SSRI wie Paroxetin und Fluoxetin), die ein großes Interaktions-Potenzial besitzen [13, 155].

Aufgrund der hohen Nebenwirkungsrate von Tamoxifen und nicht zuletzt daraus resultierender starker Compliance-Probleme bei den Patientinnen wurde pharmakologisch das Medikament *Z-Endoxifen* entwickelt und *in-vivo* getestet. Im Tierversuch stellte sich bereits heraus, dass Endoxifen unter oraler Verabreichung eine hohe Bioverfügbarkeit aufzeigt [62, 137].

Im Jahre 2017 veröffentlichten Goetz et al. im Journal of Clinical Oncology die Ergebnisse der ersten klinischen Studie mit dem Medikament *Z-Endoxifen*. Untersucht und behandelt wurden Frauen mit ER-positivem, metastasierendem Mammakarzinom, die auf eine vorherige endokrine Therapie mit Tamoxifen oder Aromatasehemmern nicht angesprochen haben. Die Studie kam zu dem vielversprechenden Ergebnis, dass der Wirkstoff *Z-Endoxifen* am Menschen konzentrationsabhängig und pharmakokinetisch günstig gegen Tumore wirksam ist, insgesamt tolerierbare Nebenwirkungen aufweist und nicht beeinflusst wird durch das Enzym CYP2D6 sowie dessen Inhibitoren [63, 83].

Bisher ausstehend sind die Daten verschiedener, teils gegenwärtig laufender Phase-I-Studien zur Charakterisierung von *Z-Endoxifen* mit genauerer Untersuchung des Sicherheitsprofils, der maximalen Verträglichkeitsdosis, der Tumoransprechrates sowie der Nebenwirkungen des Medikaments. Die Testungen werden sowohl an ER-positiven

Patientinnen mit fortgeschrittenem, metastasierendem Mammakarzinom durchgeführt als auch an Patientinnen, die sich einer OP unterziehen [29, 31].

Ebenso stehen die Ergebnisse einer randomisierten Phase II-Studie aus, die sich mit der Frage beschäftigt, ob *Z-Endoxifen* im Vergleich zu Tamoxifen bei postmenopausalen Patientinnen bezüglich des Therapieansprechens, der Überlebensrate und der Pharmakogenetik potenziell wirksamer ist [30].

Ein Nebeneffekt von Endoxifen ist eine augenscheinlich positive Auswirkung auf den Knochenstoffwechsel, der in Studien noch genauer geprüft werden muss. Von einem therapiebegleitenden Aufbau der Knochenmasse könnten besonders postmenopausale Patientinnen profitieren [60].

Insgesamt bietet das bioaktive Endoxifen ein großes Forschungspotenzial bezüglich des Einsatzes in der Hormontherapie bei Brustkrebs. Zukünftig wäre der Einsatz von Endoxifen statt Tamoxifen für spezielle Patientengruppen im Sinne einer optimierten Brustkrebsbehandlung denkbar.

### 5.1.3.3 EGCG

Das Flavonoid Epigallocatechingallat (EGCG) stellt mit bis zu 50 % den Hauptanteil der in Grüntee enthaltenen Catechine dar und besitzt den stärksten Wirkeffekt u.a. hinsichtlich antioxidativer und antikarzinogener Eigenschaften, die den Polyphenolen zugeschrieben werden [181].

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten nach 24-stündiger Inkubation mit synthetisch hergestelltem EGCG bei den Zellreihen MCF-7 und MDA-MB-231 keine starke Wirkung. In den durchgeführten Zelltests konnte entgegen den Erwartungen keine oder nur eine geringe Reduktion der Lebendzellanzahl und des Wachstums durch EGCG beobachtet werden. Dabei lag die Gesamtüberlebensrate in allen Versuchen bei weit über 50 % der Tumorzellen. Im Gegensatz dazu hatte EGCG in Kombination mit Endoxifen einen deutlich viabilitätshemmenden und antiproliferativen Effekt auf die Brustkrebszellen (Abschnitt 5.1.3.7).

In der Literatur wurde ein inhibierender Effekt von EGCG auf Viabilität und Proliferation der genannten Brustkrebszelllinien beschrieben [161, 187, 188]. Zeng et al. fanden heraus, dass der molekulare Mechanismus des EGCG u.a. intrazellulär über die Modulation regulatorischer Proteine sowie über die Blockade des Signalwegs PI3K/Akt abläuft, wodurch es über induzierte Apoptose der Tumorzellen eine antitumorale Wirkung erzielt. Die hemmenden Effekte wurden in Abhängigkeit von der eingesetzten Dosis beobachtet [188]. Zan et al. bestätigten, dass die Wachstumshemmung von MCF-7-Zellen verstärkt werden konnte bei Erhöhung der EGCG-Dosis und Einwirkdauer (> 24 h). Ebenfalls von Bedeutung war der Zeitpunkt der durchgeführten Messung nach Inkubation mit den Testsubstanzen [187]. Ein möglicher Erklärungsansatz für die Differenzen zwischen den Ergebnissen dieser Arbeit und denen in Literaturangaben könnte daher sein, dass die Inkubationszeit von EGCG nicht von ausreichender Dauer war, um eine signifikante Wirkung auf die Tumorzellen nachzuweisen. In Bezug auf rezeptornegative Brustkrebszellen stellten Li et al. bei EGCG-Gabe ein großes Potenzial hinsichtlich der Voraussetzungen für eine Hormontherapie fest. Sie wiesen nach, dass die Einwirkung von EGCG auf MDA-MB-231-Zellen über molekulare Prozesse zu einer Rekonstruktion des ER $\alpha$ -Rezeptors führte. Dieser bietet eine potenzielle Andockstelle für Antiöstrogene in der Therapie des Mammakarzinoms bei ursprünglich ER-negativen Zellen [101].

Es gibt bereits diverse *in-vivo*-Studien, die bei der Gabe von EGCG antikanzerogene Effekte (u.a. Hemmung des Wachstums von Brusttumoren im Tierversuch) darstellen, allerdings bedarf die Klärung des genauen Wirkmechanismus und beteiligter Signalwege weiterer Untersuchungen [176, 187].

Aufgrund des daraus sich abzeichnenden Potenzials in der Antitumorthherapie und sehr guter Verträglichkeit ist EGCG in den letzten Jahren in den Fokus der Forschung gerückt. Allerdings wird die Entwicklung als Therapeutikum durch die geringe Molekülstabilität und eine niedrige Bioverfügbarkeit bei oraler Aufnahme des Flavonoids beeinträchtigt. Zahlreiche wissenschaftliche Ansätze befassen sich daher mit der Herstellung von geeigneten EGCG-Analoga, u.a. in Form von Prodrugs (Abschnitt 5.3), um eine verbesserte biologische Aktivität des EGCG für den therapeutischen Einsatz zu erzielen [4, 103, 177]. Eine spezifizierte Weiterführung dieses Forschungsansatzes ist basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit und der aktuellen Datenlage zu empfehlen.

#### 5.1.3.4 Quercetin

Quercetin wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, weil es ein häufig vorkommendes, natürliches Flavonoid in Pflanzen darstellt, dem v.a. hinsichtlich chronischer Entzündungen und Tumorerkrankungen gesundheitsfördernde Wirkungen zugeschrieben werden. Von Bedeutung sind dabei besonders das antioxidative sowie das antikanzerogene Potenzial von Quercetin [115, 141].

In den Ergebnissen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass synthetisch hergestelltes Quercetin in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration eine Hemmung der Viabilität und des Wachstums der getesteten Brustkrebszelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 verursachte. In Literaturangaben finden sich übereinstimmende *in-vitro*-Ergebnisse [27, 81, 139]. Beispielsweise konnten Jia et al. in ihren Versuchen bestätigen, dass die Inhibierung der Zellen von der verwendeten Dosis und der Inkubationszeit mit Quercetin abhängig war [81].

Die genauen molekularen Wirkmechanismen von Quercetin auf Tumorzellen *in-vitro* und *in-vivo* sind noch ungeklärt. Untersuchungen ergaben, dass die Modulation diverser intrazellulärer Vorgänge eine Rolle spielt, u.a. die Hemmung des PI3K/Akt-Signalweges. Dieser reguliert das Zellwachstum und führt bei gestörten Abläufen zur Apoptose der Zelle [19, 81, 139].

In den letzten Jahren wurde die Forschung an und mit Phytotherapeutika intensiviert. Bei der Entwicklung diverser Quercetin-Analoga konnte für einen möglichen Einsatz in der Krebstherapie festgestellt werden, dass die biologische Aktivität von Quercetin modifizierbar ist und maßgeblich von der chemischen Struktur des Moleküls abhängt. Massi et al. erstellten eine Übersicht mit den aussichtsreichsten Modifikationen der Quercetin-Struktur für eine optimierte antikanzerogene Therapie [115].

### 5.1.3.5 Rutin

Das Flavonoid Rutin stellt ein Glykosid des Quercetin dar, das in zahlreichen Pflanzen vorkommt und aufgrund antioxidativer sowie protektiver Eigenschaften ein therapeutisches Potenzial besonders in der Krebstherapie besitzt [55, 122].

Rutin konnte in dem für diese Forschungsarbeit hergestellten Extrakt als Bestandteil des Grünen Tees nachgewiesen werden. Getestet wurde es zusätzlich als kommerziell erworbene Reinsubstanz im Rahmen der Zellversuche. Dabei zeigte Rutin eine ähnliche dosisabhängige Wirkung wie Quercetin. Besonders in der höheren Konzentration hatte Rutin einen zytotoxischen und antiproliferativen Effekt auf Brustkrebszellen. Diese Ergebnisse konnten in Literaturangaben bestätigt werden [49, 67, 144].

Für Rutin liegen bisher insgesamt nur begrenzte Daten vor. Ganeshpurkar et al. fassten verschiedene experimentelle Untersuchungen hinsichtlich des antikanzerogenen Potenzials von Rutin in einer Übersicht zusammen [55]. Weitere *in-vivo*-Versuche bestätigten, dass Rutin die Proliferation von Tumorzellen hemmt [12, 122, 144]. Insgesamt bietet das Flavonoid Rutin einen vielversprechenden Ansatz in der Krebstherapie und bedarf in Zukunft weiterer Forschung.

### 5.1.3.6 Grüner Tee

Grüner Tee hat seinen Ursprung im Süden Chinas und wird Überlieferungen zufolge dort bereits seit dem 3. Jahrtausend v. Chr. kultiviert [84]. Tee wurde anfangs als Heilmittel eingesetzt und etablierte sich im Laufe der Zeit als Genussmittel und zentraler Kulturbestandteil [42]. Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurde die Teesorte Bancha ausgewählt, welche in Japan als Alltagsstee konsumiert wird [41].

Die Ergebnisse dieser Forschungsarbeit zeigten ein deutliches Potenzial von Grüntee-Extrakt hinsichtlich einer therapeutischen Anwendung aufgrund einer stark zytotoxischen und antiproliferativen Wirkung auf zwei Brustkrebszelllinien (MCF-7 und MDA-MB-231) unabhängig von dem Hormonrezeptorstatus der Zellen. Dies konnte auch mit Daten aus der Literatur bestätigt werden [105, 113].

Auffällig stellte sich in den vorliegenden Ergebnissen eine deutlich stärker hemmende Wirkung des Grüntee-Extrakts im Vergleich zu den einzeln getesteten Flavonoiden auf die Zellen dar. Eine mögliche Erklärung dafür bieten Kale et al., die feststellten, dass die kombinierte Verabreichung mehrerer Flavonoide eine stärkere Wirksamkeit zeigt als die ausschließliche Substitution einzelner Flavonoide [86]. Wang et al. beobachteten unabhängig davon ebenfalls bei der kombinierten Gabe von EGCG und Quercetin eine höhere Bioverfügbarkeit der Stoffe mit einer im Resultat stärkeren Tumorchemmung [173].

Flavonoide sind wichtige Inhaltsstoffe des Grünen Tees und stehen mit zahlreichen vielversprechenden Wirkungen im Fokus der Forschung.

In der Literatur sind Beschreibungen zu finden bezüglich der Beeinflussung neuronaler Prozesse durch Flavonoide, die u.a. über eine enzymbedingte Reduktion von oxidativem Stress sowie die Anregung der Neurogenese zu Verbesserungen von Alzheimer-Demenz, Morbus Parkinson und altersbedingten kognitiven Störungen führen [110, 141, 170].

Weiterhin zeigen Studien günstige Effekte der Flavonoide in Bezug auf kardiovaskuläre Risikofaktoren und Herz-Kreislauf-Erkrankungen (CVD), besonders auf die arterielle Hypertonie und Atherosklerose. Dabei spielen antioxidative, vasodilatatorische sowie anti-entzündliche Wirkungsmechanismen der Flavonoide eine Rolle [21, 94, 112, 117, 166]. Peterson et al. fassten die wichtigsten prospektiven Studien im Zeitraum von 1993 bis 2008 zusammen, die eine Korrelation zwischen Flavonoidzufuhr und Inzidenz bzw. Mortalität von kardiovaskulären Erkrankungen bei europäischen sowie amerikanischen Erwachsenen untersucht haben [128]. Lai et al. registrierten in einer britischen Kohortenstudie mit mehr als 30.000 teilnehmenden Frauen unter polyphenolreichem Obstkonsum und jahrelanger Beobachtungszeit ein verringertes CVD-Risiko [98]. Darüber hinaus wurden förderliche Wirkungen der Flavonoide an Skelettmuskel, Fettgewebe, Leber, Nieren und Pankreas sowie im Immunsystem beschrieben [121].

Es gibt allerdings auch kontroverse Ergebnisse in Bezug auf die Wirkung der Tee-Flavonoide in der Brustkrebstherapie. Eine verminderte Wirkung der Flavonoide in einigen Studien erklärten Xiang et al. mit einer geringen Bioverfügbarkeit *in-vivo* [180]. Der Einsatz der Flavonoide als Therapeutika wird durch den schnellen Metabolismus erschwert. Um die Bioverfügbarkeit der Tee-Inhaltsstoffe im menschlichen Körper auch bei synthetischer Herstellung adäquat gewährleisten zu können, bedarf es der genauen Betrachtung des Metabolismus nach oraler Aufnahme der Flavonoide. In Abhängigkeit von der Molekularstruktur und Nahrungszusammensetzung, aber auch von Faktoren wie Alter, Geschlecht und Genotyp werden stoffwechselaktive Proteine aktiviert [20]. Hydrolytische Enzyme, die im Speichel und Gastrointestinaltrakt vorliegen, spalten die Flavonoide und ermöglichen die Resorption an den Enterozyten. Im weiteren Schritt durchlaufen die Flavonoide im Darmepithel und in der Leber einen Phase-II-Metabolismus mit Umwandlung in verschiedene glucuronidierte, sulfatierte und methylierte Stoffwechselprodukte, welche anschließend in den systemischen Kreislauf eingespeist werden [34, 121, 141]. Hinsichtlich der Flavonoid-Resorption im menschlichen Verdauungstrakt ist der mikrobielle Stoffwechsel im Kolon hervorzuheben. Bei der bakteriell bedingten Biokonversion entstehen durch Ringspaltung kleine Flavonoid-Metabolite, die im Plasma eine besonders hohe Bioverfügbarkeit und längere Halbwertszeiten aufweisen [121, 169]. Anknüpfend an diese Erkenntnisse bedarf es weiterer Forschung, um perspektivisch für den medizinischen Einsatz eine verbesserte Geweberesorption, Bioverfügbarkeit sowie Wirksamkeit von aufgenommenen Flavonoiden und ihren Analoga im menschlichen Organismus zu erreichen [162].

### 5.1.3.7 Diskussion über kumulative Effekte

Ein Teil dieser Arbeit bestand darin, die Wirkung des Grüntee-Extrakts und ausgewählter Inhaltsstoffe (EGCG, Quercetin und Rutin) in der Kombination mit Endoxifen zu testen. Dabei wurden die Zellen bei der kombinierten Gabe nur mit der halbierten Dosis der Testsubstanzen konfrontiert im Vergleich zu den einzeln getesteten Stoffen. Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigten, dass durch die Kombinationen sehr starke Wirkeffekte auf die Brustkrebszellen mit maximaler Reduzierung der Lebendzellanzahl erzeugt wurden. Es stellte sich daher die Frage, ob bei der gleichzeitigen Gabe von Endoxifen und grünem Tee bzw. Flavonoiden eine kumulative Wirkung auftritt.

Eine genaue Differenzierung, ob die Wirkung auf die Zellen durch synergistische Wirkeffekte zustande kam oder allein auf eine toxische Konzentration von Endoxifen zurückzuführen war, konnte anhand der gewählten Konzentration nicht endgültig vorgenommen werden. Endoxifen zeigte in den einzeln getesteten Konzentrationen (1 µg/µl; 6,2 µg/µl) ebenfalls eine starke Hemmung der Zellviabilität und Proliferation. Eine höhere Aussagekraft über kumulative Effekte könnte erreicht werden, indem weitere Versuche besonders in geringeren Konzentrationsbereichen und variierender Dosierung der Testsubstanzen durchführt werden.

In der Literatur finden sich unterschiedliche Studien, in denen die therapeutische Wirkung von Grüntee bzw. Flavonoiden in Ergänzung zu herkömmlichen Medikamenten in der Krebstherapie gezeigt wurden. Xing et al. erstellten dementsprechend eine Übersicht mit den wissenschaftlichen Ansätzen der letzten Jahre [181].

Im Forschungsrahmen der Brustkrebstherapie wurde besonders das Flavonoid EGCG in Kombination mit Tamoxifen wiederholt an humanen Zelllinien getestet. Dabei konnte in Abhängigkeit von der verwendeten Dosis der Testsubstanzen eine synergistische Wirkung festgestellt werden [54, 143, 145].

Grüner Tee gilt in ergänzender Anwendung zur Schulmedizin als aussichtsreiches Mittel in der Krebstherapie [54, 102, 181]. Fujiki et al. fassten erfolgsversprechende Ergebnisse verschiedener Studien zusammen und unterstrichen das antikanzerogene Potenzial von Grüntee sowohl in der Kombination mit dem SERM Tamoxifen als auch mit anderen etablierten Medikamenten, v.a. Zytostatika und NSAIDs [54].

Diese Arbeit stellt eine Pilotstudie dar und deutet auf eine mögliche kumulative Wirkung zwischen Endoxifen, als aktivem Metabolit des Tamoxifen, und Grüntee-Extrakt hin. Die Effekte konnten in dieser Arbeit und in anderen Studien ebenfalls bei ER-negativen Brustkrebszellen festgestellt werden und bieten daher mögliche Ansatzpunkte in der besonders schwierigen Therapie des triple-negativen Mammakarzinoms.

Genauere Erkenntnisse und das Verständnis des molekularen Wirkmechanismus erfordern weitere Forschung. Perspektivisch könnte der Einsatz einer geringeren Dosis von Tamoxifen bzw. Endoxifen zu einer Reduktion von begleitenden Nebenwirkungen führen. Für die Patientinnen ergäbe sich durch die ergänzende Gabe von grünem Tee eine gesteigerte Lebensqualität unter Bewahrung des therapeutischen Effekts.

#### 5.1.4 Stoffwechselanalyse

Zur ergänzenden Beurteilung der Vitalität der behandelten Zellen wurden der pH-Wert sowie der Glukose- und Laktatgehalt in den Zellüberständen nach Inkubation mit den Testsubstanzen bestimmt.

Tumorzellen haben wegen ihres beschleunigten Wachstums einen gesteigerten Energiebedarf, der in Form anaerober Glykolyse gedeckt wird. Auch veränderte Umgebungsbedingungen von Zellen bzw. progressiver Zelltod verursachen Störungen oxidativer Prozesse und resultieren in anaerober Glykolyse. Durch instabile Plasmamembranen werden u.a. Laktat freigesetzt und der Extrazellularraum angesäuert [66, 69].

Aus den Ergebnissen der Stoffwechselanalyse in dieser Arbeit war ersichtlich, dass im Vergleich zum reinen Medium der Glucose-Gehalt im Überstand beider Zelllinien sowohl bei den Tumorzellen als auch unter zusätzlicher Einwirkung der Testsubstanzen gleichermaßen gesenkt war. Dabei konnte nicht differenziert werden, ob und inwiefern die Testsubstanzen den Metabolismus der Tumorzellen beeinflussten. Allerdings ist laut Kallio et al. davon auszugehen, dass bereits unter Einsatz geringer Tamoxifen-Mengen sowohl MCF-7- als auch MDA-MB-231-Zellen nach kurzer Einwirkzeit absterben und somit der toxische Einfluss der in dieser Arbeit verwendeten Testsubstanzen eine veränderte Stoffwechsellage und den anschließenden Zelltod bedingte [87].

Die gemessenen Laktat-Konzentrationen nach Inkubation mit den Testsubstanzen zeigten bei beiden Zelllinien im Vergleich zum Medium größtenteils erhöhte Werte. Erklärt werden könnte dies nach Zugabe der Testsubstanzen einerseits durch zytotoxische Effekte, die zu einer Schädigung der Zellmembran und resultierender Laktat-Freisetzung in den extrazellulären Raum führten. Die stark erhöhten Laktat-Werte im Zellüberstand nach Gabe von Estradiol bzw. bei den Tumorzellen im reinen Medium hingegen könnten aus einer stattfindenden Zellproliferation resultieren, die einhergeht mit anaerober Glykolyse [66, 69, 77].

Auf Grundlage der oben genannten Überlegungen bezüglich der Laktat-Anreicherung durch verstärkte anaerobe Glykolyse konnte im Vorfeld eine leichte Ansäuerung der Zellüberstände nach Inkubation mit den Testsubstanzen im Vergleich zum pH-Wert des reinen Mediums vermutet werden. Dieses galt ebenfalls für proliferierende Tumorzellen in reinem Medium [77]. Wider Erwarten befanden sich die gemessenen pH-Werte im Rahmen der Untersuchungen dieser Arbeit im basischen Bereich. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die einmalige Messung des pH-Werts nur eine Momentaufnahme darstellt und sich bei mehrfach durchgeführten Messungen in gewissen zeitlichen Abständen ggf. eine Tendenz der extrazellulären pH-Werte in den sauren Bereich abgezeichnet hätte.

Innerhalb der Testsubstanzen fielen die Stoffwechselfparameter des unverdünnten Grüntee-Extrakts auf. Im Vergleich zum reinen Medium waren die extrazelluläre Glukose-Konzentration erhöht und die Laktat- und pH-Werte unverändert. Das könnte darauf hinweisen, dass der 100 %-ige Extrakt keine so starke Wirkung auf die Zellen entfaltet wie seine Verdünnungen (Abschnitt 5.2). Dies würde mit den sich ebenfalls abhebenden Ergebnissen für den unverdünnten Grüntee-Extrakt bei den anderen Zelltests übereinstimmen und bedarf genauerer Klärung durch weitere Forschung.

## 6 Methodenkritik

Für diese Arbeit wurde die Teesorte Bancha verwendet, welche besonders im ostasiatischen Raum als Alltagstee getrunken wird und repräsentativ für einen häufig konsumierten Grüntee steht [41].

Bereits die Auswahl der Teesorte sollte für Forschungszwecke und perspektivisch für den therapeutischen Einsatz bezüglich des Wirkungspotenzials beachtet werden, weil unterschiedliche Anbau- und Herstellungsmethoden sowie Lagerungsbedingungen zu einer unterschiedlichen Qualität und Zusammensetzung des grünen Tees führen [3].

Der in dieser Forschungsarbeit verwendete Grüntee-Extrakt wurde durch ein mikrowellenbasiertes Extraktionsverfahren hergestellt. Beim Nachweis der Inhaltsstoffe mittels HPLC war unter gegebenen Voraussetzungen nur eine qualitative Analyse möglich. Dadurch konnte keine Aussage über die genaue Menge der Catechine im Grüntee-Extrakt getroffen werden. Für weitere Forschungsansätze von grünem Tee sollte beachtet werden, dass die Quantifizierung der Tee-Inhaltsstoffe essentiell für den Vergleich mit Konzentrationswerten aus Literaturangaben ist und in Bezug auf den klinischen Nutzen für die Einordnung in therapeutische Bereiche benötigt wird.

Die im Rahmen dieser Arbeit genutzten Zelltests stellen etablierte Verfahren dar. Für differenziertere Testergebnisse müssten eine größere Versuchsanzahl sowie eine Anpassung der Substanzkonzentrationen erfolgen. Eine Möglichkeit wäre das Testen des Grüntee-Extrakts zusätzlich in den Verdünnungsstufen 5 %, 2,5 %, 1 % und 0,5 %, um ein Dosis-Wirkungs-Profil erstellen zu können.

Unter Betrachtung der Ergebnisse der durchgeführten Zelltests ist anzunehmen, dass der 100 %-ige Extrakt keine Wirkung auf die Zellen hatte. Besonders fiel dies im Vergleich zu den verdünnten Lösungen (50 %, 20 %, 10 %) des Grüntee-Extrakts auf, welche in der Gesamtbetrachtung der Versuche eine stärkere zellhemmende und antiproliferative Wirkung entfalteten. Eine mögliche Erklärung dafür wäre ggf. das Vorhandensein zu großer Teeblatt-Bestandteile, welche an den Zellen keine Wirkung entfalten können. Auf eine ausreichende Lösung der Tee-Inhaltsstoffe sollte durch ein präzises und sorgfältiges Vorgehen bei der Extraktherstellung geachtet werden.

## 7 Ausblick

Der Grüne Tee und die enthaltenen Flavonoide EGCG, Quercetin und Rutin weisen vielfache Wirkungen und ein großes Potenzial bezüglich des präventiven als auch des supplementären Einsatzes in der Krebsbehandlung auf. Xiang et al. erstellten eine Übersicht mit epidemiologischen Nachweisen, dass ein regelmäßiger Teekonsum im Zusammenhang mit einem verringerten Brustkrebsrisiko steht [180].

In einer Tasse Grüntee sind normalerweise etwa 100 bis 200 mg Polyphenole enthalten [91]. Die Teepflanze *Camellia sinensis* wird bereits in Form eines Teegetränks bzw. als festes Kräuterpräparat zur oralen Aufnahme von der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) als pflanzliches Arzneimittel anerkannt. Dabei sollten aufgrund des Koffein-Gehalts nicht mehr als fünf Tassen Grüner Tee pro Tag getrunken werden [71, 72]. Die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) prüfte in einem wissenschaftlichen Gutachten die klinische Sicherheit der in Grüntee vorhandenen Catechine, u.a. bezüglich eines toxischen Einflusses auf die Leber. Das Risiko für das Auftreten unerwünschter Nebenwirkungen beim Konsum von Grüntee konnte als niedrig eingestuft werden [184]. Darauf aufbauend ist es in Zukunft dringend erforderlich, weitere Erkenntnisse bezüglich der Inhaltsstoffe und des Nebenwirkungsprofils von Grünem Tee für eine sichere therapeutische Anwendung zu gewinnen.

Aufgrund der breiten biologischen Aktivität bieten Flavonoide ein großes Potenzial in der Vorbeugung von Atherosklerose und klinisch resultierender Krankheiten wie u.a. Myokardinfarkt und Apoplex [112, 117, 166]. Auch in der Prävention und Behandlung von Krebserkrankungen könnten Flavonoide zukünftig in Ergänzung zur Schulmedizin von Nutzen sein. In verschiedenen Studien wurde die Wirkung auf molekularer Ebene u.a. durch Abbruch des Zellzyklus, Förderung der Apoptose, Reduktion oxidativer Prozesse sowie durch Hemmung der Proliferation von Krebszellen festgestellt [23, 73, 94, 138]. Die entsprechenden Signalwege sollten zukünftig für ein besseres Verständnis der Wirkmechanismen und der Einflussfaktoren näher untersucht werden.

Das Mammakarzinom tritt häufig auf und ist derzeit besonders bei negativem Hormonrezeptorstatus schwer zu bekämpfen. Bei annähernd drei von zehn Frauen beträgt das Alter bei Erstdiagnose der Krankheit unter 55 Jahren [189, 190]. Es gibt verschiedene Ansätze, um die Therapie für die Patientinnen möglichst optimal und individuell zugeschnitten zu gestalten. Seit September 2019 läuft die randomisierte klinische Studie TAMENDOX, bei der u.a. ergänzend zur standardmäßigen Tamoxifen-Therapie eine Zugabe von niedrigdosiertem Z-Endoxifen bei Patientinnen mit eingeschränkter CYP2D6-Aktivität erfolgt. Supplementiert wird individuell angepasst nur die fehlende Menge an Endoxifen, die bis zum Erreichen einer wirksamen Konzentration im Blut notwendig ist. [57, 160].

Komplementärmedizinische Ansätze in der Tumorthherapie könnten zu einer reduzierten Nebenwirkungsrate beitragen. Die kombinierte Anwendung von Phytotherapeutika mit Endoxifen zeigte in dieser Forschungsarbeit sowie in anderen Studien erfolgsversprechende Ergebnisse [113, 145]. Allerdings erweist sich die synthetische Herstellung von Flavonoiden mit einer beständigen Stabilität als komplex. Geeignet für die Anwendung als bioaktive Substanzen wären u.a. methylierte Flavonoid-Derivate [177]. Auch Prodrugs scheinen eine verbesserte Bioverfügbarkeit aufzuweisen [4, 84, 103].

Zukünftig sollten diese Forschungsansätze sowie mögliche kumulative Effekte bei ergänzender Anwendung zur Schulmedizin *in-vitro* und *in-vivo* weiterhin verfolgt werden.

## 8 Zusammenfassung

Die Wissenschaft befasst sich im Rahmen einer angestrebten Optimierung der Krebsbehandlung zunehmend sowohl mit den präventiven als auch mit den therapeutischen Möglichkeiten von Phytotherapeutika. In dieser Forschungsarbeit soll überprüft werden, ob sich Grüner Tee und seine Bestandteile perspektivisch für den ergänzenden Einsatz in der Brustkrebstherapie eignen. Dafür wurden die vielfältigen und besonders die antikanzerogenen Wirkungen von grünem Tee sowie seiner Inhaltsstoffe EGCG, Quercetin und Rutin dargestellt und an estrogenrezeptor-positiven und -negativen Brustkrebszellen (MCF-7 und MDA-MB-231) *in-vitro* mithilfe verschiedener Methoden getestet. Die Untersuchungen fanden ebenfalls im Vergleich und in Kombination mit dosisreduziertem Endoxifen statt, dem bioaktiven Metaboliten des etablierten Brustkrebsmedikaments Tamoxifen. Dabei stellte sich die Frage nach einem potenziell synergistischen Wirkeffekt.

Im Rahmen der experimentellen Untersuchungen dieser Arbeit wurde handelsüblicher Bancha-Tee in 70 %-igem Ethanol gelöst und mittels mikrowellenbasierter Extraktion aufbereitet. In der anschließenden HPLC-Analyse erfolgte der Nachweis der Inhaltsstoffe EGCG, Quercetin und Rutin in dem gewonnenen Grüntee-Extrakt. Mithilfe einer immunhistochemischen Charakterisierung wurde der Rezeptorstatus der verwendeten Zelllinien überprüft. Dabei bestätigte sich, dass die MCF-7-Zellen den Estrogen- und Progesteronrezeptor exprimieren, während MDA-MB-231-Zellen sich als hormonrezeptor-negativ erwiesen. Die anschließend durchgeführten Zelltests basierten auf der Messung der Zellviabilität anhand des ATP-Gehalts, der Bestimmung der Zytotoxizität durch Detektion einer Dead-Cell-Protease-Aktivität sowie der Ermittlung der Zellproliferation mithilfe eines BrdU-Tests nach 24-stündiger Inkubation mit den Testsubstanzen. Die Ergebnisse zeigten bei Gabe der einzelnen Testsubstanzen auf die Zellen größtenteils hemmende Effekte, die konzentrationsabhängig auftraten. Eine starke zytotoxische und antiproliferative Wirkung zeigten jeweils der Grüntee-Extrakt und Endoxifen, wohingegen die getesteten Flavonoide EGCG, Quercetin und Rutin als Reinsubstanzen eine eher geringe bis gar keine Wirkung hatten. Dies entsprach Angaben aus der Literatur und bestätigte Beobachtungen, die einen stärkeren Wirkeffekt von Flavonoiden in kombinierter Verabreichung feststellten. Die genauen molekularen Mechanismen sind noch nicht geklärt und bedürfen weiterer Forschung.

In der Kombination mit Endoxifen zeigten alle Testsubstanzen eine starke viabilitäts- und proliferationshemmende Wirkung auf die Brustkrebszellen. Dabei konnte unter den gegebenen Bedingungen nicht differenziert werden, ob es sich um kumulative Effekte handelte oder ob die Wirkung allein von Endoxifen ausging.

Im Vergleich der beiden Zellreihen wurden nahezu keine Unterschiede in der Wirkung der Testsubstanzen festgestellt. Daraus kann abgeleitet werden, dass der Wirkmechanismus von Grüntee und der Flavonoide u.a. über ER-unabhängige Signalwege erfolgt, was v.a. für Therapieansätze des triple-negativen Mammakarzinoms von großem Interesse ist.

Zusammenfassend ist unter Berücksichtigung der Erkenntnisse dieser Arbeit und der vielversprechenden Studienlage zu empfehlen, die Forschung an grünem Tee und seinen Inhaltsstoffen *in-vitro* und *in-vivo* fortzusetzen. Besonders der ergänzende Einsatz von Grüntee in der Brustkrebstherapie, z.B. in Kombination mit Endoxifen in geringerer Dosis, bietet großes Potenzial, unter Verringerung von Nebenwirkungen adäquate Therapieerfolge und eine gesteigerte Lebensqualität der Patientinnen zu erreichen.

## 9 Thesen

Thema der Dissertation:

Die Wirkung von grünem Tee und seinen Bestandteilen Epigallocatechingallat (EGCG), Quercetin und Rutin im Vergleich sowie in Kombination mit Endoxifen auf maligne hormonrezeptorpositive und -negative Mammakarzinomzelllinien (MCF-7 und MDA-MB-231).

Verfasst von Wenke Hlawa, geboren am 16.01.1995 in Ribnitz-Damgarten.

1. Brustkrebs stellt die meist auftretende Tumorerkrankung und zugleich häufigste Ursache krebsbedingter Todesfälle bei Frauen dar.
2. Die Therapie des Mammakarzinoms gestaltet sich komplex und bedarf bei jeder Frau eines individuell angepassten Therapieansatzes.
3. Der Einsatz von Tamoxifen ist in der adjuvanten Systemtherapie des Mammakarzinoms etabliert, verzeichnet aber zahlreiche Nebenwirkungen.
4. Der aktive Metabolit von Tamoxifen ist Endoxifen.
5. Komplementäre Heilmethoden nehmen einen wachsenden Stellenwert in der modernen Krebstherapie ein.
6. Grüner Tee enthält u.a. die Flavonoide EGCG, Quercetin und Rutin. Dabei stellt EGCG die Hauptkomponente dar.
7. Flavonoide kombiniert verabreicht wirken stärker als die einzelne Gabe.
8. Der Konsum von und die Substitution mit grünem Tee haben präventives sowie therapeutisches Potenzial bezüglich des Erkrankungs- und Rezidivrisikos sowie in der Bekämpfung von Brustkrebs.
9. MCF-7-Brustkrebszellen exprimieren Estrogen- sowie Progesteron-Rezeptoren, wohingegen MDA-MB-231-Zellen hormonrezeptor-negativ sind.
10. Grüntee-Extrakt sowie seine synthetisch hergestellten Bestandteile EGCG, Quercetin und Rutin wirken *in-vitro* zytotoxisch auf MCF-7- und MDA-MB-231-Brustkrebszellen und hemmen die Proliferation.
11. Endoxifen hat *in-vitro* einen zytotoxischen Effekt sowohl auf die hormonrezeptorpositiven MCF-7-Zellen als auch auf die hormonrezeptor-negativen MDA-MB-231 - Brustkrebszellen.

12. Grüntee-Extrakt sowie seine synthetisch hergestellten Bestandteile EGCG, Quercetin und Rutin wirken in Kombination mit Endoxifen *in-vitro* stark viabilitätshemmend und antiproliferativ auf MCF-7- und MDA-MB-231-Brustkrebszellen. Möglichweise besteht ein synergistischer Wirkeffekt.
13. Zur Untersuchung einer kumulativen Wirkung unter der kombinierten Applikation von Grüntee-Extrakt und Endoxifen sollten weitere Dosis-Wirkungs-Beziehungen bei Mammakarzinomzellen getestet und eine höhere Anzahl an Zelltests durchgeführt werden.
14. Flavonoide, speziell EGCG, weisen durch den Metabolismus im menschlichen Körper nur eine geringe Bioverfügbarkeit auf. Weitere Forschung hinsichtlich des molekularen Wirkmechanismus und *in-vivo*-Studien sind nötig für einen optimierten und sicheren therapeutischen Einsatz am Menschen.
15. Durch die Wirkung von Endoxifen auch auf hormonrezeptor-negative Zellen ergibt sich Potenzial für Behandlungsansätze des schwer therapierbaren triple-negativen Mammakarzinoms.
16. Weitere Untersuchungen der antikanzerogenen Wirkung von grünem Tee und Flavonoiden auch in Kombination mit herkömmlich eingesetzten Medikamenten in Ergänzung zur Schulmedizin sind im Hinblick auf einen in Zukunft möglichen therapeutischen Einsatz zu empfehlen.

# 10 Posterbeitrag

Das folgende Poster wurde für die Präsentation der Ergebnisse dieser Forschungsarbeit im Rahmen der 133. Tagung der NGGG am 14. und 15. Juni 2019 in Lüneburg erstellt.

## Die Wirkung von grünem Tee und seinen Bestandteilen Epigallocatechingallat (EGCG), Quercetin und Rutin im Vergleich sowie in Kombination mit Endoxifen auf maligne hormonrezeptorpositive und -negative Mammakarzinomzelllinien (MCF-7; MDA-MB-231)

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

Universitätsfrauenklinikum am Klinikum Südstadt, Südring 81, 18059 Rostock



### Einleitung

Den in Grüntee enthaltenen Flavonoiden werden präventive und heilende Eigenschaften für u.a. onkologische Erkrankungen nachgesagt<sup>1,2</sup>. Ziel dieser Studie soll sein, die antiproliferative und zytotoxische Wirkung von Grüntee-Extrakt und seinen Bestandteilen auf zwei humane Mammakarzinomzelllinien in vitro zu untersuchen und vergleichend sowie in Kombination mit Endoxifen zu messen.

### Material & Methoden

Herstellung des Grüntee-Extrakts (Lösungsmittel: Ethanol 70%)	Ausgangskonzentration: 1g Bancho-Teepulver je 10 ml Ethanol (70%) Mikrowellenextraktion Verdünnungsreihe: 100%, 50%, 20%, 10%	 Abb.3: grobe Blätter des Grüntees (Ursprungsort China).
Einsetz der HPLC	qualitative Analyse des Extrakts	
Immunhistochemie	Rezeptorstatus der Mammakarzinomzellen (MCF-7 und MDA-MB-231)	
Ansatz der Referenzen und Kontrollen	Epigallocatechingallat, Quercetin, Rutin (jeweils zwei Konzentrationen) Estradiol (Negativkontrolle) Endoxifen (Positivkontrolle)	
Zellmetabolismus	Messungen von Glukose, pH-Wert- und Laktat (unter Extraktwirkung)	
Biochemische Assays	Zellviabilität (CellTiter-Glo®, Promega) Zytotoxizität (CytoTox-Glo®, Promega) Zellproliferation (BrdU, Roche)	

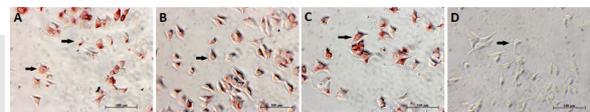


Abb. 1: Immunhistochemie der MCF-7-Zelllinie  
A: ER-α positiv, B: ER-β positiv, C: PR positiv, D: Negativkontrolle.

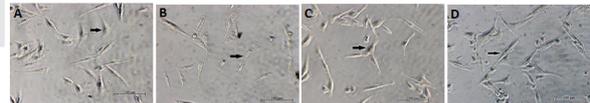


Abb. 2: Immunhistochemie der MDA-MB-231-Zelllinie  
A: ER-α negativ, B: ER-β negativ, C: PR negativ, D: Negativkontrolle.

### Ergebnisse

Im Grüntee-Extrakt wurden EGCG, Quercetin und Rutin nachgewiesen. Bei beiden Zelllinien konnte in allen Konzentrationen ein hemmender Effekt des Extrakts auf Zellviabilität und Wachstumsverhalten beobachtet werden. Die Kombination des Extrakts sowie seiner Bestandteile mit Endoxifen wirkte zytotoxisch. Die Referenzlösungen als Reinstoffe zeigten keine adäquate Wirkung.

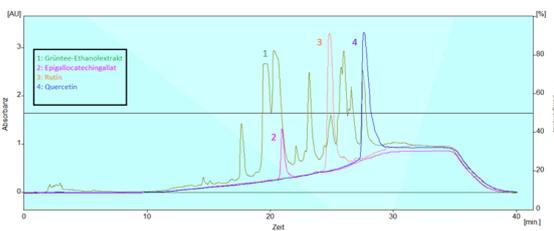


Abb. 4: HPLC-Analyse des Grüntee-Extrakts und der Referenzen EGCG, Rutin und Quercetin. Im Chromatogramm aufgetragen ist die Absorbanz [AU] gegen die Retentionszeit [min].

### Schlussfolgerung

Die Resultate dieser Arbeit zeigen eine deutliche antitumorale Wirkung des Grüntees auf Mammakarzinomzellen, auch und v.a. in Kombination mit Endoxifen und unabhängig vom Rezeptorstatus. Somit bieten sie Grundlage zur Diskussion über den Einsatz von grünem Tee in der Komplementärmedizin, z.B. als Surrogat zum gebräuchlichen Tamoxifen mit dem Ziel, unerwünschte Nebenwirkungen zu reduzieren. In weiteren Studien bleibt dies zu prüfen.

Literatur  
<sup>1</sup>Colburn C, Artacho R, Giménez R (2006). Beneficial Effects of Green Tea—A Review. *Journal of the American College of Nutrition* 25(2): 79-99  
<sup>2</sup>Yihai Cao R C (1999). Angiogenesis inhibited by drinking tea. *Nature*. 398: 381.

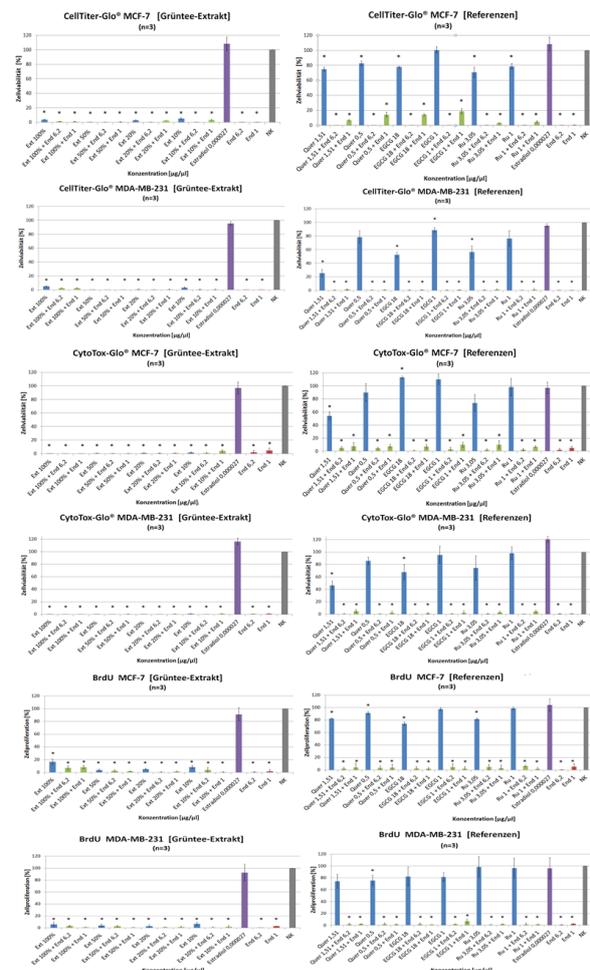


Abb. 5: Durchgeführte biochemische Assays zur Prüfung der Zellviabilität und Zellproliferation: CellTiter-Glo®, CytoTox-Glo®, BrdU  
 Ext = Extrakt; End = Endoxifen; Quer = Quercetin; EGCG = Epigallocatechingallat; Ru = Rutin; NK = Negativkontrolle = Medium/Zellen, \*p<0,05.

## 11 Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne Inanspruchnahme fremder Hilfe verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Aus Veröffentlichungen wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen habe ich in jedem einzelnen Fall als solche kenntlich gemacht.

Hiermit versichere ich weiterhin, dass ich mich bisher noch keinem Promotionsverfahren unterzogen oder mich für ein solches beworben habe. Die eingereichte Schrift wurde in dieser oder ähnlicher Fassung an keiner anderen in- oder ausländischen Fakultät vorgelegt.

Ort, Datum

Unterschrift

## **12 Lebenslauf**

Aus Datenschutzgründen wird der Lebenslauf nicht online veröffentlicht.

## 13 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Doktormutter und Betreuerin Frau PD Dr. Dagmar-Ulrike Richter bedanken, welche mit viel Kraft und Engagement den Fortgang meiner Arbeit unterstützte und stets Zeit für interessante und motivierende Gespräche fand.

Ebenfalls richte ich meinen Dank an Herrn Prof. Bernd Gerber, welcher diese Arbeit und ebenfalls die Präsentation der Forschungsergebnisse auf der NGGG-Tagung ermöglichte.

Weiterhin bedanke ich mich bei der gesamten Laborabteilung, besonders bei Frau Bianca Gosch für das Einlernen und die Unterstützung im Forschungslabor.

Herrn Prof. Udo Jeschke der LMU München danke ich für seine fachliche Beratung im Umgang mit der HPLC.

Für die statistische Beratung bedanke ich mich bei Herrn M. Sc. Frank Weber.

Besonderer Dank gilt meiner Mutter Antje Hlawka für ihr immer offenes Ohr und das Vertrauen in mich.

Ebenfalls danke ich meiner Familie, meinem Freund und all meinen Freunden für die wertvolle Unterstützung besonders in der Zeit des Schreibens.

## 14 Literaturverzeichnis

1. Aboulwafa MM, Youssef FS, Gad HA, Sarker SD, Nahar L, Al-Azizi MM, Ashour ML (2019): Authentication and discrimination of green tea samples using UV-vis, FTIR and HPLC techniques coupled with chemometrics analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 164:653–658. doi:10.1016/j.jpba.2018.11.036.
2. AGO Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V. (2019): Leitlinien: Empfehlungen gynäkologische Onkologie Kommission Mamma. <https://www.ago-online.de/leitlinien-empfehlungen/leitlinien-empfehlungen/kommission-mamma>. Zugegriffen: 22. Dezember 2020.
3. Ahmed S, Stepp JR (2013): Green Tea. In: Preedy V. R. (Hrsg) *Tea in health and disease prevention*. Elsevier, Boston, S 19–31.
4. Ahmed RSI, Liu G, Renzetti A, Farshi P, Yang H, Soave C, Saed G, El-Ghoneimy AA, El-Banna HA, Foldes R, Chan T-H, Dou QP (2016): Biological and Mechanistic Characterization of Novel Prodrugs of Green Tea Polyphenol Epigallocatechin Gallate Analogs in Human Leiomyoma Cell Lines. *J Cell Biochem* 117(10):2357–2369. doi:10.1002/jcb.25533.
5. Al-Mahmood S, Sapiezynski J, Garbuzenko OB, Minko T (2018): Metastatic and triple-negative breast cancer: challenges and treatment options. *Drug Deliv Transl Res* 8(5):1483–1507. doi:10.1007/s13346-018-0551-3.
6. ATCC® Cell Lines. [https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/Cells\\_and\\_Microorganisms/Cell\\_Lines/Human.aspx](https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/Cells_and_Microorganisms/Cell_Lines/Human.aspx). Zugegriffen: 16. Februar 2021.
7. ATCC® (2021) MCF7 (ATCC® HTB-22™). <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-22.aspx#characteristics>. Zugegriffen: 16. Februar 2021.
8. ATCC® (2021) MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™). <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-26.aspx#generalinformation>. Zugegriffen: 16. Februar 2021.
9. Atzori L, Griffin JL, Scherer PE, Irminger-Finger I (2011): Editorial for the directed issue: "Metabolic pathways in cancer". *Int J Biochem Cell Biol* 43(7):948–949. doi:10.1016/j.biocel.2011.04.018.
10. Aversa C, Rossi V, Geuna E, Martinello R, Milani A, Redana S, Valabrega G, Aglietta M, Montemurro F (2014): Metastatic breast cancer subtypes and central nervous system metastases. *Breast* 23(5):623–628. doi:10.1016/j.breast.2014.06.009.
11. AWMF Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. Leitlinien-Detailansicht: Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/032-045OL.html>. Zugegriffen: 11. Januar 2021.
12. ben Sghaier M, Pagano A, Mousslim M, Ammari Y, Kovacic H, Luis J (2016): Rutin inhibits proliferation, attenuates superoxide production and decreases adhesion and migration of human cancerous cells. *Biomed Pharmacother* 84:1972–1978. doi:10.1016/j.biopha.2016.11.001.
13. BfArM Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte BfArM - Weitere Arzneimittelrisiken - Tamoxifen: Wechselwirkung mit CYP2D6-Inhibitoren. <https://www.bfarm.de/SharedDocs/Risikoinformationen/Pharmakovigilanz/DE/RI/2010/RI-tamoxifen-cyp2d6.html>. Zugegriffen: 30. Dezember 2020.
14. Bio-Rad Laboratories BrdU: chemical structure and use in cell proliferation assays. <https://www.bio-rad-antibodies.com/brdu-bromodeoxyuridine.html>. Zugegriffen: 11. Januar 2021.

15. Braakhuis AJ, Campion P, Bishop KS (2016): Reducing Breast Cancer Recurrence: The Role of Dietary Polyphenolics. *Nutrients* 8(9). doi:10.3390/nu8090547.
16. Broeders M, Moss S, Nyström L, Njor S, Jonsson H, Paap E, Massat N, Duffy S, Lynge E, Paci E (2012): The impact of mammographic screening on breast cancer mortality in Europe: a review of observational studies. *J Med Screen* 19 Suppl 1:14–25. doi:10.1258/jms.2012.012078.
17. Bröker B, Schütt C, Fleischer B (2019): *Grundwissen Immunologie*, 4. Aufl. Springer Berlin / Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
18. Bromham N, Schmidt-Hansen M, Astin M, Hasler E, Reed MW (2017) Axillary treatment for operable primary breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 1:CD004561. doi:10.1002/14651858.CD004561.pub3.
19. Bruning A (2013): Inhibition of mTOR signaling by quercetin in cancer treatment and prevention. *Anticancer Agents Med Chem* 13(7):1025–1031. doi:10.2174/18715206113139990114.
20. 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. doi:10.3945/ajcn.116.136051.
21. Cassidy A, O'Reilly ÉJ, Kay C, Sampson L, Franz M, Forman JP, Curhan G, Rimm EB (2011): Habitual intake of flavonoid subclasses and incident hypertension in adults. *Am J Clin Nutr* 93(2):338–347. doi:10.3945/ajcn.110.006783.
22. CEM GmbH Theorie zum Mikrowellen-Aufschluss. <https://www.cem.de/theorie-zum-mikrowellen-aufschluss/>. Zugegriffen: 11. Januar 2021.
23. Chahar MK, Sharma N, Dobhal MP, Joshi YC (2011): Flavonoids: A versatile source of anticancer drugs. *Pharmacogn Rev* 5(9):1–12. doi:10.4103/0973-7847.79093.
24. Chase DM, Gibson SJ, Sumner DA, Bea JW, Alberts DS (2014): Appropriate use of complementary and alternative medicine approaches in gynecologic cancers. *Curr Treat Options Oncol* 15(1):14–26. doi:10.1007/s11864-013-0269-x.
25. Chen Q, Guo Z, Zhao J (2008): Identification of green tea's (*Camellia sinensis* (L.)) quality level according to measurement of main catechins and caffeine contents by HPLC and support vector classification pattern recognition. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 48(5):1321–1325. doi:10.1016/j.jpba.2008.09.016.
26. Cheng A-X, Han X-J, Wu Y-F, Lou H-X (2014): The function and catalysis of 2-oxoglutarate-dependent oxygenases involved in plant flavonoid biosynthesis. *Int J Mol Sci* 15(1):1080–1095. doi:10.3390/ijms15011080.
27. Chou C-C, Yang J-S, Lu H-F, Ip S-W, Lo C, Wu C-C, Lin J-P, Tang N-Y, Chung J-G, Chou M-J, Teng Y-H, Chen D-R (2010): Quercetin-mediated cell cycle arrest and apoptosis involving activation of a caspase cascade through the mitochondrial pathway in human breast cancer MCF-7 cells. *Arch Pharm Res* 33(8):1181–1191. doi:10.1007/s12272-010-0808-y.
28. Chu C, Deng J, Man Y, Qu Y (2017): Green Tea Extracts Epigallocatechin-3-gallate for Different Treatments. *Biomed Res Int* 2017:5615647. doi:10.1155/2017/5615647.
29. ClinicalTrials.gov Phase I Trial of Endoxifen Gel Versus Placebo in Women Undergoing Breast Surgery - Full Text View - ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03317405>. Zugegriffen: 31. Dezember 2020.
30. ClinicalTrials.gov (2020): Tamoxifen Citrate or Z-Endoxifen Hydrochloride in Treating Patients With Locally Advanced or Metastatic, Estrogen Receptor-Positive, HER2-Negative Breast Cancer - Full Text View - ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02311933>. Zugegriffen: 30. März 2020.

31. ClinicalTrials.gov (2020): Z-Endoxifen Hydrochloride in Treating Patients With Metastatic or Locally Recurrent Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer - Full Text View - ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01327781>. Zugegriffen: 30. März 2020.
32. Cunha SI, Jia M, Souchelnytskyi S (2018): Exposure to EGF and 17 $\beta$ -estradiol irreversibly affects the proliferation and transformation of MCF7 cells but is not sufficient to promote tumor growth in a xenograft mouse model upon withdrawal of exposure. *Int J Mol Med* 42(3):1615–1624. doi:10.3892/ijmm.2018.3737.
33. 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. doi:10.1093/annonc/mdx308.
34. Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JPE, Tognolini M, Borges G, Crozier A (2013): Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal* 18(14):1818–1892. doi:10.1089/ars.2012.4581.
35. Deutsche Krebsgesellschaft e. V. (Hrsg) (2016): Gynäkologische Tumoren. Urban & Fischer in Elsevier, München.
36. Deutscher Teeverband e.V. Tee Report 2020. <https://www.teeverband.de/presse/marktzahlen/id-2020/teereport/>. Zugegriffen: 29. Dezember 2020.
37. DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V. Mammakarzinom der Frau. DGHO Empfehlungen der Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen; Onkopedia Leitlinie Mammakarzinom der Frau. <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/mammakarzinom-der-frau/@@guideline/html/index.html>. Zugegriffen: 21. Dezember 2020.
38. Di Chen, Wan SB, Yang H, Yuan J, Chan TH, Dou QP (2011): EGCG, green tea polyphenols and their synthetic analogs and prodrugs for human cancer prevention and treatment. *Adv Clin Chem* 53:155–177. doi:10.1016/b978-0-12-385855-9.00007-2.
39. dkfz Deutsches Krebsforschungszentrum Brustkrebs. <https://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/brustkrebs/was-ist-brustkrebs.php>. Zugegriffen: 21. Dezember 2020.
40. Dou QP, Landis-Piwowar KR, Chen D, Huo C, Wan SB, Chan TH (2008): Green tea polyphenols as a natural tumour cell proteasome inhibitor. *Inflammopharmacology* 16(5):208–212. doi:10.1007/s10787-008-8017-8.
41. Dr. Schweikart Verlag. Banча Tee. <https://www.gruenertee.com/banча/>. Zugegriffen: 29. Dezember 2020.
42. Dr. Schweikart Verlag. Grüner Tee und seine Geschichte. <https://www.gruenertee.com/gruenteegeschichte/>. Zugegriffen: 29. Dezember 2020.
43. Drögemöller BI, Wright GEB, Shih J, Monzon JG, Gelmon KA, Ross CJD, Amstutz U, Carleton BC (2019): CYP2D6 as a treatment decision aid for ER-positive non-metastatic breast cancer patients: a systematic review with accompanying clinical practice guidelines. *Breast Cancer Res Treat* 173(3):521–532. doi:10.1007/s10549-018-5027-0.

44. Drozdoff L, Klein E, Kiechle M, Paepke D (2018): Use of biologically-based complementary medicine in breast and gynecological cancer patients during systemic therapy. *BMC Complement Altern Med* 18(1):259. doi:10.1186/s12906-018-2325-3.
45. Du G-J, Zhang Z, Wen X-D, Yu C, Calway T, Yuan C-S, Wang C-Z (2012): Epigallocatechin Gallate (EGCG) is the most effective cancer chemopreventive polyphenol in green tea. *Nutrients* 4(11):1679–1691. doi:10.3390/nu4111679.
46. Dunn BK, Wickerham DL, Ford LG (2005): Prevention of hormone-related cancers: breast cancer. *J Clin Oncol* 23(2):357–367. doi:10.1200/JCO.2005.08.028.
47. ECIBC European Commission Initiative on Breast Cancer European guidelines on breast cancer screening and diagnosis. <https://healthcare-quality.jrc.ec.europa.eu/european-breast-cancer-guidelines>. Zugegriffen: 22. Dezember 2020.
48. EKF Diagnostics Holdings Biosen C-Line. <https://www.ekfdiagnostics.de/produkt/biosen-glukose-und-laktatmessgerate/>. Zugegriffen: 22. Dezember 2020.
49. 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. doi:10.1080/01635581.2017.1367936.
50. El-Shahawi MS, Hamza A, Bahaffi SO, Al-Sibaai AA, Abduljabbar TN (2012): Analysis of some selected catechins and caffeine in green tea by high performance liquid chromatography. *Food Chem* 134(4):2268–2275. doi:10.1016/j.foodchem.2012.03.039.
51. Emens LA (2018): Breast Cancer Immunotherapy: Facts and Hopes. *Clin Cancer Res* 24(3):511–520. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-3001.
52. Fink DA, Petru E (2011): *Praxisbuch Gynäkologische Onkologie*. S. 271 ff. Springer, Dordrecht.
53. Francis PA, Pagani O, Fleming GF et al (2018): Tailoring Adjuvant Endocrine Therapy for Premenopausal Breast Cancer. *N Engl J Med* 379(2):122–137. doi:10.1056/NEJMoa1803164.
54. Fujiki H, Sueoka E, Watanabe T, Suganuma M (2015): Primary cancer prevention by green tea, and tertiary cancer prevention by the combination of green tea catechins and anticancer compounds. *J Cancer Prev* 20(1):1–4. doi:10.15430/JCP.2015.20.1.1.
55. Ganeshpurkar A, Saluja AK (2017): The Pharmacological Potential of Rutin. *Saudi Pharm J* 25(2):149–164. doi:10.1016/j.jsps.2016.04.025.
56. Gätje R (2015): *Kurzlehrbuch Gynäkologie und Geburtshilfe*, S. 275 bis 302. Thieme-Verlag, Stuttgart.
57. GBG German Breast Group Studien: Tamendox (GBG 91). <https://www.gbg.de/de/studien/tamendox.php>. Zugegriffen: 31. Dezember 2020.
58. Genomic Health Oncotype DX®Test Deutschland. <https://www.oncotypeiq.com/de-DE/brustkrebs/arzte/oncotype-dx-breast-recurrence-score/Oncotype-DX-in-leitlinien>. Zugegriffen: 22. Dezember 2020.
59. Gey M (2015): *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik*, 3. Aufl. Lehrbuch. Springer Spektrum, Berlin.
60. Gingery A, Subramaniam M, Pitel KS, Reese JM, Cicek M, Lindenmaier LB, Ingle JN, Goetz MP, Turner RT, Iwaniec UT, Spelsberg TC, Hawse JR (2014): The effects of a novel hormonal breast cancer therapy, endoxifen, on the mouse skeleton. *PLoS ONE* 9(5):e98219. doi:10.1371/journal.pone.0098219.

61. Giuliano AE, Hunt KK, Ballman KV, Beitsch PD, Whitworth PW, Blumencranz PW, Leitch AM, Saha S, McCall LM, Morrow M (2011): Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: a randomized clinical trial. *JAMA* 305(6):569–575. doi:10.1001/jama.2011.90.
62. Goetz MP (2018): The development of endoxifen for breast cancer. *Clin Adv Hematol Oncol* 16(2):102–105.
63. Goetz MP, Suman VJ, Reid JM, Northfelt DW, Mahr MA, Ralya AT, Kuffel M, Buhrow SA, Safgren SL, McGovern RM, Black J, Dockter T, Haddad T, Erlichman C, Adjei AA, Visscher D, Chalmers ZR, Frampton G, Kipp BR, Liu MC, Hawse JR, Doroshow JH, Collins JM, Streicher H, Ames MM, Ingle JN (2017): First-in-Human Phase I Study of the Tamoxifen Metabolite Z-Endoxifen in Women With Endocrine-Refractory Metastatic Breast Cancer. *J Clin Oncol* 35(30):3391–3400. doi:10.1200/JCO.2017.73.3246.
64. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn H-J (2011): Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol* 22(8):1736–1747. doi:10.1093/annonc/mdr304.
65. Gonzales GB, Smaghe G, Grootaert C, Zotti M, Raes K, van Camp J (2015): Flavonoid interactions during digestion, absorption, distribution and metabolism: a sequential structure-activity/property relationship-based approach in the study of bioavailability and bioactivity. *Drug Metab Rev* 47(2):175–190. doi:10.3109/03602532.2014.1003649.
66. Gstraunthaler G, Lindl T (2013): *Zell- und Gewebekultur*, 7. Aufl. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
67. Hasani NAH, 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 $\alpha$ +breast cancer MCF-7 cells. *Jurnal Teknologi* 80(1). doi:10.11113/jt.v80.10704.
68. Hein L, Fischer JW (2020): *Taschenatlas Pharmakologie*, 8. Aufl. Thieme-Verlag.
69. Heinrich PC, Löffler G (2014): *Biochemie und Pathobiochemie*, 9. Aufl. Springer-Lehrbuch. Springer, Heidelberg.
70. Hermey G (2011): *Der Experimentator*. Experimentator. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
71. HMPC Committee on Herbal Medicinal Products Assessment report on *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, non fermentatum folium
72. HMPC Committee on Herbal Medicinal Products Community herbal monograph on *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, non fermentatum folium.
73. Hosseinzadeh E, Hassanzadeh A, Marofi F, Alivand MR, Solali S (2020): Flavonoid-Based Cancer Therapy: An Updated Review. *Anticancer Agents Med Chem*. doi:10.2174/1871520620666200423071759.
74. IARC International Agency for Research on Cancer Breast cancer fact sheet. <http://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers>. Zugriffen: 21. Dezember 2020.
75. IARC International Agency for Research on Cancer Cancer today: Maps. [http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2018&mode=population&mode\\_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=2&cancer=20&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=5&group\\_cancer=1&include\\_nmsc=1&include\\_nmsc\\_other=1&projection=natural-](http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2018&mode=population&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=2&cancer=20&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=5&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&projection=natural-)

- earth&color\_palette=default&map\_scale=quantile&map\_nb\_colors=5&continent=0&rotate=%255B10%252C0%255D. Zugegriffen: 21. Dezember 2020.
76. IARC International Agency for Research on Cancer (WHO) Organization, World Health (2016): Handbook: Breast Cancer Screening. IARC Handbooks of Cancer Prevention. International Agency for Research on Cancer, Lyon.
  77. Ionescu J, Schulte-Uebbing C, Jennrich P (2018): Stoffwechselmerkmale der Tumorzellen als Ziel komplementärer Therapien. *DZO* 50(03):108–119. doi:10.1055/a-0582-4624.
  78. Ito J, Takahashi R, Sasanuma H, Tsuda M, Morimoto S, Matsumoto Y, Ishii T, Sato F, Takeda S, Toi M (2020): Estrogen Induces Mammary Ductal Dysplasia via the Upregulation of Myc Expression in a DNA-Repair-Deficient Condition. *iScience* 23(2):100821. doi:10.1016/j.isci.2020.100821.
  79. Janni W (Hrsg) (2017): *Facharztwissen Gynäkologie*, 2. Aufl. Urban & Fischer, München.
  80. Jayaraman S, Hou X, Kuffel MJ, Suman VJ, Hoskin TL, Reinicke KE, Monroe DG, Kalari KR, Tang X, Zeldenrust MA, Cheng J, Bruinsma ES, Buhrow SA, McGovern RM, Safgren SL, Walden CA, Carter JM, Reid JM, Ingle JN, Ames MM, Hawse JR, Goetz MP (2020): Antitumor activity of Z-endoxifen in aromatase inhibitor-sensitive and aromatase inhibitor-resistant estrogen receptor-positive breast cancer. *Breast Cancer Res* 22(1):51. doi:10.1186/s13058-020-01286-7.
  81. Jia L, Huang S, Yin X, Zan Y, Guo Y, Han L (2018): Quercetin suppresses the mobility of breast cancer by suppressing glycolysis through Akt-mTOR pathway mediated autophagy induction. *Life Sci* 208:123–130. doi:10.1016/j.lfs.2018.07.027.
  82. Jiang H, Engelhardt UH, Thräne C, Maiwald B, Stark J (2015): Determination of flavonol glycosides in green tea, oolong tea and black tea by UHPLC compared to HPLC. *Food Chem* 183:30–35. doi:10.1016/j.foodchem.2015.03.024.
  83. Jordan VC (2017): Endoxifen: The End, or Are We at the Beginning? *J Clin Oncol* 35(30):3378–3379. doi:10.1200/JCO.2017.74.9325.
  84. Joshee N, Dhekney SA, Parajuli P (Hrsg) (2019): *Medicinal Plants. Discovery of Green Tea Polyphenol-Based Antitumor Drugs: Mechanisms of Action and Clinical Implications*, 1. Aufl. Springer-Verlag.
  85. Kagihara JA, Andress M, Diamond JR (2020): Nab-paclitaxel and atezolizumab for the treatment of PD-L1-positive, metastatic triple-negative breast cancer: review and future directions. *Expert Rev Precis Med Drug Dev* 5(2):59–65. doi:10.1080/23808993.2020.1730694.
  86. KALE A, GAWANDE S, Kotwal Swati (2010): A combination of green tea extract, specific nutrient mixture and quercetin: An effective intervention treatment for the regression of N-methyl-N-nitrosourea (MNU)-induced mammary tumors in Wistar rats. *Oncol Lett* 1(2):313–317. doi:10.3892/ol\_00000056.
  87. 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. doi:10.1007/s10495-005-2137-z.
  88. Karam M, Bièche I, Legay C, Vacher S, Auclair C, Ricort J-M (2014): Protein kinase D1 regulates ER $\alpha$ -positive breast cancer cell growth response to 17 $\beta$ -estradiol and contributes to poor prognosis in patients. *J Cell Mol Med* 18(12):2536–2552. doi:10.1111/jcmm.12322.
  89. Kemper P (Hrsg) (1994): *Die Geheimnisse der Gesundheit: Medizin zwischen Heilkunde und Heiltechnik*, 1. Aufl, S. 76 ff. Insel-Verlag, Frankfurt am Main.

90. Kemppainen LM, Kemppainen TT, Reippainen JA, Salmenniemi ST, Vuolanto PH (2018): Use of complementary and alternative medicine in Europe: Health-related and sociodemographic determinants. *Scand J Public Health* 46(4):448–455. doi:10.1177/1403494817733869.
91. Khan N, Mukhtar H (2018): Tea Polyphenols in Promotion of Human Health. *Nutrients* 11(1). doi:10.3390/nu11010039.
92. Kiyotani K, Mushiroda T, Sasa M, Bando Y, Sumitomo I, Hosono N, Kubo M, Nakamura Y, Zembutsu H (2008): Impact of CYP2D6\*10 on recurrence-free survival in breast cancer patients receiving adjuvant tamoxifen therapy. *Cancer Sci* 99(5):995–999. doi:10.1111/j.1349-7006.2008.00780.x.
93. Klöppel G, Remmele W, Cardesa A, Bubendorf L, Paulus W, Dietel M, Stolte M (2013): *Pathologie*, 3. Aufl. Springer, Berlin.
94. Kozłowska A, Szostak-Wegierek D (2014): Flavonoids--food sources and health benefits. *Rocz Panstw Zakl Hig* 65(2):79–85.
95. Kreienberg R, Jonat W, Volm T, Volm T, Mvbus V, Alt D, Alt D (2006): *Management des Mammakarzinoms*, 3. Aufl. Springer, Secaucus.
96. Kumar S, Pandey AK (2013): Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *ScientificWorldJournal* 2013:162750. doi:10.1155/2013/162750.
97. Kumar P, Aggarwal R (2016): An overview of triple-negative breast cancer. *Arch Gynecol Obstet* 293(2):247–269. doi:10.1007/s00404-015-3859-y.
98. Lai HTM, Threapleton DE, Day AJ, Williamson G, Cade JE, Burley VJ (2015): Fruit intake and cardiovascular disease mortality in the UK Women's Cohort Study. *Eur J Epidemiol* 30(9):1035–1048. doi:10.1007/s10654-015-0050-5.
99. Lee L-S, Kim S-H, Kim Y-B, Kim Y-C (2014): Quantitative analysis of major constituents in green tea with different plucking periods and their antioxidant activity. *Molecules* 19(7):9173–9186. doi:10.3390/molecules19079173.
100. Leiner P (2017): Mammakarzinom: Vorteile durch Suppression der Ovarfunktion. *Im Focus Onkologie* 20(12):44–46. doi:10.1007/s15015-017-3691-2.
101. Li Y, Yuan Y-Y, Meeran SM, Tollefsbol TO (2010): Synergistic epigenetic reactivation of estrogen receptor- $\alpha$  (ER $\alpha$ ) by combined green tea polyphenol and histone deacetylase inhibitor in ER $\alpha$ -negative breast cancer cells. *Mol Cancer* 9:274. doi:10.1186/1476-4598-9-274.
102. Li Y, Meeran SM, Tollefsbol TO (2017): Combinatorial bioactive botanicals re-sensitize tamoxifen treatment in ER-negative breast cancer via epigenetic reactivation of ER $\alpha$  expression. *Sci Rep* 7. doi:10.1038/s41598-017-09764-3.
103. Li F, Wang Y, Li D, Chen Y, Qiao X, Fardous R, Lewandowski A, Liu J, Chan T-H, Dou QP (2018): Perspectives on the recent developments with green tea polyphenols in drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 13(7):643–660. doi:10.1080/17460441.2018.1465923.
104. Liu C-Y, Hung M-H, Wang D-S, Chu P-Y, Su J-C, Teng T-H, Huang C-T, Chao T-T, Wang C-Y, Shiau C-W, Tseng L-M, Chen K-F (2014): Tamoxifen induces apoptosis through cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A-dependent phospho-Akt inactivation in estrogen receptor-negative human breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 16(5):431. doi:10.1186/s13058-014-0431-9.
105. Liu S, Ou S, Huang H (2017): Green tea polyphenols induce cell death in breast cancer MCF-7 cells through induction of cell cycle arrest and mitochondrial-mediated apoptosis. *J Zhejiang Univ Sci B* 18(2):89–98. doi:10.1631/jzus.B1600022.

106. LO - Laboroptik GmbH Zählkammer Bürker.  
<http://www.zaehlkammer.de/deutsch/buerker.html>. Zugegriffen: 11. Januar 2021.
107. Lognos B, Carbonnel F, Boulze Launay I, Bringay S, Guerdoux-Ninot E, Mollevi C, Senesse P, Ninot G (2019): Complementary and Alternative Medicine in Patients With Breast Cancer: Exploratory Study of Social Network Forum Data. *JMIR Cancer* 5(2):e12536. doi:10.2196/12536.
108. Lopes CM, Dourado A, Oliveira R (2017): Phytotherapy and Nutritional Supplements on Breast Cancer. *Biomed Res Int* 2017:7207983. doi:10.1155/2017/7207983.
109. Lum DWK, Perel P, Hingorani AD, Holmes MV (2013): CYP2D6 genotype and tamoxifen response for breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 8(10):e76648. doi:10.1371/journal.pone.0076648.
110. Macready AL, Kennedy OB, Ellis JA, Williams CM, Spencer JPE, Butler LT (2009): Flavonoids and cognitive function: a review of human randomized controlled trial studies and recommendations for future studies. *Genes Nutr* 4(4):227–242. doi:10.1007/s12263-009-0135-4.
111. Magne Nde CB, Zingue S, Winter E, Creczynski-Pasa TB, Michel T, Fernandez X, Njamen D, Clyne C (2015): Flavonoids, Breast Cancer Chemopreventive and/or Chemotherapeutic Agents. *Curr Med Chem* 22(30):3434–3446.
112. Majewska-Wierzbicka M, Czeczot H (2012): Flavonoids in the prevention and treatment of cardiovascular diseases. *Pol Merkur Lekarski* 32(187):50–54.
113. Marahrens P (2019): Die Wirkung von grünem Tee und Matchatee, sowie ihrer Bestandteile Epigallocatechingallat und Quercetin auf MCF-7- und MDA-MB-231-Brustkarzinomzellen.
114. Marunaka Y, Marunaka R, Sun H, Yamamoto T, Kanamura N, Inui T, Taruno A (2017): Actions of Quercetin, a Polyphenol, on Blood Pressure. *Molecules* 22(2). doi:10.3390/molecules22020209.
115. Massi A, Bortolini O, Ragno D, Bernardi T, Sacchetti G, Tacchini M, Risi C de (2017): Research Progress in the Modification of Quercetin Leading to Anticancer Agents. *Molecules* 22(8). doi:10.3390/molecules22081270.
116. Maximov PY, McDaniel RE, Fernandes DJ, Bhatta P, Korostyshevskiy VR, Curpan RF, Jordan VC (2014): Pharmacological relevance of endoxifen in a laboratory simulation of breast cancer in postmenopausal patients. *J Natl Cancer Inst* 106(10). doi:10.1093/jnci/dju283.
117. McGrail L, Garelnabi M (2019): Polyphenolic compounds and gut microbiome in cardiovascular diseases. *Curr Pharm Biotechnol*. doi:10.2174/1389201020666191111150239.
118. Missmer SA, Eliassen AH, Barbieri RL, Hankinson SE (2004): Endogenous estrogen, androgen, and progesterone concentrations and breast cancer risk among postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 96(24):1856–1865. doi:10.1093/jnci/djh336.
119. Molassiotis A, Fernández-Ortega P, Pud D, Ozden G, Scott JA, Panteli V, Margulies A, Browall M, Magri M, Selvekerova S, Madsen E, Milovics L, Bruyns I, Gudmundsdottir G, Hummerston S, Ahmad AM-A, Platin N, Kearney N, Patiraki E (2005): Use of complementary and alternative medicine in cancer patients: a European survey. *Ann Oncol* 16(4):655–663. doi:10.1093/annonc/mdi110.

120. Morigi C (2019): Highlights of the 16th St Gallen International Breast Cancer Conference, Vienna, Austria, 20–23 March 2019: personalised treatments for patients with early breast cancer. *Ecancermedicalsecience* 13. doi:10.3332/ecancer.2019.924.
121. Mozaffarian D, Wu JHY (2018): Flavonoids, Dairy Foods, and Cardiovascular and Metabolic Health: A Review of Emerging Biologic Pathways. *Circ Res* 122(2):369–384. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.309008.
122. Nouri Z, Fakhri S, Nouri K, Wallace CE, Farzaei MH, Bishayee A (2020): Targeting Multiple Signaling Pathways in Cancer: The Rutin Therapeutic Approach. *Cancers (Basel)* 12(8). doi:10.3390/cancers12082276.
123. Okakura K, Hammitzsch H, Schaarschmidt-Richter I (1979): *Das Buch vom Tee*, 1. Aufl. Insel-Taschenbuch, Bd 412. Insel Verl., Frankfurt a. M.
124. Otto M (2006): *Analytische Chemie*, 3. Aufl. Wiley-VCH, Weinheim.
125. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR (2016): Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci* 5:e47. doi:10.1017/jns.2016.41.
126. Pang B-B, Chu Y-K, Yang H (2018): Anti-breast cancer mechanism of flavonoids. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 43(5):913–920. doi:10.19540/j.cnki.cjcm.20171211.005.
127. Persson IA-L (2013): Tea Flavanols: An Overview. In: Preedy V. R. (Hrsg) *Tea in health and disease prevention*. Elsevier, Boston, S 73–78.
128. Peterson JJ, Dwyer JT, Jacques PF, McCullough ML (2012): Associations between flavonoids and cardiovascular disease incidence or mortality in European and US populations. *Nutr Rev* 70(9):491–508. doi:10.1111/j.1753-4887.2012.00508.x.
129. Petru E (2019): *Praxisbuch Gynäkologische Onkologie*. Springer Berlin Heidelberg.
130. Porter R (2000): *Die Kunst des Heilens: Eine medizinische Geschichte der Menschheit von der Antike bis heute*. S. 576. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
131. Prasanth MI, Sivamaruthi BS, Chaiyasut C, Tencomnao T (2019): A Review of the Role of Green Tea (*Camellia sinensis*) in Antiphotaging, Stress Resistance, Neuroprotection, and Autophagy. *Nutrients* 11(2). doi:10.3390/nu11020474.
132. Preedy V. R. (Hrsg) (2013): *Tea in health and disease prevention*. Elsevier, Boston.
133. Promega Corporation CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay. [https://www.promega.de/Products/Cell-Health-Assays/Cell-Viability-and-Cytotoxicity-Assays/CellTiter\\_Glo-Luminescent-Cell-Viability-Assay/?catNum=G7570](https://www.promega.de/Products/Cell-Health-Assays/Cell-Viability-and-Cytotoxicity-Assays/CellTiter_Glo-Luminescent-Cell-Viability-Assay/?catNum=G7570). Zugegriffen: 11. Januar 2021.
134. Promega Corporation CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay. [https://www.promega.de/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/cytotox\\_glo-cytotoxicity-assay/?catNum=G9290](https://www.promega.de/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/cytotox_glo-cytotoxicity-assay/?catNum=G9290). Zugegriffen: 22. Dezember 2020.
135. Radiologienetz Mammographie: Grundlagen und Technik. <https://www.radiologie.de/untersuchungsmethoden-im-uberblick/mammographie/grundlagen-und-technik/>. Zugegriffen: 22. Dezember 2020.
136. Rahim AA, Nofrizal S, Saad B (2014): Rapid tea catechins and caffeine determination by HPLC using microwave-assisted extraction and silica monolithic column. *Food Chem* 147:262–268. doi:10.1016/j.foodchem.2013.09.131.

137. Reid JM, Goetz MP, Buhrow SA, Walden C, Safgren SL, Kuffel MJ, Reinicke KE, Suman V, Haluska P, Hou X, Ames MM (2014): Pharmacokinetics of endoxifen and tamoxifen in female mice: implications for comparative in vivo activity studies. *Cancer Chemother Pharmacol* 74(6):1271–1278. doi:10.1007/s00280-014-2605-7.
138. Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L (2003): Flavonoids: promising anticancer agents. *Med Res Rev* 23(4):519–534. doi:10.1002/med.10033.
139. Reyes-Farias M, Carrasco-Pozo C (2019): The Anti-Cancer Effect of Quercetin: Molecular Implications in Cancer Metabolism. *Int J Mol Sci* 20(13). doi:10.3390/ijms20133177.
140. Roche Diagnostics GmbH Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric). <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Roche/Bulletin/1/11647229001bul.pdf>. Zugegriffen: 11. Januar 2021.
141. Rodriguez-Mateos A, Vauzour D, Krueger CG, Shanmuganayagam D, Reed J, Calani L, Mena P, Del Rio D, Crozier A (2014): Bioavailability, bioactivity and impact on health of dietary flavonoids and related compounds: an update. *Arch Toxicol* 88(10):1803–1853. doi:10.1007/s00204-014-1330-7.
142. Ronnefeldt® TeeShop Banча. <https://www.teeshop-ronnefeldt.com/tee/de/shop/loser-tee/gruener-tee/g-china/banча/?card=314>. Zugegriffen: 11. Januar 2021.
143. Sakata M, Ikeda T, Imoto S, Jinno H, Kitagawa Y (2011): Prevention of mammary carcinogenesis in C3H/OuJ mice by green tea and tamoxifen. *Asian Pac J Cancer Prev* 12(2):567–571.
144. Saleh A, ElFayoumi HM, Youns M, Barakat W (2019): Rutin and orlistat produce antitumor effects via antioxidant and apoptotic actions. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 392(2):165–175. doi:10.1007/s00210-018-1579-0.
145. Scandlyn MJ, Stuart EC, Somers-Edgar TJ, Menzies AR, Rosengren RJ (2008): A new role for tamoxifen in oestrogen receptor-negative breast cancer when it is combined with epigallocatechin gallate. *Br J Cancer* 99(7):1056–1063. doi:10.1038/sj.bjc.6604634.
146. Schmid P, Adams S, Rugo HS, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, Diéras V, Hegg R, Im S-A, Shaw Wright G, Henschel V, Molinero L, Chui SY, Funke R, Husain A, Winer EP, Loi S, Emens LA (2018): Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med* 379(22):2108–2121. doi:10.1056/NEJMoa1809615.
147. Schmitz S (2011): *Der Experimentator: Zellkultur*, 3. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
148. Schubert J (2014): *Leitfaden der klinischen Zytologie für Internisten.*, 1. Aufl. Karger, S, Freiburg im Breisgau.
149. Senthil Kumar RS, Murugesan S, Kottur G, Gyamfi D (2013): Black Tea: The Plants, Processing/Manufacturing and Production. In: Preedy V. R. (Hrsg) *Tea in health and disease prevention*. Elsevier, Boston, S 41–57.
150. Shirazi FH (2011): *Remarks in Successful Cellular Investigations for Fighting Breast Cancer Using Novel Synthetic Compounds*. InTech, Rijeka.
151. Siewert JR, Rothmund FC von, Schumpelick V (Hrsg) (2006): *Onkologische Chirurgie*, 2. Aufl. *Praxis der Viszeralchirurgie*. Springer Medizin, Heidelberg.
152. Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR (2013): *Instrumentelle Analytik*, 6. Aufl. Lehrbuch. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg.

153. Sparano JA, Gray RJ, Della Makower F, Pritchard KI, Albain KS, Hayes DF, Geyer CE, Dees EC, Goetz MP, Olson JA, Lively T, Badve SS, Saphner TJ, Wagner LI, Whelan TJ, Ellis MJ, Paik S, Wood WC, Ravdin PM, Keane MM, Gomez Moreno HL, Reddy PS, Goggins TF, Mayer IA, Brufsky AM, Toppmeyer DL, Kaklamani VG, Berenberg JL, Abrams J, Sledge GW (2018): Adjuvant Chemotherapy Guided by a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *N Engl J Med* 379(2):111–121. doi:10.1056/NEJMoa1804710.
154. Stauffer D. (2008): Chromatographie. <https://docplayer.org/16516794-1-das-chromatogramm-daniel-stauffer.html>. Zugegriffen: 11. Januar 2021.
155. Stearns V, Johnson MD, Rae JM, Morocho A, Novielli A, Bhargava P, Hayes DF, Desta Z, Flockhart DA (2003): Active tamoxifen metabolite plasma concentrations after coadministration of tamoxifen and the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine. *J Natl Cancer Inst* 95(23):1758–1764. doi:10.1093/jnci/djg108.
156. Subik K, Lee J-F, Baxter L, Strzepak T, Costello D, Crowley P, Xing L, Hung M-C, Bonfiglio T, Hicks DG, Tang P (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 (Auckl)* 4:35–41.
157. Suganuma M, Takahashi A, Watanabe T, Iida K, Matsuzaki T, Yoshikawa HY, Fujiki H (2016): Biophysical Approach to Mechanisms of Cancer Prevention and Treatment with Green Tea Catechins. *Molecules* 21(11). doi:10.3390/molecules21111566.
158. Sun Y-S, Zhao Z, Yang Z-N, Xu F, Lu H-J, Zhu Z-Y, Shi W, Jiang J, Yao P-P, Zhu H-P (2017): Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int J Biol Sci* 13(11):1387–1397. doi:10.7150/ijbs.21635.
159. Swain SM, Miles D, Kim S-B et al (2020): Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA): end-of-study results from a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *The Lancet Oncology*. doi:10.1016/S1470-2045(19)30863-0.
160. TAMENDOX Tamendox: Verbesserte endokrine Therapie beim Mammakarzinom. <http://tamendox.de/>. Zugegriffen: 31. Dezember 2020.
161. Thangapazham RL, Singh AK, Sharma A, Warren J, Gaddipati JP, Maheshwari RK (2007): Green tea polyphenols and its constituent epigallocatechin gallate inhibits proliferation of human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Letters* 245(1-2):232–241. doi:10.1016/j.canlet.2006.01.027.
162. Thilakarathna SH, Rupasinghe H (2013): Flavonoid bioavailability and attempts for bioavailability enhancement. *Nutrients* 5(9):3367–3387. doi:10.3390/nu5093367.
163. Thomas TJ, Thomas T (2018): Cellular and Animal Model Studies on the Growth Inhibitory Effects of Polyamine Analogues on Breast Cancer. *Med Sci (Basel)* 6(1). doi:10.3390/medsci6010024.
164. Toellner R (1992): *Illustrierte Geschichte der Medizin: Geschichte des Krebses*. Band 5. S. 2758 - 2760. Andreas-Verlag, Vaduz.
165. Trabert B, Sherman ME, Kannan N, Stanczyk FZ (2019): Progesterone and breast cancer. *Endocr Rev*. doi:10.1210/endrev/bnz001.
166. Tressera-Rimbau A, Arranz S, Eder M, Vallverdú-Queralt A (2017): Dietary Polyphenols in the Prevention of Stroke. *Oxid Med Cell Longev* 2017:7467962. doi:10.1155/2017/7467962.
167. Uhl B (2018): *Gynäkologie und Geburtshilfe compact*. Alles für Station, Praxis und Facharztprüfung, 6. Aufl. compact. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

168. van Aller GS, Carson JD, Tang W, Peng H, Zhao L, Copeland RA, Tummino PJ, Luo L (2011): Epigallocatechin gallate (EGCG), a major component of green tea, is a dual phosphoinositide-3-kinase/mTOR inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 406(2):194–199. doi:10.1016/j.bbrc.2011.02.010.
169. van Duynhoven J, van der Hooft JJJ, van Dorsten FA, Peters S, Foltz M, Gomez-Roldan V, Vervoort J, Vos RCH de, Jacobs DM (2014): Rapid and sustained systemic circulation of conjugated gut microbial catabolites after single-dose black tea extract consumption. *J Proteome Res* 13(5):2668–2678. doi:10.1021/pr5001253.
170. Vauzour D (2012): Dietary polyphenols as modulators of brain functions: biological actions and molecular mechanisms underpinning their beneficial effects. *Oxid Med Cell Longev* 2012:914273. doi:10.1155/2012/914273.
171. Vector Laboratories ImmPRESS® HRP Universal Antibody (Anti-Mouse IgG/Anti-Rabbit IgG, Peroxidase) Polymer Detection Kit. <https://vectorlabs.com/immpressr-hrp-universal-antibody-horse-anti-mouse-rabbit-igg-polymer-detection-kit-peroxidase.html>. Zugegriffen: 11. Januar 2021.
172. Wachira FN, Kamunya S, Karori S, Chalo R, Maritim T (2013): The Tea Plants. In: Preedy V. R. (Hrsg) *Tea in health and disease prevention*. Elsevier, Boston, S 3–17.
173. Wang P, Vadgama JV, Said JW, Magyar CE, Doan N, Heber D, Henning SM (2014): Enhanced inhibition of prostate cancer xenograft tumor growth by combining quercetin and green tea. *J Nutr Biochem* 25(1):73–80. doi:10.1016/j.jnutbio.2013.09.005.
174. Wang S-K, Xiao H-M, Xia H, Sun G-J (2018): Tea consumption and risk of breast cancer: A meta-analysis. *Int J Clin Pharmacol Ther* 56(12):617–619. doi:10.5414/CP203303.
175. Watzl B RG (2001): Flavonoide. *Ernährungs-Umschau* (48 (12)):498–502.
176. Wei R, Mao L, Xu P, Zheng X, Hackman RM, Mackenzie GG, Wang Y (2018): Suppressing glucose metabolism with epigallocatechin-3-gallate (EGCG) reduces breast cancer cell growth in preclinical models. *Food & function* 9(11):5682–5696. doi:10.1039/c8fo01397g.
177. Wen L, Jiang Y, Yang J, Zhao Y, Tian M, Yang B (2017): Structure, bioactivity, and synthesis of methylated flavonoids. *Ann N Y Acad Sci* 1398(1):120–129. doi:10.1111/nyas.13350.
178. WHO World Health Organization Cancer. Breast cancer: prevention and control. <https://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/>. Zugegriffen: 21. Dezember 2020.
179. Wu X, Hawse JR, Subramaniam M, Goetz MP, Ingle JN, Spelsberg TC (2009): The tamoxifen metabolite, endoxifen, is a potent antiestrogen that targets estrogen receptor alpha for degradation in breast cancer cells. *Cancer Res* 69(5):1722–1727. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3933.
180. Xiang L-P, Wang A, Ye J-H, Zheng X-Q, Polito CA, Lu J-L, Li Q-S, Liang Y-R (2016): Suppressive Effects of Tea Catechins on Breast Cancer. *Nutrients* 8(8). doi:10.3390/nu8080458.
181. Xing L, Zhang H, Qi R, Tsao R, Mine Y (2019): Recent Advances in the Understanding of the Health Benefits and Molecular Mechanisms Associated with Green Tea Polyphenols. *J Agric Food Chem* 67(4):1029–1043. doi:10.1021/acs.jafc.8b06146.
182. Yager JD, Davidson NE (2006): Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N Engl J Med* 354(3):270–282. doi:10.1056/NEJMra050776.

183. Yi T, Zhu L, Peng W-L, He X-C, Chen H-L, Li J, Yu T, Liang Z-T, Zhao Z-Z, Chen H-B (2015): Comparison of ten major constituents in seven types of processed tea using HPLC-DAD-MS followed by principal component and hierarchical cluster analysis. *LWT - Food Science and Technology* 62(1):194–201. doi:10.1016/j.lwt.2015.01.003.
184. Younes M, Aggett P (2018): Scientific opinion on the safety of green tea catechins. *EFSA Journal* 16(4). doi:10.2903/j.efsa.2018.5239.
185. Yue W, Santen R, Wang J-P, Li Y, Verderame M, Bocchinfuso W, Korach K, Devanesan P, Todorovic R, Rogan E, Cavalieri E (2003): Genotoxic metabolites of estradiol in breast: potential mechanism of estradiol induced carcinogenesis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 86(3-5):477–486. doi:10.1016/S0960-0760(03)00377-7.
186. Yue W, Yager JD, Wang J-P, Jupe ER, Santen RJ (2013): Estrogen receptor-dependent and independent mechanisms of breast cancer carcinogenesis. *Steroids* 78(2):161–170. doi:10.1016/j.steroids.2012.11.001.
187. Zan L, Chen Q, Zhang L, Li X (2019): Epigallocatechin gallate (EGCG) suppresses growth and tumorigenicity in breast cancer cells by downregulation of miR-25. *Bioengineered* 10(1):374–382. doi:10.1080/21655979.2019.1657327.
188. Zeng L, Yan J, Luo L, Ma M, Zhu H (2017): Preparation and characterization of (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)-loaded nanoparticles and their inhibitory effects on Human breast cancer MCF-7 cells. *Sci Rep* 7:45521. doi:10.1038/srep45521.
189. ZfKD Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland. [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Krebsgeschehen\\_node.html](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Krebsgeschehen_node.html). Zugegriffen: 21. Dezember 2020.
190. ZfKD Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut. Krebs in Deutschland für 2015/2016. Brustkrebs. [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/krebs\\_in\\_deutschland\\_inhalt.html](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/krebs_in_deutschland_inhalt.html). Zugegriffen: 19. Dezember 2020.
191. ZfKD Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut. Krebsarten: Grafik Inzidenzen in Deutschland 2016. [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/krebsarten\\_node.html](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/krebsarten_node.html). Zugegriffen: 21. Dezember 2020.