

UNIVERSITÄTSFRAUKLINIK ROSTOCK

DIREKTOR: PROF. DR. MED. HABIL. BERND GERBER

PROLIFERATIVE UND ZYTOTOXISCHE EFFEKTE VON
PHYTOLACCA (C 12, C 30, C 200) AN HUMANEN
BENIGNEN UND MALIGNEN ESTROGENREZEPTOR-
POSITIVEN UND -NEGATIVEN MAMMAZELLINIEN
(MCF-12A, MCF-10A, MCF-7, MDA-MB-231)

INAUGURALDISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES
DOKTOR DER MEDIZIN (DR. MED.)
DER
UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

VORGELEGT VON

FLORINA TABEA FISCHER

GEB. AM 30.10.1995 IN SCHWÄBISCH GMÜND

ROSTOCK | OKTOBER 2021

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00004002

DOKTORARBEIT

UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

DEKAN: PROF. DR. MED. UNIV. EMIL C. REISINGER, UNIVERSITÄT ROSTOCK

GUTACHTER:

ERSTGUTACHTER: PD DR. RER. NAT. HABIL. DAGMAR-ULRIKE RICHTER

EINRICHTUNG: UNIVERSITÄTSFRAUENKLINIK, FORSCHUNGLABOR, ROSTOCK

ZWEITGUTACHTER: PROF. DR. MED. KARIN KRAFT

EINRICHTUNG: PROFESSUR FÜR NATURHEILKUNDE, UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

DRITTGUTACHTER: PROF. DR. ULRICH KARCK

EINRICHTUNG: ÄRZTLICHER DIREKTOR DER FRAUENKLINIK, KLINIKUM STUTTGART

VIERTGUTACHTER: PROF. DR. RER. NAT. STEFAN OSWALD

EINRICHTUNG: INSTITUT FÜR PHARMAKOLOGIE U. TOXIKOLOGIE, UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

EINREICHUNG: NOVEMBER 2021

VERTEIDIGUNG: OKTOBER 2022



„Similia similibus curentur“

Samuel Hahnemann (1790)

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
1.1	<i>DAS MAMMAKARZINOM</i>	1
1.1.1	EPIDEMIOLOGIE	1
1.1.2	ÄTIOLOGIE - RISIKOFAKTOREN	2
1.1.3	PATHOLOGIE	4
1.1.4	DIAGNOSTIK	5
1.1.5	THERAPIE	6
1.1.6	PRÄVENTION	8
1.2	<i>BENIGNE BRUSTERKRANKUNGEN</i>.....	9
1.2.1	MASTODYNIE.....	9
1.2.2	MASTOPATHIE	10
1.2.3	BENIGNE TUMORÖSE VERÄNDERUNGEN.....	11
1.2.4	ENTZÜNDLICHE BRUSTERKRANKUNGEN	12
1.3	<i>KOMPLEMENTÄRER THERAPIEANSATZ</i>.....	13
1.4	<i>HOMÖOPATHIE</i>	15
1.4.1	DIE PRINZIPIEN	15
1.4.2	KLINISCHE ANWENDUNG	17
1.4.3	KRITIK AN DER METHODE	18
1.5	<i>TESTSUBSTANZEN</i>.....	19
1.5.1	PHYTOLACCA AMERICANA.....	19
1.5.1.1	PHYTOLACCA GLOBULI	20
1.5.2	ENDOXIFEN	21
1.5.3	ESTRADIOL	21
1.5.4	SEKUNDÄRE PFLANZENSTOFFE	22
II.	ZIELSTELLUNG.....	24
III.	MATERIAL UND METHODEN	25
3.1	<i>MATERIAL</i>.....	25
3.1.1	GERÄTE.....	25

3.1.2	GEBRAUCHS- UND VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	26
3.1.3	CHEMIKALIEN, REAGENZIEN UND TESTSUBSTANZEN	27
3.1.4	EXTRAKTE.....	29
3.1.5	ZELLINIEN.....	29
3.1.5.1	MCF-12A	30
3.1.5.2	MCF-10A	30
3.1.5.3	MCF-7	31
3.1.5.4	MDA-MB-231	32
3.2	METHODEN	32
3.2.1	HERSTELLUNG DER TESTSUBSTANZEN.....	32
3.2.1.1	WASSER-EXTRAKT	32
3.2.1.2	ETHANOL-EXTRAKT	33
3.2.1.3	REFERENZEN	33
3.2.2	HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)	34
3.2.3	ZELLKULTIVIERUNG.....	36
3.2.4	VORBEREITUNG DER ZELLTESTS	37
3.2.4.1	BESTIMMUNG DER LEBENDZELLZAHL	37
3.2.4.2	AUFARBEITUNG DER ZU UNTERSUCHENDEN SUBSTANZEN	38
3.2.5	IMMUNHISTOCHEMIE (IHC)	39
3.2.6	IN-VITRO ZELLTESTS	40
3.2.6.1	CELLTITER-GLO® - VIABILITÄTSTEST	41
3.2.6.2	CYTOTox-GLO™ - ZYTOTOXIZITÄTSTEST	42
3.2.6.3	BRDU - PROLIFERATIONSTEST	45
3.2.7	MESSUNG DER GLUKOSE- UND LAKTATKONZENTRATION UND DES PH-WERTES.....	47
3.2.8	STATISTISCHE AUSWERTUNG	48
IV.	ERGEBNISSE	49
4.1	HIGH PERFORMANCE LIQUID CROMATOGRAPHY (HPLC)	49
4.2	IMMUNHISTOCHEMIE (IHC)	52
4.2.1	HORMONREZEPTORPOSITIVE ZELLINIEN	52
4.2.2	HORMONREZEPTORNEGATIVE ZELLINIEN	53

4.3	<i>IN-VITRO ZELLTESTS</i>	54
4.3.1	CELLTITER-GLO® - VIABILITÄTSTEST	55
4.3.2	CYTOTOX-GLO™ - ZYTOTOXIZITÄTSTEST	59
4.3.3	BRDÜ - PROLIFERATIONSTEST	63
4.3.4	FAZIT DER IN-VITRO ZELLTESTS	67
4.4	<i>MESSUNG DER GLUKOSE- UND LAKTATKONZENTRATION UND DES PH-WERTES</i>	67
4.4.1	GLUKOSE-MESSUNG	68
4.4.2	LAKTAT-MESSUNG	70
4.4.3	PH-MESSUNG	72
V.	DISKUSSION	74
5.1	<i>METHODENKRITIK</i>	74
5.1.1	HERSTELLUNG DER EXTRAKTE UND DEREN ANALYTIK	74
5.1.2	IN-VITRO ZELLTESTS	75
5.1.3	ZELLINIEN	78
5.2	<i>DISKUSSION DER SUBSTANZWIRKUNGEN</i>	80
5.2.1	WIRKUNG DER KONTROLLEN ENDOXIFEN UND ESTRADIOL	80
5.2.2	WIRKUNG DER EXTRAKTE	81
5.2.3	ZELLINIEN IM VERGLEICH	82
5.3	<i>WIRKUNG VON HOMÖOPATHIE</i>	83
VI.	AUSBLICK	85
VII.	ZUSAMMENFASSUNG	86
VIII.	THESEN	88
IX.	PUBLIKATION	89
X.	LITERATURVERZEICHNIS	91
XI.	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	102
XIII.	DANKSAGUNG	103

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland.....	2
ABBILDUNG 2: Herstellungsprinzip der Potenzierung bei homöopathischen Arzneimitteln.	16
ABBILDUNG 3: <i>Phytolacca Americana</i>	19
ABBILDUNG 4: Übersicht über die sekundäre Pflanzenstoffe	23
ABBILDUNG 5: „ <i>Phytolacca-Globuli</i> “ in den Konzentrationen C 12, C 30 und C 200.....	29
ABBILDUNG 6: Kultivierte MCF-12A Zellen	30
ABBILDUNG 7: Kultivierte MCF-10A Zellen	31
ABBILDUNG 8: Kultivierte MCF-7 Zellen	31
ABBILDUNG 9: Kultivierte MDA-MB-231 Zellen	32
ABBILDUNG 10: Schematischer Aufbau der HPLC.	35
ABBILDUNG 11: Schematische Darstellung einer Zählkammer nach Bürker	37
ABBILDUNG 12: Schematische Darstellung der immunohistochemischen Reaktion.	39
ABBILDUNG 13: Schematisches Reaktionsprinzip des CellTiter-Glo®.	41
ABBILDUNG 14: Schematisches Reaktionsprinzip des CytoTox-Glo™ Zytotoxizitätstest.	43
ABBILDUNG 15: Funktionsprinzip des BrdU-tests.	45
ABBILDUNG 16: Schritt 13 beim BrdU-Test.	46
ABBILDUNG 17: HPLC-Ergebnisse der Extrakte.....	50
ABBILDUNG 18: HPLC-Ergebnisse der Referenzen.....	51
ABBILDUNG 19: Immunhistochemische Untersuchung der MCF-12A-Zelllinie.....	52
ABBILDUNG 20: Immunhistochemische Untersuchung der MCF-7-Zelllinie	53
ABBILDUNG 21: Immunhistochemische Untersuchung der MCF-10A-Zelllinie.....	53
ABBILDUNG 22: Immunhistochemische Untersuchung der MDA-MB-231-Zelllinie	54
ABBILDUNG 23: Zellviabilität der Zelllinien MCF-12A und MCF-10A, (n=3): CellTiter-Glo®.....	55
ABBILDUNG 24: Zellviabilität der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231, (n=3): CellTiter-Glo®.....	56
ABBILDUNG 25: Zellviabilität aller vier Zelllinien (MCF-12A, MCF-10A, MCF-7 und MDA-MB-231), (n=3): CellTiter-Glo®	57
ABBILDUNG 26: Zellviabilität der Zelllinien MCF-12A und MCF-10A	58
ABBILDUNG 27: Zellviabilität der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231	58
ABBILDUNG 28: Zellviabilität der Zelllinien MCF-12A und MCF-10A, (n=3): CytoTox-Glo™	59
ABBILDUNG 29: Zellviabilität der Zelllinien MCF-12A und MCF-10A, (n=3): CytoTox-Glo™	60
ABBILDUNG 30: Zellviabilität aller vier Zelllinien (MCF-12A, MCF-10A, MCF-7 und MDA-MB-231), (n=3): CytoTox-Glo™	61
ABBILDUNG 31: Zellviabilität der Zelllinien MCF-12A und MCF-10A	62
ABBILDUNG 32: Zellviabilität der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231	62

ABBILDUNG 33: Zellproliferation der Zelllinien MCF-12A und MCF-10A, (n=3): BrdU-Test	63
ABBILDUNG 34: Zellproliferation der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231, (n=3): BrdU-Test	64
ABBILDUNG 35: Zellproliferation aller vier Zelllinien (MCF-12A, MCF-10A, MCF-7 und MDA-MB-231), (n=3): BrdU-Test.....	65
ABBILDUNG 36: Zellproliferation der Zelllinien MCF-12A und MCF-10A	66
ABBILDUNG 37: Zellproliferation der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231	66
ABBILDUNG 38: Glukose-Messung der Zelllinien MCF-12A und MCF-10A, (n=1).....	68
ABBILDUNG 39: Glukose-Messung der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231, (n=1).....	69
ABBILDUNG 40: Laktat-Messung der Zelllinien MCF-12A und MCF-10A, (n=1).....	70
ABBILDUNG 41: Laktat-Messung der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231, (n=1).....	71
ABBILDUNG 42: pH-Messung der Zelllinien MCF-12A und MCF-10A, (n=1)	72
ABBILDUNG 43: pH-Messung der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231, (n=1).....	73
ABBILDUNG 44: Poster für 38. Senologie-Kongress 2018, Stuttgart.....	90

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1: Geräte.....	25
TABELLE 2: Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien	26
TABELLE 3: Chemikalien und Reagenzien.....	27
TABELLE 4: Zelllinien	29
TABELLE 5: Konzentrationen der untersuchten Substanzen mit jeweiligen Lösungsmitteln	33
TABELLE 6: Konzentrationen der verwendeten Zellen pro Versuchsreihe	38

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AK	Antikörper
ALND	Axilläre Lymphknotendisektion (<i>axillary lymph node dissection</i>)
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i> (einfach destilliertes Wasser)
ATP	Adenosintriphosphat
BET	brusterhaltende Therapie
BRCA	<i>BReast CAncer gene</i>
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
c-erb-B2	<i>epidermal growth factor receptor 2</i>
CIS	<i>Carcinoma in situ</i>
CK	Zytokeratin
CP	Zellproliferation
CV	Zellviabilität
DCIS	duktales <i>Carcinoma in situ</i>
DHU	Deutsche Homöopathie-Union
DMSO	Dimethylsulfoxid
ED₅₀	Effektivdosis / halbmaximale Wirkungsstärke
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay</i>
ER	Estrogenrezeptor
FKS	fetales Kälberserum
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
GPOR	<i>G Protein-coupled Estrogen Receptor</i>
HER2/neu	<i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IgG	Immunoglobulin-G
LCIS	lobuläres <i>Carcinoma in situ</i>
MCF	<i>Michigan Cancer Foundation</i>
MRM	Modifizierte, radikale Mastektomie
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
NK – Zellen	Natürliche Killer – Zellen
NST	<i>no special type</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PR	Progesteronrezeptor
RR	Relatives Risiko
RT	Raumtemperatur
SERM	selektiver Estrogen-Rezeptor-Modulator
SD	Standardabweichung
SLNE	Sentinel-Lymphknotenentfernung (<i>sentinel lymph node exstirpation</i>)
U/min	Umdrehungen pro Minute

I. EINLEITUNG

Erkrankungen der Brust sind ein häufiges Krankheitsbild, von dem viele Frauen im Laufe ihres Lebens betroffen sind. Oft zeigen Betroffene ein Interesse an Behandlungsmethoden, die über die Schulmedizin hinausgehen, wie beispielsweise die Homöopathie.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Wirkung eines homöopathischen Arzneimittels auf verschiedenen Mammazelllinien.

1.1 DAS MAMMAKARZINOM

Unter der Bezeichnung Mammakarzinom sind einige histologisch unterschiedliche Karzinome zusammengefasst, die sich sowohl phänotypisch als auch in ihrer Malignität sehr unterscheiden. Man differenziert vor allem präinvasive (*In-situ*)-Karzinome (z.B. DCIS) und invasive Karzinome (lobuläre bzw. duktale). Mit ca. 28 % stellt das Mammakarzinom die häufigste Krebserkrankung der Frau dar. Bei den 35-50-jährigen Frauen des globalen Nordens ist es die häufigste Todesursache¹³⁵.

Brustneoplasien können nach ihrer Dignität in benigne, semimaligne und maligne Tumore eingeteilt werden. Das Mammakarzinom zählt zu den malignen Tumoren. Zu den benignen Erkrankungen gehört beispielsweise das Fibroadenom, Papillom, Lipom und die fibrös-zystische Mastopathie. Letztere kann wiederum zum bösartigen Mammakarzinom entarten. Der Phylloides-Tumor dagegen wird als semimaligne beschrieben¹⁷¹.

1.1.1 EPIDEMIOLOGIE

Das Mammakarzinom der Frau weist die größte Prävalenz unter den weiblichen Krebserkrankungen auf^{17,125} (Abbildung 1), sowohl in Ländern des globalen Nordens als auch des globalen Südens²¹. Mit 56 % aller statistisch erfassten Brustkrebserkrankungen weltweit, zeigt der globale Norden (vor allem USA und Nordeuropa) eine deutlich höhere Inzidenz im Vergleich zu Asien und Afrika¹¹⁸. Weltweit sterben von 1,5 Millionen erkrankten Frauen 450 000 pro Jahr. Bei zurückgehender Sterblichkeit nimmt jedoch die Inzidenz weiter zu^{118,159,176}. Die Behandlung und Prävention von Krebserkrankungen gewinnen durch die steigende Lebenserwartung immer mehr an Bedeutung. Allein im Jahr 2017 erkrankten in Deutschland ca. 70 000 Patientinnen neu an Brustkrebs, 1 % der Betroffenen sind Männer⁹³. Davon sterben über 18 000 Frauen und knapp 200 Männer pro Jahr. Das Mammakarzinom ist in Deutschland die häufigste Krebstodesursache der Frau⁹⁷. Damit leidet statistisch mehr als jede achte Frau im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom¹⁷, was einem Lebenszeitrisko von 12,5 % entspricht⁵. In Deutschland liegt das mittlere Erkrankungsalter etwa bei 63 Jahren¹³⁵.

Trotz steigender Inzidenz sinkt die Mortalität, dank stets besser werdender Diagnostik und modernisierter, multimodaler Therapiekonzepte²⁵. Da übliche Therapieverfahren, wie zum Beispiel Strahlen- und systemische Chemotherapie, oft starke Nebenwirkungen verursachen, haben die Betroffenen häufig den Wunsch, über ihre Therapie mitentscheiden zu dürfen und über alternative Therapiemöglichkeiten aufgeklärt zu werden. So wünscht sich laut einer Querschnittsstudie die Mehrzahl der Brustkrebspatientinnen über Angebote der Komplementärmedizin aufgeklärt zu werden¹⁶⁰. Außerdem nutzen bereits über 60 % der befragten Patientinnen ergänzende Therapieoptionen zusätzlich zur Standardtherapie¹⁶⁰. Die Brustkrebspatientinnen gehören zu den am meisten interessierten Personen an komplementären Therapieansätzen, verglichen mit Patientenkollektiven anderer Tumorentitäten¹¹⁹. Dies zeigt beispielhaft den vorhandenen Bedarf am Forschungsgebiet der komplementären Onkologie, um bestehende Therapien weiter ergänzen zu können.

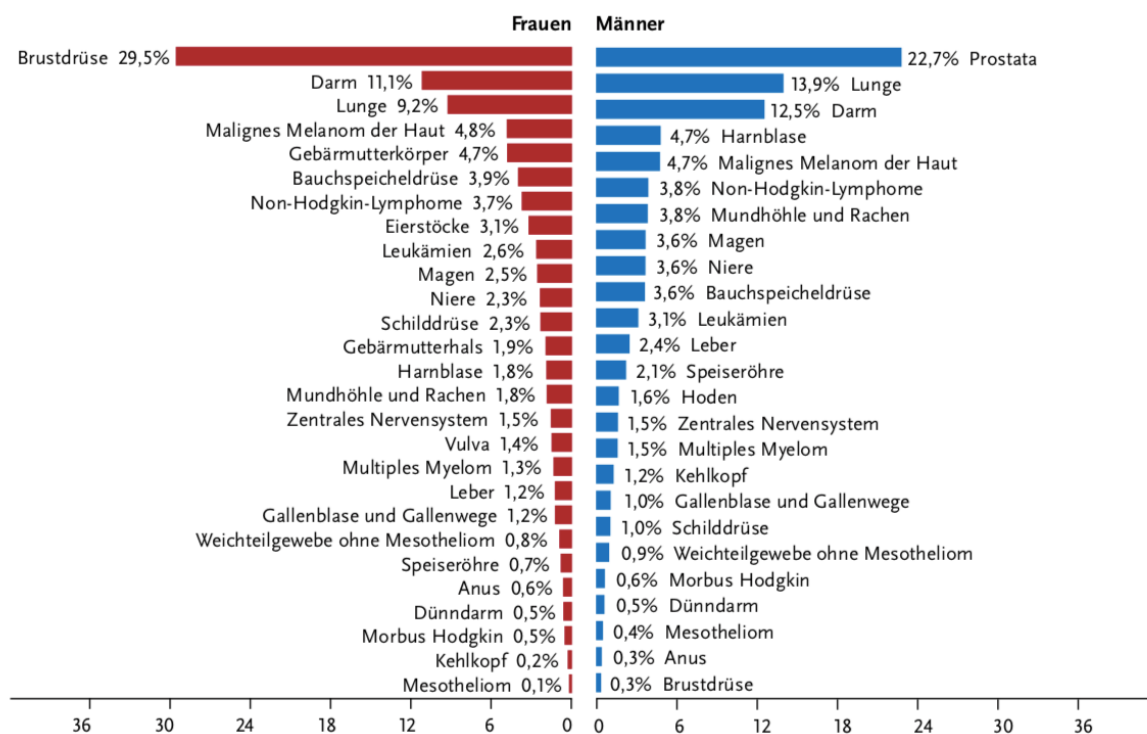


ABBILDUNG 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2016 (RKI 2019)⁹⁷.

1.1.2 ÄTIOLOGIE - RISIKOFAKTOREN

Es gibt diverse Faktoren, die das Risiko im Laufe des Lebens an Brustkrebs zu erkranken erhöhen. Zu den bedeutsamsten Risikofaktoren zählen das weibliche Geschlecht, die familiäre Vorbelastung und das Alter¹¹⁰. Letzteres stellt den wichtigsten Risikofaktor für die Entstehung eines Mammakarzinoms dar. Das Risiko einer 80-jährigen, an Brustkrebs zu erkranken, liegt bei 1:10, das einer 25-jährigen hingegen bei 1:20 000^{9,17,135}. Es wird davon ausgegangen, dass

bis zu 10 % aller Mammakarzinome in Verbindung mit einer erblichen Disposition stehen. Dabei ist in der Hälfte der Fälle der genetische Hintergrund bisher noch unbekannt¹³⁵. Mit einer Mutation des Tumorsuppressorgenes BRCA 1 (Breast-Cancer-Gene-1) oder BRCA 2 sind etwa 25 % aller erblichen Mammakarzinome assoziiert¹⁷. Bei einer positiven Familienanamnese muss beachtet werden, ob die Verwandten prä- oder erst postmenopausal erkrankt sind. Das einseitige prämenopausale Auftreten eines Mammakarzinoms der Mutter erhöht das eigene Risiko bereits um ca. 30 %, selbst auch zu erkranken. Das postmenopausale Erkranken einer Verwandten 1. Grades erhöht das Risiko jedoch nicht signifikant²².

Generell steigt das Brustkrebsrisiko, wenn eine Frau lange unter einem erhöhten Estrogeneinfluss steht, also die Estrogenspiegel im Blut erhöht sind⁹¹. Der Estrogenüberschuss ist als eine der Hauptursachen für Brustkrebs zu vermuten. Einerseits soll der Hormonüberschuss durch die Entstehung oxidativer Metabolite die DNA Schädigung beeinflussen, andererseits soll es durch eine Bindung an den Estrogenrezeptoren zu einer manipulierten Genexpression mit wiederum steigender Zellproliferation und verminderter Apoptose kommen⁹¹. Die ovarielle Tätigkeit wird durch den Eintritt der Menarche und der Menopause definiert. Dadurch gelten eine frühe Menarche (< 11 Jahre: 3-fach), eine späte Menopause (> 54 Jahre: 2-fach), und eine ausbleibende oder erst späte Gravität (Entbindung > 40 Jahre: 3-fach) als potenzielle Risikofaktoren^{35,135}. Auf estrogenrezeptorpositive Erkrankungen wirkt sich dieser Estrogeneinfluss stärker aus, als auf ER-negative. Von außen zugefügte Estrogene zum Beispiel in Form von oralen Kontrazeptiva (1,25 – 3,3-fach) oder einer Hormonsubstitution (1,36 – 1,63-fach) sind kritisch abzuwägen, da sie das Risiko ebenfalls erhöhen können^{28,135}. Bei zeitlich begrenzter Applikation der oralen Kontrazeptiva gilt das Risiko jedoch nicht als erhöht³².

Neben den endogenen Risikofaktoren spielen auch exogene Faktoren eine bedeutsame Rolle, wie beispielsweise der Lebensstil und die Ernährung¹³⁵. Eine Adipositas, die mit einem Body-Mass-Index > 30 einhergeht, hat einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Entstehung von Brustkrebs (RR: 1,9- 2-fache)^{17,171}. Dafür gibt es verschiedene Erklärungsansätze: Zum einen kann es durch die Aromatisierung der Fettzellen bei postmenopausalen Frauen zu einer gesteigerten Estrogenproduktion kommen. Außerdem konnte in *in-vitro* Versuchen eine Wechselwirkung zwischen Adipozyten und Mammazellen gezeigt werden, welche Einfluss auf den Phänotyp, Motilität und das Proliferationsverhalten nehmen kann^{17,89}.

Als weiterer toxischer Einflussfaktor zeigt sich Alkohol für die Entstehung von Brustkrebs mitverantwortlich. Dabei ist vor allem die Alkoholdosis und weniger die Kontinuität des Trinkens von Bedeutung¹⁷³. So bringt bereits ein Konsum von > 20 g Ethanol/Tag ein um 1,5 bis 2-faches erhöhtes Risiko zu erkranken¹⁷¹.

Auch Zigarettenkonsum stellt einen Risikofaktor für die Genese von Brustkrebs dar. Dabei ist vor allem bei Frauen, die bereits früh zu rauchen begannen, also vor oder während ihrer Menarche, ein besonders signifikanter Risikoanstieg zu verzeichnen¹¹⁴. Selbst bei Passivraucherinnen konnte inzwischen ein etwas erhöhtes Risiko für Brustkrebs nachgewiesen werden³.

Dass der Lifestyle einen erheblichen Einfluss auf die Entstehung von Brustkrebs hat, wird auch deutlich, wenn man sich beispielsweise vor Augen führt, dass das Brustkrebsrisiko der in Japan lebenden Japanerinnen deutlich niedriger liegt, als das von deren Landsleuten, die in den USA leben. Es gehen dabei allein 60 % des Risikozuwachses auf die umgestellte, zunehmend westlichere Ernährung zurück^{37,140,142}.

Bis heute gilt die endgültige Ursache des Mammakarzinoms als unbekannt, sie ist als Zusammenspiel von verschiedenen Veränderungen auf jeder einzelnen Ebene der Zellproliferation und -regulation zu sehen¹³⁵.

1.1.3 PATHOLOGIE

Das Mammakarzinom wird mittlerweile als systemische Erkrankung mit einer lokalen Komponente gesehen. Bereits bei kleineren Tumoren ist eine Metastasierung über Blut- und Lymphgefäße möglich. Das Mammakarzinom tritt topografisch am häufigsten im axillären (oberen äußeren) Quadranten der Brust auf⁸⁷. Ausgangslage einer Tumortransformation einer somatischen Zelle ist meist eine DNA-Schädigung in Kombination mit fehlenden Reparaturmechanismen und einigen Mutationen⁹⁹.

Brustkrebs kann entweder durch eine maligne Entartung in den Milchgängen (duktales Karzinom) oder in den Drüsenläppchen (lobuläres Karzinom) entstehen¹³⁵.

Analog dazu unterscheidet man bei den Vorstufen zum Krebs, den präinvasiven Stadien (*Carcinoma in situ*, CIS) LCIS und DCIS. Beim selteneren lobulären *Carcinoma in situ* (LCIS) handelt es sich um eine Neubildung monomorpher Tumorzellen, welche von den Brustdrüsenepithelien der Drüsenläppchen ausgehen. Charakteristischerweise wird es durch eine Basalmembran begrenzt und zeigt in frühen Phasen atypische lobuläre Hyperplasien. Es zeigt in 30 – 40 % ein multifokales Wachstum, bei dem beide Seiten betroffen sind²³.

Das duktale *Carcinoma in situ* (DCIS) wiederum stellt das häufigere CIS dar, es macht etwa 5 – 30 % aller Mammakarzinome aus. Aus Drüsenzellen, segmental entstehend mutiert es und wächst in die Architektur des Drüsenbaums ein. Zu Beginn ist es ebenfalls durch eine Basalmembran begrenzt. Wenn ein CIS in ein invasives Mammakarzinom übergeht, zeichnet es sich durch die Fähigkeit zu infiltrativem Wachstum und die Fähigkeit zum Metastasieren aus²³. In 50 – 80 % der Fälle handelt es sich histologisch jedoch bereits um ein invasives Karzinom, vor allem um das NST („*no special type*“). Diese Subgruppe charakterisiert, dass sie keine typischen Kriterien aufweisen, um sie einem der speziellen Typen zuweisen zu können¹³⁵. Die

große Mehrheit, nämlich 95 % der Mammakarzinome gehört zur Gruppe der Adenokarzinome¹⁶³.

Eine weitere wichtige Klassifikation des Tumors erfolgt anhand des Rezeptorstatus. Estrogene wirken auf mamäre Drüsenepithelzellen wachstumsfördernd und beeinflussen so die Zelldifferenzierung. Für Tumorzellen stellen sie dadurch wiederum einen Wachstumsreiz dar⁶². Sowohl von therapeutischer, als auch von prognostischer Bedeutung ist vor allem der Estrogenrezeptor – α und – β (ER) und der Progesteronrezeptor (PR). Dabei weisen insgesamt in etwa 80 % der Mammakarzinome einen hormonrezeptorpositiven Status auf (ER⁺ und PR⁺). Dieser Status zeigt sich prognostisch als günstig, da er ein endokrines Therapieregime möglich macht.

Außerdem von Relevanz ist der HER2/neu-Status („*human epidermal growth factor receptor 2*“). Bei einer Überexpression von HER2/neu besitzen Zellen einen epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), dieser ist in etwa 12 – 20 % der Brustkrebsfälle positiv⁸². Bei dessen Positivität zeigt sich wiederum eher eine schlechtere Prognose, da es häufiger zu positiven Lymphknotenbiopsien kommt²⁷. Jedoch ist ein positiver HER2/neu-Status sowohl mit einem guten Ansprechen auf eine Antikörpertherapie mit beispielsweise Trastuzumab assoziiert als auch auf ein gutes Ansprechen mit Zytostatika wie Anthracycline oder Taxane assoziiert. Wenn immunhistochemisch weder ER, PR oder HER2/neu nachgewiesen werden können (ER⁻, PR⁻, HER2⁻) spricht man von einem „Triple-Negativen-Mammakarzinom“. Dies bringt die schlechteste Prognose mit sich, da keine rezeptorabhängige Therapie möglich ist. So ist weder eine Hormon- noch eine Antikörpertherapie wirksam. Letztere ist von einem positiven HER2/neu-Status abhängig. In etwa einem Drittel der Fälle liegt bei einem „Triple-Negativen-Mammakarzinom“ eine Mutation im BRCA-1 vor. Bei dieser Mutation handelt es sich um den bisher am häufigsten nachgewiesenen Gendefekt. Er führt zu einer Steigerung des „Life-Time-Risks“ für ein Mammakarzinom auf bis zu 80 %^{73,127,132}.

Es gibt histologische Typen, die mit einem günstigeren Krankheitsverlauf assoziiert sind, dazu gehören beispielsweise das tubuläre und das invasive kribriforme Karzinom, sowie das gut differenzierte muzinöse und das invasiv papilläre Karzinom. Diese Typen sind meistens hormonrezeptorpositiv¹³⁵. Das adenoidzystische Karzinom ist ein Beispiel für ein häufig triplenegatives Karzinom, das zwar lokal aggressiv wächst aber nur selten metastasiert und dadurch oft keine systemische Therapie benötigt¹³⁵.

1.1.4 DIAGNOSTIK

Um Neoplasien oder Tumoren der Mammæe frühzeitig zu entdecken, stehen vielseitige diagnostische Methoden zur Verfügung. Bereits über die Anamnese und klinische Untersuchung lassen sich wichtige Informationen gewinnen, wie zum Beispiel die individuelle Risikobelastung oder das Vorhandensein klinischer Symptome, da Mammakarzinome sowohl sicht- als auch tastbar sein können. Deshalb sollte zu Beginn jeder Untersuchung neben einer ausführlichen Anamnese auch die Inspektion und Palpation der Mammæe stattfinden.

Ein erstes klinisches Zeichen ist häufig ein derber, schwer verschieblicher Knoten. Dieser wird in über der Hälfte der Fälle von den Patientinnen selbst entdeckt, weshalb die Motivation zur monatlichen Selbstuntersuchung der Brust von elementarer Bedeutung ist¹³⁵.

Jedoch kann ein Mammakarzinom auch erst in der entsprechenden bildgebenden Untersuchung erkannt werden, weshalb den apparativen Möglichkeiten, zusätzlich zu den basisdiagnostischen Maßnahmen, eine wichtige Rolle zukommt. Sie werden hauptsächlich zur Diagnosesicherung genutzt¹³⁵.

Bei suspektem klinischem Befund sollte ein bildgebendes Verfahren zum Einsatz kommen, wobei das Alter der Patientin maßgeblich entscheidet, auf welches Verfahren zurückgegriffen wird. Generell ist die Mammografie der Goldstandard in der bildgebenden Diagnostik des Mammakarzinoms. Sie stellt Mikrokalzifikationen ($< 200 \mu\text{m}$) dar, die in etwa 30 % der invasiven Mammakarzinome und 80 % der DCIS vorliegen¹³⁵. Letzteres bildet meistens keinen Knoten und ist dadurch palpatorisch oft nicht zu ertasten, weshalb die mammografisch erkennbaren Mikroverkalkungen meist den entscheidenden Hinweis liefern. Je nach Dichte des Drüsenepithels ergibt sich bei der Mammografie eine Sensitivität von 85 – 90 %. Da jüngere Frauen über ein dichteres Drüsenepithel verfügen, ist für Frauen < 35 Jahre vorrangig die Sonografie der Mamma und Axilla empfohlen^{17,125}. Dabei stellt sich der Nachweis von Mikrokalk jedoch als nicht so zuverlässig dar und eine morphologische Unterscheidung ist nicht möglich. Bei spezifischeren Fragestellungen bietet die mit Kontrastmittel unterstützte MRT-Untersuchung eine Option^{17,135}.

Interventionelle Maßnahmen kommen meist zur endgültigen Diagnosesicherung zum Einsatz. Mit der sonografisch gesteuerten Stanzbiopsie steht hierfür eine wenig belastende und unter direkter Kontrolle durchführbare, sichere Methode der Gewebeentnahme zur Verfügung, die eine pathologische Einschätzung ermöglicht. Bei ca. 60 % aller mammografisch suspekten, nicht palpablen Auffälligkeiten liegt ein sonografisches Korrelat vor, was die sonografisch gesteuerte Mamma- oder Lymphknotenbiopsie ermöglicht. Falls kein solches sonografisches Korrelat besteht, muss die Biopsie unter mammografischer Kontrolle oder MRT gesteuert erfolgen^{17,135}.

1.1.5 THERAPIE

Ist ein Mammakarzinom diagnostisch gesichert, stehen verschiedene Therapiemöglichkeiten zur Verfügung. Dabei kann prinzipiell in drei Hauptsäulen unterschieden werden: die operative Therapie, die Radiotherapie und die medikamentöse Therapie, die sich wiederum in dreierlei Optionen aufteilt: die zytostatische, die endokrine, sowie die Antikörpertherapie.

Bei einer frühen Entdeckung gilt Brustkrebs als heilbar¹³⁵. Die Therapiemethoden können bis zum lokal fortgeschrittenen oder lokal rezidierten Stadium immer noch eine kurative Perspek-

tive bieten. Wenn bereits Fernmetastasen vorliegen, bleibt nur noch die palliative Vorgehensweise. Dabei steht vor allem die Systemtherapie im Vordergrund. Das Kollektiv aller von einem Mammakarzinom Betroffenen zeigt eine 5-Jahres-Überlebensrate von 82 %¹³⁵.

Welche Therapie letztendlich gewählt wird, hängt von tumorbiologischen Parametern, wie Tumorgroße, Ausbreitung, Hormonrezeptorstatus, Lymphknotenbefall und Fernmetastasen, die Histologie des Primärtumors und von individuellen Faktoren der Patientinnen ab.

Die operative Therapie kann sowohl brusterhaltend (BET) als auch radikal als Mastektomie, hierbei jedoch meist als modifizierte, radikale Mastektomie (MRM), durchgeführt werden. Einer BET sollte zwingend eine adjuvante Radiatio folgen^{17,58,138}, dann zeigt diese Methode kein schlechteres Outcome bezüglich des Überlebens verglichen mit der MRM¹⁷. Indiziert ist eine MRM zum Beispiel bei einem inflammatorischen Mammakarzinom, bei Multizentrität, bei diffus ausgedehnten Kalzifikationen, bei Kontraindikationen zu einer Nachbestrahlung nach BET oder auch bei Wunsch der aufgeklärten Patientin. Inzwischen wird die anschließende totale axilläre Lymphknotendisektion (ALND) nach Operation nicht mehr zwingend bei allen invasiven Karzinomen mit positiven Sentinel-Lymphknoten durchgeführt. Bei der Sentinel-Lymphknoten-Technik (SLNE) wird das nuklearmedizinische Verfahren der Lymphabfluss-Szintigraphie eingesetzt, wodurch der Wächterlymphknoten detektiert wird. Sie wird bevorzugt, wenn nicht mehr als 2 Makrometastasen vorhanden sind, ein Tumorstadium T1 oder T2 vorliegt, eine adäquate adjuvante medikamentöse Tumorthherapie möglich ist oder eine BET mit postoperativer Bestrahlung durch tangential Felder geplant ist. Die SLNE hat den Vorteil einer geringeren Morbidität, ist aber im Stadium I und IIa der ALND gleichwertig^{68,125}. Die Radiotherapie ist nicht nur nach einer BET als adjuvante Therapie der betroffenen Brust und der angrenzenden Thoraxwand indiziert, sondern auch nach einer MRM bei Patientinnen mit einem bereits fortgeschrittenen Tumorstadium (T3/T4) und mit einem hohen Lokalrezidivrisiko. So kann durch eine adjuvante Radiatio das Risiko eines lokoregionalen Rezidivs gesenkt werden¹⁰⁶.

Der Befund ist auch für die medikamentöse Behandlungsschiene wegweisend. Zur Hormontherapie gehören die SERM (z.B. Tamoxifen), Aromataseinhibitoren und GnRH-Analoga. Sie werden in erster Linie bei positivem Hormonrezeptorstatus eingesetzt und können sowohl primär, adjuvant als auch palliativ verwendet werden⁶². Die Wirkung dieser Therapieoption besteht darin, dass der Proliferationsreiz, der von Estrogen ausgeht, für die Tumorzellen gesenkt wird. Tamoxifen beispielsweise blockiert die Estrogenwirkung (s. S. 21, 1.5.2 Endoxifen), die Aromatasehemmer inhibieren in der Peripherie die Estrogensynthese und wirken vor allem in den Adipozyten. Aromatasehemmer werden bevorzugt in der Postmenopause eingesetzt⁶². Die endokrine Therapie sollte, falls ebenfalls eine Chemotherapie durchgeführt wird, nach dieser begonnen werden.

Eine Chemotherapie mit Zytostatika wie beispielsweise Anthrazyklinen und Taxanen spielen vor allem bei einem negativen Hormonrezeptorstatus („triple-negativ“) eine wichtige Rolle.

Dadurch kann die Krebsmortalität um ca. 30 % gesenkt werden¹⁰⁶. Jedoch können auch Patientinnen mit hormonrezeptorpositiven Tumoren von einer adjuvanten Chemotherapie profitieren, vor allem bei HER2/Neu-Negativität^{17,125}.

Die Antikörpertherapie kommt bei Patientinnen zum Einsatz, deren Tumor HER2/neu überexprimiert (immunhistochemischer Score von 3 +) und mindestens einen Durchmesser von 1 cm zeigt. Anti-HER2-Antikörper wie z.B. Trastuzumab oder Pertuzumab sollten für 12 Monate gegeben werden¹⁷.

Häufig werden von den Patientinnen auch komplementäre Therapien angewandt (1.3 Komplementärer Therapieansatz).

1.1.6 PRÄVENTION

Die Prävention ist ein Baustein der Medizin, der immer mehr an Bedeutung gewinnt. Allein durch das in Deutschland im Jahr 2005 eingeführte Mammografie-Screening gelang es, die Sterblichkeit altersabhängig um 20 – 40 % zu senken¹²⁷. Das sekundär-präventive Screening ist für alle Frauen zwischen dem 50. und 69. Lebensjahr alle 2 Jahre zusätzlich zu den bisherigen gynäkologischen Vorsorgeuntersuchungen empfohlen¹⁷. Für Frauen, die von einem hohen familiären Risiko betroffen sind, gilt die Empfehlung für das Mammografie-Screening bereits 5 Jahre vor dem familiären Erkrankungsalter¹²⁷.

Die primäre Prävention hat das Ziel darüber aufzuklären, was zur Entstehung eines Mammakarzinoms beiträgt und wie man dies gegebenenfalls verhindern oder zumindest das Risiko vermindern kann. Beeinflussbare Risikofaktoren sollten im Rahmen der allgemeinen Vorsorgen reduziert werden, wie zum Beispiel das Gewicht bei Adipositas, oder der Alkohol- und Nikotinkonsum (1.1.2 Ätiologie - Risikofaktoren). Das Aufbauen einer körperlichen Fitness und eine Ernährungsumstellung hinsichtlich einer gesünderen Ernährung sollen protektiven Einfluss auf die Genese von Brustkrebs nehmen. So wird einer mediterranen Ernährungsweise, bei der vor allem Obst und Gemüse sowie Vollkornprodukte konsumiert werden, sowie dem Verzehr von mehrfach ungesättigten Fettsäuren ein protektiver Effekt zugeschrieben^{31,98}. Empfohlen wird außerdem fünfmal pro Woche eine moderate körperliche Aktivität, dadurch kann eine Risikoreduktion um bis zu 25 % erreicht werden^{33,34}.

Die Empfehlung einer Chemoprävention für postoperative Patientinnen ist Teil der tertiären Prävention. Diese kann beispielsweise bei prämenopausalen Patientinnen, die über ein hohes Erkrankungsrisiko und einen positiven Hormonrezeptorstatus verfügen über fünf Jahre mit Tamoxifen erfolgen. Bei postmenopausalen Frauen mit erhöhtem Risiko empfiehlt man die Einnahme eines Aromatasehemmers oder eines SERMs, da sie davon mehr profitieren^{17,125}.

1.2 BENIGNE BRUSTERKRANKUNGEN

Häufig lösen Beschwerden in der Brust bei Frauen Verunsicherung und Angst aus, da vielen Betroffenen bewusst ist, dass Brustkrebs eine relativ häufige Erkrankung ist. Allerdings wird nur bei 3 – 6 % aller Patientinnen mit klinischen Symptomen ein Mammakarzinom detektiert. Bei der Mehrheit liegt eine benigne Erkrankung vor¹⁵². Bisher liegt das Hauptaugenmerk auf der Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms, es fehlen daher evidenzbasierte Handlungsempfehlungen für die benignen Erkrankungsbilder. Von diesen sind am häufigsten jüngere Frauen betroffen, so liegt der Erkrankungsgipfel zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr. Bei typischen Leitsymptomen wie Schmerzen, Tastbefund und Mamillensekretion ist eine klinische, radiologische und bei Bedarf eine histopathologische Diagnostik gefordert, um ein Malignom auszuschließen. Diese Symptomatik ist jedoch auch typisch für einige benigne Differenzialdiagnosen. Nach Ausschluss eines Karzinoms stehen die Linderung der Beschwerden, eine ausführliche Beratung und gegebenenfalls eine weitere Überwachung im Vordergrund. Benigne Erkrankungen der Brust dürfen nicht unterschätzt werden, da sie viele Frauen betreffen, oftmals mit einem hohen Leidensdruck einhergehen und zum Teil Jahre lang anhalten^{152,154}. Bei den benignen Brusterkrankungen handelt es sich um eine heterogene Gruppe, die oftmals mit Brustschmerzen einhergeht, beispielsweise bei der Mastodynie, jedoch unterschiedliche Ursachen haben und meistens nur ein geringes Entartungsrisiko zeigen. Es lassen sich drei Hauptgruppen abgrenzen, zu denen die entzündlichen Veränderungen (wie zum Beispiel die Mastitis puerperalis / - non puerperalis), die Mastopathie (am häufigsten hier die fibrozystische Mastopathie oder auch die radiäre Narbe) und letztendlich die benignen tumorösen Veränderung (z.B. Papillom, Fibroadenom, Hamartom) gehören^{135,152}.

Anbei werden die wichtigsten und häufigsten benignen Veränderungen der Brust beschrieben.

1.2.1 MASTODYNIE

Ein Synonym für die Mastodynie ist die Mastalgie, darunter versteht man Schmerzen der Brust, die entweder spontan oder durch Berührung ausgelöst vorkommen können. Der Brustschmerz ist keiner der oben genannten Gruppen zuzuordnen, da er sowohl mit anderen Erkrankungen zusammen als auch alleine auftreten kann. Über die Hälfte aller Frauen leidet unter Brustschmerzen, bei über einem Drittel dieser Betroffenen führt es zu einer Beeinträchtigung des Alltags- und Sexuallebens. Am häufigsten sind die Schmerzen bei den Frauen um das 30. Lebensjahr, zyklusabhängig, mit einem Höhepunkt von wenigen Tage prä- und perimenstruell. Zyklusunabhängige Schmerzen dagegen können auch ein Hinweis für eine maligne Erkrankung sein und bedürfen daher einer Abklärung^{85,152}. Sie kommen vor allem bei Frauen in einem mittleren Erkrankungsalter vor und sind schwierig zu therapieren. Zum Einsatz kann zum Beispiel das Unterspritzen mit einem Lidocain/Methylprednisolacetat – Gemisch kommen¹⁵⁴.

Zur Symptomlinderung der zyklusabhängigen Mastodynie tragen beispielsweise das Tragen eines gut sitzenden Büstenhalters, eine regelmäßige sportliche Aktivität, Analgetikatherapie (z.B. Diclofenc-Gel) und Entspannungsübungen bei. In Studien konnte auch gezeigt werden, dass die 2-3 monatige Einnahme der Phytotherapeutika Leinsamen und Mönchspfeffer zu einer Reduktion der zyklusabhängigen Mastodynie geeignet ist^{108,141}.

1.2.2 MASTOPATHIE

Die Mastopathie ist die häufigste gutartige Erkrankung der Brustdrüse, bei der es zu abnormen, proliferativen oder degenerativen Umbauprozessen des Brustdrüsenparenchyms kommt, die jedoch primär nicht von neoplastischer Natur sind¹³⁵. Mastopathie ist der Oberbegriff für verschiedene klinische und pathologisch-anatomische Veränderungen des weiblichen Brustdrüsenparenchyms. Es handelt sich dabei nicht zwingend um Erkrankungen, sondern teilweise eher um Störungen der Entwicklung, Reifung und Rückbildung der Brustdrüse. Daher gestaltet sich der Übergang zu Normvarianten fließend¹⁵².

Die fibrozystische Mastopathie ist die häufigste Form, diese weisen ca. 50 % aller Frauen ab dem 30. Lebensjahr auf. Bei dieser tumorösen Veränderung sind meist beide Brüste betroffen. Typisch ist eine zunehmende epithelisierte Zystenbildung, Fibrosierung und apokrine Metaplasie. Wie ausgeprägt der jeweilige Befund ist, kann individuell sehr verschieden sein, außerdem können nur einzelne Quadranten oder das gesamte Organ betroffen sein^{109,171}. Bei dieser Form der Mastopathie handelt es sich grundsätzlich um keine neoplastische Erkrankung. Jedoch kann sie sich unter spezifischen histopathologischen und klinischen Bedingungen mit einem bis zu 50 %igem Risiko zu einem malignen Mammakarzinom entwickeln⁵¹.

Vermutlich kommt es durch ein Ungleichgewicht der weiblichen Sexualhormone zu einer vermehrten estrogenen Stimulation bei relativem Progesteronmangel. Es resultiert eine proliferative Umwandlung des Brustdrüsenepithels und -mesenchyms. Ebenfalls können eine Hyperprolaktinämie, ein Progesteronmangel, eine Hyperandrogenämie und eine thyreoidale Fehlsteuerung ursächlich sein¹⁷¹.

Bei 20 % der betroffenen Frauen zeigen sich Makrozysten, welche Symptome verursachen können wie Schmerzen oder einen Tastbefund (glatt, elastisch, mobil). Die relevanteste diagnostische Methode bei Zysten ist die Sonografie, in der sich Zysten als glatt begrenzte, runde, echoleere / - arme Herdbefunde darstellen lassen¹⁵². Diese sind von komplexen Zysten sonografisch abzugrenzen, da letztere ein Malignomrisiko aufzeigen können und daher histologisch abgeklärt werden müssen.

Je nach Schweregrad kann sich die Erkrankung durch eine zyklusabhängige, prämenstruelle Mastodynie und eine Knotenbildung, bis hin zur klassischen Schrotkugelbrust manifestieren.

In der klinischen Untersuchung zeigt sich daher eine diffuse, druckdolente Verdichtung, welche oftmals im oberen äußeren Quadranten liegt^{135,171}.

Eine passende Therapie sollte individuell abhängig vom Krankheitsgrad und subjektiven Leidensdruck gewählt werden. Einfache physikalische Mittel, wie die Kryotherapie, können bereits helfen. Hormonhaltige Medikamente, entweder gestagenhaltig oder anti-estrogenhaltige Mittel, können lokal aufgetragen werden z.B. als Gele oder oral appliziert werden¹⁷¹. Zu einer Symptombesserung können auch phytotherapeutische Extrakte auf Alkoholbasis, z.B. Nachtkerzenextrakte, führen³⁸. GnRH-Analoga verringern den Estrogenspiegel über eine Senkung des LH- und FSH-Spiegels und wirken so krankheitsmildernd¹³⁶. Die Ultima Ratio stellt in schweren Fällen eine operative Knotenentfernung bis zur Mastektomie dar.

1.2.3 BENIGNE TUMORÖSE VERÄNDERUNGEN

Gutartige Mammatumoren können sich sowohl aus Drüsenepithel als auch aus Bindegewebe entwickeln oder stellen Mischformen dar. Häufig fallen sie durch derb veränderte, tastbare Strukturen auf. Am häufigsten kommen Fibroadenome und Milchgangspapillome vor¹³⁵.

Mit einer Prävalenz von 25 % stellen Fibroadenome die häufigsten gutartigen Tumoren der Brust dar. Sie zeigen einen Erkrankungsgipfel zwischen dem 15. und 35. Lebensjahr und betreffen somit häufig jüngere Frauen. Die Ätiologie konnte bisher noch nicht vollständig geklärt werden, man geht jedoch von einem hormonellen Einfluss aus. Dazu passend bilden sie sich in der Menopause meist zurück¹⁸. Im klinischen Tastbefund können sie eine Größe von bis zu 3 cm erreichen. Sonografisch können Fibroadenome bei jüngeren Frauen schnell wachsenden Mammakarzinomen ähneln. Pathogonomisch hingegen entspricht ihr mammografisches Bild einem glatt begrenzten Herdbefund mit popcornartigen Verkalkungen. Ein asymptomatisches Fibroadenom bedarf meist keiner weiteren Therapie^{152,154}. Falls die Patientin Beschwerden angibt, ein unklarer Befund vorliegt oder es der Wunsch der Patientin ist, besteht die Möglichkeit zur chirurgischen Exzision (> 2cm) oder zur sonografischen Vakuumsbiopsie¹⁵².

Phylloidtumoren, ca. 1 % aller Brusttumoren, gilt es davon abzugrenzen. Sie sind gekennzeichnet durch überschießendes Wachstum der Stromazellen, erhöhte Mitoseaktivität, eventuellen stromalen Zellatypien, einer Rezidivneigung und hohem Metastasierungspotenzial, weshalb sie wenn möglich mit einem Sicherheitssaum von 10 mm exzidiert werden sollen. Es kann sich dabei histopathologisch um einen benignen, malignen oder einen Borderline-Tumor handeln, die Einteilung kann jedoch nur am Operationspräparat erfolgen^{69,152}.

Papillome sind mit 5 – 10 % relativ häufige Ursachen für benigne Neubildungen der Brust¹⁵². Es handelt sich um intraduktale papilläre Proliferationen, die ein baumartiges, fibrovaskuläres

Stroma, das von Drüsenepithel und Myoepithel bedeckt ist, aufweisen. Dabei kommen epitheliale Hyperplasien relativ häufig vor, wobei Atypien eher selten vorkommen¹³⁵. Eingeteilt werden sie in zentral gelegene, solitäre intraduktale Papillome und in die meist peripher angesiedelten multiplen Milchgangspapillome, welche auch Papillomatose genannt werden. Klinisch imponieren sie oft durch spontane seröse oder blutige Mamillensekretion, teilweise auch als Tastbefund. Papillome stellen Risikoläsionen dar, da sie mit einem gesteigerten Malignitätsrisiko einhergehen. Bei Verdacht auf ein Papillom, sollte eine histologische Sicherung durch eine Biopsie erfolgen. Es ist die Übereinstimmung von Pathologie und Bildgebung zweifelsfrei zu belegen, da unvollständig entfernte Papillome wenn möglich vollständig zu exzidieren sind, in jedem Fall beim Vorliegen von Atypien^{152,154}.

1.2.4 ENTZÜNDLICHE BRUSTERKANKUNGEN

Die Entzündung der Brustdrüse, die Mastitis, kann unterteilt werden in die *Mastitis puerperalis*, wenn es im Zusammenhang mit der Laktation auftritt, oder in die *Mastitis nonpuerperalis*, welche alle Mastitisformen außerhalb der Laktationszeit zusammenfasst. Mittlerweile kommen beide Formen der Mastitis ungefähr gleich häufig vor, was vor allem daran liegt, dass in den letzten Jahren aus bisher ungeklärten Gründen, die Inzidenz der *Mastitis nonpuerperalis* stark gestiegen ist¹³⁵. Seltener entzündliche Brusterkrankungen sind zum Beispiel die granulomatöse Mastitis oder die Aktinomykosen^{135,154}. Ist nur die Brustwarze entzündet, spricht man von der Thelitis, welche vor allem durch Stillen auftreten kann.

Die Mastitis puerperalis, welche relativ häufig, bei etwa 17 % aller stillenden Mütter, meist in den ersten drei Monaten *post partum* auftritt¹⁰⁴, äußert sich durch Schmerzen, eine meist einseitige, lokale Rötung, Überwärmung und Schwellung der Brust, Fieber und Gliederschmerzen sowie durch einen reduzierten Allgemeinzustand. Anhand der typischen Symptomatik kann die Diagnose gestellt werden. Inkorrekte Stilltechniken, Stress und Schlafmangel zählen zu den Risikofaktoren, die eine Entstehung begünstigen. Meistens liegt eine bakterielle Genese zu Grunde, deren Erreger durch Epithelläsionen im Bereich der Mamille eintreten können. Bei dem Erreger, der aus dem kindlichen Nasen-Rachenraum stammt, handelt es sich zu > 90 % um *Staphylococcus aureus*^{135,152}. Die Erreger können durch Aszension in Kombination mit einem bestehenden Milchstau dann eine Infektion verursachen. Frühzeitige Diagnosestellung und Therapiebeginn sind von zentraler Bedeutung, da es sich histologisch um eine phlegmonöse Entzündung handelt, bei der es sekundär zur Abszedierung und Fistelbildung kommen kann. Therapeutisch am wichtigsten sind eine regelmäßige Milchentleerung der Brust und eine frühzeitige Antibiose über mindesten 10 Tage. Außerdem ist das Wärmen der Brust kurz vor dem Stillen und das Kühlen in Phasen der Stillkarenz empfohlen. Wenn sich spätestens

72 Stunden nach Therapiebeginn keine Besserung abzeichnet, sollte eine Abszedierung mittels Sonografie ausgeschlossen werden. Beim Vorliegen eines Abszesses sollte dieser durch Punktion entlastet werden. Während des Krankheitsverlaufs ist es weiterhin möglich zu stillen oder Milch abzupumpen. Häufig kann die *Mastitis puerperalis* durch eine richtige Stilltechnik, Vermeidung von Milchstauung und eine Pflege der Brustwarze vermieden werden^{135,152}.

Zu der *non-puerperalen Mastitis* gehören alle bakteriellen und abakteriellen Entzündungen, die nicht mit der Laktation zusammenhängen. Dazu zählen alle Formen der periduktalen Mastitis, die seltene granulomatöse Mastitis und auch iatrogen verursachte Entzündungen, beispielsweise nach Bestrahlung oder Operation. Bei allen Patientinnen ab dem 35. Lebensjahr ist es essentiell ein Mammakarzinom sicher auszuschließen. Dies sollte durch eine ausführliche Anamnese, eine klinische Untersuchung und den Einsatz der passenden bildgebenden Untersuchungsmethode (Sonografie oder Mammografie) erfolgen. Im Wesentlichen entsprechen die Symptome denen, der *Mastitis puerperalis*, jedoch kommt es nur selten zu einem Anstieg der Körpertemperatur. Charakteristisch ist eine schmerzhafte Rötung der Brust, die innerhalb weniger Stunden bis Tage entstanden ist¹³⁵.

Bei der abszedierenden *Mastitis nonpuerperalis* ist die sonografisch gestützte Abszesspunktion in Kombination mit einer Antibiose über mindestens 7 Tage die Therapie der ersten Wahl. Kommt es rezidivierend zu einer *non-puerperalen Mastitis* ist oft eine Milchgangsfistel mit Fistelgang im Bereich der Areola die Ursache, welche operativ durch Revision und Fistelgangexstirpation behandelt werden muss¹⁵².

1.3 KOMPLEMENTÄRER THERAPIEANSATZ

Unter Komplementärmedizin versteht man Methoden, die in Ergänzung zur konventionellen bewährten Medizin (sog. Schulmedizin) wirken sollen und so vor allem auch zur Linderung von Nebenwirkungen beitragen oder Stress und Ängste verringern sollen. Dies steht bei den komplementären Therapien im Gegensatz zur herkömmlichen Schulmedizin im Vordergrund, bei der es primär um die Heilung der Erkrankung geht¹⁶⁵. Bisher gibt es keine allseits anerkannte Definition für diesen Begriff. Der Begriff sollte laut Mediziner*innen nicht mit dem der „Alternativmedizin“ verwechselt werden, da die Komplementärmedizin nicht als Alternative zur Schulmedizin verstanden werden sollte, und daher etablierte konventionelle Verfahren nicht ersetzen sollte^{17,167}. Vielmehr ist die komplementäre Therapie dazu gedacht, bei Patientenwunsch die herkömmliche Schulmedizin zu unterstützen und mit ihr zusammen zu wirken. Von „integrativer Onkologie“ spricht man, wenn zur Unterstützung evidenzbasierter Tumorthérapien komplementäre Methoden eingesetzt werden^{17,66}. Diese können sehr vielseitig sein und reichen

von Homöopathie, Phyto- und Hydrotherapie, über physikalische Therapien bis zu Bewegungstherapien⁶⁶.

Inzwischen werden bereits weltweit über 40 % aller Tumorerkrankungen ergänzend zur konventionellen Therapie komplementär behandelt, dabei ist die Tendenz stets steigend¹⁰⁷. Durch Tumoren erkrankte Patienten zeigen ein besonders hohes Interesse an komplementären Therapiemethoden⁷⁴. In Deutschland nutzt beispielsweise jeder zweite onkologische Patient während seines Krankheitsverlaufs bereits eine komplementärmedizinische Methode. Bei Mammakarzinompatientinnen besteht ein besonderes Interesse, so nutzen über 75 % mindestens eine Methode der Komplementärmedizin^{17,83,107}. Es zeigt sich ein typisches Nutzerprofil: weiblich, eher jung mit einem höheren Bildungsstand⁸⁴. Dadurch wird ersichtlich, dass bei Patientinnen der onkologischen Gynäkologie, insbesondere von Brustkrebs Betroffene, ein überdurchschnittlich hohes Interesse gegenüber komplementären Therapieansätzen zeigen und solche auch häufig Gebrauch finden. Immer häufiger finden komplementäre Therapien Berücksichtigung in Leitlinien. Außerdem gibt es mittlerweile eine speziell auf Komplementärmedizin ausgerichtete S3-Leitlinie¹⁰². Daran wird deutlich, dass es für Ärzte wichtig ist, sich in diesem Bereich der Medizin ebenfalls auszukennen.

Ein potenzielles Risiko der Komplementärmedizin besteht, wenn Patienten ausschließlich auf komplementäre Behandlungsmethoden vertrauen und dadurch konventionelle Therapien vernachlässigen. Außerdem bergen mögliche Interaktionen zwischen Nahrungsergänzungsmitteln oder Phytotherapeutika mit anderen Arzneimitteln und eine dadurch negativ beeinflusste Wirksamkeit ein weiteres Risiko^{17,167}. Einige Phytotherapeutika werden deshalb aktuell noch überprüft, zum Beispiel führt die „CAM-Cancer Webseite“ (*Complementary and alternative Medicine for Cancer*) Informationen zur statistischen Relevanz alternativer Therapien und Pflanzenstoffe auf, sowie Empfehlungen für Mediziner³⁰. So heißt es laut einer S3-Leitlinie beispielsweise, dass Sojaextrakt Nebenwirkungen wie Hitzewallungen verbessern kann, allerdings auch eine abschwächende Wirkung auf die antihormonelle Therapie *in-vivo* und *in-vitro* zeigt¹⁷. Daher ist es wichtig, alle Patienten nach komplementären oder alternativen Therapiemethoden zu befragen und bei einer etwaigen Anwendung auf Risiken oder Wechselwirkungen mit Standardtherapien aufmerksam zu machen, wie es in der S3-Leitlinie des Mammakarzinoms ebenfalls empfohlen ist.

1.4 HOMÖOPATHIE

Die Homöopathie ist eine Heilmethode die bereits vor etwa 200 Jahren vom deutschen Arzt Samuel Hahnemann (*1755 - † 1843) maßgeblich begründet und von ihm nahezu allein vollendet wurde⁶¹. Sie beruht auf drei Grundprinzipien: der Ähnlichkeitsprüfung, der Lebenskraft und der Potenzierung⁷⁸.

Zur Zeit Hahnemanns kamen oft gefährliche medizinische Behandlungen zum Einsatz, wie beispielsweise die Therapie mit Aderlässen oder die hochdosierte Verabreichung von toxischen Medikamenten, wie z.B. Quecksilber^{53,61}. Hinzukommt, dass damals das Verständnis der Naturgesetze noch nicht soweit ausgereift war wie heute, weshalb die Ideen Hahnemanns weniger unglaublich erschienen als heute⁵³. So fanden seine selbst hergestellten homöopathischen Arzneimittel eine hohe Nachfrage und seine Behandlungen führten zu einem baldigen, weltweiten Erfolg⁵⁴.

Heutzutage wird die Homöopathie vor allem in Indien, Deutschland und Frankreich sowie Teilen Südamerikas nachgefragt⁵³.

1.4.1 DIE PRINZIPIEN

Ähnlichkeitsprinzip:

Im Jahr 1790 führte Hahnemann einen Selbstversuch mit der Chinarinde durch, welcher später die Begründung der Ähnlichkeitsregel darstellte⁷⁸. Durch 2-mal tägliches Kauen von 15 g Chinarinde, bemerkte er Symptome, die denen von an Malaria Erkrankten ähnelten. Dadurch zog er den Rückschluss, dass Arzneimittel, die an Gesunden typische Krankheitssymptome erzeugen, Erkrankte, die diese Symptome ebenfalls zeigen, heilen können.

Damit begründete Hahnemann die Grundlagen der Homöopathie: „*Similia similibus curentur*“ = Ähnliches werde durch Ähnliches geheilt^{61,78}.

Lebenskraft:

Hahnemann war der Meinung, dass es eine dem Organismus übergeordnete Kraft aller Lebensfunktionen gibt, welche unsichtbar das Leben in Gang hält. Während völliger Gesundheit wohnt diese geistartige Lebenskraft (Dynamis) in einem und der Geist kann sich dessen zu gesundheits- und höheren Zwecken frei bedienen.

Bei Krankheit wiederum liegt eine Verstimmung der besagten Lebenskraft zugrunde, welche sich in unterschiedlichen Symptomen äußern kann⁷⁸.

Potenzierung:

Da oftmals sehr toxische Arzneimittel zur Anwendung kamen, entwickelte Hahnemann eine weitere Methode, um unerwünschte und starke Nebenwirkungen zu verhindern. Durch die Potenzierung, welche auf Verdünnen und zwischenzeitliches Verschütteln (= Dynamisation) beruht, fand er heraus, dass es zur Verringerung der Vergiftungserscheinungen kam, bei einer gleichzeitigen Verstärkung der Arzneikraft⁶¹.

Dies erfolgt, indem ein Teil der Urtinktur (= Extrakt) entweder mit 9 Teilen einer Alkohol- / Wassermischung vermischt wird ($\triangleq 1:10 = D\ 1$ für dezi) bzw. mit 99 Teilen ($\triangleq 1:100 = C\ 1$ für centi). Anschließend wird es 100-mal mit gleichmäßiger Kraftaufwendung auf einen elastischen, harten Boden gestoßen. Im folgenden Schritt wird wieder ein Teil der D 1 oder C 1 Lösung mit jeweils 9 bzw. mit 99 Teilen einer Alkohol- / Wassermischung miteinander verschüttelt. So erhält man nach obigem Schema die Potenzen D 2 bzw. C 2, dabei geben die Zahlen hinter dem Buchstaben den entsprechenden Potenzierungsschritt an (Abbildung 2). Heutzutage versteht man unter Tiefpotenzen die D-Potenzen (D 6 und D 12) oder C-Potenzen wie C 12. Ihnen wird vor allem eine organotrope Wirkung nachgesagt. Zu den Hochpotenzen zählen die C-Potenzen (ab C 30) sowie alle höheren Potenzen. Hierfür werden vor allem Wirkungen auf der Geist-Gemüts-Ebene zugeschrieben. Je höher die Potenzen, desto höher die Wirkung, weshalb das Arzneimittelbild und die Symptome des Patienten umso besser übereinstimmen müssen, je höher die gewählte Potenz ist, um unerwünschte Arzneimittelnebenwirkungen zu verhindern^{53,78}.

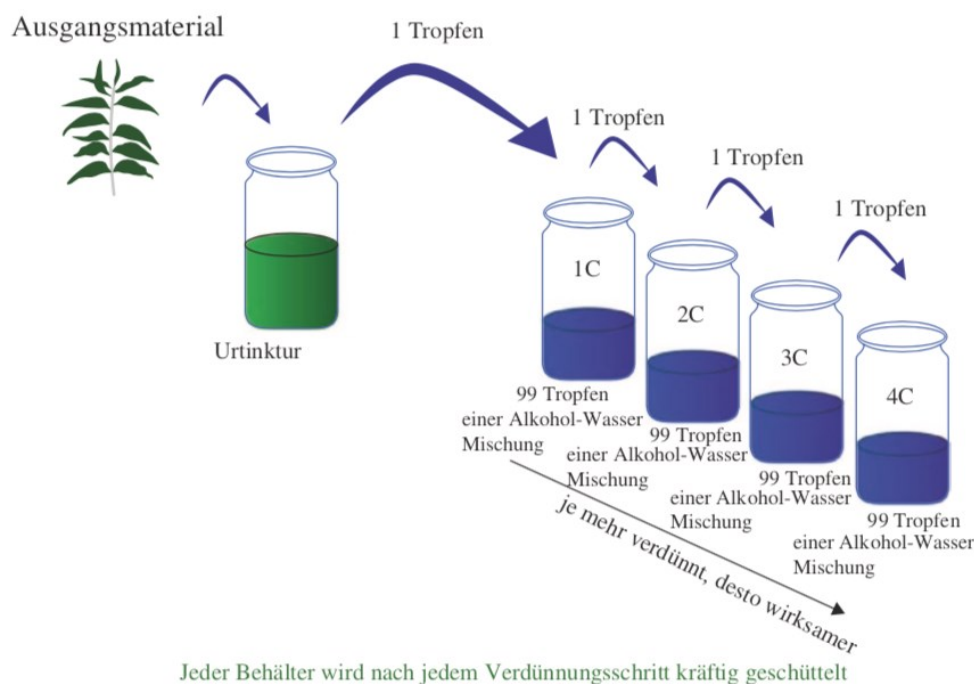


ABBILDUNG 2: Herstellungsprinzip der Potenzierung bei homöopathischen Arzneimitteln. Neben der seriellen Verdünnung findet nach jedem Schritt auch die Dynamisation statt⁵³. Aus Edzard Ernst: Heilung oder Humbug?

1.4.2 KLINISCHE ANWENDUNG

In der praktischen Anwendung ist laut einigen Heilpraktikern die ausführliche Anamnese besonders wichtig, da aufgrund dieser das probate Mittel gewählt wird. Dabei stehen Fragen der Causa und Ätiologie (wodurch ist die Krankheit entstanden?), nach der Empfindung und Lokalisation der Beschwerden, nach Begleitsymptomen, nach Modalitäten (was führt zu einer Verschlechterung oder Besserung der Beschwerden?), sowie nach der Geistes- und Gemütslage des Patienten im Vordergrund. Es folgt eine Hierarchisierung der Symptome anhand ihrer Intensität, Vollständigkeit und der absteigenden Rangfolge von Geistes- und Gemütsymptomen, sowie Allgemeinsymptomen und Lokalsymptomen. Das passende Mittel wird mithilfe der Symptomverzeichnisse ausgewählt^{61,78}. Akute Erkrankungen sollten bevorzugt mit C 30 oder D-Potenzen und in häufigen Zeitabständen (z.B. alle 5 – 60 min) eingenommen werden. Für chronische Erkrankungen wiederum ist die Einnahme von Hochpotenzen wie beispielsweise C 200 in großen Zeitabständen (im Wochen- bis Monatebereich) empfohlen. Dabei gilt, dass die Arzneimittel erst wieder genommen werden sollen, wenn die ursprünglichen Symptome wieder auftreten und nicht, solange die Besserung der Beschwerden anhält.

Nach der Einnahme von homöopathischer Arznei darf es kurzzeitig zur Zunahme der Symptome kommen, die jedoch nach kurzer Zeit verschwinden sollten. Diese Erstreaktion lässt jedoch erkennen, dass es sich vermutlich um das passende Mittel handelt, weil es die im Körper bereits vorhandenen Symptome verstärkt⁷⁸. Von einer Heilung spricht man, wenn die Symptome von innen nach außen, von oben nach unten oder in gegensätzlicher Reihenfolge zu deren Auftreten wieder verschwinden, was man als Hering-Regel bezeichnet.

Bevorzugt sollte die homöopathische Konstitutionstherapie von einem Heilpraktiker als Monotherapie erfolgen, da es durch Interaktionen mit anderen Pharmaka sonst zu Wirkbeeinträchtigung kommen könnte.

Prinzipiell ist die Behandlung aller Krankheiten mit Homöopathie möglich. Dabei können Beschwerden vor allem gelindert werden, wohingegen bestehende Organschäden nicht behoben werden können. Bei psychosomatischen Erkrankungen und funktionellen Erkrankungen konnten gute Behandlungserfolge verbucht werden⁶¹. Außerdem kann sich die Krankheitsdauer verkürzen sowie Komplikation bei Infektionskrankheiten gemieden werden. Zu beachten ist einerseits, dass die homöopathische Behandlung in schweren akuten Krankheitszuständen nicht allein eingesetzt werden sollte und andererseits auch die allopathische Medikation nicht plötzlich abgesetzt werden sollte. Bei der Wahl des passenden Präparats sollte das zweite getestete Mittel eine positive Wirkung zeigen, ansonsten sollte um Nebenwirkungen zu vermeiden, auf eine andere Therapiemethoden zurückgegriffen werden^{61,78}. Die Produktion homöopathischer Arzneimittel erfolgt nach dem Europäischen homöopathischen Arzneibuch unter hohen Qualitätsstandards. Dabei ist die Dokumentation der Herkunft der verwendeten Substanzen und die exakte Berücksichtigung der Herstellungsrichtlinien von Bedeutung⁶¹.

1.4.3 KRITIK AN DER METHODE

Oft wird die Homöopathie mit der Phytotherapie verwechselt oder gleichgesetzt, wobei sie sich grundlegend unterscheiden. Bei pflanzlichen Arzneimitteln verfügen die Pflanzenextrakte über potenziell aktive Inhaltsstoffe. Die Homöopathischen Arzneimittel basieren zwar oft auf Pflanzen, sind jedoch in der Regel soweit verdünnt, dass von der ursprünglichen Substanz kein Molekül mehr vorhanden ist (1.4.1 Die Prinzipien)⁵³. Durch die Verschüttlung soll die „Lebenskraft“ des Heilmittels sich auf die nächste Verdünnung übertragen und dabei sogar noch wirksamer werden. Aus der Sicht der konventionellen Medizin ist es schwer nachzuvollziehen, wie das Ähnlichkeitsprinzip wirken soll, in dem Ähnliches mit Ähnlichem behandelt wird. So müsste laut diesem Prinzip ein Reizzustand wie beispielsweise ein gereiztes, tränendes Auge, durch weitere Reizung behandelt werden (z.B. mit einer Zwiebel), was aus konventioneller Sicht zu keiner erklärbaren Heilung führen könnte⁵³.

Dabei widersprechen diese Annahmen den heute bekannten Naturgesetzen. Was wiederum implizieren würde, dass die Homöopathie nur funktionieren kann, wenn unsere Naturgesetze nicht richtig sind⁵³.

Seit jeher ist die Debatte über die Wirkung der Homöopathie ein Thema und sie ist so alt wie die Homöopathie selbst. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von klinischen Studien veröffentlicht, dabei waren die Ergebnisse weder ausschließlich negativ, noch ausschließlich positiv. Jedoch zeigte die bisherige Studienlage im Großen und Ganzen keine Evidenz, dass homöopathische Arzneimittel mehr Wirkung als Placebos besitzen.

Um das Problem des selektiven Zitierens lösen zu können, wurde eine Metaanalyse als systematische Übersicht aller zuverlässigen Belege sowie deren Bewertung erstellt. Insgesamt sechs Artikel der „Cochrane Database of Systematic Reviews“ erfüllten die Einschlusskriterien. Diese Metaanalyse konnte nicht bestätigen, dass homöopathische Arzneimittel eine über Placebo hinausgehende Wirkung besitzen^{53,55}.

Dennoch ist zu beachten, dass viele Patienten eine unbestreitbare Beschwerdebesserung nach der Einnahme eines homöopathischen Arzneimittels feststellen.

Jedoch ist davon auszugehen, dass diese Verbesserung nicht zwingend mit dem homöopathischen Mittel an sich zusammenhängt. So wird vermutet, dass sie ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren ist, wie beispielsweise einer ausführlichen, einfühlsamen und empathischen Beziehung zu einem Homöopathen in Kombination mit einem Placebo-Effekt oder anderen Faktoren. Dies bezeichnen Experten gerne als „Kontexteffekte“⁵³. Diese Erkenntnis, nämlich dass es nicht die homöopathischen Mittel an sich sind, die dem Patienten helfen, sondern die einfühlsamen, therapeutischen Begegnungen, konnte in Studien belegt werden^{24,46,53,56}.

1.5 TESTSUBSTANZEN

Im folgenden Abschnitt werden die Testsubstanzen, welche für die Untersuchungen zum Einsatz kamen, näher erläutert.

1.5.1 PHYTOLACCA AMERICANA

Die in Nordamerika verbreitete Amerikanische Kermesbeere (= *Phytolacca americana* oder *Phytolacca decandra*) gehört zur Gattung der Kermesbeeren (*Phytolacca*) innerhalb der Familie der Kermesbeerengewächse (*Phytolaccaceae*)^{59,96}. Nach Europa muss sie spätestens im 17. Jahrhundert eingeführt worden sein, da sie zu dieser Zeit bereits in verschiedenen Listen Erwähnung fand⁶. Heute kommt sie in Mitteleuropa als Kulturpflanze vor, in südlichen Teilen Europas, wie zum Beispiel in der Südsteiermark, ist sie teils verwildert und zerstreut aufzufinden⁶³.

Der Name setzt sich aus dem griechischen „Phyton“ für Pflanze und dem italienischen „Lacca“ zusammen, was für „Lack“ steht. Es bezieht sich auf den purpurroten Saft der Früchte^{116,151}.

Bei der Kermesbeere handelt es sich um eine ausdauernde, krautige Pflanze, die eine Wuchshöhe von bis zu 3 m erreichen kann. Das charakteristische Erscheinungsbild ist von dem meist purpurfarbenen, kräftigen, gabelig verzweigten und gefurchten Stängel, sowie von den im Bogen überhängenden, traubigen Blüten- und Fruchständen geprägt, welche von Juli bis September blühen. Während des Reifungsprozesses werden die schwarz bis purpurfarbenen Früchte zunehmend glatter, kugelig und verlieren ihr gefurchtes Erscheinungsbild⁵⁹.



ABBILDUNG 3: *Phytolacca Americana*

links: von www.heilpflanzenwissen.at⁶³,

Mitte + rechts: aus dem „Heilpflanzengarten“ der Universität Hohenheim.

Durch die enthaltenen Saponine und Lektine ist die Pflanze roh giftig und schleimhautreizend. Beim Verzehr kommt es neben Erbrechen und blutigen Durchfällen auch zu Schwindel sowie Blutdruckabfällen. In schweren Fällen können Krämpfe und Atemlähmungen, die bis zum Tod führen können, auftreten⁹⁶. Der Saft der fast schwarzen, reifen Früchte ist stark toxisch. Eine Menge von bis zu ca. 10 Beeren gelten bei Erwachsenen jedoch als harmlos, für Kleinkinder kann diese Menge gefährlich sein⁵⁰. Früher wurden die Beeren vor allem zum Färben von Rotwein oder als wenig permanente Tinte eingesetzt. Außerdem fand die Kermesbeere in Nordamerika auch als Brech- und Abführmittel Verwendung.

Neben Verwendungen als Brech- und Abführmittel fand die Kermesbeere ihren Gebrauch im Einsatz gegen Rheuma, anderen Autoimmunerkrankungen, Ulkus, Drüsenschwellungen, Bronchitis und Krebs. Außerdem wird den getrockneten Beeren und Wurzeln eine schmerzstillende, entzündungshemmende, antirheumatische und narkotisierende Wirkung nachgesagt⁹⁶.

1.5.1.1 PHYTOLACCA GLOBULI

Bei der Zubereitung des homöopathischen Mittels Phytolacca wird die ganze Pflanze verarbeitet und entsprechend der homöopathischen Lehre potenziert⁷⁹. Es soll eine tiefgreifende Wirkung haben, welche sich vor allem an Drüsengewebe, insbesondere auf die Brustdrüse und Ohrspeicheldrüse, sowie auf das Bindegewebe und die Muskeln zeigt¹²¹. Außerdem könne Phytolacca auch bei Krebsgeschwülsten ergänzend nützlich sein⁵⁰, denn dem Mittel wird eine ausgeprägte Wirkung auf das Lymphsystem, vor allem auf die Brustdrüse und auf die Mandeln im Rachenraum, nachgesagt. So wird es von Heilpraktikern zum Beispiel für Patienten mit Halsschmerzen, die sich zu einer Rachenentzündung entwickeln können oder auch für Frauen mit jeglicher Art von Brustbeschwerden empfohlen⁵⁰.

Beispielsweise wird Phytolacca bei Mastodynie vor und während der Menstruationsblutung und bei Neigung zu entzündlichen Prozessen wie einer Mastitis empfohlen. Außerdem bei Mastopathie, bei Galaktorrhö, wenn es zu gespannten Brüsten mit Knotenbildung kommt, oder bei einem erschwerten und verzögerten Milcheinschuss, der wiederum zu gestauten und harten Brüsten führt¹⁷².

Da Phytolacca in der Literatur ein homöopathisches Mittel darstellt, das vor allem bei gynäkologischen Beschwerden seinen Einsatz finden kann, und so beispielsweise auch als „Heilmittel bei Frauenleiden“ bezeichnet wird⁷⁹, wurde es in dieser Arbeit gewählt, um es an den verschiedenen Mammazelllinien zu testen.

1.5.2 ENDOXIFEN

Bei Endoxifen handelt es sich um einen aktiven Metaboliten von Tamoxifen, einem selektiven Estrogen-Rezeptor-Modulator (SERM), der mit einer höheren Affinität an den Estrogenrezeptor (ER) bindet und dadurch bis zu 100-mal wirksamer ist als Tamoxifen selbst⁴. Da Tamoxifen über CYP2D6 Enzyme zu Endoxifen metabolisiert wird, können beispielsweise CYP2D6-hemmende Medikamente die Bildung von Endoxifen verringern, was wiederum zu einer abgeschwächten Wirkung führen kann. Es zeigt sich in mehreren Studien, dass direkt verabreichtes Endoxifen gegenüber Tamoxifen überlegen ist^{1,88,120}.

Endoxifen wirkt einerseits über eine antagonistische Bindung am ER auf ER-positive Mammazellen, indem es deren Wachstum hemmt. Andererseits wirkt es am Endometrium und im Knochengewebe schwach agonistisch^{64,174}. Mehrere Studien zeigen inzwischen auch eine Wirkung von Tamoxifen und Endoxifen auf ER-negative Mammazellen, da sie über viele verschiedene Mechanismen wirken können^{2,64,133}.

Tamoxifen ist nach wie vor für prämenopausale Brustkrebspatientinnen für eine adjuvante Therapie bei ER-positiven Mammakarzinomen empfohlen¹⁷. Dadurch ist sowohl die Wahrscheinlichkeit für ein Rezidiv um etwa 40 % verringert, als auch das Versterben um etwa 30 %⁴⁷. Bei postmenopausalen Patientinnen mit einem ER-positiven Tumor kann Tamoxifen zusätzlich zu den Aromatasehemmern verabreicht werden¹⁷.

Außerdem kann Tamoxifen auch als Off-Label-Use bei Mastodynie für 3-6 Monate verschrieben werden, es konnte dafür eine Besserung der Symptome gezeigt werden¹⁵².

Endoxifen wurde bei dieser Arbeit als positive Kontrollsubstanz verwendet, da es auf die ER-positiven Mammazelllinien, sowie auch potenziell auf die ER-negativen Zelllinien, eine zytotoxische Wirkung zeigt.

1.5.3 ESTRADIOL

Das aromatisierte C18 - Steroid Estradiol stellt den Hauptvertreter der Estrogene dar. Die hauptsächliche Produktion findet im Ovar und den Thekazellen des Graaf-Follikels statt, geringe Mengen in der Nebennierenrinde und den Hoden. Die Synthese von Estradiol erfolgt über Androgene, die durch eine Aromatase in Estradiol umgewandelt werden können. Dadurch kann es in Geweben mit vorhandener Aromataseaktivität gebildet werden, was beispielsweise im Fettgewebe der Fall ist. Die Plazenta stellt einen weiteren Bildungsort des Hormons während der Schwangerschaft dar. Es wirkt sowohl stimulierend auf das Wachstum der Genitalorgane, so führt es zu einem Wachstum der Brustdrüsen, des Uterus und der Vagina, als auch extragenital. Dadurch kommt es zum Knochenwachstum und zur Mineraleinlagerungen in den Knochen, weshalb es beispielsweise auch zur Osteoporoseprophylaxe genutzt wird⁶⁰. Über die Bindung an Estrogenrezeptoren (ER) wirkt Estradiol auf den weiblichen wie auch auf den männlichen Reproduktionstrakt.

Es gibt zwei verschiedene Formen von Estrogenrezeptoren: Den ER- α und - β , wobei die Affinität zum α -Rezeptor deutlich höher ist als die zum β -Rezeptor^{69,80}. Dem ER- α wird eine zellteilungsfördernde Wirkung zugeschrieben, wohingegen der ER- β bei Aktivierung die Proliferation beeinträchtigt. Somit zeigen die beiden Rezeptoren eine gegensätzliche Wirkung²⁹.

Für das Mammakarzinom nimmt Estradiol die Rolle des Promotors ein, dadurch können langfristig erhöhte Serumspiegel von Estradiol mit einem höheren Risiko an Brustkrebs zu erkranken einhergehen^{86,147}. Das ist der Grund, warum Estradiol als potenziell proliferationssteigernde Kontrollsubstanz in dieser Arbeit verwendet wurde und damit die Negativkontrolle (= keine hemmende Wirkung) darstellt.

1.5.4 SEKUNDÄRE PFLANZENSTOFFE

Ohne den Primärstoffwechsel, welcher auch Grundstoffwechsel genannt wird, wäre eine Pflanze nicht lebensfähig. Er ist bei allen Pflanzen ähnlich und beinhaltet beispielsweise die Metabolisierung von Kohlenhydraten, Fetten, Proteinen und Nucleinsäuren^{26,75}.

Die sekundären Pflanzenstoffe sind wiederum Metabolite, die während des Sekundärstoffwechsels einer Pflanze entstehen. Sie sind zwar nicht überlebensnotwendig, übernehmen jedoch entscheidende ökologische Aufgaben im Stoffwechsel einer Pflanze und bringen ihr so einen Umweltvorteil^{42,122}. Durch die enge Verknüpfung des sekundären Stoffwechsels mit dem primären können oft Zwischenprodukte für die Bildung der sekundären Pflanzenstoffe weiterverwendet werden⁷⁵. Die sekundären Pflanzenstoffe zeigen eine hohe Variabilität innerhalb der einzelnen Pflanzenarten, weshalb sie oft für die verschiedenen Wirkungen der Pflanzen verantwortlich sind. Unter anderem gelang es gesundheitsfördernde Effekte nachzuweisen, wie beispielsweise entzündungshemmende, blutdrucksenkende, antioxidative oder antikarzinogene Effekte^{26,39}.

Je nach chemischer Struktur und funktioneller Eigenschaft lassen sich die sekundären Pflanzenstoffe in Gruppen wie z.B. Polyphenole oder Phytoestrogene einteilen.

Letztere bezeichnen eine Gruppe, die eine Strukturähnlichkeit zum körpereigenen Estrogen verbindet. Dadurch können sie über eine Bindung am Estrogenrezeptor eine estrogene Wirkung erzeugen⁷. Zu der Gruppe der Phytoestrogene zählen auch die Isoflavonoide, wie beispielsweise Genistein und Daidzein (Abbildung 4). Diese kommen unter anderem in Obst, Gemüse, Samen, Kichererbsen und Sojaprodukten vor^{7,26}. Über ihre hormonelle Wirkung üben sie Einfluss auf den Körper aus und werden deshalb beispielsweise bei klimakterischen Beschwerden oder postmenopausaler Osteoporose eingesetzt^{65,76}. Sie können dadurch auch bei einer Hormonersatztherapie zum Einsatz kommen¹⁷⁷. Die Wirkung bei Brustkrebspatientinnen wird zwar häufig postuliert, ist jedoch umstritten^{7,65,117}.

Zur Gruppe der Polyphenole zählen die Flavonoide, die über zwei aromatische Ringe verfügen. Diese sind über eine C3-Brücke miteinander verbunden, anhand deren Unterschiede sie

in verschiedenen Untergruppen unterteilt werden (Abbildung 4). Dazu gehören unter anderem die bereits erwähnten Isoflavonoide. Außerdem bilden die Flavonole eine weitere Untergruppe der Flavonoide, zu der Quercetin und Kämpferol zählen¹⁷⁷. Alle höheren Pflanzenarten verfügen über Flavonoide, jedoch fehlen sie bei Bakterien, Algen und Pilzen, sowie im Tierreich⁷⁵. Sie sollen über viele gesundheitsfördernde Wirkungen verfügen und sind vor allem in Obst- und Gemüsesorten wie beispielsweise Zwiebeln und Orangen vorhanden^{11,143}.

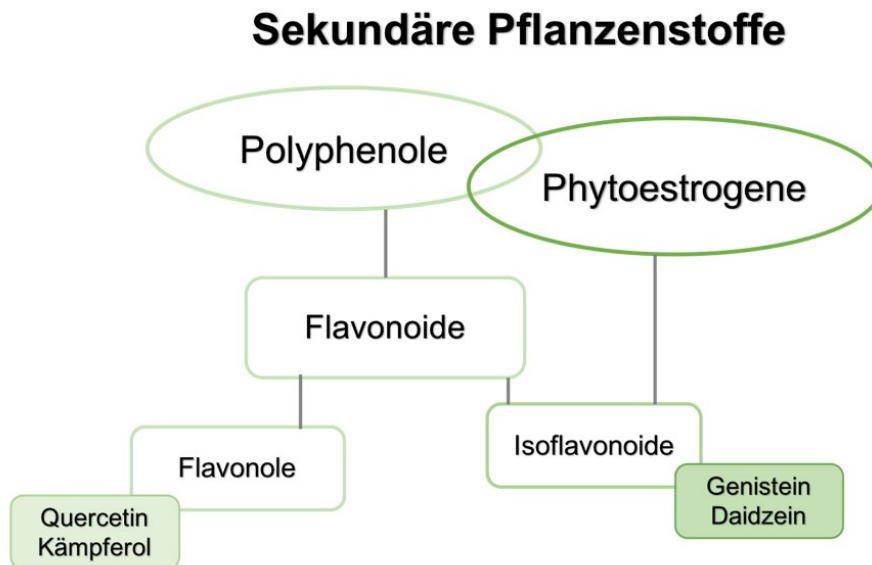


ABBILDUNG 4: Übersicht über die sekundäre Pflanzenstoffe und die Zuordnung von Quercetin, Kämpferol, Genistein und Daidzein.

Die Isoflavonoide Genistein und Daidzein, sowie die Flavonole Quercetin und Kämpferol sollen in dieser Arbeit als Referenzen in der HPLC-Untersuchung dienen, um zu untersuchen, ob diese sekundären Pflanzenstoffe Bestandteile in *Phytolacca* sind.

II. ZIELSTELLUNG

Benigne Erkrankungen der Brust sind häufig der Grund für eine Konsultation des Gynäkologen und können teilweise ein Risikofaktor für die Entstehung eines Mammakarzinoms sein, der häufigsten Krebserkrankung der Frau. Die Nachfrage nach Angeboten im Rahmen der Komplementärmedizin ist steigend, vor allem Frauen zeigen ein gesteigertes Interesse daran, so hat die Anwendung komplementärer Therapien beim Mammakarzinom in letzter Zeit zunehmend an Bedeutung gewonnen. Die Homöopathie ist eine von vielen komplementären Heilmethoden, die einerseits viele Befürworter zählt, andererseits jedoch auch oft in der Kritik steht und kontrovers diskutiert wird. Einen Hauptgrund dafür stellt die momentane Studienlage dar. Zum jetzigen Zeitpunkt konnte in wissenschaftlichen Studien fast nie eine über den „Placebo-Effekt“ hinausgehende Wirkung von Homöopathie nachgewiesen werden. Vor allem homöopathische *in-vitro* Studien sind kaum zu finden. Eine dieser wenigen Studien zeigte jedoch eine Wirkung verschiedener homöopathischer Mittel auf Krebszellen (unter anderem von *Phytolacca* auf MCF-7 Zellen), weshalb Arora *et al.* zu weiteren Studien aufrufen¹².

Außerdem gibt es mehrere Beobachtungsstudien, die eine vermeintliche Wirkung der Homöopathie aufzeigen. Nachdem das Interesse an Homöopathie bei vielen gynäkologischen Patientinnen vorhanden ist, bedarf es weiterer wissenschaftlicher Studien auf diesem Gebiet.

Aufgrund dieser Vorüberlegungen soll experimentell überprüft werden, ob ein homöopathisches Arzneimittel (*Phytolacca*) *in-vitro* das Wachstumsverhalten von verschiedenen Mammazelllinien beeinflusst. *Phytolacca* sind „Globuli“ die aus der amerikanischen Kermesbeere gewonnen werden und bei verschiedenen gynäkologischen Indikationen, wie beispielsweise einer Brustentzündung, von Homöopathen empfohlen werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, aus dem homöopathischen Arzneimittel *Phytolacca* (in den Dosierungen C 12, C 30, C 200) Extrakte mit unterschiedlichen Verdünnungen herzustellen und deren *in-vitro* Wirkung mithilfe verschiedener Zelltests zu untersuchen. Nachdem die Extrakte mittels HPLC qualitativ auf Inhaltsstoffe untersucht worden sind, werden sie bezüglich ihrer Wirkung auf Zellviabilität, Zytotoxizität, Zellproliferation und die Stoffwechsellage überprüft.

Die Untersuchungen erfolgen an kommerziell erworbenen benignen und malignen Mammazelllinien mit jeweils unterschiedlichem Hormonrezeptorstatus: maligne pos.: MCF-7, maligne neg.: MDA-MB-231, benigne pos.: MCF-12A, benigne neg.: MCF-10A. Dadurch soll eine Differenzierung der Ergebnisse hinsichtlich Dignität und Rezeptorstatus ermöglicht werden. Als Referenzen kommen sekundäre Pflanzenstoffe zum Einsatz. Außerdem dienen als Kontrollen Endoxifen, Estradiol und ein „Zuckerwasser-Extrakt“, da Saccharose die Trägersubstanz der „Globuli“ darstellt.

Die Arbeit soll Hinweise geben, ob das homöopathische Mittel *Phytolacca* dafür geeignet sein könnte, auf Brusterkrankungen positive Einflüsse zu haben.

III. MATERIAL UND METHODEN

3.1 MATERIAL

Im folgenden Abschnitt werden die Geräte, Gebrauchsmaterialien und Chemikalien/Reagenzien aufgelistet, die während der Arbeit im Labor verwendet wurden und zur Erstellung der Ergebnisse nötig waren. Die Auflistung erfolgt in alphabetischer Reihenfolge in tabellarischer Form.

3.1.1 GERÄTE

Anbei die Auflistung der Geräte, die für die Herstellung der Testsubstanzen, die Zellpflege und Durchführung der Versuche benötigt wurden.

TABELLE 1: Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank	Function Line	Heræus Instruments
Eismaschine	AF 80	Scotsman
Glukose-/Laktat – Automat	Biosen 5140	EKF - Diagnostic
Hochleistungsflüssigkeits – Chromatograph (Hplc)	Smartline Manager 5000 Smartline Pump 1000 Smartline UV-Detector 2500 Smartline RI Detector Smartline Column Thermostat	Knauer
HPLC – Säule	Vertex – Säule 250 x 4 mm Eurospher 100-5 C 18 mit integrierter Vorsäule	Knauer
HPLC – Injektionsspritze	100 µl Injektionsspritze	Knauer
HPLC – Software	ClarityChrom V 2.6.	Knauer
Microplate Reader	Modell 680	Bio Rad
Mikroskop	Axiostar Plus	Zeiss
Mikroskop	Axiovert 40 C	Zeiss
Mikroskop – Kamera	AxioCam MRc	Zeiss
Multimode Reader	Discover SP	Promega
Multipipette	Multipipette Plus	Eppendorf
PH – Messelektrode	Orion 3 Star pH Benchtop	Thermo Scientific
Plattenrüttler	TPM – 2	Sarstedt
Rollenmischer	RM 5	Hecht

Sicherheitswerkbank	Hera Safe	Heræus Instruments
Ultraschallbad	Emmi®-H22	EMAG AG
Vakuum – Konzentrator - Zentrifuge	Concentrator 5301	Eppendorf
Vakuumpumpe	Vacuum Pump MZ 2 NT	Vacuubrand
Vortexer	Reax 2000	Heidolph
Waage	MT5	Mettler Toledo
Waage	Sartorius Basic	Sartorius AG
Wärmeschrank	SM400	Memmert
Zentrifuge	Biofuge pico	Heræus Instruments
Zentrifuge	Universal 320R	Hettich

3.1.2 GEBRAUCHS- UND VERBRAUCHSMATERIALIEN

Anbei die Auflistung der Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien, die für die Herstellung der Testsubstanzen, die Zellpflege und Durchführung der Versuche verwendet wurden.

TABELLE 2: Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
1,5 ml Zentrifugationsröhrchen	Greiner bio-one
15 ml Zentrifugationsröhrchen	TPP (Techno Plastic Products AG)
50 ml Zentrifugationsröhrchen	Greiner bio-one
24 – Well Zellkultur Testplatte, transparent	TPP (Techno Plastic Products AG)
96 - Well Zellkultur Testplatte, transparent	Greiner bio-one
96 - Well Zellkultur Testplatte, weiß	Promega
Aufsätze Multipipette 3 – 200 µl	Eppendorf
Bürker - Zählkammer	Fein – Optik
Ethanol 70 %	Roth
Ethanol 90 %	Roth
Filter für 50 ml Zentrifugationsröhrchen (0,45 µm Porengröße)	Greiner bio-one
Glaspipette 10 ml	Greiner bio-one
Glucose Standard Cups	CARE diagnostica
Methanol	Roth
Multipipette Plus	Eppendorf

Parafilm	American National Can
Pipettenspitzen (10 – 5000 µl)	Sarstedt AG
Tubes (1,5 ml und 50 ml)	Greiner bio-one
Zellkulturflasche 50 ml (25 cm²)	Greiner bio-one
Zellkulturflasche 250 ml (75 cm²)	TPP (Techno Plastic Products AG)
Zellkulturflasche 550 ml (155 cm²)	Greiner bio-one

3.1.3 CHEMIKALIEN, REAGENZIEN UND TESTSUBSTANZEN

Anbei die Auflistung der Chemikalien und Reagenzien, die für die Herstellung der Testsubstanzen, die Zellpflege und Durchführung der Versuche genutzt wurden.

TABELLE 3: Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Ergänzung	Hersteller
Amphotericin B	Mediumumsatz (0,5 %), 250 µl/ml	CC-Pro
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colometric)	Fertigkit mit allen Substanzen für BrdU	Roche
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Fertigkit mit allen Substanzen für Viabilität	Promega
Cholera Toxin from Vibrio cholerae		Sigma-Aldrich
CytoTox-Glo™ Reagenz	Fertigkit mit allen Substanzen für Zytotoxizität	Promega
Daidzein	CAS-Nr.: 486-66-8	Carl Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Zusatz Einfriermedium, Zellpassage	G. Vogler b.v. Rotterdam
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM): mit Phenolrot, mit 10 % FKS		C.C. pro GmbH
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM): mit Phenolrot		C.C. pro GmbH
Endoxifen	Kontrolle	Sigma-Aldrich
ER Alpha AK	Rabbit monoclonal IGG	Biorbyt

ER BETA AK	Mouse monoclonal IgG2a	GeneTex
Estradiol	Kontrolle	Sigma-Aldrich
FKS	Fetales Kälberserum	Sigma-Aldrich
Formafix 4 %	Gepuffert	Grimm med. Recycling GmbH
Genistein	CAS-NR.: 4446-72-0	Carl Roth
Ham's F-12	1:1 Ansatz mit DMEM	C.C. pro GmbH
Horse Serum	Mediumzusatz (5 %)	Sigma-Aldrich
Impress Reagent Kit Horse Serum	R.T.U. Normal Horse Serum (2,5 %)	Vector Laboratories
Impress Reagent Kit Peroxidase	Anti-Mouse/Rabbit Ig MP-7500	Vector Laboratories
Kämpferol	CAS-Nr.: 520-18-3	Carl Roth
LinRed IHC	Substratkit für Peroxidase	Linaris
Nutrient Mixture F-12 (Ham's F-12)	1:1 mit DMEM	Biowest
PBS (phosphate buffered saline)	Phosphat gepufferte Salzlösung: pH 7,4 (8,0 g NaCl, 2,9 Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O + 0,2 g NaH ₂ PO ₄ + 0,2 KCl in 1,0 l Aquabidest.)	Roth
Penicillin/Streptomycin	Mediumumsatz (0,2 %)	PAN Biotech
Phytolacca	C 12, C 30, C 200	DHU
Progesteronrezeptor AK	Rabbit monoclonal IgG	Biorbyt
Quercetin	CAS-Nr.: 117-39-5	Sigma-Aldrich
Supplement Mix Mammary Epithelial Cell GM	Mediumumsatz (2 %)	Promo-Cell
Trypanblau	Trypan Blue Stain 0,4 %	Gibco
Trypsin	Trypsin-EDTA 10x (5000 mg/l Trypsin, 2000 mg/l EDTA)	CC-Pro
Wasserstoffperoxid	35 %	Roth

3.1.4 EXTRAKTE

Für die Herstellung der Extrakte wurde das Homöopathische Arzneimittel Phytolacca in drei verschiedenen Konzentrationen verwendet: C 12, C 30 und C 200. Hergestellt wird das Arzneimittel von der DHU (Deutsche Homöopathie-Union) und ist ohne Verschreibung z.B. in Apotheken erhältlich⁴⁰.



ABBILDUNG 5: „Phytolacca-Globuli“ in den Konzentrationen C 12, C 30 und C 200.

3.1.5 ZELLINIEN

Um die Wirkung der Extrakte zu untersuchen, kamen vier verschiedenen Mammazelllinien zum Einsatz. Diese unterschieden sich in der Dignität sowie im Rezeptorstatus, um eventuelle verschiedene Wirkungen auf diese Zelleigenschaften zurückzuführen.

TABELLE 4: Zelllinien

Zellbezeichnung	Dignität	Rezeptorstatus	Hersteller
MCF-12A (ATCC® CRL-10782™)	benigne	positiv	ACCT – LCG Standards GmbH
MCF-10A (ATCC® CRL-10317™)	benigne	negativ	ACCT – LCG Standards GmbH
MCF-7 (ATCC® HTB-22™)	maligne	positiv	ACCT – LCG Standards GmbH
MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™)	maligne	negativ	ACCT – LCG Standards GmbH

3.1.5.1 MCF-12A

MCF-12A-Zellen sind benigne, spontan immortalisierte Mamma-Epithelzellen. Sie entstammen einer 60-jährigen kaukasischen, nulliparen Frau mit fibrozystischer Mastopathie. Die Zellen ließen sich bei einer Reduktions-Mammoplastik gewinnen und konnten anschließend kultiviert werden. Sie wurden aus adhärennten Zellen der Population gewonnen. Einzelne Bereiche enthielten auch Anteile intraduktaler Hyperplasien^{13,126}.

Neben einer in der Literatur beschriebenen Estrogenrezeptorpositivität, verfügt MCF-12A an ihrer Oberfläche auch über HER-2/neu-, GPER-, EGF- Rezeptoren. Zytokeratin CK 5/6 und der Proliferationsmarker Ki-67 werden ebenfalls exprimiert^{111,155}.



ABBILDUNG 6: Kultivierte MCF-12A Zellen, lichtmikroskopische Darstellung (20x Vergrößerung), Pfeil zeigt beispielhafte Zelle.

3.1.5.2 MCF-10A

Bei MCF-10A handelt es sich ebenfalls um benigne, spontan immortalisierte Mamma-Epithelzellen, die einer 36-jährigen kaukasischen, prämenopausalen Frau entstammen, welche an einer fibrozystischen Mastopathie erkrankt war. Histologisch konnten keine proliferativen Veränderungen oder Atypien nachgewiesen werden. Die Zelllinie wurde von adhärennten Zellen abgeleitet^{148,158}.

Die Zellen sind in der Literatur im Vergleich zu MCF-12A als Estrogen-, Progesteron-, und Androgen- rezeptornegativ beschrieben, jedoch exprimieren sie den Herz-2/neu-Rezeptor. Außerdem lassen sich der GPER- und der EGF Rezeptor, sowie Zytokeratin CK5/6 an der Oberfläche nachweisen^{144,150,155}.

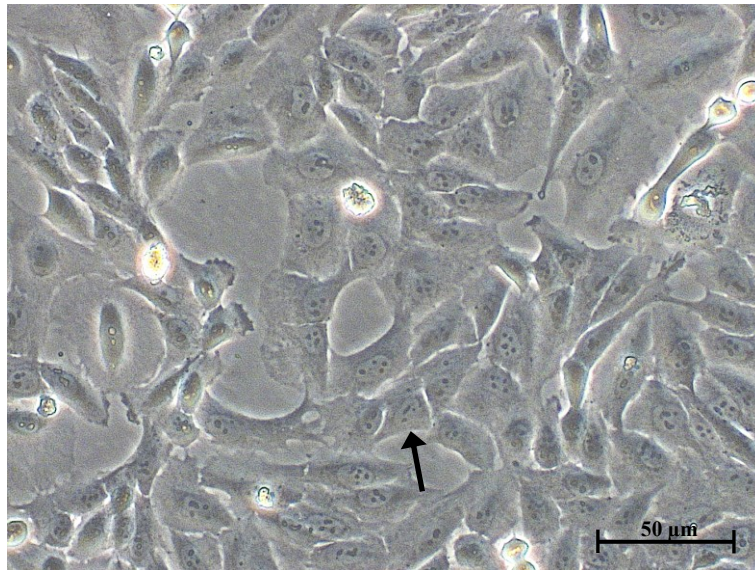


ABBILDUNG 7: Kultivierte MCF-10A Zellen, Lichtmikroskopische Darstellung (20x Vergrößerung), Pfeil zeigt beispielhafte Zelle.

3.1.5.3 MCF-7

Bei MCF-7 handelt es sich um maligne Zellen eines Adenokarzinoms, welche einer 69-jährigen kaukasischen Mammakarzinom-Patientin aus deren Pleurapunktat entnommen wurden. Laut Literatur exprimieren sie den Estrogenrezeptor und gelten damit als rezeptorpositiv. Über eine Her-2-Expression verfügen sie jedoch nicht^{14,95,103,149}.

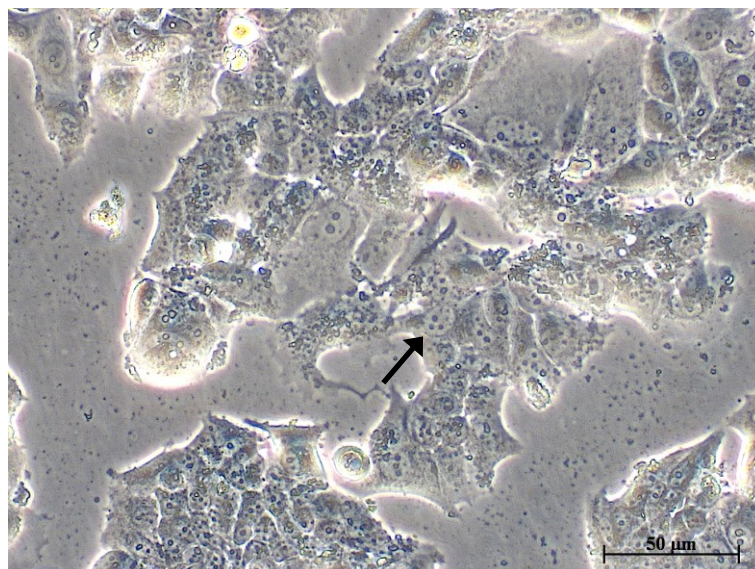


ABBILDUNG 8: Kultivierte MCF-7 Zellen, Lichtmikroskopische Darstellung (20x Vergrößerung), Pfeil zeigt beispielhafte Zelle.

3.1.5.4 MDA-MB-231

Bei der MDA-MB-231 Zellreihe handelt es sich ebenso um maligne Zellen eines Adenokarzinoms. Sie konnten aus dem Mammakarzinom einer 51-jährigen Kaukasierin gewonnen werden. Laut Literatur sind sie estrogenrezeptor-negativ^{15,95}.

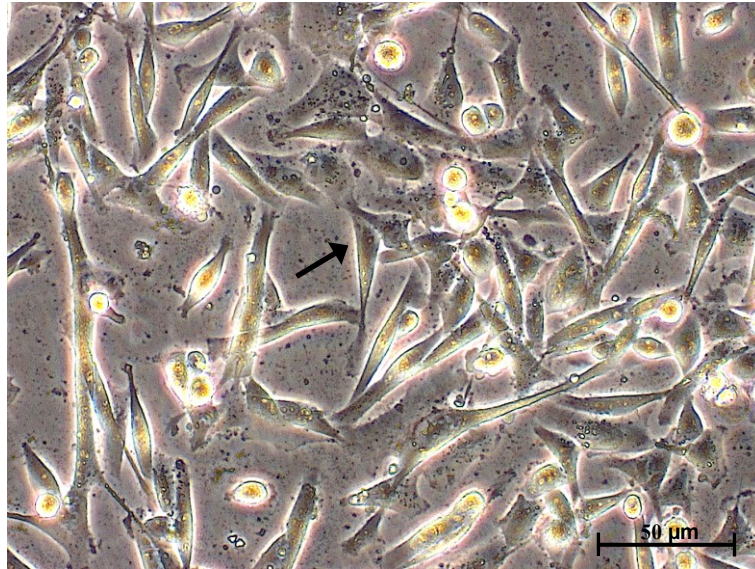


ABBILDUNG 9: Kultivierte MDA-MB-231 Zellen, Lichtmikroskopische Darstellung (20x Vergrößerung), Pfeil zeigt beispielhafte Zelle.

3.2 METHODEN

3.2.1 HERSTELLUNG DER TESTSUBSTANZEN

Die Herstellung der Testsubstanzen erfolgte unter sterilen Kautelen unter der Laborabzugshaube um Kontaminationen zu vermeiden.

3.2.1.1 WASSER-EXTRAKT

Eine Stammlösung wurde mit je 25 Streukügelchen (= „Globuli“) von Phytolacca C 12, C 30 und C 200 in 5 ml Wasser (Aqua dest.) in einer Tube aufgelöst. Außerdem wurde als Vergleichssubstanz 0,25 g (entspricht dem Gewicht von 25 Streukügelchen) Saccharose (Haushaltszucker) in gleicher Menge Wasser aufgelöst, da Saccharose die Trägersubstanz der Streukügelchen ist⁴¹. Angemerkt sei, dass laut Beipackzettel ein Streukügelchen 0,01 g wiegt, unsere Messungen haben jedoch ergeben, dass jedes Streukügelchen unterschiedlich schwer ist, durchschnittlich ca. 0,008 g.

3.2.1.2 ETHANOL-EXTRAKT

Die andere Stammlösung wurde nach dem gleichen Prinzip wie die erste Stammlösung hergestellt, anstatt mit Wasser jedoch mit 70%igem Ethanol. Die Streukügelchen lösten sich nach Zuhilfenahme des Ultraschallbades gut auf. Nach der Herstellung wurden die Tubes mit Wachsstreifen verschlossen, um zu verhindern, dass der Alkohol verdampft.

Die Herstellung der Extrakte erfolgte unter sterilen Kautelen unter der Laborabzugshaube um Kontaminationen zu vermeiden.

3.2.1.3 REFERENZEN

Kämpferol, Quercetin, Daidzein und Genistein dienten als Referenzen. Quercetin und Genistein wurden in einem Verhältnis von 1:1 Aqua dest. und DMSO angesetzt. Kämpferol und Daidzein konnten in einem 1:1 Gemisch aus 70%igem Ethanol und DMSO gelöst werden, nachdem sie sich zuvor in Aqua dest. nicht vollständig lösen ließen. Dazu wurde je nach Molekulargewicht die entsprechende Menge Substanz in 1 ml Substanz angesetzt.

Alle Extrakte wurden bei - 80 °C aufbewahrt. Tabelle 5 zeigt eine Übersicht der jeweiligen Konzentrationen.

TABELLE 5: Konzentrationen der untersuchten Substanzen mit jeweiligen Lösungsmitteln

Substanz	Lösungsmittel	Konzentration
Phytolacca je für C 12, C 30, C 200 (100 %)	Aqua dest. / 70 % Ethanol	0,05 g/ml
Phytolacca je für C 12, C 30, C 200 (50 %)	Aqua dest. / 70 % Ethanol	0,025 g/ml
Phytolacca je für C 12, C 30, C 200 (20 %)	Aqua dest. / 70 % Ethanol	0,01 g/ml
Phytolacca je für C 12, C 30, C 200 (10 %)	Aqua dest. / 70 % Ethanol	0,005 g/ml
„Zuckerwasser“ (Saccharose)	Aqua dest.	0,05 g/ml
Kämpferol	70 % Ethanol + DMSO	0,00143 g/ml
Quercetin	Aqua dest. + DMSO	0,00151 g/ml
Daidzein	70 % Ethanol + DMSO	0,00127 g/ml
Genistein	Aqua dest. + DMSO	0,00135 g/ml
Estradiol	90 % Ethanol	$2,72 \times 10^{-7}$ g/ml
Endoxifen	90 % Ethanol	0,0062 g/ml

3.2.2 HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatografie ist ein analytisches Trennverfahren, um ein Probengemisch anhand seiner physikochemischen Bindungseigenschaften in seine einzelnen Bestandteile aufzutrennen. Bei dem hier verwendeten System erfolgt die Auftrennung anhand der Polarität der einzelnen Komponenten, welche durch einen UV-Detektor qualitativ und quantitativ vermessen werden können.

Das Probengemisch wird hierfür unter hohen Drücken zwischen einer mobilen Phase, die an einer stationären Phase vorbeiläuft, verteilt. Die Trennsäule wird je nach Extraktbestandteil unterschiedlich schnell passiert, wodurch die einzelnen Stoffe bestimmt werden können. Jeder Stoff besitzt bei gleichbleibenden Bedingungen eine charakteristische Retentionszeit, die Zeit bis zum Erreichen des Detektors, wodurch Rückschlüsse auf die Qualität des Probengemisches gezogen werden können.

Es entsteht ein Chromatogramm, auf dem über die Zeit aufgetragen für jeden Stoffbestandteil ein separater Peak entsteht, dessen Maximum die Intensität des Stoffes zeigt. Die Fläche ist dabei proportional zur eingesetzten Menge des Stoffes und ermöglicht so eine quantitative Aussage^{67,77}.

Bei der Umkehrphasenchromatographie besteht die mobile Phase (Eluent) aus Aqua dest. und DMSO, eine hydrophobe Kohlenstoffsäule (C 18) stellt die stationäre Phase dar. Durch die unterschiedliche Polarität der beiden Phasen, weisen unpolare Verbindungen stärkere Wechselwirkungen zur Oberfläche der stationären Phase auf, wobei hydrophile Substanzen eine deutlich höhere Affinität zur polaren mobilen Phase zeigen. Dadurch durchwandern letztere deutlich schneller die Säule, werden so bereits früh detektiert und haben somit die kleinste Retentionszeit. Es kamen als Eluenten sowohl Aqua dest. als auch DMSO zum Einsatz, um zu verhindern, dass Stoffe mit ähnlichen Polaritätseigenschaften fast zeitgleich detektiert werden und man so die jeweiligen Peaks nicht mehr deutlich voneinander trennen könnte. Beginnend mit Aqua dest. wird nach 5 Minuten zunehmend DMSO dazu gemischt, nach 5 weiteren Minuten besteht dann die mobile Phase bereits zu 100 % aus DMSO, welches dann wieder langsam durch Aqua dest. ausgetauscht wurde. DMSO stellt ein sehr starkes Lösungsmittel dar, wodurch auch sehr stark haftende Moleküle aus der stationären Phase gelöst werden. Nach Rücksprache mit der Herstellerfirma Knauer wurde DMSO mit 10 % Aqua dest. und das Aqua dest. selbst mit 10 % Methanol versetzt, um die Säule zu schonen^{67,72}.

Einen schematischen Aufbau einer HPLC-Anlage zeigt Abbildung 10. Zu Beginn werden die Eluenten mittels Hochdruck über einen Entgaser zu dem Injektor gepumpt, hier gelangt die Probe (20 µl) zum Elutionsmittel, ohne dass der Druck verloren geht. Um mögliche Verunreinigungen herauszufiltern durchwandert das Gemisch zunächst eine Filtersäule, bevor es in die Hauptsäule gelangt. Hier finden aufgrund der verschiedenen physikochemischen Eigenschaften die oben beschriebenen Prozesse mit der stationären Phase statt, bis dann nach und nach

die aufgetrennten Stoffe unter niedrigem Druck per UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm detektiert und anschließend grafisch dargestellt werden.

Diese Variante einer Verteilungschromatografie zeichnet sich bei einem geringen Zeitbedarf durch eine hohe Trennschärfe aus^{67,105}.

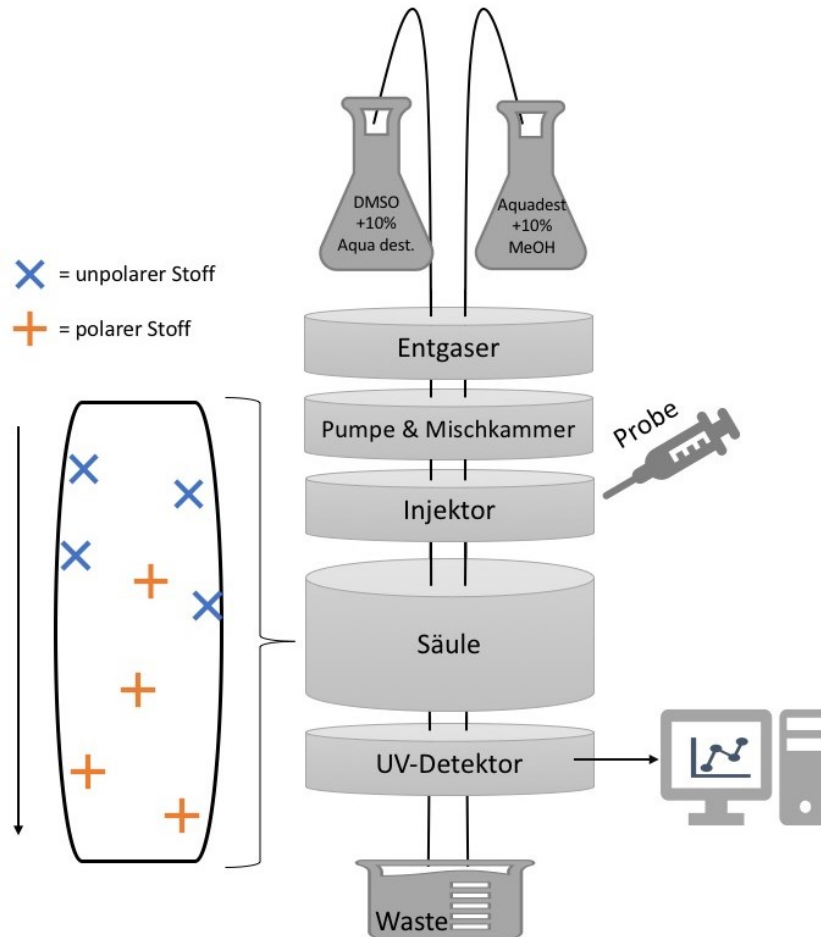


ABBILDUNG 10: Schematischer Aufbau der HPLC. Schema modifiziert nach Gey⁶⁷.

Durchführung:

1. Steuerungsprogramm ClarityChrom® und HPLC-Apparatur starten.
2. Spülen des Pumpenkreislaufs.
3. 20 µl des zu untersuchenden Extrakts mit Injektionsspritze in Injektionsschleife geben
4. Messung starten.
5. Mit der „Injection“-Funktion nach 3 min die Probe dem Messkreislauf zuführen.
6. Messung für 40 min laufen lassen, die Eluenten werden je nach Einstellung selbst gemischt.
7. Nach 40 min Messung beenden, Ergebnis abspeichern.
8. Weitere Auswertung mittels Software ClarityChrom® (z.B. Leerwert absetzen, Flächenberechnung der Peaks).

3.2.3 ZELLKULTIVIERUNG

Alle hier verwendeten Zelllinien sind kommerziellen Ursprungs. Die Kultivierung und Aufbereitung erfolgte in standardisierten Nährmedien in Zellflaschen mit einem Filter-Schraubverschluss unter physiologischen Bedingungen (37 °C, wasserdampfgesättigte Atmosphäre mit 5 % CO₂). Das Arbeiten mit offenem Zellmaterial fand unter sterilen Kautelen an mikrobiologischen Sicherheitswerkbänken statt.

Je nach individuellen Bedürfnissen der verwendeten Zellreihe gab es bei der Zellkultivierung kleinere Abweichungen, was zum Beispiel die Zentrifugeneinstellung oder das Trypsinieren zum Ablösen der Zellen betrifft.

Im Folgenden ist das allgemeine Vorgehen beschrieben:

Die tiefgefrorenen Zellen lagen zur Langzeitaufbewahrung in DMSO-Medium (Einfriermedium Dimethylsulfoxid) bei -185 °C in flüssigem Stickstoff vor. Um die Zellen kultivieren zu können mussten sie schonend aufgetaut werden, indem sie zunächst auf Eis überführt wurden, bevor sie in Raumtemperatur gelangten. Wenn die Zellen aufgetaut waren, wurde das DMSO ausgewaschen. Dazu wurden die Zellen in 15 ml Röhrchen überführt, mit DMEM versetzt und für 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Durch das entstandene Zellpellet konnte das Einfriermedium entfernt werden und anschließend die Zellen mit 5 ml Medium resuspendiert werden. Diese wurden in eine kleine Zellkulturflasche (25 cm²) überführt und im Brutschrank kultiviert. Die Zellpflege erfolgte ca. alle 2 Tage. Nach einer mikroskopischen Vitalitätskontrolle wurde bei geringer Konfluenz (= die Bedeckung der Oberfläche der Kulturflasche mit adhären Zellen) nur das verbrauchte Medium gewechselt. Bei einer Konfluenz von 70 % – 90 % wurden die Zellen in eine neue, größere Zellkulturflasche oder auf mehrere, gleichgroße Flaschen passagiert. Dazu mussten die Zellen vom Flaschenboden gelöst werden, an dem sie über Peptidbindungen hafteten. Um den Boden zu spülen, kam zunächst PBS zum Einsatz, welches die Reste des Serums entfernte. Anschließend wurde der Zellrasen mit der Protease Trypsin versetzt (verdünnt mit PBS 1:10), es daute die Zell-Matrix Verbindungen an und die Zellen verloren so ihre Bindung zur Kulturflasche. Diese wurde für 5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Durch leichtes Klopfen lösten sich die Zellen von der Kulturflasche. Die Trypsinierung musste mit der ca. 1,5-fachen Menge Medium und FKS neutralisiert werden, da sonst die Zellen durch das Trypsin zerstört werden könnten. Die Suspension wurde erneut in ein Röhrchen überführt und um die Zellen zu isolieren bei ca. 1000 U/min für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes, wurde frisches Medium hinzugegeben. Durch vortexen konnte eine gründliche Auflösung des Zellpellets erreicht werden. Je nach festgestellter Zelldichte wurde eine bestimmte Menge der Zellsuspension, eventuell mit weiterem Medium, in eine passende Zellkulturflasche überführt, unter einem Lichtmikroskop begutachtet und wieder in den Brutschrank überführt⁷¹.

3.2.4 VORBEREITUNG DER ZELLTESTS

3.2.4.1 BESTIMMUNG DER LEBENDZELLZAHL

Die einzelnen Versuche sollten möglichst gut miteinander vergleichbar und standardisiert sein, weshalb gleiche Untersuchungsbedingungen herrschen sollten. Hierfür ist die optimale Konfluenz von großer Bedeutung, deshalb wurde vor jeder Versuchsreihe die Lebendzellzahl mikroskopisch ermittelt, um so bei jedem Test die gleiche Zellzahl einzusetzen.

Hierfür wurden 20 µl der Zellsuspension in 360 µl des jeweiligen Nährmediums gegeben und mit 20 µl Trypanblau vermischt. Dies entspricht einer Verdünnung von 1:20 (= Verdünnungsfaktor) der Zellsuspension. Bei letalen Zellen diffundiert der Farbstoff Trypanblau in die Zellmembran und färbt diese Zellen blau. Vitale Zellen bleiben ungefärbt. Dadurch konnten die toten von den lebenden Zellen unterschieden werden¹⁵³.

Von der angesetzten verdünnten Zellsuspension ließen sich je 10 µl in beide Bürker-Zählkammern (Abbildung 11) luftblasenfrei einbringen. Es folgte die Zellzählung der intakten, ungefärbten Zellen in je 25 Kleinquadraten pro Zellkammer unter einem Lichtmikroskop bei 100-facher Vergrößerung. Diese fand innerhalb von 5 Minuten statt, da nach längerer Inkubationszeit Trypanblau zytotoxisch wirken kann.

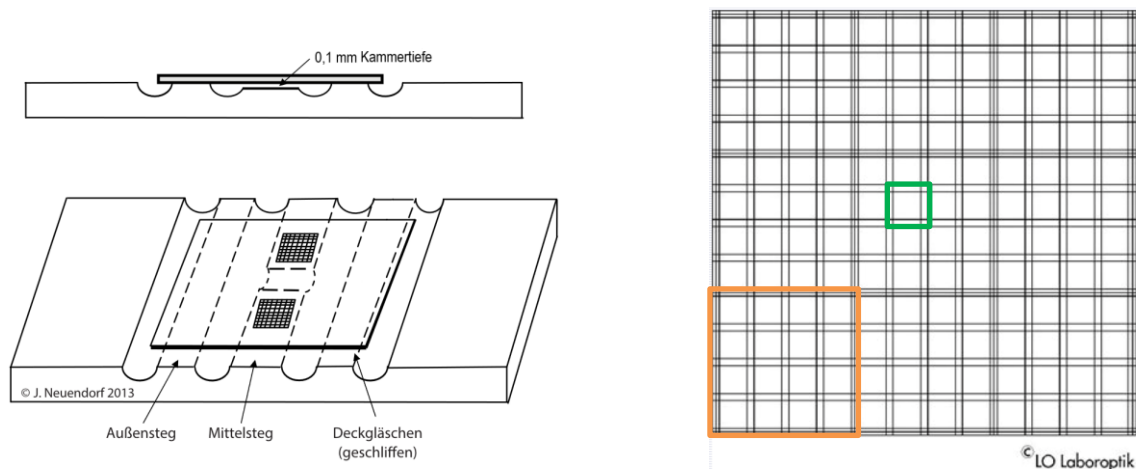


ABBILDUNG 11: Links: Schematische Darstellung einer Zählkammer nach Neuendorf¹²³.
Rechts: Schematische Darstellung eines Zählnetzes nach Bürker unter mikroskopischer Sicht¹⁰⁰.
Grüne Markierung zeigt exemplarisch ein Kleinquadrat, orangene Markierung zeigt ein Großquadrat.

Die Zellzahl ließ sich folgendermaßen berechnen¹⁴⁶:

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

Z = Mittelwert der Summe der Zellzahl, die in 2 x 25 Kleinquadraten gezählt wurde

VF = Verdünnungsfaktor

$10^4 \triangleq$ Kammerfaktor (ein Großquadrat der Zählkammer enthält 0,1 mm³)

Für jede Versuchsreihe wurde je nach Zellreihe die Zellsuspension individuell verdünnt, um so optimale Versuchsbedingungen zu erreichen. Die jeweiligen Werte konnten von Vorarbeiten im Labor übernommen werden: Tabelle 6 führt die Zellzahl auf, die im Einzelnen ausgesät wurde.

TABELLE 6: Konzentrationen der verwendeten Zellen pro Versuchsreihe

Zelllinie	Test	Zellen/ml
MCF-12A	Immunohistochemie	300.000
	CellTiter-Glo® -Test	150.000
	CytoTox-Glo™ -Test	150.000
	BrdU-Test	200.000
	Zellstoffwechsel	150.000
MCF-10A	Immunohistochemie	300.000
	CellTiter-Glo® -Test	150.000
	CytoTox-Glo™ -Test	150.000
	BrdU-Test	200.000
	Zellstoffwechsel	150.000
MCF-7	Immunohistochemie	300.000
	CellTiter-Glo® -Test	300.000
	CytoTox-Glo™ -Test	300.000
	BrdU-Test	300.000
	Zellstoffwechsel	300.000
MDA-MB-231	Immunohistochemie	300.000
	CellTiter-Glo® -Test	300.000
	CytoTox-Glo™ -Test	300.000
	BrdU-Test	400.000
	Zellstoffwechsel	300.000

3.2.4.2 AUFARBEITUNG DER ZU UNTERSUCHENDEN SUBSTANZEN

Zur Vorbereitung der Zelltests erfolgte das Ansetzen verschiedener Verdünnungsreihen der zu untersuchenden Extrakte. Diese wurden in einer Verdünnung von 1:10, 1:5, 1:2 und 1:1 auf die Zellen gegeben.

Als Kontrollen dienten Estradiol, Endoxifen und Zuckerwasser. Estradiol und Endoxifen ließen sich in 90 %igem Ethanol lösen und es erfolgte die Verdünnung entsprechend Tabelle 5.

Im einzelnen Well lag ein Verhältnis von 1:100 Untersuchungssubstanz zu Medium vor.

3.2.5 IMMUNHISTOCHEMIE (IHC)

In dieser Arbeit kamen verschiedene Zellreihen zum Einsatz, die sich laut Hersteller in ihrem Hormonrezeptorstatus unterscheiden. Die jeweilige Rezeptorpositivität als auch -negativität in den entsprechenden Ausgangszelllinien und in den höheren Zellpassagen sollte ein immunhistochemisches Verfahren bestätigen, um potenzielle Testergebnisse in Bezug auf den Rezeptorstatus analysieren zu können. Gesichert wurde das Vorhandensein vom Estrogen- α , Estrogen- β (ER- α / - β) - und dem Progesteron-Rezeptor (PR).

Bei den beiden gesichert rezeptorpositiven Zellreihen kam noch eine Testung auf den „epidermal growth factor receptor 2“ = c-erb-B2 (= HER2/neu) zum Einsatz.

Bei dem Verfahren handelt es sich um ein Sandwich-ELISA-Prinzip, zunächst bindet ein Primärantikörper an ein Antigen, das hier ein Teil des Hormonrezeptors ist. Dazu wurden monoklonale IgG-Antikörper des Kaninchens und der Maus genutzt. Im nächsten Schritt bindet ein zweiter Enzymgekoppelter-Antikörper an den Primärantikörperkomplex⁸¹. Nach Zugabe des Substrat LinRed spaltet die gekoppelte Peroxidase dieses, was zu einem roten Farbumschlag führt. Durch Spülzwischenschritte werden alle nicht gebundenen Antikörper abgespült. Eine positive Farbbildung kann unter dem Lichtmikroskop beurteilt werden und zeigt damit ein Vorhandensein des jeweiligen Rezeptors an¹⁶².

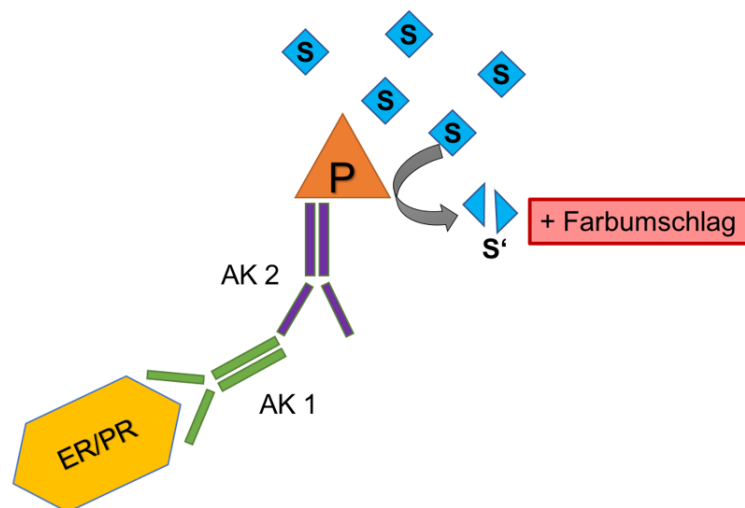


ABBILDUNG 12: Schematische Darstellung der immunohistochemischen Reaktion¹⁶⁶.

ER= Estrogenrezeptor, PR= Progesteronrezeptor, AK 1 = Primärantikörper, AK 2= Sekundärantikörper,
P= Peroxidase, S= Substrat LinRed, S'= gespaltenes Substrat.

Durchführung:

1. Bestimmung der Lebendzellzahl und Ansetzen einer Zellsuspension von 300.000 Zellen/ml. Davon je 300 µl/Well in eine 24-Wellplatte aussäen.
2. 48 h Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre.
3. Medium vorsichtig abpipettieren und 3x mit PBS spülen.
4. Zur Zellfixierung 300 µl/Well Formafix (4 % Formalin in PBS gepuffert) zugeben und für 30 min bei RT inkubieren.
5. Formafix entfernen und 3x mit PBS spülen.
6. 300 µl/Well 0,3 % H₂O₂ zugeben und bei RT für 30 min inkubieren.
7. 2x mit PBS spülen, ca. 5 min einwirken lassen und zwischendurch leicht schwenken.
8. 200 µl/Well Horse-Serum zugeben und bei RT für 20 min inkubieren, um unspezifische Reaktionen zu verhindern.
9. Das Horse-Serum in allen Wells, außer der Negativkontrolle, dekantieren.
10. 200 µl/Well des jeweiligen Primär-AKs zugeben (ER-α -, ER-β -, PR - AK) und bei 4 °C im Kühlschrank für 24 h inkubieren.
11. Primär-AK abpipettieren und 3x mit PBS spülen.
12. 200 µl pro Well des Sekundär-AKs zugeben und bei RT für 30 min inkubieren.
13. Sekundär-AK abpipettieren und 3x mit PBS spülen.
14. 200 µl/Well des Farbstoffes LinRed zugeben und bei RT im Dunkeln für 10 min inkubieren.
15. Farbreaktion mit Leitungswasser abstoppen und Zellen mit PBS bedecken, damit die Zellen nicht austrocknen.
16. Zellen unter dem Lichtmikroskop begutachten, fotografieren und dokumentieren.

3.2.6 IN-VITRO ZELLTESTS

Um das Wachstumsverhalten der verschiedenen Mammazelllinien unter dem Einfluss der Phytolacca-Extrakte *in-vitro* zu untersuchen, kamen nachfolgende Zelltests zum Einsatz. Die Referenzen wurden dabei nicht mehr einzeln mituntersucht, da zuvor in der HPLC-Untersuchung nachgewiesen werden konnte, dass diese kein Bestandteil des Phytolaccas sind. Es ließen sich dabei Viabilität, Toxizität, Proliferation, sowie der Metabolismus der Zellen analysieren. Bei der Zellviabilität werden die lebenden Zellen in der Kultur gemessen. Unter Zellproliferation versteht man die Fähigkeit der Zellen sich zu vermehren.

Jede Messung erfolgte zudem an Wells, die nur mit Medium benetzt waren. Dies diente als Hintergrundwert, der von den Messwerten der zu untersuchten Substanzen abgezogen wurde.

Zusätzlich wurden Wells während jedem Test sowohl nur mit unbehandelten Zellen und dem jeweiligen Medium, als auch mit den entsprechenden Lösungsmitteln durchgeführt, um ausschließen zu können, dass die Zellen mit dem Medium oder den Lösungsmitteln interagieren und die Testergebnisse dadurch beeinflussen würden. Um die Wirkung der Lösungsmittel auf die Zellen zu eliminieren, konnten die Messwerte der Stoffe ins Verhältnis gebracht werden. Jeder Test beinhaltete pro Zellreihe mindestens 3 Wiederholungen mit Zellen in unterschiedlichen Passagen, dabei kamen pro Test wiederum jede Substanz in mindestens 3 Wells zum Einsatz.

3.2.6.1 CELLTITER-GLO® - VIABILITÄTSTEST

Der CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay misst die Anzahl der noch lebensfähigen Zellen in der Kultur. Dafür dient ATP als Marker für die noch stoffwechselaktiven Zellen, wobei die Menge an gemessenem ATP direkt proportional zur Anzahl der Lebendzellen ist.

Nach Zugabe des CellTiter-Glo® Reagenz werden die Zellen lysiert, wodurch ATP freigesetzt wird. An dieses bindet eine sich ebenfalls im Reagenz befindende Luziferase, gewonnen aus dem thermostabilen Glühwürmchen (*Photuris pennsylvanica*), welche ein „leuchtendes“ Lumineszenzsignal erzeugt, das über eine Halbwertszeit von mehr als 5 Stunden verfügt und sich so als sehr robust erwies. Die Luziferase besitzt die Fähigkeit, das Substrat Luziferin unter Mitwirkung von Magnesium, Sauerstoff und ATP in Oxyluciferin umzusetzen (Abbildung 13). Um die Menge des freiwerdenden ATPs konstant zu halten, werden gleichzeitig freigesetzte endogene Enzyme, wie die ATPase, gehemmt. Mittels eines Lumineszenz-Readers erfolgt die Quantifizierung des luminiszierenden Signals¹³⁰.

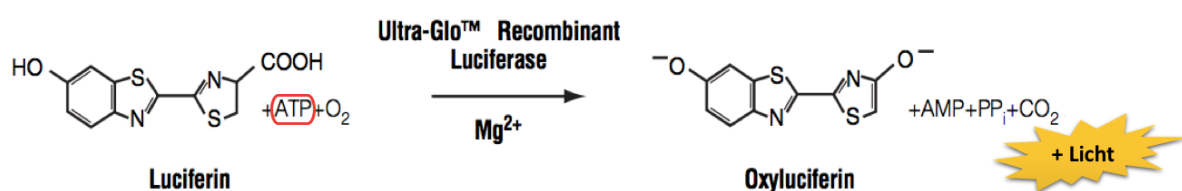


ABBILDUNG 13: Schematisches Reaktionsprinzip des CellTiter-Glo®.
Nach Technical-Bulletin CellTiter-Glo®, Promega 2015¹³¹.

Durchführung:

1. Bestimmung der Lebendzellzahl und Ansetzen einer Zellsuspension mit der entsprechenden Anzahl an Zellen/ml je nach Zellreihe (Tabelle 6). Davon je 100 µl/Well in eine 96-Wellplatte aussäen.
2. 24 h Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre.

3. Pro Well je 1 µl der Extrakte hinzugeben und für 24 h im Brutschrank inkubieren.
4. Zellen aus dem Brutschrank entnehmen, lichtmikroskopisch kontrollieren und für 30 min bei RT lagern, um die Zellsuspensionen auf RT abzukühlen.
5. Das CellTiter-Glo-Substrat mit dem CellTiter-Glo-Puffer mischen.
6. 80 µl/Well des gemischten Reagenzes zugeben.
7. Nach 30 min Inkubationszeit bei RT (davon die ersten 2 min auf einem Plattenrüttler) das Zellkultur-Reagenz-Gemisch in eine weiße, intransparente 96-Well-Platte umpipetieren (dient zur Vermeidung von Lichtleitung in die benachbarten Wells).
8. Messung des Lumineszenzsignals der einzelnen Wells mit dem Lumineszenzreader im Programm CellTiter-Glo®.

Auswertung:

Für die jeweiligen Vierfachbestimmungen der einzelnen Lumineszenzmessungen erfolgte eine Bildung des Mittelwerts. Von den Mittelwerten der Untersuchungsmedien war der Mittelwert der bestimmten Lumineszenz des Mediums zu subtrahieren, er diente als Leerwert. Somit konnte ein Einfluss des Mediums auf die einzelnen Ergebnisse verhindert werden. Die Zell-Medium-Suspension diente als 100 % - Vergleichswert. Je nach hinzugefügten Extrakten oder Kontrollen, wurden die jeweiligen Lösungsmittel in Relation dazu in die Rechnung miteinbezogen.

Daraus ergab sich folgende Beispielrechnung für M + Z + C 12 (100 %) = Ex. für Extrakt
Me. = Medium, Alc. für M + Z+ 90% Ethanol:

$$\text{Ergebnis [\%]} = \frac{\text{Mittelwert Messungen Ex.} - \text{Mittelwert Messungen Me.}}{\text{Mittelwert Messungen Alc.} - \text{Mittelwert Messungen Me.}} \times 100$$

3.2.6.2 CYTOToX-GLO™ - ZYTOTOXIZITÄTSTEST

Der CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay misst mithilfe der „Dead-Cell-Protease“ die Anzahl der toten Zellen in einer Zellpopulation. Die Membranintegrität ist ein wichtiges Merkmal vitaler Zellen. Wenn diese nicht mehr intakt ist, werden von den Zellen Enzyme freigesetzt, die sich sonst im Zytosol befinden, wie zum Beispiel Proteasen. Sie liegen bei toten Zellen frei im Medium vor, weshalb anhand der Quantifizierung der Proteasen Rückschlüssen auf die Zelltoxizität gezogen werden können. Der Assay verwendet ein luminogenes Peptidsubstrat (Alanyl-Alanyl-phenylalanyl-Aminoluciferin = AAF-Glo™ Substrat), welches durch die freigewordene „Dead-Cell-Protease“ gespalten wird. Das dabei gebildete Aminoluziferin reagiert mit einer ebenfalls im Substrat enthaltenen, thermostabilen Luziferase unter Verstoffwechselung von

Sauerstoff, ATP und Magnesium. Das emittierte Licht kann durch ein Luminometer detektiert werden (Abbildung 14). Es korreliert mit der Anzahl toter Zellen, da das Substrat die intakte Membran lebender Zellen nicht überwinden kann und somit diese nicht erfasst werden.

Anschließend können durch Zugabe eines Lysereagens auch die bisher intakten Zellmembranen zerstört werden. Durch die Freisetzung der Proteasen aus den eigentlich vitalen Zellen, entspricht das neue Lichtsignal der Anzahl aller Zellen. Um die Zellviabilität indirekt bestimmen zu können, muss das Lichtsignal der toten Zellen von dem aller Zellen subtrahiert werden³⁶.

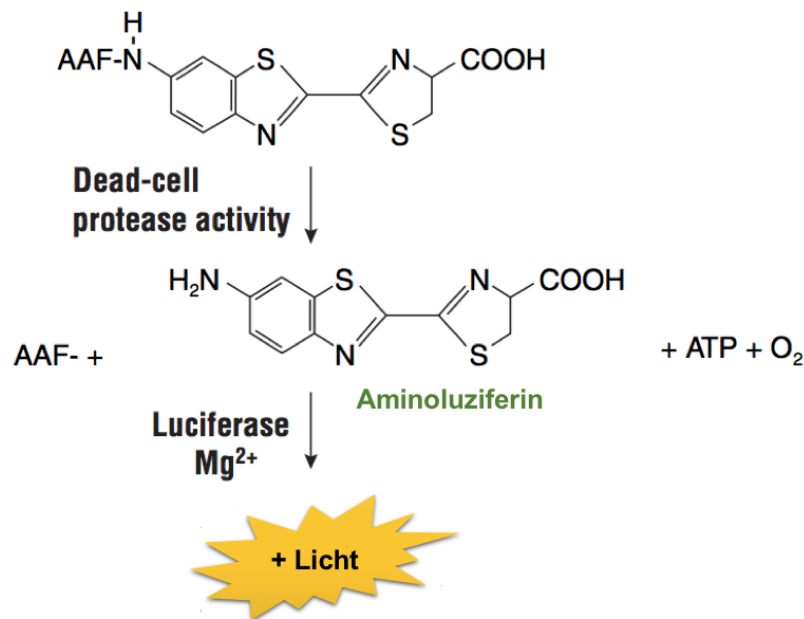


ABBILDUNG 14: Schematisches Reaktionsprinzip des CytoTox-Glo™ Zytotoxizitätstest.
Nach Technical-Bulletin CytoTox-Glo™, Promgega 2017³⁶.

Durchführung:

1. Bestimmung der Lebendzellzahl und Ansetzen einer Zellsuspension mit der entsprechenden Anzahl an Zellen/ml je nach Zellreihe (Tabelle 6). Davon je 100 µl/Well in eine 96-Wellplatte aussäen.
2. 24 h Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre.
3. Pro Well je 1 µl der Extrakte hinzugeben und für 24 h im Brutschrank inkubieren.
4. Zellen aus dem Brutschrank entnehmen, lichtmikroskopisch kontrollieren und für 30 min bei RT lagern, um die Zellsuspensionen abzukühlen.
5. Das AAF-Glo™-Substrat mit dem Puffer mischen.
6. 50 µl/Well des gemischten Reagenzes zugeben.

7. Nach 15 min Inkubationszeit bei RT (davon die ersten 2 min auf einem Plattenrüttler) das Zellkultur-Reagenz-Gemisch in eine weiße, intransparente 96-Well-Platte umpipettieren (dient zur Vermeidung von Lichtleitung in die benachbarten Wells).
8. Messung des Lumineszenzsignals der einzelnen Wells mit dem Lumineszenzreader im Programm CytoTox-Glo™ -Step 1.
9. Das Gemisch wieder auf die transparente Wellplatte zurück pipettieren.
10. 50 µl/Well der Lysereagenz zugeben.
11. Nach 15 min Inkubationszeit bei RT (davon die ersten 2 min auf einem Plattenrüttler) das Zellkultur-Lysereagenz-Gemisch in eine neue, saubere, weiße, intransparente 96-Well-Platte umpipettieren.
12. Messung des Lumineszenzsignals der einzelnen Wells mit dem Lumineszenzreader im Programm CytoTox-Glo™ -Step 2.

Auswertung:

Der CytoTox-Glo™ -Test besteht aus zwei Schritten. Die Auswertung des ersten Schritts erfolgte wie die des CellTiter-Glo®. Diese Lumineszenzmessung zeigt als Ergebnis die Zytotoxizität an.

Im zweiten Teil des Versuchs wurde die totale Lumineszenz gemessen, nachdem das Lysereagenz hinzugegeben wurde. Mit den gleichen Rechenschritten wie im ersten Teil des Versuchs konnten die Werte ermittelt werden. Um die indirekte Zellviabilität zu errechnen, wurde die im ersten Schritt ermittelte Lumineszenz von der totalen Lumineszenz aus Schritt zwei subtrahiert.

Die Zell-Medium-Suspension diente als 100 %- Vergleichswert. Je nach hinzugefügten Extrakten oder Kontrollen, wurden die jeweiligen Lösungsmittel in Relation dazu in die Rechnung miteinbezogen.

$$\text{Zellviabilität [\%]} = \text{Step 2} - \text{Step 1}$$

Die eigentliche Zytotoxizität ermittelte sich durch Subtraktion der indirekten Zellviabilität von 100 %.

$$\text{Zytotoxizität [\%]} = 100 \% - \text{Zellviabilität [\%]}$$

3.2.6.3 BrdU - PROLIFERATIONSTEST

Bei dem BrdU-Test handelt es sich um einen kolorimetrischen Immunoassay zur Quantifizierung der Zellproliferation. Durch Einbau des Pyrimidinanalogons 5-Brom-2'-desoxyuridin (= BrdU) anstelle der Base Thymidin in die DNA während der Replikationsphase vitaler Zellen (Abbildung 15) ist es möglich das Proliferationsverhalten der Zellkulturen in Abhängigkeit von den jeweiligen Extrakten photometrisch zu messen.

Zu Beginn erfolgt die Zugabe des BrdUs zu den Zell-Extrakt-Gemischen und den Kontrollen, sodass es zum Einbau des Thymidinanalogons durch die Polymerase in die DNA kommt. Nach der Inkubation werden die Zellen durch das FixDenat-Reagenz denaturiert. An die nun freiliegende DNA kann der dazugegebene Peroxidase-gekoppelte Anti-BrdU-Antikörper (Anti-BrdU-POD-AK) an das freie, neu eingebaute Bromdesoxyuridin binden. Es ist ein monoklonaler Antikörper aus Maus-hybridzellen, welcher mit einer Peroxidase konjugiert ist. Diese Peroxidase reagiert mit dem hinzugegebenen Substrat Tetramethylbenzidin und führt zu einem blauen Farbumschlag. Die Farbintensität korreliert dabei mit der Menge der neu synthetisierten DNA. Das Stoppen dieser Reaktion mithilfe von Schwefelsäure sorgt für einen gelben Farbumschlag. Die Absorption dieses Reaktionsproduktes wird mittels des ELISA-Readers bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Zusätzlich kam neben den üblichen Kontrollen und Leerwerten bei diesem Test noch eine Backgroundkontrolle zum Einsatz, um eventuelle Zeichen einer unspezifischen Bindung des Anti-BrdU-POD-AKs an Zellen ohne BrdU-Einbau zu registrieren.

Je häufiger sich die Zellen während der Inkubationszeit teilen, desto mehr kommt es zum Einbau des Pyrimidinanalogons. Wenn sich die Zellkulturen also proliferativ sehr aktiv verhalten, kann dies durch einen intensiveren Farbumschlag demonstriert werden. Findet wiederum kaum ein Zellwachstum statt, ist kaum eine photometrisch messbare Absorbanz zu verzeichnen¹³⁷.

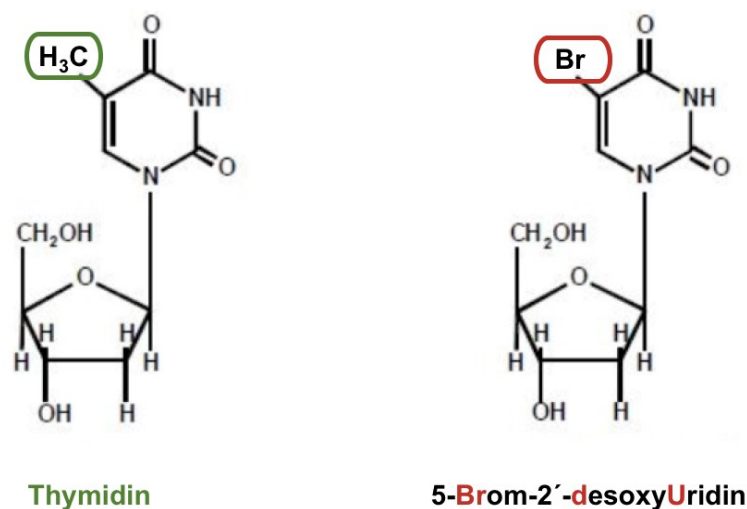


ABBILDUNG 15: Funktionsprinzip des BrdU-tests: BrdU unterscheidet sich nur an einer Stelle vom Thymidin und wird stattdessen eingebaut. Übernommen nach Cell Proliferation ELISA (Roche 2018)¹³⁷.

Durchführung:

1. Bestimmung der Lebendzellzahl und Ansetzen einer Zellsuspension mit der entsprechenden Anzahl an Zellen/ml je nach Zellreihe (Tabelle 6). Davon je 100 µl/Well in eine 96-Wellplatte aussäen.
2. 24 h Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre.
3. Pro Well je 1 µl der Extrakte hinzugeben und für 24 h im Brutschrank inkubieren.
4. Zellen aus dem Brutschrank entnehmen, lichtmikroskopisch kontrollieren und für 30 min bei RT lagern, um die Zellsuspensionen abzukühlen.
5. BrdU-Reagenz ansetzen (1:100 mit jeweiligem Kulturmedium) und je 10 µl/Well zugeben, außer in den Backgroundkontrollen.
6. Nach 4 h Inkubationszeit im Brutschrank das Medium abkippen und vorsichtig abklopfen.
7. 200 µl/Well des FixDenat-Reagenz zugeben, um die Zellen zu fixieren.
8. Nach 30 min Inkubationszeit bei RT das FixDenat abkippen und vorsichtig abklopfen.
9. 100 µl/Well der Anti-BrdU-POD-AK mit Antibody-dilution-solution im Verhältnis 1:100 gemischt zugeben.
10. Nach 60 min Inkubationszeit bei RT die Anti-BrdU-POD-AK-Lösung entfernen.
11. Den Waschpuffer mit Aqua dest. 1:10 verdünnen und die Wells damit je 3x spülen und anschließend „herausklopfen“.
12. 100 µl/Well Substratlösung (Tetramethylbenzidin) zugegeben und bei RT für 10 min inkubieren.
13. Stoppen der Reaktion durch 25 µl/Well 1-molarer Schwefelsäure.
14. Durch einen ELISA-Reader photometrische Messung des Farbumschlags bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzlänge von 620 nm.

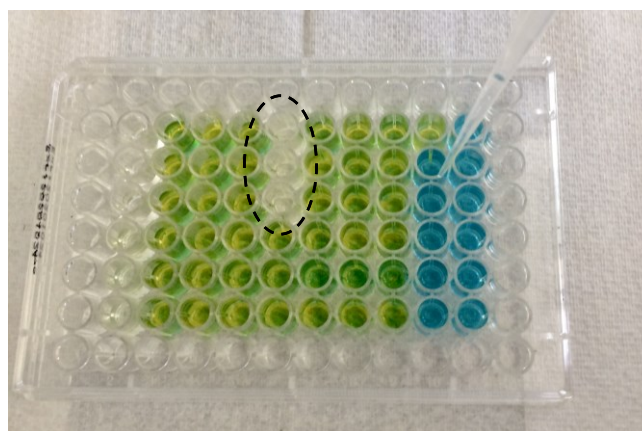


ABBILDUNG 16: Schritt 13 beim BrdU-Test: Abstoppen der Reaktion mit Schwefelsäure. Durch die geringere Farbintensität (gestrichelte Linie) ist bereits makroskopisch zu erkennen, dass bei Endoxifen eine Proliferationshemmung stattfand.

Auswertung:

Von den Mittelwerten der Absorbanz der Vierfachbestimmungen erfolgte die Subtraktion der Werte des Mediums von den Werten der Untersuchungsmedien. So konnte der Einfluss des Kulturmediums ausgeglichen werden.

Die Zell-Medium-Suspension diente als 100 % - Vergleichswert. Je nach hinzugefügten Extrakten oder Kontrollen, wurden die jeweiligen Lösungsmittel in Relation dazu in die Rechnung miteinbezogen.

Die oben beschriebene Backgroundkontrolle sollte - wenn überhaupt - nur eine marginale Absorbanz bilden, und somit negativ ausfallen, damit ausgeschlossen werden konnte, dass es eine unspezifische Reaktion der Anti-BrdU-AK mit den Zellen gab.

Die Berechnung erfolgt wie beim CellTiter-Glo® (s. Beispielrechnung CellTiter-Glo®).

3.2.7 MESSUNG DER GLUKOSE- UND LAKTATKONZENTRATION UND DES PH-WERTES

Als Maß für den Stoffwechsel einer Zelle kamen die Messungen der Glukose und Laktatkonzentration zum Einsatz, sowie die Bestimmung des pH-Werts. So konnte untersucht werden, wie die Stoffwechselleistung der Mammazelllinien durch die Extrakte und Kontrollen beeinflusst wurde. Durch die drei Parameter konnten Rückschlüsse auf den Zellmetabolismus gezogen werden, da nur lebende Zellen zu solchen Stoffwechselleistungen fähig sind⁷⁷. Es erfolgte eine solitäre Vierfachbestimmung.

Wenn die Zelle über einen erhöhten Energiebedarf verfügt, benötigt sie mehr Glukose um diese in ATP umzuwandeln. Tote Zellen können wenig bis gar keine Glucose mehr aktiv über Transporter aufnehmen und somit auch keinen Stoffwechsel mehr betreiben. Die extrazelluläre Glukosekonzentration steigt, je mehr tote Zellen im Verhältnis zu vitalen Zellen sich in der Zellsuspension befinden. Die ATP-Synthese kann entweder aerob durch die mitochondriale Glykolyse erfolgen oder auf anaerobem Weg durch die Umwandlung von Pyruvat zu Laktat. Demnach steigt bei vermehrter anaerober Glykolyse viabler Zellen der Laktatspiegel an. Je mehr vitale Zellen in der Zellsuspension vorhanden sind, umso höher ist die Laktatkonzentration im Überstand. Die Laktatkonzentration verhält sich damit invers zur Glukosekonzentration. Toxische Effekte sorgen für eine Störung des oxidativen Stoffwechsels. Dadurch wird vermehrt anaerobe Glykolyse betrieben, wodurch wiederum mehr Laktat anfällt. Laktat führt gleichzeitig zu einem Ansäuern des Extrazellulärraumes, was einen verminderten pH-Wert zur Folge hat⁷⁷. Für einen ausgeprägten Zellmetabolismus sprechen eine verminderte Glukosekonzentration und eine erhöhte Laktatkonzentration im Zellüberstand. Ein elektrochemisches Messprinzip ist die Grundlage dieses Versuches. Nach Hinzufügen einer Glukoseoxidase reagiert die in der Probe enthaltene Glukose zu Glukonsäure und Wasserstoffperoxid, welches durch eine Elektrode detektiert wird.

Der daraus generierte Stromfluss ist proportional zur Glukosekonzentration. Am Glukose-Laktat-Automaten erfolgte diese Messung vollautomatisch.

Der pH-Wert des restlichen Zellkulturüberstandes konnten durch eine pH-Glaselektrode der Firma Thermo Scientific gemessen werden⁴⁹.

Durchführung:

1. Bestimmung der Lebendzellzahl und Ansetzen einer Zellsuspension mit der entsprechenden Anzahl an Zellen/ml je nach Zellreihe (Tabelle 6). Davon je 100 µl/Well in eine 96-Wellplatte aussäen.
2. 24 h Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre.
3. Pro Well je 1 µl der Extrakte hinzugeben und für 24 h im Brutschrank inkubieren.
4. Alle Überstände der jeweiligen Untersuchungssubstanz abpipettieren und in einem Eppendorf Röhrchen zusammenführen.
5. Je 20 µl der Überstände zu 1 ml Pufferlösung.
6. Untersuchung im ansässigen Routinelabor im Biosen Glucose-/Lactat-Analyzer (Biosen 5140 der Firma EKF-Diagnostic).
7. Die in den Eppendorf Röhrchen befindende restliche Probe (ca. 60 µl) mit dem pH-Messgerät analysieren.

3.2.8 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die Untersuchungen zur Zellviabilität, Zytotoxizität und Zellproliferation erfolgten mittels Cell-Titer-Glo®, CytoTox-Glo™ und BrdU pro Ansatz jeweils in mindestens dreifacher Ausführung unter Bildung des Mittelwertes. Zusätzlich wurde jeder Test pro Zelllinien dreimal in unterschiedlichen Zellpassagen wiederholt (n=3). Eine Ausnahme stellte die Untersuchung des Zellstoffwechsels (Glukose-, Laktat-, pH- Tests) dar, der aus Kostengründen nur solitär durchgeführt werden konnte.

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Programms Microsoft Excel 2019.

Aus den Ergebnissen aller Testdurchläufen wurde zunächst Mittelwerte und anschließend die Standardabweichungen berechnet.

Die Signifikanz der einzelnen Versuchsergebnisse wurde mit dem Student's T-Test mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ durchgeführt, nachdem dieser Test in Vorarbeiten des Labors vom ansässigen Institut für Biostatistik und Informatik in Medizin und Altersforschung der Universitätsmedizin Rostock empfohlen wurde¹⁶⁶. In allen Diagrammen ist die Signifikanz durch einen Stern gekennzeichnet.

IV. ERGEBNISSE

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen präsentiert. Im anschließenden Kapitel der Diskussion erfolgt die Interpretation der Ergebnisse.

4.1 HIGH PERFORMANCE LIQUID CROMATOGRAPHY (HPLC)

Mittels der HPLC sollten die selbst hergestellten Phytolacca-Extrakte auf potenzielle Inhaltsstoffe untersucht werden. Dabei kamen die Wasserextrakte zum Einsatz. Für jeden Extrakt erfolgten mindestens zwei Messdurchgänge, um etwaige Unterschiede zu überprüfen. Des Weiteren erfolgte die Messung mit dem Saccharose-Extrakt, da Haushaltszucker die Trägersubstanz der „Globuli“ darstellt.

Die finale Auswertung der HPLC-Ergebnisse erfolgte mit Hilfe von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Udo Jeschke, welcher ein Kooperationspartner des Forschungslabors der UFK Rostock ist.

Zu Beginn der HPLC-Untersuchungen erfolgte die erste Messung als Leerwert, es wurde kein zu untersuchender Extrakt hinzugegeben. Der Graph zeigt den Verlauf, der durch das Auswaschen der Lösungsmittel entsteht. Die Analyse sollte in erster Linie qualitativ erfolgen, um nachzuweisen, um welche Reinstoffe es sich in den Phytolacca-Extrakten handelt. Für jeden „Peak“ auf dem Chromatogramm des Phytolacca-Extrakts wäre das Ziel gewesen, einen passenden Reinstoff zu identifizieren, welche ebenfalls mittels der HPLC untersucht worden wäre. Liegen die Peaks des Reinstoffes und des Extraktes übereinander, so zeigt das eine gleiche Retentionszeit und damit den Nachweis des Reinstoffes im Extrakt.

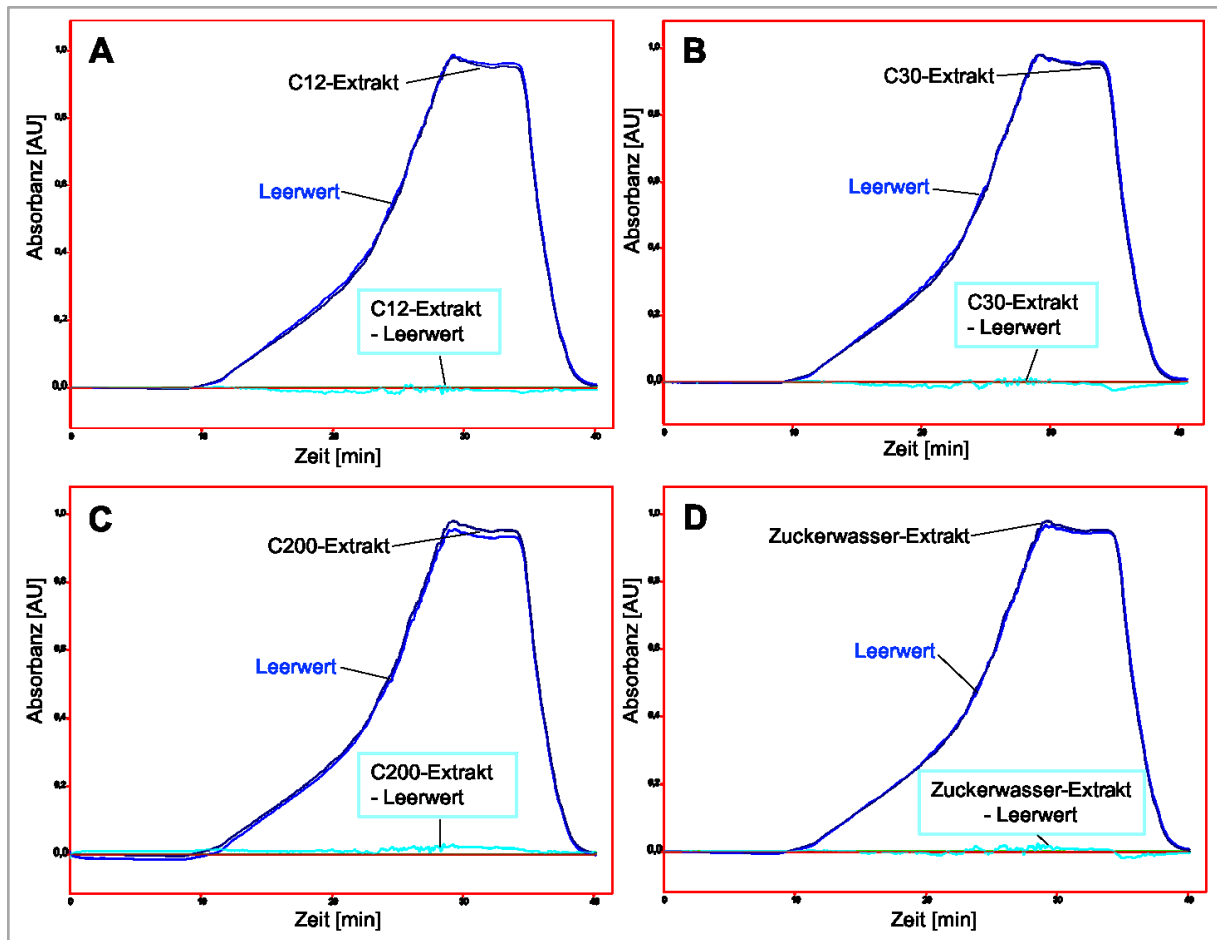


ABBILDUNG 17: HPLC-Ergebnisse der Extrakte, Ordinate \triangleq Absorbanz in Absorbance Unit, Abszisse \triangleq Zeit in Minuten. A zeigt den Graph des „C 12-Extraktes“, B den des „C 30-Extraktes“, C den des „C 200-Extraktes“ und D den des „Zuckerwasser-Extraktes“.

Schwarz: Farbe des jeweiligen Extraktes, Blau: Leerwert, Türkis: Differenz zwischen Extrakt und Leerwert. Die schwarze und die blaue Kurve verlaufen bei A-D nahezu identisch, so dass sich die türkise Kurve der Differenz annähernd auf der Nulllinie befindet.

Beim Betrachten der Abbildung 17 fällt auf, dass bei allen drei *Phytolacca*-Extrakten (C 12, C 30, C 200) die Chromatogramme nahezu direkt auf denen des Leerwerts verlaufen und keine Peaks zu sehen sind. Es konnten somit in den „Globuli-Extrakten“ keine Inhaltstoffe differenziert werden.

Der Graph des „Zuckerwasser-Extraktes“ verläuft ebenfalls nahezu auf dem des Leerwertes. Bei der Untersuchung der Trägersubstanz Saccharose kam es somit auch zu keinem Peak.

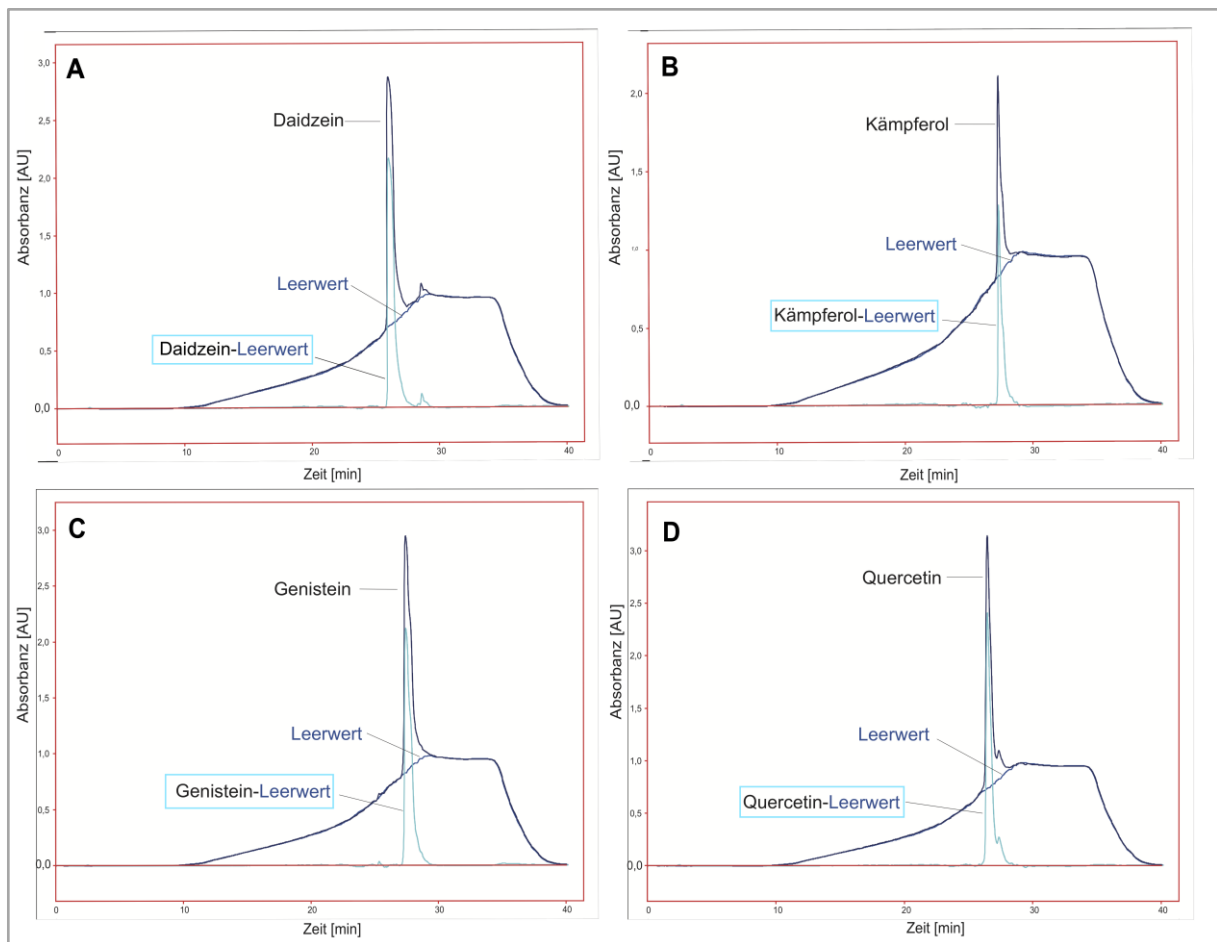


ABBILDUNG 18: HPLC-Ergebnisse der Referenzen, Ordinate \triangleq Absorbanz in Absorbance Unit, Abszisse \triangleq Zeit in Minuten. A zeigt den Graph von Daidzein, B den Kämpferol, C den von Genistein und D den Quercetin. Schwarz: Farbe der jeweiligen Referenz, Blau: Leerwert, Türkis: Differenz zwischen Referenz und Leerwert, welche bei A-D einen eindeutigen Peak zeigt.

Um zu zeigen, dass die Versuchsmethode der HPLC jedoch funktionierte, und in anderen zu untersuchenden Stoffen ein Peak nachgewiesen werden konnte, kamen kommerziell erworbene Reinsubstanzen als Referenzen zum Einsatz: Daidzein, Kämpferol, Genistein und Quercetin. Bei allen kam es in der DMSO Phase zu einem eindeutigen Peak, welcher den jeweiligen Substanzen zugeschrieben werden konnte (Abbildung 18).

Da die hier durchgeführte Analyse nicht zeigen konnte, dass die Referenzen Inhaltsstoffe der Phytolacca-Extrakte sind, kamen sie in weiteren Versuchen nicht mehr zum Einsatz.

4.2 IMMUNHISTOCHEMIE (IHC)

Durch die immunhistochemische Untersuchung konnte der Hormonrezeptorstatus der verwendeten Zellreihen bezüglich der Estrogenrezeptoren α (ER- α) und β (ER- β) sowie ein Progesteronrezeptor (PR) untersucht und gegebenenfalls gesichert werden.

Der Hormonrezeptorstatus ist in der Literatur schon häufig beschrieben¹⁵⁵. Je nach Charge kann es aber zu Variationen der Expressionsprofile kommen, weshalb in dieser Arbeit der Rezeptorstatus nochmals untersucht und potenziell bestätigt werden sollte.

Ein positiver Rezeptorstatus liegt vor, wenn lichtmikroskopisch ein roter Farbumschlag festgestellt werden kann. Als Überprüfung der Funktion des Tests lief eine Negativkontrolle (NK) ohne primäre Antikörper mit. Diese durfte keine rote Farbreaktion zeigen.

4.2.1 HORMONREZEPTORPOSITIVE ZELLINIEN

Bei der immunhistochemischen Untersuchung der Zellreihen MCF-12A und MCF-7 kam es bei der Testung aller drei Rezeptoren zu einer rötlichen Verfärbung. Außerdem wurde bei diesen beiden Zellreihen zusätzlich noch auf den Rezeptor c-erb-B2 untersucht, welcher sich durch eine rote Farbreaktion ebenfalls als positiv verifizierte (Abbildung 19 und 20). Die Zellen der Negativkontrollen verfärbten sich nicht rötlich, das Testverfahren funktionierte somit, wodurch belegt werden konnte, dass die beiden Zellreihen die Hormonrezeptoren ER- α , ER- β , PR und c-erb-B2 exprimieren.

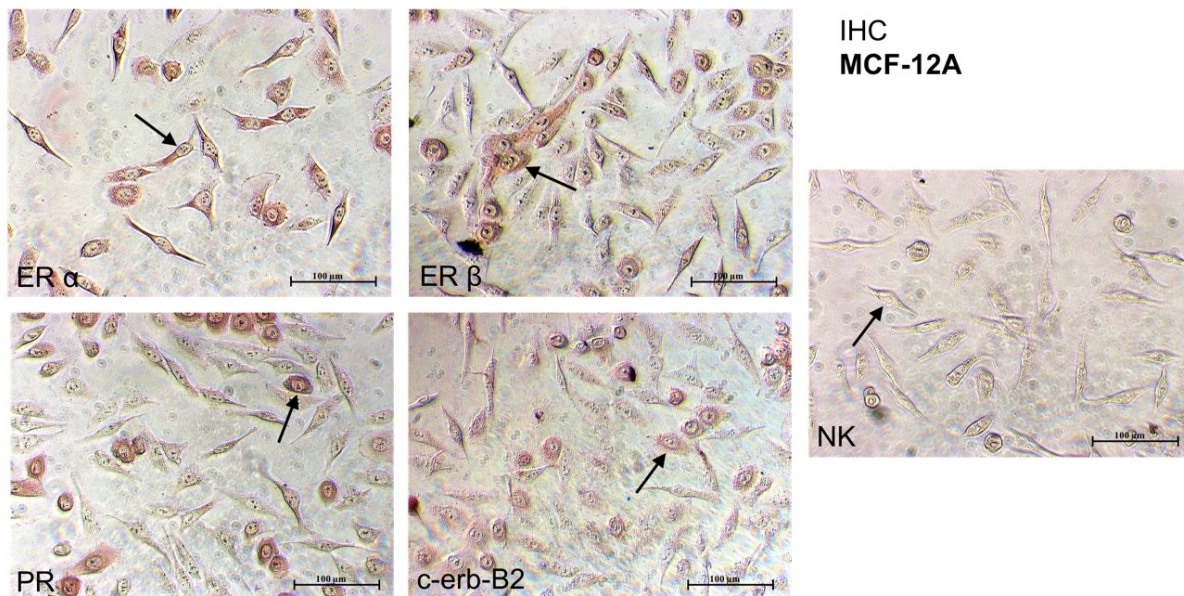


ABBILDUNG 19: Immunhistochemische Untersuchung der MCF-12A-Zelllinie, lichtmikroskopische Aufnahme in 20x Vergrößerung; bei allen getesteten Rezeptoren ist eine rötliche Farbreaktion zu erkennen (Pfeile zeigen auf beispielhafte Zellen), welche die Expression der jeweiligen Rezeptoren zeigt. Bei der Negativkontrolle ist keine Farbreaktion zu erkennen. ER = Estrogenrezeptor, PR = Progesteronrezeptor, NK = Negativkontrolle.

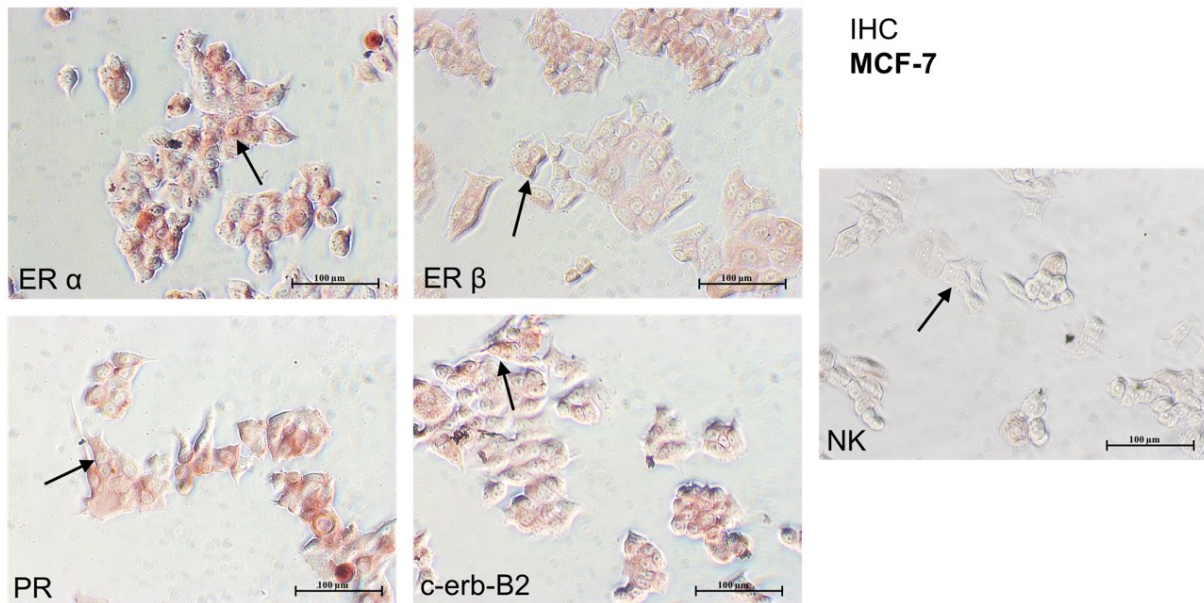


ABBILDUNG 20: Immunhistochemische Untersuchung der MCF-7-Zelllinie, lichtmikroskopische Aufnahme in 20x Vergrößerung; bei allen getesteten Rezeptoren ist eine rötliche Farbreaktion zu erkennen (Pfeile zeigen auf beispielhafte Zellen), welche die Expression der jeweiligen Rezeptoren zeigt. Bei der Negativkontrolle ist keine Farbreaktion zu erkennen. ER = Estrogenrezeptor, PR = Progesteronrezeptor, NK = Negativkontrolle.

4.2.2 HORMONREZEPTORNEGATIVE ZELLINIEN

Die Immunhistochemie der Zellreihen MCF-10A und MDA-MB-231 zeigte bei keinem der drei Rezeptoren eine rötliche Farbreaktion unter dem Lichtmikroskop und glichen somit den Zellen der Negativkontrolle (Abbildung 21 und 22). Es konnte damit belegt werden, dass beide verwendeten Zelllinien weder ER- α und ER- β , noch PR exprimieren.

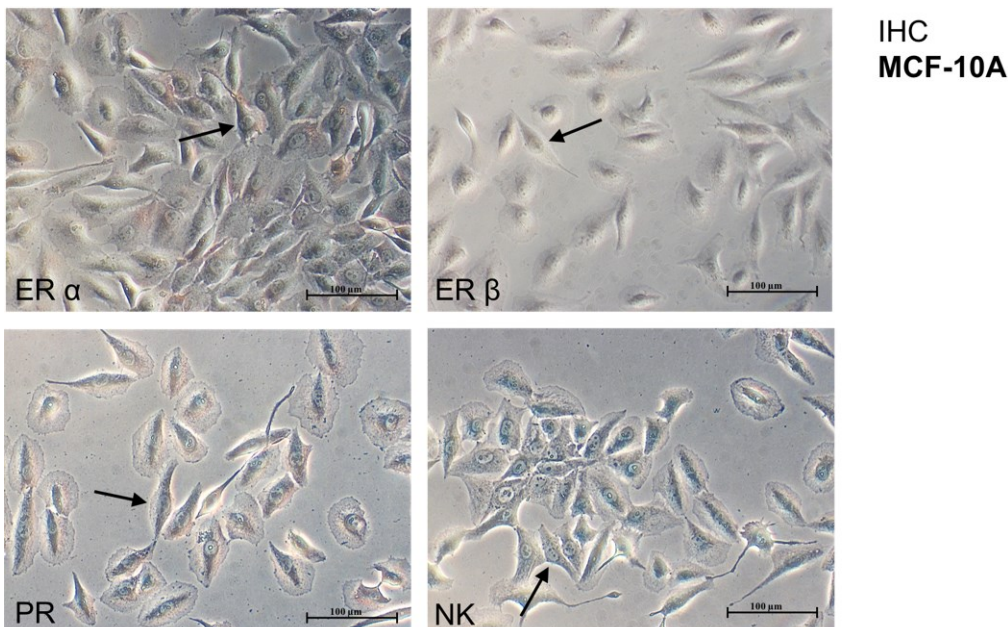


ABBILDUNG 21: Immunhistochemische Untersuchung der MCF-10A-Zelllinie, lichtmikroskopische Aufnahme in 20x Vergrößerung; bei allen getesteten Rezeptoren ist keine rötliche Farbreaktion zu erkennen (Pfeile zeigen auf beispielhafte Zellen), was keine Expression der jeweiligen Rezeptoren zeigt. Bei der Negativkontrolle ist ebenfalls keine Farbreaktion zu erkennen. ER = Estrogenrezeptor, PR = Progesteronrezeptor, NK = Negativkontrolle.

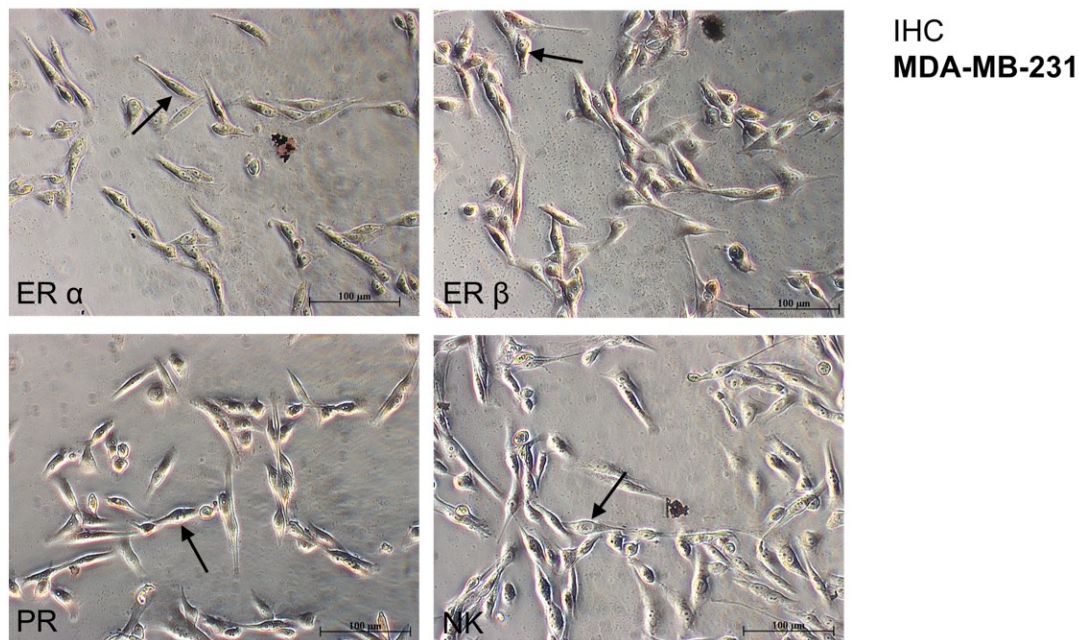


ABBILDUNG 22: Immunhistochemische Untersuchung der MDA-MB-231-Zelllinie, lichtmikroskopische Aufnahme in 20x Vergrößerung; bei allen getesteten Rezeptoren ist keine rötliche Farbreaktion zu erkennen (Pfeile zeigen auf beispielhafte Zellen), was keine Expression der jeweiligen Rezeptoren zeigt. Bei der Negativkontrolle ist ebenfalls keine Farbreaktion zu erkennen. ER = Estrogenrezeptor, PR = Progesteronrezeptor, NK = Negativkontrolle.

4.3 IN-VITRO ZELLTESTS

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der *in-vitro* Zelltests der vier Zelllinien untereinander vergleichend dargestellt. Dabei sind je die zwei benignen Zelllinien, MCF-12A und MCF-10A, und die beiden malignen Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 in einem Diagramm abgebildet. Ein weiteres Diagramm zeigt den Überblick über alle vier Zelllinien exemplarisch an den „100 % Extrakten“.

Im Verhältnis zu den unbeeinflussten Zellen („Medium + Zellen“) sind die verwendeten Lösungsmittel aufgetragen. Alle Grafiken der untersuchten Substanzen (Extrakte, Kontrollen) sind prozentual zu den entsprechenden Lösungsmitteln dargestellt. So konnten Auswirkungen der Lösungsmittel auf die Zellen eliminiert werden (Tabelle 5). Die Mittelwerte der Referenzgruppe „Medium + Zellen“ sind auf 100 % gesetzt, um die Ergebnisse einheitlich darzustellen. Für jede untersuchte Probe wird sowohl die Standardabweichung als auch die Signifikanz mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ durch einen Stern angegeben.

4.3.1 CELLTITER-GLO® - VIABILITÄTSTEST

Bei dem CellTiter-Glo® -Test von Promega kann die Zellviabilität mithilfe des ATP-Gehalts vitaler Zellen durch Lumineszenz-Messungen bestimmt werden.

Die Abszisse zeigt die Proben in g/l. Auf der Ordinate ist die Zellviabilität in Prozent aufgeführt.

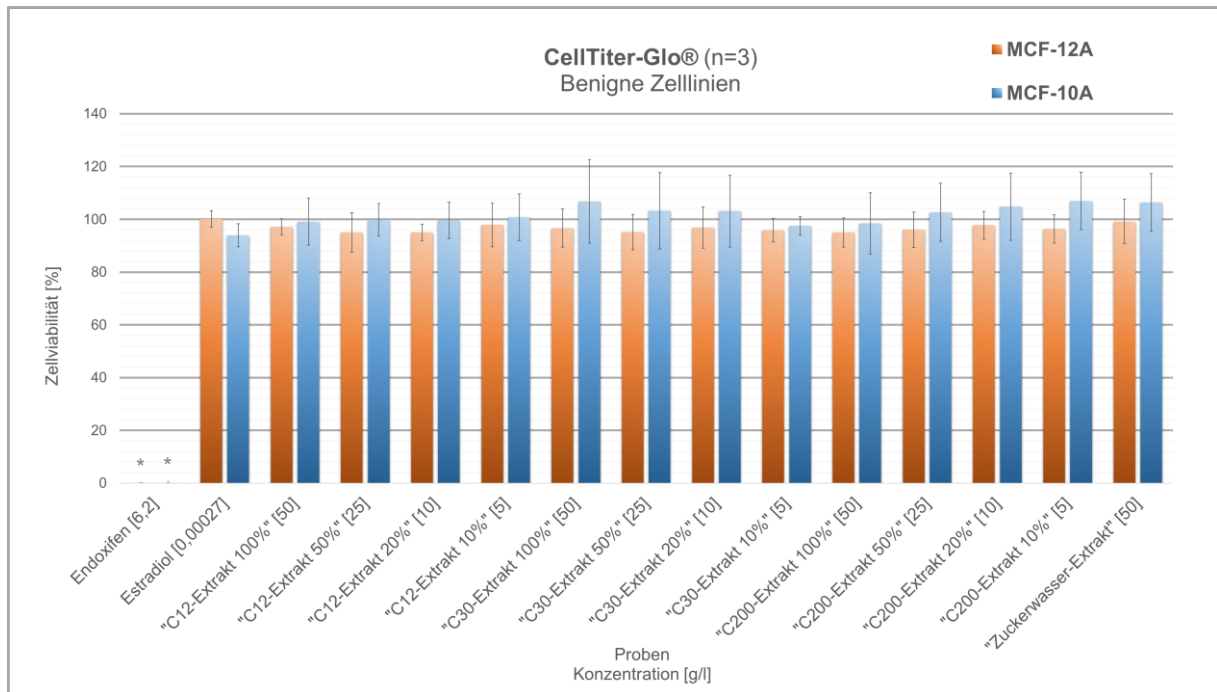


ABBILDUNG 23: Zellviabilität der Zelllinien MCF-12A und MCF-10A, (n=3): CellTiter-Glo®, nach 24 h; Einfluss der Kontrollen (Endoxifen und Estradiol) sowie der Extrakte in verschiedenen Konzentrationen auf die Viabilität der Zellen im Verhältnis zum jeweiligen Lösungsmittel. Illustriert sind die Mittelwerte der Testdurchgänge, Standardabweichung und Signifikanz ($p < 0,05$) sind aufgeführt.

Im CellTiter-Glo® -Test zeigt sich weder für MCF-12A noch für MCF-10A nach Hinzugabe der Extrakte eine Hemmung der Zellviabilität (CV) (Abbildung 23). Dabei gibt es keinen erkennbaren Unterschied unter den einzelnen Extrakten der verschieden dosierten „Globuli“ (Phytolacca C 12, C 30 und C 200). Beispielsweise beträgt die Zellviabilität bei dem „C 12-Extrakt 100 %“ nahe 100 %. Dies entspricht keiner beeinflussenden Wirkung (MCF-12A: CV = 97,1 %, SD \pm 3,05, $p < 0,18$; MCF-10A: CV = 99,1 %, SD \pm 8,91, $p < 0,87$). Ähnliches zeigt sich bei den Werten des „C 200-Extrakt 100%“ (MCF-12A: CV = 95,0 %, SD \pm 5,50, $p < 0,19$; MCF-10A: CV = 98,5 %, SD \pm 11,62, $p < 0,83$). Beim Betrachten der einzelnen Verdünnungsstufen zeigt sich ebenfalls keine Abstufung. Sowohl die 100 % Extrakte als auch die 10 % Extrakte zeigen keine Wirkung auf die Viabilität der Zellen.

Im Vergleich der beiden Zelllinien fällt auf, dass die Extrakte auf die MCF-10A Zellen (rezeptornegativ) tendenziell eine leicht steigernde Wirkung auf die Viabilität haben, was beispielsweise am „C 30-Extrakt 100 %“ zu erkennen ist (MCF-10A: CV = 106,8 %, SD \pm 15,9, $p < 0,49$).

Als Kontrolle der Trägersubstanz Saccharose wurde die Zellviabilität nach Hinzugeben von „Zuckerwasser-Extrakt“ untersucht. Die Ergebnisse gleichen denen der „Globuli-Extrakte“ (MCF-12A: CV = 99,1 %, SD \pm 8,39, $p < 0,86$; MCF-10A: CV = 106,3 %, SD \pm 10,92, $p < 0,37$). Es kann keine hemmende Wirkung, sondern tendenziell, in erster Linie bei den MCF-10A Zellen, eine viabilitätsteigernde Wirkung festgestellt werden.

Die verwendeten Kontrollen Estradiol und Endoxifen zeigen eine zu erwartende Wirkung. Als Negativkontrolle diente Estradiol. Unter dessen Einwirkung verändert sich die Zellviabilität nur geringfügig (MCF-12A: CV = 100,2 %, SD \pm 3,13, $p < 0,94$; MCF-10A: CV = 93,9 %, SD \pm 4,31, $p < 0,07$). Bei der Positivkontrolle Endoxifen hingegen zeigt sich eine hoch signifikante, nahezu komplette Hemmung der Zellviabilität, die ED₅₀ wird deutlich erreicht (MCF-12A: CV = 0,04 %, SD \pm 0,01, $p < 0,02 \times 10^{-15}$; MCF-10A: CV = 0,03 %, SD \pm 0,01, $p < 0,05 \times 10^{-15}$).

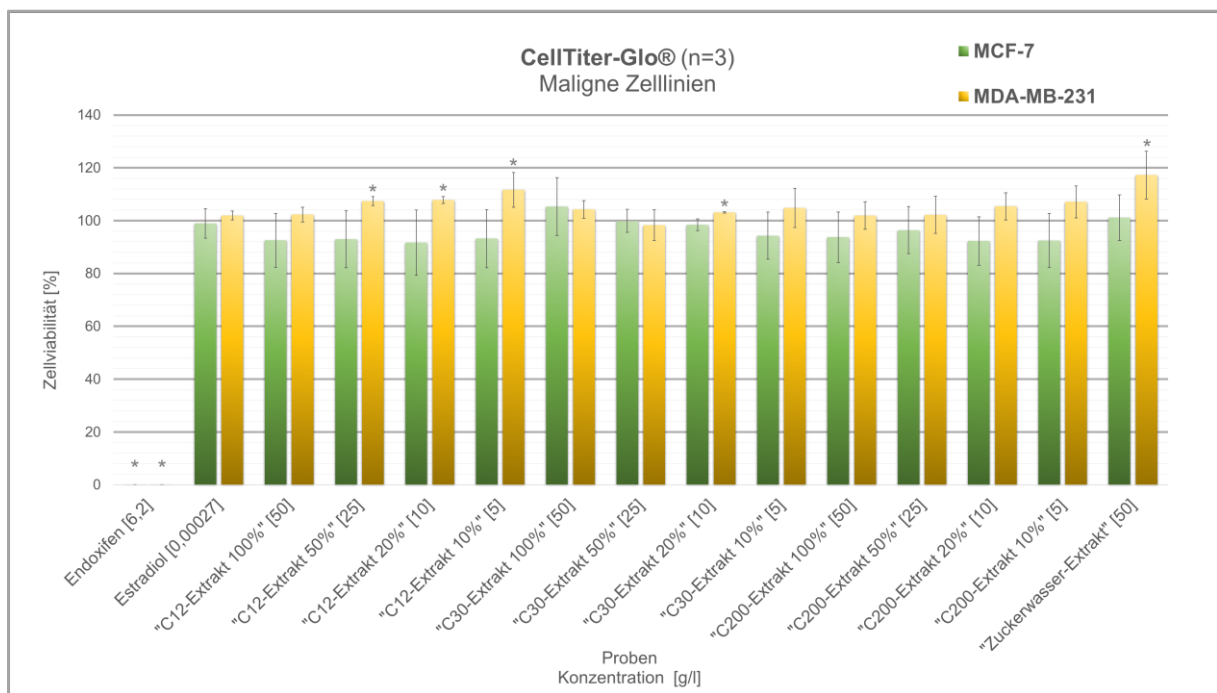


ABBILDUNG 24: Zellviabilität der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231, (n=3): CellTiter-Glo®, nach 24 h; Einfluss der Kontrollen (Endoxifen und Estradiol) sowie der Extrakte in verschiedenen Konzentrationen auf die Viabilität der Zellen im Verhältnis zum jeweiligen Lösungsmittel. Illustriert sind die Mittelwerte der Testdurchgänge, Standardabweichung und Signifikanz ($p < 0,05$) sind aufgeführt.

Für die zwei malignen Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 zeigen sich im CellTiter-Glo® - Test ähnliche Ergebnisse, wie für die beiden benignen Zelllinien (Abbildung 24): Es kann nahezu keine hemmende Wirkung der Extrakte auf die Zellviabilität festgestellt werden, weder bei den unterschiedlichen Extrakten, noch bei den einzelnen Verdünnungen. Die Zellviabilität beträgt bei den „Globuli-Extrakten“ mindestens 91,7 % (MCF-7 bei „C 12-Extrakt 20 %“) und maximal 111,7 % (MDA-MB-231 bei „C 12-Extrakt 10 %“).

Im Vergleich der beiden Zelllinien fällt hier bereits auf, dass die MDA-MB-231 Zellen überwiegend eine viabilitätssteigernde Wirkung erfahren haben ($CV > 100\%$) als die MCF-7 Zellen. Dies zeigt sich beispielsweise beim „C 12-Extrakt 50 %“ (MCF-7: $CV = 93,0\%$, $SD \pm 10,81$, $p < 0,32$; MDA-MB-231: $CV = 107,4\%$, $SD \pm 1,74$, $p < 0,002$). Einzelne Extrakte konnten auf die MCF-7 Zellen eine minimal hemmende Wirkung ausüben, die jedoch nicht signifikant ist.

Der „Zuckerwasser-Extrakt“ zeigt wieder eine tendenziell viabilitätsteigernde Wirkung, vor allem bei den MDA-MB-231 Zellen (MCF-7: $CV = 101,0\%$, $SD \pm 8,60$, $p < 0,83$; MDA-MB-231: $CV = 117,2\%$, $SD \pm 9,08$, $p < 0,03$).

Unter Estradiolwirkung verändert sich die Zellviabilität nicht signifikant (MCF-7: $CV = 99,0\%$, $SD \pm 5,60$, $p < 0,77$; MDA-MB-231: $CV = 101,9\%$, $SD \pm 1,69$, $p < 0,12$). Eine signifikante, nahezu komplette Hemmung zeigt dagegen Endoxifen auf beide Zelllinien und erfüllt die ED_{50} damit deutlich (MCF-7: $CV = 0,03\%$, $SD \pm 0,004$, $p < 0,02 \times 10^{-16}$; MDA-MB-231: $CV = 0,03\%$, $SD \pm 0,05 \times 10^{-13}$, $p < 0,03 \times 10^{-6}$).

In der folgenden Abbildung 25 sind die Viabilitätsergebnisse von allen vier Zelllinien zum besseren Verständnis nochmals zusammengefasst.

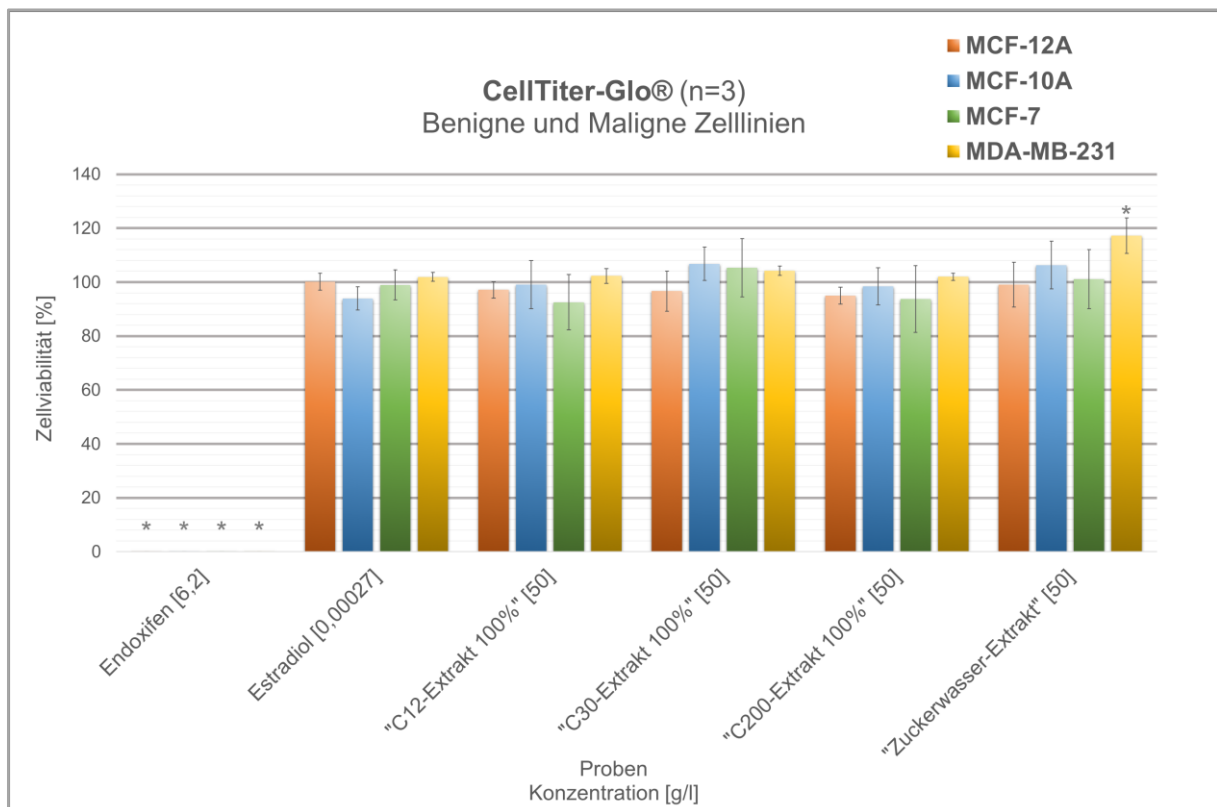


ABBILDUNG 25: Zellviabilität aller vier Zelllinien (MCF-12A, MCF-10A, MCF-7 und MDA-MB-231), (n=3): CellTiter-Glo®, nach 24 h; Einfluss der Kontrollen (Endoxifen und Estradiol) sowie der „100 % - Extrakte“ auf die Viabilität der Zellen im Verhältnis zum jeweiligen Lösungsmittel. Illustriert sind die Mittelwerte der Testdurchgänge, Standardabweichung und Signifikanz ($p < 0,05$) sind aufgeführt.

Fazit: Beim Vergleich der vier Zelllinien zeigt sich unter den einzelnen Zelllinien kein deutlicher Unterschied (Abbildung 25), so ist die Zellviabilität immer nahe 100 %. Die benignen Zelllinien (MCF-12A und MCF-10A) unterscheiden sich in der Zellviabilität kaum von den malignen Zelllinien (MCF-7 und MDA-MB-231).

Nuancen sind jedoch erkennbar, wenn man die rezeptorpositiven Zelllinien (MCF-12A und MCF-7) den rezeptornegativen Zelllinien (MCF-10A und MDA-MB-231) gegenüberstellt. Auf letztere übten die Extrakte beim CellTiter-Glo® -Test tendenziell eine stärker viabilitätssteigernde Wirkung aus, das lässt sich beispielsweise am „C 12-Extrakt 100 %“ sehen (MCF-12A: CV = 97,1; MCF-7: CV = 92,6 % und MCF-10A: CV = 99,1 %; MDA-MB-231: CV = 102,3%).

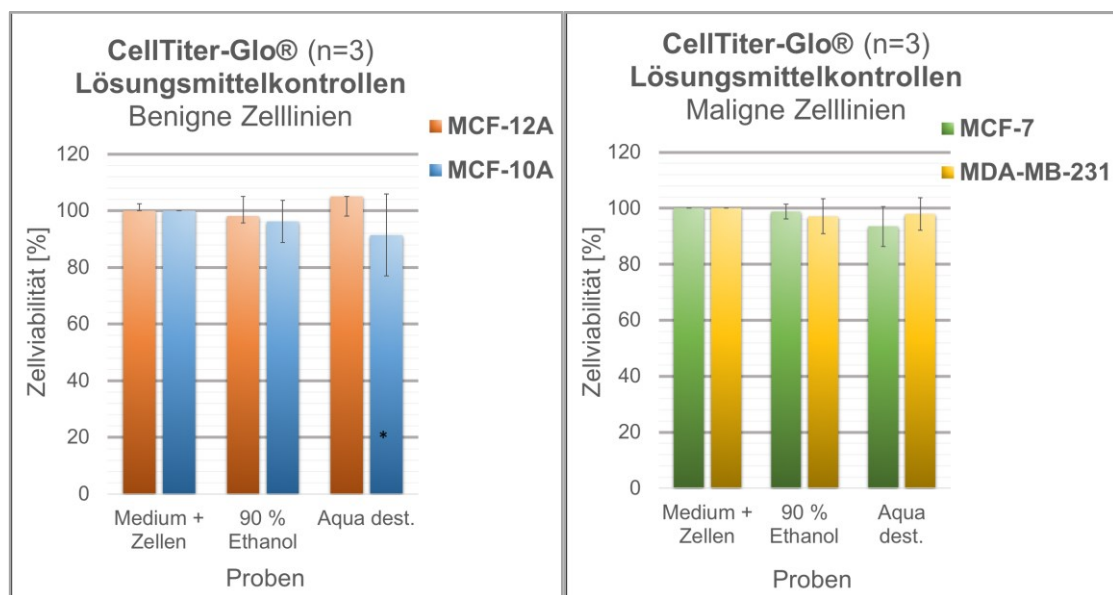


ABBILDUNG 26: Zellviabilität der Zelllinien MCF-12A und MCF-10A

ABBILDUNG 27: Zellviabilität der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231

(n=3): CellTiter-Glo®, nach 24 h; Einfluss der Lösungsmittel auf die Viabilität der Zellen im Verhältnis zu unbeeinflussten Zellen (Medium + Zellen). Illustriert sind die Mittelwerte der Testdurchgänge, Standardabweichung und Signifikanz ($p < 0,05$) sind aufgeführt.

Die beiden verwendeten Lösungsmittel (Aqua dest. und 90 % Ethanol) wirkten sich nicht auf die Zellviabilität aus (Abbildung 26 und 27).

4.3.2 CYTOToX-GLO™ - ZYTOTOXIZITÄTSTEST

Bei dem CytoTox-Glo™-Test von Promega, einem Zytotoxizitäts- bzw. Viabilitätstest, werden aus toten Zellen freigesetzte Enzyme bestimmt, wodurch im Rückschluss die vitalen Zellen ermittelt werden können.

In den folgenden Abbildungen zeigt die Abszisse die Proben in g/l. Auf der Ordinate ist die Zellviabilität in Prozent aufgeführt.

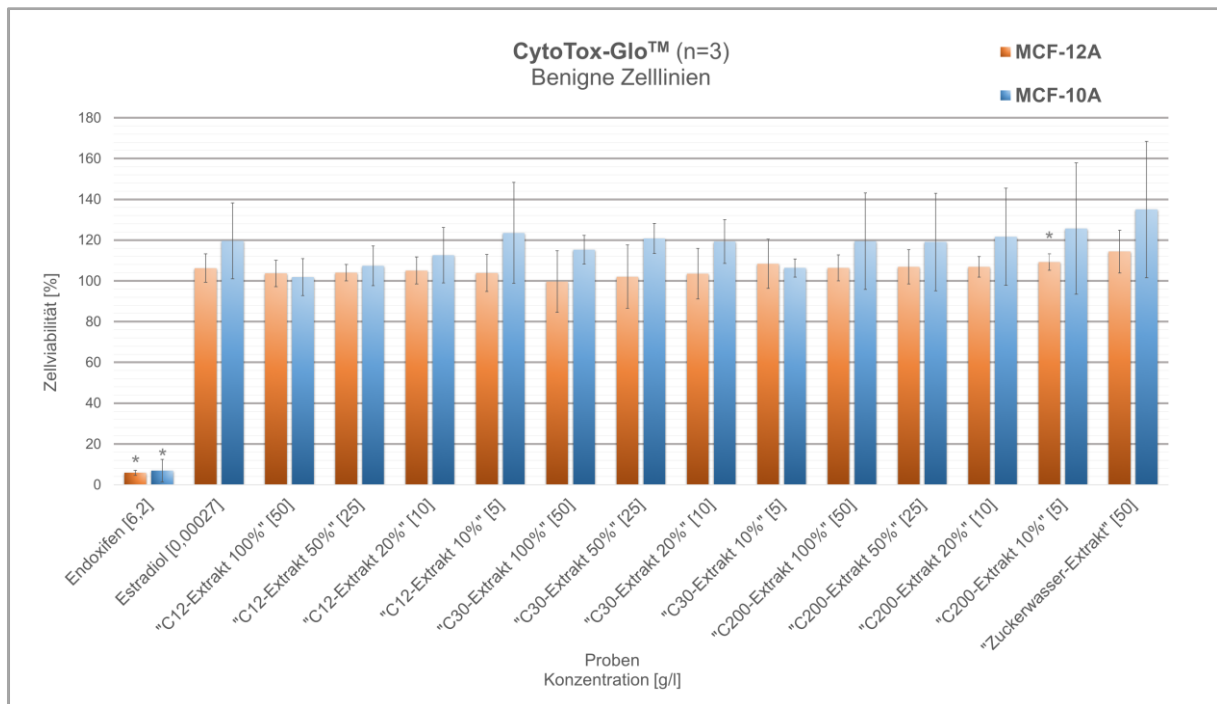


ABBILDUNG 28: Zellviabilität der Zelllinien MCF-12A und MCF-10A, (n=3): CytoTox-Glo™, nach 24 h; Einfluss der Kontrollen (Endoxifen und Estradiol) sowie der Extrakte in verschiedenen Konzentrationen auf die Viabilität der Zellen im Verhältnis zum jeweiligen Lösungsmittel. Illustriert sind die Mittelwerte der Testdurchgänge, Standardabweichung und Signifikanz ($p < 0,05$) sind aufgeführt.

Im CytoTox-Glo™-Test zeigt sich weder für MCF-12A noch für MCF-10A nach Hinzugabe der Extrakte eine Hemmung der Zellviabilität (Abbildung 28). Beim Vergleich der Extrakte untereinander lässt sich dabei kein Unterschied feststellen. Alle Extrakte zeigen bei beiden benignen Zelllinien keinerlei hemmende Wirkung, die Zellviabilität beträgt nie $< 100\%$. Somit wirken sich sowohl die verschiedenen „Globuli-Extrakte“ (Phytolacca C 12, C 30, C 200), als auch die einzelnen Verdünnungsstufen (100 %, 50 %, 20 %, 10 %) nur geringfügig anders auf die Zellviabilität aus. Die Ergebnisse zeigen, dass nicht nur keine Viabilitätshemmung von den Extrakten ausgeht, sondern stattdessen eine gesteigerte Wirkung auf die Zellen festzustellen ist. Diese Wirkung ist bei den rezeptornegativen MCF-10A Zellen ausgeprägter, wie beispielsweise beim „C 200-Extrakt 10 %“ zu erkennen ist (MCF-12A: CV = 109,2 %, SD \pm 3,98, $p < 0,02$; MCF-10A: CV = 125,7 %, SD \pm 32,17, $p < 0,38$).

Eine deutliche gesteigerte Viabilität zeigt sich auch bei der Kontrolle „Zuckerwasser-Extrakt“ (MCF-12A: CV = 114,4 %, SD \pm 10,49, $p < 0,08$; MCF-10A: CV = 135,0 %, SD \pm 33,49, $p < 0,28$).

Unter der Einwirkung von Estradiol, welches als Negativkontrolle verwendet wurde, steigt die Zellviabilität leicht (MCF-12A: CV = 106,3 %, SD \pm 6,90, $p < 0,19$; MCF-10A: CV = 119,6 %, SD \pm 18,59, $p < 0,27$). Das als Positivkontrolle verwendete Endoxifen zeigt hingegen eine Hemmung (MCF-12A: CV = 5,8 %, SD \pm 1,27, $p < 0,02 \times 10^{-6}$; MCF-10A: CV = 6,9 %, SD \pm 5,53 $p < 0,002$), die ED₅₀ wird erreicht.

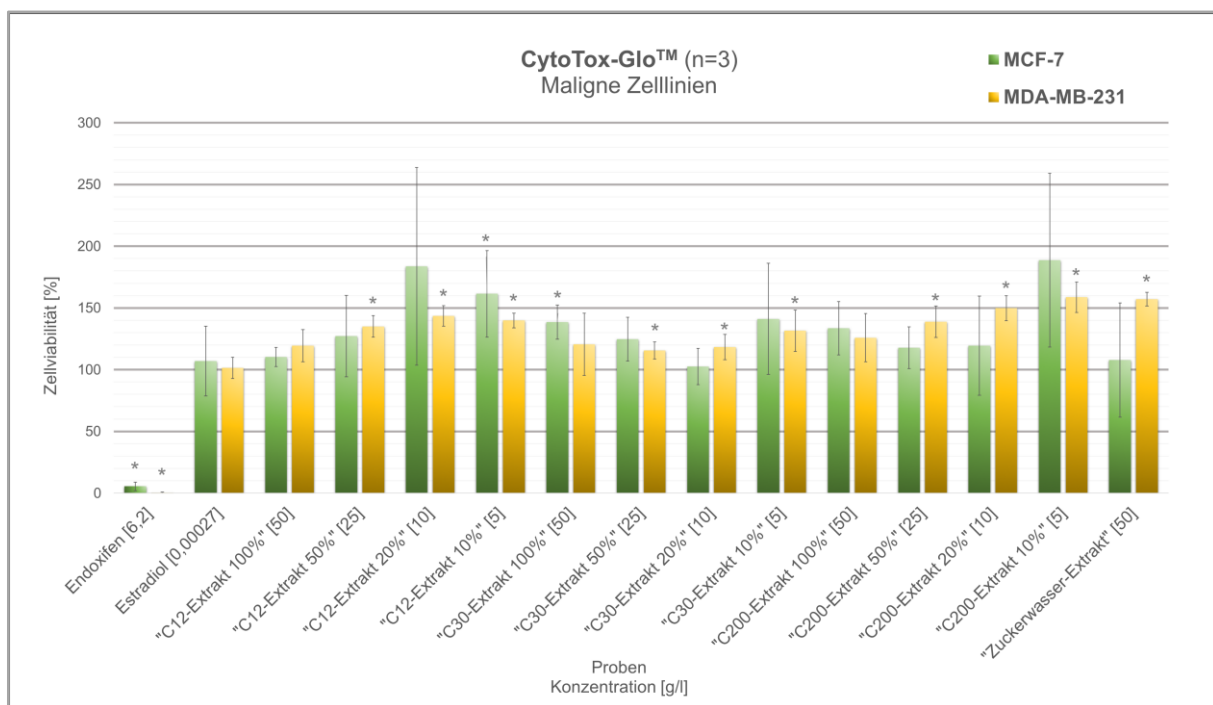


ABBILDUNG 29: Zellviabilität der Zelllinien MCF-12A und MCF-10A, (n=3): CytoTox-Glo™, nach 24 h; Einfluss der Kontrollen (Endoxifen und Estradiol) sowie der Extrakte in verschiedenen Konzentrationen auf die Viabilität der Zellen im Verhältnis zum jeweiligen Lösungsmittel. Illustriert sind die Mittelwerte der Testdurchgänge, Standardabweichung und Signifikanz ($p < 0,05$) sind aufgeführt.

Auch für die malignen Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 zeigt sich im CytoTox-Glo™ -Test keine zellviabilitätshemmende Wirkung der Extrakte auf die Zellen (Abbildung 29). So beträgt der niedrigste Werte für die Zellviabilität in diesem Versuch bei den MCF-7 Zellen 102,6 % („C 30-Extrakt 20 %“) und bei den MDA-MB-231 Zellen 115,6 % („C 30-Extrakt 50 %“). Bei den unterschiedlichen „Globuli-Extrakten“ oder den verschiedenen Verdünnungen ist kein zusammenhängender Unterschied festzustellen. Tendenziell entsprechen alle Ergebnisse der Extrakte damit einer viabilitätssteigernden Wirkung auf die Zellen (CV > 100 %). Dies zeigt sich beispielsweise anhand einer signifikanten Steigerung der Viabilität beider Zelllinien beim „C 12-Extrakt 10 %“ (MCF-7: CV = 161,5 %, SD \pm 35,04, $p < 0,038$; MDA-MB-231: CV = 139,8 %, SD \pm 5,91, $p < 0,001$).

Eine stark viabilitätssteigernde Wirkung fand vor allem bei den rezeptorpositiven MCF-7 Zellen statt. Bei insgesamt drei Extrakten übersteigt die Zellviabilität deutlich die 150 %

(C 12-Extrakt 20 %: CV = 183,7 %, C 12-Extrakt 10 %: CV = 161,5 %, C 200-Extrakt 10 %: CV = 188,7 %). Bei den rezeptornegativen MDA-MB-231 Zellen ist die Viabilitätssteigerung am signifikantesten bei dem „C 200-Extrakt 10 %“ ausgeprägt (CV = 158,7 %, SD \pm 12,34, $p < 0,001$).

Die Kontrolle „Zuckerwasser-Extrakt“ zeigt bei den MCF-7 Zellen eine weniger viabilitätssteigernde Wirkung (CV = 107,8 %, SD \pm 46,38, $p < 0,78$) und bei den MDA-MB-231 Zellen eine signifikante proliferierende Wirkung (CV = 157,1 %, SD \pm 5,57, $p < 0,05 \times 10^{-3}$).

Unter Estradiolwirkung steigert sich die Zellviabilität marginal. (MCF-7: CV = 106,9 %, SD \pm 28,2, $p < 0,69$; MDA-MB-231: CV = 101,47 %, SD \pm 8,68, $p < 0,78$). Eine signifikante, starke Hemmung zeigt wiederum auch hier Endoxifen auf beide Zelllinien und unterbietet die ED₅₀ damit deutlich (MCF-7: CV = 5,4 %, SD \pm 3,59, $p < 0,01 \times 10^{-4}$; MDA-MB-231: CV = 0,45 %, SD \pm 0,36 $p < 0,01 \times 10^{-8}$).

In der folgenden Abbildung 30 sind die Viabilitätsergebnisse von allen vier Zelllinien zum besseren Verständnis nochmals zusammengefasst.

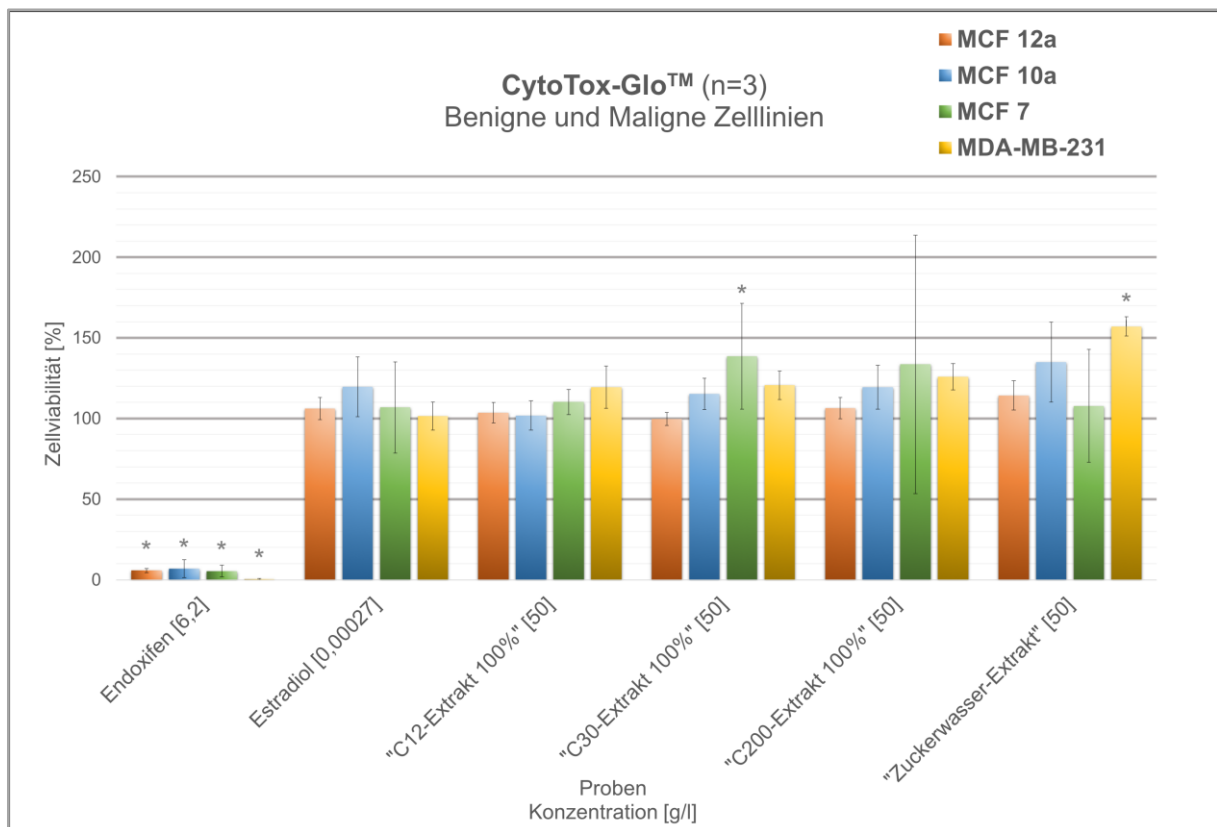


ABBILDUNG 30: Zellviabilität aller vier Zelllinien (MCF-12A, MCF-10A, MCF-7 und MDA-MB-231), (n=3): CytoTox-Glo™, nach 24 h; Einfluss der Kontrollen (Endoxifen und Estradiol) sowie der „100 % - Extrakte“ auf die Viabilität der Zellen im Verhältnis zum jeweiligen Lösungsmittel. Illustriert sind die Mittelwerte der Testdurchgänge, Standardabweichung und Signifikanz ($p < 0,05$) sind aufgeführt.

Fazit: Im gemeinsamen Vergleich aller vier Zelllinien zeigen sich bei den verschiedenen „Globuli-Extrakten“ keine ausgeprägten Unterschiede in den Ergebnissen (Abbildung 30). So sind keinerlei zytotoxische bzw. viabilitätshemmende Effekte auf die Mammazellen zu erkennen. Die Zellviabilität ist stets über 100 %.

Bei den beiden malignen Zelllinien (MCF-7 und MDA-MB-231) ist im Vergleich zu den zwei benignen Zelllinien (MCF-12A und MCF-10A) im CytoTox-Glo™-Test eine noch stärker ausgeprägte viabilitätssteigernde Wirkung auf die Zellen zu erkennen. Dies wird zum Beispiel beim „C 30-Extrakt 100 %“ deutlich (MCF-7: CV = 138,6 %; MDA-MB-231: CV = 120,6% und MCF-12A: CV = 100 %; MCF-10A: CV = 115,3 %).

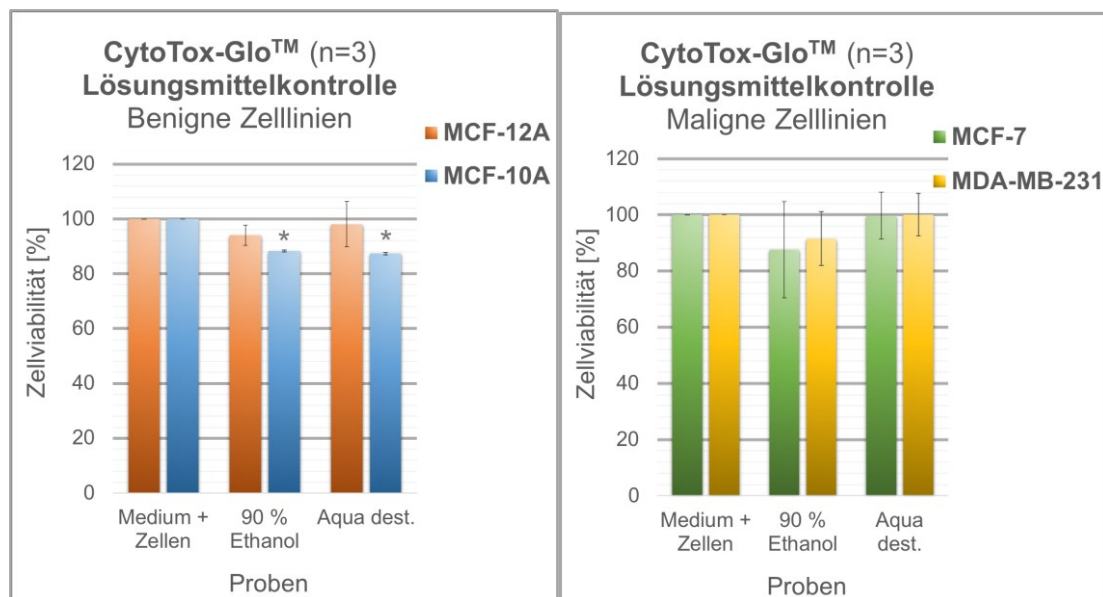


ABBILDUNG 31: Zellviabilität der Zelllinien MCF-12A und MCF-10A

ABBILDUNG 32: Zellviabilität der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231

(n=3): CytoTox-Glo™, nach 24 h; Einfluss der Lösungsmittel auf die Viabilität der Zellen im Verhältnis zu unbeeinflussten Zellen (Medium + Zellen). Illustriert sind die Mittelwerte der Testdurchgänge, Standardabweichung und Signifikanz ($p < 0,05$) sind aufgeführt.

Die verwendeten Lösungsmittel (Aqua dest. und 90 % Ethanol) wirkten sich geringfügig auf die Zellviabilität aus (Abbildung 31 und 32). Tendenziell bei allen Zelllinien jedoch eher zellviabilitätshemmend, was sich vor allem am 90 % Ethanol zeigt (MCF-12A: CV = 94,1; MCF-10A: CV = 88,3 %; MCF-7: CV = 87,6 %; MDA-MB-231: CV = 91,5%).

4.3.3 BRdU - PROLIFERATIONSTEST

Bei dem BrdU-Test von der Firma Roche, einem Proliferationstest, wird neu synthetisierte DNA ermittelt, wodurch Rückschlüsse auf das Wachstumsverhalten der Zellen geschlossen werden können.

Die Abszisse zeigt die Proben in g/l. Auf der Ordinate ist die Zellproliferation in Prozent aufgeführt.

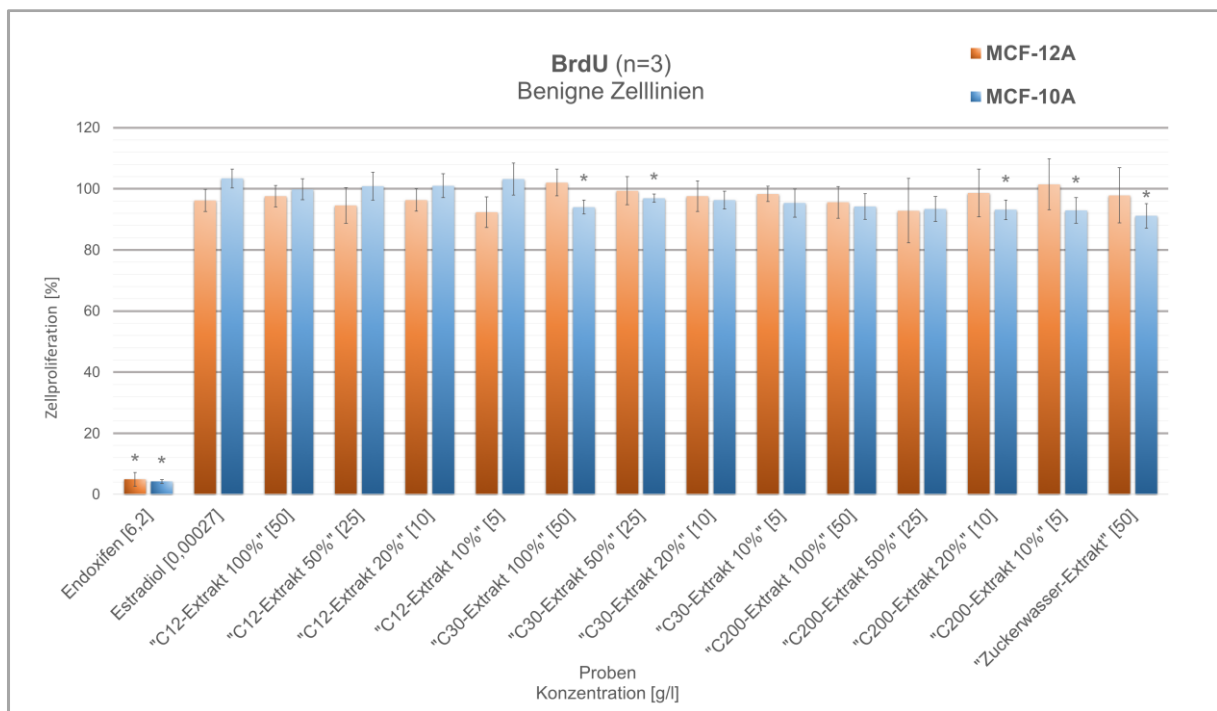
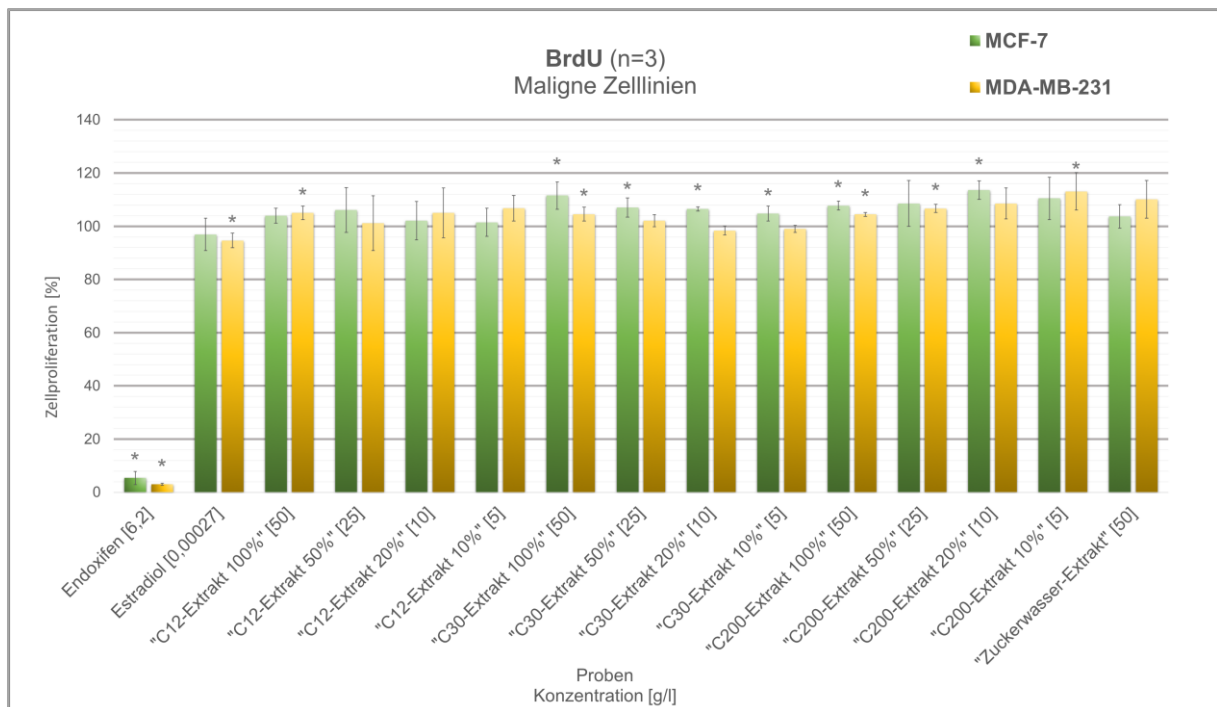


ABBILDUNG 33: Zellproliferation der Zelllinien MCF-12A und MCF-10A, (n=3): BrdU-Test, nach 24 h; Einfluss der Kontrollen (Endoxifen und Estradiol) sowie der Extrakte in verschiedenen Konzentrationen auf die Proliferation der Zellen im Verhältnis zum jeweiligen Lösungsmittel. Illustriert sind die Mittelwerte der Testdurchgänge, Standardabweichung und Signifikanz ($p < 0,05$) sind aufgeführt.

Im BrdU-Test zeigen die „Globuli-Extrakte“ auf die beiden benignen Zelllinien MCF-12A und MCF-10A keine starke Hemmung der Zellproliferation (= CP) (Abbildung 33). Dabei lässt sich auch keine Dosis-Wirkungs-Beziehung nachvollziehen, es ist also kein deutlicher Unterschied zwischen den einzelnen „Globuli-Extrakten“ oder den unterschiedlichen Verdünnungen zu erkennen. Beispielsweise gleichen die Ergebnisse des „C 30-Extrakt 100 %“ (MCF-12A: CP = 102,0 %, SD \pm 4,39, $p < 0,47$; MCF-10A: CP = 94,0 %, SD \pm 2,24, $p < 0,01$) denen des „C 200-Extrakt 10 %“ (MCF-12A: CP = 101,5 %, SD \pm 9,0, $p < 0,7$; MCF-10A: CP = 92,9 %, SD \pm 4,19, $p < 0,04$). Bei einigen „Globuli-Extrakten“ liegt ein leichter proliferationssteigernder Effekt vor mit CP > 100% (MCF12-A: C 30-Extrakt 100 %, C 200-Extrakt 10 %; MCF-10A: C 12-Extrakt 50 %, 20 % und 10 %). Der Maximalwert mit der höchsten Proliferation erreicht bei den rezeptorpositiven MCF-12A Zellen der „C 12-Extrakt 100 %“ (CP = 102,0 %,

SD \pm 4,39, $p < 0,47$) und bei den rezeptornegativen MCF-10A Zellen der „C 12-Extrakt 10 %“ (CP = 103,2 %, SD \pm 5,26, $p < 0,35$). Der Minimalwert, und damit die größte Hemmung der Proliferation, jedoch immer noch > 90 %, fand bei den MCF-12A Zellen bei „C 12-Extrakt 10 %“ statt (CP = 92,4 %, SD \pm 5,03, $p < 0,058$). Bei den MCF-10A Zellen ergibt sich die geringste Proliferation bei „C100-Extrakt 10 %“ (CP = 92,9 %, SD \pm 4,19, $p < 0,04$).

Die Kontrolle „Zuckerwasser-Extrakt“ zeigt in diesem Versuch minimal hemmende Wirkung (MCF-12A: CP = 97,8 %, SD \pm 9,00, $p < 0,70$; MCF-10A: CP = 91,1 %, SD \pm 3,98, $p < 0,018$). Die Negativkontrolle von Estradiol zeigt kaum eine Wirkung mit Werten von CP nahe 100 % (MCF-12A: CP = 96,2 %, SD \pm 3,62, $p < 0,14$; MCF-10A: CP = 103,4 %, SD \pm 3,09, $p < 0,13$). Endoxifen wiederum erreicht für beide Zelllinien eine statistisch hochsignifikante Proliferationshemmung, deutlich unter der ED₅₀ (MCF-12A: CP = 4,9 %, SD \pm 2,28, $p < 0,02 \times 10^{-5}$; MCF-10A: CP = 4,2 %, SD \pm 0,62, $p < 0,01 \times 10^{-7}$).



ABILDUNG 34: Zellproliferation der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231, (n=3): BrdU-Test, nach 24 h; Einfluss der Kontrollen (Endoxifen und Estradiol) sowie der Extrakte in verschiedenen Konzentrationen auf die Proliferation der Zellen im Verhältnis zum jeweiligen Lösungsmittel. Illustriert sind die Mittelwerte der Testdurchgänge, Standardabweichung und Signifikanz ($p < 0,05$) sind aufgeführt.

Die „Globuli-Extrakte“ zeigen im BrdU-Test für die beide malignen Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 so gut wie keine dosisabhängige Wirkung auf die Proliferation (Abbildung 34). Eine marginale proliferationshemmende Wirkung ist lediglich bei zwei Verdünnungen des C 30-Extraktes auf die MDA-MB-231 Zellen zu erkennen (C 30-Extrakt 20 %: CP = 98,4 %, SD \pm 1,72, $p < 0,19$; C 30-Extrakt 10 %: CP = 99,1 %, SD \pm 1,36, $p < 0,28$). Alle anderen „Globuli-Extrakte“ hatten auf die Mammakarzinomzellen eine proliferationssteigernde Wirkung. Bei den

rezeptorpositiven MCF-7 Zellen erreicht „C 200-Extrakt 20 %“ die höchste, signifikante Proliferationssteigerung (CP = 113,6 %, SD \pm 3,49, $p < 0,003$). Bei rezeptornegativen MDA-MB-231 Zellen zeigt sie sich bei „C 200-Extrakt 10 %“ (CP = 113,0 %, SD \pm 7,02, $p < 0,032$). Die zwei Zelllinien stellen sich bei diesem Proliferationsstest relativ einheitlich dar und gleichen sich in den einzelnen Werten bei den unterschiedlichen Extrakten, wie beispielsweise bei „C 12-Extrakt 100 %“ (MCF-7: CP = 103,3 %, SD \pm 2,82, $p < 0,07$; MDA-MB-231: CP = 104,9 %, SD \pm 2,54, $p < 0,027$) und „C 200-Extrakt 50 %“ (MCF-7: CP = 108,5 %, SD \pm 8,65, $p < 0,16$; MDA-MB-231: CP = 106,7 %, SD \pm 1,59, $p < 0,001$) zeigt.

Die Kontrolle „Zuckerwasser-Extrakt“ zeigt eine geringfügig proliferationssteigernde Wirkung (MCF-7: CP = 103,7 %, SD \pm 4,38, $p < 0,21$; MDA-MB-231: CP = 110,1 %, SD \pm 7,06, $p < 0,07$). Bei Estradiol kann kaum eine Wirkung auf die Mammakarzinomzellen nachgewiesen werden (MCF-7: CP = 96,9 %, SD \pm 6,02, $p < 0,43$; MDA-MB-231: CP = 94,7 %, SD \pm 2,70, $p < 0,026$). Nur die Kontrollsubstanz Endoxifen zeigt eine fast komplette, signifikante Proliferationshemmung unter der ED₅₀ (MCF-7: CP = 5,4 %, SD \pm 2,47, $p < 0,03 \times 10^{-5}$; MDA-MB-231: CP = 2,9 %, SD \pm 0,40, $p < 0,02 \times 10^{-8}$).

In der folgenden Abbildung 35 sind die Proliferationsergebnisse von allen vier Zelllinien zum besseren Verständnis nochmals zusammengefasst.

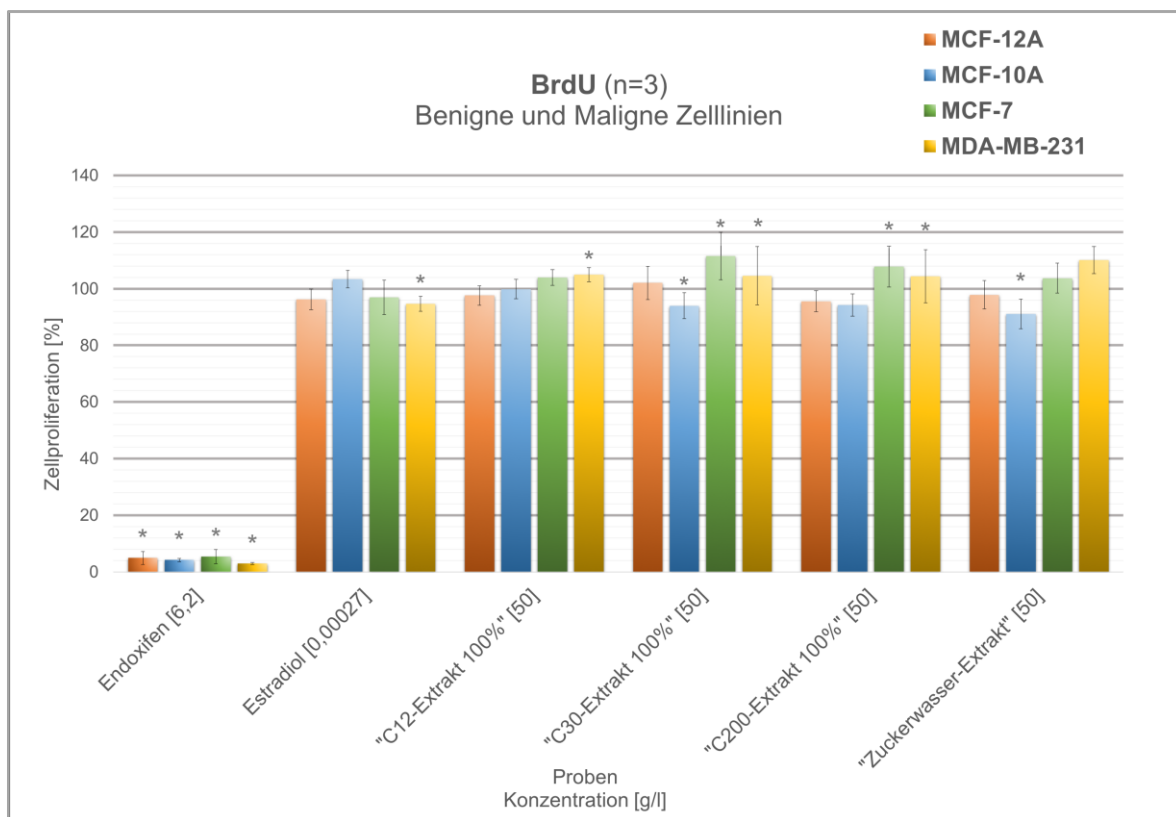


ABBILDUNG 35: Zellproliferation aller vier Zelllinien (MCF-12A, MCF-10A, MCF-7 und MDA-MB-231), (n=3): BrdU-Test, nach 24 h; Einfluss der Kontrollen (Endoxifen und Estradiol) sowie der „100 % - Extrakte“ auf die Proliferation der Zellen im Verhältnis zum jeweiligen Lösungsmittel. Illustriert sind die Mittelwerte der Testdurchgänge, Standardabweichung und Signifikanz ($p < 0,05$) sind aufgeführt.

Fazit: Beim abschließenden Vergleich aller vier Mammazelllinien zeigt sich zwischen den verschiedenen Zelllinien keine große Diskrepanz (Abbildung 35). Die Zellproliferation ist bei den „Globuli-Extrakten“ immer nahe 100 %, was weder einer hemmenden noch einer steigernden Wirkung entspricht.

Die Extrakte zeigen auf die malignen Zelllinien MCF-7 und MDA-MB231 verglichen mit den benignen Zelllinien (MCF-12A und MCF-10A) im BrdU-Test tendenziell eine stärkere, proliferierende Wirkung, dies wird beispielsweise bei „C 200-Extrakt 100 %“ sichtbar: (MCF-7: CP = 107,8 %; MDA-MB-231: CP = 104,4% und MCF-12A: CP = 95,6 %; MCF-10A: CP = 94,2 %).

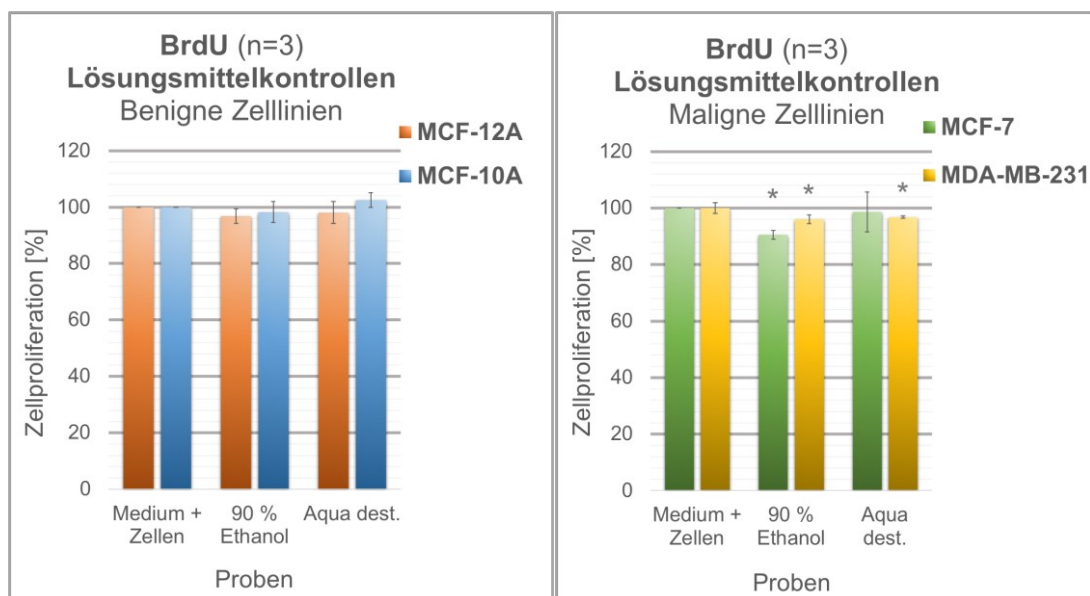


ABBILDUNG 36: Zellproliferation der Zelllinien MCF-12A und MCF-10A

ABBILDUNG 37: Zellproliferation der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231

(n=3): BrdU-Test, nach 24 h; Einfluss der Lösungsmittel auf die Proliferation der Zellen im Verhältnis zu unbeeinflussten Zellen (Medium + Zellen). Illustriert sind die Mittelwerte der Testdurchgänge, Standardabweichung und Signifikanz ($p < 0,05$) sind aufgeführt.

Die verwendeten Lösungsmittel (Aqua dest. und 90 % Ethanol) wirken sich nahezu nicht auf die Zellproliferation aus (Abbildung 36 und 37). Marginal ist lediglich vor allem bei den malignen Zelllinien eine leichte proliferationshemmende Wirkung festzustellen, was sich dort am meisten beim 90 % Ethanol zeigt (MCF-7: CP = 90,5 %, SD \pm 1,60, $p < 0,001$; MDA-MB-231: CP = 96,1%, SD \pm 1,91, $p < 0,02$).

4.3.4 FAZIT DER IN-VITRO ZELLTESTS

In den durchgeführten Untersuchungen zur Zellviabilität und Zellproliferation konnte für die „Globuli-Extrakte“ keine eindeutige hemmende Wirkung nachgewiesen werden. Dabei zeigen die vier Zelllinien keine klaren Unterschiede. Auch beim Vergleich der einzelnen „Globuli-Extrakte“ untereinander fällt weder bei den unterschiedlich hochdosierten „Globuli“ (Phytolacca in C 12, C 30 und C 200), noch bei den verschiedenen Verdünnungen ein sich wiederholender Unterschied zwischen den Extrakten auf. Die „Globuli-Extrakte“ zeigen in allen Untersuchungen eine ähnliche Wirkung, tendenziell eine viabilitäts-/proliferationssteigernde Wirkung, wie die Kontrollsubstanz „Zuckerwasser-Extrakt“.

Lediglich die Positivkontrolle Endoxifen weist bei allen Untersuchungen eine signifikant hemmende Wirkung auf.

Beim Cell-Titer-Glo® -Test fällt auf, dass es bei den beiden rezeptornegativen Zelllinien zu einer stärkeren Viabilitätssteigerung kommt, als bei den beiden rezeptorpositiven Zelllinien.

Der CytoTox-Glo™ -Test und der BrdU-Test zeigen bei den malignen Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 tendenziell eine stärkere Viabilitäts-/Proliferationssteigerung, als bei den beiden benignen Zelllinien.

4.4 MESSUNG DER GLUKOSE- UND LAKTATKONZENTRATION UND DES pH-WERTES

Um die Stoffwechsellaage der Zellen bewerten zu können, erfolgt die Bestimmung der Glukose- und Laktatkonzentration, sowie des pH-Wertes im Überstand der Zellen. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt. Zusammengefasst sind je die zwei benignen und die zwei malignen Zelllinien. Anhand der Messungen sollte hauptsächlich die Vitalität der Zellen überprüft werden. Die pH-Messung sollte außerdem untersuchen, ob eine aerobe oder anaerobe Stoffwechsellaage vorliegt. Letztere wäre mit einem niedrigen pH-Wert assoziiert.

4.4.1 GLUKOSE-MESSUNG

Die Glukosewerte zeigen bei den benignen Zelllinien jeweils ein relativ konstantes Bild (Abbildung 38).

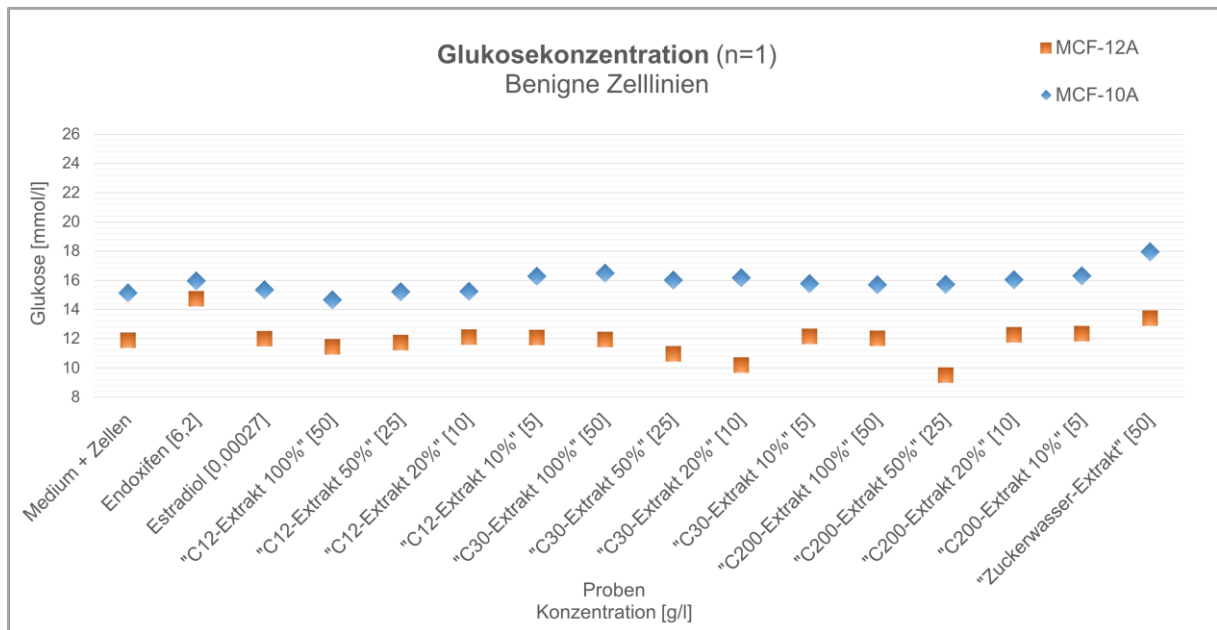


ABBILDUNG 38: Glukose-Messung der Zelllinien MCF-12A und MCF-10A, (n=1): Glukosekonzentration [mmol/l] im Medium nach 24 h unter Einwirken der Referenz (Medium+Zellen), der Kontrollen (Endoxifen und Estradiol) sowie der Extrakte in verschiedenen Konzentrationen.

Bei den rezeptorpositiven MCF-12A Zellen ergeben sich unter Einwirkung der verschiedenen Extrakte und ihrer Verdünnungen ähnliche Ergebnisse wie für „Medium+Zellen“ (Glukose = 11,9 mmol/l), was als Referenzwert dient. Dies verdeutlicht, dass die Extrakte keinen großen Einfluss auf den Zuckergehalt des Mediums genommen haben. Der Minimalwert der „Globuli-Extrakte“ bei dieser Zelllinie ergibt sich unter dem „C 200-Extrakt 50 %“ (Glukose = 9,5 mmol/l), der Maximalwert für „C 200-Extrakt 10 %“ (Glukose = 12,3 mmol/l). Dies ergibt eine *Range* von 2,8 mmol/l. Die Kontrolle Endoxifen erreicht den höchsten Anstieg der Glukosekonzentration (Glukose = 14,7 mmol/l) und „Zuckerwasser-Extrakt“ den zweithöchsten (Glukose = 13,4 mmol/l). Estradiol wiederum zeigt nur einen marginalen Unterschied von 0,09 mmol/l verglichen mit dem Referenzwert Medium + Zellen (Glukose = 12,0 mmol/l).

Die Ergebnisse der rezeptornegativen MCF-10A Zellen fallen ungefähr 4,5 mmol/l höher aus, als bei den MCF-12A Zellen. Die Range bei den MCF-10A Zellen unter Einwirken der „Globuli-Extrakte“ zeigt sich einheitlicher mit 1,8 mmol/l (Maximum: „C 30-Extrakt 100 %“ (Glukose = 16,5 mmol/l), Minimum: „C 12-Extrakt 100 %“ (Glukose = 14,7 mmol/l) bei einem Referenzwert von 15,1 mmol/l, was auch hier gegen einen ausgeprägten Einfluss auf den Zuckergehalt spricht. Die Kontrolle Estradiol zeigt ein sehr ähnliches Ergebnis wie die Referenz (Glukose = 15,3 mmol/l).

Endoxifen steigert die Glukosekonzentration geringfügig (Glukose = 16,0 mmol/l). Die höchste Steigerung bewirkt „Zuckerwasser-Extrakt“ (Glukose = 17,9 mmol/l).

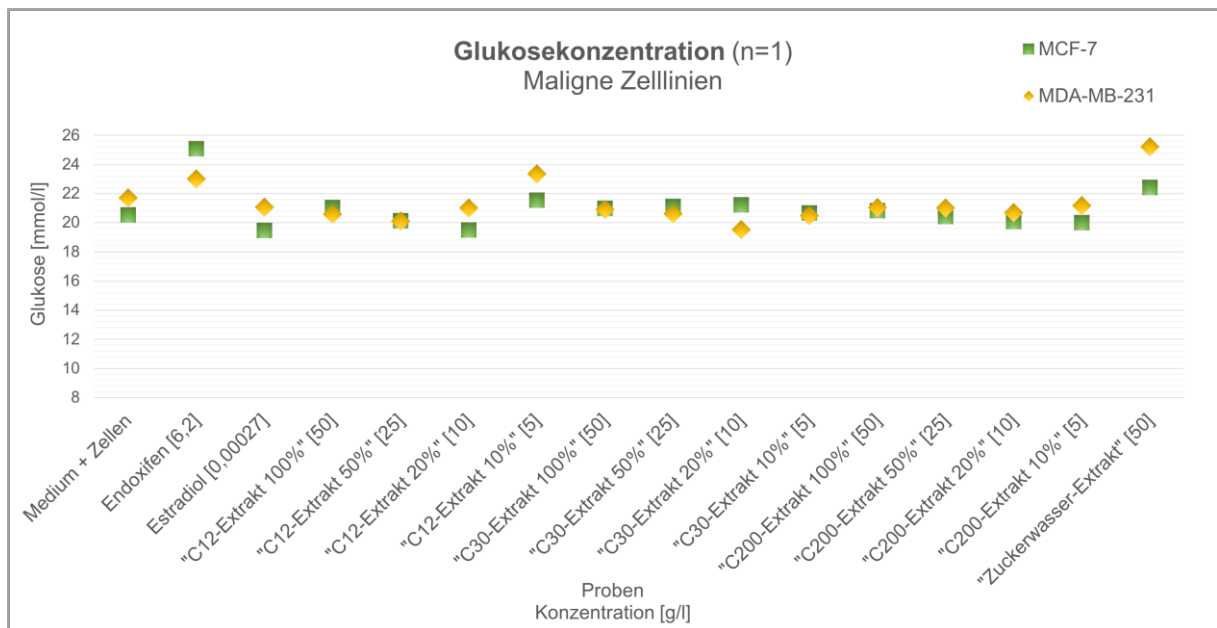


ABBILDUNG 39: Glukose-Messung der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231, (n=1): Glukosekonzentration [mmol/l] im Medium nach 24 h unter Einwirken der Referenz (Medium+Zellen), der Kontrollen (Endoxifen und Estradiol) sowie der Extrakte in verschiedenen Konzentrationen.

Die beiden malignen Zelllinien zeigen bei der Glukose-Messung ähnliche Ergebnisse. Unter Einwirkung der „Globuli-Extrakte“ konnte kaum eine Beeinflussung der Glukosekonzentration erreicht werden, so ähneln diese Werte dem der Referenzen Medium + Zellen (MCF-7: Glukose = 20,5 mmol/l; MDA-MB-231: Glukose = 21,7) (Abbildung 39). Den höchsten Wert erreicht jeweils der „C 12-Extrakt 10 %“ (MCF-7: Glukose = 21,5 mmol/l; MDA-MB-231; Glukose = 23,4 mmol/l), bei den MDA-MB-231 Zellen. Den niedrigsten Wert zeigt bei den MCF-7 Zellen „C 12-Extrakt 20 %“ (Glukose = 19,5 mmol/l) und bei den MDA-MB-231 Zellen „C 30-Extrakt 20 %“ (Glukose = 19,5 mmol/l). Dies ergibt eine Range von 2,0 mmol/l bei MCF-7 und eine etwas höhere Range von 3,9 mmol/l bei MDA-MB-231.

Auch bei diesen Zelllinien zeigt die Kontrolle Estradiol ähnliche Werte wie die Referenz und damit kaum einen Einfluss auf den Zuckergehalt (MCF-7: Glukose = 19,5 mmol/l; MDA-MB-231; Glukose = 21,1 mmol/l). Endoxifen (MCF-7: Glukose = 25,1 mmol/l; MDA-MB-231; Glukose = 23,0 mmol/l) und „Zuckerwasser-Extrakt“ (MCF-7: Glukose = 22,4 mmol/l; MDA-MB-231; Glukose = 25,2 mmol/l) zeigen jeweils eine erhöhte Glukosekonzentration.

Insgesamt fällt auf, dass beide maligne Zelllinien deutlich höhere Ergebnisse für die Glukosekonzentration zeigen, als die zwei benignen Zelllinien. Bei allen vier Zelllinien kann kein großer Unterschied unter den verschiedenen „Globuli Extrakten“ festgestellt werden.

4.4.2 LAKTAT-MESSUNG

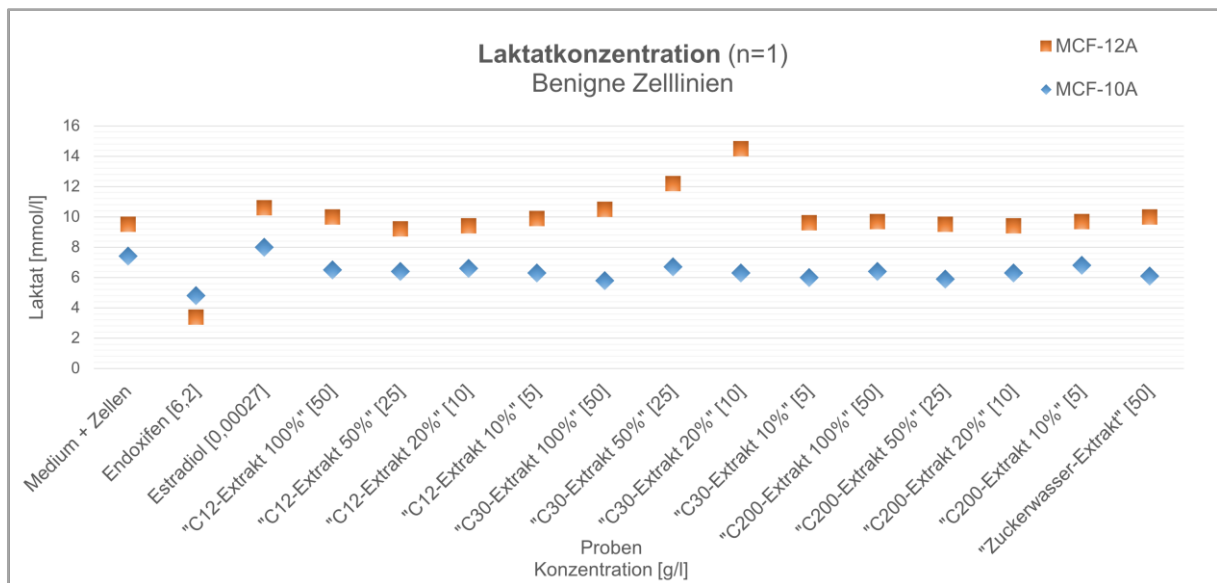


ABBILDUNG 40: Laktat-Messung der Zelllinien MCF-12A und MCF-10A, (n=1): Laktatkonzentration [mmol/l] im Medium nach 24 h unter Einwirken der Referenz (Medium+Zellen), der Kontrollen (Endoxifen und Estradiol) sowie der Extrakte in verschiedenen Konzentrationen.

Bei beiden benignen Zelllinien ist bei der Messung der Laktatkonzentration im Überstand keine deutliche Wirkung zu erkennen (Abbildung 40). Das zeigt sich daran, dass die Laktatwerte der Extrakte in einem ähnlichen Bereich wie das Ergebnisse der Referenz Medium+Zellen (MCF-12A: Laktat = 9,5 mmol/l, MCF-10A: Laktat = 7,4 mmol/l) liegen. Bei MCF-12A zeigt „C 30-Extrakt 20 %“ einen höheren Wert (Laktat = 14,5 mmol/l). Die Laktatkonzentration von der Kontrolle „Zuckerwasser-Extrakt“ (MCF-12A: Laktat = 10,0 mmol/l, MCF-10A: Laktat = 6,1 mmol/l) zeigt keine große Abweichung von den Werten der Referenz der „Globuli-Extrakte“.

Die Werte von Estradiol liegen etwas über den jeweiligen Referenzwerten (MCF-12A: Laktat = 10,6 mmol/l, MCF-10A: Laktat = 8,0 mmol/l). Endoxifen wiederum zeigt eine deutlich geringere Laktatkonzentration (MCF-12A: Laktat = 3,4 mmol/l, MCF-10A: Laktat = 4,8 mmol/l). Generell ergeben die Ergebnisse der Laktatmessung der rezeptornegativen MCF-10A Zellen (außer bei Endoxifen) etwas niedriger Werte als die der MCF-12A Zellen.

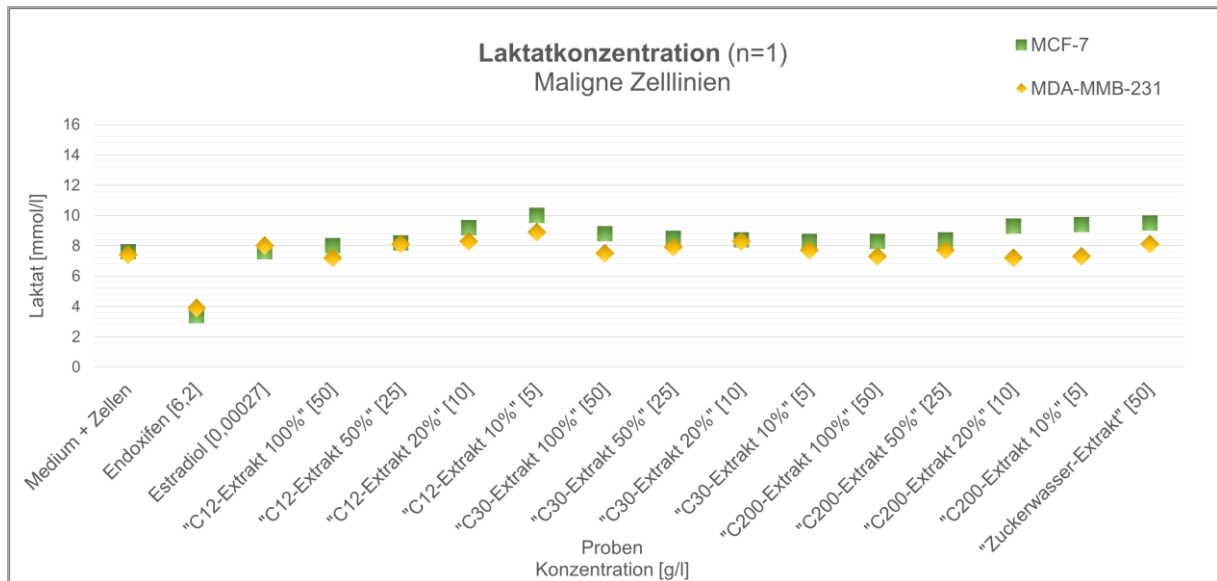


ABBILDUNG 41: Laktat-Messung der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231, (n=1): Laktatkonzentration [mmol/l] im Medium nach 24 h unter Einwirken der Referenz (Medium+Zellen), der Kontrollen (Endoxifen und Estradiol) sowie der Extrakte in verschiedenen Konzentrationen.

Die malignen Zelllinien zeigen bei den Laktat-Messungen im Zellüberstand ein fast identisches Bild (Abbildung 41), das dem der benignen Zelllinien gleicht. Die Ergebnisse der Extrakte liegen bei MCF-7 mit 8,0 – 10,0 mmol/l und bei MDA-MB-231 mit 7,2 – 8,9 mmol/l, bei beiden Zelllinien nahe am entsprechenden Referenzwert (MCF-7: Laktat = 7,6 mmol/l, MDA-MB-231: Laktat = 7,4 mmol/l). Somit zeigt sich auch hier keine eindeutige Wirkung.

De Kontrollsubstanz Estradiol ist jeweils identisch zur Referenz (MCF-7: Laktat = 7,6 mmol/l, MDA-MB-231: Laktat = 8,0 mmol/l). Eine eindeutig erniedrigte Laktatkonzentration liegt bei diesen beiden Zelllinien nur bei Endoxifen vor (MCF-7: Laktat = 3,4 mmol/l, MDA-MB-231: Laktat = 3,9 mmol/l).

Bei der Laktat-Messung kann zwischen den verschiedenen Mammazellen kein großer Unterschied unter den verschiedenen „Globuli Extrakten“ festgestellt werden.

4.4.3 PH-MESSUNG

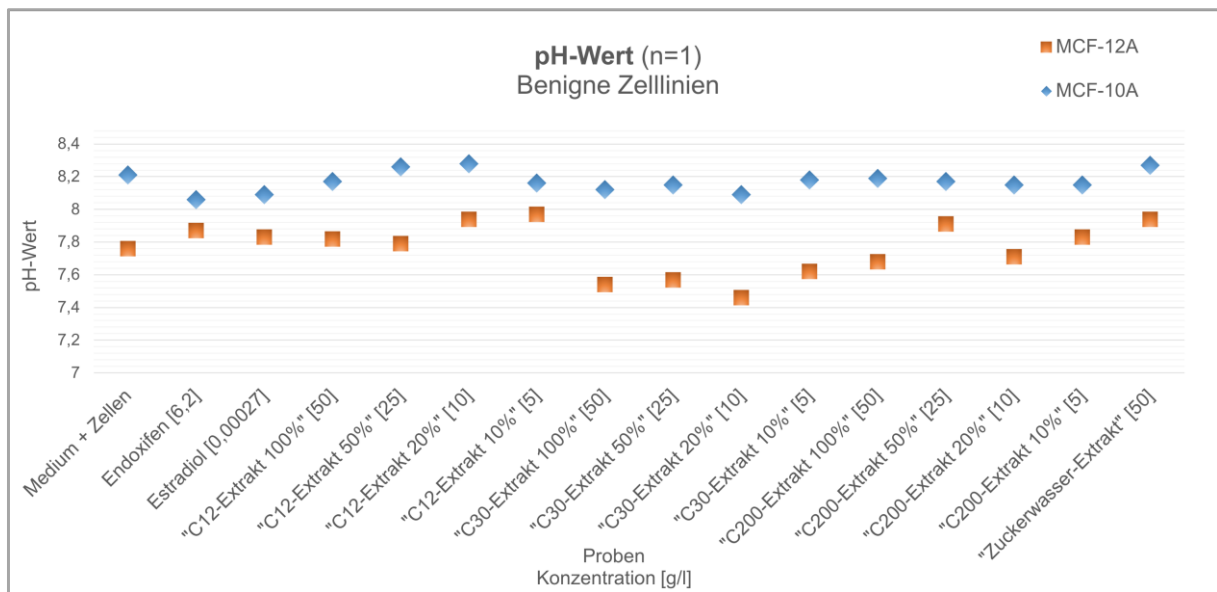


ABBILDUNG 42: pH-Messung der Zelllinien MCF-12A und MCF-10A, (n=1): pH-Wert im Medium nach 24 h unter Einwirken der Referenz (Medium+Zellen), der Kontrollen (Endoxifen und Estradiol) sowie der Extrakte in verschiedenen Konzentrationen.

Die Ergebnisse der pH-Messung des Zellüberstandes ergeben für beide benigne Zelllinien ein relativ einheitliches Bild (Abbildung 42). Dabei zeigen alle Werte, sowohl die der Extrakte, als auch die der Kontrollen, ähnliche Werte zu den Referenzwerten von „Medium+Zellen“ MCF-12A: pH = 7,76; MCF-10A: pH = 8,21). Bei den rezeptorpositiven MCF-12A liegen die Werte im relativ neutralen Bereich zwischen einem pH-Wert von 7,46 und 7,97. Bei den rezeptornegativen MCF-10A Zellen liegen sie geringfügig in Richtung basischen Bereich verschoben zwischen 8,06 und 8,27.

Die Werte von Endoxifen fallen bei dieser Untersuchung nicht heraus und stellen sich in der Mitte der Streuung dar (MCF-12A: pH = 7,87; MCF-10A: pH = 8,06).

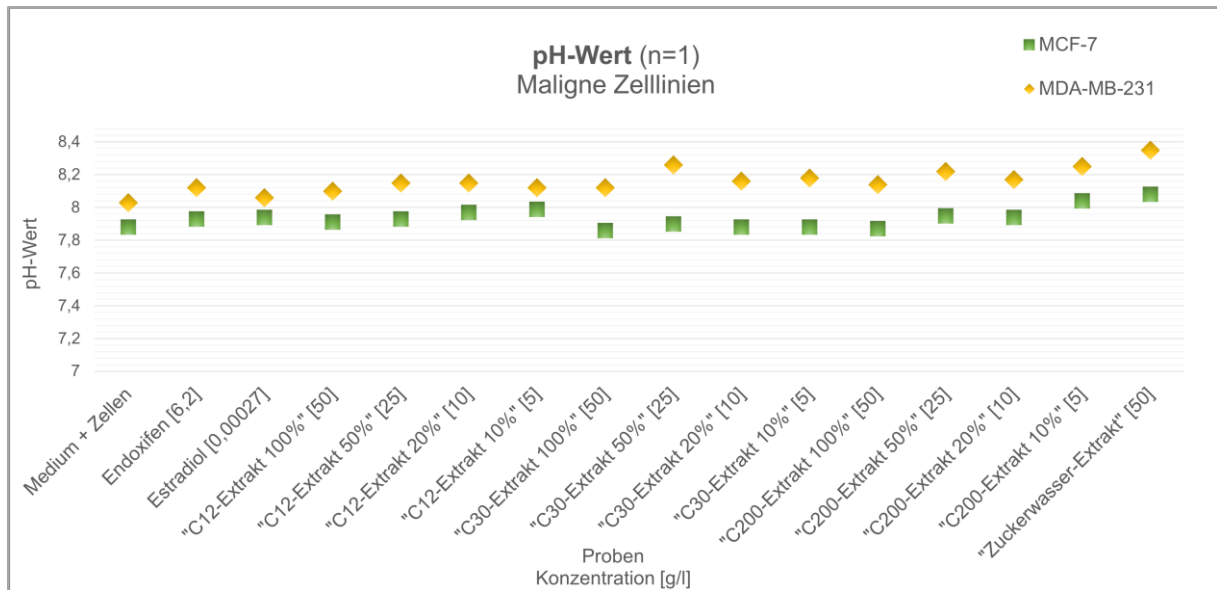


ABBILDUNG 43: pH-Messung der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231, (n=1): pH-Wert im Medium nach 24 h unter Einwirken der Referenz (Medium+Zellen), der Kontrollen (Endoxifen und Estradiol) sowie der Extrakte in verschiedenen Konzentrationen.

Die Untersuchung des pH-Wertes der malignen Zelllinien ergibt ein einheitlicheres Bild (Abbildung 43), als das der benignen Zellen. Alle Ergebnisse rangieren bei den rezeptorpositiven MCF-7 zwischen einem pH-Wert von 7,86 bis 8,08. Bei den rezeptornegativen MDA-MB-231 fallen alle pH-Werte in eine Range von 8,06 bis 8,35. Bei beiden Zelllinien zeigt die Kontrolle „Zuckerwasser-Extrakt“ die höchsten Werte. Die Referenzwerte von „Medium+Zellen“ (MCF-7: pH = 7,88; MDA-MB-231: pH = 8,03) liegen im unteren Bereich der jeweiligen Range. Endoxifen zeigt auch bei den malignen Zelllinien bei der pH-Messung keine auffällige Wirkung, die Messwerte liegen relativ mittig in der jeweiligen Range (MCF-7: pH = 7,93; MDA-MB-231: pH = 8,12).

Bei den pH-Messungen kann folglich in allen vier Zelllinien kein gravierender Unterschied in Anbetracht auf die verschiedenen Testsubstanzen festgestellt werden.

V. DISKUSSION

Die Homöopathie ist eine an Beliebtheit zunehmende alternative Heilmethode, die im Allgemeinen bezüglich ihrer Wirksamkeit viel diskutiert wird und umstritten ist. Sie soll die Fähigkeit des individuellen Organismus zur Selbstheilung nutzen und stellt so eine minimale Intervention dar ohne dabei bekannte oder dokumentierte Nebenwirkungen zu verzeichnen^{53,169}. Besonders in Deutschland herrscht hohes Interesse an dieser Heilmethode, so griffen im Jahr 2014 beispielsweise knapp 12 % der deutschen Bevölkerung auf homöopathische Behandlungen zurück⁵⁷. Huebner *et al.* zeigten, dass an Brustkrebs erkrankte Frauen zudem ein besonderes Interesse an komplementärer Medizin äußern. Über 75 % dieser Frauen nutzen mindestens eine Methode der Komplementärmedizin ergänzend zur konventionellen Therapie⁸³. Das Interesse des Patientenkollektivs ist demnach stark vertreten, jedoch ist die Datenlage bezüglich der Wirkung homöopathischer Mittel auf Brusterkrankungen, insbesondere Brustkrebs, noch schwach. Generell sind homöopathische *in-vitro* Studien schwer zu finden. Speziell für die Wirkung von „Phytolacca-Globuli“ auf benigne Veränderungen der Brust und auf Mammakarzinomzellen sind aktuelle keine *in-vitro* Studien bekannt.

Diese Forschungsarbeit soll zum einen diese Forschungslücke ein Stück schließen und zum anderen einen aktuellen Überblick über die Studienlage geben. Anhand der Ergebnisse der *in-vitro* Studie werden Rückschlüsse sowohl über Wirksamkeit als auch über Risiken und Nutzen der Homöopathie gezogen.

5.1 METHODENKRITIK

Im Folgenden werden die einzelnen Methoden auf einschränkende Faktoren und eventuelle Fehlerquellen während der jeweiligen Arbeitsschritte untersucht, was eine objektive Interpretation der Ergebnisse ermöglichen soll.

5.1.1 HERSTELLUNG DER EXTRAKTE UND DEREN ANALYTIK

Die Gewinnung des Extraktes aus den homöopathischen Streukügelchen erfolgte so schonend wie möglich. Die „Globuli“ konnten durch langsames Rühren mit Plastiklöffel in destilliertem Wasser und in Alkohol gleichermaßen gut aufgelöst werden. Um eine etwaige Wirkungsabschwächung der „Globuli-Extrakte“ zu vermeiden, kamen diese ausschließlich mit Materialien aus Plastik und nie mit Metall in Kontakt, da manche Homöopathen postulieren, dass Metall die Wirkung der „Globuli“ beeinflussen könne und daher diesbezüglich kein Risiko eingegangen werden sollte. Aus demselben Grund kamen die „Globuli-Extrakte“ auch nicht in die Nähe von Mikrowellenstrahlung¹⁴⁵.

Für die weiteren Versuchsreihen kam der „Wasser-Extrakt“ zum Einsatz, da davon auszugehen ist, dass dieses Lösungsmittel natürlicher ist und die „Globuli“ weniger angreift. Dadurch sind weniger Interaktionen zwischen Lösungsmittel und Zellen zu vermuten, als es mit Ethanolextrakten der Fall wäre.

Die Lagerung der Extrakte erfolgte zwischen den Versuchstagen bei -80 °C im Gefrierschrank, um die Extrakte über die Monate der Zeit im Labor zu konservieren. Dabei ist anzumerken, dass nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann, dass der Einfrier- und Auftauprozess die „Globuli-Extrakte“ beeinflussen könnte.

Mithilfe der HPLC konnte der „Globuli-Extrakt“ auf Inhaltsstoffe untersucht werden. Da nach der Potenzierung bei der Herstellung der „Globuli“ (1.4.1 Die Prinzipien) in der Regel keine Moleküle mehr vorhanden sind⁵³, war zu erwarten, dass das Ergebnis dieser Untersuchung wie folgt ausfiel: Keine Peaks auf dem Chromatogramm und demnach keine Inhaltsstoffe in den „Globuli-Extrakten“. Jedoch muss erwähnt werden, dass dabei die Einstellung der Detektionswellenlänge der HPLC generell auch von Bedeutung ist. Für diese Arbeit wurde eine Wellenlänge von 254 nm gewählt, da in der Literatur für diese Wellenlänge eine gute Detektionsrate für Pflanzenstoffe beschrieben ist und man in erster Linie herausfinden wollte, ob etwas Dergleichen in dem untersuchten Extrakt vorhanden ist¹⁰⁵.

Wichtig ist zu hinterfragen, warum die HPLC-Untersuchung den Zucker, der de facto als Trägerstoff der „Globuli“ deren einziger Inhaltsstoff ist, nicht detektieren konnte. Dies ist vermutlich auf die bereits erwähnte Detektionswellenlänge zurückzuführen. Saccharose müsste bei einer Wellenlänge von etwa 195 nm einen Peak bereits nach wenigen Minuten ergeben, da Zucker nicht mit der Säule interagiert¹³⁴. Stimmig damit ist wiederum das Ergebnis des „Zuckerwasser-Extraktes“, das ebenfalls bei gewählter Wellenlänge keinen Peak zeigte.

Die Ergebnisse der Referenzen der Pflanzenstoffe (Genistein, Daidzein, Quercetin und Kämpferol), welche einen eindeutigen Peak ergeben haben, belegen das prinzipielle Funktionieren der Methode.

5.1.2 IN-VITRO ZELLTESTS

Bei *in-vitro* Versuchen besteht die Möglichkeit, dass die Testergebnisse durch methodische Fehler beeinflusst werden. Dadurch lassen sich zum Teil die großen Schwankungsbreiten der Ergebnisse erklären. Es kann beispielsweise zu einer unterschiedlich homogenen Aussaat der Zellen in den einzelnen Wells kommen, da trotz sorgfältigem Arbeiten qualitative Unterschiede in der Durchmischung der Zellsuspensionen nicht verhindert werden können. Ebenso können kleine Abweichungen der Inkubationszeit und Zellschäden bei der Trypsinierung während des Passagierens nicht gänzlich vermieden werden. Hinzu kommen feine Differenzen im Pipettiervorgang, die letztlich ebenfalls zu einer Streuung der Ergebnisse führen können. Damit es

gelang, diese Schwankungsbreite möglichst gering zu halten und diese und weitere zufällige Effekte zu minimieren, wurden innerhalb eines Versuchs immer mindestens je drei Wells pro Substanz untersucht und daraus der Mittelwert berechnet. Um die Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, kam für jeden Test eine Testserie von drei unabhängigen Wiederholungen zum Einsatz, welche jeweils an unterschiedlichen Zellpassagen erfolgte (n=3). Um möglichst einheitliche Versuchsbedingungen zu schaffen, wurde die Inkubationszeit bei RT standardisiert¹⁷⁰.

Anhand des **Cell-Titer-Glo® -Tests** konnte die Wirkung der Extrakte und Kontrollen in Bezug auf die Viabilität bewertet werden, was durch eine ATP-abhängige Lumineszenzmessung erfolgte. Dieser Test zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität aus, so können beispielsweise Unterschiede von wenigen Zellen (< 15 Zellen / Well) festgestellt werden¹³¹. Studien haben gezeigt, dass dieser ATP abhängige Test gegenüber alternativ verwendeten Tests, wie z.B. dem MTT-Test, überlegen ist¹²⁸. Jedoch muss besonders auf die Temperatur des Tests geachtet werden, da die Luziferasereaktion davon abhängig ist. Es kann bei dem Test außerdem zu einer Beeinflussung der Leuchtkraft kommen, wenn im Medium enthaltene Stoffe dieses färben. Die hier verwendeten Extrakte waren nahezu farblos, sodass dieser Einfluss weitestgehend ausgeschlossen werden konnte¹⁶¹. Da es bei durchsichtigen Wellplatten bei dem Versuch zu einer Verfälschung der Messwerte durch Überstrahlen aus den benachbarten Wells kommen kann, kamen undurchsichtige, weiße Wellplatten zum Einsatz. Eine Interaktion von Bestandteilen der Extrakte oder des Mediums auf Teile der Luziferasereaktion kann jedoch nicht ganz ausgeschlossen werden. Dafür gibt es allerdings keine Anhaltspunkte, da es weder für die verwendeten Medien in der Literatur dafür Belege gäbe, noch die Extrakte diesbezügliche Hinweise zeigten¹²⁸.

Der **CytoTox-Glo™ -Test** beruht auf der Quantifizierung der durch die perforierte Zellmembran ins Medium gelangten „Dead-Cell-Protease-Aktivität“. Dadurch kann sowohl die Zytotoxizität als auch, in einem zweiten Schritt, die Zellviabilität bestimmt werden. Dabei handelt es sich um einen neueren Test, für den mehrere Störfaktoren in der Literatur beschrieben sind, woraus sich ergibt, dass der Test störanfälliger sein könnte als vergleichbare Tests^{8,36}. So können beispielsweise Zellkulturmedien geringe Mengen der verwendeten Protease beinhalten. Außerdem zeigt die Protease ein temperaturempfindliches Verhalten. Hinzukommt, dass das AAF-Glo-Substrat eine Lichtanfälligkeit zeigt³⁶. Durch parallel mitlaufende Kontrollen und Vermeidung der genannten Einflüsse wurde versucht die Störfaktoren zu minimieren. Dennoch zeigten bei allen Zelllinien dieses Versuches die Ergebnisse zur Zytotoxizität zu niedrige Resultate. Die Messung der Zellviabilität wiederum lieferte bessere Ergebnisse. Das könnte daran liegen, dass das AAF-Glo-Substrat oder die freigesetzte Proteasen von verschiedenen

Substanzen beeinflusst oder abgebaut werden können, wie in der Literatur bereits beschrieben ist^{36,94}.

Aufgrund der Tatsache, dass die Messung bei der späteren Bestimmung der Viabilität plausible Werte lieferte, als die Proteasen schlagartig durch das Lysereagenz freigesetzt wurden, ist zu vermuten, dass die Proteasen bei der Zytotoxizitätsmessung bereits mit anderen vorliegenden Substanzen interagiert haben und abgebaut wurden, weshalb sie kaum mehr zu messen waren. Beispielsweise konnte bei der lichtmikroskopischen Begutachtung der Zellen festgestellt werden, dass sich unter dem Einfluss von Endoxifen nicht mehr viele erkenntlich vitale Zellen zeigten. Die „Dead-Cell-Protease“ wurde also über einen längeren Zeitraum bereits ins Medium freigesetzt, wo es beispielsweise zum Kontakt mit tierischem Serum, im Medium enthaltenen Phenolrot oder weiteren Substanzen kommen konnte, was zu Interaktionen und zum frühzeitigen Abbau der Protease führen konnte. Zum Zeitpunkt der Messung, könnte die Protease bereits nicht mehr signifikant nachzuweisen gewesen sein, weshalb diese Interaktionen eine Erklärung für die unzureichenden Ergebnisse der direkten Toxizitätsmessung sein könnten. Im Ergebnissteil dieser Arbeit ist die Viabilität zur Ergebnisdarstellung des CytoTox-Glo™-Test aufgeführt, weil dies aussagekräftigere Ergebnisse brachte.

Bei dem verwendeten *in-vitro* **Proliferationstest BrdU** erfolgt die photometrische Quantifizierung des in die Zell-DNA eingebauten Pyrimidin-Analogons Bromodesoxyuridin. Es handelt sich dabei um ein etabliertes, jahrelang verbessertes Verfahren und kommt daher in der Forschung oft zum Einsatz^{137,157}. Während des gesamten Versuchablaufs, wurde bei gedämpftem Licht gearbeitet, da es bei zu hellem Licht sonst zu einem Zersetzen von Teilen der Basenanaloga kommen kann. Außerdem kamen bei den Versuchen nur Kulturmedien zum Einsatz, welche zuvor auf Interaktionen getestet wurden, da endogene Substanzen den Einbau von BrdU hemmen könnten⁷¹. Auch bei diesem Versuch können die Reagenzien ein temperaturempfindliches Verhalten zeigen. Durch genaues Befolgen des Protokolls konnte dieser Einflussfaktor jedoch minimal gehalten werden. Bei der abschließenden kolorimetrischen Messung kann es durch Wählen von unterschiedlichen Wellenlängen des ELISA-Readers zu abweichenden Ergebnissen kommen. Um die Vergleichbarkeit unter den einzelnen Versuchen zu erhalten, wurde jedoch immer die gleiche Wellenlänge (450 nm) gewählt.

Für einen orientierenden Eindruck über den **Zellmetabolismus** diente die Stoffwechsel-Untersuchung nach Extrakt- und Kontrolllösungsbehandlung, die anhand dreier Parameter der Zellsuspension erhoben wurde: Glukose-, Laktat- und pH-Gehalt. Für die Interpretation dieser Untersuchungen sind grundlegenden Überlegungen anzustellen. Zum einen verfügen benigne wie auch maligne immortalisierte Mammazellen über einen angeregten Stoffwechsel, da sie

unkontrollierter und rapider wachsen als unveränderte Zellen. Daher weisen sie eine gesteigerte Glykolyse auf und besitzen die Fähigkeit der Autophagozytose¹³⁹. Unter diesem Gesichtspunkt wäre dort, wo es zu vermehrtem Zellwachstum kam und (unabhängig ob aerob oder anaerober Metabolismus) viel Glukoseabbau stattfand, ein reduzierter Glukosespiegel zu erwarten gewesen. Da bei der Glykolyse Pyruvat entsteht, was wiederum zu Laktat verstoffwechselt wird, steigt im Umkehrschluss der Laktatspiegel. Laut dem „Warburg-Effekt“ kommt es in Karzinomzellen auch bei aeroben Bedingungen hauptsächlich zur anaeroben Glykolyse, es wird also Glukose sauerstoffunabhängig zu Laktat abgebaut¹³⁹. Durch ansteigende Laktatspiegel, kommt es wiederum zu fallenden pH-Werten.

Zum anderen reagieren Zellen bei vermehrtem Stress, wie es zum Beispiel unter Endoxifengabe der Fall sein könnte, mit zunehmender anaerober Glykolyse^{43,129}. Sie wandeln also zur Energiegewinnung Glukose in Laktat um, anstatt weiterhin oxidative Phosphorylierung zu betreiben. Durch den toxischen Stress auf die Zellen kann es so vorerst zu einem gesteigerten Glukoseverbrauch kommen, der Glukose im Zellüberstand würde sinken. Wenn es durch weitere toxische Effekte jedoch zur Lyse der Zelle kommt, kann Glukose frei werden. Es würde anschließend nicht mehr zum weiteren Verbrauch der Glukose kommen, da letale Zellen keinen Zellstoffwechsel mehr betreiben und der Glukosegehalt im Zellüberstand könnte sogar etwas steigen. Die zwei geschilderten Effekte könnten sich im Endeffekt bei der Messung teilweise aufheben.

Die Mechanismen, die zu Veränderungen im Stoffwechsel führen sind daher relativ komplex, können sich gegenseitig beeinflussen und wirken sich so eventuell sogar gegensätzlich auf die gemessenen Parameter aus.

Je nach Dichte der Zellaussaat kam es bei den einzelnen Zelllinien vermutlich zu Abweichungen, weshalb die Ausgangswerte für Medium + Zellen unterschiedliche Werte ergaben. Die Ergebnisse sollten also in erster Linie innerhalb einer Zelllinie betrachtet werden.

5.1.3 ZELLINIEN

Bei den für die Untersuchungen verwendeten Zelllinien handelte es sich um immortalisierte, adhärente Monolayerkulturen^{13–16,126}. Bei solchen Zelllinien werden Mechanismen, die das Replikationspotenzial begrenzen, durch das Einwirken von Reagenzien ausgesetzt. Dazu zählen beispielsweise mutierte Tumorsuppressorgene, welche durch unphysiologische Bedingungen, Gentransfer oder Einbringen viraler Proteine entstanden. Über jene Mechanismen erlangen transformierte Zellen bzw. Tumorzellen die Fähigkeit zur unbegrenzten Teilung¹⁴⁶. Die Vorteile bestehen darin, dass immortalisierte Zellen fast unbegrenzt verfügbar sind und für relativ lange Zeiträume über konstante Eigenschaften verfügen. Jedoch kommt es durch die Mechanismen, die die Immortalisierung der Zellen bedingen, zu bemerkenswerten Änderungen in der Zellphysiologie, wodurch sich teilweise erhebliche Unterschiede im Vergleich zu

den Primärzellen aufzeigten^{113,146}. Das wirkt sich vor allem auf die beiden benignen Zelllinien (MCF-12A und MCF-10A) aus, da deren Primärzellen kein uneingeschränktes Replikationspotenzial zeigten. So verfügen die verwendeten immortalisierten benignen Zelllinien über eine etwas ähnlichere Physiologie zu den malignen Zellen als gewöhnlich¹⁷⁵. Da vor allem in höheren Zellpassagen ein gesteigertes Entartungsverhalten gezeigt werden konnte (beispielsweise für MCF-12A¹⁵⁶), wurde in der Arbeit darauf geachtet, dass nur niedrige Zellpassagen (< 30) für die Untersuchungen zum Einsatz kamen.

In-vitro Arbeiten an Zelllinien bilden eine gute Grundlage, um eine erste Aussage über die Auswirkungen einzelner Wirkstoffe auf die untersuchten Zellen treffen zu können. Jedoch ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf das ursprüngliche Gewebe nur bedingt möglich. Das liegt unter anderem daran, dass das Zusammenspiel der Mammazellen im umliegenden Bindegewebe von wichtiger Bedeutung ist, da hier wichtige Mechanismen in der Differenzierung und Entwicklung des Mammaepithels ablaufen^{19,111}. Die Anordnung in Zellsystemen ist speziell für die Pathogenese der fibrozystischen Mastopathie von Bedeutung¹⁵². Außerdem nehmen stroma-epitheliale Interaktionen in der Pathogenese des Mammakarzinoms eine bedeutende Rolle ein¹²⁴. Es gibt bereits Studien, die zeigen, dass dreidimensionale Zellkulturen für Mammazellen besser geeignet sind, um das in-vivo Mammagewebe nachzuempfinden¹⁷⁵. Solche 3D-Kulturen könnten also die beschriebene Problematik der immortalisierten Monolayerkulturen verringern, und sich einer realen Untersuchungssituation annähern^{111,156,175}.

Des Weiteren muss beachtet werden, dass bei der direkten Applikation von Stoffen auf in-vitro Zellsysteme der wichtige Faktor der Bioverfügbarkeit einzelner Substanzen und deren Metabolisierung in-vivo umgangen wird. So können sich in-vivo weitere interindividuelle Unterschiede, die beispielsweise auch von der Darmmikroflora abhängen können, ergeben^{77,80}.

Es erfolgte vor jeder Testserie eine standardisierte optische Zellzählung in einer Zählkammer, wodurch versucht wurde, die Zellzahl zu normieren. Dieses Verfahren birgt jedoch eine potenzielle Fehlerquelle (Variationskoeffizient > 10 %) und kann daher Auswirkungen auf alle weiteren Versuchsschritte nach sich ziehen⁷¹. Durch eine ungenügende Durchmischung der Zellsuspension oder zu schwache Anfärbung mit Trypanblau kann es zu Fehlern der Quantifizierung kommen. Daraus kann wiederum eine Abweichung in der Zellkonfluenz resultieren, was die Testbedingungen verändert und so die Ergebnisse verzerrt¹⁴⁶. Als Alternative könnte die Zellzählung mit automatisierten, elektronischen Zählgeräten durchgeführt werden, deren Messung vor allem auf dem Erfassen elektrischer Widerstände beruht oder über eine digitale Bildanalyse des Zellmaterials erfolgt¹⁴⁶.

5.2 DISKUSSION DER SUBSTANZWIRKUNGEN

Nachdem in der HPLC keine Inhaltstoff in den „Globuli-Extrakten“ nachgewiesen werden konnten, sollte das Wirkverhalten der Extrakte, sowie der Kontrollen, *in-vitro* aufgearbeitet und interpretiert werden.

5.2.1 WIRKUNG DER KONTROLLEN ENDOXIFEN UND ESTRADIOL

In dieser Arbeit diente die Behandlung der Zellen mit Endoxifen als Positivkontrolle, da dieser Stoff eine wachstumshemmende Wirkung auf die Zellen zeigen sollte. Es handelt sich dabei um die biologische aktive Form des SERM Tamoxifen, welches das Wachstum estrogenrezeptorpositiver Mammazellen hemmt. Es ist nicht nur bei der Therapie von ER-positiven Mammakarzinomen das Mittel der Wahl, sondern wird auch als *Off-Label-Use* bei benignen Erkrankungen verwendet¹⁵².

Bei allen Zelltests konnte Endoxifen in der vorliegenden Arbeit signifikante viabilitätshemmende und antiproliferative Effekte zeigen. Dabei zeigten sich keine nennenswerten Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien, so wirkte Endoxifen sowohl unabhängig von der jeweiligen Dignität der Zelllinien, als auch unabhängig bezüglich des entsprechenden Rezeptorstatus. Die Untersuchungen zur Stoffwechsellage (Glukose- und Laktatkonzentration und pH-Wert) ergaben folgende Wirkung von Endoxifen: Es führte zu einer Steigerung der Glukosekonzentration, welche bei den beiden rezeptorpositiven Zelllinien (MCF-12A und MCF-7) deutlicher zu sehen war. Die Laktatkonzentration verringerte sich bei allen Zelllinien deutlich. Der pH-Wert wiederum differenzierte sich von den anderen Werten kaum. Dass diese Untersuchungen kein eindeutiges Ergebnis ergaben, ist nicht zuletzt auch der einmaligen Untersuchungsdurchführung geschuldet. Dennoch zeigt das Gesamtbild der Ergebnisse der Stoffwechselaktivität, dass Endoxifen vermutlich eine zeitnahe toxische Wirkung auf die Zellen bewirkte, weshalb die Glukose nicht weiter verbraucht wurde und das Laktat nicht weiter anstieg. Die Ergebnisse der Untersuchungen mit Endoxifen lassen demnach erkennen, dass dessen Wirkung nicht rein über die Estrogenrezeptoren abläuft, sondern in großen Teilen über weitere Mechanismen stattfinden muss. Ein rezeptorunabhängiges Wirken der SERMs wird bereits in mehrere Studien in der Literatur beschrieben, die eine Wirkung über unterschiedliche Mechanismen belegen¹³³. Es konnten beispielsweise Interaktionen von Tamoxifen mit dem mitochondrialen Energiestoffwechsel gezeigt werden, die zu Veränderungen der oxidativen Aktivität und der Membranintegrität der Zellen führen². Außerdem kann es über eine Sensibilisierung der Zellen für NK-Zellen zur Zytotoxizität kommen, welche ebenfalls rezeptorunvermittelt durch Tamoxifen induziert wäre⁶⁴. Bei den MCF-7 und den MCF-10A Zellen führt Tamoxifen zu signifikanten DNA Schäden, woraus ebenfalls eine Zytotoxizität resultiert¹³³. Des Weiteren konnten Studien eine Wirkung von Tamoxifen über den G-Protein gekoppelten Rezeptor GPER 1 zeigen, für welchen das SERM einen reinen Agonist darstellt²⁰.

Die aktuelle Studienlage ist demnach mit dem hier erzielten Ergebnis stimmig und so ist es wenig verwunderlich, dass Endoxifen auf alle vier untersuchten Zelllinien eine signifikante hemmende Wirkung ausübt.

Als Negativkontrolle diente Estradiol, da Estrogene, vor allem Estradiol, laut Literatur eine schwach karzinogene Wirkung zeigen und daher eine viabilitäts- und proliferationssteigernde Wirkung auf die Zellen ausüben, welche über eine Induktion der Mitose auf rezeptorpositive Mammazellen abläuft^{91,138}.

Bei den hier durchgeführten Zelltests konnte die erwartete Wirkung nicht eindeutig gezeigt werden. So stellte sich in keinem der Zelltests eine deutliche Beeinflussung oder Steigerung der Zellviabilität oder -proliferation unter Estradiol heraus. Dabei ist ebenfalls kein erkenntlicher Zusammenhang unter den einzelnen Zelllinien zu erkennen, es konnte weder ein Unterschied bezüglich der Dignität, noch des Rezeptorstatus festgestellt werden. Insbesondere bei den beiden rezeptorpositiven Mammazelllinien (MCF-12A und MCF-7) wäre mit einer ausgeprägteren steigernden Wirkung von Estradiol zu rechnen gewesen. Sowohl bei dem Cell-Titer-Glo®-Test als auch bei dem BrdU -Test zeigte sich für beinahe alle Zelllinien tendenziell eher eine leichte Hemmung der Viabilität und Zellproliferation.

In der Literatur werden dafür potenzielle Erklärungen aufgeführt. Zum einen wird ein zytotoxischer Effekt von Estradiol in hohen Konzentrationen auf MCF-7 Zellen beschrieben, der vor allem Zellen in der Teilungsphase vulnerabel macht⁹⁰. Da die hier verwendete Konzentration von Estradiol über der physiologischen liegt, wäre das eine mögliche Erklärung. Hinzukommt, dass die Affinität von Estradiol durch höhere Estradiolkonzentrationen zu beiden Estrogenrezeptoren sinkt⁴⁸. Zum anderen konnte eine Hemmung der ER- α induzierten Proliferation durch eine antagonistische Wirkung des ER- β gezeigt werden²⁹. Das Überwiegen der Wirkung von Estradiol auf ER- β könnte so wiederum die proliferationssteigernde Wirkung, die eher über ER- α vermittelt wird, teilweise aufheben.

Aufgrund der Vielzahl von Wechselwirkungen und den oben erläuterten Effekten ist anzunehmen, dass sich keine signifikante Viabilitäts- oder Proliferationssteigerung gezeigt hat, was vermutlich auch an der gewählten Dosis von Estradiol liegt.

5.2.2 WIRKUNG DER EXTRAKTE

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Auswirkungen des homöopathischen Arzneimittels *Phytolacca* in drei verschiedenen Dosierungen (C 12, C 30 und C 200) auf die Viabilität und Proliferation verschiedener Mammazelllinien untersucht.

Die Extrakte kamen in verschiedenen Verdünnungen zum Einsatz. Der stärkste Extrakt enthielt 100 % des jeweiligen Extraktes und der schwächste 10 %. Dadurch sollte es ermöglicht wer-

den, eine Aussage über eine eventuelle Dosiswirkungsbeziehung treffen zu können. Ziel dieser Studie war es, eine Aussage über die *in-vitro* Wirkung dieses homöopathischen Mittels sowohl auf die zwei Brustkrebszelllinien, als auch auf die zwei benignen, fibrozystisch veränderten Mammazelllinien zu treffen.

Die Ergebnisse zeigten, dass in keinen der Zelltests einer der „Globuli-Extrakte“ eine hemmende Wirkung auf die Zellviabilität bzw. Proliferation einer der untersuchten Zelllinien induzierte. Dabei konnte kein Unterschied zwischen den einzelnen Dosierungen und Verdünnungen der „Phytolacca-Extrakte“ festgestellt werden und somit auch keine Dosiswirkungsbeziehung formuliert werden. Generell ähnelten die Ergebnisse des homöopathischen Mittels denen des „Zuckerwasser-Extraktes“, was daran liegen könnte, dass durch die Potenzierung auf Molekülebene kein Inhaltstoff mehr vorhanden ist und so gesehen „Globuli“ nichts anderes als Zucker sind^{41,70}.

5.2.3 ZELLINIEN IM VERGLEICH

Wenn man die Ergebnisse genauer betrachtet, sind marginale Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien zu erkennen.

Im Cell-Titer-Glo® -Test zeigte sich für die beiden rezeptornegativen Zelllinien (MCF-10A und MDA-MB-231) tendenziell eine stärkere viabilitätssteigernde Wirkung durch die Extrakte.

Bei den Ergebnissen des Cyto-Tox-Glo™ -Test ist auffällig, dass die Zellviabilität stets über 100 % betrug und teils sogar eine hohe, signifikante Steigerung festzustellen war (beispielsweise bei den MCF-7 Zellen unter dem „C 30 – Extrakt 100 %“). Bei diesem Viabilitätstest zeigt die vergleichende Betrachtung der Ergebnisse aller vier Zelllinien, dass die beiden malignen Zelllinien (MCF-7 und MDA-MB-231) eine stärker ausgeprägte viabilitätssteigernde Wirkung durch die „Globuli-Extrakte“ erfahren haben.

Ähnliche Rückschlüsse erlaubt auch die Betrachtung der Ergebnisse des BrdU – Tests, denn hier zeigten die malignen Zelllinien eine deutlichere, teils signifikante, proliferationssteigernde Wirkung auf die „Globuli-Extrakte“.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die Ergebnisse keiner Zelllinie besonders hervorstechen, da in erster Linie zu betonen ist, dass nirgends eine viabilitäts- oder proliferationshemmende Wirkung der Extrakte zu verzeichnen ist. Die Zelllinien unterscheiden sich lediglich leicht, was die Wirkung auf die gesteigerte Viabilität oder Proliferation angeht. So lässt sich sagen, dass die Extrakte vor allem auf die beiden malignen Zelllinien eher viabilitäts- und proliferationssteigernd, anstatt hemmend wirkten.

Dies entspricht dem Effekt der Kontrolllösung „Zuckerwasser-Extrakt“. In der Literatur sind dazu passende Erklärungen zu finden, da gezeigt werden konnte, dass Zucker die Tumorbildung, speziell die von Brustkrebs, fördert. So stellt Zucker einen wichtigen Nährstoff für den vermehrten Stoffwechsel der Tumorzellen dar⁹².

5.3 WIRKUNG VON HOMÖOPATHIE

In der hier durchgeführten *in-vitro* Arbeit konnte keine Wirkung des homöopathischen Mittels *Phytolacca* auf eine der untersuchten Zelllinien festgestellt werden. In einer der wenigen homöopathischen *in-vitro* Studien, die die Literatur aufzeigt, kamen Amin *et al.* zu einem ähnlichen Ergebnis: Sie untersuchten die Wirkung dreier verschiedener homöopathischer Mittel (*Sepia*, *Phosphorus* und *Pulsatilla*) auf Brustkrebszellen (MCF-7) und fanden heraus, dass keine der getesteten Verbindungen eine zytotoxische Wirkung auf die MCF-7 Zellen zeigte¹⁰. Edzard Ernst fasste in seiner Übersichtsarbeit „Homeopathy: what does the „best“ evidence tell us?“⁵⁵ die aktuelle Studienlage zusammen: Allein in den letzten Jahrzehnten wurden über 150 kontrollierte klinische Studien veröffentlicht, deren Ergebnisse weder ausschließlich positiv noch rein negativ waren. Das öffnet die Tür zu dem Problem, des „selektiven Zitierens“. Darunter versteht man, dass sich viele Autoren der Studien bedienen, die zu ihrer Meinung und Sichtweise passen. Man kann dieses Phänomen als eine Art „Rosinenpickerei“ sehen: Wenn ein Kommentator beispielsweise der Meinung ist, dass Homöopathie uneingeschränkt wirkt, dann kann er die wenigen Studien zitieren, die zu diesem Ergebnis gekommen sind. Dass es aber weitaus mehr Studien gibt, die keine Wirkung feststellen können, kann der Kommentator unerwähnt lassen. Dies kann bei anderen Forschungsbereichen zwar ebenfalls problematisch sein, kommt bei einem so kontrovers diskutierten Thema wie der Homöopathie jedoch deutlicher zum Vorschein. Ernst hat aus diesem Grund versucht, eine systematische Übersicht aus unvoreingenommenen Studien zu erstellen. Bei seiner Bewertung der Cochrane-Reviews von Studien zu Homöopathie zeigte sich, dass homöopathische Arzneimittel keine über Placebo hinausgehende Wirkung haben⁵⁵.

Frass *et al.* beschäftigten sich wiederum mit dem „Placebo-Effekt“ und erläutern den Begriff: Demnach hat „Placebo“ seinen Wortursprung im lateinischen und bedeutet so viel wie „Ich werde gefallen“. Sie sehen einen Unterschied zwischen Wirksamkeit und Wirkung und vertreten die These, dass „in der Heilbehandlung nicht alles wirksam ist, was wirkt und auch nicht alles unwirksam, was nicht wirkt“. So bedinge Wirkung eine messbare physiologische Veränderung, Wirksamkeit jedoch bedeute Heilung oder Linderung von Erkrankung⁶¹. Wenn man nun davon ausgeht, dass, wie auch das Ergebnis dieser Arbeit zeigt, Homöopathie zwar nicht über eine messbare Wirkung verfügt, jedoch eine Wirksamkeit sehr wohl mit sich bringen kann und so einen Teil zur Heilung beitragen kann, hat die Heilmethode dann nicht alleine aus diesem Grund schon eine Berechtigung?

Außerdem sollte auch erwähnt werden, dass beispielsweise in dem Buch „Adjuvante Homöopathie in der Onkologie“¹⁰¹ mehrere Studien angeführt werden, die postulieren, dass homöopathische Mittel eine positive Wirkung bei Brustkrebspatientinnen zeigten. Zum Beispiel beobachtete eine klinische Studie in den 1980er Jahren 84 Frauen mit Brustkrebs nach Mastektomie, die Homöopathie zusätzlich zur Chemotherapie anwendeten. Dabei zeigte sich in der

homöopathischen Gruppe eine signifikante Verbesserung der 5-Jahres-Überlebensrate sowie der Lebensqualität (Kivelou 1990)¹⁰¹. Ist dieses Ergebnis auch nur auf den „Placebo-Effekt“ zurückzuführen oder wodurch lässt sich diese Wirkung erklären? Da stellt sich die Frage, ob die angewandten Testmethoden überhaupt dazu geeignet sind, die Wirkweise der Homöopathie nachweisen zu können. Einige Befürworter der Homöopathie sind der Meinung, dass die Homöopathie über eine Wirksamkeit, die jedoch nicht eine kausal-spezifische ist, verfügt. Dann wäre die klinische Studie das falsche Instrument, um diese Wirksamkeit zu demonstrieren. Die „Nichtlokalitätshypothese“ besagt, dass nicht nur kausale Faktoren in der Homöopathie von Bedeutung sind, sondern auch sogenannte „nichtlokale Effekte“, welche man beispielsweise in herkömmlichen *in-vitro* Studien nicht erfassen würde. So wird diskutiert, ob die in der Quantenmechanik zugrunde gelegte Nichtlokalität unter bestimmten Bedingungen eventuell auch für makroskopische Systeme auftreten könnte und so über die Quantenphysik die Wirkweise der Homöopathie bewiesen werden könnte^{44,168}. Dies ist wissenschaftlich zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht erklärbar. Viele Autoren fordern daher, ein Prüfsystem zu finden, dass diese Ebene der Wirkung miteinschließen würde und die Theorie bestätigen würde¹⁶⁹. Des Weiteren kritisieren Homöopathen, dass die meisten Homöopathie-Studien die eigentlichen homöopathischen Prinzipien nicht berücksichtigen würden. Ein Hauptproblem bestehe darin, dass die Studien meist den Standpunkt widerspiegeln, dass die Behandlung mit einem bestimmten Mittel bei einer bestimmten Krankheit durchgeführt werden müsse. Die Heilmethode der Homöopathie zielt jedoch viel mehr auf die Behandlung des ganzen Menschen ab und nicht „nur“ auf die Behandlung von Krankheiten. Außerdem müsse jeder Patient individuell gesehen werden und mit einem bestimmten Mittel behandelt werden. So könne die eigentliche Wirksamkeit der Behandlung nur beurteilt werden, wenn homöopathischen Grundsätze eingehalten wären¹⁶⁴. Deshalb sind viele Homöopathie-Befürworter der Meinung, dass die klinische Studie ein unzureichendes Forschungsinstrument für die Prüfung ihrer Behandlung sei und sehen daher in Beobachtungsstudien ihre Methode besser überprüft^{56,115}. Schließlich ist aus mehreren Beobachtungsstudien bekannt, dass es einigen Patienten nach der Konsultation eines Homöopathen besser geht⁴⁵. In einer Studie von Brien *et al.* konnte wiederum gezeigt werden, dass dieser Nutzen der Homöopathie nicht auf der Wirkung der homöopathischen Arzneimittel an sich zurückzuführen ist, sondern viel mehr auf die Beratung, die therapeutische Beziehung und die einfühlsame Begegnung mit einem Homöopathen²⁴. Eine wichtige Erkenntnis, die man daraus ziehen sollte ist nicht nur, dass das eigentliche homöopathische Arzneimittel unwirksam ist, sondern auch, dass eine gute therapeutische Beziehung klinische Ergebnisse positiv beeinflussen kann. Dieser Aspekt gerät teilweise in der modernen Schulmedizin zu kurz. So wäre es wünschenswert, dass die Therapie zwar auf dem aktuellen Forschungsstand beruht, aber zusätzlich um Grundwerte in der Arzt-Patienten-Interaktion wie Empathie, Ganzheitlichkeit, Verständnis und Zeit für Gespräch und Beratung ergänzt wird^{52,53,56}.

VI. AUSBLICK

Aktuell ist die Studienlage zur Wirkung der Homöopathie nicht zufriedenstellend, da es nur wenige qualitativ hochwertige wissenschaftliche Studien gibt. Dringend erforderlich wären randomisierte, kontrollierte Doppelblindstudien zu bestimmten homöopathischen Arzneimitteln, um eine eindeutigere Interpretation der Wirksamkeit bei bestimmten klinischen Symptomen oder Erkrankungen zu ermöglichen¹¹². Bisher vorhandene Metaanalysen konnten keine Wirksamkeit zeigen, was bedeutet, dass das Ergebnis einer Behandlung mit einem standardisierten homöopathischen Mittel sich nicht von der Behandlung mit einem Placebo unterscheidet¹¹².

Ein Konflikt besteht jedoch darin, dass wie oben beschrieben, einige Homöopathen der Meinung sind, dass klassische wissenschaftliche Studien nicht dazu geeignet sind, die Wirksamkeit der Homöopathie nachzuweisen. Dies ist als „Totschlagargument“ zu sehen, womit jeder wissenschaftlichen Studie, die zeigt, dass Homöopathie über keine Wirkung verfügt, widersprochen werden kann und stellt somit ein bisher ungelöstes Problem dar.

Nichtsdestotrotz sind mehr wissenschaftliche Studien zum Thema Homöopathie wünschenswert. Vor allem *in-vitro* Forschungen, wie die Forschung die als Grundlage dieser Arbeit diente, sind noch immer sehr selten. Solange jedoch keine aussagekräftigeren Ergebnisse vorliegen, kann die Homöopathie nicht als eine evidenzbasierte Therapieform angesehen werden.

In Bezug auf diese Arbeit wäre es spannend gewesen einen Extrakt aus der amerikanischen Kermesbeere als Kontrolllösung sowohl bei der HPLC, als auch bei den *in-vitro* Zelltests mitzuführen um feststellen zu können, ob der Pflanzenextrakt an sich, auf dem das homöopathische Mittel beruht, eine Wirkung gezeigt hätte. Eine derartige Untersuchung könnte man als weitere Forschungsarbeit anstreben.

Es konnte in dieser Studie nachgewiesen werden, dass *Phytolacca* *in-vitro* keine hemmende Wirkung auf die Zellviabilität oder Proliferation der Zelllinien ausüben konnte. Damit bestätigt sich die Wirkung von *Phytolacca* auf Brustkrebszellen, welche von Arora *et al.* beschrieben wurde, nicht¹². Dies zeigt den Bedarf weiterer Studien. Beispielsweise wäre eine *in-vivo* Studie im Tierversuch mit einer Placebo-Kontrollgruppe wünschenswert, da so gezeigt werden könnte, ob die „*Phytolacca-Globuli*“ eventuell eine andere Wirkungsgrundlage besitzen, welche *in-vitro* nicht nachgewiesen werden konnte.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Das Mammakarzinom stellt als häufigste Krebserkrankung der Frau eine gefürchtete Diagnose dar, die die betroffene Frau sehr beeinträchtigt. Auch benigne Erkrankungen der weiblichen Brust stellen ein häufiges Problem dar, zumal ein Teil der gutartigen Erkrankungen mit einem erhöhten Risiko einhergeht, an Brustkrebs zu erkranken. Vor allem für die benignen Erkrankungen gibt es noch wenig Handlungsempfehlungen. Da Frauen sich häufig empfänglich für komplementärmedizinische Ansätze zeigen, lohnt es sich die Forschung auf diesem Gebiet weiter voranzubringen. Einen Teil sollte diese Arbeit dazu beitragen.

Ziel dieser *in-vitro* Studie war es, die Wirkung des homöopathische Mittel *Phytolacca* in drei verschiedenen Dosierungen sowohl auf Mammakarzinomzellen (MCF-7 und MDA-MB-231), als auch auf benigne fibrozystisch veränderte Mammazellen (MCF-12A und MCF-10A) zu untersuchen. Es wurden dabei je eine rezeptorpositive (MCF-7 und MCF-12A) und -negative (MDA-MB-231 und MCF-10A) Zelllinie untersucht, um nicht nur eine Aussage bezüglich der Dignität der Zellen treffen zu können, sondern auch um einen möglichen Einfluss des Hormonrezeptorstatus der Zellen demonstrieren zu können. Um potenzielle dosisabhängige Effekte feststellen zu können, kamen dabei unterschiedliche Konzentrationen der Extrakte zum Einsatz.

Bei einer allgemein dünnen Studienlage auf diesem Themengebiet lag eine derartige Untersuchung bisher noch nicht vor.

Die HPLC-Analysen konnten keine sekundären Pflanzenstoffe als potenzielle Inhaltsstoffe in den „*Phytolacca-Globuli*“ nachweisen. Mit diesem Ergebnis war aufgrund der Potenzierung bei der Herstellung der „*Globuli*“ allerdings zu rechnen.

Der Einfluss der hergestellten „*Globuli-Extrakte*“ und der Kontrolllösungen (Endoxifen, Estradiol und „*Zuckerwasser-Extrakt*“) auf die Mammazellen wurde anhand von Zellviabilitäts- und Zellproliferationstests, sowie der Stoffwechsellage untersucht.

Endoxifen zeigte in allen Untersuchungen auf alle vier Zelllinien eine nahezu vollständige Hemmung der Zellviabilität und Proliferation. Aus den Ergebnissen der „*Globuli-Extrakte*“ ist zu entnehmen, dass *in-vitro* keine Wirkung des homöopathischen Arzneimittels *Phytolacca* auf die verschiedenen Mammazellen existiert. Dabei konnte im Vergleich der einzelnen Zelllinien kein Unterschied zwischen deren Dignität oder Rezeptorstatus festgestellt werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass nach diesen Erkenntnissen die Anwendung des homöopathischen Arzneimittels *Phytolacca* zur Bekämpfung von Mammakarzinomen oder anderen benignen Brusterkrankungen fraglich ist, da es tendenziell sogar eher eine zellwachstumssteigernde Wirkung als eine hemmende, zytotoxische Wirkung aufweist. Dies entspricht dem Effekt der Kontrolllösung „*Zuckerwasser-Extrakt*“.

Eine folgende in-vivo Studie mit einer Placebo-Kontrollgruppe wäre wünschenswert, um zu prüfen, ob diese „Globuli“ eine andere Wirkungsgrundlage besitzen.

Auch wenn diese Arbeit generell eher wachstumssteigernde Effekte von *Phytolacca* zeigte, ist nicht von einer schädlichen Wirkung auszugehen, sondern lediglich von keiner in-vitro nachzuweisenden Wirkung. Diese Effekte lassen sich vermutlich auf den Zucker in den Extrakten zurückführen; so ist bereits bekannt, dass Zucker die Tumorbildung fördert. Allerdings macht die Zuckermenge die über den Konsum der „Globuli“ aufgenommen wird, im Vergleich zur sonstigen Ernährung einen eher verschwindend geringen Anteil aus.

Mehrere Beobachtungsstudien konnten bereits zeigen, dass sich homöopathische Behandlungsmethoden positiv auswirken können, beispielsweise auf das Krankheitsempfinden oder die Lebensqualität des Patienten. Auch wenn sich dies nach aktuellem wissenschaftlichem Stand hauptsächlich durch den „Placebo-Effekt“ erklären lässt, muss anerkannt werden, dass es Patienten gibt, denen Homöopathie hilft. Insofern sollte es allen Patienten freigestellt werden, ob sie sich homöopathisch behandeln lassen wollen, schließlich sollte jeder Patient das einnehmen, was ihm guttut und nicht schadet. Wichtig ist jedoch, dass dabei die konventionelle Schulmedizin nicht vernachlässigt wird, da dies, gerade bei onkologischen Patienten, sonst gravierende Folgen haben kann. So stellt die größte Gefahr der Homöopathie wohl das „Nicht-befolgen“ der konventionellen Medizin dar.

VIII. THESEN

Thema: Proliferative und zytotoxische Effekte von Phytolacca (C 12, C 30, und C 200) an humanen benignen und malignen estrogenrezeptorpositiven und -negativen Mammazelllinien (MCF-12A, MCF-10A, MCF-7, MDA-MB-231)

1. Das Mammakarzinom ist in Deutschland die häufigste krebsbedingte Todesursache der Frau.
2. In Ländern des Globalen Nordens ist die Brustkrebsinzidenz bedeutend höher als in asiatischen Ländern.
3. Benigne Erkrankungen der Mamma, wie die fibrozystische Mastopathie, sind häufige Befunde in der Gynäkologie.
4. Benigne Erkrankungen der Brust weisen zum Teil ein erhöhtes Risiko auf, ein Mammakarzinom zu entwickeln.
5. Endoxifen ist ein aktiver Metabolit von Tamoxifen (einem SERM).
6. Der Hormonrezeptorstatus der verwendeten Zelllinien kann in einer immunhistochemischen Testung verifiziert werden.
7. Endoxifen hemmt sowohl bei Estrogenrezeptor -positiven als auch -negativen Zellen stark die Zellviabilität und Proliferation.
8. Die amerikanische Kermesbeere ist roh giftig und schleimhautreizend.
9. Die „Phytolacca-Extrakte“ zeigten in der HPLC-Untersuchung keine Inhaltstoffe.
10. Die aktuelle Studienlage zeigt kaum eine über den „Placebo-Effekt“ hinausgehende Wirkung der Homöopathie.
11. Die „Phytolacca-Extrakte“ zeigten *in-vitro* keine Wirkung auf die vier Zelllinien.
12. Die vorliegende *in-vitro* Studie erlaubt keine Aussage auf Art und Umfang der Wirkung *in-vivo*. Eine Untersuchung der Einflüsse von Phytolacca *in-vivo* wäre von Interesse.

IX. PUBLIKATION

Teile dieser Arbeit wurden in folgendem Abstract veröffentlicht:

F Fischer, B Gerber, T Reimer, DU Richter.

Proliferative und zytotoxische Effekte von Phytolacca an humanen benignen und malignen estrogenrezeptor -positiven und -negativen Mammaepithelzellen,

Senologie – Zeitschrift für Mammadiagnostik und -therapie 2018; 15 (02): e13.

DOI: 10.1055/s-0038-1651704

Proliferative und zytotoxische Effekte von Phytolacca an humanen benignen und malignen estrogenrezeptor –positiven und –negativen Mammaepithelzellen (MCF 12a, MCF 10a, MCF 7, MDA-MB-231)

Fischer F, Gerber B, Reimer T, Richter D-U.

Universitätsmedizin Rostock, Universitätsfrauenklinik, Südring 81, 18059 Rostock

Zielsetzung

Ziel der Studie ist es zu erforschen, ob, und wenn ja in welchem Ausmaß das homöopathische Arzneimittel Phytolacca das Wachstum von benignen und malignen Mammaepithelzellen *in-vitro* hemmt. Das aus der Kermesbeere hergestellte Mittel wird zum Beispiel bei Brustentzündungen empfohlen.



Abb. 1: Die Kermesbeere¹



Abb. 2: Phytolacca Globuli in den verschiedenen Konzentrationen

Material und Methoden

Für die *in-vitro* Studie wurden drei verschiedene Extrakte aus Phytolacca C12, C30 und C200 (Wasser- und Ethanolextrakt) hergestellt, in je vier verschiedenen Konzentrationen (10%, 20%, 50%, 100%). Zum Nachweis, ob sich in den Extrakten Inhaltsstoffe befinden, diente eine Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC). Der Nachweis des Rezeptorstatus gelang immunhistochemisch (Biozol). Die Prüfung des Zellmetabolismus erfolgte mit pH-Wert-, Glukose- und Laktatmessung. Die Wirkung der Extrakte auf die Mammaepithelzellen wurde mittels Zell-Viabilitäts-Test (CellTiter-Glo®, Promega), Zytotoxizitätstest (CytoTox-Glo®, Promega) und Proliferationsstest (BrdU®, Roche) bestimmt. Als Kontrolllösung stand in ähnlicher Konzentration Zuckerwasser zur Verfügung. Endoxifen diente als Negativ- und Estradiol als Positivkontrolle.

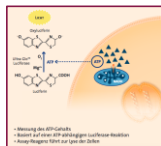


Abb. 3: Funktionsprinzip des Zellviabilitäts-Test (CellTiter-Glo®, Promega)²

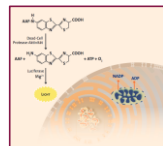


Abb. 4: Funktionsprinzip des Zytotoxizitätstest (CytoTox-Glo®, Promega)²

Ergebnisse

Mittels der Hochleistungsflüssigkeitschromatografie konnten keine Inhaltsstoffe aus Phytolacca ermittelt werden. Die Extrakte zeigten sowohl in den benignen Zellreihen MCF 12a (Rezeptor positiv) und MCF 10a (Rezeptor negativ) sowie in den malignen Zellreihen MCF 7 (Rezeptor positiv) und MDA-MB-231 (Rezeptor negativ) in allen Versuchen keine zytotoxische Wirkung. Die Versuche tendierten zur Proliferation, vor allem auf die beiden malignen Zellreihen in dem Zytotoxizitätstest (CytoTox-Glo®, Promega). Daher zeigten die malignen Zellen mit den Globuli-Extrakten nicht nur keine zytotoxische Wirkung, sondern eine stärkere proliferierende Wirkung, als die beiden benignen Zelllinien. Bei der Überprüfung des Zellmetabolismus konnten keine negativen Einflüsse nachgewiesen werden. Die Kontrollen zeigten das zu Erwartende: starke zytotoxische Effekte bei Endoxifen und eher eine proliferative Wirkung bei Östrogen.

MCF 12a

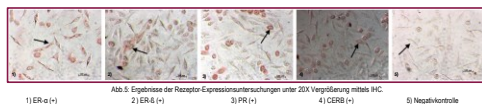


Abb. 5: Ergebnisse der Rezeptor-Expressionsuntersuchungen unter 20X Vergrößerung mittels IHC

MCF 7

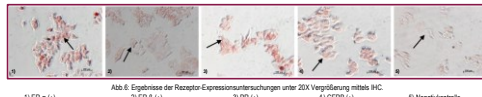


Abb. 6: Ergebnisse der Rezeptor-Expressionsuntersuchungen unter 20X Vergrößerung mittels IHC

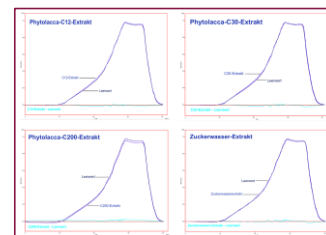


Abb. 7: Durchgeführte HPLC Durchgänge aufgetragen ist die Absorbanz [AU] gegen die Zeit [min]

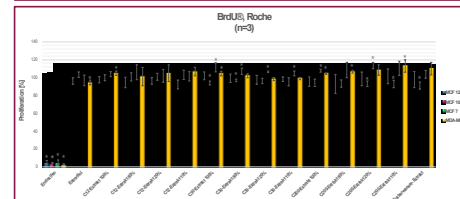
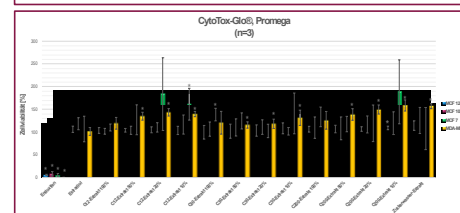
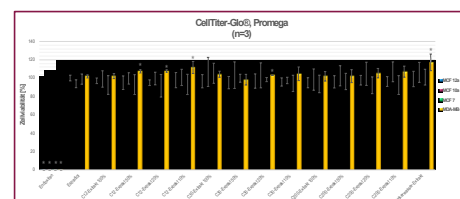


Abb. 8: Zusammenfassungen der In-vitro-Untersuchungen: aufgetragen sind die Veränderungen der Zellviabilität (%) bzw. Zytotoxizität (%) und die Signifikanz (*p < 0,05) bezogen auf Medium + Zellen (1-TEST).

Schlussfolgerung

Aus den Ergebnissen ist zu entnehmen, dass *in-vitro* keine Wirkung des homöopathischen Arzneimittels Phytolacca auf die Mammaepithelzellen existiert. Bereits anhand der HPLC-Ergebnisse konnte nachgewiesen werden, dass in den Globuli keine Wirkstoffe, wie zum Beispiel Phytoonkogene, enthalten sind. Nur Glukose wurde detektiert. Mit diesem Ergebnis war allerdings zu rechnen, was auf der Herstellung der Globuli beruht.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass nach diesen Erkenntnissen das homöopathische Arzneimittel Phytolacca zur Bekämpfung von Mammakarzinom fraglich ist, da es tendenziell eher eine proliferative Wirkung als eine zytotoxische Wirkung aufweist. Dies entspricht dem Effekt der Kontrolllösung „Zuckerwasser-Extrakt“. So ist in der Literatur bereits zu finden, dass Zucker die Tumorbildung fördert³.

Eine *in-vivo* Studie im Tierversuch mit einer Placebo-Kontrollgruppe wäre wünschenswert, da in dieser Forschungsarbeit nur die *in-vitro* Wirkung untersucht wurde. Damit wäre es möglich zu zeigen, ob diese Globuli eine andere Wirkungsgrundlage besitzen.

¹ Panther/Media / Liane Matrich: „Phytolacca Globuli“, auf: <https://www.globuli.de/einzelmittel/globuli-von-p-bis-q/phytolacca/> (26.05.2018).

² Promega GmbH (Hq): „Zellbasierte & Biochemische Assays von Promega“, S. 10, 19.

³ Yang P, Cohen L et al.: „A Sucrose-Enriched Diet Promotes Tumorigenesis in Mammary Gland in Part through the 12-Lipoxygenase Pathway“, Cancer Res, 2016.

X. LITERATURVERZEICHNIS

1. A, A. *et al.* Endoxifen, a new cornerstone of breast cancer therapy: demonstration of safety, tolerability, and systemic bioavailability in healthy human subjects. *Clin. Pharmacol. Ther.* 88, 814–817 (2010).
 2. A, K., A, Z., J, D., KM, H. & P, H. Role of mitochondria in tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells. *Apoptosis* 10, 1395–1410 (2005).
 3. A, M., P, A., M, B. & P, B. Active and passive smoking and risk of breast cancer: a meta-analysis. *Breast Cancer Res. Treat.* 154, 213–224 (2015).
 4. AB, S.-S. *et al.* Clinical pharmacokinetics and pharmacogenetics of tamoxifen and endoxifen. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* 12, 523–536 (2019).
 5. Ahmad, A. Breast Cancer Statistics: Recent Trends. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1152, 1–7 (2019).
 6. Aiton, W., Aiton, W. T., Gowen, J. R. & Whitfield, R. *Hortus kewensis, or, A catalogue of the plants cultivated in the Royal Botanic Garden at Kew.* (Longman, Hurst, Rees, Orme, and Brown, 1810). doi:10.5962/bhl.title.105339.
 7. AL, M., G, W. & SR, D. Clinical review 92: Phytoestrogens. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 297–303 (1998).
 8. AL, N. *et al.* A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers. *Anal. Biochem.* 366, 197–206 (2007).
 9. Albert, U. *et al.* Federführende Organisationen Eine Leitlinie für Leitlinien: methodische Erstellung und Anwendung der Leitlinie Frauenin-formation. *Zentralbl Gynaekol* 125, 484–493 (2003).
 10. Amin, B., Aldaghi, L., Moalemzadeh, H. & Soltani, F. Evaluation of cytotoxic effects of three homeopathy remedies (Sepia, Phosphorus and Pulsatilla) in the breast cancer cell line, MCF-7. *J. Sabzevar Univ. Med. Sci.* 28, 207–213 (2021).
 11. AN, P., AD, D. & SR, C. Flavonoids: an overview. *J. Nutr. Sci.* 5, (2016).
 12. Arora, S., Singla, P., Jyoti, S. & Tandon, S. Anti-proliferative effects of homeopathic medicines on human kidney, colon and breast cancer cells Human ES cells IN cardiotoxicity testing View project. doi:10.1016/j.homp.2013.06.001.
 13. ATCC. MCF-12A | ATCC. <https://www.atcc.org/products/crl-10782>.
 14. ATCC. MCF7 | ATCC. <https://www.atcc.org/products/htb-22>.
 15. ATCC. MDA-MB-231 | ATCC. <https://www.atcc.org/products/htb-26>.
 16. ATCC. MCF 10A | ATCC. <https://www.atcc.org/products/crl-10317>.
 17. AWMF, DKG & Deutsche Krebshilfe. Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms - Langversion 4.4. (2021).
-

18. B, O. & JL, K. Benign Breast Diseases: Evaluation and Management. *Clin. Obstet. Gynecol.* 59, 710–726 (2016).
19. BA, H. & P, L. Stromal regulation of embryonic and postnatal mammary epithelial development and differentiation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 25–26, 43–51 (2014).
20. Baral, E., And, E. N. & Berczi, I. Target cells are sensitized for cytotoxic T-lymphocyte-mediated destruction by estradiol and tamoxifen. *Int. J. Cancer* 58, 64–68 (1994).
21. Benson, J. R. & Jatoi, I. The global breast cancer burden. <http://dx.doi.org/10.2217/fon.12.61> 8, 697–702 (2012).
22. Berek, J. *Berek and hacker's gynecologic oncology: Sixth edition. Berek and Hacker's Gynecologic Oncology: Sixth Edition* (Wolters Kluwer Health Adis (ESP), 2015).
23. Böcker, W. *et al. Pathologie: mit rund 150 Tabellen.* (Elsevier, Urban & Fischer, 2012).
24. Brien, S., Lachance, L., Prescott, P., McDermott, C. & Lewith, G. Homeopathy has clinical benefits in rheumatoid arthritis patients that are attributable to the consultation process but not the homeopathic remedy: a randomized controlled clinical trial. *Rheumatology* 50, 1070–1082 (2011).
25. Bühling, K. J. & Friedmann, W. *Intensivkurs Gynäkologie und Geburtshilfe, Klinik. 2. Aufl.* (Elsevier, Urban & Fischer, 2009).
26. Bühring, U. *Lehrbuch Heilpflanzenkunde.* (Karl F. Haug Verlag in Georg Thieme Verlag KG, 2021). doi:10.1055/b000000072.
27. C, D.-H. & P, S. Breast cancer: overview & updates. *Nurse Pract.* 36, 20–26 (2011).
28. C, K., F, M., DM, P. & WB, S. Oral contraceptive use as a risk factor for premenopausal breast cancer: a meta-analysis. *Mayo Clin. Proc.* 81, 1290–1302 (2006).
29. C, W., K, E., SA, L., A, S. & JA, G. A genome-wide study of the repressive effects of estrogen receptor beta on estrogen receptor alpha signaling in breast cancer cells. *Oncogene* 27, 1019–1032 (2008).
30. Cam-Cancer. Cam-Cancer | Cam-Cancer. <https://cam-cancer.org/en>.
31. CJ, F., BF, K. & SD, H. Omega-3 fatty acids for breast cancer prevention and survivorship. *Breast Cancer Res.* 17, (2015).
32. CM, F., J, M., A, L., Q, L. & JA, S. Long term hormone therapy for perimenopausal and postmenopausal women. *Cochrane database Syst. Rev.* (2005) doi:10.1002/14651858.CD004143.PUB2.
33. CM, F. & AE, C. Physical activity and breast cancer risk: impact of timing, type and dose of activity and population subgroup effects. *Br. J. Sports Med.* 42, 636–647 (2008).
34. CM, F., HK, N. & BM, L. State of the epidemiological evidence on physical activity and cancer prevention. *Eur. J. Cancer* 46, 2593–2604 (2010).

35. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *Lancet. Oncol.* 13, 1141–1151 (2012).
 36. Corporation, P. CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay Instructions for Use of Products G9290, G9291 and G9292.
 37. D, D., L, L., C, P., L, B. & RK, R. Rapidly rising breast cancer incidence rates among Asian-American women. *Int. J. cancer* 99, 747–750 (2002).
 38. D, von F. *et al.* Hormonal and non-hormonal medical therapy of benign breast disease. *Horm. Res.* 32 Suppl 1, 28–31 (1989).
 39. DGE. Sekundäre Pflanzenstoffe und ihre Wirkung auf die Gesundheit – Eine Aktualisierung anhand des Ernährungsberichts 2012 - DGE.
<https://www.dge.de/wissenschaft/weitere-publikationen/fachinformationen/sekundaere-pflanzenstoffe-und-ihre-wirkung/>.
 40. DHU. Fragen zu Homöopathie? Hier gibt's Antworten.
<https://www.dhu-globuli.de/homoeopathie/haeufig-gestellte-fragen.html>.
 41. DHU. Gebrauchsinformation: Information für den Anwender Phytolacca C30.
 42. Dietger, M. Sekundäre Pflanzenstoffe. in *Fit und gesund von 1 bis Hundert* 30–31 (Springer Berlin Heidelberg, 2018). doi:10.1007/978-3-662-56307-6_25.
 43. DL, L. *et al.* In Vivo Imaging of Tumor Metabolism and Acidosis by Combining PET and MRI-CEST pH Imaging. *Cancer Res.* 76, 6463–6470 (2016).
 44. Dr. Weingärtner, W. Homöopathische Potenzen (Weingärtner – 2003) – HVS – HomöopathieVerband Schweiz.
<https://hvs.ch/homoeopathische-potenzen-weingaertner-2003/>.
 45. DS, S., EA, T. & SJ, B. Homeopathic treatment for chronic disease: a 6-year, university-hospital outpatient observational study. *J. Altern. Complement. Med.* 11, 793–798 (2005).
 46. E, E. The public's enthusiasm for complementary and alternative medicine amounts to a critique of mainstream medicine. *Int. J. Clin. Pract.* 64, 1472–1474 (2010).
 47. EBCTCG, E. B. C. T. C. G. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet (London, England)* 365, 1687–1717 (2005).
 48. Effenberger, K. Der Einfluss von Phytoestrogenen auf Estrogenrezeptor gesteuerte Expressionsmuster in unterschiedlichen Zellpopulationen - Untersuchung potentieller pflanzlicher Alternativen zur Hormonersatztherapie in der Menopause.
 49. EKF Diagnostics. Science made Simple Biosen C-Line Clinic / GP+.
-

50. ENB - Europäischer Naturheilbund e.V. Phytolacca Globuli | Anwendung, Wirkung & Dosierung. <https://www.globuli.de/einzelmittel/globuli-von-p-bis-q/phytolacca/>.
 51. ER, M., NA, Z. & CG, K. Metaplastic Breast Carcinoma: Update on Histopathology and Molecular Alterations. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 143, 1492–1496 (2019).
 52. Ernst, E. A systematic review of systematic reviews of homeopathy. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 54, 577 (2002).
 53. Ernst, E. *Heilung oder Humbug?* (Springer Berlin Heidelberg, 2021). doi:10.1007/978-3-662-61709-0.
 54. Ernst, E. *Homeopathy - The Undiluted Facts : Including a Comprehensive A-Z Lexicon.* (Springer International Publishing AG, 2016).
 55. Ernst, E. Homeopathy: what does the “best” evidence tell us? *Med. J. Aust.* 192, 458–460 (2010).
 56. Ernst, E. Homeopathy, non-specific effects and good medicine. *Rheumatology (Oxford)*. 50, 1007–1008 (2011).
 57. Ernst, E. Beliebtheit, Akzeptanz und gesetzliche Regelungen. in *Homöopathie - die Fakten [unverdünnt]* 27–35 (Springer Berlin Heidelberg, 2018). doi:10.1007/978-3-662-54946-9_4.
 58. F, S. et al. DEGRO practical guidelines: radiotherapy of breast cancer I: radiotherapy following breast conserving therapy for invasive breast cancer. *Strahlenther. Onkol.* 189, 825–833 (2013).
 59. Fischer, M. A., Oswald, K. & Adler, W. *Exkursionsflora für Österreich, Liechtenstein, Südtirol.* (Biologiezentrum des Oberösterreichischen Landesmuseen, 2008).
 60. Förster, C. & Kietz, S. estrogenrezeptor beta (ER β) vermittelt zelluläre Differenzierungsprozesse. *BIOspektrum* 02, 162–164 (2006).
 61. Frass, M. & Krenner, L. *Integrative Medizin.* (Springer Berlin Heidelberg, 2019). doi:10.1007/978-3-662-48879-9.
 62. Freissmuth, M. & Böhm, S. *Pharmakologie und Toxikologie, von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie.* (Springer Medizin Verlag, 2012).
 63. Fröhmann, E. Kermesbeere - Heilpflanzenwissen — Heilpflanzenwissen. <http://heilpflanzenwissen.at/pflanzen/kermesbeere/>.
 64. G, E., A, M. & C, T. Tamoxifen and Endometrial Cancer: A Janus-Headed Drug. *Cancers (Basel)*. 12, 1–11 (2020).
 65. G, F., H, H. & B, H. Ansatzpunkte für einen therapeutischen Einsatz von Phytoöstrogenen (Isoflavonen) bei postmenopausalen Frauen. *J. für Menopause* 5, 7–16 (1998).
 66. Gerhard, I. & Kiechle, M. *Gynäkologie integrativ.* (Elsevier, 2006). doi:10.1016/B978-3-437-56260-0.X5001-7.
-

67. Gey, M. H. *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik*. (Springer Berlin Heidelberg, 2015). doi:10.1007/978-3-662-46255-3.
 68. Giuliano, A. E. *et al.* Effect of Axillary Dissection vs No Axillary Dissection on 10-Year Overall Survival Among Women With Invasive Breast Cancer and Sentinel Node Metastasis: The ACOSOG Z0011 (Alliance) Randomized Clinical Trial. *JAMA* 318, 918 (2017).
 69. Goerke, K., Steller, J. & Valet, A. *Klinikleitfaden Gynäkologie, Geburtshilfe*. (Urban & Fischer).
 70. Green, D. PHYTOLACCA C200. <https://www.doc.green/phytolacca-c200-4231825>.
 71. Gstraunthaler, G. & Lindl, T. *Zell- und Gewebekultur*. (Springer Berlin Heidelberg, 2013). doi:10.1007/978-3-642-35997-2.
 72. Guo, Q., Rimbach, G. & Packer, L. Nitric oxide formation in macrophages detected by spin trapping with iron-dithiocarbamate complex: Effect of purified flavonoids and plant extracts. *Methods Enzymol.* 335, 273–282 (2001).
 73. Haag, P., Hanhart, N. & Müller, M. *Gynäkologie und Urologie für Studium und Praxis*. (Medizinischer Verlags- und Informationsdienste).
 74. Hafer, L. Der Einfluss der gelben Hauszwiebel (*Allium cepa*) im Vergleich zu den synthetischen Flavonoiden (Quercetin und Rutin) auf das Wachstumsverhalten der estrogenrezeptorpositiven Mammakarzinomzelllinie MCF-7. (Rostock, 2018).
 75. Hänsel, R. & Sticher, O. *Pharmakognosie — Phytopharmazie*. (Springer Berlin Heidelberg, 2010). doi:10.1007/978-3-642-00963-1.
 76. HB, P. & W, J. The pros and cons of phytoestrogens. *Front. Neuroendocrinol.* 31, 400–419 (2010).
 77. Heinrich, P., Müller & Graeve. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. (Springer Berlin Heidelberg, 2014). doi:10.1007/978-3-642-17972-3.
 78. Herzog, M. & Bierbach, E. *Handbuch Naturheilpraxis Behandlungsstandards und -strategien für Heilpraktiker*. (Elsevier, 2017).
 79. Homöopathiewelt. Die Amerikanische Kermesbeere Phytolacca in der Homöopathie | Homöopathiewelt. <http://www.homoeopathiewelt.com/einzelmittel/phytolacca-decandra/>.
 80. Horn, F. *Biochemie des Menschen*. (Thieme, 2009).
 81. Hosseini, S., Marco, P. V.-V., Sergio, R.-P. & Martinez-Chapa, O. *SPRINGER BRIEFS IN APPLIED SCIENCES AND TECHNOLOGY □ FORENSIC AND MEDICAL BIOINFORMATICS Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) From A to Z*. <http://www.springer.com/series/11910>.
-

82. I, S. *et al.* 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. *Lancet (London, England)* 369, 29–36 (2007).
83. J, H. *et al.* Online survey of patients with breast cancer on complementary and alternative medicine. *Breast Care (Basel)*. 9, 60–63 (2014).
84. J, H. *et al.* User rate of complementary and alternative medicine (CAM) of patients visiting a counseling facility for CAM of a German comprehensive cancer center. *Anticancer Res.* 34, 943–948 (2014).
85. J, I. & JM, D. Mastalgia. *BMJ* 347, bmj.f3288 (2013).
86. JA, C. *et al.* Elevated serum estradiol and testosterone concentrations are associated with a high risk for breast cancer. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Ann. Intern. Med.* 130, 270–277 (1999).
87. Jacobs, W. Disease-Management-Programm Brustkrebs. *Manag. des Mammakarzinoms* 21–24 (2006) doi:10.1007/978-3-540-31748-7_4.
88. Jayaraman, S. *et al.* Antitumor activity of Z-endoxifen in aromatase inhibitor-sensitive and aromatase inhibitor-resistant estrogen receptor-positive breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2020 221 22, 1–12 (2020).
89. JC, C. & FC, C. Mature breast adipocytes promote breast cancer cell motility. *Exp. Mol. Pathol.* 92, 312–317 (2012).
90. JC, S. *et al.* The cytotoxic effects of estradiol-17 beta, catecholestradiols and methoxyestradiols on dividing MCF-7 and HeLa cells. *J. Steroid Biochem.* 32, 797–809 (1989).
91. JD, Y. & NE, D. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 354, 270–282 (2006).
92. Jiang, Y. *et al.* A Sucrose-Enriched Diet Promotes Tumorigenesis in Mammary Gland in Part through the 12-Lipoxygenase Pathway. *Cancer Res.* 76, 24–29 (2016).
93. Katalinic, A., Eisemann, N., Kraywinkel, K., Nofzt, M. R. & Hübner, J. Breast cancer incidence and mortality before and after implementation of the German mammography screening program. *Int. J. Cancer* 147, 709–718 (2020).
94. Katsares, V. *et al.* A Rapid and Accurate Method for the Stem Cell Viability Evaluation: The Case of the Thawed Umbilical Cord Blood. *Lab. Med.* 40, 557–560 (2009).
95. Kim, J. B., O'Hare, M. J. & Stein, R. Models of breast cancer: Is merging human and animal models the future? *Breast Cancer Research* vol. 6 22–30 (2004).
96. Klaus Becker, S. J. *Farbatlas: Nutzpflanzen in Mitteleuropa. Journal of Agronomy and Crop Science* vol. 186 (2008).
97. Koch-Institut, R. Krebs in Deutschland | 2015/2016. (2015).

98. L, S., C, S., C, G. & G, H. Adherence to Mediterranean Diet and Risk of Cancer: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients* 9, (2017).
99. LA, L. A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res.* 61, 3230–3239 (2001).
100. LO Laboroptik. Zählkammern Zählkammer Bürker.
<http://www.zaehlkammer.de/deutsch/buerker.html>.
101. Lehrke, P., Quak, T. & Wurster, J. *Adjuvante Homöopathie in der Onkologie*. (Elsevier, 2018).
102. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, A. S3-Leitlinie Komplementärmedizin in der Behandlung von onkologischen PatientInnen. *AWMF Regist. 032/055OL* 1–592 (2021).
103. Levenson, A. S. & Jordan, V. C. MCF-7: The First Hormone-responsive Breast Cancer Cell Line. *Cancer Res.* 57, (1997).
104. LH, A., DA, F., J, L. & H, M. A descriptive study of mastitis in Australian breastfeeding women: incidence and determinants. *BMC Public Health* 7, (2007).
105. Lombard, K. A., Geoffriau, E. & Peffley, E. Flavonoid quantification in onion by spectrophotometric and high performance liquid chromatography analysis. *HortScience* 37, 682–685 (2002).
106. M, C. *et al.* Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet (London, England)* 366, 2087–2106 (2005).
107. M, H. *et al.* How many cancer patients use complementary and alternative medicine: a systematic review and metaanalysis. *Integr. Cancer Ther.* 11, 187–203 (2012).
108. M, M., S, M.-A.-C., P, A. & Y, J. Effects of Vitex agnus and Flaxseed on cyclic mastalgia: A randomized controlled trial. *Complement. Ther. Med.* 24, 90–95 (2016).
109. Malherbe, K., Khan, M. & Fatima, S. Fibrocystic Breast Disease. *UpToDate* (2021).
110. Marahrens, P. Die Wirkung von grünem Tee und Matchatee, sowie ihrer Bestandteile Epigallocatechingallat und Quercetin auf MCF-7- und MDA-MB-231-Brustkarzinomzellen. (Rostock, 2019).
111. Marchese, S. & Silva, E. Disruption of 3D MCF-12A Breast Cell Cultures by Estrogens - An In Vitro Model for ER-Mediated Changes Indicative of Hormonal Carcinogenesis. *PLoS One* 7, e45767 (2012).
112. Mathie, R. T. *et al.* Randomised, double-blind, placebo-controlled trials of non-individualised homeopathic treatment: systematic review and meta-analysis. *Syst. Rev.* 2017 61 6, 1–28 (2017).
113. May, T. Entwicklung eines transkriptionell regulierten Systems zur konditionalen Immortalisierung. (2005) doi:10.24355/DBBS.084-200511080100-339.

114. ME, J., MJ, S., LB, W., A, A. & AJ, S. Smoking and risk of breast cancer in the Generations Study cohort. *Breast Cancer Res.* 19, (2017).
 115. Milgrom, L. R. Gold Standards, Golden Calves, and Random Reproducibility: Why Homeopaths at Last Have Something to Smile About. *J. Altern. Complement. Med.* 15, 205–207 (2009).
 116. Mitich, L. W. Common Pokeweed. *Weed Technol.* 8, 887–890 (1994).
 117. MJ, M. & CL, L. Soy for breast cancer survivors: a critical review of the literature. *J. Nutr.* 131, (2001).
 118. Momenimovahed, Z. & Salehiniya, H. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer (London)*. 11, 151 (2019).
 119. Morris, K. T., Johnson, N., Homer, L. & Walts, D. A comparison of complementary therapy use between breast cancer patients and patients with other primary tumor sites. *Am. J. Surg.* 179, 407–411 (2000).
 120. MP, G. *et al.* First-in-Human Phase I Study of the Tamoxifen Metabolite Z-Endoxifen in Women With Endocrine-Refractory Metastatic Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* 35, 3391–3400 (2017).
 121. Müller, M. *et al.* Phytolacca – Homöopathischer Bereitschaftsdienst. <https://www.homoeopathischer-notdienst.de/2009/07/29/phytolacca/>.
 122. Munk, K., Bilger, W., Dauborn, B. & Dietz, K.-J. *Taschenlehrbuch Biologie: Botanik.* (Thieme, 2009).
 123. Neuendorf, J. *Das Urinsediment.* (Springer Berlin Heidelberg, 2015). doi:10.1007/978-3-662-46074-0.
 124. Oh, E.-Y. *et al.* Extensive rewiring of epithelial-stromal co-expression networks in breast cancer. *Genome Biol.* 16, (2015).
 125. Onkopedia. Mammakarzinom der Frau — Onkopedia. <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/mammakarzinom-der-frau/@@guideline/html/index.html>.
 126. Paine, T. M., Soule, H. D., Pauley, R. J. & Dawson, P. J. Characterization of epithelial phenotypes in mortal and immortal human breast cells. *Int. J. Cancer* 50, 463–473 (1992).
 127. Petru, E., Jonat, W., Fink, D. & Köchli, O. R. *Praxisbuch Gynäkologische Onkologie.* (Springer Medizin Verlag, 2014).
 128. Petty, R. D., Sutherland, L. A., Hunter, E. M. & Cree, I. A. Comparison of M T T and ATP-Based Assays for t h e Measurement of Viable Cell Number. *J BIOLUMIN CHEMILUMIN* 10, 29–34 (1995).
 129. PP, H. & DM, S. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* 134, 703–707 (2008).
-

130. Promega. CellTiter-Glo ® Luminescent Cell Viability Assay Instructions for Use of Products G7570, G7571, G7572 and G7573.
 131. Promega. CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay Protocol.
<https://www.promega.de/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-glo-luminescent-cell-viability-assay-protocol/>.
 132. R, G. *et al.* Prevalence of BRCA mutations among women with triple-negative breast cancer (TNBC) in a genetic counseling cohort. *Ann. Surg. Oncol.* 20, 3254–3258 (2013).
 133. Radin, D. P. & Patel, P. Delineating the molecular mechanisms of tamoxifen's oncolytic actions in estrogen receptor-negative cancers. *Eur. J. Pharmacol.* 781, 173–180 (2016).
 134. Rahman, N. A., Hasan, M., Hussain, M. A. & Jahim, J. Determination of Glucose and Fructose from Glucose Isomerization Process by High performance Liquid Chromatography with UV Detection. *Mod. Appl. Sci.* 2, (2008).
 135. Regine Gätje, Christine Eberle, Christoph Scholz, Marion Lübke, ... *Kurzlehrbuch Gynäkologie und Geburtshilfe*. (Georg Thieme Verlag KG, 2015).
 136. RJ, S. Benign Breast Disease in Women. (2000).
 137. Roche. Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric).
 138. S, D. *et al.* Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. *Lancet (London, England)* 378, 1707–1716 (2011).
 139. S, P. *et al.* Warburg meets autophagy: cancer-associated fibroblasts accelerate tumor growth and metastasis via oxidative stress, mitophagy, and aerobic glycolysis. *Antioxid. Redox Signal.* 16, 1264–1284 (2012).
 140. S, T. & T, K. Epidemiology of Breast Cancer in Japan. *Breast Cancer* 2, 1–7 (1995).
 141. S, V., AM, K., R, van W. & PFJ, S. The treatment of premenstrual syndrome with preparations of Vitex agnus castus: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 217, 150–166 (2017).
 142. Saika, K. & Sobue, T. Epidemiology of Breast Cancer in Japan and the US Descriptive Epidemiology Number of new cases and incidence rate of breast cancer Information on cancer morbidity. *J. Japan Med. Assoc.* 52, 657–661.
 143. SB, B., VV, P. & AH, B. Foeniculum vulgare Mill: a review of its botany, phytochemistry, pharmacology, contemporary application, and toxicology. *Biomed Res. Int.* 2014, (2014).
 144. Scaling, A. L., Prossnitz, E. R. & Hathaway, H. J. GPER Mediates Estrogen-Induced Signaling and Proliferation in Human Breast Epithelial Cells and Normal and Malignant Breast. doi:10.1007/s12672-014-0174-1.
 145. Schmidt, J. & Haverland, D. Globuli richtig handhaben.
<https://www.apotheken.de/symptome/11212-globuli-richtig-handhaben>.
-

146. Schmitz, S. *Der Experimentator: Zellkultur*. (Elsevier, 2007).
 147. SE, H. *et al.* Plasma sex steroid hormone levels and risk of breast cancer in postmenopausal women. *J. Natl. Cancer Inst.* 90, 1292–1299 (1998).
 148. Sigma-Aldrich. MCF10A CELLS APC (-/-).
<https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/product/sigma/clls1069>.
 149. Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. & Brennan, M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma^{1,2}. *J. Natl. Cancer Inst.* 51, 1409–1416 (1973).
 150. Soule, H. D. *et al.* Isolation and Characterization of a Spontaneously Immortalized Human Breast Epithelial Cell Line, MCF-10. *Cancer Res.* 50, (1990).
 151. Spektrum.de. *Phytolacca americana* - Lexikon der Arzneipflanzen und Drogen.
<https://www.spektrum.de/lexikon/arzneipflanzen-drogen/phytolacca-americana/11152>.
 152. Stachs, A., Stubert, J., Reimer, T. & Hartmann, S. Benign breast disease in women. *Dtsch. Arztebl. Int.* 116, 565–573 (2019).
 153. Strober, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr. Protoc. Immunol.* 111, A3.B.1-A3.B.3 (2015).
 154. Stubert, J., Gerber, B., Stachs, A., Hartmann, S. & Reimer, T. *Gutartige Erkrankungen der Brust*. (De Gruyter, 2019). doi:10.1515/9783110611106.
 155. Subik, K. *et al.* The expression patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, KI-67 and AR by immunohistochemical analysis in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Basic Clin. Res.* 4, 35–41 (2010).
 156. Sweeney, M. F., Sonnenschein, C. & Soto, A. M. Characterization of MCF-12A cell phenotype, response to estrogens, and growth in 3D. *Cancer Cell Int.* 2018 181 18, 1–12 (2018).
 157. T, P., T, T. & S, A. Quantitation of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation into DNA: an enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response. *J. Immunol. Methods* 82, 169–179 (1985).
 158. Tait, L., Soule, H. D. & Russo, J. Ultrastructural and Immunocytochemical Characterization of an Immortalized Human Breast Epithelial Cell Line, MCF-10. *Cancer Res.* 50, (1990).
 159. Tao, Z. *et al.* Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. *Cell Biochem. Biophys.* 2014 722 72, 333–338 (2014).
 160. Tautz, E., Momm, F., Hasenburg, A. & Guethlin, C. Use of Complementary and Alternative Medicine in breast cancer patients and their experiences: A cross-sectional study. *Eur. J. Cancer* 48, 3133–3139 (2012).
 161. Tolliday, N. High-throughput assessment of Mammalian cell viability by determination of adenosine triphosphate levels. *Curr. Protoc. Chem. Biol.* 2, 153–161 (2010).
-

162. vectorlabs. *DISCOVERY through color. A Guide to Multiple Antigen Labeling*.
www.vectorlabs.com.
163. Vinay Kumar, A. A. & Aster, J. *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease*, 9. Aufl.
(Saunders Elsevier, 2014).
164. Vithoulkas, G. Serious mistakes in meta-analysis of homeopathic research. *J. Med. Life*
10, 47 (2017).
165. Voiß, P. *et al.* Lebensstilfaktoren und Komplementärmedizin beim Mammakarzinom.
Gynakologe 50, 525–532 (2017).
166. Voss, J. Einfluss von Allium porrum - Extrakt (Lauch) im Vergleich zu synthetischem
Quercetin und Rutin auf benigne und normale hormonrezeptorpositive und -negative
Mammazellen. (Rostock, 2020).
167. Wacker, J., Sillem, M., Bastert, G. & Beckmann, M. W. *Therapieshandbuch Gynäkologie
und Geburtshilfe*. (Springer Berlin Heidelberg, 2013). doi:10.1007/978-3-642-30189-6.
168. Walach, H. Die Bedeutung nichtlokaler Effekte für die klinische Forschung. *Allg.
Homöopathische Zeitung* 241, 98–121 (2007).
169. Walach, H., Jonas, W. B., Ives, J., Wijk, R. Van & Otto Weingärtner, D. P. N. Research
on Homeopathy: State of the Art. <https://home.liebertpub.com/acm> 11, 813–829 (2005).
170. Weu-Domschke, S. Wirkung phytoestrogenhaltiger Leinwurzelextrakte (Linum
usitatissimum) auf maligne und benigne Zelllinien der Mamma. (Rostock, 2018).
171. Weyerstahl, T. & Stauber, M. *Gynäkologie und Geburtshilfe [mit Filmen zu
Spontangeburt und Sectio online]*. (Thieme, 2013).
172. Wiesenauer, M. *Gynäkologisch- geburtshilfliche Praxis der Homöopathie*. (Hippokrates
Verlag GmbH, 1995).
173. WY, C., B, R., SE, H., GA, C. & WC, W. Moderate alcohol consumption during adult life,
drinking patterns, and breast cancer risk. *JAMA* 306, 1884–1890 (2011).
174. Y, D., Y, M. & A, N. Estradiol/GPER affects the integrity of mammary duct-like structures
in vitro. *Sci. Rep.* 10, (2020).
175. Y, Q. *et al.* Evaluation of MCF10A as a Reliable Model for Normal Human Mammary
Epithelial Cells. *PLoS One* 10, (2015).
176. Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut. Bericht zum Krebsgeschehen
in Deutschland 2016. 274 (2016) doi:10.17886/RKIPUBL-2016-014.
177. Zeun, S. *Phytotherapie in der Frauenheilkunde*. (Georg Thieme Verlag KG, 2021).
doi:10.1055/b0000000517.

XI. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

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

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

Esslingen

(Abgabedatum)

(Vollständige Unterschrift)

XII. DANKSAGUNG

Bei folgenden Personen möchte ich mich ganz herzlich bedanken. Sie haben mich während meiner Zeit als Doktorandin sowohl bei der Labortätigkeit als auch beim Verfassen der wissenschaftlichen Arbeit unterstützt.

Insbesondere möchte ich mich bei meiner Doktormutter Frau Priv.-Doz. Dr. Dagmar-Ulrike Richter bedanken. Nicht nur für die Vergabe des spannenden Themas, sondern auch für die enge und warmherzige Zusammenarbeit über die Jahre. Bei Fragen oder Problemen hatte sie jederzeit ein offenes Ohr und einen kompetenten Rat für mich, dies hat großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit gehabt.

Ebenso möchte ich mich beim gesamten Team des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik Rostock bedanken. Besonders Frau Gosch möchte ich meinen Dank aussprechen, sie war stets die gute Seele im Labor und stand uns mit ihrem Wissen als MTLA immer zur Seite. Ich bin sehr dankbar, dass ich die Erfahrungen einer experimentellen Doktorarbeit machen durfte. Das Arbeiten im Labor hat mir große Freude bereitet. So war die Zeit dort unglaublich bereichernd und durch die angenehme Atmosphäre habe ich mich sehr wohl gefühlt. Das Zusammenarbeiten mit den anderen DoktorandInnen lief stets sehr kollegial ab und ich genoss das gemeinsame Lösen der Probleme. Dafür möchte ich mich bei allen, die Teil meiner „Laborfamilie“ waren, vor allem bei Felix und Tim, bedanken. Ich werde diese Zeit als eine der schönsten meines Studiums in Erinnerung behalten!

Mein ausgesprochener Dank gilt auch meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meinen Geschwistern, die mich aus der Ferne auch in schwierigen Zeiten stets unterstützt, motiviert und Mut gemacht haben. Ohne ihren Rückhalt hätte ich das Studium nicht so meistern können, dafür kann ich nicht genug Dank aussprechen!

Ganz besonders möchte ich all meinen Freunden und KommilitonInnen danken.

Meine Zeit in Rostock wäre nicht halb so schön gewesen, wenn mich meine lieben Freunde nicht die ganze Zeit auf diesem Weg begleitet hätten. Ich möchte ganz besonders Insa, Isabelle, Johanna, Leonie, Natalie, und Wenke für ihren Rückhalt und ihre tiefgehende Freundschaft Danke sagen!

Mein Dank gilt auch meinen „Mädels“ und Freunden in der Heimat, die immer an mich geglaubt haben und mich all die Jahre nicht vergessen haben.

Zuletzt möchte ich von ganzem Herzen Ben danken, ohne ihn würde ich jetzt nicht hier stehen. Er ist meine bessere Hälfte und weiß immer, wie mich zu motivieren und zu bestärken. Danke für deine unerschöpfliche Liebe und Zuneigung jeden Tag!