



Aus der Universitätsfrauenklinik

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

**Einfluss von Curcuma (Curcuma longa) und ihren Inhaltsstoffen
Curcumin, Bisdemethoxycurcumin, Kaffeesäure, Quercetin und
Isoquercitrin auf hormonrezeptorpositive maligne (MCF-7) und
benigne (MCF-12A) Mammakarzinomzellen**

Inauguraldissertation zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Universitätsmedizin Rostock

Erstgutachter: PD Dr. rer. nat. habil. Dagmar-Ulrike Richter

Einrichtung: Universitätsfrauenklinik Rostock

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Rainer H. Böger

Einrichtung: Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Drittgutachter: Prof. Dr. rer. nat. D.-C. Fischer

Einrichtung: Klinik und Poliklinik Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsmedizin Rostock

Vorgelegt von: Oliver Hintze | geb. am 08.01.1994 in Mannheim

Einreichung: April 2022 – Verteidigung: Juli 2023

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das Mammakarzinom.....	1
1.1.1 Allgemeines.....	1
1.1.2 Epidemiologie	2
1.1.3 Pathogenese	3
1.1.4 Risikofaktoren.....	3
1.1.5 Rezeptorstatus	4
1.1.6 Diagnostik.....	5
1.1.7 Therapie	6
1.1.8 Tamoxifen.....	7
1.1.9 Prävention	8
1.1.10 Komplementärer Therapieansatz	8
1.2 Sekundäre Pflanzenstoffe	9
1.2.1 Die Curcumawurzel und ihre Bestandteile	10
1.2.2 Curcumin	12
1.2.3 Bisdemethoxycurcumin	14
1.2.4 Kaffeesäure	14
1.2.5 Isoquercitrin.....	15
1.2.6 Quercetin	15
1.2.7 Resorption und Bioverfügbarkeit	16
2. Zielsetzung.....	18
3. Material und Methoden	19
3.1. Material.....	19
3.1.1. Geräte.....	19
3.1.3. Chemikalien.....	22
3.2. Methoden.....	25
3.2.1. Extraktherstellung.....	25
3.2.1.1. Pflanzliche Extrakte	25
3.2.1.2. Ethanolverfahren	25
3.2.1.3. Aufbereitung der Extrakte, Referenzen und Kontrollen	25
3.2.2. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	28

3.2.3.	Zellkulturlinien.....	29
3.2.4.	Zellkultivierung.....	30
3.2.5.	Ansetzen der Zellkulturen.....	30
3.2.6.	Passagieren der Zellen.....	30
3.2.7.	Ermittlung der Lebendzellzahl.....	31
3.2.8.	Immunhistochemie (IHC).....	32
3.2.9.	Glukose-, Laktat- und pH-Messung.....	34
3.3.	Testmethoden.....	35
3.3.1.	CellTiter-Glo® - Viabilitätstest	35
3.3.2.	CytoTox-Glo™ - Zytotoxizitätstest.....	36
3.3.3.	BrdU-Proliferationstest	38
3.3.4.	Neutralrot Test-Zellvitalitätstest.....	39
3.3.5.	Statistische Auswertung	40
4.	Ergebnisse	42
4.1.	High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	42
4.2.	Immunhistochemie	46
4.3.	CellTiter-Glo®-Viabilitätstest	47
4.4.	CytoTox-Glo™- Zytotoxizitätstest.....	50
4.5.	BrdU-Proliferationstest	53
4.6.	Neutralrot-Test.....	56
4.7.	Glukosemessung	60
4.8.	Laktat- und pH-Messung	62
5.	Diskussion	64
5.1.	High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	64
5.2.	CellTiter-Glo® - Viabilitätstest	65
5.3.	CytoTox-Glo™-Zytotoxizitätstest.....	66
5.4.	BrdU-Proliferationstest	68
5.5.	Neutralrot-Test.....	69
5.6.	Stoffwechsel-Untersuchungen.....	70
5.7.	Wirkweise der Curcuminoide.....	71
5.8.	Wirkweise der Flavonoide und Kaffeesäure	73
5.9.	Methodenkritik	75

5.10.	Fazit	76
6.	Ausblick	76
7.	Zusammenfassung	79
8.	Thesen	80
9.	Publikation	81
10.	Literaturverzeichnis	83
11.	Eidesstattliche Erklärung	100
12.	Lebenslauf	101
13.	Danksagung	103

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Inzidenzrate [%] der Malignomerkrankungen im Jahr 2016 in Deutschland.....	3
Abbildung 2: Grundstrukturen der Flavonoide	10
Abbildung 3: Curcuma longa	11
Abbildung 4: Die Curcuminoide	11
Abbildung 5: Phase I-Metabolismus von Curcumin	16
Abbildung 6: Phase II-Metabolite von Curcumin.....	17
Abbildung 7: Darstellung einzelner Arbeitsschritte bei der Extraktherstellung	25
Abbildung 8: High Performance Liquid Chromatography	29
Abbildung 9: Zählnetz der Bürker-Zählkammer	32
Abbildung 10: Immunhistochemie.....	33
Abbildung 11: Darstellung der chemischen Reaktion des CellTiter-Glo®-Viabilitätstest	35
Abbildung 12: Darstellung der chemischen Reaktion des CytoTox-Glo™-Zytotoxizitätstest	37
Abbildung 13: Schematische Darstellung des BrdU-Tests	38
Abbildung 14: Darstellung der Strukturformel von Neutralrot	39
Abbildung 15: Chromatogramm des Extrakt 1 (Curcuma Gewürzpulver).....	43
Abbildung 16: Chromatogram des Extrakt 2 (Curcuma Nahrungsergänzungsmittel).....	43
Abbildung 17: Chromatograph des Extrakt 3 (Frische Curcumawurzel).....	43
Abbildung 18: Chromatograph des Curcumins	44
Abbildung 19: Chromatograph des Bisdemethoxycurcumins	44
Abbildung 20: Chromatograph der Folsäure.....	44
Abbildung 21: Chromatograph der Kaffeesäure	45
Abbildung 22: Chromatograph des Isoquercitrins.....	45
Abbildung 23: Chromatograph des Quercetins.....	45
Abbildung 24: Immunhistochemie von MCF-7 (links) und MCF-12a (rechts)	46
Abbildung 25: Einfluss der Extraktverdünnungen auf MCF-7 Zellen im CellTiter-Glo®-Test	48
Abbildung 26: Einfluss der Referenzen auf MCF-7 Zellen im CellTiter-Glo®-Test.....	48
Abbildung 27: Einfluss der Kontrollen und Lösungsmittel auf MCF-7 Zellen im CellTiter-Glo®-Test...	48
Abbildung 28: Einfluss der Extraktverdünnungen auf MCF-12A Zellen im CellTiter-Glo®-Test.....	49
Abbildung 29: Einfluss der Referenzen auf MCF-12A Zellen im CellTiter-Glo®-Test	49
Abbildung 30: Einfluss der Kontrollen und Lösungsmittel auf MCF-12A Zellen im CellTiter-Glo®-Test	49
Abbildung 31: Einfluss der Extraktverdünnungen auf MCF-7 Zellen im CytoTox-Glo™-Test	51
Abbildung 32: Einfluss der Referenzen auf MCF-7 Zellen im CytoTox-Glo™-Test	51
Abbildung 33: Einfluss der Kontrollen und Lösungsmittel auf MCF-7 Zellen im CytoTox-Glo™-Test ..	51
Abbildung 34: Einfluss der Extraktverdünnungen auf MCF-12A Zellen im CytoTox-Glo™-Test.....	52
Abbildung 35: Einfluss der Extraktverdünnungen auf MCF-12A Zellen im CytoTox-Glo™-Test.....	52
Abbildung 36: Einfluss der Kontrollen und Lösungsmittel auf MCF-12A Zellen im CytoTox-Glo™-Test	52
Abbildung 37: Einfluss der Extraktverdünnungen auf MCF-7 Zellen im BrdU-Test	54
Abbildung 38: Einfluss der Referenzen auf MCF-7 Zellen im BrdU-Test	54

Abbildung 39: Einfluss der Kontrollen und Lösungsmittel auf MCF-7 Zellen im BrdU-Test.....	54
Abbildung 40: Einfluss der Extraktverdünnungen auf MCF-12A Zellen im BrdU-Test	55
Abbildung 41: Einfluss der Referenzen auf MCF-12A Zellen im BrdU-Test.....	55
Abbildung 42: Einfluss der Kontrollen und Lösungsmittel auf MCF-12A Zellen im BrdU-Test	55
Abbildung 43: MCF-7 Zellen nach Inkubation mit Neutralrot	56
Abbildung 44: Einfluss der Extraktverdünnungen auf MCF-7 Zellen im Neutralrot-Test	58
Abbildung 45: Einfluss der Referenzen auf MCF-7 Zellen im Neutralrot-Test.....	58
Abbildung 46: Einfluss der Kontrollen und Lösungsmittel auf MCF-7 Zellen im Neutralrot-Test.....	58
Abbildung 47: Einfluss der Extraktverdünnungen auf MCF-12A Zellen im Neutralrot-Test.....	59
Abbildung 48: Einfluss der Referenzen auf MCF-12A Zellen im Neutralrot-Test	59
Abbildung 49: Einfluss der Kontrollen und Lösungsmittel auf MCF-12A Zellen im Neutralrot-Test.....	59
Abbildung 50: Glukosekonzentration nach Beimpfung der MCF-7-Zellen mit den Extrakt-verdünnungen und Kontrollen.....	61
Abbildung 51: Glukosekonzentration nach Beimpfung der MCF-12A-Zellen mit den Extrakt-verdünnungen und Kontrollen.....	61
Abbildung 52: Laktatkonzentration und pH-Wert nach Beimpfung der MCF-7-Zellen mit den Extraktverdünnungen und Kontrollen	63
Abbildung 53: Laktatkonzentration und pH-Wert nach Beimpfung der MCF-12A-Zellen mit den Extraktverdünnungen und Kontrollen	63

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: BI-RADS- Einteilung der Brust.....	5
Tabelle 2: Phenol- und Flavonoidgehalt der Curcumasorten	12
Tabelle 3: Verdünnungsreihe und Endkonzentration der Extrakte	26
Tabelle 4: Verdünnung und Endkonzentration der Referenzen.....	27
Tabelle 5: Verdünnung und Endkonzentration der Kontrollen	27

Abkürzungsverzeichnis

5-FU	Fluorouracil
Aquabidest.	Aqua bidestillata
AIF	Apoptose-induzierenden Faktor
ATP	Adenosintriphosphat
BAX	Bcl-2-associated X protein
BIRADS	Breast Imaging-Reporting and Data System
BRCA 1	Brustkrebsgen 1
BRCA 2	Brustkrebsgen 2
Caffeic acid	Kaffeesäure
CAPE	Kaffeesäurephenylester
CDKs	Cyclin-abhängigen Kinasen
CDK-Inhibitor 1	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (p21)
CED	chronisch-entzündlicher Darmerkrankung
ChK2	Checkpoint-Kinase 2
COX-2	Cyclooxygenase-2
CUR	Curcumin
CYLD	Cylindromatose-Lysin-63-Deubiquitinase
CYP	Cytochrom P450
DCIS	Ductales carcinoma in situ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
E2	17 β -Estradiol
ECM	extrazellulären Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
ELISA	Enzym linked Immunosorbent Assay
Er- α	Estrogenrezeptor- α
Er- β	Estrogenrezeptor- β
EREs	Östrogenantwortelemente
FKS	Fetales Kälberserum
GnRH-Analoga	Gonadotropin-Releasing-Hormon
GSH	Glutathion
H	Stunde
HER2/neu	Human epidermal growth factor receptor 2
HCL	Salzsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IHC	Immunhistochemie
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6

IL-8	Interleukin-8
JNK	c-Jun-N-terminalen Kinasen
LCIS	Lobuläres carcinoma in situ
LinRed	Substratkit für Peroxidase
MAPK	MAP-Kinase-Weg
mAU	milli Absorbance Units
MCF-7	Estrogen-Rezeptor positive maligne Mammakarzinomzellen
MCF10A	Estrogen-Rezeptor positive Mamma-Epithelzelle
MCF-12a	Estrogen-Rezeptor positive benigne Mammakarzinomzellen
MMPs	Matrix-Metalloproteininasen
MRT	Magnetresonanztomographie
mTor	mechanistic Target of Rapamycin
NF-kB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
PBS	Phosphat Buffered Saline
pRb	Retinoblastom-Protein
PR	Progesteronrezeptor
p16/Rb	CDK-Inhibitor 2A
P21	Inhibitor cyclin-abhängiger Kinasen (auch: CDK-Inhibitor 1)
P53	Tumor protein p53
ROS	Reaktive Sauerstoffradikale
RT	Raumtemperatur
S	Sekunden
SERM	Selektive-Estrogen-Rezeptor-Modulatoren
SLNs	Lipid-Nanopartikeln
Sv	Sievert
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
UGT	Uridin-5'-diphosphoglucuronyltransferasen
W	Watt
WHO	World Health Organization

1. Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

1.1.1 Allgemeines

Das Mammakarzinom ist als bösartiger Tumor der Brustdrüse die häufigste maligne Erkrankung der Frau in der westlichen Welt [144]. Durch Fortschritte bei Diagnostik und Therapie konnte das tumorspezifische Mortalitätsrisiko in den letzten Jahren gesenkt werden. Seit der Einführung des Mammographie-Screenings erkranken weniger Frauen an fortgeschrittenen Tumorstadien [188]. Gleichzeitig gewinnen Krebserkrankungen durch die zunehmend steigende Lebenserwartung weiter an Bedeutung. Klassische Therapieoptionen des Mammakarzinoms sind die Operation, die Bestrahlung und die medikamentöse Tumortherapie. Ein multimodaler Therapieansatz unter Einbeziehung von Phytotherapeutika wird diskutiert.

An Brustkrebs erkrankte Frauen sind mehrheitlich an einem komplementären Therapieansatz als Ergänzung zu der klassischen Therapie interessiert. Von den befragten Brustkrebs-patientinnen greifen 63 % bereits auf komplementäre Therapieoptionen zurück. Hierbei steht die Linderung von Nebenwirkungen, der Erhalt von Gesundheit und der Wunsch, selbst an Therapieentscheidungen mitzuwirken, im Mittelpunkt [223].

Das große Interesse und die dünne Datenlage im Gebiet der komplementären Onkologie zeigt den Bedarf an wissenschaftlicher Forschung auf. So könnten im Bereich der Phytotherapie weitere Naturstoffe identifiziert und deren Wirkprofil untersucht werden. Diese könnte man als unterstützende Säule neben der herkömmlichen Therapie einsetzen.

Curcuma (*Curcuma longa*) gehört zur Familie der Ingwergewächse und ist in den südlichen und südwestlichen Regionen Asiens weit verbreitet. Die Wurzel der Pflanze wird seit Jahrhunderten in der indischen (Aryuveda) und chinesischen (traditionelle chinesische Medizin) Heilkunst für die medizinische Behandlung vieler Erkrankungen verwendet [209].

Bis heute ist Curcuma als Gewürz in der Küche sehr beliebt und gewinnt gleichzeitig als Nahrungsergänzungsmittel immer mehr an Bedeutung. Curcuma ist Gegenstand vieler wissenschaftlicher Publikationen, die sich mit den antioxidativen [216], antiinflammatorischen [152] und antimikrobiellen [13, 84] Wirkungen der Pflanze befassen. Neben einem protektiven Effekt auf verschiedene Organsysteme [157, 245, 159] scheint Curcuma eine hemmende Wirkung auf die Entstehung und Ausbreitung bösartiger Zellen zu besitzen [14].

Mithilfe der Chromatographie konnte die Curcumawurzel 1953 erstmals in ihre Bestandteile aufgetrennt und quantifiziert werden [211]. Seit Einführung der High Performance Liquid Chromatography (HPLC) gibt es einen enormen Kenntniszuwachs im Bereich der Phytotherapie. Innerhalb der Curcumawurzel ist der hohe Gehalt an Polyphenolen, die den sekundären Pflanzenstoffen angerechnet werden, von besonderer pharmakologischer Bedeutung. Zu den Polyphenolen gehören die Curcuminoide, welche für die intensiv gelb-orangene Farbe der Wurzel verantwortlich sind, die Flavonoide und die Phenolsäuren. Die immense Strukturvielfalt der Polyphenole ergibt sich durch unterschiedlichste Bindungen mit Zuckern oder Säuren an den aromatischen Ringen [30]. In der Pflanze nehmen sie eine wichtige Rolle bei der Fortpflanzung, dem Schutz vor Fressfeinden und der Absorption von schädlicher UV-Strahlung ein.

Das erstmals 1815 von Vogel und Pelletier isolierte Curcumin ist der wichtigste Vertreter der Curcuminoide und einer der meisterforschten sekundären Pflanzenstoffe. Curcumin scheint – neben einer vielfältigen Schutzwirkung auf das Gehirn [237], das Herz [245], die Niere [227], die Leber [69], die Haut [234] sowie die Augen [181] – antioxidative [118], antiinflammatorische [14] und antikanzerogene Eigenschaften zu besitzen [118].

Das Wissen um die vielfältigen positiven Effekte der Polyphenole auf die menschliche Gesundheit gibt Raum für epidemiologische Studien. So zeigen Fink et al., dass die Einnahme von Flavonoiden mit einem reduzierten Risiko für postmenopausalen Brustkrebs bei Frauen verbunden ist [71]. In der Übersichtsarbeit von Braakhuis et al. wird Brustkrebspatientinnen eine mediterrane Ernährung mit einer vermehrten Aufnahme von Gemüse und Früchten und einem hohen Gehalt an Polyphenolen empfohlen [29]. Die epidemiologische Datenlage stellt sich jedoch als inkonsistent dar. In der UK Womens Cohort Study wiesen Vegetarierinnen ein signifikant geringeres Brustkrebsrisiko im Vergleich zu den Probanden mit Fleischkonsum auf [224], während Studienergebnisse der Adventist Health Study hier keinen Unterschied feststellen konnten [112].

1.1.2 Epidemiologie

Das Mammakarzinom ist mit 29,5 % die mit Abstand häufigste maligne Tumorerkrankung der Frau in Deutschland, weit vor dem Darm- und Lungenkrebs [243]. Weltweit war das Mammakarzinom 2020 mit 12 % die häufigste neu diagnostizierte Krebserkrankung [218]. Nach Aussage des Robert-Koch-Instituts erkranken jedes Jahr etwa 69.000 Frauen in Deutschland an Brustkrebs. Von diesen Frauen starben 2017 etwa 18.396 an den Folgen der Erkrankung [110, 259]. Etwa 1 % der Neuerkrankungen betrifft Männer [79]. Das mittlere Erkrankungsalter lag 2016 bei 64 Jahren. Seit der Einführung des Mammographie-Screenings 2005 zeigte sich eine Erhöhung der Inzidenz, voraussichtlich durch verbesserte diagnostische Möglichkeiten. Gleichzeitig konnte die brustkrebspezifische Mortalität durch die Mammographie um etwa 20 % Prozent reduziert werden [16]. Aufgrund der immer besser werdenden Therapiemöglichkeiten liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei 79 % [188].

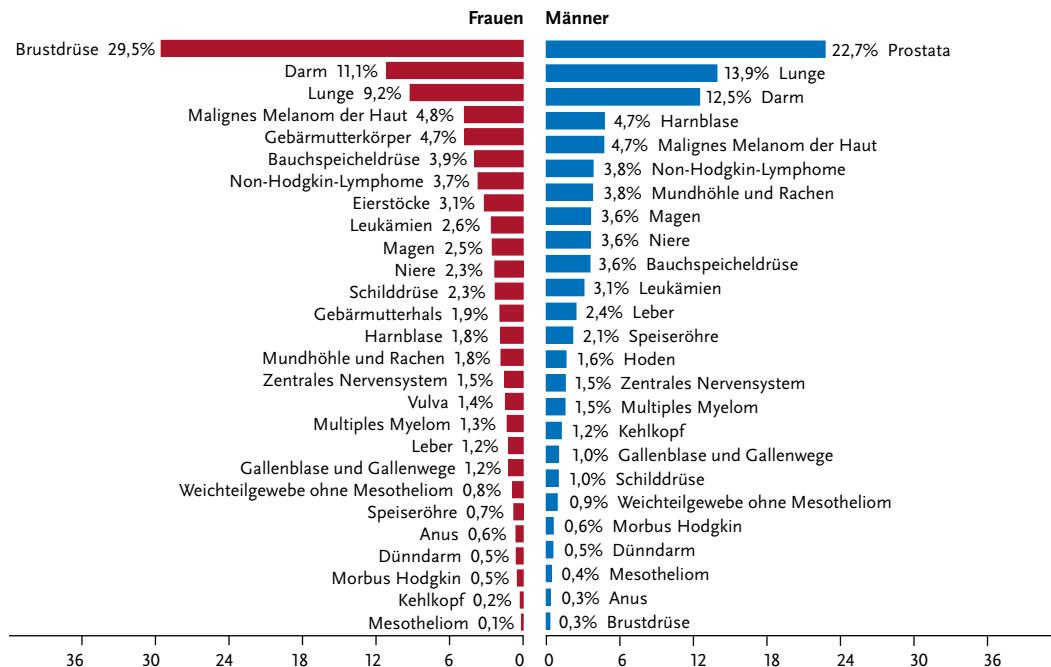


Abbildung 1: Inzidenzrate [%] der Malignomerkrankungen im Jahr 2016 in Deutschland

Brustkrebs ist die häufigste maligne Erkrankung der Frau in Deutschland. Übernommen aus dem Zentrum für Krebsregisterdaten [188].

1.1.3 Pathogenese

Das Mammakarzinom ist eine maligne Erkrankung der epithelialen Brustdrüsenzellen. Es entwickelt sich aus schon vorbestehenden gutartigen Läsionen des Brustdrüseneipithels. Hierzu zählen das duktale und lobuläre Carcinoma in situ (DCIS, LCIS) [9]. Die anatomische Lokalisation des Mammakarzinoms befindet sich zu 60 % im oberen äußeren Quadranten der Brust [1]. Die genauen Mechanismen der Entstehung von Brustkrebs sind noch unbekannt. Es gibt jedoch zahlreiche bekannte endogen und exogen bedingte Risikofaktoren [144]. Die Karzinogenese kann in drei Phasen eingeteilt werden: Die Initiation, die Promotion und die Progression. Bei der Initiation kommt es nach heutiger Sicht zu einer molekularen Transformation der Zelle mit irreversiblen genetischen Veränderungen. Dies geschieht durch spontane Mutationen und Fehler bei der DNA-Replikation und DNA-Reparatur. Auch die Umwandlung von Protoonkogenen in Onkogene und epigenetische Veränderungen spielen eine Rolle. Die Promotion bedeutet die Proliferation dieser initial transformierten Zellen, weitere Mutationen, Hemmung der DNA-Reparatur und Bildung von Tumorzellen, die sich der körpereigenen Immunabwehr entziehen können. Die Progression führt zu einer morphologischen Differenzierung des Tumorzellverbundes, mit Resistenzbildung gegen die Immunabwehr und schließlich Infiltration und Metastasierung [178].

1.1.4 Risikofaktoren

Die Entstehung von Tumorerkrankungen wird durch verschiedene Risikofaktoren erhöht. Alter, Familienanamnese, Fortpflanzungsfaktoren, Östrogen und Lebensstil sind fünf wichtige Risikofaktoren für Brustkrebs [217]. Das Alter ist neben dem Geschlecht der wichtigste Risikofaktor. 2016 wurden etwa 71,2 % aller Brustkrebs-assoziierten Todesfälle in Amerika bei Frauen über 60 Jahren gemeldet [205].

Etwa 5-10 % aller Brustkrebskrankungen sind erblich bedingt [41]. Frauen mit zwei oder mehr Verwandten mit Brustkrebs haben eine 2,5-fache Risikoerhöhung, ebenfalls an Brustkrebs zu erkranken [32]. Mit einem hohen Risiko sind Mutationen in den Genen BRCA1 und BRCA2 (hereditäres Ovarial und Mammakarzinom) verbunden [189]. Für Trägerinnen einer Mutation auf dem BRCA1- und/oder BRCA-2-Gen existiert ein bis zu achtzigprozentiges Lebenszeitrisiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken [172]. Liegt eine Mutation bei diesen Tumorsuppressorgenen vor, ist eine originalgetreue Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen durch die homologe Rekombination gestört und das Entartungsrisiko steigt an [163]. Weitere Gene mit niedrigerem Risiko sind das TP53 (Li-Fraumeni-Syndrom), das PTEN (Cowden-Syndrom) und das LKB1 (Peutz-Jeghers-Syndrom) [21].

Fortpflanzungsfaktoren wie eine frühe Menarche, eine späte Menopause oder ein hohes Alter bei der ersten Schwangerschaft können das Brustkrebsrisiko erhöhen [56, 144]. Im Gegensatz dazu können eine frühe Erstschwangerschaft, aber auch mehrere Schwangerschaften das Risiko senken [130]. Sowohl endogene als auch exogene Östrogene sind mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko verbunden. Die Hauptquellen für exogenes Östrogen sind die Einnahme von oralen Kontrazeptiva und eine postmenopausale Hormonersatztherapie. Seit Jahren wird über eine Steigerung des Brustkrebsrisikos neben einer Senkung des Eierstockkrebsrisikos durch orale Kontrazeptiva diskutiert [239, 109]. Weiterhin scheint hier das Alter bei der Erstannahme sowie die Einnahmedauer eine entscheidende Rolle zu spielen. Die absolute Risikoerhöhung bei Einnahme oraler Kontrazeptiva in Bezug auf die Entwicklung von Brustkrebs war jedoch laut Mørch et al. gering [158]. Ein ungesunder Lebensstil kann das Brustkrebsrisiko erhöhen. So gilt ein übermäßiger Alkoholkonsum und Fettleibigkeit als Risikofaktor [21]. Alkoholkonsum und Fettleibigkeit können den Östrogenspiegel im Blut erhöhen und somit das Brustkrebsrisiko steigern [85]. Eine in der westlichen Welt übliche, zu hohe Aufnahme ungesättigter Fettsäuren über die Nahrung ist mit einem negativen Einfluss auf die Brustkrebs-spezifische und die Gesamtmortalität verbunden. Ungesättigte Omega 3 Fettsäuren können von Vorteil sein [141]. Der Zusammenhang zwischen Rauchen und einer Steigerung des Brustkrebsrisikos ist umstritten. Es häufen sich jedoch die Forschungsergebnisse, die eine Rolle des Rauchens bei der Ätiologie von Brustkrebs unterstreichen, insbesondere wenn das Rauchen in jungen Jahren und vor der ersten Geburt begonnen wurde [217, 42, 77]. Nikotin gilt hier als eine Substanz mit erheblichen wachstumsfördernden Eigenschaften bei Brustkrebs [126]. Regelmäßige, moderate körperliche Aktivität und ein gesunder Lebensstil wiederum senken das Risiko [89, 230].

1.1.5 Rezeptorstatus

Die mehrheitlich in den weiblichen Ovarien gebildeten Geschlechtshormone Estrogen und Progesteron nehmen bei der Ätiologie und Therapie von Brustkrebs eine wichtige Rolle ein. Das Vorhandensein ihrer jeweiligen Rezeptoren bestimmt den Rezeptorstatus eines Tumors und ist für das Therapiekonzept enorm wichtig. Estrogene sind lipophile Moleküle, die im menschlichen Organismus eine anabole Wirkung entfalten. Sie sind für die Ausbildung und Erhaltung der sekundären weiblichen Geschlechtsmerkmale verantwortlich und wichtig für den weiblichen Zyklus. So bewirken sie auch die Entwicklung der Brust und den Aufbau der Milchdrüsen. Weiterhin stimulieren Estrogene den allgemeinen Stoffwechsel, indem sie die Bildung von Knochen sowie die Retention von Calcium,

Phosphat und Natrium fördern. Eine Hormontherapie ist dann sinnvoll, wenn der Tumor Estrogenrezeptoren exprimiert, da dieser durch die Bindung der Rezeptoren an Estradiol (E2) einen besonderen Wachstumsreiz erfahren kann. Der Estrogenrezeptor (ER) liegt in den zwei Isoformen Estrogenrezeptor-α (ER-α) Estrogenrezeptor-β (ER-β) im menschlichen Zytosol vor. Der klassische Mechanismus beinhaltet die Estradiolbindung an Estrogenrezeptoren im Zellkern, wonach diese dimerisieren, um schließlich an spezifische Estrogenantwortelemente (EREs) der DNA zu binden. Estrogenrezeptoren können jedoch auch die Genexpression durch Protein-Protein-Wechselwirkungen mit anderen DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren im Kern regulieren, ohne dabei direkt an DNA zu binden [24]. Beide Isoformen scheinen unterschiedliche bis gegensätzliche Wirkungen zu entfalten. Während ER-α für die proliferative Wirkung von Estrogen verantwortlich ist, wurde gezeigt, dass ER-β diese ER-α-induzierte Proliferation reduziert [214, 193]. Dieser Proliferation kann ER-β zum einen durch Fusion mittels Hetero-dimerisierung mit der ER-α Untereinheit oder mittels der Induktion bestimmter Gene auf Transkriptionsebene entgegenwirken [244].

1.1.6 Diagnostik

Neben der sorgfältigen klinischen Untersuchung jeder Patientin mit Verdacht auf ein Mammakarzinom, hat sich in den letzten Jahrzehnten die Mammographie als führendes Diagnostikverfahren etabliert. Die weltweit erste Mammographie erfolgte in Leipzig im Jahre 1927 durch den Chirurg Otto Kleinschmidt [241]. In Deutschland gibt es für Frauen zwischen 50 und 69 Jahren die Möglichkeit, an dem bundesweiten Mammographie-Screening Programm teilzunehmen, wobei die Krankenkasse die Kosten übernimmt [58]. Die Mammographie bringt den Nachteil einer Strahlenbelastung von 0,5 mSv bei einer Mammographie beidseits in zwei Ebenen mit sich. Dies entspricht 25 Röntgen-Thorax-Aufnahmen [199]. Alternative und strahlungsfreie Bildgebungsverfahren sind die Mamma-sonographie sowie die Magnetresonanzmammographie [167]. Für junge Frauen wird eine jährliche Tastuntersuchung empfohlen. Hierbei werden die Brustdrüsen und die Lymphknoten in den Achselhöhlen, am Schlüssel- und Brustbein abgetastet sowie Form und Größe der Brust und Brustwarzen kontrolliert [34]. Sollte eine erbliche Vorbelastung oder Genveränderung (z.B. im BCRA1- oder BCRA2-Gen) vorliegen, werden halbjährliche Tast- und Ultraschall-untersuchungen sowie jährliche MRT Untersuchungen empfohlen [34]. Mittels der internationalen BI-RADS-Klassifikation (Breast Imaging-Reporting and Data System) können die Befunde der Mammographie in unauffällig, benigne und malige eingeteilt werden (Tabelle 1). Ab BI-RADS IV, was einen unklaren und auch verdächtigen Befund bedeutet, wird eine Stanzbiopsie zur Gewebeuntersuchung mit möglicher Diagnosesicherung empfohlen [124]. Sollte die Diagnose Brustkrebs festgestellt werden, wird eine beidseitige Mammographie sowie selten ein MRT mit Kontrastmittel durchgeführt. Besteht der klinische Verdacht einer Metastasenbildung, kann eine Computertomographie des Brust- und Bauchraums sowie eine Knochenmarksszintigraphie durchgeführt werden [170].

Tabelle 1: BI-RADS-Klassifikation der Brust

Einteilung der BI-RADS-Klassifikation

Kategorie	Beschreibung	Empfehlung
-----------	--------------	------------

0	Unvollständige Untersuchung	Weitere Bildgebung erforderlich
1	Negativ, normale symmetrische Brust ohne Herdbefund, architektonische Strukturstörung oder verdächtige Verkalkungen	Jährliche Vorsorgeuntersuchung fortführen
2	Definitiv benigner Befund	Jährliche Vorsorgeuntersuchung fortführen
3	Vermutlich gutartiger Befund (Malignomwahrscheinlichkeit < 2 %) Bei Konstanz in 2 Jahren evtl. Abstufung auf BI-RADS 2	Kontrolluntersuchung empfohlen. Veränderungen bedürfen meist einer Biopsie
4	Verdächtig (Malignomwahrscheinlichkeit > 2 bis < 95 %) Weitere Einteilung in 4A (2-9 %), 4B (10-49 %) und 4C (50-94 %)	Biopsie oder Aspiration empfohlen
5	Hochverdächtig (Malignomwahrscheinlichkeit > 95 %)	Biopsie oder direktes chirurgisches Vorgehen empfohlen
6	Biopsie, erfolgt, Malignität nachgewiesen	Therapieplanung

1.1.7 Therapie

Die Therapie des Mammakarzinoms sollte individuell, mit Bedacht und unter Einbeziehung aller beteiligten Fachärzte und Untersuchungsergebnisse ausgewählt werden. Sie steht bis zum Stadium der Fernmetastasierung unter einem kurativen Ansatz. Dies beinhaltet auch lokal fortgeschrittene Tumore sowie Tumorrezipide [190]. Bei vorhandener Fernmetastasierung ist eine palliative Linderung der Krankheitsbeschwerden von großer Wichtigkeit. Als Therapieoptionen gibt es die Operation, die hormonelle Therapie, die Chemotherapie sowie die Therapie durch Bestrahlung. Die neue molekularbiologische Therapie, bei der spezifische Wirkstoffe zielgenau Krebszellen angreifen, gewinnt immer mehr an Bedeutung [37]. Häufig folgen die unterschiedlichen Therapieansätze aufeinander oder werden kombiniert. Hierbei gibt es die Möglichkeit, eine Chemo- oder Strahlentherapie postoperativ, oder eine neoadjuvante Therapie, mit dem Ziel, den Tumor präoperativ zu verkleinern, durchzuführen. Die Beurteilung des Therapieansatzes erfolgt anhand der TNM-Klassifikation. Weiterhin spielen die feingeweblichen und biologischen Merkmale eine wichtige Rolle [35].

Ziel der Operation ist es, den Tumor vollständig zu entfernen (R0-Resektion). Die Operation kann brusterhaltend durchgeführt werden, wobei eine adjuvante Bestrahlung der Brust zur Senkung der

Rezidivrate obligat ist [143]. Indikationen für eine komplette Entfernung der Brust (modifizierte radikale Mastektomie) sind eine Multizentrität, eine inkomplette Resektion, ein inflammatorisches Karzinom, diffus ausgebreitete Kalzifikationen, oder sollte eine Bestrahlung nach der Operation nicht möglich sein [145].

Die systemische Therapie des Mammakarzinoms kann in antihormonelle, zytostatische und antikörpervermittelte Therapieoptionen unterteilt werden. Die Hormontherapie mittels Aromatasehemmer (Anastrazol, Exemestan etc.), SERM (Tamoxifen) und GnRH-Analoga wird bei hormonabhängigen Brustkrebsformen primär, adjuvant und palliativ angewendet. Tamoxifen wirkt antagonistisch am Estrogenrezeptor und kann bei Frauen vor und während der Menopause angewendet werden (siehe Kapitel: Tamoxifen). Nach der Menopause wird im Körper durch verschiedene Gewebe (v.a. Adipozyten) weiterhin Östrogen gebildet. Diese Synthese kann durch die Aromatasehemmer inhibiert werden [72]. Es werden die körpereigenen Hormone ausgeschaltet, um dem Brustkrebs weitere Wachstumsreize zu entziehen.

Eine zytostatische Therapie (Chemotherapie) wird bei fortgeschrittenen und prognostisch ungünstigen Brustkrebsformen empfohlen. Hierzu zählen hormonrezeptor-positive und HER2/neu-negative Tumore mit hohem Rezidivrisiko sowie dreifach negative Tumore [120].

Die Antikörpertherapie richtet sich direkt gegen spezielle Eigenschaften von Krebszellen. Bei einer HER2/neu-Positivität des Tumors kann der humanisierte monoklonale Antikörper Trastuzumab als Inhibitor des Wachstumsfaktorrezeptors dienen. Dies zeigt im Vergleich zur Chemotherapie eine erhöhte Remissionsrate, welche bei Kombination der beiden Therapieoptionen weiter steigt [225]. Bei HER2/neu positivem, metastasierten Brustkrebs untersuchte die Cleopatra Studie 2013, inwiefern eine duale Antikörpertherapie mit Trastuzumab und Pertuzumab sowie dem Taxan Docetaxel als Chemotherapeutikum in Kombination von Vorteil wäre. Das Ergebnis war eine signifikante Verlängerung des progressionsfreien Überlebens, ohne Steigerung der kardialen Toxizität [20, 171].

Trotz effektiver Primärtherapie treten bei etwa 20 % der Brustkrebspatientinnen Fern-metastasen auf. In der Regel erfolgt ab diesem Zeitpunkt eine palliative Therapie (Best-supportive-care-Therapie). Dies beinhaltet die Behandlung körperlicher und psychischer Beschwerden [144]. Bisphosphonate und Denosumab (Anti-RANKL-Antikörper) reduzieren hierbei das Risiko skelettbezogener Komplikationen. Dies bestätigt die ABSCG 18 Studie aus 2012, welche eine signifikante Verlängerung des Zeitraums bis zur ersten skelettalen Komplikation durch den Osteoklasteninhibitor Denosumab zeigt [249].

1.1.8 Tamoxifen

Tamoxifen ist ein selektiver Estrogenrezeptormodulator und blockiert als solcher kompetitiv den Östrogenrezeptor. Je nach Gewebespezifität hat dies einen antagonistischen antiöstrogenen (Brustdrüse) oder agonistischen östrogenen (Endometrium) Effekt. Bei der Behandlung des Mammakarzinoms wird seine antagonistisch-antiöstrogene Wirkung genutzt [66]. Tamoxifen wird als Prodrug durch CYP3A4 zu N-Desmethyl-Tamoxifen und anschließend durch CYP2D6 zu Endoxifen metabolisiert und aktiviert. Diese Metaboliten zeigen eine höhere Affinität zum Östrogenrezeptor, weshalb es bei Interaktionen mit dem jeweiligen Cytochrom P450-System (CYP) zu Wirkungsveränderungen kommen kann [168]. Tamoxifen wird prä- und perimenopausal zur adjuvanten

Therapie bei hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen sowie zur Therapie von metastasierten Mammakarzinomen eingesetzt [190].

1.1.9 Prävention

Brustkrebs ist die häufigste Krebserkrankung der Frau im Alter von 35 bis 50 Jahren. Präventionsmaßnahmen besitzen bei dieser Krebsform einen besonderen Stellenwert. Screening und Früherkennung bauen dabei auf mehreren Säulen auf. Neben einer ausgewogenen, mediterranen Ernährung mit viel Obst, Gemüse und Vollkornprodukten [197], dem Verzicht von Nikotin [126] und einem reduzierten Alkoholkonsum, spielen Bewegung, Gewichtsreduktion nach der Menopause und die Vermeidung von krebserregenden Substanzen bei der primären Prävention eine wichtige Rolle [36, 73, 74]. Die Sekundär-prävention beinhaltet das monatliche selbstständige Abtasten der Brust ab dem 20. Lebensjahr sowie das Wahrnehmen der ärztlichen Vorsorgeuntersuchungen. Allein durch die Einführung des bundesweiten Mammographie Screenings 2005 konnte die brustkrebs-assoziierte Sterblichkeit um etwa 25 % gesenkt werden [184, 190]. Bei einem hohen familiären Risiko sollte ein erweitertes Screening-Programm 5 Jahre vor Erkrankungsbeginn der Verwandten begonnen werden [238]. Frauen mit einer Mutation der Gene BRCA1 oder BRCA2 besitzen ein 55- bis 85-prozentiges Risiko, an Brustkrebs zu erkranken. Hier kann über eine prophylaktische bilaterale Mastektomie nach abgeschlossener Familienplanung, zur Senkung des Brustkrebsrisikos, nachgedacht werden [15, 151]. Die Tertiärprävention soll durch Ernährung und Ausdauersport ein Fortschreiten der Erkrankung sowie das Auftreten eines Rezidivs verhindern [18, 146]. Bei Frauen mit postmenopausalem rezeptorpositivem Mammakarzinom können Aromatasehemmer zur Prävention von kontralateralen Mammakarzinomen eingesetzt werden [81].

1.1.10 Komplementärer Therapieansatz

Ein multimodaler Therapieansatz bei der Behandlung von Tumorerkrankungen findet insbesondere bei an Brustkrebs erkrankten Frauen mehr und mehr Zuspruch [27, 236]. Die Komplementärmedizin umfasst Behandlungen, die als Ergänzung neben der Standardtherapie eingesetzt werden. In der komplementären Onkologie ist es das Ziel, die Lebensqualität zu verbessern, das allgemeine Wohlbefinden zu steigern und Krankheitssymptome sowie Nebenwirkungen konventioneller Behandlungen zu lindern. Die Konzentration liegt hierbei auf dem Erhalt der Gesundheit. Die Evidenz, die den Einsatz von komplementären Therapie-ansätzen unterstützt, ist jedoch begrenzt. Auf einige evidenzbasierte Therapieoptionen soll im nächsten Abschnitt eingegangen werden.

Ein hohes Maß an Evidenz zeigte regelmäßige und ausreichende Bewegung, eine ausgewogene Ernährung sowie die routinemäßige Anwendung von Mind-Body-Praktiken wie Yoga, Meditation, Entspannungstechniken und passive Musiktherapie. Häufige psychische und körperliche Gesundheitsprobleme bei Patientinnen mit Brustkrebs können so gelindert werden [82, 68]. Die Anwendung von Akupunktur kann prä- und postoperative Angst, Muskelverspannungen und Schmerzen lindern [142, 50]. Auch zur direkten Behandlung chemotherapie-induzierter Nebenwirkungen wird die Komplementärmedizin eingeschränkt empfohlen. So können etwa chemotherapie-induzierte Fatigue, Übelkeit, Erbrechen und Aromatase-Hemmer induzierte Arthralgien mittels Akupunktur begrenzt

gelindert werden [33, 64, 135, 252]. Viele Patientinnen sind auch an einer Stärkung des Immunsystems durch eine Supplementierung von Vitaminen, Spurenelementen und Pflanzenextrakten interessiert [121]. In der randomisierten, kontrollierten Phase I/IIa-Studie von Ma et al. zeigte sich, dass eine zusätzliche intravenöse Gabe von hochdosiertem Vitamin C bei neu diagnostiziertem Ovarialkarzinom die chemotherapeutische Toxizität reduzierte [94]. Bei Frauen mit Mammakarzinom stellte Vollbracht et al. fest, dass die intravenöse Gabe von Vitamin C im ersten postoperativen Jahr zur einer signifikanten Reduzierung der Beschwerden infolge der Krankheit selbst sowie der Chemo- bzw. Strahlentherapie führte [233].

Ein weiteres, in Deutschland weit verbreitetes und erforschtes Verfahren bei therapie-assoziierten Nebenwirkungen ist die Misteltherapie. Sie geht auf die Zusammenarbeit der Ärztin Ita Wegmann mit Rudolf Steiner, dem Begründer der anthroposophischen Medizin, zurück. Dabei verglichen sie Anfang des 20. Jahrhunderts die schmarotzerhafte Lebensweise eines Tumors im Menschen mit der Lebensweise der Mistel im Baum [103]. Diese beschriebene, vom Wirt abhängige Lebensweise des Krebsgeschwürs und der Mistel, nutzte Rudolf Steiner mit Erfolg, um nach dem Simile-Prinzip „Gleiches mit Gleichen“ zu behandeln. Vielfach untersuchte Inhaltsstoffe der Mistel sind die zytotoxisch wirkenden Mistellektine sowie die immunmodulierenden Viskotoxine, welche eine Stimulation sowohl der T-Lymphozyten als auch der Granulozyten bewirken [138]. Die Ergebnisse einer multizentrischen Studie aus Deutschland und der Schweiz konnten bei primärem, nicht metastasiertem Mammakarzinom eine signifikante Verringerung von Nebenwirkungen der konventionellen Krebstherapie, weniger krankheits- und therapiebedingte Symptome und eine längere Überlebenszeit bei der Langzeitbehandlung mit einem standardisierten Extrakt aus der europäischen Mistel (*Viscum album* L.) zusätzlich zur konventionellen, adjuvanten onkologischen Therapie darlegen [25].

Die Website CAM Cancer [40] bietet Gesundheitsexperten hochwertige, evidenzbasierte Informationen über komplementäre und alternative Medizin (CAM) bei Krebs. Hier wird bei antioxidativ wirkenden Substanzen unter anderem bei Matcha-Tee und der Aroniabeere vor einer Steigerung beziehungsweise Abschwächung der chemo- und strahlentherapeutischen Wirkung gewarnt [78].

Selten gehen die Meinungen zu einem Thema so weit auseinander, wie bei der komplementären Krebstherapie. Durch aktuelle Forschung und einen großen Kenntniszuwachs in diesem Bereich kann den Betroffenen immer mehr wissenschaftlich relevante Information zur Verfügung gestellt werden [10]. Auch der Einsatz von Curcuma als unterstützende Säule der klassischen Krebstherapie wird weiter untersucht, wohlwissend, dass den darin enthaltenen Stoffen seit alters her viele gesundheitsfördernde Wirkungen zugesprochen werden.

1.2 Sekundäre Pflanzenstoffe

Die sekundären Pflanzenstoffe sind im Gegensatz zu den primären Pflanzenstoffen für eine Pflanze nicht überlebensnotwendig. Sie entstehen im Sekundärmetabolismus und sind nicht am Energiestoffwechsel der Pflanze beteiligt. Zu den sekundären Pflanzenstoffen zählen die Polyphenole, die Terpenoide, die Alkaloide und die Glucosinolate. Ihre antibiotischen, antimykotischen und antiviralen Eigenschaften schützen die Pflanze vor Krankheitserregern. Die Flavonoide sind die wichtigste Untergruppe der sekundären Pflanzenstoffe und gehören zu den Polyphenolen. Sie werden weiterhin

in die Klassen der Flavone, Flavonole, Flavanole (Catechine), Flavanone, Anthocyanidine und Isoflavonoide unterteilt (Abbildung 2). Die Flavonoide bestehen aus zwei aromatischen Ringen (A-Ring und B-Ring), die über eine C3-Einheit (C-2, C-3 und C-4) verknüpft sind. Die Strukturvielfalt der Flavonoide ergibt sich durch unterschiedlichste Bindungen mit Zuckern oder Säuren an den aromatischen Ringen [30]. Ihre Aufgaben in den verschiedensten Pflanzen unterscheiden sich anhand ihrer strukturellen Variationen. Zu diesen Aufgaben zählen unter anderem eine wichtige Rolle bei der Fortpflanzung, der Schutz vor pathogenen Erregern, eine Fresshemmung für Insekten sowie die Absorption von schädlicher UV-Strahlung. Zusätzlich erhöhen die Zuckerverbindungen die Wasserlöslichkeit der Substanzen und schützen die Pflanze vor enzymatischen Abbauvorgängen [88]. Der Flavonoid-Gehalt von Curcuma wurde in einer Studie mittels der Methode von Harbone bestimmt und deren antioxidative Aktivität untersucht [87]. Herausgefunden wurde, dass die Flavonoide weitgehend zu den antioxidativen Aktivitäten von Curcuma beitragen und einen wichtigen Baustein für die vorteilhaften Wirkungen der Pflanze darstellen könnten [65]. Die Curcuminoide gehören als Diarylheptanoide zu den Polyphenolen und den am intensivsten wissenschaftlich untersuchten Naturstoffen. In den folgenden Kapiteln wird auf die Curcumawurzel und die enthaltenen, in dieser Arbeit untersuchten, sekundären Pflanzenstoffe eingegangen.

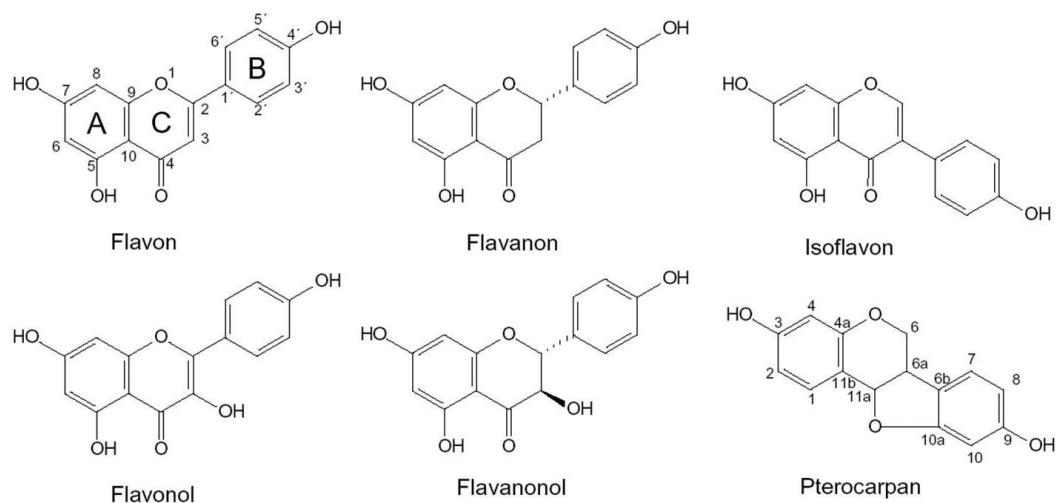


Abbildung 2: Grundstrukturen der Flavonoide

Dargestellt sind die verschiedenen Untergruppen der Flavonoide [63].

1.2.1 Die Curcumawurzel und ihre Bestandteile

Curcuma (*Curcuma longa*) ist eine Pflanzenart, die zur Familie der Ingwergewächse gehört und in den südlichen und südwestlichen tropischen Regionen Asiens weit verbreitet ist. Die Pflanze kann eine Wuchshöhe von einem Meter erreichen. Die Wurzel (Rhizom, Abbildung 3) ist neben ihrer vielfältigen Verwendung in den Küchen von Iran, Malaysia, Indien, China, Polynesien und Thailand auch dafür bekannt, seit Jahrhunderten in der indischen (Aryurveda) und chinesischen (traditionelle chinesische Medizin) Heilkunst für die medizinische Behandlung von Hautkrankheiten, Infektionen, Stress und Depressionen verwendet zu werden [209].



Abbildung 3: Curcuma longa

Dargestellt ist das Rhizom der Curcuma longa in fester und in pulvriger Form.

Die wichtigsten Bestandteile der Curcumawurzel sind, neben Wasser, die polyphenolischen Curcuminoide, welche für die intensive gelb-orangene Farbe verantwortlich sind, die Flavonoide (z.B. Quercetin und Isoquercitrin), die Phenolsäuren (z.B. Kaffeessäure) sowie verschiedene ätherische Öle, Zucker, Proteine und Harze.

Die Curcuminoide – bestehend aus Curcumin (70-80 %), Demethoxycurcumin (15-20 %) und Bisdemethoxycurcumin (3-5 %) – machen etwa 3-5 % des Rhizoms aus [97] (Abbildung 4).

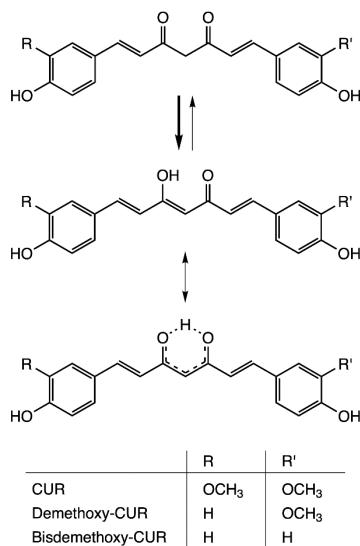


Abbildung 4: Die Curcuminoide

Dargestellt ist die Grundstruktur der Curcuminoide (CUR: Curcumin) [95].

Die Flavonoide sind sekundäre Pflanzenstoffe aus der Gruppe der Phenole, denen unter anderem antioxidative Aktivitäten nachgesagt werden. Der gemessene Flavonoidgehalt schwankt je nach Publikation, was vermutlich auf die verschiedenen Curcuma-Sorten und Extrahierungsverfahren zurückzuführen ist.

Ein weiterer Inhaltsstoff der Curcumawurzel ist die Kaffeesäure (Caffeic acid). Sie gehört zur Gruppe der Phenolsäuren. Als solche werden ihr ebenfalls antioxidative, antiinflammatorische, immunmodulierende sowie potentiell antikanzerogene Wirkmechanismen zugeordnet [186, 101].

Auf die einzelnen in dieser Arbeit untersuchten Inhaltsstoffe der Curcumawurzel wird in den folgenden Kapiteln näher eingegangen.

Aufgrund des zunehmenden Interesses an den vorteilhaften pharmakologischen Eigenschaften der Curcumawurzel wurden in den letzten Jahrzehnten hunderte wissenschaftliche Publikationen zu diesem Thema veröffentlicht. Zu diesen Eigenschaften zählen ihre antioxidativen [216, 152], antiinflammatorischen [152, 49] und antimikrobiellen Wirkungen [154, 84, 13]. Die Anwendung von Curcumaöl gegen *Staphylococcus Aureus* wird in der Arbeit von Singh et al. aufgrund einer stark hemmenden Wirkung empfohlen [206]. Weiterhin scheint Curcuma eine protektive Wirkung auf die Fortpflanzungsorgane, bei zusätzlicher pro-apoptotischer Wirkung auf bösartige Zellen, zu besitzen [157]. Des Weiteren zeigen jüngste Erkenntnisse eine Abschwächung des oxidativen Stresses und der mit *Helicobacter pylori* verbundenen histologischen Veränderungen bei chronischer Gastritis durch die Behandlung mit Curcuma [128]. Eine weitere Studie an Mäusen zeigte, dass Curcumaöl das Wachstum von Leberkrebszellen in vivo und in vitro hemmen kann, indem es entzündlichem und oxidativem Stress entgegenwirkt [133]. Die besonders niedrige Inzidenz der Alzheimer-Demenz in Indien wird mit der reichlich Curcuma-enthaltenden indischen Küche in Verbindung gebracht [75].

Tabelle 2: Phenol- und Flavonidgehalt der Curcumasorten

Dargestellt ist der Gehalt an Polyphenolen und Flavonoiden der verschiedenen Curcumasorten [mg/g] Quercetin-Äquivalent [192]

Pflanzenextrakte	Polyphenol-Gehalt [mg/g]	Flavonoid-Gehalt [mg/g]
Curcuma longa	260 ± 0,25	79,36 ± 0,01
Curcuma caesia	134,47 ± 0,06	40,6 ± 0,1
Curcuma amada	92,30 ± 0,05	22,52 * 0,015

Im Hinblick auf die vielfältigen gesundheitlichen Vorteile stellt sich die Frage einer möglichen Toxizität durch die Einnahme von Curcuma-Präparaten. Forschungsarbeiten ergaben, dass Curcuma weder für Tiere noch für den Menschen giftig sei. Eine Übersicht, welche die Sicherheit und Toxizität von Curcuma in der Medizin erörtert, wurde von Soleimani V. et al. erstellt [209]. Hierbei wurde das Fehlen von Langzeitdaten, Studien an schwangeren Frauen und ausreichende Studien zur Dosissteigerung beim Menschen bemängelt. Schlussendlich wurde die Einnahme von Curcuma jedoch als unbedenklich eingestuft.

1.2.2 Curcumin

Curcumin (Diferuloylmethan) ist ein stark färbendes, polyphenolisches gelb-orangenes Pigment und zählt zu den meistuntersuchten sekundären Pflanzenstoffen. Es wurde erstmals 1815 von den zwei deutschen Wissenschaftlern Vogel und Pelletier aus der Curcumawurzel isoliert [105]. Mithilfe der Chromatographie konnten 1953 erstmals die Bestandteile der Curcumawurzel aufgetrennt und quantifiziert und so die einzelnen Curcuminide voneinander differenziert werden [211].

Die intensiv-gelbe Farbe und die geschmackliche Schärfe bedingen den vielfältigen Einsatz unter anderem als Farbstoff in Lebensmitteln, Kosmetika oder im Currypulver und Speisesenf. Curcumin ist ein Keto-Enol-Tautomer mit der Formel $C_{21}H_{20}O_6$ und besitzt zwei aromatische Ringe, die durch zwei

ungesättigte Carbonylgruppen verbunden sind. Wasserstoffbrücken stabilisieren das Molekül rund um die zentrale Hydroxylgruppe, bei welcher angenommen wird, dass sie unter anderem für die Funktion als Radikalfänger bedeutsam ist [194, 177]. Aufgrund des vielversprechenden biologischen Wirkspektrums ist Curcumin Gegenstand unzähliger Publikationen, die sich mit den antioxidativen, antiinflammatorischen [14] und anti-kanzerogenen Eigenschaften dieser Substanz beschäftigen [118, 4, 99, 84]. Das in neutralem und saurem Milieu sehr stabile Curcumin verfügt über eine Reihe von Einheiten (phenolische Hydroxylgruppe, Methoxygruppe und 1,3-β-Diketon), die das Potenzial haben, reaktive Sauerstoffzwischenprodukte zu neutralisieren [200].

In diesem Sinne scheint Curcumin eine vielfältige Schutzwirkung auf diverse Organsysteme zu besitzen. So belegten aktuelle Studien eine neuroprotektive [237, 137], kardioprotektive [245, 159], renoprotektive [227], hepatoprotektive [69], dermaprotektive [234] sowie die Augenschützende [181] Aktivität. In einer Übersichtsstudie wurden die vielversprechenden Daten aus mehreren kürzlich durchgeföhrten Studien zu Curcumin bei verschiedenen neurologischen Erkrankungen wie der Alzheimer-Demenz, Parkinson, Multiple Sklerose, Huntington-Krankheit und Prionen-Krankheit, zusammengetragen [22, 54, 183]. In Tiermodellen verzögerte ein Curcumin-Extrakt die Diabetesentwicklung, verbesserte die pankreatischen β-Zellfunktion, verhinderte den Tod von β-Zellen und verringerte die Insulinresistenz [174]. Curcumin gilt ebenfalls als vielversprechend bei der Behandlung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen (CED) [108]. Dabei kann die Darmbarriere gestärkt und das Mikrobiom positiv beeinflusst werden [70]. Die Cyclooxygenase 2 (COX-2) wandelt Arachidonsäure zu Eicosanoid Prostaglandin H2 um. Induziert wird diese Umwandlung zum Beispiel bei Verletzungen oder Entzündungen durch verschiedene Zytokine und Mitogene. Es kann angenommen werden, dass eine gesteigerte COX-2 Aktivität mit einem erhöhten Karzinomrisiko einhergeht [57]. Dabei konnte festgestellt werden, dass Curcumin eine hemmende Wirkung auf die COX-2 Aktivität besitzt [99, 220, 175]. So konnte über Curcumin eine induzierte Hochregulation der COX-2 in menschlichen Brustepithelzellen (MCF10A) durch Unterdrücken der ERK1/2-Phosphorylierung und NF-κB-Transaktivierung gehemmt werden [131]. Sarkar et al. beschrieben diese chemopräventiven Eigenschaften des Curcumins als präventives Mittel gegen die von *Helicobacter pylori* vermittelte Magenkarzinogenese [194].

Während Curcumin eine, wie oben beschrieben, schützende Rolle in Bezug auf das menschliche Organsystem zu übernehmen scheint, bestätigten weitere Studien ein breites antikanzerogenes Wirkspektrum im Bereich der Onkologie. So konnte eine Curcumin-vermittelte Apoptose durch Aktivierung der Caspase-3 Protease mittels der Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) und der Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien von AK-5-Tumorzellen (ein Rattenhistiozytom) und Osteosarkomzellen ermittelt werden [23, 45]. Dazu setzt die ROS-Erzeugung durch Curcumin den Apoptose-induzierenden Faktor (AIF) frei, fördert den intrazellulären Glutathion (GSH) Abbau und induziert eine Chromatinkondensation, was zu einer DNA-Fragmentierung führt [114]. Weiterhin besitzt Curcumin die Möglichkeit, die Aktivität des Tumorsuppressorproteins p53 zu steigern, um eine selektive Apoptoseinduktion in Tumorzellen einzuleiten [191, 86]. Choudhuri et al. beobachteten eine p53-induzierte Apoptose in humane Brustkarzinomzellen (MCF-7) [52]. Bush et al. wiederum zeigten, dass Curcumin eine p53-unabhängige Apoptose in menschlichen Melanomzellen induzierte [39]. Weiterhin zeigte Curcumin hemmende Wirkungen auf NF-κB, MAPK, Zytokine und reduzierte die Expression von TNF-α sowie TNF-α-induzierten IL-1b, IL-6 und IL-8 [93, 51]. Zusätzlich

zeigte die Studie von Chen et al., dass Curcumin die c-Jun-N-terminalen Kinasen (JNK), welche zur Gruppe der MAP-Kinasen gehören und unter anderem die Zellproliferation und den programmierten Zelltod regulieren, hemmt, was die starke entzündungshemmende und antikanzerogene Wirkung des Curcumins erklären könnte [46]. Über eine Hemmung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B sowie eine Herunterregulierung der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-XL konnte eine effiziente Reduzierung des Zellüberlebens erreicht werden [61, 246, 201]. Es konnte nachgewiesen werden, dass Curcumin in verschiedenen Krebszellen zu einem Zellzyklusarrest in der G2-G2/M [53, 122] und seltener in der G1-Phase [96] der Mitose beiträgt und somit einer Tumorzellproliferation entgegenwirkt [191]. Dies geschah sowohl p-53 abhängig als auch unabhängig.

1.2.3 Bisdemethoxycurcumin

Bisdemethoxycurcumin ist ein weiteres Curcuminoid der Curcumawurzel. Es besitzt eine hellgelbe, intensive und stark färbende Farbe. Unter den Curcuminoiden ist Bisdemethoxycurcumin mit 3-5 % am schwächsten vertreten. Im Unterschied zu Curcumin fehlen diesem Molekül zwei Methoxygruppen, welche durch Wasserstoffatome ausgetauscht sind (siehe Abbildung 3) [59]. Interessanterweise schien Bisdemethoxycurcumin im Vergleich zu Curcumin eine schwächere antioxidative [106] und entzündungshemmende [83], dafür aber eine stärkere antikanzerogene [147] und antimetastatische [254] Aktivität zu besitzen. Die beiden fehlenden Methoxygruppen des Bisdemethoxycurcumin wurden für die niedrigere antioxidative Kapazität verantwortlich gemacht [6]. Die antikanzerogene Aktivität im Vergleich zu Curcumin ist jedoch umstritten. Neuere Studienergebnisse legen nahe, dass Bisdemethoxycurcumin zwar ebenfalls vielversprechende antikanzerogene Eigenschaften besitze [134, 255, 179], diese jedoch im Vergleich zu Curcumin schwächer ausfallen würden [3, 98]. Lesmana et al. zeigten in einer aktuellen Arbeit aus diesem Jahr (2021) die effektivere Proliferationshemmung von Curcumin im Vergleich zu Bisdemethoxycurcumin an MCF-7 Brustkrebszellen [132].

1.2.4 Kaffeesäure

Die Kaffeesäure (3,4-Dihydroxyzimtsäure) gehört zur Gruppe der Hydroxyzimtsäuren und damit zu den Phenolsäuren. Sie besitzt phenolische und acrylische funktionelle Gruppen und ist in der Pflanzenwelt weit verbreitet. Sie ist unter anderem in hohen Mengen in verschiedenen Kräutern und Beeren vertreten. Auch in der Curcumawurzel konnte die Kaffeesäure mittels der HPLC-Methode detektiert werden [207]. Sie gehört als Vorstufe von Ferulasäure, Coniferylalkohol und Sinapylalkohol zu den Bausteinen des Lignins, welches wichtig für den Aufbau der pflanzlichen Zellwand und die Verholzung der Zelle ist [26]. Laut Fachliteratur besitzt Kaffeesäure starke antioxidative, antimykotische und antivirale Eigenschaften [176]. Hemmati et al. deckten in ihrer Arbeit das antimuskarinische, antihistaminische und entzündungshemmende Potenzial der Kaffeesäure im Hinblick auf Asthmatherapie auf [91]. Kaffeesäurephenylester (CAPE), ein Derivat der Kaffeesäure, steht im Verdacht, neuroprotektive, renoprotektive sowie antikanzerogene Eigenschaften zu besitzen [210, 125, 104]. Die antikanzerogenen Eigenschaften erreicht die Kaffeesäure über eine gesteigerte ROS-Produktion und die Beeinträchtigung mitochondrialer Funktionen, was eine gesteigerte Apoptose-Neigung der entarteten Zellen zur Folge hat [153]. In den menschlichen Brustkrebszellen MCF-7 induzierte Kaffeesäurephenylester über die

Hemmung von NF- κ B ebenfalls den programmierten Zelltod [240]. Kaffeesäure ist das in der Natur am häufigsten vertretene Polyphenol und als solches für das Verständnis der pharmakologischen Eigenschaften sekundärer Pflanzenstoffe, auch bei der Curcumawurzel, von großer Bedeutung.

1.2.5 Isoquercitrin

Das Flavonoid Isoquercitrin (Quercetin-3-glucosid) ist eines der häufigsten Derivate von Quercetin. Es wurde bereits in verschiedenen Pflanzenarten isoliert. Neben Quercetin zeigte auch Isoquercitrin in zahlreichen Studien ein breites Wirkpektrum. Laut Kolesárová et al. besitzt Isoquercitrin antioxidative sowie entzündungshemmende Eigenschaften [119]. Die Fähigkeit, freie Radikale zu eliminieren, übertraf dabei die von Quercetin [164]. Die antientzündlichen Eigenschaften können auf eine Hemmung der Cyclooxygenase 2 und Lypooxygenase zurückgeführt werden. Wie Quercetin scheint auch Isoquercitrin eine wirksame biologische Aktivität gegenüber diversen Krebszellen zu besitzen. So führt das Flavonoid in Gebärmutterhalskrebszellen zu einem Zellzyklusarrest in der S-Phase. Weiterhin induzierte es Apoptose unter anderem durch chromosomal DNA-Abbau und die gesteigerte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Weiterhin besaß Isoquercitrin die Fähigkeit, die Expression des anti-apoptotischen Bcl-2-Proteins in entarteten Zellen zu hemmen, während es die Expression des pro-apoptotischen Proteins Bax steigerte [164]. Da Isoquercitrin neben einer besseren Bioverfügbarkeit ein vergleichbares Wirkprofil zu Quercetin besitzt, wird es als vielversprechende Substanz zur Vorbeugung und Behandlung diverser Krankheiten beschrieben [231].

1.2.6 Quercetin

Quercetin ist ein Pentahydroxyflavon ($C_{15}H_{10}O_7$) und gehört zur Gruppe der Flavonoide, einer Untergruppe der Polyphenole. Als Phytoestrogen besitzt es eine strukturelle Ähnlichkeit zum menschlichen Estrogen. Es kommt in vielen Hülsenfrüchten, Obst und Gemüsesorten vor [259]. Auch in der Curcumawurzel konnte Quercetin, hauptsächlich glykosyliert, als Quercetin-3-D-galactoside gefunden werden [207]. Aufgrund der immensen Strukturvielfalt und vielfältigen pharmakologischen Eigenschaften ist Quercetin Bestandteil diverser wissenschaftlicher Publikationen. Es wurde gezeigt, dass Quercetin antiinflammatorische, antioxidative und immunmodulierende Eigenschaften aufweist [113]. Weiterhin scheint Quercetin großes Potenzial bei der Prävention degenerativer Erkrankungen wie Diabetes, Bluthochdruck, Herz-Kreislauf- und neurodegenerativer Erkrankungen zu besitzen [166]. Insbesondere bei der Alzheimer-Krankheit könnte die Neutralisation reaktiver Sauerstoff-spezies durch Quercetin eine entscheidende Rolle bei der Prävention und Therapie einnehmen [257]. Nach oraler Aufnahme kann Quercetin von aktivierten Makrophagen aufgenommen und zu verletzten oder entzündeten Arterien gebracht werden, um dort seine Wirkung zu entfalten [111].

Laut Jeong et al. wirkt Quercetin der Karzinogenese entgegen, indem es eine krebszellspezifische Hemmung der Proliferation, resultierend aus einem Zellzyklusarrest in der G(1)-Phase der Mitose, induziert. Die Studie zeigte, dass die chemopräventive Wirksamkeit von Quercetin schon durch niedrige und physiologisch relevante Dosierung erreicht werden kann [107]. In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass Quercetin für eine konzentrations- und zeitabhängige Verringerung der Lebensfähigkeit von menschlichen MCF-7-Brustkrebszellen sorgte [60]. Ferner konnte festgestellt werden, dass

Quercetin die Sensitivität von MCF-7 Zellen gegenüber 5-Fluorouracil (5-FU) erhöht, sodass diese Kombination für die Therapie von Brustkrebs in Erwägung gezogen werden kann [148]. Die Behandlung mit Quercetin bewirkte eine Herunterregulierung des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2. Eine Spaltung der Caspase 3 und 9 sowie die Freisetzung von Cytochrome C legen eine mitochondriale Beteiligung nahe. Zusätzlich konnte eine gesteigerte Apoptose durch die Hochregulierung der Tumorsuppressorgene Bax und p53 beobachtet werden [213].

Die positiven Eigenschaften des Quercetins werden durch eine niedrige Bioverfügbarkeit und schnelle Metabolisierung gedämpft. Die Entwicklung verschiedener Nanoträger zeigte eine verbesserte Bioverfügbarkeit sowie eine gesteigerte Konzentration im gewünschten Zielgewebe [173].

1.2.7 Resorption und Bioverfügbarkeit

In diesem Kapitel soll auf die Resorption und Bioverfügbarkeit der sekundären Pflanzenstoffe am Beispiel von Curcumin als wichtigste Substanz dieser Arbeit näher eingegangen werden. Viele in-vitro und in-vivo Studien zeigten vielversprechende Effekte des Curcumins bei diversen Krankheitsbildern. Im Gegensatz dazu stellten schon die beiden Wissenschaftler Wahlstrom und Blennow 1978 fest, dass das in Wasser nahezu unlösliche Curcumin nach oraler Aufnahme über den Magen-Darm-Trakt ausgesprochen schlecht resorbiert wird. In ihrer in-vivo Studie mit Ratten wurde nach oraler Gabe von Curcumin (1g/kg) im Schnitt 75 % des Curcumins unverändert mit der Fäces wieder ausgeschieden [235]. Weitere Studien bestätigen diese niedrige Resorption und die damit einhergehende kurzweilige und niedrige Konzentration von Curcumin in Darm, Blut, Leber und Niere [182]. Ferner wird das im Magen-Darm-Trakt resorbierte Curcumin in Darm- und Leberzellen durch ein endogenes Reduktasen-System in die Hauptmetabolite Tetrahydrocurcumin und Hexahydrocurcumin reduziert (Abbildung 5), um anschließend durch die Uridin-5'-diphosphoglucuronyltransferasen (UGT) als Cosubstrat bevorzugt glucuronidiert bzw. durch Sulfotransferasen sulfatiert zu werden (Abbildung 6).

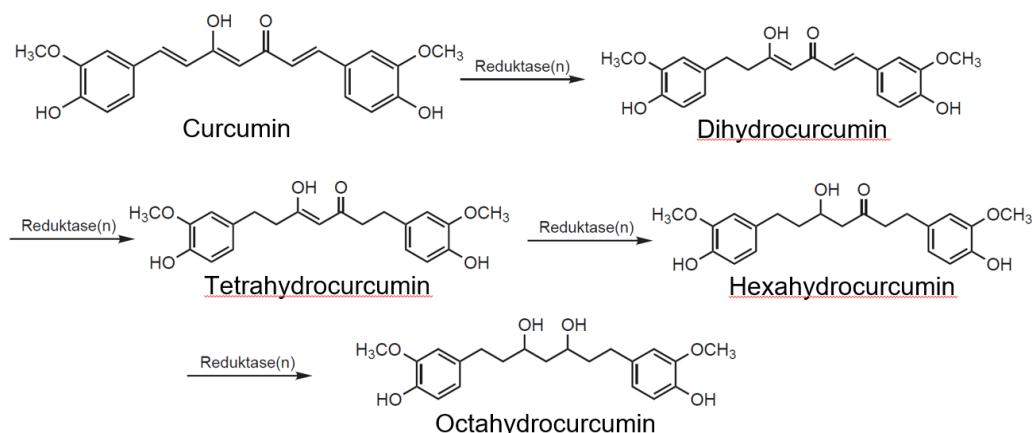


Abbildung 5: Phase I-Metabolismus von Curcumin

Darstellung der Strukturformel von Curcumin und seinen Hauptmetaboliten [59].

Hauptmetabolite des Curcumin sind nach oraler Gabe also Glucuronide und Glucuronsäure/Sulfat-Konjugate [17, 203, 102]. Eine weitere Möglichkeit ist die spontane Interaktion von Curcumin mit Glutathion, bei welcher Monoglutathionylcurcumin entsteht [59]. Die Einnahme von Curcumin in hohen

Dosen scheint für den Menschen ungefährlich zu sein. Eine empfohlene Höchstdosis variiert stark von 3mg-10g/kg [117]. Ein Grund hierfür kann auch die niedrige Bioverfügbarkeit sein [47]. Garcea et al. legt nahe, dass eine ausreichende Dosierung von Curcumin, um eine pharmakologische Aktivität auszuüben, wahrscheinlich nicht durchführbar ist [76].

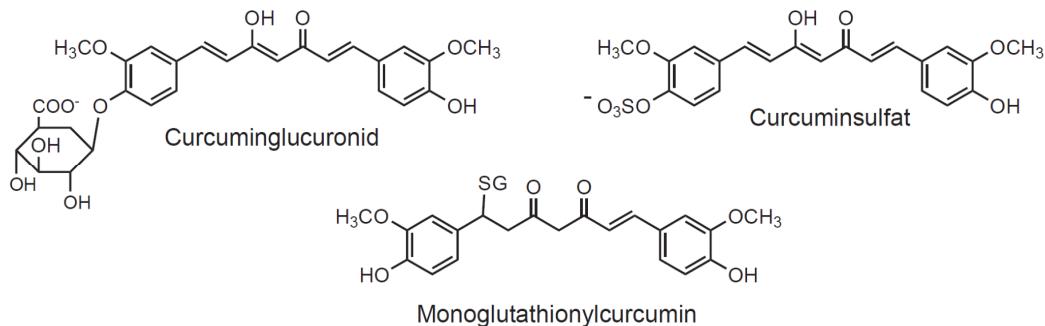


Abbildung 6: Phase II-Metabolite von Curcumin

Darstellung der Strukturformel der Glucuronide und Glucuronsäure/Sulfat-Konjugate von Curcumin [59].

Diese Erkenntnisse entfachten den Wunsch, die Bioverfügbarkeit von Curcumin durch verschiedene Verfahren zu erhöhen. So wird beispielsweise versucht, die Metabolisierung zu verringern, bzw. die Resorption von Curcumin zu erhöhen. Eine Steigerung der Bioverfügbarkeit erfolgte durch eine Komplexbildung aus Curcumin und Sojaphospholipiden, der simultanen Einnahme von Curcumin mit Piperin (Inhibitor der hepatischen und intestinalen Glucuronidierung) sowie durch das Verpacken von Curcumin in Micellen aus beispielsweise Natriumdeoxycholat [136, 202, 219, 140]. Einen weiteren Ansatz zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit bietet die Entwicklung von, mit Lipid-Nanopartikeln (SLNs) beladenen, Curcumin-Molekülen [195, 204, 228].

2. Zielsetzung

Krebskrankungen nehmen einen immer größer werdenden Stellenwert in unserem Alltag ein. Seit Jahrzehnten wissen wir, dass Ernährung, körperliche Aktivität und die Vermeidung exogener Risikofaktoren einen erheblichen Einfluss auf die Entstehung von Krebs-erkrankungen haben können. Es gilt, die Risikofaktoren zu vermeiden, für Aufklärung zu sorgen und Vorsorgemaßnahmen wahrzunehmen. Studien zeigten, dass ein hoher Konsum an sekundären Pflanzenstoffen, wie den Polyphenolen, über die Nahrung mit einer Risikosenkung bestimmter Krebskrankheiten einhergeht. Der Verzehr von Nahrungsmitteln wie Obst und Gemüse, die reich an Polyphenolen sind, scheint einen günstigen Effekt auf Brustkrebspatientinnen zu besitzen. Die Fülle an wissenschaftlichen Untersuchungen spiegelt hier das große Interesse der Bevölkerung wider. Es gibt jedoch widersprüchliche Veröffentlichungen, die keinen positiven Zusammenhang bestätigen können. Im Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik Rostock werden seit Jahren verschiedenste Lebensmittel auf Polyphenole und deren Auswirkungen auf unterschiedliche Krebszellen untersucht.

Die in der Curcumawurzel enthaltenen Polyphenole Curcumin, Bisdemethoxycurcumin, Quercetin, Isoquercitrin und Kaffeesäure gelten allgemein als Substanzen mit vielschichtigen antioxidativen, antiinflammatorischen und antimikrobiellen Wirkungen. Weiterhin konnten diesen Verbindungen in zahlreichen Forschungsarbeiten antikanzerogene Wirkmechanismen zugesprochen werden.

In Anbetracht der Studienlage zu den Vorteilen einer hohen Zufuhr sekundärer Pflanzenstoffe über die Nahrung sowie der antikanzerogenen Kenntnisse über die Polyphenole ist das Ziel dieser Arbeit, drei Curcumaextrakte herzustellen und diese in-vitro an Brustkrebszellen zu testen.

Hierfür werden drei Pflanzenextrakte aus der Curcumawurzel hergestellt. Diese sollen chromatographisch mithilfe der High Performance Liquid Chromatography (HPLC) aufgetrennt und auf das Vorhandensein der genannten Polyphenole untersucht werden. Anschließend soll eine experimentelle in-vitro Untersuchung der Viabilität und Proliferation an der malignen rezeptorpositiven (MCF-7) und benignen rezeptorpositiven (MCF-12A) Brustkrebszelllinie erfolgen. Später soll ein Vergleich zwischen den Extrakten und den synthetisch hergestellten Referenz-Polyphenolen in Bezug auf deren inhibitorische Wirkung gezogen werden. Hierbei wird der Effekt von Folsäure sowie die stimulierende Wirkung von Estradiol und die hemmende Wirkung von Tamoxifen miteinbezogen.

In der anschließenden Auswertung und Interpretation der Ergebnisse soll über einen therapeutischen und präventivmedizinischen Einsatz der Curcumaextrakte diskutiert und eine tägliche Supplementierung eines Curcuma Nahrungsergänzungsmittels erörtert werden.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte

Gerät/Software	Hersteller	Land
HPLC Smartline Manager 5000 Smartline Pump 1000 Smartline UV-Detector 2500 Smartline RI Detector Smartline Column Thermostat	Knauer	Deutschland
HPLC - Vertex-Säule 250 x 4 mm Eurospher 100-5 C 18 mit integrierter Vorsäule	Dr. Maisch GmbH	Deutschland
HPLC - Injektionsspritze Injektionsspritze 100 µl	Knauer	Deutschland
HPLC - Software ClarityChrom V 2.6.	Knauer	Deutschland
Mikrowelle Discover SP	CEM GmbH	Deutschland
Vakuum-Konzentrator-Zentrifuge Concentrator 5301	Eppendorf	Deutschland
Waage Sartorius Basic	Sartorius AG	Deutschland
Waage MT 5	Mettler Toledo	USA
Zentrifuge Universal 320R	Hettich	Deutschland
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus Instruments	Deutschland
Rollenmischer RM 5	Hecht	Deutschland
Vakuumpumpe Vacuum Pump MZ 2 NT	Vacuubrand	Deutschland
Mikroskop Axiostar Plus	Zeiss	Deutschland
Mikroskop Axiovert 40 C	Zeiss	Deutschland
Mikroskop-Kamera AxioCam MRc	Zeiss	Deutschland
pH-Mess-Elektrode Orion 3 Star pH Benchtop	Thermo Scientific	USA
Brutschrank Function Line	Heraeus Instruments	Deutschland

Gefrierschrank Herafreeze	Heraeus Instruments	Deutschland
Gefriertruhe	Liebherr Premium	Schweiz
Kühlschrank	Liebherr Premium	Schweiz
Wärmeschrank SM 400	Memmert	Deutschland
Sicherheitswerkbank Hera Safe	Heraeus Instruments	Deutschland
Vortexer Reax 2000	Heidolph	Deutschland
Plattenrüssler TPM – 2	Sarstedt	Deutschland
Microplate Reader Model 680	BioRad	USA
Multimode Reader GloMax Discover	Promega	USA
Glukoseautomat Biosen 5140	EKF - Diagnostic	Deutschland
Pipetten Research 5000 µl, 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl	Eppendorf	Deutschland
Multipipette Plus	Eppendorf	Deutschland
Eppendorf Pipetten- Spitzen 5000 µl, 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl	Eppendorf	Deutschland
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG.	Deutschland
Pipetten-Spitze 10 ml, 5 ml	Greiner Bio-One	Greiner Bio-One
Emmi®-H22 Ultraschallbad	EMAG AG	Deutschland
Bürker-Zählkammer		
Eismaschine AF80	Fa. Roth	Deutschland
Excel 2011 und 2018	Microsoft Corporation	USA
Filter (45 µm)	Sigma-Aldrich	USA
Flächendesinfektionsmittel Bacillol® AF	Paul Hartmann AG	Deutschland

Händedesinfektionsmittel Sterillium ® classic pure	Paul Hartmann AG	Deutschland
50 ml Tubes	Greiner Bio-One	Österreich
1,5 ml Tubes	Greiner Bio-One	Österreich
1,5 ml Kryotubes	TPP®	Schweiz
24-Well Platte, transparent	TPP®	Schweiz
96-Well Platte, transparent	Greiner Bio-One	Österreich
Zellkulturflasche 50ml	Greiner Bio-One	Österreich
Zellkulturflasche 75 cm ²	TPP®	Schweiz
Zellkulturflasche 155 cm ²	Greiner Bio-One	Österreich
Zelllinie MCF-12A	ATCC LGC Standards GmbH	Deutschland
Zelllinie MCF-7	ATCC LGC Standards GmbH	Deutschland
Parafilm®	Carl Roth GmbH & Co.KG	

3.1.3. Chemikalien

Bezeichnung	Zusatzbezeichnung	Hersteller	Land
Folsäure	CAS-Nr: 59-30-3	Sigma-Aldrich	USA
Curcumin	CAS-Nr: 458-37-7	Sigma-Aldrich	USA
Kaffesäure	CAS-Nr: 331-39-5	Sigma-Aldrich	USA
Bisdemethoxycurumin	CAS-Nr: 33171-05-0	Sigma-Aldrich	USA
Quercetin	CAS-Nr: 6151-25-3	Sigma-Aldrich	USA
Isoquercitrin	CAS-Nr: 482-35-9	Sigma-Aldrich	USA
Tamoxifen	CAS-Nr: 10540-29-1	Sigma-Aldrich	USA
Endoxifen	MDL-Nr: MFCD09840374	Sigma-Aldrich	USA
Estradiol	CAS-Nr: 50-28-2	Sigma-Aldrich	USA
Dimethylsulfoxid p.a. (DMSO)	CAS-Nr: 67-68-5	CarlRoth, Karlsruhe	Deutschland
Aqua destilliert		Eigenherstellung	Deutschland
Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM): mit Phenolrot, mit 10 % FKS	Dulbecco´s Modified Eagle Medium: mit 4,5 g/l Glukose, mit 20 ml/l L- Glutamin, 100ml/l FKS, 2 ml/l Penicillin/Streptomycin (100x), 5 ml/l Amphotericin B (250 µg/ml), 15 mg/l Phenolrot	CC-Pro GmbH, Oberdorla	Deutschland
Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM): ohne Phenolrot, mit 10 % FKS	mit 4,5 g/l Glukose, mit 20 ml/l L- Glutamin, 100 ml/l FKS, 2 ml/l Penicillin/Streptomycin (100x), 5 ml/l Amphotericin B (250 µg/ml)	CC-Pro GmbH, Oberdorla	Deutschland
Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM): ohne Phenolrot, mit 1 % FKS	mit 4,5 g/l Glukose, mit 20 ml/l L- Glutamin, 10 ml/l FKS, 2 ml/l Penicillin/Streptomycin (100x), 5 ml/l Amphotericin B (250 µg/ml)	CC-Pro GmbH, Oberdorla	Deutschland

FKS	Fetales Kälberserum	Sigma-Aldrich, Steinheim	USA
Amphotericin B	250 µl / ml	PAA, Cölbe	Deutschland
Penicillin / Streptomycin	10000 U / ml Penicillin + 10 mg / ml Streptomycin	PAA, Cölbe	Deutschland
Trypsin	Trypsin-EDTA 10x (5000 mg / l Trypsin, 2000 mg/l EDTA)	CC-Pro GmbH, Oberdorla	Deutschland
Trypan Blau	Trypan Blue Stain 0,4 %	Gibco, Auckland	Neuseeland
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung; pH 7,4 (8,0 g NaCl, 2,9 Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O + 0,2 g NaH ₂ PO ₄ + 0,2 KCl in 1 l Aquabidest	Biochrom GmbH	Deutschland
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colometric)		Roche, Basel	Schweiz
In Vitro Toxicology Assay Kit, Neutral Red based		Sigma-Aldrich, Steinheim	USA
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay - Kit		Promega, Madison	USA
CytoTox-Glo™- Cytotoxicity Assay – Kit		Promega, Madison	USA
Progesteron- Antikörper	PR antibody, IgG, unconjugated, Rabbit, Monoclonal	Biorbyt, Cambridge	Großbritannien
Estrogen Beta Antikörper	Mouse IgG2a	BioLegend, San Diego	USA
Estrogen Alpha Antikörper	Rabbit monoclonal IgG	Biorbyt, Cambridge	Großbritannien

H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid 35 %	Carl Roth, Karlsruhe	Deutschland
LinRed IHC	Substratkit für Peroxidase	Linaris, Dossenheim	Deutschland
Immpress Reagent Kit Peroxidase (IHC)	Anti-Mouse/Rabbit Ig MP-7500 R.T.U. Normal Horse Serum (2,5 %)	Vector, Burlingame	USA
Formafix 4 %		Carl Roth GmbH & Co.KG	Deutschland
pH-Puffer		Thermo Scientific, Waltham	USA
Ethanol 70 %		Eigenherstellung	
Methanol		J.T. Baker, Deventer	Niederlande

3.2. Methoden

3.2.1. Extraktherstellung

3.2.1.1. Pflanzliche Extrakte

In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Pflanzenextrakte der Curcumawurzel hergestellt und verwendet. Extrakt 1 ließ sich aus einem kommerziell erhältlichen Curcuma Gewürzpulver in Bioqualität herstellen. Extrakt 2 enthielt ein Curcuma Nahrungsergänzungsmittel, bestehend aus 1000 mg Curcuma (95 % Curcuminoide; Curcumin C3 Complex) und 10 mg schwarzem Pfeffer (95 % Piperin) aus den USA. Die Herstellung von Extrakt 3 erfolgte aus frischen Curcumawurzeln in Bioqualität aus dem Supermarkt. Alle Extrakte wurden in doppelter Menge hergestellt.

3.2.1.2. Ethanolverfahren

Das für die Herstellung der Pflanzenextrakte verwendete Ethanolverfahren kann wie folgt beschrieben werden: Die verschiedenen Formen der Curcumawurzel wurden auf 2x2 g abgewogen. Das Gewürzpulver (Extrakt 1) und das Nahrungsergänzungsmittel (Extrakt 2) waren sofort einsatzbereit. Die frischen Curcumawurzeln (Extrakt 3) ließen sich mithilfe eines Häckslers für die weitere Verarbeitung zerkleinern. Durch die Zugabe von 20 ml 70 %-gen Alkohol konnten die Extrakte verflüssigt werden. Im Anschluss erfolgte die Erwärmung der Extrakte in der Discover CEM Mikrowelle bei 60 °C und 80 Watt für 20 Minuten. Nach dem Abpipettieren der flüssigen Extrakt-Überstände konnten diese in der Zentrifuge (Hettich Universal 320 R) bei 4000 U/min für 15 min weiter in ihre festen und flüssigen Bestandteile aufgetrennt werden. Nun war es möglich, die flüssigen Überstände vorsichtig mit einer Pipette abzuziehen und auf Eppendorf-Tubes zu verteilen. Nachfolgend ließen sich die flüssigen Überstände der Extrakte durch wiederholtes Zentrifugieren (Heraeus BIOFUGE pico) bei 13000 U/min weiter auftrennen. Im letzten Schritt erfolgte die Filtrierung (Minisart Plus 0,45 µm) sowie die Einengung der Extrakte mittels Verdampfungs-Vakuum-Zentrifuge bei 45 °C. Schlussendlich standen alle drei Extrakte zu 2x1 ml (1000 mg/ml) eingeengt für die weitere Arbeit zur Verfügung.



Abbildung 7: Darstellung einzelner Arbeitsschritte bei der Extraktherstellung

Im linken Bild sind die drei Formen der Curcumawurzel zu sehen, aus welchen sich mithilfe der Mikrowelle im mittleren Bild die Pflanzenextrakte (rechtes Bild) herstellen ließen.

3.2.1.3. Aufbereitung der Extrakte, Referenzen und Kontrollen

Die Herstellung der für die Versuchsreihe benötigten Referenzen und Kontrollen erfolgte eigenhändig. Aus den Stammlösungen der Curcumaextrakte (100 mg/ml) ließen sich Verdünnungsreihen herstellen. Die Referenzen wurden nach ihrem Molekulargewicht von 5 mikromolar abgewogen und mit einem Milliliter ihres passenden Lösungsmittels (Negativkontrolle 2) angesetzt. Curcumin, Folsäure und

Kaffeesäure konnten in absolutem Alkohol, Isoquercitrin und Quercetin in absolutem Alk und DMSO im Verhältnis 1:1 und Bisdemthoxycurcumin in reinem DMSO gelöst werden.

Die Kontrollsubstanzen Estradiol, Tamoxifen und Endoxifen ließen sich in 1 ml absoluten Alkohol lösen.

Während der Versuchsreihe war das Verhältnis aus Untersuchungssubstanz zu Medium 1:100. Die jeweilige Endkonzentration der Testsubstanzen im Well ist in den Tabellen 3, 4 und 5 angegeben. Alle Testsubstanzen wurden mit der Sartorius Basic Waage abgewogen.

Zwischengelagert wurden sowohl die Stammlösungen und Verdünnungsreihen aller Extrakte als auch die Referenzen und Kontrollen lichtgeschützt bei -80°C.

Tabelle 3: Verdünnungsreihe und Endkonzentration der Extrakte

Angegeben sind die Verdünnungsreihen der Extrakte und deren Endkonzentrationen im Well

Extrakte [%]	Konzentration [mg/ml]	Endkonzentration im Well [µg/ml]
100	100	1000
50	50	500
20	22	200
10	10	100
5	5	50
3	3	30

Tabelle 4: Verdünnung und Endkonzentration der Referenzen

Angegeben sind die Referenzen und deren Endkonzentrationen im Well

Referenz	Konzentration [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Endkonzentration im Well [$\mu\text{g}/\text{ml}$]
Bisdemethoxycurcumin	1540 in DMSO	15,4
Curcumin	1840 in abs. Alk	18,4
Folsäure	1000 in abs. Alk	10
Kaffeesäure	450 in abs. Alk	4,5
Isoquercitrin	2320 in absolutem Alkohol/DMSO 1:1	23,2
Quercetin	1510 in absolutem Alkohol/DMSO 1:1	15,1

Tabelle 5: Verdünnung und Endkonzentration der Kontrollen

Angegeben sind die Kontrollen und deren Endkonzentrationen im Well

Kontrollen	Konzentration [g/ml]	Endkonzentration im Well [$\mu\text{g}/\text{ml}$]
Tamoxifen	0,0056 in abs. Alk	56
Endoxifen	0,006 in abs. Alk	60
Estradiol	0,0027 in abs. Alk	27

3.2.2. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Die HPLC, ein chromatographisches Trennverfahren, ermöglicht die qualitative und quantitative Darstellung einzelner Inhaltsstoffe eines Extrakts anhand ihrer Polarität. Das Ziel ist es, mithilfe dieses Verfahrens die Inhaltsstoffe der Curcumaextrakte qualitativ nachzuweisen. Für den qualitativen Nachweis von sekundären Pflanzenstoffen, wie den Polyphenolen, ist die HPLC in der Literatur als erfolgreiche Methode beschrieben [28, 123, 12].

Die HPLC trennt flüssige Stoffgemische in ihre Einzelverbindungen auf. Diese werden als Signalpeaks in Abhängigkeit zur Relationszeit im Chromatogramm dargestellt. Die Methode nutzt das physikalische Bindungsverhalten des zu untersuchenden Analyten.

Der Ablauf kann wie folgt beschrieben werden (Abbildung 8). Die zu untersuchende Substanz durchläuft die HPLC gemeinsam mit einer mobilen Phase (Elutionsmittel). Hierbei trifft sie in der Trennsäule auf die stationäre Phase. Wechselwirkt nun ein Bestandteil des Analyten stark mit der stationären Phase, verbleibt er länger in der Säule. Ist die Wechselwirkung schwächer, verlässt er die Säule früher. So erscheinen die Stoffe, je nach Polarität, zeitlich verschoben am Ende der Trennsäule und werden dort detektiert. Diese verschiedenen Zeitpunkte werden als Retentionszeitpunkte beschrieben, welche mithilfe eines UV-Detektors bei einer Wellenlänge von 254 nm gemessen wurden. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Reverse-Phase-HPLC (Umkehrchromatographie) bestand die mobile Phase aus DMSO (Dimethylsulfoxid) mit 10 % Aquabidestilata und Aquabidestilata, gemischt mit 10 % MeOH. Für die stationäre Phase wurde eine apolare Kohlenstoffsäule (C-18 Universalsäule) verwendet.

Es wird darauf geachtet, dass die mobile Phase mithilfe des Entgasers und der Pumpe blasenfrei mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min zu der Säule geleitet wird. Während der Messung wird die Zusammensetzung der mobilen Phase verändert, um einen Gradienten aufzubauen (Gradiententrennung). Dies hat zur Folge, dass auch Stoffe mit sehr ähnlichen physikalischen Bindungseigenschaften isoliert detektiert werden können [80].

Von dem zu untersuchenden Stoff ließen sich mithilfe einer Injektionsspritze 20 µl zur mobilen Phase hinzugeben. In der Vorsäule werden grobe Partikel herausgefiltert. Nach dem Durchlaufen werden die verschiedenen Stoffe zu den verschiedenen Retentionszeiten mithilfe des UV-Detektors im Chromatogramm am Computer dargestellt.

Das Chromatogramm zeigt die gemessenen Peaks und deren Retentionszeit an. Mithilfe von synthetischen Derivaten der in der untersuchten Substanz zu erwartenden Inhaltsstoffe, kann eine genaue Aussage über deren Vorhandensein getroffen werden. Weiterhin steht die Fläche unterhalb des Peaks proportional zur Menge des detektierten Stoffes. Dazu müssen die Pflanzenextrakte sowie die einzelnen Referenzen unter gleichen Voraussetzungen getestet und in der Software Clarity Chrome übereinandergelegt werden. Bei identischer Retentionszeit eines Referenzstoffes und eines Peaks im Chromatogramm der Pflanzenextrakte gilt dieser Stoff als nachgewiesen. Alle Messungen wurden unter den gleichen Messbedingungen sowie in 3-facher Ausführung durchgeführt. Im Anschluss an die Versuchsreihe hat der Chemiker Herr Prof. Dr. Jeschke der Ludwig-Maximilians-Universität München die Ergebnisse gesichtet und verifiziert.

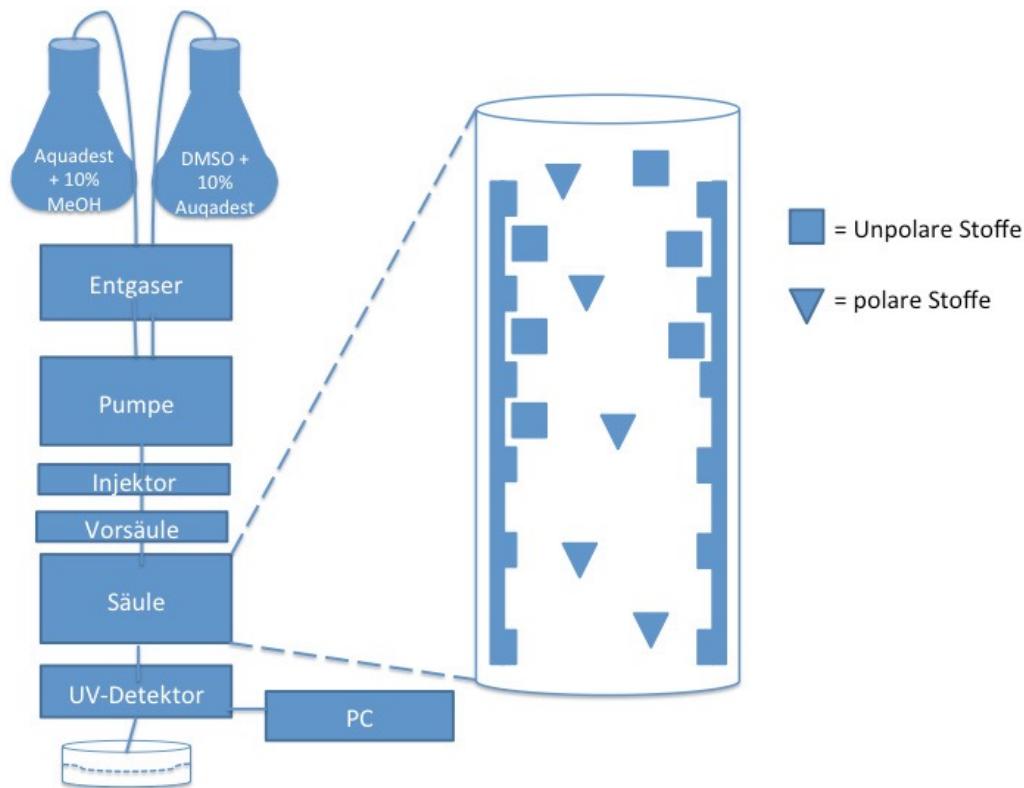


Abbildung 8: High Performance Liquid Chromatography

Dargestellt ist das Funktionsprinzip der High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Apparatur modifiziert nach M. Gey [80].

3.2.3. Zellkulturlinien

Für die Versuchsreihe dieser Forschungsarbeit wurden die maligne Mammakarzinomzelllinie MCF-7 und die bengine Mammakarzinomzelllinie MCF-12A verwendet. Beide Zellreihen stammen aus der Michigan Cancer Foundation. Die MCF-7 Zelllinie ist eine in der Brustkrebsforschung weit verbreitete epithelialie, östrogen -und progesteronrezeptorpositive Adenokarzinomzelle einer kauasischen 69-jährigen Frau aus dem Jahre 1970 [149]. Die Zellen haben eine ungefähre Verdopplungszeit von 29 Stunden.

Bei MCF-12A handelt es sich um eine pseudo-epitheliale, ebenfalls östrogen- und progesteronrezeptorpositive benigne Zelllinie einer postmenopausalen 60-jährigen nulliparischen kaukasischen Frau mit fibrozystischer Mastopathie. Die Zellen zeigen eine typische luminale Epithelmorphologie, dreidimensionales Wachstum in Kollagen und bilden in konfluenten Kulturen Kuppeln mit einer Verdopplungszeit von etwa 19 Stunden [150, 221]. Beide Zelllinien exprimieren die Östrogenrezeptoren alpha und beta.

3.2.4. Zellkultivierung

Die Zellkultivierung erfolgte im Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik Rostock mit dort eigens dafür angesetzten Zellkulturmedien. Beide Zellreihen wurden in unterschiedlichen Medien kultiviert.

Die Kultivierung der MCF-7 Zelllinie erfolgte in einem Medium, bestehend aus DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) und 10 % fetalem Kälberserum (FKS). Zusätzlich enthielt das Medium zum Schutz vor einer bakteriellen bzw. mykotischen Infektion 1,0 ml Penizillin-Streptomycin (10,000 U Penizillin/ml, 10 mg Streptomycin/ml) und 2,5 ml Amphotericin B (250 µg/ml). FKS wird verwendet, um den Zellen ein optimales Wachstum zu bieten und sie mit essentiellen Eiweißen zu versorgen. Es enthält essenzielle Wachstumsfaktoren und Nährstoffe.

Für die MCF-12A Zelllinie wurde eine 1:1 Basismixtur aus DMEM und Ham's F12 als Kulturmedium verwendet. Weiterhin enthielt es Horseserum (5 %), 100 ng/ml Cholera-Toxin (Cholera Toxin from Vibrio Cholerae), 10 µg/ml Bovine Insulin, 500 ng/ml Hydrocortison (95 %) und 20 ng/ml Epidermal Growth Faktor. Auch hier enthielt das Medium zusätzlich zum Schutz vor einer bakteriellen bzw. mykotischen Infektion 1,0 ml Penizillin-Streptomycin (10,000 U Penizillin/ml, 10 mg Streptomycin/ml) und 2,5 ml Amphotericin B (250 µg/ml). Bei beiden Kulturmedien sorgte Phenolrot für die charakteristische farbliche Darstellung.

3.2.5. Ansetzen der Zellkulturen

Zu Beginn der Versuchsreihe mussten die Zelllinien, die bei -180 °C unter Verwendung von Stickstoff gekühlt waren, aufgetaut werden. Um eine Kontamination zu vermeiden, wurde ausschließlich unter sterilen Kautelen unter der Laborabzugshaube gearbeitet. Da die eingefrorenen Zellen mit DMSO (Dimethylsulfoxid) vermengt waren, sollte dieses Zellgift zum Schutz der Zellen während des Auftauprozesses entfernt werden. Es wurde eine 1,5 ml Zellsuspension mit 26 ml Kulturmedium in einem 50 ml Tube vermengt und bei 120 U/min für 6 min ohne Bremse zentrifugiert. Das entstandene Pellet konnte nach Verwerfen des Überstandes mit 7 ml frischem Kulturmedium in einer 25 ml Zellkulturflasche mit Bakterienfilter (0,2 µm, Greiner) resuspendiert und anschließend nach gründlicher Begutachtung unter dem Lichtmikroskop in den Inkubator gelegt werden. Die Zellenkultivierung erfolgte bei 37 °C, einer Begasung mit 5 % CO₂ und in einer wasserdampf-gesättigten Atmosphäre.

3.2.6. Passagieren der Zellen

Um eine optimale Versorgung der Zellen zu gewährleisten, erfolgte alle 2-3 Tage ein Mediumwechsel. Bei einer Konfluenz von 70-80 % konnten die Zellen unter sterilen Kautelen unter einer Zellkulturbank

passagiert und in die nächstgrößere Zellkulturflasche überführt werden. Für die Passagierung wurde das Kulturmedium mit einer Pipette entfernt und verworfen. Anschließend konnte der Boden der Kulturflasche vorsichtig mit PBS gespült (MCF-12A: Trypsin statt PBS) und die adhärenten Zellen mit der Protease Trypsin von der Flaschenwand gelöst werden. Für diesen Vorgang war eine vollständige Benetzung des Bodens mit der Protease wichtig. Das Ablösen dauerte ca. 3 min und wurde zur Steigerung der Effektivität im Inkubator durchgeführt. Um eine Proteolyse und Schädigung der Zellen zu vermeiden, musste die Trypsinierung durch Zugabe von Kulturmedium (DMEM +10 % FKS) gestoppt werden. Die Zellsuspension ließ sich nun mit einer Pipette entnehmen und in ein 50 ml Tube überführen. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 5 min bei 1000 U/min ohne Bremse. Das entstandene Pellet konnte nach vorsichtigem Dekantieren des flüssigen Überstandendes mit frischem Zellkulturmedium (MCF-12A nun wieder mit DMEM/Ham's F12) versehen und durch den Vortex resuspendiert werden. Nachfolgend wurde die frische Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche überführt, unter dem Lichtmikroskop begutachtet und in den Inkubator gelegt.

3.2.7. Ermittlung der Lebendzellzahl

Da während dieser Versuchsreihe die verschiedenen Tests mehrfach durchgeführt wurden, war es enorm wichtig, eine gleichbleibende Zellzahl zu gewährleisten. Dies ließ sich durch eine Bestimmung der Zellzahl in der Zellsuspension vor jedem Test mithilfe der Bürker-Zählkammer (Abbildung 9) erreichen. Diese besteht aus einer oberen und unteren Kammer. Eine Lösung aus Zellkulturmedium, Zellsuspension aus der Zellkulturflasche und Trypanblau im Verhältnis 20:1:1 (360 µl DMEM-Medium + 20 µl Zellsuspension + 20 µl Trypanblau) half dabei, die Zellen unter dem Lichtmikroskop bei 100facher Vergrößerung zu zählen. Nach einer blasenfreien Überführung von 20 µl (10 µl je Kammer) dieser Lösung in die Zählkammer, konnten die vitalen Zellen von den abgestorbenen Zellen mithilfe des Mikroskops unterschieden werden. Der anionische Diazofarbstoff Trypanblau eignet sich gut zur Feststellung der Zellviabilität. Abgestorbene Zellen mit zerstörter Zellmembran nehmen den Farbstoff auf, während er in vitale Zellen nicht eindringen kann. Aufgrund dessen zeigen sich vitale Zellen nicht gefärbt, während letale Zellen den Farbstoff aufgenommen haben.

Durch das Addieren der Zellen aus den gleichgroßen 25 Quadranten der oberen und unteren Kammer konnte mit folgender Rechnung die Zellzahl ermittelt werden:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Zellzahl gezählt aus } 2 \times 25 \text{ Quadranten (Z)} \times 10 \text{ (V)} \times 104 \text{ (KF)}$$

Z = Summe der Zellzahl in 2 x 25 Quadranten

V = Verdünnung

KF = Kammerfaktor (104)

Mit der errechneten Zellzahl konnte die Zellsuspension jetzt weiter mit Nährmedium bis zur gewünschte Zellmenge pro Milliliter verdünnt werden.

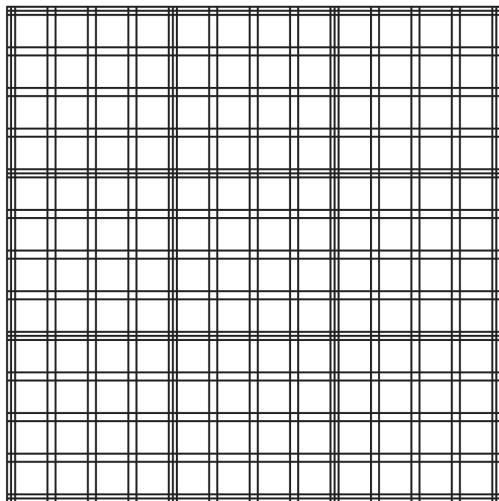


Abbildung 9: Zählnetz der Bürker-Zählkammer

Mithilfe des Zählnetzes der Bürker-Zählkammer lässt sich die Zellzahl bestimmen [38].

3.2.8. Immunhistochemie (IHC)

Zur Sicherung des Rezeptorstatus erfolgte eine immunhistochemische Untersuchung der Zelllinien auf eine Estrogen- α , Estrogen- β und Progesteron Rezeptorpositivität. Diese Rezeptoren werden laut Fachliteratur und Hersteller in beiden Zelllinien synthetisiert [149, 221].

Die Methode der Wahl war die indirekte Immunmarkierung (Abbildung 10). Der Primär-Antikörper bindet an den Hormonrezeptor. Ein Sekundär-Antikörper mit gekoppeltem Enzym bindet an den Komplex aus Hormonrezeptor und Primär-Antikörper. Aus der anschließenden Zugabe des Substrats resultiert dessen Spaltung durch das gekoppelte Peroxidase-Enzym des sekundären Antikörpers mit Farbumschlag, welcher im Falle einer Positivität lichtmikroskopisch beobachtet werden kann.

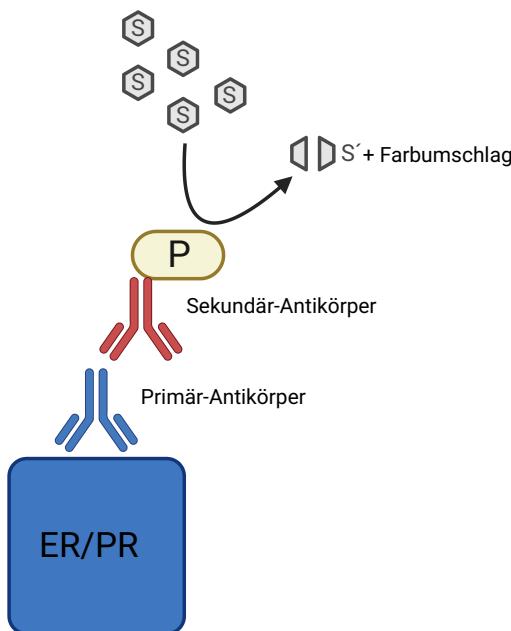


Abbildung 10: Immunhistochemie

Dargestellt ist die immunhistochemische Reaktion zur Sicherung des Hormonrezeptorstatus der Zelllinien. ER = Estrogenrezeptor, PR = Progesteronrezeptor, P = Peroxidase, S = Substrat.

Durchführung:

- Schritt 1: Bestimmung der Lebendzellzahl und Aussaat von 90.000 Zellen/ml für 24 h auf eine 24 Wellplatte im Inkubator bei physiologischen Bedingungen (37 °C, 5,0 % CO₂ und wasserdampfgesättigte Atmosphäre). Die Zellsuspension beträgt 300 µl/Well.
- Schritt 2: Dreimaliges Waschen der Wells mit PBS (300 µl).
- Schritt 3: Fixierung der Zellen durch 1 ml/Well Formarfix (4 % in PBS) für 30 min bei RT.
- Schritt 4: Dreimaliges Waschen der Wells mit PBS (300 µl).
- Schritt 5: Inkubation mit 300 µl/Well 0,3 % H₂O₂ für 30 min bei RT.
- Schritt 6: Zweimaliges Spülen der Wells mit PBS, dabei Platte schwenken.
- Schritt 7: Inkubation mit 4 Tropfen Horse Serum für 20 min bei RT.
- Schritt 8: Entfernen des Horse Serums (außer bei Negativkontrolle) und Hinzugabe von 100 µl Primär-Antikörper (ER-α, 1:10 verdünnt mit PBS, monoklonaler Antikörper der Firma Biorbyt, USA; ER-β, 1:10 verdünnt mit PBS, Progesteron, monoklonaler Antikörper der Firma Gene-Tex, USA; monoklonaler Antikörper der Firma Biorbyt, USA). Inkubation für 24 h im Kühlschrank (8 °C).
- Schritt 9: Antikörper entfernen und dreimaliges Waschen der Wells mit PBS.
- Schritt 10: Hinzufügen von 4 Tropfen (200 µl) sekundärem Antikörper (Universal Anti-Mouse/Rabbit IgG Antikörper der Firma Vector Laboratories, USA) und Inkubation für 30 min bei RT.
- Schritt 11: Dreimaliges Waschen der Wells mit PBS. Hinzufügen von 200 µl/Well LinRed IHC (Substrat) und Inkubation im Dunkeln für 5-10 min bei RT.
- Schritt 12: LinRed entfernen und Reaktion mit Aquabidest stoppen. Die Zellen mit PBS bedecken, um eine Austrocknung zu vermeiden.

Schritt 13: Betrachtung unter dem Lichtmikroskop mit entsprechender Dokumentation.

3.2.9. Glukose-, Laktat- und pH-Messung

Zur Darstellung der Stoffwechsellage der Brustkrebszellen nach Beimpfung mit den Extrakten, Referenzen und Kontrollen, erfolgte eine einmalige Glukose-, Laktat- und pH-Messung.

Der grundsätzlich höhere Energiebedarf von malignen Zellen im Vergleich zu benignen Zellen wird durch eine gesteigerte Glukose-Aufnahme und anschließende ATP-Produktion gedeckt. Die ATP-Synthese erfolgt entweder aerob über die mitochondrielle Glykolyse unter Einsatz von Sauerstoff und Glukose oder anaerob über die Umwandlung von Pyruvat in Laktat durch die Laktatdehydrogenase. Durch eine vermehrte anaerobe Energiegewinnung steigt der Laktatspiegel in der Zelle. Dies hat eine Verminderung des pH-Wertes zur Folge.

Geschädigte oder abgestorbene Zellen nehmen wenig bis keine Glukose auf. Schädigende Einwirkungen auf die Zelle und ihre Organellen können eine hypoxische Stoffwechsellage auslösen, wodurch eine vermehrt anaerobe Energiegewinnung mit erhöhter Laktatproduktion und resultierender Ansäuerung der Zelle zu beobachten ist.

Dementsprechend sind die Glukose- und Laktat-Konzentrationen sowie der pH-Wert ein Indikator für die Viabilität und Vitalität der Zellen.

Durchführung:

- Schritt 1: Bestimmung der Lebendzellzahl und Aussaat von 100 µl Zellsuspension/Well (MCF-7: 600.000 Zellen/ml; MCF-12A: 300.000 Zellen/ml) und Inkubation (MCF-7 für 24 h; MCF-12A für 48 h) im Brutschrank unter physiologischen Bedingungen (37 °C, 5,0 % CO₂ und wasserdampfgesättigte Atmosphäre).
- Schritt 2: Zugabe von 1 µl/Well der verschiedenen Extrakte, Referenzen, Kontrollen und Lösungsmittel. Inkubation für 48 h unter physiologischen Bedingungen im Brutschrank.
- Schritt 3: Die Glukosemessung erfolgte mit 20 µl Überstand in 1 ml Systemlösung mittels Glukose-Analysegerät (eco Twenty) im ansässigen Routinelabor vermessen.
Für die Laktatmessung wurden 20 µl Überstand in 1 ml Systemlösung gegeben und im Laktat-Analysegerät (Beckman Coulter AU 480) im ansässigen Routinelabor vermessen.
- Schritt 4: Die restlichen 60 µl dienten der pH-Analyse, welche mit dem pH-Messgerät (Orion 3 Star pH Benchtop Elektrode) im Forschungslabor durchgeführt werden konnte.

3.3. Testmethoden

3.3.1. CellTiter-Glo® - Viabilitätstest

Der CellTiter-Glo®-Viabilitätstest von Promega misst die Anzahl lebensfähiger Zellen durch Quantifizierung des ATP-Gehalts. Das Hinzufügen des CellTiter Reagent mit der hitzestabilen Luciferase (Ultra-GloTM Recombinant Luciferase) resultiert in einer Zelllyse und erzeugt ein lumineszierendes Signal vom „Glühtyp“, proportional zur im Zytosol vorhandenen ATP-Menge (Abbildung 11). Die gemessene ATP-Menge ist direkt proportional zur Anzahl der in der Kultur vorhandenen vitalen Zellen. Eine hohe Zellvitalität geht mit einer hohen zytosolischen ATP-Aktivität einher und kann über die entsprechend intensive Lumineszenz dargestellt werden.

1. Description (continued)

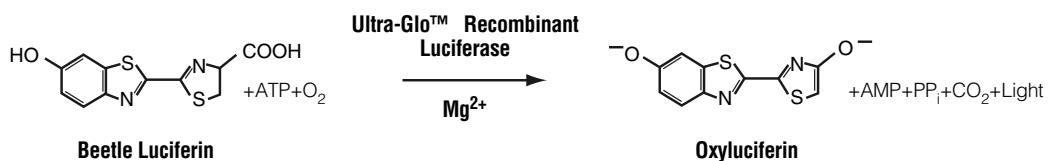


Abbildung 11: Darstellung der chemischen Reaktion des CellTiter-Glo®-Viabilitätstest

Luciferin wird im Beisein von ATP, Magnesium und Sauerstoff, katalysiert durch die Ultra-Glo™ Recombinant Luciferase, zu Oxyluciferin decarboxyliert [44].

Durchführung:

Schritt 1: Bestimmung der Lebendzellzahl und Aussaat von 50 µl Zellsuspension/Well (MCF-7: 600.000 Zellen/ml; MCF-12A: 300.000 Zellen/ml) und Inkubation (MCF-7 für 24 h; MCF-12A für 48 h) im Brutschrank unter physiologischen Bedingungen (37 °C, 5,0 % CO₂ und wasserdampfgesättigte Atmosphäre).

- Schritt 2: Zugabe von 0,5 µl/Well der verschiedenen Extrakte, Referenzen, Kontrollen und Lösungsmittel. Inkubation für 48 h im Brutschrank.
- Schritt 3: Bereitstellung des CellTiter Glo Reagent bestehend aus CellTiter Glo Puffer und CellTiter Glo Substrat.
- Schritt 4: Zugabe von 50 µl/Well CellTiter-Glo®-Reagenz. Inkubation auf dem Orbital-schüttler für 2 min zur Induktion der Zelllyse und Inkubation für 30 min bei RT, Ausbildung der Luminiszenz.
- Schritt 5: Umpipettieren der Wells auf die zur Messung geeignete weiße Wellplatte.
- Schritt 6: Messung der Luminiszenz mittels des GloMax® Luminometer (Promega).

3.3.2. CytoTox-Glo™ - Zytotoxizitätstest

Der CytoTox-Glo™ Test von Promega erlaubt es dem Benutzer, kolorimetrisch die relative Anzahl abgestorbener Zellen zu bestimmen. Durch den Verlust einer intakten Zellmembran können intrazelluläre Proteasen (Dead-Cell-Proteasen) von abgestorbenen Zellen extrazellulär mittels des AAF-Glo™ Substrats (Alanyl-alanyl-phenylalanyl-aminoluciferin) gemessen werden. Dieses Substrat kann die Zellmembran von vitalen Zellen nicht durchdringen. Durch die extrazelluläre Proteaseaktivität der abgestorbenen Zellen wird das AAF-Glo™ Substrat in Anwesenheit von ATP und Sauerstoff gespalten. Diese Spaltung führt zur Luciferase-vermittelten Lichtreaktion, welches durch eine Luminiszenzmessung mithilfe des GloMax® Luminometer erfasst werden kann (Abbildung 12). Die

Lumineszenzmenge korreliert direkt mit dem Prozentsatz der Zellen, die zytotoxischem Stress ausgesetzt sind [55].

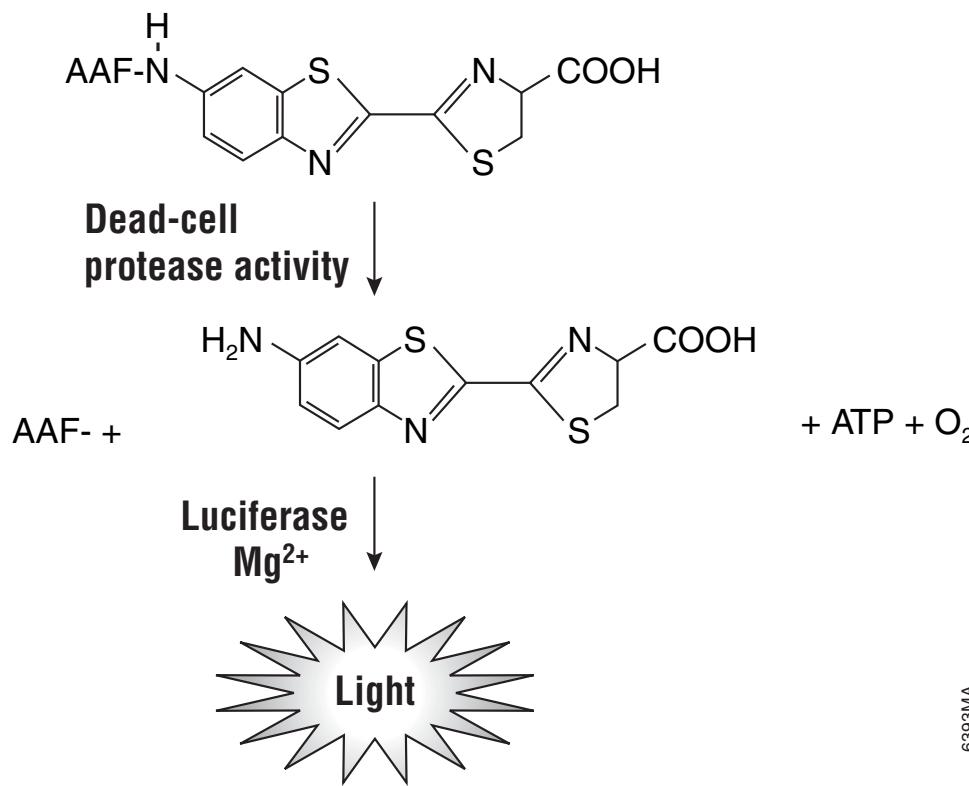


Abbildung 12: Darstellung der chemischen Reaktion des CytoTox-Glo™-Zytotoxitätstest

Die Spaltung des luminogenen AAF-Glo™-Substrats erfolgt durch die Protease-Aktivität toter Zellen. Nach der Spaltung wird ein Substrat für Luciferase (Aminoluciferin) freigesetzt, was zur Luciferase-vermittelten Lichtproduktion führt [55].

Zur Bestimmung der Zellviabilität erfolgte eine zweite Messung nach vollständiger Lysierung der Zellen durch Zugabe eines Lysereagenzes. Die Viabilität kann berechnet werden, indem das Lumineszenz-Totzellsignal der ersten Messung vom Gesamtlumineszenzwert der zweiten Messung abgezogen wird [55].

$$\text{Zellviabilität [\%]} = \text{Gesamtzytotoxitätssignal} - \text{Anfangszytotoxisches Signal}$$

Durchführung:

- Schritt 1: Bestimmung der Lebendzellzahl, Aussaat von 100 µl Zellsuspension (MCF-7: 300.000 Zellen/ml; MCF-12A: 150.000 Zellen/ml) und Inkubation (MCF-7 für 24 h; MCF-12A für 48 h) im Brutschrank unter physiologischen Bedingungen (37 °C, 5,0 % CO₂ und wasserdampfgesättigte Atmosphäre).
- Schritt 2: Zugabe von 1 µl/Well der verschiedenen Extrakte, Referenzen, Kontrollen und Lösungsmittel. Inkubation für 48 h im Brutschrank.
- Schritt 3: Herstellung des CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay Reagent aus AAF-Glo™ Substrat und Assay Buffer. Vorbereitung des Lysis Reagent.
- Schritt 4: Zugabe von 50 µl/Well CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay Reagent. Inkubation auf dem Orbitalschüttler für 2 min. Anschließend Inkubation für 15 min bei RT.

- Schritt 5: Übertragung auf ein Luminometer-kompatibles Well. Messung der Luminiszenz mittels des GloMax® Luminometer (Promega).
- Schritt 6: Übertragung in das jeweilige zuvor benutzte Well.
- Schritt 7: Zugabe von 50 µl/Well Lysis Reagent. Inkubation für 2 min auf dem Orbitalschüttler. Anschließend Inkubation für 15 min bei RT.
- Schritt 8: Erneute Übertragung auf ein frisches Luminometer-kompatibles Well. Zweite Messung der Luminiszenz mittels des GloMax® Luminometer (Promega).
- Schritt 9: Die Zellviabilität erhält man durch Subtrahieren der ersten von der zweiten Messung.

3.3.3. BrdU-Proliferationstest

Mithilfe des BrdU-Tests kann die Proliferationsaktivität der Zellen photometrisch gemessen werden. Es erfolgt der Einbau des Pyrimidinanalogs BrdU (5-Bromo-2'-deoxyuridine) anstelle des Nukleosids Thymidin während der Replikationsphase in die DNA der Zelle (Abbildung 13). Dieser Vorgang findet nur in vitalen Zellen statt. Nach einer Inkubationszeit von 3 Stunden bei MCF-7 und 4 Stunden bei MCF-12A werden die Zellen durch das Reagenz Fix-Denat fixiert und denaturiert. Durch die Zugabe von Antikörpern (Anti-BrdU-POD-Antikörper), welche an das in die DNA eingebaute BrdU binden, entsteht ein Immunkomplex. Diese Antikörper sind mit einer Peroxidase gekoppelt [43]. Durch das Substrat Tetramethylbenzidin, welches die Peroxidase spaltet, kann ein Farbumschlag erzeugt und kolorimetrisch mittels ELISA-Reader (Enzym linked Immunosorbent Assay) quantitativ gemessen werden. Dabei korreliert die gemessene Farbintensität mit der Zellproliferation [43]. Dementsprechend bedeutet ein intensiver Farbumschlag ein aktives Proliferationsverhalten der Zellen, während bei niedriger Aktivität nur eine geringe photometrische Absorbanz messbar ist.

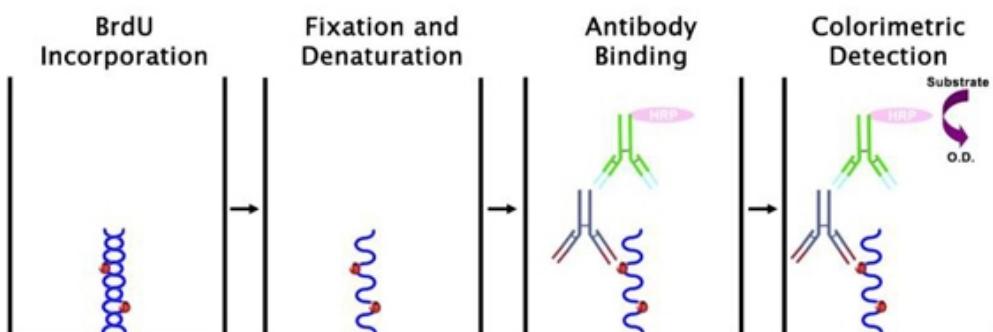


Abbildung 13: Schematische Darstellung des BrdU-Tests

BrdU wird in die DNA vitaler Zellen anstelle des Nukleosids Thymidin eingebaut. Anschließend kann ein immunhistochemisch erzeugter Farbumschlag kolorimetrisch gemessen werden [31].

Durchführung:

- Schritt 1: Bestimmung der Lebendzellzahl und Aussaat von 100 µl Zellsuspension (MCF-7: 300.000 Zellen/ml; MCF-12A: 150.000 Zellen/ml). Inkubation (MCF-7 für 24 h; MCF-12A für 48 h) im Brutschrank unter physiologischen Bedingungen (37 °C, 5,0 % CO₂ und wasserdampfgesättigte Atmosphäre).

- Schritt 2: Zugabe von 1 µl/Well der verschiedenen Extrakte, Referenzen, Kontrollen und Lösungsmittel. Inkubation für 48 h unter physiologischen Bedingungen im Brutschrank.
- Schritt 3: Zugabe von 10 µl/Well BrdU-Reagenz (1:100 verdünnt im jeweiligen Nährmedium) unter Ausschluss der Background-Kontrolle und Inkubation im Brutschrank (MCF-7 für 3 h und MCF-12A für 4 h).
- Schritt 4: Leichtes „Abklopfen“ der Wellplatten zum Entfernen des BrdU-Reagenzes und Zugabe von 200 µl/Well Fix-Denat-Lösung. Inkubation für 30 min bei RT.
- Schritt 5: „Abklopfen“ der Fix-Denat-Lösung und Zugabe von 100 µl/Well Anti-BrdU-POD Arbeitslösung (1:100 verdünnt in Antibody dilution solution). Inkubation für 60 min bei RT.
- Schritt 6: „Abklopfen“ der Anti-BrdU-POD Arbeitslösung und dreimaliges Spülen der Wells mit dem Waschpuffer (1:10 verdünnt mit destilliertem Wasser).
- Schritt 7: Waschlösung „Abklopfen“ und Zugabe von 100 µl/Well Substrat-Lösung. Inkubation für etwa 15 min bei RT. Die Farbentwicklung wird sichtbar. Leichtes Beklopfen der Wellplatten zur Homogenisierung der Farbentwicklung.
- Schritt 8: Abstoppen der Reaktion mit 25 µl/Well 1-molarer Schwefelsäure. Vermengen durch leichtes Beklopfen.
- Schritt 9: Photometrische Messung des Farbumschlags durch einen ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 420 nm und einer Referenzlänge von 620 nm.

3.3.4. Neutralrot Test-Zellvitalitätstest

Neutralrot wird von vitalen Zellen aktiv in ihre Lysosomen aufgenommen und dort gespeichert. So spiegelt auch dieser Test die Zellviabilität wider [100]. Dabei bindet das leicht kationische Neutralrot (3-Amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride) innerhalb des sauren Milieus der Lysosomen an anionische Reste, wird dadurch zum Ion und färbt sich rot (Abbildung 14). Der Farbstoff kann die Lysosomen aufgrund der Ionenfalle nicht mehr verlassen. Zellen, die sich im Sterbeprozess befinden oder schon tot sind, färben sich wenig bis gar nicht an. So kann je nach Neutralrotaufnahme zwischen vitalen und letalen Zellen unterschieden werden. Durch einen Waschvorgang wird der nicht aufgenommene Farbstoff aus den Wells entfernt. Durch eine anschließende Lysierung der Zellen kann der aus den Zellen freigesetzte Farbstoff spektrophotometrisch gemessen werden. Dabei korreliert die Farbintensität mit der Anzahl vitaler Zellen. Um eine Verfälschung der Messung zu vermeiden, wird das phenolrothaltige Medium vor dem Test durch farbloses Medium ausgetauscht. So können die entfernten Reste der Untersuchungssubstanzen die Messung nicht verfälschen.

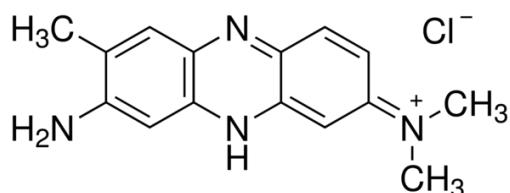


Abbildung 14: Darstellung der Strukturformel von Neutralrot

Der Farbstoff wird als Redoxindikator für die Bestimmung der Zellviabilität verwendet [100].

Durchführung:

- Schritt 1: Bestimmung der Lebendzellzahl und Aussaat von 100 µl Zellsuspension (MCF-7: 400.000 Zellen/ml; MCF-12A: 200.000 Zellen/ml). Inkubation (MCF-7 für 24 h; MCF-12A für 48 h) im Brutschrank unter physiologischen Bedingungen (37 °C, 5,0 % CO₂ und wasserdampfgesättigte Atmosphäre).
- Schritt 2: Zugabe von 1 µl/Well der verschiedenen Extrakte, Referenzen, Kontrollen und Lösungsmittel. Inkubation für 48 h unter physiologischen Bedingungen im Brutschrank.
- Schritt 3: Vorbereitung des Austauschmediums (DMEM ohne Zusätze), Zugabe von 4 % Neutral-Rot-Lösung in das Medium und Absenkung des pH-Werts auf etwa 7,2.
- Schritt 4: Austausch des alten durch das neue Medium. Inkubation im Brutschrank für 1 h. Regelmäßige Sichtkontrolle unter dem Lichtmikroskop.
- Schritt 5: Bei erster Kristallbildung in den Wells der Negativkontrolle 1 (Medium und Zellen) Medium aller Wells absaugen und mit 150 µl PBS spülen.
- Schritt 6: Zugabe von 100 µl/Well Solubilisierungslösung (Ethanol/Eisessigmischung) zur Lysierung der Zellen. Inkubation für 15 min bei RT auf dem Orbitalschüttler.
- Schritt 7: Photometrische Messung des Farbumschlags durch einen ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 570 nm und einer Referenzlänge von 655 nm.

3.3.5. Statistische Auswertung

Alle Tests wurde bei beiden Zellreihen mindestens dreimal für alle Referenzen, Kontrollen und Lösungsmittel wiederholt. Die photometrischen Tests BrdU und Neutralrot erfolgten in 4 x 3-facher Ausführung. Aufgrund der Gewährleistung einer höheren Mess-genaugigkeit bei den Luminiszenztests CellTiter-Glo® und CytoTox-Glo™ reichte eine 3 x 3-fache Bestimmung für alle Ansätze aus. Aus den gebildeten Mittelwerten ließen die Hintergrundabsorbanz (reines Medium) subtrahieren und der Standardfehler (SEM) errechnen. Sowohl die Untersuchungssubstanzen als auch die Kontrollen konnten nun mit ihrem jeweiligen Lösungsmittel (Negativkontrolle 2) verrechnet und ein Vergleich zu Medium und Zellen gezogen werden. Um die Ergebnisse nicht durch eine mögliche Zytotoxizität des Lösungsmittels (Negativkontrolle 2) zu verfälschen, wurde die Negativkontrolle 1 (Medium und Zellen) gleich 100 % gesetzt und mit den Lösungsmitteln (Negativkontrolle 2) verrechnet.

Dementsprechend wurde folgende Gleichung aufgestellt:

$$\text{Zellviabilität/Proliferation [%]} = \frac{(EW - HA)}{(Lösungsmittel - HA)} \times 100$$

Der Einfluss des jeweiligen Lösungsmittels wurde mittels einer zweiten Rechnung prozentual dargestellt:

$$\text{Zellviabilität/Proliferation [%]} = \frac{(\text{Mittelwert des Lösungsmittels} - HA)}{(\text{Medium und Zellen} - HA)} \times 100$$

EW: Mittelwert aus den experimentellen Werten

HA: Hintergrundabsorbanz (reines Medium)

Die statistische Auswertung und graphischen Darstellungen erfolgten mit der Software GraphPad Prism 9. Die Berechnung möglicher signifikanter Unterschiede zwischen den Extrakten, den Referenzen und den Kontrollen, verrechnet mit ihrem jeweiligen Lösungsmittel (Negativkontrolle 2), zur Negativkontrolle 1 (Medium und Zellen), ließ sich mittels gepaartem T-Test (bei einer Testsubstanz mit einer Kontrolle) und RM one-way ANOVA (bei mehreren Testsubstanzen mit einer Kontrolle) durchführen. Dabei wurde das Signifikanzniveau auf $*p < 0,05\%$, $**p < 0,01\%$, $***p < 0,001\%$ und $****p < 0,0001\%$ festgelegt.

4. Ergebnisse

4.1. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Nachfolgend sind die Ergebnisse der HPLC-Untersuchungen im jeweiligen Chromatogramm graphisch dargestellt. Zu sehen ist die UV-Absorption in AU (Absorptions Units) in Abhängigkeit zur Retentionszeit in Minuten. Es gelang die Auftrennung der Extrakte mit der Darstellung möglicher Inhaltsstoffe anhand ihrer Polarität.

Alle Extrakte zeigen mehrere größere und kleinere Peaks. Dies spricht für eine Fülle an Inhaltsstoffen. Zunächst wurden die Extrakte miteinander verglichen und anschließend auf ihre Inhaltsstoffe geprüft. Vergleicht man die Extrakte untereinander (Abbildung 15-17), so zeigt sich in Extrakt 1 (Curcuma Gewürzpulver) und 3 (Frische Curcumawurzel) ein deutlicher Peak mit einer geringen Retentionszeit. Dieser Peak im polaren Laufbereich der HPLC spricht für eine geringe Affinität zur Säule. Weitere deutliche Peaks zeigten sich im zunehmend apolaren Bereich mit einer Retentionszeit von 10-20 min. Bei sehr apolaren Verhältnissen (Retentionszeit: 20-30 min) zeigten sich vor allem im Extrakt 2 (Curcuma Nahrungsergänzungsmittel) weitere deutliche Peaks mit starker Affinität zur Säule.

Im Verlauf wurden die Inhaltsstoffe nach vorheriger Literaturrecherche als synthetische Reinstoffe chromatographiert und mit den Ergebnissen der Extrakte verglichen (Abbildung 18-23). Liegt in den übereinandergelegten Chromatogrammen der Peak einer Referenzanalyse zeitlich genau über einem Peak eines Extraktes, deutet das auf eine identische Polarität und einen qualitativen Nachweis des Stoffes im Extrakt hin.

In allen drei Extrakten konnten, in Absprache mit Herrn Prof. Dr. Jeschke von der LMU München, folgende Substanzen mittels der HPLC qualitativ nachgewiesen werden: Folsäure bei 1,9 min; Kaffeesäure bei 24,6 min; Isoquercitrin bei 24,7 min; Quercetin bei 27,7 min; Curcumin bei 28,9 min und Bisdemethoxycurcumin bei 29,2 min Retentionszeit.

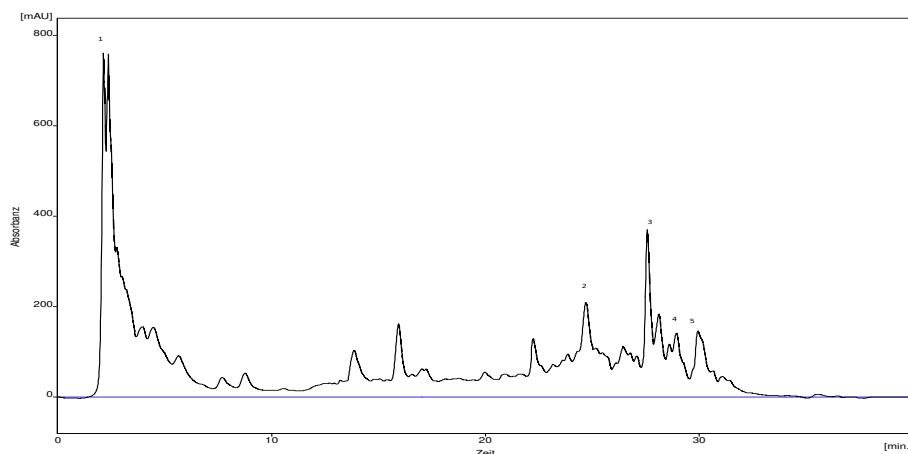


Abbildung 15: Chromatogramm des Extrakt 1 (Curcuma Gewürzpulver)

Ordinate: Absorbanz [mAU]; Abszisse: Zeit [min]. Retentionszeiten: Peak 1: Folsäure (1,9 min); Peak 2: Kaffeesäure (24,6 min) und Isoquercitrin (24,7 min); Peak 3: Quercetin (27,7 min); Peak 4: Curcumin (28,9 min); Peak 5: Bisdemethoxycurcumin (29,2 min).

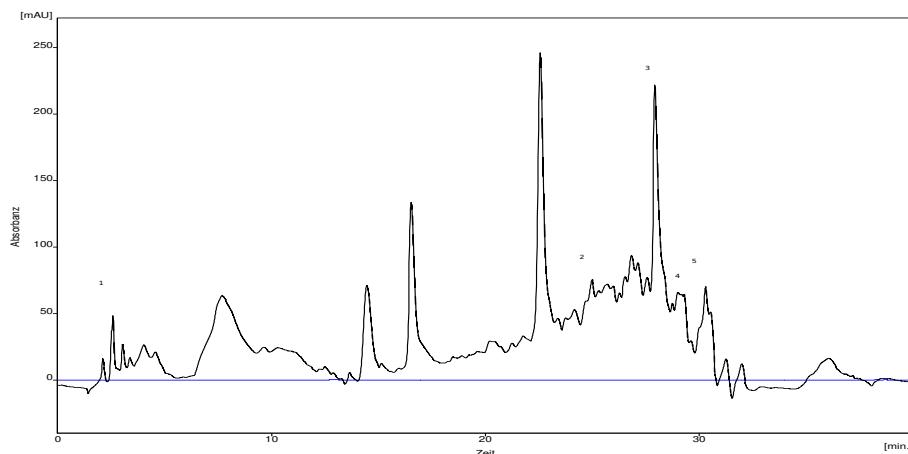


Abbildung 16: Chromatogramm des Extrakt 2 (Curcuma Nahrungsergänzungsmittel)

Ordinate: Absorbanz [mAU]; Abszisse: Zeit [min]. Retentionszeiten: Peak 1: Folsäure (1,9 min); Peak 2: Kaffeesäure (24,6 min) und Isoquercitrin (24,7 min); Peak 3: Quercetin (27,7 min); Peak 4: Curcumin (28,9 min); Peak 5: Bisdemethoxycurcumin (29,2 min).

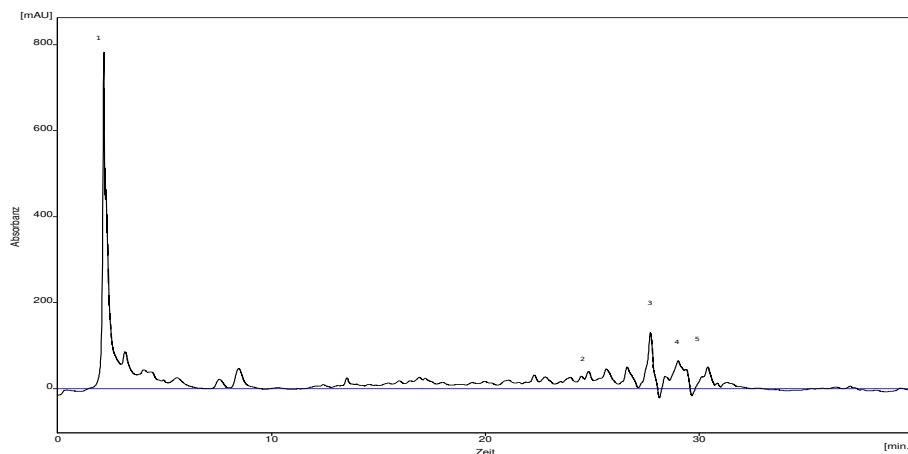


Abbildung 17: Chromatograph des Extrakt 3 (Frische Curcumawurzel)

Ordinate: Absorbanz [mAU]; Abszisse: Zeit [min]. Retentionszeiten: Peak 1: Folsäure (1,9 min); Peak 2: Kaffeesäure (24,6 min) und Isoquercitrin (24,7 min); Peak 3: Quercetin (27,7 min); Peak 4: Curcumin (28,9 min); Peak 5: Bisdemethoxycurcumin (29,2 min).

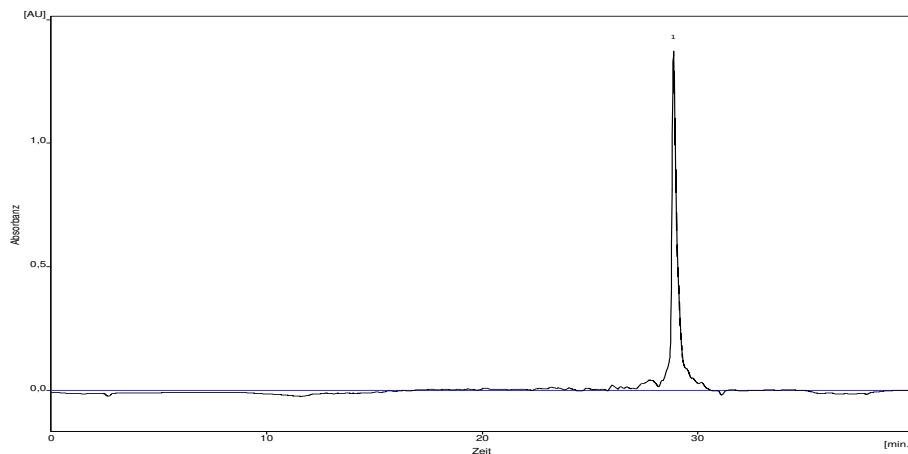


Abbildung 18: Chromatograph des Curcumins

Ordinate: Absorbanz [mAU]; Abszisse: Zeit [min]. Retentionszeit: Peak 1: 28,9 min.

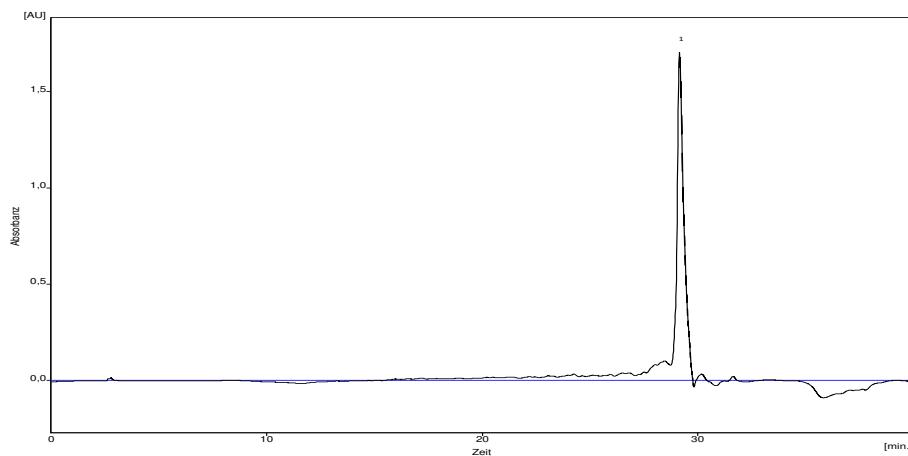


Abbildung 19: Chromatograph des Bisdemethoxycurcumins

Ordinate: Absorbanz [mAU]; Abszisse: Zeit [min]. Retentionszeit: Peak 1: 29,2 min

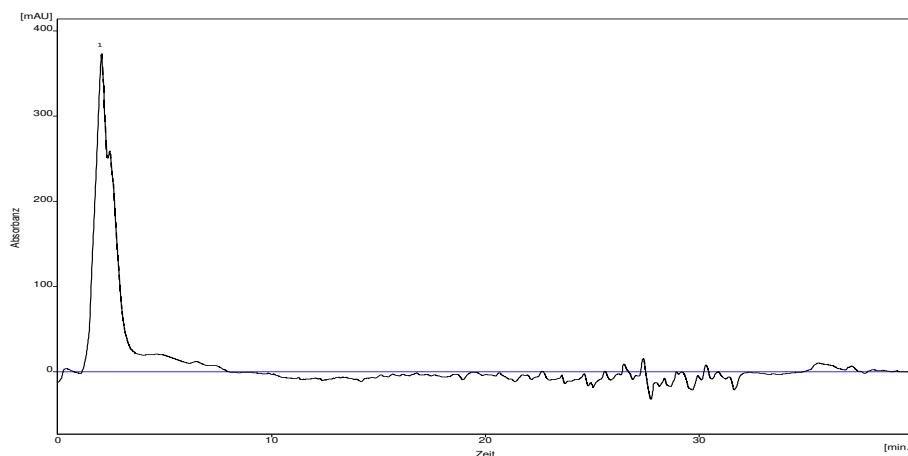


Abbildung 20: Chromatograph der Folsäure

Ordinate: Absorbanz [mAU]; Abszisse: Zeit [min]. Retentionszeit: Peak 1: 1,9 min.

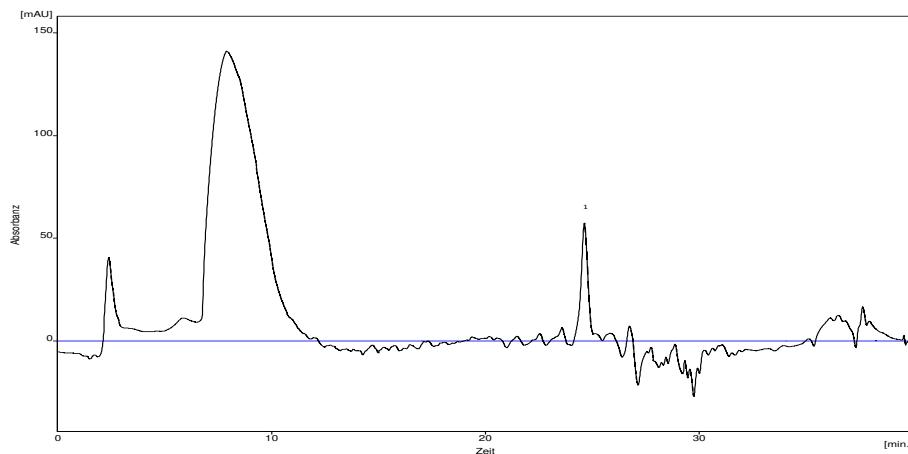


Abbildung 21: Chromatograph der Kaffeesäure

Ordinate: Absorbanz [mAU]; Abszisse: Zeit [min]. Retentionszeit: Peak 1: 24,6 min.

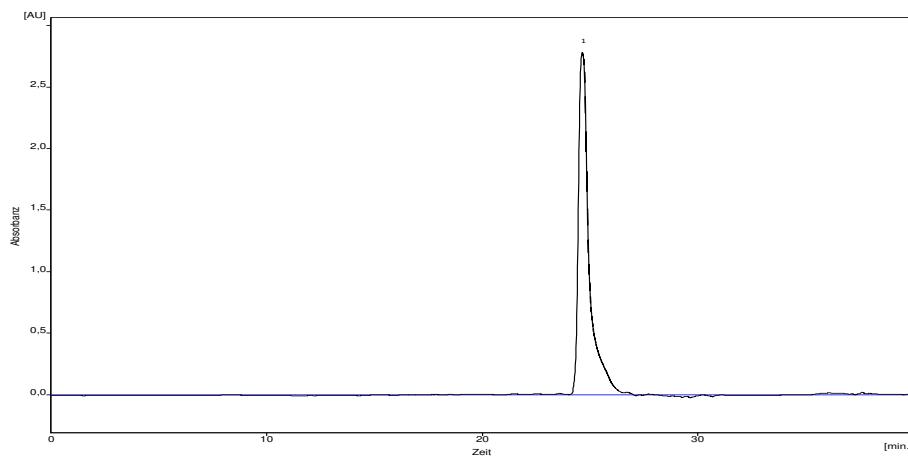


Abbildung 22: Chromatograph des Isoquercitrins

Ordinate: Absorbanz [mAU]; Abszisse: Zeit [min]. Retentionszeit: Peak 1: 24,7 min.

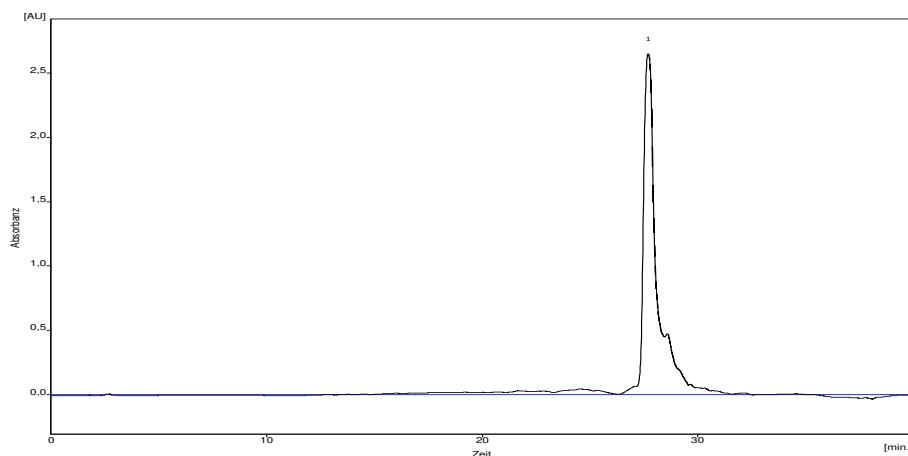


Abbildung 23: Chromatograph des Quercetins

Ordinate: Absorbanz [mAU]; Abszisse: Zeit [min]. Retentionszeit: Peak 1: 27,7 min.

4.2. Immunhistochemie

Mithilfe der Immunhistochemie konnte der Hormonrezeptorstatus der Zelllinien MCF-7 und MCF-12A gesichert werden (Abbildung 24). In beiden Zellreihen ließen sich die Estrogenrezeptoren- α (A), - β (B) sowie der Progesteronrezeptor (C) nachweisen. Für MCF-7 konnte weiterhin eine C-Erb (Her2)-Positivität bestätigt werden. Dies erfolgte über eine indirekte Immunreaktion mit Farbumschlag (rote Farbreaktion), welche im Lichtmikroskop bestätigt werden konnte. Die Negativkontrolle (D) zeigt keine rezeptorvermittelte Farbreaktion.

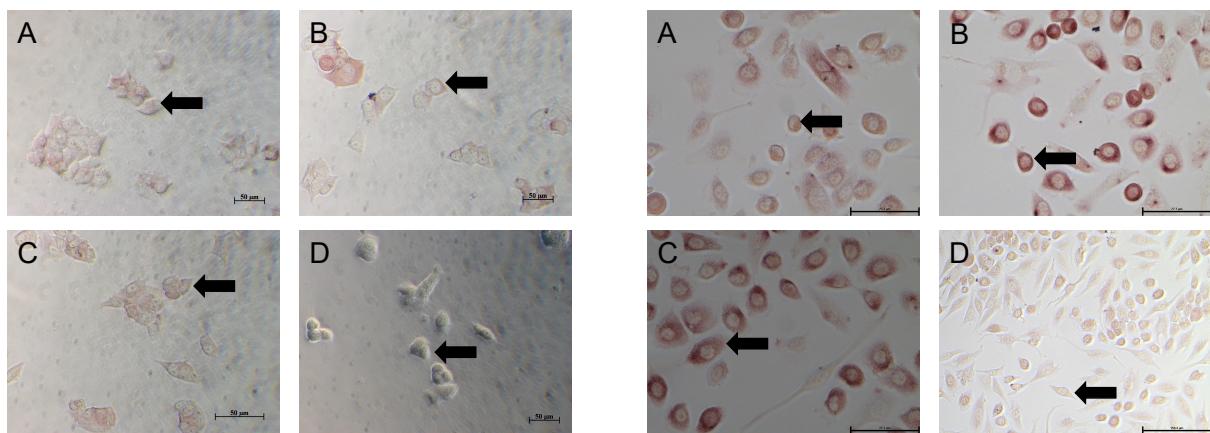


Abbildung 24: Immunhistochemie von MCF-7 (links) und MCF-12a (rechts)

Repräsentativ sind positive Ergebnisse für das Vorhandensein von ER- α (A), ER- β (B) und Progesteronrezeptor (C) dargestellt. Die Negativkontrollen (D) zeigen keine rote Farbreaktion.

4.3. CellTiter-Glo®-Viabilitätstest

Mit dem CellTiter-Glo®-Viabilitätstest konnte die Viabilität der Zellen anhand ihres ATP-Gehalts mittels Lumineszensmessung bestimmt und grafisch dargestellt werden.

Die Abszisse zeigt die Extraktverdünnungen, Referenzen und Kontrollen in µg/ml, während die Ordinate die Viabilität in % darstellt.

MCF-7:

Extrakt 1 (Curcuma Gewürzpulver) präsentierte bei 1000 µg/ml und 500 µg/ml eine signifikante Verminderung der Zellzahl (36,0 %; p = 0,0228; SE ± 4,7 und 51,3 %; p = 0,0269; SE ± 2,7). Bei 1000 µg/ml wurde dabei eine LD50 erreicht. Weiterhin zeigte Extrakt 3 (frische Curcumawurzel) in seiner höchsten Konzentration eine Hemmung der Viabilität auf 59,7 % (p = 0,0345; SE ± 6,2). Extrakt 2 (Curcuma Nahrungsergänzungsmittel) hatte keine inhibierende Wirkung auf das Zellwachstum (Abbildung 25).

Bisdemethoxycurcumin und Curcumin zeigten bei den Referenzen ebenfalls eine sehr deutliche (8,0 %; p = 0,0136; SE ± 3,5) und deutliche (56,6 %; p = 0,0388; SE ± 5,8), signifikante Verminderung der Zellzahl (Abbildung 26).

Bei den Kontrollen und Lösungsmitteln hatte Estradiol keine, Tamoxifen und Endoxifen eine stark zytotoxische Wirkung (Abbildung 27).

MCF-12A:

Extrakt 1 (Curcuma Gewürzpulver) ließ bei 1000 µg/ml eine signifikante Verminderung der Zellzahl auf 45,6 % (p = 0,0331; SE ± 1,7) beobachten. Die beiden anderen Extrakte wiesen keine inhibierende Wirkung auf (Abbildung 28).

Bei den Referenzen überzeugten Bisdemethoxycurcumin (10,6 %; p = 0,0432; SE ± 2,1) und Curcumin (16,6 %; p = 0,0232; SE ± 4,7) sowie Kaffeesäure (47,0 %; p = 0,0234; SE ± 7,767) und Quercetin (28,5 %; p = 0,0388; SE ± 9,1) mit einer signifikanten Hemmung der Viabilität (Abbildung 29).

Nach der Beimpfung der Zellen mit den Kontrollen Estradiol, Endoxifen und Tamoxifen konnten die erwarteten Ergebnisse beobachtet werden. Bei den Lösungsmitteln überraschte Alkohol 90 %/DMSO und DMSO mit einer moderaten bis starken Zytotoxizität (Abbildung 30).

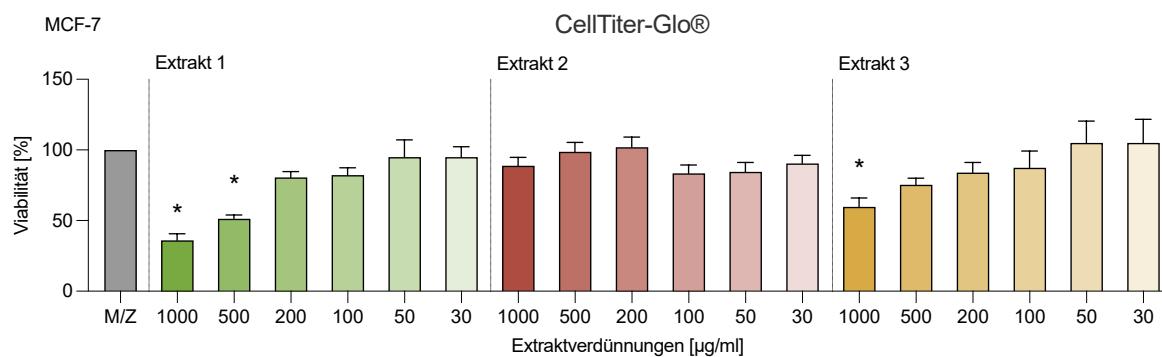


Abbildung 25: Einfluss der Extraktverdünnungen auf MCF-7 Zellen im CellTiter-Glo®-Test

Dargestellt ist die Viabilität [%] nach 48 h Inkubation mit den Extraktverdünnungen [µg/ml]. Die Quantifizierung zeigt den Mittelwert \pm SEM. N = 3. Signifikanzen sind mit * $p < 0,05$ % angegeben. M/Z = Medium/Zellen; Extrakt 1 = Curcuma Gewürzpulver; Extrakt 2 = Curcuma Nahrungsergänzungsmittel; Extrakt 3 = Frische Curcumawurzel.

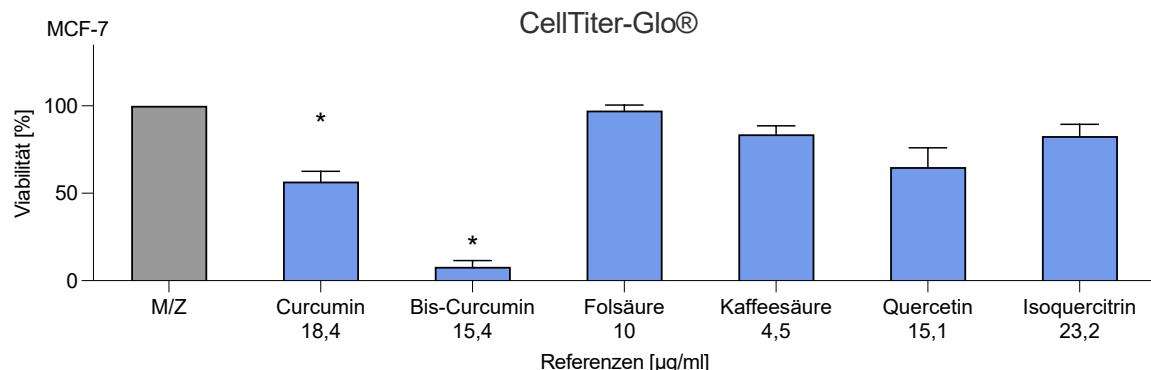


Abbildung 26: Einfluss der Referenzen auf MCF-7 Zellen im CellTiter-Glo®-Test

Dargestellt ist die Viabilität [%] nach 48 h Inkubation mit den Referenzen [µg/ml]. Die Quantifizierung zeigt den Mittelwert \pm SEM. N = 3. Signifikanzen sind mit * $p < 0,05$ % angegeben. Lösungsmittel: Curcumin = DMSO; Bis-Curcumin = Alkohol 90 %; Folsäure = Alkohol 90 %; Kaffeesäure = Alkohol 90 %; Quercetin und Isoquercitrin = Alkohol 90 % / DMSO 1:1. M/Z = Medium/Zellen; Bis-Curcumin = Bisdemethoxycurcumin.

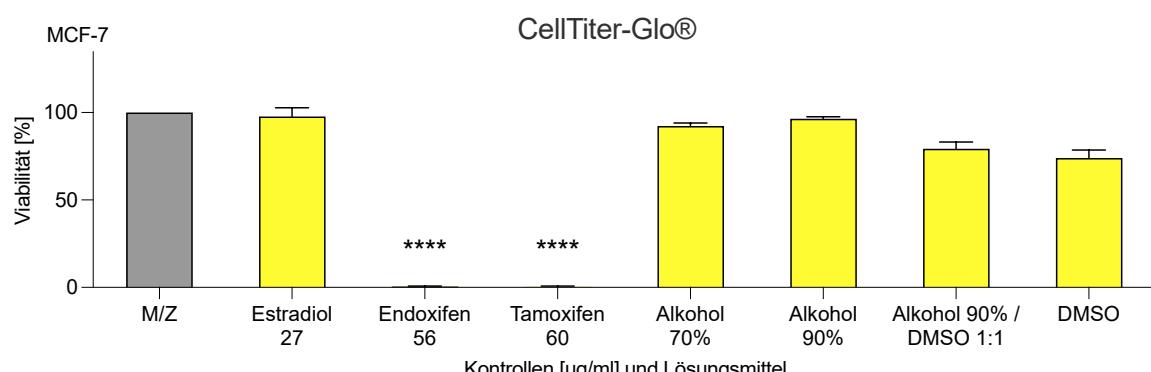


Abbildung 27: Einfluss der Kontrollen und Lösungsmittel auf MCF-7 Zellen im CellTiter-Glo®-Test

Dargestellt ist die Viabilität [%] nach 48 h Inkubation mit den Kontrollen und Lösungsmitteln [µg/ml]. Die Quantifizierung zeigt den Mittelwert \pm SEM. N = 3. Signifikanzen sind mit **** $p < 0,0001$ % angegeben. M/Z = Medium/Zellen.

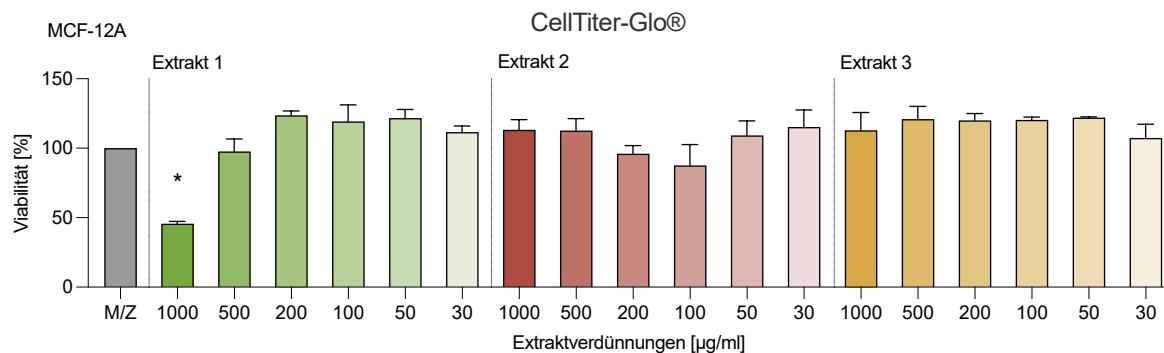


Abbildung 28: Einfluss der Extraktverdünnungen auf MCF-12A Zellen im CellTiter-Glo®-Test

Dargestellt ist die Viabilität [%] nach 48 h Inkubation mit den Extraktverdünnungen [µg/ml]. Die Quantifizierung zeigt den Mittelwert \pm SEM. N = 3. Signifikanzen sind mit *p < 0,05 % angegeben. M/Z = Medium/Zellen; Extrakt 1 = Curcuma Gewürzpulver; Extrakt 2 = Curcuma Nahrungsergänzungsmittel; Extrakt 3 = Frische Curcumawurzel.

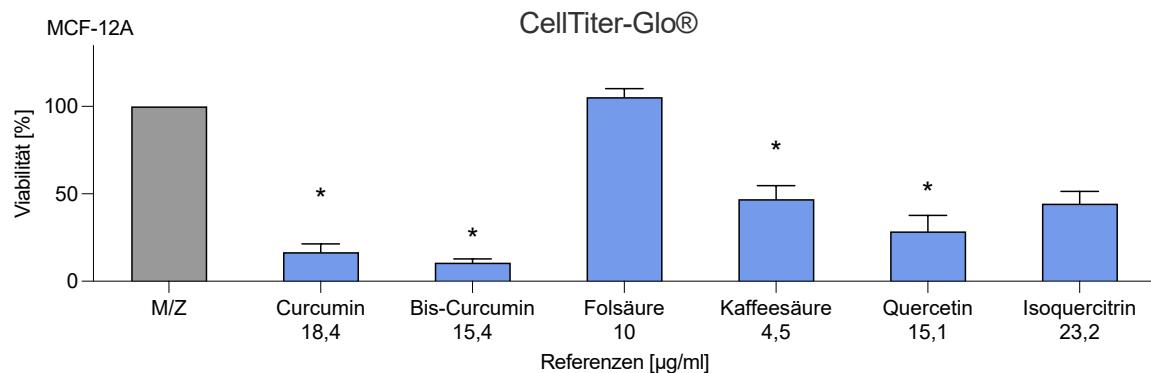


Abbildung 29: Einfluss der Referenzen auf MCF-12A Zellen im CellTiter-Glo®-Test

Dargestellt ist die Viabilität [%] nach 48 h Inkubation mit den Referenzen [µg/ml]. Die Quantifizierung zeigt den Mittelwert \pm SEM. N = 3. Mögliche Signifikanzen sind mit *p < 0,05 % angegeben. Lösungsmittel: Curcumin = DMSO; Bis-Curcumin = Alkohol 90 %; Folsäure = Alkohol 90 %; Kaffeesäure = Alkohol 90 %; Quercetin und Isoquercitrin = Alkohol 90 % / DMSO 1:1. M/Z = Medium/Zellen; Bis-Curcumin = Bisdemethoxycurcumin.

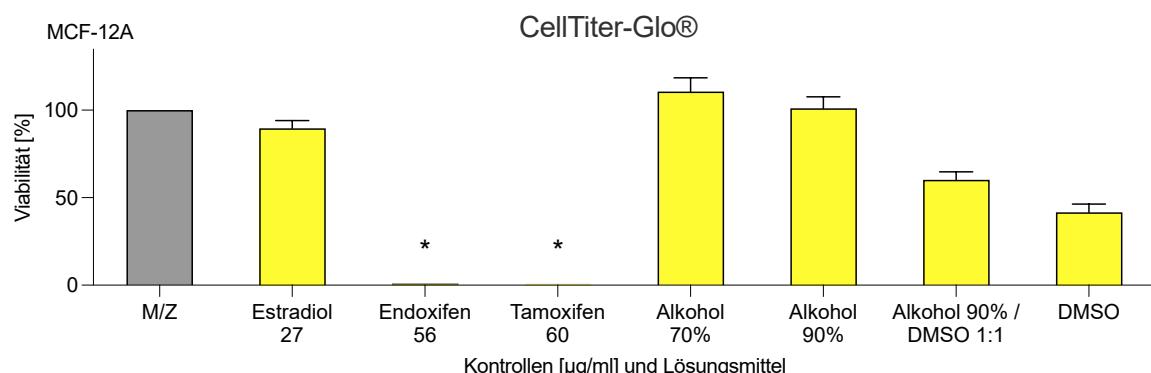


Abbildung 30: Einfluss der Kontrollen und Lösungsmittel auf MCF-12A Zellen im CellTiter-Glo®-Test

Dargestellt ist die Viabilität [%] nach 48 h Inkubation mit den Kontrollen und Lösungsmitteln [µg/ml]. Die Quantifizierung zeigt den Mittelwert \pm SEM. N = 3. Signifikanzen sind mit *p < 0,05 % angegeben. M/Z = Medium/Zellen.

4.4. CytoTox-Glo™- Zytotoxizitätstest

Anhand des CytoTox-Glo™-Zytotoxizitätstests ließ sich die Anzahl der abgestorbenen Zellen über eine Lumineszenzmessung durch Ermittlung der Dead-Cell-Proteasen-Aktivität messen. Um die Viabilität in % angeben zu können, wurde eine zweite Messung nach vollständiger Lysierung der Zellen durchgeführt. Die Zellviabilität konnte berechnet werden, indem die aus dem experimentellen Zelltod resultierenden Lumineszenzsignale von den Gesamt-lumineszenzwerten subtrahiert wurden [55]. Die Abszisse zeigt die Extraktverdünnungen, Referenzen und Kontrollen in µg/ml und die Ordinate die Viabilität in % an.

MCF-7:

Extrakt 1 (Curcuma Gewürzpulver) und Extrakt 2 (Curcuma Nahrungsergänzungsmittel) lieferten hemmende Ergebnisse bei 1000 µg/ml mit signifikanten Verminderungen der Zellzahl auf 46,0 % (p = 0,0312; SE ± 6,1) und 66,3 % (p = 0,0107; SE ± 11,7; Abbildung 31).

Bei den Referenzen präsentierte Bisdemethoxycurcumin eine sehr starke und Kaffeesäure eine moderate Zytotoxizität mit einer Viabilität von 6,3 % (p = 0,0142; SE ± 1,4), beziehungsweise 45,3 % (p = 0,0079; SE ± 4,0; Abbildung 32).

Die Kontrollen zeigten bei Estradiol eine leicht stimulierende, bei Endoxifen und Tamoxifen eine gänzlich letale Wirkung auf das Zellwachstum. Die Lösungsmittel hatten keine, beziehungsweise eine schwache zytotoxische Wirkung (Abbildung 33).

MCF12:

Bei den Extrakten überzeugte die stärkste Verdünnung von Extrakt 1 (Curcuma Gewürzpulver) mit einer moderaten und signifikanten Verminderung der Zellzahl auf 68,3 % (p = 0,0394; SE ± 2,0). Die beiden anderen Extrakte wiesen keine signifikante zytotoxische Wirkung auf die Brustkrebszellen auf (Abbildung 34).

Bei den Referenzen konnte Bisdemethoxycurcumin mit einer sehr deutlichen (8,3 %; p<0,0001; SE ± 0,3) und Curcumin (27,6 %; p = 0,0204; SE ± 2,6) sowie Quercetin (40,3 %; p = 0,0168; SE ± 2,9) mit einer moderaten und signifikanten Verminderung der Zellzahl überzeugen (Abbildung 35).

Die Beimpfung der Zellen mit den Kontrollen ergab bei Estradiol eine leicht stimulierende, bei Endoxifen und Tamoxifen eine deutlich zytotoxische Wirkung. Bei den Lösungsmitteln zeigte Alkohol 90 % / DMSO und reines DMSO eine moderate Zytotoxizität (Abbildung 36).

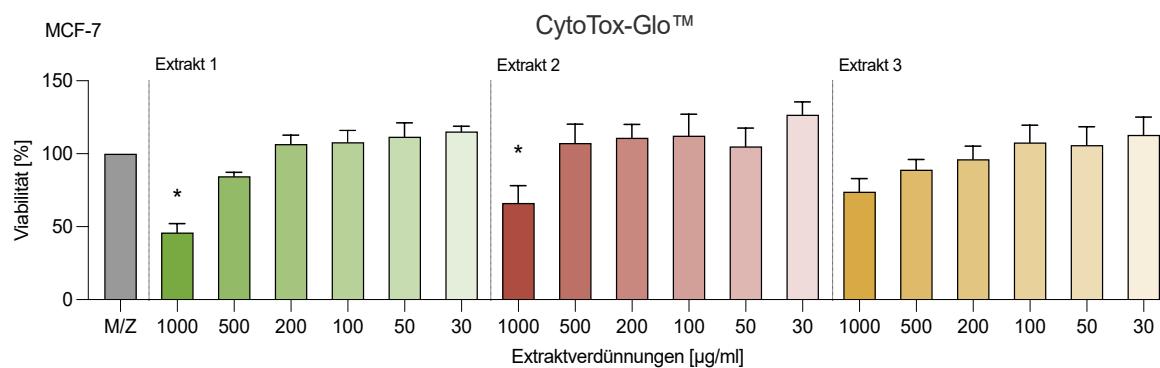


Abbildung 31: Einfluss der Extraktverdünnungen auf MCF-7 Zellen im CytoTox-Glo™-Test

Dargestellt ist die Viabilität [%] nach 48 h Inkubation mit den Extraktverdünnungen [µg/ml]. Die Quantifizierung zeigt den Mittelwert \pm SEM. N = 3. Signifikanzen sind mit *p < 0,05 % angegeben. M/Z = Medium/Zellen; Extrakt 1 = Curcuma Gewürzpulver; Extrakt 2 = Curcuma Nahrungsergänzungsmittel; Extrakt 3 = Frische Curcumawurzel.

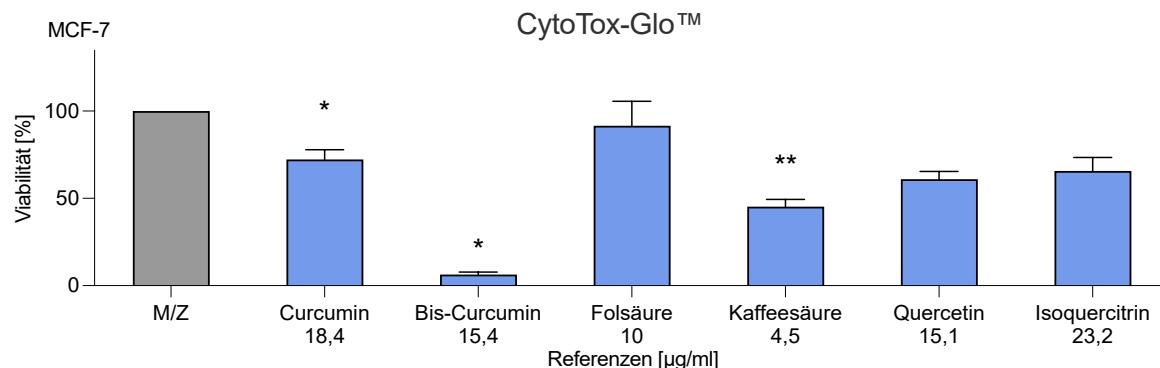


Abbildung 32: Einfluss der Referenzen auf MCF-7 Zellen im CytoTox-Glo™-Test

Dargestellt ist die Viabilität [%] nach 48 h Inkubation mit den Referenzen [µg/ml]. Die Quantifizierung zeigt den Mittelwert \pm SEM. N = 3. Signifikanzen sind mit *p < 0,05 % und **p < 0,01 % angegeben. Lösungsmittel: Curcumin = DMSO; Bis-Curcumin = Alkohol 90 %; Folsäure = Alkohol 90 %; Kaffeesäure = Alkohol 90 %; Quercetin und Isoquercitrin = Alkohol 90 % / DMSO 1:1. M/Z = Medium/Zellen; Bis-Curcumin = Bisdemethoxycurcumin.

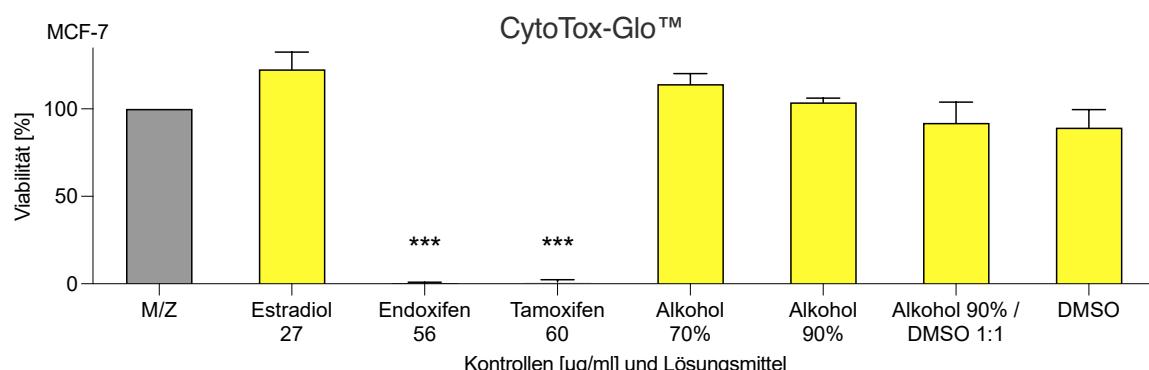


Abbildung 33: Einfluss der Kontrollen und Lösungsmittel auf MCF-7 Zellen im CytoTox-Glo™-Test

Dargestellt ist die Viabilität [%] nach 48 h Inkubation mit den Kontrollen und Lösungsmitteln [µg/ml]. Die Quantifizierung zeigt den Mittelwert \pm SEM. N = 3. Signifikanzen sind mit ***p < 0,001 % angegeben. M/Z = Medium/Zellen.

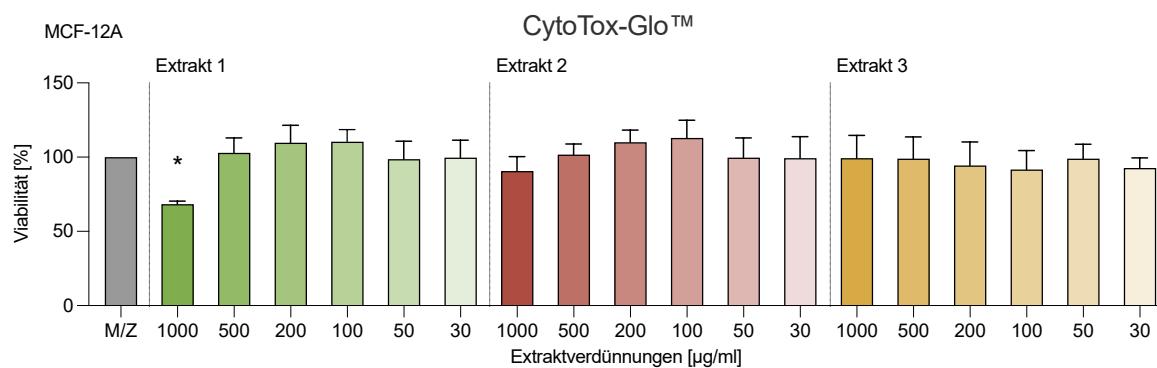


Abbildung 34: Einfluss der Extraktverdünnungen auf MCF-12A Zellen im CytoTox-Glo™-Test
Dargestellt ist die Viabilität [%] nach 48 h Inkubation mit den Extraktverdünnungen [µg/ml]. Die Quantifizierung zeigt den Mittelwert \pm SEM. N = 3. Signifikanzen sind mit *p < 0,05 % angegeben.
M/Z = Medium/Zellen; Extrakt 1 = Curcuma Gewürzpulver; Extrakt 2 = Curcuma Nahrungsergänzungsmittel; Extrakt 3 = Frische Curcumawurzel.

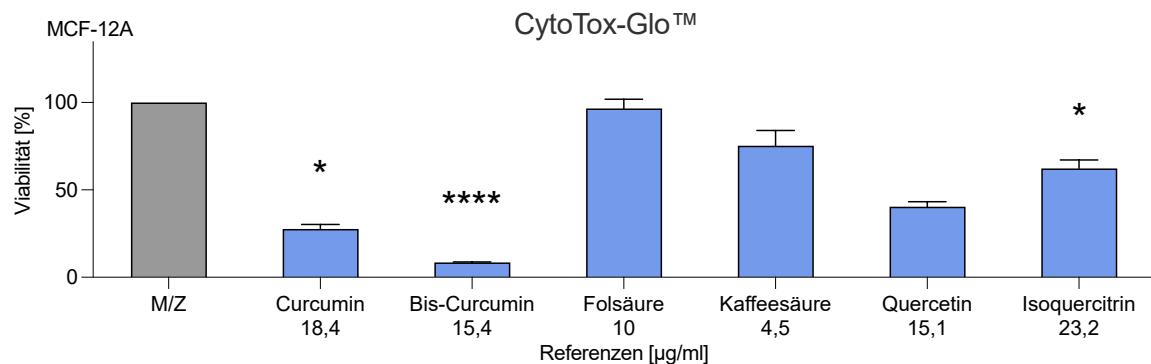


Abbildung 35: Einfluss der Extraktverdünnungen auf MCF-12A Zellen im CytoTox-Glo™-Test
Dargestellt ist die Viabilität [%] nach 48 h Inkubation mit den Referenzen ([µg/ml]. Die Quantifizierung zeigt den Mittelwert \pm SEM. N = 3. Signifikanzen sind mit *p < 0,05 % und ****p < 0,0001 % angegeben.
M/Z = Medium/Zellen. Lösungsmittel: Curcumin = DMSO; Bis-Curcumin = Alkohol 90 %; Folsäure = Alkohol 90 %; Kaffeesäure = Alkohol 90 %; Quercetin und Isoquercitrin = Alkohol 90 % / DMSO 1:1.
M/Z = Medium/Zellen; Bis-Curcumin = Bisdemethoxycurcumin.

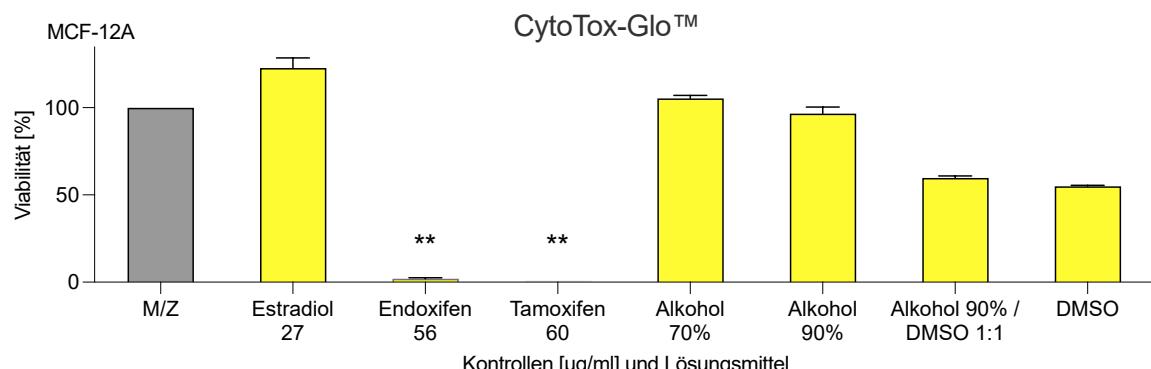


Abbildung 36: Einfluss der Kontrollen und Lösungsmittel auf MCF-12A Zellen im CytoTox-Glo™-Test
Dargestellt ist die Viabilität [%] nach 48 h Inkubation mit den Kontrollen und Lösungsmitteln [µg/ml]. Die Quantifizierung zeigt den Mittelwert \pm SEM. N = 3. Signifikanzen sind mit **p < 0,01 % angegeben.
M/Z = Medium/Zellen.

4.5. BrdU-Proliferationstest

Der BrdU-Test dient der Ermittlung des Wachstumsverhaltens der Zellen. Hierbei wird, anstelle von Thymidin, während der S-Phase des Zellzyklus Brom-desoxyuridin (BrdU) in die Zell-DNA eingebaut. Anschließend kann die Menge an eingebautem BrdU durch die Kopplung eines spezifischen Antikörpers kolorimetrisch gemessen werden. Insofern hilft der BrdU-Test dabei, eine Aussage über die Zellproliferation zu tätigen

Die Abszisse zeigt die Extraktverdünnungen, Referenzen und Kontrollen in $\mu\text{g}/\text{ml}$, während die Ordinate die Proliferation in % angibt.

MCF-7:

Bei allen drei Extrakten ist eine abnehmende Tendenz des Proliferationsverhaltens der Zellen in Richtung der stärksten Konzentrationen (1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$), bis hin zu einer moderaten bis starken (Extrakt 1) Verminderung der Proliferation, zu erkennen. Extrakt 1 (Curcuma Gewürzpulver) präsentierte hierbei eine signifikante Hemmung der Zellproliferation auf 48,7 % ($p = 0,0471$; $\text{SE} \pm 6,5\%$; Abbildung 37). Während die Referenzen Bisdemethoxycurcumin (45,0 %; $p = 0,3790$; $\text{SE} \pm 0,5\%$) und Curcumin (50,0 %; $p = 0,0364$; $\text{SE} \pm 3,0\%$) das Zellwachstum signifikant hemmten, Folsäure wie erwartet etwas stimulierend wirkte, zeigten Kaffeesäure, Isoquercitrin und Quercetin eine nicht-signifikante Hemmung (Abbildung 38).

Die Behandlung der Zellen mit den Kontrollen ließ bei Estradiol keine Wirkung erkennen. Tamoxifen und Endoxifen hemmten den Zellmetabolismus deutlich (Abbildung 39).

MCF-12A:

Bei Extrakt 1 (Curcuma Gewürzpulver) sowie Extrakt 3 (Curcuma Nahrungsergänzungs-präparat) ist eine abnehmende Tendenz des Proliferationsverhaltens der Zellen in Richtung der stärksten Konzentrationen zu erkennen. Die Beimpfung der Zellen mit der stärksten Konzentration von Extrakt 1 (1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ergab eine signifikante Hemmung der Proliferation auf 44,3 % ($p = 0,0306$; $\text{SE} \pm 4,0\%$; Abbildung 40).

Die Referenzen Bisdemethoxycurcumin (21,2 %; $p = 0,0472$; $\text{SE} \pm 7,8\%$) und Curcumin (26,7 %; $p = 0,0041$; $\text{SE} \pm 5,9\%$) konnten mit einer signifikanten und deutlichen, Isoquercetin und Quercetin mit einer moderaten Hemmung auf das Zellwachstum überzeugen. Folsäure wirkte leicht stimulierend (Abbildung 41).

Die Kontrollen zeigten bei Estradiol keine, bei Endoxifen und Tamoxifen eine sehr starke Hemmung der Viabilität. Bei den Lösungsmitteln wirkten Alkohol 90 % / DMSO und DMSO moderat proliferationshemmend (Abbildung 42).

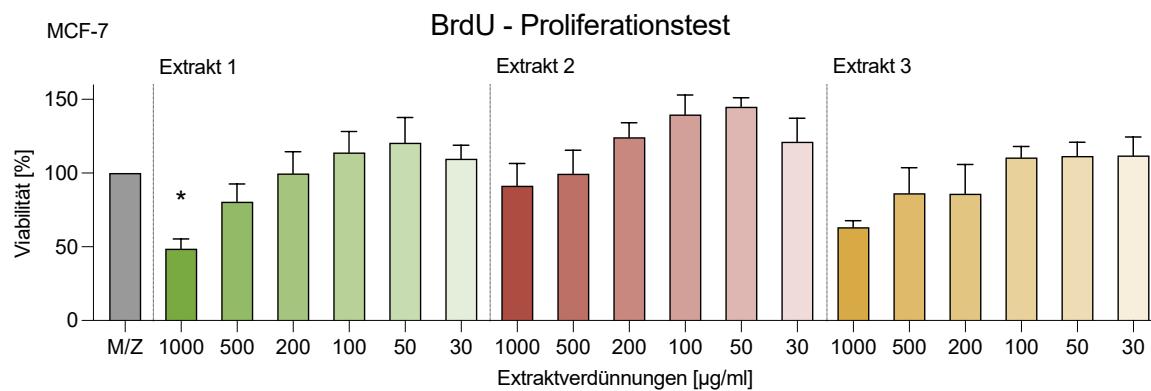


Abbildung 37: Einfluss der Extraktverdünnungen auf MCF-7 Zellen im BrdU-Test

Dargestellt ist die Proliferation [%] nach 48 h Inkubation mit den Extraktverdünnungen [μg/ml]. Die Quantifizierung zeigt den Mittelwert \pm SEM. N = 3. Signifikanzen sind mit *p < 0,05 % angegeben. M/Z = Medium/Zellen; Extrakt 1 = Curcuma Gewürzpulver; Extrakt 2 = Curcuma Nahrungsergänzungsmittel; Extrakt 3 = Frische Curcumawurzel.

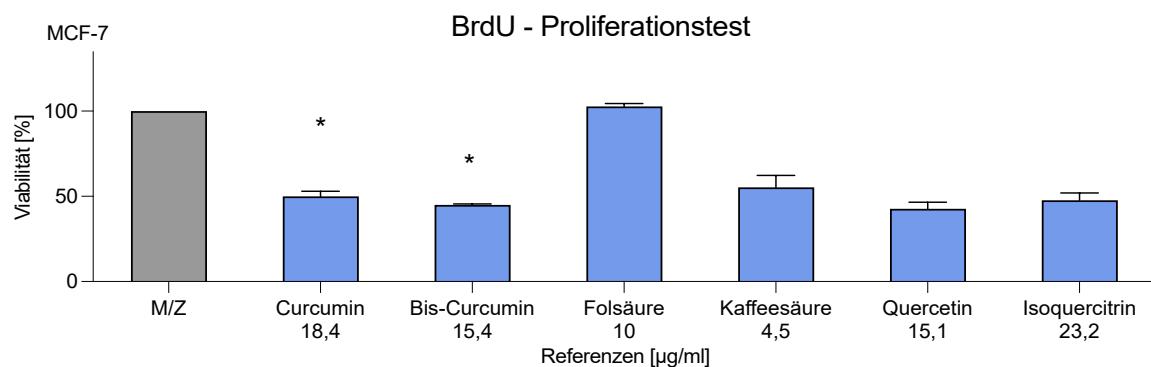


Abbildung 38: Einfluss der Referenzen auf MCF-7 Zellen im BrdU-Test

Dargestellt ist die Proliferation [%] nach 48 h Inkubation mit den Referenzen [μg/ml]. Die Quantifizierung zeigt den Mittelwert \pm SEM. N = 3. Signifikanzen sind mit *p < 0,05 % angegeben. Lösungsmittel: Curcumin = DMSO; Bis-Curcumin = Alkohol 90 %; Folsäure = Alkohol 90 %; Kaffeesäure = Alkohol 90 %; Quercetin und Isoquercitrin = Alkohol 90 % / DMSO 1:1 M/Z = Medium/Zellen; Bis-Curcumin = Bisdemethoxycurcumin.

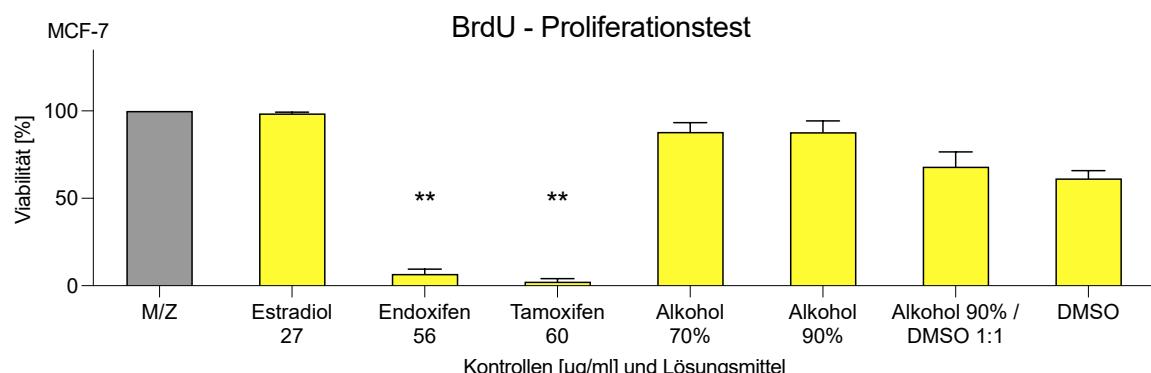


Abbildung 39: Einfluss der Kontrollen und Lösungsmittel auf MCF-7 Zellen im BrdU-Test

Dargestellt ist die Proliferation [%] nach 48 h Inkubation mit den Kontrollen und Lösungsmittel [μg/ml]. Die Quantifizierung zeigt den Mittelwert \pm SEM. N = 3. Signifikanzen sind mit **p < 0,01 % angegeben. M/Z = Medium/Zellen.

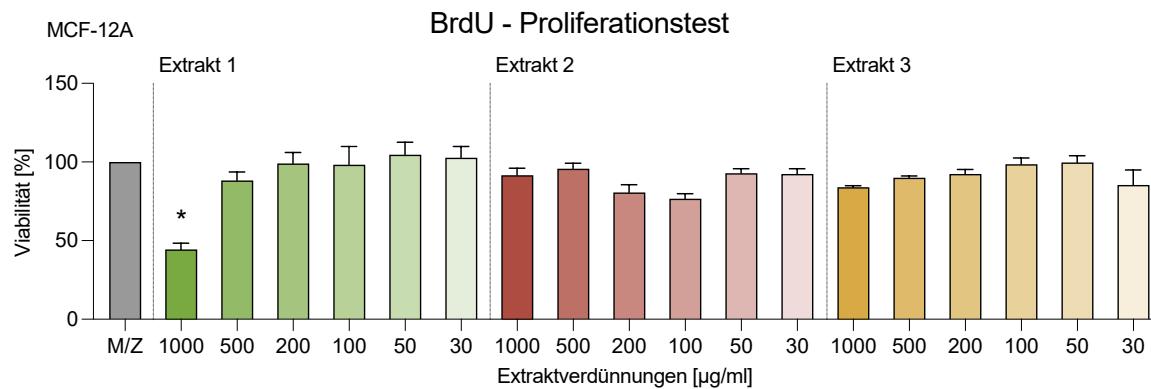


Abbildung 40: Einfluss der Extraktverdünnungen auf MCF-12A Zellen im BrdU-Test

Dargestellt ist die Proliferation [%] nach 48 h Inkubation mit den Extraktverdünnungen [$\mu\text{g}/\text{ml}$]. Die Quantifizierung zeigt den Mittelwert \pm SEM. N = 3. Signifikanzen sind mit * $p < 0,05\%$ angegeben. M/Z = Medium/Zellen; Extrakt 1 = Curcuma Gewürzpulver; Extrakt 2 = Curcuma Nahrungsergänzungsmittel; Extrakt 3 = Frische Curcumawurzel.

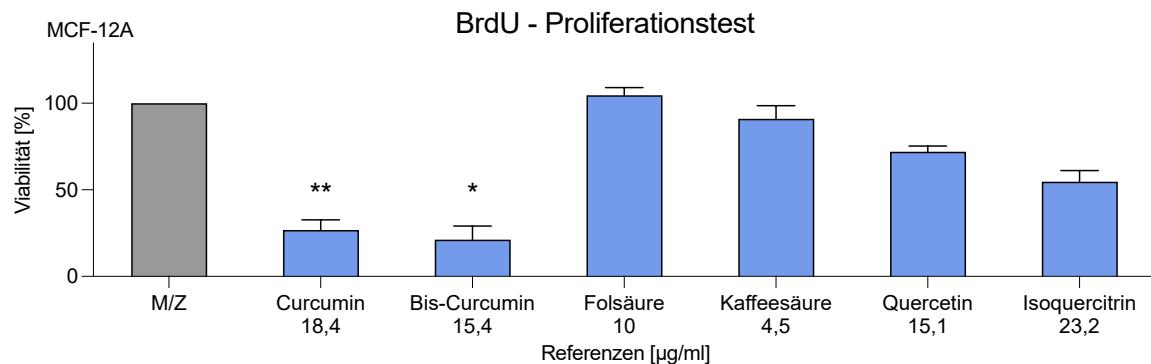


Abbildung 41: Einfluss der Referenzen auf MCF-12A Zellen im BrdU-Test

Dargestellt ist die Proliferation [%] nach 48 h Inkubation mit den Referenzen [$\mu\text{g}/\text{ml}$]. Die Quantifizierung zeigt den Mittelwert \pm SEM. N = 3. Signifikanzen sind mit * $p < 0,05\%$ und ** $p < 0,01\%$ angegeben. Lösungsmittel: Curcumin = DMSO; Bis-Curcumin = Alkohol 90 %; Folsäure = Alkohol 90 %; Kaffeesäure = Alkohol 90 %; Quercetin und Isoquercitrin = Alkohol 90 % / DMSO 1:1. M/Z = Medium/Zellen; Bis-Curcumin = Bisdemethoxycurcumin.

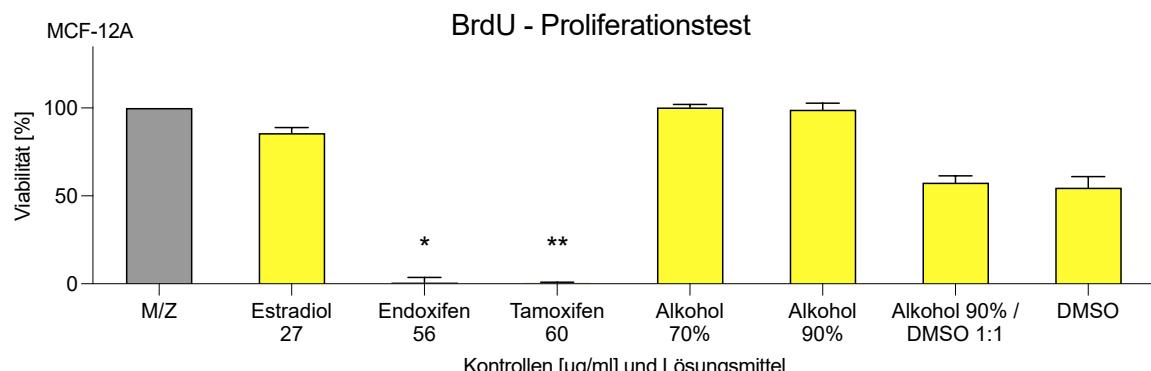


Abbildung 42: Einfluss der Kontrollen und Lösungsmittel auf MCF-12A Zellen im BrdU-Test

Dargestellt ist die Proliferation [%] nach 48 h Inkubation mit den Kontrollen und Lösungsmittel [$\mu\text{g}/\text{ml}$]. Die Quantifizierung zeigt den Mittelwert \pm SEM. N = 3. Signifikanzen sind mit * $p < 0,05\%$ und ** $p < 0,01\%$ angegeben. M/Z = Medium/Zellen.

4.6. Neutralrot-Test

Der Neutralrot-Test dient der Bestimmung der Zellviabilität. Durch Endozytose des Farbstoffes färben sich vitale Zellen rötlich. Die Färbung ist im Lichtmikroskop gut zu beobachten (Abbildung 43). Nach einer Inkubationszeit von etwa einer Stunde kann die Menge an aufgenommenem Neutralrot kolorimetrisch mittels eines ELISA-Readers gemessen werden.

Die Abszisse zeigt die Extraktverdünnungen, Referenzen und Kontrollen in $\mu\text{g}/\text{ml}$, während die Ordinate die Viabilität in % darstellt.

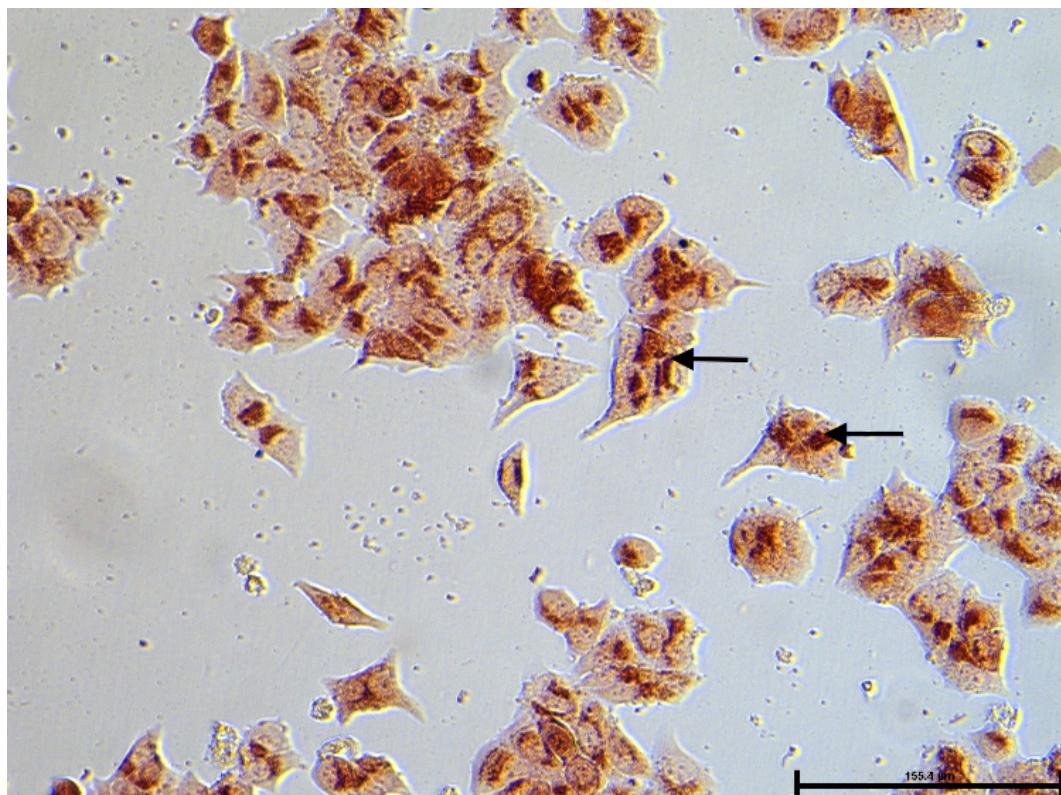


Abbildung 43: MCF-7 Zellen nach Inkubation mit Neutralrot

Die vitalen Zellen nehmen den Farbstoff auf und färben sich rot. Abbildung aus dem Lichtmikroskop bei 20-facher Vergrößerung.

MCF-7:

Alle Extrakte wiesen die Tendenz einer abnehmenden Zellviabilität in Richtung steigender Extraktkonzentrationen auf. Es wurde jedoch weder eine signifikante Verminderung der Zellzahl noch eine LD50 erreicht (Abbildung 44).

Bei den Referenzen präsentierte Bisdemethoxycurcumin eine sehr starke ($6,2\% ; p = 0,0025 ; \text{SE} \pm 5,2$), Curcumin ($50,0\% ; p = 0,0168 ; \text{SE} \pm 5,339$) und Quercetin ($43,50\% ; p = 0,0455 ; \text{SE} \pm 6,021$) eine moderate zytotoxische Wirkung auf die Zellen (Abbildung 45).

Die Kontrollen zeigten bei Estradiol eine schwach stimulierende und bei Endoxifen und Tamoxifen eine stark zytotoxische Wirkung (Abbildung 46).

MCF-12A:

Bei den stärksten Konzentrationen der Pflanzenextrakte konnte eine moderate bis leichte Hemmung der Zellviabilität gemessen werden. Diese Verminderung der Zellviabilität erreichte jedoch keine signifikanten Werte (Abbildung 47).

Bei den Referenzen zeigte Bisdemethoxycurcumin (18,5 %; $p = 0,0009$; $SE \pm 4,573$) eine sehr starke, Curcumin (32,6 %; $p = 0,0149$; $SE \pm 1,453$) und Quercetin (34,6 %, $p = 0,0291$; $SE \pm 3,333$) eine starke Zytotoxizität (Abbildung 48).

Die Kontrollen ließen bei Estradiol keine, bei Endoxifen und Tamoxifen eine sehr stark zytotoxische Wirkung erkennen. Bei den Lösungsmitteln wurde kein, beziehungsweise ein sehr schwacher toxischer Effekt festgestellt (Abbildung 49).

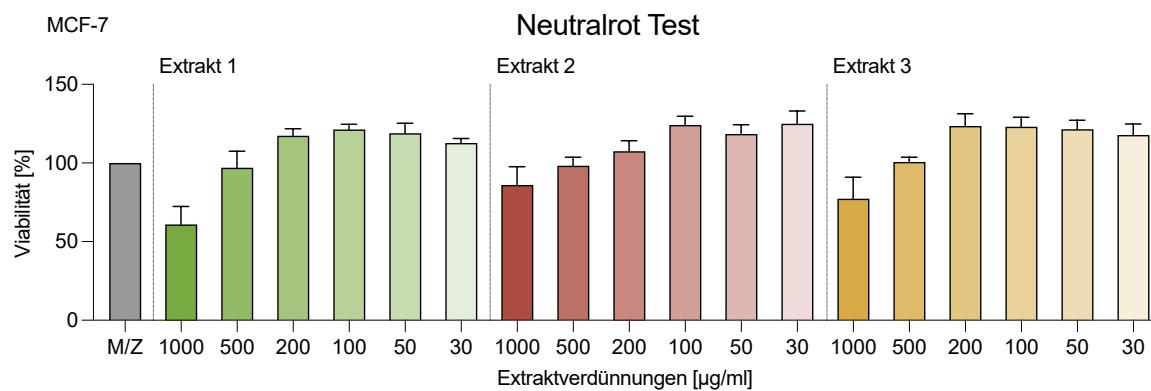


Abbildung 44: Einfluss der Extraktverdünnungen auf MCF-7 Zellen im Neutralrot-Test

Dargestellt ist die Viabilität [%] nach 48 h Inkubation mit den Extraktverdünnungen [µg/ml]. Die Quantifizierung zeigt den Mittelwert \pm SEM. N = 3. Signifikanzen sind mit *p < 0,05 % angegeben. M/Z = Medium/Zellen; Extrakt 1 = Curcuma Gewürzpulver; Extrakt 2 = Curcuma Nahrungsergänzungsmittel; Extrakt 3 = Frische Curcumawurzel.

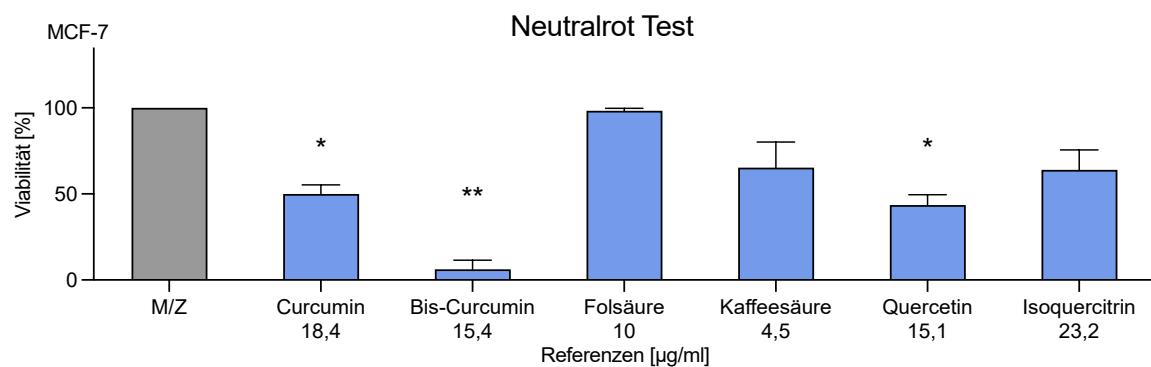


Abbildung 45: Einfluss der Referenzen auf MCF-7 Zellen im Neutralrot-Test

Dargestellt ist die Viabilität [%] nach 48 h Inkubation mit den Referenzen [µg/ml]. Die Quantifizierung zeigt den Mittelwert \pm SEM. N = 3. Signifikanzen sind mit *p < 0,05 % und **p < 0,01 % angegeben. Lösungsmittel: Curcumin = DMSO; Bis-Curcumin = Alkohol 90 %; Folsäure = Alkohol 90 %; Kaffeesäure = Alkohol 90 %; Quercetin und Isoquercitrin = Alkohol 90 % / DMSO 1:1. M/Z = Medium/Zellen; Bis-Curcumin = Bisdemethoxycurcumin.

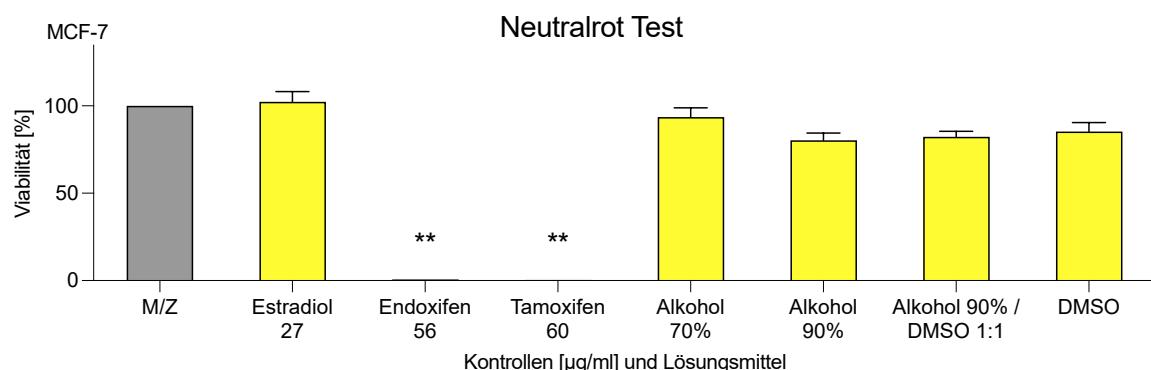


Abbildung 46: Einfluss der Kontrollen und Lösungsmittel auf MCF-7 Zellen im Neutralrot-Test

Dargestellt ist die Viabilität [%] nach 48 h Inkubation mit den Kontrollen und Lösungsmittel [µg/ml]. Die Quantifizierung zeigt den Mittelwert \pm SEM. N = 4. Signifikanzen sind mit **p < 0,01 % angegeben. M/Z = Medium/Zellen.

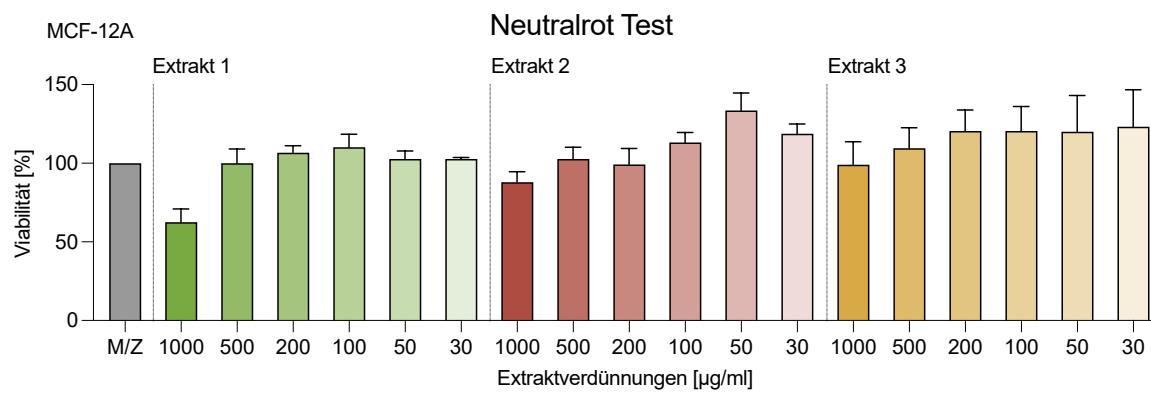


Abbildung 47: Einfluss der Extraktverdünnungen auf MCF-12A Zellen im Neutralrot-Test

Dargestellt ist die Viabilität [%] nach 48 h Inkubation mit den Extraktverdünnungen [$\mu\text{g}/\text{ml}$]. Die Quantifizierung zeigt den Mittelwert \pm SEM. N = 4. Signifikanzen sind mit * $p < 0,05\%$ angegeben. M/Z = Medium/Zellen; Extrakt 1 = Curcuma Gewürzpulver; Extrakt 2 = Curcuma Nahrungsergänzungsmittel; Extrakt 3 = Frische Curcumawurzel.

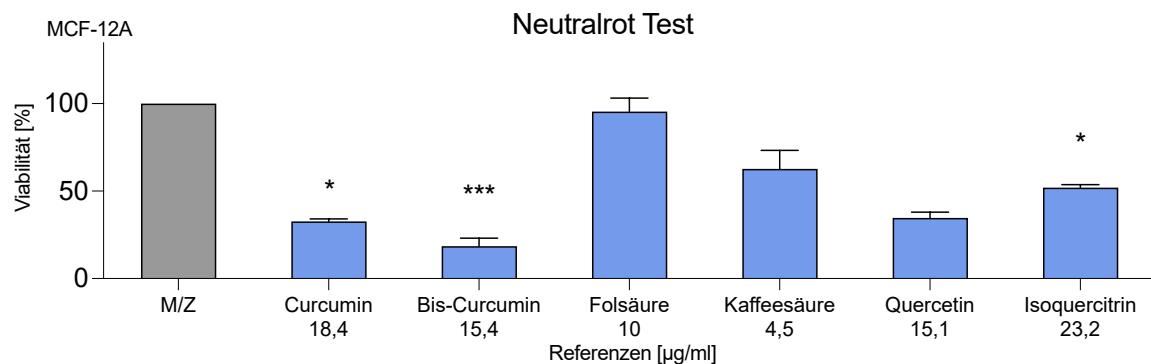


Abbildung 48: Einfluss der Referenzen auf MCF-12A Zellen im Neutralrot-Test

Dargestellt ist die Viabilität [%] nach 48 h Inkubation mit den Referenzen [$\mu\text{g}/\text{ml}$]. Die Quantifizierung zeigt den Mittelwert \pm SEM. N = 3. Signifikanzen sind mit * $p < 0,05\%$ und *** $p < 0,001\%$ angegeben. Lösungsmittel: Curcumin = DMSO; Bis-Curcumin = Alkohol 90 %; Folsäure = Alkohol 90 %; Kaffeesäure = Alkohol 90 %; Quercetin und Isoquercitrin = Alkohol 90 % / DMSO 1:1. M/Z = Medium/Zellen; Bis-Curcumin = Bisdemethoxycurcumin.

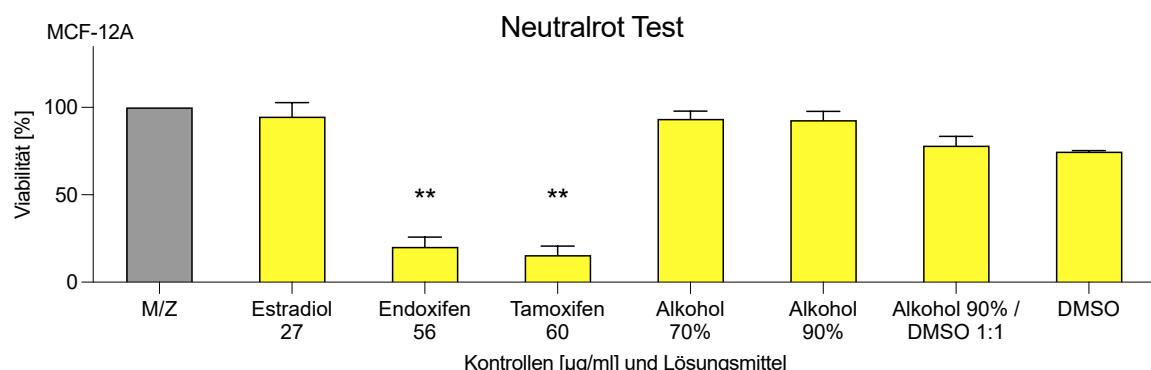


Abbildung 49: Einfluss der Kontrollen und Lösungsmittel auf MCF-12A Zellen im Neutralrot-Test

Dargestellt ist die Viabilität [%] nach 48 h Inkubation mit den Kontrollen und Lösungsmittel [$\mu\text{g}/\text{ml}$]. Die Quantifizierung zeigt den Mittelwert \pm SEM. N = 4. Signifikanzen sind mit ** $p < 0,01\%$ angegeben. M/Z = Medium/Zellen.

4.7. Glukosemessung

Mithilfe der Glukosemessung können Rückschlüsse auf die Stoffwechsellage der Brustkrebszellen unter Einwirkung der Pflanzenextrakte und Kontrollen gezogen werden. Nur vitale Zellen nehmen aktiv Glukose zur Verstoffwechselung auf, was die Glukosekonzentration im Medium senkt.

MCF-7:

Der Glukosewert des Kulturmediums lag bei 31 mmol/l. Die Glukosebestimmung von Medium und Zellen ohne Testsubstanz ergab einen Wert von 20,7 mmol/l. Bis auf die höchste Konzentration von Extrakt 1 (Curcuma Gewürzpulver) wurden bei den Verdünnungen aller Extrakte Werte zwischen 17 und 22 mmol/l gemessen. Die Behandlung mit der stärksten Konzentration von Extrakt 1 (1000 µl/ml) ergab einen Glukosewert von 29,9 mmol/l.

Nach der Beimpfung mit Estradiol konnte ein Glukosespiegel von 19,9 mmol/l gemessen werden. Bei Tamoxifen und Endoxifen wurden die Werte 23,2 mmol/l und 24,6 mmol/l gemessen (Abbildung 50).

MCF-12A:

Der Glukosegehalt des Kulturmediums ergab einen Wert von 21 mmol/l. Die Glukosebestimmung von Medium und Zellen ohne Testsubstanz präsentierte einen Wert von 13,6 mmol/l. Nach der Behandlung mit der stärksten Konzentration von Extrakt 2 zeigte sich ein Glukosewert von 19,7 mmol/l. Bei der Bestimmung der Glukosekonzentration aller weiteren Extraktverdünnungen konnten Werte zwischen 12 und 15 mmol/l gemessen werden.

Nach der Beimpfung mit Estradiol ließ sich ein Glukosewert von 13,1 mmol/l beobachten. Bei Tamoxifen und Endoxifen wurden die Werte 16,8 mmol/l und 16,9 mmol/l gemessen (Abbildung 51).

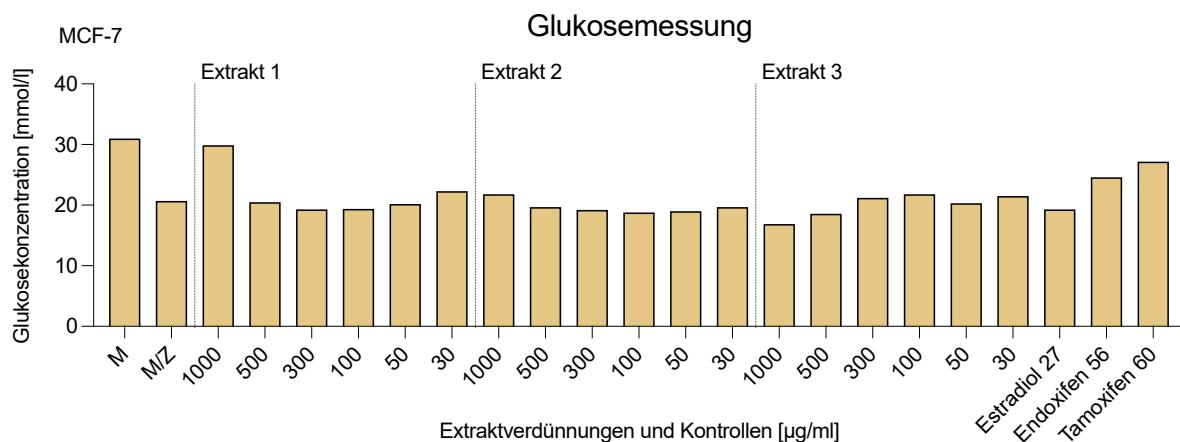


Abbildung 50: Glukosekonzentration nach Beimpfung der MCF-7-Zellen mit den Extraktverdünnungen und Kontrollen

Dargestellt ist der Glukosespiegel in [μ g/ml] nach 48 h Inkubation mit den Extraktverdünnungen und Kontrollen [μ g/ml]. M = Medium; M/Z = Medium/Zellen; Extrakt 1 = Curcuma Gewürzpulver; Extrakt 2 = Curcuma Nahrungsergänzungsmittel; Extrakt 3 = Frische Curcumawurzel.

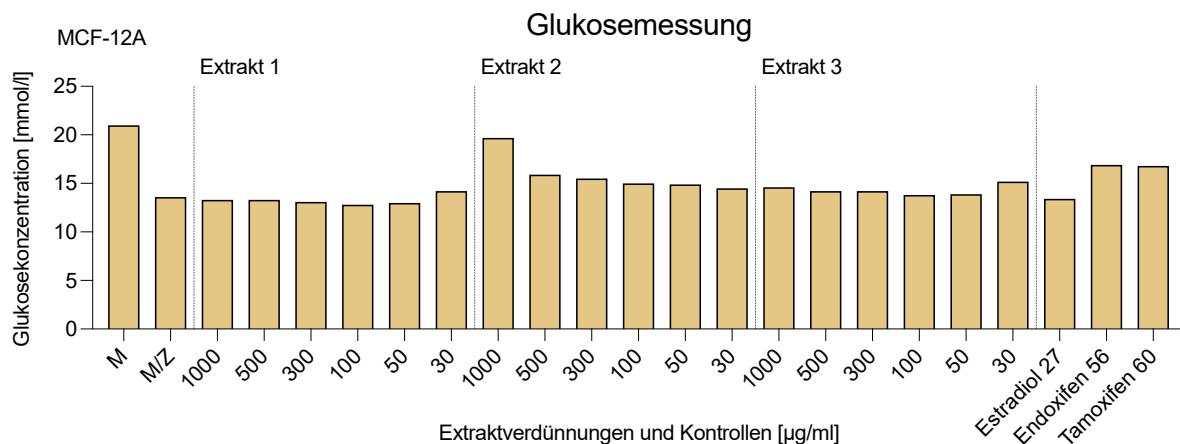


Abbildung 51: Glukosekonzentration nach Beimpfung der MCF-12A-Zellen mit den Extraktverdünnungen und Kontrollen

Dargestellt ist der Glukosespiegel [μ g/ml] nach 48 h Inkubation mit den Extraktverdünnungen und Kontrollen [μ g/ml]. M = Medium; M/Z = Medium/Zellen; Extrakt 1 = Curcuma Gewürzpulver; Extrakt 2 = Curcuma Nahrungsergänzungsmittel; Extrakt 3 = Frische Curcumawurzel.

4.8. Laktat- und pH-Messung

Mithilfe dieser Messung kann das Laktat, welches als Endprodukt der anaeroben Glykolyse anfällt, bestimmt werden. Ein erhöhtes Laktat gilt als Indikator für einen gesteigerten Zellmetabolismus. In reinem Medium ist aufgrund der fehlenden Zellen kein Laktat vorhanden. Die pH-Messung gibt Aufschluss darüber, ob eine aerobe oder anaerobe Stoffwechselleage vorliegt. Ein anaerober Zellmetabolismus ist hierbei mit einem verminderten pH-Wert assoziiert.

MCF-7:

Bei den unbehandelten Zellen in Medium wurde ein Laktatspiegel von 8,2 mmol/l gemessen. Nach der Beimpfung mit den Extrakten ist bei den höchsten Konzentrationen der Extrakte 1 (Curcuma Gewürzpulver) und 2 (Curcuma Nahrungsergänzungsmittel) ein Laktatanstieg auf 12 mmol/l bzw. 10,9 mmol/l zu beobachten. Dieser nimmt in Richtung der schwächeren Konzentrationen der Extrakte ab. Bei Extrakt 3 wurde bei den beiden mittleren Verdünnungen die höchste Laktat Konzentration von 12,2 mmol/l gemessen.

Nach der Beimpfung mit Estradiol wurde ein Wert von 8,9 mmol/l ermittelt. Die Suspension mit Tamoxifen und Endoxifen versetzten Zellen zeigte einen Laktatwert von 6,2 mmol/l bzw. 4,4 mmol/l (Abbildung 52).

Die pH-Messung der MCF-7-Zellreihe präsentierte substanzübergreifend Werte zwischen 7,9 und 8,4 (Abbildung 52). Der pH-Wert von Medium und Zellen lag bei 8,2. Bei den drei stärksten Verdünnungen von Extrakt 1 wurden pH-Werte von 8,3 (1000 µg/ml) und 8,4 (500 µg/ml und 300 µg/ml) gemessen. Die pH-Messungen bei den mit Tamoxifen und Endoxifen behandelten Zellen ergaben pH-Werte von jeweils 8,3. Bei Estradiol wurde ein pH-Wert von 8,1 festgestellt.

MCF12A:

Die Laktatmessung von Medium und Zellen ergab 9,5 mmol/l. Die Zellen reagierten auf die Extraktverdünnungen von Extrakt 1 mit ähnlichen Laktatwerten. Extrakt 2 und 3 wiesen einen leichten Anstieg der Laktatwerte auf 12,6 mmol/l bzw. 10,6 mmol/l auf.

Nach der Beimpfung mit Estradiol wurde ein Laktatwert von 9,2 mmol/l gemessen. Tamoxifen und Endoxifen zeigten erniedrigte Laktatwerte von 4,3 mmol/l und 4 mmol/l (Abbildung 53).

Bei der MCF-12A-Zellreihe wurden substanzübergreifend pH-Werte zwischen 7,8 und 8,4 gemessen (Abbildung 53). Der pH-Wert von reinem Medium und Zellen lag bei 7,9. Die pH-Messung der stärksten Verdünnung von Extrakt 2 zeigte mit 8,4 den höchsten Wert. Bei den Kontrollen zeigte sich für Estradiol ein pH-Wert von 7,8 und für Tamoxifen und Endoxifen jeweils ein pH-Wert von 8.

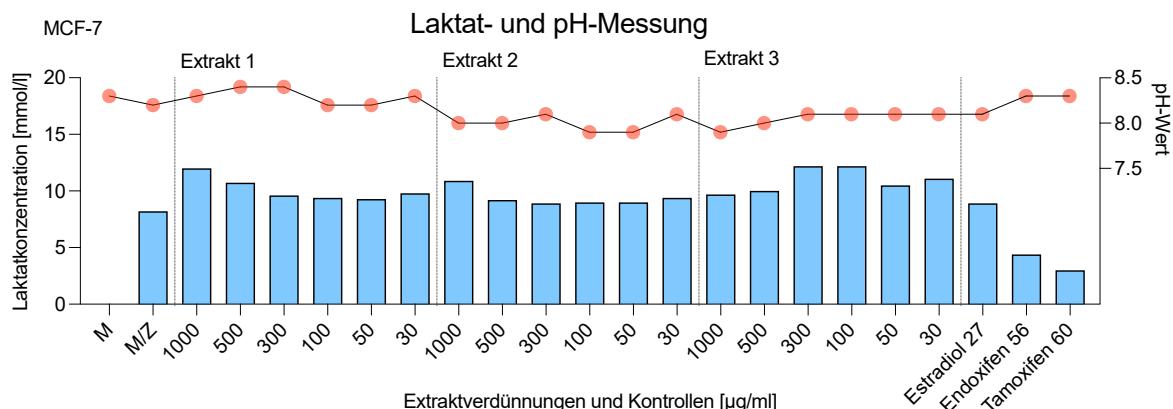


Abbildung 52: Laktatkonzentration und pH-Wert nach Beimpfung der MCF-7-Zellen mit den Extraktverdünnungen und Kontrollen

Dargestellt sind der Laktatspiegel [μ g/ml] und der pH-Wert nach 48 h Inkubation mit den Extraktverdünnungen und Kontrollen [μ g/ml]. M = Medium; M/Z = Medium/Zellen; Extrakt 1 = Curcuma Gewürzpulver; Extrakt 2 = Curcuma Nahrungsergänzungsmittel; Extrakt 3 = Frische Curcumawurzel.

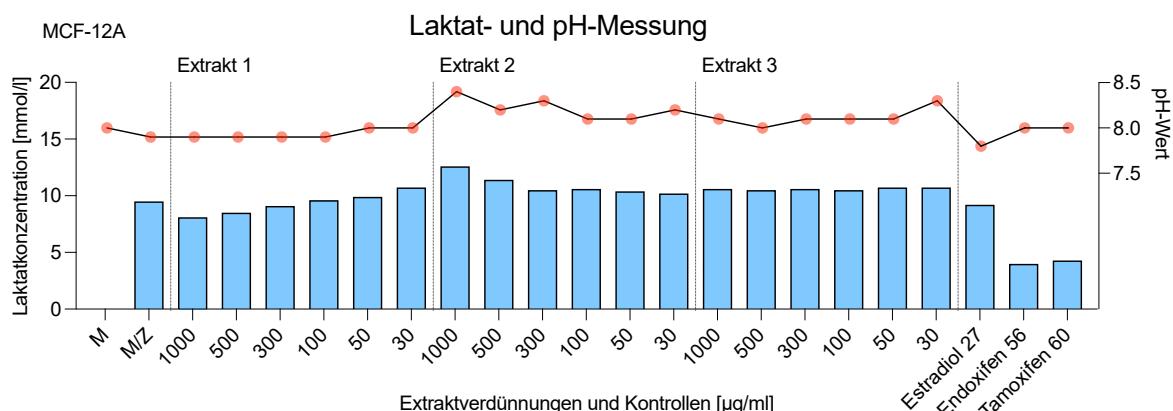


Abbildung 53: Laktatkonzentration und pH-Wert nach Beimpfung der MCF-12A-Zellen mit den Extraktverdünnungen und Kontrollen

Dargestellt sind der Laktatspiegel [μ g/ml] und der pH-Wert nach 48 h Inkubation mit den Extraktverdünnungen und Kontrollen [μ g/ml]. M = Medium; M/Z = Medium/Zellen; Extrakt 1 = Curcuma Gewürzpulver; Extrakt 2 = Curcuma Nahrungsergänzungsmittel; Extrakt 3 = Frische Curcumawurzel.

5. Diskussion

5.1. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Die High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ist eine in der Literatur weitverbreitete und anerkannte Methode zur Detektion von Polyphenolen und wurde in dieser Versuchsreihe zur chromatographischen Untersuchung der Curcuma-Pflanzenextrakte genutzt [28, 123, 12]. Weiterhin hat sich dieses Trennverfahren in unserem Forschungslabor in der Vergangenheit als erfolgreich herausgestellt. Ziel war es, verschiedene sekundäre Pflanzenstoffe aus der Gruppe der Polyphenole mithilfe von Referenzanalysen zu isolieren und deren Vorhandensein in den Pflanzenextrakten nachzuweisen.

Durch die HPLC konnten die Curcumaextrakte hinsichtlich ihrer qualitativen und quantitativen Pflanzenbestandteile untersucht werden. Die Chromatogramme der Curcuma Pflanzen-extrakte zeigten eine numerisch ähnliche Anzahl an Peaks, diese unterschieden sich jedoch in ihrer Intensität (Abbildung 15-16). Die Extrakte 1 und 2 (Curcuma Gewürzpulver; Curcuma Nahrungsergänzungsmittel) zeigten im apolaren Bereich intensivere Peaks im Vergleich zu Extrakt 3 (frische Curcumawurzel). Durch das Übereinanderlegen der Chromatogramme der Referenzstoffe und Curcumaextrakte konnten in diesem Bereich die polyphenolische Kaffeesäure, die Flavonoide Quercetin und Isoquercitrin sowie die Curcuminoide Curcumin und Bisdemethoxycurcumin eindeutig nachgewiesen werden. Diese Polyphenole ließen sich erst durch das starke anorganische Lösungsmittel DMSO von der apolaren Säule lösen, was für ein sehr apolares Bindungsverhalten spricht.

Die Retentionszeit des Peaks der Quercetin-Referenzanalyse stimmte in allen Extrakten zeitlich mit der Retentionszeit eines deutlichen Peaks bei 27,7 min überein (Abbildung 23). Eine literarische Bestätigung dieser Ergebnisse durch HPLC-Methode gestaltete sich jedoch als schwierig. Ahn et al. beschreiben in ihrer Arbeit die bis dahin erstmalige Isolierung von Quercetin und verschiedener Quercetin-Derivate mittels Säulenchromatographie aus der Curcumawurzel [5]. Dieser Nachweis wurde 2021 durch Sm et al. bestätigt [207]. Ihnen gelang es weiterhin, die polyphenolische Kaffeesäure (3,4-Dihydroxyzimtsäure) in ihrem ethanolbasierten Pflanzenextrakt aus der Curcumawurzel nachzuweisen. Die sekundären Pflanzenstoffe kommen in den Pflanzen in unterschiedlichsten Derivaten vor. So scheint Quercetin in der Curcumawurzel hauptsächlich als Quercetin-3-D-galactosid vorzuliegen [207]. Neben den bereits bekannten Curcuminoiden Curcumin, Demethoxycurcumin und Bisdemethoxycurcumin konnten weitere Derivate dieser Stoffgruppe, unter anderem Curcumin-O-Glucuronid und Curcuminol, in der Curcumawurzel nachgewiesen werden [207]. Es darf nicht außer Acht gelassen werden, dass diese Derivate eine wichtige Rolle bei der Bioverfügbarkeit der Curcuma Pflanzenextrakte einzunehmen scheinen. In dieser Arbeit wurden die Extrakte nur auf das Vorhandensein der synthetisch hergestellten Hauptmetaboliten der genannten Polyphenole geprüft.

Zur Herstellung der Extrakte wurde siebzigprozentiger Alkohol als Lösungsmittel verwendet. Hierzu gab es in der Literatur wegweisende Studien, die eine Ethanol-Konzentration zwischen 70- und 80 Prozent für eine optimale, chromatographisch analysierbare Extraktionsausbeute der Flavonoide empfohlen [165]. Weiterhin war es mit dem Ethanolverfahren möglich, Vergleiche innerhalb der Labor-Projekte zu ziehen. Die chromatographische Darstellung der Curcumawurzel und der darin enthaltenen Phenole gelang mit einer C-18 Säule und einer Laufzeit von 40 Minuten. Diese Methode hatte sich bereits in

vorherigen Forschungsarbeiten des Labors als erfolgreich gezeigt. Weitere Faktoren, die eine chromatographische Detektion sekundärer Pflanzenstoffe beeinflussen können, sind das Elutionsmittel, der pH-Wert, die Temperatur und die Laufzeit der HPLC [207, 67].

Auffällig war, dass sowohl das Curcuma Gewürzpulver (Extrakt 1), als auch der Pflanzenextrakt aus frischen Curcumawurzeln (Extrakt 3) im Vergleich zum Curcuma-Nahrungsergänzungsmittel (Extrakt 2) einen hoch intensiven (bis 800 mAU) Peak bei einer Retentionszeit von 1,9 min zeigten. Dieser Peak war mit einer Referenzanalyse der Folsäure vereinbar. Das Vorhandensein von Folsäure in Curcuma Pflanzenextrakten ließ sich jedoch literarisch nicht bestätigen. Es zeigte sich jedoch, dass die Folsäure mit der HPLC-Methode bereits in vielen Obst, Gemüse und Getreidesorten nachgewiesen worden war [161]. Zur Bestätigung der HPLC-Ergebnisse wurden alle Extrakte im Routinelabor im Klinikum Südstadt Rostock auf das Vorhandensein von Folsäure untersucht. Hier zeigte sich, dass in Extrakt 1 (Curcuma Gewürzpulver) 27,3 µg/100ml, in Extrakt 2 (Curcuma Nahrungsergänzungsmittel) 16,3 µg/100 ml und in Extrakt 3 (frische Curcumawurzel) 31 µg/100 ml Folsäure vorhanden war. Für die geringere Intensität im Extrakt 2 könnte der hohe prozentuale Anteil an Curcuminoiden im Vergleich zu weiteren Inhaltsstoffen verantwortlich sein.

Interessanterweise ließ sich das Curcuminoid Demethoxycurcumin nicht in den Extrakten nachweisen, wenngleich dies bereits bei früheren Forschungsarbeiten gelungen war [242]. In einem parallelen Projekt des Forschungslabors konnte Demethoxycurcumin unter identischen Bedingungen in den Pflanzenextrakten nachgewiesen werden.

Differierende Ergebnisse zeigten sich beim Isoquercitrin. Es gelang mir, mit der Hilfe von Prof. Dr. Jeschke der LMU München, das Flavonoid in den Pflanzenextrakten nachzuweisen. Dies ließ sich jedoch literarisch nicht bestätigen.

5.2. CellTiter-Glo® - Viabilitätstest

Der CellTiter-Glo®-Test erzeugt ein Lumineszenzsignal proportional zur vorhandenen ATP-Menge. Entsprechend konnte die Viabilität der Pflanzenextrakte und Referenzen gemessen werden.

Die MCF-7 Zellreihe zeigte bei den Pflanzenextrakten und den Referenzen deutlich unterschiedliche Ergebnisse. Bei der stärksten und zweitstärksten Verdünnung von Extrakt 1 (Curcuma Gewürzpulver) sowie der stärksten Verdünnung von Extrakt 3 (frische Curcumawurzel) reagierten die Zellen mit einer signifikanten Verminderung der Viabilität. Es konnte eine erkennbare Tendenz der Wirkabschwächung in Richtung der schwächeren Verdünnungen beobachtet werden. Dies deutet auf eine Dosis-Wirkungs-Beziehung hin. Gegensätzliche Ergebnisse ließ Extrakt 2 (Curcuma Nahrungsergänzungsmittel) mit fehlenden Anzeichen einer Viabilitäts-Einschränkung der Zellen erkennen.

Bei den Referenzstoffen zeigte Bisdemethoxycurcumin die stärkste Hemmung der Viabilität mit einer Verminderung der Zellzahl auf 8 %, gefolgt von Curcumin mit 56 %. Die Ergebnisse werden durch die Arbeit von Lesmana et al. bestätigt [132]. Die eindrucksvolle Wirkung von Bisdemethoxycurcumin könnte, wie von Li et al. beschrieben, durch eine Apoptose-Induktion der Zellen begründet sein [134]. Die Hemmung der Viabilität durch die Extrakte und die Curcuminoide lassen auf eine mögliche Beteiligung der Estrogenrezeptoren der Zellen schließen. In der Arbeit von Mohajeri et al. wird für

Curcumin und seine Derivate eine gezielte Hemmung estrogen-vermittelter Signalwege beschrieben [155]. Die beiden Flavonoide Quercetin und Isoquercitrin sowie die polyphenolische Kaffeesäure zeigten einen sehr schwachen, beziehungsweise keinen Einfluss auf die Zellen. Laut einer Übersichtsstudie besitzen sowohl Quercetin als auch Kaffeesäure die Fähigkeit, bei der Entstehung von Brustkrebs einzutreten und diese zu modulieren [90]. Isoquercitrin (Quercetin-3-O-glucopyranosid) kann in Brustkrebszellen Apoptose induzieren und zeigte an MCF-7-Zellen eine antiproliferative Wirkung [253, 250]. Dies konnte durch diesen Test nicht bestätigt werden.

Estradiol erwies sich als wirkungslos, während Tamoxifen und Endoxifen für einen signifikanten Einbruch der Zellviabilität sorgten.

Ähnliche Ergebnisse konnten bei den Viabilitätstests der benignen, ebenfalls rezeptorpositiven MCF-12a-Zellen beobachtet werden. Auf die stärkste Verdünnung des Extraktes 1 (Curcuma Gewürzpulver) reagierten die Zellen mit einer signifikanten Verminderung der Viabilität auf 45,6 %. Die beiden anderen Extrakte 2 und 3 zeigten keine Reduzierung der Lebensfähigkeit. Eindrucksvolle Ergebnisse zeigten die etwas schwächeren Verdünnungen vor allem von Extrakt 1: sie entfalteten eine leicht proliferierende Wirkung. Während sich die sekundären Pflanzenstoffe innerhalb der Pflanzenextrakte in einer zytotoxischen und nicht-zytotoxischen Wirkweise unterscheiden, scheint deren Wirkung auch von der biologischen Beschaffenheit der Zelle abzuhängen [251]. Weiterhin scheint die Dosis eine wichtige Rolle einzunehmen. So deuten Extrakt 1 und seine Inhaltsstoffe in hohen Konzentrationen eine zytotoxische Wirkweise an, die sich jedoch in schwächer werdenden Verdünnungen zu einer leicht proliferierenden Wirkweise wandelt. Die beiden schwächsten Verdünnungen hatten wiederum keine Effekte auf die Zellen. Diese paradoxe Wirkung wurde bereits am Beispiel von Quercetin untersucht [247].

Die Referenzen hatten mit den Curcuminoiden Bisdemethoxycurcumin und Curcumin, dem Flavonoid Quercetin sowie der polyphenolischen Kaffeesäure einen starken bis moderaten, in allen Fällen signifikanten zytotoxischen Einfluss auf die Zellen. Besonders Bisdemethoxy-curcumin stach hier mit einer Senkung der Zellzahl auf 10,6 % hervor. Im Vergleich zu den Ergebnissen der MCF-7 Zellreihe scheinen die benignen MCF-12a-Zellen eine höhere Sensibilität gegenüber den Referenzen zu besitzen. Im Gegensatz dazu zeigten die Extrakte insgesamt eine deutlich schwächere Wirkung auf die MCF-12a-Zellreihe. Dieses Phänomen könnte anhand der Erkenntnisse über die Dosis-Wirkungs-Beziehung der sekundären Pflanzenstoffe erklärt werden. Während nach dieser Theorie einzelne Inhaltsstoffe eine höhere Toxizität besitzen, könnte die Fülle an Inhaltsstoffen der Extrakte für den weniger toxischen Effekt auf die benignen Zellen verantwortlich sein. Weiterhin könnte die unterschiedliche Expression der Östrogenrezeptoren ER- α und ER- β in den Zellen für die differierende Wirkweise verantwortlich sein.

Estradiol zeigte keinen Effekt, während Tamoxifen und Endoxifen ihr deutlich zytotoxisches Wirkungsprofil bestätigten.

5.3. CytoTox-Glo™-Zytotoxizitätstest

Durch den CytoTox-Glo™-Test konnte die relative Anzahl abgestorbener Zellen kolorimetrisch quantifiziert werden. Die Viabilität konnte anschließend durch die Subtraktion des lumineszierenden

Totzellsignals vom Gesamtlumineszenzwert, nach erfolgreicher Lysierung aller Zellen, errechnet werden [55].

Ähnlich wie im Test zuvor reagierten die MCF-7-Zellen auf die stärkste Verdünnung des Extraktes 1 (Curcuma Gewürzpulver) mit einer signifikanten Verminderung ihrer Zellzahl. Auch Extrakt 2 (Curcuma Nahrungsergänzungsmittel) zeigte in seiner stärksten Konzentration einen signifikant zytotoxischen Effekt. Deutlich ist eine Dosis-Wirkungs-Beziehung aller Extrakte zur erkennen. Während die Extrakte bei der stärksten Verdünnung (1000 µg/ml) eine deutliche Hemmung der Viabilität zu erkennen ließen, nahm dieser Effekt mit der zweiten und dritten Verdünnung deutlich ab. Ab der vierten Verdünnung (100 µg/ml) deutete sich gar eine leicht proliferative Wirkweise an. Dies könnte, ähnlich wie von Van der Woude et al. für Quercetin beschrieben, eine Estrogenrezeptorabhängige, biphasische Dosisreaktion der Extrakte auf die Zellen andeuten. Die hormetische Natur vieler sekundärer Pflanzenstoffe beschreibt eine gegensätzliche biologische Wirkung bei unterschiedlicher Dosis [247]. Möglich wäre eine stärkere Stimulation des antiproliferierend wirkenden ER- β durch höhere Extraktkonzentrationen, welche im Übergang zu den schwächeren Verdünnungen in eine dominierende ER- α Aktivierung mit einer proliferierende Wirkung umschlägt [248]. Eine weitere Quelle beschreibt eine ER- α -abhängige Proliferation bei niedriger Flavonoid-Konzentration, die sich bei hohen Konzentrationen unter anderem bei Quercetin in eine ER unabhängige Zytotoxizität auf die Zellen umwandelt [139].

Bei den Referenzen zeigte Bisdemethoxycurcumin eine sehr deutliche und signifikante Zytotoxizität mit einer Senkung der Zellzahl auf 6,3 %. Ebenfalls signifikant zytotoxisch wirkte Curcumin und Kaffeesäure. Die zytotoxische Aktivität der Kaffeesäure auf die MCF-7-Zellen könnte, wie bereits von Watabe et al. beschrieben, über eine Hemmung von NF- κ B und einer damit einhergehenden Apoptose-Induktion erklärt werden [240]. Quercetin und Isoquercitrin zeigten eine moderate, nicht signifikante Hemmung der Viabilität.

Estradiol wirkte leicht stimulierend, während Tamoxifen und Endoxifen die Zellen gänzlich auslöschen.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen des vorherigen Tests, reagierten die benignen MCF-12a Zellen bei der stärksten Konzentration von Extrakt 1 (Curcuma Gewürzpulver) mit einer signifikanten Verminderung der Zellzahl. Die beiden anderen Extrakte wiesen keinerlei Zytotoxizität auf.

Die Curcuminoide Bisdemethoxycurcumin und Curcumin zeigten sich wiederholt als effektiv zytotoxisch. Quercetin tötete etwa 60 % der Zellen signifikant ab. Srivastava et al. beschreiben in ihrer Arbeit eine Quercetin-induzierte Tumorregression durch mitochondriale Apoptose-Induktion [213]. Bei Brustkrebszellen zeigte Quercetin eine konzentrations- und zeitabhängige Verringerung der Viabilität [60]. Spannend hierbei ist der schon durch niedrige Dosierung erreichbare chemopräventive Effekt des Quercetins [107].

Die Wirkung des Estradiols war, den Ergebnissen der MCF-7-Zellreihe ähnlich, leicht stimulierend. Dies steht in Differenz zu den vorherigen Tests ohne eine östrogeninduzierte Wirkung. Tamoxifen und Endoxifen zeigten den erwarteten, gänzlich zytotoxischen Effekt.

5.4. BrdU-Proliferationstest

Der BrdU-Test misst photometrisch die Aktivität von sich teilenden Zellen anhand des Einbaus von Bromo-desoxyuridin (5-bromo-2'-deoxyuridine) in die Zell-DNA.

Anhand des BrdU-Proliferationstests konnte an der MCF-7-Zellreihe eine signifikante Minderung der Proliferation, ausgelöst durch die stärkste Verdünnung des Extraktes 1 (Curcuma Gewürzpulver), gemessen werden. Die beiden Extrakte 2 und 3 zeigten in dieser Verdünnung ebenfalls eine moderate antiproliferative Wirkung. Alle Extrakte wiesen auf eine Dosis-Wirkungs-Beziehung, in Abhängigkeit ihrer Konzentrationen mit einer sinkenden antiproliferativen Wirkung in Richtung der schwächeren Verdünnungen hin. Es zeigte sich, den Ergebnissen aus den Viabilitätstests entsprechend, ein paradoyer, proliferations-steigernder Effekt der 10- und 5-prozentigen Verdünnungen von Extrakt 1 und 2.

Die Curcuminoide Bisdemethoxycurcumin und Curcumin hemmten die Proliferation signifikant. Die Flavonoide Quercetin und Isoquercitrin zeigten eine deutliche, jedoch nicht signifikante antiproliferative Wirkung. Die Ergebnisse dieser Referenzen konnten bereits in früheren Untersuchungen dargestellt werden [46, 191, 213, 164]. Die sehr deutlichen, zytotoxischen Eigenschaften des Bisdemethoxycurcumins in den Viabilitätstests zuvor, konnten in dem Proliferationstest nicht bestätigt werden. Hier zeigte sich eine dem Curcumin ähnliche, moderate Hemmung des Zellmetabolismus. Die Ergebnisse von Lesmana et al. ließen gar eine stärkere Proliferationshemmung an MCF-7-Zellen durch Curcumin im Vergleich zu Bisdemethoxycurcumin beobachten [132].

Während Estradiol keine Wirkung auf die Zellen hatte, ließ sich bei Tamoxifen und Endoxifen eine signifikante und sehr deutliche Hemmung des Zellmetabolismus beobachten. Diese antiproliferative Wirkung von Tamoxifen könnte sich durch den Rezeptorstatus erklären lassen. Es werden jedoch ebenfalls differierende, rezeptorunabhängige Wirkungswege beschrieben [196].

Die MCF-12a-Zellreihe bestätigte die bereits zuvor gezeigte, konzentrationsabhängige, signifikante Verminderung der zellulären Aktivität, ausgelöst durch die stärksten Verdünnungen von Extrakt 1 und 3. Die hundertprozentige Verdünnung von Extrakt 1 (Curcuma Gewürzpulver) hemmte den Zellmetabolismus auf 44,3 % im Vergleich zu Medium und Zellen. Eine mit den Ergebnissen der MCF-7-Zellen äquivalente und in den Viabilitätstests bereits dargestellte Dosis-Wirkungs-Beziehung zeigte sich nur beim Curcuma Gewürzpulver (Extrakt 1). Der Sprung zwischen der stärksten (100 %) und der zweitstärksten (50 %) Verdünnungsreihe war hier deutlicher als bei den vorherigen Ergebnissen.

Die Curcuminoide Bisdemethoxycurcumin und Curcumin bremsten die Proliferation auf 21 beziehungsweise 26 % herunter. Quercetin und Isoquercetin hemmten das Zellwachstum moderat, jedoch nicht signifikant. Die Ergebnisse der beiden Flavonoide blieben dabei hinter der Wirkung auf die MCF-7-Zellen zurück. Dies könnte mit einer unterschiedlichen Aktivierung der Östrogenrezeptoren ER- α und ER- β beider Zellreihen durch die Flavonoide zusammenhängen [247]. In diesem Fall könnte eine erhöhte ER- α Aktivierung den schwächeren antiproliferativen Effekt von Quercetin erklären [248].

Ähnlich der MCF-7-Zellreihe löste Estradiol keine Wirkung auf die Zellen aus. Tamoxifen und Endoxifen zeigten wie zuvor eine sehr stark antiproliferative Wirkung.

5.5. Neutralrot-Test

Über die lysosomale Aufnahme von Neutralrot durch vitale Zellen kann ein quantitativer Nachweis der Zellviabilität erbracht werden. Letale Zellen nehmen den Farbstoff nicht auf und bleiben dementsprechend farblos.

Bei den drei Pflanzenextrakten der Curcumawurzel konnte an der MCF-7-Zellreihe eine Hemmung der Viabilität durch die jeweils stärkste Konzentration mit abnehmender Tendenz in Richtung der schwächeren Verdünnungen festgestellt werden. Hierbei konnte eine Dosis-Wirkungs-Beziehung beobachtet werden. Es erreichte jedoch keine der Extrakt-Verdünnungen signifikante Ergebnisse. Studzińska-Sroka et al. bestätigten in ihrer Arbeit die Möglichkeit, über den Neutralrot-Test die Wirkung polyphenolischer Pflanzenextrakte auf Brustkrebszellen zu ermitteln [215]. Es zeigte sich ein paradoxes Wirkungsprofil der Pflanzenextrakte durch einen leicht proliferativen Effekt der schwächeren Extraktkonzentrationen.

Die Curcuminoide Bisdemethoxycurcumin und Curcumin hemmten die Zellviabilität signifikant und zum Teil deutlich auf 6 beziehungsweise 50 %. Hier bestätigt Bisdemethoxycurcumin die deutlichen Ergebnisse der vorherigen Tests. Die Wirkung von Curcumin und anderer Polyphenole auf Brustkrebszellen kann, laut Bacanli et al., über den Neutralrot-Test ermittelt werden [19]. Das Flavonoid Quercetin präsentierte ebenfalls eine signifikante Viabilitäts-Einschränkung mit einer Minderung der Zellzahl auf 43 %.

Estradiol wirkte leicht stimulierend. Tamoxifen und Endoxifen wiesen einen deutlich zytotoxischen Effekt mit signifikanten Werten auf.

Die Ergebnisse des Neutralrot-Tests der MCF-12a-Zellreihe ließen nach Beimpfung der Zellen mit den Pflanzenextrakten äquivalente Ergebnisse zur MCF-7-Zellreihe beobachten. Es konnte keine signifikante Hemmung der Zellviabilität festgestellt werden. Eine Dosis-Wirkungs-Beziehung mit einer moderaten Verminderung der Zellzahl durch die jeweils höchste Konzentration der Extrakte 1 (Curcuma Gewürzpulver) und 2 (Curcuma Nahrungsergänzungs-präparat) war zu beobachten.

Auch die Referenzstoffe zeigten ähnliche Ergebnisse wie bei der MCF-7-Zellreihe. Bisdemethoxycurcumin, Curcumin und Quercetin hemmten die Viabilität der Zellen signifikant. Bisdemethoxycurcumin stach hier mit einer deutlich signifikanten Verminderung der Zellzahl auf 18 % hervor. Es wurde bereits gezeigt, dass die hemmende Wirkung des Curcuminooids auf die Brustkrebszellen unter anderem über eine Aktivierung des pro-apoptotischen Proteins p53 und dessen nachgeschaltetem Effektorprotein p21 zustande kommt [134]. Weiterhin scheint der positive Rezeptorstatus beider Zellreihen eine wichtige Rolle einzunehmen. Laut Abroodi et al. können komplexe Gemische von Polyphenolen über eine Aktivierung der ER- β - und Caspase 3-Expression den programmierten Zelltod in MCF-7-Zellen auslösen [2]. Damit wirken sie der von Al-Bader et al. beschriebenen krebserregenden Wirkung durch ER- α entgegen [8].

Wie bei den vorherigen Tests wies Estradiol keine Wirkung auf die MCF-12a-Zellen auf. Die selektiven Östrogenrezeptormodulatoren Tamoxifen und Endoxifen ließen eine stark zytotoxische Wirkung auf die Zellen beobachten.

5.6. Stoffwechsel-Untersuchungen

Anhand der Bestimmung des Glukose- und Laktatspiegels sowie des pH-Wertes konnte die Stoffwechselleage der Brustkrebszellen nach der Behandlung mit den Extraktverdünnungen und Kontrollen eingeschätzt werden. Grundsätzlich können Zellen Glukose als Energiequelle zur Herstellung des Energieträgers ATP nutzen. Die ATP-Synthese erfolgt dabei aerob in Anwesenheit von Sauerstoff oder auf anaerobem Wege über die Laktatproduktion. Schnell proliferierende Krebszellen besitzen einen deutlich höheren Energiebedarf und nutzen neben der effizienteren ATP-Produktion über die sauerstoffabhängige Atmungskette zusätzlich die anaerobe Laktatherstellung, um ihren hohen Energiebedarf zu decken. Diese aerobe Glykolyse mit anschließender Ausscheidung von Laktat wird bei malignen Zellen interessanterweise auch in Anwesenheit von ausreichend Sauerstoff genutzt und nennt sich der Warburg-Effekt [232]. Ein solches Verhalten der Krebszellen kann durch erhöhte Laktat- und fallende pH-Werte detektiert werden. Weiterhin deuten erhöhte Glukosewerte in der Zellsuspension der behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen auf einen erhöhten Anteil abgestorbener Zellen in der Zellsuspension hin.

Die Glukosemessung brachte bei den unbehandelten Zellen sowie bei den mit den Extrakt und Kontrollen behandelten Zellen der MCF-7-Zellreihe konstante Werte um die 20 mmol/l. Ausnahmen ließen sich bei der stärksten Verdünnung von Extrakt 1 mit einem Glukosespiegel von 29,9 mmol/l und bei Tamoxifen und Endoxifen mit Werten von 27,2 mmol/l und 24,6 mmol/l beobachten. Der Glukosewert der stärksten Verdünnung von Extrakt 1 bestätigt die Ergebnisse der zuvor durchgeführten Zelltests, bei denen diese Konzentration eine deutliche zytotoxische und antiproliferierende Wirkung gezeigt hatte. Intrazellulär gespeicherte Glukose könnte über die permeable Membran der abgetöteten Brustkrebszellen in den Extrazellulärraum gelangt sein und so zu den erhöhten Messwerten geführt haben. Die unbehandelten Zellen in reinem Medium unterstützen diese Annahme durch ihren deutlich niedrigeren Glukosespiegel von 20,7 mmol/l. Hier konnte keine intrazellulär gespeicherte Glukose aus der Zelle in die Zellsuspension gelangen.

Die Kontrollen Tamoxifen und Endoxifen bestätigen ihre substanzspezifischen, sehr deutlich zytotoxisch und antiproliferierenden Effekte aus den vorherigen Zelltests.

Ähnliche Ergebnisse konnten bei der Glukosemessung der benignen Zellen der MCF-12a-Zellreihe beobachtet werden. Durch einen generell niedrigeren Glukosewert des Mediums von 21 mmol/l waren die Werte der unbehandelten und behandelten Zellen niedriger als bei der Zellreihe zuvor. Die Glukosewerte zeigten sich ebenfalls konstant zwischen 13 und 15 mmol/l. Eine Ausnahme ließ sich bei der stärksten Verdünnung von Extrakt 2 mit einem Glukosewert von 19,7 mmol/l beobachten. Dieser Wert konnte nur teilweise durch die zuvor durchgeführten Zelltests bestätigt werden.

Bei den Kontrollen ließen sich die substanzspezifischen Effekte von Estradiol (13,4 mmol/l), Tamoxifen (16,8 mmol/l) und Endoxifen (16,9 mmol/l) aus den Zelltests bestätigen.

Die Laktatmessungen stützen die Ergebnisse der Glukosewerte beider Zellreihen. Es zeigten sich bei der stärksten Konzentration von Extrakt 1 mit dem erhöhten Glukosespiegel der MCF-7-Zellreihe ebenfalls ein leicht erhöhter Laktatspiegel von 12 mmol/l im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (8,2

mmol/l). Dies könnte durch eine verstärkte aerobe Glykolyse mit Laktatherstellung als Energiequelle aufgrund von Sauerstoffmangel, ausgelöst durch die Extraktverdünnung, verursacht worden sein.

Die Kontrollen ergaben bei Estradiol keinen Effekt. Tamoxifen und Endoxifen ließen niedrige Laktatwerte von 3 mmol/l und 4,4 mmol/l beobachten, was für einen schnellen Zelltod der behandelten Zellen sprechen könnte.

Die Laktatmessung der MCF-12a-Zellen zeigte ähnliche Ergebnisse wie bei der Zellreihe zuvor. Heraussticht der Laktatspiegel der stärksten Konzentration von Extrakt 2 mit einem Wert von 12,6 mmol/l. Dies könnte ebenfalls durch eine gesteigerte Laktatproduktion aufgrund von Sauerstoffmangel erklärt werden. Die Kontrollen ließen ihre substanzspezifischen Effekte beobachten.

Die pH-Messung beider Zellreihen ließen Ergebnisse zwischen pH-Werten von 7,8 und 8,4 beobachten. Schwankungen des pH-Wertes aufgrund der unterschiedlichen Laktatwerte konnten bei den Extraktverdünnungen nicht beobachtet werden. Eine Ausnahme ließ sich bei den Kontrollen beobachten. Hier reagierte der pH-Wert auf die mit Tamoxifen und Endoxifen behandelten Zellen mit einer leichten Wertsteigerung. Dies könnte durch die niedrigen Laktatwerte der mit diesen Substanzen behandelten Zellen erklärt werden.

5.7. Wirkweise der Curcuminoide

Die Curcuminoide Curcumin und Bisdemethoxycurcumin zeigten sowohl bei den Viabilitäts- als auch den Proliferationstests eine deutliche Wirksamkeit auf die rezeptorpositive maligne MCF-7- und die ebenfalls rezeptorpositive benigne MCF-12a-Brustkrebszelllinien mit überwiegend signifikanten Ergebnissen.

Die Ergebnisse bestätigen die zahlreichen Erkenntnisse aus früheren Forschungsarbeiten, in denen den Curcuminoiden eine zytotoxische und antiproliferative Wirkung zugesprochen wird. Bemerkenswert war die Wirkung von Bisdemethoxycurcumin, da es die stärkste Hemmung aller Referenzstoffe auf die beiden Zellreihen zeigte. Die unterschiedliche Dignität der Tumorzelllinien ließ keinen erkennbaren Effekt auf die Wirksamkeit der Curcuminoide erkennen.

Auf einige Signaltransduktionswege der Curcuminoide soll hier nun noch einmal näher eingegangen werden: In vielen Forschungsarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass die Curcuminoide auf unterschiedlichste Weise Einfluss auf die Viabilität und Proliferation von entarteten Zellen nehmen können. So besitzt Curcumin die Fähigkeit, eine Expressionssteigerung des Tumorsuppressorgens p53 und die damit einhergehende selektive Apoptoseinduktion zu bewirken [191, 86]. Choudhuri et al. konnten eine durch Curcumin erhöhte p53-Aktivität zeigen, die eine gesteigerte Apoptoserate in MCF-7-Brustkrebszellen zur Folge hatte [52]. Neben einer vermehrten p53-Aktivität kann Curcumin die Apoptoserate auch über p53-unabhängige Wege induzieren. Es konnte eine Curcumin-vermittelte Apoptose durch Aktivierung der Caspase 3 Protease mittels der Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) und der Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien verschiedener Krebszellen beobachtet werden [23, 45]. Eine erhöhte ROS-Erzeugung durch Curcumin setzt vermehrt den Apoptose-induzierenden Faktor (AIF) frei, fördert den Abbau intrazellulären Glutathions (GSH) und induziert eine Chromatinkondensation, was in einer DNA-Fragmentierung resultiert [114]. Darüber

hinaus erniedrigte Curcumin die Aktivierung verschiedener MAP-Kinasen und zeigte eine hemmende Wirkung auf proinflammatorische Zytokine. Ferner konnte über eine Curcumin-vermittelte Hemmung von TNF- α eine erniedrigte Expression der Interleukine IL-1b, IL-6 und IL-8 beobachtet werden [51]. Chen et al. zeigten eine über Curcumin erreichte Hemmung der C-Jun-N-terminalen Kinasen (JNK), welche ebenfalls zur Gruppe der MAP-Kinasen gehören und unter anderem die Zellproliferation und Apoptose regulieren [46]. Durch Herunterregulierung der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xL durch Curcumin konnte eine gesteigerte Apoptose erreicht werden [246]. Shishodia et al. fanden heraus, dass Curcumin den Transkriptionsfaktor NF- κ B hemmt. Folglich wurde die Expression aller NF- κ B-regulierten Genprodukte durch das Polyphenol herunterreguliert, was zur Suppression der Proliferation, zum Stillstand des Zellzyklus in der G1/S-Phase des Zellzyklus und zur Induktion der Apoptose führte [201]. Di Tu et al. beschrieben bemerkenswerte inhibierende Potentiale, die Curcumin auf den PI3K/AKT/mTOR Signalweg ausübt [62]. Die PI3K/Akt/mTOR-Signalwege spielen eine wichtige Rolle bei der humanen Brustkarzinogenese, da sie an der Steuerung des Zellzyklus und dem Proliferationsverhalten beteiligt sind [162]. Das Aktivatorprotein-1 (AP-1) steht in Beziehung mit Onkogenen, die unter anderem an mitogenen, pro-angiogenen und anti-apoptotischen Prozessen beteiligt sind. Weiterhin steht AP-1 mit einer Expressionssteigerung von NF- κ B in Verbindung. Curcumin konnte die Expression AP-1 und NF κ B in menschlichen Gliomzellen hemmen [198].

Das Auslösen eines Zellzyklusarrests durch Curcumin konnte in verschiedenen Krebszellen in der G2-G2/M [53, 122] und seltener in der G-1Phase [96] der Mitose, sowohl p53-ab- als auch unabhängig, gezeigt werden.

Bisdemethoxycurcumin macht nur etwa 5 % der Curcuminoide in der Curcumawurzel aus. Wie sich in den Ergebnissen meiner Arbeit und in der Literatur jedoch gezeigt hat, scheint das Derivat des Curcumins eine durchaus bedeutsame Rolle im Stoffgemisch der Curcumaextrakte zu besitzen. Bisdemethoxycurcumin zeigte bei allen in dieser Versuchsreihe durchgeföhrten Viabilitäts- und Proliferationstests signifikante Werte, die eine deutliche Hemmung der Zellüberlebensfähigkeit und des Zellwachstums beobachten ließen. Diese beeindruckenden Ergebnisse könnten durch die folgenden Studien erklärt werden. Bisdemethoxycurcumin kann DNA-Schäden und -Kondensation induzieren. Gleichzeitig kann es die DNA-Reparaturproteine beeinflussen, indem es diese herunter reguliert [255]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Bisdemethoxycurcumin über eine erhöhte ROS-Akkumulation die p53/p21- und p16/Rb-Signalwege regulierte und dadurch zu einer hemmenden Wirkung auf die Lebensfähigkeit von MCF-7-Zellen beitragen konnte [134]. Qiu. et al. fanden heraus, dass Bisdemethoxycurcumin zeit- und dosis-abhängig die Proliferation von hepatozellulären Krebszellen hemmte, indem es eine Inaktivierung des Akt-Signalweges verursachte. Das Curcuminoid regulierte die Expression von CYLD (Cylindromatose-Lysin-63-Deubiquitinase) hoch, was zu einer Akt-Deubiquitinierung und -Inaktivierung führte [179]. Es konnte festgestellt werden, dass unter verschiedenen Polyphenolen Bisdemethoxycurcumin den Tumormarker AKR1B10, welcher mit der Karzinogenese verschiedener Krebsarten in Verbindung gebracht wird, am effektivsten hemmte, und zwar deutlich effektiver als Curcumin [147]. Yodkeeree et al. beschreiben eine hemmende Wirkung der Curcuminoide auf die Invasion von Krebszellen über eine Regulation von Matrix-Metalloproteininasen (MMPs). Diese Regulation von MMPs spielt eine wichtige Rolle bei der Invasion von Krebszellen durch

Spaltung der extrazellulären Matrix (ECM). Yodkeree et al. sprachen hierbei dem Bisdemethoxycurcumin die deutlichste anti-metastatische Aktivität unter den untersuchten Polyphenolen zu [254]. Andere Studien zeigen differierende Ergebnisse [132]. Sie bestätigen die vielversprechenden antikanzerogenen Eigenschaften des Bisdemethoxycurcumins, die jedoch im Vergleich zu Curcumin schwächer ausfallen würden. Lesmana et al. stellte in einer aktuellen Arbeit aus dem Jahr 2021 eine effektivere Proliferationshemmung durch Curcumin, verglichen mit Bisdemethoxycurcumin an MCF-7 Brustkrebszellen, fest [132]. Vielversprechend könnte ein kombinierter Einsatz der Curcuminoide sein. Das zeigte eine Studie von Huang et al., in welcher die Kombination aus Curcumin, Demethoxycurcumin und Bisdemethoxycurcumin synergistisch die Caspase-3-vermittelte Apoptose durch die Aktivierung von Smad2/3- und Akt-Signalwegen erhöhte und somit die Zelllebensfähigkeit und Koloniebildung entarteter Zellen senkte [98].

5.8. Wirkweise der Flavonoide und Kaffeesäure

Die Wirksamkeit der Flavonoide Quercetin, Isoquercitrin und der zu den Polyphenolsäuren gehörenden Kaffeesäure auf die beiden hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomzellen MCF-7 (maligne) und MCF-12a (benigne) konnte anhand der Viabilitäts- und Proliferationstests gezeigt werden.

Quercetin ließ teilweise bemerkenswerte Ergebnisse mit deutlichen Unterschieden zwischen den beiden Zellreihen beobachten. Auf die maligne MCF-7-Brustkrebszelllinie zeigte es eine moderate Hemmung bei den Viabilitätstest, wobei nur im Neutralrot-Test signifikante Werte erreicht wurden. Die benigne MCF-12a-Zellreihe reagierte auf die Beimpfung mit Quercetin bei allen Viabilitätstest mit signifikanten Ergebnissen und einer deutlichen Verminderung der Zellzahl. Da Quercetin ein Phytoöstrogen ist, könnten diese Wirkunterschiede auf eine unterschiedlich ausgeprägte Expression der Estrogenrezeptoren ER- α und ER- β in den beiden Zellreihen zurückzuführen sein. Die durch die ER-Signalkaskaden vermittelten Wirkungen decken jedoch nicht das gesamte Wirkspektrum von Quercetin ab. Einige dieser Signaltransduktionswege sollen im folgenden Abschnitt zusammengetragen und ergänzt werden.

Deng et al. konnten eine konzentrations- und zeitabhängige Verringerung der Lebensfähigkeit und eine Apoptoseinduktion durch Quercetin an menschlichen MCF-7-Brustkrebszellen nachweisen [60]. Laut Chien et al. kann Quercetin in Brustkrebszellen den Zelltod über Caspase-3-abhängige Wege bewirken. Weiterhin erhöhte Quercetin die Expression des pro-apoptotischen Proteins Bax und senkte den Spiegel des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 [48]. Diese Ergebnisse konnten von Srivastava et al. an diversen Zelllinien unterschiedlichster Tumorgenese bestätigt werden. Sie beschrieben ferner, dass Quercetin zu einer Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials führt, was eine Freisetzung von Cytochrome C zur Folge hat. Dies spricht für eine Beteiligung des mitochondrialen Weges bei der Quercetin-vermittelten Apoptoseinduktion [213]. Jeong et al. konnten feststellen, dass Quercetin der Karzinogenese entgegen wirkt, indem es einen Zellzyklusarrest in der G(1)-Phase der Mitose induziert. Es wurde beobachtet, dass Quercetin leichte DNA-Schäden verursachen und die Chk2 (Checkpoint-Kinase 2), welche an der DNA-Reparatur, dem Stillstand des Zellzyklus und der Apoptose als Reaktion auf DNA-Schäden beteiligt ist, erhöhen kann [107].

Rivera et al. zeigten in ihrer Studie, dass Quercetin als Inhibitor von Akt- und mTOR-Aktivitäten zu einer reduzierten Zellproliferation, einem Zellzyklusarrest und Apoptose in Brustkrebszellen führt [187]. Ferner konnte festgestellt werden, dass Quercetin die Sensitivität von MCF-7 Zellen gegenüber 5-Fluorouracil (5-FU) erhöht, sodass diese Kombination für die Therapie von Brustkrebs in Erwägung gezogen werden kann [148].

Die Dosierung des Quercetins scheint einen Einfluss auf dessen Wirkungsweise zu haben. Es konnte dargestellt werden, dass die chemopräventive Wirkung von Quercetin bereits bei niedriger und physiologisch relevanter Dosierung erkennbar ist [107]. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Van der Woude et al., welche dem Quercetin eine biphasische Dosisreaktion zuschreiben. Sie zeigten unter anderem an MCF-7-Brustkrebszellen, dass eine hohe Konzentration an Quercetin eine signifikante Abnahme der Zellproliferation zur Folge hatte, bei niedrigen Konzentrationen jedoch eine leichte Zellproliferation beobachtet werden konnte [247]. Sie versuchten, dieses Phänomen über eine unterschiedliche, konzentrationsabhängige Aktivierung der beiden Estrogenrezeptoren ER- α und ER- β zu erklären. Während eine hohe Konzentration an Quercetin eine verstärkte Expression des anti-proliferierend wirkenden ER- β zur Folge hätte, könnte eine niedrige Konzentration in einer proliferierenden Wirkung durch vermehrte ER- α Aktivierung resultieren [248]. Maggiolini et al. wiederum stellten eine ER-unabhängige Zytotoxizität des Quercetins bei hohen Konzentrationen fest [139].

Dem Flavonoid Isoquercitrin konnten ebenfalls wirksame pharmakologische Eigenschaften gegenüber Krebszellen nachgewiesen werden. Es wurde festgestellt, dass das Flavonoid in Gebärmutterhalskrebszellen zu einem Zellzyklusarrest in der S-Phase führt und die Apoptose der entarteten Zellen unter anderem durch chromosomal DNA-Abbau und einer gesteigerten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) induziert. Ferner war Isoquercitrin für die Hemmung des anti-apoptotischen Bcl-2-Proteins verantwortlich, während es die Expression des pro-apoptotischen Proteins Bax steigerte [164].

Die Kaffeesäure erreicht ihre antikanzerogenen Wirkungen über eine gesteigerter ROS-Produktion. Ferner hemmt sie mitochondriale Funktionen, was die Apoptose in entarteten Zellen fördert [153]. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B konnte in MCF-7-Brustkrebszellen durch Kaffeesäurephenethyllester (CAPE), der Ester von Kaffeesäure und Phenethylalkohol, gehemmt werden. Dies hatte eine Apoptoseinduktion der Zellen zur Folge [240]. Das pharmakologische Potenzial dieser in der Natur weit verbreiteten phenolischen Verbindung scheint von großem Interesse zu sein. Laut Kuo et al. kann CAPE die Akt-Signalgebung, zellzyklusregulierende Proteine, die NF- κ B-Funktion sowie die Aktivität von Matrix-Metalloproteinase (MMPs), des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) und der Cyclooxygenase-2 (COX-2) hemmen [127]. In OV7-Ovarialkarzinomzellen induzierte CAPE die Apoptose über eine Dysregulation des Bax/Bcl-2-Gleichgewichts, wobei das Expressionsniveau des proapoptotischen Bax-Gens zehnmal höher war als das von Bcl-2 [115].

5.9. Methodenkritik

Die Herstellung der ethanolbasierten Extrakte erfolgte über eine etablierte Methode des Forschungslabors, die sich in der Vergangenheit als erfolgreich herausgestellt hatte. In der Literatur werden verschiedene Methoden zur effizienten Extraktion sekundärer Pflanzenstoffe beschrieben. Diese unterscheiden sich in der Art des Lösungsmittels, dessen Konzentration sowie der Extraktionsmethode und Extraktionszeit.

Unter den verschiedenen Lösungsmitteln stellte sich Ethanol zur Extrahierung von Curcumin als effizienteste Lösung heraus [226]. Dabei wurde eine Extraktionszeit von 60 min und eine Temperatur von 55 °C angewendet. Pan et al. erzielten die höchste Curcumin Ausbeute unter Verwendung von 80 % Ethanol, kombiniert mit einer Extraktionstemperatur von 70 °C und einem Flüssigkeits-zu-Material-Verhältnis von 20:1 [169]. Ein niedrigeres Fest-Flüssig-Verhältnis von 1:10 [256] und eine niedrigere Ethanolkonzentration von 69 % zeigten ebenfalls gute Extraktionsergebnisse [258]. Die genannten Methoden eignen sich ebenfalls zur Extraktion anderer Phenol- und Flavonoidverbindungen [67].

Bei der anschließenden chromatographischen Detektion von Pflanzenstoffen in den Curcumaextrakten mittels der HPLC-Methode gab es literarische Unterschiede bei der Wahl der Laufgeschwindigkeit, der Wellenlänge des UV-Detektors und der Zusammensetzung der mobilen Phase. Alaerts et al. verwendeten zur Untersuchung der Curcuma Wurzel ebenfalls eine C-18 Säule und eine Detektionswellenlänge von 254 nm. Die Flussrate betrug jedoch 2 ml/min und die Retentionszeit 50 min [7]. Mudge et al. verwendeten eine mobile Phase, bestehend aus Wasser und Acetonitril, sowie eine Wellenlänge von 425 nm mit einer Flussrate von 1,4 ml/min für die Quantifizierung von Curcuminoiden [160]. Alves et al. detektierten Quercetin und Isoquercitrin bei einer Flussrate von 1,8 ml/min und einer Wellenlänge von 350 nm. Die mobile Phase bestand aus Acetonitril und einem Phosphorsäurepuffer [11].

Um die Pflanzenextrakte auf ihre Inhaltsstoffe untersuchen zu können, wurden synthetische Referenzanalysen der Polyphenole verwendet. Durch die immense Strukturvielfalt der in der Natur vorkommenden Polyphenole kann nicht genau gesagt werden, in welcher Menge weitere pharmakologisch wirksame Stoffderivate in den Extrakten vorhanden sind [30]. Beispielsweise liegt das Flavonoid Quercetin in der Curcuma Wurzel hauptsächlich glykosyliert als Quercetin-3-D-galactoside vor [207]. Weitere Untersuchungen der einzelnen Stoffderivate könnten zu einem besseren Verständnis der Polyphenole im Hinblick auf deren pharmakologisches Wirkprofil führen.

Die Referenz Curcumin wurde zur Anwendung bei den Tests in absolutem Alkohol gelöst. Bisdemethoxycurcumin ließ sich in absolutem Alkohol nur ungenügend lösen. In der Literatur wurde eine gute Löslichkeit des Curcuminoids in Dimethylsulfoxid (DMSO) beschrieben, was für diese Arbeit übernommen wurde [180, 208]. Ein Vergleich zwischen den beiden Referenzen konnte durch die Einbeziehung der Negativkontrolle 2 (Lösungsmittel) bei der Ergebnisberechnung gezogen werden. Für weitere Arbeiten mit diesen Referenzstoffen sollte die Anwendung eines einheitlichen Lösungsmittels angestrebt werden.

Der CellTiter-Glo®-Test stützt sich auf die Eigenschaften einer proprietären thermostabilen Luciferase (Ultra-GloTM Recombinant Luciferase), die ein stabiles „glow-type“-lumineszierendes Signal erzeugt. Lösungsmittel für die verschiedenen Referenzen können diese Luciferase-Reaktion und damit die Lichtleistung des Tests beeinträchtigen. Dimethylsulfoxid (DMSO), das häufig als Vehikel zur Lösung organischer Chemikalien verwendet wird, wurde im Test in Endkonzentrationen von bis zu 2 % getestet und wirkt sich nur minimal auf die Lichtleistung aus [44]. In dieser Arbeit wurden die Flavonoide Quercetin und Isoquercitrin in absolutem Alk und DMSO im Verhältnis 1:1 und das Curcuminoid Bisdemethoxycurcumin in reinem DMSO gelöst.

Der Neutralrot-Aufnahmetest liefert eine quantitative Schätzung der Anzahl lebensfähiger Zellen in einer Kultur. Gelegentlich können einige Chemikalien dazu führen, dass der neutralrote Farbstoff irreversibel zu feinen, nadelförmigen Kristallen ausfällt, was zu einer Überschätzung der toxischen Wirkung führt [185]. Dies wurde durch eine regelmäßige mikroskopische Kontrolle der Wells während der Inkubation mit dem Farbstoff verhindert.

5.10. Fazit

Das Thema dieser Arbeit war der Einfluss von drei Pflanzenextrakten der Curcumawurzel auf hormonrezeptorpositive maligne (MCF-7) und benigne (MCF-12a) Brustkrebszellen. Weiterhin wurde das Wirkprofil der in der Curcumawurzel enthaltenen Polyphenole Curcumin, Bisdemethoxycurcumin, Kaffeesäure, Quercetin und Isoquercitrin auf die Zellreihen untersucht. Bei den Pflanzenextrakten konnte vor allem der Extrakt 1 (Curcuma Gewürzpulver) mit einer dosisabhängigen zytotoxischen und antiproliferierenden Wirkung auf die Krebszellen überzeugen. Die Referenzstoffe wiesen eine teilweise sehr deutlich hemmende Wirkung auf das Viabilitäts- und Proliferationsverhalten der Zellen auf. Besonders hervorzuheben ist das stark zytotoxische sowie antiproliferative Wirkverhalten der Curcuminoide auf beide Zellreihen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sowie die zahlreichen wissenschaftlichen Forschungsarbeiten der vergangenen Jahre demonstrieren das große Potential der Polyphenole im Hinblick auf die Therapie und Prävention von Brustkrebs. In einer weiteren Arbeit könnte untersucht werden, inwieweit die Verwendung eines Curcuma Gewürzpulvers beziehungsweise die Supplementierung eines Curcuma Nahrungsergänzungsmittels einen präventiven Effekt auf die Entstehung von Brustkrebs besitzt.

6. Ausblick

Durch die zahlreichen Forschungsarbeiten, die der Curcumawurzel und ihren Inhaltsstoffen unter anderem antikanzerogene Eigenschaften beimessen, besteht großes Interesse an weiteren präklinischen und klinischen Untersuchungen.

Bei zukünftigen Untersuchungen sollte die Extraktion der sekundären Pflanzenstoffe aus der Curcumawurzel optimiert werden. Eine Möglichkeit, den Ertrag der Curcuminoide zu erhöhen, wäre eine verlängerte Extraktionszeit auf 60 min [226]. Die Erträge des Flavonoids Quercetin lassen sich laut Ko et al. durch einen hohen Druck (90 bar), eine höhere Temperatur (165 °C) und eine kurze Extraktionszeit (15 min) erheblich steigern [116].

Das Flavonoid Quercetin liegt in der Curcuma-Wurzel hauptsächlich glykosyliert als Quercetin-3-D-galactoside vor [207]. Um eine genaue Quantifizierung des Quercetins innerhalb der Curcumaextrakte zu gewährleisten, müssten die Glykosid-Bindungen während der Extrahierung der Pflanzenextrakte mit Salzsäure hydrolysiert werden [92]. Weiterhin sind neben Curcumin und Bisdemethoxycurcumin weitere Derivate der Curcuminoide in der Curcumawurzel vorhanden, die eine pharmakologische Wirksamkeit besitzen könnten. Deshalb sollte eine Isolierung dieser Derivate mithilfe der HPLC durchgeführt und deren Wirkprofil separat in in-vitro untersucht werden. Weiterhin sollte zur besseren Vergleichbarkeit der sekundären Pflanzenstoffe untereinander ein einheitliches Lösungsmittel verwendet werden.

Die wachstumshemmenden Ergebnisse dieser Arbeit wurden an malignen und benignen Brustkrebszellen erzielt. Der Einfluss auf gesunde Brustzellen sollte zukünftig ebenfalls erforscht werden.

Bei der Therapie und Prävention von Brustkrebs besitzt der Hormonrezeptor eine besondere Relevanz. Für Quercetin konnte sowohl eine rezeptorabhängige [248] also auch rezeptorunabhängige Hemmung von Brustkrebszellen gezeigt werden [139]. So müsste geklärt werden, inwieweit sich ein Wirkeffekt an rezeptornegativen Karzinomzellen durch die Pflanzenextrakte und Referenzen zeigen ließe. Laut Van der Woude et al. besitzt Quercetin eine biphasische Dosisreaktion. So hatte hochkonzentriertes Quercetin einen hemmenden Effekt auf MCF-7 Zellen, während niedrige Konzentrationen eine gesteigerte Proliferation auslösten [247]. Um eine mögliche Unterdosierung des Quercetins oder der anderen Referenzen zu überprüfen, wäre es sinnvoll, die in vorliegender Arbeit angewandten Untersuchungsreihen mit unterschiedlichen Konzentrationen zu wiederholen.

Das Betrachten der Wirkmechanismen auf molekularer Ebene könnte Aufschluss darüber geben, inwieweit die Pflanzenextrakte mit ihrer Komplexität und Fülle an Inhaltsstoffen im Vergleich zur jeweiligen synthetisch hergestellten Reinsubstanz der Polyphenole bei der Therapie und Prävention von Brustkrebs vorteilhaft wären. Gleichzeitig könnten potenzielle Interaktionen zwischen den sekundären Pflanzenstoffen aufgedeckt werden. Srivastava et al. beschreiben in ihrer Arbeit eine synergistische Wirkungsweise von Quercetin in Verbindung mit Curcumin mit einer deutlichen Hemmung der Zellproliferation [212].

Weiterhin sollten mögliche Interaktionen mit der klassischen Krebstherapie untersucht werden. Hierbei gilt beispielsweise, dass Wechselwirkungen zwischen Curcumin und Enzymen der Cytochrom-P450-Familie auftreten können [229]. Im Anschluss daran könnte mit in-vivo Studien begonnen werden.

Klinische Studien würden zu einem besseren Verständnis der Wirkung von Polyphenolen bezüglich der Resorption, des Metabolismus und der Bioverfügbarkeit im menschlichen Körper führen. Die Bioverfügbarkeit schwankt stark innerhalb der Polyphenole und ihren Derivaten. So scheint Tetrahydrocurcumin, ein wichtiger Metabolit der Curcuminoide, in Sachen Wasserlöslichkeit, chemischer Stabilität, Bioverfügbarkeit und antioxidativer Aktivität Curcumin überlegen zu sein [129]. Im Kapitel 1.2.7 Resorption und Bioverfügbarkeit wurden bereits die Besonderheiten der Resorption und Metabolisierung von Polyphenolen nach oraler Aufnahme besprochen. Diese hängen unter anderem von Glykosidsubstituenten, zellulären Transportmechanismen, bakterieller Darmflora und genetischer Disposition ab. Hier gilt es, die Pharmakokinetik und -dynamik der Polyphenole innerhalb des Blutkreislaufes und Organsysteme weiter zu untersuchen.

Eine Möglichkeit, etablierte Therapieschemata bei Krebserkrankungen mit Polyphenolen zu kombinieren, wird in dieser Arbeit untersucht. Dies könnte eine Reduktion der Zytostatika-Dosis und damit eine Senkung der Nebenwirkungen durch die zytostatische Chemotherapie zur Folge haben. So wurde festgestellt, dass Quercetin die Sensitivität von MCF-7 Zellen gegenüber 5-Fluorouracil erhöht, sodass diese Kombination für die Therapie von Brustkrebs in Erwägung gezogen werden kann [148]. Curcumin soll durch Doxorubicin vermittelte Gewebeschädigungen wiederherstellen und eine schützende Wirkung auf Herz, Nieren, Leber, Gehirn und die Fortpflanzungsorgane haben [156]. Gleichzeitig soll Curcumin ebenfalls Krebszellen gegenüber Chemotherapeutika sensibilisieren [222]. So scheinen die Polyphenole sowohl untereinander als auch in Kombination mit klassischen Chemotherapeutika synergistisch wirken zu können. Es bleiben jedoch auch die unerwünschten Wechselwirkungen der CYP-Enzyme, die es weiter zu untersuchen gilt.

Weiterhin stellen sich interessante Fragen als Ergänzung zu dieser Arbeit:

Wie häufig und in welcher Menge sollte das Curcuma Gewürzpulver in der Küche verwendet werden, um einen möglichen präventiven Effekt auf die Karzinogenese von Brustkrebs zu entfalten?

Ist eine Supplementation von Polyphenolen über ein Curcuma-Präparat zur Prävention von Brustkrebs sinnvoll?

Welche langfristigen und physiologischen Blutkonzentrationen der Polyphenole können mit einer Supplementierung von Curcuma-Präparaten erreicht werden und besitzen diese einen präventiven Effekt auf die Karzinogenese von Brustkrebs?

7. Zusammenfassung

Sekundäre Pflanzenstoffe in der Therapie und Prävention von Brustkrebs sind seit Jahren fester Bestandteil wissenschaftlicher Forschungsarbeiten. Die Curcumawurzel enthält in hohen Mengen Polyphenole, denen in in-vitro Untersuchungen antikanzerogene Eigenschaften zugesprochen werden konnte.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss verschiedener Curcumaxtrakte auf maligne (MCF-7) und benigne (MCF-12a) rezeptorpositive Brustkrebszellen untersucht. Die Extraktherstellung erfolgte mittels Ethanolverfahren aus Curcuma Gewürzpulver (Extrakt 1), einem Curcuma Nahrungsergänzungsmittel (Extrakt 2) und frischer Curcumawurzel (Extrakt 3).

Mithilfe der HPLC-Methode gelang eine teilweise chromatographische Auftrennung der Pflanzenextrakte. Unter den Polyphenolen konnten die Curcuminoide Curcumin und Bisdemethoxycurcumin, die Flavonoide Quercetin und Isoquercitrin, sowie die Kaffeesäure in allen drei Extrakten nachgewiesen werden. Durch eine immunhistochemische Untersuchung beider Brustkrebszelllinien gelang der positive Rezeptornachweis. Anhand von Viabilitäts- und Proliferations-tests konnte der Einfluss der Pflanzenextrakte, Referenzen und Kontrollen auf die Lebens- und Vermehrungsfähigkeit der Zellen dargestellt werden.

Zusammenfassend wurde eine dosisabhängige Hemmung der Viabilität und Proliferation durch die Extrakte beobachtet. Die hochdosierten Extraktverdünnungen lieferten teilweise deutlich zytotoxische Ergebnisse, während die niedrigeren Konzentrationen keinen, beziehungsweise einen leicht proliferierenden Effekt erkennen ließen.

Die in den Extrakten chromatographierten Referenzstoffe wiesen eine teilweise sehr deutlich hemmende Wirkung auf das Viabilitäts- und Proliferationsverhalten der Zellen auf. Unter ihnen konnte den Curcuminoiden ein stark zytotoxischer sowie antiproliferativer Effekt sowohl auf die maligne rezeptorpositive als auch auf die benigne rezeptorpositive Zellreihe nachgewiesen werden. Hierbei wies Bisdemethoxycurcumin eine deutlich effektivere Wirkung im Vergleich zu Curcumin auf. Die Flavonoide Quercetin und Isoquercitrin sowie die Kaffeesäure überzeugten mit einer moderaten Verminderung der Zellzahl und Vermehrungsfähigkeit in den Viabilitäts- und Proliferationstests. Dieser Effekt zeigte sich etwas deutlicher bei den Zellen der benignen MCF-12a-Reihe.

Die Kontrollen ließen bei Estrogen, neben einer schwachen Proliferationssteigerung beim CytoTox-Glo™-Zytotoxizitätstests, keinen Effekt auf die Zellreihen erkennen. Tamoxifen und Endoxifen bestätigten ihre substanzspezifische Wirkung auf beide Zellreihen mit deutlich zytotoxischen Ergebnissen und verdeutlichen die Aussagekraft der in-vitro Untersuchungen.

Die deutlich antikanzerogenen Ergebnisse der Pflanzenextrakte und Polyphenole in dieser Arbeit stehen im Einklang mit dem aktuellen wissenschaftlichen Forschungsstand und sind für weitere Untersuchungen von großem Interesse.

8. Thesen

Thema:

Einfluss von Curcuma und ihren Inhaltsstoffen Curcumin, Bisdemethoxycurcumin, Kaffeesäure, Quercetin und Isoquercitrin auf hormonrezeptorpositive maligne (MCF-7) und benigne (MCF-12A) Mammakarzinomzellen.

1. Brustkrebs ist die häufigste maligne Erkrankung der Frau in Deutschland und weltweit.
2. Ein inhibitorischer Effekt einiger der in der Curcumawurzel enthaltenen Polyphenole auf Brustkrebs ist vielfältig in Studien beschrieben und untersucht worden.
3. Die vorliegende wissenschaftliche Untersuchung befasst sich mit den Wirkungen dreier Pflanzenextrakte aus der Curcumawurzel und deren synthetisch hergestellten polyphenolischen Inhaltsstoffen Curcumin, Bisdemethoxycurcumin, Kaffeesäure, Quercetin und Isoquercitrin auf die Mammakarzinomzellen MCF-7 und MCF-12a.
4. In allen drei Pflanzenextrakten können die Polyphenole Curcumin, Bisdemethoxy- curcumin, Kaffeesäure, Quercetin und Isoquercitrin mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatography) isoliert werden.
5. Im Extrakt 1 (Curcuma Gewürzpulver) kann die höchste Intensität der Inhaltsstoffe detektiert werden.
6. Der Hormonrezeptorstatus der MCF-7- und MCF-12a-Zellen kann mittels immunhistochemischer Untersuchung verifiziert werden.
7. Die in-vitro Zelltests CellTiter-Glo®, CytoTox-Glo™, BrdU und Neutralrot werden zur Beurteilung von Zellviabilität, Zytotoxizität und Proliferation herangezogen.
8. Extrakt 1 (Curcuma Gewürzpulver) weist mit seinen hochdosierten Extrakt-verdünnungen signifikant inhibitorische Wirkungen auf die Zellviabilität und Proliferation auf.
9. Extrakt 2 (Curcuma Nahrungsergänzungsmittel) und Extrakt 3 (frische Curcuma-wurzel) bestätigen diese Ergebnisse nur vereinzelt.
10. Die synthetischen Curcuminoide Curcumin und Bisdemethoxycurcumin zeigen eine moderate bis starke, signifikante Hemmung der Zellviabilität und Proliferation an beiden Brustkrebszellreihen.
11. Die synthetischen Flavonoide Quercetin und Isoquercitrin sowie die Kaffeesäure zeigen eine moderate bis schwache, teilweise signifikante Inhibition der Zellviabilität und Proliferation an beiden Brustkrebszellreihen.
12. Die Kontrollen Estradiol, Tamoxifen und Endoxifen weisen ein substanzspezifisches Wirkverhalten an beiden Brustkrebszellreihen auf.
13. Die Dosis-Wirkungs-Beziehungen der Curcumaextrakte müssen weiter untersucht werden.
14. Die weitere Differenzierung der Polyphenolderivate innerhalb der Curcumawurzel kann nun fortgeführt und deren Wirkprofil untersucht werden.
15. Die antikanzerogenen Effekte der Curcumaextrakte sind für weitere Untersuchungen in-vivo von großem Interesse.

9. Publikation

Teile dieser Arbeit wurden in folgendem Abstract veröffentlicht:

Einfluss von Curcuma und seinen Inhaltsstoffen Curcumin, Bisdemethoxycurcumin, Kaffeesäure, Isoquercitrin und Quercetin auf maligne und benigne hormon-rezeptorpositive Mammakarzinomzellen (MCF-7 und MCF-12A)

Hintze O¹, Jeschke U², Gerber B¹, Reimer T¹, Richter D-U¹.

Geburtshilfe Frauenheilkd 2020; 80(10): e171

DOI: 10.1055/s-0040-1718077

Einfluss von Curcuma und seinen Inhaltsstoffen Curcumin, Bisdemethoxycurcumin, Kaffeesäure, Isoquercitrin und Quercetin auf maligne und benigne hormon-rezeptorpositive Mammakarzinomzellen (MCF-7 und MCF-12A)

Hintze O¹, Jeschke U², Gerber B¹, Reimer T¹, Richter D-U¹.

¹Universitätsmedizin Rostock, Universitätsfrauenklinik, Südring 81, 18059 Rostock

²Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Maistrasse 11, 80337 München

Einleitung

Brustkrebs ist die häufigste Krebserkrankung der Frau weltweit [1]. Da klassische Therapieformen teilweise nicht ausreichend effizient, oft mit starken Nebenwirkungen befreit und teuer sind, neigen immer mehr Frauen zur Unterstützung durch eine integrative Therapie [2]. Dabei spielt bewusste Ernährung und Zufuhr von Nahrungsergänzungsmitteln eine immer größere werdende Rolle. Den Curcuminoiden, Curcumin und Bisdemethoxycurcumin, wird hier ein großes Potential bei der Prävention und Therapie von Brustkrebs zugesprochen [3] [4]. Ziel dieser Studie ist es, die zytotoxische und antiproliferative Wirkung von Curcumin und der darin enthaltenen Referenzen auf maligne und benigne hormonrezeptorpositive Mammakarzinomzellen (MCF7 und MCF-12A) zu untersuchen.

Material und Methoden

Aus konventionell erworbenem Curcuma-Gewürzpulver (Extrakt 1), einem Curcuma-Nahrungsergänzungspräparat aus den USA (Extrakt 2) und einer frischen Curcuma-Wurzel (Extrakt 3) wurden mithilfe eines Mikrowellenverfahrens drei Ethanoextrakte hergestellt. Mittels Hochleistungschromatographie (HPLC) konnten die einzelnen Extrakte auf ihre Inhaltsstoffe analysiert werden. Der Rezeptormechanismus der Zellen gelang immunhistochemisch (Biozol). Der Einfluss der drei Curcuma-Extrakte sowie der Referenzen wurde mithilfe von Zellviabilitäts- (CellTiter-Glo®, Promega; Neutralrot, Sigma-Aldrich®), Zytotoxizitäts- (CytoTox-Glo®, Promega) und Proliferationstests (BrdU®, Roche) untersucht. Durch Glucose-, pH- und Lactatmessungen konnte der Zellmetabolismus während der Testansätze überprüft werden. Die drei Curcuma-Extrakte waren bei allen Tests in 5 Konzentrationen diluiert (100%, 50%, 20%, 10%, 5%, 3%). Als Kontrollen fungierten Tamoxifen, Endoxifen und Estradiol.



Abb. 1: Herstellung der Curcuma-Extrakte aus Gewürzpulver, einem Nahrungsergänzungsmittel und zwei frischen Curcuma-Wurzeln mithilfe der Discov SP Mikrowelle (CEM GmbH).

Ergebnisse

In allen drei Extraktarten konnten die sekundären Pflanzenstoffe Curcumin, Bisdemethoxycurcumin, Kaffeesäure, Isoquercitrin und Quercetin nachgewiesen werden. Vor allem Extrakt 1 (Curcuma-Gewürzpulver) zeigte bei beiden Zellreihen eine konzentrationsabhängige Hemmung der Zellviabilität und Zellproliferation. Bei den Referenzen stachen Bisdemethoxycurcumin, Curcumin und Quercetin mit einer stark zytotoxischen und stark antiproliferativen Wirkung auf beide Zellreihen hervor. Die Kontrollen Tamoxifen und Endoxifen, sowie die Lösungsmittel lieferten die zu erwarteten Ergebnisse. Hier fiel auf, dass sowohl DMSO als auch Alkohol 90% / DMSO als Lösungsmittelkontrolle bei MCF-12A eine moderate zytotoxische Wirkung zeigte.

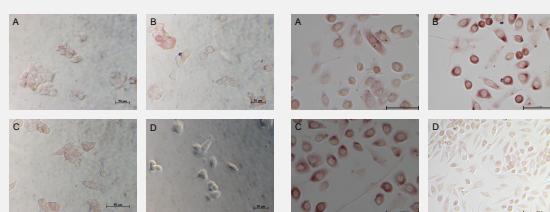


Abb. 2: Immunhistochemie von MCF-7 (links) und MCF-12a (rechts). Repräsentativ sind positive Ergebnisse für das Vorhandensein von ER-α (A), ER-β (B) und Progesteron-Rezeptor (C) dargestellt. Die Negativkontrollen (D) zeigen keine Farbreaktion.

Schlussfolgerung

Sowohl die Extrakte als auch die Referenzen zeigten bei den in-vitro Untersuchungen eine teilweise beachtliche Wirkung auf die hormonrezeptorpositive maligne (MCF-7) und benigne (MCF-12A) Mammazelllinie. In weiteren Untersuchungen kann geprüft werden, inwiefern diese Wirkung hormonrezeptorvermittelt abläuft, welchen Einfluss die Extrakte und Referenzen auf gesunde Brustzellen ausüben und welche Ergebnisse unter physiologischen Bedingungen in-vivo auftreten.

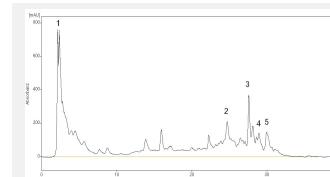


Abb. 3: HPLC-Chromatogramm des Curcuma-Gewürzpulvers. Die Zahlen kennzeichnen die Peaks der nachgewiesenen Referenzen.

Referenzsubstanzen	Retentionszeit [min]
Folsäure (1)	1,9
Kaffeesäure (2)	24,6
Isoquercitrin (2)	24,7
Quercetin (3)	27,7
Curcumin (4)	28,9
Bisdemethoxycurcumin (5)	29,2

Tab. 1: Nachgewiesene Referenzsubstanzen und Retentionszeiten des Curcuma-Gewürzpulvers

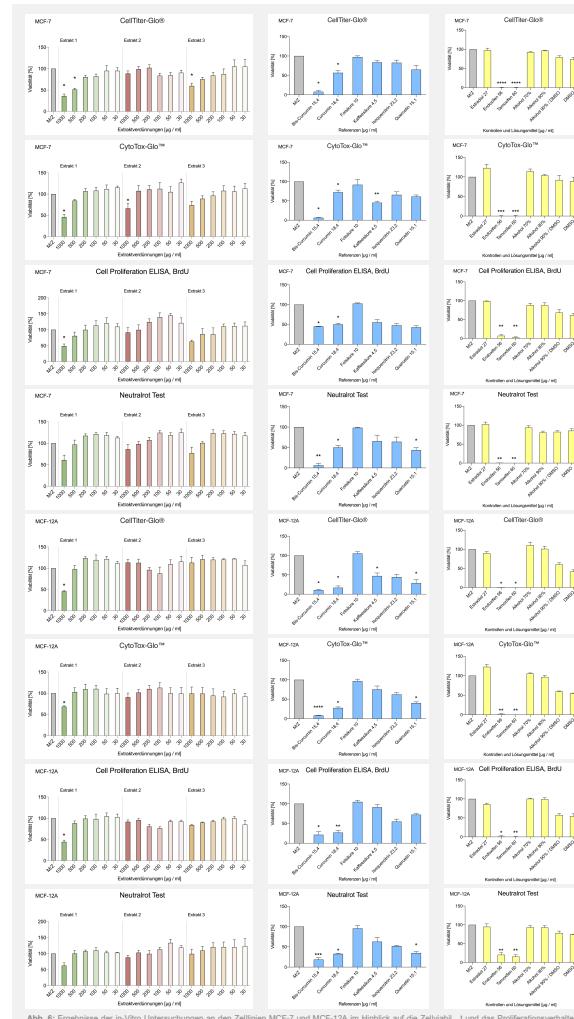


Abb. 4: Ergebnisse der in-vitro Untersuchungen an den Zelllinien MCF-7 und MCF-12A im Hinblick auf die Zellviabilität (CellTiter-Glo) und das Proliferationsverhalten.

Literatur

- [1] Jemal, Ahmedin, Freddie Bray, Melissa M. Center, Jacques Ferlay, Elizabeth Ward, and David Forman, „Global Cancer Statistics: CA A Cancer Journal for Clinicians 61, Nr. 2 (1. M 2011): 6–29.
- [2] Bright-Gebrey M, Makam KH, Rohan JP, et al. Use of multivitamins, folic acid and herbal supplements among breast cancer survivors: the black women's health study. *BMC Complement Altern Med.* 2011;11:30. Published 2011 Apr 15. doi:10.1186/1472-6882-11-30
- [3] Bishayee A, et al. Curcumin and its analogs as chemopreventive agents against breast cancer. *Anticancer Agents Med Chem.* 2007;3(14):243-205. doi:10.1016/j.anticancermol.2007.04.001
- [4] Li YB, Gao J, Zhong ZF, Hoi PM, Lee SM, Wang YT. Bisdemethoxycurcumin suppresses MCF-7 cells proliferation by inducing ROS accumulation and modulating senescence-related pathways. *Pharmacol Rep.* 2013;65(3):700-709. doi:10.1016/j.pharma.2013.01.048-x

10. Literaturverzeichnis

- [1] A. C. Regierer KP. Mammakarzinom: Morphologische Grundlagen, Klassifikation, Stadieneinteilung. 2005. Available: <https://www.onkodin.de/e2/e32345/e32485/>. Accessed 12 Nov 2020.
- [2] Abroodi Z, Sajedi N, Nikbakht M, Soleimani M. Estrogen Receptor Beta (ER β) May Act as Mediator in Apoptotic Induction of Grape Seed Extract (GSE). *Asian Pac J Cancer Prev APJCP* 2019;20:3729–3734.
- [3] Adeyeni TA, Khatwani N, San K, Ezekiel UR. BMI1 is downregulated by the natural compound curcumin, but not by bisdemethoxycurcumin and dimethoxycurcumin. *Physiol Rep* 2016;4:e12906.
- [4] Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res* 2003;23:363–398.
- [5] Ahn D, Lee EB, Ahn M-S, Kim BJ, Lee SY, Lee TG, Lim HW, Lee HY, Bae JJ, Kim DK. Flavonoids from the Underground Parts of Curcuma longa. *Korean J Pharmacogn* 2013;44:253–256.
- [6] Ahsan H, Parveen N, Khan NU, Hadi SM. Pro-oxidant, anti-oxidant and cleavage activities on DNA of curcumin and its derivatives demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Chem Biol Interact* 1999;121:161–175.
- [7] Alaerts G, Matthijs N, Smeyers-Verbeke J, Vander Heyden Y. Chromatographic fingerprint development for herbal extracts: a screening and optimization methodology on monolithic columns. *J Chromatogr A* 2007;1172:1–8.
- [8] Al-Bader M, Ford C, Al-Ayadhy B, Francis I. Analysis of estrogen receptor isoforms and variants in breast cancer cell lines. *Exp Ther Med* 2011;2:537–544.
- [9] Allred DC, Mohsin SK, Fuqua SA. Histological and biological evolution of human premalignant breast disease. *Endocr Relat Cancer* 2001;8:47–61.
- [10] Alternative und komplementäre Krebstherapie – ja oder nein? Tipps vom Krebsinformationsdienst, Deutsches Krebsforschungszentrum. n.d. Available: <https://www.krebsinformationsdienst.de/aktuelles/2018/news056-alternative-und-komplementaere-krebsmedizin.php>. Accessed 26 Mar 2021.
- [11] Alves DR, Maia de Morais S, Tomiotto-Pellissier F, Miranda-Sapla MM, Vasconcelos FR, Silva ING da, Araujo de Sousa H, Assolini JP, Conchon-Costa I, Pavanelli WR, Freire F das CO. Flavonoid Composition and Biological Activities of Ethanol Extracts of Caryocar coriaceum Wittm., a Native Plant from Caatinga Biome. *Evid Based Complement Alternat Med* 2017;2017:e6834218.
- [12] Ang LF, Yam MF, Fung YTT, Kiang PK, Darwin Y. HPLC method for simultaneous quantitative detection of quercetin and curcuminoids in traditional Chinese medicines. *J Pharmacopuncture* 2014;17:36–49.
- [13] Apisariyakul A, Vanittanakom N, Buddhasukh D. Antifungal activity of turmeric oil extracted from Curcuma longa (Zingiberaceae). *J Ethnopharmacol* 1995;49:163–169.
- [14] Araújo CC, Leon LL. Biological activities of Curcuma longa L. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001;96:723–728.
- [15] Ärzteblatt DÄG Redaktion Deutsches. Brustkrebs und prophylaktische Mastektomie bei Frauen mit Mutationen von BRCA1 oder BRCA2. *Dtsch Ärztebl* 2002. Available: <https://www.aerzteblatt.de/archiv/31725/Brustkrebs-und-prophylaktische-Mastektomie-bei-Frauen-mit-Mutationen-von-BRCA1-oder-BRCA2>. Accessed 24 Mar 2021.

- [16] Ärzteblatt DÄG Redaktion Deutsches. Mammographie-Screening: Nutzen-Schaden-Abwägung im internationalen Vergleich. *Dtsch Ärztebl* 2016. Available: <https://www.aerzteblatt.de/archiv/173582/Mammographie-Screening-Nutzen-Schaden-Abwaegung-im-internationalen-Vergleich>. Accessed 27 Jan 2021.
- [17] Asai A, Miyazawa T. Occurrence of orally administered curcuminoid as glucuronide and glucuronide/sulfate conjugates in rat plasma. *Life Sci* 2000;67:2785–2793.
- [18] Association of Low-Fat Dietary Pattern With Breast Cancer Overall Survival: A Secondary Analysis of the Women's Health Initiative Randomized Clinical Trial | Breast Cancer | JAMA Oncology | JAMA Network. n.d. Available: <https://jamanetwork.com/journals/jamaoncology/article-abstract/2682190>. Accessed 24 Mar 2021.
- [19] Bacanli M, Anlar HG, Başaran AA, Başaran N. Assessment of Cytotoxicity Profiles of Different Phytochemicals: Comparison of Neutral Red and MTT Assays in Different Cells in Different Time Periods. *Turk J Pharm Sci* 2017;14:95–107.
- [20] Baselga J, Cortés J, Kim S-B, Im S-A, Hegg R, Im Y-H, Roman L, Pedrini JL, Pienkowski T, Knott A, Clark E, Benyunes MC, Ross G, Swain SM. Pertuzumab plus Trastuzumab plus Docetaxel for Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med* 2012;366:109–119.
- [21] Berek JS, Hacker NF eds. *Berek & Hacker's gynecologic oncology*. Sixth edition. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2015.
- [22] Bhat A, Mahalakshmi AM, Ray B, Tuladhar S, Hediya TA, Manthiannem E, Padamati J, Chandra R, Chidambaram SB, Sakharkar MK. Benefits of curcumin in brain disorders. *BioFactors Oxf Engl* 2019;45:666–689.
- [23] Bhaumik S, Anjum R, Rangaraj N, Pardhasaradhi BV, Khar A. Curcumin mediated apoptosis in AK-5 tumor cells involves the production of reactive oxygen intermediates. *FEBS Lett* 1999;456:311–314.
- [24] Björnström L, Sjöberg M. Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling: Convergence of Genomic and Nongenomic Actions on Target Genes. *Mol Endocrinol* 2005;19:833–842.
- [25] Bock PR, Friedel WE, Hanisch J, Karasman M, Schneider B. Wirksamkeit und Sicherheit der komplementären Langzeitbehandlung mit einem standardisierten Extrakt aus Europäischer Mistel (*Viscum album L.*) zusätzlich zur konventionellen adjuvanten onkologischen Therapie bei primärem, nicht metastasiertem Mammakarzinom. *Drug Res* 2004;11.
- [26] Boerjan W, Ralph J, Baucher M. Lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* 2003;54:519–546.
- [27] Boon HS, Olatunde F, Zick SM. Trends in complementary/alternative medicine use by breast cancer survivors: Comparing survey data from 1998 and 2005. *BMC Womens Health* 2007;7:4.
- [28] Bos R, Windono T, Woerdenbag HJ, Boersma YL, Koulman A, Kayser O. HPLC-photodiode array detection analysis of curcuminoids in Curcuma species indigenous to Indonesia. *Phytochem Anal* 2007;18:118–122.
- [29] Braakhuis AJ, Campion P, Bishop KS. Reducing Breast Cancer Recurrence: The Role of Dietary Polyphenolics. *Nutrients* 2016;8:E547.
- [30] Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 1998;56:317–333.
- [31] BrdU Cell Proliferation Assay - Creative Bioarray | Creative Bioarray. n.d. Available: <https://www.creative-bioarray.com/brdu-cell-proliferation-assay.htm>. Accessed 26 Apr 2020.

- [32] Brewer HR, Jones ME, Schoemaker MJ, Ashworth A, Swerdlow AJ. Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. *Breast Cancer Res Treat* 2017;165:193–200.
- [33] Brinkhaus B, Kirschbaum B, Stöckigt B, Binting S, Roll S, Carstensen M, Witt CM. Prophylactic acupuncture treatment during chemotherapy with breast cancer: a randomized pragmatic trial with a retrospective nested qualitative study. *Breast Cancer Res Treat* 2019;178:617–628.
- [34] Brustkrebs - Früherkennung | DKG. n.d. Available: <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/brustkrebs/frueherkennung.html>. Accessed 27 Jan 2021.
- [35] Brustkrebs: Behandlungsverfahren. n.d. Available: <https://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/brustkrebs/behandlung-uebersicht.php>. Accessed 24 Feb 2021.
- [36] Brustkrebs Deutschland e.V. Prävention und Früherkennung. n.d. Available: <https://brustkrebsdeutschland.de/informationen-angebote/praevention-und-frueherkennung-2/>. Accessed 24 Mar 2021.
- [37] Brust-Krebs: Therapieverfahren im Überblick | DKG. n.d. Available: <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/brustkrebs/therapie/brust-krebs-therapieverfahren-im-ueberblick.html>. Accessed 22 Feb 2021.
- [38] Bürker K. Eine neue Form der Zählkammer. *Arch Für Gesamte Physiol Menschen Tiere* 1905;107:426–451.
- [39] Bush JA, Cheung K-JJ, Li G. Curcumin Induces Apoptosis in Human Melanoma Cells through a Fas Receptor/Caspase-8 Pathway Independent of p53. *Exp Cell Res* 2001;271:305–314.
- [40] Cam-Cancer. Cam-Cancer n.d. Available: <https://cam-cancer.org/en/cam-cancer>. Accessed 8 Feb 2022.
- [41] Cao A, Huang L, Shao Z. The Preventive Intervention of Hereditary Breast Cancer. *Adv Exp Med Biol* 2017;1026:41–57.
- [42] Catsburg C, Miller AB, Rohan TE. Active cigarette smoking and risk of breast cancer. *Int J Cancer* 2015;136:2204–2209.
- [43] Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) | Sigma-Aldrich. n.d. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/11647229001?lang=de®ion=DE>. Accessed 19 Apr 2020.
- [44] CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay Protocol. n.d. Available: <https://www.promega.de/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-glo-luminescent-cell-viability-assay-protocol/>. Accessed 19 Apr 2020.
- [45] Chang Z, Xing J, Yu X. Curcumin induces osteosarcoma MG63 cells apoptosis via ROS/Cyto-C/Caspase-3 pathway. *Tumour Biol* 2014;35:753–758.
- [46] Chen YR, Tan TH. Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway by curcumin. *Oncogene* 1998;17:173–178.
- [47] Cheng AL, Hsu CH, Lin JK, Hsu MM, Ho YF, Shen TS, Ko JY, Lin JT, Lin BR, Ming-Shiang W, Yu HS, Jee SH, Chen GS, Chen TM, Chen CA, Lai MK, Pu YS, Pan MH, Wang YJ, Tsai CC, Hsieh CY. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Res* 2001;21:2895–2900.

- [48] Chien S-Y, Wu Y-C, Chung J-G, Yang J-S, Lu H-F, Tsou M-F, Wood WG, Kuo S-J, Chen D-R. Quercetin-induced apoptosis acts through mitochondrial- and caspase-3-dependent pathways in human breast cancer MDA-MB-231 cells. *Hum Exp Toxicol* 2009;28:493–503.
- [49] Chin K-Y. The spice for joint inflammation: anti-inflammatory role of curcumin in treating osteoarthritis. *Drug Des Devel Ther* 2016;10:3029–3042.
- [50] Chiu HY, Hsieh YJ, Tsai PS. Systematic review and meta-analysis of acupuncture to reduce cancer-related pain. *Eur J Cancer Care (Engl)* 2017;26.
- [51] Cho J-W, Lee K-S, Kim C-W. Curcumin attenuates the expression of IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha as well as cyclin E in TNF-alpha-treated HaCaT cells; NF-kappaB and MAPKs as potential upstream targets. *Int J Mol Med* 2007;19:469–474.
- [52] Choudhuri T, Pal S, Agwarwal ML, Das T, Sa G. Curcumin induces apoptosis in human breast cancer cells through p53-dependent Bax induction. *FEBS Lett* 2002;512:334–340.
- [53] Choudhuri T, Pal S, Das T, Sa G. Curcumin Selectively Induces Apoptosis in Deregulated Cyclin D1-expressed Cells at G2 Phase of Cell Cycle in a p53-dependent Manner *. *J Biol Chem* 2005;280:20059–20068.
- [54] da Costa IM, Freire MA de M, de Paiva Cavalcanti JRL, de Araújo DP, Norrara B, Moreira Rosa IMM, de Azevedo EP, do Rego ACM, Filho IA, Guzen FP. Supplementation with Curcuma longa Reverses Neurotoxic and Behavioral Damage in Models of Alzheimer's Disease: A Systematic Review. *Curr Neuropharmacol* 2019;17:406–421.
- [55] CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay. n.d. Available: https://www.promega.de/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/cytotox_glo-cytotoxicity-assay/. Accessed 19 Apr 2020.
- [56] Dall GV, Britt KL. Estrogen Effects on the Mammary Gland in Early and Late Life and Breast Cancer Risk. *Front Oncol* 2017;7:110.
- [57] Dannenberg AJ, Altorki NK, Boyle JO, Dang C, Howe LR, Weksler BB, Subbaramaiah K. Cyclooxygenase 2: a pharmacological target for the prevention of cancer. *Lancet Oncol* 2001;2:544–551.
- [58] Das Mammographie Screening-Programm. n.d. Available: <https://www.mammo-programm.de/>. Accessed 27 Jan 2021.
- [59] Dempe J. Curcumin: Zelluläre Verteilung, Metabolismus und toxische Effekte. 2009. doi:10.5445/IR/1000012070.
- [60] DENG X-H, SONG H-Y, ZHOU Y-F, YUAN G-Y, ZHENG F-J. Effects of quercetin on the proliferation of breast cancer cells and expression of survivin in vitro. *Exp Ther Med* 2013;6:1155–1158.
- [61] Dhandapani KM, Mahesh VB, Brann DW. Curcumin suppresses growth and chemoresistance of human glioblastoma cells via AP-1 and NFkappaB transcription factors. *J Neurochem* 2007;102:522–538.
- [62] Di Tu Q, Jin J, Hu X, Ren Y, Zhao L, He Q. Curcumin Improves the Renal Autophagy in Rat Experimental Membranous Nephropathy via Regulating the PI3K/AKT/mTOR and Nrf2/HO-1 Signaling Pathways. *BioMed Res Int* 2020;2020:7069052.
- [63] Döring W. Flavonoide: Chemischer Aufbau, Eigenschaften. n.d.:7.
- [64] Eghbali M, Yekaninejad MS, Varaei S, Jalalinia SF, Samimi MA, Sa'atchi K. The effect of auricular acupressure on nausea and vomiting caused by chemotherapy among breast cancer patients. *Complement Ther Clin Pract* 2016;24:189–194.

- [65] Eleazu C, Eleazu K, Chukwuma S, Adanma I, Igwe A. Polyphenolic Composition and Antioxidant Activities of 6 New Turmeric (*Curcuma Longa L.*) Accessions. *Recent Pat Food Nutr Agric* 2015;7:22–27.
- [66] Endometriumveränderungen nach Tamoxifen-Therapie. [springermedizin.de](https://www.springermedizin.de/endometriumveraenderungen-nach-tamoxifen-therapie/8299104) n.d. Available: <https://www.springermedizin.de/endometriumveraenderungen-nach-tamoxifen-therapie/8299104>. Accessed 22 Mar 2021.
- [67] Engida AM, Kasim NS, Tsigie YA, Ismadji S, Lien HH, Yi-Hsu J. Extraction, identification and quantitative HPLC analysis of flavonoids from sarang semut (*Myrmecodia pendan*). *Ind Crops Prod* 2013;41:392–396.
- [68] Eyigor S, Uslu R, Apaydın S, Caramat I, Yesil H. Can yoga have any effect on shoulder and arm pain and quality of life in patients with breast cancer? A randomized, controlled, single-blind trial. *Complement Ther Clin Pract* 2018;32:40–45.
- [69] Farzaei MH, Zobeiri M, Parvizi F, El-Senduny FF, Marmouzi I, Coy-Barrera E, Naseri R, Nabavi SM, Rahimi R, Abdollahi M. Curcumin in Liver Diseases: A Systematic Review of the Cellular Mechanisms of Oxidative Stress and Clinical Perspective. *Nutrients* 2018;10:E855.
- [70] Feng W, Wang H, Zhang P, Gao C, Tao J, Ge Z, Zhu D, Bi Y. Modulation of gut microbiota contributes to curcumin-mediated attenuation of hepatic steatosis in rats. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 2017;1861:1801–1812.
- [71] Fink BN, Steck SE, Wolff MS, Britton JA, Kabat GC, Schroeder JC, Teitelbaum SL, Neugut AI, Gammon MD. Dietary flavonoid intake and breast cancer risk among women on Long Island. *Am J Epidemiol* 2007;165:514–523.
- [72] Freissmuth M, Offermanns S, Böhm S. *Pharmakologie und Toxikologie: Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie*. 2nd ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2016 doi:10.1007/978-3-662-46689-6.
- [73] Friedenreich CM, Cust AE. Physical activity and breast cancer risk: impact of timing, type and dose of activity and population subgroup effects. *Br J Sports Med* 2008;42:636–647.
- [74] Friedenreich CM, Neilson HK, Lynch BM. State of the epidemiological evidence on physical activity and cancer prevention. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990 2010;46:2593–2604.
- [75] Ganguli M, Chandra V, Kamboh MI, Johnston JM, Dodge HH, Thelma BK, Juyal RC, Pandav R, Belle SH, DeKosky ST. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer disease: The Indo-US Cross-National Dementia Study. *Arch Neurol* 2000;57:824–830.
- [76] Garcea G, Jones DJL, Singh R, Dennison AR, Farmer PB, Sharma RA, Steward WP, Gescher AJ, Berry DP. Detection of curcumin and its metabolites in hepatic tissue and portal blood of patients following oral administration. *Br J Cancer* 2004;90:1011–1015.
- [77] Gaudet MM, Carter BD, Brinton LA, Falk RT, Gram IT, Luo J, Milne RL, Nyante SJ, Weiderpass E, Beane Freeman LE, Sandler DP, Robien K, Anderson KE, Giles GG, Chen WY, Feskanich D, Braaten T, Isaacs C, Butler LM, Koh W-P, Wolk A, Adami H-O, White E, Margolis KL, Thun MJ, Gapstur SM. Pooled analysis of active cigarette smoking and invasive breast cancer risk in 14 cohort studies. *Int J Epidemiol* 2017;46:881–893.
- [78] Ge J, Tan B-X, Chen Y, Yang L, Peng X-C, Li H-Z, Lin H-J, Zhao Y, Wei M, Cheng K, Li L-H, Dong H, Gao F, He J-P, Wu Y, Qiu M, Zhao Y-L, Su J-M, Hou J-M, Liu J-Y. Interaction of green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate with sunitinib: potential risk of diminished sunitinib bioavailability. *J Mol Med* 2011;89:595–602.
- [79] GEKID – Homepage – Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland. GEKID - Homepage n.d. Available: <https://www.gekid.de/>. Accessed 8 Nov 2020.

- [80] Gey M. Instrumentelle Analytik und Bioanalytik: Biosubstanzen, Trennmethoden, Strukturanalytik, Applikationen. 3rd ed. Springer Spektrum, 2015 doi:10.1007/978-3-662-46255-3.
- [81] Goss PE, Ingle JN, Pritchard KI, Robert NJ, Muss H, Gralow J, Gelmon K, Whelan T, Strasser-Weippl K, Rubin S, Sturtz K, Wolff AC, Winer E, Hudis C, Stopeck A, Beck JT, Kaur JS, Whelan K, Tu D, Parulekar WR. Extending Aromatase-Inhibitor Adjuvant Therapy to 10 Years. *N Engl J Med* 2016;375:209–219.
- [82] Greenlee H, DuPont-Reyes MJ, Balneaves LG, Carlson LE, Cohen MR, Deng G, Johnson JA, Mumber M, Seely D, Zick SM, Boyce LM, Tripathy D. Clinical practice guidelines on the evidence-based use of integrative therapies during and after breast cancer treatment. *CA Cancer J Clin* 2017;67:194–232.
- [83] Guo LY, Cai XF, Lee JJ, Kang SS, Shin EM, Zhou HY, Jung JW, Kim YS. Comparison of suppressive effects of demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin on expressions of inflammatory mediators in vitro and in vivo. *Arch Pharm Res* 2008;31:490–496.
- [84] Gupta A, Mahajan S, Sharma R. Evaluation of antimicrobial activity of Curcuma longa rhizome extract against Staphylococcus aureus. *Biotechnol Rep Amst Neth* 2015;6:51–55.
- [85] Hamajima N, Hirose K, Tajima K, Rohan T, Calle EE, Heath CW, Coates RJ, Liff JM, Talamini R, Chantarakul N, Koetsawang S, Rachawat D, Morabia A, Schuman L, Stewart W, Szklaruk M, Bain C, Schofield F, Siskind V, Band P, Coldman AJ, Gallagher RP, Hislop TG, Yang P, Kolonel LM, Nomura AMY, Hu J, Johnson KC, Mao Y, De Sanjosé S, Lee N, Marchbanks P, Ory HW, Peterson HB, Wilson HG, Wingo PA, Ebeling K, Kunde D, Nishan P, Hopper JL, Colditz G, Gajalanski V, Martin N, Pardthaisong T, Silpisornkosol S, Theetranont C, Boosiri B, Chutivongse S, Jimakorn P, Virutamasen P, Wongsrichanalai C, Ewertz M, Adami HO, Bergkvist L, Magnusson C, Persson I, Chang-Claude J, Paul C, Skegg DCG, Spears GFS, Boyle P, Evstifeeva T, Daling JR, Hutchinson WB, Malone K, Noonan EA, Stanford JL, Thomas DB, Weiss NS, White E, Andrieu N, Brémont A, Clavel F, Gairard B, Lansac J, Piana L, Renaud R, Izquierdo A, Viladiu P, Cuevas HR, Ontiveros P, Palet A, Salazar SB, Aristizabel N, Cuadros A, Tryggvadottir L, Tulinius H, Bachelot A, Lê MG, Peto J, Franceschi S, Lubin F, Modan B, Ron E, Wax Y, Friedman GD, Hiatt RA, Levi F, Bishop T, Kosmelić K, Primic-Zakelj M, Ravnhar B, Stare J, Beeson WL, Fraser G, Bullbrook RD, Cuzick J, Duffy SW, Fentiman IS, Hayward JL, Wang DY, McMichael AJ, McPherson K, Hanson RL, Leske MC, Mahoney MC, Nasca PC, Varma AO, Weinstein AL, Moller TR, Olsson H, Ranstam J, Goldbohm RA, van den Brandt PA, Apelo RA, Baens J, de la Cruz JR, Javier B, Lacaya LB, Ngelangel CA, La Vecchia C, Negri E, Marubini E, Ferraroni M, Gerber M, Richardson S, Segala C, Gatei D, Kenya P, Kungu A, Mati JG, Brinton LA, Hoover R, Schairer C, Spirtas R, Lee HP, Rookus MA, van Leeuwen FE, Schoenberg JA, McCredie M, Gammon MD, Clarke EA, Jones L, Neil A, Vessey M, Yeates D, Appleby P, Banks E, Beral V, Bull D, Crossley B, Goodill A, Green J, Hermon C, Key T, Langston N, Lewis C, Reeves G, Collins R, Doll R, Peto R, Mabuchi K, Preston D, Hannaford P, Kay C, Rosero-Bixby L, Gao YT, Jin F, Yuan J-M, Wei HY, Yun T, Zhiheng C, Berry G, Cooper Booth J, Jelihovsky T, MacLennan R, Shearman R, Wang Q-S, Baines C-J, Miller AB, Wall C, Lund E, Stalsberg H, Shu XO, Zheng W, Katsouyanni K, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Dabancens A, Martinez L, Molina R, Salas O, Alexander FE, Anderson K, Folsom AR, Hulka BS, Bernstein L, Enger S, Haile RW, Paganini-Hill A, Pike MC, Ross RK, Ursin G, Yu MC, Longnecker MP, Newcomb P, Bergkvist L, Kalache A, Farley TMM, Holck S, Meirik O, Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Alcohol, tobacco and breast cancer—collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *Br J Cancer* 2002;87:1234–1245.
- [86] Han SS, Chung ST, Robertson DA, Ranjan D, Bondada S. Curcumin causes the growth arrest and apoptosis of B cell lymphoma by downregulation of egr-1, c-myc, bcl-XL, NF-kappa B, and p53. *Clin Immunol Orlando Fla* 1999;93:152–161.
- [87] Harborne JB. Methods of Plant Analysis. In: Harborne JB, editor. *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. Dordrecht: Springer Netherlands, 1984. pp. 1–36. doi:10.1007/978-94-009-5570-7_1.

- [88] Harborne JB, Mabry TJ. *The Flavonoids: Advances in Research*. Springer US, 1982 doi:10.1007/978-1-4899-2915-0.
- [89] Harvie M, Howell A, Evans DG. Can diet and lifestyle prevent breast cancer: what is the evidence? *Am Soc Clin Oncol Educ Book Am Soc Clin Oncol Annu Meet* 2015:e66-73.
- [90] Hazafa A, Iqbal MO, Javaid U, Tareen MBK, Amna D, Ramzan A, Piracha S, Naeem M. Inhibitory effect of polyphenols (phenolic acids, lignans, and stilbenes) on cancer by regulating signal transduction pathways: a review. *Clin Transl Oncol* 2021;1:14.
- [91] Hemmati AA, Dianat M, Jalali A. Evaluation of the Effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) on Pharmacological Responses of Isolated Rat Trachea in vitro. *Tanaffos* 2020;19:256–261.
- [92] Hertog MGL, Hollman PCH, Venema DP. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *J Agric Food Chem* 1992;40:1591–1598.
- [93] Hidaka H, Ishiko T, Furuhashi T, Kamohara H, Suzuki S, Miyazaki M, Ikeda O, Mita S, Setoguchi T, Ogawa M. Curcumin inhibits interleukin 8 production and enhances interleukin 8 receptor expression on the cell surface: impact on human pancreatic carcinoma cell growth by autocrine regulation. *Cancer* 2002;95:1206–1214.
- [94] High-Dose Parenteral Ascorbate Enhanced Chemosensitivity of Ovarian Cancer and Reduced Toxicity of Chemotherapy | *Science Translational Medicine*. n.d. Available: <https://stm.sciencemag.org/content/6/222/222ra18>. Accessed 25 Mar 2021.
- [95] Höhle S. Curcuminoids: Metabolismus, Stabilität und reaktive Glucuronide. 2006. doi:10.5445/IR/1000004818.
- [96] Hour T-C, Chen J, Huang C-Y, Guan J-Y, Lu S-H, Pu Y-S. Curcumin enhances cytotoxicity of chemotherapeutic agents in prostate cancer cells by inducing p21WAF1/CIP1 and C/EBP β expressions and suppressing NF- κ B activation. *The Prostate* 2002;51:211–218.
- [97] Hu RW, Carey EJ, Lindor KD, Tabibian JH. Curcumin in Hepatobiliary Disease: Pharmacotherapeutic Properties and Emerging Potential Clinical Applications. *Ann Hepatol* 2017;16:835–841.
- [98] Huang C, Lu H-F, Chen Y-H, Chen J-C, Chou W-H, Huang H-C. Curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin induced caspase-dependent and – independent apoptosis via Smad or Akt signaling pathways in HOS cells. *BMC Complement Med Ther* 2020;20:68.
- [99] Huang MT, Lysz T, Ferraro T, Abidi TF, Laskin JD, Conney AH. Inhibitory effects of curcumin on in vitro lipoxygenase and cyclooxygenase activities in mouse epidermis. *Cancer Res* 1991;51:813–819.
- [100] In Vitro Toxicology Assay Kit, Neutral Red based | *Sigma-Aldrich*. n.d. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/tox4?lang=de®ion=DE>. Accessed 26 Apr 2020.
- [101] Indap MA, Radhika S, Motiwale1 L, Rao KVK. Anticancer activity of phenolic antioxidants against breast cancer cells and a spontaneous mammary tumor. *Indian J Pharm Sci* 2006;68. doi:10.4103/0250-474X.27820.
- [102] Ireson C, Orr S, Jones DJ, Verschoyle R, Lim CK, Luo JL, Howells L, Plummer S, Jukes R, Williams M, Steward WP, Gescher A. Characterization of metabolites of the chemopreventive agent curcumin in human and rat hepatocytes and in the rat in vivo, and evaluation of their ability to inhibit phorbol ester-induced prostaglandin E2 production. *Cancer Res* 2001;61:1058–1064.

- [103] ISCADOR AG | Deutschland | Besondere botanische Merkmale der Mistel. n.d. Available: <https://www.iscador.com/de-de/mistel/gestalt-und-entwicklung.html>. Accessed 25 Mar 2021.
- [104] J Kamarauskaitė, R Baniene, D Trumbeckas, A Strazdauskas, S Trumbeckaitė. Caffeic Acid Phenethyl Ester Protects Kidney Mitochondria against Ischemia/Reperfusion Induced Injury in an In Vivo Rat Model. *Antioxid* Basel Switz 2021;10. doi:10.3390/antiox10050747.
- [105] Jackson CL, Menke AE. On Certain Substances Obtained from Turmeric. I. Curcumin. *Proc Am Acad Arts Sci* 1881;17:110–124.
- [106] Jayaprakasha GK, Jaganmohan Rao L, Sakariah KK. Antioxidant activities of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Food Chem* 2006;98:720–724.
- [107] Jeong J-H, An JY, Kwon YT, Rhee JG, Lee YJ. Effects of low dose quercetin: cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression. *J Cell Biochem* 2009;106:73–82.
- [108] K Burge, A Gunasekaran, J Eckert, H Chaaban. Curcumin and Intestinal Inflammatory Diseases: Molecular Mechanisms of Protection. *Int J Mol Sci* 2019;20. doi:10.3390/ijms20081912.
- [109] Karlsson T, Johansson T, Höglund J, Ek WE, Johansson Å. Time-Dependent Effects of Oral Contraceptive Use on Breast, Ovarian, and Endometrial Cancers. *Cancer Res* 2021;81:1153–1162.
- [110] Katalinic A, Eisemann N, Kraywinkel K, Noftz MR, Hübner J. Breast cancer incidence and mortality before and after implementation of the German mammography screening program. *Int J Cancer* 2020;147:709–718.
- [111] Kawai Y, Nishikawa T, Shiba Y, Saito S, Murota K, Shibata N, Kobayashi M, Kanayama M, Uchida K, Terao J. Macrophage as a target of quercetin glucuronides in human atherosclerotic arteries: implication in the anti-atherosclerotic mechanism of dietary flavonoids. *J Biol Chem* 2008;283:9424–9434.
- [112] Key TJ, Fraser GE, Thorogood M, Appleby PN, Beral V, Reeves G, Burr ML, Chang-Claude J, Frentzel-Beyme R, Kuzma JW, Mann J, McPherson K. Mortality in vegetarians and nonvegetarians: detailed findings from a collaborative analysis of 5 prospective studies. *Am J Clin Nutr* 1999;70:516S–524S.
- [113] Khan F, Niaz K, Maqbool F, Ismail Hassan F, Abdollahi M, Nagulapalli Venkata KC, Nabavi SM, Bishayee A. Molecular Targets Underlying the Anticancer Effects of Quercetin: An Update. *Nutrients* 2016;8:E529.
- [114] Kizhakkayil J, Thayyullathil F, Chathoth S, Hago A, Patel M, Galadari S. Glutathione regulates caspase-dependent ceramide production and curcumin-induced apoptosis in human leukemic cells. *Free Radic Biol Med* 2012;52:1854–1864.
- [115] Kleczka A, Kubina R, Dzik R, Jasik K, Stojko J, Cholewa K, Kabała-Dzik A. Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) Induced Apoptosis in Serous Ovarian Cancer OV7 Cells by Deregulation of BCL2/BAX Genes. *Mol Basel Switz* 2020;25:E3514.
- [116] Ko MJ, Cheigh CI, Cho SW, Chung MS. Subcritical water extraction of flavonol quercetin from onion skin. *J Food Eng* 2011;102:327–333.
- [117] Kocaadam B, Şanlier N. Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2017;57:2889–2895.
- [118] Kocaadam Bozkurt B, Sanlier N. Curcumin, an Active Component of Turmeric (*Curcuma longa*), and Its Effects on Health. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2015;57.

- [119] Kolesárová A, Michalcová K, Roychoudhury S, Baldovská S, Tvrďá E, Vašíček J, Chrenek P, Sanisló L, Křen V. Antioxidative effect of dietary flavonoid isoquercitrin on human ovarian granulosa cells HGL5 in vitro. *Physiol Res* 2021.
- [120] Kommission Mamma | Leitlinien & Empfehlungen | Leitlinien & Stellungnahmen | AGO - Die Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie. n.d. Available: <https://www.ago-online.de/leitlinien-empfehlungen/leitlinien-empfehlungen/kommission-mamma>. Accessed 25 Feb 2021.
- [121] Komplementäre Medizin bei Krebs | DKG. n.d. Available: <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/therapieformen/komplementaere-medizin-moeglichkeiten-und-grenzen.html>. Accessed 25 Mar 2021.
- [122] Koo JY, Kim HJ, Jung K-O, Park K-Y. Curcumin Inhibits the Growth of AGS Human Gastric Carcinoma Cells In Vitro and Shows Synergism with 5-Fluorouracil. *J Med Food* 2004;7:117–121.
- [123] Kotha RR, Luthria DL. Curcumin: Biological, Pharmaceutical, Nutraceutical, and Analytical Aspects. *Mol Basel Switz* 2019;24:E2930.
- [124] Krebsinformationsdienst, Deutsches Krebsforschungszentrum. n.d. Available: <https://www.krebsinformationsdienst.de/>. Accessed 13 Nov 2020.
- [125] Kulkarni NP, Vaidya B, Narula AS, Sharma SS. Neuroprotective Potential of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) in CNS Disorders: Mechanistic and Therapeutic Insights. *Curr Neuropharmacol* 2021;19:1401–1415.
- [126] Kumari K, Das B, Adhya A, Chaudhary S, Senapati S, Mishra SK. Nicotine associated breast cancer in smokers is mediated through high level of EZH2 expression which can be reversed by methyltransferase inhibitor DZNepA. *Cell Death Dis* 2018;9:152.
- [127] Kuo Y-Y, Jim W-T, Su L-C, Chung C-J, Lin C-Y, Huo C, Tseng J-C, Huang S-H, Lai C-J, Chen B-C, Wang B-J, Chan T-M, Lin H-P, Chang W-SW, Chang C-R, Chuu C-P. Caffeic Acid phenethyl ester is a potential therapeutic agent for oral cancer. *Int J Mol Sci* 2015;16:10748–10766.
- [128] Kwiecien S, Magierowski M, Majka J, Ptak-Belowska A, Wojcik D, Sliwowski Z, Magierowska K, Brzozowski T. Curcumin: A Potent Protectant against Esophageal and Gastric Disorders. *Int J Mol Sci* 2019;20. doi:10.3390/ijms20061477.
- [129] Lai C-S, Ho C-T, Pan M-H. The Cancer Chemopreventive and Therapeutic Potential of Tetrahydrocurcumin. *Biomolecules* 2020;10:E831.
- [130] Lambe M, Hsieh CC, Chan HW, Ekbom A, Trichopoulos D, Adami HO. Parity, age at first and last birth, and risk of breast cancer: a population-based study in Sweden. *Breast Cancer Res Treat* 1996;38:305–311.
- [131] Lee KW, Kim J-H, Lee HJ, Surh Y-J. Curcumin inhibits phorbol ester-induced up-regulation of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 by blocking ERK1/2 phosphorylation and NF-κappaB transcriptional activity in MCF10A human breast epithelial cells. *Antioxid Redox Signal* 2005;7:1612–1620.
- [132] Lesmana R, Susanti null, Pediatama T, Sylviana N, Susanti Pratiwi Y, Goenawan H, Supratman U. Active Compounds from Curcuma longa and Comparison of their Effectively Induced Apoptosis in MCF-7 Cell. *Pak J Biol Sci PJBS* 2021;24:35–41.

- [133] Li Y, Shi X, Zhang J, Zhang X, Martin RCG. Hepatic protection and anticancer activity of curcuma: a potential chemopreventive strategy against hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2014;44:505–513.
- [134] Li Y-B, Gao J-L, Zhong Z-F, Hoi P-M, Lee SM-Y, Wang Y-T. Bisdemethoxycurcumin suppresses MCF-7 cells proliferation by inducing ROS accumulation and modulating senescence-related pathways. *Pharmacol Rep PR* 2013;65:700–709.
- [135] Ling W-M, Lui LYY, So WKW, Chan K. Effects of acupuncture and acupressure on cancer-related fatigue: a systematic review. *Oncol Nurs Forum* 2014;41:581–592.
- [136] Liu A, Lou H, Zhao L, Fan P. Validated LC/MS/MS assay for curcumin and tetrahydrocurcumin in rat plasma and application to pharmacokinetic study of phospholipid complex of curcumin. *J Pharm Biomed Anal* 2006;40:720–727.
- [137] Liu Z-J, Liu H-Q, Xiao C, Fan H-Z, Huang Q, Liu Y-H, Wang Y. Curcumin protects neurons against oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced injury through activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ function. *J Neurosci Res* 2014;92:1549–1559.
- [138] Ludwig J. *Viscum album als adjuvante onkologische Therapieoption bei der Behandlung von humanen Mamma- und Pankreaskarzinomen*. n.d.:226.
- [139] M Maggiolini, D Bonofoglio, S Marsico, MI Panno, B Cenni, D Picard, S Andò. Estrogen receptor alpha mediates the proliferative but not the cytotoxic dose-dependent effects of two major phytoestrogens on human breast cancer cells. *Mol Pharmacol* 2001;60. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11502892/>. Accessed 26 Oct 2021.
- [140] Ma Z, Shayeganpour A, Brocks DR, Lavasanifar A, Samuel J. High-performance liquid chromatography analysis of curcumin in rat plasma: application to pharmacokinetics of polymeric micellar formulation of curcumin. *Biomed Chromatogr* 2007;21:546–552.
- [141] Makarem N, Chandran U, Bandera EV, Parekh N. Dietary fat in breast cancer survival. *Annu Rev Nutr* 2013;33:319–348.
- [142] Mallory MJ, Croghan KA, Sandhu NP, Lemaine V, Degnim AC, Bauer BA, Cha SS, Croghan IT. Acupuncture in the postoperative setting for breast cancer patients: a feasibility study. *Am J Chin Med* 2015;43:45–56.
- [143] Mammakarzinom - Interdisziplinär | Rolf Kreienberg | Springer. n.d. Available: <https://www.springer.com/de/book/9783642126802>. Accessed 24 Feb 2021.
- [144] Mammakarzinom der Frau. Onkopedia n.d. Available: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/mammakarzinom-der-frau>. Accessed 13 Nov 2020.
- [145] Management des Mammakarzinoms | Rolf Kreienberg | Springer. n.d. Available: <https://www.springer.com/de/book/9783540317487>. Accessed 24 Feb 2021.
- [146] Marinac CR, Natarajan L, Sears DD, Gallo LC, Hartman SJ, Arredondo E, Patterson RE. Prolonged Nightly Fasting and Breast Cancer Risk: Findings from NHANES (2009–2010). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2015;24:783–789.
- [147] Matsunaga T, Endo S, Soda M, Zhao H-T, El-Kabbani O, Tajima K, Hara A. Potent and selective inhibition of the tumor marker AKR1B10 by bisdemethoxycurcumin: probing the active site of the enzyme with molecular modeling and site-directed mutagenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;389:128–132.
- [148] Mawalizadeh F, Mohammadzadeh G, Khedri A, Rashidi M. Quercetin potentiates the chemosensitivity of MCF-7 breast cancer cells to 5-fluorouracil. *Mol Biol Rep* 2021.

- [149] MCF7 ATCC® HTB-22™. n.d. Available: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-22.aspx#documentation>. Accessed 19 Apr 2020.
- [150] MCF-12A ATCC ® CRL-10782™ Homo sapiens mammary gland; breas. n.d. Available: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-10782.aspx#characteristics>. Accessed 19 Apr 2020.
- [151] Meijers-Heijboer H, van Geel B, van Putten WL, Henzen-Logmans SC, Seynaeve C, Menken-Pluymers MB, Bartels CC, Verhoog LC, van den Ouweland AM, Niermeijer MF, Brekelmans CT, Klijn JG. Breast cancer after prophylactic bilateral mastectomy in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. *N Engl J Med* 2001;345:159–164.
- [152] Menon VP, Sudheer AR. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Adv Exp Med Biol* 2007;595:105–125.
- [153] Mirzaei S, Gholami MH, Zabolian A, Saleki H, Farahani MV, Hamzehlou S, Far FB, Sharifzadeh SO, Samarghandian S, Khan H, Aref AR, Ashrafizadeh M, Zarrabi A, Sethi G. Caffeic acid and its derivatives as potential modulators of oncogenic molecular pathways: New hope in the fight against cancer. *Pharmacol Res* 2021;171:105759.
- [154] Moghadamtousi SZ, Kadir HA, Hassandarvish P, Tajik H, Abubakar S, Zandi K. A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. *BioMed Res Int* 2014;2014:186864.
- [155] Mohajeri M, Bianconi V, Ávila-Rodriguez MF, Barreto GE, Jamialahmadi T, Pirro M, Sahebkar A. Curcumin: a phytochemical modulator of estrogens and androgens in tumors of the reproductive system. *Pharmacol Res* 2020;156:104765.
- [156] Mohajeri M, Sahebkar A. Protective effects of curcumin against doxorubicin-induced toxicity and resistance: A review. *Crit Rev Oncol Hematol* 2018;122:30–51.
- [157] Mohebbati R, Anaeigoudari A, Khazdair MR. The effects of Curcuma longa and curcumin on reproductive systems. *Endocr Regul* 2017;51:220–228.
- [158] Mørch LS, Skovlund CW, Hannaford PC, Iversen L, Fielding S, Lidegaard Ø. Contemporary Hormonal Contraception and the Risk of Breast Cancer. *N Engl J Med* 2017;377:2228–2239.
- [159] Morimoto T, Sunagawa Y, Kawamura T, Takaya T, Wada H, Nagasawa A, Komeda M, Fujita M, Shimatsu A, Kita T, Hasegawa K. The dietary compound curcumin inhibits p300 histone acetyltransferase activity and prevents heart failure in rats. *J Clin Invest* 2008;118:868–878.
- [160] Mudge EM, Brown PN, Rimmer CA, Phillips MM. Determination of Curcuminoids in Turmeric Dietary Supplements by HPLC-DAD: Multi-laboratory Study Through the NIH-ODS/NIST Quality Assurance Program. *J AOAC Int* 2020;103:1625–1632.
- [161] Müller H. 6 Neubestimmung von Folsäure-Derivaten in Lebensmitteln mit Hilfe der HPLC. n.d.:6.
- [162] Narayanankutty A. Phytochemicals as PI3K/ Akt/ mTOR Inhibitors and Their Role in Breast Cancer Treatment. *Recent Patents Anticancer Drug Discov* 2020;15:188–199.
- [163] Narod SA, Salmena L. BRCA1 and BRCA2 Mutations and Breast Cancer. *Discov Med* 2011;12:445–453.
- [164] Nile A, Nile SH, Shin J, Park G, Oh J-W. Quercetin-3-Glucoside Extracted from Apple Pomace Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis by Increasing Intracellular ROS Levels. *Int J Mol Sci* 2021;22:10749.

- [165] Numonov SR, Qureshi MN, Aisa HA. Development of HPLC Protocol and Simultaneous Quantification of Four Free Flavonoids from *Dracocephalum heterophyllum* Benth. *Int J Anal Chem* 2015;2015:e503139.
- [166] Oboh G, Ademosun AO, Ogunsuyi OB. Quercetin and Its Role in Chronic Diseases. *Adv Exp Med Biol* 2016;929:377–387.
- [167] Online GL. Mammakarzinom (Brustkrebs) - Symptome, Diagnostik, Therapie | Gelbe Liste. n.d. Available: <https://www.gelbe-liste.de/krankheiten/mammakarzinom-brustkrebs>. Accessed 27 Jan 2021.
- [168] Online GL. Tamoxifen - Anwendung, Wirkung, Nebenwirkungen | Gelbe Liste. Gelbe Liste Online n.d. Available: https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffe/Tamoxifen_389. Accessed 5 Oct 2021.
- [169] Pan Y, Ju R, Cao X, Pei H, Zheng T, Wang W. Optimization extraction and purification of biological activity curcumin from *Curcuma longa* L by high-performance counter-current chromatography. *J Sep Sci* 2020;43:1586–1592.
- [170] Patientenleitlinie_Brustkrebs_im_fruehen_Stadium.pdf_v04-2020.pdf. n.d. Available: https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Patientenleitlinien/Patientenleitlinie_Brustkrebs_im_fruehen_Stadium.pdf_v04-2020.pdf. Accessed 24 Feb 2021.
- [171] Pertuzumab zur Behandlung von HER2-positivem Brustkrebs | DKG. n.d. Available: <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/basis-informationen-krebs-allgemeine-informationen/wirkstoff-glossar/pertuzumab.html>. Accessed 25 Feb 2021.
- [172] Petru E, Jonat W, Fink D, Köchli O. *Praxisbuch Gynäkologische Onkologie*. Springer, 2011.
- [173] Pinheiro RGR, Pinheiro M, Neves AR. Nanotechnology Innovations to Enhance the Therapeutic Efficacy of Quercetin. *Nanomater* Basel Switz 2021;11:2658.
- [174] Pivari F, Mingione A, Brasacchio C, Soldati L. Curcumin and Type 2 Diabetes Mellitus: Prevention and Treatment. *Nutrients* 2019;11.
- [175] Plummer SM, Holloway KA, Manson MM, Munks RJ, Kaptein A, Farrow S, Howells L. Inhibition of cyclo-oxygenase 2 expression in colon cells by the chemopreventive agent curcumin involves inhibition of NF- κ B activation via the NIK/IKK signalling complex. *Oncogene* 1999;18:6013–6020.
- [176] Possamai Rossatto FC, Tharmalingam N, Escobar IE, d'Azevedo PA, Zimmer KR, Mylonakis E. Antifungal Activity of the Phenolic Compounds Ellagic Acid (EA) and Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) against Drug-Resistant *Candida auris*. *J Fungi* Basel Switz 2021;7:763.
- [177] Priyadarsini KI, Maity DK, Naik GH, Kumar MS, Unnikrishnan MK, Satav JG, Mohan H. Role of phenolic O-H and methylene hydrogen on the free radical reactions and antioxidant activity of curcumin. *Free Radic Biol Med* 2003;35:475–484.
- [178] Pschyrembel Online | Kanzerogenese. n.d. Available: <https://www.pschyrembel.de/Kanzerogenese/K0BD0>. Accessed 13 Nov 2020.
- [179] Qiu C, Liu K, Zhang S, Gao S, Chen W, Li D, Huang Y. Bisdemethoxycurcumin Inhibits Hepatocellular Carcinoma Proliferation Through Akt Inactivation via CYLD-Mediated Deubiquitination. *Drug Des Devel Ther* 2020;14:993–1001.
- [180] Quitschke WW. Differential solubility of curcuminoids in serum and albumin solutions: implications for analytical and therapeutic applications. *BMC Biotechnol* 2008;8:84.

- [181] Radomska-Leśniewska DM, Osiecka-Iwan A, Hyc A, Góźdż A, Dąbrowska AM, Skopiński P. Therapeutic potential of curcumin in eye diseases. *Cent-Eur J Immunol* 2019;44:181–189.
- [182] Ravindranath V, Chandrasekhara N. Absorption and tissue distribution of curcumin in rats. *Toxicology* 1980;16:259–265.
- [183] Reddy PH, Manczak M, Yin X, Grady MC, Mitchell A, Kandimalla R, Kuruva CS. Protective effects of a natural product, curcumin, against amyloid β induced mitochondrial and synaptic toxicities in Alzheimer's disease. *J Investig Med Off Publ Am Fed Clin Res* 2016;64:1220–1234.
- [184] Reduktion-der-Brustkrebssterblichkeit-durch-Mammographie-Screening-Gesund-leben-heute-Ausgabe-3-10.pdf. n.d. Available: <http://mammographie-screening-suedhessen.de/assets/Uploads/Reduktion-der-Brustkrebssterblichkeit-durch-Mammographie-Screening-Gesund-leben-heute-Ausgabe-3-10.pdf>. Accessed 24 Mar 2021.
- [185] Repetto G, del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc* 2008;3:1125–1131.
- [186] Rezaei-Seresht H, Cheshomi H, Falanji F, Movahedi-Motlagh F, Hashemian M, Mireskandari E. Cytotoxic activity of caffeic acid and gallic acid against MCF-7 human breast cancer cells: An in silico and in vitro study. *Avicenna J Phytomedicine* 2019;9:574–586.
- [187] Rivera Rivera A, Castillo-Pichardo L, Gerena Y, Dharmawardhane S. Anti-Breast Cancer Potential of Quercetin via the Akt/AMPK/Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Signaling Cascade. *PLoS ONE* 2016;11:e0157251.
- [188] Robert Koch Institut Zentrum für Krebsregisterdaten (2017) Krebs in Deutschland 2015/2016 Zentrum für Krebsregisterdaten.pdf. n.d. Available: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2019/kid_2019_c50_brust.pdf?__blob=publicationFile. Accessed 9 Jun 2020.
- [189] S S, La K. Genetics of breast cancer: a topic in evolution. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2015;26. doi:10.1093/annonc/mdv022.
- [190] S3-Leitlinie Mammakarzinom. 2021:467.
- [191] Sa G, Das T. Anti cancer effects of curcumin: cycle of life and death. *Cell Div* 2008;3:14.
- [192] Sahu R, Saxena J. Screening of Total Phenolic and Flavonoid Content in Conventional and Non-Conventional Species of Curcuma. *Int J Pharm Sci Rev Res* 2013;21:24–26.
- [193] Saji S, Hirose M, Toi M. Clinical significance of estrogen receptor beta in breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005;56 Suppl 1:21–26.
- [194] Sarkar A, De R, Mukhopadhyay AK. Curcumin as a potential therapeutic candidate for Helicobacter pylori associated diseases. *World J Gastroenterol* 2016;22:2736–2748.
- [195] Sasaki H, Sunagawa Y, Takahashi K, Imaizumi A, Fukuda H, Hashimoto T, Wada H, Katanasaka Y, Kakeya H, Fujita M, Hasegawa K, Morimoto T. Innovative preparation of curcumin for improved oral bioavailability. *Biol Pharm Bull* 2011;34:660–665.
- [196] Schröder L, Marahrens P, Koch JG, Heidegger H, Vilsmeier T, Phan-Brehm T, Hofmann S, Mahner S, Jeschke U, Richter DU. Effects of green tea, matcha tea and their components epigallocatechin gallate and quercetin on MCF-7 and MDA-MB-231 breast carcinoma cells. *Oncol Rep* 2019;41:387–396.
- [197] Schwingshackl L, Schwedhelm C, Galbete C, Hoffmann G. Adherence to Mediterranean Diet and Risk of Cancer: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients* 2017;9:E1063.

- [198] Shanmugam MK, Rane G, Kanchi MM, Arfuso F, Chinnathambi A, Zayed ME, Alharbi SA, Tan BKH, Kumar AP, Sethi G. The Multifaceted Role of Curcumin in Cancer Prevention and Treatment. *Molecules* 2015;20:2728–2769.
- [199] Shannoun F, Blettner M, Schmidberger H, Zeeb H. Radiation Protection in Diagnostic Radiology. *Dtsch Aerzteblatt Online* 2008. doi:10.3238/atztbl.2008.0041.
- [200] Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: the story so far. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990 2005;41:1955–1968.
- [201] Shishodia S, Amin HM, Lai R, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive NF- κ B activation, induces G1/S arrest, suppresses proliferation, and induces apoptosis in mantle cell lymphoma. *Biochem Pharmacol* 2005;70:700–713.
- [202] Shoba G, Joy D, Joseph T, Majeed M, Rajendran R, Srinivas PS. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Med* 1998;64:353–356.
- [203] Shoji M, Nakagawa K, Watanabe A, Tsuduki T, Yamada T, Kuwahara S, Kimura F, Miyazawa T. Comparison of the effects of curcumin and curcumin glucuronide in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Food Chem* 2014;151:126–132.
- [204] Shome S, Talukdar AD, Choudhury MD, Bhattacharya MK, Upadhyaya H. Curcumin as potential therapeutic natural product: a nanobiotechnological perspective. *J Pharm Pharmacol* 2016;68:1481–1500.
- [205] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* 2017;67:7–30.
- [206] Singh R, Chandra R, Bose M, Luthra PM. Antibacterial activity of Curcuma longa rhizome extract on pathogenic bacteria. *Curr Sci* 2002;83:737–740.
- [207] Sm Sabir, A Zeb, M Mahmood, Sr Abbas, Z Ahmad, N Iqbal. Phytochemical analysis and biological activities of ethanolic extract of Curcuma longa rhizome. *Braz J Biol Rev Brasileira Biol* 2021;81. doi:10.1590/1519-6984.230628.
- [208] Soares JM, Silva KOO, Inada NM, Bagnato VS, Blanco KC. Optimization for microbial incorporation and efficiency of photodynamic therapy using variation on curcumin formulation. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2020;29:101652.
- [209] Soleimani V, Sahebkar A, Hosseinzadeh H. Turmeric (Curcuma longa) and its major constituent (curcumin) as nontoxic and safe substances: Review. *Phytother Res PTR* 2018;32:985–995.
- [210] Soner BC, Acikgoz E, Inan SY, Ayla S, Sahin AS, Oktem G. Neuroprotective Effect of Intrastriatal Caffeic Acid Phenethyl Ester Treatment in 6-OH Dopamine Model of Parkinson's Disease in Rats. *Park Dis* 2021;2021:5553480.
- [211] Srinivasan KR. A Chromatographic Study of the Curcuminoids in Curcuma Longa, L. *J Pharm Pharmacol* 1953;5:448–457.
- [212] Srivastava NS, Srivastava RAK. Curcumin and quercetin synergistically inhibit cancer cell proliferation in multiple cancer cells and modulate Wnt/ β -catenin signaling and apoptotic pathways in A375 cells. *Phytomedicine* 2019;52:117–128.
- [213] Srivastava S, Somasagara RR, Hegde M, Nishana M, Tadi SK, Srivastava M, Choudhary B, Raghavan SC. Quercetin, a Natural Flavonoid Interacts with DNA, Arrests Cell Cycle and Causes Tumor Regression by Activating Mitochondrial Pathway of Apoptosis. *Sci Rep* 2016;6:24049.
- [214] Ström A, Hartman J, Foster JS, Kietz S, Wimalasena J, Gustafsson J-Å. Estrogen receptor β inhibits 17 β -estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D. *Proc Natl Acad Sci* 2004;101:1566–1571.

- [215] Studzińska-Sroka E, Piotrowska H, Kucińska M, Murias M, Bylka W. Cytotoxic activity of physodic acid and acetone extract from Hypogymnia physodes against breast cancer cell lines. *Pharm Biol* 2016;54:2480–2485.
- [216] Subramanian M, Sreejayan null, Rao MN, Devasagayam TP, Singh BB. Diminution of singlet oxygen-induced DNA damage by curcumin and related antioxidants. *Mutat Res* 1994;311:249–255.
- [217] Sun Y-S, Zhao Z, Yang Z-N, Xu F, Lu H-J, Zhu Z-Y, Shi W, Jiang J, Yao P-P, Zhu H-P. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int J Biol Sci* 2017;13:1387–1397.
- [218] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021;71:209–249.
- [219] Suresh D, Srinivasan K. Studies on the in vitro absorption of spice principles--curcumin, capsaicin and piperine in rat intestines. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc* 2007;45:1437–1442.
- [220] Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, Lee SS. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. *Mutat Res* 2001;480–481:243–268.
- [221] Sweeney MF, Sonnenschein C, Soto AM. Characterization of MCF-12A cell phenotype, response to estrogens, and growth in 3D. *Cancer Cell Int* 2018;18:43.
- [222] Tan BL, Norhaizan ME. Curcumin Combination Chemotherapy: The Implication and Efficacy in Cancer. *Molecules* 2019;24:2527.
- [223] Tautz E, Momm F, Hasenburg A, Guethlin C. Use of complementary and alternative medicine in breast cancer patients and their experiences: a cross-sectional study. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990 2012;48:3133–3139.
- [224] Taylor EF, Burley VJ, Greenwood DC, Cade JE. Meat consumption and risk of breast cancer in the UK Women's Cohort Study. *Br J Cancer* 2007;96:1139–1146.
- [225] Trastuzumab zur Behandlung von HER2-positivem Brustkrebs | DKG. n.d. Available: <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/basis-informationen-krebs-allgemeine-informationen/wirkstoff-glossar/trastuzumab.html>. Accessed 25 Feb 2021.
- [226] Tripathy S, Verma DK, Thakur M, Patel AR, Srivastav PP, Singh S, Gupta AK, Chávez-González ML, Aguilar CN, Chakravorty N, Verma HK, Utama GL. Curcumin Extraction, Isolation, Quantification and Its Application in Functional Foods: A Review With a Focus on Immune Enhancement Activities and COVID-19. *Front Nutr* 2021;8:747956.
- [227] Trujillo J, Chirino YI, Molina-Jijón E, Andérica-Romero AC, Tapia E, Pedraza-Chaverri J. Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: Recent findings. *Redox Biol* 2013;1:448–456.
- [228] Tsai Y-M, Jan W-C, Chien C-F, Lee W-C, Lin L-C, Tsai T-H. Optimised nano-formulation on the bioavailability of hydrophobic polyphenol, curcumin, in freely-moving rats. *Food Chem* 2011;127:918–925.
- [229] Turmeric | Memorial Sloan Kettering Cancer Center. n.d. Available: <https://www.mskcc.org/cancer-care/integrative-medicine/herbs/turmeric>. Accessed 29 Dec 2021.

- [230] Ursachen und Risikofaktoren für Brustkrebs | DKG. n.d. Available: <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/brustkrebs/ursachen-und-risikofaktoren.html>. Accessed 12 Nov 2020.
- [231] Valentová K, Vrba J, Bancířová M, Ulrichová J, Křen V. Isoquercitrin: pharmacology, toxicology, and metabolism. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc* 2014;68:267–282.
- [232] Vazquez A, Liu J, Zhou Y, Oltvai ZN. Catabolic efficiency of aerobic glycolysis: the Warburg effect revisited. *BMC Syst Biol* 2010;4:58.
- [233] Vollbracht C, Schneider B, Leendert V, Weiss G, Auerbach L, Beuth J. Intravenous vitamin C administration improves quality of life in breast cancer patients during chemo-/radiotherapy and aftercare: results of a retrospective, multicentre, epidemiological cohort study in Germany. *Vivo Athens Greece* 2011;25:983–990.
- [234] Vollono L, Falconi M, Gaziano R, Iacovelli F, Dika E, Terracciano C, Bianchi L, Campione E. Potential of Curcumin in Skin Disorders. *Nutrients* 2019;11:E2169.
- [235] Wahlström B, Blennow G. A study on the fate of curcumin in the rat. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 1978;43:86–92.
- [236] Wanchai A, Armer JM, Stewart BR. Complementary and alternative medicine use among women with breast cancer: a systematic review. *Clin J Oncol Nurs* 2010;14:E45–55.
- [237] Wang Q, Sun AY, Simonyi A, Jensen MD, Shelat PB, Rottinghaus GE, MacDonald RS, Miller DK, Lubahn DE, Weisman GA, Sun GY. Neuroprotective mechanisms of curcumin against cerebral ischemia-induced neuronal apoptosis and behavioral deficits. *J Neurosci Res* 2005;82:138–148.
- [238] Was kann ich tun bei erhöhtem Brustkrebsrisiko? n.d. Available: <https://www.gbg.de/de/patientinnen/erhoehtes-risiko.php>. Accessed 24 Mar 2021.
- [239] Washbrook E. Risk factors and epidemiology of breast cancer. *Womens Health Med* 2006;3:8–14.
- [240] Watabe M, Hishikawa K, Takayanagi A, Shimizu N, Nakaki T. Caffeic Acid Phenethyl Ester Induces Apoptosis by Inhibition of NFkB and Activation of Fas in Human Breast Cancer MCF-7 Cells *. *J Biol Chem* 2004;279:6017–6026.
- [241] Weltweit erste Mammografie in Leipzig. n.d. Available: <https://www.uniklinikum-leipzig.de/Seiten/geschichte-erste-mammographie.aspx>. Accessed 27 Jan 2021.
- [242] Wichitnithad W, Jongaroonngamsang N, Pummangura S, Rojsitthisak P. A simple isocratic HPLC method for the simultaneous determination of curcuminoids in commercial turmeric extracts. *Phytochem Anal PCA* 2009;20:314–319.
- [243] Wie häufig ist Brustkrebs? | DKG. n.d. Available: <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/brustkrebs-definition-und-haeufigkeit.html>. Accessed 8 Nov 2020.
- [244] Williams C, Edvardsson K, Lewandowski SA, Ström A, Gustafsson J-Å. A genome-wide study of the repressive effects of estrogen receptor beta on estrogen receptor alpha signaling in breast cancer cells. *Oncogene* 2008;27:1019–1032.
- [245] Wongcharoen W, Phrommintikul A. The protective role of curcumin in cardiovascular diseases. *Int J Cardiol* 2009;133:145–151.
- [246] Woo J-H, Kim Y-H, Choi Y-J, Kim D-G, Lee K-S, Bae JH, Min DS, Chang J-S, Jeong Y-J, Lee YH, Park J-W, Kwon TK. Molecular mechanisms of curcumin-induced cytotoxicity: induction of apoptosis through generation of reactive oxygen species, down-regulation of Bcl-X L and IAP, the release of cytochrome c and inhibition of Akt. *Carcinogenesis* 2003;24:1199–1208.

- [247] van der Woude H, Gliszczyńska-Swigło A, Struijs K, Smeets A, Alink GM, Rietjens IMCM. Biphasic modulation of cell proliferation by quercetin at concentrations physiologically relevant in humans. *Cancer Lett* 2003;200:41–47.
- [248] van der Woude H, Ter Veld MGR, Jacobs N, van der Saag PT, Murk AJ, Rietjens IMCM. The stimulation of cell proliferation by quercetin is mediated by the estrogen receptor. *Mol Nutr Food Res* 2005;49:763–771.
- [249] www.graphiks.info. ABCSG - Austrian Breast & Colorectal Cancer Study Group |. n.d. Available: <https://www.abcsg.org>. Accessed 25 Feb 2021.
- [250] Xu X, Peng W, Liu C, Li S, Lei J, Wang Z, Kong L, Han C. Flavone-based natural product agents as new lysine-specific demethylase 1 inhibitors exhibiting cytotoxicity against breast cancer cells in vitro. *Bioorg Med Chem* 2019;27:370–374.
- [251] Yadegarynia S, Pham A, Ng A, Nguyen D, Lialiutska T, Bortolazzo A, Sivryuk V, Bremer M, White JB. Profiling flavonoid cytotoxicity in human breast cancer cell lines: determination of structure-function relationships. *Nat Prod Commun* 2014;9:597–606.
- [252] Yang GS, Kim HJ, Griffith KA, Zhu S, Dorsey SG, Renn CL. Interventions for the Treatment of Aromatase Inhibitor-Associated Arthralgia in Breast Cancer Survivors: A Systematic Review and Meta-analysis. *Cancer Nurs* 2017;40:E26–E41.
- [253] Yang J, Liu RH. Synergistic effect of apple extracts and quercetin 3-beta-D-glucoside combination on antiproliferative activity in MCF-7 human breast cancer cells in vitro. *J Agric Food Chem* 2009;57:8581–8586.
- [254] Yodkeeree S, Chaiwangyen W, Garbisa S, Limtrakul P. Curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin differentially inhibit cancer cell invasion through the down-regulation of MMPs and uPA. *J Nutr Biochem* 2009;20:87–95.
- [255] Yu C-C, Yang S-T, Huang W-W, Peng S-F, Huang A-C, Tang N-Y, Liu H-C, Yang M-D, Lai K-C, Chung J-G. Bisdemethoxycurcumin induces DNA damage and inhibits DNA repair associated protein expressions in NCI-H460 human lung cancer cells. *Environ Toxicol* 2016;31:1859–1868.
- [256] Yulianto ME, Amalia R, Paramita V, Hartati I, Maulinda NA, Shulthoni MA. The Effect of Operating Conditions on Curcumin Extracted from Turmeric by Hydrothermal Extraction. *E3S Web Conf* 2019;125:19001.
- [257] Zaplatic E, Bule M, Shah SZA, Uddin MS, Niaz K. Molecular mechanisms underlying protective role of quercetin in attenuating Alzheimer's disease. *Life Sci* 2019;224:109–119.
- [258] Zhou P, Shan J, Jiang J. [Extraction Optimization of Rhizome of Curcuma longa by Response Surface Methodology and Support Vector Regression]. *Zhong Yao Cai Zhongyaocai J Chin Med Mater* 2015;38:2611–2615.
- [259] Stat Bundesamt n.d. Available: <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/todesfaelle.html>. Accessed 31 Aug 2021.

11. Eidesstattliche Erklärung

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

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

Rostock

April 2022

(Abgabedatum)



(Vollständige Unterschrift)

12. Lebenslauf

Oliver Hintze

Geb. 08.01.1994 in Mannheim

Wormser Str. 26 | 69123 Heidelberg
Tel. +49 17630497179 | hintze1994@gmail.com



Ausbildung

2016 - 2021

Universität Rostock

Humanmedizin

2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (10/2019)
3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (06/2021)

2014 - 2016

Universität Göttingen

1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (09/2016)

2011 - 2013

Elisabeth-von-Thadden Schule Heidelberg

Allgemeine Hochschulreife (06/2013)

2000 - 2011

Waldorfschule Heidelberg

Praktisches Jahr

12/2020 - 04/2021

Chirurgisches Tertial

München Klinik Schwabing, Technische Universität München
Unfallchirurgie (Dr. med. S. Gass)
Viszeralchirurgie (Dr. med. M. Rudolph)

09 - 12/2020

Internistisches Tertial

Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München
Hämatologie und Onkologie (Prof. Dr. med. F. Bassermann)
Gastroenterologie (Univ.-Prof. Dr. med. R. Schmid)

05 - 09/2020

Anästhesiologisch-intensivmedizinisches Tertial

Universitätsmedizin Rostock (Univ.-Prof. Dr. med. D. Reuter)

Famulaturen

02/2019

Chirurgischen Notfallambulanz

St. Josefskrankenhaus, Heidelberg

07/2018

Allgemeinmedizin

Hausarztpraxis Dres. Pohl, Mannheim

08/2017

Unfallchirurgie

Universitätsklinik, Heidelberg

02/2017

Anästhesie und Intensivmedizin

Kliniken Nordoberpfalz AG, Weiden

Praktika

01/2019

„Besonderheiten der ambulanten Orthopädie und Unfallchirurgie“

Wahlfach, Universität Rostock

Kongressteilnahme

2020

63. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe

München

Hobbys

2004 - 2013

Basketball

Mitglied im TSV Wieblingen

2008 - 2010

Viola

Jugendsymphonieorchester Mannheim

Auslandsaufenthalte

2010 - 2011

Schüleraustausch

Formosa, Argentinien

Sprachkenntnisse

Muttersprache:

Deutsch

1. Fremdsprache:

Englisch

2. Fremdsprache:

Spanisch

Heidelberg, April 2022

Offiziel

13. Danksagung

Ich möchte mich sehr herzlich bei folgenden Personen bedanken, die mich während meiner Labortätigkeit und während der wissenschaftlichen Ausarbeitung unterstützt haben:

Mein Dank gilt meiner Doktormutter Frau Priv.-Doz. Dr. Dagmar-Ulrike Richter für die Vergabe des spannenden Themas und die durchweg ausgezeichnete Betreuung auf fachlicher und persönlicher Ebene. Insbesondere die regelmäßigen konstruktiven und aufbauenden Gespräche waren stets eine große Hilfe für mich und haben mich positiv beeinflusst und ermutigt.

Auch bedanke ich mich bei dem gesamten Team des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik Rostock für die großartige Unterstützung während meiner Labortätigkeit. Diese war stets geprägt von einer angenehmen Atmosphäre, wertvollen Diskussionen und großer Hilfsbereitschaft. Ein besonderes Dankeschön möchte ich Frau Gosch für ihr offenes Ohr und die hilfreichen Ratschläge aussprechen.

Vielen Dank an Herrn Prof. Udo Jeschke der LMU München für die Unterstützung im Umgang mit der HPLC.

Danke an Professor Dr. Bernd Gerber für die Möglichkeit der Teilnahme am 63. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e. V. 2020 in München auf welchem ich meine wissenschaftlichen Ergebnisse präsentieren konnte.

Meiner Familie, meinen Freunden und ganz besonders meiner Mutter möchte ich herzlich für die geduldige, liebevolle und kreative Unterstützung während des Verfassens dieser Arbeit danken.