

Universität Rostock



Traditio et Innovatio

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

Vergleichende Untersuchungen zum Proliferationsverhalten
hormonaktiver Endometriumkarzinomzellen (RL95-2 und Ishikawa)
unter Einfluss eines Moringablattextraktes

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorengrades
der
Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Sophia Viktoria Rudolf
geb. 28.04.1997 in Lörrach

Rostock, November 2021

verteidigt am
26. Oktober 2022

Dekan

Prof. Dr. med. univ. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter/-in

Prof. PD Dr. rer. nat. habil. Dagmar-Ulrike Richter
Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik Rostock

2. Gutachter/-in

Prof. Dr. med. Karin Kraft
Lehrstuhl für Naturheilkunde Rostock

3. Gutachter/-in

Prof. Dr. Michael Keusgen
Institut für Pharmazeutische Chemie Marburg

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Abbildungsverzeichnis | III |
| Tabellenverzeichnis | IV |
| Abkürzungsverzeichnis | V |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Endometriumkarzinom | 1 |
| 1.1.1 Epidemiologie | 1 |
| 1.1.2 Aufbau des Uterus - grober Überblick | 2 |
| 1.1.3 Pathogenese | 2 |
| 1.1.4 Risikofaktoren | 4 |
| 1.1.5 Diagnostik | 8 |
| 1.1.6 Therapie | 10 |
| 1.1.7 Prävention | 14 |
| 1.2 Moringa | 15 |
| 1.3 Referenzen | 18 |
| 1.3.1 Quercetin | 18 |
| 1.3.2 Rutin | 20 |
| 1.3.3 Kämpferol | 22 |
| 1.3.4 Isorhamnetin | 24 |
| 1.3.5 Folsäure | 25 |
| 1.4 Kontrollen | 27 |
| 1.4.1 Tamoxifen | 27 |
| 1.4.2 Endoxifen | 29 |
| 1.4.3 Estradiol | 29 |
| 1.5 Zielstellung | 30 |
| 2 Material und Methoden | 31 |
| 2.1 Extraktherstellung | 31 |
| 2.1.1 Ethanol-Verfahren | 31 |
| 2.1.2 Vorbereitung der klinisch chemischen Analyse des Extraktes | 31 |
| 2.1.3 Herstellung der Referenzwerte | 32 |
| 2.2 Vorbereitung für die Kontrollen | 33 |
| 2.3 Zelllinie und Zellkultivierung | 33 |
| 2.4 Immunhistochemie | 34 |

| | | |
|-------|--|----|
| 2.5 | Vorbereitung der Zellteste | 35 |
| 2.5.1 | Bestimmung der Lebendzellzahl | 35 |
| 2.6 | HPLC | 36 |
| 2.6.1 | Funktionsweise der HPLC | 36 |
| 2.6.2 | Aufbau einer HPLC-Apparatur | 37 |
| 2.7 | Zellteste | 38 |
| 2.7.1 | CellTiter-Glo [®] Test | 39 |
| 2.7.2 | CytoTox-Glo [™] Test | 40 |
| 2.7.3 | BrdU Test | 41 |
| 2.7.4 | Neutralrottest | 42 |
| 2.7.5 | Statistische Auswertung | 43 |
| 2.7.6 | Messung der Glucose-, Laktat und pH-Werte | 44 |
| 2.8 | Geräte, Materialien und Chemikalien | 46 |
| 3 | Ergebnisse | 49 |
| 3.1 | Immunhistochemie | 49 |
| 3.2 | HPLC | 51 |
| 3.3 | CellTiter-Glo [®] Test | 53 |
| 3.4 | CytoTox-Glo [™] Test | 55 |
| 3.5 | BrdU Test | 57 |
| 3.6 | Neutralrottest | 59 |
| 3.7 | Messung der pH-, Glucose- und Laktat-Werte | 61 |
| 4 | Diskussion | 65 |
| 4.1 | Material und Methoden | 65 |
| 4.2 | Ergebnisse | 65 |
| 5 | Methodenkritik | 73 |
| 6 | Ausblick | 74 |
| 7 | Zusammenfassung | 75 |
| 8 | Thesen | 76 |
| 9 | Publikation | 77 |
| | Literaturverzeichnis | 92 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|----|--|----|
| 1 | Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2016 | 2 |
| 2 | Histologischer Aufbau des Endometriums | 3 |
| 3 | Neue FIGO-/TNM-Klassifikation des Endometriumkarzinoms (2010) | 9 |
| 4 | Risikostratifizierung des Endometriumkarzinoms, nach der European Society for Medical Oncology (ESMO), der European Society for Radiotherapy Oncology (ESTRO) und der European Society of Gynaecological Oncology (ESGO) | 13 |
| 5 | Strukturformel von Quercetin | 18 |
| 6 | Strukturformel von Rutin | 20 |
| 7 | Strukturformel von Kämpferol | 22 |
| 8 | Strukturformel von Isorhamnetin | 24 |
| 9 | Strukturformel von Tetrahydrofolat | 26 |
| 10 | Zählnetz der Bürker-Zählkammer | 36 |
| 11 | Aufbau einer HPLC-Apparatur | 38 |
| 12 | CytoTox Reaktion | 40 |
| 13 | Immunhistochemie Ishikawa | 49 |
| 14 | Immunhistochemie RL95-2 | 50 |
| 15 | HPLC-Chromatogramme Moringa, Folsäure, Isorhamnetin | 52 |
| 16 | HPLC-Chromatogramme Moringa, Rutin, Quercetin, Kämpferol | 52 |
| 17 | CellTiter-Glo [®] Test: Extrakte | 54 |
| 18 | CellTiter-Glo [®] Test: Referenzen und Kontrollen | 54 |
| 19 | CytoTox-Glo [™] Test: Extrakte | 56 |
| 20 | CytoTox-Glo [™] Test: Referenzen und Kontrollen | 56 |
| 21 | BrdU Test: Extrakte | 58 |
| 22 | BrdU Test: Referenzen und Kontrollen | 58 |
| 23 | Neutralrottest: Extrakte | 60 |
| 24 | Neutralrottest: Referenzen und Kontrollen | 60 |
| 25 | Glucose-Konzentration der Extrakte | 62 |
| 26 | Glucose-Konzentration der Kontrollen | 62 |
| 27 | Laktat-Konzentration der Extrakte | 63 |
| 28 | Laktat-Konzentration der Kontrollen | 63 |
| 29 | pH-Werte der Extrakte | 64 |
| 30 | pH-Werte der Kontrollen | 64 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|---|---|----|
| 1 | Verdünnungen für die klinische Analyse | 32 |
| 2 | Herstellung der Referenzwerte | 33 |
| 3 | Herstellung der Kontrollen | 33 |
| 4 | Zelltest mit jeweiligem Zielvolumen und Zellmenge | 36 |
| 5 | Substanz und jeweiliges Lösungsmittel | 44 |
| 6 | Geräte und Software | 46 |
| 7 | Chemikalien | 47 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------------------|---|
| Abb. | Abbildung(en) |
| ABC-Transporter | Adenosine Triphosphate-binding Cassette |
| AK | Antikörper |
| Aqua dest. | destilliertes Wasser |
| ATLAS | Ädjuvant Tamoxifen: Longer Against Shorter Studie |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| AU | Absorbance Units |
| BMI | Body-Mass-Index |
| BrdU | Bromodesoxyuridin |
| °C | Grad Celcius |
| ca. | circa |
| CdK | Cyclin-dependent Kinase |
| COX | Cyclooxygenase |
| CRP | C-reaktives Protein |
| CS | Cowden Syndrom |
| CYC | Cyclophosphamid |
| DHFR | Dihydrofolatreduktase |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DM2 | Diabetes Mellitus Typ 2 |
| DNA | deoxyribonucleic acid, <i>deutsch: Desoxyribonukleinsäure</i> |
| EBRT | External Beam Radiation Therapy, <i>deutsch: externe Beckenbestrahlung</i> |
| EGF | Epidermal Growth Factor, <i>deutsch: Epidermaler Wachstumsfaktor</i> |
| EIN | Endometrioide Intraepitheliale Neoplasie |
| ERα | Östrogenrezeptor alpha |
| ERβ | Östrogenrezeptor beta |
| ESMO-ESGO-ESTRO | European Society for Medical Oncology (ESMO), European Society of Gynaecological Oncology (ESGO) und European Society for Radiotherapy Oncology (ESTRO) |
| etc. | et cetera |
| EX | Extrakt |
| FAS | Fatty-Acid-Synthase, <i>deutsch: Fettsäure-Synthase</i> |
| FKS | Fetales Kälberserum |
| FIGO | Fédération Internationale de Gynécologie et Obstétrique |
| GOG | Gynecological Oncology Group |
| h | Stunde(n) |
| HDL | High Density Lipoprotein |

| | |
|----------------------|--|
| HNPCC | Hereditäres Nicht-Polypöses Colorectales Carcinom, syn. Lynch-Syndrom |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography |
| HRT | Hormon replacement therapy, <i>deutsch: Hormonersatztherapie</i> |
| IUP | Intrauterinpeessar |
| LS | Lynch-Syndrom |
| MDR | Multiple-Drug-Resistances |
| min | Minuten |
| MMMT | Maligner Müllersche Misch tumor |
| MMR | DNA-Mismatch-Reparatur-System |
| MPA | Medroxyprogesteronacetat |
| mRNA | messenger Ribonucleic Acid |
| MS | Mikrosatelliten |
| MSI | Mikrosatelliten-Instabilität |
| MTX | Methotrexat |
| NDM-Tamoxifen | N-Desmethyl-Tamoxifen |
| OC | orale Kontrazeption |
| Pap-Abstrich | Papanicolaou-Abstrich |
| PBS | Phosphate Buffered Saline, <i>deutsch: Phosphatgepufferte Salzlösung</i> |
| PORTEC | Post Operative Radiation Therapy in Endometrial Cancer |
| PCOS | Polyzystisches Ovar Syndrom |
| RKI | Robert-Koch-Institut |
| ROS | Reaktive Sauerstoffspezies |
| rpm | revolutions per minute, <i>deutsch: Umdrehung pro Minute</i> |
| RT | Raumtemperatur |
| RT-PCR | Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, <i>deutsch: Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion</i> |
| SERM | selective estrogen receptor modulator, <i>deutsch: selektiver Östrogen-Rezeptor-Modulator</i> |
| SEIC | Seröses Intraepitheliales Karzinom |
| SHBG | Sexualhormon-bindendes Globulin |
| s.o. | siehe oben |
| s.u. | siehe unten |
| TAM | Tamoxifen |
| U | Umdrehungen |
| VBT | vaginale Brachytherapie |
| VEGF | Vascular Endothelial Growth Factor, <i>deutsch: vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor</i> |
| VLDL | Very Low Density Lipoprotein |
| WHO | World Health Organization |
| ZfKD | Zentrum für Krebsregisterdaten |

1 Einleitung

1.1 Endometriumkarzinom

Das Endometriumkarzinom ist eine Tumorerkrankung der Gebärmutter, die sich in der inneren Schicht des Uterus entwickelt. Es ist die häufigste Krebserkrankung der weiblichen Genitale in Deutschland [120]. Die meisten Diagnosen werden in einem frühen Stadium (FIGO I) gestellt und die Fünfjahres-Überlebenswahrscheinlichkeit stellt mit über 80 % eine hervorragende Prognose dar [24, 151]. Mit der hohen Inzidenz, die laut Forschern und Forscherinnen zwischen 2010 und 2030 um 55 % gestiegen sein wird, ist das Endometriumkarzinom eine bedeutende Diagnose in der gynäkologischen Onkologie [87]. Die frühestmögliche Erkennung und Differenzierung der Tumorart hat beim Endometriumkarzinom einen hohen Stellenwert, da beide Faktoren einen wesentlichen Einfluss auf das weitere diagnostische Vorgehen und die Therapie für die Patientinnen darstellen [55].

1.1.1 Epidemiologie

Das Endometriumkarzinom ist die häufigste Krebserkrankung der weiblichen Genitale in den Entwicklungsländern und die fünfthäufigste Krebserkrankung bei Frauen im Allgemeinen [120] und betrifft vor allem postmenopausale Frauen [108]. Häufigstes Symptom des Endometriumkarzinoms ist postmenopausale Blutung oder abnormale Uterusblutung vor der Menopause [6].

Das Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD) im Robert-Koch-Institut (RKI) veröffentlicht alle zwei Jahre einen Bericht über die aktuellen Daten aller Krebserkrankungen in Deutschland unter dem Namen "Krebs in Deutschland". Der letzte Bericht aus dem Jahr 2019 beinhaltet Daten über das Endometriumkarzinom aus dem Jahr 2016. Demzufolge wurden 2016 in Deutschland 11.090 Neuerkrankungen registriert, was eine Erkrankungsrate von 16,5 pro 100.000 Einwohnern ausmacht¹. Die Sterberate lag 2016 in Deutschland bei 3,0 pro 100.000¹. Das mittlere Erkrankungsalter liegt laut dem Bericht "Krebs in Deutschland für 2015/2016" vom RKI bei 68 Jahren [120]. Dem Bericht der ESMO-ESGO-ESTRO-Konsensus Konferenz² von 2016 zufolge lag die europaweite Inzidenz im Jahr 2012 geringfügig niedriger bei 13,6 pro 100.000 Einwohnern und das mittlere Erkrankungsalter bei 63 Jahren. In 90 % der Fälle betraf die Neuerkrankung mit Endometriumkarzinom Frauen, die älter als 50 Jahre waren und nur 25 % der Frauen befanden sich zum Zeitpunkt der Diagnose vor der Menopause. 5 % der Frauen waren jünger als 40 Jahre bei Erstdiagnose [24, 29]. Die Diagnose Endometriumkarzinom wurde in 80 % der Fällen in einem frühen Stadium (FIGO I) gestellt, mit einer Fünfjahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 80 % [24, 151].

¹altersstandardisiert nach alter Europastandardbevölkerung

²European Society for Medical Oncology (ESMO), European Society of Gynaecological Oncology (ESGO) und European Society for Radiotherapy Oncology (ESTRO)

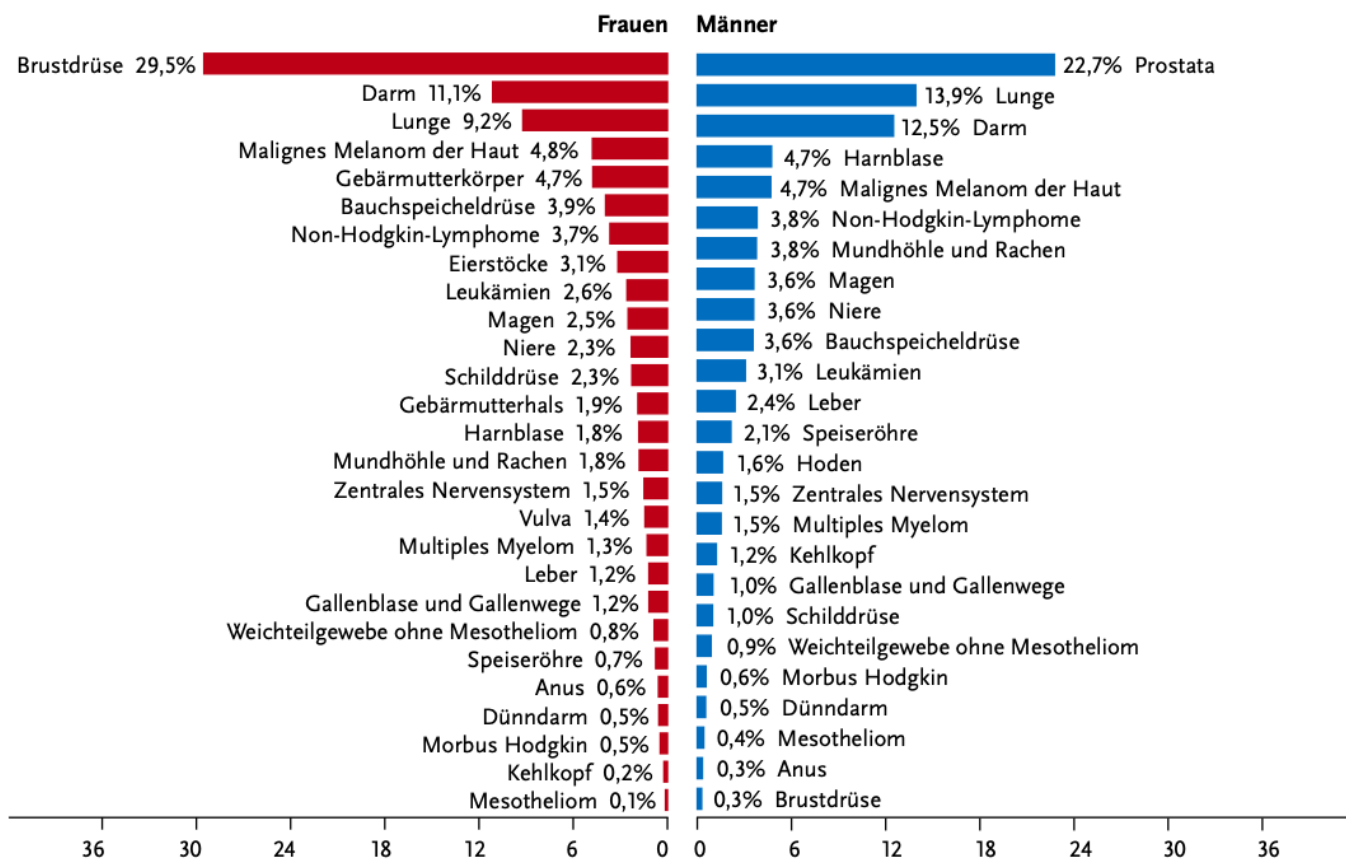


Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2016 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs) [120].

1.1.2 Aufbau des Uterus - grober Überblick

Um die Entstehung und Lokalisation des Endometriumkarzinoms besser zu verstehen, wird hier ein orientierender Überblick über den Aufbau des Uterus und des Endometriums gegeben. Der Uterus ist ein birnenförmiges, 7,5 cm langes Organ und besteht aus den drei Anteilen Fundus, Gebärmutterkorpus und Zervix [33]. Die Wand des Korpus wird aus dem Endometrium (der inneren Schleimhautschicht), dem Myometrium und dem ummantelnden Perimetrium gebildet. Das Endometrium wird in verschiedene Schichten unterteilt: Direkt am Myometrium liegt das Stratum basale an, gefolgt vom Stratum compactum und Stratum spongiosum. Die beiden letzteren bilden zusammen das Stratum functionale und unterliegen zyklusabhängigen Abstoßungsvorgängen³. Innerhalb des Endometriums finden sich tubulöse Drüsen, Stroma und Spiralarterien, die sich zyklusabhängig kontrahieren. Die äußerste Zellschicht, die das Innere der Gebärmutter auskleidet, wird von einschichtigem prismatischem Oberflächenepithel gebildet [21].

1.1.3 Pathogenese

Vorläuferläsion Endometriumhyperplasie Atypische Endometriumhyperplasien, also Schleimhautvermehrungen im Uterus mit atypischer Zellteilung, gelten laut der WHO-

³siehe Abbildung 2

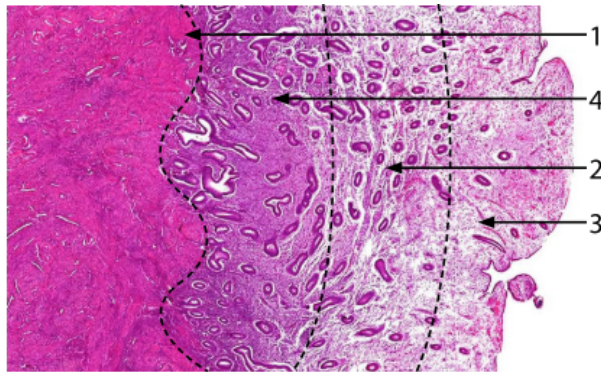


Abbildung 2: histologischer Aufbau des Endometriums. 1 = Myometrium, 2 = Stratum compactum, 3 = Stratum spongiosum, 4 = Stratum basale [21].

Klassifikation als Vorläuferläsionen des Typ-1-Endometriumkarzinoms [55]. Ein Synonym dafür ist die endometrioiden intraepitheliale Neoplasie (EIN). Hingegen stellen Endometriumhyperplasien ohne Atypie keine Vorläuferläsion dar. Generell ist das Risiko für die Entstehung eines endometrioiden Karzinoms bei den Hyperplasien ohne Atypie mit 1-4 % gering. Das Risiko bei der atypischen Hyperplasie ist dagegen mit durchschnittlich 45 % deutlich erhöht. Im Allgemeinen sind Endometriumhyperplasien durch eine Vermehrung von Drüsen und Stroma durch gesteigerte Proliferation charakterisiert. Vor allem bei atypischen Hyperplasien ist hierbei das Verhältnis von Drüsen und Stroma zugunsten der Drüsen verschoben und es finden sich vermehrt klonal entstandene Drüsen mit zellulären Atypien [34].

Es werden zwei verschiedene Typen von Endometriumkarzinomen unterschieden: Typ-1-Tumore sind östrogenabhängig und machen 80 % der Endometriumkarzinom-Diagnosen aus. Es handelt sich dabei um endometrioiden und muzinösen Karzinome und entstehen typischerweise unter Einfluss eines Hyperöstrogenismus. Durch einen erhöhten Östrogenspiegel, der verschiedene Pathomechanismen als Ursache haben kann, kann es im Uterus zu einer Endometriumhyperplasie und dadurch auch zu einem erhöhten Risiko kommen, dass Zellen entarten, da Östrogene die Proliferation und das Wachstum des Endometriums stimulieren. Physiologische Bedingungen, die den Östrogenspiegel erhöhen, bedingen somit auch ein erhöhtes Risiko für das Typ-1-Endometriumkarzinom [58]. Auf Molekularebene konnten mehrere Genmutationen gefunden werden, die eine Rolle bei der Genese des Endometriumkarzinoms spielen. Früh auftretende Veränderungen im Verlauf der Tumorerkrankung betreffen die Gene PTEN, KRAS und β -Catenin [108, 151]. PTEN ist ein Tumorsuppressor, der als Phosphatase in Signalwege des Zellzyklus eingreift und bei abnormaler Zellteilung die Apoptose der entarteten Zelle einleitet. Kommt es aufgrund von Mutationen im PTEN-Gen zum Funktionsverlust der Tumorsuppression, können entartete Zellen unkontrolliert wachsen und werden deshalb häufig im Zusammenhang mit Krebserkrankungen beobachtet [77]. Auch Mutationen im KRAS-Gen und β -Catenin-Gen führen über veränderte Zellzykluskontrolle zur Entstehung von Tumorerkrankungen [108]. Ebenso sind bestimmte Keimbahnmutationen im Mismatch-Reparatur-System, was die Gene MLH1, MSH2 und MSH6 betrifft, für das erhöhte Risiko eines Endometriumkarzinoms verantwortlich. Diese Gene spielen bei der Erkrankung HNPCC (hereditäres nicht-polypöses Colorectales Carcinom,

syn. Lynch-Syndrom) eine Rolle⁴ [108, 151].

Typ-2-Tumore sind im Gegensatz zu Typ-1-Tumore östrogen-unabhängig und entstehen typischerweise auf Grundlage eines atrophnen Endometriums, beziehungsweise innerhalb von glandulär-zystischen Endometriumpolypen [34]. Frauen mit Typ-2-Tumor sind bei Erstdiagnose etwas älter als Frauen mit Typ-1-Tumor und weniger wahrscheinlich Bedingungen ausgesetzt, die zu einem erhöhten Östrogenlevel führen [108]. Typ-2-Tumore umfassen die Subtypen seröses und klarzelliges Adenokarzinom und machen 5 % der Endometriumkarzinomdiagnosen aus [35]. Des weiteren werden noch das gemischte, un- und dedifferenzierte Karzinom und das Karzinosarkom unterschieden. Sehr selten handelt es sich beim Endometriumkarzinom um einen neuroendokrinen Tumor [35]. Genmutationen, die zu einem Typ-2-Tumor führen können, betreffen vor allem das TP53-Gen, das mit spezifischen Checkpunkten im Zellzyklus assoziiert wird. Bei DNA-Schäden und Onkogen-induzierter Zellproliferation wird das P53-Protein aktiviert und führt zur Apoptose der entarteten Zelle [108]. Auch eine Überexpression von Cyclin E und Veränderungen des PIK3CA-Pathways können die Entstehung eines Typ-2-Tumors begünstigen [34].

Die Unterscheidung des Endometriumkarzinoms in die zwei Typen beruht auf dem ursprünglich auf Jan Bokhman zurückgehenden simplifizierten Modell von 1938 [55, 108]. Dieses dualistische Modell weist jedoch aus heutiger Sicht Schwächen auf. Die histologische Einteilung in die zwei Typen erscheint durch molekulare Subtypisierung nicht mehr zeitgemäß, weshalb eine neue Subklassifizierung des Endometriumkarzinoms auf molekularer und genetischer Ebene, wie sie auch schon bei anderen Tumorerkrankungen zu finden ist, erwartet wird [151].

1.1.4 Risikofaktoren

Die meisten Risikofaktoren des Endometriumkarzinoms gehen mit einem erhöhten Östrogen-spiegel und einem Mangel an Progesteron, das eine dem Östrogen entgegenwirkende Funktion ausübt, einher [122].

Übergewicht Zu den Hauptrisikofaktoren zählen Übergewicht und Adipositas. Mehrere epidemiologischen Studien haben den Zusammenhang zwischen einem BMI oberhalb der Normalgewichtsgrenze⁵ mit einem erhöhten Endometriumkarzinom-Risiko gezeigt, wobei sich das Risiko bei einem BMI über 25 kg/m^2 verdoppelt und bei einem BMI über 30 kg/m^2 sogar verdreifacht [6]. Das Endometriumkarzinom ist das am stärksten mit Hormonen verbundene und im Zusammenhang mit Übergewicht stehende Karzinom [108]. Fettzellen wandeln mit dem Enzym Aromatase Androgene in Östrogene um, so dass bei vermehrtem Vorkommen von Fettgewebe auch der Östrogenspiegel steigt. Nach der Menopause ist die periphere Androgenumwandlung in Fettzellen die Hauptquelle von Östrogen im weiblichen Körper. Der BMI steht hierbei in einem direkten korrelativen Zusammenhang mit dem Anteil frei zirkulierender Östrogene [91]. Da mit der Menopause die ovarielle Progesteronproduktion endet, sinkt der

⁴siehe unten, „1.1.4 Risikofaktoren“

⁵BMI = Body-Mass-Index, $25\text{-}29,9 \text{ kg/m}^2$ = Übergewicht, $>30 \text{ kg/m}^2$ = Adipositas [37]

Progesteronspiegel und die hemmende Wirkung auf Östrogene fällt weg. Zudem wird Adipositas mit einem erniedrigten SHBG-Spiegel in Verbindung gebracht, was höhere Konzentrationen frei zirkulierender Sexualhormone erlaubt [108]. Befinden sich Frauen noch vor der Menopause, scheint der Östrogenspiegel nicht mit dem BMI im Zusammenhang zu stehen. Der Hauptgrund eines erhöhten hormonellen Risikos für Endometriumkarzinome besteht bei Frauen vor der Menopause eher in einem Mangel oder Nichtvorhandensein von Progesteron durch zum Beispiel Zyklusunregelmäßigkeiten [66].

Im Zusammenhang mit einem erhöhten BMI als Risikofaktor für die Entstehung des Endometriumkarzinoms steht auch Diabetes Mellitus [125]. Diabetes Mellitus Typ 2 (DM2) wurde lange Zeit als eigenständiger Risikofaktor gesehen mit einer Verdoppelung des Risikos [123]. Hierbei muss aber angemerkt werden, dass viele DM2-Patientinnen auch an Übergewicht leiden. Eine im Jahr 2014 erschienene Arbeit aus den USA hinterfragte dabei den unabhängigen Einfluss und die Therapie von Diabetes Mellitus auf die Entstehung eines Endometriumkarzinoms [90]. Das Ergebnis dieser prospektiven Studie, die elf Jahre lang über 88.000 Frauen in den USA begleitet und 1.241 Endometriumkarzinom-Diagnosen aufgezeichnet und verglichen hat, besagt, dass es keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Diabetes Mellitus und einem Risiko für Endometriumkarzinome unabhängig vom BMI der Patientinnen gibt. Dabei wurde der BMI von Erkrankten und Nichterkrankten angeglichen. Ebenso konnte kein Zusammenhang zwischen der Therapie von DM2 mit Metformin und dem Entstehen eines Endometriumkarzinoms festgestellt werden [90].

Reproduktionsfaktoren Gewisse Faktoren, die die Reproduktion der Frau betreffen, werden mit einem signifikanten Anstieg des Endometriumkarzinom-Risikos verbunden. Dazu gehören ein junges Alter zum Zeitpunkt der Menarche, ein hohes Alter bei der Menopause, Infertilität, Nulliparität, hohes Alter der Frau bei Erstgeburt und der Langzeit-Gebrauch einer Östrogen-Monotherapie während einer Hormon-Replacement-Therapie (HRT). Auf der anderen Seite reduzieren folgende Faktoren das Risiko für Endometriumkarzinome: Erhöhte Parität, der Gebrauch von Östrogen-Progesteron-Kombipräparaten als orale Kontrazeption und der Gebrauch von Progestin, einem Gestagen-Analogon [58]. Generell lässt sich sagen, dass eine erhöhte Östrogen- und eine verminderte Progesteronausschüttung pathophysiologisch zur Entstehung des Endometriumkarzinoms beitragen. Umgekehrt wirkt ein erhöhter Progesteronlevel schützend. Mehrfache Schwangerschaften, ein regelmäßiger Ovulationszyklus und späte Menarche bzw. frühe Menopause sind insofern protektiv, als dass es durch diese physiologischen Situationen zu einem, auf Lebenszeit gesehen, erhöhten Progesteronspiegel der Frau kommt.

Eine Analyse mit zwei Kohortenstudien und zwölf Fall-Kontroll-Studien mit 8.153 Fällen und 11.713 Kontrollen untersuchte den Zusammenhang zwischen Infertilität und der Inzidenz von Endometriumkarzinomen. Die Daten aus dieser 2015 veröffentlichten Analyse demonstrieren, dass Nulliparität und Infertilität unabhängig voneinander signifikant zur Erhöhung des Endometriumkarzinom-Risikos beitragen [155]. Die vorhandenen Daten suggerieren, dass hierbei Nulliparität ein stärkerer Prädiktor als Infertilität ist [155]. Eine weitere Studie, die den Zusammenhang zwischen Infertilität und dem Erkranken an Endometriumkarzinom untersucht hat,

erschien 2019 von Lundberg et al. [88]. Die Querschnitt-Studie untersuchte hierfür die Daten von 2.882.847 in Schweden registrierten Frauen. Die Autorinnen fanden auch in dieser Studie ein erhöhtes Risiko, an Endometriumkarzinom zu erkranken, bei infertilen Frauen im Vergleich zu fruchtbaren Frauen. Das Risiko zeigte sich bei Frauen mit Ovulationsstörungen ebenfalls erhöht, insbesondere in Kombination mit Infertilität. Unter nulliparen Frauen zeigte sich eine sogar noch stärkere Erhöhung [88]. Im Rahmen der schwedischen Studie wurde auch das fragliche Risiko einer Endometriose für die Entstehung von Endometriumkarzinomen untersucht. Die Fragestellung wurde damit beantwortet, dass es keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen Endometriose und dem Endometriumkarzinom zu geben scheint [88]. Insgesamt kamen Lundberg et al. zu dem Schluss, dass die Ergebnisse ihrer Studie keinen unabhängigen Effekt von Infertilität auf die Entstehung von Endometriumkarzinomen aufzeigen konnten, sondern das erhöhte Risiko durch Infertilität im Zusammenhang mit den einhergehenden Ovulationsstörungen steht. Dieser Zusammenhang wurde bei nulliparen Frauen oder Frauen jünger als 50 Jahre verstärkt beobachtet, was darauf hindeutet, dass das erhöhte Endometriumkarzinom-Risiko wahrscheinlicher Ovulationsstörungen zuzuschreiben ist, als Infertilität per se. Die gründliche Analyse der Daten beider Studien [155, 88] suggeriert zusammenfassend, dass Infertilität mit all den Faktoren, die dazu führen und damit einhergehen, ein Schlüsselfaktor bei der Entstehung von Endometriumkarzinomen zu sein scheint [58].

PCOS Das Polyzystische Ovar Syndrom (PCOS) ist die häufigste Endokrinopathie bei Frauen im reproduktiven Alter und geht mit einer Prävalenz von bis zu 10 bis 15 % einher. PCOS geht mit einer chronischen Anovulation durch ovarielle Dysfunktion und einem Hyperandrogenismus bei betroffenen Patientinnen einher [74]. Es entsteht eine hormonelle Dysbalance durch den Anovulations-bedingten Progesteronmangel. Der Östrogenüberschuss kann dann zur Proliferation und Differenzierung des Endometriums beitragen, wodurch Frauen mit einem PCOS ein erhöhtes Risiko tragen, an Endometriumkarzinom zu erkranken [58]. In mehreren Studien [39, 13] kamen die Autoren und Autorinnen zu der Annahme, dass das erhöhte Risiko für Endometriumkarzinom bei Frauen mit PCOS mit der erhöhten Prävalenz von Adipositas bei Patientinnen mit PCOS zusammen hängt. In der Studie von Fearnley et al. [39] wurden dazu Frauen ≤ 50 Jahren verglichen. Ein vierfach erhöhtes Risiko für Endometriumkarzinom wurde bei Frauen mit PCOS im Vergleich zu Frauen ohne PCOS beobachtet. Nach Angleichung der BMI zwischen Fall- und Kontrollgruppen konnte jedoch kein statistischer Zusammenhang mehr zwischen PCOS und dem Risiko für Endometriumkarzinome gefunden werden [39]. Die Erkrankung PCOS macht aber unter Frauen mit Infertilität den größten Einflussfaktor auf die Risikoerhöhung, an einem Endometriumkarzinom zu erkranken, aus [24].

Tamoxifen Tamoxifen (TAM) ist ein selektiver Östrogen-Rezeptor-Modulator (engl. „selective estrogen receptor modulator“, SERM) und wird zur Behandlung von Brustkrebs verwendet. Durch die östrogene Wirkung kann die Einnahme von Tamoxifen zu Endometriumhyperplasie und Endometriumkarzinom führen. Vor allem die TAM-Therapie postmenopausaler Frauen mit Brustkrebs wird mit einem erhöhten Risiko für Endometriumhyperplasie in Verbindung gebracht

[58]. Der Langzeitgebrauch von TAM erhöht das Risiko für betroffene Patientinnen um das zwei- bis dreifache, ein Endometriumkarzinom zu entwickeln im Vergleich zu Frauen ohne TAM-Therapie [22]. Die weltweite „Adjuvant Tamoxifen: Longer Against Shorter“-Studie (ATLAS) aus dem Jahr 2013 kam zu folgendem Ergebnis: Das Risiko für Endometriumkarzinome war nach zehnjähriger Tamoxifen-Therapie im Vergleich zur fünfjährigen TAM-Therapie signifikant höher [26]. Eine Meta-Analyse aus dem Jahr 2018, die die ATLAS-Studie und andere randomisierte Studien vergleicht, bestätigt die Schlussfolgerung, dass der verlängerte TAM-Gebrauch mit einem höheren Endometriumkarzinom-Risiko einhergeht [43]. Der fördernde Effekt von Tamoxifen auf die Entstehung eines Endometriumkarzinoms ist hierbei unabhängig von der Dosierung, nur evident während der TAM-Einnahme, und persistiert zwei Jahre nach Einnahmestopp [94].

Genetische Disposition Bis zu 5 % aller Endometriumkarzinome beruhen auf monogen erblichen Dispositionen. Dabei treten die überwiegende Anzahl hereditärer Endometriumkarzinome im Rahmen eines HNPCC auf [55]. Die Erkrankung HNPCC (hereditäres nicht-polypöses Colorectales Carcinom, syn. Lynch-Syndrom) beruht auf einer Keimbahnmutation und betrifft die Gene MLH1, MSH2 und MSH6. Diese Gene codieren für Proteine aus dem postreplikativen DNA-Mismatch-Reparatur-System (MMR). Ihre Dysfunktion durch Mutationen kann zur Anhäufung von Insertions- und Deletionsmutationen in Mikrosatelliten (MS) führen. Mikrosatelliten (syn. Simple-Repeated-Sequences) sind nicht-codierende DNA-Regionen, die aus einer variablen Anzahl sich wiederholender DNA-Sequenzmotiven bestehen. Durch Mutation im MMR kann es zu einer sogenannten Mikrosatelliteninstabilität kommen. Betrifft solch eine Mikrosatelliteninstabilität bestimmte Onkogene oder Tumorsuppressorgene, sind diese in ihrer Funktion verändert und die Entstehung und Proliferation von entarteten Zellen kann ihren Lauf nehmen [128]. Keimbahnmutationen in den Mismatch-Reperatur-Genen zeigen eine hohe Assoziation mit der autosomal-dominant vererbten Erkrankung HNPCC, auch bekannt als Lynch-Syndrom (LS).

Das Endometriumkarzinom ist nach dem kolorektalen Karzinom die häufigste Krebserkrankung bei HNPCC. Hierbei ist das Risiko, bis zum 70. Lebensjahr auch an Endometriumkarzinom zu erkranken, für Patientinnen mit MMR-Mutationen je nach betroffenem Gen gesteigert (MLH1 54 %, MSH2 21 %, MSH6 16 %) [151]. Trägerinnen dieser mutierten Gene haben ein Lebenszeitrisiko von bis zu 40-60 %, ein Endometriumkarzinom und ein kolorektales Karzinom zusammen zu entwickeln und ein Lebenszeitrisiko von 9-12 %, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken [24]. In 50-70 % der Fällen tritt das Endometriumkarzinom bei HNPCC-Anlageträgerinnen sogar vor dem kolorektalen Karzinom auf, bezeichnet als sogenanntes „Sentinel-Karzinom“ [55]. Da mehrere Kohortenstudien der letzten Jahre übereinstimmend zeigen, dass über ein Drittel (37 %) der HNPCC-assoziierten Endometriumkarzinome keine klinischen Kriterien für die Erkrankung HNPCC erfüllt, wurde festgelegt, dass unabhängig vom histologischen Subtyp bei allen neu diagnostizierten Endometriumkarzinomen eine Mikrosatelliteninstabilität(MSI)-Untersuchung in Analogie zum kolorektalen Karzinom durchgeführt werden sollte [55]. Das seltene Cowden-Syndrom, das einer Keimzellmutation im PTEN-Gen zu Grunde liegt, ist ebenfalls mit einem höheren Endometriumkarzinom-Risiko verbunden [151]. Beim Cowden-Syndrom (CS) handelt es

sich ebenso wie beim HNPCC um ein autosomal dominantes Syndrom. Das PTEN-Gen codiert für eine Phosphatase des Zellsignalwegs mit Auswirkungen auf die Zellproliferation. CS erhöht das Lebenszeitrisiko für verschiedene Krebserkrankungen, wobei Endometriumkarzinom bei 21-28 % der CS-Patientinnen auftritt und sich auch schon im jungen Alter entwickeln kann [30].

1.1.5 Diagnostik

Vaginale Blutungen in der Postmenopause oder atypische Blutungen vor der Menopause sind meist die ersten Symptome einer Endometriumhyperplasie oder eines bereits invasiven Endometriumkarzinoms [6]. Stellen sich Frauen mit beobachteten Blutungen vor, so wird zur Abklärung des Verdachts eine Reihe von Untersuchungen durchgeführt. Es erfolgt die allgemein gynäkologische Untersuchung mit Pap-Abstrich und rektovaginaler Palpation. Zusätzlich sollte ein transvaginaler Ultraschall sowie die Sonographie beider Nieren erfolgen [151]. Um ein Karzinom ausschließen zu können, muss bei jeder atypischen oder postmenopausalen Blutung eine histologische Sicherung erfolgen [151].

Staging Wenn die pathologisch gesicherte Diagnose Endometriumkarzinom steht, erfolgt je nach histologischer Beurteilung der Tumorausbreitung eine Einteilung in das sogenannte FIGO-System (Fédération Internationale de Gynécologie et Obstétrique)⁶[36].

Das Staging des Endometriumkarzinoms erfolgt meist mittels Laparoskopie oder chirurgischer Robotik [108]. 2009 veröffentlichte die Gynecological Oncology Group (GOG) ihre Ergebnisse der bislang größten randomisierten Studie, die die zwei Verfahren Laparotomie und Laparoskopie beim Staging von neu-diagnostizierten Endometriumkarzinomen vergleicht. Die Ergebnisse zeigen, dass das minimal-invasive Staging mit weniger Komplikationen und einem kürzeren Krankenhausaufenthalt einhergeht. Bei der Überlebensrate gibt es keine Unterschiede zur Laparotomie [143].

Die exakte Tumortypisierung, also das Wissen, um welchen Krebs es sich im Genauen handelt, ist relevant für das weitere therapeutische Vorgehen und die Prognose [55]. Für eine bessere Übersicht sind im folgenden die genannten Tumortypen gelistet:

Histologische Subtypen des Endometriumkarzinoms [55]

- Typ-1-Endometriumkarzinom
 - Endometrioides Adenokarzinom
 - Muzinöses Adenokarzinom
- Typ-2-Endometriumkarzinom
 - Seröses Adenokarzinom
 - * SEIC
 - Klarzelliges Adenokarzinom

⁶siehe Abbildung 3

- Gemischtes Karzinom
- Undifferenziertes Karzinom
 - Dedifferenziertes Karzinom
- Karzinosarkom (MMMT)
- Neuroendokrine Tumore

| TNM-Kategorie | FIGO-Stadien | Definition |
|-----------------------|--------------|--|
| TX | | Primärtumor kann nicht beurteilt werden |
| T0 | | Kein Anhalt für Primärtumor |
| T1 | I' | Tumor begrenzt auf Corpus uteri |
| T1a | IA' | Tumor begrenzt auf Endometrium oder infiltriert weniger als die Hälfte des Myometriums |
| T1b | IB | Tumor infiltriert die Hälfte oder mehr des Myometriums |
| T2 | II | Tumor infiltriert das Stroma der Zervix, breitet sich jedoch nicht jenseits des Uterus aus |
| T3 und/oder N1 | III | Lokale und/oder regionäre Ausbreitung wie nachfolgend beschrieben: |
| T3a | IIIA | Tumor befällt Serosa und/oder Adnexe (direkte Ausbreitung oder Metastasen) |
| T3b | IIIB | Vaginal- oder Parametriumbefall (direkte Ausbreitung oder Metastasen) |
| N1 | IIIC | Metastasen in Becken- und/oder paraaortalen Lymphknoten² |
| | IIIC1 | Metastasen in Beckenlymphknoten |
| | IIIC2 | Metastasen in paraaortalen Lymphknoten |
| T4 | IVA | Tumor infiltriert Blasen- und/oder Rektumschleimhaut³ |
| M1 | IVB | Fernmetastasen, einschließlich intraabdomineller Metastasen (ausgenommen Metastasen in Vagina, Beckenserosa oder Adnexen, einschließlich Metastasen in inguinalen und anderen intraabdominalen Lymphknoten als paraaortalen und/oder Beckenlymphknoten) |

¹ Die alleinige Beurteilung von endozervikalen Drüsen soll als Stadium I klassifiziert werden.
² Eine positive Zytologie soll gesondert diagnostiziert und ohne Änderung des Stadiums dokumentiert werden.
³ Das Vorhandensein eines bullösen Ödems genügt nicht, um einen Tumor als T4 zu klassifizieren. Infiltration der Schleimhaut von Blase oder Rektum bedarf des Nachweises durch Biopsie.

Abbildung 3: Die neue (2010) FIGO-/TNM-Klassifikation des Endometriumkarzinoms [34].

Die Mehrheit der Endometriumkarzinome sind mit 70-80 % endometrioides Typ-1-Karzinome. Die Typ-2-Karzinome sind mit rund 5 % deutlich seltener und bestehen aus den serösen und klarzelligem Karzinomen. Das SEIC (seröses intraepitheliales Karzinom) stellt biologisch ein Oberflächenkarzinom dar, morphologisch jedoch eine nichtinvasive Form des serösen Karzinoms. Es wird selten isoliert diagnostiziert und geht in mehr als 50 % der Fälle mit einem ausgedehnten

extrauterinen serösen Karzinom und einer peritonealen Ausbreitung einher [55, 34]. Beim SEIC wird das Oberflächen- und/oder Drüsenepithel durch hochgradig atypisches Epithel ersetzt [55, 34] und es ist häufig schwierig zu entdecken, da die Tumorkläsion eher klein und herdförmig ist [97]. Weil es schwierig zu diagnostizieren ist, wird speziell für Biopsien bzw. Abrasionsmaterial der synonyme Begriff „minimales uterus seröses Karzinom“ empfohlen [34]. Da sich das SEIC ähnlich aggressiv wie das seröse Endometriumkarzinom verhält, ist eine möglichst genaue Diagnose und ein entsprechendes chirurgisches Staging von großer Bedeutung [97]. Neben den Zuordnungen der histologischen Subtypen zu Typ-1 und Typ-2 gibt es auch noch die gemischten Tumore. Sie bestehen aus mindestens zwei verschiedenen Subtypen, von denen jeweils ein Subtyp mindestens 5 % des Gesamttumors ausmachen muss [55]. Des weiteren werden auch noch das undifferenzierte Karzinom, das keinerlei Differenzierung zu den Subtypen aufweist und aus monomorphen Tumorzellen besteht, und das dedifferenzierte Karzinom unterschieden. Das dedifferenzierte Karzinom enthält neben einem undifferenzierten Tumoranteil auch eine Low-grade-Komponente (G1 oder G2) eines endometrioiden Karzinoms [34]. Ein weiterer Tumortyp des Endometriumkarzinoms ist das sehr seltene Karzinom, das synonym auch maligner Müllersche Misch tumor (MMMT) genannt wird. Hierbei handelt es sich um biphasische Tumore, die aus malignen mesodermalen und epithelialen Komponenten bestehen [52]. Ebenso selten sind neuroendokrine Endometriumkarzinome [35].

Grading Das Grading erfolgt durch die histologische Beurteilung der Tumorzellen anhand ihres Differenzierungsgrades. Beurteilt wird hierbei, wie stark sich die Tumorzellen von gesundem Gewebe entdifferenzieren. Endometrioides und muzinöses Typ-1-Karzinome werden mittels dem Anteil solider, nicht-plattenepithelialer Areale eingeteilt: G1-Karzinome enthalten weniger als 5 %, G2 zwischen 6-50 % und G3 mehr als 50 % dieser Anteile. Finden sich bei der histologischen Beurteilung zudem hochgradige zelluläre Atypien, wird jeweils um ein Grad hochgestuft. Seröse und klarzellige Typ-2-Karzinome sind per se als G3 einzustufen, genauso wie Karzinom Sarkome [34].

1.1.6 Therapie

Die Therapie stützt sich auf die drei Grundpfeiler Operation, Chemotherapie und Bestrahlung. Je nach vorherrschender Erkrankung, Tumoreinteilung und Patientinnenwunsch ergeben sich verschiedene Indikationen für die genannten Therapieoptionen.

Operative Therapie Die meisten Endometriumkarzinome werden in einem frühen Stadium diagnostiziert. Dabei ist die operative Entfernung des Uterus und der Ovarien eine sehr effektive Maßnahme und nur wenige Frauen benötigen eine adjuvante Therapie [122]. Laut aktueller S3-Leitlinie von 2018 besteht die operative Therapie des Endometriumkarzinoms aus der totalen Hysterektomie und der beidseitigen Adnexektomie. In gewissen Ausnahmefällen, die im weiteren noch besprochen werden, kann auf die Entfernung der Ovarien verzichtet werden [34]. Wichtig für die Planung der operativen Therapie sind die Angaben über Differenzierung (G1-G4),

Tumortypisierung und das Stadium (FIGO), da sich danach das operative Vorgehen richtet [151]. Zur operativen Therapie des Endometriumkarzinoms gehört neben der Entfernung des Uterus und der Adnexe auch das Erwägen von Lymphadenektomien. Die S3-Leitlinie empfiehlt die Lymphknotenentfernung von allen suspekten oder palpatorisch bzw. makroskopisch vergrößerten Lymphknoten. Beim Typ-1-Karzinom pT1a, G1/2 sollte bei unauffälligen Lymphknoten keine systemische Lymphadenektomie erfolgen. Ab einem Typ-1-Karzinom pT1b, G3 jedoch sollten die beteiligten Lymphknoten systemisch mitentfernt werden. Beim Endometriumkarzinom Typ-2 und Karzinosarkomen sollte generell eine systemische Lymphonodektomie erfolgen. Die Biopsie des Sentinel-Lymphknotens soll laut Leitlinie nur im Rahmen von kontrollierten Studien durchgeführt werden [34].

Nicht selten werden die Angaben zum Grading und der Tumordinvasionstiefe postoperativ höher eingestuft. Helpmann et al. veröffentlichten 2014 eine Studie, mit der sie zeigten, dass 18 % der präoperativ durch Biopsie als G1 eingestuften Adenokarzinome im Nachhinein als G2 hochgestuft wurden. Je 2 % wurden sogar als G3 oder als nicht-endometrioides High-Grade-Tumore hochgestuft [53]. Wird im Nachhinein ein höheres Grading als vor der Operation vermutet festgestellt, muss die Lymphknotenentfernung in einer zweiten Operation nachträglich erfolgen [151]. Zur Operationstechnik bei endometrioiden Adenokarzinomen im Frühstadium schreibt die S3-Leitlinie die Empfehlung einer laparoskopischen oder laparoskopisch assistierten vaginalen Extirpation aus. Ebenso können roboterunterstützte laparoskopische Verfahren in gleicher Weise zur Operation des Endometriumkarzinoms eingesetzt werden [34]. Walker et al. [143] veröffentlichten 2009 die LAP2-Studie, die die zwei Operationstechniken Laparoskopie und Laparotomie prospektiv miteinander vergleicht. Ergebnis ihrer Evaluation ist, dass beim laparoskopischen Verfahren eine geringere Komplikationsrate und ein kürzerer Krankenhausaufenthalt auftreten. Ergänzend dazu zeigten Zullo et al. [161] in einer Meta-Analyse keine Unterschiede in der perioperativen Komplikationsrate, jedoch fiel die Rate an postoperativen Komplikationen und einem Hämoglobin-relevanten Blutverlust in der Laparotomiegruppe höher aus. Das Verfahren der vaginalen Operation sollte aufgrund der fehlenden Möglichkeit zur Inspektion des Abdominalraums eine Ausnahme bleiben [151].

Bei prämenopausalen Frauen, bei denen ein frühes Endometriumkarzinom (Typ-1, G1-2, pT1a) diagnostiziert wurde, können die Ovarien trotz totaler Hysterektomie und beidseitiger Salpingektomie belassen werden. Bedingung hierfür ist, dass keine genetischen Dispositionen für ein Ovarialkarzinom vorliegen (z.B. BRCA-Mutation, HNPCC) und die Patientin über das Risiko aufgeklärt wurde [34]. Sun et al. [136] verglichen in einer Meta-Analyse die Überlebensrate von Patientinnen, die sich einer Oophorektomie im Rahmen ihrer Endometriumkarzinom-Therapie unterzogen mit Patientinnen, bei denen die Ovarien belassen wurden und konnten keinen Unterschied hinsichtlich Gesamtüberleben bei prämenopausalen Patientinnen feststellen. Sollte die Patientin den Wunsch nach Fertilitätserhalt durch noch nicht abgeschlossene Familienplanung äußern, können Uterus und Adnexe belassen werden. Die Patientin muss aber in diesem Falle darüber aufgeklärt werden, dass die Standardbehandlung die totale Hysterektomie ist und sie auf eigene Verantwortung hin auf die kurative Behandlung ihres Malignoms mit möglicherweise

schwerwiegenden Folgen (Metastasierung, Progression) verzichtet. Engmaschige Kontrollen sollten hierbei erfolgen und weitere Therapiemaßnahmen mit der Patientin besprochen werden [34]. Typ-2-Endometriumkarzinome und Karzinosarkome zeigen sich mit einem deutlich aggressiveren Verhalten mit teilweise lymphogener und transperitonealer Metastasierung. Die operative Therapie bei diesen Tumortypen besteht ebenso wie beim Typ-1-Karzinom aus der totalen Hysterektomie und bilateralen Adnexektomie, zusätzlich aber sollten auch die pelvinen und paraaortalen Lymphknoten sowie sämtliche Tumorherde entfernt werden [151, 141].

Bestrahlung Die Strahlentherapie ist kein primärer Therapieansatz bei der Behandlung des Endometriumkarzinoms. Sie stellt nur in bestimmten Situationen (perioperative Risiken, lokal fortgeschrittener Tumor, Ablehnung einer Operation) eine Alternative zur operativen Behandlung dar [151]. Adjuvant hat die Strahlentherapie aber häufig einen Stellenwert. Die postoperative vaginale Brachytherapie beim Endometriumkarzinom Typ-1 kann oder soll laut S3-Leitlinie je nach Stadium und Grading durchgeführt werden [34]. Die PORTEC⁷-1-Studie begleitete von 1990 bis 1997 insgesamt 714 Patientinnen, die randomisiert entweder adjuvante externe Beckenbestrahlung (EBRT, „external beam radiation therapy“) oder keine zusätzliche Therapie erhielten [25, 44]. Die Studie konnte zeigen, dass postoperative Radiotherapie bei Patientinnen im Stadium FIGO I das Lokalrezidivrisiko senken kann, aber keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben hat. Ebenso konnte die Erkenntnis gewonnen werden, dass Radiotherapie die Rate an Therapie-assoziierten Morbiditäten erhöht [44]. Im Rahmen der PORTEC-1-Studie konnte zudem eine neue Subgruppe zu den bereits vorhandenen Risikoklassifizierungen definiert werden⁸[151]. Die ESMO-ESGO-ESTRO ergänzte 2016 in ihrem Konsensuspapier nun zusätzlich zur Low-, Intermediate- und High-Risk-Gruppe die High-Intermediate-Risk-Gruppe [24]. Die nachfolgende PORTEC-2-Studie untersuchte die Unterschiede zwischen EBRT und vaginaler Brachytherapie (VBT) innerhalb der neu definierten High-Intermediate-Risk-Gruppe [106]. Die vaginale Brachytherapie zeigte ähnlich wie die EBRT eine Reduzierung der Lokalrezidivneigung bei geringeren gastrointestinalen Nebenwirkungen und einer besseren Verträglichkeit und ist somit der EBRT vorzuziehen [106]. Frauen, bei denen ein fortgeschrittenes Endometriumkarzinom (FIGO III) diagnostiziert wurde, sollten eine perkutane Bestrahlung und ggf. eine Brachytherapie erhalten [151]. Im Stadium IV stellt die Bestrahlung ein Therapiekonzept dar, das individuell mit den betroffenen Frauen besprochen werden sollte [151].

Chemotherapie Laut ESMO-ESGO-ESTRO stellt bei der Behandlung eines weit fortgeschrittenen Stadiums (FIGO III und IV) die primär systemische Therapie mit Carboplatin und Paclitaxel das therapeutisch günstigste Schema für eine Chemotherapie dar [24]. Bei der Therapie von Endometriumkarzinomen mit niedrigerem Stadium kann die Chemotherapie als adjuvante Therapiemöglichkeit genutzt werden [34]. Auch hierbei wird die Kombination aus einem platinhaltigen Präparat und Paclitaxel empfohlen [151].

⁷Post Operative Radiation Therapy in Endometrial Cancer

⁸siehe Abbildung 4

| Risikogruppe | Charakteristika |
|------------------------|--|
| Low risk | endometrioides EC, G1, G2, < 50 % myometrane Infiltration, L0 |
| Low-intermediate risk | endometrioides EC, G1, G2, ≥ 50 % myometrane Infiltration, L0 |
| High-intermediate risk | endometrioides EC, G3, < 50 % myometrane Infiltration, L0 oder L1 endometrioides EC, G1, G2, L1, </≥ 50 % myometrane Infiltration |
| High risk | endometrioides EC, G3, ≥ 50 % myometrane Infiltration, L0 oder L1, FIGO/TNM-Stadium II/T2 endometrioides EC, FIGO/TNM-Stadium III/T3, R0 non-endometrioides EC (serös/klarzellig, undifferenziert, MMMT) |

Abbildung 4: Risikostratifizierung des Endometriumkarzinoms, nach der European Society for Medical Oncology (ESMO), der European Society for Radiotherapy Oncology (ESTRO) und der European Society of Gynaecological Oncology (ESGO) [34].

Hormontherapie Eine Hormontherapie stellt für Frauen mit Wunsch nach Fertilitätserhalt, Frauen mit fortgeschrittenem oder palliativem Stadium und solchen, die aus bestimmten Gründen keiner Operation unterzogen werden können, eine Therapiemöglichkeit dar [122, 147]. Die ESMO-ESGO-ESTRO-Konsensus Konferenz veröffentlichte 2016 ihre Empfehlungen zum medizinischen Umgang mit der Diagnose Endometriumkarzinom. Die Experten empfehlen eine Therapie mit Gestagen-Präparaten, zum Beispiel mit Medroxyprogesteronacetat (MPA) 200 mg. Als alternative Hormonpräparate können Tamoxifen, Fulvestrant und Aromatase-Inhibitoren in Betracht gezogen werden. Die Hormontherapie zeigt jedoch unterschiedlich starke Effektivität je nach Tumor-Grading; je niedriger der Tumorgrad, desto effektiver die Hormontherapie [24]. In Deutschland gibt es keine offizielle Empfehlung zur Behandlung des Endometriumkarzinoms mit einer Gestagentherapie [34]. Die S3-Leitlinie stützt sich mit dieser Empfehlung auf die Studie von Martin-Hirsch et al. Die Meta-Analyse konnte keinen Unterschied im Gesamtüberleben gegenüber der adjuvanten Bestrahlung finden. Die Autoren und Autorinnen kommen zu dem Schluss, dass die adjuvante Gestagentherapie des Endometriumkarzinoms keinen Nutzen aufweist und weitere Studien zu dieser Frage nicht gerechtfertigt sind [95].

Komplementärmedizinischer Ansatz Die Rolle der komplementären Medizin kann für betroffene Frauen einen großen Stellenwert im Gesamttherapiekonzept bei der Behandlung des Endometriumkarzinoms einnehmen [16] und hat in den letzten 10 bis 20 Jahren an Bedeutung zugenommen [54]. Bislang gibt es nur wenige Studien, die sich mit dem Therapiekonzept der komplementären Medizin bei der Behandlung des Endometriumkarzinoms beschäftigen [12]. Die Fall-Kontroll-Studie von Horn-Ross et al. [56] konnte eine inverse Korrelation zwischen der Nahrungsaufnahme von Isoflavonen und Lignanenen und dem Erkrankungsrisiko an Endometriumkarzinom feststellen. Die Fall-Kontroll-Studie von Bandera et al. [12] suggeriert eine Risikoreduktion durch die Einnahme von Quercetin und Isoflavonen bei schlanken Frauen. Eine neuere Studie von Neill et al. [103] kommt jedoch zu dem Schluss, dass keine signifikante Relation

zwischen der Einnahme von Phytoöstrogenen und dem Risiko, an Endometriumkarzinom zu erkranken, besteht. Somit ist die Studienlage heterogen.

1.1.7 Prävention

Zur Prävention können Risikofaktoren minimiert werden, um das Erkrankungsrisiko zu senken [24]. Dazu gehört eine Gewichtsreduktion bei einem erhöhten BMI zusammen mit einer Steigerung der physikalischen Fitness durch Sport. Beides wirkt sich nicht nur positiv auf ein gesundes Körpergewicht, sondern auch auf die Prävention von Diabetes aus, was wiederum einen Benefit bei der Risikoreduktion des Endometriumkarzinoms zeigt. Der Zusammenhang zwischen dem Entstehen von verschiedenen Krebserkrankungen und dem Langzeitgebrauch von oralen Kontrazeptiva (engl. orale contraception, OC) wurde in vielen Studien untersucht. Im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Niemals-Anwenderinnen führt die Einnahme von OC bei der Gruppe mit Frauen, die irgendwann in ihrem Leben orale Kontrazeptiva eingenommen haben, zu einer signifikanten Senkung der Endometriumkarzinomrate [48].

Eine 2015 erschienene Studie der "Collaborative Group on Epidemiological Studies on Endometrial Cancer"[23] untersuchte den Einfluss von OC im Zusammenhang mit der Einnahmedauer und weiteren Faktoren wie das Alter, Parität, BMI, Rauchen und HRT. Die Ergebnisse machen deutlich, dass je länger Frauen OC einnahmen, umso stärker die Risikosenkung für Endometriumkarzinome war. Jede fünf weiteren Einnahmejahre trugen mit einem relativen Risiko von 0,76 (95 % CI; 0,73-0,78; $p < 0,0001$) zur Risikosenkung bei. Diese Risikosenkung blieb sogar noch über 30 Jahre nach Einnahmestopp bestehen, auch ohne sichtbaren Unterschied während der 1960er-, 1970er- und 1980er Jahre, trotz der höheren Östrogenkonzentration in den damals verschriebenen OC. Es wird geschätzt, dass in Industrieländern eine zehnjährige Einnahme von OC das absolute Risiko, an Endometriumkarzinom zu erkranken, von 2,3 auf 1,3 pro 100 Frauen reduziert [23].

Die neuere Studie von Michels et al. [98] untersuchte den Einfluss verschiedener Lebensstil-Charakteristika auf den protektiven Effekt von oralen Kontrazeptiva. Die Studie zeigt eine Risikoreduktion von 34 % für Endometriumkarzinome durch den Langzeitgebrauch von OC. Die Autoren beobachteten, dass die stärkste Risikoreduktion durch OC-Einnahme bei Frauen, die aktuell rauchen, auftrat und dies nur bei jenen mit einem BMI über 25. Ebenso wurde eine OC-assoziierte Risikoreduktion vor allem bei Frauen mit Alkoholkonsum und moderater bis seltener körperlicher Tätigkeit gefunden [98]. Es sei möglich, dass zwischen dem Tabakrauch und den oralen Kontrazeptiva eine anti-östrogene Interaktion entstünde, die sich zusätzlich protektiv auf das Risiko eines Endometriumkarzinoms auswirke [98]. Da die Einnahme von OC sich laut den Ergebnissen von Michels et al. vor allem bei übergewichtigen Frauen positiv auf das Endometriumkarzinom-Risiko auswirkt, scheint die Einnahme oraler Kontrazeptiva, bezüglich des Endometriumkarzinom-Risikos, eine durchaus attraktive Möglichkeit zur Verhütung für Frauen mit Übergewicht zu sein. Auch der Gebrauch eines Intrauterinpressars (IUP, syn. „Hormon-Spirale“) scheint das Risiko für Endometriumkarzinome signifikant zu reduzieren [62].

1.2 Moringa

Moringa Oleifera Lam. ist die am weitesten verbreitete Pflanze der Moringacea Familie [20, 8]. Moringa-Pflanzen sind in tropischen und subtropischen Regionen, wie Indien, Teilen Afrikas, Süd- und Zentralamerika, Mexiko, Hawaii und weiteren Teilen Asiens beheimatet [135, 20]. Der immergrüne Baum kann eine Höhe von 5 bis 10 Metern erreichen und wird synonym auch Trommelstockbaum aufgrund der länglichen Form seiner unreifen Samenhülsen genannt [50, 135]. Ein anderer Trivialname, Meerrettichbaum, verdankt der Baum seinen Wurzeln, die stark beißend nach Meerrettich riechen und schmecken [135]. Er verträgt trockenen, nährstoffarmen, sandigen Boden und gedeiht bei feuchtem Klima mit hohem Niederschlag, ebenso wie in sehr trockenen Gebieten und toleriert eine pH-Spannweite von 5,0 bis 9,0. [8, 63]. Nicht zuletzt durch seine Robustheit gegenüber äußeren Einflüssen wird Moringa Oleifera auch Wunderbaum genannt, vor allem aber wegen seiner vielfältigen Nutzbarkeit.

Der gesamte Baum mit seinen Wurzeln, Rinde, Baumharz, Früchten, Blüten und Samen kann für die Ernährung von Mensch und Tier und für medizinische Zwecke genutzt werden [100, 8, 5]. Die Samen können frisch, gemahlen, geröstet oder zu Öl verarbeitet konsumiert werden [8]. Die Blätter sind der nährstoffreichste Teil der Pflanze, da sie verschiedenste Mikro- und Makronährstoffe enthalten [50]. A.O. Ogbe, J. Affiku und Moyo et al. untersuchten für eine genauere Charakterisierung die Spurenelemente der getrockneten Blätter. Sie fanden Kalzium, Phosphor, Magnesium, Kalium, Natrium, Schwefel, Zink, Kupfer, Eisen und Selen. Zudem enthalten die getrockneten Blätter 77 mg/100 g Vitamin E und 18,5 mg/100 g Ascorbinsäure (Vitamin C) [100, 107]. Sie bestehen zu 30,3 % aus Proteinen und 19,89 % aus Ballaststoffen [100].

Die Blüten der Pflanze beinhalten Antioxidantien in Form von Ascorbinsäure und β -Carotenoiden sowie Tannine, Alkaloide und Herzglykoside [3]. Aber auch in den Blättern sind Antioxidantien wie Ascorbinsäure, Phenole und Carotenoide enthalten [8]. Das Öl der Moringasamen hat einen hohen Anteil mehrfachungesättigter Fettsäuren (80,4 %) und schmeckt süßlich [107, 8]. Des Weiteren sind in der Pflanze Glucosinolate (syn. Senfölglykoside), Phenolsäuren und verschiedene Flavonoide, darunter die Flavonole Quercetin, Rutin, Kämpferol und Isorhamnetin enthalten [135, 79].

Der Moringa-Pflanze werden heilsame Wirkungen nachgesprochen, und sie findet schon seit langer Zeit in der traditionellen ayurvedischen und südasiatischen Medizin Anwendung bei Entzündungen, Infektionen, als Herzkreislaufstimulans sowie bei Erkrankungen hämatologischen Ursprungs, des Gastrointestinaltrakts und der Leber. [50, 8]. Mittlerweile gibt es immer mehr Studien, die sich mit der medizinischen Wirkung der Pflanze befassen und hypoglykämische, antientzündliche, antibakterielle, antikanzerogene und hepatoprotektive Effekte nachgewiesen haben [50, 20]. Eine 2010 von D. Kumari veröffentlichte Studie untersuchte den Effekt von Moringa Oleifera auf die Blutzuckerkonzentration von Diabetes Mellitus Typ 2 (DM2)-Patienten und -Patientinnen [72]. Bei DM2-Erkrankten, die 8 g Pulver der getrockneten Moringa-Blätter 40 Tage lang in Form von Tabletten verabreicht bekamen, zeigte sich eine signifikante Senkung der Nüchternglukosekonzentration und der postprandialen Glukosekonzentration im Blut. Der

Autor schließt daraus, dass Moringa eine Blutzucker-senkende Wirkung mit einer Verbesserung der Glukosetoleranz und diabetischen Symptomatik besitzt [72]. Die ebenfalls 2010 erschienene Studie von Nambiar et al. befasst sich mit der Wirkung der Pflanze auf das Blutfettprofil von DM2-Erkrankten mit Dyslipoproteinämie. Die Studienteilnehmer und Studienteilnehmerinnen nahmen 4,6 g getrocknetes Blattpulver in Tablettenform für eine Dauer von 50 Tagen ein. Verglichen mit der Kontrollgruppe konnte eine signifikante Steigerung des HDL beobachtet werden. Die Ergebnisse der Studie suggerieren daher einen positiven Effekt auf das Blutfettprofil von Hyperlipidämie-Erkrankten [101].

2019 veröffentlichten Cirimi et al. die Ergebnisse ihrer Forschung zur Wirkung von Moringa auf menschliche Neuroblastomzellen. Dabei betrachteten sie genauer die Wirkung des im Moringa enthaltenen Glucomoringin, einem Senfölglykosid. Moringin reduziert statistisch signifikant das Wachstum der Krebszellen zeit- und konzentrationsabhängig. Ebenso induziert es signifikant zytotoxische Zellprozesse. Es trägt zur gesteigerten Expression der Enzyme Caspase 3 und 9 bei, welche als wichtigste Bestandteile bei der Einleitung des programmierten Zelltods, der Apoptose, gelten. Defekte an diesen Caspasen können bei der Tumorentstehung beteiligt sein [42]. Durch die Expressionssteigerung wirkt Moringin somit antiproliferativ auf die Neuroblastomzellen [20]. Die Autoren und Autorinnen der Studie konnten zudem zeigen, dass Moringin die nukleäre Translokation und Aktivierung von NF- κ B verhindert, was mit einer erhöhten Apoptose-Rate einhergeht. Somit spielt das Verhindern der NF- κ B-Aktivierung eine Schlüsselfunktion in der Chemoprävention von Krebserkrankungen. Schlussfolgernd erklärt die proapoptotische und antiproliferative Wirkung des Moringins die Wachstumsreduzierung der Neuroblastomzellen und könnte laut der Autoren und Autorinnen eine vielversprechende Rolle als onkologischer Wirkstoff spielen [20].

Eine andere Studie, 2017 von T. Guon und H. Chung veröffentlicht, widmet sich der Wirkung der Moringafrucht auf menschliche Melanomzellen. Es konnte gezeigt werden, dass der Fruchtextrakt die Zellviabilität signifikant unterdrückt und die Apoptoseeinleitung der Melanomzellen konzentrationsabhängig fördert. Auch hier wird ein therapeutischer Effekt bei der Behandlung von menschlichen Melanomen mit Moringa Oleifera angedeutet [50].

In der Frauenheilkunde nimmt Moringa Oleifera als pflanzliche Therapiealternative ebenso wie in anderen Fachbereichen einen Stellenwert ein. Auf den Philippinen wird Moringa Oleifera im Volksmund als „mother’s best friend“ bezeichnet, da es dort genutzt wird, um die Muttermilchproduktion anzuregen. Im Jahr 2000 veröffentlichten Estrella et al. ihre Studie, mit der sie diese These untermauern konnten. Untersucht wurde die Milchproduktion von 68 Müttern von Frühgeborenen (\leq 37. Schwangerschaftswoche) mittels einer standardisierten Brustpumpe in den ersten fünf Tagen postpartum. Die doppelt-verblindete Studie teilte die Mütter in zwei Gruppen ein, von denen die eine Gruppe Kapseln mit 250 mg Blätterextrakt, die andere Kapseln mit Placebo erhielten. Bei der Gruppe mit Moringa erhöhte sich die Muttermilchproduktion signifikant an Tag 4 und 5 [38]. Kushwaha et al. befassten sich mit den Effekten von Moringa Oleifera auf die Blutwerte von 90 postmenopausalen Frauen. Sie setzten einen Fokus auf die Blutwertveränderung von Antioxidantien und Markern oxidativen Stresses. Östrogen verhindert

oxidativen Stress, der für viele körperlichen Veränderungen im Alter verantwortlich gemacht wird. In der Postmenopause wirkt sich der Mangel an antioxidativem Östrogen negativ auf das System antioxidativer Enzyme aus, welche als Radikalfänger dafür zuständig sind, reaktive Sauerstoffspezies zu inaktivieren. Die untersuchten Frauen, die zu dem Zeitpunkt zwischen 45 und 60 Jahre alt waren, wurden in drei Gruppen aufgeteilt und erhielten als Nahrungsergänzung täglich je nach Gruppeneinteilung einen Placebo-Wirkstoff, 7 g getrocknetes Moringa-Blattpulver oder 9 g eines anderen Pflanzenstoffes (Amaranth-Blattpulver). Die Ergebnisse der 2014 erschienenen Studie zeigen, dass Moringa (ebenso wie Amaranth) antioxidative Eigenschaften besitzt und damit potentiell zur Prävention von postmenopausalen Komplikationen beitragen kann. Zusätzlich konnte auch hier, wie schon in anderen Studien beschrieben, signifikant eine Reduktion der postprandialen Blutzuckerkonzentration beobachtet werden [73].

Mehrere experimentelle Tierstudien haben bereits gezeigt, dass die Einnahme von Moringaextrakten einen hohen Grad an Sicherheit aufweist. Auch in menschlichen Studien, bei denen mit einmaliger Maximalgabe von 50 g des Blattpulvers oder einer Maximaldosis von 8 g täglich für eine Dauer von 40 Tagen gearbeitet wurde, wurden noch keine unerwünschten Effekte beobachtet. Nichtsdestotrotz gibt es bis heute keine standardisierten Moringaextrakte und nur geringe Bestrebungen, einen solchen Extrakt zu entwickeln. Dadurch bleiben die Studienergebnisse untereinander schlecht vergleichbar [135].

In der Reinigung von verschmutztem Wasser findet Moringa Oleifera bereits Anwendung. Die Samen des Baums gelten als eines der besten natürlichen Flockungsmittel (syn. Koagulantien) zur Reinigung von Wasser [102]. Die zerstoßenen Samen stellen eine natürliche Alternative zu synthetisierten Flockungsmitteln dar, die zur Abwasserreinigung und in der Trinkwasseraufbereitung genutzt werden [64]. Moringasamen sind sehr effektiv bei der Reinigung von stark getrübttem Wasser und zeigen ähnlich wasserreinigende Effekte wie die Alaune. Jener Effekt hängt von der initialen Trübheit des Wassers ab. Es soll je nachdem die Trübung zu 92 % bis 99 % reduzieren. Moringasamen können außerdem als antiseptisches Mittel bei der Trinkwasseraufbereitung genutzt werden [8].

1.3 Referenzen

Die Wirkung von bestimmten Pflanzenstoffen, wie die der Flavonoide und anderer Mikronährstoffe als natürliche Heilmittel bei der Therapie verschiedenster Erkrankungen, ist schon seit Langem bekannt und immer wieder Gegenstand neuer Studien. Aus vorausgegangenen Studien ist bekannt, dass Quercetin, Rutin, Kämpferol, Isorhamnetin und Folsäure Inhaltsstoffe von *Moringa Oleifera* sind [135, 79, 67]. Um eine ganzheitliche Aussage über die antikanzerogene und antiproliferative Wirkung von *Moringa* auf Endometriumkarzinomzellen treffen zu können, habe ich im Rahmen der Forschungsarbeit nicht nur die Wirkung von *Moringa* auf die untersuchten Krebszellen, sondern auch die Wirkung der genannten Inhaltsstoffe, im Folgenden als *Referenzen* genannt, separat betrachtet.

1.3.1 Quercetin

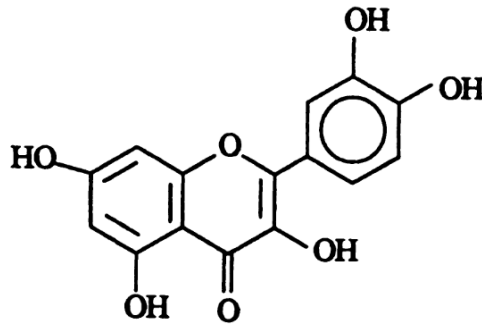


Abbildung 5: Strukturformel von Quercetin [41].

Flavonoide sind Pflanzenstoffe mit einer polyphenolischen Struktur und sind in vielen Früchten, Gemüsesorten, Nüssen, Tees und weiteren Pflanzenarten zu finden [109, 140]. Sie besitzen unterschiedliche biochemische und antioxidative Effekte und gehen dadurch mit einer Bandbreite an biologischen Funktionen einher. Unter anderem sollen sie antiinflammatorisch, antidiabetogen, antiproliferativ und antikanzerogen wirken [109, 140, 138]. Quercetin⁹ gehört zu der Familie der Flavonoide, genauer gesagt zu der Subgruppe der Flavonole, bei denen es sich um Flavonoide mit einer Ketongruppe handelt [119, 109]. Quercetin gehört neben Kämpferol zu den am besten untersuchten Flavonolen und spielt eine Rolle in der Prävention und in der Behandlung von verschiedensten Erkrankungen [109, 138]. Es ist als ubiquitäres Flavonol Teil der üblichen westlichen Ernährung und findet sich unter anderem in Zwiebeln, Brokkoli, Buchweizen und auch in *Moringa* [119, 138, 135]. Quercetin hat durch seine antioxidative Wirkung einen Einfluss auf das antioxidative Schutzsystem von Organismen. Eine Störung im Gleichgewicht zwischen der Bildung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und jenem genannten Schutzsystem zugunsten der ROS führt zu oxidativem Stress, was mit der Entstehung von Tumorerkrankungen in Verbindung gebracht wird [119]. Seine chemische Struktur, unter anderem die OH-Gruppe an Position C3, ermöglicht es Quercetin, freie Radikale abzufangen

⁹siehe Abbildung 5

und so oxidativem Stress vorzubeugen [140]. Die Modulation von Entzündungsreaktion ist eine andere besondere Fähigkeit des Quercetins. Es hemmt die Enzyme Cyclooxygenase (COX) und Lipoxygenase und reduziert dadurch die Entstehung von Prostaglandinen und Leukotrienen, die als Mediatoren an Entzündungsreaktionen beteiligt sind. Weitere Untersuchungen kamen zu dem Ergebnis, dass Quercetin nicht nur COX-2 hemmt, sondern auch das Level an C-reaktivem Protein (CRP), einem entzündungsspezifischen Blutmarker, signifikant senkt [138, 140]. Die Bioverfügbarkeit von Quercetin ist jedoch sehr gering, ebenso die Absorptionsrate und es unterliegt einem schnellen Stoffwechsel und einer raschen systemischen Elimination [140]. Neueste Studien bringen hervor, dass die Darmflora eine wichtige Rolle bei der Bildung von Glykosidasen und Enzymen spielt, die Quercetin in kleinere, besser absorbierbare Moleküle umwandeln [129, 153]. Bislang konnten einige Studien zeigen, die mit *in vivo* und *in vitro* Modellen arbeiteten, dass Quercetin eine antikanzerogene Wirkung besitzt und protektiv auf die Entstehung von Brustkrebs, Lungenkrebs, Nierenkarzinomen, Kolorektalen Karzinomen, sowie dem Prostata- und Ovarial-Karzinom wirken kann [138, 140]. Es ist in der Lage, die Tumorzellproliferation zu reduzieren, Apoptose einzuleiten und mitochondriale Prozesse zu verhindern [119] und es zeigt konzentrationsabhängige zytotoxische Wirkungen auf Krebszellen [9]. Mehrere Signalwege sind bereits bekannt, die von Quercetin beeinflusst werden und bei bestimmten Tumorerkrankungen eine Rolle spielen [140]. Dazu gehören die Signalwege PI3K/Akt/mTOR, WNT/ β -Catenin und der MAPK/ERK1/2, die bei der Entstehung und Proliferation von Tumorzellen beteiligt sind und von Quercetin gehemmt werden [119].

In vivo Tierstudien zeigen, dass die Überlebensrate von krebserkrankten Tieren signifikant gestiegen und das Tumolvolumen stark geschrumpft war, nachdem die Tiere mit Quercetin behandelt wurden [138]. Die Studie von Pratheeshkumar et al. befasst sich mit der Wirkung von Quercetin auf die Angiogenese von Prostata-Tumoren. Dabei untersuchten die Autoren und Autorinnen die Wirkung *in vivo* an Mausmodellen und *in vitro* an humanen Prostatazelllinien und stellten fest, dass Quercetin das Volumen und Gewicht der Prostata Tumore bei Mäusen signifikant reduziert, was auf die gezielte Wirkung des Flavonols auf die Angiogenese zurückzuführen ist. Es reduziert zudem die Zellviabilität der humanen Prostatazellen und indiziert dort die Einleitung der Apoptose. Zusammenfassend kommen die Autoren zu dem Schluss, dass Quercetin das Tumorstadium und die Angiogenese durch direkten Einfluss auf das VEGF-System, der wichtigsten Signalkette bei der Entstehung neuer Blutgefäße, hemmt [114].

Im Jahr 1992 erschien die erste Studie, die sich mit der Wirkung von Quercetin auf Endometriumkarzinome befasst. Die Forscher und Forscherinnen arbeiteten mit Tumorzellen, die fünf Patientinnen mit einem Durchschnittsalter von 56 Jahren entnommen wurden. Quercetin wurde in einer Ethanollösung auf die untersuchten Zellen gegeben und mit einem BrdU(Bromodesoxyuridin)-Test untersucht. Zum ersten Mal wurde nachgewiesen, dass Quercetin die Zellanordnung von Endometriumkarzinomzellen verhindert und somit eine hemmende Wirkung auf die Entstehung und das Wachstum eines primären Endometriumkarzinoms in diesem Modell ausübt [130].

Im Jahr 2003 wurde eine Studie veröffentlicht, die die Wirkung von Quercetin auf die Endometriumkarzinom-Zelllinie Ishikawa untersucht. Die Absicht der Autoren und Autorinnen

war es, die bereits nachgewiesene antikanzerogene Wirkung von Quercetin auch auf Endometri-
umkarzinomzellen zu untersuchen, weil es bislang zu dieser Krebserkrankung nur sehr wenig
Daten gibt. Die Zellkultur wuchs unter lebensähnlichen Bedingungen, bei 37 °C in einem 5 %igen
CO₂-Inkubator. Quercetin wurde in verschiedenen Konzentrationen (1, 10, 50 und 100 µM) in
0,1 %igem DMSO mit 10 % FKS gelöst. Die Ishikawazellen blieben 7 Tage lang unter Einwir-
kung des Quercetins inkubiert und erhielten alle zwei Tage frisches Quercetin-haltiges Medium.
Die durchgeführten Zelltests untersuchten Zellproliferationsgene, Wachstumssignalgene (EGF,
VEGF, TGF- α), Zellzyklusgene (p53, p21, p73, Cyclin D1) und mit Apoptose assoziierte Gene
(bcl-2, bax) mittels RT-PCR und Westernblot. Verglichen mit den Kontrollzellen supprimierte
Quercetin, in einer Dosierung von 10, 50 und 100 µM, das Zellwachstum signifikant um 49, 10
und 13 %. Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀) von Quercetin auf das Zellwachstum
der Ishikawa betrug nach 3, 5 und 7 Tagen 95, 35 und 12 µM. Nach 24-stündiger Inkubation der
Zellen mit 100 µM Quercetin zeigte sich ein signifikanter Rückgang der EGF-mRNA-Expression.
Die VEGF-Expression war interessanterweise signifikant höher als bei den Kontrollzellen. Bei den
Zellzyklusgenen zeigte sich bei Cyclin D1 eine 0,75-fache Minderung. Alle anderen untersuchten
Gene zeigten keine signifikanten Änderungen in ihrem Expressions-Muster. Diese Ergebnisse
lassen vermuten, dass Quercetin unabhängig von der p53- und p21-Signaltransduktion das
Zellwachstum hemmt. Deutlich erwiesen scheint der antiproliferative Effekt von Quercetin auf
Ishikawazellen durch eine Downregulierung der EGF- und Cyclin D1-Gene [65].

1.3.2 Rutin

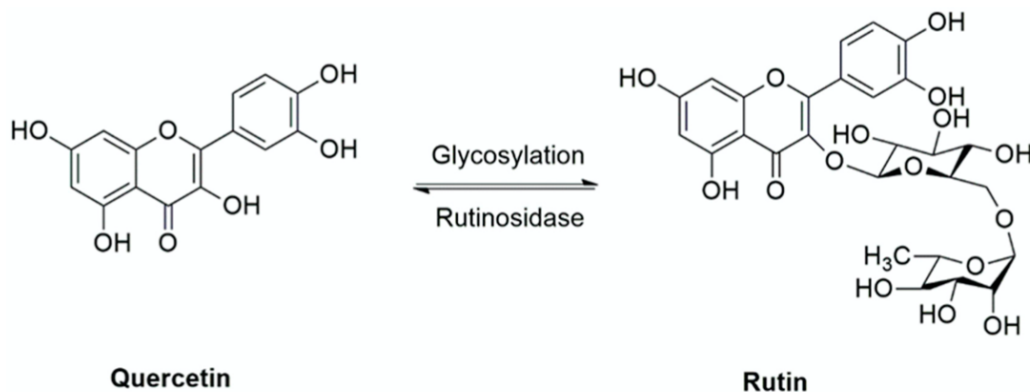


Abbildung 6: Strukturformel von Rutin [105].

Rutin, auch Sophorin, Quercetin-3-O-Rutinosid oder Vitamin P genannt, ist ein Glykosid
des Quercetins und gehört somit zur Familie der Flavonole¹⁰ [105]. Der Name Rutin leitet sich
von der Pflanze *Ruta graveolens* (syn. Weinraute) ab, die Rutin beinhaltet [45]. Rutin kommt
in vielen Gemüse- und Obstsorten wie Spargel, Aprikosen, Äpfeln, Kirschen, Trauben und
Orangen, in Buchweizen und verschiedenen Pflanzen, darunter auch in *Moringa Oleifera*, vor
[105, 135]. Die Grundstruktur von Rutin entspricht der von Quercetin, einem Gerüst aus 15 Koh-
lenstoffatomen in drei Ringen angeordnet (davon zwei aromatische Ringe), mit dem Disaccharid

¹⁰Abbildung 6

Rutinose an C3 [105, 59]. Rutin werden verschiedene pharmakologische Effekte nachgesagt. Es soll antikanzerogene, zytoprotektive, vasoprotektive, antithrombotische, antiinflammatorische und kardioprotektive Effekte haben [126, 85]. Rutin weist eine geringe gastrointestinale Absorptionsrate auf und hat eine limierte Bioverfügbarkeit, was die Fähigkeit erschwert, in ausreichender Konzentration auf Tumorgewebe zu wirken. Um dieses Hindernis zu überwinden, kann Rutin in verschiedene Formen, zum Beispiel eingekapselt in Folsäure-konjugierte Nanopartikel, verabreicht werden [105]. Die Nanopartikel binden an Folsäure-bindende Proteine und gelangen so zielgerichtet in Tumorzellen, da diese einen gesteigerten Folsäureumsatz aufweisen und vermehrt Folsäure-Rezeptoren exprimieren [134]. Die antitumorale Wirkung von Rutin beruht auf seiner Interaktion mit verschiedenen Signalwegen, die bei der Tumorentstehung beteiligt sind [105]. *In vitro* Studien konnten zeigen, dass Rutin die Transkription von FAS unterdrückt [152]. FAS (Fatty-Acid-Synthase) ist das Hauptenzym bei der Lipogenese und spielt eine wichtige Rolle bei der Krebsentstehung, indem es Zellen vor Apoptose schützt [86] und wird in Krebszellen aufgrund des Wachstums und Proliferation vermehrt exprimiert [126, 71]. In der Studie von Saleh et al. konnte abermals belegt werden, dass Rutin FAS reduziert, antiproliferative Wirkung besitzt und die Apoptose von humanen Brustkrebs- und Bauchspeicheldrüsenkrebszellen induziert [126]. In einer anderen Studie, bei der Mäuse humane Leukämie-HL-60-Zellen implantiert bekamen, zeigen die Ergebnisse, dass die Tumorgröße bei Mäusen, die mit Rutin behandelt wurden, signifikant kleiner war als bei der unbehandelten Kontrollgruppe [84]. Die Studie von A.J. Alonso-Castro, F. Domínguez und A. García-Carrancá untersuchte die Wirkung des Flavonols auf humane Kolonkarzinomzellen. Rutin zeigte deutliche zytotoxische Effekte gegen die getesteten Krebszellen und senkte konzentrationsabhängig das Tumolvolumen und -gewicht bei Xenograft-Mausmodellen. Eine durchschnittliche Lebenszeitverlängerung von 50 Tagen und eine VEGF-Senkung¹¹ um 55% im Serum wurden bei den Mäusen mit Quercetin-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Mäusen beobachtet [4].

Rutin wirkt aber nicht nur an sich gegen Krebs, sondern zeigt auch in Kombination mit konventionellen Krebsmedikamenten positive Effekte. Durch die kombinierte Gabe von Cyclophosphamid (CYC) bzw. Methotrexat (MTX) mit Rutin reicht die halbe Dosierung der Medikamente für denselben therapeutischen Effekt aus, wodurch die Rate an dosis-abhängigen Nebenwirkungen stark gesenkt werden kann [59]. Die Autoren und Autorinnen, die diese Ergebnisse veröffentlicht haben, finden bei ihren Untersuchungen keine antitumorale Wirkung von Rutin alleine auf die von ihnen untersuchten Brustkrebszellen. Jedoch zeigen ihre Ergebnisse, dass Rutin Multiple-Drug-Resistances (MDR) bei Brustkrebszellen rückgängig macht. MDR entsteht unter anderem durch einen gesteigerten Auswärtstransport der Medikamente durch sogenannte ABC-Transporter (Adenosine Triphosphate-binding Cassette). Die Ergebnisse der Studie machen deutlich, dass Rutin diese Transportmechanismen durch Interaktion mit den Pumpen überwindet und somit als Chemosensitizer die Wirkung von CYC und MTX verstärkt [59]. Auch in der Gynäkologischen Onkologie gibt es mehrere Studien, die sich mit der Wirkung von Rutin befassen. Rutin-Kupfer-Komplexe supprimieren laut der Studie von Roy et al. das

¹¹VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor, fördert die Angiogenese in Tumoren [40]

Wachstum und die Zellproliferation von Zervixkarzinomzellen zeit- und konzentrationsabhängig [124]. Und bei Ovarialkarzinomzellen zeigt Rutin hemmendes Potential auf die Zellproliferation und VEGF-Expression [89]. Eine 2016 im „Journal of Ovarian Research“ erschienene Studie beleuchtete die Wirkung von Rutin auf das Polyzystische Ovar Syndrom (PCOS) [60]. PCOS gilt als die häufigste Endokrinopathie bei Frauen im reproduktiven Alter und geht mit verschiedenen hyperandrogenen Symptomen wie chronischer Anovulation, Hirsutismus und Alopezie einher [74]. PCOS gilt als Risikofaktor bei der Entstehung von Endometriumkarzinomen [24]. Die Studie belegt die anti-androgene Eigenschaft Rutins und zeigt, dass das Flavonol in der Lage ist, die ovarielle Funktion wiederherzustellen, wodurch es unterstützend zur PCOS-Therapie eingesetzt werden kann [60].

1.3.3 Kämpferol

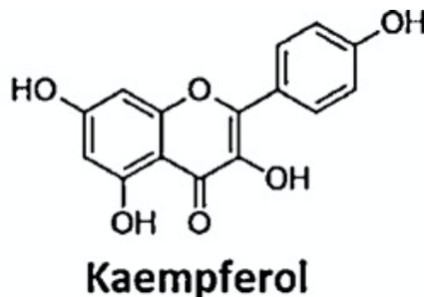


Abbildung 7: Strukturformel von Kämpferol [145].

Kämpferol¹² zählt ebenso wie Quercetin zur Familie der Flavonoide, beziehungsweise zur Subklasse der Flavonole und ist unter anderem in Weißkohl, Brokkoli, Endivien, Grünkohl, Bohnen, Tomaten, Erdbeeren und Trauben enthalten. Es zählt zu den am häufigsten in der üblichen Ernährung vorkommenden Flavonolen [109, 10]. Wie auch die anderen Flavonole zeigt Kämpferol therapeutische Effekte bei der Behandlung von Krebserkrankungen [17]. Eine Studie von 2018 zeigte die *in vitro* Zytotoxizität von Kämpferol gegenüber verschiedenen Krebszellreihen (Ovarial-, Lungen-, Haut-, Pankreas-, Prostata-, Kolon-, Brustkrebs, Neuroblastom und Glioblastom) [112]. Ein Mechanismus, wie Kämpferol gegen Krebszellen wirkt, ist der Einfluss auf Autophagozytose-Mechanismen der Zellen. Autophagozytose (syn. Autophagie) ist neben Apoptose ein Mechanismus des regulierten Zelluntergangs und kann als „Selbstverdau“ von Zellen betrachtet werden. Autophagozytose wird bei bestimmten Bedingungen wie oxidativem Stress oder Nährstoffmangel hochreguliert und schützt den Organismus vor beschädigten und überalterten Zellen. Bei der Entstehung von Krebs spielt Autophagozytose eine entscheidende Rolle, da es bei Zellveränderungen wie DNA-Schäden, Entzündungen oder genomischer Instabilität vor einer Zellentartung schützt. Ebenso gibt es einige neurodegenerative Erkrankungen, darunter M. Parkinson und Multiple Sklerose, die mit der Entstehung abnormaler Proteine

¹²Abbildung 7

durch fehlende Autophagozytose in Verbindung gebracht werden [10]. In der Studie von F. Zhang und C. Ma von 2019 mit Magenkrebszellen kommen die Autoren und Autorinnen zu dem Ergebnis, dass Kämpferol die Autophagozytose der untersuchten Krebszellen induziert und die Zellproliferation hemmt [158]. Die 2020 erschienene Studie von Ashrafizadeh et al. nimmt die Wirkung von Kämpferol auf Autophagozytose-Prozesse genauer unter die Lupe und arbeitet mit dem BrdU-Assay, mit dem auch im Rahmen dieser Doktorarbeit gearbeitet wurde. Die Ergebnisse des BrdU-Tests demonstrieren die proliferationshemmende Wirkung des Flavonols durch ER-Stress¹³-assoziierte Autophagozytose [10]. Das endoplasmatische Retikulum (ER) ist eine Zellorganelle, die für das Falten von Proteinen, ihre Translokation und posttranslationale Modifizierung zuständig ist [2]. Bei einer pathologischen Störung der ER-Funktion entsteht ER-Stress, und es kommt zu verschiedenen Prozessen, die entweder den entstandenen Schaden wiederherstellen oder bei Nichtgelingen die Autophagozytose einleiten [32]. ER-Stress führt zu einer verstärkten Kalzium-Ausschüttung, was zu oxidativem Stress und damit einhergehend einer erhöhten Apoptoserate führt [57, 32]. El-Kott et al. beschäftigten sich erst kürzlich mit der Wirkung von Kämpferol auf Ovarial-Karzinom-Zellen, indem sie jene beschriebenen Prozesse genauer betrachteten. Ihre Ergebnisse, die sie 2020 veröffentlichten, machen deutlich, dass Kämpferol ER-Stress und Autophagozytose verursacht und dadurch das Zellüberleben und die Proliferation der Krebszellen verhindert [32]. Zudem untersuchte das Forscherteam die Wirkung von Kämpferol auf Medikamentensensitivität bei den Ovarial-Karzinom-Zellen. Sie fanden eine erhöhte Sensitivität der Krebszellen gegenüber Cisplatin, einem konventionellen Krebsmedikament, wenn eine Ko-Behandlung mit Kämpferol stattgefunden hat. Dieser Effekt trat unabhängig von ER-Stress und Autophagozytose auf [32].

Wang et al. veröffentlichten 2019 ihre Erkenntnisse zur Wirkung von Kämpferol auf Brustkrebs. Die Autoren und Autorinnen fassen zusammen, dass Kämpferol das Wachstum von Brustkrebszellen hemmt, die Apoptose der Krebszellen einleitet und die Invasion und Migration der Zellen in umliegendes Gewebe verhindert [145]. Begründet wird dies unter anderem damit, dass Kämpferol die Glukose-Aufnahme von Brustkrebszellen behindert, was zu einem signifikanten Rückgang von Zellviabilität und Proliferation führt. Des weiteren nennen sie als Begründung die Studienergebnisse von Li Zhu und Lijun Xue [160], die darlegen, dass mehr Zellen in Phase G2 und weniger Zellen in Phase G1 im Zellzyklus verbleiben, wenn sie mit Kämpferol behandelt werden. Dies deutet an, dass Kämpferol Zellwachstum durch Unterbrechung des Zellzyklus verhindern kann [160, 145].

Mehrere Studien haben sich bislang auch schon mit der Wirkung von Kämpferol auf Endometriumkarzinomzellen befasst [78, 156, 19]. Auch sie kommen zu dem Ergebnis, dass Kämpferol antitumorale Wirkung besitzt, indem es die Apoptose der Krebszellen einleitet, den Zellzyklus stoppt und den Tumor-assoziierten m-TOR/PI3K/Akt-Signalweg hemmt [78]. Die *in silico* Studie von Yani et al., die sich mit Kämpferol als Östrogen-Konkurrent an Östrogenrezeptoren beim Endometriumkarzinom beschäftigt hat, demonstriert, dass das Flavonol eine stärkere Bindung zum Östrogenrezeptor ER α aufweist, als natürliches Östrogen (17 β -Estradiol). Somit

¹³Stress im endoplasmatischen Retikulum

stellt Kämpferol ein potentielles Phytoestrogen zur alternativen Behandlung von Endometriumkarzinomen dar [156]. Auch Chuwa et al. untersuchten die Wirkung von Kämpferol auf Östrogenrezeptoren verschiedener Endometriumkarzinomzelllinien, darunter die Zelllinie Ishikawa. Bei den Ishikawazellen supprimiert Kämpferol in ihren Untersuchungen das Zellwachstum bei einer IC_{50} von $83 \mu\text{M}$. Es führt zu Zellakkumulation in der Sub-G1- und G2/M-Phase im Zellzyklus. Des weiteren supprimiert Kämpferol den $ER\alpha$ und führt unter anderem dadurch signifikant zu einer erhöhten Zytotoxizität durch Einleitung der Apoptose. Auf Östrogenrezeptornegative Krebszellen zeigt Kämpferol keine antikanzerogene Wirkung, was die These der Autoren und Autorinnen unterstützt, dass die zytotoxischen Wirkungen auf einer Interaktion mit Östrogenrezeptoren beruht [19]. Kämpferol unterliegt wie Quercetin und Rutin einer sehr geringen Bioverfügbarkeit. Bevor es Zielgewebe wie Tumore erreichen kann, ist es längst durch den First-Pass-Metabolismus der Leber in inaktivere Metabolite umgewandelt [17]. Bei Brustkrebszellen wurde ein Protein (Abcg2) gefunden, das zytotoxische Stoffe, zum Beispiel Krebsmedikamente, aus der Zelle herausschleust. An et al. untersuchten den Effekt von Kämpferol auf jene Proteine in simultaner Gabe mit Quercetin. Da Kämpferol eine stärkere Affinität zu Abcg2 als Quercetin aufweist, blockiert es das Protein, wodurch höhere Konzentrationen von Quercetin in den Krebszellen erreicht werden und es seine therapeutische Wirkung entfalten kann. Die Autoren und Autorinnen schlagen deshalb eine kombinierte Gabe von Flavonoiden vor, um ihre Bioverfügbarkeit und Wirkung am Zielgewebe zu erhöhen [7]. Ebenso könnte Kämpferol mit einer anderen Substanz kombiniert werden, die eine noch höhere Affinität zu Abcg2 aufweist, damit Kämpferol in die Krebszellen gelangen und dort wirken kann [17].

1.3.4 Isorhamnetin

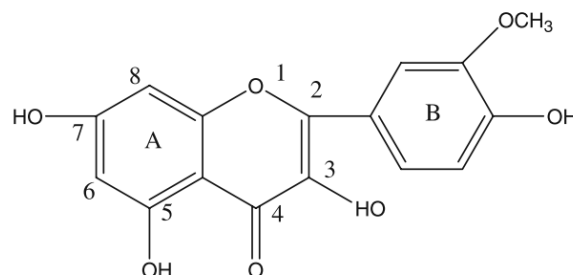


Abbildung 8: Strukturformel von Isorhamnetin [111].

Isorhamnetin, auch 3-Methylquercetin genannt, ist ein Metabolit des Quercetins und ähnelt in seiner Struktur Kämpferol¹⁴. Es ist in gewissen Heilpflanzen zu finden, darunter Hippophae rhamnoides Lam. (Sanddorn) und Ginkgo biloba Lam., welche in der traditionellen Medizin zur Behandlung von Rheuma, kardiovaskulären Erkrankungen und Krebs eingesetzt werden [110, 49]. Isorhamnetin ist reichlich in Zwiebeln, Pfirsichen, Tee und weiteren Pflanzen enthalten, auch in Moringe Oleifera [144, 79]. Dem Flavonoid wird ein weites Spektrum an pharmakologischen Effekten zugeschrieben, darunter soll es antientzündlich, antikanzerogen, antioxidativ sowie

¹⁴Abbildung 8

antibakteriell und antiviral wirken [49, 131, 117]. Viele *in vitro* Studien haben sich bereits mit seinen antitumoralen Eigenschaften befasst und krebshemmende Wirkungen konnten bei Leukämie, Brust-, Kolon-, Lungen- und Zervixkarzinomen sowie weiteren Krebszelllinien festgestellt werden [110, 144]. Diese Wirkungen beruhen unter anderem darauf, dass Isorhamnetin den Zellzyklus der Krebszellen beeinflusst. Eine 2019 erschienene Studie untersuchte die Wirkung von Isorhamnetin auf Blasenkrebszellen in Bezug auf Zellzyklus-Arrest [110]. Es ist erwiesen, dass die antitumorale Wirkung vieler Pflanzenstoffe auf der Unterbrechung des unkontrollierten Zellzyklus der Krebszellen beruht, so auch bei Isorhamnetin. Die Ergebnisse der Studie von Park et al. zeigen, dass Isorhamnetin die Krebszellen in der G2/M-Phase anhält, was ein Mechanismus seiner wachstumshemmenden Eigenschaft auf Tumorzellen darstellt [110]. Um die Zellzyklus-stoppende Wirkung genauer zu verstehen, untersuchten die Autoren und Autorinnen weiterhin verschiedene Zellzyklus-assoziierte Moleküle. Sogenannte Cdk¹⁵-Moleküle sind im Verlauf des Zellzyklus dafür zuständig, die nächste Zellzyklusphase einzuleiten [27]. Beim Übergang von der G2- zur M-Phase ist Cdk1 involviert. Durch Heraufregulierung von Cdk1-hemmenden Proteinen übt Isorhamnetin seine Zellzyklus-stoppende Wirkung auf die untersuchten Blasenkrebszellen aus [110]. Andere Studien zeigen ähnlich hemmende Effekte von Isorhamnetin auf den Zellzyklus [49]. Die Studie von Wang et al. beispielsweise, die Bauchspeicheldrüsenkrebszellen untersucht hat, kommt zu dem Ergebnis, dass Isorhamnetin einen signifikanten Zellzyklus-Arrest in der S-Phase bei den untersuchten Krebszellen induziert [144]. Bei verschiedenen untersuchten Krebszelllinien hemmt Isorhamnetin das Zellwachstum und fördert die Apoptose durch Aktivierung von extrinsischen und intrinsischen Zelltod-Signalwegen [81, 110]. Wie generell alle Flavonoide wirkt Isorhamnetin antioxidativ, kann also freie Radikale abfangen, somit oxidativen Stress verhindern und dadurch präventiv bei der Entstehung von Tumorerkrankungen wirken [119, 49]. Diese Fähigkeit hängt von der Anzahl der Hydroxylgruppen (-OH) an den Ringen und dem Vorhandensein der Doppelbindung an C2-C3 ab. Je mehr Hydroxylgruppen vorhanden sind, desto höher das Potenzial der Flavonoide, freie Radikale abzufangen. Isorhamnetin besitzt vier dieser Hydroxylgruppen, wovon die an C3 entscheidend für seine antioxidative Wirkung ist. Je größer die Konzentration von Isorhamnetin, desto höher seine antioxidative Aktivität [111].

1.3.5 Folsäure

Folsäure¹⁶ ist die synthetische Form von Folat, einem essentiellen, wasserlöslichen B-Vitamin. Folate sind in dunkelgrünem Blattgemüse, Hülsenfrüchten, Brokkoli, Spargel, Zitrusfrüchten, Karotten, Nüssen und weiteren Gemüsesorten enthalten [82, 31]. Über die normale Ernährung hinaus wird Folsäure über Nahrungsergänzungsmittel oder speziell mit Folsäure angereicherte Lebensmittel aufgenommen [113]. Die synthetisierte Folsäure unterscheidet sich von Folat durch seine zusätzlichen Glutamat-Reste und seiner reduzierenden Eigenschaften in Di- oder Tetrahydrofolat-Formen [82]. Die Bioverfügbarkeit des mit der Nahrung aufgenommenen Folats beträgt 10 bis 98 %, abhängig vom intestinalen pH-Wert, Malabsorptionsstörungen, der Aufnah-

¹⁵Cdk = Cyclin-dependent Kinase

¹⁶Abbildung 9

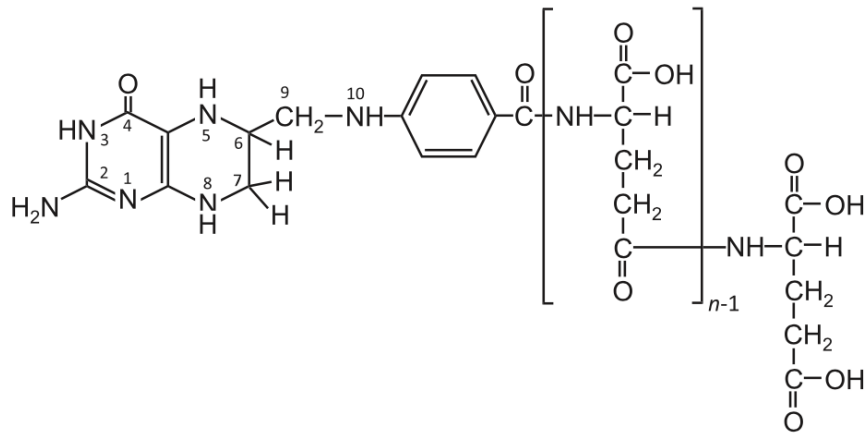


Abbildung 9: Strukturformel von Tetrahydrofolat, der aktiven Form von Folsäure [31].

me von Alkohol und anderen Stoffen, die die Folat-Aufnahme hemmen [113]. Supplementierte Folsäure gelangt rasch in den Kreislauf, indem es im proximalen Dünndarmabschnitt via passiver Diffusion absorbiert wird und in der Leber durch die Dihydrofolatreduktase (DHFR) in das biologisch aktive Tetrahydrofolat umgewandelt wird [82, 113]. Folsäure erfüllt verschiedene Funktionen, darunter ist es vor allem als Coenzym bei der Übertragung von C1-Einheiten essentiell für die Methionin-Synthese aus Homocystein, die Pyrimidinsynthese und Methylierungsprozesse in der DNA. Dadurch können bei einem Folsäure-Mangel Krankheiten aufgrund abnormaler Protein-Synthese, DNA-Synthese und Genexpression entstehen und es gibt Berichte über Zusammenhänge zwischen Folsäure-Mangel und kardiovaskulären Erkrankungen, Krebs und kognitiven Dysfunktionen [31].

Studien haben gezeigt, dass ein Folsäure-Mangel mit DNA-Strang-Brüchen, vermehrten Mutations-Raten und gestörten DNA-Reperatur-Mechanismen einhergeht, was wiederum zu einem erhöhten Risiko für Tumorzellentstehungen führt [11]. Ein Hauptsymptom des Folsäure-Mangels zeigt sich als megaloblastäre Anämie [31]. Bezüglich der Wirkung von Folsäure auf Krebserkrankungen kommen die bisher durchgeführten Studien zu einem nicht-einheitlichen Ergebnis. Bei manchen Krebsarten scheint Folsäure einen protektiven Effekt auszuüben, bei anderen zeigt sich keinerlei Effekt und bei einer erhöhten Folsäure-Aufnahme zeigt sich für manche Krebserkrankungen ein erhöhtes Risiko [113]. Eine Meta-Analyse aus dem Jahr 2013 untersuchte den Zusammenhang zwischen der Einnahme von Folsäure und dem Risiko für Ovarial-Karzinome. Die WissenschaftlerInnen konnten bei ihrer Studie keinen signifikanten Zusammenhang finden und gehen deshalb von keiner Folsäure-assoziierten Anfälligkeit für Ovarial-Karzinome aus [80]. Die Meta-Analyse von Kim et al. zeigt für das Kolon-Karzinom einen signifikanten protektiven Effekt mit einer 2 %igen Risikoreduktion für jede weiteren eingenommenen 100 µg pro Tag [68]. Die Studie von X. Zhou und Y. Meng beschäftigte sich der Assoziation zwischen Serumfolat und Zervixkarzinomen. Die Meta-Analyse kommt zu dem Ergebnis, dass ein Mangel an Serumfolat mit einem erhöhten Risiko für Zervixkarzinome unter asiatischen Frauen einhergeht [159]. Chen et al. zeigten bei ihrer Studie einen U-förmigen Dosis-abhängigen Effekt von Folsäure auf Brustkrebs. Eine signifikante Senkung des Brustkrebsrisikos

konnte bei einer Folat-Einnahme zwischen 153 und 400 µg beobachtet werden im Vergleich zu einer Einnahme unterhalb von 153 µg. Eine Folat-Einnahme unter 153 µg und über 400 µg zeigte keine signifikante Wirkung auf das Brustkrebsrisiko. Zudem zeigt diese Meta-Analyse einen inversen Zusammenhang zwischen Folat-Einnahme und Brustkrebsrisiko vor allem bei Frauen mit einem erhöhten Alkoholkonsum im Vergleich zu Frauen, die keinen oder wenig Alkohol zu sich nehmen [18].

Die 2018 veröffentlichte Studie von Bahmani et al. untersuchte den Effekt von Folsäure-Supplementierung auf die Rezidivrate von Endometriumhyperplasien. Die doppelt-verblindete, randomisierte Studie kommt zu dem Ergebnis, dass eine Einnahme von Folsäure-Präparaten für 12 Wochen keinen Einfluss auf das Eintreten von Endometriumhyperplasie-Rezidiven hat. Es zeigten sich jedoch signifikante Senkungen bei bestimmte Serum-Werten, darunter Serum-Insulin, Triglyceriden und VLDL [11]. Beim Endometriumkarzinom gibt es verschiedene Ergebnisse bezüglich der Wirksamkeit von Folsäure. Die im Jahr 2000 erschienene Studie von Jain et al. findet keinen statistisch signifikanten Effekt von Folsäure auf das Risiko, an Endometriumkarzinom zu erkranken [61]. Die Fall-Kontroll-Studie von Xu et al. konnte einen dosisabhängigen Zusammenhang zwischen Folat-Einnahme und einer Risikosenkung für Endometriumkarzinome finden [154]. Andere Studien, wie zum Beispiel die Studie von Lu et al., zeigen andere Ergebnisse. Bei der prospektiven Kohortenstudie fanden die Forschenden ein erhöhtes Risiko für Endometriumkarzinome bei einer erhöhten Folat-Einnahme [87]. Und das, obwohl mehrere Untersuchungen bei Frauen im reproduktiven Alter ergaben, dass eine erhöhte Folsäure-Aufnahme mit höheren Progesteron-Spiegeln im Blut einhergeht, was potentiell präventiv bei der Entstehung von Endometriumkarzinomen wirkt [99]. Die Fachgesellschaften für Ernährung in Deutschland, Österreich und der Schweiz empfehlen eine tägliche Folat-Zufuhr von 300 µg für Jugendliche und Erwachsene. Frauen, die beabsichtigen, zeitnah schwanger zu werden, und Schwangeren werden eine erhöhte Zufuhr von 400 µg bzw. 550 µg täglich empfohlen, um Neuralrohrdefekte beim Kind vorzubeugen [70].

1.4 Kontrollen

Die Kontrollen dienten mir im Rahmen der Forschungsarbeit als Negativkontrollen. Eine stark zytotoxische Wirkung von Tamoxifen und Endoxifen durch hohe Dosierung und eine wachstumssteigernde Wirkung von Estradiol wurden vor Testdurchlauf erwartet. Sind besagte Effekte bei den untersuchten Krebszellen beobachtet worden, konnte davon ausgegangen werden, dass die Krebszellen regelrechten Bedingungen während der Testdurchläufe unterlegen sind, was die Aussagekraft der Testergebnisse stärkt.

1.4.1 Tamoxifen

Tamoxifen ist ein sogenannter selektiver Östrogen-Rezeptor-Modulator (engl. „SERM“) und gilt seit über 40 Jahren als Goldstandard zur adjuvanten hormonellen Behandlung von Frauen mit Östrogenrezeptor-positivem Brustkrebs [69, 43]. Bei primärem Brustkrebs senkt Tamoxifen signifikant die Rezidivrate und Mortalität bei prä- und postmenopausalen Frauen. Zusätzlich

wird es auch zur Prävention bei Frauen mit einem hohen Brustkrebsrisiko und zur Behandlung von Männern mit Brustkrebs verwendet [14]. Als SERM hat Tamoxifen einen antagonistischen Effekt an α -Östrogenrezeptoren im Brustgewebe, jedoch zeigt es auch östrogene Wirkungen je nach Zielorgan und Dosis [76]. An β -Östrogenrezeptoren im Endometrium wirkt Tamoxifen agonistisch, weswegen Tamoxifen mit einer erhöhten Inzidenz von Endometriumhyperplasien, -polypen und -karzinomen in Verbindung gebracht wird [43]. Es scheint eine selektive Affinität zu endometrialem Gewebe zu haben und bewirkt an den Ovarien eine erhöhte Östrogen-Synthese [69]. Der genaue Mechanismus, dem eine erhöhte Endometriumkarzinom-Inzidenz durch Tamoxifen-Einnahme unterliegt, ist bislang nicht ausreichend geklärt. Der Östrogen-agonistische Effekt wird in Verbindung mit der Hochregulierung verschiedener Signalwege gebracht, die zu Tumorentstehungen führen können [43]. Gerber et al. untersuchten in ihrer Studie aus dem Jahr 2000 die Effekte der adjuvanten Tamoxifen-Therapie bei postmenopausalen Brustkrebs-Patientinnen auf das Endometrium. Nach drei Jahren Tamoxifen-Einnahme erhöhte sich die Dicke des Endometriums von durchschnittlich 3,5 mm auf 9,2 mm bei den untersuchten Frauen. Diese Veränderung erwies sich als statistisch signifikant gegenüber der Kontrollgruppe ohne Tamoxifen-Therapie. Bei einer der insgesamt 52 Patientinnen mit verdicktem oder morphologisch suspektem Endometrium wurde ein Endometriumkarzinom festgestellt [46]. Das Risiko, durch eine Tamoxifen-Behandlung Endometriumhyperplasien oder -polypen zu entwickeln, ist bei den betroffenen Patientinnen um das zwei- bis vierfache erhöht. Endometriumpolypen gehören zu den am häufigsten auftretenden Endometrium-Pathologien im Zusammenhang mit einer Tamoxifen-Einnahme bei postmenopausalen Frauen [76].

Die Studie von Fleming et al. untersuchte das kumulative Risiko für Endometriumkarzinome durch eine Tamoxifen-Therapie. Die Autoren und Autorinnen verglichen dabei die Daten der fünfjährigen mit der verlängerten zehnjährigen Tamoxifen-Behandlung. Die Ergebnisse der Meta-Analyse zeigen ein zweifach erhöhtes Risiko bei der verlängerten Tamoxifen-Therapie, mit einer Risikoerhöhung von 1,5 % auf 3,2 %. Weitere Daten zeigen einen erhöhten Zusammenhang zwischen Tamoxifen und seltenen, aggressiven Formen von Endometriumkarzinomen, wie dem MMMT¹⁷. Obwohl die Mehrheit der mit Tamoxifen-assoziierten Endometriumkarzinome zu den Low-Grade-Tumoren gezählt und in einem frühen Stadium diagnostiziert werden, ist eine höhere Inzidenz seltener Uterus-Sarkome bei Tamoxifen-Patientinnen zu finden [43]. Tamoxifen findet paradoxerweise aber auch Anwendung bei der Behandlung von Endometriumkarzinomen. Das SERM zeigt einen hochregulierenden Effekt auf Progesteron-Rezeptoren bei Endometriumkarzinomen, wodurch es theoretisch die Wirksamkeit von Progesteron-Präparaten steigern könnte [150]. Die kombinierte Gabe von Progesteron-Präparaten und Tamoxifen wurde unter anderem in der GOG¹⁸-Studie untersucht und teilnehmende Patientinnen bekamen täglich zwei Mal 20 mg Tamoxifen und wöchentlich-intermittierend 200 mg Medroxyprogesteronacetat (MPA). Die Ergebnisse zeigen eine 33 %ige Ansprechrate mit einem progressionsfreien Überleben von 3 Monaten und einem Gesamtüberleben von 13 Monaten [15]. Tamoxifen alleine zeigt nur limitierten Effekt auf die Endometriumkarzinom-Behandlung mit einer Ansprechrate von 10 % [139].

¹⁷MMMT = Maligner Müllersche Misch tumor

¹⁸GOG = Gynecologic Oncology Group

1.4.2 Endoxifen

Endoxifen ist der klinisch aktive Metabolit von Tamoxifen. Es hat ein 30 bis 100-fach stärkeres Potential als anti-Östrogen im Vergleich zu Tamoxifen und besitzt eine höhere Affinität zu Östrogen-Rezeptoren. Verschiedene Cytochrom-P-450-Enzyme katalysieren die Umwandlung von Tamoxifen in primäre Metabolite, darunter N-Desmethyl(NDM)-Tamoxifen. CYP2D6 kann als einziges Enzym NDM-Tamoxifen in Endoxifen umwandeln, wodurch das Enzym einen entscheidenden Stellenwert beim Therapieerfolg von Tamoxifen einnimmt [127]. Die Studie von Lim et al. untersuchte die Auswirkungen des CYP2D6-Genotyps auf die Serumkonzentrationen von Endoxifen bei Patientinnen, die aufgrund von Brustkrebs mit Tamoxifen behandelt wurden. Je nachdem, um welche CYP2D6-Allel-Trägerinnen es sich bei den Frauen handelte, wurden unterschiedlich hohe Serumkonzentrationen der aktiven Metabolite von Tamoxifen gemessen. Schlussfolgernd geben die Erkenntnisse eine mögliche Erklärung für die unterschiedlich starke Ansprechrate von Patientinnen auf Tamoxifen, da sich je nach CYP2D6-Ausprägung viel oder wenig therapeutisch wirksames Endoxifen im Blutkreislauf der Frauen befindet [83]. Die von Madlensky et al. durchgeführte Studie untersuchte erstmals den Zusammenhang zwischen Endoxifen-Konzentration und klinischem Outcome bei Brustkrebs-Patientinnen. In der Analyse zeigt sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Schwellenwert-Konzentration von 5,97 ng/ml Endoxifen und einem 30 %ig erniedrigtem Risiko für Brustkrebs-Rezidive [92]. Da Tamoxifen einem sehr komplexen Metabolismus mit verschiedenen beteiligten Enzymen und Metaboliten unterliegt, können Vorhersagen über die Effizienz einer Tamoxifen-Therapie unter Einbezug des CYP2D6-Genotyps getroffen werden, wobei das CYP2D6-Gen aber nicht als alleiniges Schlüsselemente betrachtet werden darf [127].

1.4.3 Estradiol

17- β -Estradiol (oder *Östradiol*) gehört zu den natürlichen Östrogenen und stellt während der Geschlechtsreife das am stärksten wirkende Östrogen dar [148]. Östrogene üben im Zyklus der Frau einen entscheidenden Einfluss auf das Endometrium auf, indem sie für Zellwachstum in der Gebärmutter-schleimhaut sorgen, was der potentiellen Einnistung einer befruchteten Eizelle dient. Progesteron wirkt als natürlicher Antagonist dem Östrogen-induzierten Zellwachstum entgegen [122]. Es ist für die Umwandlung des proliferativen in das sekretorische Endometrium zuständig und entscheidend für den Erhalt der Frühschwangerschaft [148]. Endometriumkarzinome entstehen durch eine Dysbalance zwischen dem proliferativen Östrogen und dem entgegenwirkenden Progesteron zugunsten des Östrogens. Viele der Risikofaktoren für das Endometriumkarzinom beruhen auf einer gesteigerten Östrogenkonzentration beziehungsweise einem Mangel an Progesteron [122].

1.5 Zielstellung

Das Endometriumkarzinom stellt mit steigenden Inzidenzen eine präsenter werdende Diagnose im Bereich der Frauenheilkunde dar. Es ist die fünfthäufigste Krebserkrankung unter Frauen allgemein und die häufigste der weiblichen Genitale. Zu den Therapieoptionen, die laut aktueller S3-Leitlinie empfohlen werden, gehören die operative Entfernung der Gebärmutter, der Eileiter und Eierstöcke sowie begleitende Bestrahlungs- oder Chemotherapie. Der Wunsch nach Eigenverantwortung, Mitbestimmung und Eigeninitiative bei der Therapie des eigenen Krebsleiden ist für viele Patientinnen groß.

Moringa Oleifera wird nicht ohne Grund auch Wunderbaum genannt. Die tropische Pflanze besitzt zahlreiche Eigenschaften, die eine vielfältige Nutzung der Pflanzenbestandteile ermöglichen. Dazu gehört, dass Moringa als natürliches Mittel zur Trinkwasserreinigung genutzt werden kann und bei der medizinischen Behandlung vieler Erkrankungen eingesetzt wird, nicht zuletzt aufgrund seiner antikanzerogenen Wirkung. Die getrockneten und zu Pulver verarbeiteten Pflanzenblätter sind mittlerweile auch in Europa in Reformhäusern, Drogeriemärkten und vereinzelt in Lebensmittelläden erhältlich und nehmen eine prominente Rolle im Bereich der sogenannten „Superfoods“ ein.

Ziel meiner Doktorarbeit ist es, Aussagen über die Wirkung von Moringa Oleifera auf das Wachstumsverhalten von hormonaktiven Endometriumkarzinomzellen treffen zu können, mit der Absicht, Moringa als potentiell komplementäres Therapeutikum zusätzlich zu den bisherigen Therapieoptionen zu etablieren. Dabei betrachte ich nicht nur die Wirkung des in Ethanol zubereiteten Moringa-Extraktes auf die Krebszellen, sondern zusätzlich auch die Wirkung bestimmter Pflanzenstoffe im Einzelnen. Dazu gehören die Flavonoide Quercetin, Rutin, Kämpferol und Isorhamnetin sowie Folsäure. Die Wirksamkeit der genannten Stoffe auf Krebszellen und deren andere medizinisch wertvollen Eigenschaften (antiinflammatorisch, antioxidativ, antidiabetogen etc.) wurden bereits in vielen Studien untersucht und belegt. Ebenso gibt es Studien, die den Nachweis jener Stoffe in der Moringa-Pflanze hervorbringen. Um die Aussagekraft meiner Ergebnisse zu kräftigen, untersuche ich dennoch spezifisch den von mir verwendeten Moringa-Extrakt, hergestellt aus herkömmlich erworbenem Moringa-Pulver, mit Hilfe der HPLC auf die besagten Referenzstoffe. Die Zellteste, die bereits in mehreren Vorarbeiten über ähnliche Themen verwendet und erprobt wurden, bringen mir Aussagen über das Proliferationsverhalten der Zelllinien, die Zellviabilität und die Zytotoxizität. Mit bestimmten Kontrollstoffen kann ich die Aussagekraft der durchgeführten Zellteste bewerten, dazu zählen Tamoxifen, Endoxifen und Estradiol. Ebenso werde ich als Kontrolle die Alkohole, in denen das Moringa und die Referenzen gelöst sind, auf ihre Wirkung testen, um zu überprüfen, dass die Wirkung von den Stoffen selbst und nicht von den Vehikel-Lösungen ausgeht.

2 Material und Methoden

In dieser Doktorarbeit soll die Wirkung von *Moringa Oleifera* auf Krebszellen des Endometriums untersucht werden. Dafür muss zuerst aus dem Moringapulver ein Extrakt hergestellt werden, der *in vitro* auf Krebszellen gegeben werden kann. Um bei einer Wirkung des Extraktes genauere Rückschlüsse darauf ziehen zu können, welche Inhaltsstoffe des Pulvers besonders wirksam oder unwirksam sind, muss vorab herausgefunden werden, welche Inhaltsstoffe im verwendeten Moringapulver enthalten sind. Diese Analyse erfolgt mittels der HPLC (s.u.). Die jeweiligen Inhaltsstoffe, die in *Moringa* enthalten sind, müssen dann ebenfalls in Lösung gebracht werden, um sie als Vergleichssubstanzen gesondert auf die Krebszellen geben zu können. Damit die Ergebnisse der Zelltests aussagekräftig sind, müssen zudem weitere Kontrollwerte gemessen werden: dazu gehören die Stoffe, in denen der Extrakt und die Inhaltsstoffe gelöst sind (Ethanol, DMSO), sowie Tamoxifen, Endoxifen und Estradiol. Denn nur in der Gesamtheit aller Referenz- und Kontrollwerte kann eine Aussage über die reine *Moringa*-Wirkung gemacht werden.

2.1 Extraktherstellung

Zur Herstellung des *Moringa*-Extraktes wurde das Pflanzen-Pulver der Marke *Vita Trend*, das in Bioläden und Reformhäusern erwerbbar ist, verwendet und mittels Ethanol-Verfahren durchgeführt.

2.1.1 Ethanol-Verfahren

Zuerst wurden 4 g des Pulvers mit 70 %igem Ethanol in einem Reagenzgefäß vermischt. Daraufhin wurde das Gemisch in der Discover M Mikrowelle (80 Watt) bei 40 °C für 30 min erwärmt. Der flüssige Anteil wurde in ein neues Reagenzgefäß abpipetiert und bei 4.030 U/min (U = Umdrehungen) für 15 min zentrifugiert. Dadurch konnten die festen Bestandteile erneut von den flüssigen getrennt werden. Der Überstand musste wieder abpipetiert und die entstandenen 27 ml Flüssigkeit in Eppendorf-Gefäße á 1 ml umpipetiert werden. Die 27 Eppendorf-Gefäße wurden erneut zentrifugiert; dieses Mal bei 13.000 U/min für 5 min. Der Überstand wurde erneut abpipetiert und ergab insgesamt einen Extrakt mit dem Volumen von 25 ml. Dieser *Moringa*-Extrakt wurde unter sterilen Kautelen durch einen Filter 0,45 µm gepresst. Der gefilterte Extrakt ist auf Eppendorf-Gefäße à 1 ml Fassvermögen verteilt und die 25 Gefäße in einer Vakuumzentrifuge (Eppendorf Concentrator 5301) eingengt worden. Dabei entstand aus den ursprünglichen 25 ml bei 45 °C ein Zielvolumen von 2 ml. Der Extrakt wurde hierbei ca. 12,5-fach aufkonzentriert.

2.1.2 Vorbereitung der klinisch chemischen Analyse des Extraktes

Damit *Moringa* als pflanzlicher Wirkstoff betrachtet werden kann, bedarf es eine umfassenden Analyse aller enthaltenen Mikro- und Makronährstoffe. Um den *Moringa*-Extrakt klinisch chemisch analysieren zu können, musste vorab eine Verdünnungsreihe des Extrakts mit 70 %igem Ethanol angesetzt werden. Für die Eiweiß- und Glucose-Messung wurde eine 1:5 Verdünnung

angefertigt. Dabei wurden 10 µl Extrakt mit 400 µl Ethanol vermischt. Für die Eisen-Messung wurde eine 1:10 Verdünnung hergestellt, also 50 µl Extrakt mit 450 µl Ethanol gemischt. Zum Nachweis von Kalium, Kalzium und Magnesium wurde eine 1:100 Verdünnung durchgeführt. 5 µl Extrakt wurden mit 495 µl Ethanol vermischt. Und um Folsäure nachzuweisen, musste eine 1:200 Verdünnung angefertigt werden, bei der 2,5 µl Extrakt mit 497,5 µl Ethanol vermischt wurden (Tabelle 1). Nach dem jeweiligen Pippetieren erfolgte die Vermischung mittels *Vortexer Reax 2000*.

Tabelle 1: Verdünnungen für die klinische Analyse

| Nährstoff | Verdünnung |
|----------------------------------|-----------------------------------|
| Glucose 1:5 | 10 µl Extrakt + 400 µl Ethanol |
| Eisen 1:10 | 50 µl Extrakt + 450 µl Ethanol |
| Kalium, Calcium, Magnesium 1:100 | 5 µl Extrakt + 495 µl Ethanol |
| Folsäure 1:200 | 2,5 µl Extrakt + 497,5 µl Ethanol |

2.1.3 Herstellung der Referenzwerte

Aus vorhergegangenen Analysen anderer Autoren ist ersichtlich, dass Moringa unter vielen anderen die Inhaltsstoffe Folsäure, Quercetin, Kämpferol, Isorhamnetin und Rutin enthält, die im weiteren Verlauf als Referenzstoffe bezeichnet werden [135, 79, 67]. Um zu bestätigen, dass sich auch in dem hier verwendeten Moringa die genannten Referenzstoffe befinden, wurde eine HPLC-Analyse des Moringa-Extraktes durchgeführt. Mit der HPLC (High Performance Liquid Chromatography) kann ein Wirkstoff quantitativ und qualitativ auf seine enthaltenen Inhaltsstoffe untersucht werden (s.u.). Damit der Moringa-Extrakt mittels HPLC auf seine Referenzstoffe Folsäure, Quercetin, Kämpferol, Isorhamnetin und Rutin untersucht werden kann, musste der Moringa-Extrakt zuerst mit 70 %igem Ethanol in verschiedenen Konzentrationen verdünnt werden. Dabei wurden jeweils 100 µl Lösungen hergestellt, die zu 100 %, 50 %, 20 %, 10 %, 9 %, 7 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % und zu 1 % aus Extrakt bestehen. Der Chromatograph aus der HPLC-Analyse, mit dem gearbeitet wurde, enthielt die Probe des zu 10 % verdünnten Extraktes. Für die Referenzherstellung mussten ebenso entsprechende Lösungen angefertigt werden. Folsäure wurde in einer 1 µg/µl Konzentration in absolutem Alkohol (99,8 %) vermischt. Zum Lösen der Folsäure mussten mehrere Vortex-Durchläufe sowie Ultraschallbäder durchgeführt werden. Quercetin wurde in einer Konzentration von 0,0152 g/10 ml in einer 1:2 Ethanol/DMSO Mischung gelöst. Die Substanz Kämpferol wurde in einer Lösung der Konzentration 1,43 µg/ml in einer 1:1 Mischung aus Ethanol/DMSO angesetzt. Isorhamnetin wurde in einer Konzentration von 158 µg/µl in DMSO gelöst. Und für Rutin wurde eine Lösung mit der Konzentration von 3,05 µg/µl in einer 1:2 Mischung aus absolutem Alkohol (99,8 %) und DMSO hergestellt (Tabelle 2). Die hergestellten Lösungen wurden auch bei allen durchgeführten Zelltests als Referenzwerte benutzt, so dass nicht nur die allgemeine Wirkung des Moringa-Extraktes auf die Krebszellen bewertet werden konnte, sondern auch die spezifische Wirkung der jeweiligen enthaltenen Referenzwerte.

Tabelle 2: Herstellung der Referenzwerte

| Referenzen | Konzentration | Lösungsmittel |
|--------------|----------------|---------------------------------|
| Quercetin | 0,0152 g/10 ml | Ethanol/DMSO (1:2) |
| Isorhamnetin | 158 µg/ml | DMSO |
| Rutin | 3,05 µg/µl | abs. Alkohol (99,8%)/DMSO (1:2) |
| Kämpferol | 1,43 µg/µl | Ethanol/DMSO |
| Folsäure | 1 µg/µl | abs. Alkohol (99,8%) |

2.2 Vorbereitung für die Kontrollen

Endoxifen und Tamoxifen sind gängige Arzneistoffe bei der Therapie von Brustkrebs. Eine *in vitro* zytotoxische Wirkung bei hoher Dosierung wird auch bei Endometriumkarzinomzellen im Rahmen dieser Arbeit erwartet. Beide Substanzen wurden, genau wie das Hormon Estradiol, als Kontrolllösungen auf die Krebszellen gegeben, um sicher zu stellen, dass die verwendeten Krebszellen ein ihrer Morphologie entsprechendes Verhalten zeigen. Um die abschließenden Kontrollen des Extraktes auf die Karzinomzellen durchführen zu können, mussten vorab Kontroll-Lösungen hergestellt werden. Endoxifen wurde hierfür in einer Konzentration von 6,2 µg/µl mit absolutem Alkohol (99,8 % Ethanol) verdünnt. Für Tamoxifen wurde im gleichen Verfahren eine Konzentration von 5,6 µg/µl hergestellt. Estradiol musste in einer Konzentration von 2,72 µg/µl gelöst werden und die dadurch entstandene Verdünnung von 10^{-2} g/ml auf eine Konzentration von 10^{-7} g/ml verdünnt werden (Tabelle 3).

Tabelle 3: Herstellung der Kontrollen

| Kontrollen | Konzentration | Lösungsmittel |
|----------------------------|---------------|-----------------------|
| Endoxifen | 6,2 µg/µl | abs. Alkohol (99,8 %) |
| Tamoxifen | 5,6 µg/µl | abs. Alkohol (99,8 %) |
| Estradiol $\times 10^{-5}$ | 2,72 µg/µl | abs. Alkohol (99,8 %) |

2.3 Zelllinie und Zellkultivierung

Für die Zellversuche wurden die Endometriumkarzinomzellen der Linie RL95-2 und Ishikawa verwendet. Bei RL95-2 handelt es sich um eine Zelllinie einer kaukasisch abstammenden, 65-jährigen postmenopausalen Frau mit einem Adenosquamösen Typ-1-Karzinom Grad 2 [96]. Die Zelllinie Ishikawa wurde einer japanischen, 39-jährigen Frau mit einem gut differenzierten Adenokarzinom des Endometriums (Typ-1) entnommen [104]. Beide Zelllinien exprimieren α - und β -Östrogenrezeptoren, Ishikawa ist zudem Progesteronrezeptor-positiv [137, 104].

Die Zellen beider Linien wurden unter physiologischen Bedingungen kultiviert, also bei 37 °C bei einer Begasung von 5 % CO₂ und unter wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Um Zellwachstum und Proliferation sicherzustellen, wurden die Zellen alle zwei bis drei Tage mit einem frischen Kulturmedium genährt. Dieses Kulturmedium besteht aus DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) mit Phenylrot, 10 % FKS (Fetales Kälberserum), L-Glutamin, Streptomycin, Penicillin und Amphotericin B. Die Zusammensetzung optimiert das Wachstum

und verhindert die Erregerausbreitung bei etwaiger Kontamination. Um letztere bestmöglichst zu vermeiden, fand die Laborarbeit ausschließlich unter sterilen Kautelen statt. Sobald die Zellen 70 - 80 % des Flaschenbodens bedeckt hatten und eine ausreichende Konfluenz gegeben war, wurden die Zellen vom Flaschenboden gelöst und in eine nächst größere Kulturflasche passagiert. Dabei musste zuerst das alte Kulturmedium entfernt und der Flaschenboden mit PBS gespült werden, um Zelltrümmer zu beseitigen und überschüssiges Eiweiß aus dem Medium zu entfernen, welches sonst zu einer suboptimalen Trypsinierung der Zellen geführt hätte. Es erfolgte die Zugabe von Trypsin, welches bei einer Inkubationszeit von 5 min im Brutschrank die Zelladhärenz ablöste. Hinzugegebenes DMEM (+ 10 % FKS) stoppte die Ablösungsreaktion und die nun abgelösten Zellen konnten zusammen mit dem verbrauchten Medium in der Zentrifuge getrennt werden (6 min bei 1.200 rpm). Durch Vortexen durchmischten sich das entstandene Zellpellet mit frischem Kulturmedium und ließ sich in eine neue Zellflasche überführen. Die Zellen in den Kulturflaschen wurden zur optimalen Proliferation in den Brutschrank mit oben genannten Bedingungen zur Inkubation gestellt und das Wachstumsverhalten regelmäßig unter dem Mikroskop begutachtet.

2.4 Immunhistochemie

Die Endometriumkarzinomzellen der beiden verwendeten Zelllinien Ishikawa und RL95-2 exprimieren laut Herstellerangaben den Östrogenrezeptor (ER) in seinen zwei Isoformen alpha und beta [137, 104]. Der Nachweis der Rezeptoren in der Ausgangszelllinie und in höheren Zellpassagen erfolgt durch eine immunhistochemische Reaktion. Bei dieser Reaktion handelt es sich um eine indirekte Antikörperreaktion. Primäre Antikörper (AK) binden dabei an bestimmte Bereiche (Epitope) der Rezeptoren. Sekundäre Antikörper binden nun an die entstandenen Komplexe aus Rezeptorepitop und primärem Antikörper. Der sekundäre Antikörper verfügt dabei über ein Peroxidase-Enzym, das bei Bindung an einen Komplex mit Rezeptorepitop und primärem Antikörper und zusätzlicher Zugabe eines Substrats eine Farbänderung der Reagenz erzeugt. Ist also ein Farbumschlag der Reagenz zu sehen, müssen folglich Rezeptoren vorhanden sein. Zusätzlich soll das Vorhandensein von Progesteronrezeptoren bei der Zelllinie Ishikawa bestätigt werden. Bei der Durchführung der immunhistochemischen Untersuchung werden neben den Antikörper-Suspensionen zuerst Wasserstoffperoxid und ein Horse Serum auf die Zellen gegeben. Das Wasserstoffperoxid hemmt dabei die endogene Peroxidase der Zellen, das Horse Serum blockiert unspezifische Antikörper-Bindungsstellen [75]. So kann das Ergebnis der Antikörper-Tests sensitiver betrachtet werden und erhält eine höhere Aussagekraft.

Procedere

Schritt 1 Aussaat von 300.000 Zellen/ml auf einer 24-Wellplatte mit je 300 µl/Well. Inkubation der Wellplatte für 48 Stunden im Brutschrank (37 °C, 5,0 % CO₂, wasserdampfgesättigte Atmosphäre).

Schritt 2 Medium abpipettieren und drei Mal mit PBS spülen. Fixierung der Zellen mit Formafix 4 %, 30 min RT Inkubation. Erneut dreimaliges Spülen mit PBS und Zugabe

von 0,3 % H₂O₂, 30 min RT Inkubation. Zwei Mal mit PBS spülen mit jeweils 5 min Einwirkzeit. Dabei Platte vorsichtig schwenken.

Schritt 3 4 Tropfen Horse Serum in die Wells, 20 min Inkubation bei Raumtemperatur.

Schritt 4 Horse Serum entfernen, außer bei der Negativkontrolle.

Schritt 5 Antikörper-Lösung (primärer AK) mit PBS verdünnen. ER α -AK und Progesteron-AK werden 1 : 200 mit PBS verdünnt. ER β -AK werden 1 : 40 mit PBS verdünnt. 100 μ l der Antikörper-Verdünnung in die dafür vorgesehenen Wells pipettieren. 24 h Inkubation im Kühlschrank (bei + 8 °C).

Schritt 6 Überstand entfernen, 3 Mal mit PBS spülen.

Schritt 7 200 μ l des sekundären Antikörpers (ready to use) in die Wells geben, 30 min Inkubation bei Raumtemperatur, abschließend Überstand entfernen und 3 Mal mit PBS spülen.

Schritt 8 200 μ l LinRed in die Wells geben, 5 - 10 min Inkubation in Dunkelheit.

Schritt 9 LinRed verwerfen und Farbreaktion mit Leitungswasser (300 μ l/Well) abstoppen.

Schritt 10 Mikroskopische Analyse einschließlich Dokumentation.

2.5 Vorbereitung der Zellteste

2.5.1 Bestimmung der Lebendzellzahl

Bei allen Zelltesten fand eine 96-Well-Zellkultur-Testplatte Anwendung. Die verschiedenen Zellteste bedurften unterschiedlichen Zellkonzentrationen pro Well für ihre optimale Durchführung. Die Benutzung der Bürker-Zählkammer als Hilfsmittel erlaubte die genaue Bestimmung der Zellzahl.

Für die Zellzählung musste zunächst im Vorfeld eine Zell-Trypanblau-DMEM-Lösung angesetzt werden. Das Verhältnis hierbei war 1:1:20, also 20 μ l Trypanblau + 20 μ l Zellsuspension + 360 μ l DMEM-Medium. Die Pipettierung in beide Bürker-Zählkammern erfolgte luftblasenfrei mit je 10 μ l dieser Lösung. Unter dem Lichtmikroskop bei 100-facher Vergrößerung wurden die Zellen daraufhin gezählt. Geschädigte Zellen nehmen den Farbstoff Trypanblau durch Diffusion über ihre Zellmembran auf. Zellen mit intakter Zellmembran jedoch bleiben ungefärbt, so dass diese im Mikroskop von defekten Zellen unterscheidbar sind. Vorsicht war bei der Dauer der Zellzählung geboten, da bei längerer Einwirkzeit das Trypanblau zytotoxisch wirkt und daher die Zellzählung innerhalb von 5 min erfolgen muss.

Die Zellzahl lässt sich nach folgender Gleichung berechnen:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = Z \cdot VF \cdot V \cdot 10^4$$

Z = Mittelwert der Zellzahl aus 5 Quadraten

VF = Verdünnungsfaktor 20 (s.o.)

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

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

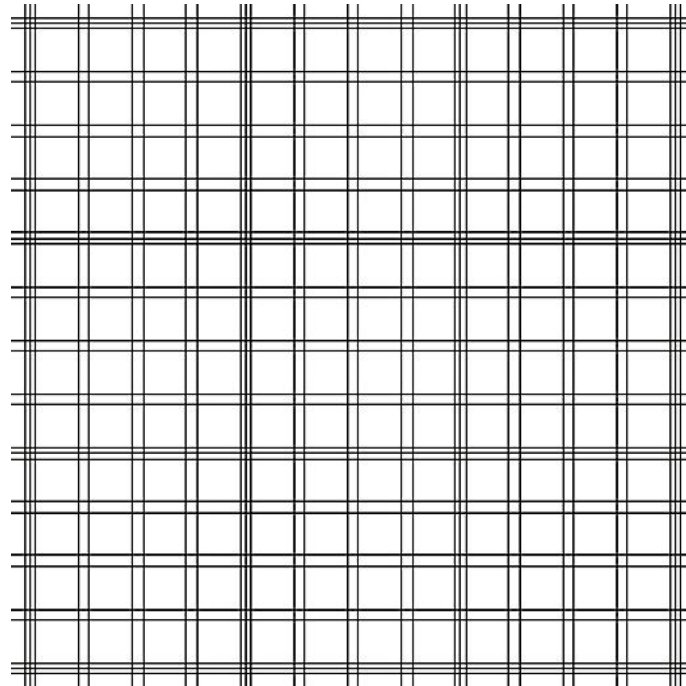


Abbildung 10: Zählnetz der Bürker-Zählkammer (Quelle: aufgerufen 11.03.2021 von <https://www.carlroth.com/at/de/zaehlkammern/zaehlkammer-buerker-linien-dunkel/p/-t730.1>).

Die neue Stammlösung (Zellzahl / ml) musste nun so weit verdünnt werden, dass sie nach Aussaat in die Wellplatten die jeweilig verlangte Endkonzentration der einzelnen Teste entsprach (Tabelle 4). Die ausgesäte Zellsuspension inkubiert für 24 h im Brutschrank. Dabei werden die Zellen adhärent und differenzieren aus.

Tabelle 4: Zelltest mit jeweiligem Zielvolumen und Zellmenge

| Zelltest | Zielvolumen und Zellmenge |
|----------------------------|--|
| CellTiter-Glo [®] | 50 µl Zielvolumen pro Well mit 600.000 Zellen / ml |
| CytoTox-Glo [™] | 100 µl Zielvolumen mit 300.000 Zellen / ml |
| BrdU | 100 µl Zielvolumen mit 300.000 Zellen / ml |
| Neutralrot | Test : 100 µl Zielvolumen mit 400.000 Zellen / ml |

2.6 HPLC

2.6.1 Funktionsweise der HPLC

Die *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) ist ein analytisches Verfahren, um Moleküle qualitativ und quantitativ zu untersuchen. Die HPLC stellt einen Trennprozess dar, bei welchem die zu untersuchende Probe in einer flüssigen (mobilen) Phase durch die Trennsäule

wandert. In der Säule befindet sich die stationäre Phase, ein unpolares C18-Kieselgel, das aus kleinen Teilchen mit unterschiedlicher Porengröße besteht. Mit Hilfe einer Pumpe wird die mobile Phase an dem Kieselgelbett vorbei geleitet, so dass die zu analysierenden Moleküle der mobilen Phase mit der stationären Phase in Wechselwirkung treten. Substanzen, die eine stärkere Affinität zur stationären Phase zeigen, verbleiben relativ lange am Säulenmaterial gebunden, wohingegen Substanzen mit einer Affinität zur mobilen Phase eher schneller hindurch wandern. Es entsteht ein sogenanntes Chromatogramm; ein Graph mit einem Signal auf der Ordinate (für die UV-Absorption) und einem Zeitwert (= Retentionszeit) auf der Abszisse. Jede Substanz hat als qualitatives Merkmal eine spezifische Retentionszeit, so dass bei der Auswertung des Chromatogramms unter Betrachtung der Retentionszeit Rückschluss auf die analysierte Substanz gezogen werden kann. Durch Vergleichen, bzw. Übereinanderlagern der Chromatogramme von verschiedenen Substraten und Extrakten, können Aussagen darüber getroffen werden, ob die betrachteten Substrate auch in den Extrakten enthalten sind.

Bei der Umkehrphasenchromatographie, wie sie bei der Analyse des Moringa-Extraktes genutzt wurde, ist die stationäre Phase relativ apolar, die mobile Phase relativ polar. Apolare Moleküle bleiben in den Poren der stationären Phase länger haften als polare, worauf schlussendlich der Trennvorgang beruht. Es entstehen unterschiedliche Peaks je nach Retentionszeiten, die dann bei der Auswertung verschiedenen Substanzen zugeordnet werden können [47].

2.6.2 Aufbau einer HPLC-Apparatur

In beiden Vorratsbehältern (A, Abbildung 11) befinden sich zwei unterschiedliche Laufmittel, die die mobile Phase bilden. Als Laufmittel werden die unterschiedlich stark polaren Lösungsmittel DMSO und Aqua dest. verwendet. Durch die Mischung von Aqua dest. und DMSO ergibt sich ein Elutionsgradient, der notwendig ist, um auch geringe Polaritätsunterschiede weiter differenzieren und auf dem Chromatogramm sichtbar unterscheiden zu können. DMSO verdrängt dabei als stärkstes organisches Lösungsmittel auch stark haftende Moleküle von der Säule. Zum Schutz der sensiblen Stahlsäule werden die Laufmittel DMSO mit 10 % Aqua dest. und Aqua dest. mit 10 % Methanol versetzt. In der Mischkammer (B, Abb. 11) wird das Verhältnis der beiden Laufmittel während eines Chromatogramms so verändert, dass die an die Säule gebundenen Probenmoleküle nach und nach abgelöst werden. Je polarer das Laufmittelgemisch ist, desto eher werden die polaren Probemoleküle von der stationären Phase gelöst und mitgeschwemmt. Über den Injektor (C, Abb. 11) werden manuell 20 µl der zu untersuchenden Substanz zur mobilen Phase hinzugefügt. Das Laufmittel samt Probensubstanz fließt nun, durch eine Pumpe (B, Abb. 11) getrieben, weiter und trifft auf die stationäre Phase, die HPLC-Säule (D, Abb. 11). Dort wechselwirken die Moleküle der zu untersuchenden Substanz aufgrund ihrer Polarität mittels Van-der-Waals-Kräfte unterschiedlich stark mit der stationären Phase, der C18-Säule. Apolare Stoffe verharren länger an der Säule, wohingegen polare Stoffe mit den Eluenten wechselwirken und dadurch mitgeschwemmt werden. Der Laufmittelstrom gelangt schließlich am Detektor (E, Abb. 11) vorbei, der die unterschiedlichen Zeitpunkte beim Eintreffen der Moleküle nach Durchlaufen der Säule (Retentionszeiten) detektiert. Polare Stoffe, die mit den Laufmitteln mitgeschwemmt

werden, erscheinen früher als Peak als jene Stoffe, die mit der Säule wechselwirken. Mit Hilfe eines Computerprogramms (F, Abb. 11) wird das Chromatogramm graphisch dargestellt. Nach Passieren des Detektors fließt das Laufmittel weiter in einen Abfallkanister (G, Abb. 11) [93].

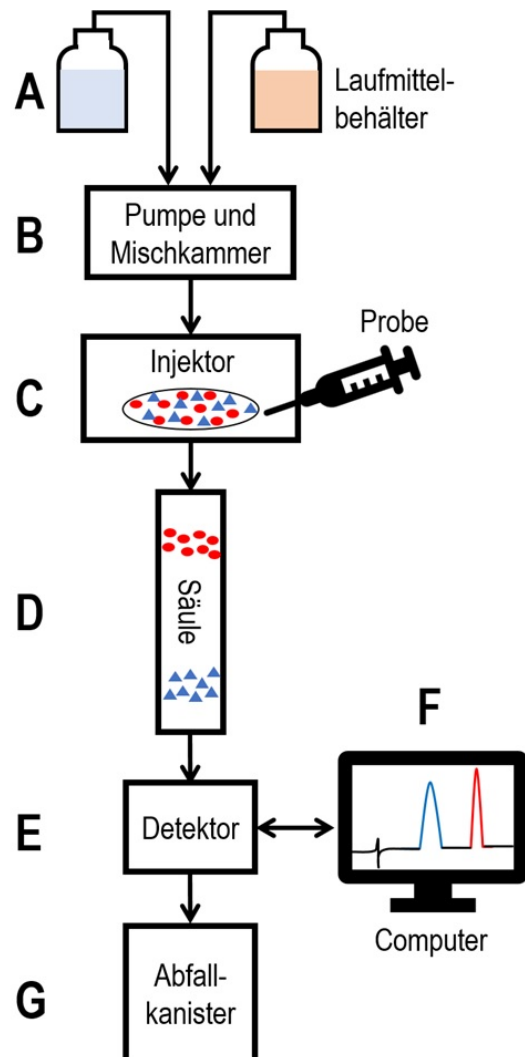


Abbildung 11: Aufbau einer HPLC-Apparatur. Gezeigt sind die chronologischen Schritte und die dafür benötigten Materialien und Geräte: Laufmittelbehälter, Pumpe und Mischkammer, Injektor und Pumpe, C18-Säule, Detektor und Computerprogramm sowie Abfallbehälter; *Quelle: aufgerufen 12.03.2021 von <https://mpl.loesungsfabrik.de/blog/hplc/hplc-anlage-einfach-erklart>*).

2.7 Zellteste

Den Hauptteil dieser Arbeit umfasst die Ausführung der verschiedenen Zellteste an den beiden Endometriumkarzinom-Zellreihen. Durch die Durchführung der Teste und den dadurch erlangten Ergebnissen können Rückschlüsse auf die Wirksamkeit von Moringa und den einzelnen Flavonoiden gezogen werden, ebenso kann die Aussagekraft der Ergebnisse durch die Kontrollen (Endoxifen, Tamoxifen und Estradiol) überprüft werden. Es ist wichtig, dass die einzelnen Zellteste auf unterschiedliche Funktionsweise die Viabilität der Zellen prüfen, um eine stärkere Aussagekraft der Ergebnisse zu erhalten und mögliche Fehlerquellen zu entdecken und um zu vermeiden, dass diese als eigenständige Ergebnisse gewertet werden. Verschiedene, nicht

beeinflussbare Umweltbedingungen könnten eine proliferierende oder hemmende Wirkung auf das Zellwachstum ausüben. Um dies auszuschließen, werden die Zellteste in Mehrfachbestimmung durchgeführt und an verschiedenen Tagen wiederholt. Bei den hier beschriebenen Experimenten arbeitete ich mit dem CellTiter-Glo[®] Test und dem CytoTox-Glo[™] Test der Firma Promega, dem BrdU-Immunoassay Test der Firma Roche und dem Neutralrottest der Firma Sigma-Aldrich.

2.7.1 CellTiter-Glo[®] Test

Der CellTiter-Glo[®] Test der Firma Promega misst die Anzahl der lebenden Zellen innerhalb einer Zellkultur anhand des ATP-Aufkommens. Zellen müssen stetig ATP zur Energiegewinnung produzieren. Demnach spricht ein hoher quantitativer Nachweis von ATP innerhalb einer Zellkultur dafür, dass viele Zellen metabolisch aktiv sind. Ein Mangel an ATP zeigt dagegen, dass sich vermehrt leblose Zellen in der Zellkultur befinden. Beim CellTiter-Glo[®] Test wird ein Substrat, sogenanntes Luciferin, zu den Zellen in die Wells gegeben, das zur Lyse der Zellen führt und mit dem vorhandenen ATP reagiert. Das Enzym Luciferase katalysiert dabei die Reaktion des Luciferins mit ATP. Es entsteht neben den Umsatzprodukten Licht, welches messbar und in direktem quantitativen Zusammenhang mit dem umgesetzten ATP steht [115]. Die Messung der erzeugten Reaktion des Luciferins mit ATP erfolgte im GloMax[®] Discover Microplate Reader bei einer Wellenlängen-Spannweite von 350 bis 700 nm.

CellTiter Formelgleichung:



Procedere

Schritt 1 Zellaussaat von 50 μl (300.000 Zellen/ml) auf eine 96-Wellplatte. Inkubation im Inkubator für 24 h bei physiologischen Bedingungen (37 °C, 5,0 % CO₂ und wasserdampfgesättigte Atmosphäre).

Schritt 2 Hinzugabe der Extrakte (0,5 μl) in allen angesetzten Verdünnungen sowie der Referenzen und Kontroll-Lösungen. Inkubation für 24 h unter physiologischen Bedingungen (s.o.).

Schritt 3 CellTiter-Glo[®] Puffer und Substrat auftauen und vermengen.

Schritt 4 50 μl der CellTiter-Glo[®] Reagenz in jedes Well pipettieren. Die Wellplatte für 2 min auf einen Plattenschüttler stellen, um Zellysis zu induzieren. Inkubation bei Raumtemperatur für 30 min zur Stabilisierung des Lumineszenzsignals.

Schritt 5 Den Inhalt jedes einzelnen Wells auf eine weiße Eppendorf Polypropylen Microplatte umpipettieren. Die weiße Eppendorf Microplatte eignet sich besonders gut für Lumi-

neszenzassays, da durch Reflektion die Signalintensität maximiert und aufgrund ihrer Lichtdurchlässigkeit ein „Crosstalk“ zwischen den Wells reduziert wird [149].

Schritt 6 Lumineszenz messen (Bei einer Wellenlänge von 350 - 700 nm).

2.7.2 CytoTox-Glo™ Test

Mit dem CytoTox-Glo™ Test der Firma Promega kann ein quantitativer Nachweis von leblosen Zellen innerhalb einer Zellkultur erbracht werden. Der Test misst die Aktivität einer *dead-cell-Protease*, die nur von Zellen freigegeben wird, die ihre Membranstabilität und -integrität durch Zelluntergang verloren haben. Durch Zugabe des Test-Substrats Alanyl-Alanyl-Phenylalanyl-Aminoluciferin (AAF-Glo™ Substrat) katalysiert diese Protease im 1. Teil des Tests die Abspaltung von Aminoluciferin. Im zweiten Teil reagiert das Aminoluciferin mit einer Luciferase und es entsteht messbares Licht, das in direktem quantitativen Zusammenhang mit der Protease aus Teil 1 und somit dem Zelluntergang steht (Abbildung 12) [116].

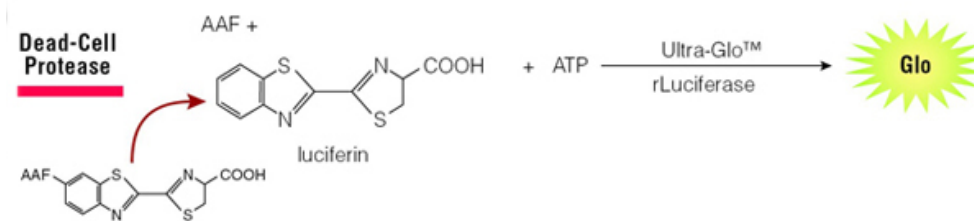


Abbildung 12: CytoTox Reaktion: *dead-cell-Protease* katalysiert die Abspaltung von Aminoluciferin von Alanyl-Alanyl-Phenylalanyl-Aminoluciferin. Aminoluciferin reagiert mit dem Enzym Luciferase, es entsteht messbares Licht [116].

Die Messung der erzeugten Reaktion der Luciferase mit Aminoluciferin erfolgte im GloMax® Discover Microplate Reader bei einer Wellenlängen-Spannweite von 350 bis 700 nm.

Procedere

Schritt 1 Zellaussaat von 100 µl (300.000 Zellen / ml) auf eine 96-Wellplatte. Inkubation im Inkubator für 24 h bei physiologischen Bedingungen (37 °C, 5,0 % CO₂ und wasserdampf-gesättigte Atmosphäre).

Schritt 2 Hinzugabe der Extrakte (1 µl) in allen angesetzten Verdünnungen sowie der Referenzen und Kontroll-Lösungen. Inkubation für 24 h unter physiologischen Bedingungen (s.o.).

Schritt 3 Zur Herstellung von Reagenz 1 *AAF-Glo™ Substrat* und Testpufferlösung bei RT auftauen und vermengen. Bei der Herstellung von Reagenz 2 mit Digitonin und Testpufferlösung gleich verfahren.

Schritt 4 50 µl der Reagenz 1 in jedes Well pipettieren. Die Wellplatte für 2 min auf einen Plattenschüttler stellen. Inkubation bei Raumtemperatur für 15 min.

Schritt 5 Den Inhalt jedes einzelnen Wells auf eine weiße Eppendorf Polypropylen Microplatte umpipettieren. Lumineszenz messen (Bei einer Wellenlänge von 350 - 700 nm).

Schritt 6 Zurückpipettieren jedes Wells auf die 96 - Wellplatte. 50 µl von Reagenz 2 in jedes Well pipettieren und für 2 min auf einen Plattenschüttler stellen. Inkubation bei Raumtemperatur für 15 min.

Schritt 7 Den Inhalt jedes einzelnen Wells erneut auf eine unbenutzte weiße Eppendorf Polypropylen Microplatte umpipettieren. Lumineszenz messen (Bei einer Wellenlänge von 350 - 700 nm).

Die Lumineszenz-Messung wertet Daten als „Relative Licht Einheiten“ (RLU) aus. Beim ersten Teil des Testdurchlaufs wird ein Gleichgewicht der dead-cell-Protease und der Luciferase nach etwa 15 min erreicht. Das gemessene Lumineszenz-Signal entspricht dann der Anzahl der toten Zellen (Initiales Zellysis-Signal). Im zweiten Part wird durch Zugabe von Digitonin eine vollständige Zellysis induziert, womit dann bei Lumineszenz-Messung die Gesamtheit aller Zellen, die sich in den Wells befanden, detektiert werden kann (Vollständiges Zellysis-Signal). Rückschluss auf den Anteil lebender Zellen, der sich vor Test-Substrat-Zugabe in den Wells befand, wird nach Subtraktion des initialen Zellysis-Signals vom vollständigen Zellysis-Signal erhalten.

Berechnung : Lichtsignal der lebenden Zellen = Vollständige Zellysis – Initiale Zellysis

2.7.3 BrdU Test

Mit dem BrdU-Immunoassay Test der Firma Roche kann das Proliferationsverhalten von Zellen quantitativ gemessen werden. Dabei wird während der Replikationsphase der vitalen Zellen das Pyrimidinanalogon BrdU (5-Bromo-2'-Desoxyuridin) anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut. Im weiteren Schritt wird die DNA mit Hilfe der Reagenz FixDenat denaturiert. Dadurch können spezielle Antikörper (Anti-BrdU-POD-Antikörper) an das freiliegende BrdU binden. Der nun entstandene BrdU-Antikörper-Komplex enthält eine Peroxidase, die bei Hinzugabe des Substrats Tetramethylbenzidin einen Farbumschlag der Lösungen in den Wells nach blau bewirkt. Die Intensität des Farbumschlags und somit die Menge an entstandenen BrdU-Antikörper-Komplexen können im ELISA-Reader kolorimetrisch ermittelt werden. Eine hohe Intensität deutet auf eine entsprechend hohe mitotische Aktivität der Zellen und somit Zellviabilität hin. Während des Testdurchlaufs werden vier Background-Wells erstellt, die nur mit Medium und Zellen und ohne jegliche Extrakte oder Referenzen befüllt werden und auch keine BrdU-Reagenz erhalten. Die Background-Wells sollen Informationen über die unspezifische Bindung des Anti-BrdU-POD-Antikörpers liefern. Demnach würde ein Farbumschlag bzw. der kolorimetrische Nachweis von BrdU-Antikörper-Komplexen in diesen Background-Wells dazu führen, dass der Testdurchlauf nicht aussagekräftig und auswertbar ist [121].

Procedere

Schritt 1 Zellaussaat von 100 µl (300.000 Zellen / ml) auf eine 96-Wellplatte. Inkubation im Inkubator für 24 h bei physiologischen Bedingungen (37 °C, 5,0 % CO₂ und wasserdampfgesättigte Atmosphäre).

Schritt 2 Hinzugabe der Extrakte (1 µl) in allen angesetzten Verdünnungen sowie der Referenzen und Kontroll-Lösungen. Inkubation für 24 h unter physiologischen Bedingungen (s.o.).

Schritt 3 BrdU-Reagenz mit Medium im Verhältnis 1:100 unter sterilen Kautelen ansetzen und 10 µl in jedes Well pipettieren. Inkubation für 3 h unter physiologischen Bedingungen (s.o.). Den Überstand dekantieren und 200 µl FixDenat hinzufügen. Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur.

Schritt 4 Überstand dekantieren durch kräftiges Ausklopfen der Wellplatten auf Zellstofftücher, so dass keine Luftblasen mehr erkennbar sind. Den in 1,1 ml Aquabidest. gelösten Anti-BrdU-POD-Antikörper mit Antibody-dilution-solutionn 1:100 verdünnen. Je 100 µl der eben hergestellten Antikörperlösung in jedes Well pipettieren. Inkubation für 60 min bei Raumtemperatur.

Schritt 5 Erneut den Überstand dekantieren durch kräftiges Ausklopfen der Wellplatten auf Zellstofftücher, bis keine Luftblasen mehr zu erkennen sind. Waschlösung herstellen durch Verdünnen des Wasch-Puffer-Konzentrats mit Aquabidest. im Verhältnis 1:10. Je 200 µl der Waschlösung in die Wells geben und wieder entfernen. Der Waschvorgang wird insgesamt drei Mal durchgeführt.

Schritt 6 In die gewaschenen und flüssigkeitsleeren Wells je 100 µl Substratlösung geben. Inkubation bei Raumtemperatur für 5 bis 20 min, bis blauer Farbumschlag sichtbar wird.

Schritt 7 Reaktionsstopp durch Zufügen von 25 µl 1M H₂SO₄ pro Well.

Schritt 8 Messung mittels ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 420 nm und einer Referenzlänge von 620 nm.

2.7.4 Neutralrottest

Der Neutralrottest der Firma Sigma-Aldrich bietet eine Aussage über die Zytotoxizität einer Substanz mit Hilfe des Farbstoffs Neutralrot. Vitale Zellen nehmen den leicht kationischen Farbstoff Neutralrot (ungeladen bei pH 7,4) durch Diffusion auf. Der Farbstoff bindet dann an einen anionischen Rest der lysosomalen Matrix. Im sauren Milieu, wie er in Lysosomen gegeben ist (pH < 5), ionisiert der Farbstoff, färbt sich rot und kann aufgrund seiner Ladung nicht mehr die lysosomale Membran durchqueren („Ionenfalle“). Geschädigte Zellen haben die Fähigkeit verloren, Neutralrot aufzunehmen und zu binden, so dass diese Zelle nicht angefärbt werden. Nachdem vitale Zellen den Farbstoff aufgenommen haben, werden sie mit einer Pufferlösung

gewaschen, um überschüssigen Farbstoff, der nicht aufgenommen wurde, zu entfernen. Nach dem Waschvorgang wird der von vitalen Zellen eingeschlossene Farbstoff durch die „Neutral Red Assay Solubilization Solution“ gelöst. Die Menge an ionisiertem, rotem Farbstoff ist nun mittels ELISA-Reader quantifizierbar [133].

Procedere

Schritt 1 Zellaussaat von 100 µl (300.000 Zellen / ml) auf eine 96-Wellplatte. Inkubation im Inkubator für 24 h bei physiologischen Bedingungen (37 °C, 5,0 % CO₂ und wasserdampf-gesättigte Atmosphäre).

Schritt 2 Hinzugabe der Extrakte (1 µl) in allen angesetzten Verdünnungen sowie der Referenzen und Kontroll-Lösungen. Inkubation für 24 h unter physiologischen Bedingungen (s.o.).

Schritt 3 Neues Medium ansetzen. Dafür zusatzfreies Medium auf einen pH-Wert von 7,2 durch schrittweise Zugabe von HCl bringen. 3 % des Medium-Volumens „Neutral Red Solution“ hinzugeben.

Schritt 4 Altes Medium mit der Vakuum-Absaugpumpe (Firma Carl Roth) aus den Wells absaugen und 100 µl des neu angesetzten Mediums in die Wells pipettieren. Inkubation im Inkubator unter physiologischen Bedingungen (s.o.) unter regelmäßiger Beobachtung. Nach 60 min erscheinen in den Wells mikroskopisch sichtbare kristallartige Strukturen. Nun rasch mit dem nächsten Schritt fortfahren.

Schritt 5 Absaugen der Waschlösung. Dann erfolgt ein einmaliges Waschen der Wells mit 200 µl PBS und erneutes Absaugen der Waschlösung.

Schritt 6 Zugabe von 100 µl „Neutral Red Solubilization Solution“ in jedes Well. Wellplatte für 15 min auf den Plattenschüttler stellen.

Schritt 7 Spectrophotometrische Messung mit dem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 570 nm und einer Referenzlänge von 655 nm.

2.7.5 Statistische Auswertung

Bei den Zelltesten wurden 3 x 4-fach, bzw. 4 x 4-fach Ansätze bestimmt. Dabei wurden auf der 96-Wellplatte jeweils 3, bzw. 4 Wells mit derselben Substanz angelegt. Es entstanden für jede Extrakt-Konzentration und jeden Referenzwert Mittelwerte. Von den resultierenden Mittelwerten konnte der Mittelwert des reinen Mediums, also der Hintergrundabsorbanz, subtrahiert werden. Es entstanden experimentelle Extinktionswerte, die dann im Verhältnis zur Negativkontrolle, also den darin gelösten Alkohol-Lösungen, gesetzt wurden. In Tabelle 5 finden sich die Negativkontrollen, die dem jeweiligen Extrakt und Referenzwert zugeordnet sind.

Formel zur Berechnung der Testergebnisse:

$$\text{Zellviabilität}[\%] = \frac{EW - HA}{NK - HA} \cdot 100$$

EW: Mittelwert der experimentellen Werte

HA: Mittelwert der Hintergrundabsorbanz (reines Medium)

NK: Mittelwert der Negativkontrolle

Tabelle 5: Substanz und jeweiliges Lösungsmittel

| Substanz | Lösungsmittel |
|---|-------------------------------|
| Ethanol-Extrakt | 70 %iges EtOH |
| Quercetin, Kämpferol, Isorhamnetin, Rutin | 99 %iges EtOH / 50 %iges DMSO |
| Folsäure, Endoxifen, Tamoxifen, Estradiol | 99 %iges EtOH |

Die statistische Auswertung der Zellteste (CellTiter-Glo[®], CytoTox-Glo[™], BrdU, Neutralrot-Test) wurde mit OpenOffice Calc 2015 und der funktionalen Programmiersprache R durchgeführt. Die Normalverteilung wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test überprüft, die Varianzhomogenität mit dem Levene-Test. Anschließend wurden einfaktorielle Varianzanalysen (Welch-ANOVA) berechnet und mit Post-Hoc-Tests (Games-Howell) Paarvergleiche angestellt. Dadurch konnte spezifischer analysiert werden, ob zwischen der untersuchten Substanz und der Negativkontrolle ein signifikanter Unterschied besteht. Das Signifikanzniveau wurde hierbei auf $p = 0,05$ festgelegt.

2.7.6 Messung der Glucose-, Laktat und pH-Werte

Vitale Zellen haben durch ihren natürlichen Metabolismus einen gewissen Energiebedarf. Dieser Energiebedarf kann aerob durch die Glykolyse und anaerob durch die Umwandlung von Pyruvat in Laktat gedeckt werden. Bei beiden Stoffwechselwegen entsteht ATP, das den Zellen als Energielieferant zur Verfügung steht [118]. Zellen mit einem besonders hohen Metabolismus, wie er bei malignen Tumorzellen zu finden ist, haben einen entsprechend hohen ATP-Bedarf [51]. Durch die in hohen Maßen betriebenen aeroben Glykolyse reichert sich Laktat an und der pH-Wert sinkt [119]. Geschädigte und tote Zellen können wenig bis keine Glucose aktiv über Transporter aufnehmen, wodurch die extrazelluläre Glucosekonzentration ansteigt. Stoffwechselwege wie die Glykolyse werden nicht mehr betrieben und es fallen keine Stoffwechselprodukte wie Laktat an. Das umgebende Milieu wird basisch. Die extrazelluläre Glucoseakkumulation, die sinkende Laktatkonzentration und der pH-Wert sind dementsprechend Messwerte für Zellviabilität und -vitalität [28]. Aus diesem Grund wurden die Zellen für 24 Stunden unter Einwirkung des Moringa-Extraktes und der Kontroll-Lösungen inkubiert. Aus den Wells wurde je 20 μl Überstand abpipettiert und dem Analysiergerät für Glucose der Firma Biosen zugeführt. Das Gerät detektiert einen Farbstoff, der bei der enzymatischen Glucoseumwandlung freigesetzt wird.

Der pH-Wert wurde über die pH-Elektrode ORION 3 Star[™]pH Benchtop (Fa. Thermo Scientific) ermittelt.

Das Prinzip der Laktat-Messung entspricht einem enzymatischen Farbttest. Laktat wird durch die Laktatoxidase (LOD) zur Pyruvat und Wasserstoffperoxid oxidiert. Eine Peroxidase (POD) katalysiert die Reaktion des entstandenen Wasserstoffperoxids und es entsteht ein farbiges Produkt. Die ursprüngliche Laktatkonzentration ist der Farbzunahme proportional. Die Untersuchung der Laktatkonzentration erfolgte im Systemkalibrator der Firma Beckman Coulter.

Procedere

Schritt 1 Zellaussaat von 100 µl (300.000 Zellen / ml) auf eine 96-Wellplatte. Inkubation im Inkubator für 24 h bei physiologischen Bedingungen (37 °C, 5,0 % CO₂ und wasserdampf-gesättigte Atmosphäre).

Schritt 2 Hinzugabe der Extrakte (1 µl) in allen angesetzten Verdünnungen sowie der Referenzen und Kontroll-Lösungen. Inkubation für 24 h unter physiologischen Bedingungen (s.o.).

Schritt 3 20 µl Überstand zu 1 ml Pufferlösung (spezielle Glucose-Systemlösung der Firma Biosen) hinzugegen und Untersuchung im Biosen Glucose-Analyzer.

Schritt 4 Restvolumen in den Wells in einzelne 1 ml Eppendorf-Gefäße sammeln und mit pH-Elektrode ORION 3 Star™ pH Benchtop den pH-Wert ermitteln.

Schritt 5 Laktatmessung mit der Reagenz und dem Systemkalibrator der Firma Beckman Coulter.

2.8 Geräte, Materialien und Chemikalien

Tabelle 6: Geräte und Software

| Geräte und Software | Hersteller |
|--|---|
| Waage Sartorius Basic | Sartorius AG (<i>Deutschland</i>) |
| Zentrifuge Universal 320R | Hettich (<i>Deutschland</i>) |
| Zentrifuge Biofuge pico | Heraeus Instruments (<i>Deutschland</i>) |
| Vakuum-Konzentrator-Zentrifuge Concentrator 5301 | Eppendorf (<i>Deutschland</i>) |
| La moulinette Zerkleinerer | Moulinex (<i>Frankreich</i>) |
| Discover SP Mikrowelle | CEM GmbH (<i>Deutschland</i>) |
| Ultraschallbad Emmi-H 22 | EMGG (<i>Deutschland</i>) |
| High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Smartline | Knauer (<i>Deutschland</i>) |
| ProntoSIL 100-5 KromaPlus C18 HPLC Säule | Bischoff Chromatography (<i>Deutschland</i>) |
| HPLC-Software ClarityChrom V 2.6. | Knauer (<i>Deutschland</i>) |
| Brutschrank Function Line | Heraeus Instruments (<i>Deutschland</i>) |
| Gefrierschrank Herafreeze | Heraeus Instruments (<i>Deutschland</i>) |
| Vortex-Genie™ 1 Touch Mixer | Scientific Industries (<i>USA</i>) |
| 96-Well-Zellkultur-Platte (transparent) | Greiner bio-one GmbH (<i>Deutschland</i>) |
| 96-Well-Zellkultur-Platte (weiß) | Promega (<i>USA</i>) |
| 24-Well-Zellkultur-Platte (transparent) | TPP (Techno Plastic Products AG) (<i>Schweiz</i>) |
| Bürker-Zählkammer | |
| Zentrifugationsröhrchen, Zellkulturflaschen (50ml, 250ml, 500ml) | Greiner bio-one GmbH (<i>Deutschland</i>) |
| Mikroskop Axiostar Plus | Zeiss (<i>Deutschland</i>) |
| Mikroskop Kamera | Zeiss (<i>Deutschland</i>) |
| Rollenmischer RM 5 | Hecht (<i>Deutschland</i>) |
| Microplate Reader Model 680 | Bio Rad (<i>USA</i>) |
| GloMax® Explorer Multimode Microplate Reader | Promega (<i>USA</i>) |

| | |
|--|---|
| Analysiergerät für Glucose (Biosen 5140) | EKF-Diagnostik (<i>Großbritannien</i>) |
| pH-Mess-Elektrode Orion 3 Star pH Benchtop | Thermo Scientific (<i>USA</i>) |
| R (Programmiersprache für statistische Berechnung) | R Core Team (<i>Österreich</i>) |
| TexMaker Version 5.0.4 | Entwickler: Pascal Brachet, Joël Amblard |
| Apache OpenOffice 4.1.2 | Apache Software Foundation (<i>USA</i>) |

Tabelle 7: Chemikalien

| Chemikalien | Ergänzung | Hersteller |
|--|--|---|
| Quercetin, Isorhamnetin, Rutin, Kämpferol, Folsäure, Tamoxifen, Endoxifen, Estradiol | | Sigma-Aldrich, Steinheim (<i>Deutschland</i>) |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | | Carl Roth, Karlsruhe (<i>Deutschland</i>) |
| Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM): mit Phenolrot und 10 % FKS | mit 4,5 g/l Glukose, 20 ml/l FKS, 2 ml/l Penicillin/Amphotericin B (250 µg/ml, 15 mg/l Phenolrot. Antiinfektiöse Zusätze: 1000 U/ml Penicillin + 10 mg/ml Streptomycin, Amphotericin B 250 µl/ml | c.c.pro GmbH, Oberdorla (<i>Deutschland</i>) |
| Ham's F12 + DMEM + Insulin | mit 10 % FKS, 2,5 mg Insulin (0,005 mg/ml), 2,5 ml Amphotericin B, 1 ml Penicillin | CC-Pro, Oberdorla (<i>Deutschland</i>) |
| Insulin (10 mg/ml in 25 mm Hepes) | 0,5 ml/500 ml | Sigma-Aldrich, Steinheim (<i>Deutschland</i>) |
| FKS | Fetales Kälberserum | c.c.pro GmbH, Oberdorla (<i>Deutschland</i>) |
| Amphotericin B | 250 µl/ml | c.c.pro GmbH, Oberdorla (<i>Deutschland</i>) |
| Trypsin | | c.c.pro GmbH, Oberdorla (<i>Deutschland</i>) |

| | | |
|---|--|---|
| Trypan Blau Solution | | Sigma-Aldrich, Steinheim (<i>Deutschland</i>) |
| PBS (phosphate buffered saline) | | Biochrom GmbH, Darmstadt (<i>Deutschland</i>) |
| Progesteron-Antikörper | PR antibody, IgG, unconjugated, Rabbit, Monoclonal | Biorbyt, Cambridge (<i>Großbritannien</i>) |
| Estrogen-Beta-Antikörper | Mouse IgG2a | BioLegend, San Diego (<i>USA</i>) |
| Estrogen-Alpha-Antikörper | Rabbit monoclonal IgG | Biorbyt, Cambridge (<i>Großbritannien</i>) |
| H₂O₂ | Wasserstoffperoxid 35 % | Carl Roth, Karlsruhe (<i>Deutschland</i>) |
| LinRed IHC | Substratkit für Peroxidase | Linaris, Dossenheim (<i>Deutschland</i>) |
| Impress Reagent Kit Peroxidase (IHC) | Anti-Mouse/Rabbit Ig MP-7500 (monoclonal), R.T.U. Normal Horse Serum (2,5 %) | Vector, Burlingame (<i>USA</i>) |
| pH-Puffer | | Thermo Scientific, Waltham (<i>USA</i>) |
| Ethanol 99 % | EtOH | Eigenherstellung |
| Methanol | MeOH | J.T. Baker, Deventer (<i>Niederlande</i>) |
| CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay | | Promega (<i>USA</i>) |
| CytoTox-Glo[™] Cytotoxicity Assay | | Promega (<i>USA</i>) |
| Cell Proliferation ELISA, BrdU (colometric) | | Roche GmbH (<i>Schweiz</i>) |
| Neutralrot-Test | | Sigma-Aldrich (<i>USA</i>) |

3 Ergebnisse

3.1 Immunhistochemie

Die immunhistochemische Untersuchung der Zellen zeigte das Vorhandensein von α - und β -Östrogenrezeptoren bei beiden Zelllinien (Abbildungen 13 und 14). Bei der Zelllinie Ishikawa reagierten zudem auch die Zellen, zu denen Progesteronrezeptor-Antikörper gegeben wurden, was das Vorhandensein von Progesteronrezeptoren beweist. Zur Kontrolle wurden in einem weiteren Well Zellen gesät, zu denen keine primären Rezeptor-Antikörper gegeben wurden. Das restliche Procedere wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Diese Negativkontrollen verblieben ohne Farbumschlag, weshalb von einer korrekten Testausführung ausgegangen werden konnte.

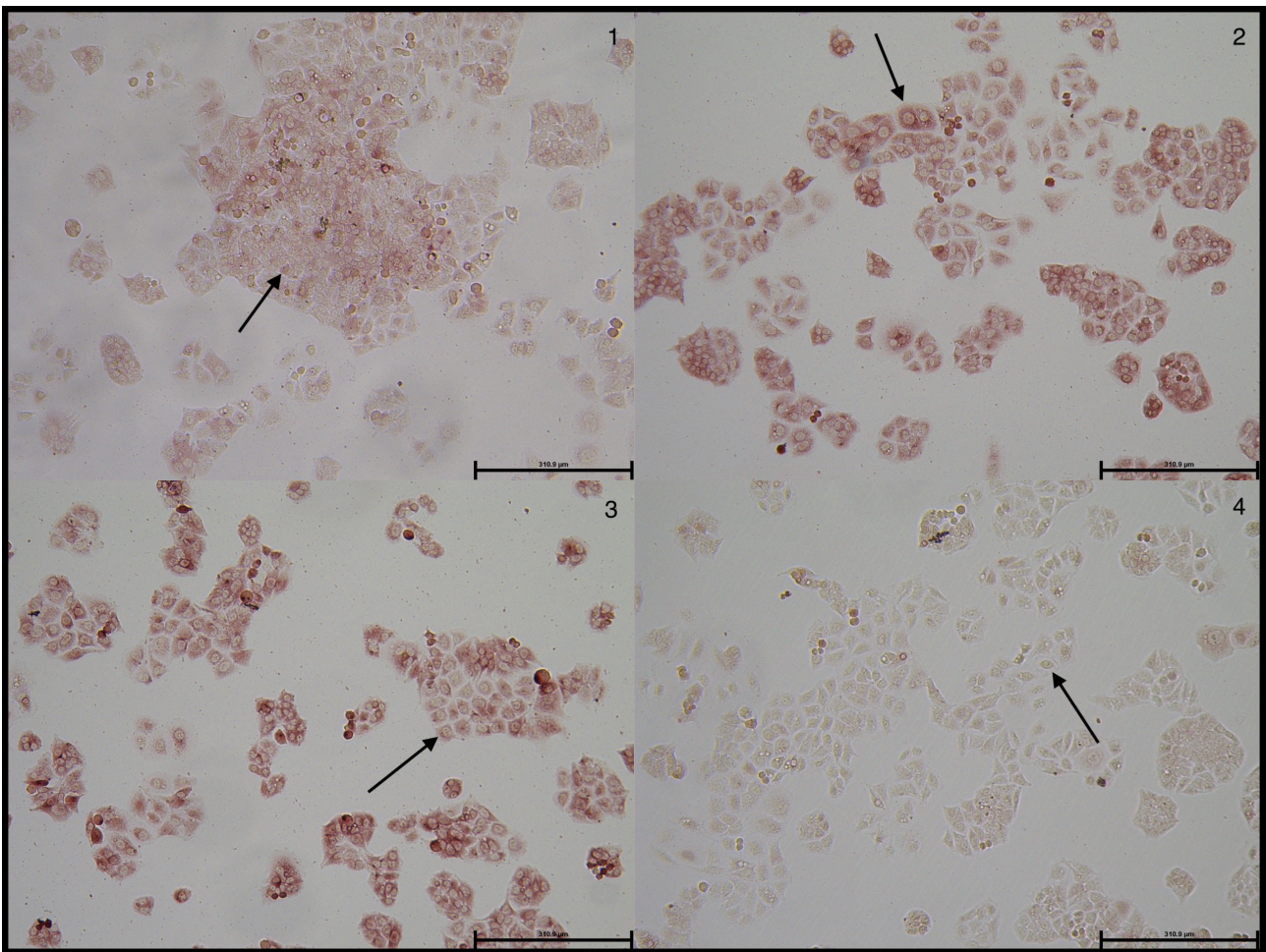


Abbildung 13: Immunhistochemie Ishikawa. Bild 1: α -Östrogenrezeptor positiv, Bild 2: β -Östrogenrezeptor positiv, Bild 3: Progesteronrezeptor positiv, Bild 4: Negativkontrolle. Maßstab entspricht 310,9 μm .

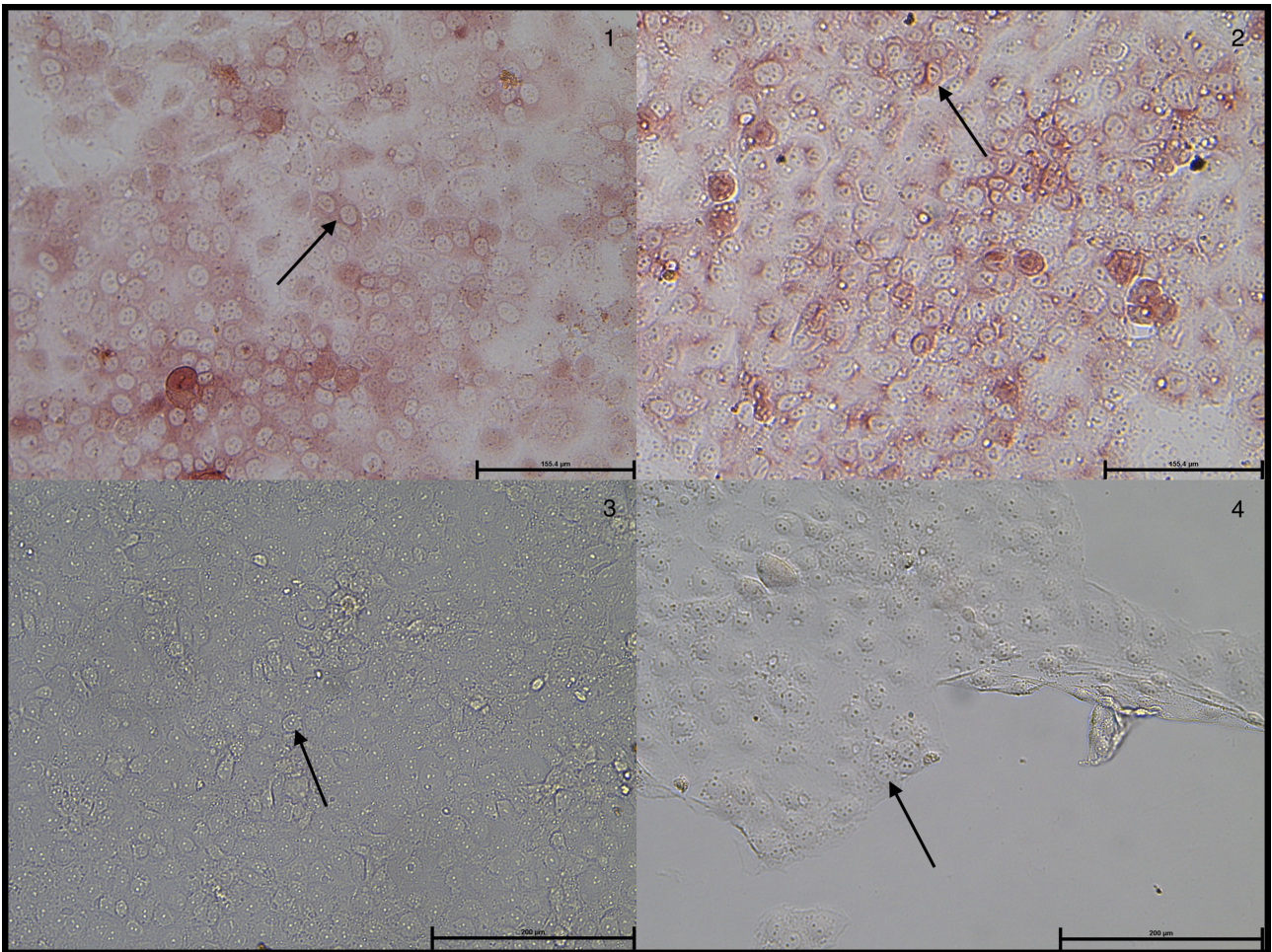


Abbildung 14: Immunhistochemie RL95-2. Bild 1: α -Östrogenrezeptor positiv, Bild 2: β -Östrogenrezeptor positiv, Bild 3: Progesteronrezeptor negativ, Bild 4: Negativkontrolle. Maßstab entspricht 155,4 μm (Bild 1 und 2) und 200 μm (Bild 3 und 4).

3.2 HPLC

Das Chromatogramm, das durch die HPLC entsteht, zeigt die UV-Absorption (AU = Absorbance Units) in Abhängigkeit zur Zeit. Unterschiedliche Moleküle wandern abhängig von ihrer Polarität unterschiedlich lange und erscheinen dadurch als einzelne Peaks auf dem Chromatogramm. Die Peakhöhe und -fläche ist zur Konzentration des Substrats proportional. Zur Bestimmung des Moringa-Extraktes auf seine Bestandteile wurde sowohl der Extrakt selbst, als auch bestimmte Referenzen, von denen bereits bekannt ist, dass sie Bestandteile von Moringa sind, mittels HPLC untersucht. Dazu gehören Quercetin, Isorhamnetin, Rutin, Kämpferol und Folsäure. Die Chromatogramme der Referenzen konnten dadurch mit dem des Moringa-Extraktes verglichen werden. Enthielt das Chromatogramm des Extraktes Peaks mit ähnlichen Absorptions-Zeiten wie diejeniger der einzelnen Referenzen, so konnte daraus geschlussfolgert werden, dass die entsprechenden Referenzen im hier untersuchten Moringa-Extrakt enthalten sind. Bei der Untersuchung des Moringa-Extraktes mittels High Performance Liquid Chromatography zeigten sich mehrere Peaks, die entsprechenden Referenzen zugeordnet werden konnten. Die einzelnen Chromatogramme sind in den Abbildungen 15 und 16 übereinandergelegt dargestellt.

Das Chromatogramm des Moringa-Extraktes ist blau dargestellt (Abbildungen 15 & 16). Der erste hohe Peak bei 2,7 min entspricht Folsäure, welches bei 2,6 min einen Peak zeigt. Nach 25,2 min erscheint ein Peak, der Rutin (Peak bei 25,1 min) zugeordnet werden kann. Quercetin zeigt nach 27,4 und 28,1 einen Peak, welcher sich zur gleichen Zeit auch beim Extrakt finden lässt. Weiterhin ist auf dem Chromatogramm des Extraktes nach 28,4 min ein Peak zu sehen, der Kämpferol entspricht (Peak bei 28,3 min) und nach 32 min einer, der Isorhamnetin zugeordnet werden kann (Peak bei 32,1 min).

Prof. Dr. Udo Jeschke, Leiter des interdisziplinären onkologischen Forschungslabors in Augsburg, hat die Ergebnisse der HPLC-Chromatogramme bestätigt. Dadurch konnte die Annahme, die genannten Referenzen seien Inhaltsstoffe des hier verwendeten Moringa-Extraktes, überprüft und gesichert werden.

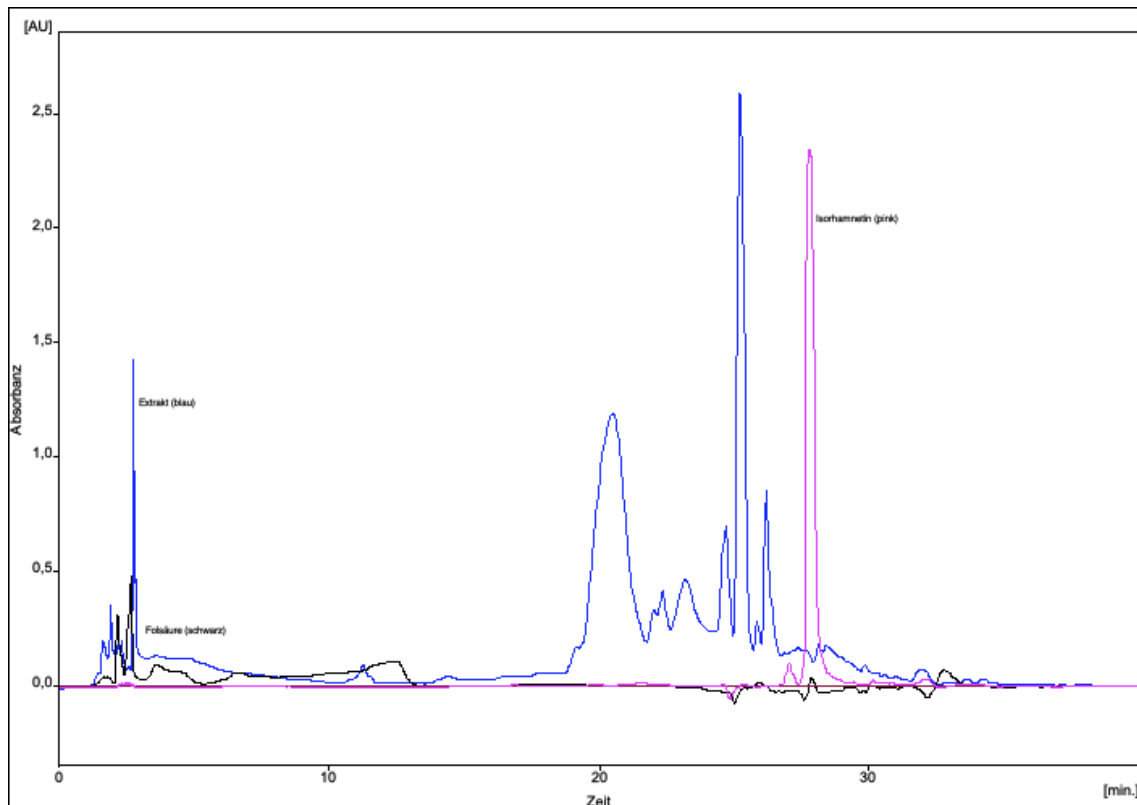


Abbildung 15: Chromatogramm des Extraktes (blau), Folsäure (schwarz) und Isorhamnetin (rosarot). Ordinate: Absorbance Units [AU], Abszisse: Zeit [min].

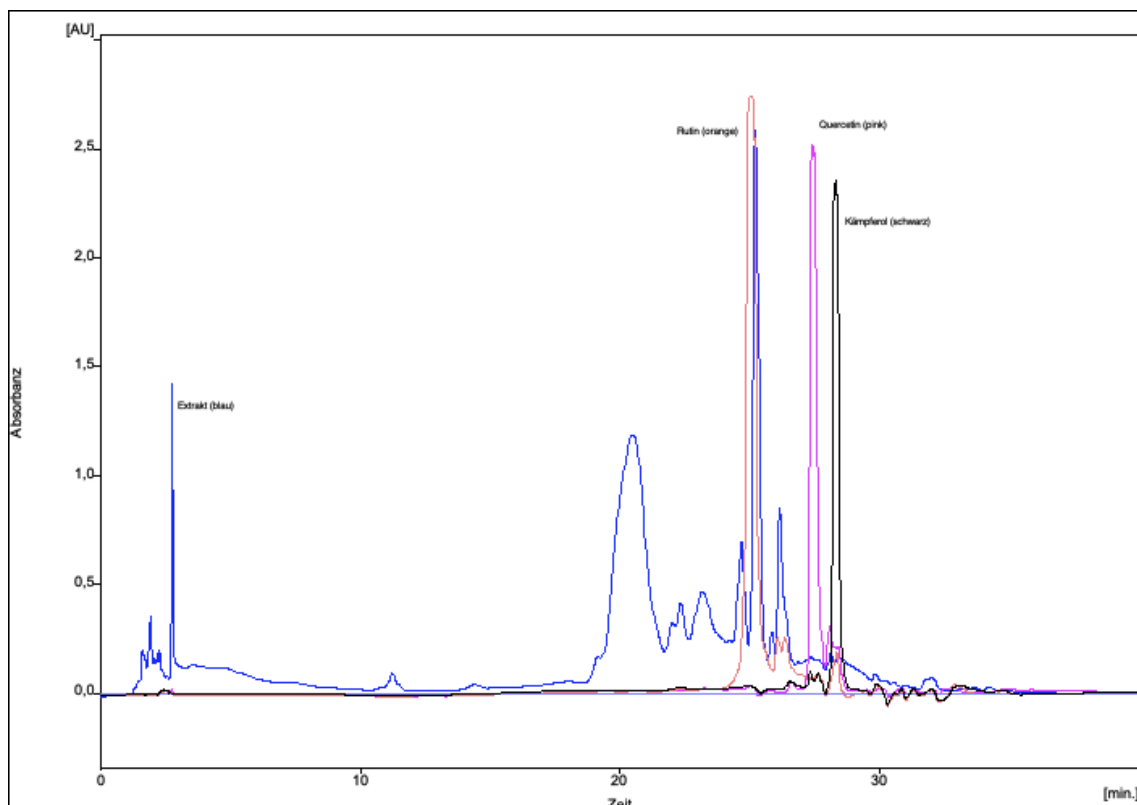


Abbildung 16: Chromatogramm des Extraktes (blau), Rutin (orange), Quercetin (rosarot) und Kämpferol (schwarz). Ordinate: Absorbance Units [AU], Abszisse: Zeit [min].

3.3 CellTiter-Glo[®] Test

Der CellTiter-Glo[®] Test diente der Bestimmung der Zellviabilität, also des Anteils lebender Zellen nach Einwirken des Moringa-Extraktes, der Referenzen und der Kontrollen in der Zellkultur. Der Test basiert auf der Messung von Licht, das durch die enzymatische Reaktion mit dem Enzym Luciferase freigesetzt wird und proportional zum ATP-Gehalt der Zellen ist. Tote Zellen weisen keinen ATP-Stoffwechsel mehr auf, so dass bei diesen Zellen kein Licht messbar ist.

Insgesamt zeichnete sich eine sinkende Zellviabilität bei höherer Extraktkonzentration ab (Abbildung 17). Bei beiden Zelllinien fand sich eine stark verminderte Zellviabilität bis einschließlich 7 %igem Extrakt mit Zellviabilitäten von 16,17 % bei Ishikawa und 5,43 % bei RL95-2. Signifikant war diese Aussage bei der Zelllinie Ishikawa bei den Extraktkonzentrationen 100 bis 10 ($p < 0,001$, $SD \pm 0,68$ bei 100 %, 2,02 bei 50 %, 4,91 bei 20 % und 9,5 bei 10 %).

Die Zelllinie RL95-2 zeigte sogar noch bis zum 2 %igen Extrakt eine verminderte Viabilität mit 37,85 % ($p < 0,001$ bei 10 % mit $SD \pm 3,3$, bei 9 % mit $SD \pm 3,09$, bei 9 % mit $SD \pm 2,51$, bei 7 % mit $SD \pm 1,04$, bei 4 % mit $SD \pm 1,29$ und bei 3 % mit $SD \pm 5,84$). Der 1 %ige Extrakt zeigte nur eine schwache, aber signifikante Hemmung mit einer Zellviabilität von 61,25 % auf ($p=0,042$ bei 1 % mit $SD \pm 22,5$).

Bei den Referenzen ist insgesamt eine weniger starke Viabilitäts-Senkung als bei den Extrakten beobachtet worden (Abbildung 18). Die Viabilitätswerte sanken nur bei Isorhamnetin (RL95-2) auf einen signifikanten Wert von 40,43 % ab ($p < 0,001$, $SD \pm 20,22$). Auch Kämpferol und Folsäure wiesen signifikante Wirkungen auf die Zellviabilität von RL95-2-Zellen auf ($p < 0,001$, $SD \pm 16,54$ bei Kämpferol, $p=0,009$, $SD \pm 11,81$ bei Folsäure), jedoch zeigten diese beiden Referenzen eine höhere Zellviabilität mit Werten über 100 %, dem Vergleichswert von reinen Zellen (Medium/Zellen) ohne Zugabe von Extrakt, Referenz oder Kontrolle.

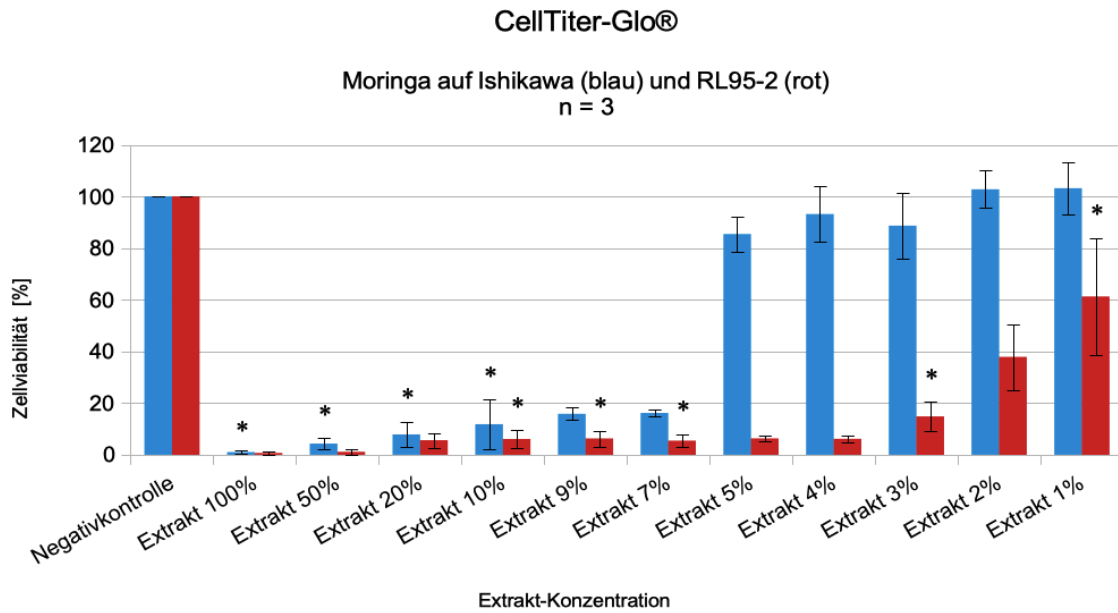


Abbildung 17: Zellviabilitätstest CellTiter-Glo®; Einfluss der Moringa-Extrakte auf Ishikawazellen (blau) und RL95-2-Zellen (rot). Dargestellt sind Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzen; * = signifikante Wirkung in Bezug auf Negativkontrolle (bei $p < 0,05$). Negativkontrollen sind die Wirkungen der Lösungsmittel der Testsubstanzen auf die Zellen (Moringa-Extrakte: 70 %iger Ethanol), n = Anzahl der Untersuchungen.

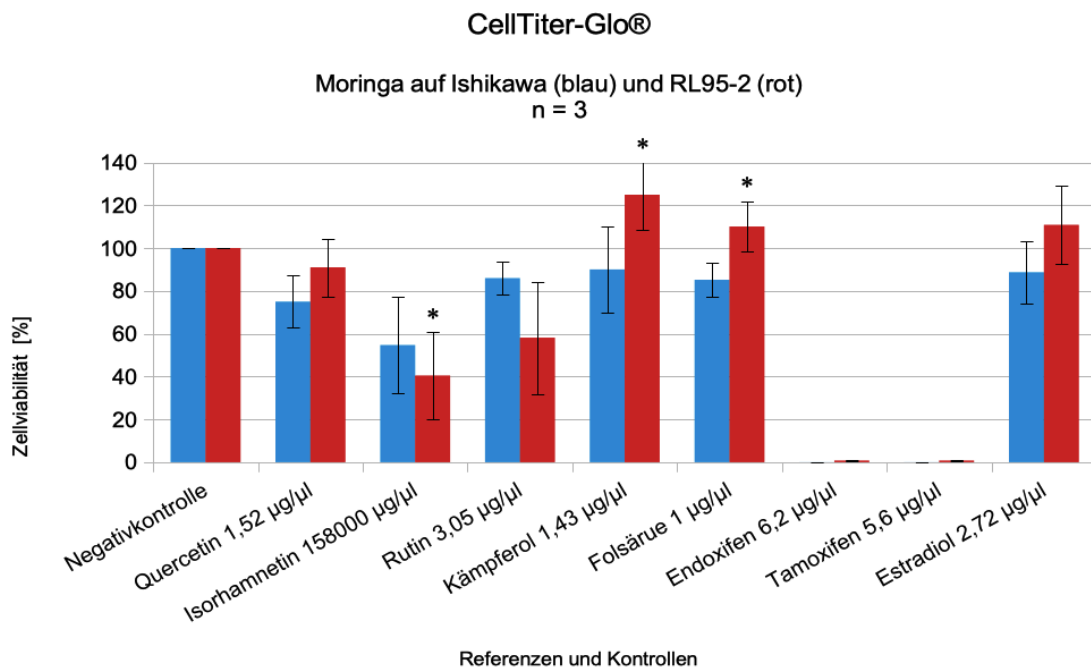


Abbildung 18: Zellviabilitätstest CellTiter-Glo®; Einfluss der Referenzen und Kontrollen auf Ishikawazellen (blau) und RL95-2-Zellen (rot). Dargestellt sind Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzen; * = signifikante Wirkung in Bezug auf Negativkontrolle (bei $p < 0,05$). Negativkontrollen sind die Wirkungen der Lösungsmittel der Testsubstanzen auf die Zellen, n = Anzahl der Untersuchungen.

3.4 CytoTox-Glo™ Test

Der Zelltest CytoTox-Glo™ trifft Aussagen über die zytotoxische Wirkung von Substanzen. Abgestorbene Zellen verlieren ihre Membranstabilität und -integrität, wodurch die sogenannte dead-cell-Protease frei wird, die mit dem Testsubstrat reagiert. Es entsteht messbares Licht, das in direktem quantitativen Zusammenhang mit dem Anteil untergegangener Zellen steht. Je mehr tote Zellen sich in der Zellkultur befinden, desto mehr Licht wird bei der Reaktion zwischen Testsubstrat und dead-cell-Protease frei und desto stärker das Lichtsignal. Für die Darstellung im Diagramm wurde dazu die übrig gebliebene Zellviabilität aufgetragen (Abbildungen 19 und 20).

Die Zelllinie Ishikawa zeigte bis einschließlich 5 %igem Extrakt eine zytotoxische Wirkung bis über 50 % (Zellviabilität beim 5 %igen Extrakt betrug 33,5 %). Signifikant war diese Wirkung bei Ishikawa bei Extrakten der Konzentrationen 100 % ($p=0,015$, $SD \pm 0,49$), 50 % ($p=0,016$, $SD \pm 0,93$), 20 % ($p=0,018$, $SD \pm 1,45$) und 10 % ($p=0,018$, $SD \pm 1,1$). Moringa hatte dagegen bei RL95-2 eine stärkere zytotoxische Wirkung bei den niedrig-konzentrierten Extrakten als bei Ishikawa mit signifikanten Werten bei den Konzentrationen 50 % ($p<0,001$, $SD \pm 0,43$), 20 % ($p<0,001$, $SD \pm 2,93$), 10 % ($p<0,001$, $SD \pm 2,28$), 9 % ($p<0,001$, $SD \pm 2,5$), 7 % ($p<0,001$, $SD \pm 2,26$), 4 % ($p<0,001$, $SD \pm 3,4$), 4 % ($p<0,001$, $SD \pm 4,04$) und 1 % ($p<0,001$, $SD \pm 18,23$). Die RL95-2-Zellen erreichten erst beim 1 %igen Extrakt eine Zellviabilität von über 50 % (62,65%).

Bei den Referenzen zeigte sich vor allem bei Quercetin, Isorhamnetin und Kämpferol eine signifikante zytotoxische Wirkung (Abb. 20). Die Zellen hatten unter Einwirkung von Quercetin eine Rest-Viabilität von 25,66 % bei Ishikawa ($p=0,026$, $SD \pm 9,12$) und 34,3 % bei RL95-2 ($p<0,001$, $SD \pm 12,82$). Unter Isorhamnetin blieb eine Rest-Viabilität von 8,78 % bei Ishikawa ($p=0,005$, $SD \pm 4,3$) und 12,38 % bei RL95-2 ($p<0,001$, $SD \pm 2,11$). Ähnlich niedrig war die Zellviabilität unter Kämpferol-Einwirkung bei 6,03 % bei Ishikawa ($p=0,004$, $SD \pm 2,67$) und 6,34 % ($p<0,001$, $SD \pm 1,76$) bei RL95-2. Folsäure zeigte keine bis geringe Zytotoxizität (Viabilität bei RL95-2: 95,6 %, $p=0,003$, $SD \pm 9,92$). Endoxifen und Tamoxifen hingegen erwiesen sich als deutlich zytotoxisch mit verbliebenen Zellviabilitäten von unter 1 % bei Ishikawa und 1,9 % bzw. 1,69 % bei RL95-2 (mit Signifikanzen bei Ishikawa von $p=0,004$, $SD \pm 2,39$ bei Endoxifen und $p=0,002$, $SD \pm 5,37$ bei Tamoxifen).

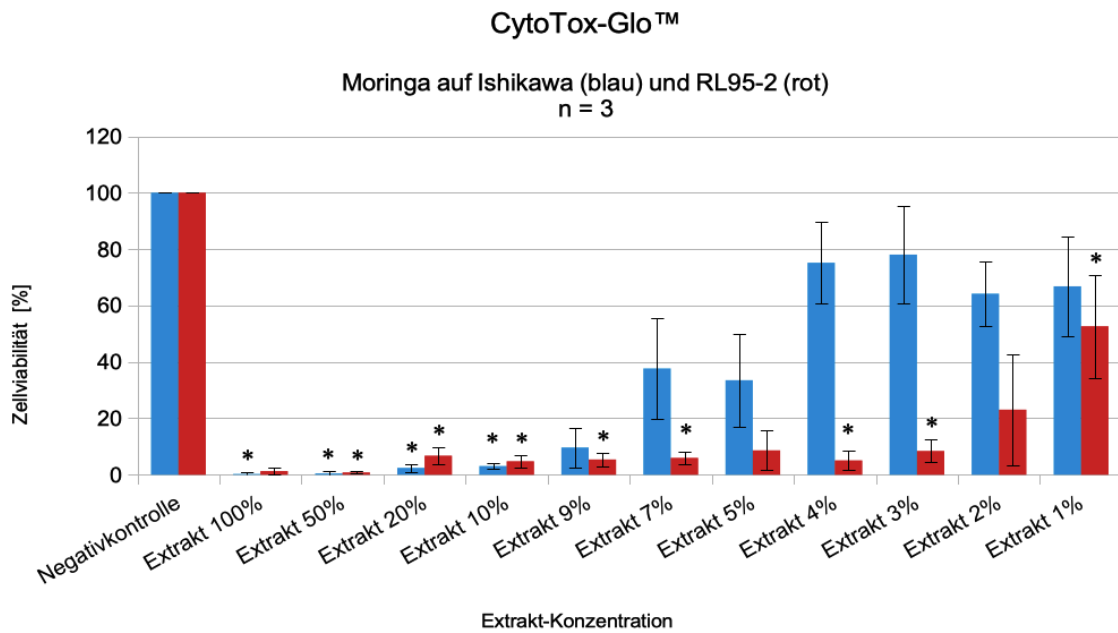


Abbildung 19: Zytotoxizitätstest CytoTox-Glo™ Einfluss der Moringa-Extrakte auf Ishikawazellen (blau) und RL95-2-Zellen (rot). Dargestellt sind Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzen; * = signifikante Wirkung in Bezug auf Negativkontrolle (bei $p < 0,05$). Negativkontrollen sind die Wirkungen der Lösungsmittel der Testsubstanzen auf die Zellen (Moringa-Extrakte: 70 %iger Ethanol), n = Anzahl der Untersuchungen.

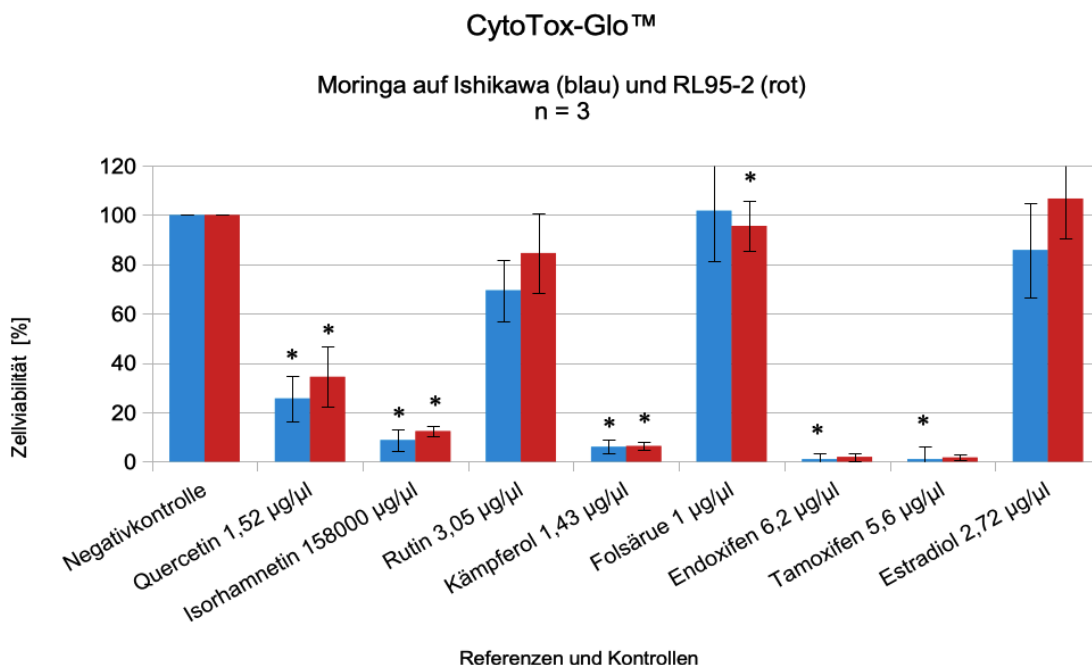


Abbildung 20: Zytotoxizitätstest CytoTox-Glo™ Einfluss der Referenzen und Kontrollen auf Ishikawazellen (blau) und RL95-2-Zellen (rot). Dargestellt sind Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzen; * = signifikante Wirkung in Bezug auf Negativkontrolle (bei $p < 0,05$). Negativkontrollen sind die Wirkungen der Lösungsmittel der Testsubstanzen auf die Zellen, n = Anzahl der Untersuchungen.

3.5 BrdU Test

Der Zelltest BrdU misst das Proliferationsverhalten von Zellen. Bei der Testdurchführung wird das Pyrimidinanalogon BrdU (5-Bromo-2'-Desoxyuridin) anstelle von Thymidin während der Replikationsphase der Zellen in die DNA eingebaut. Das BrdU reagiert über verschiedene Schritte mit den weiteren Testsubstraten, was zu einem Farbumschlag innerhalb der Wells führt, der mittels ELISA-Reader gemessen werden kann. Je stärker die Messabsorbanz in den Wells, desto stärker das Proliferationsverhalten der Zellen.

Auch in diesem Zelltest zeigte sich eine deutliche Wirkung des Moringa (Abbildung 21). Je stärker der Extrakt konzentriert war, desto stärker war die proliferationshemmende Wirkung auf die Krebszellen. Vor allem bei der Zellreihe RL95-2 zeigte sich diese Wirkung ab dem 50 %igen Extrakt signifikant. (Extrakt 50 %: $p < 0,001$, $SD \pm 3,81$; Extrakt 20 %: $p < 0,001$, $SD \pm 9,41$; Extrakt 10 %: $p < 0,001$, $SD \pm 11,0$; Extrakt 9 %: $p < 0,001$, $SD \pm 9,78$; Extrakt 7 %: $p < 0,001$, $SD \pm 6,79$; Extrakt 5 %: $p < 0,001$, $SD \pm 11,5$; Extrakt 4 %: $p < 0,001$, $SD \pm 12,93$; Extrakt 3 %: $p < 0,001$, $SD \pm 13,14$; Extrakt 2 %: $p < 0,001$, $SD \pm 9,27$; Extrakt 1 %: $p < 0,001$, $SD \pm 11,69$). Bei der Zellreihe Ishikawa wurde eine signifikante Wirkung beim 100 %igen Extrakt mit $p = 0,001$ und $SD \pm 9,96$, beim 50 %igen Extrakt mit $p = 0,002$ und $SD \pm 15,23$ und beim 20 %igen Extrakt mit $p = 0,006$ und $SD \pm 18,08$ sichtbar. Bei den Referenzen wurde keine deutliche Proliferationshemmung erkennbar (Abbildung 22). Die Werte wichen nur knapp vom Vergleichswert der Negativkontrolle (Medium/Zellen) ab. Die geringste Proliferation wurde bei Quercetin in den RL95-2-Zellen mit 69,54 % gemessen.

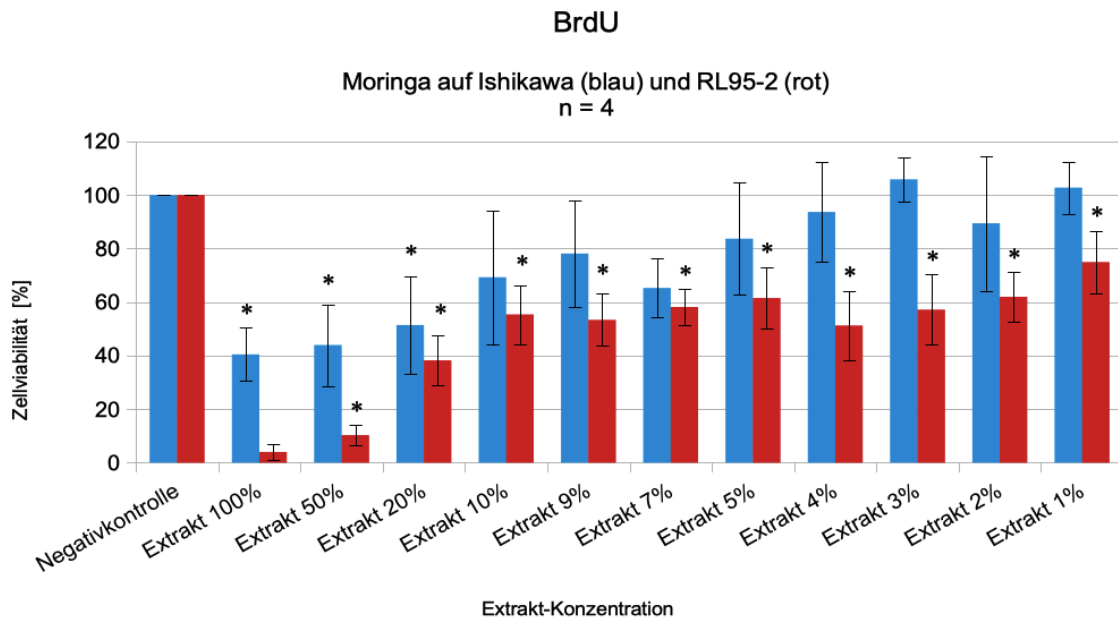


Abbildung 21: Brdu Test; Einfluss der Moringa-Extrakte auf das Proliferationsverhalten von Ishikawazellen (blau) und RL95-2-Zellen (rot). Dargestellt sind Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzen; * = signifikante Wirkung in Bezug auf Negativkontrolle (bei $p < 0,05$). Negativkontrollen sind die Wirkungen der Lösungsmittel der Testsubstanzen auf die Zellen (Moringa-Extrakte: 70 %iger Ethanol), n = Anzahl der Untersuchungen.

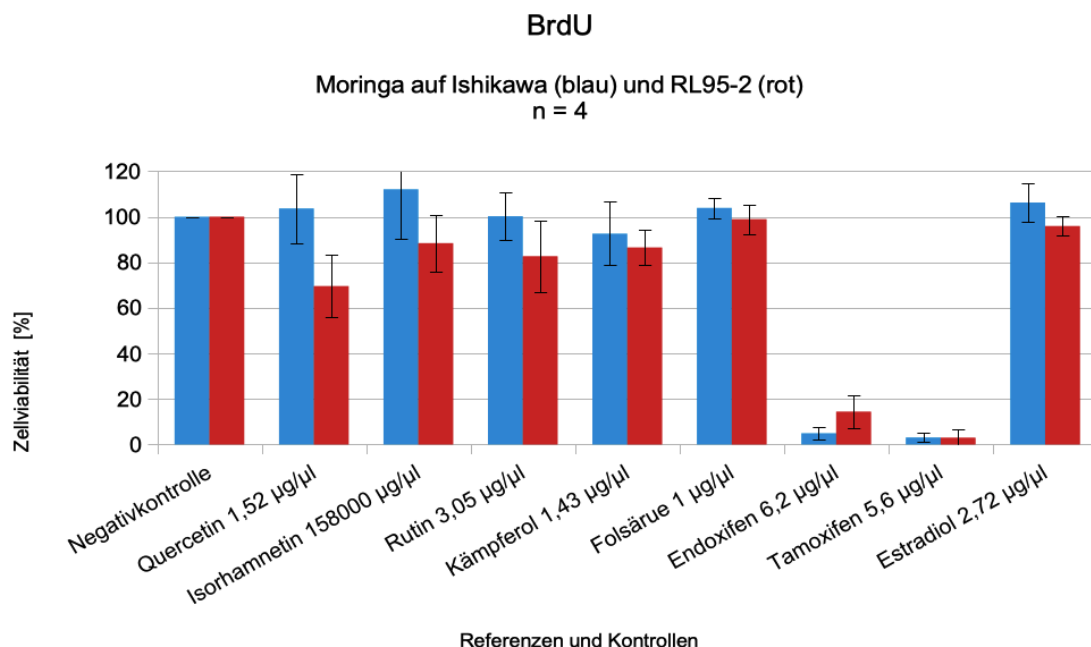


Abbildung 22: Brdu Test; Einfluss der Referenzen und Kontrollen auf das Proliferationsverhalten von Ishikawazellen (blau) und RL95-2-Zellen (rot). Dargestellt sind Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzen; * = signifikante Wirkung in Bezug auf Negativkontrolle (bei $p < 0,05$). Negativkontrollen sind die Wirkungen der Lösungsmittel der Testsubstanzen auf die Zellen, n = Anzahl der Untersuchungen.

3.6 Neutralrottest

Der Neutralrottest diente der Messung von Zytotoxizität. Bei diesem Zelltest wurde ein Farbstoff in die Wells gegeben, der aufgrund seiner kationischen Ladung durch Diffusion in lebende Zellen aufgenommen wurde und in den Lysosomen verblieb. Die Menge an aufgenommenem Farbstoff war mittels ELISA-Reader messbar. Je weniger Farbstoff gemessen wurde, desto weniger lebende Krebszellen befanden sich in den Wells.

Der Neutralrottest zeigte sich bei den zwei Zelllinien Ishikawa und RL95-2 unterschiedlich (Abbildungen 23 und 24). Nur die höher konzentrierten Moringa-Extrakte wirkten ähnlich stark zytotoxisch mit 1,18 % Zellviabilität bei Ishikawa ($p < 0,001$, $SD \pm 0,83$) und 0,84 % bei RL95-2 ($p < 0,001$, $SD \pm 0,13$) beim 100 %igen Extrakt, 0,93 % bei Ishikawa ($p < 0,001$, $SD \pm 0,29$) und 0,86 % bei RL95-2 ($p < 0,001$, $SD \pm 0,15$) beim 50 %igen Extrakt und 9,66 % bei Ishikawa ($p < 0,001$, $SD \pm 8,4$) und 0,9 % bei RL95-2. Ab dem 10 %igen Extrakt ging die Wirkung des Moringa-Extraktes auf die Zellen stark auseinander. Die Viabilität der Zelllinie Ishikawa stieg auf über 100 % mit Signifikanzen beim 10 %igen Extrakt mit 104,43 % ($p < 0,001$, $SD \pm 13,48$) und beim 3 %igen Extrakt mit 118,44 % ($p < 0,001$, $SD \pm 9,31$). Dahingegen verblieb die Zellviabilität der Zellreihe RL95-2 erniedrigt bis einschließlich 2 %igem Extrakt mit 31,13 % ($p < 0,001$, $SD \pm 11,18$) und stieg erst beim 1 %igen Extrakt auf einen Wert von 83,71 %.

Auch bei den Referenzen war ein deutlicher Unterschied in der Zellviabilität zwischen den Zellreihen zu erkennen. Die Ishikawa-Zellen stiegen mit ihrer Viabilität über den Wert der Negativkontrolle (Medium/Zellen) mit 101,12 % bei Quercetin ($p = 0,004$, $SD \pm 17,99$), 129,35 % bei Isorhamnetin ($p < 0,001$, $SD \pm 13,98$), 140,84 % bei Rutin ($p < 0,001$, $SD \pm 26,62$), 121,83 % bei Kämpferol ($p < 0,001$, $SD \pm 19,52$) und 105,98 % bei Folsäure ($p = 0,037$, $SD \pm 19,29$). Auch die Kontrollen mit Endoxifen und Tamoxifen zeigten sich bei Ishikawa signifikant mit je 0,98 % bei Endoxifen ($p < 0,001$, $SD \pm 0,04$) und 0,86 % bei Tamoxifen ($p < 0,001$, $SD \pm 0,16$). Bei RL95-2 sank vor allem die Viabilität bei Quercetin mit verbliebenen 46,91 %.

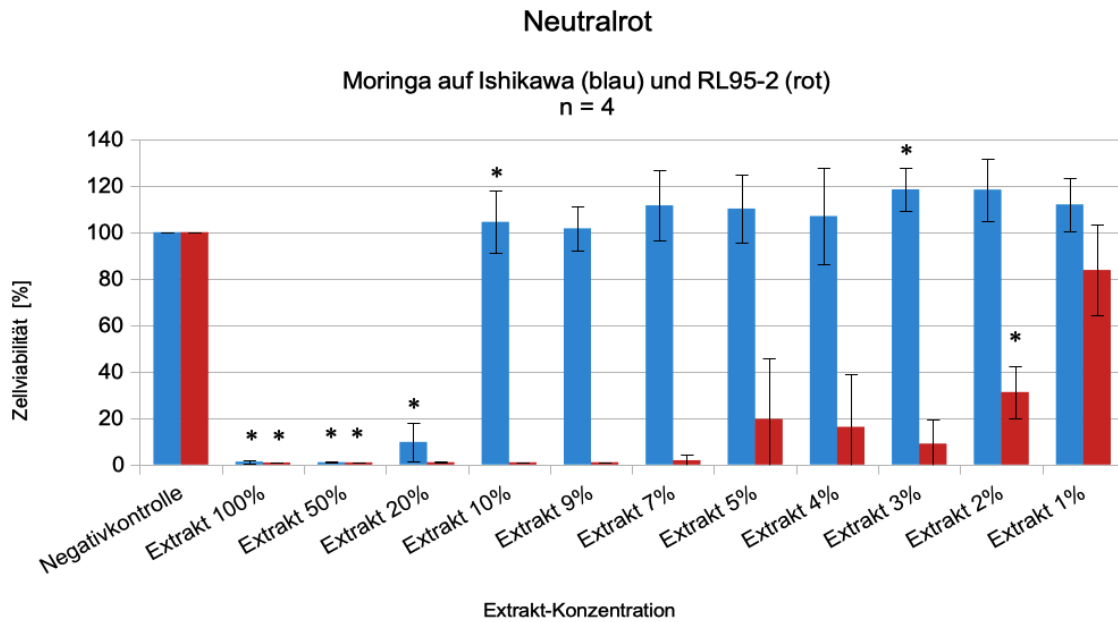


Abbildung 23: Zytotoxizitätstest Neutralrot; Einfluss der Moringa-Extrakte auf Ishikawazellen (blau) und RL95-2-Zellen (rot). Dargestellt sind Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzen; * = signifikante Wirkung in Bezug auf Negativkontrolle (bei $p < 0,05$). Negativkontrollen sind die Wirkungen der Lösungsmittel der Testsubstanzen auf die Zellen (Moringa-Extrakte: 70 %iger Ethanol), n = Anzahl der Untersuchungen.

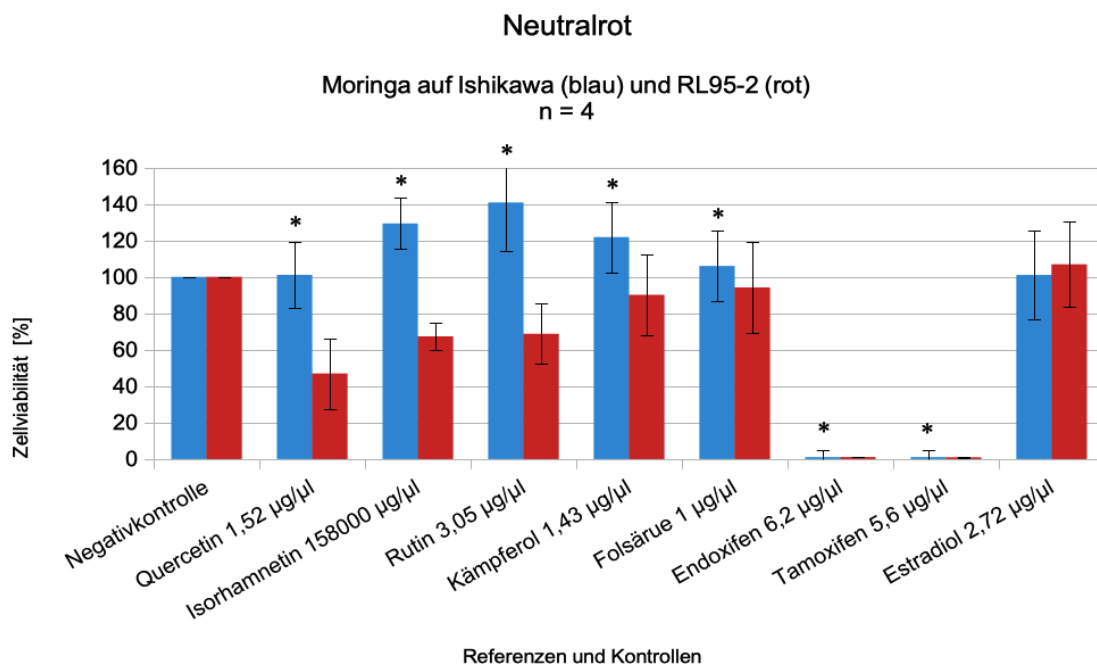


Abbildung 24: Zytotoxizitätstest Neutralrot; Einfluss der Referenzen und Kontrollen auf Ishikawazellen (blau) und RL95-2-Zellen (rot). Dargestellt sind Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzen; * = signifikante Wirkung in Bezug auf Negativkontrolle (bei $p < 0,05$). Negativkontrollen sind die Wirkungen der Lösungsmittel der Testsubstanzen auf die Zellen, n = Anzahl der Untersuchungen.

3.7 Messung der pH-, Glucose- und Laktat-Werte

Zusätzlich zu den durchgeführten Zelltesten sollten Untersuchungen der Stoffwechsellage der Zellen Aussagen über die Wirkung des Moringa-Extraktes treffen können. Lebende Zellen durchlaufen verschiedene Stoffwechselwege und produzieren dabei Metabolite, die messbar sind und einen Zusammenhang zur Viabilität der Zellen herstellen können. Da Krebszellen besonders aktiv sind, brauchen sie viel ATP zur Energiegewinnung, ergo auch viel Glucose, um das ATP durch Glykolyse zu gewinnen und erzeugen dabei Laktat. Bei abgestorbenen Zellen kann Glucose nicht mehr durch die Membran aufgenommen werden und reichert sich extrazellulär an. Die Laktatkonzentration sinkt und der pH-Wert steigt.

Bei der Zelllinie RL95-2 (rot) ließ sich dieses Verhalten gut beobachten (Abbildungen 25, 26, 27, 28, 29 und 30). Die Glucosekonzentration betrug beim 100 %igen Extrakt 12,5 mmol/l, die Negativkontrolle (Medium/Zellen) misst 6,5 mmol/l. Die extrazelluläre Glucosekonzentration nahm mit sinkender Extraktkonzentration ab und endete beim 1 %igen Extrakt mit 7 mmol/l. Bei den Laktatwerten zeigte sich die erwartete Tendenz mit 18,5 mmol/l bei der Negativkontrolle (Medium/Zellen) und abfallenden 7,8 mmol/l im Gegensatz dazu beim 100 %igen Extrakt. Der pH-Wert war auch hier wie erwartet bei der Negativkontrolle am geringsten mit einem Wert von 7,87. Es zeigt sich jedoch im Verlauf der Extraktkonzentrationen keine einheitliche Senkung.

Die Zelllinie Ishikawa (blau) brachte bei der Laktatmessung eine ähnliche Tendenz wie die RL95-2-Zellen (Abbildungen 27 und 28). Die Laktatkonzentration war bei der Negativkontrolle (Medium/Zellen) mit 12,4 mmol/l deutlich höher als beim 100 %igen Extrakt, wo eine Laktatkonzentration von 6 mmol/l gemessen wurde. Die Glucosemessung zeigte hier einen weniger starken Unterschied mit 20,2 mmol/l bei der Negativkontrolle und 22,1 mmol/l beim 100 %igen Extrakt (Abbildungen 25 und 26) und ebenso schwach unterschieden sich die pH-Werte der einzelnen untersuchten Extraktkonzentrationen im Vergleich zu den Kontrollen (niedrigster pH-Wert mit 8,02 beim 50 %igen Extrakt und höchster pH-Wert mit 8,39 beim 3 %igen Extrakt, Abbildungen 29 und 30).

Glucose-Messung

Moringa auf Ishikawa (blau) und RL95-2 (rot)
n = 1

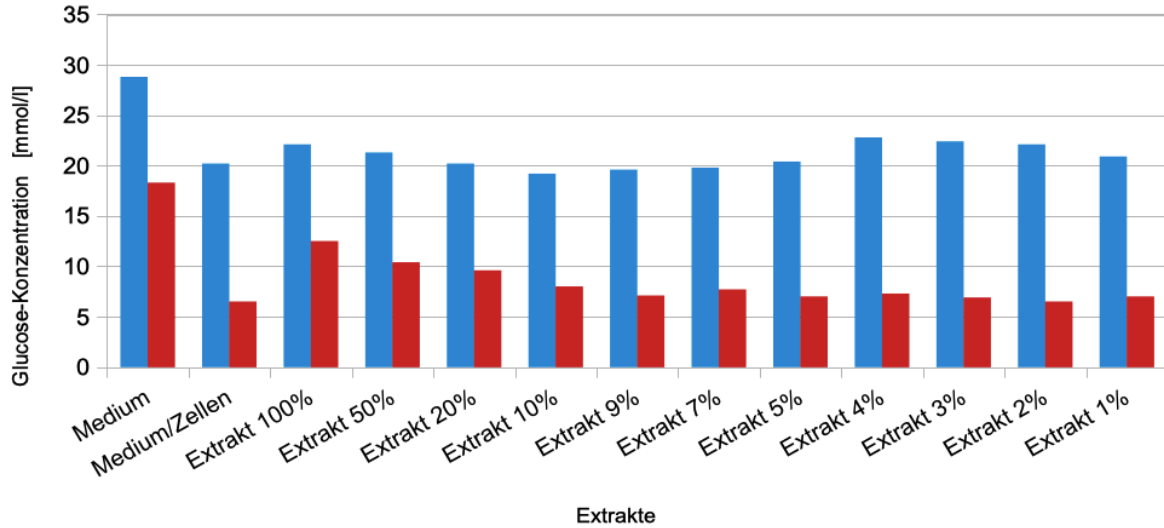


Abbildung 25: Glucose-Konzentration der Extrakte nach 24 h in [mmol/l], n = Anzahl der Untersuchungen.

Glucose-Messung

Moringa auf Ishikawa (blau) und RL95-2 (rot)
n = 1

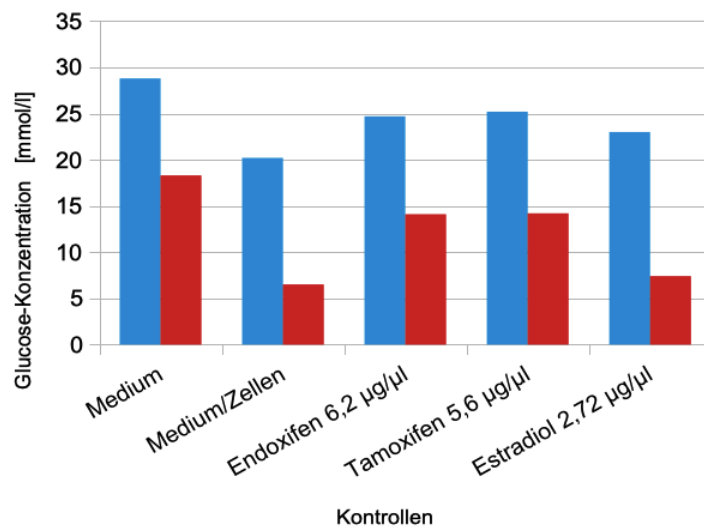


Abbildung 26: Glucose-Konzentration der Kontrollen nach 24 h in [mmol/l], n = Anzahl der Untersuchungen.

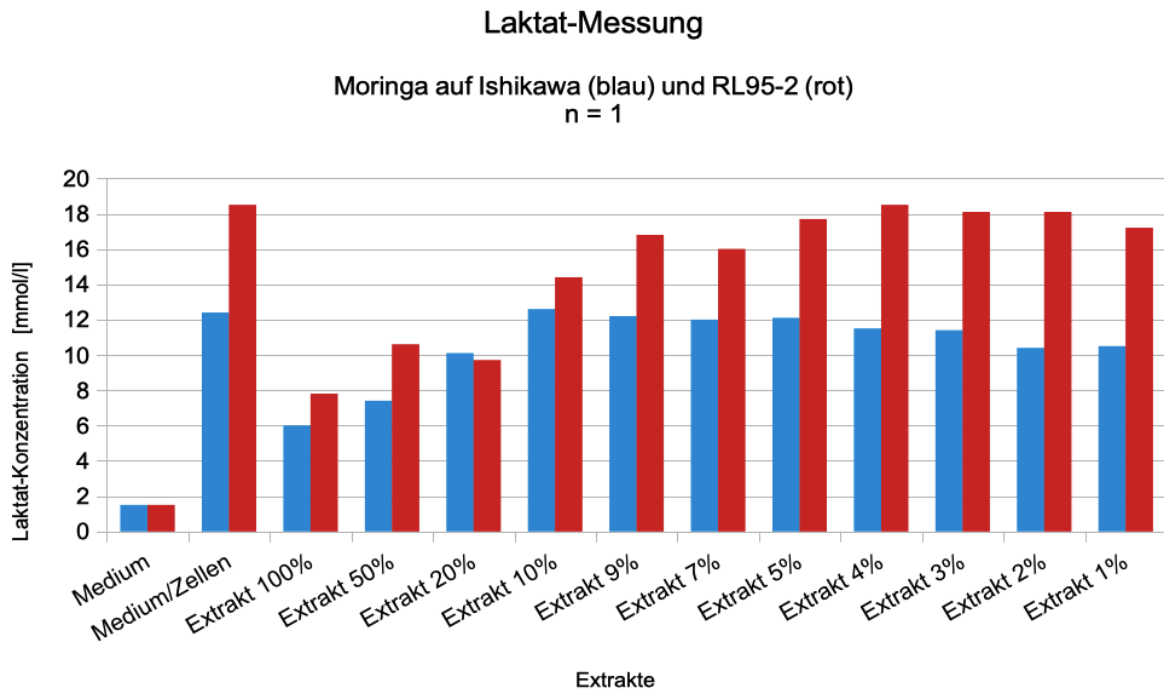


Abbildung 27: Laktat-Konzentration der Extrakte nach 24 h in [mmol/l], n = Anzahl der Untersuchungen.

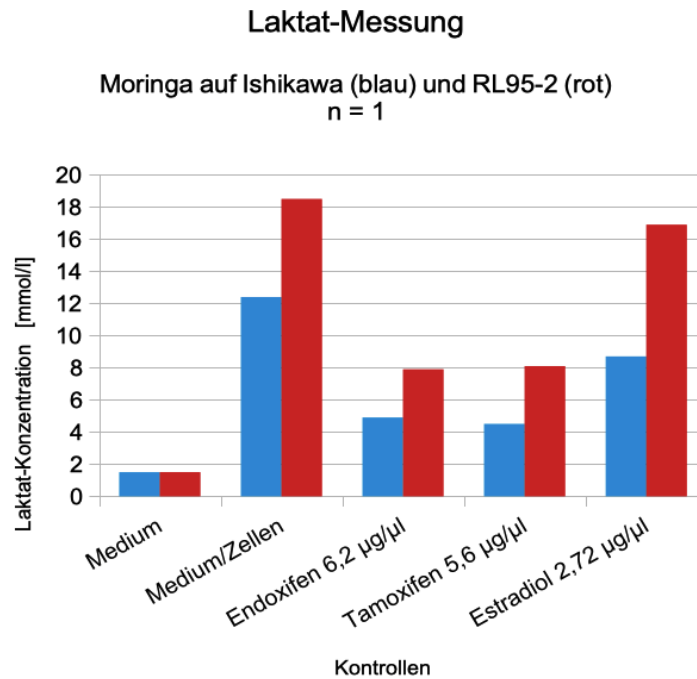


Abbildung 28: Laktat-Konzentration der Kontrollen nach 24 h in [mmol/l], n = Anzahl der Untersuchungen.

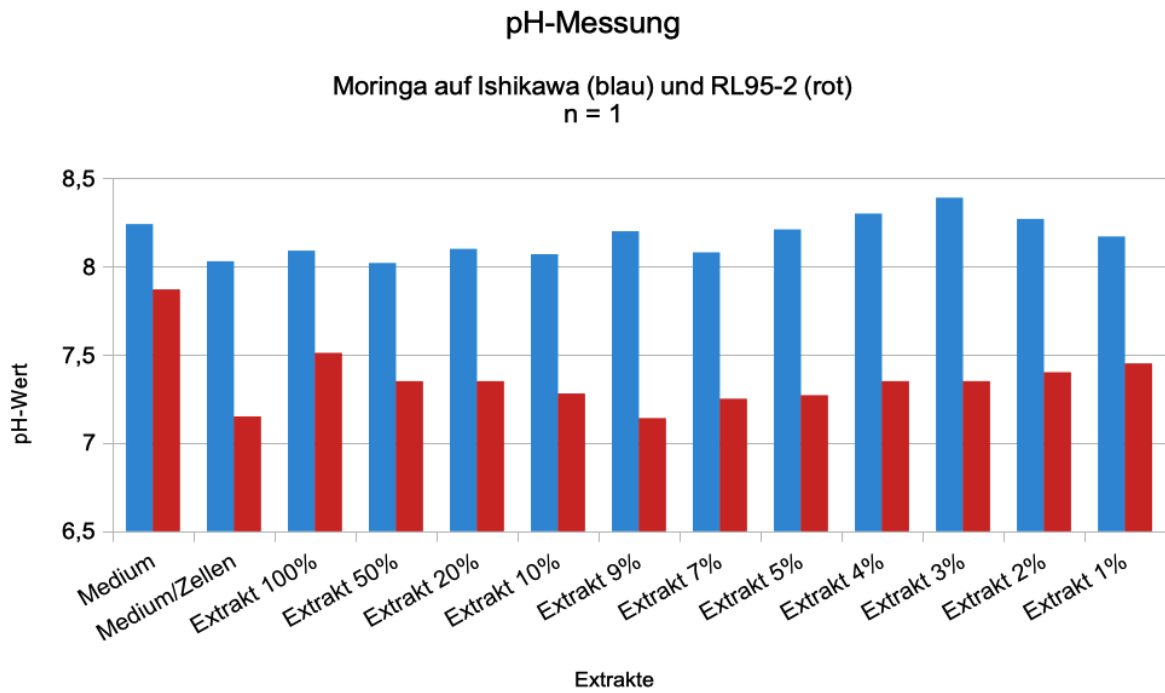


Abbildung 29: pH-Werte der Extrakte, n = Anzahl der Untersuchungen.

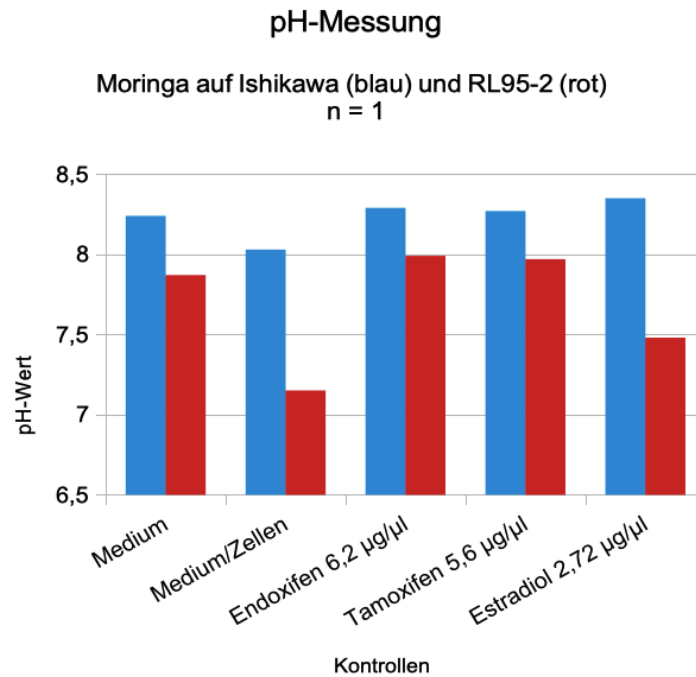


Abbildung 30: pH-Werte der Kontrollen, n = Anzahl der Untersuchungen.

4 Diskussion

4.1 Material und Methoden

In dieser Arbeit nutzte ich Moringa in Form eines Ethanol-Extraktes. Mehrere Studien arbeiteten bereits mit einem Ethanol-Extrakt an *in vivo* Tiermodellen und *in vitro* Zelllinien in unterschiedlich hohen Ethanol-Konzentrationen und erbrachten aussagekräftige Ergebnisse [135]. In Anbetracht dessen und der Tatsache, dass bereits mehrere HPLC-Untersuchungen von Moringa-Ethanol-Extrakten veröffentlicht wurden, erschien die Arbeit mit einem Ethanol-Extrakt statt eines Wasser- oder Methanol-Extraktes sinnvoll [142, 132]. Erst kürzlich, im Februar 2021, veröffentlichten die Forscher Ahmed et al. ihre HPLC-Analysen, in denen sie verschiedene Moringa-Extrakte verglichen. Sie fanden beim Ethanol-Extrakt im Vergleich zum Wasser-Extrakt mehr polyphenolische Bestandteile, zu denen auch Flavonoide gehören [1]. Die Herstellung des von mir verwendeten Extraktes wurde mit einem Moringa-Produkt durchgeführt, das in einer Biolebensmittelladen-Filiale einer deutschlandweiten Handelskette erhältlich ist. Dies ermöglicht einen mühelosen, lokalen Zugriff zu dem speziell in dieser Arbeit untersuchtem Moringa-Produkt.

Die HPLC erwies sich als Analyseverfahren für den Moringa-Extrakt als geeignete Methode. In vorherigen Studien wurde die HPLC ebenso erfolgreich zur quantitativen und qualitativen Untersuchung von verschiedenen Moringa-Extrakten genutzt [142, 132, 1].

Die Endometriumkarzinomzellreihen RL95-2 und Ishikawa eigneten sich gut zur *in vitro* Untersuchung und fanden auch in anderen Studien bislang Anwendung [137, 96, 65].

Die Immunhistochemische Untersuchung der besagten Zelllinien auf Östrogen- und Progesteron-Rezeptoren ist ein sicheres Verfahren, um das Vorhandensein dieser Rezeptoren zu bestimmen [47]. Um Zellviabilität, Proliferationsverhalten und Zytotoxizität der Zellen zu untersuchen, stellten die verwendeten Zelltest CellTiter-Glo[®], CytoTox-Glo[™], BrdU-Immunoassay und Neutralrottest geeignete Methoden dar. Sie wurden in vorherigen Arbeiten dieses Forschungslabors mehrfach erprobt und erwiesen sich als geeignete Verfahren, um die Wirkung von verschiedenen Substanzen auf Krebszellen zu messen.

4.2 Ergebnisse

HPLC Mit der HPLC konnte der hergestellte Moringa-Extrakt auf seine Bestandteile untersucht werden. Der Chromatogramm des Extraktes zeigte deutliche Peaks, die den fünf Inhaltsstoffen Quercetin, Rutin, Kämpferol, Isorhamnetin und Folsäure zugeordnet werden konnten. Die Retentionszeiten der Referenzen unterschieden sich um maximal 0,1 Minuten (entspricht 6 Sekunden) bei Rutin, Kämpferol und Isorhamnetin. Bei Folsäure und Quercetin, dem zwei Peaks zuzuordnen waren, erschienen die Peaks zeitgleich im Chromatogramm des Moringa-Extraktes und in den Chromatogrammen der einzelnen Referenzen. Vorherige Studien, die Moringa auf Inhaltsstoffe untersuchten, bestätigten die Ergebnisse der HPLC-Analyse [135, 79, 67]. Die Peakhöhe und -fläche unterschieden sich jedoch zwischen Extrakt und einzelnen Referenzen. So zeigte Folsäure einen deutlich niedrigeren Ausschlag (Peak bei 2,6 min) und

auch Isorhamnetin hatte einen niedrigeren Peak (bei 32,1 min) als der Extrakt an den jeweiligen Retentionszeiten. Da die Peakhöhe und -fläche mit der Menge an Substanz korreliert, ist daraus zu schließen, dass im Ethanol-Extrakt von Moringa bei höheren Peaks eine größere Menge der Substanzen enthalten ist, als diese für die einzelnen Analysen konzentriert waren (Tabelle 2). R. Khalid Abbas, F. Elsharbasy und A. Fadlelmula untersuchten in ihrem 2018 veröffentlichten Paper Moringa Oleifera auf seine Nährstoff-Bestandteile und fanden eine Menge von 41 µg Folsäure pro 100 g Moringa-Blatt-Extrakt. Die Gesamtmenge an allen von ihnen gefundenen Vitaminen machte einen Anteil von 10 % aller Pflanzen-Inhaltsstoffe aus [67]. Amaglo et al. analysierten die verschiedenen Pflanzenstrukturen von Moringa Oleifera mit Hilfe der HPLC und konnten eine Vielzahl von Flavonoiden darin finden. Sie errechneten eine Masse von 1,83 mg pro Gramm Frischmasse Moringa-Blätter für Rutin (Quercetin-3-O-Rutinosid), für Kämpferol-3-(6''-Malonylglucosid) eine Masse von 0,25 mg/g, für Quercetin-3-O-(X''-Acetylglucosid) bzw. Quercetin-3-O-(Y''-Malonylglucosid) eine Masse von 0,02 bzw. 0,03 mg/g und für Isorhamnetin-3-O-(6''-Malonylglucosid) 0,05 mg/g. Der Peak, den die Autoren in ihrem HPLC-Chromatogramm Isorhamnetin (bzw. seinem Glucosid) zuordneten, zeigte jedoch eine frühere Retentionszeit als der Peak des von mir untersuchten Isorhamnetins. Bei Rutin, Quercetin und Kämpferol konnten sie verschiedene Glucosid-Formen der Flavonoide detektieren, wovon die Retentionszeiten der oben genannten mit meinen untersuchten Referenz-Extrakten übereinstimmen [5].

Immunhistochemie Die immunhistochemische Untersuchung der besagten Zelllinien auf vorhandene Östrogen- und Progesteron-Rezeptoren zeigte im Lichtmikroskop eindeutige Ergebnisse. Östrogenrezeptor-positive Eigenschaften beider Zelllinien konnten mittels Literatur bestätigt werden [104, 146], jedoch fanden sich widersprüchliche Aussagen zur meinen Ergebnissen bezüglich des mangelnden Vorhandenseins von Progesteron-Rezeptoren bei RL95-2 [157].

Moringa-Extrakt Der Ethanol-Extrakt des Moringa zeigte in allen durchgeführten Versuchen eindeutige zytotoxische und proliferationshemmende Wirkungen mit teilweise signifikanten Werten. Je höher konzentriert der Extrakt war, desto stärker die Wirkung. Der CellTiter-Glo[®] Test lieferte Aussagen über die zellviabilitätsverändernde Wirkung der Extrakte und Referenzen. Moringa erwies sich bei beiden Zelllinien als stark viabilitätssenkend mit signifikanten Werten. Bei Ishikawa war zu beobachten, dass diese Wirkung ab dem 5 %igen Extrakt nachließ und die Viabilität der Zellen bei 90 % und höher blieb. RL95-2 zeigte stärkere Einflüsse, dort sank bis einschließlich 2 %igem Extrakt die Viabilität unter 40 %. Ebenso stark waren die zytotoxischen Effekte der Moringa-Extrakte auf beide Zelllinien, die durch den CytoTox-Glo[™] Test gemessen wurden. Auch hier erwies sich RL95-2 als anfälliger gegenüber Moringa und sank mit seiner Zellviabilität bis einschließlich 2 %igem Extrakt auf knapp 20 %. Auf Ishikawa hatte der Moringa-Extrakt ab einer Konzentration von 4 % keine stark zytotoxischen Wirkungen mehr, die Rest-Viabilität blieb beim 4 %igen bis 1 %igen Extrakt mehrheitlich über 60 %. Der Neutralrottest, der auf eine andere Art und Weise die Zytotoxizität von Zellen messen kann, erbrachte bei den hochkonzentrierten Moringa-Extrakten (100 %ig bis 20 %ig) stark zytotoxische Ergebnisse auf beide Zellreihen mit signifikanten Werten. Ab einer Extrakt-Konzentration von

10 % jedoch konnten keine zytotoxischen Wirkungen mehr auf Ishikawa-Zellen beobachtet werden. Die Zellviabilität stieg sogar auf über 100 % bei den niedriger konzentrierten Moringa-Extrakten. RL95-2 zeigte bis einschließlich 2 %igem Moringa-Extrakt stark zytotoxische Einflüsse mit einer Rest-Viabilität von 30 %. Auch das Proliferationsverhalten, durch den BrdU-Test gemessen, wurde vom Moringa-Extrakt beeinflusst. Je höher konzentriert die Extrakte waren, desto stärker die proliferationshemmende Wirkung. Es zeigten sich bei diesem Zelltest durchgängig signifikante Werte, jedoch auch große Standardabweichungen. Zusammengefasst bestätigten sich die Ergebnisse der Studie von Cirimi et al., die in ihrer Studie signifikante wachstumshemmende und zytotoxische konzentrationsabhängige Eigenschaften von Moringa beobachten konnten [20]. Ihre Studie befasste sich jedoch mit einer Neuroblastom-Zelllinie (SH-SY5Y) und sie konnten durch spezifischere Untersuchungen die antitumorale Wirkung des Moringa dem in der Pflanze enthaltenen Glucomoringin, einem Senfölglykosid, zuschreiben. Sie beobachteten zudem, genau wie ich im Rahmen des BrdU-Immunoassays, antiproliferative Wirkungen. Sie führten es darauf zurück, dass Moringin die Expression der apoptoseinduzierenden Enzyme Caspase 3 und 9 steigert. Auch die Ergebnisse der Studie von T. Guon und H. Chung erwiesen sich im Rahmen meiner Arbeit als gültig. Ihre Ergebnisse zeigten eine konzentrationsabhängige Zellviabilitätsenkung, jedoch betrachteten die Autoren nicht die Wirkung der Moringa-Blätter, sondern die der Moringa-Frucht [50].

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit habe ich die Wirkung von Moringa in Form eines Ethanol-Extraktes untersucht, das aus 4 g Moringapulver und 70 %igem Ethanol hergestellt wurde. Das Betrachten und Vergleichen anderer Moringa-Extrakte auf die Endometriumkarzinomzellen und vor allem auch auf gesunde Zellen wären hierbei hilfreiche Ergänzungen beim Auswerten der Ergebnisse gewesen. Trotzdem präsentierten die durchgeführten Zellteste eine aussagekräftige antitumorale Tendenz von Moringa Oleifera. Interessanterweise unterschieden sich die beiden Zelllinien Ishikawa und RL95-2 zum Teil stark voneinander. Bei den sehr hoch konzentrierten Extrakten erwiesen sich mehrheitlich stark antitumorale Wirkungen, jedoch entstand ab einer gewissen Extrakt-Konzentration eine große Divergenz zwischen den zytotoxischen und viabilitätssenkenden Effekten. Aber nicht nur zwischen den Zelllinien entstanden zum Teil entgegengesetzte Ergebnisse, sondern auch innerhalb. So wiesen viele Ergebnisse trotz statistischer Signifikanz eine große Standardabweichung auf.

Quercetin Quercetin zeigte im CytoTox-Glo™ Test signifikant zytotoxische Wirkungen bei beiden Zelllinien mit einer Rest-Viabilität von 25,7 % bei Ishikawa und 34,3 % bei RL95-2. Im Neutralrottest konnte diese Beobachtung nicht so eindeutig gemacht werden. Die Viabilität der Ishikawa-Zellen blieb durch Quercetin-Einwirkung nahezu unverändert und stieg minimal auf 101,12 % an. Bei den RL95-2 Zellen sank von allen Referenzen nur unter Quercetin die Zellviabilität auf knapp unter 50 %, dies jedoch nicht signifikant. Die zytotoxische Wirkung des Flavonols, die bei verschiedenen *in vitro* Studien bereits an anderen humanen Krebszelllinien beobachtet wurde [9], konnte somit im Falle des CytoTox-Glo™ Tests bestätigt werden. Quercetin erwies sich beim Neutralrottest als signifikant wirkungslos bezüglich der Zytotoxizität bei den Ishikawa-Zellen und bei RL95-2 als nicht statistisch aussagekräftig. Der BrdU-Test untersuchte

das Proliferationsverhalten von Zellen. Bei der Auswertung der Testergebnisse des BrdU-Tests zeigte sich unter den Referenzen lediglich bei Quercetin eine leichte Proliferationshemmung mit einer Rest-Viabilität von 69,54 %, dies jedoch nicht signifikant. Die Autoren M. Reyes-Farias und C. Carrasco-Pozo präsentierten in ihrem 2019 erschienenen Paper die verschiedenen Wirkungsweisen von Quercetin durch Datenvergleich vorheriger Studien-Ergebnisse. Sie trugen zusammen, dass Quercetin auf verschiedene Krebszelllinien *in vitro* proliferationshemmende Wirkungen zeigt, darunter Brustkrebs- und Ovarialkarzinomzellen [119]. Die von ihnen angeführten Studien erklären den proliferationshemmenden Effekt durch die Eigenschaft, dass Quercetin unter anderem das Enzym Cdk1 herunterreguliert, das für das Fortschreiten des Zellzyklus verantwortlich ist und p21 hochreguliert, der als Cdk-Inhibitor fungierend zum Zellzyklus-Arrest beiträgt [119].

Die Studie von Kaneuchi et al., die die Wirkung von Quercetin auf Ishikawa-Zellen untersuchte, kommt zu anderen Ergebnissen. Auch ihre Ergebnisse zeigen deutliche antiproliferative Effekte auf die Zellen unter Quercetin-Einwirkung. Sie fanden jedoch keinen Einfluss auf die Genexpression von p21 und andere zyklusregulierende und apoptotische Gene, mit Ausnahme des Cyclin D1-Gens, das durch Quercetin supprimiert wurde. Die Blockade von Cyclin D1 verhindert ähnlich wie die Blockade von Cdk1 das Fortschreiten des Zellzyklus. Desweiteren beobachteten Kaneuchi et al. eine verminderte intrinsische EGF-Produktion¹⁹ der Zellen nach Quercetin-Einwirkung. Schlussfolgernd berichteten die Autoren von antiproliferativen Effekten Quercetins auf Ishikawa-Zellen unabhängig von p21 durch Herunterregulierung von EGF und des Cyclin D1 Gens. Die mehrfach auf Molekularebene nachgewiesene proliferationshemmende Wirkung von Quercetin konnte ich mit dem BrdU-Test nicht signifikant bestätigen. Auch Aussagen über zellviabilitätssenkende Wirkungen des Quercetins lassen sich im Rahmen meiner Arbeit nicht signifikant treffen. Der CellTiter-Glo[®] Test, der die Viabilität von Zellen misst, brachte keine hochwertigen Ergebnisse bei Betrachtung von Quercetin auf beide untersuchten Zelllinien. Es zeigten sich zwar leicht viabilitätssenkende Wirkungen (mit einer maximalen Viabilitätssenkung um weniger als 30 % bei Ishikawa), jedoch ohne statistische Signifikanz.

Rutin Rutin zeigte in den durchgeführten Zelltests keine zytotoxischen, viabilitätssenkenden oder antiproliferativen Wirkungen. Lediglich beim CellTiter-Glo[®] Test senkte Rutin die Zellviabilität auf knapp unter 60 % bei RL95-2, jedoch ohne statistische Signifikanz. Der Neutralrottest erbrachte sogar gegenteilige Ergebnisse zu der erwarteten zytotoxischen Wirkung Rutins. Hierbei stieg die Viabilität der Krebszellen nach Einwirkung von Rutin auf 140,84 % bei Ishikawa signifikant an. Die proapoptotischen und antiproliferativen Wirkungen, die Saleh et al. in ihren Untersuchungen bei Rutin feststellen konnten [126], blieben meinen Ergebnissen zufolge unbestätigt. Die Autoren arbeiteten in ihrer Studie im Gegensatz zu mir nicht mit Endometriumkarzinomzellen, sondern mit *in vivo* Mausmodellen (mit Ehrlich-Aszites-Tumor) und *in vitro* Brust- und Bauchspeicheldrüsenkrebszelllinien. Bei den *in vivo* Mausmodellen fanden sie eine Tumolvolumen-Reduzierung und *in vitro* zytotoxische und proapoptotische

¹⁹EGF = *epidermal growth factor*, stimuliert die Überproliferation von epidermalem Gewebe [65]

Effekte bei beiden genannten Zelllinien [126]. Auch die antitumorale Wirkungen, die Rutin bei weiteren Studien zeigte, die sich mit verschiedenen Tumorerkrankungen wie Kolonkarzinom, Leukämie, Zervix- und Ovarialkarzinom beschäftigten [4, 124, 89, 84], konnte ich im Rahmen meiner Arbeit bei den Endometriumkarzinomzellen Ishikawa und RL95-2 mittels der von mir genutzten Zellteste nicht finden.

Kämpferol Kämpferol erwies sich durch Untersuchung mittels CytoTox-Glo™ Test als stark zytotoxisch. Die Zellviabilität der Krebszellen sank unter Kämpferol-Einwirkung signifikant auf 6,03 % und 6,34 % bei Ishikawa und RL95-2. Der Neutralrottest, der ebenso ein Testverfahren für die Zytotoxizitätsmessung ist, zeigte paradoxerweise eine signifikante Viabilitätssteigerung um 20 % auf 121,83 % bei Ishikawa. Die RL95-2 Zellen wurden weder stark in ihrer Viabilität durch Kämpferol beeinträchtigt, noch zeigten sich die Ergebnisse statistisch aussagekräftig. Die *in vitro* Zytotoxizität, die Pham et al. in ihrer Studie bei verschiedenen Krebszelllinien, darunter Ovarialkarzinom und Brustkrebs, unter Einwirkung von Kämpferol feststellen konnten [112], blieb in meinen Untersuchungen nur in Betrachtung des CytoTox-Glo™ Tests erwiesen, dort jedoch in starkem Ausmaß und mit signifikanten Werten. Der CellTiter-Glo® Test zeigte eine signifikante Viabilitätssteigerung der RL95-2 Zellen auf über 120 %. Auf Ishikawa zeigte Kämpferol keine signifikante Wirkung, die Zellviabilität sank nur gering auf 90 %. Die Ergebnisse der Studie von Chuwa et al., die ebenfalls die Effekte von Kämpferol auf Ishikawa-Zellen untersuchte, kommen dagegen zu einem anderen Schluss. Die Wissenschaftler nutzten als Zelltestverfahren den MTT Assay, der Aussagen über die Zellviabilität macht, sowie Zellzyklus- und Apoptose-Analysen. Wachstumshemmende und proapoptotische Wirkungen von Kämpferol auf Ishikawa-Zellen konnten signifikant gefunden werden [19]. Die Studie von Lei et al. von 2019 untersuchte die antitumorale Wirkung des Flavonols auf MFE-280 Endometriumkarzinomzellen. Auch sie fanden wachstumshemmende Effekte durch Kämpferol konzentrationsabhängig und führten dies auf seine proapoptotische Eigenschaft zurück [78]. Der BrdU-Test konnte in meiner Arbeit keine signifikanten Aussagen über das Proliferationsverhalten der Zellen nach Einwirken von Kämpferol treffen. Die Rest-Viabilität sank nur gering auf um die 90 %. Ashrafizadeh et al. arbeiteten ebenso in ihrer 2020 veröffentlichten Studie mit dem BrdU-Assay. Sie untersuchten dabei verschiedene Krebszellreihen, darunter jedoch keine Endometriumkarzinomzellen, auf ihr Proliferationsverhalten. Die Ergebnisse ihrer Studie zeigen, anders als meine Ergebnisse, eine konzentrationsabhängige Wachstumshemmung, die sich laut der Autoren anhand der durch Kämpferol induzierten Autophagozytose-Stimulation der Zellen erklären lässt [10].

Isorhamnetin Isorhamnetin erwies sich laut der Ergebnisse des CytoTox-Glo™ Tests als signifikant stark zytotoxisch mit Rest-Viabilitäten von 8,78 % bei Ishikawa und 12,38 % bei RL95-2. Und auch im CellTiter-Glo® Test zeigte Isorhamnetin auf RL95-2 viabilitätssenkende Effekte, die signifikant bei 40 %iger Rest-Viabilität gemessen wurden. Der BrdU-Test zeigte keine Veränderung auf das Proliferationsverhalten der Zellen durch Isorhamnetin und die Ergebnisse des Neutralrottest lassen sogar viabilitätssteigernde Effekte durch Isorhamnetin vermuten, da nach Einwirken des Flavonoids auf die Ishikawa-Zellen eine signifikante Erhöhung der Viabilität

auf 129,35 % auftrat. Die wachstumshemmende und apoptoseeinleitende Wirkung, die Li et al. in ihrer Studie *in vitro* und *in vivo* bei Lungenkrebszellen beobachteten [81], kann ich nur teilweise bestätigen. Zytotoxisch zeigte sich Isorhamnetin im Rahmen des CytoTox-Glo™ Tests, jedoch nicht antiproliferativ. Auch die von Park et al. beschriebenen antiproliferativen Effekte des Flavonoids scheinen in meiner Arbeit nicht bestätigt, wohl aber die proapoptotische Wirkung, die eine verminderte Zellviabilität beider Zellreihen durch die Zellteste der Firma Promega messen ließen [110].

Folsäure Die Ergebnisse aller Zellteste geben keinen richtigen Aufschluss über die Frage, ob Folsäure einen hemmenden oder einen fördernden Effekt auf die Zellviabilität von Endometriumkarzinomzellen hat. Signifikante Messwerte zeigten sich beim CellTiter-Glo® Test mit Viabilitätswerten von 110 %, beim CytoTox-Glo™ Test mit 95,6 % bei der Zelllinie RL95-2 und beim Neutralrottest mit einer Viabilität von 105,98 % bei Ishikawa. Damit entsprechen meine Ergebnisse bezüglich der Wirkung von Folsäure der Aussage von Pieroth et al., die in ihrer vergleichenden Studie zusammentragen, dass Folsäure bei manchen Krebserkrankungen mit keinen bis wenig Effekten assoziiert wird, sich bei anderen Krebserkrankungen protektive Effekte zeigen und wiederum bei manchen sogar ein erhöhtes Erkrankungsrisiko besteht, wenn eine gewisse hohe Dosis an Folsäure zu sich genommen wurde [113]. Meine Untersuchungen beziehen sich lediglich auf eine Dosierung von 1 µg/µl und stellen keine Vergleiche mit niedrigeren oder höheren Konzentrationen an. Die von Bahmani et al. untersuchten Frauen, die an der doppelt-verblindeten Studie bezüglich der Effekte von Folsäure-Supplementation auf Endometriumhyperplasie-Rezidive teilnahmen, erhielten täglich 5 mg Folsäure-Tabletten für 12 Wochen, wenn sie nicht der Placebo-Gruppe zugewiesen wurden. Es zeigten sich keinerlei Effekte auf die Rezidivrate von Endometriumhyperplasien [11]. Die Studien-Ergebnisse der Foll-Kontroll-Studien von Jain et al. und Xu et al., die einen dosisabhängigen inversen Zusammenhang zwischen Folat-Supplementierung und dem Risiko, an Endometriumkarzinom zu erkranken, aufzeigten, widersprechen den Ergebnissen von Lu et al. [61, 154, 87]. Die prospektive Kohortenstudie beobachtete ein erhöhtes Risiko für Endometriumkarzinome bei Frauen mit einer erhöhten Folat-Einnahme [87]. Zusammenfassend zeigen die verschiedenen Studien-Ergebnisse unterschiedliche Ergebnisse, die sich auf meine Arbeit bezüglich der zum Großteil unveränderten Zellviabilität übertragen lassen. Mögliche Gründe könnten dafür die verschiedenen Effekte der Folsäure auf zellulärer Ebene sein. Folsäure ist in seiner biologisch aktiven Form als Tetrahydrofolat notwendig, um Pyrimidinbausteine für die DNA-Synthese herzustellen. Da Krebszellen durch die gesteigerte Zellproliferation eine erhöhte Mitose-Rate haben, sind sie dementsprechend auf ausreichende Folsäure-Zufuhr angewiesen und exprimieren verstärkt Folsäure-Rezeptoren an ihrer Zelloberfläche [134]. Andererseits konnten Studien zeigen, dass ein Folsäure-Mangel mit DNA-Strang-Brüchen, vermehrten Mutations-Raten und gestörten DNA-Reparatur-Mechanismen einhergeht und somit in Zusammenhang mit Tumorzellentstehungen steht [11]. Eine klare Aussage über Folsäure und seine Wirkung auf Krebszellen ist demnach und in Anbetracht meiner Ergebnisse nicht zu treffen.

Kontrollen Tamoxifen und Endoxifen zeigten *in vitro* die von ihnen erwarteten zytotoxischen Effekte, die ihrer hohen Dosierung (5,6 µg/µl und 6,2 µg/µl) zuzuschreiben sind. Estradiol erbrachte weder stark senkende noch stark steigernde Effekte auf die Zellviabilität. Diese Negativkontrollen dienten zur Überprüfung der Rahmenbedingungen während der Testdurchläufe. Da die erwarteten Zellreaktionen durch die jeweiligen Kontrollsubstanzen hervorgerufen wurden, kann davon ausgegangen werden, dass die Zelllinien keinen unphysiologischen Bedingungen ausgesetzt waren. Die Viabilitätsveränderungen, die durch Zugabe der Extrakte und Referenzen zu beobachten waren, wurden durch die jeweiligen Substanzen und nicht durch äußere Parameter beeinflusst.

Alkohole Die Alkohole, in denen der Moringa-Extrakt, die Referenzen und die Kontrollen gelöst waren, wurden genauso auf ihre Wirkung getestet, wie alle anderen Substanzen auch. Damit wollte ich sicher gehen, dass mögliche Viabilitäts-Veränderungen nicht durch die Alkohole, sondern durch die Substanzen allein verursacht wurden. Im CellTiter-Glo® Test zeigten die Alkohole nur geringe viabilitätssenkende Wirkungen (mit Rest-Viabilitäten von über 80 %), was sich bei beiden Zelllinien einheitlich beobachten ließ. Der CytoTox-Glo™ Test hingegen erbrachte bei beiden Zelllinien zum Teil stark auseinandergehende Ergebnisse. Die Ishikawa-Zellen bußten unter allen getesteten Alkohol-Lösungen einen gewissen Anteil ihrer Viabilität ein (am stärksten unter absolutem Alkohol mit einer Rest-Viabilität von 70 %). Die RL95-2-Zellen hingegen zeigten sogar eine erhöhte Viabilität unter absolutem Alkohol und 70 %igem Ethanol. Unter der DMSO/Alkohol-Mischung sank bei beiden Zelllinien die Viabilität, allerdings unterlagen die Messungen einer hohen Standardabweichung von 15 bzw. 18 bei Ishikawa und RL95-2. Der BrdU-Assay zeigte im Mittelwert keine starken Proliferations-Schwankungen der Zellen unter den Alkoholen, wohingegen der Neutralrottest bei beiden Zelllinien eine Zytotoxizität auf bis zu 60 % Rest-Viabilität der Ishikawa-Zellen unter der DMSO/Alkohol-Mischung ergab. Keiner der Zelltests lieferte unter den Alkoholen signifikante Messungen zu den viabilitätssenkenden, antiproliferativen und zytotoxischen Effekten und zum Teil unterlagen die Messungen hohen Standardabweichungen. Da die Mittelwerte aber nahe der 100 %, und somit nahe dem Vergleichswert der reinen Medium/Zellen-Messungen lagen, komme ich zu dem Schluss, dass die Alkohole keine signifikante Wirkung auf das Zellverhalten der getesteten Endometriumkarzinomzellen haben.

Stoffwechsel-Messungen Die Stoffwechsel-Messungen beinhalteten das Messen der extrazellulären Glucosekonzentration, der Laktatkonzentration und des pH-Wertes. Die Glucosekonzentration zeigte bei den RL95-2-Zellen eine sinkende Tendenz, je niedriger konzentriert der Moringa-Extrakt war. Unter Einwirken von Endoxifen und Tamoxifen zeigte sich eine verstärkte, unter Estradiol eine verminderte extrazelluläre Glucoseakkumulation. Auch die Ishikawa-Zellen zeigten unter den letztgenannten Kontrollen ähnliche Tendenzen mit einer höheren Glucosekonzentration bei Endoxifen und Tamoxifen und einer niedrigeren bei Estradiol. Die Konzentrationsunterschiede waren jedoch nur sehr gering mit einem maximalen Unterschied zwischen Tamoxifen und Estradiol von 2,2 mmol/l. Innerhalb der Moringa-Extrakte war bei

Ishikawa kein aussagekräftiges Ergebnis bezüglich sinkender Glucosekonzentration bei höher konzentriertem Extrakt zu sehen. Ähnlich unterschiedlich waren auch die Ergebnisse der Laktat-Messungen zwischen Ishikawa und RL95-2. Die erwartete verringerte Laktatkonzentration bei den höher konzentrierten Moringa-Extrakten im Vergleich zum reinen Medium/Zellen-Wert zeigte sich zwar bei beiden Zelllinien, jedoch verschwand diese Tendenz bei Ishikawa ab dem 9 %igen Extrakt und die Laktatkonzentration sank sogar bis zum 1 %igen Extrakt wieder ab. Bei RL95-2 ließ sich eine steigende Laktatkonzentration bei niedriger konzentrierten Moringa-Extrakten beobachten.

Bei beiden Zelllinien konnten die Kontrollen die erwarteten Wirkungen bestätigen. Unter Endoxifen und Tamoxifen sanken die Laktatwerte, unter Estradiol stiegen sie an. Der pH-Wert, der unter anderem durch die Laktatkonzentration beeinflusst wird, verhielt sich bei RL95-2 entsprechend der gezeigten Laktat-Veränderungen. Die höchsten pH-Werte wurden bei Endoxifen und Tamoxifen mit Werten von 7,99 und 7,97 gemessen. Unter den Extrakten zeigten die Zellen unter 100 %igem Extrakt den höchsten Wert mit 7,51. Die reine Medium/Zell-Suspension im Vergleich dazu hatte einen pH-Wert von 7,15. Die Ishikawa-Zellen zeigten hingegen keinerlei Tendenz zwischen den einzelnen Extrakten und den Kontroll-Lösungen. In allen untersuchten Zellsuspensionen schwankte der pH-Wert lediglich zwischen 8,02 und 8,39 ohne Relation zu den jeweiligen Substanzen. Krebszellen unterliegen aufgrund ihrer unkontrollierten Zellproliferation einem Wechsel in ihrem Nährstoff-Bedarf. Sie bevorzugen den aeroben Glykolyse-Stoffwechsel, der mit einer Laktatakkumulation und einer pH-Verschiebung in saure Bereiche einhergeht [119]. Kommt es zum Absterben der Zellen oder zu zellulären Dysfunktionen, wird Glucose nicht mehr von den Zellen aufgenommen, reichert sich extrazellulär an, die Laktatbildung wird gesenkt und der pH-Wert steigt. Diese Effekte zeichneten sich vor allem bei der Endometriumkarzinomzelllinie RL95-2 deutlich ab. Je höher die Extrakt-Konzentration, desto höher die extrazelluläre Glucoseakkumulation, desto niedriger die Laktatkonzentration und desto höher der pH-Wert. Die untersuchten Ishikawa-Zellen zeigten ähnliche Tendenzen bei der Laktat-Messung, jedoch keine starken Auswirkungen auf die Glucosekonzentration und den pH-Wert. Bei Betrachtung der RL95-2-Zellen lässt sich schlussfolgern, dass je höher der Moringa-Extrakt konzentriert war, desto stärker die zytotoxischen Wirkungen waren. In Bezug auf die Ishikawa-Zellen lässt sich diese Wirkung nicht mit derselben Stärke im Rahmen der Stoffwechsel-Untersuchungen nachweisen.

5 Methodenkritik

Die im Rahmen dieser Forschungsarbeit durchgeführten Zellteste erwiesen sich als aussagekräftige Untersuchungsmethoden, um die Wirkung von Substanzen - in meinem Falle von Moringa und einzelnen Bestandteilen - auf Krebszellen zu analysieren. Da die Standardabweichungen zum Teil sehr groß gewesen sind und um die Aussagekraft noch weiter zu erhöhen und mehr Daten miteinander vergleichen zu können, wären noch mehr Durchläufe der einzelnen Teste von Vorteil gewesen. Zudem hätte ich noch weitere Moringa-Extrakte, zum Beispiel als Wasser- oder Methanol-Extrakt, testen können oder den Ethanol-Extrakt in verschiedenen Dosierungen, mit mehr oder weniger als den verwendeten 4 g Moringa-Pulver, anfertigen können. Auch dadurch hätte ich eine noch größere Bandbreite an Aussagen bezüglich der Wirkung und Anwendung von Moringa treffen können. Die HPLC hätte noch präzisere Auftrennungen der Substanzen liefern können, indem zum Beispiel der Gradient des Lösungsmittels abgeflacht worden wäre. Dadurch wäre eine genauere Analyse der Referenzen und ihren einzelnen Glukosid-Formen möglich gewesen.

6 Ausblick

Das Interesse an komplementärer Therapieoptionen insbesondere in der Onkologie ist am Wachsen und bedarf aufgrund steigender Tumor-Inzidenzwerte und der immer weitreichenderen Problematik der Multi-Drug-Resistance einer größeren Zuwendung. Viele Studien haben sich bislang mit der antikanzerogenen und antitumoralen Wirkung von *Moringa Oleifera* befasst und vielversprechende Ergebnisse geliefert. Unter Einbezug meiner Forschung mit *in vitro* Endometriumkarzinomzellen könnte *Moringa* auch bei der Behandlung des Endometriumkarzinoms Anwendung finden. Die meisten *in vivo* Studien arbeiteten bislang mit Nagetieren und keine davon untersuchte die Wirkung auf Endometriumkarzinome im Speziellen. Weitere Untersuchungen an beispielsweise Mäusen mit Xenograft-Tumoren sind daher essentiell. Bislang hat es nur wenig Bemühungen gegeben, einen einheitlich standardisierten *Moringa*-Extrakt herzustellen und diesen Extrakt über mehrere Studien hinweg zu untersuchen [135]. Die Sicherheit der *Moringa*-Einnahme wurde in mehreren Studien als sehr hoch eingestuft und keine unerwünschten Effekte konnten bei einer Studie mit Menschen beobachtet werden, die eine Einmaldosis von 50 g getrocknetem Blatt-Pulver oder 40 Tage lang eine Dosis von 8 g verabreicht bekamen [135]. Untersuchungen an Menschen mit Wasser- oder Ethanol-Extrakten gibt es bislang nicht. Auch hier bedarf es weiterer Untersuchungen bezüglich der Sicherheit der Einnahme als auch der Wirkungen auf den gesamten menschlichen Organismus unter Berücksichtigung der geringen oralen Bioverfügbarkeit von *Moringa* und der damit einhergehenden Notwendigkeit, gewisse Mengen einnehmen zu müssen. Das im *Moringa* enthaltene Flavonol Kämpferol zeigte bei der Studie von Yani et al. eine stärkere Bindung zum α -Östrogenrezeptor als natürliches Östrogen [156]. *Moringa* könnte dadurch an den Östrogenrezeptoren der Endometriumkarzinomzellen antagonistisch zum proliferationsstimulierenden Östrogen wirken. Des Weiteren zeigte Kämpferol eine stärkere Affinität zu den Abcg2-Transportern an Krebszellen, die zytotoxische Substanzen, wie zum Beispiel Krebsmedikamente, aus der Zelle wieder herausschleusen. Durch die Blockade der Transporter mit Kämpferol konnten somit höhere Konzentrationen und damit stärkere Effekte anderer Wirkstoffe erzielt werden [7]. Zusätzlich sollte deshalb nicht nur die alleinige Wirkung von *Moringa* betrachtet werden, sondern auch die synergistischen Effekte bei einer Doppeltherapie mit *Moringa* und konventionellen Therapeutika bei der Behandlung des Endometriumkarzinoms. Da *Moringa*-Pulver mittlerweile hier in Europa im Einzelhandel zu kaufen ist und durch das Internet als sogenanntes Superfood gefeiert wird, erreicht es eine immer größere Bekanntheit und Nutzung. Studien, die Effekte und Wirkungen durch eine alltägliche *Moringa*-Supplementierung bei Menschen untersuchen, könnten daher einfachere Anwendung finden. Um *Moringa* jedoch als eigenständiges Therapeutikum zu etablieren, bedarf es - wie oben bereits angeführt - noch vielen weiteren Untersuchungen bezüglich der Applikationsform, des genauen Wirkmechanismus und der Nebenwirkungen.

7 Zusammenfassung

Moringa Oleifera gilt schon seit langer Zeit in verschiedenen Regionen dieser Erde als Wunderpflanze bezüglich seiner vielfältigen Nutzbarkeit. Mehrere Studien haben sich bislang bereits mit den antikanzerogenen und antitumoralen Effekten der Pflanze beschäftigt. Im Bereich der Frauenheilkunde jedoch gibt es jedoch nach wie vor einen Mangel an Studien, die die Wirkung von Moringa auf Tumorerkrankungen der Geschlechtsorgane betrachten.

Ziel meiner Doktorarbeit ist es gewesen, die Wirkung des Moringablattextraktes auf das Proliferationsverhalten hormonaktiver Endometriumkarzinomzellen zu untersuchen. Dafür habe ich aus kommerziell erworbenem Moringa-Pulver einen Ethanol-Extrakt hergestellt und ihn mittels HPLC analysiert. Bei der Auswertung des Chromatogramms konnten verschiedene Inhaltsstoffe des Moringablattextraktes festgestellt werden; dazu zählen Quercetin, Rutin, Kämpferol, Isorhamnetin und Folsäure. Der Moringa-Extrakt wurde in verschiedenen Konzentrationen angefertigt. Um mögliche Wirkungen von Moringa auf die Endometriumkarzinomzellen genauer zu verstehen und interpretieren zu können, habe ich nicht nur den Ethanol-Extrakt, sondern auch die einzelnen Referenzen auf ihre Effekte untersucht. Die beiden verwendeten Zelllinien Ishikawa und RL95-2 wurden zu Beginn immunhistochemisch auf das Vorhandensein von Östrogenrezeptoren untersucht, wobei sich beide Zelllinien als α ER- und β ER-positiv und Ishikawa zusätzlich als PR-positiv präsentierten. Als Zellteste nutze ich CellTiter-Glo[®], CytoTox-Glo[™], BrdU-Immunoassay und Neutralrottest, anhand derer ich zellviabilitätssenkende, zytotoxische und antiproliferative Wirkungen messen konnte. Die Tests wurden in mehreren Durchläufen und mit Mehrfachbestimmungen durchgeführt und statistisch ausgewertet. Als Kontrollen dienten mir zum einen die zytotoxischen Therapeutika Tamoxifen und Endoxifen, das Steroidhormon Estradiol und zum anderen die Alkohole, in denen die Extrakte und Referenzen gelöst waren. Die Ergebnisse der Testauswertungen zeigten statistisch signifikante antitumorale Wirkungen der Moringa-Extrakte. Je höher konzentriert der Extrakt war, desto stärker war die zellviabilitätssenkende, zytotoxische und antiproliferative Wirkung. Bei den Referenzen zeigten sich abhängig vom durchgeführten Zelltest unterschiedliche Wirkungen auf die Endometriumkarzinomzellen. Vor allem Quercetin zeigte im CytoTox-Glo[™] zytotoxische und im BrdU leicht antiproliferative Wirkungen, so dass sich daraus schlussfolgern lässt, dass es zu den antitumoralen Eigenschaften von Moringa beiträgt. Für eine genauere Untersuchung mit der Fragestellung, welche Inhaltsstoffe spezifisch die antikanzerogenen und antitumoralen Effekte des Moringa-Extraktes auszeichnen, bedarf es noch weiterer Studien. Ebenso gilt es zu ergründen, welche Wirkung Moringa *in vivo* auf Endometriumkarzinome zeigt und in welcher Form Moringa verabreicht werden kann. Zusammenfassend konnte ich die positiven Effekte von Moringa Oleifera auf hormonaktive Endometriumkarzinomzellen zeigen. Die starken antitumoralen Eigenschaften von Moringa sind deshalb auf pharmakologischer Ebene für weitere Forschungsarbeiten von großem Interesse.

8 Thesen

Thema: Vergleichende Untersuchungen zum Proliferationsverhalten hormonaktiver Endometriumkarzinomzellen (RL95-2 und Ishikawa) unter Einfluss eines Moringablattextraktes.

Eingereicht von Sophia Viktoria Rudolf.

1. Die Inzidenz des Endometriumkarzinoms erhöht sich seit Jahren stetig.
2. Die Behandlung des Endometriumkarzinoms beruht vor allem auf der operativen Organentnahme und möglicher adjuvanter Strahlen- oder Chemotherapie.
3. Es gibt keine ausreichenden Studien zu komplementärmedizinischen Therapieoptionen für das Endometriumkarzinom.
4. Die antitumorale Wirkung von Moringa ist bereits in mehreren Studien untersucht worden.
5. Moringa Oleifera ist als komplementärmedizinisches Therapeutikum zur Behandlung des Endometriumkarzinoms in Betracht zu ziehen.
6. Für die qualitative und quantitative Analyse des Moringa-Ethanol-Extraktes ist die HPLC ein geeignetes Verfahren.
7. Die Flavonoide Quercetin, Rutin, Kämpferol und Isorhamnetin sowie Folsäure sind in den Blättern der Moringa-Pflanze enthalten.
8. Die Flavonoide Quercetin, Rutin, Kämpferol und Isorhamnetin wirken *in vitro* hemmend auf die Zellviabilität von Endometriumkarzinomzellen.
9. Die *in vitro* Wirkung von Folsäure auf Endometriumkarzinomzellen ist nicht einheitlich zytotoxisch oder wachstumsfördernd.
10. Die Endometriumkarzinomzelllinien Ishikawa und RL95-2 sind Östrogenrezeptor-positiv, zudem ist Ishikawa Progesteronrezeptor-positiv.
11. Die Zellteste CellTiter-Glo[®], CytoTox-Glo[™], BrdU-Immunoassay und Neutralrottest sind geeignete Testverfahren, um die Zellviabilität, Zellproliferation und Zytotoxizität zu messen.
12. Der Moringa-Ethanol-Extrakt weist in allen durchgeführten Zelltesten signifikant zytotoxische und antiproliferative Wirkungen auf.
13. Diese inhibitorische Wirkung des Moringa-Extraktes ist nicht auf das enthaltene Ethanol zurückzuführen.
14. Weitere Studien sollten sich mit der *in vivo* Wirkung von Moringa auf Endometriumkarzinome befassen.

9 Publikation

Posterpräsentation beim 63. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V. (DGGG) vom 07.10.2020 bis 10.10.2020

Vergleichende Untersuchungen zum Proliferationsverhalten hormonaktiver Endometriumkarzinomzellen (Ishikawa) unter Einfluss eines Moringablattextraktes

Rudolf S¹, Jeschke U², Gerber B¹, Reimer T¹, Richter D-U¹.

¹Universitätsmedizin Rostock, Universitätsfrauenklinik, Südring 81, 18059 Rostock

²Universitätsklinikum Augsburg, Stenglinstr. 2, 86156 Augsburg

Einleitung

Die gesundheitsfördernde Wirkung von Moringa wird schon seit langem diskutiert. Die Pflanze wirkt nicht nur bakterizid und wird daher zur Wasserreinigung genutzt, sondern findet auch auf dem Gebiet der komplementären Onkologie Anwendung. In dieser Studie sollen deshalb mögliche Wirkungen eines Moringaextraktes auf die maligne Endometriumcarcinomzelle (Ishikawa) untersucht werden. Dazu wurden Assays zur Bestimmung der Zellviabilität, Zytotoxizität und des Proliferationsverhaltens genutzt.

Material und Methoden

Die Gewinnung des ethanolschen Moringaextraktes erfolgte mit einem mikrowellenunterstützten Verfahren. Die Analyse des Extraktes gelang mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC). Im Moringaextrakt nachgewiesene Inhaltsstoffe dienten in der Studie als Referenzsubstanzen für die Assays. Zusätzlich liefen bei jedem Ansatz Endoxifen, Tamoxifen und Estradiol, sowie die jeweils darin gelösten Alkoholkonzentrationen als Kontrollsubstanzen mit. Die Zelllinien wurden immunhistochemisch auf ihren Hormonrezeptorstatus untersucht. Die Assays zur Bestimmung der Zellviabilität (CellTiter-Glo®) und Zytotoxizität (CytoTox-Glo™) stammen von der Fa. Promega, das Assay zur Bestimmung der Proliferation (BrdU) von der Fa. Roche und der Neutralrottest, der ebenfalls Aussagen über die Zytotoxizität macht, von der Fa. Sigma-Aldrich.

Ergebnisse

Die HPLC erbrachte den qualitativen Nachweis von Quercetin, Isorhamnetin, Rutin, Kämpferol und Folsäure im Moringaextrakt. In der immunhistochemischen Untersuchung zeigte sich Ishikawa positiv für die Estrogenrezeptoren α (ER- α) und β (ER- β), sowie für Progesteronrezeptoren. Mit steigender Konzentration des Moringaextraktes konnte eine Abnahme der Zellviabilität bei allen Zelllinien beobachtet werden. Zytotoxische Effekte nahmen mit steigender Konzentration zu. Die Apoptoseaktivität stieg mit abnehmender Konzentration des Moringaextraktes an.

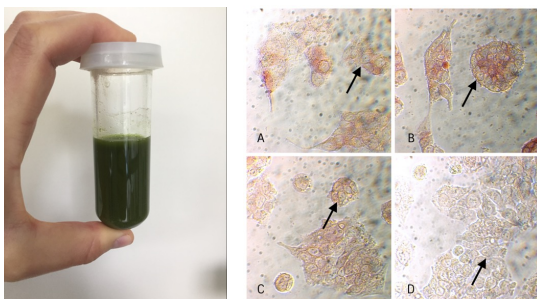


Abb. 1: Herstellung des Moringaextraktes: Das Pulver wurde mikrowellenunterstützt zu einem ethanolschen Extrakt verarbeitet.

Abb. 2: Immunhistochemie von Ishikawa. Repräsentativ sind positive Ergebnisse für das Vorhandensein von ER- α (A), ER- β (B) und Progesteron-Rezeptor (C) mit schwarzen Pfeilen dargestellt. Die Negativkontrollen (D) zeigen keine Farbreaktion.

Literatur

- Torondel B, Opare D, Brandberg B, Cobb E, Cairncross S. Efficacy of Moringa oleifera leaf powder as a hand-washing product: a crossover controlled study among healthy volunteers. BMC Complement Altern Med. 2014 Feb 14;14:57. doi: 10.1186/1472-6882-14-57
- https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/cb_99040201?lang=de®ion=DE&gclid=CMA46...msOCFZUW0wodi3cljg
- Simultaneous determination of quercetin, rutin and kaempferol in the leaf extracts of Moringa oleifera Lam. and Raphanus sativus Linn. by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Venkatapura C Devaraj, Burdipad G Krishna, Gollapalle L Viswanatha. 2011 Sep;9(9):1022-30. doi: 10.3736/jcim20110914

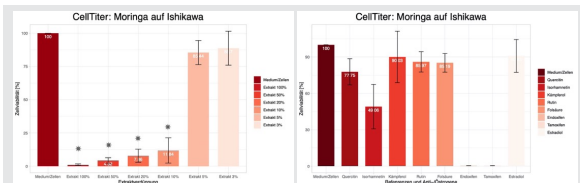


Abb. 3: CellTiter-Glo®: Effekte auf die Zellviabilität von Ishikawa. Angegeben sind die Konzentrationen der zugegebenen Substanzen: Extrakt 100%, 50%, 20%, 10%, 5%, 3%, sowie die Referenzen und Anti-/Ostrogene. Mittelwerte \pm Standardabweichung. * = signifikant ($p < 0.05$).

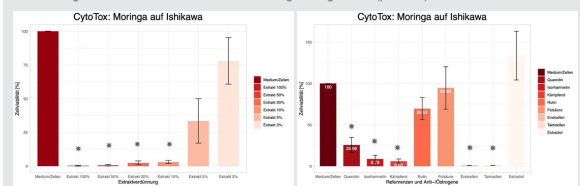


Abb. 4: CytoTox-Glo™: Effekte der Zytotoxizität auf die Zellen. Angegeben sind die Konzentrationen der zugegebenen Substanzen: Extrakt 100%, 50%, 20%, 10%, 5%, 3%, sowie die Referenzen und Anti-/Ostrogene. Mittelwerte \pm Standardabweichung. * = signifikant ($p < 0.05$).

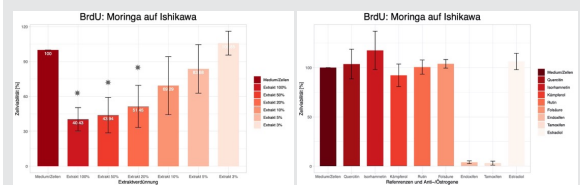


Abb. 5: BrdU: Effekte auf die Zellproliferation von Ishikawa. Angegeben sind die Konzentrationen der zugegebenen Substanzen: Extrakt 100%, 50%, 20%, 10%, 5%, 3%, sowie die Referenzen und Anti-/Ostrogene. Mittelwerte \pm Standardabweichung. * = signifikant ($p < 0.05$).

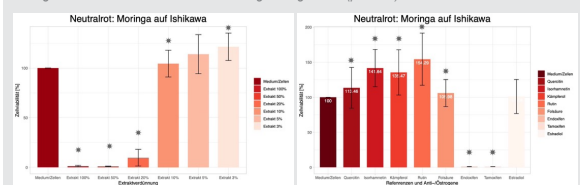


Abb. 6: Neutralrottest: Effekte der Zytotoxizität auf die Zellen. Angegeben sind die Konzentrationen der zugegebenen Substanzen: Extrakt 100%, 50%, 20%, 10%, 5%, 3%, sowie die Referenzen und Anti-/Ostrogene. Mittelwerte \pm Standardabweichung. * = signifikant ($p < 0.05$).

Schlussfolgerung

Eine deutliche Wirkung des Moringaextraktes auf das Zellverhalten ist nachweisbar. Daher kann der Einsatz von Moringa als komplementäre Therapie bei malignen Endometriumerkrankungen in Erwägung gezogen werden. Ob die in dieser Studie untersuchten Inhaltsstoffe oder noch nicht gefundene Inhaltsstoffe des Moringa die Wirkung erzeugen, muss noch weiter erforscht werden. Außerdem ist noch zu untersuchen, in welcher Form Moringa eingenommen werden soll, um die gewünschte therapeutische Wirkung zu erzielen.

Literaturverzeichnis

- [1] K.S. Ahmed, I.A. Jahan, F. Jahan, and H. Hosain. Antioxidant activities and simultaneous HPLC-DAD profiling of polyphenolic compounds from *Moringa oleifera* Lam. Leaves grown in Bangladesh. *Food Research*, 5(1):401–408, 2021.
- [2] Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. *Molekularbiologie der Zelle*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 6. auflage edition, 2017.
- [3] Fatma Alhakmani, Sokindra Kumar, and Shah Alam Khan. Estimation of total phenolic content, in-vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of flowers of *Moringa oleifera*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(8):623–627, 2013.
- [4] Angel Josabad Alonso-Castro, Fabiola Domínguez, and Alejandro García-Carrancá. Rutin exerts antitumor effects on nude mice bearing SW480 tumor. *Archives of Medical Research*, 44(5):346–351, 2013.
- [5] N.K. Amaglo, G.M. Timpo, W.O. Ellis, and R.N. Bennett. Effect of Spacing and Harvest Frequency on the Growth and Leaf Yield of *Moringa* (*Moringa oleifera* Lam), a Leafy Vegetable Crop. *Moringa and other highly nutritious plant resources: strategies, standards and markets for a better impact on nutrition in Africa*, pages 1–15, 2006.
- [6] Frederic Amant, Philippe Moerman, Patrick Neven, Dirk Timmerman, Erik Van Limbergen, and Ignace Vergote. Endometrial cancer. *Lancet*, 366(9484):491–505, 2005.
- [7] Guohua An, Jorge Gallegos, and Marilyn E Morris. The Bioflavonoid Kaempferol Is an Abcg2 Substrate and Inhibits Abcg2-Mediated Quercetin Efflux. *Drug Metabolism and Disposition*, 39(3):426–432, 2011.
- [8] Farooq Anwar, Sajid Latif, Muhammad Ashraf, and Anwarul Hassan Gilani. *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 21(1):17–25, 2007.
- [9] Kelly Carolina Frauzino Araújo, Eula Maria Eula, Francine Pazini, Marize Campos Valadares, and Valéria De Oliveira. Bioconversion of quercetin and rutin and the cytotoxicity activities of the transformed products. *Food and Chemical Toxicology*, 51(1):93–96, 2013.

- [10] Milad Ashrafizadeh, Shima Tavakol, Zahra Ahmadi, Sahar Roomiani, Reza Mohammadinejad, and Saeed Samarghandian. Therapeutic effects of kaempferol affecting autophagy and endoplasmic reticulum stress. *Phytotherapy Research*, 34(5):911–923, 2020.
- [11] Fereshteh Bahmani, Fatemeh Rahimi Galougahi, Zahra Vahedpoor, Mehri Jamilian, Samaneh Mahmoodi, Raheleh Baghban, Tayebah Bagherian, Maryam Zarezade Mehrizi, and Zatollah Asemi. The effects of folic acid supplementation on recurrence and metabolic status in endometrial hyperplasia: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Archives of Iranian Medicine*, 21(10):452–459, 2018.
- [12] Elisa V. Bandera, Melony G. Williams, Camelia Sima, Sharon Bayuga, Katherine Pulick, Homer Wilcox, Robert Soslow, Ann G. Zaubler, and Sara H. Olson. Phytoestrogen consumption and endometrial cancer risk: A population-based case-control study in New Jersey. *Cancer Causes and Control*, 20(7):1117–1127, 2009.
- [13] John A. Barry, Mallika M. Azizia, and Paul J. Hardiman. Risk of endometrial, ovarian and breast cancer in women with polycystic ovary syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update*, 20(5):748–758, 2014.
- [14] Hiltrud Brauch, Thomas E. Mürdter, Michel Eichelbaum, and Matthias Schwab. Pharmacogenomics of tamoxifen therapy. *Clinical Chemistry*, 55(10):1770–1782, 2009.
- [15] Matthew J. Carlson, Kristina W. Thiel, and Kimberly K. Leslie. Past, present, and future of hormonal therapy in recurrent endometrial cancer. *International Journal of Women’s Health*, 6(1):429–435, 2014.
- [16] Lucy Caughey, Saira Sanjida, Andreas Obermair, and Monika Janda. The use of CAM products, practices, and practitioners by long-term endometrial cancer survivors in Australia. *Supportive Care in Cancer*, 28(11):5479–5489, 2020.
- [17] Allen Y. Chen and Yi Charlie Chen. A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food Chemistry*, 138(4):2099–2107, 2013.
- [18] P. Chen, C. Li, X. Li, J. Li, R. Chu, and H. Wang. Higher dietary folate intake reduces the breast cancer risk: A systematic review and meta-analysis. *British Journal of Cancer*, 110(9):2327–2338, 2014.
- [19] Agapiti Hipoliti Chuwa, Kenbun Sone, Katsutoshi Oda, Michihiro Tanikawa, Asako Kukita, Machiko Kojima, Shinya Oki, Tomohiko Fukuda, Makoto Takeuchi, Aki Miyasaka, Tomoko Kashiyama, Yuji Ikeda, Kazunori Nagasaka, Mayuyo Mori-Uchino, Yoko Matsumoto, Osamu Wada-Hiraike, Hiroyuki Kuramoto, Kei Kawana, Yutaka Osuga, and Tomoyuki Fujii. Kaempferol, a natural dietary flavonoid, suppresses 17 β -estradiol-induced survivin expression and causes apoptotic cell death in endometrial cancer. *Oncology Letters*, 16(5):6195–6201, 2018.
- [20] Santa Cirmi, Nadia Ferlazzo, Agnese Gugliandolo, Laura Musumeci, Emanuela Mazzon, Alessia Bramanti, and Michele Navarra. Moringin from moringa oleifera seeds inhibits growth, arrests cell-cycle, and induces apoptosis of SH-SY5Y human neuroblastoma cells through the modulation of NF-kB and apoptotic related factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8), 2019.

- [21] Jessica Claus, Carsten Fechner, Annette Zimpfer, and Andreas Erbersdobler. *Kurs Allgemeine Pathologie*. Springer-Verlag GmbH Deutschland, 2019.
- [22] Ilan Cohen, Eran Perel, Dov Flex, Ron Tepper, Marco M. Altaras, Mario Cordoba, and Yoram Beyth. Endometrial pathology in postmenopausal tamoxifen treatment: Comparison between gynaecologically symptomatic and asymptomatic breast cancer patients. *Journal of Clinical Pathology*, 52(4):278–282, 1999.
- [23] Collaborative Group on Epidemiological Studies on Endometrial Cancer. Endometrial cancer and oral contraceptives: An individual participant meta-analysis of 27 276 women with endometrial cancer from 36 epidemiological studies. *The Lancet Oncology*, 16(9):1061–1070, 2015.
- [24] Nicoletta Colombo, C. Creutzberg, F. Amant, T. Bosse, A. González-Martón, J. Ledermann, C. Marth, R. Nout, D. Querleu, M. R. Mirza, and C. Sessa. ESMO-ESGO-ESTRO consensus conference on endometrial cancer: Diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 27(1):16–41, 2016.
- [25] Carien L. Creutzberg, Remi A. Nout, Marnix L.M. Lybeert, Carla C. Wárlám-Rodenhuis, Jan J. Jobsen, Jan Willem M. Mens, Ludy C.H.W. Lutgens, Elisabeth Pras, Lonneke V. Van De Poll-Franse, and Wim L.J. Van Putten. Fifteen-year radiotherapy outcomes of the randomized PORTEC-1 trial for Endometrial Carcinoma. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 81(4):631–638, 2011.
- [26] Christina Davies, Hongchao Pan, Jon Godwin, Richard Gray, Rodrigo Arriagada, Vinod Raina, Mirta Abraham, Victor Hugo Medeiros Alencar, Atef Badran, Xavier Bonfill, Joan Bradbury, Michael Clarke, Rory Collins, Susan R. Davis, Antonella Delmestri, John F. Forbes, Peiman Haddad, Ming Feng Hou, Moshe Inbar, Hussein Khaled, Joanna Kielanowska, Wing Hong Kwan, Beela S. Mathew, Indraneel Mittra, Bettina Müller, Antonio Nicolucci, Octavio Peralta, Fany Pernas, Lubos Petruzela, Tadeusz Pienkowski, Ramachandran Radhika, Balakrishnan Rajan, Maryna T. Rubach, Sera Tort, Gerard Urrútia, Miriam Valentini, Yaochen Wang, and Richard Peto. Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *The Lancet*, 381(9869):805–816, 2013.
- [27] Santiago Diaz-Moralli, Míriam Tarrado-Castellarnau, Anibal Miranda, and Marta Cascante. Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. *Pharmacology and Therapeutics*, 138(2):255–271, 2013.
- [28] Joanne R Doherty, John L Cleveland, Joanne R Doherty, and John L Cleveland. Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics Review series Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(9):3685–3692, 2013.
- [29] Thilo Dörk, Peter Hillemanns, Clemens Tempfer, Julius Breu, and Markus C. Fleisch. Genetic susceptibility to endometrial cancer: Risk factors and clinical management. *Cancers*, 12(9):1–23, 2020.

- [30] Thilo Dörk, Peter Hillemanns, Clemens Tempfer, Julius Brey, and Markus C Fleisch. Genetic susceptibility to endometrial cancer: Risk factors and clinical management. *Cancers*, 12(9):2407, 2020.
- [31] Shuhei Ebara. Nutritional role of folate. *Congenital Anomalies*, 57(5):138–141, 2017.
- [32] A. F. El-Kott, A. A. Shati, M. A. Al-Kahtani, and S. A. Alharbi. Kaempferol induces cell death in A2780 ovarian cancer cells and increases their sensitivity to cisplatin by activation of cytotoxic endoplasmic reticulum-mediated autophagy and inhibition of protein kinase B. *Folia Biologica (Czech Republic)*, 66(1):36–46, 2020.
- [33] Harold Ellis. Anatomy of the uterus. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, 12(3):99–101, 2011.
- [34] Günter Emons and Eric Steiner. S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge der Patientinnen mit EndometriumkarzinomS. *Der Gynäkologe*, 51(12):996–999, 2018.
- [35] Günter Emons and Eric Steiner. S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge der Patientinnen mit EndometriumkarzinomS3 guideline diagnosis, treatment, and aftercare of endometrial cancer patients. *Der Gynäkologe*, 51(12):996–999, 2018.
- [36] K. Engelhard. Endometriumkarzinom. *Radiologe*, 51(7):596–601, 2011.
- [37] Atilla Engin. Obesity-associated breast cancer: Analysis of risk factors. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 960(November):571–606, 2017.
- [38] Ma. Corazon P. Estrella, Jacinto Bias V. Mantaring III, Grace Z. David, and Michelle A. Taup. A double-blind, randomized controlled trial on the use of malunggay (*Moringa oleifera*) for augmentation of the volume of breastmilk among non-nursing mothers of preterm infants. *golacta.com*, 49(1):3–6, 2000.
- [39] Emily J. Fearnley, Louise Marquart, Amanda B. Spurdle, Philip Weinstein, and Penelope M. Webb. Polycystic ovary syndrome increases the risk of endometrial cancer in women aged less than 50 years: An Australian case-control study. *Cancer Causes and Control*, 21(12):2303–2308, 2010.
- [40] Napoleone Ferrara, Hans-Peter Gerber, and Jennifer LeCouter. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine*, 9(6):669–676, 2003.
- [41] David R. Ferry, Anna Smith, Joy Malkhandi, David W. Fyfe, Philippa G. DeTakats, David Anderson, Jim Baker, and David J. Kerr. Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: Pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition. *Clinical Cancer Research*, 2(4):659–668, 1996.
- [42] M.V. Fiandalo and N. Kyprianou. CASPASE CONTROL: PROTAGONISTS OF CANCER CELL APOPTOSIS. *Bone*, 34(3):165–175, 2012.

- [43] C A Fleming, H M Heneghan, D O'Brien, D P McCartan, E W McDermott, and R S Prichard. Meta-analysis of the cumulative risk of endometrial malignancy and systematic review of endometrial surveillance in extended tamoxifen therapy. *British Journal of Surgery*, 105(9):1098–1106, 2018.
- [44] Raja M. Flores, Kenneth E. Rosenzweig, and Valerie W. Rusch. Surgery and postoperative radiotherapy. *Malignant Mesothelioma: Advances in Pathogenesis, Diagnosis, and Translational Therapies*, 355:678–695, 2005.
- [45] Aditya Ganeshpurkar and Ajay K. Saluja. The Pharmacological Potential of Rutin. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(2):149–164, 2017.
- [46] B Gerber, A Krause, H Müller, T Reimer, T Külz, J Makovitzky, G Kundt, and K Friese. Effects of adjuvant tamoxifen on the endometrium in postmenopausal women with breast cancer: a prospective long-term study using transvaginal ultrasound. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 18(20):3464–3470, oct 2000.
- [47] Manfred Gey. *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik : Biosubstanzen, Trennmethoden, Strukturanalytik, Applikationen*. Lehrbuch. Springer Spektrum, [Berlin, u.a.], 3. aufl. edition, 2015.
- [48] Jennifer M. Gierisch, Remy R. Coeytaux, Rachel Peragallo Urrutia, Laura J. Havrilesky, Patricia G. Moorman, William J. Lowery, Michaela Dinan, Amanda J. McBroom, Vic Hasselblad, Gillian D. Sanders, and Evan R. Myers. Oral contraceptive use and risk of breast, cervical, colorectal, and endometrial cancers: A systematic review. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 22(11):1931–1943, 2013.
- [49] Gang Gong, Ying Yun Guan, Zhong Lin Zhang, Khalid Rahman, Su Juan Wang, Shuang Zhou, Xin Luan, and Hong Zhang. Isorhamnetin: A review of pharmacological effects. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 128(May), 2020.
- [50] Tae Eun Guon and Ha Sook Chung. Moringa oleifera fruit induce apoptosis via reactive oxygen species-dependent activation of mitogen-activated protein kinases in human melanoma A2058 cells. *Oncology Letters*, 14(2):1703–1710, 2017.
- [51] Nissim Hay. Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? *Nature Reviews Cancer*, 16(10):635–649, 2016.
- [52] Viola Heinzlmann-Schwarz, André B. Kind, Marcus Vetter, Kenneth Russell, Siti Omar, Andreas Schoetzau, Kerstin Hoeck, Daniel Fink, Michael L. Friedlander, and Neville F. Hacker. Should MMT still be treated with adjuvant taxane-based combination chemotherapy? *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 146(3):695–704, 2020.
- [53] L. Helpman, R. Kupets, A. Covens, R. S. Saad, M. A. Khalifa, N. Ismiil, Z. Ghorab, V. Dubé, and S. Nofech-Mozes. Assessment of endometrial sampling as a predictor of final surgical pathology in endometrial cancer. *British Journal of Cancer*, 110(3):609–615, 2014.
- [54] Hartmut Henß. *Therapieshandbuch Gynäkologie und Geburtshilfe*. Springer Berlin Heidelberg, 2020.

- [55] L. C. Horn, G. Emons, S. Aretz, N. Bock, M. Follmann, S. Lax, M. Nothacker, E. Steiner, and D. Mayr. S3 guidelines on the diagnosis and treatment of carcinoma of the endometrium: Requirements for pathology. *Pathologe*, 40(1):21–35, 2019.
- [56] Pamela L. Horn-Ross, Esther M. John, Alison J. Canchola, Susan L. Stewart, and Marion M. Lee. Phytoestrogen intake and endometrial cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*, 95(15):1158–1164, 2003.
- [57] Kangmao Huang, Yanyan Chen, Rui Zhang, Yizheng Wu, Yan Ma, Xiangqian Fang, and Shuying Shen. Honokiol induces apoptosis and autophagy via the ROS/ERK1/2 signaling pathway in human osteosarcoma cells in vitro and in vivo article. *Cell Death and Disease*, 9(2), 2018.
- [58] Atanas Ignatov and Olaf Ortmann. Endocrine risk factors of endometrial cancer: Polycystic ovary syndrome, oral contraceptives, infertility, tamoxifen. *Cancers*, 12(7):1–10, 2020.
- [59] Marcello Iriti, Robert Kubina, Andrea Cochis, Rita Sorrentino, Elena M. Varoni, Agata Kabala-Dzik, Barbara Azzimonti, Arkadiusz Dziedzic, Lia Rimondini, and Robert D. Wojtyczka. Rutin, a Quercetin Glycoside, Restores Chemosensitivity in Human Breast Cancer Cells. *Phytotherapy Research*, 31(10):1529–1538, 2017.
- [60] Sarwat Jahan, Faryal Munir, Suhail Razak, Anam Mehboob, Qurat Ul Ain, Hizb Ullah, Tayyaba Afsar, Ghazala Shaheen, and Ali Almajwal. Ameliorative effects of rutin against metabolic, biochemical and hormonal disturbances in polycystic ovary syndrome in rats. *Journal of Ovarian Research*, 9(1):1–9, 2016.
- [61] Meera G. Jain, Thomas E. Rohan, Geoffrey R. Howe, and Anthony B. Miller. A cohort study of nutritional factors and endometrial cancer. *European Journal of Epidemiology*, 16(10):899–905, 2000.
- [62] Mie Jareid, Jean-Christophe Thalabard, Morten Aarflot, Hege M Bøvelstad, Eiliv Lund, and Tonje Braaten. Levonorgestrel-releasing intrauterine system use is associated with a decreased risk of ovarian and endometrial cancer, without increased risk of breast cancer. Results from the NOWAC Study. *Gynecologic Oncology*, 149(1):127–132, apr 2018.
- [63] Johanna Krüger. *Untersuchung der Wirkung des Moringa oleifera-Extraktes auf den Tonus der glatten Muskulatur*. PhD thesis, Universität Rostock, 2016.
- [64] Y. Kalogo, F. Rosillon, F. Hammes, and W. Verstraete. Effect of a water extract of Moringa oleifera seeds on the hydrolytic microbial species diversity of a UASB reactor treating domestic wastewater. *Letters in Applied Microbiology*, 31(3):259–264, 2000.
- [65] Masanori Kaneuchi, Masahiro Sasaki, Yuichiro Tanaka, Noriaki Sakuragi, Seiichiro Fujimoto, and Rajvir Dahiya. Quercetin regulates growth of Ishikawa cells through the suppression of EGF and cyclin D1. *International journal of oncology*, 22(1):159–164, 2003.
- [66] T. J.A. Key and M. C. Pike. The dose-effect relationship between ‘unopposed’ oestrogens and endometrial mitotic rate: Its central role in explaining and predicting endometrial cancer risk. *British Journal of Cancer*, 57(2):205–212, 1988.

- [67] Rasha Khalid Abbas, Fatma S Elsharbasy, and Abdalfatah Abdalla Fadlelmula. Nutritional Values of *Moringa oleifera*, Total Protein, Amino Acid, Vitamins, Minerals, Carbohydrates, Total Fat and Crude Fiber, under the Semi-Arid Conditions of Sudan. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 10(2):56–58, 2018.
- [68] Dong Hyun Kim, Stephanie A. Smith-Warner, Donna Spiegelman, Shiaw Shyuan Yaun, Graham A. Colditz, Jo L. Freudenheim, Edward Giovannucci, R. Alexandra Goldbohm, Saxon Graham, Lisa Harnack, Eric J. Jacobs, Michael Leitzmann, Satu Mannisto, Anthony B. Miller, John D. Potter, Thomas E. Rohan, Arthur Schatzkin, Frank E. Speizer, Victoria L. Stevens, Rachael Stolzenberg-Solomon, Paul Terry, Paolo Toniolo, Matty P. Weijenberg, Walter C. Willett, Alicja Wolk, Anne Zeleniuch-Jacquotte, and David J. Hunter. Pooled analyses of 13 prospective cohort studies on folate intake and colon cancer. *Cancer Causes and Control*, 21(11):1919–1930, 2010.
- [69] S. P.S. Kochar, P. Arora, and A. B. Chattopadhyay. Tamoxifen therapy for breast cancer and endometrial pathology. *Medical Journal Armed Forces India*, 61(4):313–315, 2005.
- [70] M. B. Krawinkel, D. Strohm, A. Weissenborn, B. Watzl, M. Eichholzer, K. Bärlocher, I. Elmadfa, E. Leschik-Bonnet, and H. Heseker. Revised D-A-CH intake recommendations for folate: How much is needed? *European Journal of Clinical Nutrition*, 68(6):719–723, 2014.
- [71] Francis P. Kuhajda. Fatty acid synthase and cancer: New application of an old pathway. *Cancer Research*, 66(12):5977–5980, 2006.
- [72] D Jalaja Kumari. Hypoglycaemic effect of *Moringa oleifera* and *Azadirachta indica* in type 2 Diabetes mellitus. *The Bioscan*, 5(2):211–214, 2010.
- [73] Shalini Kushwaha, Paramjit Chawla, and Anita Kochhar. Effect of supplementation of drumstick (*Moringa oleifera*) and amaranth (*Amaranthus tricolor*) leaves powder on antioxidant profile and oxidative status among postmenopausal women. *Journal of Food Science and Technology*, 51(11):3464–3469, 2014.
- [74] Ioannis Kyrou, Emmanouil Karteris, Tim Robbins, Kamaljit Chatha, Fotios Drenos, and Harpal S. Randeva. Polycystic ovary syndrome (PCOS) and COVID-19: An overlooked female patient population at potentially higher risk during the COVID-19 pandemic. *BMC Medicine*, 18(1):1–10, 2020.
- [75] Gudrun Lang. Immunohistochemie. In *Histotechnik*, pages 269–304. Springer, 2013.
- [76] Seul Lee, Yun Hwa Kim, Seung Chul Kim, Jong Kil Joo, Dong Suh Seo, Ki Hyung Kim, and Kyu Sup Lee. The effect of tamoxifen therapy on the endometrium and ovarian cyst formation in patients with breast cancer. *Obstetrics and Gynecology Science*, 61(5):615–620, 2018.
- [77] Yu-Ru Lee, Ming Chen, and Pier Paolo Pandolfi. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor: new modes and prospects. *Nature reviews Molecular cell biology*, 19(9):547–562, 2018.
- [78] Xia Lei, Jing Guo, Yuan Wang, Jie Cui, Bei Feng, Yani Su, Hong Zhao, Weiwei Yang, and Yunfeng Hu. Inhibition of endometrial carcinoma by Kaempferol is interceded through apoptosis induction,

G2/M phase cell cycle arrest, suppression of cell invasion and upregulation of m-TOR/PI3K signalling pathway. *Journal of B.U.ON.*, 24(4):1555–1561, 2019.

- [79] Alessandro Leone, Giovanni Fiorillo, Franca Criscuoli, Stefano Ravasenghi, Laura Santagostini, Gelsomina Fico, Angela Spadafranca, Alberto Battezzati, Alberto Schiraldi, Federica Pozzi, Sara Di Lello, Sandro Filippini, and Simona Bertoli. Nutritional characterization and phenolic profiling of moringa oleifera leaves grown in chad, sahwari refugee camps, and Haiti. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8):18923–18937, 2015.
- [80] Chenglin Li, Peizhan Chen, Pingting Hu, Mian Li, Xiaoguang Li, He Guo, Jingquan Li, Ruiiai Chu, Wei Zhang, and Hui Wang. Folate intake and MTHFR polymorphism C677T is not associated with ovarian cancer risk: Evidence from the meta-analysis. *Molecular Biology Reports*, 40(12):6547–6560, 2013.
- [81] Qiong Li, Fu Qiang Ren, Chun Lei Yang, Li Ming Zhou, Yan You Liu, Jing Xiao, Ling Zhu, and Zhen Grong Wang. Anti-proliferation Effects of Isorhamnetin on Lung Cancer Cells in Vitro and in Vivo. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(7):3035–3042, 2015.
- [82] Siaw Cheok Liew. Folic acid and diseases - Supplement it or not? *Revista da Associacao Medica Brasileira*, 62(1):90–100, 2016.
- [83] Hyeong Seok Lim, Han Ju Lee, Keun Seok Lee, Eun Sook Lee, In Jin Jang, and Jungsil Ro. Clinical implications of CYP2D6 genotypes predictive of tamoxifen pharmacokinetics in metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 25(25):3837–3845, 2007.
- [84] Jing-Pin Lin, Jai-Sing Yang, Jen-Jyh Lin, Kuang-Chi Lai, Hsu-Feng Lu, Chia-Yu Ma, Rick Sai-Chuen Wu, King-Chuan Wu, Fu-Shin Chueh, W. Gibson Wood, and Chung Jing-Gung. First record of the ground beetle *Trechoblemus postilenatus* (Coleoptera, Carabidae) in Primorskii krai. *Far Eastern Entomologist*, 165(April):16, 2006.
- [85] Qiao Lin, Xiu-Ying Chen, Ji Zhang, Yong-Liang Yuan, Wen Zhao, and Bo Wei. Upregulation of SIRT1 contributes to the cardioprotective effect of Rutin against myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Journal of Functional Foods*, 46:227–236, 2018.
- [86] Massimo Loda, Toshiro Migita, Stacey Ruiz, Alessandro Fornari, Michelangelo Fiorentino, Carmen Priolo, Giorgia Zadra, Fumika Inazuka, Chiara Grisanzio, Emanuele Palescandolo, Eyoung Shin, Christopher Fiore, Wanling Xie, Andrew L. Kung, Phillip G. Febbo, Aravind Subramanian, Lorelei Mucci, Jing Ma, Sabina Signoretti, Meir Stampfer, William C. Hahn, and Stephen Finn. Fatty acid synthase: A metabolic enzyme and candidate oncogene in prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 101(7):519–532, 2009.
- [87] Jana Lu, Britton Trabert, Linda M. Liao, Ruth M. Pfeiffer, and Kara A. Michels. Dietary intake of nutrients involved in folate-mediated one-carbon metabolism and risk for endometrial cancer. *International Journal of Epidemiology*, 48(2):474–488, 2019.
- [88] Frida E. Lundberg, Anastasia N. Iliadou, Kenny Rodriguez-Wallberg, Kristina Gemzell-Danielsson, and Anna L.V. Johansson. The risk of breast and gynecological cancer in women with a diagnosis of

- infertility: a nationwide population-based study. *European Journal of Epidemiology*, 34(5):499–507, 2019.
- [89] Haitao Luo, Bing-Hua Jiang, Sarah M King, and Yi Charlie Chen. Inhibition of Cell Growth and VEGF Expression in Ovarian Cancer Cells by Flavonoids. *Nutrition and Cancer*, 60(6):800–809, 2008.
- [90] J. Luo, S. Beresford, C. Chen, R. Chlebowski, L. Garcia, L. Kuller, M. Regier, J. Wactawski-Wende, and K. L. Margolis. Association between diabetes, diabetes treatment and risk of developing endometrial cancer. *British journal of cancer*, 111(7):1432–1439, 2014.
- [91] M. Patricia Madigan, Rebecca Troisi, Nancy Potischman, Joanne F. Dorgan, Louise A. Brinton, and Robert N. Hoover. Serum hormone levels in relation to reproductive and lifestyle factors in postmenopausal women (United States). *Cancer Causes and Control*, 9(2):199–207, 1998.
- [92] L. Madlensky, L. Natarajan, S. Tchu, M. Pu, J. Mortimer, S. W. Flatt, D. M. Nikoloff, G. Hillman, M. R. Fontecha, H. J. Lawrence, B. A. Parker, A. H.B. Wu, and J. P. Pierce. Tamoxifen metabolite concentrations, CYP2D6 genotype, and breast cancer outcomes. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 89(5):718–725, 2011.
- [93] Philip Marahrens. Die Wirkung von grünem Tee und Matchatee, sowie ihrer Bestandteile Epigallocatechingallat und Quercetin auf MCF-7- und MDA-MB-231-Brustkarzinomzellen, 2020.
- [94] O Markovitch, R Tepper, A Fishman, R Aviram, and Ilan Cohen. Long-term follow-up of postmenopausal breast cancer patients following discontinuation of tamoxifen therapy. *Maturitas*, 59(4):387–393, 2008.
- [95] Pierre PL Martin-Hirsch, Andrew Bryant, Sarah L Keep, Henry C Kitchener, and Richard Lilford. Adjuvant progestagens for endometrial cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (6), 2011.
- [96] Zankhana Master, Amit Chaudhary, Thomas R. Sutter, and Kristine L. Willett. Effects of flavonoids on CYP1 expression in RL95-2 endometrial carcinoma cells. *Food Chemistry*, 133(3):912–922, 2012.
- [97] H Matsubara, Y Hashiguchi, M Kasai, T Fukuda, T Ichimura, T Yasui, and T Sumi. Case Report Serous endometrial intraepithelial carcinoma diagnosed by hysteroscopic transcervical resection. Technical Report October, Department of Obstetrics and Gynecology, Osaka City University Graduate School of Medicine, Osaka (Japan), 2019.
- [98] Kara A Michels, Ruth M Pfeiffer, Louise A Brinton, and Britton Trabert. Modification of the Associations Between Duration of Oral Contraceptive Use and Ovarian, Endometrial, Breast, and Colorectal Cancers. *JAMA Oncology*, 4(4):516–521, apr 2018.
- [99] Kara A. Michels, Jean Wactawski-Wende, James L. Mills, Karen C. Schliep, Audrey J. Gaskins, Edwina H. Yeung, Keewan Kim, Torie C. Plowden, Lindsey A. Sjaarda, Ellen N. Chaljub, and Sunni L. Mumford. Folate, homocysteine and the ovarian cycle among healthy regularly menstruating women. *Human Reproduction*, 32(8):1743–1750, 2017.

- [100] Busani Moyo, Patrick J. Masika, Arnold Hugo, and Voster Muchenje. Nutritional characterization of Moringa (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *African Journal of Biotechnology*, 10(60):12925–12933, 2011.
- [101] Vanisha S Nambiar, Parul Guin, Shilpa Parnami, and Mammen Daniel. Impact of Antioxidants from Drumstick Leaves on the Lipid Profile of Hyperlipidemics. *Journal of Herbal Medicine and Toxicology*, 4(1):165–172, 2010.
- [102] Anselme Ndabigengesere and K. Subba Narasiah. Quality of water treated by coagulation using *Moringa oleifera* seeds. *Water Research*, 32(3):781–791, 1998.
- [103] Annette S. Neill, Torukiri I. Ibiebele, Petra H. Lahmann, Maria Celia Hughes, Christina M. Nagle, and Penelope M. Webb. Dietary phyto-oestrogens and the risk of ovarian and endometrial cancers: Findings from two Australian case-control studies. *British Journal of Nutrition*, 111(8):1430–1440, 2014.
- [104] Masato Nishida. The Ishikawa cells from birth to the present. *Human cell*, 15(3):104–117, sep 2002.
- [105] Zeinab Nouri, Sajad Fakhri, Keyvan Nouri, Carly E. Wallace, Mohammad Hosein Farzaei, and Anupam Bishayee. Targeting multiple signaling pathways in cancer: The rutin therapeutic approach. *Cancers*, 12(8):1–34, 2020.
- [106] R. A. Nout, V. Smit, H. Putter, I. M. Jürgenliemk-Schulz, J. J. Jobsen, L. Lutgens, E. M. van der Steen-Banasik, J. Mens, A. Slot, M. C. Stenfert Kroese, B. van Bunningen, A. C. Ansink, W. van Putten, and C. L. Creutzberg. Vaginal brachytherapy versus pelvic external beam radiotherapy for patients with endometrial cancer of high-intermediate risk (PORTEC-2): an open-label, non-inferiority, randomised trial. *The Lancet*, 375(9717):816–823, 2010.
- [107] A O Ogbe and John P Affiku. Proximate Study, Mineral and Anti-Nutrient Composition of *Moringa Oleifera* Leaves Harvested From Lafia, Nigeria: Potential Benefits in Poultry Nutrition and Health. *Journal of Microbiology*, 12(3):296–308, 2011.
- [108] Sara H. Olson, Elizabeth Jewell, and Radhai M. Rastogi. Endometrial Cancer. *Women and Health*, pages 1147–1158, 2013.
- [109] A. N. Panche, A. D. Diwan, and S. R. Chandra. Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5, 2016.
- [110] Cheol Park, Hee Jae Cha, Eun Ok Choi, Hyesook Lee, Hyun Hwang-Bo, Seon Yeong Ji, Min Yeong Kim, So Young Kim, Su Hyun Hong, Jae Hun Cheong, Gi Young Kim, Seok Joong Yun, Hye Jin Hwang, Wun Jae Kim, and Yung Hyun Choi. Isorhamnetin induces cell cycle arrest and apoptosis via reactive oxygen species-mediated AMP-activated protein kinase signaling pathway activation in human bladder cancer cells. *Cancers*, 11(10), 2019.
- [111] Liu Pengfei, Deng Tiansheng, Hou Xianglin, and Wang Jianguo. Antioxidant properties of isolated isorhamnetin from the sea buckthorn marc. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64(2):141–145, 2009.

- [112] Hong Ngoc Thuy Pham, Jennette A. Sakoff, Quan Van Vuong, Michael C. Bowyer, and Christopher J. Scarlett. Comparative cytotoxic activity between kaempferol and gallic acid against various cancer cell lines. *Data in Brief*, 21:1033–1036, 2018.
- [113] Renee Pieroth, Stephanie Paver, Sharon Day, and Carolyn Lammersfeld. Folate and Its Impact on Cancer Risk. *Current Nutrition Reports*, 7(3):70–84, 2018.
- [114] Poyil Pratheeshkumar, Amit Budhraj, Young Ok Son, Xin Wang, Zhuo Zhang, Songze Ding, Lei Wang, Andrew Hitron, Jeong Chae Lee, Mei Xu, Gang Chen, Jia Luo, and Xianglin Shi. Quercetin Inhibits Angiogenesis Mediated Human Prostate Tumor Growth by Targeting VEGFR-2 Regulated AKT/mTOR/P70S6K Signaling Pathways. *PLoS ONE*, 7(10):1–10, 2012.
- [115] Promega. CellTiter-Glo [®] Luminescent Cell Viability Assay Cell Viability Assay. www.promega.com, 2015.
- [116] Promega. Cytotoxicity Assay CytoTox-Glo [™] Cytotoxicity Assay. www.promega.com, 2017.
- [117] Feng Qi, Ji-hao Sun, Jia-qun Yan, Chun-mei Li, and Xue-chao Lv. Anti-inflammatory effects of isorhamnetin on LPS-stimulated human gingival fibroblasts by activating Nrf2 signaling pathway. *Microbial Pathogenesis*, 120:37–41, 2018.
- [118] Gertrud Rehner and Hannelore Daniel. *Biochemie der Ernährung*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 3. auflage edition, 2010.
- [119] Marjorie Reyes-Farias and Catalina Carrasco-Pozo. The anti-cancer effect of quercetin: Molecular implications in cancer metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13):1–19, 2019.
- [120] Robert Koch-Institut. Krebs in Deutschland für 2015 / 2016. Technical Report 12. Ausgabe, Robert-Koch-Institut, 2019.
- [121] Roche. Cell Proliferation ELISA , BrdU (colorimetric). sigma-aldrich.com, 2018.
- [122] Adriana C. Rodriguez, Zannel Blanchard, Kathryn A. Maurer, and Jason Gertz. Estrogen Signaling in Endometrial Cancer: a Key Oncogenic Pathway with Several Open Questions. *Hormones and Cancer*, 10(2-3):51–63, 2019.
- [123] V. Rosato, A. Zucchetto, C. Bosetti, L. Dal Maso, M. Montella, C. Pelucchi, E. Negri, S. Franceschi, and C. La Vecchia. Metabolic syndrome and endometrial cancer risk. *Annals of Oncology*, 22(4):884–889, 2011.
- [124] Atanu Singha Roy, Debi Ranjan Tripathy, Sintu Samanta, Sudip K Ghosh, and Swagata Dasgupta. DNA damaging, cell cytotoxicity and serum albumin binding efficacy of the rutin-Cu(II) complex. *Molecular bioSystems*, 12(5):1687–1701, apr 2016.
- [125] Eduardo Salazar-Martínez, Eduardo Cesar Lazcano-Ponce, Guillermo González Lira-Lira, Pedro Escudero-De Los Ríos, Jorge Salmerón-Castro, Fernando Larrea, and Mauricio Hernández-Avila. Case-control study of diabetes, obesity, physical activity and risk of endometrial cancer among Mexican women. *Cancer Causes and Control*, 11(8):707–711, 2000.

- [126] Amira Saleh, Hassan M. ElFayoumi, Mahmoud Youns, and Waleed Barakat. Rutin and orlistat produce antitumor effects via antioxidant and apoptotic actions. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 392(2):165–175, 2019.
- [127] A. B. Sanchez-Spitman, J. J. Swen, V. O. Dezentje, D. J.A.R. Moes, H. Gelderblom, and H. J. Guchelaar. Clinical pharmacokinetics and pharmacogenetics of tamoxifen and endoxifen. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 12(6):523–536, 2019.
- [128] Francesca Sanguedolce, Antonella Cormio, Paolo Massenio, Maria C. Pedicillo, Simona Cagiano, Francesca Fortunato, Beppe Calò, Giuseppe Di Fino, Giuseppe Carrieri, Pantaleo Bufo, and Luigi Cormio. Altered expression of HER-2 and the mismatch repair genes MLH1 and MSH2 predicts the outcome of T1 high-grade bladder cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 144(4):637–644, 2018.
- [129] Rosaria Santangelo, Andrea Silvestrini, and Cesare Mancuso. Ginsenosides, catechins, quercetin and gut microbiota: Current evidence of challenging interactions. *Food and Chemical Toxicology*, 123:42–49, 2019.
- [130] G. Scambia, F. O. Ranelletti, P. Benedetti Panici, M. Piantelli, G. Bonanno, R. De Vincenzo, G. Ferrandina, N. Maggiano, A. Capelli, and S. Mancuso. Inhibitory effect of quercetin on primary ovarian and endometrial cancers and synergistic activity with cis-diamminedichloroplatinum(II). *Gynecologic Oncology*, 45(1):13–19, 1992.
- [131] Suho Seo, Kyuhwa Seo, Sung Hwan Ki, and Sang Mi Shin. Isorhamnetin inhibits reactive oxygen species-dependent hypoxia inducible factor (HIF)-1 α accumulation. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 39(11):1830–1838, 2016.
- [132] Karuna Shanker, Madan M. Gupta, Santosh K. Srivastava, Dnyaneshwar U. Bawankule, Anirban Pal, and Suman P.S. Khanuja. Determination of bioactive nitrile glycoside(s) in drumstick (*Moringa oleifera*) by reverse phase HPLC. *Food Chemistry*, 105(1):376–382, 2007.
- [133] Sigma-Aldrich. In Vitro Toxicology Assay Kit Neutral Red Based. *sigma-aldrich.com*, pages 4–5.
- [134] Barbara Stella, Silvia Arpicco, Maria Teresa Peracchia, Didier Desmaële, Johan Hoebeke, Michel Renoir, Jean D'Angelo, Luigi Cattell, and Patrick Couvreur. Design of Folic Acid-Conjugated Nanoparticles for Drug Targeting. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 89(11):1452–1464, 2000.
- [135] Sidney J. Stohs and Michael J. Hartman. Review of the safety and efficacy of *Moringa oleifera*. *Phytotherapy Research*, 29(6):796–804, 2015.
- [136] Chaoyang Sun, Gang Chen, Zongyuan Yang, Jie Jiang, Xingsheng Yang, Na Li, Bo Zhou, Tao Zhu, Juncheng Wei, Danhui Weng, Ding Ma, Changyu Wang, and Beihua Kong. Safety of ovarian preservation in young patients with early-stage endometrial cancer: A retrospective study and meta-analysis. *Fertility and Sterility*, 100(3):782–787.e5, 2013.
- [137] Karin Tamm, Miia Rõõm, Andres Salumets, and Madis Metsis. Genes targeted by the estrogen and progesterone receptors in the human endometrial cell lines HEC1A and RL95-2. *BioMed Central*, 12:1–12, 2009.

- [138] Si Min Tang, Xue Ting Deng, Jian Zhou, Quan Peng Li, Xian Xiu Ge, and Lin Miao. Pharmacological basis and new insights of quercetin action in respect to its anti-cancer effects. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 121(July 2019):109604, 2020.
- [139] Tate Thigpen, Mark F Brady, Howard D Homesley, John T Soper, and Jeffrey Bell. Tamoxifen in the Treatment of Advanced or Recurrent Endometrial Carcinoma: A Gynecologic Oncology Group Study. *Journal of Clinical Oncology*, 19(2):364–367, 2001.
- [140] Asma Vafadar, Zahra Shabaninejad, Ahmad Movahedpour, Farzaneh Fallahi, Mona Taghavipour, Younes Ghasemi, Maryam Akbari, Alimohammad Shafiee, Sarah Hajighadimi, Sanaz Moradizarmehri, Ebrahim Razi, Amir Savardashtaki, and Hamed Mirzaei. Quercetin and cancer: New insights into its therapeutic effects on ovarian cancer cells. *Cell and Bioscience*, 10(1):1–17, 2020.
- [141] Ingrid Vandenput, Jone Trovik, Ignace Vergote, Philippe Moerman, Karin Leunen, Patrick Berteloot, Patrick Neven, Helga Salvesen, and Frédéric Amant. The Role of Adjuvant Chemotherapy in Surgical Stages I-II Serous and Clear Cell Carcinomas and Carcinosarcoma of the Endometrium: A Collaborative Study. *International Journal of Gynecologic Cancer*, 21(2):332–336, 2011.
- [142] Boonyadist Vongsak, Pongtip Sithisarn, and Wandee Gritsanapan. Simultaneous HPLC quantitative analysis of active compounds in leaves of moringa oleifera lam. *Journal of Chromatographic Science*, 52(7):641–645, 2014.
- [143] Joan L. Walker, Marion R. Piedmonte, Nick M. Spirtos, Scott M. Eisenkop, John B. Schlaerth, Robert S. Mannel, Gregory Spiegel, Richard Barakat, Michael L. Pearl, and Sudarshan K. Sharma. Laparoscopy compared with laparotomy for comprehensive surgical staging of uterine cancer: Gynecologic Oncology Group Study LAP2. *Journal of Clinical Oncology*, 27(32):5331–5336, 2009.
- [144] Jia Li Wang, Qinghua Quan, Ruifang Ji, Xiao Yu Guo, Jia Mei Zhang, Xia Li, and Yong Gang Liu. Isorhamnetin suppresses PANC-1 pancreatic cancer cell proliferation through S phase arrest. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 108(September):925–933, 2018.
- [145] Xueni Wang, Yuting Yang, Yating An, and Gang Fang. The mechanism of anticancer action and potential clinical use of kaempferol in the treatment of breast cancer. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 117(May):109086, 2019.
- [146] Dennis L Way, David S Grosso, John R Davis, Earl A Surwit, C D Christian, and W A Y E T Al. Characterization of a new human endometrial carcinoma (RL95-2) established in tissue culture. *In Vitro*, 19(3), 1983.
- [147] Willem Jan Van Weelden and Leon F A G Massuger. Anti-estrogen Treatment in Endometrial Cancer : A Systematic Review. *frontiers in Oncology*, 9(May), 2019.
- [148] Jürgen Weiss, Klaus Diedrich, Askan Schultze-Mosgau, Wolfgang Holzgreve, Walter Jonat, and Klaus-Theo M. Schneider. *Gynäkologie und Geburtshilfe*. Springer-Lehrbuch. Springer Medizin Verlag Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2., völlig edition, 2007.
- [149] Natascha Weiß, Daniel Wehrhahn, and Sarah Shultz. Untersuchung der Eignung weißer Eppendorf Polypropylen Microplates für den Promega CellTiter-Glo ® Luminescent Assay. *Applications Eppendorf Technical Report*, 2009.

- [150] Charles W Whitney, Virginia L Brunetto, Richard J Zaino, Samuel S Lentz, Joel Sorosky, Deborah K Armstrong, and Roger B Lee. Phase II study of medroxyprogesterone acetate plus tamoxifen in advanced endometrial carcinoma : a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecologic Oncology*, 92:4–9, 2004.
- [151] P. Widschwendter, B. Welte, N. de Gregorio, W. Janni, and C. Scholz. Diagnostik und Therapie des Endometriumkarzinoms. *Gynakologe*, 50(5):343–356, 2017.
- [152] Cheng Hsun Wu, Ming Cheng Lin, Hsueh Chun Wang, Mon Yuan Yang, Ming Jia Jou, and Chau Jong Wang. Rutin Inhibits Oleic Acid Induced Lipid Accumulation via Reducing Lipogenesis and Oxidative Stress in Hepatocarcinoma Cells. *Journal of Food Science*, 76(2):T65–T72, 2011.
- [153] Jun Xu, Hu-Biao Chen, and Song-Lin Li. Understanding the molecular mechanisms of the interplay between herbal medicines and gut microbiota. *Medicinal Research Reviews*, 37(5):1140–1185, 2017.
- [154] Wang Hong Xu, Martha J. Shrubsole, Yong Bing Xiang, Qiuyin Cai, Gen Ming Zhao, Zhi Xian Ruan, Jia Rong Cheng, Wei Zheng, and Ou Shu Xiao. Dietary folate intake, MTHFR genetic polymorphisms, and the risk of endometrial cancer among Chinese women. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 16(2):281–287, 2007.
- [155] H. P. Yang, L. S. Cook, E. Weiderpass, H. O. Adami, K. E. Anderson, H. Cai, J. R. Cerhan, T. V. Clendenen, A. S. Felix, C. M. Friedenreich, M. Garcia-Closas, M. T. Goodman, X. Liang, J. Lissowska, L. Lu, A. M. Magliocco, S. E. Mccann, K. B. Moysich, S. H. Olson, S. Petruzella, M. C. Pike, S. Polidoro, F. Ricceri, H. A. Risch, C. Sacerdote, V. W. Setiawan, X. O. Shu, A. B. Spurdle, B. Trabert, P. M. Webb, N. Wentzensen, Y. B. Xiang, Y. Xu, H. Yu, A. Zeleniuch-Jacquotte, and L. A. Brinton. Infertility and incident endometrial cancer risk: A pooled analysis from the epidemiology of endometrial cancer consortium (E2C2). *British Journal of Cancer*, 112(5):925–933, 2015.
- [156] S. Yani, T. Opik, R. Siti, K. Ida, and P. Epa. In silico analysis of kaempferol as a competitor of estrogen on estrogen receptor alpha of endometrial cancer. *Journal of Physics: Conference Series*, 1402(6):0–5, 2019.
- [157] Noah Zafran, Alexandra Levin, Shlomit Goldman, and Eliezer Shalev. [Progesterone receptor’s profile and the effect of the hormone and its derivatives on invasiveness and MMP2 secretion in endometrial carcinoma cell lines]. *Harefuah*, 148(7):416–9, 477, jul 2009.
- [158] Fan Zhang and Cuimei Ma. Kaempferol suppresses human gastric cancer SNU- 216 cell proliferation, promotes cell autophagy, but has no influence on cell apoptosis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 52(2), 2019.
- [159] Xinyue Zhou and Yuanguang Meng. Association between serum folate level and cervical cancer: a meta-analysis. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 293(4):871–877, 2016.
- [160] Li Zhu and Lijun Xue. Kaempferol suppresses proliferation and induces cell cycle arrest, apoptosis, and DNA damage in breast cancer cells. *Oncology Research*, 27(6):629–634, 2019.

- [161] Fulvio Zullo, Angela Falbo, and Stefano Palomba. Safety of laparoscopy vs laparotomy in the surgical staging of endometrial cancer: a systematic review and metaanalysis of randomized controlled trials. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 207(2):94–100, aug 2012.

Danksagung

Ein herzliches Dankeschön gilt meiner Betreuerin Frau PD Dr. rer. nat. habil. Richter, die es mir ermöglicht hat, zu solch einem interessanten Thema zu forschen und zu promovieren. Frau Gosch danke ich insbesondere für ihre engelsgleiche Geduld. Die herzliche und familiäre Atmosphäre im Labor durch alle Mitarbeiterinnen und Promovierenden hat zu einem sehr guten Arbeitsklima geführt, was sich schlussendlich auch in meiner Arbeitsmoral und Motivation wiedergespiegelt hat. Bei Prof. Dr. Jeschke bedanke ich mich für die fachliche Beratung bei der Auswertung der HPLC-Ergebnisse.

Ein großer Dank gilt Felix Börs, der die Naturwissenschaftlerin in mir gefördert und gefordert hat.

Zuletzt möchte ich mich noch bei meiner Familie und meinen Freunden und Freundinnen für ihre Unterstützung auf meinem Weg bedanken.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Sophia Viktoria Rudolf, geboren am 28.04.1997 in Lörrach, dass ich die Arbeit ohne zulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als den angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken, Daten oder Konzepte sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form und keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Rostock, 4.11.2021

Sophia Viktoria Rudolf

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name Sophia Viktoria Rudolf
Geburtsdatum,-ort 28.04.1997 in Lörrach

PROMOTION

2019 - 2022 Promotion an der Universitätsfrauenklinik Rostock
„Vergleichende Untersuchungen zum Proliferationsverhalten hormonaktiver Endometriumkarzinomzellen (RL95-2 und Ishikawa) unter Einfluss eines Moringablattextraktes“

STUDIUM

November 2022 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung absolviert mit Note gut
Oktober 2021 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung absolviert mit Note befriedigend
2018 - 2022 klinischer Studienabschnitt des Studienfachs Humanmedizin an der Universität Rostock
September 2018 Physikum absolviert mit Note gut
2016 - 2018 vorklinischer Studienabschnitt des Studienfachs Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg

SCHULBILDUNG

Juni 2015 Abiturprüfung bestanden mit Note 1,9
2007 - 2015 Kreisgymnasium Neuenburg am Rhein
2003 - 2007 Rheinschule Neuenburg am Rhein

Rostock, 15.11.2022 Sophia Viktoria Rudolf