



AUS DER UNIVERSITÄTSFRAUENKLINIK ROSTOCK

DIREKTOR: Prof. Dr. med. habil. Bernd Gerber

**EINFLUSS VON FENCHEL (*FOENICULUM VULGARE*)
AUF EINE BENIGNE
HORMONREZEPTORPOSITIVE UND -NEGATIVE
MAMMAZELLINIE
(MCF10A UND MCF12A)**

INAUGURALDISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES
DOKTOR DER MEDIZIN
DER
UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

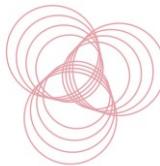
VORGELEGT VON

BENJAMIN SCHNEIDER | GEB. AM 17.06.1994 IN SCHWÄBISCH GMÜND

AUS ROSTOCK

ROSTOCK | 07.2021

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00004080



DEKAN: PROF. DR. MED. UNIV. EMIL C. REISINGER

GUTACHTER:

1. GUTACHTERIN: PD DR. RER. NAT. HABIL. DAGMAR-ULRIKE RICHTER, UNIVERSITÄT ROSTOCK
LEITERIN DER FORSCHUNGSASTELUNG DER UFK ROSTOCK
2. GUTACHTERIN: PROF. DR. MED. KARIN KRAFT, UNIVERSITÄT ROSTOCK
ZENTRUM FÜR INNERE MEDIZIN, LEHRSTUHL FÜR NATURHEILKUNDE
3. GUTACHTER: PROF. DR. MED. INGO B. RUNNEBAUM, MBA, UNIVERSITÄT JENA
KLINIKDIREKTOR DER KLINIK UND POLIKLINIK FÜR FRAUENHEILKUNDE UND
FORTPFLANZUNGSMEDIZIN

EINREICHUNG: JULI 2021

VERTEIDIGUNG: MAI 2022

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
1.1	MALIGNE BRUSTERKRANKUNGEN	1
1.2	BENIGNE BRUSTERKRANKUNGEN	2
1.2.1	MASTODYNIE.....	3
1.2.2	ENTZÜNDLICHE BRUSTERKRANKUNGEN	4
1.2.3	MASTOPATHIE	5
1.2.4	BENIGNE TUMORÖSE VERÄNDERUNGEN.....	9
1.3	ESTROGENREZEPTOREN.....	9
1.4	KOMPLEMENTÄRER THERAPIEANSATZ.....	10
1.5	FOENICULUM VULGARE (FENCHEL).....	11
1.6	SEKUNDÄRE PFLANZENSTOFFE.....	14
1.6.1	PHYTOESTROGENE.....	15
1.6.1.1	ESTRAGOL	16
1.6.2	FLAVONOIDE	16
1.6.2.1	RUTIN	17
1.7	FOLSÄURE	19
1.8	ESTRADIOL	20
1.9	ENDOXIFEN	21
II.	ZIELSTELLUNG	22
III.	MATERIAL UND METHODEN.....	23
3.1	MATERIAL	23
3.1.1	ZELLLINIEN.....	23
3.1.1.1	MCF 10A.....	23
3.1.1.2	MCF 12A.....	24
3.2	METHODEN	24
3.2.1	ZELLKULTIVIERUNG.....	24
3.2.2	IMMUNHISTOCHEMIE	27

3.2.3	HERSTELLUNG DER TESTSUBSTANZEN.....	28
3.2.3.1	FENCHEL	28
3.2.3.2	REFERENZEN	28
3.2.4	HPLC (<i>HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY</i>)	29
3.2.5	IN-VITRO ZELLTESTE.....	32
3.2.5.1	BRDU-TEST	32
3.2.5.2	CELLTITER-GLO® LUMINESZENZTEST.....	34
3.2.5.3	NEUTRALROT-TEST	35
3.2.5.4	CYTOTOX-GLO™ TEST	37
3.2.5.5	GLUKOSE- UND LAKTATBESTIMMUNG	38
3.2.5.6	PH-WERT BESTIMMUNG.....	39
3.2.5.7	STATISTISCHE AUSWERTUNG	39
IV.	ERGEBNISSE.....	40
4.1	IMMUNHISTOCHEMIE	40
4.1.1	MCF 10A.....	40
4.1.2	MCF 12A.....	40
4.2	ANALYSE DER EXTRAKTE	42
4.2.1	HPLC.....	42
4.2.1.1	FENCHEL-ETHANOLEXTRAKT (MIKROWELLENEXTRAKT):.....	42
4.2.1.2	FENCHEL-WASSEREXTRAKT:.....	44
4.2.2	UNTERSUCHUNG WEITERER INHALTSSTOFFE.....	45
4.3	IN-VITRO ZELLTESTE.....	45
4.3.1	CELLTITER-GLO® LUMINESZENZTEST.....	46
4.3.2	BRDU TEST.....	48
4.3.3	CYTOTOX-GLO™-TEST	50
4.3.4	NEUTRALROT TEST.....	53
4.3.5	FAZIT DER IN-VITRO ZELLTESTS	55
4.3.6	GLUKOSE UND LAKTATBESTIMMUNG	56
4.3.7	PH-WERT BESTIMMUNG.....	59

V.	DISKUSSION	61
5.1	DISKUSSION DER EXTRAKTHERSTELLUNG UND ANALYSE.....	62
5.2	DISKUSSION DER SUBSTANZWIRKUNGEN	64
5.2.1	WIRKUNG VON ESTRADIOL	64
5.2.2	WIRKUNG VON ENDOXIFEN.....	65
5.2.3	WIRKUNG VON RUTIN	65
5.2.4	WIRKUNG VON ESTRAGOL.....	66
5.2.5	WIRKUNG VON FOLSÄURE	68
5.2.6	WIRKUNG DES FENCHELEXTRAKTES	69
5.2.7	ZELLLINIEN IM VERGLEICH.....	72
5.3	METHODENKRITIK	74
5.3.1	ZELLLINIEN.....	74
5.3.2	IN-VITRO TESTVERFAHREN.....	76
5.3.3	EXTRAKTE (EXTRAKTIONSMETHODEN UND EXTRAKTANALYTIK).....	79
VI.	AUSBLICK.....	81
VII.	ZUSAMMENFASSUNG	83
VIII.	THESEN	85
IX.	PUBLIKATIONEN	87
X.	LITERATURVERZEICHNIS	88
XI.	ANHANG	105
XII.	DANKSAGUNG.....	109

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: SCHEMATISCHE EINTEILUNG DER GUTARTIGEN BRUSTERKRANKUNGEN	2
ABBILDUNG 2: FIBROZYSTISCHE MASTOPATHIE:	6
ABBILDUNG 3: SCHEMATISCHE ZEICHNUNG EINER FENCHHELPFLANZE.....	11
ABBILDUNG 4: AUSWAHL AN UNTERSUCHTEN UND IN DER LITERATUR BESCHRIEBENEN PHARMAKOLOGISCHER WIRKUNGEN VON FOENICULUM VULGARE ^{19,113}	13
ABBILDUNG 5: GRUNDSTRUKTUR DER FLAVONOIDE (FLAVAN).....	17
ABBILDUNG 6: ÜBERSICHT DER FLAVONOIDE MIT UNTERGRUPPEN UND DEREN DERIVATEN.	17
ABBILDUNG 7: CHEMISCHE STRUKTUR VON RUTIN (QUERCETIN-3-O-RUTINOSID).....	18
ABBILDUNG 8: ESTRADIOLSYNTHESЕ AUS DEN ANDROGENEN ANDROSTENDION UND TESTOSTERON MITTELS AROMATASE UND 17-BETA-HYDROXYSTEROIDDEHYDROGENASE..	20
ABBILDUNG 9: MCF10A ZELLEN, LICHTMIKROSKOPISCHE DARSTELLUNG, 10X VERGRÖßERUNG	23
ABBILDUNG10: MCF12A ZELLEN, LICHTMIKROSKOPISCHE DARSTELLUNG, 10X VERGRÖßERUNG	24
ABBILDUNG 11: A: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINER ZÄHLKAMMER, B: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINES ZÄHLNETZES NACH BÜRKER	26
ABBILDUNG 12: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES TRENNPRINZIPS IN EINER HPLC SÄULE MIT PASSENDEM CHROMATOGRAMM.....	30
ABBILDUNG 13: AUFBAU DER HPLC MIT EINZELNEN BAUTEILEN.	31
ABBILDUNG 14: UNTERSCHIED VON BRDU (5-BROM-2'-DESOXYURIDIN) ZU THYMINIDIN.....	33
ABBILDUNG 15: CELLTITER-GLO SCHEMATISCHES REAKTSPRINZIP.....	34
ABBILDUNG 16: FARBREAKTION AUF WELLPLATTE NACH NEUTRALROTTEST.....	36
ABBILDUNG 17: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES CYTOTOX-GLO TM TEST.....	37
ABBILDUNG 18: MCF10A ZELLEN NACH IMMUNHISTOCHEMISCHER REAKTION, MIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN, 20X VERGRÖßERUNG.....	41
ABBILDUNG 19: MCF12A ZELLEN NACH IMMUNHISTOCHEMISCHER REAKTION, MIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN, 20X VERGRÖßERUNG.....	41
ABBILDUNG 20: HPLC NACHWEIS FOLSÄURE..	43
ABBILDUNG 21: HPLC NACHWEIS RUTIN.....	43
ABBILDUNG 22: HPLC NACHWEIS ESTRAGOL.....	43
ABBILDUNG 23: HPLC NACHWEIS FOLSÄURE IN WASSEREXTRAKT	44
ABBILDUNG 24: HPLC ERGEBNIS WASSEREXTRAKT, NEGATIVBEFUND VON RUTIN.....	44
ABBILDUNG 25: : HPLC ERGEBNIS WASSEREXTRAKT, NEGATIVBEFUND VON ESTRAGOL	45
ABBILDUNG 26: ZELLVIABILITÄT MCF10A UND MCF12A (N=3): CELLTITER-GLO® / PROMEGA NACH 24 h; EINFLUSS DES FENCHELEXTRAKTES IN VERSCHIEDENEN KONZENTRATIONEN	46
ABBILDUNG 27: ZELLVIABILITÄT MCF10A UND MCF12A (N=3): CELLTITER-GLO® / PROMEGA NACH 24 h; EINFLUSS DER REFERENZPROBEN UND DER KONTROLLEN	47

ABBILDUNG 28: ZELLVIABILITÄT MCF10A UND MCF12A (N=3): CELLTITER-GLO® / PROMEGA NACH 24 h; EINFLUSS DER LÖSUNGSMITTEL	48
ABBILDUNG 29: ZELLPROLIFERATION MCF10A UND MCF12A (N=3): BRDU TEST / ROCHE NACH 24 h; EINFLUSS DES FENCHELEXTRAKTES IN VERSCHIEDENEN KONZENTRATIONEN	48
ABBILDUNG 30: ZELLPROLIFERATION MCF10A UND MCF12A (N=3): BRDU-TEST / ROCHE NACH 24 h; EINFLUSS DER REFERENZPROBEN UND DER KONTROLLEN	49
ABBILDUNG 31: ZELLPROLIFERATION MCF10A UND MCF12A (N=3): BRDU-TEST / ROCHE NACH 24 h; EINFLUSS DER LÖSUNGSMITTEL	50
ABBILDUNG 32: ZELLVIABILITÄT MCF10A UND MCF12A (N=3): CYTOTOX-GLO™ / PROMEGA NACH 24 h; EINFLUSS DES FENCHELEXTRAKTES IN VERSCHIEDENEN KONZENTRATIONEN	51
ABBILDUNG 33: ZELLVIABILITÄT MCF10A UND MCF12A (N=3): CYTOTOX-GLO™ / PROMEGA NACH 24 h; EINFLUSS DER REFERENZPROBEN UND DER KONTROLLEN	52
ABBILDUNG 34: ZELLVIABILITÄT MCF10A UND MCF12A (N=3): CYTOTOX-GLO™ / PROMEGA NACH 24 h; EINFLUSS DER LÖSUNGSMITTEL	52
ABBILDUNG 35: ZELLVIABILITÄT MCF10A UND MCF12A (N=3): NEUTRALROT-TEST / SIGMA-ALDRICH NACH 24 h; EINFLUSS DES FENCHELEXTRAKTES	53
ABBILDUNG 36: ZELLVIABILITÄT MCF10A UND MCF12A (N=3): NEUTRALROT-TEST / SIGMA-ALDRICH NACH 24 h; EINFLUSS DER REFERENZPROBEN UND DER KONTROLLEN	54
ABBILDUNG 37: ZELLVIABILITÄT MCF10A UND MCF12A (N=3): NEUTRALROT-TEST / SIGMA-ALDRICH NACH 24 h; EINFLUSS DER LÖSUNGSMITTEL.....	55
ABBILDUNG 38: GLUKOSEMESSUNG MCF10A	56
ABBILDUNG 39: GLUKOSEMESSUNG MCF12A.....	57
ABBILDUNG 40: LAKTATMESSUNG MCF10A	58
ABBILDUNG 41: LAKTATMESSUNG MCF12A.....	58
ABBILDUNG 42: PH-WERT BESTIMMUNG MCF10A	59
ABBILDUNG 43: PH-WERT BESTIMMUNG MCF12A	60
ABBILDUNG 44: THEORIE DES EINFLUSS VON FOLSÄURE (FS) -MANGEL UND -SUPPLEMENTIERUNG ABHÄNGIG DER DIGNITÄT DES BEEINFLUSSTEN GEWEBES.....	69

TABellenVERZEICHNIS

TABELLE 1: EINTEILUNG MASTOPATHISCHER VERÄNDERUNGEN IN DREI GRADE NACH PRECHTEL.	8
TABELLE 2: KONZENTRATIONEN DER VERWENDEten ZELLEN PRO VERSUCHSREIHE	26
TABELLE 3: PROTOKOLL IMMUNHISTOCHEMIE	27
TABELLE 4: KONZENTRATIONEN DER UNTERSUCHten SUBSTANZEN MIT LÖSUNGSMITTEL.....	29
TABELLE 5: PROTOKOLL HPLC	32
TABELLE 6: PROTOKOLL BrDU-TEST	33
TABELLE 7: PROTOKOLL CELL TITER-GLO® LUMINESZENZTEST	35
TABELLE 8: PROTOKOLL NEUTRALROTTEST	36
TABELLE 9: PROTOKOLL CYTOTOx-GLO™-TEST.....	37
TABELLE 10: PROTOKOLL GLUKOSE- UND LAKTATBESTIMMUNG	38
TABELLE 11: KONZENTRATIONEN WEITERER UNTERSUCHTER INHALTSSTOFFE IM EXTRAKT	45
TABELLE 12: ZELLINNENABHÄNGIGE UNTERSCHIEDE DER WIRKSAMEN EXTRAKTE	73
TABELLE 13: ÜBERSICHT VERWENDETER GERÄTE.....	105
TABELLE 14: ALLGEMEINE LABORMATERIALIEN UND REAGENZIEN	106
TABELLE 15: REAGENZIEN UND LÖSUNGEN FÜR DIE ZELLKULTIVIERUNG	106
TABELLE 16: REAGENZIEN FÜR IN-VITRO ZELLTESTS	107
TABELLE 17: REAGENZIEN FÜR IMMUNHISTOCHEMISCHEN TEST	108
TABELLE 18: ÜBERSICHT ZELLINNEN.....	108

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AF2	Aktivierungsfunktion 2
AK	Antikörper
Aqua dest.	Aqua destillada – einfach destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BgVV	Bundesministerium für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
CP	Zellproliferation
CV	Zellviabilität
CYP	Enzym der Cytochrom P450 Familie
DCIS	Duktales Carcinoma in situ
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGCG	Epigallocatechingallat
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur (European Medicines Agency)
ER	Estrogenrezeptor
ER- α	Estrogenrezeptor Alpha
ER- β	Estrogenrezeptor Beta
ERBB2	Synonym zu HER-2/neu (<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>)
F. vulgare	<i>Foeniculum vulgare</i> (Fenchel)
FS	Folsäure
GPER	<i>G protein-coupled estrogen receptor 1</i>
HCL	Chlorwasserstoff / Salzsäure
HER-2/neu	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatografie)
IgG	Immunglobulin G
KM	Komplementärmedizin
LCIS	Lobuläres Carcinoma in situ
M	Mol
MAE	<i>Microwave-Assistest-Extraction</i> = Mikrowellenextraktion

MP	<i>Mastitis puerperalis</i>
MNP	<i>Mastitis nonpuerperalis</i>
mTOR	<i>Mechanistic Target of Rapamycin</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
µl	Mikroliter
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SERMs	Selektive Estrogenrezeptormodulatoren
17β-HSD	17-Beta-Hydroxysteroiddehydrogenase
TCM	Traditionelle chinesische Medizin
TDLU	Terminale duktulo-lobuläre Einheit
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
UFK	Universitätsfrauenklinik
W	Watt

I. EINLEITUNG

Die weibliche Brust besteht im Wesentlichen aus Binde- und Fettgewebe, in welches Drüsen und das Milchgangsystem eingebettet sind⁵². Dieser Gewebeverbund unterliegt physiologischerweise starken Veränderungsprozessen, was mit einer erhöhten Vulnerabilität einhergeht¹⁰⁴. Erkrankungen der Brust sind daher ein Problem das sehr viele Frauen betrifft. Allein an Brustkrebs erkrankt in Deutschland mehr als jede achte Frau im Laufe ihres Lebens¹⁷. Gutartige Veränderungen der Brust sind jedoch wesentlich häufiger. So gibt mehr als die Hälfte der Frauen einer Umfrage zufolge relevante Brustschmerzen an, welche häufig auch mit Beeinträchtigung des Alltags und des Sexuallebens einhergehen¹⁹⁴. Um Beschwerden wie beispielsweise diese zu lindern, greifen insbesondere Frauen häufig auf komplementäre Therapieansätze zurück⁹⁶. Sie sind eine der Hauptnutzergruppen dieser immer beliebteren Therapien, wozu auch die Pflanzenheilkunde gehört²¹⁷.

1.1 MALIGNE BRUSTERKRANKUNGEN

Die unter dem Begriff Brustkrebs (Mammakarzinom) zusammengefassten, malignen Erkrankungen der Brust umfassen eine Vielzahl verschiedener Tumoren, die sich sowohl morphologisch, phänotypisch sowie bezüglich ihres malignen Potentials, teilweise deutlich unterscheiden. Einteilen lassen sie sich anhand ihres Ursprungsgewebes in duktale und lobuläre Neoplasien. Außerdem hat der Hormonrezeptorstatus für die Klassifizierung eine hohe Relevanz. Die genaue Einteilung nach WHO ist komplexer und wird regelmäßig gemäß neuer Methoden und Erkenntnissen angepasst^{17,210}.

Die bösartigen Neubildungen der Brust stellen mit einer Inzidenz von ca. 70 000 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland die häufigste weibliche Krebserkrankung dar^{185,202}. Statistisch leidet mehr als jede achte Frau im Verlauf ihres Lebens an einem Mammakarzinom¹⁷. Weltweit erkranken mehr als 1,5 Millionen Frauen pro Jahr und über 450 000 sterben jährlich daran. Trotz abnehmender Sterblichkeit nimmt die weltweite Inzidenz weiter zu^{147,185,211}. Auffällig ist eine wesentlich höhere Inzidenz des Mammakarzinoms in den USA und Nordeuropa im Vergleich zu Afrika und Asien¹⁴⁷. Einfluss auf das Erkrankungsrisiko nehmen eine Vielzahl verschiedener Faktoren wie Ernährung, Lebensstil, Schwangerschaften oder Kontrazeption¹⁷. Außerdem haben auch genetische Risikofaktoren wie die Mutation des BRCA-1-Gens einen großen Einfluss auf das Erkrankungsrisiko¹⁴⁷.

Als Hauptursache für Brustkrebs gilt derzeit ein Estrogenüberschuss als wahrscheinlich. Dieser soll zum einen über seine oxidativen Metabolite die Schädigung der DNA begünstigen, zum anderen soll die Bindung an den Estrogenrezeptoren zu einer veränderten Genexpression mit steigender Zellproliferation und verminderter Apoptose führen²²⁵.

Therapeutisch kommen neben chirurgischen und strahlentherapeutischen Verfahren auch Chemo- und Hormontherapie zum Einsatz. Diese Therapien bieten bis zum lokal rezidivierten oder lokal fortgeschrittenem Stadium immer noch eine kurative Perspektive. Das genaue Therapieverfahren hängt individuell von der Größe, Ausdehnung, Invasivität und Rezeptorstatus des Tumors sowie vom Lymphknotenbefall bzw. der Metastasierung ab. Bei Estrogenrezeptor positiven (ER+) Tumoren werden beispielsweise adjuvante endokrine Therapien wie Aromatasehemmer oder SERMs wie Tamoxifen eingesetzt¹⁷.

1.2 BENIGNE BRUSTERKRANKUNGEN

Bei der Mehrzahl der Patientinnen mit klinischer Symptomatik liegt eine benigne Erkrankung zugrunde, wohingegen bei nur 3-6 % der Patientinnen Brustkrebs diagnostiziert wird²⁰². Dennoch mangelt es an Handlungsempfehlungen für diese Erkrankungsbilder, da der Fokus der Diagnostik und Therapie von Brustbeschwerden nach wie vor auf das Mammakarzinom gerichtet ist²⁰⁵. Aufgrund der Malignität des Mammakarzinoms ist es wichtig dieses zu fokussieren. Dabei dürfen benigne Erkrankungen aber nicht vergessen werden. Denn auch diese Brustveränderungen gehen häufig mit hohem Leidensdruck einher, betreffen meist junge Frauen und begleiten diese teilweise viele Jahre²⁰⁵.

Unter den Begriff der benignen Brusterkrankung fällt eine Vielzahl verschiedener Erkrankungen, welche häufig mit Brustschmerzen (Mastodynies / Mastalgie) einhergehen, aber unterschiedliche Ursachen haben. Im Unterschied zum Mammakarzinom zeigen diese Erkrankungen meist kein, oder nur geringes Entartungsrisiko.

Grob unterteilt werden kann diese heterogene Gruppe in drei Hauptgruppen, welchen eine Vielzahl der Erkrankungen zugeordnet werden kann (Abbildung 1).

Die wichtigsten dieser, teils als knotige Strukturen auffallende Veränderungen sollen in den folgenden Kapiteln beschrieben werden.

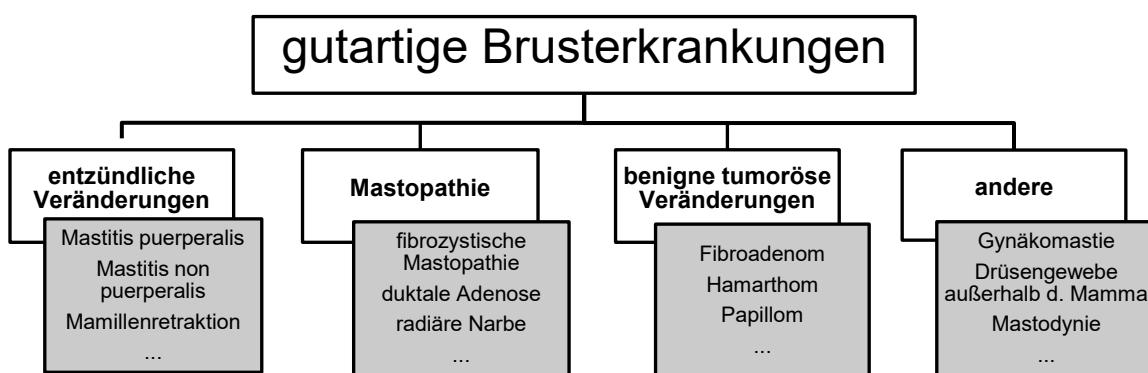


Abbildung 1: Schematische Einteilung der gutartigen Brusterkrankungen. Angelehnt an Stubert et al.²⁰⁵ erstellt.

1.2.1 MASTODYNIE

Der Brustschmerz ist keiner der Gruppen eindeutig zuzuordnen, da er teilweise in Zusammenhang mit anderen Erkrankungen auftritt, aber auch als unabhängige Erkrankung betrachtet werden kann. Aufgrund des gehäuften Vorhandenseins von fibrozystischer Mastopathie bei vorliegender Mastodynien, wird der Brustschmerz teilweise den Mastopathien zugeordnet.

Die Schmerzen der Brustdrüse können sowohl spontan, als auch bei Berührung auftreten und betreffen mehr als jede zweite Frau, wodurch viele im Alltag beeinträchtigt sind¹⁹⁴. Die Mastodynien wird in die zyklusabhängige und zyklusunabhängige Form unterteilt. Während zyklusabhängige Schmerzen meist unproblematischer sind, können zyklusunabhängige Schmerzen hinweisend für eine benigne oder maligne Erkrankung sein.

Die zyklusabhängige Form kommt mit zwei Dritteln häufiger vor und manifestiert sich um das 30. Lebensjahr, bei der zyklusunabhängigen Form dagegen liegt das mittlere Erkrankungsalter bei über 40 Jahren¹⁹⁴. Obwohl der genaue Mechanismus noch nicht geklärt werden konnte, liegt eine hormonelle Kausalität der Erkrankung nahe, da hormonelle Veränderungen wie das Erreichen der Menopause zu Besserung der zyklusabhängigen Mastodynien führen²⁰². Im Zusammenhang mit Mastodynien wird zwar häufig eine fibrozystische Mastopathie nachgewiesen, eine Kausalität kann aufgrund der hohen Prävalenz der Mastopathie aber trotzdem nicht angenommen werden²⁰⁵. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass auch die psychoaffektive Komponente bei dieser Erkrankung nicht zu vernachlässigen ist^{87,106}.

Da bei 2-7 % der Patientinnen die sich primär wegen zyklusunabhängiger Mastodynien vorstellen ein Malignom vorliegt, ist der Ausschluss eines Malignoms von besonders hoher klinischer Relevanz^{99,202}.

Für die Symptomlinderung der zyklusabhängigen Mastodynien gibt es eine Vielzahl an Möglichkeiten. Das Tragen eines gut sitzenden Büstenhalters, Analgetikatherapie, Entspannungsübungen oder regelmäßige sportliche Aktivität führen häufig schon zu einer Besserung der Symptomatik⁷⁸. Im Bereich der Phytotherapeutika gibt es durch randomisierte kontrollierte Studien belegte Therapieoptionen. Leinsamen und Mönchspfeffer über 2-3 Monate eingenommen führen zur Reduktion zyklusabhängiger Mastodynien^{144,216}. Weitere diätetische Maßnahmen wie der Verzicht auf Kaffee oder Schokolade werden häufig angeraten, sind aber wissenschaftlich häufig von geringer Evidenz. Lokal angewendet können Diclofenac-Gel sowie Schwarzkümmelöl zu einer Schmerzreduktion führen. Die systemische Therapie mit Tamoxifen 10 mg/d über 3-6 Monate sollte nur bei ausgeprägter Symptomatik oder Versagen alternativer Therapien erwogen werden, ist dann aber das Mittel der ersten Wahl. Zyklusunabhängige Mastodynien dagegen sind schwieriger zu therapieren. Mögliche Therapieoptionen sind das Unterspritzen mit einem Lidocain/Methylprednisolonacetat Gemisch, oder bei Verdacht neuropathischer Schmerzen die Gabe von Gapapentin²⁰⁵.

1.2.2 ENTZÜNDLICHE BRUSTERKRANKUNGEN

EINTEILUNG UND EPIDEMIOLOGIE

Die Entzündung der Brustdrüse im Zusammenhang mit der Laktation bezeichnet man als *Mastitis puerperalis* (MP), wohingegen die außerhalb der Laktationsphase liegenden Mastitiden als *Mastitis nonpuerperalis* (MNP) bezeichnet werden. Den entzündlichen Brusterkrankungen können auch die selteneren Krankheiten der granulomatösen Mastitis, Aktinomykosen und der Morbus Mondor zugeordnet werden²⁰⁵.

Die *M. puerperalis* tritt laut einer Studie aus 2007, innerhalb der ersten 3 Monate bei 17 % aller stillenden Mütter auf¹². Die nonpuerperale Form zeigt eine Inzidenz von 1-2 pro 10.000 Frauen und macht damit 1-2 % aller symptomatischen Brustveränderungen aus. Der Häufigkeitsgipfel liegt zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr der Betroffenen. Rund 60 % der nonpuerperalen Mastitiden sind bakterieller Genese, bei den restlichen handelt es sich um abakterielle Formen oder Sonderformen²⁰⁵.

ÄTIOLOGIE UND PATHOGENESE

Während bei der MNP meist eine bakterielle Genese zugrunde liegt, handelt es sich bei der MP auch häufig um eine abakterielle Entzündung infolge eines Milchstaus. Kommt es bei der laktierenden Mamma zu einer ungenügenden Entleerung und damit zu einem Milchstau in den Drüsenlappchen, kann dies zur Entzündung und damit zu MP führen. Bedingt wird diese durch Milchbestandteile, welche aufgrund des erhöhten Drucks in das Gewebe austreten. Verstopfungen der Milchgänge, Stillschwierigkeiten oder eine überstarke Milchproduktion sind daher häufig ursächlich. Auch das Auftreten einer bakteriellen Infizierung ist durch einen Milchstau begünstigt. Bei der MP ist in mehr als 90 % der Fälle *Staphylococcus aureus* Ursache der Infektion und wird normalerweise vom kindlichen Nasen-Rachen-Raum auf die Brustwarze übertragen^{74,205}. Bei der MNP hingegen entspricht das Keimspektrum meist der physiologischen Keimflora der Haut¹⁴⁵. Ähnlich dem Milchstau der MP ist pathophysiologisch auch bei der MNP ein Sekretstau von Bedeutung, auf dessen Boden sich die bakterielle Entzündung entwickeln kann. Die physiologisch im Sekret enthaltenen Bakterien können sich vermehren und ins Brustdrüsengewebe ausbreiten, wobei es zu Abszessbildungen und letztlich zur Ruptur mit Bildung eines infizierten Fistelgangs kommen kann. Ursächlich für den Sekretstau kann ein mechanisches Abflusshindernis wie eine vorbestehende Mammillenretraktion oder Narbenbildung nach Mamillenpiercing sein. Ist dies nicht der Fall, so stellt Nikotinabusus den Hauptrisikofaktor der MNP dar, wobei dessen genauer Mechanismus noch unklar ist²⁰⁵.

KLINIK

Klinisch zeigen Patientinnen mit Mastitiden die klassischen Entzündungszeichen, welche häufig peri/retroareolär betont sind und oft unilateral auftreten: Rötung (Rubor), Schwellung (Tumor), Überwärmung (Calor) und Schmerzen (Dolor). Bei der *M. puerperalis* ist ein weiteres Hinweiszeichen allgemeines Unwohlsein und Fieber über 38,4 °C. Bei der MNP ist meist kein Fieber nachweisbar. Mikrobiologische Diagnostik ist meist verzichtbar und nur in komplizierten Fällen zu veranlassen²⁰². Da sich häufig Rhagaden und Schrunden als Eintrittspforte bakterieller Infektionen finden, ist im Rahmen der Inspektion besonders auf Hautläsionen im Bereich der Mamille zu achten. Ein tief liegender Abszess oder eine beginnende Abszessbildung sind häufig klinisch nicht sicher abgrenzbar, weshalb bei jeder Mastitis zusätzlich eine Mammasonografie durchgeführt werden sollte. Bei nonpuerperalen Mastitiden müssen differenzialdiagnostisch insbesondere bei Patientinnen ab dem 35 Lebensjahr, bei Fehlen von Risikofaktoren (Piercing, Nikotinabusus) sowie bei Therapieresistenz, Malignome wie das inflammatorische Mammakarzinom in Betracht gezogen und abgeklärt werden²⁰⁵.

THERAPIE

Die Therapie der Mastitiden ist stark abhängig vom Ausmaß der Erkrankung. Bei Mastitiden ohne Abszedierung sind bei der MNP symptomatische Maßnahmen (Kühlen und Analgetika), sowie die antibiotische Therapie meist ausreichend. Bei der MP ist zusätzlich primär eine regelmäßige Milchentleerung der Brust sowie Wärmeapplikation unmittelbar vor dem Stillen von Bedeutung⁵⁰. In den meisten Fällen der MP ist ein sekundäres Abstillen nicht von Nöten^{104,202}. Zeigt sich klinisch oder sonographisch eine Abszessbildung, so ist immer eine interventionelle Entlastung indiziert, welche normalerweise primär durch Punktions- und Spülung erfolgt. Die sonographisch kontrollierte Punktions- und Spülung muss häufig mehrfach durchgeführt werden. Bei ausgeprägten Befunden, rezidivierenden Abszessbildungen oder frustranem Punktionsversuch ist eine operative Abszesseroöffnung indiziert²⁰⁵.

Die puerperale Mastitis kann häufig durch präventive Maßnahmen wie der richtigen Stilltechnik, Vermeidung von Milchstau und Pflege der Brustwarze vermieden werden⁵⁰.

1.2.3 MASTOPATHIE

EINTEILUNG UND EPIDEMIOLOGIE

Unter dem Begriff Mastopathie werden verschiedene pathologisch-anatomische Veränderungen des weiblichen Brustdrüsengewebes zusammengefasst. Diese sind häufig proliferierend, können sich aber auch atroph-regressiv zeigen²⁰⁵. Neben der häufigen fibrozystischen Mastopathie lassen sich die diabetische Mastopathie, duktale Adenosen und Hyperplasien sowie radiäre Narben und weitere Veränderungen dem mastopathischen Formenkreis zuordnen.

nen¹⁰⁴. Nicht alle dieser Veränderungen sollten als Krankheit, sondern teilweise mehr als Störung der Entwicklung, Reifung und Rückbildung der Brustdrüse gesehen werden, wodurch der Übergang zu Normvarianten fließend ist²⁰².

Das Vollbild der fibrozystischen Mastopathie beschreibt die Konstellation von zystischen Erweiterungen der terminalen duktulokulären Einheiten (TDLU) mit Fibrosierung des umgebenden Stomas (Abbildung 2)²⁰⁵.

Bei prämenopausalen Frauen stellt die fibrozystische Mastopathie den häufigsten Befund unter den benignen Brustveränderungen dar^{74,188}. Etwa 50 % aller Frauen jenseits des 30. Lebensjahres weisen eine fibrozystische Mastopathie auf, bei rund 20 % verursachen Makrozysten dabei Schmerzen^{188,202}. Der Altersgipfel liegt in der Perimenopause (45.- 55. Lebensjahr)⁷⁴.



Abbildung 2: fibrozystische Mastopathie:

links: typische Makroskopie mit Zysten und Fibrose

rechts: typische Histologie mit zystischen Erweiterungen und Fibrosierung

Pfeile (beispielhaft): gelb \triangleq fibrosiertes Stroma, schwarz \triangleq zystisch erweiterte Ausführergänge

Quelle: „PathoPic“¹⁶⁸.

ÄTIOLOGIE UND PATHOGENESE

Die Pathogenese der fibrozystischen Mastopathie ist bis heute noch nicht im Detail geklärt. Vermutlich spielt pathophysiologisch ein Ungleichgewicht der Sexualhormone mit Überwiegen der estrogenen Stimulation bei relativem Progesteronmangel eine wesentliche Rolle²⁰². Hinweisend dafür ist, dass Frauen mit geringerer Estrogenproduktion seltener an Mastopathien leiden sowie dass die balancierte Estrogen- und Progesteronzufuhr mittels Kontrazeptiva zu geringerer Inzidenz fibrozystischer Veränderungen führt^{104,162}. Im Rahmen eines hormonellen Ungleichgewichtes kann es zu Veränderungen kommen, welche die zystische Erweiterung der TDLU begünstigen. Durch gesteigerte sekretorische Aktivität oder einer Hyperplasie der Epithelien mit Verlegung der großen und kleinen Gänge kommt es zu einer Stauung des Sekrets und zu Dilatation der TDLU. Auch Flüssigkeitseinstrom infolge eines erhöhten kolloidosmotischen Drucks der Zystenflüssigkeit, sowie übermäßige Sekretion aus apokrin-metaplastischen Epithelien werden als Ursache diskutiert^{135,205}.

KLINIK UND KLASIFIKATION

Klinisch imponiert die fibrozystische Mastopathie in der Regel durch schmerzhafte, teils auch schmerzlose palpable Brustverdichtungen mit homogener und teils inhomogener Konsistenzveränderung¹⁰⁴. Die Zysten sind meist beidseits vorhanden und sind teils mit einer prämenschwangeren Größenzunahme verbunden und gehen häufig mit einem Spannungsgefühl und vermehrter Schmerzempfindlichkeit der Brust einher^{55,110}. Sie werden als Tastbefund, als Zufallsbefund im Rahmen von bildgebenden Untersuchungen, oder histologisch durch Biopsien detektiert²⁰². Andere Erkrankungen des mastopathischen Formenkreises wie die einfache duktale Hyperplasie können auch klinisch-bildgebend asymptomatisch sein. Rupturiert eine Zyste kann dies mit plötzlich eintretenden, heftigen Schmerzen einhergehen. Tastbefunde sollten spätestens ab einem Alter von 35 Jahren bildgebend durch Mammasonografie und ggf. durch Mammografie abgeklärt werden²⁰⁵. Das mammografische Erscheinungsbild mastopathischer Läsionen ist vielfältig und umfasst Herdbefunde, fokale Verdichtungen sowie Mikroverkalkungen. Diagnoseweisend für die fibrozystische Mastopathie ist die Sonografie von Zysten, die als glatt begrenzte, echoarme bis -leere, runde bis ovale Herdbefunde mit variabler Größe imponieren²⁰². Von einfachen Zysten abzugrenzen sind komplexe Zysten, die ein Malignomrisiko von bis zu 30 % haben und daher immer abgeklärt werden müssen¹⁵. Weitere biopsische-histologische Abklärungen sollten nur erfolgen, wenn klinisch-bildgebend eine Zuordnung des Befundes als benigne nicht sicher möglich ist¹⁰⁴. Differenzialdiagnostisch ist neben Malignomen auch an inflammatorische Prozesse zu denken.

Hinsichtlich des Brustkrebsrisikos wird bei Mastopathien zwischen proliferierenden und nicht proliferierenden Veränderungen unterschieden. Darüber hinaus sind atypische Zellveränderungen abzugrenzen. Anhand dieser Kriterien erfolgt die Einteilung in drei Grade nach Prechtel (Tabelle 1).

Einfache mikro- und makrozystische Veränderungen (Grad I) sind nicht mit erhöhtem Brustkrebsrisiko assoziiert und benötigen daher keine besondere Überwachung. Das geringgradig erhöhte Risiko für Malignome bei proliferierenden Veränderungen ohne Atypien (Grad II), ist bisher nicht sicher geklärt. Ein kausaler Zusammenhang wird vermutet, ist aber noch nicht sicher geklärt. Das fast bis zu 4-fach erhöhte relative Risiko für Mammakarzinome bei proliferierenden Veränderungen mit Atypien (Grad III) ist von besonderer Bedeutung und wirkt sich auf die Therapie aus²⁰⁵.

Tabelle 1: Einteilung mastopathischer Veränderungen in drei Grade nach Prechtel und damit assoziiertes Risiko für die Entwicklung von Brustkrebs, * relatives Risiko für zukünftige Entwicklung von Brustkrebs im Vergleich zur Normalpopulation,[95% Konfidenzintervall], modifiziert nach Stachs et al.²⁰⁵ und Janni¹⁰⁴

Grad	Läsionstyp	Häufigkeit	histopathologische Diagnose	Rel. Risiko für Entwicklung von Brustkrebs *
I	Nicht proliferierend	70%	<ul style="list-style-type: none"> Einfache Zysten Papilläre apokrine Metaplasie 	1,17 [0,94 – 1,47]
II	Proliferierend ohne Atypien	20 %	<ul style="list-style-type: none"> Einfache Hyperplasie sklerosierende Adenose Radiäre Narben 	1,76 [1,58 – 1,95]
III	Proliferierend mit Atypien	10 %	<ul style="list-style-type: none"> Flache epitheliale Atypie Atyp. Duktale Hyperplasie Atyp. Lobuläre Hyperplasie 	3,93 [3,24 – 4,76]

THERAPIE

Da mastopathische Veränderungen nicht immer als Erkrankungen zu sehen sind, sondern teilweise auch als Veränderungen in Folge zyklischer und altersbedingter hormoneller Dysbalancen, wird generell die Therapie eher konservativ gehalten^{104,205}. Zysten zeigen häufig eine spontane Rückbildungstendenz, weshalb nur im Falle von Makrozysten, die mit Schmerzen verbunden sind, eine Aspirationspunktion in Erwägung gezogen werden sollte^{135,205}. Eine Untersuchung dieses Punktats ist nicht zwingend erforderlich, sollte aber aufgrund häufiger Verunsicherung großzügig durchgeführt werden. Größere rezidivierende Zysten können mittels sonographisch gestützter Vakuumbiopsie entfernt werden. Komplexe Zysten müssen mittels Stanzbiopsie oder operativer Entfernung histologisch gesichert werden. Bei histologischer Diagnose von Atypien ist immer die offene Exstirpation des Befundes zu veranlassen. Da kleine radiäre Narben meist mittels Biopsie vollständig entfernt werden können, muss in diesem Fall nicht zwangsläufig operiert werden²⁰⁵.

Da auch harmlose Mastopathien teilweise mit Schmerzen und Leidensdruck einhergehen, möchten viele Patientinnen Therapieoptionen wahrnehmen. Hierfür infrage kommen vor allem die unter 1.2.1 beschriebenen Therapien wie physikalische Maßnahmen oder Phytoestrogene zur Linderung der Mastodynies. Im Vordergrund steht aber vor allem der Ausschluss von malignen Veränderungen. Erst bei hohem subjektivem Leidensdruck werden gestagenhaltige Präparate, lokales Progesteron-Gel oder selten auch Danazol und Tamoxifen oder Prolaktinhemmer eingesetzt^{52,104}.

1.2.4 BENIGNE TUMORÖSE VERÄNDERUNGEN

Zur Gruppe der benignen tumorösen Veränderungen gehören Fibroadenome, Adenome, Lipome, Phylloidtumore und weitere seltene benigne Tumore wie Angiome oder mesenchymale Tumore. Diese Veränderungen fallen häufig durch derbe veränderte, tastbare Strukturen auf. Das Fibroadenom ist mit einer Prävalenz von rund 25 % die häufigste Ursache benigner Brustknoten, mit einem Altersgipfel von 15-35 Jahren insbesondere bei jungen Frauen¹⁸⁸. Die Ätiologie der Fibroadenome ist unklar, ein hormoneller Einfluss gilt aber als sehr wahrscheinlich¹⁸⁸. Klinisch imponieren sie als meist bis zu 3 cm große, derbe Tastbefunde. Häufig werden asymptomatische Fibroadenome im Mammografie-Screening als Zufallsbefund entdeckt, wo sie durch ihre typische popcornartige Verkalkungen auffallen²⁰². Das therapeutische Vorgehen ist abhängig von Alter, Symptomatik, klinischem Befund und bildgebender Diagnostik. Asymptomatische Fibroadenome benötigen in der Regel keine weiter Therapie^{202,205}. Eine Exzision ist nur bei Beschwerden, unklaren Befunden oder auf Wunsch der Patientin erforderlich⁷⁴. Eine Sonderform des Fibroadenoms (ca. 3 %) stellt der Phylloidtumor dar, der durch überschießendes Wachstum der Stromazellen gekennzeichnet ist und aufgrund des erhöhten Metastasierungspotentials und sehr hoher Rezidivneigung immer mit einem Sicherheitssaum entfernt werden sollte^{74,202}.

Papillome sind mit 5-10 % die Ursache benigner Neubildungen²⁰². Man unterteilt sie in zentral gelegenen, solitäre intraduktale Papillome, sowie die meist peripher gelegenen multiple Milchgangpapillome (auch Papillomatose). Sie fallen klinisch meist durch spontane seröse oder blutige Mamillensekretion, seltener durch Tastbefunde oder in der Mammographie, auf. Obwohl Papillome per se gutartige Neubildungen sind, werden sie auch als Risikoläsionen bezeichnet, da sie mit einem erhöhten Malignomrisiko assoziiert werden. Besteht der Verdacht auf ein Papillom, so sollte dieser durch Biopsie histologisch gesichert werden. Werden kleine Papillome (< 2 mm) ohne Atypien durch Biopsie vollständig entfernt, benötigen diese keine weitere Therapie. Bei gleichem Szenario, aber größeren Läsionen ist zusätzlich die Übereinstimmung von Pathologie und Bildgebung zweifelsfrei zu belegen. Unvollständig entfernte Papillome ohne Atypien sollten vollständig exzidiert werden. Dies gilt in jedem Fall auch für papilläre Läsionen mit Atypien²⁰⁵.

1.3 ESTROGENREZEPTOREN

Endogene Estrogene haben auf den menschlichen Organismus eine Vielzahl verschiedener Effekte, welche vor allem durch Estrogenrezeptoren (ER) vermittelt werden. Auf die mamären Drüsenepithelzellen wirken Estrogene wachstumsfördernd und sorgen für Zelldifferenzierung. Da Estrogene auch für Tumoren einen besonderen Wachstumsreiz darstellen können, ist die Inhibierung der Estrogenwirkung bei ER+ Zellen therapeutisch von großer Bedeutung. Estrogenrezeptoren kommen in zwei unterschiedlichen Formen vor: ER α und ER β .

Diese liegen in Abwesenheit eines Liganden vornehmlich im Zytosol, an Proteine gebunden vor. Den beiden ER Formen werden gegensätzliche Wirkungen zugeschrieben. Während ER α die Zellteilung fördert, kann über Aktivierung des ER β die Proliferation beeinträchtigt werden²¹⁹. Die Bindung von Agonisten (z.B. Estradiol) an den Rezeptor sorgt für die Dissoziation der Proteine, wodurch der Rezeptor in den Nucleus gelangen und als Dimer via Estrogen-Response-Element an die DNA binden kann. Dadurch kann die Transkription spezifischer Zielgene aktiviert werden. Neben der direkten Bindung an die DNA gibt es auch andere Möglichkeiten, die Transkription zu beeinflussen, wie beispielsweise das Binden an andere Transkriptionsfaktoren. Es gibt auch Hinweise darauf, wonach ER teilweise auch ligandenunabhängig durch Phosphorylierung aktiviert werden können⁶⁸.

Zusätzlich zu den klassischen ER können auch andere Rezeptoren, wie der G-Protein gekoppelte Estrogenrezeptor (GPER) für schnelle Estrogenwirkungen verantwortlich sein¹⁹¹.

1.4 KOMPLEMENTÄRER THERAPIEANSATZ

Der Begriff der Komplementärmedizin (KM) hat sich in den vergangenen Jahren zur Unterscheidung von der sogenannten „Schulmedizin“ zunehmend etabliert, wobei es keine allseits anerkannte Definition gibt. Häufig wird (fälschlicherweise) als Synonym der Begriff „Alternativmedizin“ verwendet. Die KM im allgemeinen Verständnis grenzt sich von der Alternativmedizin allerdings dadurch ab, dass sie nicht den Anspruch hat, „schulmedizinische“ Verfahren zu ersetzen^{17,217}. Vielmehr steht in komplementären Verfahren häufig das gemeinsame Wirken mit der Schulmedizin sowie die Linderung von Nebenwirkungen, Stress oder Ängsten im Vordergrund. Die KM ist dabei sehr facettenreich und umfasst Gebiete wie zum Beispiel der Phyto-, Hydro-, Bewegungstherapie, physikalischen Therapie oder die TCM⁷². Werden komplementäre Methoden zur Unterstützung evidenzbasierter Tumortherapie eingesetzt, so wird das auch als „integrative Onkologie“ bezeichnet^{17,72}.

Die Nutzung komplementärer Therapieansätze erfährt in den letzten Jahren zunehmend an Beliebtheit²¹⁷. Insbesondere bei Patienten mit Tumorerkrankungen ist das Interesse an komplementären Therapien besonders hoch. So nutzt im Durchschnitt jeder zweite Tumorpatient im Verlaufe der Erkrankung und Therapie oder nach Abschluss der Therapie mindestens eine dieser Methoden. Besonders häufig werden diese Therapien von Mammakarzinopatientinnen genutzt, wo Nutzerraten von bis zu 90 % angegeben werden^{17,88,97}. Die typische Nutzengruppe ist weiblich, eher jung und hat einen hohen Bildungsstand⁹⁶. Es wird also deutlich, dass insbesondere bei onkologischen, gynäkologischen und vor allem bei Brusterkrankungen komplementäre Therapien gefragt sind und häufig genutzt werden. Der zunehmende Einzug komplementärer Therapien in Leitlinien sowie eine eigens auf KM ausgerichtete S3-Leitlinie unterstreichen die Aktualität der Thematik und zeigt, dass es für, in diesem Bereich tätige Ärzte wichtig ist, mit der Thematik vertraut zu sein^{17,123}.

Obwohl komplementäre Therapien von Patienten häufig als hilfreich empfunden werden, bergen sie auch Risiken. Insbesondere Nahrungsergänzungsmittel und Phytotherapeutika können mit anderen Arzneimitteln wechselwirken und so deren Wirksamkeit negativ beeinflussen. Außerdem besteht das Risiko, dass Patienten der Wirksamkeit der komplementären Methoden zu viel Vertrauen schenken und dadurch die konventionelle Therapie vernachlässigen^{17,217}. In der S3-Leitline des Mammakarzinoms wird daher empfohlen, alle Patientinnen nach komplementären/alternativen Therapien zu befragen und bei Anwendung auf mögliche Risiken und ggf. Interaktionen mit Standardtherapien hinzuweisen¹⁷.

1.5 FOENICULUM VULGARE (FENCHEL)

Der Fenchel (*Foeniculum vulgare*) ist eine weltweit verbreitete Gemüse-, Gewürz- und Heilpflanze, welche wie zum Beispiel Anis, Dill und Petersilie zur Familie der Doldenblütengewächse (Apiceae) gehört⁷¹. Es handelt sich dabei um eine zwei- bis mehrjährige, krautige Pflanze mit hohlen Stängeln, gefiederten Blättern und einer Wuchshöhe von bis zu 2,5 m¹⁸². Die kleinen gelben Blüten finden sich in endständigen, flachen Blütendoldchen, welche bis zu 20 Blüten tragen. Die Früchte des Fenchels sind die 4-10 mm langen, trockenen, aromatischen Samen^{19,182}.



Abbildung 3: a: schematische Zeichnung einer Fenchelpflanze mit Blüten, Samen und Knolle. ⁹⁴

b: handelsüblicher frischer Fenchel, welcher für die vorliegende Arbeit verarbeitet wurde.

Foeniculum vulgare kann anhand der Wuchsform sowie des Geschmacks der Samen in mehrere Untergruppen unterteilt werden, wobei die Unterteilung in der Literatur nicht immer einheitlich ist. Die gängigste Einteilung unterscheidet zwei Unterarten, wovon eine wiederum in drei Varianten unterteilt werden kann. So ergeben sich die ausschließlich wild wachsende Unterart *piperitum* (*F. vulgare* ssp. *piperitum*), auch Pfefferfenchel genannt, sowie die kultivierte

Unterart *vulgare* (*F. vulgare* ssp. *vulgare*), auch Gartenfenchel genannt¹⁴⁹. Beim Gartenfenchel unterscheidet man den Bitterfenchel (*var. vulgare*) mit bitter schmeckenden Samen, den süßen Fenchel (*var. dulce*) mit süßen Samen sowie den Zwiebelfenchel (*var. azoricum*), dessen Blattscheiden am Stängel verdickt sind^{149,227}. Der in Deutschland als Gemüse handelsübliche und in dieser Arbeit verwendete Fenchel entspricht dem Zwiebelfenchel (*F. vulgare* ssp. *vulgare* var. *azoricum*).

Die Fenchelpflanze stammt ursprünglich aus dem südlichen Mittelmeerraum, wird inzwischen aber weltweit angebaut und wächst insbesondere in der Nähe der Küsten auch wild^{19,182}. Alle Teile der Pflanze, wie Samen, Blätter, Knollen, aber auch Blüten und Stiele können verzehrt werden¹²⁵. So findet die Pflanze und das aus den Samen extrahierte Öl beispielsweise Verwendung als Gemüse, in Fischgerichten, Backwaren, alkoholischen Getränken und vielen weiteren Nahrungsmitteln⁵¹. Auch der meist aus den Samen bestehende Fencheltee hat eine weite Verbreitung.

Fenchel war schon in der Antike eine beliebte und vielfach gehandelte Pflanze, weshalb sie sich schnell vom Mittelmeerraum auf ganz Europa und Asien verbreitete^{19,149}. Aufgrund des aromatischen Geschmacks war Fenchel ein gerne verzehrtes Lebensmittel und Gewürz, sowohl in der asiatischen, als auch der europäischen Küche. Doch die eigentliche Beliebtheit röhrt nicht nur aufgrund des Geschmacks, sondern vielmehr den schon damals bekannten, vielseitigen Wirkungen des Fenchels. So war zum Beispiel wohl mit als erstes bekannt, dass weibliche Weidetiere, welche Fenchel gefressen hatten, mehr Milch gaben⁸.

Vor allem aber als medizinische Heilpflanze war der Fenchel jahrtausendelang wichtig und sowohl Ägyptern, Römern und Indern sowie auch in der traditionellen chinesischen Medizin bekannt^{19,83}. Dort war die Pflanze vor allem wegen ihrer diversen Wirkungen sehr beliebt. Sie wurde schon früher für analgetische, antiinflammatorische, diuretische, krampflösende, galaktogene Zwecke, bei Verdauungsbeschwerden sowie bei vielen weiteren Beschwerden genutzt^{6,83,98,114}. Doch nicht nur historisch, sondern auch heutzutage bleibt Fenchel eine der wichtigsten und am häufigsten genutzten Heilpflanzen^{19,114}.

Inzwischen wurde *F. vulgare* in vielen Studien untersucht und es sind viele Inhaltsstoffe sowie Wirkungen bekannt. Die Zusammensetzung der Inhaltsstoffe hängt davon ab, welcher Teil der Pflanze untersucht wird sowie vom Erntezeitpunkt, der genauen Fenchelsorte und von Umweltbedingungen^{4,116}. Neben den Hauptbestandteilen Wasser (ca. 75 %) und Kohlenhydraten (ca. 20 %), ist *F. vulgare* besonders reich an Vitaminen und Mineralien und enthält mehr als 20 Fettsäuren²³. Die Fenchelknolle enthält ähnlich viel Vitamin C und ein vielfaches an Kalium und Calcium, wie ein durchschnittlicher Apfel (pro 100g)^{64,132}. Besonders die sekundären

Pflanzenstoffe (1.6) machen den Fenchel als Heilpflanze beliebt. Sie kommen vor allem in den ätherischen Ölen vor, welche auch für den aromatischen Duft verantwortlich sind. Dort finden sich diverse Fettsäuren, flüchtige-, phenolische Komponenten wie Flavonoide und viele weitere bioaktive Substanzen, denen bereits verschiedenste pharmakologische Effekte zugeschrieben werden konnten. In den Übersichtsarbeiten von Kooti *et al.*¹¹⁴ und Badgujar *et al.*¹⁹ werden viele pharmakologische Eigenschaften von *F. vulgare* beschrieben (Abbildung 4).

Wirkungen von *F. vulgare*



Abbildung 4: Auswahl an untersuchten und in der Literatur beschriebenen pharmakologischen Wirkungen von *Foeniculum vulgare*^{19,114}.

Fenchel besitzt antibakterielle und antifungale Eigenschaften. Gegenüber diversen Bakterien wie *Escherichia coli*, Listerien, *Staphylokokkus aureus* sowie gegen *Helicobacter pylori* und *Campylobacter jejuni* zeigte Fenchelextrakt eine sehr starke antibakterielle Aktivität^{45,131}. Kaur *et al.* beschreiben für einige Erreger sogar eine stärkere Wirkung ihres Pflanzenextraktes als das jeweilige Standardantibiotikum¹¹¹. Auch das Wachstum von Pilzen wie *Candida albicans*, Dermatophyten und Aspergillusarten konnte mittels Fenchelextrakt gehemmt werden^{163,181}.

F. vulgare kann aufgrund seines hohen Gehalts an Polyphenolen und Flavonoiden freie Radikale inaktivieren und hat dadurch ausgezeichnete antioxidative Eigenschaften¹¹⁴. Diese Fähigkeiten werden mit einer Hinderung der Krebsentstehung, der Alterung und weiteren positiven Effekten assoziiert¹³².

Zudem weist Fenchelextrakt antiinflammatorische Aktivität auf. Im Mausmodel konnte gezeigt werden, dass Fenchel sowohl auf akute als auch subakute Entzündungen inhibitorische Effekte hat^{41,114}. Choi *et al.* erklären dies anhand des Einflusses von Fenchel auf Cyclooxygenase- und Lipoxygenase Signalwege⁴¹.

Schon seit Jahrhunderten ist bekannt, dass Fenchel bei Kindern mit Bauchschmerzen helfen soll. Alexandrovich *et al.* konnten diese Annahme in einer randomisierten kontrollierten Studie

signifikant belegen⁹. Auch laxative und verdauungsfördernde Wirkungen sowie protektive Effekt auf Magenulcera konnte gezeigt werden^{26,132}.

Die Estrogenwirkung von Fenchel beruht auf Phytoestrogenen, vor allem auf dem in den ätherischen Ölen enthaltenen Anethol sowie diesem ähnlichen Verbindungen⁸. So wird berichtet, dass Fenchel laktationssteigernd, menstruationsfördernd, geburtserleichternd und libidosteigernd sei sowie gegen klimakterische Beschwerden helfe. Die estrogene Aktivität konnte in zahlreichen Studien belegt werden. Beispielsweise zeigten Namavar *et al.*¹⁵² die positive Wirkung auf Dysmenorrhöe und Mallni *et al.*¹³³, sowie Pourjafari *et al.*¹⁷⁴ die fördernde Wirkung auf das Wachstum weiblicher Genitalorgane.

Neben den oben genannten Wirkungen werden auch diverse antikarzinogene Eigenschaften von Fenchel beschrieben. Verantwortlich für diese Eigenschaften ist wohl vor allem der inhibitorische Effekt auf den Transkriptionsfaktor NfKB, welcher vor allem durch die im Fenchel enthaltenen Anethole bewirkt wird^{38,42}.

Bogucka-Kocka *et al.*²⁷ zeigten einen zytotoxischen Effekt auf Leukämiezellen. Singh und Kale²⁰⁰ konnten eine signifikante Inzidenzreduktion von Haut- und Magentumoren an Mäusen belegen. In einer in-vitro Studie konnte die zytotoxische Wirkung von Fenchelextrakt auf Leberkrebszellen gezeigt werden. Auch für Brustkrebs gibt es Studien, die das tumorhemmende Potential von *F. vulgare* darstellen^{132,146,148}. In der Studie von Batool *et al.* zeigt Fenchelextrakt eine dosisabhängige Proliferationshemmung auf die estrogenrezeptorpositive Mammakarzinomzellreihe MCF-7²⁴.

Im Gegensatz zu diesen gesundheitsfördernden Wirkungen von Fenchel stehen Warnungen der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA), und des Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) vor übermäßigem Verzehr von Fenchel aufgrund des darin enthaltenen Estragols^{35,62} (1.6.1.1).

1.6 SEKUNDÄRE PFLANZENSTOFFE

Da den sekundären Pflanzenstoffen eine Vielzahl an Wirkungen zugesprochen werden und diese auch für die Fenchelwirkung wichtig sind, werden diese hier zusammenfassend dargestellt und auf einige im Fenchel enthaltenen Stoffe näher eingegangen.

Unter sekundären Pflanzenstoffen versteht man Metabolite, welche nicht am Grundstoffwechsel beteiligt sind und damit nicht für die Aufrechterhaltung des Lebens und der Fortpflanzung der Pflanze benötigt werden. Vielmehr verschaffen ihr diese sehr diversen, bioaktiven Substanzen einen Umweltvorteil. So handelt es sich zum Beispiel um Farb- und Aromastoffe, die Insekten anlocken, sowie um bittere und toxische Verbindungen, die Fressfeinde fernhalten,

oder um Metabolite, die die Pflanze vor Umwelteinflüssen wie übermäßiger UV-Strahlung schützen⁵³. Ihnen gegenüber stehen die primären Pflanzeninhaltsstoffe, d.h. Kohlenhydrate, Proteine und Fette. Der sekundäre Pflanzenstoffwechsel ist allerdings kein komplett vom Primärstoffwechsel unabhängiger Prozess, sondern eng mit diesem verflochten. Häufig werden Zwischenprodukte für die Bildung der sekundären Pflanzenstoffe weiterverwendet.⁸² Anhand ihrer chemischen Struktur und funktionellen Eigenschaften werden sie in Gruppen wie z.B. Polyphenole, Carotinoide, Phytoestrogene, Phytosterine oder Lektine eingeteilt, wobei nicht alle Stoffe einer Gruppe zugeordnet werden können⁴⁹.

Durch gemischt Kost werden täglich schätzungsweise ca. 1,5 g der Metabolite aufgenommen, wobei durch eine vegetarische Ernährung häufig wesentlich höhere Werte erreicht werden¹²⁴. Die sekundären Pflanzenstoffe variieren zwischen den verschiedenen Pflanzenarten sehr stark und sind daher häufig auch für die unterschiedlichen Wirkungen von Pflanzen verantwortlich. Dazu liegen inzwischen diverse Publikationen vor, welche die Wirkungen der Sekundärmetabolite auf Zellen und den menschlichen Organismus untersucht haben. Dabei konnten unterschiedlichste gesundheitsförderliche Effekte nachgewiesen werden. So reichen die Wirkungen beispielsweise von antioxidativen und entzündungshemmenden Effekten, über blutdrucksenkenden, bis zu immunmodulatorischen und antikarzinogenen Effekten⁴⁹. Trotz vieler Publikationen bleibt noch Raum für Forschung, da bisher nur etwa 5 % der Pflanzen der Erde auf sekundäre Pflanzenstoffe untersucht wurden¹²⁴.

1.6.1 PHYTOESTROGENE

Unter dem Begriff der Phytoestrogene werden sekundäre Pflanzenstoffe zusammengefasst, die durch Strukturähnlichkeiten zum körpereigenen Estrogen gekennzeichnet sind. Aufgrund dieser Ähnlichkeit können sie auch an Estrogenrezeptoren binden und haben daher estrogene Wirkungen¹⁵¹. Da Phytoestrogene aber mit geringerer Affinität an den Rezeptor binden, sind für die Wirkung wesentlich höhere Konzentrationen als vom endogenen Estrogen notwendig¹¹⁸. Um an die Rezeptoren binden zu können, müssen sie allerdings im Magen-Darm-Trakt metabolisiert werden^{119,173}. Die Konzentration an aktiven Phytoestrogenen im Blut hängt somit auch von der individuellen Darmflora ab. Zu den Phytoestrogenen gehören die Isoflavonoide (1.6.2), die Lignane und die Coumestane. Neben Obst, Gemüse und Samen kommen Isoflavonoide vor allem in Sojaproducten vor, Lignane in vielen Getreidesorten und Coumestane auch in Sojasprossen¹⁵¹. Aufgrund ihrer hormonellen Wirkung haben Phytoestrogene großen Einfluss auf den Körper. So werden sie beispielsweise bei klimakterischen Beschwerden, gegen postmenopausale Osteoporose sowie zur Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen eingesetzt^{169,222}. Auch die Wirkung auf Brustkrebspatientinnen wird häufig proklamiert, bleibt allerdings umstritten^{143,151,222}.

1.6.1.1 ESTRAGOL

Estragol ist ein flüchtiges Phenylpropanoid, das als Bestandteil ätherischer Öle in einer Vielzahl von Pflanzen vorkommt. Beispielsweise in Estragon, Basilikum, Anis, Fenchel und Muskatnuss, wobei im europäischen Gebrauch Anis und Fenchel hinsichtlich des Estragolkonsums am relevantesten sind⁶². Neben den natürlichen Vorkommen in Pflanzen findet Estragol Verwendung als Duftstoff und Aroma in Parfüms, Likören und Lebensmitteln⁷⁶. Da Studien gezeigt haben, dass isoliertes Estragol eine kanzerogene Wirkung auf Ratten und Mäuse sowie in-vitro Zellkulturen hat, wird der Konsum von Estragol sehr kritisch gesehen^{33,56}. Die Europäische Arzneimittel-Agentur (EMA) und das Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) warnen vor übermäßigem Verzehr von Estragol, sowie Pflanzen, die dieses enthalten. Die EMA kam aufgrund toxikologischer Daten zu dem Entschluss, dass Estragol ein natürlich vorkommendes Karzinogen ist⁶². Estragol selbst ist zwar nicht karzinogen, es wird aber in der Leber metabolisiert, wobei unter anderem reaktive Metabolite gebildet werden¹⁶⁵. Paini et. al.¹⁶⁵ beschrieben für diesen in-vivo Prozess mehrere Metabolisierungswege für Estragol. Darunter auch die Möglichkeit zur Hydroxylierung und anschließender Sulfonierung zu 1'-Sulfoxyestragol. Dieser reaktive Metabolit kann an DNA, RNA und teilweise auch an Proteine binden und so genotoxische und kanzerogene Produkte zur Folge haben^{36,165}. Daher empfiehlt die EMA nach wie vor den täglichen Estragolkonsum von Erwachsenen auf 0,05 mg pro Tag einzuschränken. Für Kinder wird empfohlen, den Wert von 0,001 mg / kg Körpergewicht nicht zu überschreiten⁶². Bei einem täglichen Konsum von 0,05 mg isoliertem Estragol liegt das Lebenszeitrisiko dadurch an Krebs zu erkranken, für eine 50 kg schwere Person bei 1 : 100 000^{43,62}.

Gori et al. kommen zu dem Schluss, dass oben beschriebener karzinogener Effekt stark dosisabhängig sei und insbesondere bei geringer Estragolexposition kaum Bedeutung habe. Bei Paini et al.¹⁶⁵ traten erst bei Expositionen von mehr als 30 mg Estragol pro kg Körpergewicht, was einem Vielfachen des normalen Konsums entspricht, deutliche DNA Veränderungen auf. Gori et al.⁷⁶ beschrieben, dass Estragol als isolierte Substanz zwar karzinogen sein kann, als komplexes phytochemisches Gemisch, aber wohl eine wesentlich reduzierte, oder sogar aufgehoben kanzerogene Wirkung hat. Sie führen als Beispiel dafür an, dass Stoffe, die in anderen Studien die Bildung von 1'-Sulfoxyestragol hemmten, auch in Fencholextrakten vorhanden sind.

1.6.2 FLAVONOIDE

Die Flavonoide sind innerhalb der sekundären Pflanzenstoffe der Gruppe der Polyphenole zuordnen. Flavonoide kennzeichnen sich durch zwei aromatische Ringe, die über eine C3-Brücke verbunden sind (Abbildung 5).

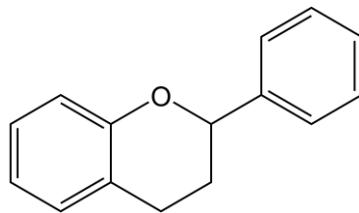


Abbildung 5: Grundstruktur der Flavonoide (Flavan), nach Liu¹²⁶.

Anhand der Unterschiede der C3-Brücke werden die Flavonoide in mehrere Untergruppen unterteilt, welchen die einzelnen Stoffe zugeordnet werden können (Abbildung 6). Flavonoide kommen in allen höheren Pflanzen vor, fehlen allerdings bei Bakterien, Algen, Pilzen und im Tierreich⁸². Die mehr als 8000 verschiedenen Flavonoide erfüllen in Pflanzen eine Vielzahl von Funktionen. Unter anderem sind sie die wichtigste Gruppe unter den Blütenfarbstoffen, schützen die Pflanzen vor UV Licht und wirken antimikrobiell¹²⁶. Ihnen werden besonders viele gesundheitsfördernde Wirkungen auf den Menschen zugeschrieben. Neben Obst- und Gemüsesorten wie Zwiebeln, Brokkoli und Orangen sind Flavonoide in Doldenblütlern wie Fenchel besonders reichlich vorhanden^{19,166}.

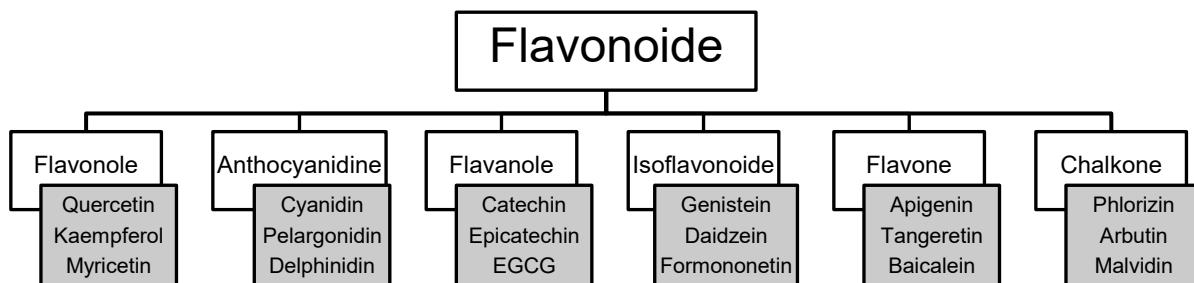


Abbildung 6: Übersicht der Flavonoide mit Untergruppen und deren Derivaten, modifiziert nach Panche *et al.*¹⁶⁶.

1.6.2.1 RUTIN

Das Flavonoid Rutin oder auch Quercetin-3-O-rutinosid ist ein Derivat des Flavonols Quercetin. Es unterscheidet sich von diesem durch Bindung des Disaccharides Rutinose (Glukose-Rhamnose) an der Grundstruktur des Quercetins³. Diese Grundstruktur besteht aus zwei aromatischen Ringen, die über einen heterozyklischen Kohlenstoffring in Verbindung stehen (Abbildung 7).

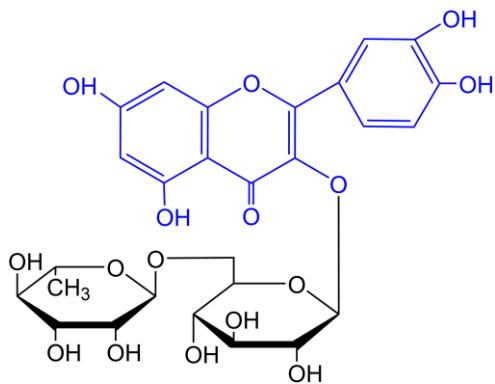


Abbildung 7: chemische Struktur von Rutin (Quercetin-3-O-rutinosid), blau \triangleq Quercetin-Grundstruktur, schwarz \triangleq Rutinose (Disaccharid), nach Hosseinzadeh et al.⁸⁹.

Rutin konnte in einer Vielzahl von Pflanzen nachgewiesen werden. Neben Fenchel kommt es in Zwiebeln, Buchweizen, grünem Tee, Kirschen, Aprikosen und vielen weiteren Früchten vor^{167,175}. Viele der unter 1.5 beschriebenen Effekte von Fenchel können auch Rutin zugeordnet werden. So werden viele gesundheitsfördernde Wirkmechanismen von Rutin und seinen Derivaten beschrieben^{7,69,175}. In-vitro und in-vivo Forschungen zeigen eine Vielzahl an Eigenschaften zur antioxidativen Wirkung. Es fördert Enzyme wie die Superoxiddismutase, hemmt die Lipidperoxidation, fängt freie Radikale ab und verhindert mitochondriale Schäden^{18,70,175,226}. Kardioprotektiv wirkt Rutin, indem es die Arteriosklerose fördernde Blutlipide, sowie auch den Blutdruck senken kann^{160,175}.

Rutin und sein Derivat Quercetin unterlagen bereits vielen Studien, in welchen zytotoxische und antiproliferative Wirkungen auf eine Vielzahl verschiedener Tumorzelllinien gezeigt werden konnten¹⁷⁵. Chen et al.⁴⁰ beschrieben, dass Rutin auf Krebszellen apoptotisch wirkt sowie zu einem Zellzyklusarrest in der G2/M Phase führt, wodurch die Zellen strahlensensibler werden. In der Brustkrebszelllinie MCF 7 konnte für Quercetin durch Inhibierung von Proteasomen und der mTOR-Kaskade eine Induktion der Apoptose und Autophagolyse nachgewiesen werden¹¹³. Auch auf die Chemotherapie von Krebserkrankungen hat Rutin einen positiven Einfluss. Bei einer kombinierten Gabe von Chemotherapeutika und Rutin konnte ein stärkerer Effekt beobachtet werden als bei Einzelgabe. Der vermutete Mechanismus dabei ist, dass Rutin das P-Glykoprotein hemmt, wodurch es zu einem geringeren Efflux des Chemotherapeutikums aus der Zelle kommt und dieses dadurch stärker wirken kann¹⁰⁰.

Rutin zeigt eine geringe Bioverfügbarkeit, da es selbst vom Darm wenig resorbiert wird, weil es vorher von der Darmflora in eine Vielzahl an Komponenten zerlegt wird. Vor allem im Kolon wird es zu seinem Aglykon Quercetin und dem Zuckerrest hydrolysiert, welche dann gut resorbiert werden können^{117,161}.

1.7 FOLSÄURE

Folsäure (FS) ist ein wasserlösliches Vitamin aus der B-Vitamin-Gruppe und wird auch als Vitamin B9 bezeichnet. Es ist aufgebaut aus einem Pteridinkern, para-Aminobenzoësäure und L-Glutamat. Die in der Natur vorkommende Folate unterscheiden sich von der synthetisch hergestellten Folsäure in der Anzahl ihrer Glutamylreste¹²⁷. Besonders reich an FS sind grüne Blattgemüse, Spargel, Hülsenfrüchte, Vollkorngetreide, Hefe und Innereien²¹⁸. Auch Fenchel enthält rund 0,03 mg/100 g des Vitamins¹⁹. Mit der Nahrung aufgenommenen Folate werden nach Abspaltung überschüssiger Glutamatresten als FS-Monoglutamat, über den protonengekoppelten Folattransporter, vor allem im proximalen Dünndarm resorbiert^{127,218}. Die biologisch aktive Form Tetrahydrofolat ist Coenzym für die Übertragung von C1 Gruppen. Sie wird für die Nukleotidsynthese für die DNA Synthese sowie die DNA Methylierung benötigt. Folsäuremangel wird daher vor allem bei Wachstum und Zellteilung deutlich. Sie steht in Verbindung mit Gesundheitsschäden wie megaloblastischer Anämie und Neuralrohrdefekten¹²⁷. Schwangere müssen daher auf eine ausreichende Zufuhr von FS achten, da dies das Risiko der Neugeborenen, mit Spina bifida geboren zu werden, senkt⁹⁰.

Im Einsatz gegen Tumore spielt der FS-Stoffwechsel schon lange eine wichtige Rolle. In neoplastischen Zellen, in denen DNA-Replikation und Zellteilung beschleunigt ablaufen, führt die Unterbrechung des FS-Stoffwechsels zu einer ineffektiven DNA-Synthese, was zu einer Hemmung des Tumorwachstums führt. Je weniger aktive FS vorhanden ist, desto weniger kann der Tumor wachsen. Dieses Prinzip findet Anwendung in Zytostatika wie Methotrexat.

Unsicher ist noch, ob eine Supplementierung von FS in Nahrungsmitteln die Krebsinzidenz steigert, keine Auswirkung darauf hat, oder gar senkt. Obwohl epidemiologische Studien teilweise gezeigt haben, dass die Krebsinzidenz nach Supplementierung gestiegen war, gibt es Studien, die vertreten, dass FS Supplementierung das Krebsrisiko verringert, ein Mangel aber das Risiko erhöht^{57,112,218}.

Die Schwierigkeit ist, dass Folsäure je nach Stadium der Zellveränderung, unterschiedliche Effekte auf die Krebsentstehung und -progression hat. Auf die Progression (prä-)neoplastischer Läsionen hat FS-Supplementierung einen fördernden, FS- Mangel einen hemmenden Effekt. Dies kommt dadurch zustande, dass die gesteigerte DNA Synthese der neoplastischen Zellen bei FS Supplementierung bedient werden kann, bei FS-Mangel aber nicht. Im Gegensatz dazu sind normale (nicht neoplastische Gewebe) durch FS-Mangel für neoplastische Transformationen prädisponiert, wobei geringe Mengen an FS-Supplementierung diese unterdrücken. Grund dafür ist, dass es durch FS-Mangel vermehrt zu DNA-Strangbrüchen kommen kann und die DNA Reparaturmechanismen vermindert aktiv sind^{112,218}.

Aufgrund dieses Gegensatzes, aber des Vorhandenseins von FS in Fenchel ist es Ziel dieser Arbeit, die Wirkung von Folsäure auf die benignen Mammatzen zu beschreiben.

1.8 ESTRADIOL

Estradiol (auch Östradiol) ist ein aromatisiertes C18 – Steroid und stellt eines der wichtigsten körpereigenen Estrogene dar. Die Produktion von Estradiol findet vor allem im Ovar statt, während der Schwangerschaft aber auch in der Plazenta. Darüber hinaus wird es auch in geringen Mengen im Hoden und der Nebennierenrinde gebildet. Außerdem kann Estradiol auch in Geweben mit Aromataseaktivität, wie z.B. dem Fettgewebe produziert werden. Die Synthese erfolgt über Androgene, welche mithilfe einer Aromatase zu Estradiol umgewandelt werden können (Abbildung 8). An den Genitalorganen führt es zu einem vermehrten Wachstum von Vagina, Uterus und Brustdrüsen. Exogen stimuliert Östradiol das Knochenwachstum und die Mineraleinlagerung in den Knochen, weshalb es auch in der Osteoporoseprophylaxe Anwendung findet. Die Wirkung erfolgt über das Binden an Estrogenrezeptoren. Dabei ist die Affinität zu Rezeptoren des Typ α wesentlich höher als zu Rezeptoren des Typ β ^{67,136}.

Dauerhaft erhöhte Serumestrogenspiegel gehen mit einer erhöhten Risiko an Brustkrebs zu erkranken einher^{37,80}. Daher wurde das Hormon in dieser Untersuchung als potentiell proliferationssteigernde Kontrollsubstanz verwendet.

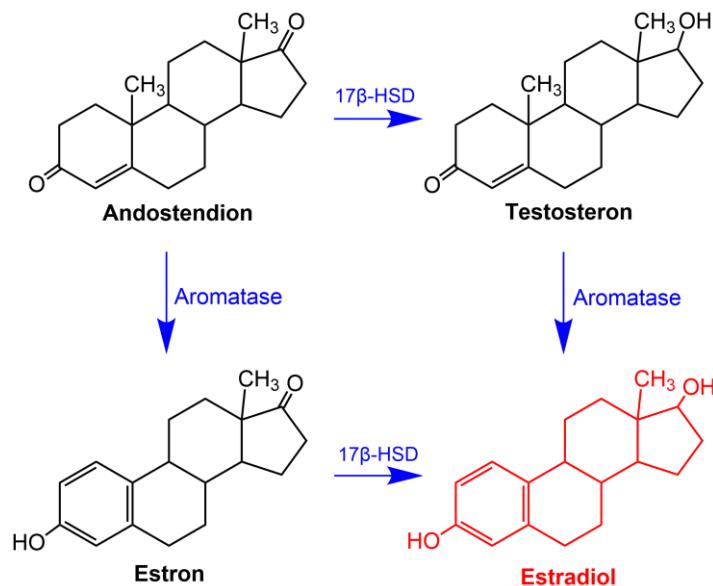


Abbildung 8: Estradiolsynthese aus den Androgenen Androstendion und Testosteron mittels Aromatase und 17-Beta-Hydroxysteroiddehydrogenase, modifiziert nach Löffler et al.¹²⁷.

1.9 ENDOXIFEN

Endoxifen ist ein aktiver Metabolit des selektiven Estrogen-Rezeptor-Modulators (SERMs) Tamoxifen. Endoxifen bindet mit höherer Affinität an die Estrogenrezeptoren (ER) und ist daher bis zu 100-mal potenter als Tamoxifen selbst¹⁹⁰. Bei Tamoxifengabe wird es mithilfe von CYP2D6 Enzymen in der Leber aus Tamoxifen gebildet. Dies kann bei CYP2D6 Langsam-Metabolisierern, oder durch CYP2D6-hemmende Pharmaka dazu führen, dass zu wenig Endoxifen gebildet wird und die Wirkung dadurch abgeschwächt ist⁶⁸. Mehrere Studien zeigen die Überlegenheit von direkt verabreichtem Endoxifen, gegenüber Tamoxifen auf^{5,75,105}.

Endoxifen wirkt auf ER+ Mammazellen, indem es an die ER bindet, dort antagonistisch wirkt und so das Wachstum hemmt. Im Knochengewebe und Endometrium zeigt es allerdings schwach agonistische Wirkung. Der genaue Hintergrund dieser gewebespezifischen Wirkung ist nach wie vor nicht endgültig geklärt. Eine Theorie geht davon aus, dass SERMs unterschiedliche Konformationsänderungen der Transaktivierungsbereiche (AF2) des ER verursachen. Diese Konformationen besitzen unterschiedliche Affinitäten für Co-Regulatoren. Da die Co-Regulatoren gewebespezifisch exprimiert werden, ist die Wirkung auf den ER ja nach Gewebe verschieden. Eine neue Theorie vermutet die Wirkung der SERMs über den Rezeptor GPER1, an welchem Endoxifen rein agonistisch wirkt^{48,61}. Mehrere Studien zeigen, dass Tamoxifen/Endoxifen einen großen Teil der Wirkung über eine Vielzahl verschiedener Mechanismen erreicht und so auch auf ER negative Zellen wirken kann^{61,108,180}.

Bei prämenopausalen Brustkrebspatientinnen ist Tamoxifen nach wie vor das Mittel der Wahl für eine adjuvante Therapie von hormonrezeptorpositiven Tumoren. In der S3-Leitlinie wird die Gabe von 20 mg Tamoxifen pro Tag über 5-10 Jahre empfohlen¹⁷. Diese adjuvante, endokrine Therapie reduziert die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs um ca. 40 % sowie die Wahrscheinlichkeit des Versterbens um ca. 30 %¹. Bei postmenopausalen, ER+ Patientinnen kann Tamoxifen zusätzlich zu den empfohlenen Aromatasehemmern gegeben werden¹⁷. Als Off-Label-Use zeigte die Gabe von Tamoxifen (10 mg/d) über 3-6 Monate auch bei Mastodynien eine Besserung der Symptome²⁰².

Aufgrund der zytotoxischen Wirkung auf ER+ Mammazelllinien, aber auch der mehrfach berichteten toxischen Wirkung auf rezeptornegative Zellen, wurde Endoxifen hier als Kontrollsubstanz verwendet^{55,58}.

II. ZIELSTELLUNG

Brusterkrankungen sind ein häufiges Krankheitsbild in der Gynäkologie. Neben der häufigsten weiblichen Krebsursache, dem Mammakarzinom, liegen aber noch häufiger benigne Erkrankungen der Brust vor^{115,202}.

Auffällig ist dabei, dass die Inzidenzraten von Brusterkrankungen zwischen asiatischen Ländern und westlichen Regionen wie Europa und den USA große Unterschiede zeigen¹⁴⁷. Dabei werden immer wieder die unterschiedlichen Ernährungsformen diskutiert. Um dieses Phänomen genauer zu verstehen, gibt es bereits viele Untersuchungen zur Wirksamkeit von Pflanzenextrakten und isolierten Pflanzenstoffen auf maligne entartete Zelllinien.

Die Wirkung von Phytopharmaka wie Leinsamen und Mönchspfeffer auf zyklusabhängige Mastodynien konnte bereits belegt werden²⁰⁵. Für die Effekte von Pflanzenstoffen auf benigne, mastopathische Brustveränderungen gibt es jedoch kaum Studien. Aufgrund der Häufigkeit und dem teilweise erhöhten Risiko für Brustkrebskrankungen, ist es Ziel dieser Arbeit, Wirkungen eines Pflanzenextraktes aus Fenchel auf Zellen der fibrozystischen Mastopathie zu untersuchen.

Da Fenchel (*Foeniculum vulgare*) schon lange eine bedeutsame Heilpflanze ist und vielseitige gesundheitsfördernde Wirkungen gezeigt wurden, welche auch auf Phytoestrogenen beruhen, liegt die Vermutung nahe, dass die Pflanze auch Wirkung auf Mammazellen zeigen könnte^{19,182}. Studien liegen diesbezüglich bisher allerdings nur an malignen Zellreihen vor, an denen bereits eine inhibitorische Wirkung gezeigt werden konnte²⁰. Neben den vielen positiven Effekten von Fenchel wird andererseits auch vor dem Konsum von Fenchel und seinen Inhaltsstoffen gewarnt, da Studien gezeigt haben, dass isolierte Pflanzenstoffe, die auch in Fenchel enthalten sind, kanzerogen wirken können^{35,62}.

Vor dem Hintergrund dieser gegensätzlichen Wirkungen sowie der schlechten Studienlage an benignen Zelllinien ist das Ziel dieser Arbeit ein Fenchelextrakt zu gewinnen und die in-vitro Wirkung mithilfe verschiedener Zelltests zu untersuchen. Dabei wird der gewonnene Extrakt zuerst mittels HPLC qualitativ auf Inhaltsstoffe geprüft. Die Wirkungen sollen hinsichtlich Zellviabilität, Zytotoxizität sowie Zellproliferation betrachtet werden. Dafür werden der BrdU-Proliferationstest von Roche, der CellTiter-Glo[®] sowie der CytoTox-Glo[™] Test von Promega und der Neutralrot-Test von Sigma-Aldrich eingesetzt. Die Untersuchungen erfolgen an kommerziell erworbenen, benigne mastopathisch veränderten Mammazellen mit unterschiedlichem Hormonrezeptorstatus (MCF10a und MCF12a). Dadurch soll ein möglicher rezeptorabhängiger Unterschied exploriert werden. Neben dem Fenchelextrakt wird untersucht, welche Effekte die im Extrakt enthaltenen Stoffe Rutin, Estragol und Folsäure sowie Estradiol und Endoxifen auf die verschiedenen Zellen zeigen.

III. MATERIAL UND METHODEN

Im folgenden Kapitel werden die verwendeten Materialien beschrieben, sowie die durchgeführten Methoden kurz dargestellt.

3.1 MATERIAL

Die detaillierte Auflistung der einzelnen Materialien, Geräte, Zelllinien, Test- und Kontrollsubstanzen sowie Reagenzien befinden sich in tabellarischer Form im Anhang (XI).

3.1.1 ZELLINNEN

Die Wirkung des Fenchelextraktes sollte an zwei verschiedenen, benigne veränderten Mammazelllinien untersucht werden. Dafür wurden die kommerziell erworbenen Zelllinien MCF10a und MCF12a verwendet, welche im Folgenden kurz beschrieben werden.

3.1.1.1 MCF 10A

Bei der MCF10a Zelllinie handelt es sich um spontan immortalisierte, nicht tumorbildende Zellen der weiblichen Brust. Sie entstammen einer 36-jährigen, „kaukasischen“, prämenopausalen Frau, die an fibrozystischer Mastopathie litt, aber keine familiäre Vorbelastung hatte. Proliferative Veränderungen bzw. Atypien wurden histologisch nicht nachgewiesen. Von der aus dem mastopathischen Gewebe gewonnenen, ursprünglich sterblichen Zelllinie (MCF 10) wurden durch kalziumarme Medien die zwei immortalisierten Linien MCF 10F (floating) und MCF10a (adhärent) kultiviert^{14,201,209}.

MCF10a wird in der Literatur als Estrogen-, Progesteron- sowie Androgen- rezeptornegativ beschrieben. Allerdings exprimieren die Zellen an ihrer Oberfläche den HER-2/neu-, den GPER- sowie den EGF Rezeptor und es lässt sich Zytokeratin CK5/6 nachweisen^{137,191,206}.

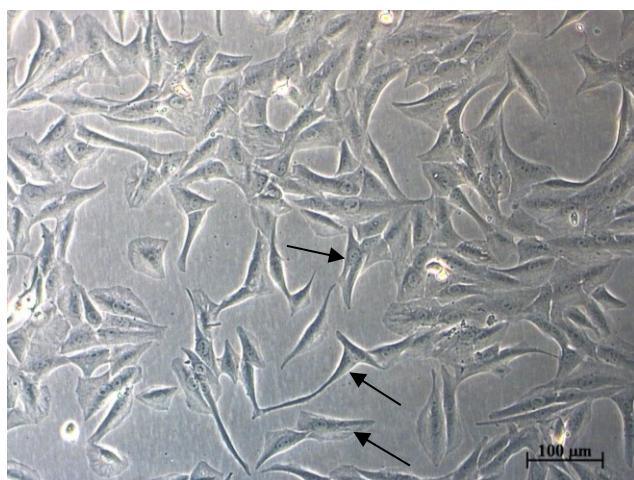


Abbildung 9: MCF10a Zellen, Lichtmikroskopische Darstellung, 10x Vergrößerung, Pfeile zeigen beispielhaft Zellen.

3.1.1.2 MCF 12A

Bei dieser Zelllinie handelt es sich ebenfalls um spontan immortalisierte, nicht tumorbildende Zellen der Mamma. Die MCF12a Zellen stammen von einer 60-jährigen, „kauasischen“ nulliparösen Frau. Die ursprünglichen Zellen wurden aufgrund fibrozystischer Veränderungen, bei einer Reduktionsmammaplastik entnommen und durch ähnlichen Prozess wie bei MCF10a immortalisiert^{16,164}. Im Unterschied zu MCF10a, wurden bei MCF12a proliferative Veränderungen (intraduktale Hyperplasie) nachgewiesen. Außerdem wird MCF12a im Vergleich zu MCF10a teilweise als estrogenrezeptorpositiv beschrieben. Zusätzlich exprimieren sie an ihrer Oberfläche auch HER-2/neu-, GPER-, EGF Rezeptoren, sowie Zytokeratin CK5/6 und den Proliferationsmarker Ki-67^{137,206}.

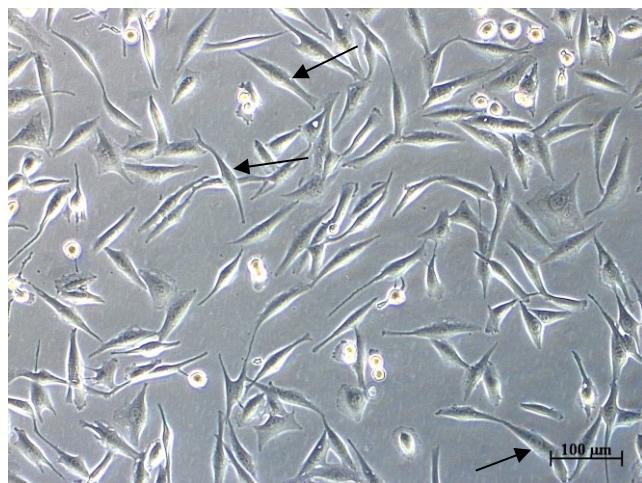


Abbildung 10: MCF12a Zellen, lichtmikroskopische Darstellung, 10x Vergrößerung, Pfeile zeigen beispielhaft Zellen.

3.2 METHODEN

Die theoretischen Ansätze der in dieser Arbeit verwendeten Methoden zur Untersuchung der Zellen, der Extrakte sowie der Wirkung auf die Zellen, werden für ein grundlegendes Verständnis im Folgenden beschrieben.

3.2.1 ZELLKULTIVIERUNG

Die hier verwendeten Mammazelllinien MCF10a und MCF12a wurden kommerziell bezogen und in Zellflaschen mit Filter-Schraubverschluss, in standardisierten Nährmedien unter physiologischen Bedingungen (37 °C, wasserdampfgesättigte Atmosphäre mit 5 % CO₂) kultiviert und aufbereitet. Beiden Ziellinien diente eine 1:1 Mischung aus HAM's F12 und DMEM als Nährmedium. Zugesetzt wurden Horse-Serum (5 %), 2 % Suppl. Mammaepithelium sowie zur Verhinderung einer Bakterien- oder Pilzbesiedelung 0,2 % Penicillin/Streptomycin und 0,5 % Amphotericin.

KULTIVIERUNG:

Alle Arbeiten mit offenem Zellmaterial fanden unter sterilen Kautelen an mikrobiologischen Sicherheitswerkbänken statt. Zuerst wurden die bei -185 °C gelagerten Zellen schonend aufgetaut, was durch Lagerung auf Eis und anschließend unter Raumtemperatur geschah. Durch überführen in ein 15 ml Röhrchen und Zugabe von DMEM/Hams F12 und anschließendem Zentrifugieren (1200 U/min, 6 min, RT), wurde das Zellpellet vom Einfriermedium Dimethylsulfoxid (DMSO) entfernt. Erst dann konnten die Zellen mit Medium resuspendiert und in eine kleine Zellkulturflasche (25 cm²) überführt werden.

Alle 2-3 Tage erfolgte eine mikroskopische Vitalitätskontrolle und der Austausch des verbrauchten Mediums. Bei einer Konfluenz der Flasche von 70 % - 90 %, wurden die Zellen in eine größere, beziehungsweise mehrere Flaschen umgesetzt. Dazu musste das verbrauchte Medium dekantiert und die vitalen adhärenten Zellen mit PBS gespült werden. PBS sorgt dafür, dass Reste des Serums abgewaschen werden und die Wirkung des darauf folgenden Trypsin nicht beeinträchtigt wird. Die Protease Trypsin daut die Zell-Matrix Verbindungen an, wodurch die Zellen die Bindung zur Kulturflasche verlieren. Die Zellen wurden mit einer Trypsinverdünnung (1:10 mit PBS) bedeckt und 5 Minuten unter physiologischen Bedingungen inkubiert, wodurch die Zellen vom Boden der Flasche gelöst werden konnten. Die Trypsinierung wurde mit der 1,5-fachen Menge Medium gestoppt, da die Zellen sonst beschädigt werden könnten. Durch anschließender Zentrifugation bei 1200 U/min für 6 Minuten gelang es, die Zellen zu isolieren und in die neue Flasche zu überführen⁷⁷.

ERMITTlung DER ZELLZAHL:

Um für jede Versuchsreihe optimale Konfluenz und vergleichbare Untersuchungsbedingungen zu schaffen, wurde vor jeder Versuchsreihe die Lebendzellzahl mikroskopisch ermittelt. Dazu wurde zunächst eine 1:20 Verdünnung der Zellsuspension hergestellt (20 µl Zellsuspension, 20 µl Trypanblau, 360 µl Medium). Trypanblau kann nur die Membranen toter Zellen durchdringen und diese damit blau färben. Vitale Zellen bleiben daher ungefärbt. Dadurch konnten tote von vitalen Zellen unterschieden werden²⁰⁴. Die Auszählung erfolgte lichtmikroskopisch mittels einer Bürker-Zählkammer (Abbildung 11).

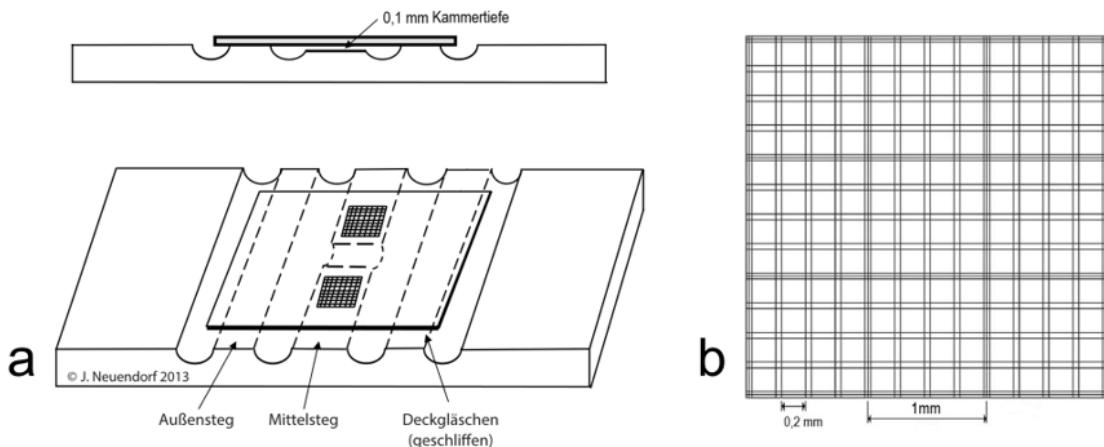


Abbildung 11: a: Schematische Darstellung einer Zählkammer, modifiziert nach Neuendorff¹⁵³.
b: Schematische Darstellung eines Zählnetzes nach Bürker³².

Die Zellzahl pro Milliliter der Suspension ließ sich wie folgt berechnen¹⁹²:

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

Z = Mittelwert der Zellzahl pro Großquadrat (1 mm x 1 mm)

VF = Verdünnungsfaktor (hier 20 s.o.)

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

Die Zellsuspension musste für jede Versuchsreihe je nach Zelllinie und Test individuell verdünnt werden, um gleich gute Versuchsbedingungen zu erreichen. Viele Werte wurden im Labor schon erprobt und konnten übernommen werden. Tabelle 2 zeigt die Zellzahl, die für die einzelnen Tests ausgesät wurde.

Tabelle 2: Konzentrationen der verwendeten Zellen pro Versuchsreihe

Zelllinie	Test	Zellen / ml
MCF10a	BrdU-Test	100.000
	CellTiter-Glo®-Lumineszenztest	100.000
	CytoTox-Glo™-Test	100.000
	Neutralrot-Test	400.000
	Immunhistochemie	300.000
MCF12a	BrdU-Test	200.000
	CellTiter-Glo®-Lumineszenztest	300.000
	CytoTox-Glo™-Test	150.000
	Neutralrot-Test	400.000
	Immunhistochemie	300.000

3.2.2 IMMUNHISTOCHEMIE

Um die beiden Zelllinien bezüglich der Expression von Estrogen- (ER- α und - β) und Progesteronrezeptoren (PR) zu untersuchen, diente ein immunhistochemisches Verfahren. Dieses basiert auf dem klassischen Sandwich-ELISA-Prinzip, welches im Vergleich zum ursprünglichen, direkten ELISA Prinzip ein stärkeres Signal liefert²¹⁴.

Zunächst bindet ein Primärantikörper spezifisch an das jeweilige Antigen, welches hier ein Teil des Rezeptors ist. Hierfür wurden monoklonale IgG-Antikörper des Kaninchens (PR und ER α) und der Maus (ER β) genutzt. Daraufhin wird ein weiterer Antikörper (AK) hinzugegeben, der mit einem Enzym, hier einer Peroxidase gekoppelt ist. Dieser bindet an den Primärantikörper-Komplex. Um zu verhindern, dass die AK unspezifische Bindungen eingehen, wird vor Zugabe des ersten AK ein Blockierungsschritt durchgeführt, welcher freie Bindungsstellen blockiert²¹⁴. Zuletzt wird das Substrat LinRed dazu gegeben, welches mit der Peroxidase reagiert, wodurch es zu einer roten Farbbildung kommt. Da alle nicht gebundenen AK abgespült werden, zeigt die Farbbildung, dass der jeweilige Rezeptor vorhanden ist. Die Färbung kann letztlich lichtmikroskopisch beurteilt werden²¹⁵. Zur Durchführung des Verfahrens wurde das *Impress Reagent Kit (Vector)* verwendet.

Tabelle 3: Protokoll Immunhistochemie

1.	300 μ l/Well Zellsuspension in 24-Wellplatte zur Zellkultivierung ansetzen. Anschließend 24 h Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO ₂ in wasser dampfgesättigter Atmosphäre.
2.	Medium abpipettieren und 3x mit PBS waschen.
3.	Je 300 μ l/Well Formafix 4 % zugeben und 30 min bei RT inkubieren.
4.	Formafix entfernen und 3x mit PBS waschen.
5.	Je 300 μ l/Well H ₂ O ₂ (0,3 %) zugeben und 30 min bei RT inkubieren.
6.	2x mit PBS spülen, dabei vorsichtig schwenken.
7.	200 μ l/Well Horse-Serum und 20 min bei RT inkubieren (Blockierungsschritt).
8.	Entfernen des Horse-Serum in allen Wells, außer bei Negativkontrolle.
9.	Je 100 μ l/Well entsprechenden Primärantikörper zugeben (ER α -AK, ER β -AK, PR-AK) und 24 h im Kühlschrank (+8 °C) inkubieren.
10.	Entfernen der AK und 3x mit PBS waschen.
11.	Je 4 Tropfen/Well (~0,5 ml) des sekundären AK zugeben und 30 min bei RT inkubieren. Anschließend 3x mit PBS spülen.
12.	Zugeben von 200 μ l/Well LinRed und 15 min im Dunkeln bei RT inkubieren.
13.	Reaktion mit Leitungswasser abstoppen.
14.	Lichtmikroskopische Beurteilung der Färbung einschließlich Dokumentation.

3.2.3 HERSTELLUNG DER TESTSUBSTANZEN

Im Folgenden wird dargestellt, wie die Herstellung der Fenchelextrakte sowie die Referenzproben erfolgte.

3.2.3.1 FENCHEL

Grundlage für die Herstellung des Fenchelextraktes war handelsüblicher, grüner Fenchel (*Foeniculum vulgare*) welcher im April 2018 im Supermarkt erworben wurde. Dieser wurde grob zerkleinert und anschließend mit dem Keramikmörser zu einem breiigen Gemisch verarbeitet. Zwei Gramm dieser feuchten Masse wurden in 20 ml 70 % Ethanol gelöst und für 20 min bei 60 °C und 80 W in einer Mikrowelle (Discover SP) erhitzt. Dieses Verfahren sorgt für eine schonende Extraktion und hat im Vergleich zu herkömmlichen Verfahren viele Vorteile^{47,187}.

Daraufhin wurden der Extrakt 15 min bei 4030 U/min und 5 min bei 13000 U/min zentrifugiert und der Überstand durch einen Membranfilter filtriert (Porengröße 0,45 µm). Zuletzt erfolgte die Einengung des Fenchelextraktes mittels Vakuum-Konzentrator (Eppendorf Concentrator 5301) bei 45 °C auf 1 ml, wodurch die Stammlösung des Fenchelextraktes entstand.

Zusätzlich zu dieser Ethanollösung wurden 2 g des frischen Fenchels in 20 ml kochendem Wasser für 10 Minuten ziehen gelassen, filtriert und nach obigem Verfahren ebenfalls auf 1 ml konzentriert. Da dieser Extrakt in der HPLC allerdings kaum Inhaltsstoffe zeigte (4.2.1.2), erfolgten mit diesem Extrakt keine in-vitro Zellteste.

Um den Extrakt in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Zellen zu testen, wurden 6 Verdünnungsstufen der Stammlösung mit 70 % Ethanol erstellt (Tabelle 4). Die Aufbewahrung der Extrakte erfolgte bei -20 °C. Vor jeder Anwendung wurden die Extrakte aufgetaut und gevortext.

3.2.3.2 REFERENZEN

Die Vergleichssubstanzen Estragol und Folsäure wurden in 99 % Ethanol gelöst. Rutin konnte in einem Gemisch mit dem Verhältnis 1:2 Ethanol (99 %) / DMSO gelöst werden. Eine Übersicht über die jeweiligen Konzentrationen sind in Tabelle 4 zu sehen. Estradiol, Endoxifen, Rutin und Estragol wurden bei -80 °C aufbewahrt, Folsäure bei -20 °C.

Tabelle 4: Konzentrationen der untersuchten Substanzen mit jeweiligem Lösungsmittel

Substanz	Lösungsmittel	Konzentration
Fenchelextrakt (100%)	70 % Ethanol	2 g/ml
Fenchelextrakt (50 %)	70 % Ethanol	1 g/ml
Fenchelextrakt (20 %)	70 % Ethanol	0,5 g/ml
Fenchelextrakt (10 %)	70 % Ethanol	0,2 g/ml
Fenchelextrakt (5 %)	70 % Ethanol	0,1 g/ml
Fenchelextrakt (2,5 %)	70 % Ethanol	0,05 g/ml
Fenchelextrakt (1%)	70 % Ethanol	0,02 g/ml
Rutin	DMSO/Ethanol (2:1)	0,00305 g/ml
Estragol	99 % Ethanol	0,000741 g/ml
Folsäure	99 % Ethanol	0,001 g/ml
Estradiol	70 % Ethanol	$2,72 \times 10^{-7}$ g/ml
Endoxifen	70 % Ethanol	0,0062 g/ml

3.2.4 HPLC (*HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY*)

Bei der Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC) handelt es sich um ein analytisches Verfahren zur Auftrennung eines Stoffgemisches anhand der physikochemischen Bindungseigenschaften der einzelnen Stoffe. Das Probengemisch wird dabei unter hohen Drücken, zwischen zwei Phasen durch eine Säule gepresst, wobei verschiedene Stoffe die Säule unterschiedlich schnell passieren. Die Zeit bis zum Erreichen des Detektors (Retentionszeit) ist für jeden einzelnen Stoff charakteristisch und lässt daher Rückschlüsse auf die Zusammensetzung des Gemisches zu. Die Intensitäten der Stoffe werden als Peaks auf der Zeitachse aufgetragen, wodurch ein Chromatogramm entsteht. Der Zeitbedarf dieser Variante einer Verteilungschromatografie ist gering sowie die Trennschärfe hoch, weshalb die HPLC eines der wichtigsten Verfahren zur Trennung von Pflanzenstoffen ist^{65,127}.

Das Prinzip der zeitlichen Auftrennung besteht darin, dass das Analyt bei Durchlaufen der Säule in Wechselwirkung mit einer mobilen Phase (Eluent) und einer stationären Phase tritt, wobei die mobile Phase zusammen mit der Probe die stationäre durchläuft. Weil eine Phase polare, die andere unpolare Eigenschaften hat, werden die Stoffe anhand ihrer Polarität aufgetrennt. Da es sich in dieser Arbeit um eine Umkehrphasenchromatographie handelt, dienten als Eluenten die polaren Flüssigkeiten Aqua dest. und DMSO, wohingegen als feste, stationäre Phase eine hydrophobe Kohlenstoffsäule (C18) zum Einsatz kam.

Während unpolare Verbindungen in der Probe stärkere Wechselwirkungen mit den hydrophoben Oberflächengruppen der stationären Phase haben, zeigen polare Verbindungen eine höhere Affinität zum Eluenten. Daher interagieren unpolare Stoffe stärker mit der stationären Phase und bewegen sich in Folge dessen langsamer durch die Säule als polare Stoffe, welche eine stärkere Interaktionen mit der beweglichen Phase eingehen und mit dieser schneller durch die Säule gespült werden. Sehr polare Verbindungen kommen somit zuerst am Detektor an und haben damit die kleinste Retentionszeit. Abbildung 12 zeigt dieses Prinzip schematisch in zeitlich aufeinanderfolgenden Zuständen (a-d), mit dem dazu passenden Chromatogramm, wobei $t_R(X)$ die Retentionszeit des stark polaren Stoffes darstellt.

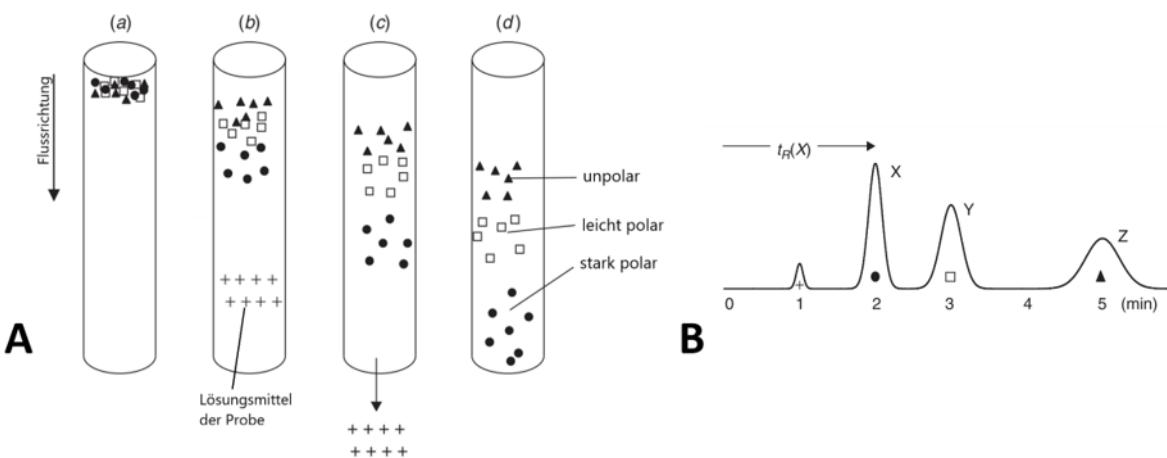


Abbildung 12: Schematische Darstellung des Trennprinzips in einer HPLC Säule mit passendem Chromatogramm.

A: Die Säulen (a)-(d) Stellen zeitlich aufeinanderfolgende Zustände der Säule dar. Sind die Stoffe anfangs (a) noch unsortiert ganz oben in der Säule bewegen sie sich weiter nach unten (bis d) und werden dabei immer mehr getrennt.

B: passendes Chromatogramm zu A, mit den einzelnen Stoffen. X/Y/Z stellen die Peaks der unterschiedlich stark polaren Stoffe dar. $t_R(X) \triangleq$ Retentionszeit.
modifiziert nach Lee¹²².

Um zu verhindern, dass Stoffe mit ähnlichen Polaritätseigenschaften nahezu zeitgleich detektiert werden, wodurch es zu einer Überlagerung der einzelnen Peaks kommen würde, welche dann schlechter zu differenzieren wären, kamen zwei unterschiedliche Lösungsmittel als Eluenten zum Einsatz. Beginnend mit Aqua dest. wurde nach 5 Minuten ein Elutionsgradient aufgebaut, bis die mobile Phase zu 100 % aus DMSO bestand, welches dann wieder langsam durch Aqua dest. ersetzt wurde. Dadurch bewegen sich im ersten Teil vor allem die hydrophilen Stoffe mit dem Aqua dest. zum Detektor. Dann erst sorgt DMSO als starkes organisches Lösungsmittel dafür, dass auch stark adhäsente Moleküle aus der stationären Phase eliminiert und dem Detektor zugeführt werden⁷³. Auf Empfehlung des Herstellers Knauer enthielt die

DMSO-Lösung 10 % Aqua dest., sowie die Aqua dest.-Lösung 10 % Methanol, um die Säule zu schonen.

In Abbildung 13 ist der Gesamtaufbau der HPLC dargestellt. Zuerst werden die Eluenten unter hohem Druck durch einen Entgaser zur Pumpe gepresst. Hierbei werden Luftblasen in den Flüssigkeiten, welche die spätere Messung beeinflussen, sowie die Pumpleistung stören könnten, eliminiert¹²². In der Mischkammer der Pumpe werden die beiden Eluenten nach gewünschtem Verhältnis gemischt. Über einen Injektor werden diesem Eluenten 20 µl Probengemisch zugefügt. Bevor die Flüssigkeit der Hauptsäule zugegeben werden kann, durchläuft sie eine Vorsäule, in der grobe Verunreinigung herausgefiltert werden sollen, um die Hauptsäule zu schonen. In der Hauptsäule durchläuft die Probe den oben beschriebenen Prozess zur Auf trennung der Verbindungen und trifft dann unter niedrigem Druck auf einen UV-Detektor, welcher die Extinktion misst und an einen Computer weiterleitet. Die Messung erfolgte bei 254 nm, da diese Wellenlänge für die hier zu erwartenden Flavonoide gut geeignet ist^{73,128}.

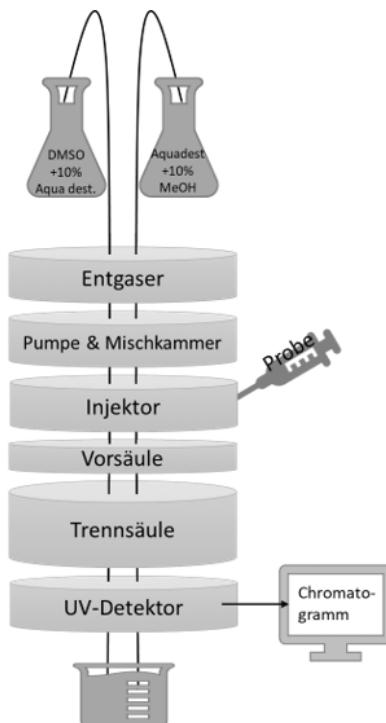


Abbildung 13: Aufbau der HPLC mit einzelnen Bauteilen. Schema erstellt nach Gey⁷³.

Tabelle 5: Protokoll HPLC

1.	Spülen des Pumpenkreislaufs
2.	Injectionsspritze mit 20 µl des Extraktes füllen und in Injectionsschleife geben
3.	Messung starten
4.	Nach 3 min durch „Inject“-Funktion die Probe dem Messkreislauf zuführen.
5.	Messung für 40 min laufen lassen. Eluenten werden laut Messprotokoll selbst gemischt.
6.	Messung nach 40 min beenden und Ergebnis abspeichern
7.	Abzug des Leerwertes von den Messwerten mittels Software (<i>Clarity Chrome</i>)

3.2.5 IN-VITRO ZELLTESTE

Mithilfe folgender Zelltests konnte das Wachstumsverhalten der Mammazelllinien unter dem Einfluss der Fenchelextrakte sowie den Referenzen in-vitro untersucht werden. Damit ließen sich Proliferation, Viabilität, Toxizität sowie der Metabolismus der Zellen nachweisen.

Um auszuschließen, dass Testergebnisse aufgrund der Interaktion der Zellen mit dem Medium oder den verwendeten Lösungsmitteln zustande kommen, wurden zusätzlich Wells mit unbehandelten Zellen (Medium + Zellen) und den Lösungsmitteln mitgeführt. Zu diesen Referenzproben konnten die Messwerte der Stoffe ins Verhältnis gebracht werden und so die Wirkung der Lösungsmittel auf die Zellen eliminiert werden. Tabelle 4 zeigt, in welchem Lösungsmittel die einzelnen Stoffe gelöst sind und somit bei der Berechnung im Verhältnis stehen. Zusätzlich erfolgte jede Messung auch an Wells, die nur mit Medium gefüllt waren. Dieser Hintergrundwert wurde von den Messwerten der untersuchten Substanzen abgezogen.

Zur Berechnung der Testergebnisse (in Prozent der Lösungsmittelkontrolle) wurde für den BrdU-, den CellTiter-Glo®, sowie den Neutralrottet folgende Formel verwendet:

$$\text{Ergebnis [%]} = \frac{\text{Messwert der Probe} - \text{Leerwert Medium}}{\text{Messwert des entsprechenden Lösungsmittels} - \text{Leerwert Medium}} \times 100$$

3.2.5.1 BRDU-TEST

Der BrdU-Test ist ein klassischer kolorimetrischer ELISA Test zur Quantifizierung der Zellproliferation. Er beruht auf dem Einbau des Pyrimidinanalogs 5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU) (Abbildung 14) in die DNA anstelle von Thymidin während der Replikationsphase vitaler Zellen. Nach der Inkubation der Zell-Extrakt-Gemische und der Kontrollen mit dem zugegebenen

BrdU werden die Zellen mittels FixDenat-Reagenz denaturiert. Dadurch wird die DNA freigegeben und der Antikörper kann an das freiliegende BrdU binden, welches während der Inkubationsphase je nach Proliferationsaktivität von der Polymerase in die neu synthetisierte DNA eingebaut wurde. Bei dem Antikörper (Anti-BrdU-POD-Antikörper) handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper von Maus-Maus-Hybridzellen, welcher mit einer Peroxidase konjugiert ist. Anschließend wird das Substrat Tetramethylbenzidin zugegeben, welches mit der Peroxidase reagiert und für einen blauen Farbumschlag sorgt. Die Intensität korreliert mit den am eingebauten BrdU haftenden Immunkomplexen und somit mit der Proliferationsrate der Zellen. Das Stoppen der Peroxidasereaktion mittels Schwefelsäure sorgt für einen gelben Farbumschlag, deren Absorption mittels ELISA-Reader bei 450 nm quantifiziert werden kann. Um unspezifische Bindungen zwischen Anti-BrdU-POD-Antikörper und Zellen ohne BrdU-Einbau aufzuzeigen, musste bei diesem Test zu den sonst üblichen Kontrollen und Leerwerten eine weitere Kontrolle (Backgroundkontrolle) mitgeführt werden¹⁸⁶.

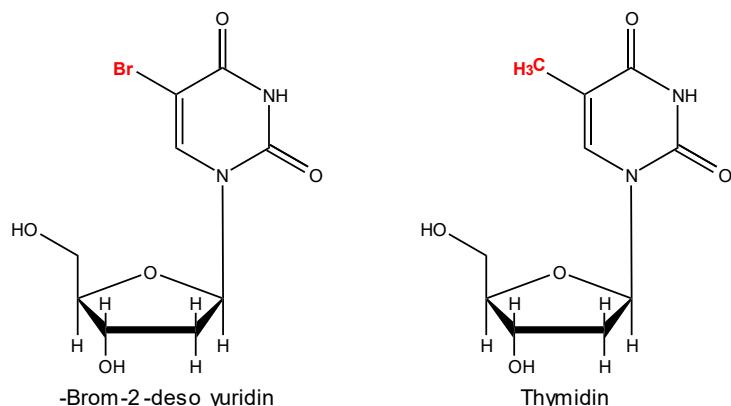


Abbildung 14: Prinzip des BrdU (schematisch): Unterschied von BrdU (5-Brom-2'-desoxyuridin) zu Thymidin. Der Unterschied liegt lediglich im rot markierten Brom bei BrdU, anstelle des CH₃ bei Thymidin. Gezeichnet nach Cell Proliferation ELISA, BrdU (Roche 2018)¹⁸⁶.

Tabelle 6: Protokoll BrdU-Test

1. 100 µl/Well der Zellsuspension in 96-Wellplatten zur Zellkultivierung angesetzt. Anschließend 24 h Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre.
 2. Zugabe der Extrakte (1 µl/Well). Anschließend 24 h Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre.
 3. BrdU-Reagenz 1:100 ansetzen und davon 10 µl in jedes Well, außer den Background Kontrollen geben.
 4. Anschließend 4 h Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre.

5.	Entfernung des Überstands.
6.	200 μ l FixDenat-Reagenz hinzufügen und die Platten bei RT für 30 min inkubieren
7.	FixDenat entfernen. Anti-BrdU-POD-Antikörper mit Antibody-dilution-solution im Verhältnis 1:100 mischen und je 100 μ l/Well zugeben. Anschließend 60 min bei RT inkubieren.
8.	Anti-BrdU-POD-Antikörperlösung entfernen. Waschpuffer 1:10 mit Aqua dest. verdünnen und Wells je 3x spülen und Überstand abklopfen.
9.	100 μ l/Well Substratlösung (Tetramethylbenzidin) hinzufügen. Anschließend 15 min Inkubation bei RT.
10.	Abstoppen der Reaktion mit 25 μ l/Well 1 M H_2SO_4 .
11.	Messung am ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm. Referenz 620 nm.

3.2.5.2 CELLTITER-GLO® LUMINESZENZTEST

Der CellTiter-Glo®-Lumineszenztest nutzt ATP als Marker für metabolisch aktive Zellen zur Quantifizierung vitaler Zellen. Durch Zugeben des CellTiter-Glo-Substrates und dem CellTiter-Glo-Puffer werden die Zellen lysiert, wodurch ATP aus den Zellen austritt und mit der ebenfalls im Reagenz enthaltenen Luciferase reagiert, wodurch Licht emittiert wird (Abbildung 15). Gleichzeitig werden ebenfalls freigesetzte, endogene Enzyme wie die ATPase, welche die Messung beeinflussen könnten, inhibiert. Die thermostabile „Glühwürmchen-Luciferase“ (Ultra-Glo™ Recombinant Luciferase) basiert auf den Genen des Leuchtkäfers „Photuris pennsylvanica“ und zeigt sich in Zellkulturen sehr robust.

Die Menge des gemessenen ATP ist direkt proportional zur Anzahl viabler Zellen und kann anhand der Lumineszenz mithilfe eines Lumineszenz-Readers quantifiziert werden^{44,176}.

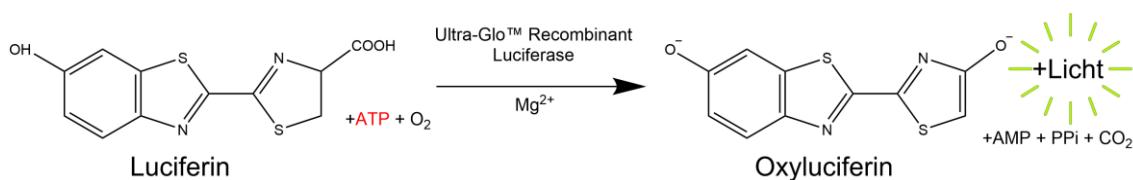


Abbildung 15: CellTiter-Glo Schematisches Reaktionsprinzip. Das freie ATP aus den Zellen reagiert mit Luciferin und der Luciferase des Substrates zu Oxyluciferin, wobei Licht emittiert wird. Modifiziert nach Technical-Bulletin CellTiter-Glo (Promega 2015)¹⁷⁶.

Tabelle 7: Protokoll Cell Titer-Glo® Lumineszenztest

1.	50 µl/Well Zellsuspension in 96-Wellplatte zur Zellkultivierung angesetzt. Anschließend 24 h Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO ₂ in wasser dampfgesättigter Atmosphäre.
2.	Zugabe von 0,5 µl/Well Fenchelextrakt. Anschließend wieder 24 h Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO ₂ in wasser dampfgesättigter Atmosphäre.
3.	Mischen des CellTiter-Glo-Substrates mit dem CellTiter-Glo-Puffer.
4.	Zugabe von 50 µl/Well des gemischten Reagenz.
5.	30 min Inkubation bei Raumtemperatur (die ersten 2 min auf einem Platten rüttler).
6.	Umpipettieren der Zellkultur-Reagenz-Gemische in eine weiße, intransparente 96-Wellplatte um Lichtleitung in benachbarten Wells zu vermeiden.
7.	Messung der Wells mit dem Lumineszenzreader im Programm CellTiter-Glo®.

3.2.5.3 NEUTRALROT-TEST

Der Neutralrot-Test beruht auf der Aufnahme des Farbstoffes Neutralrot (3-Amino-7-dimethylamino-2-methylphenazin Hydrochlorid) in Lysosomen viabler Zellen, wodurch Rückschlüsse auf die Zellviabilität sowie die Zytotoxizität gezogen werden können. Das leicht kationische Neutralrot wird von lebendigen Zellen durch aktiven Transport in die Zellen aufgenommen und intrazellulär an die Lysosomenmembran gebunden. Unter nahezu neutralen pH Bedingungen außerhalb der Zellen sowie im Zytoplasma ist Farbstoff ungeladen. Im sauren Milieu der Lysosomen wird dieser allerdings positiv geladen, kann die Membran nicht mehr passieren und bleibt aufgrund dessen im lysosomalen Lumen gefangen (Ionenfalle)^{150,158}. Da die Zelle sowohl für die Aufnahme des Farbstoffs als auch zum Aufrechterhalten des pH Wertes in den Lysosomen Energie benötigt, funktioniert dieses Prinzip nur bei vitalen Zellen. In geschädigten Zellen wird aufgrund des geringeren pH-Gradienten weniger Neutralrot gebunden, tote Zellen dagegen können gar keinen Farbstoff mehr speichern. Nach der Inkubation wird in einem Waschschritt überschüssiger Farbstoff entfernt und die Zellen mit einem leicht sauren Ethanolgemisch lysiert, um den gebundenen Farbstoff freizusetzen. Die Farbintensität, die schon mit bloßem Auge zu sehen ist, kann mittels ELISA-Reader gemessen werden und korreliert mit der Anzahl vitaler Zellen^{29,198}.

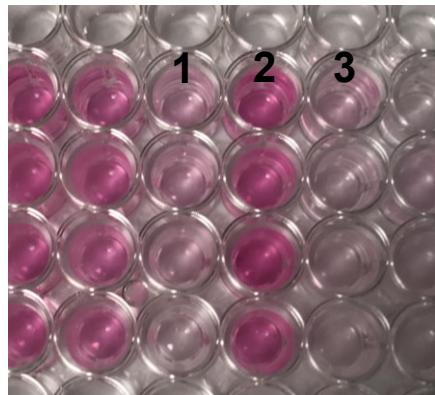


Abbildung 16: Makroskopische Auswertung Neutralrottet: die Farbreaktion von Fenchel ist Vergleichbar mit der Farbreaktion des Endoxifen. Proben in Spalten angeordnet, **Spalte 1**: Endoxifen, **Spalte 2**: Estradiol, **Spalte 3**: Fenchelextrakt.

Protokoll:

Aufgrund der starken Kristallbildung des Neutralrot-Reagenz unter Standardprotokollbedingungen, wurde der Test leicht abweichend vom Standardprotokoll durchgeführt. Das Reagenz wurde in dreiprozentiger Konzentration mit dem mittels HCL, auf pH 7,2 eingestellten Medium zu den Zellen gegeben und über 60 min inkubiert, um gute Ergebnisse bei wenig Kristallbildung zu erreichen. Da das normalerweise verwendete Medium, Zusätze mit rotem Farbstoff enthält, kam hier DMEM ohne Zusätze zum Einsatz. Für den Waschschritt wurde anstatt der Neutral Rot Assay Fixative, die im Protokoll vorgeschlagene Alternative PBS genutzt, da die Zellen so besser in den Wells verblieben.

Tabelle 8: Protokoll Neutralrottet

1.	100 µl/Well Zellsuspension in 96-Wellplatte zur Zellkultivierung angesetzt. Anschließend bei 37 °C und 5 % CO ₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre für 24 h inkubiert.
2.	Zugabe der Extrakte (1 µl/Well). Inkubation im Brutschrank, bei 37 °C und 5 % CO ₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre für 24h.
3.	Austausch des Mediums auf 100 µl/Well DMEM hell ohne Zusätze (pH 7,2) und Zugabe von 3 µl Neutralrot-Reagenz.
4.	60 min Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO ₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Alle 10 min prüfen, ob Ausfällung von Kristallen vorhanden.
5.	Entfernen des Mediums.
6.	Spülen der Wells mit 200 µl PBS/Well.
7.	Auffüllen der Wells mit 100 µl/Well Neutral Rot Solubilisierungslösung.
8.	15 min Inkubation bei RT auf dem Plattenrüttler.
9.	Messung mittels ELISA-Reader bei 570 nm Wellenlänge, Referenz: 655 nm.

3.2.5.4 CYTOTOX-GLO™ TEST

Die Membranintegrität ist ein wichtiges Kriterium für viable Zellen, welches im CytoTox-Glo™ Test Anwendung findet, um tote von vitalen Zellen zu unterscheiden. Die normalerweise bei tierischen Zellen im Zytosol liegenden Enzyme, wie Proteasen, treten bei toxischen Zellen aus und liegen frei im Medium vor, wodurch die Anzahl toter Zellen quantifiziert werden kann.¹⁵⁵

Der CT-Glo Assay nutzt das Peptidsubstrat Alanyl-Alanyl-Phenylalanyl-Aminoluciferin (AAF-Glo™ Substrat), welches durch die freigesetzte „*dead cell protease*“ zu Aminoluciferin umgesetzt wird. Dieses reagiert mit der ebenfalls im Substrat enthaltenen Luciferase (Ultra-Glo™ Recombinante Luciferase), wobei Licht emittiert wird. Da das AAF-Glo™ Substrat die intakte Membran lebender Zellen, nicht überwinden kann und daher nur mit den freigewordenen Proteasen reagiert, korreliert die Lumineszenz mit der Anzahl toter Zellen¹⁷⁷.

Durch Zugabe eines Lysereagens werden die Membranen aller noch vitalen Zellen zerstört, wodurch das neue Signal der Anzahl aller enthaltenen Zellen entspricht. Durch Subtraktion des Lumineszenzsignals der toten Zellen vom Signal aller Zellen, kann die Zellviabilität berechnet werden¹⁷⁷.



Abbildung 17: Schematische Darstellung des CytoTox-Glo™ Test. Aus toten Zellen frei gesetzte Proteasen reagieren mit dem Substrat zu Aminoluciferin, welches in einer weiteren Reaktion mit der Luciferase Licht emittiert. In Anlehnung an Technical Bulletin CytoTox-Glo (Promega 2017)¹⁷⁷.

Tabelle 9: Protokoll CytoTox-Glo™-Test

1.	100 µl/Well Zellsuspension in 96-Wellplatte (5000 Zellen/Well) zur Zellkultivierung ansetzen. Anschließend 24 h Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO ₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre.
2.	Zugabe von je 1 µl/Well der Extrakte. Anschließend wieder 24 h Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO ₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre.
3.	Mischen des AAF-Glo™ Substrat mit dem Puffer.
4.	Zugabe von 50 µl/Well des Reagens.
5.	15 min Inkubation bei RT (die ersten 2 min auf einem Plattenröhrtler).
6.	Umpipettieren der Zellkultur-Reagenz-Gemische in eine weiße, intransparente 96-Wellplatte um Lichtleitung in benachbarten Wells zu vermeiden.

7.	Messung der Wells mit dem Lumineszenzreader im Programm CytoTox-Glo TM -Step1.
8.	Rückpipettieren der Gemische auf ursprüngliche, transparente Wellplatte.
9.	Zugabe von je 50 µl/Well Lysereagenz.
10.	15 min Inkubation bei RT (die ersten 2 min auf einem Plattenrüttler).
11.	Umpipettieren der Gemische in eine weiße, intransparente Wellplatte und Messung am Lumineszenzreader im Programm CytoTox-Glo TM -Step2.

3.2.5.5 GLUKOSE- UND LAKTATBESTIMMUNG

Die Bestimmung des Glukosegehalts im Überstand der Zellkultur ist ein Maß für den intrazellulären Abbau der Glukose und damit auch für die Stoffwechselaktivität der Zellen. Fällt die Glukosekonzentration im Überstand ab, spricht dies für einen hohen Stoffwechsel der Zellen. Da tote Zellen keine Glukose aufnehmen und keinen Stoffwechsel mehr betreiben können, steigt die Glukosekonzentration, je mehr tote Zellen im Verhältnis zu vitalen vorhanden sind. Daher kann die extrazelluläre Glukosekonzentration als Indiz für die Zytotoxizität und Zellviabilität gesehen werden⁷⁷.

Da bei der anaeroben Glykolyse viabler Zellen, Glukose zu Laktat abgebaut wird, ist zu erwarten, dass die Laktatkonzentration im Überstand mit dem Anteil an vitalen Zellen steigt. Die Laktatkonzentration verhält sich also invers zu Glukosekonzentration.

Der Test zur Messung der Glukosekonzentration beruht auf einem elektrochemischen Messprinzip mithilfe eines speziellen Chipsensors. Die in der Probe enthaltene Glukose reagiert mit der zugefügten Glukoseoxidase zu Glukonsäure und Wasserstoffperoxid (H₂O₂). Eine Elektrode misst das H₂O₂ und der daraus generierte Stromfluss ist proportional zur Glukosekonzentration. Die Messung erfolgte vollautomatisch am Glukose Laktat Automaten (Biosen 5140) der Firma EKF-Diagnostic⁸⁶.

Tabelle 10: Protokoll Glukose- und Laktatbestimmung

1.	100 µl/Well Zellsuspension in 96-Wellplatte zur Zellkultivierung angesetzt. Anschließend bei 37 °C und 5 % CO ₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre für 24h inkubiert.
2.	Zugabe der Extrakte (1µl/Well). Inkubation im Brutschrank, bei 37 °C und 5 % CO ₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre für 24h.
3.	Abpipettieren und Zusammenführen der Überstände des jeweiligen Extraktes.
4.	Je 20 µl Überstand zu 1 ml Pufferlösung geben.
5.	Messung an Biosen Glukose-/Laktat-Analyzer

3.2.5.6 pH-WERT BESTIMMUNG

Die pH-Wertmessung stellt eine weitere Methode zur Beurteilung der Zellvitalität dar. Zum einen sorgen toxische Effekte dafür, dass es zu Störungen des oxidativen Stoffwechsels kommt, wodurch vermehrt anaerobe Glykolyse betrieben wird, bei welcher dann vermehrt Laktat anfällt. Zum anderen sprechen mehr vitale Zellen aber auch für vermehrten Stoffwechsel, wobei dann insgesamt auch mehr Laktat anfällt. Das freie Laktat sorgt für eine Ansäuerung des Extrazellulärraumes und damit für eine pH-Wertänderung.

Für die pH-Messung wurde wie unter 3.2.5.5 beschrieben vorgegangen und der pH-Wert des Zellkulturüberstandes mithilfe einer pH-Glaselektrode der Firma Thermo Scientific gemessen.

3.2.5.7 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die Untersuchungen zur Zellproliferation, Zellviabilität sowie Zytotoxizität mittels BrdU, Neutralrot-, CellTiter-Glo- und CytoTox-Glo-Test, erfolgten pro Ansatz jeweils mindestens in Drei-fachbestimmung unter Bildung des Mittelwertes. Jeder Test wurde pro Zelllinie dreimal mit unterschiedlichen Zellpassagen wiederholt ($n=3$).

Die Berechnungen der Proliferations-, Viabilitäts- und Toxizitätswerte erfolgte mit oben genannter Formel (3.2.5). Aus den Ergebnissen der Tests konnten zunächst Mittelwerte und anschließend Standardabweichungen berechnet werden.

Die gewonnenen Daten wurden zunächst mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung geprüft. Konnte damit die Normalverteilung nicht widerlegt werden erfolgte die weitere Auswertung unter Verwendung eines gruppenvergleichenden parametrischen t-Tests für normalverteilte Daten. Lag keine Normalverteilung vor, wurde ein nichtparametrische Gruppenvergleichstest (Mann-Whitney-Test) gewählt.

Dabei wurde der jeweils untersuchte Stoff mit der jeweiligen Referenzprobe (Lösungsmittel) dahingehend untersucht, ob die Unterschiede in den Daten der Gruppen signifikant sind. Hierbei galten Vergleiche mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit (p) von $< 0,05$ als statistisch signifikant. Signifikante Ergebnisse werden in den Grafiken durch einen Stern (*) markiert.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Statistikprogramms IBM SPSS Statistics 25, sowie Microsoft Excel 2016.

IV. ERGEBNISSE

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen ohne tiefergehende Interpretation dargestellt. Zu Beginn werden die Ergebnisse zur Untersuchung des Rezeptorstatus der Zelllinien mittels Immunhistochemie aufgezeigt. Daran schließen sich die Resultate der Analyse der Extrakte an, welche vor allem mittels HPLC erfolgte. Zuletzt werden die Ergebnisse der unterschiedlichen in-vitro Zelltests zur Untersuchung auf Zellviabilität und -proliferation sowie die Untersuchungen zum Stoffwechsel der Zellen dargestellt. Die Diskussion der Ergebnisse erfolgt im anschließenden Kapitel.

4.1 IMMUNHISTOCHEMIE

Der Hormonrezeptorstatus der zwei Zelllinien (MCF10a und MCF12a) wurde in der Vergangenheit schon häufig untersucht und beschrieben. Da allerdings bekannt ist, dass die Expressionsprofile der Rezeptoren zwischen verschiedenen Chargen variieren, sollte hier der Status nochmals untersucht und gegebenenfalls bestätigt werden^{137,207}.

Untersucht wurden die Estrogenrezeptoren α (ER α) und β (ER β) sowie ein Progesteronrezeptor (PR). Eine rote Farbreaktion, welche beim Betrachten der Zellen durch das Lichtmikroskop beobachtet werden kann bedeutet das Vorhandensein des entsprechenden Rezeptors. Um die Funktionsweise des Tests zu überprüfen, wurde eine Negativkontrolle (NK) ohne primäre Antikörper mitgeführt, welche stets keine rote Reaktion aufweisen sollte.

Im Folgenden sind die lichtmikroskopischen Aufnahmen der immunhistochemischen Untersuchungen dargestellt.

4.1.1 MCF 10A

Die Immunhistochemie der Zellreihe MCF10a zeigte bei keinem der getesteten AK eine rötliche Färbung unter dem Lichtmikroskop (Abbildung 18), wodurch belegt wurde, dass die hier vorhandene Zelllinie weder ER α und ER β , noch PR exprimiert.

4.1.2 MCF 12A

Das immunhistochemische Verfahren der Zellreihe MCF12a zeigte bei den Antikörpern ER α und ER β , sowie dem Progesteronrezeptor eine rötliche Verfärbung der Zellen unter dem Lichtmikroskop (Abbildung 19). Die Negativkontrolle blieb ungefärbt. Dies belegt, dass die hier verwendete Zellreihe alle drei überprüften Hormonrezeptoren exprimiert.

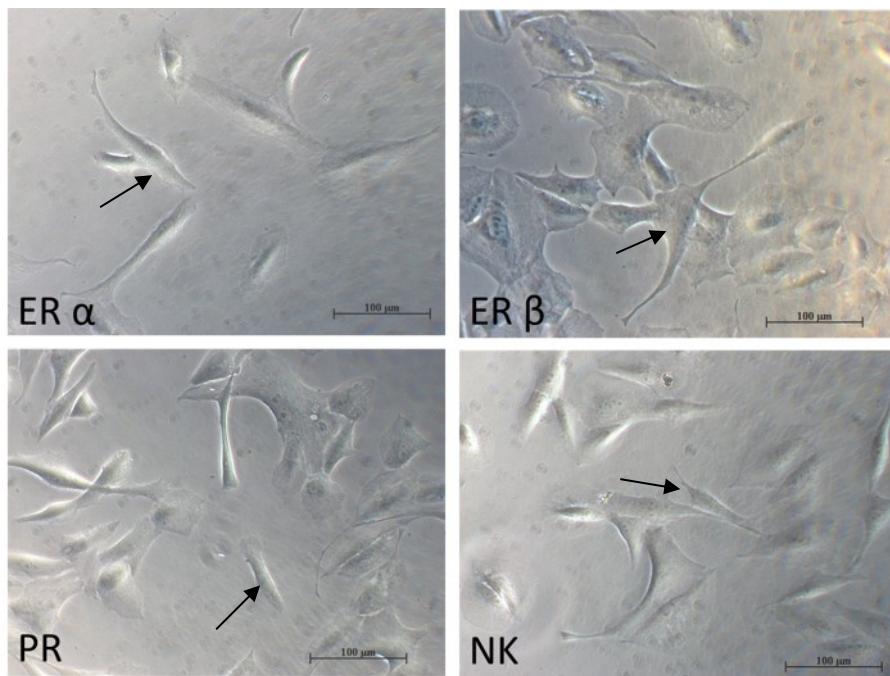


Abbildung 18: MCF10a Zellen nach immunhistochemischer Reaktion, Lichtmikroskopische Aufnahmen, 20x Vergrößerung; bei allen Rezeptoren ist keine rötliche Farbreaktion zu erkennen, was keiner Exprimierung der Rezeptoren entspricht. Negativkontrolle ohne Farbreaktion. ER = Estrogenrezeptor, PR = Progesteronrezeptor, NK = Negativkontrolle, Pfeile zeigen beispielhaft Zellen.

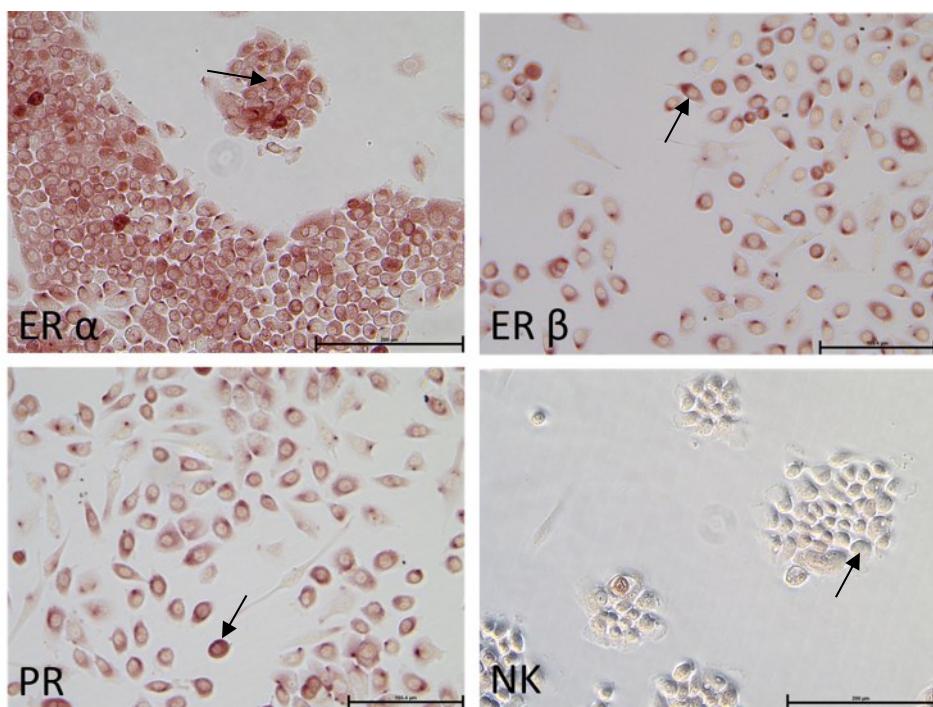


Abbildung 19: MCF12a Zellen nach immunhistochemischer Reaktion, Lichtmikroskopische Aufnahmen, 20x Vergrößerung; bei allen Rezeptoren ist eine rötliche Reaktionen zu erkennen, welche der Exprimierung der Rezeptoren entsprechen. Negativkontrolle ohne Farbreaktion. ER = Estrogenrezeptor, PR = Progesteronrezeptor, NK = Negativkontrolle, Pfeile zeigen beispielhaft Zellen.

4.2 ANALYSE DER EXTRAKTE

Die selbst hergestellten Fenchelextrakte wurden mittels HPLC auf einige vermutete Pflanzenstoffe untersucht. Darüber hinaus erfolgte im Routine-labor der UFK Rostock eine labordiagnostische Untersuchung des verwendeten Fenchelextraktes (Mikrowellenextrakt) auf weitere ausgewählte Inhaltsstoffe.

4.2.1 HPLC

Im Folgenden werden die Ergebnisse der HPLC-Analysen dargestellt. Untersucht wurden sowohl das in Ethanol gelöste Fenchelextrakt als auch das in Wasser aufgebrühte Fenchelextrakt. Um zu prüfen, welche Substanzen in den Extrakten vorhanden sind, erfolgte ebenfalls die HPLC-Analyse von den in der Literatur beschriebenen, in Fenchel enthaltenen Substanzen Rutin, Estragol, Methyleugenol, Quercetin und Folsäure^{6,19}. Diese wurden in Form von kommerziell erworbenen Reinsubstanzen in der HPLC untersucht und mit den Chromatogrammen der Fenchelextrakte verglichen. So konnte festgestellt werden, ob die Reinsubstanzen in hiesigen Fenchelextrakten vorhanden sind.

Die HPLC Analyse erfolgte hier rein qualitativ, um zu zeigen, welche Reinstoffe im Fenchelextrakt enthalten sind. Eine quantitative Auswertung des Ergebnisses wäre zwar technisch durch Integration der Peaks möglich, bringt aber Schwierigkeiten wie Kalibrations- und Integrationsprobleme mit sich^{73,122}. Da die Mengenbestimmung der Reinsubstanzen im Extrakt nicht Ziel der Arbeit ist, sondern letztlich die Wirkung des gesamten Extraktes untersucht werden soll, wurde auf die quantitative Analyse der Ergebnisse verzichtet.

Die Auswertung der HPLC-Ergebnisse erfolgte mit Prof. Dr. rer. nat. Udo Jeschke, ein Kooperationspartner des Forschungslabors der UFK Rostock.

Für jedes Extrakt beziehungsweise jede Reinsubstanz wurden mindestens zwei Messdurchgänge durchgeführt, um eventuelle Unterschiede in der Ergebnisdarstellung zu prüfen.

Die folgenden Abbildungen zeigen übereinandergelegte HPLC-Graphen von jeweils einem Extrakt und einem Reinstoff. Liegen zwei Peaks übereinander, spricht dies für die gleiche Retentionszeit und den Nachweis des Stoffes.

4.2.1.1 FENCHEL-ETHANOLEXTRAKT (MIKROWELLENEXTRAKT):

Im in Ethanol gelösten Fenchelextrakt konnten mittels HPLC Folsäure, Rutin sowie Estragol (in Spuren) nachgewiesen werden.

ERGEBNISSE

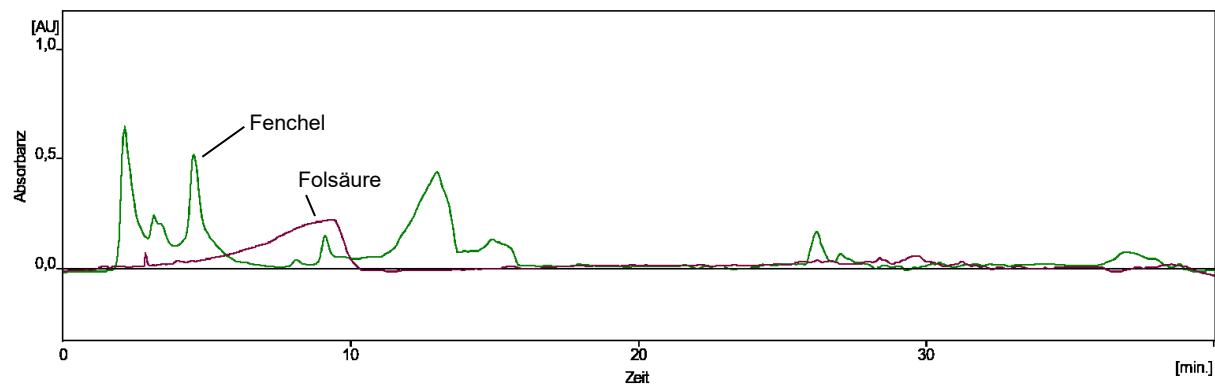


Abbildung 20: HPLC Nachweis Folsäure. Ordinate \triangleq Absorbanz in Absorbance Unit, Abszisse \triangleq Zeit in min.
Grün: Fenchel-Ethanolextrakt, Weinrot: Folsäure.

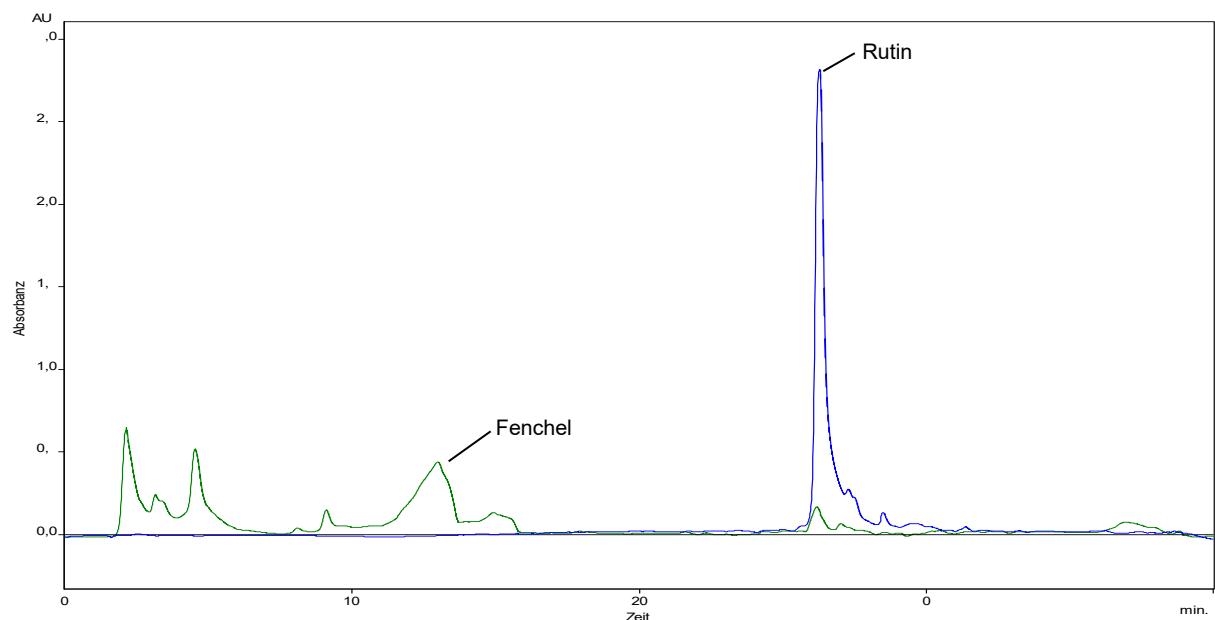


Abbildung 21: HPLC Nachweis Rutin. Ordinate \triangleq Absorbanz in Absorbance Unit, Abszisse \triangleq Zeit in min.
Grün: Fenchel-Ethanolextrakt, Blau: Rutin.

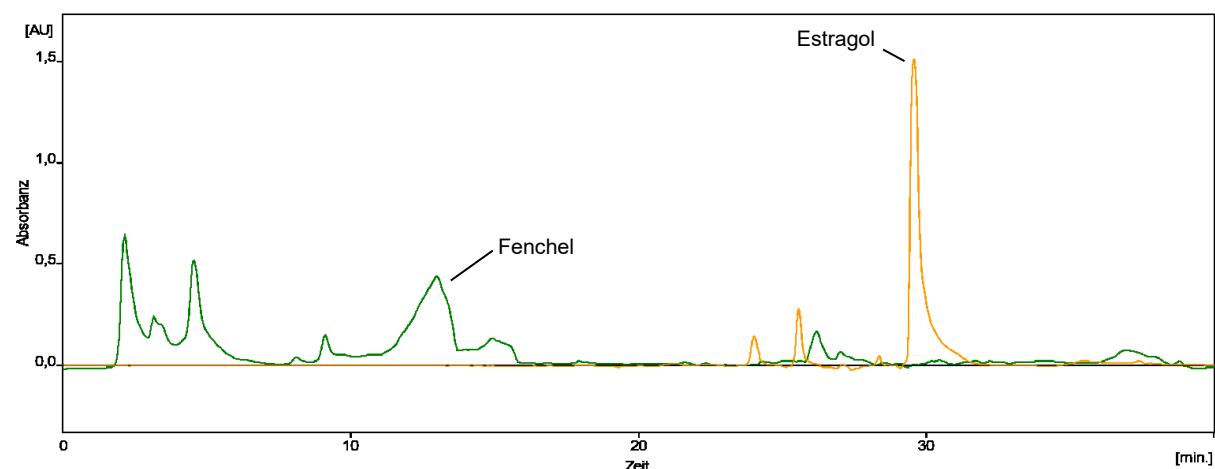


Abbildung 22: HPLC Nachweis Estragol. Ordinate \triangleq Absorbanz in Absorbance Unit, Abszisse \triangleq Zeit in min.
Grün: Fenchel-Ethanolextrakt, Gelb: Estragol.

4.2.1.2 FENCHEL-WASSEREXTRAKT:

In dem, in Wasser gelösten Fenchelextrakt konnte nur Folsäure sicher nachgewiesen werden, wohingegen hier keiner der anderen überprüften Substanzen sicher nachzuweisen war.

Da im Fenchel-Ethanol Extrakt aber zusätzlich Rutin und Estragol nachgewiesen wurden, wurde im Weiteren auf das Mitführen des Fenchel-Wasserextraktes verzichtet und nur die Wirkung des Fenchel-Ethanolextraktes auf die Zellen geprüft.

Die folgenden Grafiken zeigen den Nachweis der Folsäure im Fenchel-Wasserextrakt sowie die nicht nachzuweisenden Stoffe Rutin und Estragol. Die Chromatogramme der Reinsubstanzen sind jeweils mit dem des Extraktes überlagert.

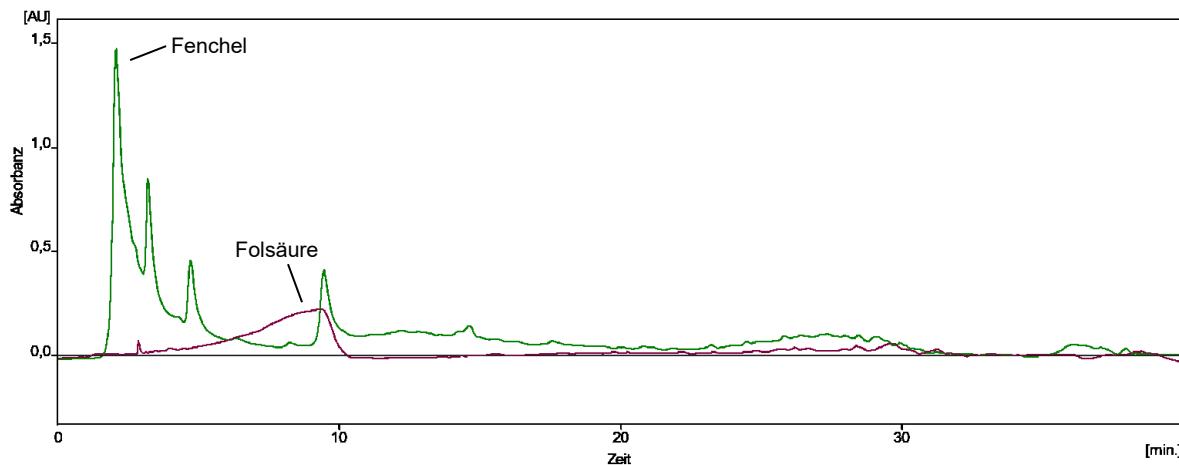


Abbildung 23: HPLC Nachweis Folsäure in Wasserextrakt, Ordinate \triangleq Absorbanz in Absorbance Unit, Abszisse \triangleq Zeit in min. Grün: Fenchel-Wasserextrakt, Weinrot: Folsäure.

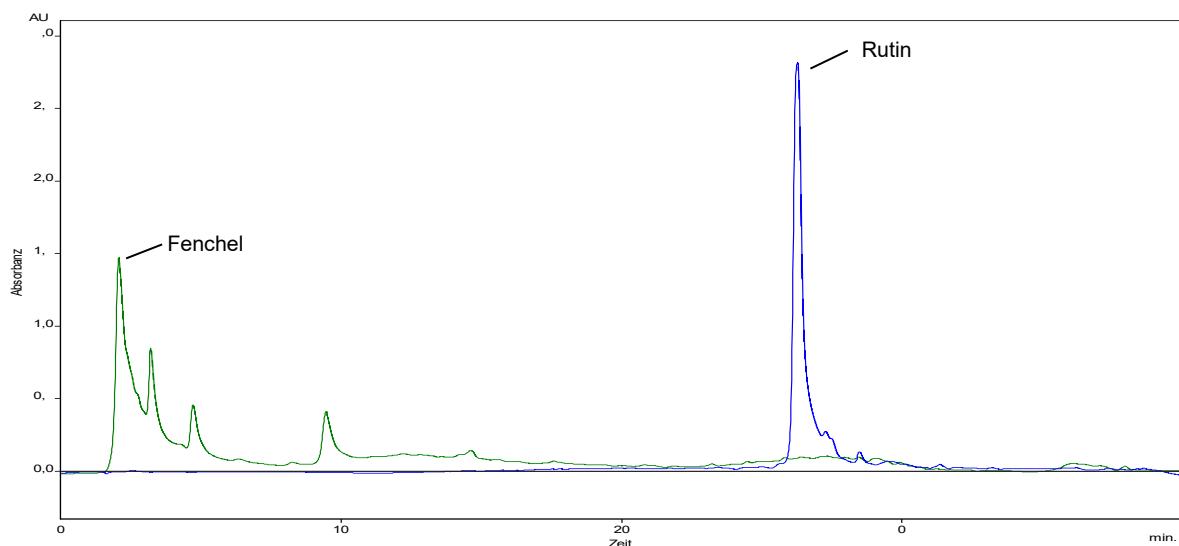


Abbildung 24: HPLC Ergebnis Wasserextrakt, Negativbefund von Rutin, Ordinate \triangleq Absorbanz in Absorbance Unit, Abszisse \triangleq Zeit in min. Grün: Fenchel-Wasserextrakt, Blau: Rutin.

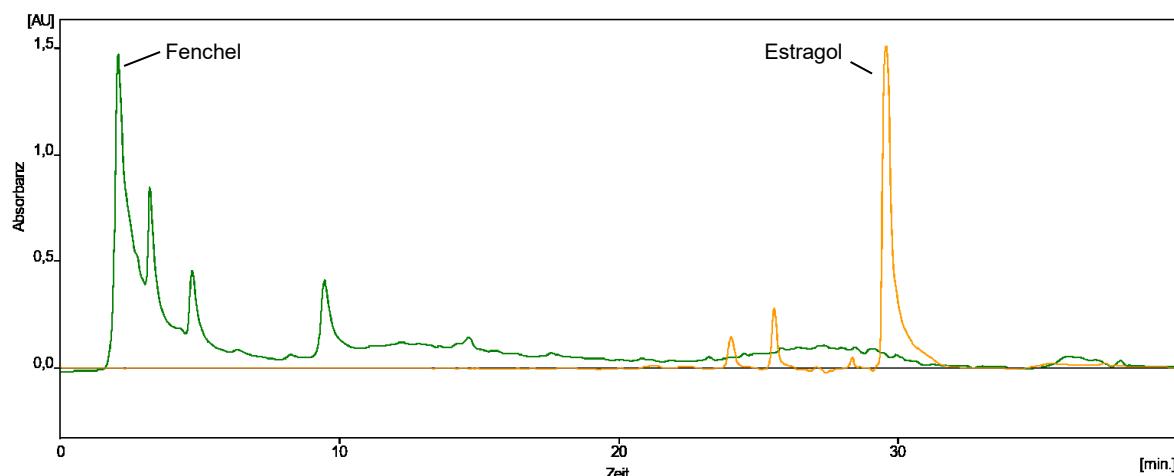


Abbildung 25: : HPLC Ergebnis Wasserextrakt, Negativbefund von Estragol, Ordinate \triangleq Absorbanz in Absorbance Unit, Abszisse \triangleq Zeit in min. Grün: Fenchel-Wasserextrakt, Gelb: Estragol.

4.2.2 UNTERSUCHUNG WEITERER INHALTSSTOFFE

Im Routine-labor des Klinikums Südstadt, Rostock erfolgte die Untersuchung auf weitere in der Literatur beschriebene Inhaltsstoffe von *Foeniculum vulgare*, welche durch automatisierte Messungen schnell im Fenchel-Ethanolextrakt bestimmt werden konnten. Tabelle 11 zeigt die untersuchten Substanzen mit enthaltener Konzentration, wobei Vitamin B12 unter der Nachweisgrenze von 111 pmol/l lag.

Tabelle 11: Konzentrationen weiterer untersuchter Inhaltsstoffe im Extrakt

Untersuchter Inhaltsstoff	Konzentration
Kalium	187 mmol/l
Calcium	14,5 mmol/l
Eisen	24,5 μ mol/l
Vitamin B12	< 111 pmol/l

4.3 IN-VITRO ZELLTESTE

Im Folgenden werden die Ergebnisse aller in-vitro Zelltests, der beiden Zelllinien (MCF10a und MCF12a) vergleichend dargestellt.

Die untersuchten Lösungsmittel sind im Verhältnis zu den unbeeinflussten Zellen „Medium + Zellen“ aufgetragen. Die Grafiken der Untersuchungssubstanzen (Extrakte, Rutin, Estragol, Folsäure) sind prozentual zu den jeweiligen Lösungsmitteln aufgetragen, um Effekte der Lösungsmittel auf die Zellen zu eliminieren (Tabelle 4).

Zur Darstellung der Ergebnisse sind die Mittelwerte der Referenzgruppe „Medium + Zellen“ einem Wert von 100% gleichgesetzt.

4.3.1 CELLTITER-GLO® LUMINESZENZTEST

Im Folgenden sind die Ergebnisse des CellTiter-Glo® Tests der Firma Promega für die Zelllinien MCF10a und MCF12a dargestellt. Der CellTiter-Glo Test stellt die Zellviabilität mithilfe des in den Zellen vorhandenen ATP dar.

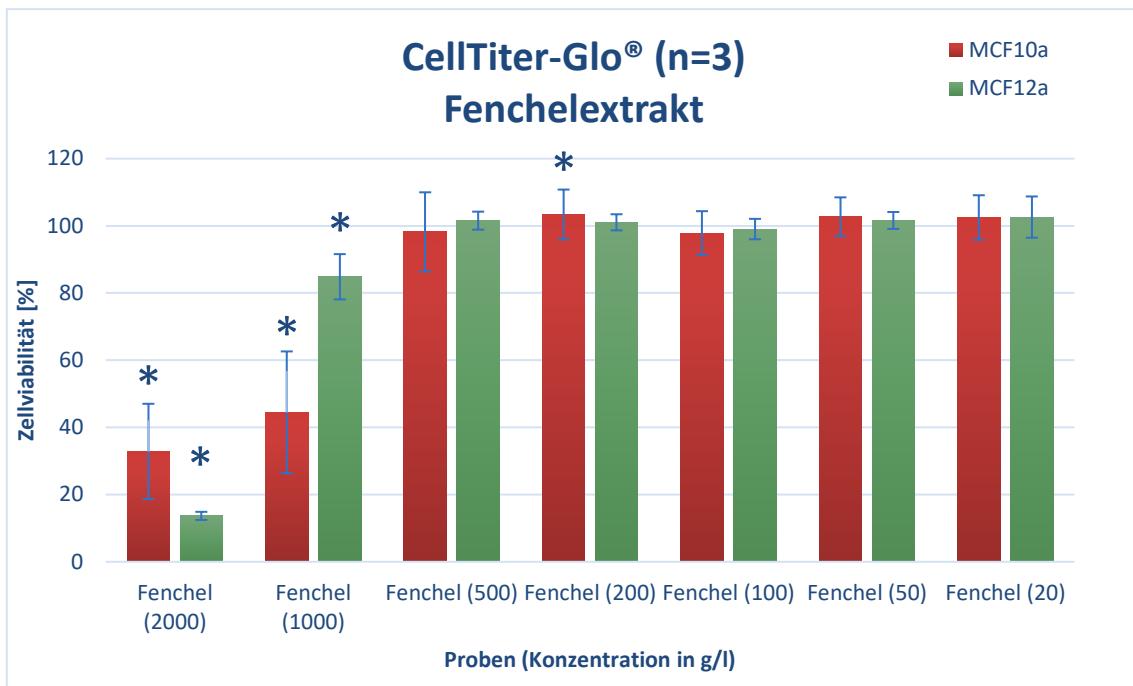


Abbildung 26: Zellviabilität MCF10a und MCF12a (n=3): CellTiter-Glo® / Promega nach 24 h; Einfluss des Fenchelextraktes in verschiedenen Konzentrationen auf die Viabilität der Zellen im Verhältnis zum Lösungsmittel (70 % Ethanol). Dargestellt sind die Mittelwerte der drei Testdurchgänge mit Standardabweichungen und Signifikanzen; * \triangleq signifikanter Wirkung in Bezug auf Referenzen ($p < 0,05$).

Im CellTiter-Glo Test zeigt sich sowohl für MCF10a als auch für MCF12a eine signifikante Hemmung der Zellviabilität (CV) durch die zwei höchsten Konzentrationen des Fenchelextraktes. Mit dem 100 % Extrakt (2000 g/l) wird bei beiden Zellreihen die Viabilität hochsignifikant gehemmt und die ED₅₀ erreicht (MCF10a: CV = 32,9 % SD \pm 14,2, $p < 0,001$; MCF12a: CV = 13,7 % SD \pm 1,2, $p < 0,001$). In der Konzentration von 1000 g/l erreicht allerdings nur noch MCF10a die ED₅₀. Die Ergebnisse zeigen sich auch für diesen Extrakt statistisch signifikant ($p < 0,05$). Im Bereich der drei stärksten Extrakte zeigt sich auf beide Zelllinien eine dosisabhängige Wirkung. Die niedriger konzentrierten Extrakte zeigen überwiegend keine signifikante Wirkung auf die Viabilität der Zellen, wobei der 10 % Extrakt (200 g/l) auf MCF10a in diesem Test sogar eine leicht steigernde Wirkung auf die Viabilität hat (CV = 103,4 %, SD \pm 7,4).

Im Vergleich der beiden Zelllinien wirkt der 2000 g/l Extrakt zwar stärker auf MCF12a, der 1000 g/l Extrakt aber stärker auf MCF10a.

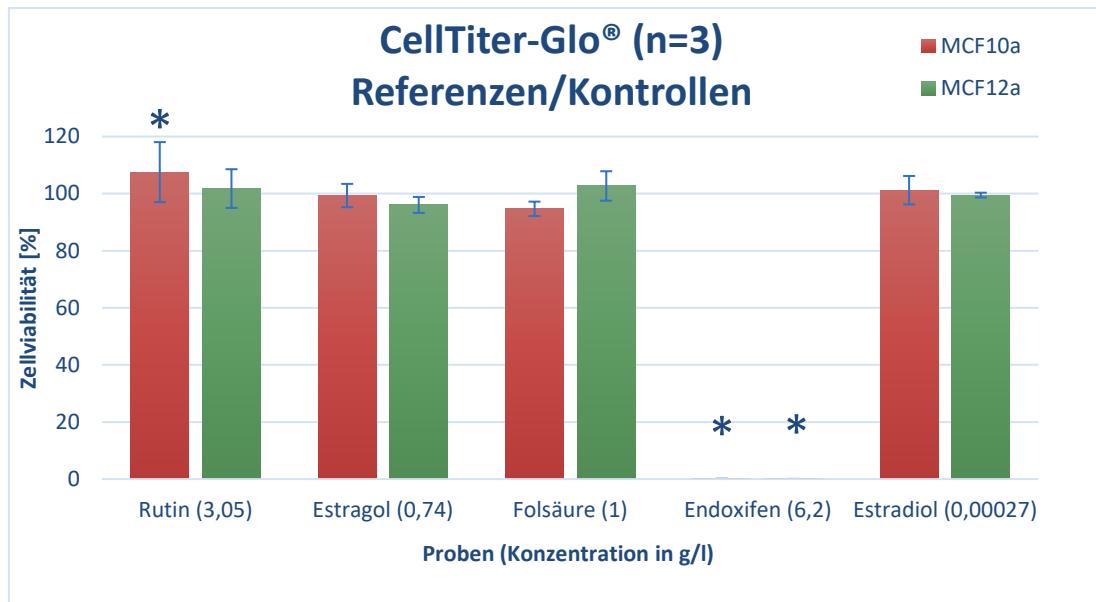


Abbildung 27: Zellviabilität MCF10a und MCF12a (n=3): CellTiter-Glo® / Promega nach 24 h; Einfluss der Referenzproben Rutin, Estragol und Folsäure und der Kontrollen Endoxifen und Estradiol auf die Viabilität der Zellen im Verhältnis zum jeweiligen Lösungsmittel. LM von Rutin = DMSO/Ethanol, LM von Estragol und Folsäure = 99 % Ethanol, LM von Estradiol und Endoxifen = 70 % Ethanol. Dargestellt sind die Mittelwerte der drei Testdurchgänge mit Standardabweichungen und Signifikanzen; * \triangleq signifikanter Wirkung in Bezug auf Referenzen ($p < 0,05$).

Unter Estradioleinwirkung verändert sich die Zellviabilität im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant (MCF10a: CV = 101,2 %, SD \pm 5; MCF12a: CV = 99,5 %, SD \pm 0,9). Endoxifen dagegen zeigt erwartungsgemäß auf beide Zelllinien eine hoch signifikante, fast komplett Hemmung der Zellviabilität (CV = 0,1 %, SD \pm 0,1, $p < 0,001$). Im Verhältnis zu seinem Lösungsmittel zeigt sich bei Rutin eine leicht viabilitätssteigernde Wirkung, wobei das Ergebnis nur bei MCF10a statistisch signifikant ist (MCF10a: CV = 107,5 %, SD \pm 10,5, $p < 0,05$). Für das Einwirken von Estragol und Folsäure konnte keine signifikante Wirkung nachgewiesen werden. MCF10a und 12a vergleichend, zeigen sich kaum Unterschiede in der Wirkung dieser Stoffe.

Das Lösungsmittelgemisch DMSO/Ethanol hat auf MCF10a und MCF12a eine signifikant hemmende Wirkung auf die Viabilität (MCF10a: CV = 81,6 %, SD \pm 8,8, $p < 0,01$; MCF12a: CV = 76,5 %, SD \pm 11, $p < 0,01$). Die beiden anderen verwendeten Lösungsmittel wirken sich in diesem Test nicht signifikant auf die Zellviabilität aus (Abbildung 28).

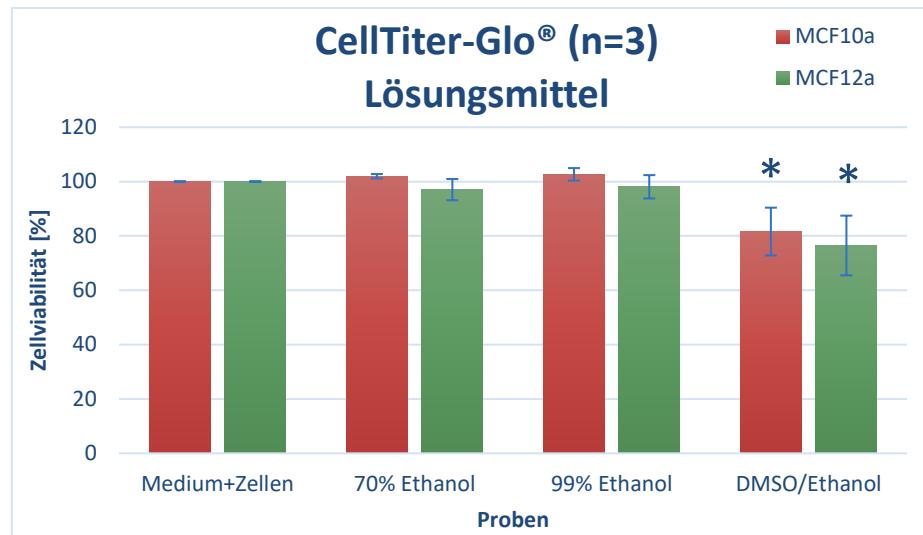


Abbildung 28: Zellviabilität MCF10a und MCF12a (n=3): CellTiter-Glo® / Promega nach 24 h; Einfluss der Lösungsmittel auf die Viabilität der Zellen im Verhältnis zu unbeeinflussten Zellen (Medium+Zellen). Dargestellt sind die Mittelwerte der drei Testdurchgänge mit Standardabweichungen und Signifikanzen; * \triangleq signifikanter Wirkung in Bezug auf Referenzen ($p < 0,05$).

4.3.2 BrDU TEST

Im Folgenden sind die Ergebnisse der BrdU-Tests der Firma Roche für die Ziellinien MCF10a und MCF12a dargestellt. Bei dem Test handelt es sich um einen Zellproliferationstest zur Ermittlung neu synthetisierter DNA.

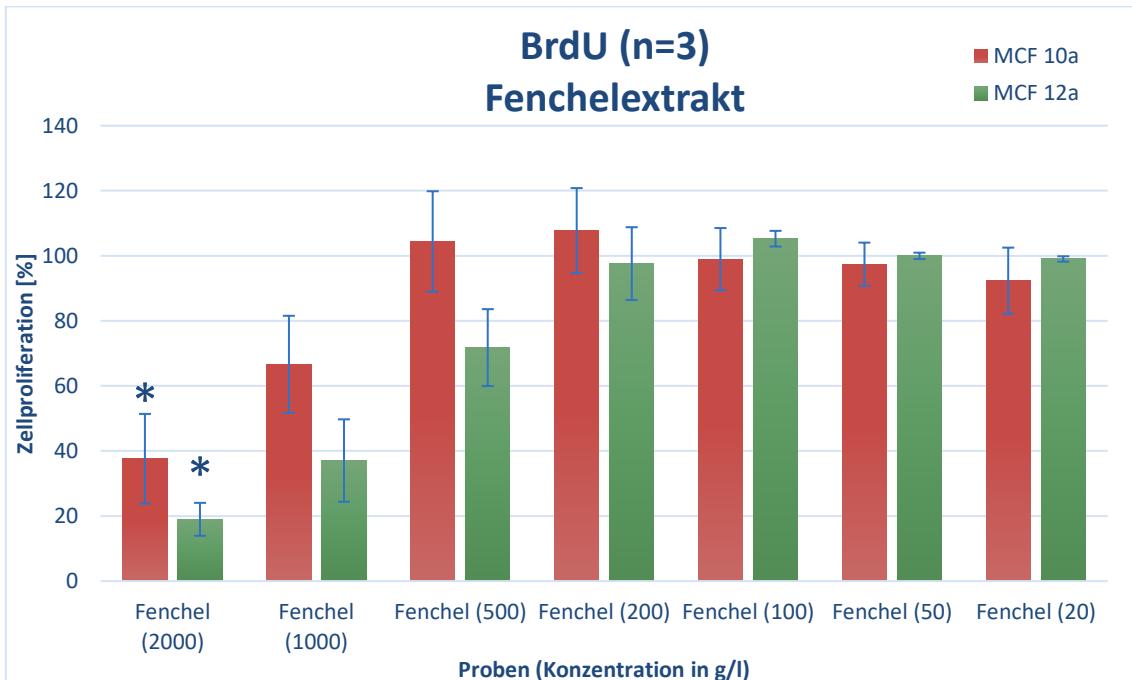


Abbildung 29: Zellproliferation MCF10a und MCF12a (n=3): BrdU Test / Roche nach 24 h; Einfluss des Fenchelextraktes in verschiedenen Konzentrationen auf die Viabilität der Zellen im Verhältnis zum Lösungsmittel (70 % Ethanol). Dargestellt sind die Mittelwerte der drei Testdurchgänge mit Standardabweichungen und Signifikanzen; * \triangleq signifikanter Wirkung in Bezug auf Referenzen ($p < 0,05$).

Der Fenchelextrakt zeigt im BrdU-Zellproliferationstest für beide Zelllinien eine dosisabhängige Hemmung der Proliferation über die vier stärksten Konzentrationen des Extraktes. Mit steigender Konzentration nimmt die Zellproliferation (CP) ab. So lässt sich bei diesem Test gut eine Dosis-Wirkungs-Beziehung nachvollziehen (MCF10a: $r = -0,98$; MCF12a: $r = -0,93$). Die Einwirkung des stärksten Fenchelextraktes zeigt auf MCF10a und MCF12a eine signifikante Hemmung der Zellproliferation, welche jeweils unter der ED₅₀ liegt (MCF10a: CP = 37,6 %, SD ± 13,7, $p < 0,05$; MCF12a: CP = 19 %, SD ± 5,1, $p < 0,001$). Für MCF12a liegt die CP auch bei dem 50 %-Extrakt (1000 g/l) unter der ED₅₀ (CP = 37,1 %, SD ± 12,7), für MCF10a wird diese nicht erreicht. Im BrdU Test zeigt die Extraktkonzentration von 500 g/l auf MCF10a keine wachstumshemmende Wirkung mehr (CP = 104,4 %, SD ± 15,4). Bei MCF12a dagegen hemmt auch diese Verdünnungsstufe noch das Zellwachstum (CP = 71,8 %, SD ± 11,8). In niedrigeren Konzentrationen können auf beide Zelllinien kaum noch Wirkungen auf die Zellproliferation nachgewiesen werden. In diesem Test zeigen sich die Extrakte auf die rezeptorpositiven MCF12a Zellen, insgesamt stärker proliferationshemmend als auf MCF10a.

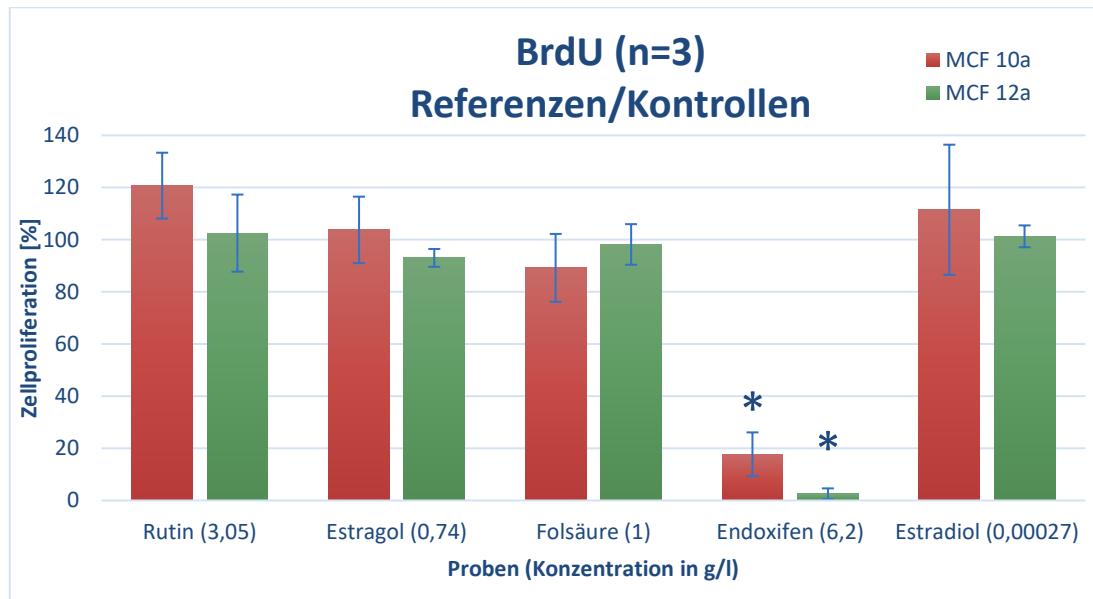


Abbildung 30: Zellproliferation MCF10a und MCF12a (n=3): BrdU-Test / Roche nach 24 h; Einfluss der Referenzproben Rutin, Estragol und Folsäure und der Kontrollen Endoxifen und Estradiol auf die Viabilität der Zellen im Verhältnis zum jeweiligen Lösungsmittel. LM von Rutin = DMSO/Ethanol, LM von Estragol und Folsäure = 99 % Ethanol, LM von Estradiol und Endoxifen = 70 % Ethanol. Dargestellt sind die Mittelwerte der drei Testdurchgänge mit Standardabweichungen und Signifikanzen; * ≈ signifikanter Wirkung in Bezug auf Referenzen ($p < 0,05$).

Bei den Referenzen und Kontrollen erreicht nur Endoxifen für beide Zelllinien eine statistisch hochsignifikante Proliferationshemmung unter der ED₅₀ (MCF10a: CP = 17,7 %, SD ± 8,4, $p < 0,001$; MCF12a: CP = 2,5 %, SD ± 2,1, $p < 0,001$). Estradiol und Rutin zeigen im Vergleich zu ihren Lösungsmitteln einen proliferationssteigernden Effekt (Estradiol: CP = 111,5 %, 101,3 %; Rutin: CP = 120,7 %, 102,5 %). Die Wirkung von Estragol auf die Zellen hat für

MCF10a einen leicht steigernden, für MCF12a einen leicht hemmenden Effekt. Folsäure wirkt auf beide Zelllinien leicht hemmend auf das Zellwachstum (CP = 89,2 %, 98,2 %).

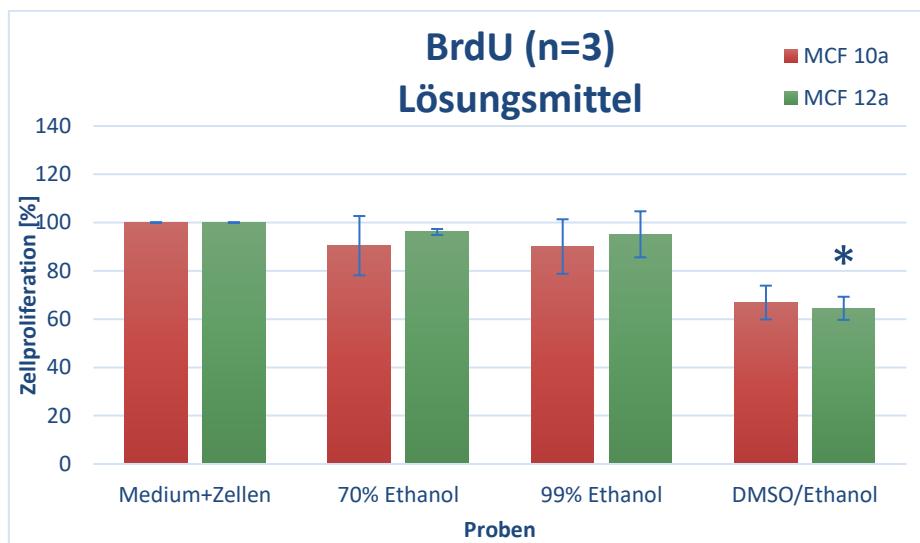


Abbildung 31: Zellproliferation MCF10a und MCF12a (n=3): BrdU-Test / Roche nach 24 h; Einfluss der Lösungsmittel auf die Viabilität der Zellen im Verhältnis zu unbeeinflussten Zellen (Medium+Zellen). Dargestellt sind die Mittelwerte der drei Testdurchgänge mit Standardabweichungen und Signifikanzen; * \triangleq signifikanter Wirkung in Bezug auf Referenzen ($p < 0,05$).

Das DMSO/Ethanol Gemisch wirkt ebenfalls proliferationshemmend auf die Zelllinien (MCF10a: CP = 66,9 %, SD \pm 7; MCF12a: CP = 64,5 %, SD \pm 4,8), wobei das Ergebnis für MCF12a auch statistisch signifikant ist ($p < 0,01$). Der 70 %- sowie der absolute Ethanol zeigen leichte, nicht signifikante proliferationshemmende Effekte.

4.3.3 CYTOTOX-GLOTM-TEST

Im Folgenden werden die Ergebnisse der CytoTox-GloTM Tests der Firma Promega, für die Zelllinien MCF10a und MCF12a dargestellt. Es handelt sich um einen Zytotoxizitäts- bzw. Viabilitätstest, zur Ermittlung der toten bzw. im Umkehrschluss vitalen Zellen mittels der aus toten Zellen freigesetzten Enzymen.

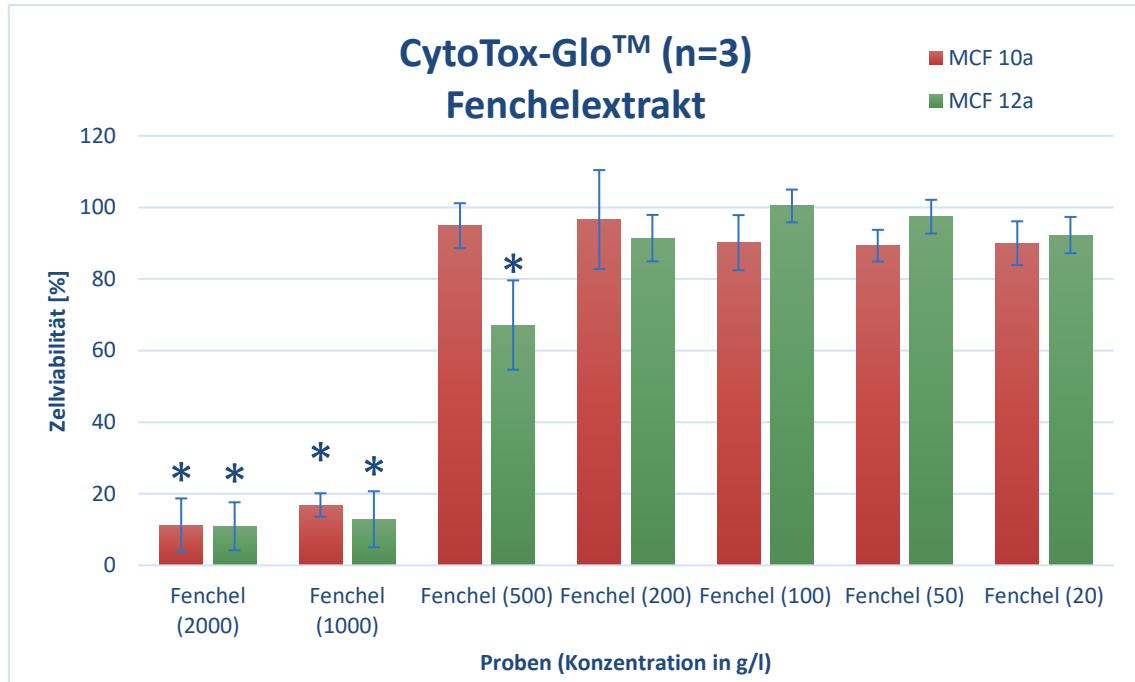


Abbildung 32: Zellviabilität MCF10a und MCF12a (n=3): CytoTox-Glo™ / Promega nach 24 h; Einfluss des Fenchelextraktes in verschiedenen Konzentrationen auf die Viabilität der Zellen im Verhältnis zum Lösungsmittel (70 % Ethanol). Dargestellt sind die Mittelwerte der drei Testdurchgänge mit Standardabweichungen und Signifikanzen; * ≈ signifikanter Wirkung in Bezug auf Referenzen ($p < 0,05$).

Bei dem CytoTox-Glo™-Test zeigt sich im Unterschied zu vielen anderen Tests sowohl beim stärksten als auch beim zweitstärksten Fenchelextrakt eine Hemmung der Zellviabilität, welche für beide Zelllinien deutlich unterhalb der ED_{50} liegen (MCF10a: CV = 11,3 % / 16,9 %, SD \pm 7,4 / 3,3; MCF12a: CV = 10,9 % / 12,9 %, SD \pm 6,7 / 7,8). Diese vier Mittelwerte wurden auf statistische Signifikanz geprüft und erwiesen sich als signifikant ($p < 0,05$) hemmend im Vergleich zu ihrem Lösungsmittel. Im Unterschied zu MCF10a, zeigt MCF12a auch beim 20 %-Extrakt (500 g/l) eine signifikante Viabilitätshemmung. In dieser Konzentration wird die ED_{50} allerdings nicht mehr erreicht (CV = 67,2 %, SD \pm 12,5). Die übrigen, stark verdünnten Extrakte zeigen nur noch sehr schwach hemmende Effekte auf die Zellviabilität der Zellen (CV = 89,3 % - 100%). Große Unterschiede zwischen den Zelllinien können, außer der verschiedenen starken Wirkung der 500 g/l Extraktkonzentration, nicht gezeigt werden.

Auch im CytoTox-Glo Test wirkt Endoxifen auf beide Zelllinien hoch signifikant viabilitätshemmend und unterbietet die ED_{50} stark (MCF10a: CV = 9,3 %, SD \pm 7,7, $p < 0,01$; MCF12a: CV = 5,9 %, SD \pm 1,6, $p < 0,001$). Estradiol, Rutin, Estragol, sowie Folsäure wirken mit Ausnahme von Rutin auf MCF10a (CV = 103,3 %), leicht viabilitätshemmend auf die Zellen (CV = 90,6 % - 96,1 %), (Abbildung 33).

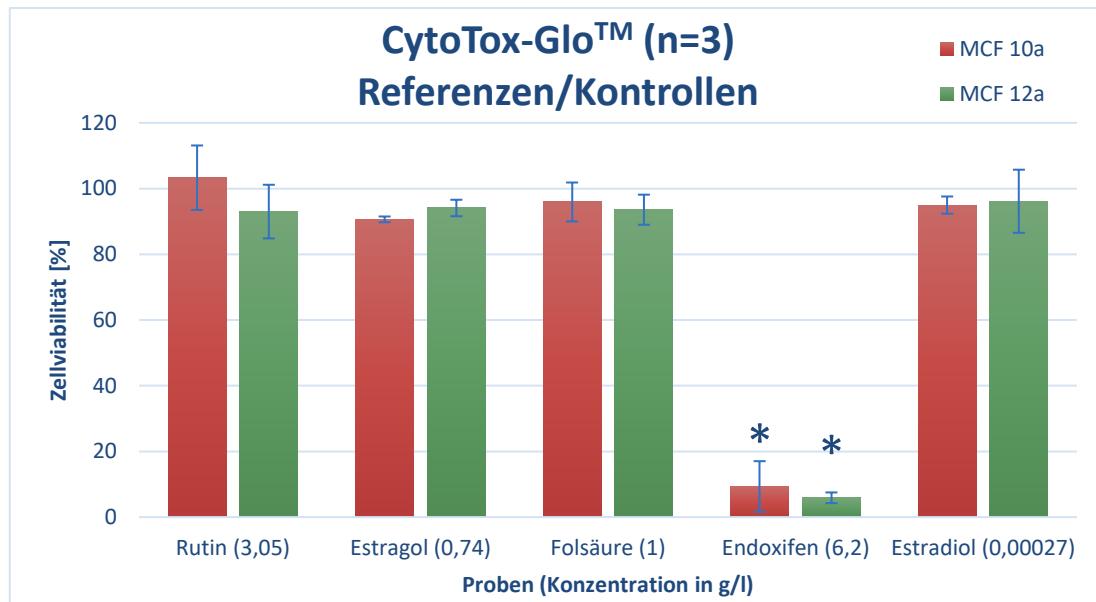


Abbildung 33: Zellviabilität MCF10a und MCF12a (n=3):CytoTox-Glo™ / Promega nach 24 h; Einfluss der Referenzproben Rutin, Estragol und Folsäure und der Kontrollen Endoxifen und Estradiol auf die Viabilität der Zellen im Verhältnis zum jeweiligen Lösungsmittel. LM von Rutin = DMSO/Ethanol, LM von Estragol und Folsäure = 99 % Ethanol, LM von Estradiol und Endoxifen = 70 % Ethanol. Dargestellt sind die Mittelwerte der drei Testdurchgänge mit Standardabweichungen und Signifikanzen; * \triangleq signifikanter Wirkung in Bezug auf Referenzen ($p < 0,05$).

Das Einwirken des Lösungsmittel „DMSO/Ethanol“ zeigt auf die Mammazellen zytotoxische bzw. viabilitätshemmende Effekte (MCF10a: CV = 69,3 %, SD \pm 17,4; MCF12a: CV = 65,4 %, SD \pm 6,2), welche sich bei MCF12a statistisch signifikant zeigen ($p < 0,01$). Die anderen Lösungsmittel hingegen zeigen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Medium+Zellen), im CytoTox-Glo™ Test keinen signifikanten Einfluss auf die Zellviabilität (Abbildung 34).

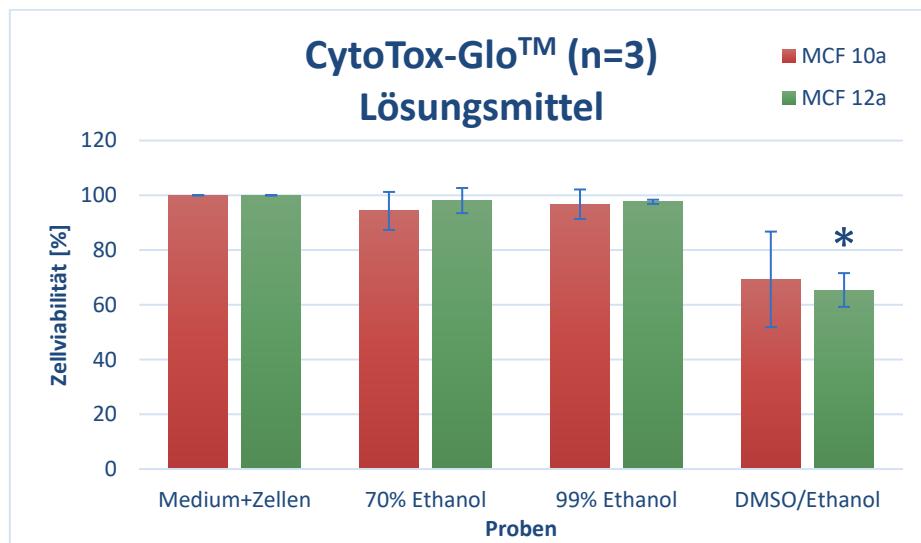


Abbildung 34: Zellviabilität MCF10a und MCF12a (n=3):CytoTox-Glo™ / Promega nach 24 h; Einfluss der Lösungsmittel auf die Viabilität der Zellen im Verhältnis zu unbeeinflussten Zellen (Medium+Zellen). Dargestellt sind die Mittelwerte der drei Testdurchgänge mit Standardabweichungen und Signifikanzen; * \triangleq signifikanter Wirkung in Bezug auf Referenzen ($p < 0,05$).

4.3.4 NEUTRALROT TEST

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Neutralrot-Tests der Firma Sigma-Aldrich dargestellt. Dieser spiegelt anhand der Aufnahme eines roten Farbstoffes in Lysosomen ausschließlich viabler Zellen, die Menge aller vitalen Zellen wider und fungiert so als Zellviabilitätstest.

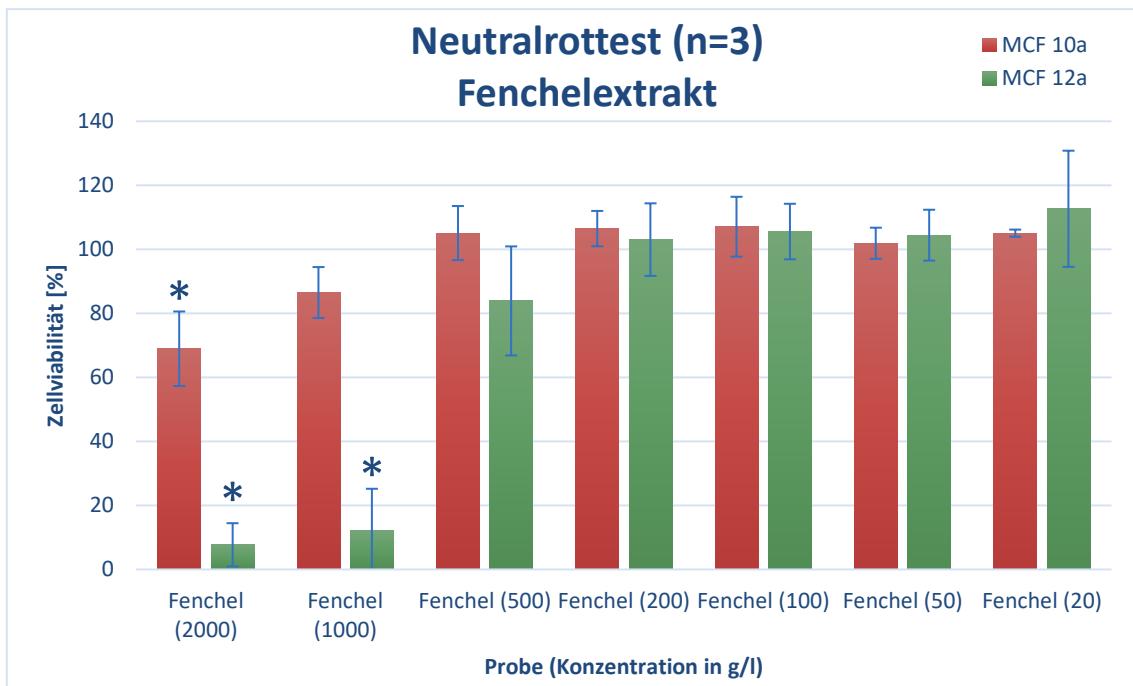


Abbildung 35: Zellviabilität MCF10a und MCF12a (n=3): Neutralrot-Test / Sigma-Aldrich nach 24 h; Einfluss des Fenchelextraktes in verschiedenen Konzentrationen auf die Viabilität der Zellen im Verhältnis zum Lösungsmittel (70 % Ethanol). Dargestellt sind die Mittelwerte der drei Testdurchgänge mit Standardabweichungen und Signifikanz; * \triangleq signifikanter Wirkung in Bezug auf Referenzen ($p < 0,05$).

Im Neutralrotttest wird ein deutlicher Unterschied zwischen den hormonrezeptornegativen MCF10a Zellen und den ER+ MCF12a Zellen sichtbar. Der stärkste Fenchelextrakt wirkt zwar bei beiden signifikant hemmend auf die Viabilität, die ED₅₀ wird aber nur bei MCF12a erreicht (MCF10a: CV = 69 %, SD \pm 11,6, $p < 0,01$; MCF12a: CV = 7,7 %, SD \pm 6,7, $p < 0,001$). Bei halber Konzentration des Extraktes zeigt MCF10a nur noch leicht gehemmte Zellviabilität (CV = 86,5 %, SD \pm 8), MCF12a dagegen zeigt immer noch signifikante Hemmung deutlich unter der ED₅₀ (CV = 12,2 %, SD \pm 13, $p < 0,001$). Wirkt die 500 g/l Extraktkonzentration bei MCF12a noch leicht hemmend auf die Viabilität (CV = 83,9 %, SD \pm 17), so hat diese Extraktstärke des Fenchels bei MCF10a bereits leicht steigernde Effekte (CV = 105,1 %, SD \pm 8,4). Alle niedrigeren Dosierungen des Extraktes wirken auf beide Mammazelllinien im Verhältnis zu ihrem Lösungsmittel 70 % Ethanol, leicht viabilitätssteigernd (CV = 101,9 % - 112,6 %). Statistisch signifikant ($p < 0,05$) sind allerdings nur die Ergebnisse des 100 % und des 50 % Extraktes (2000 g/l, 1000 g/l). Innerhalb der jeweiligen Zelllinie zeigt sich eine dosisabhängige Wirkung auf die Zellviabilität.

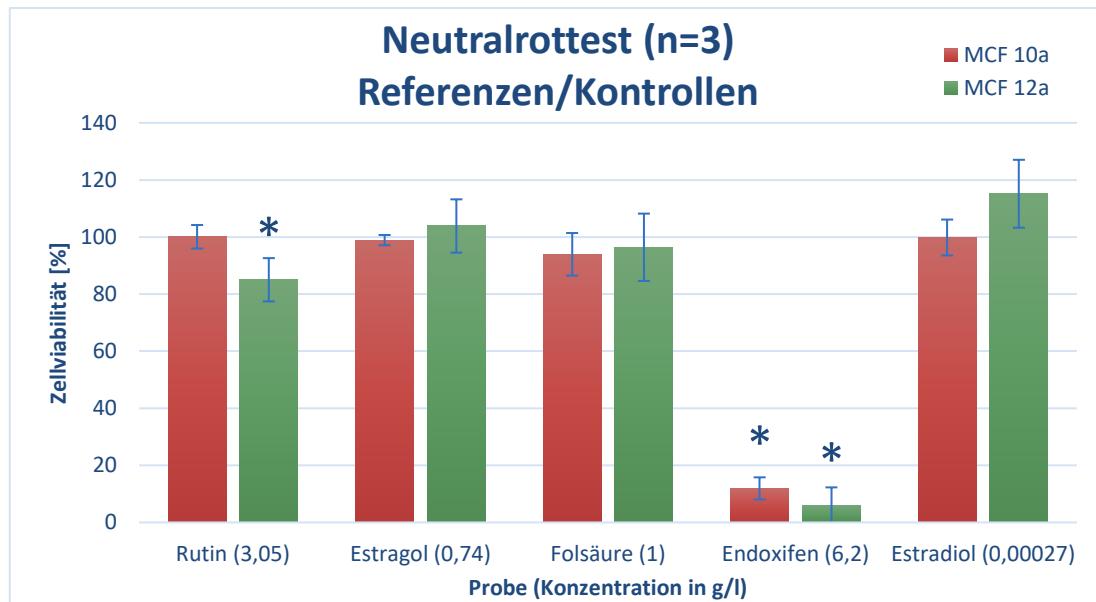


Abbildung 36: Zellviabilität MCF10a und MCF12a (n=3):Neutralrot-Test / Sigma-Aldrich nach 24 h; Einfluss der Referenzproben Rutin, Estragol und Folsäure und der Kontrollen Endoxifen und Estradiol auf die Viabilität der Zellen im Verhältnis zum jeweiligen Lösungsmittel. LM von Rutin = DMSO/Ethanol, LM von Estragol und Folsäure = 99 % Ethanol, LM von Estradiol und Endoxifen = 70 % Ethanol. Dargestellt sind die Mittelwerte der drei Testdurchgänge mit Standardabweichungen und Signifikanzen; * \triangleq signifikanter Wirkung in Bezug auf Referenzen ($p < 0,05$).

Auch im Neutralrotttest zeigt nur die Kontrollsubstanz Endoxifen eine signifikante Viabilitäts-hemmung unter der ED₅₀ (MCF10a: CV = 11,9 %, SD \pm 3,9, $p < 0,001$; MCF12a: CV = 6 %, SD \pm 6,2, $p < 0,001$). Die Vergleichssubstanz Estradiol steigert in diesem Test die Zellviabilität von MCF12a um 15 % (SD \pm 11,9) im Vergleich zum Lösungsmittel. Das Einwirken von Estragol und Folsäure ändert nach wie vor nicht viel an der Zellviabilität. Steigert Estragol die Viabilität bei MCF12a leicht (CV = 103,9 %, SD \pm 9,3), hemmt es diese bei MCF10a dagegen geringfügig (CV = 98,9 %, SD \pm 1,8). Rutin zeigt im Verhältnis zum Lösungsmittel bei MCF12a eine signifikant hemmende Wirkung (CV = 85 %, SD \pm 7,6). Folsäure hemmt die Viabilität beider Zelllinien leicht (CV = 93,9 % / 96,4 %). Im Vergleich der beiden Linien fällt außer der etwas gesteigerten Viabilität durch Estradiol auf MCF12a, im Neutralrot-Test kein großer Unterschied auf.

Die Lösungsmittel 70 % Ethanol und absoluter Ethanol zeigen auch in diesem Test im Vergleich zu den unbehandelten Zellen nur geringe Wirkung auf diese (CV = 99,8 % / 92,4%). DMSO/Ethanol wirkt im Vergleich zu den anderen Tests in diesem nicht so stark viabilitäts-hemmend (CV = 88,4 % / 100,9 %), (Abbildung 37).

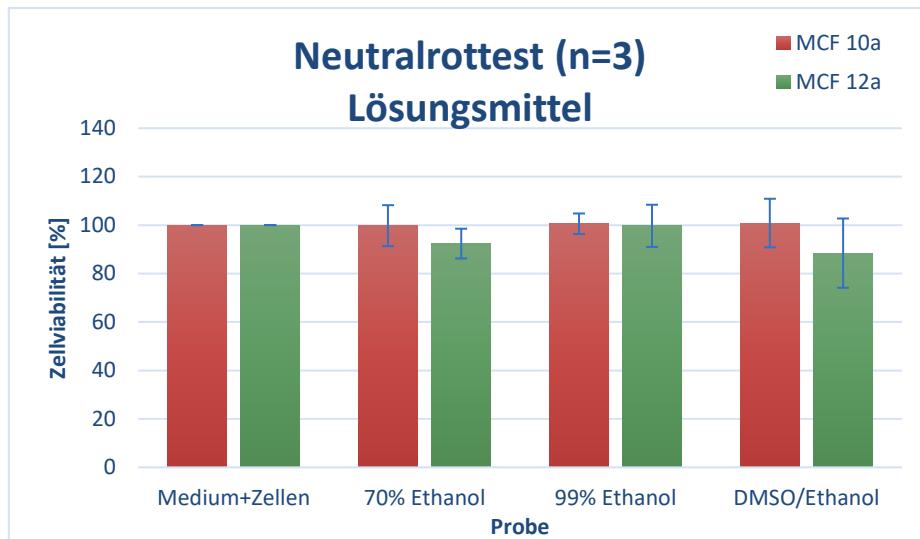


Abbildung 37: Zellviabilität MCF10a und MCF12a (n=3):Neutralrot-Test / Sigma-Aldrich nach 24h; Einfluss der Lösungsmittel auf die Viabilität der Zellen im Verhältnis zu unbeeinflussten Zellen (Medium+Zellen). Dargestellt sind die Mittelwerte der drei Testdurchgänge mit Standardabweichungen.

4.3.5 FAZIT DER IN-VITRO ZELLTESTS

In allen durchgeführten Untersuchungen zur Zellviabilität und Zellproliferation wirkt sich die Kontrollsubstanz Endoxifen, am stärksten hemmend aus. Dabei fällt auf, dass Endoxifen in allen Zelltests auf die MCF12a Zellen mindestens gleich stark (CellTiter-Glo), oder stärker als auf MCF10a wirkt.

Den zweitstärksten Effekt zeigt der höchstdosierte Fenchelextrakt (2000 g/l), welcher in allen Tests, außer im Neutralrotttest für MCF10a, die ED₅₀ deutlich unterschreitet. Auch hier zeigt sich deutlich der Trend, dass die Wirkung auf MCF12a stärker ausfällt als auf die rezeptornegativen MCF10a Zellen. Die zweitstärkste Extraktkonzentration zeigt je nach Test und Zelllinie unterschiedlich stark ausgeprägte Hemmung auf Zellviabilität bzw. Proliferation. Die ED₅₀ wird dabei nur noch teilweise unterschritten. Auch hier fällt auf, dass die Hemmung bei MCF12a im Vergleich zu MCF10a überwiegend stärker ausfällt. Der CellTiter-Glo-Test bildet dabei eine Ausnahme, da bei diesem der Extrakt auf MCF12a weniger stark wirkt als auf MCF10a. Alle geringer konzentrierten Extrakte (500 g/l - 20 g/l), konnten mit wenigen Ausnahmen keine signifikante Wirkung mehr zeigen.

Die zur Kontrolle mitgeführten Lösungsmittel 70 % Ethanol und 99 % Ethanol zeigen nur geringe Wirkung mit einer maximalen Hemmung der Viabilität/Proliferation auf 90 % (BrdU, MCF10a), bzw. maximaler Steigerung auf 102,7 % (CellTiter-Glo, MCF10a). Das Lösungsmittel DMSO/Ethanol hingegen zeigt mit reiner Reduktion bis zu 64,5 %, eine deutlich stärkere Hemmung von Zellviabilität und Proliferation. Um diese Effekte der Lösungsmittel zu eliminieren, wurden die Ergebnisse der Testsubstanzen in jeder Testreihe im Verhältnis zu ihrem jeweiligen Lösungsmittel berechnet. So sind die dargestellten Wirkungen primär auf die Test-

stoffe und nicht auf die Lösungsmittel zurückzuführen. Für die Vergleichssubstanz Rutin können keine einheitlichen Ergebnisse erzielt werden. Zeigt sich im Cell-Titer-Glo sowie im BrdU-Test eine Steigerung der Proliferation/Viabilität, so senkt Rutin im Neutralrottet die Viabilität der Zellen. Allerdings liegen die Werte für MCF10a in allen Tests über den Werten von MCF12a (teils proliferierend, teils weniger hemmend). Estragol und Folsäure zeigen keine signifikante Wirkung auf die Viabilität bzw. Proliferation der Zellen. Folsäure wirkt überwiegend leicht hemmend, jedoch ohne Signifikanz. Auch die Vergleichssubstanz Estradiol kann keine Signifikanz vorweisen, liegt aber zwischen 95 % und 115 %, und damit meist nahe im Bereich der unbehandelten Zellen.

4.3.6 GLUKOSE UND LAKTATBESTIMMUNG

Im Folgenden werden die Ergebnisse zur Bewertung der Stoffwechsellage der Zellen mittels Glukose- und Laktatkonzentrationen im Überstand der Zellen dargestellt. Diese Messungen dienten in erster Linie zur Prüfung der Vitalität und wurde in der vorliegenden Studie exemplarisch für jede Zelllinie anhand einer Versuchsreihe durchgeführt. Daher lassen sich diese Ergebnisse nicht auf ihre Signifikanz prüfen.

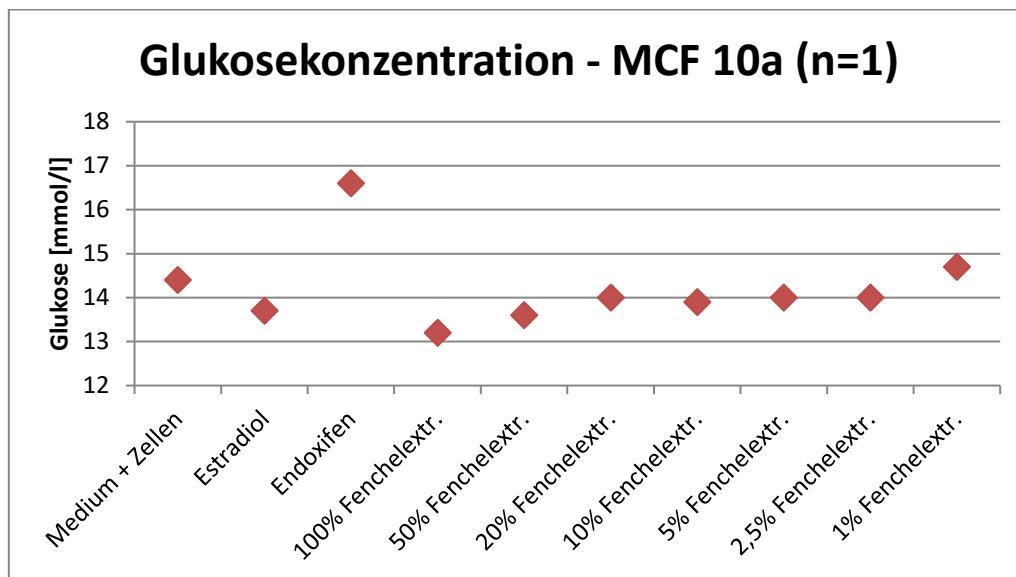


Abbildung 38: Glukosemessung MCF10a (n=1): Glukosekonzentration [mmol/l] im Medium nach 24 h Einwirkung von Estradiol, Endoxifen, den verschiedenen Fenchelextraktkonzentrationen sowie nativ (Medium+Zellen).

Bei der rezeptornegativen Zelllinie MCF10a zeigt sich für die Extrakte ein fast durchgängiger Abfall der Glukosekonzentrationen (Glukose = 13,2 mmol/l für 100 % Extrakt bis 14 mmol/l für 2,5 % Extrakt) im Vergleich zum Referenzwert (Glukose = 14,4 mmol/l). Eine Ausnahme bildet nur das schwächste Extrakt, welches in diesem Fall eine geringe Steigerung der Glukosekonzentration im Extrazellulärraum bewirkt (Glukose = 14,4 mmol/l). Auch Estradiol sorgte für einen Rückgang der Glukosekonzentration auf 13,7 mmol/l. Endoxifen hingegen bewirkt einen

deutlichen Anstieg der Glukose auf 16,6 mmol/l. Die Konzentration der Glukose, des Mediums ohne Zelleinfluss, liegt mit 19,6 mmol/l immer noch höher als der Wert bei Endoxifen.

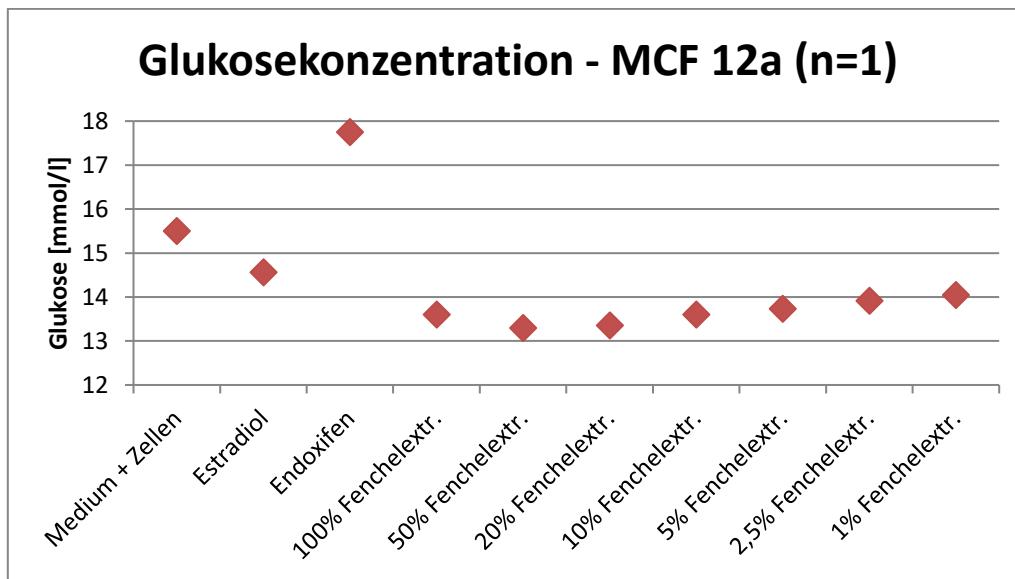


Abbildung 39: Glukosemessung MCF12a (n=1): Glukosekonzentration [mmol/l] im Medium nach 24 h Einwirkung von Estradiol, Endoxifen, den verschiedenen Fenchelextraktkonzentrationen sowie nativ (Medium+Zellen).

Für die rezeptorpositive Zelllinie zeigt sich ein sehr ähnliches Bild der Glukoseergebnisse wie bei den rezeptornegativen. Hier senken alle Extrakte die Glukosekonzentrationen im Zellüberstand (Glukose = 13,29 mmol/l - 14,04 mmol/l), im Vergleich zum Referenzwert Medium + Zellen (Glukose = 15,5 mmol/l). Wobei auch hier das 1 % Extrakt die geringste Hemmung hat. Estradiol zeigt ebenfalls einen Abfall der Glukosekonzentration auf 14,56 mmol/l. Ähnlich wie bei MCF10a zeigt auch hier der Überstand der mit Endoxifen inkubierten Zellen eine gesteigerte Glukosekonzentration (17,75 mmol/l). Damit liegt die Glukosekonzentration nach Endoxifeneinfluss leicht höher als die Glukosekonzentration des unbeeinflussten Mediums (17,56 mmol/l).

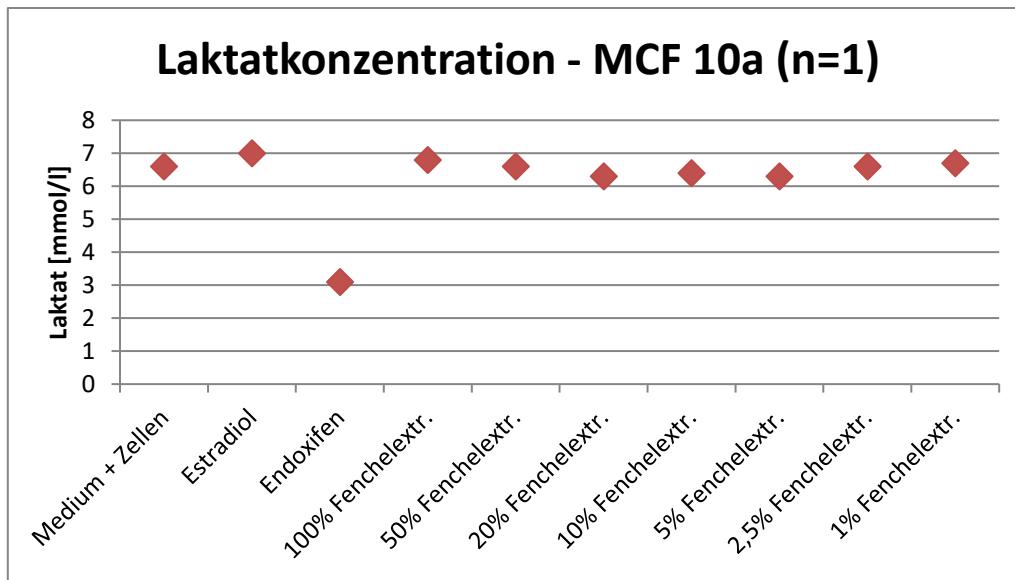


Abbildung 40: Laktatmessung MCF10a (n=1): Laktatkonzentration [mmol/l] im Medium nach 24 h Einwirkung von Estradiol, Endoxifen, den verschiedenen Fenchelextraktkonzentrationen sowie nativ (Medium+Zellen).

Die Extrakte zeigen auf die Laktatkonzentration im Überstand von MCF10a keine deutliche Wirkung. Teils liegen die Laktatwert der Extrakte knapp unter den 6,6 mmol/l der Referenz (20 % Extrakt: 6,3 mmol/l), teilweise sind sie gleich oder liegen knapp darüber (1 % Extrakt: 6,7 mmol/l). Die Laktatkonzentration nach 24 h Inkubation mit Estradiol liegt mit 7 mmol/l über der des Referenzwertes. Ein deutlicher Einfluss auf die Laktatkonzentration ist durch Endoxifen zu sehen. Bei dieser Probe liegt die Konzentration nur noch bei 3,1 mmol/l.

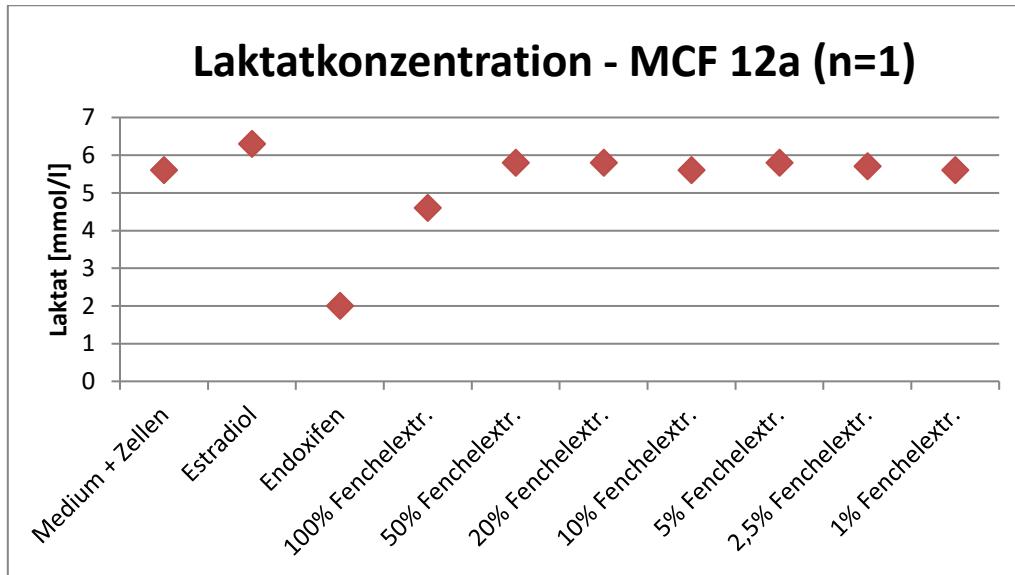


Abbildung 41: Laktatmessung MCF12a (n=1): Laktatkonzentration [mmol/l] im Medium nach 24 h Einwirkung von Estradiol, Endoxifen, den verschiedenen Fenchelextraktkonzentrationen sowie nativ (Medium+Zellen).

Bei den hormonrezeptorpositiven MCF12a Zellen zeigt sich bezüglich der Laktatkonzentration im Zellüberstand ein ähnliches Bild wie bei MCF10. Die Laktatwerte für die 50 % - 1 % Extrakte liegen mit 5,6 mmol/l - 5,8 mmol/l nahe an dem Referenzwert von Medium + Zellen (5,6 mmol/l). Der stärkste Extrakt zeigt dagegen eine deutliche Reduktion der Konzentration auf 4,6 mmol/l. Niedriger liegt die Laktatkonzentration in dieser Versuchsreihe nur bei Endoxifen (2,2 mmol/l). Die Kontrollsubstanz Estradiol führt bei Einwirkung auf MCF12a zu einer leichten Steigerung des Laktatwertes auf 6,3 mmol/l.

4.3.7 pH-WERT BESTIMMUNG

Im Folgenden werden die Ergebnisse zur Bewertung der Stoffwechsellage mittels pH-Wert Messung im Überstand der Zellen dargestellt. Diese Messungen dienten ebenfalls vor allem zur Prüfung der Vitalität und wurden in der vorliegenden Studie exemplarisch für jede Zelllinie anhand einer Versuchsreihe durchgeführt. Daher lassen sich diese Ergebnisse nicht auf ihre Signifikanz prüfen.

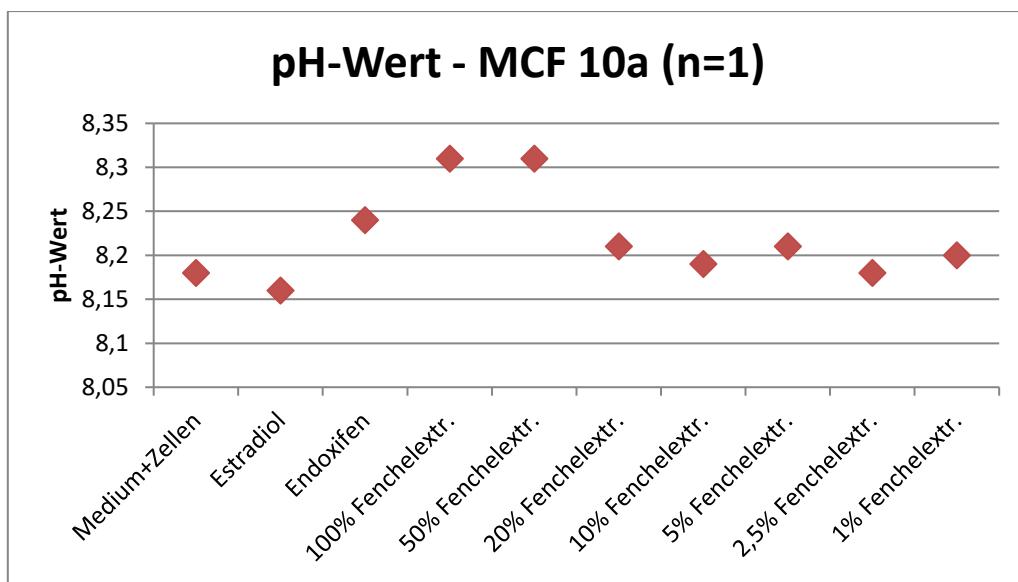


Abbildung 42: pH-Wert Bestimmung MCF10a (n=1): pH-Wert im Medium nach 24 h Einwirkung von Estradiol, Endoxifen, den verschiedenen Fenchelextraktkonzentrationen sowie nativ (Medium+Zellen).

Die Ergebnisse der pH Messung des Zellüberstandes von MCF10a zeigen sowohl für Endoxifen (pH = 8,24), als auch für die Extrakte (pH = 8,18 - 8,31) eine geringe Verschiebung der pH Werte in Richtung basischeren Bereiche, im Vergleich zur Referenz Medium + Zellen (pH = 8,18). Die höchsten pH Werte zeigen die Überstände der Zellen mit den zwei stärksten Fenchelextrakten (pH = 8,31). Die Estradiolprobe liegt mit einem pH Wert von 8,16 als einzige Probe bei MCF10a leicht unterhalb des Referenzwertes.

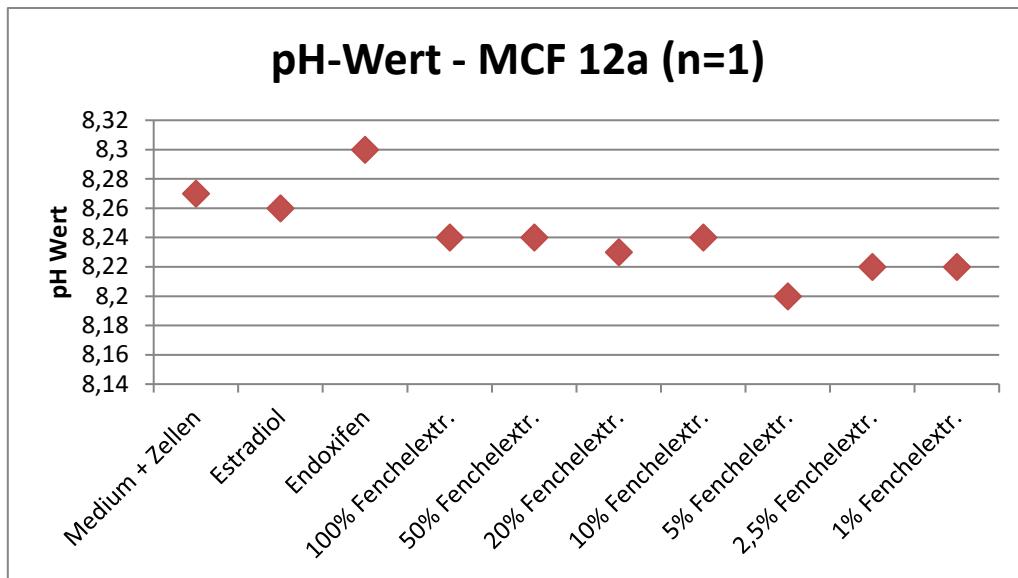


Abbildung 43: pH-Wert Bestimmung MCF12a (n=1): pH-Wert im Medium nach 24 h Einwirkung von Estradiol, Endoxifen, den verschiedenen Fenchelextraktkonzentrationen sowie nativ (Medium+Zellen).

Für die rezeptorpositiven MCF12a Zellen zeigt sich ein anderes Bild. Hier liegen die pH Werte der Extraktproben unter dem Referenzwert von den unbehandelten Zellen (pH = 8,27). Die Überstände der Extrakte zeigen pH Werte zwischen 8,24 (100 % Extrakt) und 8,2 (5 % Extrakt). Der pH Wert des Endoxifenüberstandes (pH = 8,3) ist, wie auch bei MCF10a, höher als der Referenzwert. Für Estradiol zeigt sich mit 8,26 ein marginal niedrigerer pH Wert als für die Referenzprobe.

V. DISKUSSION

Die Pflanzenheilkunde nimmt besonders in der Frauenheilkunde einen immer höheren Stellenwert ein^{88,96}. Da sich die Phytotherapie als Bestandteil der wissenschaftlichen evidenzbasierten Medizin versteht, sind wissenschaftliche Forschungen zur Wirkung der Pflanzen von wichtiger grundlegender Bedeutung.

Dass die Ernährung einen großen Einfluss auf Gesundheit und Krankheit, sowie Einfluss auf die Entstehung von Tumoren hat, ist längst kein Geheimnis mehr. Bereits vor vielen Jahren gab es Studien, welche den Einfluss ernährungsbezogener Faktoren auf die Inzidenz von Krebserkrankungen postulierten⁵⁴. Bereits 1990 beobachteten Simard *et al.* ernährungsbezogene Faktoren auf die Inzidenz von Brustkrebs und benigne Veränderungen der Brust¹⁹⁹. Seit dem gab es eine Vielzahl weiterer Forschungen, die sich mit dem Einfluss der Ernährung auf unterschiedlichste Erkrankungen befassten. Besonders sekundäre Pflanzenstoffe, wie auch die im Fenchel enthaltenen Phytoestrogene, stehen im Fokus dieser Forschungen^{2,151,169}. Ein Großteil der Arbeiten befasst sich allerdings mit der Wirkung isolierter Pflanzenstoffe, woraus Schlüsse auf die Wirkung der Pflanze gezogen werden^{42,119,171}. Bezuglich der Brusterkrankungen ist festzustellen, dass fast ausschließlich Forschungen bezüglich maligner Erkrankungen zu finden sind.

Die Erforschung von Fenchel (*Foeniculum vulgare*) erfährt steigender Beliebtheit und es zeigt sich, dass die Anzahl der Publikationen zur Pflanze in den vergangenen Jahren stark zugenommen hat¹⁹. So gibt es bereits in-vitro, in-vivo und auch randomisierte kontrollierte Studien sowie mehrere Übersichtsarbeiten, die sich mit den Inhaltsstoffen und der Wirkung beschäftigen. Auffällig ist besonders die starke Erforschung der Pflanze im asiatischen Raum. Da die Pflanze dort schon lange als Heilpflanze bekannt ist, besteht möglicherweise verstärktes Interesse daran, diese Wirkungen mit wissenschaftlichen Erkenntnissen zu belegen^{83,114}.

Bezuglich der Wirkung von *Foeniculum vulgare* auf Brusterkrankungen ist die Datenlage allerdings im Vergleich zu anderen Pflanzen noch eher schwach. Studien zu malignen Erkrankungen zeigen bereits eine zytotoxische und proliferationshemmende Wirkung auf die Zelllinie MCF 7 und aktuelle Studien am Mausmodell zeigen einen Rückgang von Brustkrebs durch Fenchelextrakt^{24,141,208}. Für die Wirkung auf benigne Veränderungen der Brust sind aktuell keine Studien zu finden.

Die vorliegende Arbeit sollte dazu beitragen, diese Forschungslücke zu schließen. Daher wurde die Wirkung eines primären Fenchelextraktes sowie einzelner Inhaltsstoffe auf benigne Mammazelllinien mit fibrozystischer Mastopathie untersucht.

5.1 DISKUSSION DER EXTRAKTHERSTELLUNG UND ANALYSE

Die verwendeten Extrakte für diese Arbeit wurden aus einer Pflanze, in Deutschland handelsüblichem Fenchel (*F. vulgare ssp. vulgare var. azoricum*) hergestellt. Durch Verwendung derselben Pflanze für alle Extrakte wurden pflanzenspezifische Unterschiede zwischen den Extrakten möglichst gering gehalten. Allerdings variiert die Zusammensetzung und die Inhaltsstoffe der Fenchelpflanzen aufgrund verschiedenster Ursachen: M.Koudela *et al.* zeigten, dass der Gehalt an Vitaminen, Mineralien und Ballaststoffen je nach Jahr sowie aufgrund verschiedener Anbauzeiträume innerhalb des Jahres variiert¹¹⁶. Agarwal *et al.* beschreiben Unterschiede im Vorkommen von Fettsäuren, welches vom Klima sowie der Anbauweise abhängt⁴. Des Weiteren werden Unterschiede in der Zusammensetzung durch den Erntezeitpunkt der Erdbeschaffenheit oder der Pflanzensorte beschrieben^{114,212}. Die Inhaltsstoffe decken sich studienübergreifend aber größtenteils und variieren vor allem quantitativ^{19,114,125}. Daher ist anzunehmen, dass jede Fenchelpflanze zwar eine gewisse individuell leicht abweichende Wirkung zeigt, aber wohl kein komplett anderes Ergebnis hätte.

Deutlichere Unterschiede hingegen gibt es zwischen den unter 1.5 beschrieben Unterarten und Varianten von Fenchel^{125,197}. Auch die einzelnen Pflanzenteile variieren in ihrer Zusammensetzung stark^{19,23}. Während das hier verwendete Kraut, die Blätter und die „Zwiebel“ besonders reich an Vitaminen und Mineralien sind, enthalten die Samen beispielsweise besonders viele Fettsäuren^{19,114}. Die meisten Inhaltsstoffe sind aber in allen Pflanzen vorhanden, nur in deutlich unterschiedlichen Mengen¹⁸².

Im Vergleich mit anderen in der Literatur beschriebenen Wirkungen ist daher darauf zu achten, welcher Extrakt verwendet wurde, da diese je nach verwendetem Pflanzenteil sowie der Art der Extraktherstellung variieren können. Leichte Abweichungen sind bei der Untersuchung von Naturstoffen jedoch kaum zu vermeiden.

Die Gewinnung von Fenchelextrakt erfolgte mittels zwei verschiedener Verfahren. Ein Extrakt wurde mittels herkömmlicher Methode durch bloßes Aufbrühen von frischem Fenchel und Sieden für 10 Minuten bei 100 °C gewonnen. Durch die hohe Temperatur wurden laut einer Studie von Kaur *et al.* allerdings vermutlich thermoinstabile Verbindungen zerstört, weshalb es unter Umständen besser gewesen wäre, eine niedrigere Wassertemperatur zu verwenden¹¹¹.

Der letztlich verwendete Extrakt konnte durch das, insbesondere zur Gewinnung von Pflanzenstoffen, etablierte Verfahren der Mikrowellenextraktion gewonnen werden^{39,187}. Dieses basiert im Gegensatz zum herkömmlichen Verfahren auf der Freisetzung der Pflanzenstoffe in das Lösungsmittel durch Ruptur der Zellwand, hier bei 60 °C. Im Vergleich zu konventionellen Methoden nimmt die Mikrowellenextraktion (MAE) häufig weniger Zeit in Anspruch und die Ausbeute an bioaktiven Substanzen ist durch den schnelleren Prozess hoch¹⁸⁷. Allgemein ist

die MAE schonender und dadurch insbesondere für thermisch instabile Verbindungen vorteilhaft¹⁸⁷. Das Verfahren wurde von Hammouda *et al.* auf Extraktion von essentiellen Ölen in Fenchel untersucht und zeigte sich im Vergleich zu zwei anderen Verfahren als bestes Verfahren⁷⁹. Routray *et al.* zeigten hinsichtlich der Gewinnung von Flavonoiden eine Überlegenheit oder mindesten Gleichwertigkeit im Vergleich zu herkömmlichen Extraktionsverfahren¹⁸⁷. Da auch in dem hier verwendeten Extrakt Flavonoide zu erwarten waren und untersucht werden sollten, stellte dieses Extraktionsverfahren die Methode der Wahl dar.

Auch die in dieser Arbeit durchgeführte Untersuchung mittels HPLC, bestätigte die Überlegenheit des Mikrowellenverfahrens gegenüber dem anderen Extrakt, weshalb im Weiteren auf das Mitführen des ersten Extraktes verzichtet wurde (4.2.1.2).

Auch verschiedene Lösungsmittel haben eine unterschiedliche Extraktionsfähigkeit für Fenchelextrakte¹³. So sind neben dem Verfahren der Extraktgewinnung auch die hier verwendeten Lösungsmittel Wasser bzw. Ethanol als möglicher Grund, der unterschiedlichen Freisetzung von geprüften Substanzen im Ethanolextrakt zu sehen.

Die in der Literatur beschriebenen Inhaltsstoffe von Fenchel umfassen neben Makronährstoffen, Ballaststoffen und Mineralien insbesondere viele Vitamine. Außerdem sind laut vorausgegangen Studien viele sekundäre Pflanzenstoffe wie Flavonoide, Cumarine oder Phytoestrogene enthalten^{19,114,182}. Da den sekundären Pflanzenstoffen viele Wirkungen, wie beispielsweise antioxidative, antiinflammatorische oder antikanzerogene Eigenschaften zugesprochen werden, wurde in dieser Studie das Vorhandensein von Quercetin, Rutin, Methyleugenol, Estragol sowie Folsäure mittels HPLC überprüft⁹⁵.

Die HPLC ist eine gängige, von WHO und vielen weiteren Verbänden akzeptierte und angewandte Methode zur Bestimmung der Inhaltsstoffe von Pflanzenextrakten⁶⁵. Besonders für Stoffe wie die hier vermuteten Flavonoide ist die HPLC ein geeignetes Verfahren²⁸. Mittels der Chromatografie konnten 3 der 5 Fenchelbestandteile nach ihren physikochemischen Eigenschaften differenziert und bestimmt werden. Der Nachweis wurde anhand der Deckungsgleichheit von Peaks geführt, da dies eine gleiche Retentionszeit bedeutet. Allerdings zeigten die Chromatogramme des Stoffgemisches teilweise Überlagerungen und nicht ausschließlich wie unter Optimalbedingungen gewünschte, einzelne Peaks¹²². Durch spezifischere Einstellung der HPLC und des Elutionsgradienten mit dem Ziel, deutlichere Peaks zu erreichen, wären die Ergebnisse wahrscheinlich deutlicher geworden.

Allerdings erschwert das Vorliegen insbesondere der Flavonoide in Form von glykosidischen Bindungen, sowie deren Vielfalt an Bindungsmöglichkeiten die Charakterisierung der Inhaltsstoffe^{85,128}. Auch andere Faktoren, wie der pH-Wert, die Temperatur oder das Lösungsmittel

haben Einfluss auf den Nachweis von Flavonoiden mittels HPLC^{85,122}. Es ist daher davon auszugehen, dass auch die hier nicht nachgewiesenen Substanzen teilweise im Extrakt enthalten sind.

Eine genauere Bestimmung der Pflanzenextrakte hätte mithilfe weiterer chromatografischer Verfahren erfolgen können, da die Verwendung mehrerer verschiedener Verfahren die beste Praxis darstellt, um pflanzliche Stoffe möglichst genau zu differenzieren⁶⁵. Da hier aber die Wirkung des Gesamtextraktes im Vordergrund stand, wurde auf weitere Methoden verzichtet. Zum Schutz der HPLC-Anlage sowie vor Verfälschungen durch Schwebteilchen, wurden die Extrakte filtriert und zentrifugiert, wobei nur der Überstand zugegeben wurde. Dadurch liegt die Messung des Fenchelextraktes wohl unter der tatsächlichen Aufnahme von Fenchelbestandteilen bei normalem Verzehr.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass sich die Verfahren der Mikrowellenextraktion sowie der HPLC zwar gut zur Isolierung und Bestimmung von sekundären Pflanzenstoffen eignen, allerdings auch gewisse Grenzen aufweisen.

5.2 DISKUSSION DER SUBSTANZWIRKUNGEN

Nachdem der qualitative Nachweis von Rutin, Estragol und Folsäure mittels HPLC erbracht werden konnte, sollte das Wirkverhalten des Fenchelextraktes sowie aller Vergleichssubstanzen in-vitro beleuchtet und interpretiert werden. Die einzelnen Substanzen werden im Folgenden besprochen.

5.2.1 WIRKUNG VON ESTRADIOL

Estradiol wurde als Vergleichssubstanz getestet, da Estrogene, insbesondere Estradiol in der Literatur als schwach karzinogen beschrieben werden^{84,225}. Dieses soll durch Induktion der Mitose auf rezeptorpositive Mammazellen proliferationssteigernde Aktivität zeigen⁸⁴.

Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden und es verwundert daher, dass in den durchgeführten Tests nicht nur MCF10a sondern ebenfalls die ER positiven Mammazellen MCF12a, nahezu unbeeinflusst bleiben. Es stellte sich in keinem der Tests eine signifikante Steigerung der Viabilität, oder der Zellproliferation heraus.

Eine mögliche Erklärung dafür liefern Williams *et al.* indem sie eine Hemmung der ER α induzierten Proliferation durch antagonistische Wirkung des ER β beschreiben²¹⁹. Durch stärkere Wirkung auf ER β könnte so die proliferationssteigernde Wirkung über ER α teilweise aufgehoben werden. Seegers *et al.* beschreiben, dass Estradiol in hohen Konzentrationen, zytotoxische Effekte auf MCF7 Zellen haben kann. Besonders vulnerabel dafür seien Zellen in der Teilungsphase¹⁹⁵. Die hier verwendete Estradiolkonzentration liegt über den physiologischen Konzentrationen. Laut Effenberger *et al.* kann allerdings die Affinität von Estradiol zu den Est-

rogenrezeptoren α und β durch höhere Estradiolkonzentrationen sinken⁵⁹. Es darf daher angenommen werden, dass sich aufgrund der beschriebenen Effekte sowie der gewählten Dosis keine signifikante Viabilitätssteigerung gezeigt hat.

5.2.2 WIRKUNG VON ENDOXIFEN

Als weitere Kontrolle diente die Behandlung der Zellen mit Endoxifen, der biologisch aktiven Form des SERM Tamoxifen. Diese inhibiert das Wachstum estrogenrezeptorpositiver Mammazellen und ist daher das Mittel der Wahl zur Therapie ER+ Tumoren, kommt aber auch als Off-Label-Use bei benignen Erkrankungen zum Einsatz²⁰⁵.

In der vorliegenden Arbeit induziert Endoxifen in allen Tests, aber unabhängig vom Rezeptorstatus der Zellen, ausgeprägte viabilitätshemmende und antiproliferative Effekte. Es besteht nur eine geringfügig stärkere Wirkung auf die rezeptorpositiven, im Vergleich zu den -negativen Zellen. In den Messungen zur Stoffwechselaktivität (Glukose, Laktat, pH-Wert) zeigt der SERM im Vergleich zu den anderen Stoffen die ausgeprägtesten Wirkungen. Die Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass die Wirkung von Endoxifen nicht nur über die Estrogenrezeptoren bewirkt wird sondern in großen Teilen auch über andere Mechanismen.

Auch in der Literatur gibt es diesbezüglich bereits mehrere Studien, die eine rezeptorunabhängige Wirkung des Substrates über unterschiedliche Mechanismen belegen¹⁸⁰. So werden Interaktionen von Tamoxifen mit dem mitochondrialen Energiestoffwechsel mit Veränderungen der oxidativen Aktivität sowie der Membranintegrität der Zellen beschrieben¹⁰⁸. In MCF7 und MCF10a Zellen induziert Tamoxifen signifikante DNA Schäden mit daraus folgender Zytotoxizität.¹⁸⁰ Auch eine durch Tamoxifen bedingte Sensibilisierung der Zellen für NK-Zellen kann rezeptorunabhängige Zytotoxizität bedingen²². Weitere Studien belegen Wirkungen über den G-Protein gekoppelten Rezeptor GPER1, wofür Tamoxifen ein reiner Agonist ist⁶¹.

Aufgrund dieser vielfältigen Studien, die ER unabhängige Mechanismen belegen, ist es gut erklärbar, dass Endoxifen auch hier auf beide Zellreihen hemmend wirkt.

Die für Endoxifen beschriebene starke Wirksamkeit konnte hier auch für benigne Mammazellen bestätigt werden.

5.2.3 WIRKUNG VON RUTIN

Das mittels HPLC im Extrakt nachgewiesene Flavonoid Rutin wurde als Vergleichssubstanz in allen Zelltests mitgeführt, um mögliche Wirkungen des Pflanzenextraktes mit der Wirkung von Rutin vergleichen zu können. Für Rutin und seine Derivate wie Quercetin sind bereits eine Vielzahl verschiedener Wirkungen erforscht (1.6.2.1). Unter anderem wurden auch zytotoxische und antiproliferative Wirkungen auf Tumorzellen gezeigt^{69,89,175}.

Obwohl mehrere Studien die hemmende Wirkung von Rutin auf diverse Tumorzellen belegen, konnte dieser Effekt auf benigne Mammazellen in dieser Studie nicht dargestellt werden.

Die verwendeten Zelltests ergaben uneinheitliche Ergebnisse bezüglich der Wirkung von Rutin. So zeigte sich im Neutralrotttest für MCF12a zwar eine signifikante Hemmung der Zellviabilität auf 85 % im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle, der CellTiter-Glo-Test von MCF10a ergab allerdings eine Viabilitätssteigerung auf 107,6 %. Für die Zellproliferation mittels des BrdU Test zeigte sich eine leichte, aber nicht signifikante Steigerung des Wachstums. Es kann anhand dieser Studie daher keine einheitliche Aussage zur Wirkung von Rutin auf die benignen Mammazelllinien getroffen werden.

Ein möglicher Grund für die uneinheitlichen Ergebnisse kann im verwendeten Lösungsmittel DMSO zu sehen sein. Dieses Lösungsmittel wurde verwendet, da es zum Lösen aromatischer Verbindungen wie Rutin gut geeignet ist¹³⁸. Allerdings haben Nguyen *et al.* gezeigt, dass DMSO auf viele Zellen, unter anderem auch die Brustkrebszelle MCF7, toxisch wirkt und daher im Vergleich zu Ethanol und Methanol als Lösungsmittel für in-vitro-Tests ungeeigneter sei¹⁵⁴. Auch in der vorliegenden Studie konnte eine deutliche Hemmung der Zellviabilität und -proliferation der benignen Zellreihen durch DMSO belegt werden. Da die Ergebnisse jeweils im Verhältnis zum Lösungsmittel dargestellt wurden, könnten sich möglicherweise die Einflüsse des Lösungsmittels daher auch auf die vorliegenden Ergebnisse von Rutin ausgewirkt haben.

Eine andere Eigenschaft von Rutin ist die starke Metabolisierung des Stoffes im Colon. Dabei wird größtenteils der Zuckerrest abgespalten und vor allem Quercetin bzw. dessen Reaktionsprodukte resorbiert^{117,161}. Dadurch erreicht wohl nur ein kleiner Teil des oral aufgenommenen Rutin in seiner ursprünglichen Form die Zellen außerhalb des Darms. Dies stellt möglicherweise eine Erklärung der geringen Wirkung auf die Mammazellen dar⁸⁹.

Alía *et al.* beschreiben dosisabhängige Einflüsse auf die Wirkung von Rutin¹⁰. Hinsichtlich dieser Studie, sowie den uneinheitlichen vorliegenden Ergebnissen, wäre die weiterführende Untersuchung unterschiedlicher Dosierungen von Rutin auf die benignen Mammazelllinien von Interesse.

5.2.4 WIRKUNG VON ESTRAGOL

Der Einfluss von Estragol auf den Organismus ist sehr umstritten. Auf der einen Seite werden karzinogene Effekte des Flavonoids beschrieben, aufgrund derer sogar die EMA vor übermäßigem Verzehr von Estragol warnt⁶². Auf der anderen Seite gibt es aber aktuelle Studien, die sogar eine tumorhemmende Wirkung unter anderem bei Mammkarzinomzellen (MCF7) beschreiben¹²¹. Diese kontroverse Situation wurde in der Einleitung bereits eingehend beschrieben, soll hier aber im Zusammenhang der Ergebnisse tiefergehend erörtert werden.

Aufgrund der konträren Studienlage sowie des Nachweises des Flavonoids auch im vorliegenden Fenchelextrakt wurde hier auch die Wirkung der isolierten Substanz auf die benignen Mammazellen untersucht.

In dieser Studie konnte keine der unterschiedlichen Meinungen bestärkt oder entkräftigt werden, da sich keine signifikante Wirkung von Estragol auf die beiden Zellreihen zeigte. Die maximale Wirkung zeigte sich im CytoTox-Glo Test durch einen Rückgang der Zellviabilität auf 90,6 % (MCF10a), was allerdings auch keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu Kontrolle darstellt. Es stellte sich also weder für die Zellviabilität noch für die Zellproliferation ein relevanter Einfluss von Estragol heraus.

Gründe für die konträre Studienlage sind in der Stoffwechselaktivität des Substrates zu vermuten. Es liegen mehrere Studien vor, die eine komplexe Verstoffwechselung von Estragol in in-vivo Studien belegen^{56,165,178}. Vor allem in der Leber wird das Substrat beispielsweise hydroxyliert und sulfoxyliert, wodurch diverse reaktive Verbindungen entstehen, welche mit DNA interagieren könnten. Paini *et al.* beschreiben, dass erst durch diese Metabolisierung der karzinogene Effekt zustande kommt¹⁶⁵. Während dadurch bei in-vivo Studien ein potentieller karzinogener Effekt der Metabolite nachgewiesen werden kann, ist dies bei direkter Wirkung in in-vitro Studien nicht der Fall. Bestärkt wird diese Annahme dadurch, dass die Studien von Lashkari *et al.*, welche eine hemmende Wirkung auf MCF7 Zellen zeigt, in-vitro stattfand, während Studien zur Karzinogenität häufig in-vivo untersucht wurden^{56,62,178}. Villarini *et al.* untersuchten eine ältere, an Mäusen proklamierte Hepatotoxizität von Estragol. In ihrer in-vitro Studie konnten sie diese Wirkung nicht nachweisen, was die Annahme der Wirkung durch in-vivo gebildete Metabolite ebenfalls bestärkt.

In Betracht der hier verwendeten Mammaepithelzellen ist anzumerken, dass sich die von der EMA zusammengefassten Studien zur Karzinogenität von Estragol allesamt auf Tumore der Leber beziehen⁶². Aufgrund der deutlich höheren metabolischen Aktivität der Leber können diese Ergebnisse nicht direkt auf die hier verwendeten Mammazellen übertragen werden¹⁶⁵. Es ist daher, zum einen aufgrund des Studiendesigns, zum anderen aufgrund der verwendeten Zellen nicht verwunderlich, dass in dieser Studie keine karzinogene Aktivität von Estragol gezeigt werden konnte.

Die von Lashkari *et al.* beschriebene antiproliferative Wirkung von Estragol auf maligne Mammazellen (MCF7), konnte bei den hier verwendeten benignen Brustzellen allerdings ebenfalls nicht bestätigt werden¹²¹. Ein Grund dafür könnte die unterschiedliche Dignität der Zellen darstellen, da maligne Zellen stärker proliferieren, könnten sich dort auch DNA Schäden stärker auswirken¹²⁷. Allerdings ist die Dosierung des Estragols bei Laskari *et al.* auch deutlich höher gewählt als in der vorliegenden Studie, was ebenfalls einen Unterschied ausmachen könnte, da die Wirkung von Estragol auch dosisabhängig ist^{76,121}.

Auch die hepatokarzinogene Wirkung von Estragol ist vorsichtig zu interpretieren, da in den Studien sehr hohe, nicht physiologische Dosierungen verwendet wurden¹⁶⁵. Es kann aber nicht

direkt linear von der Wirkung der hohen Dosis auf niedrigere Dosierungen geschlossen werden, wie die Studie von Schulte-Hubbert *et al.* belegt. Weshalb diese und andere die Standardannahme der karzinogenen Aktivität von Estragol, für niedrigere Dosierungen für fragwürdig halten^{76,193}.

Hinzu kommt das häufige Vorliegen von Estragol als Stoffgemisch in Pflanzen, wodurch die isolierte Wirkung auf den Körper differenziert betrachtet werden sollte⁷⁶. Auch in Fenchel ist Estragol als Vielstoffgemisch vorhanden uns ist in diesem Komplex zu betrachten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Warnung der EMA einerseits ernst genommen werden sollte, da sehr hoch dosiertes, isoliertes Estragol eindeutig karzinogenes Potential aufweist. Ob allerdings Naturprodukte wie Fenchel, die Estragol in einem komplexen Gemisch enthalten, gefährlich sind, bleibt offen und sollte, wie auch von der EMA empfohlen, in weiteren Studien untersucht werden. Viele Wissenschaftler wie beispielsweise Iten und Saller, sehen im Nutzen-Risiko Verhältnis, die nützlichen Aspekte überlegen und empfehlen die sachgerechte Verwendung von Fencheltee weiterhin^{102,103}.

5.2.5 WIRKUNG VON FOLSÄURE

Im Bereich der Neoplasien ist die Relevanz des Folsäurestoffwechsels schon lange bekannt und Einflüsse darauf werden bereits therapeutisch verwendet^{68,203}. Die Wirkung einer Folsäuresupplementierung ist wie unter 1.7 bereits beschrieben, allerdings noch sehr umstritten.

In dem untersuchten Pflanzenextrakt wurde Folsäure ebenfalls identifiziert, weshalb die Wirkung auf die Zellreihen untersucht werden sollte.

In den Zelltests wirkte Folsäure bis auf eine Ausnahme (CellTiter-Glo, MCF12a) lediglich nicht-signifikant, leicht hemmend auf die Zellviabilität und Proliferation.

Während die Datenlage zur Wirkung von FS auf benigne veränderte Zellen eher gering ist, liegen für maligne Zellen mehrere Studien vor. Kim *et al.* beschreiben in ihrer Übersichtsarbeit die komplizierte Situation der Interaktion der Folsäure folgendermaßen: Während ein Folsäuremangel auf neoplastische Zellen anhand des großen DNA-Umsatzes hemmend wirkt und eine Folsäuresupplementierung das Krebswachstum fördert, sei dies bei nicht neoplastischen Zellen genau invers dazu (Abbildung 44). Die genau Art und das Ausmaß der inversen Beziehung zwischen Folatstatus und dem Risiko für Malignome sei jedoch nicht eindeutig geklärt. Kim *et al.* schlussfolgern, dass die medizinische Anwendung einer folsäurereichen Ernährung daher eine mögliche Rolle als krebsvorbeugendes Mittel haben könnte¹¹². Mit dieser Aussage können auch die hier ermittelten, leicht viabilitäts- und proliferationshemmenden Ergebnisse in Einklang gebracht werden.

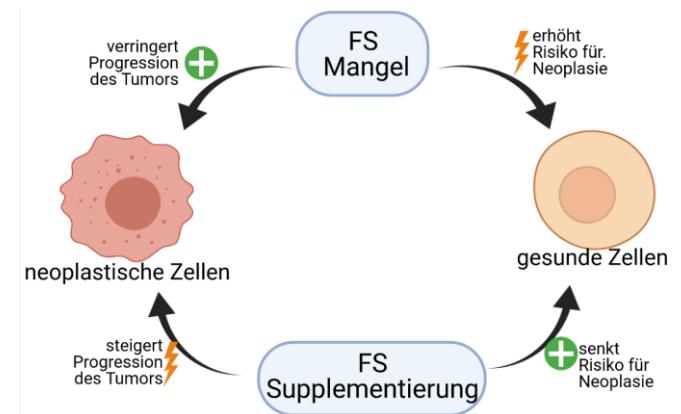


Abbildung 44: Theorie des Einflusses von Folsäure (FS) -mangel und -Supplementierung abhängig der Dignität des beeinflussten Gewebes. Bei gesunden Zellen senkt FS-Supplementierung das Risiko für Neoplasien, wohingegen ein FS-Mangel das Risiko erhöht. Für neoplastische Zellen trifft eine umgekehrte Wirkung zu. Supplementierung steigert die Tumorprogression, wohingegen FS-Mangel die Progression verringert. modifiziert nach Kim et al.¹¹², erstellt mit „biorender.com“.

Zusätzlich muss angemerkt werden, dass die hier verwendete synthetische Folsäure in der Natur nicht in dieser Art, sondern in Poly- oder Monoglutamatform vorliegt¹²⁷. Dieses wird im Darm verstoffwechselt und resorbiert und später von den peripheren Zellen meist als Foläuremonoglutamat aufgenommen. Dort kann es zu Tetrahydrofolat, der aktiven Wirkform der Folsäure umgewandelt werden¹²⁷. Die hier verwendete Folsäure kommt in-vivo somit in veränderter Form, als hier in-vitro getestet mit den Zellen in Kontakt.

5.2.6 WIRKUNG DES FENCHELEXTRAKTES

Es liegen bereits Studien vor, welche eine Wirkung von Fenchel auf hormonabhängige, maligne Brustkrebszellen (MCF7) zeigen. So konnte in-vitro eine Wachstumshemmung der Brustkrebszellen mittels unterschiedlicher Fenchelextrakte dargestellt werden^{20,24,140}. Besonders viele Studien liegen bezüglich der Wirkung isolierter, sekundärer Pflanzenstoffe, wie einzelner Phytoestrogene und Flavonoide auf Brustkrebs vor. Sowohl in-vitro, in-vivo und epidemiologische Daten wurde dazu erhoben. Daher ist bekannt, dass Pflanzenstoffe die Proliferation bzw. Viabilität von Zellen, teilweise auch gegensätzlich beeinflussen können. So beschreiben Messina et al., dass Isoflavone in einer Umgebung hoher Estrogenkonzentration anti-estrogene Wirkung zeigen, wohingegen sie in einem estrogenarmen Umgebung eine estrogene Wirkung zeigen¹⁴². Neuere Studien zeigen allerdings vermehrt eine hemmende Wirkungen der einzelnen Substanzen auf Brustkrebs. Dabei werden Mechanismen wie die Downregulation des EGF-Signalwegs, Einflüsse auf die Estrogenrezeptoren oder antioxidative Effekte genannt^{2,31,34,118}.

Für benigne Erkrankungen der Brust wie die hier untersuchten Zellen der fibrozystischen Mastopathie liegen bisher keine Studien in Zusammenhang mit Fenchel vor. Es gibt allerdings

einige Studien, die eine Wirkung einzelner Phytoestrogene und Flavonoide auf benigne Brusterkrankungen zeigen^{11,120}.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Auswirkungen des Fenchelextraktes auf die Proliferation und Viabilität benigner Brusterkrankungen mittels der fibrozystisch veränderten Mammazelllinien MF10a und MCF12a untersucht.

Dabei induzierten die zwei stärksten Extrakte („100 %“ und „0 %“) für beide Zelllinien eine hemmende Wirkung auf die Zellviabilität bzw. Proliferation. Für diese zwei Extraktkonzentrationen zeigte sich eine dosisbezogene stärkere Hemmung der Zellen durch das höher dosierte Extrakts. Bei den restlichen, niedriger konzentrierten Extraktten zeigten allerdings lediglich der noch stärkste Extrakts teilweise eine leichte Hemmung der Zellen, wohingegen die schwächeren Extrakte inkonsistente, sowohl minimal hemmende als auch steigernde Wirkungen auf Viabilität und Proliferation zeigten.

Die Feststellung, dass in dieser Arbeit lediglich die stärksten Fenchelextrakte hemmende Wirkung zeigten, wohingegen die schwachen Extrakte kaum wirken, scheint vor allem an der niedrigeren Dosierung zu liegen. Es gibt Studien, die für Brustkrebs bei leichten Phytoestrogen-Dosierungen sogar eine proliferationssteigernde Wirkung beschreiben^{55,143}. Auch Lampe *et al.* diskutieren in ihrer Arbeit die konzentrationsabhängige Wirkung von Isoflavonoiden und kommen zu dem Schluss, dass für die Wirkung hohe Plasmaspiegel vorliegen müssen. Sie begründen dies unter anderem damit, dass bei westlichen Populationen mit niedrigeren Plasmakonzentrationen häufig kein Effekt gezeigt werden konnte, bei asiatischen, deren Plasmaspiegelmeist höher liegt, aber sehr eindeutig¹²⁰. Sak spricht in diesem Zusammenhang von einem sogenannten Schwelleneffekt, wodurch der Effekt durch die signifikant niedriger konsumierten Mengen in „westlichen Ländern“ wesentlich geringer ausfallen könnte als in asiatischen Ländern, da dort eine gewisse Schwellenmenge bereits durch die normale Nahrung erreicht wird¹⁸⁹. Diese Schwellenwerttheorie liefert eine mögliche Erklärung dafür, dass die geringer konzentrierten Fenchelextrakte in dieser Studie gar nicht mehr gewirkt haben, wohingegen die starken Extrakte Wirkung zeigten.

Bezüglich der Dosierung der Extrakte ist anzumerken, dass die verwendeten Fenchel-Konzentrationen dieser Studie zwar im Vergleich zu anderen Studien hoch erscheinen mögen. Im Vergleich zu anderen Arbeiten wurde hier allerdings die feuchte Masse des frischen Fenchels und keine getrockneten Substrate verwendet, wodurch der prozentuale Anteil wirksamer Stoffe hier als geringer anzunehmen ist.

Hohe Konzentrationen des Extrakttes induzierten in den Zellen hemmende Effekte, wohingegen die im Extrakts nachgewiesenen, einzelnen Substanzen kaum Wirkung zeigten. Ein in der

Literatur häufig erwähnter Erklärungsversuch für dieses Problem liegt darin, dass für die Wirkung von Pflanzenextrakten im Allgemeinen weniger Einzelstoffe verantwortlich sind, sondern die Pflanze viel mehr als komplexes phytochemisches Stoffgemisch insgesamt ihre Wirksamkeit erhalten^{53,62,103,126}. So wurde mehrfach berichtet, dass Pflanzenextrakte ihre Wirksamkeit verlieren, wenn man sie in ihre einzelnen chemische Bestandteile fraktioniert²²⁰. Es gibt zwar prominente Beispiele wie den Fingerhut (Digitalis-Glykoside), die zeigen dass es Pflanzen gibt, bei denen einzelne Substanzen stark selektive Wirkung zeigen¹⁰¹. Die Mehrheit der Pflanzen zeigt ihre Wirkung allerdings nicht durch stark wirksame Monosubstanzen, sondern durch Wirkstoffgemische^{101,220}. Diese wirken nicht spezifisch an einzelnen zellulären Targets, sondern eher als „Breitbandwirkstoffe“. Das bedeutet, dass die isolierten Stoffe des Vielstoffgemisches keine Wirkung haben und erst als Gesamtheit Wirkung erreichen. Wink erklärt diesen Mechanismus damit, dass die vielfältigen Stoffe durch ihre Wechselwirkungen zu Konformationsänderungen von Proteinen führen und so Biomembranen, Transporter und andere Strukturen beeinflussen^{220,221}. So führt erst die Gesamtheit der Stoffe zur Konformationsänderung, wohingegen ein einzelner Stoff noch keine oder zu wenige Veränderungen erreichen kann. Dadurch könnten vor allem überexprimierte Proteine wie bei Neoplasien gebremst werden²²⁰. Auch Liu beschreibt, dass vor allem die additiven und synergistischen Effekte der Phytochemikalien für die antioxidative und krebshemmende Wirkung verantwortlich sind¹²⁶. In diesem Zusammenhang entkräftigen Gori *et al.* auch die oben beschriebene kanzerogene Wirkung von Estragol⁷⁶.

Neben dieser Vielstoffgemisch-Theorie ist anzumerken, dass die überprüften Substanzen nur einen geringen Teil der in der Pflanze und im Extrakt vorhandenen Stoffe ausmachen. Neben den hier untersuchten sekundären Pflanzenstoffen könnte somit eine Vielzahl anderer, nicht untersuchter Pflanzenstoffe für die Wirkung mitverantwortlich sein. Neben anderen phenolischen Verbindungen wie Cumarinen und Tanninen liegen laut Literatur noch eine Menge anderer Stoffe wie Vitamin C, A und K, Mineralien und Fettsäuren in Fenchel vor. Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass auch Proteine für einen Teil der Wirkung verantwortlich sein könnten. Zwei Studien von Megeressa *et al.* stellen Wirkungen auf maligne MCF7 Brustkrebszellen dar, welche nur auf die aus der Pflanze isolierten Proteine zurückzuführen sind^{139,140}. In ihrer aktuellen Studie führen sie diesen Effekt auf die nicht spezifischen Lipidtransferproteine (nsLTP1) zurück. Diese zeigen eine streng dosisabhängige, proliferationshemmende Wirkung. Der Wirkungsmechanismus dieser Beobachtung ist weiter zu untersuchen. Interessant wäre, ob diese Wirkung auch auf benigne veränderte Brustzellen zutrifft¹⁴⁰.

Fenchel ist mit 10-15 % Fett und mehr als 20 verschiedenen Fettsäuren reichhaltig an lipidhaltigen Bestandteilen^{19,114}. Darunter auch eine große Zahl an Omega-3-Fettsäuren, deren Wirkung vielfach untersucht wurde. Die Review-Arbeiten von Fabian *et al.* und Nindrea *et al.*

fassen Ergebnisse vieler Arbeiten zu Omega-3-Fettsäuren zusammen und bestätigen einen positiven Effekt auf die Risikoreduktion von Brustkrebs^{63,156}.

Da es keine Studien zur Wirkung von Fenchel auf derartige Zellen gibt, können die Ergebnisse lediglich mit der Wirkung auf maligne Zellen, oder aber mit der Wirkung ähnlicher Stoffe auf ebenfalls benigne veränderten Mammazellen verglichen werden. Dazu bestätigen Langzeituntersuchungen bei Patientinnen mit fibrozystischer Mastopathie subjektive und objektive Phytoestrogen assoziierte Besserungen. Die Ernährungsänderung geht mit einem Rückgang der Beschwerden sowie mit szintigraphisch nachweisbarer Aktivitätsminderung einher⁶⁶. Wu *et al.* untersuchten, ob die Häufigkeit von Fibroadenomen durch flavonoidreiche Sojaprodukte beeinflusst wird und fanden ein nicht-signifikant reduziertes Risiko für Fibroadenome sowohl mit Proliferationen als auch mit Atypien²²⁴. Mirghafourvand *et al.* verglichen die Wirkung von Leinsamen auf zyklische Mastalgie und fanden signifikant reduzierte Brustschmerzen in der Fallgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe nach zwei Monaten¹⁴⁴. So gibt es für diese, häufig mit fibrozystischer Mastopathie assoziierten Schmerzen, bereits Therapieempfehlungen, die eine vermehrte Aufnahme der isoflavonreichen Leinsamen einschließen²⁰⁵. Die Arbeit von Kishakevich *et al.* zeigte die Auswirkung einer 6-monatigen Einnahme von Phytoestrogenen auf sonographisch detektierte Bruststrukturen bei Frauen mit und ohne fibrozystischer Veränderungen. Sie stellten eine verringerte Gewebedichte und eine verringerte Zystenanzahl und -größe nach Einnahme der Phytoestrogene fest²²⁸. Eine der wenigen epidemiologischen Studien, die auch den Einfluss auf benigne Brusterkrankungen betrachtet hat, beschreibt für fibrozystische Mastopathie den gleichen Effekt wie bei Brustkrebs. Die zunehmende Isoflavon-Zufuhr mit steigenden Plasmakonzentrationen reduziert das Risiko für proliferative und nicht-proliferative fibrozystische Veränderungen der Brustdrüse¹²⁰.

Zusammenfassend kann gesagt werden dass der Fenchel extrakt ein hemmende Wirkung und keine proliferationssteigernde Wirkung gezeigt hat. Daher ist diesem Extrakt eher eine protektive Wirkung für diese Brusterkrankungen zuzuschreiben, wohingegen eine kanzerogene Wirkung aufgrund des enthaltenen Estragols nicht belegt werden konnte. Die beobachtete Wirkung kann jedoch keinem der isoliert untersuchten Inhaltsstoffe zugeschrieben werden.

5.2.7 ZELLINNEN IM VERGLEICH

In vergleichender Betrachtung der beiden Zelllinien fällt auf, dass sich die Wirkung der Substanzen auf Viabilität und Proliferation teils deutlich unterscheidet. Im CellTiter-Glo-Test unterscheiden sich besonders der 100 % und der 50 % Extrakt zwischen den Zelllinien.

Für den BrdU-Zellproliferationstest werden bei den drei stärksten Extrakten sowie bei Endoxifen klare Unterschiede deutlich. Im CytoTox-Glo-Test dagegen zeigen sich kaum stark unterschiedliche Wirkungen zwischen MCF10a und MCF12a. Einzig die Wirkung vom 20 % Extrakt unterscheidet sich deutlich.

Die Ergebnisse des Neutralrottet zeigen die deutlichsten Unterschiede zwischen den zwei Mammazelllinien.

Nicht alle der Unterschiede zeigen sich jedoch statistisch signifikant. Tabelle 12 stellt die Unterschiede der relevanten Stoffgruppen dar, wobei die grün hinterlegten Ergebnisse einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen MCF10a und MCF12a zeigten.

Tabelle 12: Zelllinienabhängige Unterschiede der wirksamen Extrakte. in % der Zellviabilität / Proliferation. ER- ≈ MCF10a, ER+ ≈ MCF12a, grün ≈ signifikanter Unterschied, grau ≈ nicht signifikant

	100 % Extrakt		50 % Extrakt		20 % Extrakt	
	ER-	ER+	ER-	ER+	ER-	ER+
Cell-Titer-Glo®	32,9 %	13,7 %	44,5 %	84,8 %		
BrdU-Test	37,7 %	19 %	66,6 %	37,1 %	104,4 %	71,8 %
Cyto-Tox-Glo™					94,9 %	67,2 %
Neutralrot-Test	69 %	7,7 %	86,5 %	12,2 %	105 %	83,9 %

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Zellreihe MCF12a in fast allen Zelltests eine stärkere Viabilitäts- und Proliferationshemmung durch den Fenchelextrakt zeigt. Auf die Triple-negativen MCF10a Zellen stellte sich im Vergleich dazu geringere Wirkungen heraus. Dies betrifft jeweils die drei stärksten Extrakte, wohingegen für die restlichen Extrakte aufgrund ihrer geringen Wirkung kein Unterschied ausgemacht werden kann.

Diese Ergebnisse legt unter anderem eine Wirkung des Extraktes über die Hormonrezeptoren nahe. Verantwortlich dafür könnten vor allem Phytoestrogene sein, welche über die Estrogenrezeptoren ihre antiproliferativen Effekt bewirken können. Dieser Effekt wird in der Literatur erst mit hohen Phytoestrogenkonzentrationen beschrieben, wohingegen niedrige Dosierungen auch proliferationssteigernd wirken könnten^{25,92}. Die vorliegenden Ergebnisse passen zu diesen Studien, da auch hier nur die hohen Dosen ihre Wirkung entfalten, wohingegen die niedrigen, kaum, oder teils minimal proliferationssteigernde Wirkung zeigen.

Da allerdings die Extrakte auch auf die ER negativen MCF10a Zellen eine gewisse Wirkung zeigen, ist davon auszugehen, dass der Extrakt auch über nicht-rezeptorabhängige Mechanismen seine Wirkung entfaltet. ER-unabhängige Signalwege wie die Beeinflussung antientzündlicher und antioxidativer Enzyme, Rezeptortyrosinkinasen oder epigenetische Einflüsse

wie DNA-Methylierung können auch in Triple-negativen Zellen wie MCF10a, potentiell wirksam sein^{2,117,196}.

Zur zellspezifischen Wirkung ist anzumerken, dass für MCF12a konträre Studien bezüglich des Rezeptorstatus der Zellen vorliegen. Einige Studien stimmen nicht mit dem hier untersuchten Resultat als rezeptorpositive Zelllinie ein, sondern beschreiben MCF12a als rezeptornegativ^{206,207}. Diese Studien schließen allerdings ihre Ergebnisse teilweise lediglich aus einer nicht vorhandene Wirkung auf Estradiol, was nicht dem Rezeptorstatus gleichgesetzt werden sollte²⁰⁷. Sweeney *et al.* erklären die teils verschiedenen Ergebnissen durch die Beobachtung, dass der Rezeptorstatus der Zelllinien teils von Labor zu Labor leicht variiert. Durch die immunhistologischen Tests konnte gezeigt werden, dass in der vorliegenden Arbeit Hormonrezeptor-positive Zellen verwendet wurden.

Die stärkere antiproliferative Wirkung auf die MCF12a Zellen, ist insbesondere daher interessant, da das Gewebe, aus der diese Zellen ursprünglich isoliert wurden, fibrozystische Veränderungen, insbesondere mit intraduktalen Hyperplasien und Atypien aufwies. Da dieser Zelltyp mit einem leicht erhöhten Mammakarzinom-Risiko einhergeht (1.2.3), könnte der Fenchelextrakt zum einen mastopathische Veränderungen positiv beeinflussen sowie auch karzinoprotektive Wirkung haben⁵⁵. Eine karzinoprotektive Wirkung kann auch in der Literatur beschriebenen antientzündlichen und antioxidativen Effekten zu sehen sein. Die reduzierten Oxidantien und geringere Entzündungszeichen durch polyphenolreiche Diät sind bezüglich des Krebsgeschehens als Langzeitwirkungen aufzufassen, wohingegen sie auf andere benigne Brusterkrankungen wie Mastitiden auch förderlich sein könnten^{31,171}.

Andere Autoren wie Adlercreutz *et al.* merken aber an, dass gerade diese Langzeitwirkungen erst dadurch zur Wirkung kommen könnten, wenn Phytoestrogene bereits in frühen Alter konsumiert würden. Allerdings gibt es auch Hinweise darauf, dass ein übermäßiger Konsum im Kindesalter zu einer frühzeitigen Thelarche führen könnte, weshalb ein zu hoher Konsum nicht zu empfehlen sei¹⁵⁹.

5.3 METHODENKRITIK

Im Folgenden sollen mögliche Fehlerquellen und limitierende Faktoren innerhalb der Arbeitsschritte aufgedeckt werden und so eine sachgerechte Interpretation der Ergebnisse ermöglicht werden.

5.3.1 ZELLINNEN

Bei beiden verwendeten Zelllinien (MCF10a und MCF12a) handelt es sich um adhärente, immortalisierte epitheliale Monolayerkulturen^{14,16,164}. Derartige Zelllinien werden durch das Ein-

wirken mutagener Agenzien etabliert, welche das Aussetzen von Mechanismen, die das Replikationspotential der Zellen begrenzen erreicht. Dazu gehören beispielsweise durch unphysiologische Bedingungen, Gentransfer oder einbringen viralen Proteine erzwungene Mutationen von Tumorsuppressorgenen¹⁹². Immortalisierte Zellen haben den Vorteil, dass sie sehr gut verfügbar sind und dabei über lange Zeiträume relativ konstante Eigenschaften zeigen. Allerdings führen die Mechanismen, die zur Immortalisierung der Zellen führen, zu erheblichen Änderungen der Zellphysiologie und es wurden teils deutliche Unterschiede im Vergleich zu den Primärzellen festgestellt¹⁹². Besonders für die auch hier benutzen benignen Zelllinien ist dieser Effekt zu berücksichtigen, da im Vergleich zu den immortalisierten Zellen, nicht-immortalisierte Zellen kein uneingeschränktes Replikationspotential besitzen. Es ist daher zu beachten, dass immortalisierte Zellen eine etwas ähnlichere Physiologie zu malignen Zellen haben¹⁷⁹. Passend dazu zeigten Sweeney *et al.* ein Entartungsverhalten von MCF12a in hohen Zellpassagen²⁰⁷. Um dieses zu minimieren, wurden hier lediglich niedrigere Zellpassagen (< 30) für die Tests verwendet.

Die den Testreihen vorausgehende optische Zellzählung in einer Zählkammer stellt den Versuch einer Standardisierung der Zellzahl dar. Dieses Verfahren kann jedoch als potentielle Fehlerquelle Auswirkungen auf alle weiteren Arbeitsschritte haben, da Fehler zu einer Änderung der Zellkonfluenz und damit der Testbedingungen führen^{77,192}. So führt beispielsweise ungenügendes Durchmischen oder zu geringe Anfärbung mit Trypanblau zu Fehlern der Quantifizierung. Eine exaktere Alternative wäre die Zellzählung mittels automatisierter Zählgeräte, deren Messung auf dem Erfassen elektrischer Widerstände oder per digitaler Bildanalyse erfolgt¹⁹².

In-vitro Arbeiten sind gut geeignet um erste Wirkungen von Stoffen auf Zellen zu testen. Dabei ist die Übertragbarkeit auf das ursprüngliche Gewebe allerdings häufig deutlich eingeschränkt. So stellt zum Beispiel die Zusammenwirkung von Mammazellen und dem umliegenden Bindegewebe einen wichtigen Mechanismus in der Differenzierung des Mammaepithels dar^{91,137}. Speziell bei der fibrozystischen Mastopathie ist die Anordnung der Zellsysteme relevant. Die Verlegung von Drüsenlumina durch Stromafibrose, sowie die daraus folgende zystische Dilatation kann nur in komplexen Zellsystemen zustande kommen, ist für die klinische Symptomatik aber von großer Bedeutung^{55,205}. Qu *et al.* haben die Unterschiede zwischen Monolayerkulturen und dreidimensionalen Zellkulturen für Brustzellen untersucht und sind zu dem Schluss gekommen, dass 3D-Kulturen besser geeignet sind, um dem in-vivo Brustgewebe näher zu kommen¹⁷⁹. Hübner *et al.* merken an, dass intakte Tumoren (in-vivo) teilweise Eigenschaften

haben, welche sekundäre Pflanzenstoffe unwirksam machen können⁹⁵. Außerdem sei die Wirkung von Phytoestrogenen von weiteren Faktoren wie dem Alter, dem Gesundheitszustand sowie der Darmmikroflora abhängig, was sich in-vitro nicht zeigen würde^{169,173}.

Als weiterführender Untersuchungsansatz könnten dreidimensionale Zellkulturen die beschriebene Problematik also verringern, da diese eine höhere Analogie zum Ursprungsgewebe aufweisen und so der realen Situation näher kommen^{137,179,207}.

Außerdem umgeht die direkte Applikation von Vielstoffgemischen auf Zellsystem den wichtigen Faktor der Metabolisierung und Bioverfügbarkeit einzelner Substanzen in-vivo¹⁷³. Wie bereits zu Rutin angemerkt, werden sehr viele Pflanzenstoffe metabolisiert. Es kann daher nicht sicher gesagt werden, dass alle im Fenchelextrakt vorhandenen Stoffe, die in-vitro auf die Zellen wirken, in-vivo auch wirklich in dieser Zusammensetzung auf die Zellen wirken würden^{134,175}. Aus diesem Aspekt ergeben sich in-vivo vermutlich weitere interindividuelle Unterschiede, die unter anderem von der Darmmikroflora abhängen.

5.3.2 IN-VITRO TESTVERFAHREN

Generell können bei in-vitro Testverfahren Fehler durch eine unterschiedlich homogene Aussaat in den Wells, Unterschiede im Pipettievorgang, Abweichungen der Inkubationszeit sowie durch Einflüsse der Trypsinierung im Passagierprozess entstehen. Um diese Effekte sowie zufällige Effekte zu minimieren, wurde für jeden Test eine Testserie von drei unabhängigen Tests erstellt. Diese erfolgten zeitlich getrennt an verschiedenen Zellpassagen (n=3). Innerhalb der Testserien wurden, um zufällige Effekte zu eliminieren, je mindestens drei Wells pro Substanz geprüft und deren Mittelwert berechnet.

Der Cell-Titer-Glo® Test basiert auf einer ATP-abhängigen Lumineszenzmessung. Dieses Verfahren ist schon lang bekannt und wird vielfach angewendet. Petty *et al.* beschreiben die Überlegenheit des ATP abhängigen Tests gegenüber dem alternativ verwendeten MTT-Test¹⁷⁰. ATP Tests sind sehr sensitiv und können Unterschiede von wenigen Zellen feststellen¹⁷⁶. So kann der Cell-Titer-Glo® Test weniger als 15 Zellen pro Well unterscheiden. Auf einige Besonderheiten muss allerdings geachtet werden, um möglichst genaue Messergebnisse zu erzielen. So hat die Temperatur der Tests einen Einfluss auf das Messergebnis, da die wichtige Luciferasereaktion eine Temperaturabhängigkeit zeigt. Außerdem kann es bei durchsichtigen Wellplatten zu einer Verfälschung der Messwerte durch Überstrahlen aus nebenliegenden Wells kommen. Auch im Medium enthaltene Stoffe könnten beispielsweise durch ihre Färbung die Leuchtkraft der Tests beeinflussen²¹³. Diese Schwierigkeiten wurden durch Mitführen von Medium-Kontrollwells, sowie Verwendung undurchsichtiger Wellplatten und zeitlich standardi-

sierter Inkubation bei RT vor jeder Messung minimiert. Nicht direkt beeinflussbar könnten allerdings Interaktion von Bestandteilen der Extrakte oder des Mediums auf Teile der Luciferasereaktion sein¹⁷⁰. Für die verwendeten Medien gibt es diesbezüglich in der Literatur allerdings keine Belege, und auch für die Extrakte zeigten sich keine Hinweise der Beeinflussung im CellTiter-Glo® Test.

Der Neutralrot Test ist einer der am häufigsten verwendeten Tests zur Messung der Zellviabilität /-toxizität, ist sensitiver und einfacher durchzuführen als vergleichbare Tests wie der LDH Test¹⁸³. Auch dieser Test besitzt allerdings eine gewisse Störanfälligkeit, wie bereits Bouallagui *et al.* beschrieben. So könnte der häufige Waschvorgang zum Ablösen vitaler Zellen am Boden der Wells führen und so eine erhöhte Zytotoxizität vortäuschen³⁰. Gelegentlich kann es durch Interaktionen des Farbstoffes mit verwendeten Substraten zur Ausfällung von Kristallen kommen, welche ebenfalls zur Überschätzung der toxischen Wirkung führen würde¹⁸³. Da dieses Phänomen auch hier anfangs auftrat, wurde vom Standardprotokoll leicht abgewichen und die Kristallbildung so durch angepassten pH Wert sowie verbesserte Waschschrifte vermieden (3.2.5.3). Die fehlende Kristallbildung wurde mikroskopisch kontrolliert. Außerdem könnte die Rotfärbung des verwendeten Mediums die Auswertung des kolorimetrischen Tests beeinflussen, weshalb das Medium zu Beginn durch farbfreies Medium ersetzt wurde. Durch diese Anpassungen konnten insgesamt gute Ergebnisse erzielt werden.

Der Nachweis der Zellproliferation mittels des Einbaus von Bromdesoxiuridin in die Zell-DNA ist ein altes, über viele Jahre verbessertes Verfahren und wird häufig verwendet^{77,172,186}. Da endogene Substanzen den Einbau von BrdU hemmen könnten, sollten nur vorgetestete Kulturmiedien verwendet werden, was für die hier verwendeten Medien der Fall war. Des Weiteren sollte auf gedämpftes Licht geachtet werden, da sich Teile der Basenanaloga bei grellem Licht leicht zersetzen können⁷⁷. Durch die kolorimetrische Messung können unterschiedliche Wellenlängen des ELISA-Readers zu abweichenden Ergebnissen kommen. Der BrdU-Test wird als temperaturempfindlich beschrieben, was durch genaues halten an das Protokoll allerdings keine Probleme zeigte.

Der Cyto-Tox-Glo™ Test von Promega ist verglichen mit anderen Tests ein relativ neuer Test, der sowohl zu Bestimmung der Zytotoxizität als auch der Zellviabilität geeignet ist, welche in zwei Schritten bestimmt werden können¹⁷⁷. Für diesen Test sind allerdings mehrere Störfaktoren beschrieben, die zeigen, dass der Test anfälliger sein könnte, als vergleichbare^{155,177}. Zellkulturmedien können in geringen Mengen die zur Messung verwendeten Proteasen enthalten, die Protease zeigt temperaturabhängiges Verhalten und das AAF-Glo-Substrat ist licht-anfällig¹⁷⁷. Diese Probleme konnten aber durch Vermeidung dieser Einflüsse sowie das Mitführen von Hintergrundkontrollen minimiert werden. Nichtsdestotrotz lieferten die Ergebnisse

zur Zytotoxizität zu geringe und nicht verwertbare Ergebnisse. Die ebenfalls beschriebene Messung der Zellviabilität zeigte dagegen verwertbare Resultate. In der Literatur werden mehrere Substanzen beschrieben, die das AAF-Glo-Substrat, so wie die freigesetzten Proteasen beeinflussen oder abbauen können^{109,177}. Darunter auch hohe Konzentrationen tierischen Serums oder des ebenfalls im Medium enthaltenen Phenolrot. Eine Interaktion mit den verwendeten Kontrollsubstraten oder dem Extrakt ist daher nicht auszuschließen. Diese Interaktionen könnten eine Erklärung für die unzureichenden Ergebnisse der direkten Toxizitätstestung sein. Denn im Vergleich zur späteren Viabilitätstestung, wo die Proteasen schlagartig durch das Lysereagenz freigesetzt und direkt anschließend gemessen werden, werden die Proteasen zur Messung der Zytotoxizität über einen längeren Zeitraum freigesetzt und könnten daher bis zu der Messung bereits mit anderen vorliegenden Substanzen interagieren und abgebaut werden. Dadurch würden sich geringere sowie eventuell interaktionsabhängige Resultate ergeben. Da die Messung der Viabilität gute Ergebnisse zeigte, wurden diese zur Ergebnisdarstellung des CytoTox-GloTM Test verwendet.

Durch die Messung von Glukose, Laktat und pH-Wert im Zellüberstand sollte zusätzlich zu den Zelltests Parameter bestimmt werden, die die Stoffwechselleage der Zellen näher charakterisieren. Zellen wandeln beispielsweise unter Stress zur Energiegewinnung vermehrt Glukose in Laktat um anstatt oxidative Phosphorylierung zu betreiben, was einen Einfluss auf die Glukosekonzentration sowie durch vermehrtes Laktat, auch auf den pH-Wert hat^{93,129}. Weitere der vermuteten Mechanismen, die zu Veränderungen der Werte führen könnten, sind in der Einleitung bereits beschrieben (3.2.5.5 & 3.2.5.6). Die Mechanismen die zu derartigen Veränderungen führen würden, sind allerdings komplex, beeinflussen sich gegenseitig oder wirken sich gegensätzlich auf die gemessenen Parameter aus. So könnte zum Beispiel zwar durch toxische Effekte Zellen lysiert werden, wodurch Glukose frei werden und anschließend weniger Glukose verbraucht werden würde. Bevor es aber zur Zellyse kommt, könnten die Zellen auf den vermehrten Stress auch reagieren, indem sie vermehrt anaerobe Glykolyse betreiben und mehr Glukose verbrauchen, wodurch das Laktat steigen und der pH Wert fallen würde. Die beiden Effekte würden sich im Endergebnis der Messung somit teilweise aufheben. Dies könnte erklären, weshalb in den Untersuchungen für Glukose, Laktat und pH-Wert kaum Effekte gezeigt werden konnten. Einen eindeutigen Effekt auf alle drei Parameter stellte sich lediglich für Endoxifen dar. Dass die stärksten Extrakte, die in den anderen Tests eine Wirkung hatten, hier keine deutlichen Ergebnisse liefern, könnte zusätzlich an der Zusammensetzung der Extrakte liegen, welche vermutlich selbst auch Glukose enthalten. Um belastbarere Aussagen anhand dieser Stoffwechselprodukte treffen zu können, müssten vertiefende Studien durchgeführt und die Extrakte noch genauer untersucht werden. Hier sollten die Stoffe lediglich

zusätzliche Hinweise liefern, wohingegen die besser zu vergleichenden in-vitro Zelltests die belastbaren Daten liefern sollten.

5.3.3 EXTRAKTE (EXTRAKTIONSMETHODEN UND EXTRAKTANALYTIK)

Die Herstellung von Pflanzenextrakten mittels Mikrowellenverfahren wird in der Literatur als geeignetes Verfahren zur Extraktion sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe wie Flavonoide beschrieben.^{79,187} Auch in dieser Arbeit zeigte sich die Überlegenheit dieser Methode gegenüber des wässrigen Aufbrühens. Wobei die Herstellung des wässrigen Extraktes für weitere Studien optimiert werden könnte. Um die Denaturierung teils enthaltener Pflanzenstoffe zu verhindern, sollte die Wassertemperatur gesenkt werden und die Ziehdauer könnte weiter optimiert werden¹¹¹. Auch könnten andere in der Literatur beschriebene, komplexere Extraktionsmethoden wie die Methode nach Luyengi verwendet werden, die beispielsweise durch Trocknen und mehrere Lösungsmittel einen höheren Wirkstoffgehalt erreichen können^{55,130}. Im Vergleich zu anderen Studien an Fenchel wurde der Pflanzenanteil wie bereits erwähnt, nicht getrocknet, sondern die frische Pflanze verwendet, wodurch es zu einer Verdünnung des Extraktes im Vergleich zu Trockensubstanzextrakten kam. Der hier verwendete Zwiebelfenchel (*F. vulgare ssp. vulgare var. azoricum*) weicht von den in anderen Studien häufig verwendetem Bitterfenchel (*F. vulgare ssp. vulgare var. vulgare*) ab. Dadurch ist die exakte Vergleichbarkeit mit anderen Studien nicht immer gegeben. Da sich die Inhaltsstoffe in großen Teilen aber decken sowie ohnehin jede Pflanze eine individuelle Zusammensetzung hat, ist eine vergleichende Betrachtung trotzdem als vertretbar anzusehen^{19,114}. Da für die Extraktherstellung konventionell angebauter Fenchel verwendet wurde, wäre es theoretisch denkbar, dass ein Teil der Wirkungen durch Verunreinigungen der Pflanze wie beispielsweise durch Pestizide bedingt ist. Dies hätte durch Verwenden einer biologisch angebauten Pflanze zumindest teilweise verhindert werden können.

Bei der Extraktanalyse mittel HPLC waren die Ergebnisse nicht besonders stark ausgeprägt, was zu einer erschwerten Analyse führte. Hintergrund dieser Resultate können in der Methodendurchführung der HPLC gesehen werden und müssen daher kritisch betrachtet werden. Zum einen sind die Ergebnisse bei einer Zwei-Phasen HPLC von dem Gradient der Phasen abhängig. Durch Optimieren des Elutionsgradienten hätten die Substanzen möglicherweise besser getrennt werden können und die Ergebnisse wären dadurch besser zu interpretieren gewesen^{73,122}. Durch einen langsameren Durchfluss der Extrakte hätte eine Überlagerung der Peaks möglicherweise besser vermieden werden können^{73,107,122}. Außerdem existieren unterschiedliche Versuchsbedingungen, um eine höhere Flavonoidbilanz mittel HPLC erzielen zu können. Hertog *et al.* gelang der größte Ertrag eines Quercetin-Aglycons in einer Extraktlösung von 50 % Methanol mit 1,2 M HCL, welche für 2 h bei 90 °C einem Rückflusskühler zugeführt

wurden⁸⁵. In einer Arbeit von Nuutila *et al.* führten ähnliche Versuchsbedingungen zu den deutlichsten Ergebnissen, welche durch den Zusatz von Ascorbinsäure weiter verbessert werden konnten¹⁵⁷. Lombard *et al.* erzielten aber auch mit einem stärker ethanolischen Extrakt gute Ergebnisse¹²⁸. Diese Aspekte wurden in dieser Studie nicht genauer eruiert, wobei dadurch möglicherweise bessere Ergebnisse zu erreichen gewesen wären.

Ein anderer Aspekt, der für die Auswertung von HPLC Ergebnissen beachtet werden muss, ist die Wellenlänge des Detektors. So könnte die Einstellung der Wellenlänge zu variierenden Absorbanzen führen^{21,46}. Daher wird diese in der Literatur je nach zu erwarteten Inhaltsstoffen und Versuchsbedingungen teils different gewählt. Für das Flavonoid Quercetin erreichten Rice-Evans *et al.* bei einer Wellenlänge von 371 nm die höchste Absorbanz, wohingegen Lombard *et al.* eine Wellenlänge von 261 nm verwendeten^{128,184}. Aber auch bei 254 nm der hier verwendeten Wellenlänge wurden gute Ergebnisse erzielt. Lombard *et al.* bestätigen dabei die Möglichkeit verschiedener Messbereiche zur Detektion der Flavonoide¹²⁸. Dies substanzspezifisch optimale Wellenlängen könnten erklären, warum es in den HPLC-Ergebnissen mit konstant gewählter Wellenlänge einen deutlichen Peak für Rutin gab, dieser für andere Stoffe aber geringer ausfiel.

Die Tatsache, dass Flavonoide häufig glykosidisch gebunden vorliegen, erschwert die chromatografische Detektion der Grundsubstanzen deutlich^{85,128}. So müssten, um den genauen Anteil des Aglykons bestimmen zu können, die glykosidischen Bindungen vor der Untersuchung beispielsweise mit Salzsäure hydrolysiert werden^{85,157}. Dieses Vorgehen würde allerdings wiederum andere Inhaltsstoffe ebenfalls stark beeinflussen, wäre aber ein wesentlicher Schritt, um präzisere Quantifizierungen zu ermöglichen^{85,223}. Zudem ist das Zugeben von Antioxidantien wie Ascorbinsäure zu diskutieren, da laut Van der Woude *et al.* so die Aglykon-Ausbeute zusätzlich erhöht werden kann. Durch Beachtung dieser Aspekte könnten vermutlich detailliertere Ergebnisse erreicht werden, wäre jedoch mit einem bedeutenden Mehraufwand verbunden.

VI. AUSBLICK

Da nach wie vor kaum weitere Studien zur Wirkung von Fenchel auf benigne Erkrankungen der Mamma vorliegen, sollten die vorliegenden Ergebnisse weiter vertieft werden. Für andere Pflanzen wie Leinsamen werden bereits zur Therapie benigner Brusterkrankungen eingesetzt und zeigen schmerzmildernde Effekte²⁰⁵. Dies wäre aufgrund der vorliegenden Ergebnisse auch für Fenchel gut denkbar. Die hier gezeigte wachstumshemmende Wirkung sollte mit der teils kontroverse Studienlage zur Wirkung einzelner Phytoestrogene verglichen werden. Dafür müssen weitere Studien zur Wirkung des Extraktes angeschlossen werden. Um eine Übertragbarkeit dieser Arbeit auf komplexe Organismen zu erkennen, wären vor allem weitergehende in-vivo Studien zur Wirkung des Fenchels von großem Interesse. Damit könnten möglicherweise die unter 1.6.2.1 beschriebenen Metabolisierungen besser untersucht werden. In-vivo Studien wären allerdings wesentlich komplexer und schwieriger, da viele weitere Einflussgrößen die Pharmakodynamik und -kinetik beeinflussen könnten. So hängt die Bioverfügbarkeit vieler Pflanzenstoffe unter anderem von zellulären Transportmechanismen, bakterieller Darmflora, genetischer Disposition sowie der Wechselwirkung mit anderen Stoffen ab^{81,117,161}. Für maligne Brustzellen gibt es beispielsweise bereits Hinweise einer Interaktion von Phytoestrogenen und Zytostatika¹⁰⁰. Auch die Wechselwirkung des Fenchelextraktes mit anderen Medikamenten ist zur umfänglichen Beschreibung des Extraktes von weiterem Interesse.

Aufgrund der Diskrepanz zwischen der Wirkung des Fenchelextraktes und der nicht vorhandenen Wirkung der Einzelstoffe sollten die Inhaltsstoffe des Extraktes weiter analysiert werden. Anschließend wären weiter Untersuchungen der Einzelstoffe auf die benigne Mammazellen von Interesse, um zu ergründen, ob die anfangs vermuteten Phytoestrogene überhaupt für die Wirkung verantwortlich sind oder ob andere Stoffe wie die teilweise beschriebenen Proteine eher dafür verantwortlich sind¹⁴⁰. Aufgrund der vielfach beschriebenen synergistischen Effekte von sekundären Pflanzenstoffen wäre auch die Untersuchung der Wirkung von Kombinationen der analysierten Pflanzenstoffe interessant¹²⁶.

Klinisch interessant ist vor allem die Wirkung auf MCF12a, da dort Atypien vorliegen, wodurch ein erhöhtes Risiko zur Entartung der Zellen besteht, welches durch das Extrakt verhindert werden kann. Die Relevanz der Zellen ohne Atypien ist aufgrund der Häufigkeit und des Leidensdrucks vieler Frauen allerdings auch nicht zu vernachlässigen. So ist auch die Wirkung des Extraktes auf die ER negativen MCF10a Zellen von Bedeutung und weiter zu verfolgen. Allerdings wirft die Wirkung auf die ER negativen Zellen die Frage nach den Wirkmechanismen des Extraktes auf. Denn offensichtlich liegt die Wirksamkeit des Extraktes nicht nur an dem Einfluss auf die Estrogenrezeptoren. Daher wäre es interessant, weitere Rezeptoren wie EGF oder TGF, über welche auch Tamoxifen potentiell Wirken könnte, sowie rezeptorunabhängige

Wege in Bezug auf das Fenchelextrakt weitergehen zu untersuchen, um die Wirkung auf die ER- benigen Zellen besser erklären zu können^{60,180}.

Eine zentrale Frage, die weiterhin offenbleibt, ist, ob der Fenchelextrakt auch auf gesunde, nicht veränderte Zellen ebenfalls eine viabilitäts- und proliferationshemmende Wirkung hat. Weu-Domschke konnte diese Wirkung für ein Leinwurzelextrakt bereits belegen und sieht darin Potential im Rahmen der Primärprävention von Brusterkrankungen⁵⁵. Dieser Frage sollte auch für Fenchel in weiteren Studien nachgegangen werden.

Die Warnung vor Estragol sollte auch nach dieser Studie weiterhin ernst genommen werden, auch wenn diese eher darauf hinweist, dass durch den Estragolgehalt in Fenchel keine Gefahr auszugehen scheint⁶². Dies müsste allerdings in randomisierten, kontrollierten Studien genauer untersucht und besser belegt werden. Die Ergebnisse bestärken die häufig erwähnte Meinung, dass die Warnung vor allem auf hoch dosierte Nahrungsergänzungsmittel und weniger auf Pflanzengemische mit Estragol zutreffen^{62,76,102}. Ausblickend könnte durch weitere umfangreichere Studien in Zukunft möglicherweise gezeigt werden, dass Estragol in normalen Mengen in Pflanzengemischen keine Gefahr darstellt.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Gutartige Erkrankungen der weiblichen Brust sind nach wie vor ein sehr häufiges Problem und beeinträchtigen viele Frauen. Trotzdem gibt es nur wenige Handlungsempfehlung und die Studienlage liegt weit hinter der zu Brustkrebs zurück, obwohl ein Teil der benignen Erkrankungen mit einem erhöhten Risiko an Brustkrebs zu erkranken einher geht.

Insbesondere Frauen nutzen besonders häufig komplementärmedizinische Ansätze wie die Phytotherapie. Passend dazu liegen bereits viele Studien zur Wirkung von sekundären Pflanzenstoffen, insbesondere von Phytoestrogenen vor. Ihnen werden häufig wachstumshemmende Einflüsse auch auf Brusterkrankungen, insbesondere Brustkrebs zugeschrieben. Epidemiologische Daten liefern allerdings teilweise widersprüchliche Ergebnisse.

Eine derartige Pflanze mit sekundären Pflanzenstoffen wie Phytoestrogen ist der Fenchel. Dieser ist schon lange als Heilpflanze bekannt und kommt potentiell auch in der Phytotherapie zum Einsatz. Neben einer Vielzahl anderer medizinischer Wirkungen, gibt es Studien, die eine antitumorale Wirkung auf maligne Mammapazellen zeigen. Allerdings wird aufgrund des im Fenchel enthaltenen Estragol und der damit assoziierten kanzerogenen Wirkung, auch vor dem übermäßigen Verzehr von Fenchel gewarnt, was anhand dieser Studie nicht bestätigt werden konnte.

Ziel dieser in-vitro Studie war es, die Wirkung eines Fenchelextraktes sowie einzelner Inhaltsstoffe auf fibrozystisch veränderte Mammapazellen zu untersuchen. Untersuchungen eines Fenchelextraktes auf derartige Zellen lagen bisher nicht vor. Um einen möglichen Einfluss des Hormonrezeptorstatus der Zellen zu demonstrieren, wurden die Versuche an einer rezeptorpositiven (MCF12a) sowie einer rezeptornegativen (MCF10a) Mammapazelllinie durchgeführt. Um dosisabhängige Effekte zu identifizieren kamen unterschiedliche Extraktkonzentrationen zum Einsatz.

Dieser Fenchelextrakt wurde aus handelsüblichem Fenchel, in Ethanol gelöst, mittels Mikrowellentechnik hergestellt. In der qualitativen HPLC-Analyse konnten Rutin, Estragol und Folsäure im Extrakt nachgewiesen werden. Der in Wasser gelöste Fenchel wurde aufgrund des geringeren Nachweises von Stoffen mittels HPLC nicht weiter getestet. Der Einfluss der analysierten Stoffe sowie des Fenchelextraktes und der Kontrollsubstanzen Endoxifen und Estradiol, wurde anhand Zellproliferations- und Zellviabilitätstests, sowie Stoffwechseleneinflüssen auf den Zellüberstand untersucht.

Der SERM Endoxifen zeigte in beiden Zelllinien die stärksten wachstumshemmenden Effekte mit Wirkungen deutlich unterhalb der ED₅₀.

Der Fenchelextrakt wirkte in den zwei höchsten Konzentrationen auf beide Zelllinien deutlich proliferations- und viabilitätshemmend. Für die übrigen Substanzen konnten keine eindeutigen Wirkungen auf die Mammazellen nachgewiesen werden.

Der proklamierte karzinogene Effekt von Fenchel aufgrund des enthaltenen Estragol zeigte sich in dieser in-vitro Studie nicht. Auch ein proliferationssteigernder Effekt des isolierten Estragols auf die Zellen war nicht zu erkennen.

Im Vergleich der beiden Zelllinien wurde für die hormonrezeptorpositive MCF12a Zellreihe ein stärkerer Effekt der wirksamen Fenchelkonzentrationen gegenüber der rezeptornegativen Zellen deutlich. Daher ist von einer hormonrezeptorabhängigen Komponente der Wirkung auszugehen. Darüber hinaus müssen der Wirkung des Extraktes, aufgrund der ebenfalls vorhandenen Einflüsse auf die hormonrezeptornegativen Zellen, auch rezeptorunabhängige Wirkmechanismen zugrunde liegen.

Da die isoliert untersuchten Inhaltsstoffe keine Wirkung zeigten, wohingegen der komplette Fenchelextrakt wachstumshemmend wirkte, bleibt unklar welche Inhaltsstoffe des Extraktes für die wachstumshemmende Wirkung verantwortlich sind. Zu vermuten sind neben weiteren Phytoestrogenen auch spezielle Fettsäuren oder Proteinkomplexe.

Aufgrund der hemmenden Wirkung des Fenchelextraktes auf die fibrozystischen Mammazellen kann vermutet werden, dass Fenchel eine regrediente Wirkung auf benigne Brusterkrankungen haben könnte und damit Beschwerden sowie das Fortschreiten mancher Zellen zu Brustkrebs verringern könnte. Der in der Literatur beschriebene, estragol-abhängige, karzinogene Effekt scheint sich anhand dieser Studie für Mammazellen nicht zu bestätigen. Diese Schlussfolgerungen müssen allerdings in weiterführenden Studien tiefergehend untersucht und auch an komplexeren Strukturen beschrieben werden um bestätigt werden zu können. Diese Studie ist als richtungsweisend zu sehen und zeigt dass es hinsichtlich der vielen Betroffenen, von großem Interesse sein sollte, dieses Gebiet weiter zu erforschen.

VIII. THESEN

1. Benigne Veränderungen der Mamma, wie die fibrozystische Mastopathie sind häufige Befunde in der Gynäkologie.
2. Einige gutartige Veränderungen der Brust sind mit einem gering erhöhten Risiko für Brustkrebs assoziiert.
3. Epidemiologisch zeigen sich deutliche Unterschiede in der Häufigkeit von Brusterkrankungen zwischen asiatischen Ländern und Europa/Amerika.
4. Diätetischen Faktoren werden deutlicher Einflüsse auf (benigne) Brusterkrankungen zugeschrieben.
5. Zahlreichen Phytoestrogenen werden protektive Effekte auf hormonabhängige Erkrankungen und antikarzinogene Effekte zugeschrieben.
6. Vor dem übermäßigen Konsum von Estragol wird aufgrund seiner potentiell kanzerogenen Wirkung gewarnt.
7. Phytoestrogene können aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu Estradiol an Estrogenrezeptoren binden und so als estrogenrezeptormodulierende Substanz agieren.
8. Fenchel ist eine sehr weit verbreitete Pflanze, welche schon lange in der traditionellen Pflanzenheilkunde verschiedener Kulturen eingesetzt wird.
9. Viele der oral aufgenommenen sekundären Pflanzenstoffe werden enteral metabolisiert und in veränderter Form resorbiert.

10. Endoxifen ist ein aktiver Metabolit des SERMs Tamoxifen.
11. Immunhistochemisch lassen sich für MCF12a Estrogen- sowie Progesteronrezeptoren nachweisen, bei MCF10a nicht.
12. Endoxifen wirkt sowohl auf Estrogenrezeptor -positive als auch -negative Zellen stark viabilitäts- und proliferationshemmend.
13. Der Fenchelextrakt induziert in hohen Testkonzentrationen in beiden Zelllinien anti-proliferative, sowie viabilitätshemmende Effekte, wohingegen schwache Konzentrationen des Extraktes keine Wirkung zeigen.
14. Die Wirkung des Fenchelextraktes ist in den Estrogenrezeptor positiven Zellen überwiegend ausgeprägter als in den ER negativen Zellen.
15. Die im Extrakt nachgewiesenen Substrate Rutin, Estragol und Folsäure zeigen in isolierter Form keine signifikante Wirkung auf die benignen Mammazellen.
16. Die vorliegende in-vitro Studie erlaubt keine Rückschlüsse auf Art und Umfang der systemischen Wirkung in-vivo. Daher ist eine Untersuchung der antitumoralen Wirkung des Fenchelextraktes für weitere Untersuchungen in-vivo von großem Interesse.

IX. PUBLIKATIONEN

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Fachzeitschriften publiziert:

- Geburtshilfe und Frauenheilkunde:

Schneider, B., Gerber, B., Reimer, T., & Richter, D. U. (2020). Einfluss von grünem Fenchel (*Foeniculum vulgare*) auf eine benigne hormonrezeptorpositive und-negative Mammazelllinie (MCF10a und MCF12a). *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, 80(06), 118. DOI: 10.1055/s-0040-1714628

- Senologie-Zeitschrift für Mammadiagnostik und -therapie:

Schneider, B., Gerber, B., Reimer, T., & Richter, D. U. (2020). Einfluss von grünem Fenchel (*Foeniculum vulgare*) auf eine benigne hormonrezeptorpositive und-negative Mammazelllinie (MCF10a und MCF12a). *Senologie - Zeitschrift für Mammadiagnostik und -therapie*, 17(02), 118. DOI: 10.1055/s-0040-1710728

X. LITERATURVERZEICHNIS

1. Abe, O. *et al.* Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: An overview of the randomised trials. *Lancet* 365, 1687–1717 (2005).
 2. Adlercreutz, H. Phytoestrogens and breast cancer. in *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* vol. 83 113–118 (Elsevier Ltd, 2002).
 3. Afanas'ev, I. B., Dcrozhko, A. I., Brodskii, A. V., Kostyuk, V. A. & Potapovitch, A. I. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* 38, 1763–1769 (1989).
 4. Agarwal, D., Saxena, S. N., Sharma, L. K. & Lal, G. Prevalence of Essential and Fatty Oil Constituents in Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill) Genotypes Grown in Semi Arid Regions of India. *J. Essent. Oil-Bearing Plants* 21, 40–51 (2018).
 5. Ahmad, 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).
 6. Ahmed, A. F., Shi, M., Liu, C. & Kang, W. Comparative analysis of antioxidant activities of essential oils and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds from Egypt and China. *Food Sci. Hum. Wellness* 8, 67–72 (2019).
 7. Al-Dhabi, N. A., Arasu, M. V., Park, C. H. & Park, S. U. An up-to-date review of rutin and its biological and pharmacological activities. *EXCLI Journal* vol. 14 59–63 (2015).
 8. Albert-Puleo, M. Fennel and anise as estrogenic agents. *J. Ethnopharmacol.* 2, 337–344 (1980).
 9. Alexandrovich, I., Rakovitskaya, O., Kolmo, E., Sidorova, T. & Shushunov, S. The effect of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed oil emulsion in infantile colic: A randomized, placebo-controlled study. *Altern. Ther. Health Med.* 9, 58–61 (2003).
 10. Alía, M. *et al.* Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2). *Eur. J. Nutr.* 45, 19–28 (2006).
 11. Alipour, S. & Eskandari, A. Phytoestrogens and Breast Diseases: A Matter of Concern for the Gynecologist. *Arch. Breast Cancer* 4–9 (2020) doi:10.32768/abc.2020714-9.
 12. Amir, L. H., Forster, D. A., Lumley, J. & McLachlan, H. A descriptive study of mastitis in Australian breastfeeding women: Incidence and determinants. *BMC Public Health* 7, 1–10 (2007).
 13. Anwar, F., Ali, M., Hussain, A. I. & Shahid, M. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds from Pakistan. *Flavour Fragr. J.* 24, 170–176 (2009).
-

14. ATCC. MCF 10A (ATCC ® CRL-10317™). <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-10317.aspx>. abgerufen: 2020-04-13
 15. Athanasiou, A., Aubert, E., Vincent Salomon, A. & Tardivon, A. Complex cystic breast masses in ultrasound examination. *Diagnostic and Interventional Imaging* vol. 95 169–179 (2014).
 16. ATCC. MCF-12A (ATCC ® CRL-10782™). <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-10782.aspx>. abgerufen: 2020-04-13
 17. AWMF & DGK & Deutsche Krebshilfe. S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Langversion 4.3 - Februar 2020. *Leitlinienprogramm Onkologie* <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/> (2020).
 18. Aziza, S. A. H., Azab, M. E. & El-Shall, S. K. Ameliorating Role of Rutin on Oxidative Stress Induced by Iron Overload in Hepatic Tissue of Rats. *Pakistan J. Biol. Sci.* 17, 964–977 (2014).
 19. Badgujar, S. B., Patel, V. V & Bandivdekar, A. H. *Foeniculum vulgare* Mill: a review of its botany, phytochemistry, pharmacology, contemporary application, and toxicology. *Biomed Res. Int.* 2014, 842674 (2014).
 20. Bakry, S. & M Mehany Al Azhar univerisity, A. B. *Anti carcinogenic activity of Methanolic Extract of Fennel Seeds (Foeniculum vulgare) against breast, colon, and liver cancer cells. Prenatal Exposure to Medroxyprogesterone Acetate View project Anti carcinogenic activity of Methanolic Extract of Fennel S. Article in International Journal of Advanced Research* <https://www.researchgate.net/publication/278027448> (2015).
 21. Banwart, W. L., Porter, P. M., Granato, T. C. & Hassett, J. J. HPLC separation and wavelength area ratios of more than 50 phenolic acids and flavonoids. *J. Chem. Ecol.* 11, 383–395 (1985).
 22. Baral, E., Nagy, E. & Berczi, I. Modulation of natural killer cell-mediated cytotoxicity by tamoxifen and estradiol. *Cancer* 75, 591–599 (1995).
 23. Barros, L., Carvalho, A. M. & Ferreira, I. C. F. R. The nutritional composition of fennel (*Foeniculum vulgare*): Shoots, leaves, stems and inflorescences. *LWT - Food Sci. Technol.* 43, 814–818 (2010).
 24. Batool, R., Salahuddin, H., Mahmood, T. & Ismail, M. Study of anticancer and antibacterial activities of *Foeniculum vulgare*, *Justicia adhatoda* and *Urtica dioica* as natural curatives. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. 63, 109–114 (2017).
 25. Bilal, I., Chowdhury, A., Davidson, J. & Whitehead, S. Phytoestrogens and prevention of breast cancer: The contentious debate. *World Journal of Clinical Oncology* vol. 5 705–712 (2014).
-

26. Birdane, F. M., Cemek, M., Birdane, Y. O., Gülçin, I. & Büyükokuroğlu, E. Beneficial effects of *Foeniculum vulgare* on ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats. *World J. Gastroenterol.* 13, 607–611 (2007).
 27. Bogucka-Kocka, A., Smolarz, H. D. & Kocki, J. Apoptotic activities of ethanol extracts from some Apiaceae on human leukaemia cell lines. *Fitoterapia* 79, 487–497 (2008).
 28. Boligon, A. A. & Athayde, M. L. Importance of HPLC in Analysis of Plants Extracts. *Austin Chromatogr.* 1, 2–3 (2014).
 29. Borenfreund, E. & Puerner, J. A. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Lett.* 24, 119–124 (1985).
 30. Bouallagui, Z., Han, J., Isoda, H. & Sayadi, S. Hydroxytyrosol rich extract from olive leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. *Food Chem. Toxicol.* 49, 179–184 (2011).
 31. Braakhuis, A., Campion, P. & Bishop, K. Reducing Breast Cancer Recurrence: The Role of Dietary Polyphenolics. *Nutrients* 8, 547 (2016).
 32. Brand. Zählkammern, nach Bürker, BLAUBRAND®, CE | BRAND. <https://shop.brand.de/de/p953>. abgerufen: 2021-04-20
 33. Bristol, D. W. NTP 3-month toxicity studies of estragole (CAS No. 140-67-0) administered by gavage to F344/N rats and B6C3F1 mice. *Toxic. Rep. Ser.* 1–111 (2011).
 34. Brown, N. M., Wang, J., Cotroneo, M. S., Zhao, Y.-X. & Lamartiniere, C. A. Prepubertal genistein treatment modulates TGF- α , EGF and EGF-receptor mRNAs and proteins in the rat mammary gland. *Mol. Cell. Endocrinol.* 144, 149–165 (1998).
 35. Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin. *Minimierung von Estragol-und Methyleugenol-Gehalten in Lebensmitteln.* [https://bfr.bund.de/cm/343/minimierung_von_estragol_und_methyleugenol_gehalten_i_n_lebensmitteln.pdf](https://bfr.bund.de/cm/343/minimierung_von_estragol_und_methyleugenol_gehalten_in_lebensmitteln.pdf) (2002).
 36. C M Rietjens, I. M. et al. Impact of Structural and Metabolic Variations on the Toxicity and Carcinogenicity of Hydroxy-and Alkoxy-Substituted Allyl-and Propenylbenzenes. (2014) doi:10.1021/tx500109s.
 37. Cauley, J. A. et al. Elevated serum estradiol and testosterone concentrations are associated with a high risk for breast cancer. *Ann. Intern. Med.* 130, 270–277 (1999).
 38. Chainy, G. B. N., Manna, S. K., Chaturvedi, M. M. & Aggarwal, B. B. Anethole blocks both early and late cellular responses transduced by tumor necrosis factor: Effect on NF- κ B, AP-1, JNK, MAPKK and apoptosis. *Oncogene* vol. 19 2943–2950 (2000).
 39. Chan, C. H., Yusoff, R., Ngoh, G. C. & Kung, F. W. L. Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *Journal of Chromatography A* vol. 1218 6213–6225 (2011).
-

40. Chen, H. *et al.* Anti-tumor effect of rutin on human neuroblastoma cell lines through inducing G2/M cell cycle arrest and promoting apoptosis. *Sci. World J.* 2013, (2013).
 41. Choi, E. M. & Hwang, J. K. Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of the fruit of *Foeniculum vulgare*. *Fitoterapia* 75, 557–565 (2004).
 42. Choo, E. J. *et al.* Anethole Exerts Antimetastatic Activity via Inhibition of Matrix Metalloproteinase 2/9 and AKT/Mitogen-Activated Kinase/Nuclear Factor Kappa B Signaling Pathways. *Biol. Pharm. Bull.* 34, 41–46 (2011).
 43. Committee for Human Medicinal Products. ICH guideline M7(R1) on assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk. *Int. Conf. Harmon.* 7, 1–110 (2015).
 44. Crouch, S. P. M., Kozlowski, R., Slater, K. J. & Fletcher, J. The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Methods* (1993) doi:10.1016/0022-1759(93)90011-U.
 45. Cwikla, C. *et al.* Investigations into the antibacterial activities of phytotherapeutics against *Helicobacter pylori* and *Campylobacter jejuni*. *Phyther. Res.* 24, 649–656 (2010).
 46. Daigle, D. J. & Conkerton, E. J. Analysis of flavonoids by HPLC: An update. *J. Liq. Chromatogr.* 11, 309–325 (1988).
 47. Delazar, A., Nahar, L., Hamedeyazdan, S. & Sarker, S. D. Microwave-assisted extraction in natural products isolation. *Methods Mol. Biol.* 864, 89–115 (2012).
 48. Deng, Y., Miki, Y. & Nakanishi, A. Estradiol/GPER affects the integrity of mammary duct-like structures in vitro. *Sci. Rep.* 10, (2020).
 49. Deutsche Gesellschaft für Ernährung. Deutsche Gesellschaft für Ernährung: Sekundäre Pflanzenstoffe und ihre Wirkung auf die Gesundheit – Eine Aktualisierung anhand des Ernährungsberichts 2012. DGEinfo (12/2014) S178–186. <https://www.dge.de/index.php?id=383>. abgerufen: 2020-10-12
 50. Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG). S3 *Leitlinie Therapie entzündlicher Brusterkrankungen in der Stillzeit Langfassung vom 18.03.2013.* (2013).
 51. Díaz-Maroto, M. C., Pérez-Coello, M. S., Esteban, J. & Sanz, J. Comparison of the volatile composition of wild fennel samples (*Foeniculum vulgare* Mill.) from Central Spain. *J. Agric. Food Chem.* 54, 6814–6818 (2006).
 52. Diedrich, K. *et al.* *Gynäkologie und Geburtshilfe.* (Springer Berlin Heidelberg, 2007). doi:10.1007/978-3-540-32868-1.
 53. 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.
 54. Doll, R. & Peto, R. The Causes of Cancer: Quantitative Estimates of Avoidable Risks of Cancer in the United States Today. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 66, 1192–1308 (1981).
-

55. Domschke, S. W.-. *Wirkung phytoestrogenhaltiger Leinwurzelextrakte (Linum usitatissimum) auf maligne und benigne Zelllinien der Mamma.* (2017).
 56. Drinkwater, N. R., Miller, E. C., Miller, J. A. & Pitot, H. C. Hepatocarcinogenicity of Estragole (1-Allyl-4-Methoxybenzene) and 1'-Hydroxyestragole in the Mouse and Mutagenicity of 1'-Acetoxyestragole in Bacteria. *J. Natl. Cancer Inst.* 57, 1323–1331 (1976).
 57. Ebbing, M. *et al.* Cancer incidence and mortality after treatment with folic acid and vitamin B12. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* 302, 2119–2126 (2009).
 58. Eczko, M. *Funktionelle und zytotoxische Untersuchungen zur Wirkung eines phytoestrogenhaltigen Wasserextraktes aus der Wurzel von Linum usitatissimum auf humane estrogenrezeptorpositive, -negative Mammakarzinomzellen (MCF-7; BT-20) und humane Hepatozyten.* (2014).
 59. Effenberger, K. *Der Einfluss von Phytoestrogenen auf Estrogenrezeptor gesteuerte Expressionsmuster in unterschiedlichen Zellpopulationen-Untersuchung potentieller pflanzlicher Alternativen zur Hormonersatztherapie in der Menopause.* (2004).
 60. Eisen, S. F. & Brown, H. A. Selective estrogen receptor (ER) modulators differentially regulate phospholipase D catalytic activity in ER-negative breast cancer cells. *Mol. Pharmacol.* 62, 911–920 (2002).
 61. Emons, G., Mustea, A. & Tempfer, C. Tamoxifen and endometrial cancer: A janus-headed drug. *Cancers* vol. 12 1–11 (2020).
 62. European Medicines Agency. *Public statement on the use of herbal medicinal products containing estragole.* https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/second-draft-revision-1-public-statement-use-herbal-medicinal-products-containing-estragole_en.pdf (2019).
 63. Fabian, C. J., Kimler, B. F. & Hursting, S. D. Omega-3 fatty acids for breast cancer prevention and survivorship. *Breast Cancer Research* vol. 17 62 (2015).
 64. Fachmann, W., Kraut, H., Senser, F. & Souci, S. W. *Lebensmitteltabelle für die Praxis : der kleine Souci-Fachmann-Kraut. Der kleine Souci Fachmann Kraut* (2009).
 65. Fan, X. H., Cheng, Y. Y., Ye, Z. L., Lin, R. C. & Qian, Z. Z. Multiple chromatographic fingerprinting and its application to the quality control of herbal medicines. *Anal. Chim. Acta* (2006) doi:10.1016/j.aca.2005.09.037.
 66. Fleming, R. M. What effect, if any, does soy protein have on breast tissue? *Integr. Cancer Ther.* 2, 225–228 (2003).
 67. Förster, C. & Kietz, S. Östrogenrezeptor beta (ER β) vermittelt zelluläre Differenzierungsprozesse. *BIOspektrum* 2/06, 162–164 (2006).
 68. Freissmuth, M., Offermanns, S. & Böhm, S. *Pharmakologie und Toxikologie.* (Springer Berlin Heidelberg, 2016). doi:10.1007/978-3-662-46689-6.
-

69. Ganeshpurkar, A. & Saluja, A. K. The Pharmacological Potential of Rutin. *Saudi Pharmaceutical Journal* vol. 25 149–164 (2017).
 70. Gęgotek, A., Rybałtowska-Kawałko, P. & Skrzydlewska, E. Rutin as a Mediator of Lipid Metabolism and Cellular Signaling Pathways Interactions in Fibroblasts Altered by UVA and UVB Radiation. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017, (2017).
 71. Gemeinholzer, B. Systematik der Pflanzen kompakt. in *Systematik der Pflanzen kompakt* (Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg, 2018). doi:10.1007/978-3-662-55234-6.
 72. Gerhard, I. & Kiechle, M. *Gynäkologie integrativ. Gynäkologie integrativ* (Elsevier, 2006). doi:10.1016/B978-3-437-56260-0.X5001-7.
 73. Gey, M. H. *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik - Biosubstanzen, Trennmethoden, Strukturanalytik, Applikationen. Instrumentelle Analytik und Bioanalytik* vol. 1542 (2015).
 74. Goerke, K. Mamma. in *Klinikleitfaden Gynäkologie Geburtshilfe* 394–430 (Urban & Fischer in Elsevier, 2018).
 75. Goetz, M. P. 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).
 76. Gori, L. et al. Can estragole in fennel seed decoctions really be considered a danger for human health? A fennel safety update. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* vol. 2012 (2012).
 77. Gstraunthaler, G. & Lindl, T. *Zell- und Gewebekultur. Zell- und Gewebekultur* (2013). doi:10.1007/978-3-642-35997-2.
 78. Hafiz, S. P., Barnes, N. L. P. & Kirwan, C. C. Clinical management of idiopathic mastalgia: a systematic review. *J. Prim. Health Care* 10, 312 (2018).
 79. Hammouda, F. M. et al. Evaluation of the essential oil of *Foeniculum vulgare* mill (fennel) fruits extracted by three different extraction methods by GC/MS. *African J. Tradit. Complement. Altern. Med.* 11, 277–279 (2013).
 80. Hankinson, S. E. et al. Plasma sex steroid hormone levels and risk of breast cancer in postmenopausal women. *J. Natl. Cancer Inst.* 90, 1292–1299 (1998).
 81. Hänsel, R. Sekundäre Pflanzenstoffe in Nahrungsergänzungsmitteln. in *Pharmakognosie — Phytopharmazie* 341–383 (2010). doi:10.1007/978-3-642-00963-1_15.
 82. Hänsel, R. & Sticher, O. *Pharmakognosie — Phytopharmazie*. (Springer Berlin Heidelberg, 2010). doi:10.1007/978-3-642-00963-1.
 83. He, W. & Huang, B. A review of chemistry and bioactivities of a medicinal spice: *Foeniculum vulgare*. *J. Med. Plants Res.* 5, 3595–3600 (2011).
-

84. Henderson, B. E. & Feigelson, H. S. Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21, 427–433 (2000).
 85. Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H. & Venema, D. P. *Optimization of a Quantitative HPLC Determination of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids in Vegetables and Fruits. J. Agric. FoodChem* vol. 40 <https://pubs.acs.org/sharingguidelines> (1992).
 86. Holdings, E. D. Biosen C-Line Bedienungsanleitung. vol. 44 http://www.gemar-celle.de/files/gemar/media/Produkte/Biosen_C-line/C-line_CLINIC-GP+_BA_de_2-00.pdf.
 87. Holland, P. A. & Gateley, C. A. Drug Therapy of Mastalgia: What Are the Options? *Drugs* 48, 709–716 (1994).
 88. Horneber, M. *et al.* How Many Cancer Patients Use Complementary and Alternative Medicine: A Systematic Review and Metaanalysis. *Integr. Cancer Ther.* 11, 187–203.
 89. Hosseinzadeh, H. & Nassiri-Asl, M. Review of the protective effects of rutin on the metabolic function as an important dietary flavonoid. *Journal of Endocrinological Investigation* vol. 37 783–788 (2014).
 90. Houk, V. N., Oakley, G. P., Erickson, J. D., Mulinare, J. & James, L. M. Recommendations for the use of folic acid to reduce the number of cases of spina bifida and other neural tube defects. *MMWR. Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports / Centers for Disease Control* vol. 41 1–7 (1992).
 91. Howard, B. A. & Lu, P. Stromal regulation of embryonic and postnatal mammary epithelial development and differentiation. *Seminars in Cell and Developmental Biology* vols 25–26 43–51 (2014).
 92. Hsieh, C.-Y., Santell, R. C., Haslam, S. Z. & Helferich, W. G. Estrogenic Effects of Genistein on the Growth of Estrogen Receptor-positive Human Breast Cancer (MCF-7) Cells in Vitro and in Vivo. *Cancer Res.* 58, (1998).
 93. Hsu, P. P. & Sabatini, D. M. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* 134, 703–707 (2008).
 94. <http://blog.kraeuterfarrer.at/wp-content/uploads/2012/10/Fenchel.jpg>. abgerufen: 2020-10-07
 95. Hübner, J. & Spahn, G. Sekundäre Pflanzenstoffe. *Onkologe* vol. 15 1144–1150 (2009).
 96. Huebner, J. *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).
 97. Huebner, J. *et al.* Online Survey of Patients with Breast Cancer on Complementary and Alternative Medicine. *Breast Care* 9, 60–63 (2014).
-

98. Huseman, T. G. *Handbuch der gesammten Arzneimittellehre: mit besonderer Rücksichtnahme auf die zweite Auflage der Deutschen Pharmakopoe für Aertzte und Studirende: Husemann, Theodor Gottfried, 1833-1901: Free Download, Borrow, and Streaming: Internet Archive.* (Julius Springer, 1883).
 99. Iddon, J. & Dixon, J. M. Mastalgia. *BMJ* 347, bmj.f3288 (2013).
 100. Iriti, M. *et al.* Rutin, a Quercetin Glycoside, Restores Chemosensitivity in Human Breast Cancer Cells. (2017) doi:10.1002/ptr.5878.
 101. Iten. In-vitro Vergleiche der antimikrobiellen Wirkung von pflanzlichen Vielstoffgemischen, artifiziellen Stoffkombinationen und phytogenen Monosubstanzen am Beispiel des ätherischen Öls von Thymus vulgaris. (2010) doi:10.5167/uzh-47000.
 102. Iten, F. & Saller, R. *Fencheltee: Risikoabschätzung der phytogenen Monosubstanz Estragol im Vergleich zum natürlichen Vielstoffgemisch. Übersichtsarbeit · Review Article* *Forsch Komplementärmed Klass Naturheilkd* vol. 11 www.heilpflanzewelt.de/monogra- (2004).
 103. Iten, F. & Saller, R. *Fencheltee im Kindesalter Nutzen-Risiko-Abschätzung.*
 104. Janni, W. Mammaerkrankungen. in *Facharzt Gynäkologie* 297–358 (Urban & Fischer in Elsevier, 2008). doi:10.1016/B978-3-437-23916-8.00011-1.
 105. 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.* 22, 51 (2020).
 106. Johnson, K. M. *et al.* Frequency of mastalgia among women veterans. *J. Gen. Intern. Med.* 21, S70–S75 (2006).
 107. Justesen, U., Knuthsen, P. & Leth, T. Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* 799, 101–110 (1998).
 108. Kallio, A., Zheng, A., Dahllund, J., Heiskanen, K. M. & Härkönen, P. Role of mitochondria in tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells. *Apoptosis* 10, 1395–1410 (2005).
 109. 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).
 110. Kaufmann, M., Costa, S. D. & Scharl, A. *Die Gynäkologie.* (Springer Berlin Heidelberg, 2013). doi:10.1007/978-3-642-20923-9.
 111. Kaur, G. J. & Arora, D. S. Antibacterial and phytochemical screening of Anethum graveolens, Foeniculum vulgare and Trachyspermum ammi. *BMC Complement. Altern. Med.* 9, 1–10 (2009).
-

112. Kim, Y. I. Folate and colorectal cancer: An evidence-based critical review. *Molecular Nutrition and Food Research* vol. 51 267–292 (2007).
 113. Klappan, A. K., Hones, S., Mylonas, I. & Brüning, A. Proteasome inhibition by quercetin triggers macroautophagy and blocks mTOR activity. *Histochem. Cell Biol.* 137, 25–36 (2012).
 114. Kooti, W. *et al.* Therapeutic and pharmacological potential of *Foeniculum vulgare* Mill: A review. *J. HerbMed Pharmacol.* 4, 1–9 (2015).
 115. Kosir, M. A. Abklärung der Erkrankungen der Brustdrüse - Gynäkologie und Geburtshilfe - MSD Manual Profi-Ausgabe. [https://www.msdsmanuals.com/de-de/profi/gynäkologie-und-geburtshilfe/erkrankungen-der-brustdruse/abklärung-der-erkrankungen-der-brustdruse](https://www.msdsmanuals.com/de-de/profi/gynakologie-und-geburtshilfe/erkrankungen-der-brustdruse/abklärung-der-erkrankungen-der-brustdruse). abgerufen: 2020-11-18
 116. Koudela, M. & Petříková, K. Nutritional compositions and yield of sweet fennel cultivars - *Foeniculum vulgare* Mill. ssp. *vulgare* var. *azoricum* (Mill.) Thell. *Hortic. Sci.* 35, 1–6 (2008).
 117. Koval'skii, I. V. *et al.* Molecular-biological problems of drug design and mechanism of drug action: Mechanisms of rutin pharmacological action (review). *Pharm. Chem. J.* 48, 73–76 (2014).
 118. Kuiper, G. G. J. M. *et al.* Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor β . *Endocrinology* 139, 4252–4263 (1998).
 119. Lampe, J. W. Isoflavonoid and lignan phytoestrogens as dietary biomarkers. *J. Nutr.* 133, 956S-964S (2003).
 120. Lampe, J. W. *et al.* Plasma isoflavones and fibrocystic breast conditions and breast cancer among women in Shanghai, China. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 16, 2579–2586 (2007).
 121. Lashkari, A., Najafi, F., Kavoosi, G. & Niazi, S. Evaluating the In vitro anti-cancer potential of estragole from the essential oil of *Agastache foeniculum* [Pursh.] Kuntze. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 27, 101727 (2020).
 122. Lee, T. D. *Introduction to Modern Liquid Chromatography, Third Edition. Journal of The American Society for Mass Spectrometry* vol. 22 (2011).
 123. Leitlinienprogramm Onkologie. *Komplementärmedizin bei onkologischen PatientInnen*.
 124. Leitzmann, C. Sekundäre Pflanzenstoffe in Lebensmitteln. in *Ernährung und Fasten als Therapie* 49–59 (Springer Berlin Heidelberg, 2010). doi:10.1007/978-3-540-88810-9_4.
 125. Lim, T. K. Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants: Volume 5, Fruits. in *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants: Volume 5, Fruits* vol. 5 36–59 (2013).
 126. Liu, R. H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action. in *Journal of Nutrition* vol. 134 3479–3485 (Oxford Academic, 2004).
-

127. Löffler, G., Pedrides, P. E. & Heinrich, P. C. *Biochemie & Pathobiochemie*. (2014). doi:10.1007/978-3-642-17972-3.
 128. Lombard, K. A., Geoffriau, E. & Peffley, E. Flavonoid quantification in onion by spectrophotometric and high performance liquid chromatography analysis. *HortScience* 37, 682–685 (2002).
 129. Longo, D. 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).
 130. Luyengi, L., Suh, N., Fong, H. H. S., Pezzuto, J. M. & Kinghorn, A. D. A lignan and four terpenoids from *Brucea javanica* that induce differentiation with cultured HL-60 promyelocytic leukemia cells. *Phytochemistry* 43, 409–412 (1996).
 131. Mahady, G. B. *et al.* In vitro susceptibility of *Helicobacter pylori* to botanical extracts used traditionally for the treatment of gastrointestinal disorders. *Phyther. Res.* 19, 988–991 (2005).
 132. Malhotra, S. K. Fennel and fennel seed. in *Handbook of Herbs and Spices: Second Edition* vol. 2 275–302 (Elsevier Inc., 2012).
 133. Mallni, T. *et al.* *EFFECT OF FOENICULUAI VULGARE. MILL SEED EXTRACT ON THE GENITAL ORGANS OF MALE AND FEMALE RATS.*
 134. Manach, C. *et al.* Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *FEBS Lett.* 409, 12–16 (1997).
 135. Mannello, F., Tonti, G. A. M. & Papa, S. Human gross cyst breast disease and cystic fluid: Bio-molecular, morphological, and clinical studies. *Breast Cancer Res. Treat.* 97, 115–129 (2006).
 136. Marahrens, P. Die Wirkung von grünem Tee und Matchatee, sowie ihrer Bestandteile Epigallocatechingallat und Quercetin auf MCF-7- und MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen. *Frauenheilkd. im Fokus wissenschaftlich fundiert und der Qual. verpflichtet* 78, (2018).
 137. 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, (2012).
 138. Martin, D., Weise, A. & Niclas, H. -J. The Solvent Dimethyl Sulfoxide. *Angew. Chemie Int. Ed. English* 6, 318–334 (1967).
 139. Megeressa, M., Do, V. & Ahmed, A. Cytotoxic activity of proteins extracted from fennel (*Foeniculum vulgare*) seeds against human cancer cell lines. *FASEB J.* 34, 1–1 (2020).
 140. Megeressa, M., Siraj, B., Zarina, S. & Ahmed, A. Structural characterization and in vitro lipid binding studies of non-specific lipid transfer protein 1 (nsLTP1) from fennel (*Foeniculum vulgare*) seeds. *Sci. Rep.* 10, 1–13 (2020).
-

141. Mehralikhani, A., Movahedi, M., Larypoor, M. & Golab, F. Evaluation of the Effect of *Foeniculum vulgare* on the Expression of E-Cadherin, Dysadherin and Ki-67 in BALB/C Mice with 4T1 Model of Breast Cancer. *Nutr. Cancer* (2020) doi:10.1080/01635581.2020.1746365.
142. Messina, M. & Barnes, S. The Role of Soy Products in Reducing Risk of Cancer. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 83, 541–546 (1991).
143. Messina, M. J. & Loprinzi, C. L. Soy for breast cancer survivors: A critical review of the literature. in *Journal of Nutrition* vol. 131 3095S-3108S (American Institute of Nutrition, 2001).
144. Mirghafourvand, M., Mohammad-Alizadeh-Charandabi, S., Ahmadpour, P. & Javadzadeh, Y. Effects of *Vitex agnus* and Flaxseed on cyclic mastalgia: A randomized controlled trial. *Complementary Therapies in Medicine* vol. 24 90–95 (2016).
145. Moazzez, A. *et al.* Breast abscess bacteriologic features in the era of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemics. *Arch. Surg.* 142, 881–884 (2007).
146. Mohamad, R. H. *et al.* Antioxidant and anticarcinogenic effects of methanolic extract and volatile oil of fennel seeds (*Foeniculum vulgare*). *J. Med. Food* 14, 986–1001 (2011).
147. Momenimovahed, Z. & Salehiniya, H. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer: Targets and Therapy* vol. 11 151–164 (2019).
148. Mosaddegh, M., Esmaeili, S., Hamzelomoghadam, M. & Alem Bagheri, A. *In vitro cytotoxic assay of giant Fennel fractions M. Research in Pharmaceutical Sciences* vol. 7 (2012).
149. Muckensturm, B., Foechterlen, D., Reduron, J. P., Danton, P. & Hildenbrand, M. Phytochemical and chemotaxonomic studies of *Foeniculum vulgare*. *Biochem. Syst. Ecol.* (1997) doi:10.1016/S0305-1978(96)00106-8.
150. Mulisch, M. & Welsch, U. *Romeis - Mikroskopische Technik*. (Springer Berlin Heidelberg, 2015). doi:10.1007/978-3-642-55190-1.
151. Murkies, A. L., Wilcox, G. & Davis, S. R. Phytoestrogens ¹. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 297–303 (1998).
152. Namavar Jahromi, B., Tartifizadeh, A. & Khabnadideh, S. Comparison of fennel and mefenamic acid for the treatment of primary dysmenorrhea. *Int. J. Gynecol. Obstet.* 80, 153–157 (2003).
153. Neuendorf, J. *Das Urinsediment*. (Springer Berlin Heidelberg, 2015). doi:10.1007/978-3-662-46074-0.

154. Nguyen, S. T., Nguyen, H. T.-L. & Truong, K. D. Comparative cytotoxic effects of methanol, ethanol and DMSO on human cancer cell lines. *Biomed. Res. Ther.* 7, 3855–3859 (2020).
 155. Niles, A. L. *et al.* A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers. *Anal. Biochem.* (2007) doi:10.1016/j.ab.2007.04.007.
 156. Nindrea, R. D., Aryandono, T., Lazuardi, L. & Dwiprahasto, I. Protective effect of omega-3 fatty acids in fish consumption against breast cancer in Asian patients: A meta-analysis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* vol. 20 327–332 (2019).
 157. Nuutila, A. M., Kammiovirta, K. & Oksman-Caldentey, K. M. Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. *Food Chem.* 76, 519–525 (2002).
 158. OECD. Test No. 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test. *OECD Guidel. Test. Chem.* 1–15 (2019) doi:10.1787/9789264071162-en.
 159. Okdemir, D., Hatipoglu, N., Kurtoglu, S., Akin, L. & Kendirci, M. Premature thelarche related to fennel tea consumption? *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 27, 175–179 (2014).
 160. Olaleye, M. T., Crown, O. O., Akinmoladun, A. C. & Akindahunsi, A. A. Rutin and quercetin show greater efficacy than nifedipin in ameliorating hemodynamic, redox, and metabolite imbalances in sodium chloride-induced hypertensive rats. *Hum. Exp. Toxicol.* 33, 602–608 (2014).
 161. Olthof, M. R., Hollman, P. C. H., Buijsman, M. N. C. P., Van Amelsvoort, J. M. M. & Katan, M. B. Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. *J. Nutr.* 133, 1806–1814 (2003).
 162. Ory, H., Cole, P., MacMahon, B. & Hoover, R. Oral Contraceptives and Reduced Risk of Benign Breast Diseases. *N. Engl. J. Med.* 294, 419–422 (1976).
 163. Pai, M. B. H., Prashant, G. M., Murlidhar, K. S., Shivakumar, K. M. & Chandu, G. N. Antifungal efficacy of Punica granatum, Acacia nilotica, Cuminum cyminum and Foeniculum vulgare on Candida albicans: An in vitro study. *Indian J. Dent. Res.* 21, 334–336 (2010).
 164. 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).
 165. Paini, A. *et al.* In vivo validation of DNA adduct formation by estragole in rats predicted by physiologically based biodynamic modelling. *Mutagenesis* 27, 653–663 (2012).
 166. Panche, A. N., Diwan, A. D. & Chandra, S. R. Flavonoids: an overview. *J. Nutr. Sci.* 5, 1–15 (2020).
-

167. Parejo, I. *et al.* Bioguided Isolation and Identification of the Nonvolatile Antioxidant Compounds from Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) Waste. (2004) doi:10.1021/jf030717g.
168. PathoPic - pathologische Referenz-Bilddatenbank. Pathorama. <https://v2.pathorama.ch/hipaku/6/19/112/show>. abgerufen: 2020-11-30
169. Patisaul, H. B. & Jefferson, W. The pros and cons of phytoestrogens. *Frontiers in Neuroendocrinology* vol. 31 400–419 (2010).
170. Petty, R. D., Sutherland, L. A., Hunter, E. M. & Cree, I. A. Comparison of MTT and ATP-based assays for the measurement of viable cell number. *J. Biolumin. Chemilumin.* **10**, 29–34 (1995).
171. Pietta, P. G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* vol. 63 1035–1042 (2000).
172. Porstmann, T., Ternynck, T. & Avrameas, S. Quantitation of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation into DNA: an enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response. *J. Immunol. Methods* (1985) doi:10.1016/0022-1759(85)90236-4.
173. Possemiers, S., Bolca, S., Eeckhaut, E., Depypere, H. & Verstraete, W. Metabolism of isoflavones, lignans and prenylflavonoids by intestinal bacteria: producer phenotyping and relation with intestinal community. *FEMS Microbiol. Ecol.* **61**, 372–383 (2007).
174. Pourjafari, F., Haghpanah, T., Nematollahi-Mahani, S. N., Pourjafari, F. & Ezzatabadipour, M. Hydroalcoholic extract and seed of *Foeniculum vulgare* improve folliculogenesis and total antioxidant capacity level in F1 female mice offspring. *BMC Complement. Med. Ther.* **20**, 1–8 (2020).
175. Prasad, R. & Prasad, S. A review on the chemistry and biological properties of Rutin, a promising nutraceutical agent Cyclophosphamide and ascorbic acid-mediated ultrastructural and biochemical changes in Dalton's lymphoma cells in vivo View project Antitumor and phytochemical s. (2019) doi:10.31024/ajpp.2019.5.s1.1.
176. Promega. TECHNICAL BULLETIN CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay. <https://www.promega.de/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-glo-luminescent-cell-viability-assay-protocol.pdf?la=en> (2015). abgerufen: 2020-03-21
177. Promega. TECHNICAL BULLETIN CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay. <https://www.promega.de/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/cytotox-glo-cytotoxicity-assay-protocol.pdf?la=en> (2017). abgerufen: 2020-03-21
178. Punt, A. *et al.* A physiologically based biokinetic (PBBK) model for estragole bioactivation and detoxification in rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (2008) doi:10.1016/j.taap.2008.04.011.

179. Qu, Y. *et al.* Evaluation of MCF10A as a reliable model for normal human mammary epithelial cells. *PLoS One* 10, (2015).
 180. Radin, D. P. & Patel, P. Delineating the molecular mechanisms of tamoxifen's oncolytic actions in estrogen receptor-negative cancers. *European Journal of Pharmacology* (2016) doi:10.1016/j.ejphar.2016.04.017.
 181. Rahimi, R. & Ardekani, M. R. S. Medicinal properties of *Foeniculum vulgare* Mill. in traditional Iranian medicine and modern phytotherapy. *Chin. J. Integr. Med.* 19, 73–79 (2013).
 182. Rather, M. A., Dar, B. A., Sofi, S. N., Bhat, B. A. & Qurishi, M. A. *Foeniculum vulgare*: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety. *Arabian Journal of Chemistry* vol. 9 S1574–S1583 (2016).
 183. Repetto, G., Del Peso, A. & Zurita, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. (2008) doi:10.1038/nprot.2008.75.
 184. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. & Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* vol. 20 933–956 (1996).
 185. Robert Koch Institut. *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*.
 186. Roche. Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) - Version 17. <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Roche/Bulletin/11647229001bul.pdf>. abgerufen: 2020-03-21
 187. Routray, W. & Orsat, V. Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids: A Review. *Food and Bioprocess Technology* vol. 5 409–424 (2012).
 188. Rungruang, B. & Kelley, J. L. Benign Breast Diseases: Evaluation and Management. *Clin. Obstet. Gynecol.* 59, 710–726 (2016).
 189. Sak, K. Epidemiological evidences on dietary flavonoids and breast cancer risk: A narrative review. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* vol. 18 2309–2328 (2017).
 190. Sanchez-Spitman, A. B. *et al.* Clinical pharmacokinetics and pharmacogenetics of tamoxifen and endoxifen. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* 12, 523–536 (2019).
 191. 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. *Horm. Cancer* 5, 146–160 (2014).
 192. Schmitz, S. *Der Experimentator - Zellkultur* (3. Auflage). Spektrum Verlag (Springer) (2011).
 193. Schulte-Hubbert, R., Küpper, J. H., Thomas, A. D. & Schrenk, D. Estragole: DNA adduct formation in primary rat hepatocytes and genotoxic potential in HepG2-CYP1A2 cells. *Toxicology* 444, 152566 (2020).
-

194. Scurr, J., Hedger, W., Morris, P. & Brown, N. The Prevalence, Severity, and Impact of Breast Pain in the General Population. *Breast J.* 20, 508–513 (2014).
 195. Seegers, J. C. *et al.* The cytotoxic effects of estradiol-17 β , catecholestradiols and methoxyestradiols on dividing MCF-7 and Hela cells. *J. Steroid Biochem.* 32, 797–809 (1989).
 196. Selvakumar, P. *et al.* Flavonoids and other polyphenols act as epigenetic modifiers in breast cancer. *Nutrients* vol. 12 761 (2020).
 197. Shahat, A. *et al.* Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Essential Oils from Organically Cultivated Fennel Cultivars. *Molecules* 16, 1366–1377 (2011).
 198. Sigma-Aldrich. Productinformation In Vitro Toxicology Assay Kit Neutral Red Based. <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/tox4bul.pdf>. abgerufen: 2020-03-21
 199. Simard, A., Vobecky, J. & Vobecky, J. S. Nutrition and lifestyle factors in fibrocystic disease and cancer of the breast. *Cancer Detect. Prev.* 14, 567–572 (1990).
 200. Singh, B. & Kale, R. K. Chemomodulatory action of *Foeniculum vulgare* (Fennel) on skin and forestomach papillomagenesis, enzymes associated with xenobiotic metabolism and antioxidant status in murine model system. *Food Chem. Toxicol.* 46, 3842–3850 (2008).
 201. Soule, H. D. *et al.* Isolation and Characterization of a Spontaneously Immortalized Human Breast Epithelial Cell Line, MCF-10. *Cancer Res.* 50, 6075–6086 (1990).
 202. Stachs, A., Stubert, J., Reimer, T. & Hartmann, S. Benign breast disease in women. *Dtsch. Arztebl. Int.* 116, 565–573 (2019).
 203. Stanger, O. Physiology of Folic Acid in Health and Disease. *Curr. Drug Metab.* 3, 211–223 (2005).
 204. Strober, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. in *Current Protocols in Immunology* vol. 21 A.3B.1-A.3B.2 (John Wiley & Sons, Inc., 2001).
 205. Stubert, J., Gerber, B., Stachs, A., Hartmann, S. & Reimer, T. *Gutartige Erkrankungen der Brust. Gutartige Erkrankungen der Brust* (De Gruyter, 2019). doi:10.1515/9783110611106.
 206. 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, 117822341000400 (2010).
 207. Sweeney, M. F., Sonnenschein, C. & Soto, A. M. Characterization of MCF-12A cell phenotype, response to estrogens, and growth in 3D. *Cancer Cell Int.* 18, 1–12 (2018).
-

208. Syed, F. Q. *et al.* Chloroform fraction of *Foeniculum vulgare* induced ROS mediated, mitochondria-caspase-dependent apoptotic pathway in MCF-7, human breast cancer cell line. *J. Ethnopharmacol.* 218, 16–26 (2018).
209. Tait, L., Russo, J. & Soule, H. D. Ultrastructural and Immunocytochemical Characterization of an Immortalized Human Breast Epithelial Cell Line, MCF-10. *Cancer Res.* 50, 6087–6094 (1990).
210. Tan, P. H. *et al.* The 2019 World Health Organization classification of tumours of the breast. *Histopathology* 77, 181–185 (2020).
211. Tao, Z. Q. *et al.* Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. *Cell Biochem. Biophys.* 72, 333–338 (2015).
212. Telci, I., Demirtas, I. & Sahin, A. Variation in plant properties and essential oil composition of sweet fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) fruits during stages of maturity. *Ind. Crops Prod.* 30, 126–130 (2009).
213. Tolliday, N. High-Throughput Assessment of Mammalian Cell Viability by Determination of Adenosine Triphosphate Levels. *Curr. Protoc. Chem. Biol.* 2, 153–161 (2010).
214. Vázquez-Villegas, P., Rito-Palomares, M., Martínez-Chapa, S. O. & Hosseini, S. *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) From A to Z.* (2018).
215. Vector Laboratories. A Guide to Multiple Antigen Labeling. <https://vectorlabs.com/media/folio3/productattachments/protocol/MLB.pdf>. abgerufen: 2020-04-07
216. Verkaik, S., Kamperman, A. M., van Westrhenen, R. & Schulte, P. F. J. The treatment of premenstrual syndrome with preparations of *Vitex agnus castus*: a systematic review and meta-analysis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* vol. 217 150–166 (2017).
217. Wacker, J., Sillem, M., Bastert, G. & Beckmann, M. W. *Therapiehandbuch Gynäkologie und Geburtshilfe.* (Springer Berlin Heidelberg, 2013). doi:10.1007/978-3-642-30189-6.
218. Warzyszynska, J. E. & Kim, Y.-I. J. Folate in Human Health and Disease. *eLS* (2014) doi:10.1002/9780470015902.a0002268.pub2.
219. Williams, C., Edvardsson, K., Lewandowski, S. A., Ström, A. & Gustafsson, J. Å. 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).
220. Wink, M. Wie funktionieren Phytopharmaka? - Wirkmechanismen der Vielstoffgemische. *Zeitschrift für Phyther.* 26, 262–270 (2005).
221. Wink, M. *Die Verwendung pflanzlicher Vielstoffgemische in der Phytotherapie* Secondary metabolism View project Ornithology View project. <https://www.researchgate.net/publication/242711173>.

222. Wolf, A. S. *Phytoesrogene. Journal für Menopause* vol. 5 www.kup.at/menopause (1998).
223. Van Der Woude, H. *et al.* Biphasic modulation of cell proliferation by quercetin at concentrations physiologically relevant in humans. *Cancer Lett.* 200, 41–47 (2003).
224. Wu, C. A Case-Control Study of Risk Factors for Fibrocystic Breast Conditions: Shanghai Nutrition and Breast Disease Study, China, 1995-2000. *Am. J. Epidemiol.* 160, 945–960 (2004).
225. Yager, J. D., Davidson, N. E. & Hopkins Bloomberg, J. *Estrogen Carcinogenesis in Breast Cancer. N Engl J Med* vol. 354 www.nejm.org (2006).
226. Yang, J., Guo, J. & Yuan, J. In vitro antioxidant properties of rutin. *LWT - Food Sci. Technol.* 41, 1060–1066 (2008).
227. Zander, Robert; Erhardt, Walter; Götz, E. *Handwörterbuch der Pflanzennamen : [20.000 Arten, 10.000 Synonyme, aktualisierte Nomenklatur] = Dictionary of plant names.* (Verlag Eugen Ulmer, 2008).
228. Кишакевич, I. T. & Конар, P. C. Correction of dismetabolic manifestations in perimenopausal and early postmenopausal women with fibrocystic disease. *Reprod. Endocrinol.* 0, 82 (2016).

XI. ANHANG

Tabelle 13: Übersicht verwendeter Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank	Function Line	Heraeus Instruments
Glukose-/Laktat Messsystem	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	Injektionsspritze 100 µl	Knauer
HPLC-Software	ClarityChrom V 2.6.	Knauer
<i>Microplate Reader</i>	Modell 680	Bio Rad
Mikroskop	Axiostar Plus	Zeiss
Mikroskop	Axiovert 40 C	Zeiss
Mikroskop-Kamera	AxioCam MRc	Zeiss
Mikrowelle	Discover SP	CEM GmbH
Multimode Reader	GloMax Discover	Promega
pH-Messelektrode	Orion 3 Star pH Benchtop	Thermo Scientific
Plattenrüttler	TPM – 2	Sarstedt
Rollenmischer	RM 5	Hecht
Sicherheitswerkbank	Hera Safe	Heraeus Instruments
Vakuum-Konzentrator	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	Heraeus Instruments
Zentrifuge	Universal 320R	Hettich

Tabelle 14: Allgemeine Labormaterialien und Reagenzien

Material / Reagenz	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
Ethanol 70%	Roth
Ethanol 99 %	Roth
Filter für 50 ml Zentrifugationsröhrchen (0,45 µm Porengröße)	Greiner bio-one
Methanol	Roth
Multipipette (Multipipette Plus)	Eppendorf
Parafilm	American National Can
Zählkammer	Fein-Optik
Zellkulturflaschen 550 ml, 250 ml, 50 ml (175 cm ² , 75 cm ² , 25 cm ²)	Greiner, bio-one

Tabelle 15: Reagenzien und Lösungen für die Zellkultivierung

Reagenz/Lösung	Anmerkung	Hersteller
Amphotericin B	Mediumzusatz (0,5 %)	CC-Pro
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit Phenolrot	1:1 mit Ham's F12	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)		G. Vogler b.v. Rotterdam
Horse Serum	Mediumzusatz (5 %)	Sigma-Aldrich
Nutrient Mixture F-12 (Ham's F-12),	1:1 mit DMEM	Biowest
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung	Roth
Penicillin/Streptomycin	Mediumzusatz (0,2 %)	PAN Biotech
Supplement Mix Mammary Epithelial Cell GM	Mediumzusatz (2 %)	Promo-Cell

Trypanblau	Trypan Blue Stain 0,4 %	Gibco
Trypsin	Trypsin-EDTA 10x (5000 mg / l Trypsin, 2000 mg / l EDTA)	CC-Pro

Tabelle 16: Reagenzien für in-vitro Zelltests

Reagenz	Anmerkung	Hersteller
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
CytoTox-Glo Reagenz		Promega
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Zellpassage, Zusatz Einfriermedium	G. Vogler b.v. Rotterdam
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ohne Phenolrot	Temporärer Austausch für Neutralrot Test	Sigma Aldrich
Endoxifen	Kontrolle	Sigma-Aldrich
Estradiol	Referenz zu Fenchel	Sigma-Aldrich
Estragol	Referenz zu Fenchel	Sigma-Aldrich
Fenchelextrakt	Aus frischem Fenchel	Eigenherstellung
Folsäure	Referenz zu Fenchel	Carl Roth
In-vitro Toxicology Assay Kit, Neutral Red based	Zytotoxizität	Sigma-Aldrich
Rutin	Referenz zu Fenchel	Carl Roth

Tabelle 17: Reagenzien für immunhistochemischen Test

Reagenz	Anmerkung	Hersteller
ER Alpha AK	Rabbit monoclonal IgG	Biorbyt
ER Beta AK	Mouse monoclonal IgG2a	GeneTex
Formafix 4 %	Gepuffert	Grimm med. Recycling GmbH
H ₂ O ₂	35 %	Roth
Impress Reagent Kit Peroxidase	Anti-Mouse/Rabbit Ig MP-7500	Vector Laboratories
Impress Reagent Kit Horse Serum	R.T.U. Normal Horse Serum (2,5 %)	Vector Laboratories
LinRed IHC	Substratkit für Peroxidase	Linaris
Progesteronrezeptor AK	Rabbit monoclonal IgG	Biorbyt

Tabelle 18: Übersicht Zelllinien

MCF10A (ATCC® CRL-10317™)	ACCT - LCG Standards GmbH
MCF-12A (ATCC® CRL-10782™)	ACCT - LCG Standards GmbH

XII. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich allen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin und Doktormutter Frau PD Dr. rer. nat. habil. Dagmar-Ulrike Richter, Leiterin des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik Rostock für die Vergabe dieser Arbeit, sowie die enorme Unterstützung, die kompetente Betreuung und ihren fachlichen Rat bei der Durchführung dieser Arbeit, sowie die stets freundliche und zugewandte Art.

Ebenso möchte ich mich bei dem gesamten Team und meinen Mitdoktoranden des Forschungslabors der UFK, insbesondere MTLA Frau Bianca Gosch, für die fachliche und moralische Unterstützung bei der Durchführung der Laborarbeiten, sowie die stets gute Atmosphäre im Forschungslabor bedanken.

Mein Dank gilt auch dem evangelischen Studienwerk Villigst, durch dessen Unterstützung ich trotz ehrenamtlicher Tätigkeiten noch genug Zeit für diese Arbeit aufbringen konnte.

Darüber hinaus gilt mein Dank allen Freunden und StudienkollegInnen, insbesondere Hanjo und Lennard, die mich auch in schwierigen Zeiten unterstützt und immer wieder aufgeheizt und zum Lachen gebracht haben. Meine Freunde waren stets ein großer Rückhalt für mich, der als wichtiger Teil zum Erfolg meines Studiums beigetragen hat. Hier gilt mein besonderer Dank auch Simon für das gründliche Korrekturlesen der Arbeit.

Florina danke ich von ganzem Herzen für ihre uneingeschränkte Unterstützung, das Verständnis, ihre Liebe und die Geduld die sie mir während dem Schreiben dieser Arbeit und während meines ganzen Studiums entgegengebracht hat.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Brüdern und besonders bei meinen Eltern bedanken, die mich während dem Verfassen dieser Arbeit und während meines gesamten Studiums, auch in schwierigen Situation unterstützt haben und deren uneingeschränkter Rückhalt meinen bisherigen Lebensweg stets begleitet hat. Dank ihrer Unterstützung konnte ich den Weg bis hier her gehen.