

Aus der Universitätsfrauenklinik und Poliklinik am Klinikum Südstadt Rostock

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

**Die kumulativen Proliferationswirkungen  
hormonaktiver Mammakarzinomzellen (MCF-7 und MCF-12a)  
unter Einwirkung eines Pflanzenextraktes  
aus Curcuma und schwarzem Pfeffer**

**Inauguraldissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der Medizin**

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

**Nadia Burkart**

geb. am 13.02.1996  
in Frankenthal (Pfalz)

aus Ludwigshafen (Rhein)

Rostock,

eingereicht im August 2022

verteidigt im November 2023

**Dekan:** Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger, Medizinische Fakultät der Universität Rostock

**1. Gutachterin:** PD Dr. rer. nat. habil. Dagmar-Ulrike Richter,  
Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik Rostock

**2. Gutachter:** Prof. Dr. Michael Keusgen,  
Institut für Pharmazeutische Chemie Marburg

**3. Gutachterin:** Prof. Dr. rer. nat. Dagmar-Christiane Fischer,  
Klinik und Poliklinik Kinder- und Jugendmedizin, AG Experimentelle Pädiatrie Rostock

**4. Gutachter:** Prof. Dr. Stefan Oswald,  
Institut für Pharmakologie und Toxikologie Rostock

**5. Gutachter:** Prof. Dr. med. Tycho Jan Zuzak,  
Leitender Oberarzt der Abteilung für Kinder- und Jugendmedizin, Wissenschaftliche Arbeitsgruppe der  
Abteilung für Kinder- und Jugendmedizin, stellv. Leiter Forschung für integrative Kinder- und  
Jugendmedizin Duisburg-Essen

Meinen lieben Eltern gewidmet



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>
<b>Symbol- und Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IX</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Die weibliche Brust (Mamma).....	1
1.2 Das Mammakarzinom der Frau.....	2
1.2.1 Definition.....	2
1.2.2 Epidemiologie.....	3
1.2.3 Risikofaktoren.....	4
1.2.4 Klinik.....	6
1.2.5 Therapie.....	7
1.2.5.1 Medikamentöse Therapie.....	7
1.2.5.2 Operative Therapie.....	9
1.2.5.3 Strahlentherapie.....	10
1.2.6 Früherkennung und Prävention.....	10
1.2.7 Komplementärer Therapieansatz.....	11
1.2.8 Prognose.....	12
<b>2. Zielsetzung</b> .....	<b>13</b>
<b>3. Materialien und Methoden</b> .....	<b>14</b>
3.1 Materialien.....	14
3.1.1 Zelllinien.....	14
3.1.1.1 MCF-7-Zellen.....	14
3.1.1.2 MCF-12a-Zellen.....	15
3.1.2 Testsubstanzen.....	15
3.1.2.1. Curcuma ( <i>Curcuma longa</i> ).....	15
3.1.2.2. Schwarzer Pfeffer ( <i>Piper nigrum</i> ).....	17
3.1.2.3. Tamoxifen und Endoxifen.....	18
3.1.2.4. Estradiol.....	19
3.1.2.5. Folsäure.....	19
3.1.2.6. Rhamnetin und Isorhamnetin.....	20
3.1.3 Geräte, Materialien und Chemikalien.....	21
3.2 Methoden.....	24
3.2.1 Zellkultivierung.....	24
3.2.2 Herstellung der Ethanol- und Wasserextrakte.....	26
3.2.3 Herstellung der Kontrollen und Referenzen.....	27
3.2.4 Bestimmung der Lebendzellzahl.....	27
3.2.5 High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	28
3.2.6 Immunhistochemie (IHC).....	31
3.2.7 Testverfahren.....	32
3.2.7.1 BrdU-Zellproliferationstest.....	32
3.2.7.2 CytoTox-Glo®-Test.....	34
3.2.7.3 CellTiter-Glo®-Test (ATP-Lumineszenztest).....	35

---

3.2.7.4 Neutralrot-Test (NRU-Test) .....	36
3.2.7.5 Bestimmung von Glucose- und Laktatkonzentration sowie pH-Wert .....	38
3.2.8 Statistische Auswertung .....	39
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>40</b>
4.1 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) .....	40
4.2 Immunhistochemie (IHC) .....	49
4.3 BrdU-Zellproliferationstest .....	50
4.4 CytoTox-Glo <sup>®</sup> -Test .....	54
4.5 CellTiter-Glo <sup>®</sup> -Test (ATP-Lumineszenztest) .....	58
4.6 Neutralrot-Test (NRU-Test) .....	62
4.7 Zellmetabolismus .....	66
4.7.1 Glucosekonzentration und pH-Wert .....	66
4.7.2 Laktatkonzentration .....	69
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>71</b>
5.1 Material und Methoden .....	72
5.2 Ergebnisse .....	73
5.2.1 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) .....	73
5.2.2 Immunhistochemie (IHC) .....	73
5.2.3 Einfluss der Extrakte und Referenzen auf Zellproliferation, -viabilität und -stoffwechsel .....	73
5.2.3.1 Einfluss der Extrakte und Referenzen auf die Zellproliferation .....	73
5.2.3.2 Einfluss der Extrakte und Referenzen auf die Zellviabilität .....	75
5.2.3.3 Folsäure .....	77
5.2.3.4 Isorhamnetin .....	77
5.2.4 Einfluss der Extrakte auf den Zellstoffwechsel .....	78
5.2.4.1 Einfluss der Extrakte auf den Glucoseverbrauch der Zellen .....	78
5.2.4.2 Einfluss der Extrakte auf den pH-Wert der Zellen .....	79
5.2.4.3 Einfluss der Extrakte auf die Laktatproduktion der Zellen .....	79
5.2.5 Die Kontrollen Tamoxifen, Endoxifen und Estradiol .....	79
5.2.5.1 Die SERMs Tamoxifen und Endoxifen .....	79
5.2.5.2 Estradiol .....	80
5.3 Methodenkritik .....	81
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>82</b>
<b>7. Ausblick .....</b>	<b>83</b>
<b>8. Thesen zur Promotionsschrift .....</b>	<b>84</b>
<b>9. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>86</b>
<b>10. Danksagungen .....</b>	<b>98</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> Aufbau der Mamma [94] .....	1
<b>Abb. 2:</b> Häufigste weibliche Krebsneuerkrankung 2018 im weltweiten Vergleich [25].....	4
<b>Abb. 3:</b> Lichtmikroskopische Aufnahme der MCF-7-Zelllinie.....	14
<b>Abb. 4:</b> Lichtmikroskopische Aufnahme der MCF-12a-Zelllinie .....	15
<b>Abb. 5:</b> Strukturformel von Curcumin, Demethoxycurcumin und Bisdemethoxycurcumin [1].....	16
<b>Abb. 6:</b> Strukturformel von Piperin [128] .....	17
<b>Abb. 7a:</b> Strukturformel von Tamoxifen [64] .....	18
<b>Abb. 7b:</b> Strukturformel von Endoxifen [70].....	18
<b>Abb. 8:</b> Strukturformel von Estradiol [64] .....	19
<b>Abb. 9:</b> Strukturformel von Folsäure [33].....	20
<b>Abb. 10a:</b> Strukturformel von Rhamnetin [85] .....	21
<b>Abb. 10b:</b> Strukturformel von Isorhamnetin [171] .....	21
<b>Abb. 11:</b> zyklische Veränderungen nach Mediumwechsel [60].....	25
<b>Abb. 12:</b> Bürker-Zählkammer unter mikroskopischer Sicht [30].....	28
<b>Abb. 13:</b> Schematische Darstellung der Trennsäule der HPLC [56].....	29
<b>Abb. 14:</b> Aufbau der HPLC-Apparatur [56].....	30
<b>Abb. 15:</b> Prinzip der Immunhistochemie. Indirekte Methode: Bindung des sekundären Antikörpers (Peroxidase-konjugiert) an den Primärantikörper-Antigen-Komplex [105] .....	31
<b>Abb. 16:</b> Chemische Struktur von Thymidin und dem Analogon Bromodesoxyuridin [22] .....	33
<b>Abb. 17:</b> Reaktionsschema des CellTiter-Glo <sup>®</sup> -Lumineszenz-Tests [120] .....	35
<b>Abb. 18:</b> Lichtmikroskopische Aufnahme der MCF-7-Zellen während des NRU-Tests mit Kristallbildung.	37
<b>Abb. 19:</b> Ergebnisse der HPLC .....	41
<b>Abb. 20:</b> Ergebnisse der HPLC .....	41
<b>Abb. 21:</b> Ergebnisse der HPLC .....	42
<b>Abb. 22:</b> Ergebnisse der HPLC .....	42
<b>Abb. 23:</b> Ergebnisse der HPLC .....	43
<b>Abb. 24:</b> Ergebnisse der HPLC .....	44
<b>Abb. 25:</b> Ergebnisse der HPLC .....	44
<b>Abb. 26:</b> Ergebnisse der HPLC .....	45
<b>Abb. 27:</b> Ergebnisse der HPLC .....	46
<b>Abb. 28:</b> Ergebnisse der HPLC .....	47
<b>Abb. 29:</b> Ergebnisse der HPLC .....	47
<b>Abb. 30:</b> Ergebnisse der HPLC .....	48
<b>Abb. 31:</b> Lichtmikroskopische Aufnahme der Zelllinie MCF-7 nach immunhistochemischer Reaktion .....	49
<b>Abb. 32:</b> Lichtmikroskopische Aufnahme der Zelllinie MCF-12a nach immunhistochemischer Reaktion ...	50
<b>Abb. 33:</b> BrdU-Proliferationstest MCF-7: Ergebnisse der Referenzen und Kontrollen.....	51
<b>Abb. 34:</b> BrdU-Proliferationstest MCF-7: Ergebnisse der Extrakte.....	52

---

<b>Abb. 35:</b> BrdU-Proliferationstest MCF-12a: Ergebnisse der Referenzen und Kontrollen.....	53
<b>Abb. 36:</b> BrdU-Proliferationstest MCF-12a: Ergebnisse der Extrakte.....	54
<b>Abb. 37:</b> CytoTox-Glo®-Test MCF-7: Ergebnisse der Referenzen und Kontrollen.....	55
<b>Abb. 38:</b> CytoTox-Glo®-Test MCF-7: Ergebnisse der Extrakte .....	56
<b>Abb. 39:</b> CytoTox-Glo®-Test MCF-12a: Ergebnisse der Referenzen und Kontrollen.....	57
<b>Abb. 40:</b> CytoTox-Glo®-Test MCF-12a: Ergebnisse der Extrakte.....	58
<b>Abb. 41:</b> CellTiter-Glo®-Test MCF-7: Ergebnisse der Referenzen und Kontrollen .....	59
<b>Abb. 42:</b> CellTiter-Glo®-Test MCF-7: Ergebnisse der Extrakte .....	60
<b>Abb. 43:</b> CellTiter-Glo®-Test MCF-12a: Ergebnisse der Referenzen und Kontrollen.....	61
<b>Abb. 44:</b> CellTiter-Glo®-Test MCF-12a: Ergebnisse der Extrakte .....	62
<b>Abb. 45:</b> Neutralrot-Test MCF-7: Ergebnisse der Referenzen und Kontrollen.....	63
<b>Abb. 46:</b> Neutralrot-Test MCF-7: Ergebnisse der Extrakte.....	64
<b>Abb. 47:</b> Neutralrot-Test MCF-12a: Ergebnisse der Referenzen und Kontrollen.....	65
<b>Abb. 48:</b> Neutralrot-Test MCF-12a: Ergebnisse der Extrakte.....	66
<b>Abb. 49:</b> Glucosekonzentration und pH-Wert nach 24 h; MCF-7.....	67
<b>Abb. 50:</b> Glucosekonzentration und pH-Wert nach 24 h; MCF-12a.....	68
<b>Abb. 51:</b> Laktatkonzentration nach 24 h; MCF-7.....	69
<b>Abb. 52:</b> Laktatkonzentration nach 24 h; MCF-12a.....	70

## Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b> Klassifikation molekularer Subtypen des Mammakarzinoms [38, 42] .....	3
<b>Tab. 2:</b> Geräte und Software .....	21
<b>Tab. 3:</b> Materialien .....	22
<b>Tab. 4:</b> Chemikalien und Substanzen .....	23
<b>Tab. 5:</b> Verdünnungsreihe der Extrakte .....	26
<b>Tab. 6:</b> Konzentrationen der für die biochemischen Tests verwendeten Referenzen .....	27

## Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

4AC	Adriamycin, Cyclophosphamid
A.	Arterie
Abb.	Abbildung
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
AG	Antigen
AG	Aktiengesellschaft
AGO	Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie
AK	Antikörper
Aqua dest.	Aqua destillata, <i>deutsch: destilliertes Wasser</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area Under the Curve, <i>deutsch: Fläche unter der Kurve</i>
b-FGF	basic Fibroblast Growth Factor
BDMC	Bisdemethoxycurcumin
BET	Brusterhaltende Therapie
BMI	Body-Mass-Index
BRCA1/2	Breast Cancer 1/2
BrdU	Bromodesoxyuridin
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CAF	Cyclophosphamid, Adriamycin, 5-Fluorouracil
CAS-Nr.	Chemical Abstracts Service-Nummer
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide
CI	Konfidenzintervall
CMF	Cyclophosphamid, Methotrexat, Fluorouracil
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CYP	Cytochrome P450
DMC	Demethoxycurcumin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid, <i>deutsch: Desoxyribonukleinsäure</i>
EBCTCG	Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid, <i>deutsch: Ethylendiamintetraessigsäure</i>
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	Estrogenrezeptor
ER $\alpha$	Estrogenrezeptor alpha
ER $\beta$	Estrogenrezeptor beta
et al.	et alii / et aliae / et alia, <i>deutsch: und andere</i>
FKS	Fetales Kälberserum
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
°C	Grad Celsius
g	Gramm
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon

h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
HDI	Human Development Index
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HR	Hormonrezeptor
HR	Hazard Ratio
hs-CRP	high-sensitivity C-reaktive Protein
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
IGF1	Insulin-like Growth Factor 1, <i>deutsch: Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1</i>
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IL-6	Interleukin 6
i. v.	intravenös
KAM	Komplementär- und Alternativmedizin
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
Ki67	Kiel 67-Antigen
l	Liter
LH	Luteinisierendes Hormon
MBSR	Mindfulness-Based Stress Reduction, <i>deutsch: Achtsamkeitsbasierte Stressreduktion</i>
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
µmol/l	Mikromol pro Liter
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
MPa	Megapascal
MRM	Modifizierte radikale Mastektomie
MRT	Magnetresonanztomographie
NK	Negativkontrolle
NO	Stickstoffmonoxid
NRU	Neutral Red Uptake, <i>deutsch: Neutralrot</i>
ODC	Ornithindecaboxylase
OR	Odds Ratio
PALB2	Partner And Localizer of BRCA2
PgR	Progesteronrezeptor
%	Prozent
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung

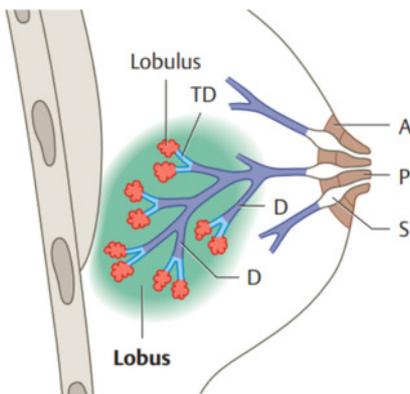
s	Sekunde(n)
SERM	selektiver Estrogenrezeptormodulator
SHBG	Sexualhormon-bindendes Globulin
SLNE	Sentinel-Lymphonodektomie
TDLE	Terminalductus-Lobulus-Einheit
TFGB	Transforming Growth Factor $\beta$
TN	triple-negativ
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TNM	Tumor, Nodus, Metastasen
U	Umdrehungen
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
UK	United Kingdom
USA	United States of America
UV	Ultraviolettstrahlung
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor, <i>deutsch: vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor</i>

# 1. Einleitung

## 1.1 Die weibliche Brust (Mamma)

Als Mamma wird die Einheit des Stromas, also des Fett- und Bindegewebes, sowie des Drüsengewebes, bestehend aus der Brustdrüse mit dem Gangsystem, definiert. Die Brustdrüsen als sekundäre Geschlechtsmerkmale entwickeln sich aus der Milchleiste, wobei sich nur im Bereich des Thorax die paarige Anlage weiter ausbildet und bei beiden Geschlechtern Milchgänge entstehen. Bei allen weiteren Anlagen, die zwischen Axilla und Leistengegend entstanden sind, kommt es zur Rückbildung. Die Ausbildung des Drüsenapparates und die Zunahme des Stromas werden bei Mädchen durch Estrogene gefördert. Beim Mann entwickelt sich die Brust kaum weiter und verbleibt nach der Pubertät in diesem Zustand. Nach der Reifung besteht die weibliche Brustdrüse je nach Quelle aus 10-20 beziehungsweise 12-15 Drüsenläppchen, den Lobi glandulae mammae. Diese werden durch einen Hauptausführungsgang und den Sinus lactifer mit der Papilla mammae (Brustwarze) verbunden [10, 94].

Die Lobi glandulae mammae gliedern sich in die Ductuli lactiferi, die Milchgänge und die Terminalductuli, die in die Endstücke eines Lobulus führen (Abb. 1). Dies wird auch als Terminalductus-Lobulus-Einheit (TDLE) bezeichnet und ist besonders erwähnenswert, da ein Großteil der epithelialen Mammakarzinome und benignen Tumore der Mamma dort ihren Ausgang nehmen [94].



**Abb. 1:** Aufbau der Mamma; Sagittalschnitt (Schema). A: Areola mammae (Warzenhof). P: Papilla mammae. Das Gangsystem ist schematisch für einen Lobus gezeigt. S: Sinus lactifer. D: Ductus lactifer (dunkelblau). TD: Terminalductus (hellblau). Lobulus (rot). Interlobuläres Bindegewebe (grün) [94].

Arteriell werden die Mammae durch die A. thoracica lateralis und - interna versorgt. Von Bedeutung sind zudem das netzförmige Lymphsystem und der Lymphabfluss, letzterer spielt in der Klinik eine große Rolle. Durch die komplexen Verzweigungen erhöht sich zudem die Wahrscheinlichkeit einer Metastasierung erheblich [10]. Die axillären Lymphknoten sind für einen Großteil des Lymphabflusses zuständig und werden anhand der Lage zum M. pectoralis minor in Level I-I eingeteilt. Zudem ist der Sentinel-Lymphknoten als Wächterlymphknoten hervorzuheben, da er im Falle einer Metastasierung vor allem in Knochen (Becken, Wirbelsäule, Femur) als auch in Lunge und Leber als erster Lymphknoten betroffen ist und radioaktiv detektiert werden kann. So kann die Verbreitung des Tumors im Lymphabflussgebiet untersucht werden [71, 76].

Abhängig vom Menstruationszyklus und den unterschiedlichen Konzentrationen der Hormone verändert sich das Mammaepithel histologisch. Zudem kommt es nach der Menopause durch die Hormonabnahme zur Altersinvolution. Das Bindegewebe und die Lobuli atrophieren, im Gegensatz dazu bleibt das Gangsystem erhalten, weshalb die Gefahr eines Mammakarzinoms, auch durch einzelne Lobuli, bestehen bleibt [94].

Außerdem sind Estrogen- und Progesteronrezeptoren (ER beziehungsweise PgR) im Epithel vorhanden, wodurch Estrogene das Wachstum des Epithels begünstigen und Estrogenquellen weiterhin durch das vermehrte Fettgewebe existent sind. Somit kann bei differenzierten Tumorzellen das Mammakarzinom mit Aromatase-Inhibitoren und Estrogen-Antagonisten therapiert werden [94].

## 1.2 Das Mammakarzinom der Frau

### 1.2.1 Definition

Häufig entstehen Mammakarzinome in der Terminalductus-Lobulus-Einheit. Dabei unterscheidet man nichtinvasive von invasiven Tumorformen. Letztere infiltrieren durch die Basalmembran das umliegende Gewebe, nichtinvasive Tumore wachsen dagegen in das Gangsystem bei intakter Basalmembran [80]. Darüber hinaus werden Karzinome histologisch beurteilt, wobei das invasive duktales Karzinom, ausgehend von den Milchgangepithelien, mit 65-80 % aller Mammakarzinome mit Abstand am häufigsten auftritt, gefolgt vom invasiven lobulären Karzinom mit 6-15 %, das von den Drüsenläppchen ausgeht. Des Weiteren sind unter anderen der tubuläre, medulläre, muzinöse und papilläre Karzinomtyp zu nennen [71]. Im Vergleich ist die Prognose beim tubulären Karzinom besonders günstig, manche Quellen zählen auch das gut differenzierte muzinöse sowie das invasive papilläre Karzinom dazu [88]. In Kombination mit dem histologischen Typ ist das Grading für die Prognoseeinschätzung von Bedeutung. Anhand von Tubulusbildung, Mitoserate und Kernpolymorphie wird zwischen gut, mäßig und schlecht differenziert (G1-3) unterschieden, wobei eine geringe Differenzierung auf eine sehr schlechte Prognose hinweist [71, 80].

Auch die anatomische Stadieneinteilung des Mammakarzinoms anhand der UICC- und TNM-Klassifikation ist für die Therapieempfehlung und Prognose sehr wichtig. T bestimmt die Tumorgroße, N den Lymphknotenbefall und M das Vorliegen von Metastasen. Die UICC-Klassifikation (Stadium 0 bis IV) beinhaltet verschiedene Einteilungen der TNM-Klassifikation. So wird zum Beispiel das Stadium IIIB als T4, N0-N2 und M0 bezeichnet [71].

Von enormer Bedeutung für die Therapie und die Prognose ist ferner die Charakterisierung des Rezeptorstatus mittels Immunhistochemie. Die Subtypen werden aufgrund unterschiedlicher Rezeptor- beziehungsweise Proteinexpression wie dem ER, PgR, Human Epidermal Growth Factor Receptor (HER2) [42, 67] und Ki-67-Antigen (Ki67) definiert, wobei letzteres in Hinblick auf die Proliferationsrate eine wichtige Rolle spielt [42]. Unterschieden wird zwischen Luminal A und B, HER2-positiv und triple-negativ (TN) (Tab. 1) [42]. Die Unterscheidung zwischen rezeptorpositiv und -negativ erfolgt ab 1 % positiver Tumorzellen. Ab diesem Wert wird das Karzinom als HR-gering-positiv und ab 10 % als HR-positiv betrachtet [43].

**Tab. 1:** Klassifikation molekularer Subtypen des Mammakarzinoms. ER - Estrogenrezeptor, HER2 - Human Epidermal Growth Factor Receptor 2, PgR - Progesteronrezeptor. Originalquelle Coates, Winer et al. 2015 [38], modifiziert nach Deutsche Gesellschaft für Haematologie und medizinische Onkologie e.V. 2016 [42]

Molekularer Subtyp	Subgruppe	Definition (Approximation mit Surrogatparametern)	Anmerkungen
Luminal A		<ul style="list-style-type: none"> <li>ER und PgR positiv</li> <li>HER2 negativ</li> <li>Ki67 niedrig</li> </ul>	„luminal A-like“
Luminal B	HER2 negativ	<ul style="list-style-type: none"> <li>ER positiv und eines der folgenden Kriterien</li> <li>PgR negativ</li> <li>Ki67 hoch</li> </ul>	„luminal B-like“ HER2 negativ
	HER2 positiv	<ul style="list-style-type: none"> <li>ER positiv</li> <li>HER2 überexprimiert oder amplifiziert</li> <li>Ki67 niedrig oder hoch</li> </ul>	„luminal B-like“ HER2 positiv
HER2 enriched		<ul style="list-style-type: none"> <li>HER2 überexprimiert oder amplifiziert</li> <li>ER und PgR negativ</li> </ul>	
Basal like		<ul style="list-style-type: none"> <li>ER und PgR negativ</li> <li>HER2 negativ</li> </ul>	weibehende Überlappung mit dem triple (endokr.) negativen Karzinom

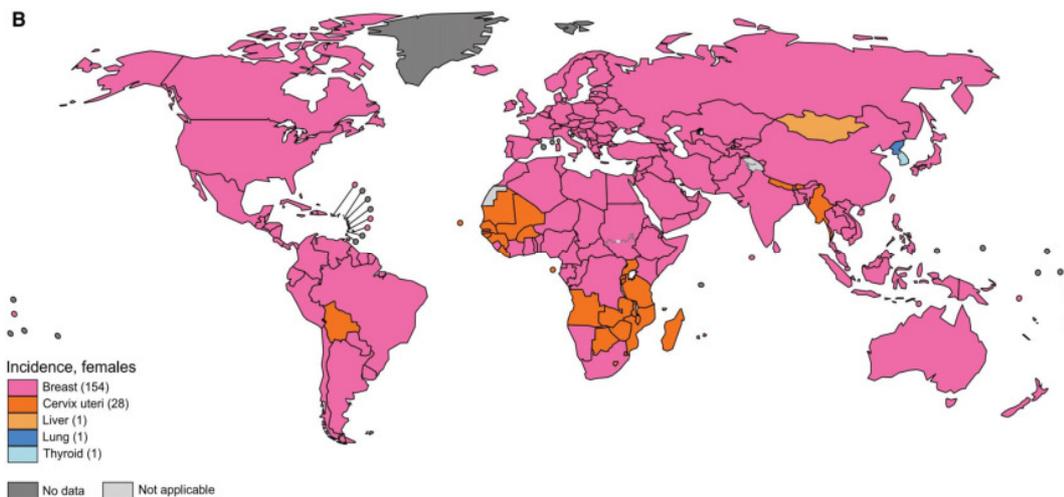
Mit über 70 % ist Luminal A der mit Abstand am häufigsten auftretende Subtyp. Der triple-negative Typ wird mit etwa 12 % bei mehr als jedem achten Mammakarzinom immunhistochemisch diagnostiziert. Fast genauso häufig ist das Luminal B-, HER2-positive Karzinom mit über 10 %. Dagegen hat der HER2-positive Subtyp einen Anteil von etwa 4,5 % [67].

Sind beide Hormonrezeptoren (HR) positiv, ist die Überlebenszeit länger und der Zeitpunkt eines möglichen Rezidivs später, wobei die Remissionsrate bei 70 % liegt. Die Prognose ist besser als bei rezeptornegativen Karzinomen, da in diesem Fall die Remissionsrate nur bei 15 % liegt. Bei einem positiven Estrogen- oder Progesteronrezeptorstatus wiederum liegt diese bei etwa 50 %, wobei der PgR-Status der wichtigere prognostische Faktor ist [76].

### 1.2.2 Epidemiologie

Die häufigste oder zweithäufigste Todesursache der unter 70-jährigen in Industrienationen war 2015 Krebs. Mit über 2,08 Millionen Neuerkrankungen 2018 und einem Anteil von 24,2 % stellen Mammakarzinome den weltweit größten Anteil aller bösartigen weiblichen Neuerkrankungen und auch die mit 15 % häufigste Krebstod-Ursache der Frau dar (Abb. 2) [25].

Berücksichtigt man den Human Development Index (HDI) als Wohlstandsindikator der Vereinten Nationen, fällt auf, dass Länder mit einem niedrigen oder mittleren Index eine deutlich niedrigere Inzidenz des Mammakarzinoms aufweisen. Bei geringem HDI lag 2018 die Inzidenz bei 31,3 von 100.000 Frauen, bei einem hohen HDI bei 54,4 Neuerkrankungen von 100.000 weiblichen Personen [25].



**Abb. 2:** Die häufigste weibliche Krebsneuerkrankung 2018 im weltweiten Vergleich; modifiziert nach Bray, Ferlay et al. 2018 [25].

Mit jährlich etwa 70.000 Erstdiagnosen und einem Anteil von 24-29 % an allen neu auftretenden Krebserkrankungen bei Frauen sind maligne Tumore der Mamma auch in Deutschland von großer Bedeutung [71, 129]. 2016 waren 7 von 10 Frauen bei Diagnosestellung über 55 Jahre alt, wobei das mittlere Erkrankungsalter bei 64 Jahren lag [129]. Die Wahrscheinlichkeit, im Leben an einem Mammakarzinom zu erkranken, liegt bei Frauen in Industrienationen bei 12 % [94, 129], das Sterberisiko bei 3,6 % [129]. Mit jährlich ca. 17.000 Todesfällen [71] und einer Sterberate von etwa 23 Frauen je 100.000 Einwohnern in Deutschland ist die Mortalität in den letzten Jahren jedoch rückläufig [129].

### 1.2.3 Risikofaktoren

#### Geschlecht

Bei Männern ist das Mammakarzinom eine Seltenheit, 99,4 % der Erkrankten sind Frauen. Somit zählt das weibliche Geschlecht zu den Risikofaktoren eines Mammakarzinoms [76].

#### Lebensalter

Ab dem 30. Lebensjahr steigt das Risiko eines Mammakarzinoms stark an und liegt bei 0,44 %. Für 40-jährige Frauen ist das Risiko mit 1,45 % mehr als dreimal so hoch, für 50-jährige liegt es bei 2,31 % und mit 3,84 % haben 70-jährige Frauen eine besonders hohe Wahrscheinlichkeit, an einem Mammakarzinom zu erkranken [18].

#### Ernährung

Als weiterer Risikofaktor des Mammakarzinoms spielt die Ernährung eine große Rolle. So weist eine unausgewogene, ballaststoffarme, alkohol-, fleisch- und fettreiche Ernährung ein erhöhtes Risiko für das Auftreten eines Mammakarzinoms auf [40, 71, 76, 163]. Eine „mediterrane Diät“ mit Meerestieren, Oliven- und Sonnenblumenöl sowie Obst und Gemüse zeigt dagegen eine präventive Wirkung [31, 40]. Als Folge der vermehrten Aufnahme ungesunder Fette und wenig Bewegung kann ein solcher Lebensstil zu Adipositas führen, ein weiterer Risikofaktor des Brustkrebses [42, 163].

### Adipositas und körperliche Bewegung

Auch bei einem Body-Mass-Index (BMI) ab 30 kg/m<sup>2</sup> (Adipositas) erhöht sich das Erkrankungsrisiko bei postmenopausalen Frauen [18, 42]. Bisher ungeklärt ist allerdings ein Zusammenhang bei prämenopausalen Frauen [18, 76]. Die steigende Inzidenz bei Adipositas ist auf den erhöhten Estradiolspiegel zurückzuführen, der durch die verstärkte Umwandlung von Testosteron im Fettgewebe entsteht, als auch auf die wachsende Aktivität des 'insulin like growth factor 1' (IGF1) [76]. IGF1 [76] und Estrogene steigern nachweislich das Wachstum von Mammakarzinomzellen [76, 154]. Mit regelmäßiger und vermehrter Bewegung kann das Brustkrebsrisiko um bis zu 25 % vermindert werden, wobei Mammakarzinompatientinnen auch schon mit gemäßigter, regelmäßiger körperlicher Aktivität die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Rezidiven als auch die Sterblichkeit senken können [18].

### Toxische Faktoren

Schon ein regelmäßiger Alkoholkonsum von täglich 10 g [18] erhöht das Risiko eines Mammakarzinoms um 4 % [139] - 12 % [18]. Ein erhöhter Alkoholkonsum von mehr als 30 g täglich lässt das Risiko um das Zehnfache ansteigen. Etwa 5 % der Mammakarzinome in Nordeuropa und Nordamerika sind auf Alkoholkonsum zurückzuführen. Schon leichte Blutalkoholkonzentrationen (0,06 %) führen zu einer gesteigerten ER - und Aromatase-Expression, wodurch vermehrt Estradiol gebildet und das Wachstum von Brustkrebszellen verstärkt wird [139]. Das Mammakarzinomrisiko des Rauchens wird in der aktuellen Literatur diskutiert [76, 129].

### Vorbelastungen

Thorakale Strahlenexposition, wie zum Beispiel Röntgen in einem Alter zwischen 10-20 Jahren, gilt ebenfalls als Risikofaktor [18, 42]. So führt eine Bestrahlung bei jungen Krebspatientinnen (vor dem 21. Lebensjahr) zu einer 30 %-Zunahme einer Mammakarzinom-Erkrankung im Alter von 50 Jahren [106].

Zusätzliche Risikofaktoren sind einige gutartige Brusterkrankungen [71], kontralaterale maligne Mammaerkrankungen in der Vorgeschichte [42] und dichtes Brustdrüsengewebe [71, 129]. Gerade bei BRCA1/2-Mutationen ist das Risiko von Brustkrebs auf der kontralateralen Seite stark erhöht und liegt bei 25-45 % in 15 Jahren [43].

### Hormonelle und reproduktive Risiken

Eine lange reproduktive Phase mit früher Menarche [15, 39, 42, 53] und einem hohen Alter bei Eintritt der Menopause erhöhen das Erkrankungsrisiko [42, 53] durch den langanhaltenden erhöhten Estrogenspiegel [18, 39, 53, 84]. Ein späterer Beginn der Menarche senkt das relative Risiko um 5 % [84]. Ältere Erstgebärende als auch Nullipara zeigen ebenfalls ein erhöhtes Auftreten von Mammakarzinomen im Vergleich zu Frauen, die früh Kinder geboren haben [18, 42]. Das Erkrankungsrisiko sinkt im Vergleich zu nulliparen Frauen um 25 %, wenn das Alter der Mutter bei der ersten Geburt unter 30 Jahren liegt. Zudem senkt Stillen über 25 Monate das Risiko einer Mammakarzinom-Erkrankung um 33 % und jede zwölfmonatige Stillperiode um 4 %. Durch die Stillzeit wird eine Erniedrigung des Estrogenspiegels induziert [84].

Zudem spielt die langjährige Hormonersatztherapie, vor allem bei Estrogen-Gestagen-Einnahme, eine große Rolle als Risikofaktor [18, 53, 129]. Studien deuten darauf hin, dass orale Kontrazeptiva ein erhöhtes Risiko für Brustkrebs darstellen [4, 15, 84, 165] und ein Zusammenhang mit der Dauer

der Einnahme besteht [165], wobei nach über zehnjähriger Einnahme das Risiko um 14 % steigt [18]. Außerdem scheint es einen Zusammenhang zwischen der Einnahme vor dem 20. Lebensjahr, allerdings unabhängig von der Dauer, und einem erhöhten Mammakarzinom-Risiko zu geben [4]. Auch die Studie von Bardaweel *et al.* 2019 belegte keinen Zusammenhang zwischen der Einnahmedauer oraler Kontrazeptiva und dem Mammakarzinom-Erkrankungsrisiko [15]. Laamiri *et al.* wiesen in einer Studie 2015 schon ab einer sechsmonatigen Einnahme ein erhöhtes Risiko für Brustkrebs nach [84]. Eine Odds Ratio von 1,93 ermittelten Wahidin *et al.* 2018 bei einer Einnahmedauer oraler Kontrazeptiva bis zu sechs Jahren, bei über sechsjähriger Einnahme von 2,90 [165].

### Genetische und familiäre Disposition

Etwa 5 % der Mammakarzinome sind erblich bedingt [42], wovon 25-30 % BRCA1- und BRCA2-Genmutationen aufweisen [42]. Diese sind von besonderer Bedeutung, da sie mit durchschnittlich 60 % [43] ein hohes lebenslanges Erkrankungsrisiko für Mammakarzinome darstellen [41–43, 99] und Trägerinnen 20 Jahre früher erkranken als Frauen ohne familiäre Disposition [43]. Auch Mutationen im PALB2-Gen erhöhen das Risiko eines Mammakarzinoms stark [42, 43]. Ein häufiges Auftreten von Mammakarzinomen sowie ein Erkrankungsalter unter 35 Jahren in der Familienanamnese ist auffällig und sollte genetisch untersucht werden [41–43].

Das Risiko, im Laufe des Lebens an einem Mammakarzinom zu erkranken, liegt bei Frauen mit BRCA1-Mutation bei 70 %, mit BRCA2-Mutation bei etwa 60 % [18] und in beiden Fällen bei etwa 80-90 % bis zum 80. Lebensjahr [71]. Bei etwa 80 % der Trägerinnen wird histologisch ein invasives duktales Mammakarzinom diagnostiziert, zudem weisen insgesamt über 85-90 % der Patientinnen G2- (mäßig differenziert) und G3-Karzinome (schlecht differenziert) auf. Allerdings nimmt der Anteil der G1-Tumore (gut differenziert) ab einem Alter von 40-50 Jahren zu und der Anteil der G3-Tumore vor allem bei der BRCA1-Mutation deutlich ab. Zudem werden bei dieser über 9 % als medulläre, und bei BRCA2-Mutationen etwa 8 % als invasive lobuläre Mammakarzinome klassifiziert [99].

Etwa 10 % der Trägerinnen beider Mutationen weisen eine HER2-Überexpression auf [99]. Bei BRCA1-Mutation wird zu circa 75 % ein HR-negatives Mammakarzinom diagnostiziert, dagegen sind es bei BRCA2-Mutation 25 % [42]. Somit ist die Wahrscheinlichkeit eines triple-negativen Karzinoms bei einer Mutation im BRCA1-Gen mit 70 % deutlich höher als bei einer BRCA2-Genmutation mit etwa 15 % TN-Karzinomen [99]. Umgekehrt weisen 8,5 % beziehungsweise 2,7 % der TN-Mammakarzinome Mutationen des BRCA1- beziehungsweise BRCA2-Gens auf [43].

### **1.2.4 Klinik**

Häufig fällt das Mammakarzinom durch tastbare Knoten auf, die sich mit 50 % am häufigsten im oberen äußeren Quadranten der Brust befinden, selten innen unten (6 %) [18, 71]. Teilweise kommt es auch zu einer Mamillensekretion oder -blutung sowie Schmerzen der Mamma während der klinischen Untersuchung. Eine weitere Abklärung ist zudem bei Hauteinziehungen oder -veränderungen wie der Orangenhaut (peau d'orange), Einziehungen der Mamille oder bei Asymmetrie der Brust wichtig [42, 71]. Zudem kann es zu Lymphknotenvergrößerungen besonders in der Axilla und bei fortgeschrittenen Karzinomen zu Allgemeinsymptomen wie ungewolltem

Gewichtsverlust und Müdigkeit kommen. Fand bereits eine Metastasierung statt, können auch Husten, Knochenschmerzen und Ikterus auffallen [42]. Am häufigsten treten Fernmetastasen in Leber, Lunge und dem Skelettsystem (Becken, Wirbelsäule, Femur) auf [71, 76].

### 1.2.5 Therapie

Grundsätzlich wird bei der Therapie des Mammakarzinoms zwischen Strahlentherapie, operativer und medikamentöser Therapie unterschieden. Bei letzterer wird zudem zwischen Chemo-, Antikörper- und Hormontherapie differenziert. Außerdem kann je nach Wunsch der Patientinnen auch ein komplementärer Therapieansatz verwendet werden.

Die Therapie richtet sich nach dem molekularen Subtyp, der TNM-Klassifikation, dem HR-Status, dem HER2-Status und dem Grading des Primärtumors sowie dem Alter und dem Willen der Patientinnen und wird in Abhängigkeit dieser Faktoren interdisziplinär und individuell entschieden [71].

#### 1.2.5.1 Medikamentöse Therapie

##### Antikörpertherapie

Für die Therapie des HER2-positiven Mammakarzinoms wird Trastuzumab, das mit Pertuzumab kombiniert werden kann, beide humanisierte Anti-HER2-AK, ein Jahr lang in Kombination mit Taxanen verabreicht [42, 71]. Während der Gabe von Trastuzumab sollten engmaschige Kontrollen bei kardial vorbelasteten Patientinnen aufgrund der kardialen Toxizität erfolgen [42, 71]. Cameron *et al.* belegten 2017 bei HER2-positiven Mammakarzinom-Patientinnen nach der abgeschlossenen individuellen Therapie und anschließender einjähriger Einnahme von Trastuzumab nach einem durchschnittlichen Beobachtungszeitraum von elf Jahren eine um etwa 24 % relative erhöhte rezidivfreie Überlebensrate. Zudem wiesen sie eine um 26 % relative verminderte Todesfallrate nach [29]. Nach Perez *et al.* 2011 reduziert sich die Rate nach etwa vierjährigem Beobachtungszeitraum um circa 39 % [115]. Zudem kann bei dem metastasierten Mammakarzinom die Therapie mittels Taxanen mit Bevacizumab, einem humanisierten monoklonalen AK, kombiniert werden [42]. Dieser Angiogeneseinhibitor wird mit Paclitaxel, Docetaxel oder Capecitabin kombiniert. Bevacizumab verhindert die Bildung neuer Gefäße und somit auch Metastasierungen, indem die Rezeptorbindung vom vascular endothelial growth factor (VEGF) blockiert und eine Aktivierung verhindert wird [71, 80].

##### Chemotherapie

Kriterien, die für eine adjuvante Chemotherapie sprechen sind HR-negative Tumore, ein positiver HER2-Status, mindestens vier befallene Lymphknoten, eine schlechte Differenzierung (G3), eine ausgedehnte Gefäßinfiltration und Brustkrebs vom Luminal-B-Typ [42]. Aktuelle Chemotherapien sind meist eine Kombination aus drei Zytostatika und bestehen häufig aus Anthrazyklinen und Taxanen [42]. Durch eine adjuvante Chemotherapie verringert sich bei Frauen unter 50 Jahren das Sterberisiko um 38 %, bei Frauen zwischen 50 und 69 Jahren um 20 % [71].

2012 wies eine Metaanalyse der Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) durch die Hinzugabe von vier Zyklen Taxane zu einer Anthrazyklin-Chemotherapie eine Senkung der 10-Jahres-Mortalität von Brustkrebs um bis zu 30 % relativ im Vergleich zur ausschließlichen Chemotherapie nach. Zusätzlich erzielte eine hochdosierte Anthrazyklin-Therapie eine ebenso starke Reduktion der Mortalität innerhalb der zehn folgenden Jahre. Zudem zeigte CAF (Polychemotherapie mit Cyclophosphamid, Adriamycin, 5-Fluorouracil) im Vergleich zu CMF (Cyclophosphamid, Methotrexat, 5-Fluorouracil) und 4AC (Adriamycin, Cyclophosphamid) eine stärkere Mortalitätsreduktion, wobei CMF und 4AC in ihrer Wirkung gleichwertig waren [45]. Durch die geringe Wirkung sollte das CMF-Schema nur bei Kontraindikation von Anthrazyklinen und Taxanen angewandt werden [71]. Bei einem triple-negativen Mammakarzinom wird eine platinhaltige, neoadjuvante Chemotherapie empfohlen. In der adjuvanten Chemotherapie werden dagegen vorwiegend Anthrazykline und Taxane verwendet. Auch bei Fernmetastasen werden diese als besonders effektive Einzelsubstanzen eingesetzt, wobei Taxane zusätzlich mit Bevacizumab kombiniert werden können [42].

### Endokrine Therapie

Die endokrine Therapie ist für HR-positive Mammakarzinome die Therapie der Wahl [71]. Da Estrogene in der Entstehung und Entwicklung des Mammakarzinoms eine große Rolle spielen (1.2.3 Risikofaktoren), ist die Reduktion des Hormons vor allem durch Hemmung der Ovarialfunktion und -wirkung in der Therapie von ER-positiven Karzinomen (1 % ER-positive Karzinomzellen) von Bedeutung [42, 133]. Zudem wird in der Therapie des HR-positiven Brustkrebses zwischen prä- und postmenopausalen Patientinnen unterschieden. Die Therapie der Wahl in der Prämenopause ist die fünfjährige Gabe von Tamoxifen, je nach Stadium und Patientenvorgeschichte mit Ausschaltung der Ovarialfunktion (GnRH-Analoga, Ovariectomie, Radiomenolyse). In der Postmenopause werden fünf Jahre lang Aromatasehemmer oder Tamoxifen gegeben, alternativ besteht die Möglichkeit, diese nacheinander für jeweils zwei bis fünf Jahre zu verabreichen [42].

### *Tamoxifen*

Unter Punkt 3.1.2.3 wird Tamoxifen bei den Testsubstanzen beschrieben.

### *Aromataseinhibitoren: Anastrozol, Letrozol, Exemestan*

Aromataseinhibitoren sind vor allem bei HR-positiven Karzinomen in der Peri- oder Postmenopause indiziert [71]. Die aktuelle Studienlage zeigt Vorteile der Aromataseinhibitoren-Therapie im Vergleich zu Tamoxifen auf [23, 71]. Bliss *et al.* konnten 2012 nach zwei- bis dreijähriger Tamoxifeneinnahme durch einen Therapiewechsel auf den Aromatasehemmer Exemestan eine Verbesserung des krankheitsfreien und des Gesamtüberlebens feststellen [23]. Jin *et al.* wiesen 2011 nach etwa fünfjähriger Tamoxifenbehandlung HR-positiver Mammakarzinom-Patientinnen einen Vorteil von Letrozol im Vergleich zu einem Placebo nach einem im Mittel 64-monatigen Follow-up bezüglich des rezidivfreien und des Gesamtüberlebens nach [73].

### *GnRH-Analoga: Goserelin, Leuprorelin, Triptorelin*

Gonadotropin-Releasing-Hormon-Analoga werden in Kombination mit Tamoxifen adjuvant, aber auch palliativ zur Therapie des prämenopausalen HR-positiven Mammakarzinoms eingesetzt [42, 71]. GnRH-Analoga führen zur Unterdrückung der Sekretion der Gonadotropine FSH und LH, wodurch eine Ovarsuppression induziert wird, die zur Reduktion des Plasmaestrogenspiegels führt [80]. Die Verabreichung erfolgt intramuskulär oder subkutan, wobei unerwünschte Arzneimittelwirkungen wie trockene Vaginalschleimhaut und Veränderungen der Libido sowie der Stimmung auftreten können [42].

### 1.2.5.2 Operative Therapie

Im Bereich der operativen Therapie wird zwischen der brusterhaltenden Therapie (BET) und der Mastektomie, meist der modifizierten radikalen Mastektomie (MRM), unterschieden, wobei das Therapieziel stets eine R0-Resektion ist [42, 71]. Die BET mit adjuvanter Radiotherapie hat im Vergleich zur Mastektomie eine äquivalente Prognose [42, 80]. Die BET wird bei 60-70 % der Mammakarzinome, vor allem bei jungem Erkrankungsalter und bei einem günstigen Verhältnis von Tumor- und Brustvolumen angewandt, wobei eine adjuvante Bestrahlung obligat ist [71]. Indikationen für eine modifizierte radikale Mastektomie sind das Vorliegen von Kontraindikationen bei der brusterhaltenden Therapie oder der Nachbestrahlung, ein fehlender tumorfreier Resektionsrand nach Nachresektionen, ein inflammatorisches Mammakarzinom nach primärer Chemotherapie, aber auch die Entscheidung der Patientinnen für eine Mastektomie [42, 71].

Ergänzt werden können die Verfahren durch die Exzision des Wächterlymphknotens (SLNE), auch Sentinel-Lymphknoten, und durch die axilläre Lymphknotendisektion, wobei über zehn Lymphknoten im ersten und zweiten Level der Axilla entfernt werden [71]. Die SLNE hat im Vergleich zur Lymphknotendisektion den Vorteil einer geringeren Morbidität und ist zudem als Kontrolle äquivalent (bis über 95 % Detektionsrate) [71]. Die Axilladisektion wird nach der Detektion von mindestens drei positiven Sentinel-Lymphknoten, einem Tumorstadium über T2 oder bei fehlender Möglichkeit einer wirksamen, der Operation angeschlossenen medikamentösen Therapie durchgeführt [42].

### *Ovarektomie*

Eine weitere operative Möglichkeit ist die Ovarektomie zur Reduktion der Hormonproduktion. Love *et al.* belegten 2002 durch Ovarektomie bei operablen HR-positiven Karzinomen in der Prämenopause eine Erhöhung des fünfjährigen rezidivfreien Überlebens von 58 % auf 75 % und eine Verbesserung der Überlebensrate in diesem Zeitraum von 70 % auf 78 % [93].

### 1.2.5.3 Strahlentherapie

Die adjuvante Bestrahlung nach der operativen Therapie des Tumors ist ein wichtiger Bestandteil der Mammakarzinom-Therapie und bei brusterhaltender Therapie obligat, um die Rezidivrate zu senken [71]. Durch eine adjuvante Radiotherapie lässt sich das Auftreten von Rezidiven von 25-39 % (nur Operation) auf 7-14 % verringern [71, 80], außerdem sinkt die Wahrscheinlichkeit, innerhalb der folgenden 15 Jahre an Brustkrebs zu sterben, um 3,8 % [71]. Zusätzlich wiesen Nielsen *et al.* 2006 nach, dass durch Radiotherapie das Auftreten von Fernmetastasen innerhalb von 18 Jahren nach Mastektomie von 64 % bei alleiniger Chemotherapie auf 53 % deutlich verringert wird [108]. Indikationen für eine adjuvante Bestrahlung nach einer Mastektomie sind mehr als drei befallene Lymphknoten der Axilla oder einer bis drei befallene Lymphknoten bei einem hohen Rückfallrisiko. Zudem gelten die Tumorstadien T3 und T4 als Indikation, keine Möglichkeit einer R0-Resektion sowie eine hohe Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs bei jungen Patientinnen [71].

### 1.2.6 Früherkennung und Prävention

Die Auseinandersetzung mit den Risikofaktoren, gerade in der Lebensführung, ist ein wichtiger Faktor in der Prävention. Kalorienreiche Ernährung, Bewegungsmangel und somit auch stark erhöhtes Körpergewicht, übermäßiger und regelmäßiger Alkoholkonsum sowie Rauchen sollten vermieden werden [42, 71]. Eine Umstellung des Essverhaltens hin zu einer ausgewogenen, abwechslungsreichen Ernährung kann das Risiko einer Mammakarzinom-Erkrankung um bis zu 40 % reduzieren [80]. Zudem ist das Mortalitätsrisiko übergewichtiger Patientinnen im Vergleich zu Frauen mit Idealgewicht bei der Diagnose um 35 % erhöht [163].

Bei hereditären Mammakarzinomen, zum Beispiel durch eine BRCA1/2-Mutation, ist die prophylaktische Mastektomie eine evidenzbasierte Maßnahme, die nachweislich das Risiko eines Karzinoms um 90 % reduziert [71]. Zudem kann die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines kontralateralen Karzinoms um bis zu 40 % gesenkt werden [71]. Allerdings ist eine Zunahme des Gesamtüberlebens nicht gesichert [43]. Auch die prophylaktische Gabe von GnRH-Analoga bei prämenopausalem Brustkrebs senkt das Risiko kontralateraler Mammakarzinome. So konnte eine um 50 % verringerte Wahrscheinlichkeit nach zweijähriger Gabe nachgewiesen werden [76].

Ab dem Alter von 30 Jahren ist eine gesetzliche Früherkennungsuntersuchung in Form einer Tastuntersuchung der Mammæ und der Lymphabflussgebiete möglich [71, 129]. Vom 50. bis zum 69. Lebensjahr wird alle zwei Jahre das Mammographie-Screening angeboten [129], das in diesem Altersbereich 90 % der Karzinome detektiert [76] und die Brustkrebssterblichkeit nachweislich um etwa 15-23 % senkt [42, 59]. Als Nachteile des Screenings sind überflüssige Untersuchungen und Überbehandlungen [42, 43, 59] bei Frauen, deren Mammakarzinom ohne Screening nicht auffällig gewesen wäre und deren Diagnose nicht zum Tode geführt hätte, zu nennen [43], sowie falsch-positive Befunde [42, 43, 59]. Ist eine BRCA1/2-Mutation bekannt, sind Tastuntersuchungen und Mammographie schon früher und auch häufiger möglich. Zudem werden sowohl Ultraschall- als auch MRT-Untersuchungen angeboten [42].

### *Chemoprävention*

Für eine medikamentöse Prävention des ER-positiven Mammakarzinoms mittels Tamoxifen sprechen ab einem Alter von 35 Jahren ein erhöhtes familiäres Risiko, aber auch Erkrankungen der Mamma in der Vorgeschichte [42, 71]. Bei einer Gabe über fünf Jahre [41] zeigt Tamoxifen, ein selektiver Estrogenrezeptormodulator (SERM), eine relative Risikoreduktion für das Auftreten eines HR-positiven Mammakarzinoms von 38-49 % [41, 71]. Zudem können Neuerkrankungen bei Frauen mit erheblichen Risikofaktoren durch Chemoprävention mit Raloxifen (SERM) und Aromataseinhibitoren wie Exemestase und Anastrozole bei über fünfjähriger Einnahme ebenfalls um 50-65 % relativ [41] reduziert werden [42]. Allerdings nehmen aufgrund ungenügenden Wissens der Patientinnen, mangels Erfahrungen des medizinischen Personals bezüglich der Medikamente, ferner aufgrund zu kurzer Beratungen und potenzieller Nebenwirkungen nur ca. 5 % der etwaigen Patientinnen in den USA die Möglichkeit einer Chemoprävention wahr [41]. Außerdem steigt das Risiko für das Auftreten von Endometriumkarzinomen und Thromboembolien [41, 76]. In Deutschland gibt es bisher für keines der oben aufgeführten Medikamente eine Zulassung zur Chemoprävention [76].

### **1.2.7 Komplementärer Therapieansatz**

Nach einer Krebsdiagnose entscheiden sich etwa 60 % der Patienten für die Einnahme von Komplementär- und Alternativmedizin (KAM) [26]. Mit etwa 70 % nimmt ein Großteil der Mammakarzinom-Patientinnen 1 Jahr nach Therapieabschluss KAM zusätzlich zur konventionellen Therapie wahr [98]. Strizich *et al.* zeigten 2015, dass circa 5 Jahren nach Diagnose etwa 24 % der Patientinnen mindestens 1 KAM einnehmen [153]. 73 % dieser Betroffenen begründen dies mit der Krebsdiagnose [98]. Buckner *et al.* belegten 2018 den Zusammenhang von Krebsdiagnose und Einnahme von KAM, wobei zum Beispiel grüner Tee nach der Diagnose statt von 4 % von 28 % der Krebspatientinnen und Curcuma statt von 3 % von 15 % der Erkrankten eingenommen wurde. So erhoffen sich Patienten mit der Einnahme, den Körper zu stärken, um bessere Chancen gegen den Krebs zu haben. Weitere häufige Gründe sind die Bewältigung von Schlafproblemen, Stress, psychischen und physischen Problemen sowie der Therapienebenwirkungen [26]. Interesse an der Einnahme wird durch jüngeres Alter bei der Diagnose, vor allem bei unter 50-jährigen Patientinnen [55], verstärkt [55, 98]. Auch der Erhalt einer Chemotherapie [153] und nicht-metastasierte Mammakarzinome begünstigen das Zuführen von KAM [55]. Vor allem pflanzliche Heilmittel wie grüner Tee, Ingwer [26] oder Ginseng [98] sowie vitamin- und mineralstoffhaltige Nahrungsergänzungsmittel werden eingenommen [98, 153].

Zudem wird eine Ernährungsberatung empfohlen, mittels derer an einer fettarmen, ballaststoffhaltigen und abwechslungsreichen Ernährung mit viel Obst und Gemüse und wenig Alkohol und Nikotin gearbeitet wird [7, 80], durch die mögliches Übergewicht reduziert werden soll [7, 163]. Durch die Ernährungsumstellung können Therapienebenwirkungen verringert und so die Compliance als auch die Lebensqualität der Patienten wesentlich verbessert werden [80]. Eine Stärkung der kardiorespiratorischen Ausdauer, aber auch der Kraft und Leistungsfähigkeit, sowie eine Verbesserung der Therapienebenwirkungen, zum Beispiel des Fatigue-Syndroms, und nicht zuletzt des Selbstbewusstseins und der Lebensqualität werden durch regelmäßige und gezielte körperliche Betätigung erreicht [80, 163].

Die Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie (AGO) beschreibt 2020 in ihren Leitlinien der komplementären Therapie der Kommission Mamma eine hohe Evidenz unter anderem von Curcumin gegen Therapienebenwirkungen wie auftretender Radiodermatitis und empfiehlt Akupunktur, insbesondere bei Übelkeit und Erbrechen durch die Chemotherapie, bei Krebschmerzen und Fatigue [7]. Auch Mistellektine, die nachweislich die Lebensqualität von Krebspatientinnen verbessern, werden empfohlen [7, 80]. Einen hohen Evidenz- und Empfehlungsgrad haben vor allem achtsamkeitsbasierte Stressbewältigung (mindfulness-based stress reduction, MBSR), regelmäßiger Sport und Yoga, wodurch Depressionen, Fatigue und Schlafstörungen reduziert werden können und eine höhere Lebensqualität erreicht werden kann [7, 163].

### **1.2.8 Prognose**

Wichtige und etablierte prognostische Parameter des Mammakarzinoms sind das Alter, Tumoreigenschaften wie die Tumorgöße, das Staging (TNM-Status), die Charakterisierung des Rezeptorstatus (1.2.1 Definition), der histologische Tumortyp und das Grading. Zur Einschätzung des Gesamtüberlebens ist der Nodalstatus der wichtigste Prognosefaktor. Je mehr Lymphknoten befallen sind, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs [71, 76]. Zudem verringert sich das relative 5-Jahres-Überleben mit fortgeschrittenem UICC-Stadium deutlich. Im Stadium I der UICC Klassifikation beträgt die Wahrscheinlichkeit des fünfjährigen Überlebens 100 %, in den Stadien II und III 94 % beziehungsweise 73 % und im IV. Stadium 29 %. Allerdings wird bei Neuerkrankungen mit 41 % das UICC-Stadium I am häufigsten diagnostiziert, Stadium IV mit nur 7 % [129].

## 2. Zielsetzung

Das Mammakarzinom ist mit über zwei Millionen Erstdiagnosen (2018) der am häufigsten diagnostizierte maligne Tumor und Ursache des häufigsten Krebstodes der Frau weltweit [25]. Etwa 55-65 % der Mammakarzinompatientinnen nehmen KAM in Anspruch, unter anderem in Form einer Einnahme von Curcumin, einem Bestandteil des Curcumas [26]. 2020 beschrieb die AGO in ihren Leitlinien der Kommission Mamma eine hohe Evidenz des Curcumins gegen Nebenwirkungen der Krebstherapie (Radiodermatitis) [7]. Zudem konnte in zahlreichen Studien eine krebshemmende, antiproliferative und proapoptotische Wirkung des Curcumins [83, 150, 156] sowie eine Erhöhung der Bioverfügbarkeit desselben durch Piperin, einem Bestandteil des schwarzen Pfeffers, nachgewiesen werden [27]. Mit der vorliegenden Arbeit wird der antikanzerogene Einfluss von Curcuma und schwarzem Pfeffer, auch in Kombination *in vitro* auf die zwei Brustkrebszelllinien MCF-7 und MCF-12a überprüft.

Die Ethanolextrakte Curcuma und schwarzer Pfeffer sowie die Kombination beider Substanzen im Verhältnis 1:1 wurden jeweils unverdünnt sowie in je fünf unterschiedlichen Verdünnungen an beiden HR-positiven Mammakarzinomzelllinien getestet. Mit jeweils dem BrdU-Zellproliferations-, CytoTox-Glo<sup>®</sup>-, CellTiter-Glo<sup>®</sup>- und dem Neutralrot-Test erfolgte die Überprüfung der Wirkung auf Zellwachstum und -viabilität beziehungsweise die Zytotoxizität. Die Stoffwechselaktivität konnte anhand der Messung der Glucose- und Laktatkonzentration und des pH-Werts bestimmt werden. Zudem wurden der Einfluss der jeweiligen Lösungsmittel, der drei Kontrollen Estradiol, Tamoxifen und Endoxifen, als auch die Wirkung von Inhaltsstoffen des Curcumas und des schwarzen Pfeffers und weiteren Extrakten auf die beiden Brustkrebszelllinien untersucht.

Ziel war es, folgende Hypothesen zu überprüfen:

- Curcuma, schwarzer Pfeffer und die Kombination aus beiden Extrakten (in 70 %-Ethanol gelöst) haben eine signifikante Wirkung auf die MCF-7- und MCF-12a-Mammakarzinomzelllinien.
- Der Einfluss zeigt sich in einer Verringerung der Zellproliferation und -viabilität, sowie einer Verminderung des Zellmetabolismus.
- Die Kombination beider Extrakte im Verhältnis 1:1 zeigt dabei die stärkste Wirkung auf die Zelllinien.
- Es gibt keine Unterschiede in der Wirkung auf benigne oder maligne Brustkrebszellen.
- Je höher die Konzentration der Extrakte ist, desto stärker ist der Einfluss auf die MCF-7- und MCF-12a-Zelllinien.

## 3. Materialien und Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Zelllinien

Für die Testverfahren wurden MCF-7- und MCF-12a-Zellen verwendet, zur Kultivierung folgende Nährmedien und Zusätze:

##### MCF-7

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) von CC-Pro (Deutschland) mit Phenolrot, 10 % FKS, 4,5 g/l Glucose, L-Glutamin, 2 ml/l Penicillin/Streptomycin (10 mg/ml), 5 ml/l Amphotericin B (250 µg/ml)

##### MCF-12a

DMEM/Ham's F-12 (Verhältnis 1:1) von CC-Pro (Deutschland) mit 5 % Horse Serum, 2 ml/l Penicillin/Streptomycin (10 mg/ml), 5 ml/l Amphotericin B (250 µg/ml)

#### 3.1.1.1 MCF-7-Zellen



**Abb. 3:** Lichtmikroskopische Aufnahme der MCF-7-Zelllinie. Exemplarische Markierung von Zellen mit Pfeilen, Vergrößerung: 20fach.

Die Brustkrebszellen MCF-7 (Abb. 3) sind epithelialen Ursprungs aus Brustdrüsengewebe und wurden 1970 dem metastasierten Adenokarzinom einer 69-jährigen Frau entnommen [9, 147]. Die maligne Brustkrebszelllinie exprimiert ER [9, 111, 155] und PgR [155], wobei die Verdopplungszeit 29 h beträgt [9]. Durch die Expressierung der ER ist die MCF-7-Linie eine hormonsensitive Brustkrebszelllinie [147] und daher gut für Laboruntersuchungen geeignet.

Dafür wurden die Passagen 11, 14-19 und 21-24 verwendet. In der obigen lichtmikroskopischen Aufnahme ist die typische asymmetrische Morphologie und Anhäufung in Zellnestern gut nachvollziehbar.

### 3.1.1.2 MCF-12a-Zellen



**Abb. 4:** Lichtmikroskopische Aufnahme der MCF-12a-Zelllinie. Exemplarische Markierung von Zellen mit Pfeilen, Vergrößerung: 20fach.

Die epithelialen benignen MCF-12a-Zellen (Abb. 4) entstammen der fibrozystischen Mastopathie einer 60-jährigen Frau [8]. Sie sind ER-positiv [48] und die Verdopplungszeit beträgt 19 h [8]. Verwendet wurden die Passagen 17-19 und 22-26.

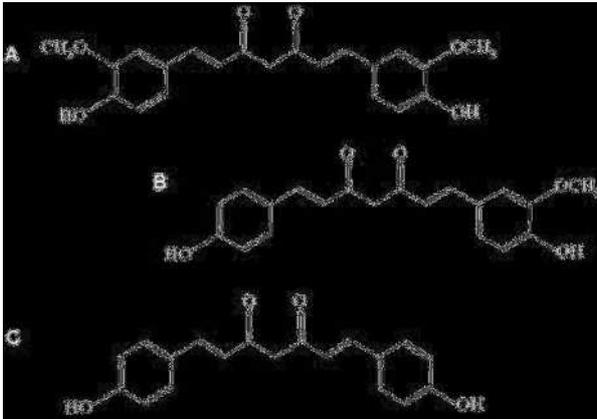
Die typische spindelförmige Morphologie ist auf der mikroskopischen Aufnahme gut zu erkennen.

## 3.1.2 Testsubstanzen

### 3.1.2.1 Curcuma (*Curcuma longa*)

Curcuma, auch als Gelbwurz bezeichnet, stammt aus Südostasien und zählt zur Familie der Ingwergewächse (*Zingiberaceae*). Die Höhe der Pflanze kann bis zu 1 m betragen [12]. Das gelbe Pulver wird aus dem Rhizom (Wurzelstock) hergestellt [12, 27], das bis zu 2,5 m lang werden kann [128]. Es schmeckt scharf, ähnlich wie Ingwer, sowie herb [128]. Schon seit tausenden von Jahren wird Curcuma in der Ayurvedischen Heilkunst traditionell zur Förderung der Verdauung angewendet [12, 103]. Unter anderem durch Zunahme der Gallensekretion [27]. Als alltägliches Gewürz, gerade auch in Curry und Senf, ist Curcuma allgemein bekannt, darüber hinaus dient es als Färbemittel für Lebensmittel sowie Textilien und Kosmetikartikel [27, 79, 83, 103, 128]. Ursprünglich erfolgte der Anbau von Curcuma in Indonesien, Vietnam und Südchina, später auch in Südamerika und Indien [128]. Bestandteile des Curcumas sind mit 70 % größtenteils Kohlenhydrate, mit 2-7% ätherische Öle mit den Sesquiterpenen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tumeron, Curcumol und Zingiberen, sowie zu 3-5 % die

Curcuminoiden Curcumin (anteilig 75-80 %), Demethoxycurcumin (DMC, anteilig 15-20 %) und Bisdemethoxycurcumin (BDMC, anteilig 3-6 %) (Abb. 5) [1, 27, 79, 128].



**Abb. 5:** Strukturformel von Curcumin (A), Demethoxycurcumin (B) und Bisdemethoxycurcumin (C) [1].

Curcuma ist Gegenstand zahlreicher Studien. *In vitro* ließ sich die antioxidative Wirkung von Curcuminoiden und Tetrahydrocurcumin, einem Metaboliten des Curcumins, nachweisen [131, 156]. Zudem zeigt Tetrahydrocurcumin *in vitro* Antimutagenität [156], Curcuma sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (in Tierversuchen) eine krebshemmende Wirkung durch Blockade der Proliferation und Zytotoxizität [79, 83, 150]. Zusätzlich wirkt Curcumin proapoptotisch, antiproliferativ [150], antiinflammatorisch [79, 175] sowie choloretisch [128] und bewirkt eine Erhöhung der Strahlen- [81, 122] und Chemosensitivität von malignen Tumorzellen [82]. Allerdings weisen Curcuminoiden durch schlechte Wasserlöslichkeit und eine niedrige Resorptionsrate im Magen-Darm-Trakt eine geringe Bioverfügbarkeit auf [1, 27, 79]. Um diese zu steigern, werden Curcuminoiden in Kombination mit unterschiedlichen Stoffen getestet, so zum Beispiel mit Piperin, das im schwarzen Pfeffer enthalten ist [1, 27]. So zeigte eine Studie von Panahi *et al.* 2015 nach einer Curcuminoidgabe von 500 mg zweimal täglich über acht Wochen, wobei diese jeweils mit 5 mg Piperin zur Steigerung der Bioverfügbarkeit kombiniert wurden, eine erhöhte antiinflammatorische und antioxidative Wirkung im Vergleich zum Placebo [112].

Studien belegen eine Verminderung von Schmerzen bei diabetischer Neuropathie und Depressionen durch Curcumin beziehungsweise Curcuma [143, 172]. So beobachteten Xia *et al.* 2006, dass der Anstieg von IL-6 und TNF- $\alpha$  bei chronisch gestressten Ratten durch die Gabe von in Ethanol gelöstem Curcuma verhindert werden konnte [172].

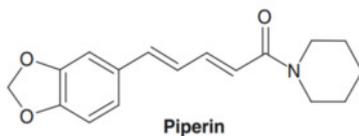
Allerdings gibt es in der Literatur Hinweise und Belege für Wechselwirkungen des Curcumins oder Curcumins mit den Cytochrom-P450-Isoenzymen wie zum Beispiel CYP3A4. So ist von Wechselwirkungen mit verschiedenen oralen Krebsmitteln wie Capecitabin und Enzalutamid berichtet worden [37]. Zudem belegten Prakash *et al.* 2010 eine antithrombotische Wirkung von Curcumaöl mit Hemmung von ADP, Kollagen und Thrombin [119]. Auch Jantan *et al.* zeigten 2007 *in vitro* eine durch Curcumin (Curcuma aromatica) vermittelte Hemmung der Thrombozytenaggregation über Arachidonsäure, Kollagen und ADP [72].

Dagegen wiesen Panahi *et al.* 2014 durch eine tägliche Einnahme von 180 mg eines Curcuminoid-Präparats über acht Wochen als adjuvante Therapie eine Verbesserung der Lebensqualität von Krebspatienten während der Chemotherapie nach. Zudem verringerten sich die Serenspiegel von IL-6,

TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , hs-CRP, Substanz P, CGRP und MCP-1, was auf eine Unterdrückung von Entzündungen innerhalb dieser Patientengruppe hindeutete [114]. 2006 belegten Sharma *et al.* ebenfalls die antiinflammatorische Wirkung des Curcumins und eine Reduktion neuropathischer Schmerzen nach Chemotherapie durch Inhibition der Freisetzung von TNF- $\alpha$  und Stickstoffmonoxid (NO) [143].

### 3.1.2.2 Schwarzer Pfeffer (*Piper nigrum*)

Der Pfeffer gehört zur Familie der Pfeffergewächse (*Piperaceae*) und ist eine immergrüne Kletterpflanze, die bis 10 m hoch wachsen kann. Durch verschiedene Reifegrade und Herstellungstechniken sind die Variationen schwarzer, roter, weißer und grüner Pfeffer bekannt, wobei aus grünem, unreif geerntetem Pfeffer nach Fermentation und Trocknung schwarzer Pfeffer entsteht, der als scharfes Gewürz verwendet wird. Als Herkunftsland wird die Westküste Indiens vermutet, zudem zählen viele weitere tropische Länder, wie zum Beispiel Indonesien, Brasilien, Thailand, Sri Lanka und Vietnam, zu den Anbauländern. Schwarzer Pfeffer enthält bis zu 3,9 % ätherische Öle, davon zu 5-9 % das Hauptalkaloid Piperin (Abb. 6), das für die Schärfe des Pfeffers verantwortlich ist. Zu den Alkaloiden zählen unter anderem Piperettin (0,4-0,8 %) und Piperylin (0,2-0,3 %). Zudem enthält schwarzer Pfeffer zu ca. 50 % Stärke und Flavonoide wie Quercetin und Rhamnetin [128].



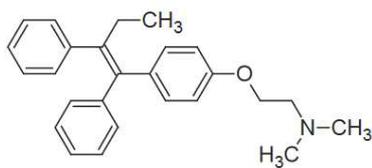
**Abb. 6:** Strukturformel von Piperin [128].

Mehrere Studien belegen eine Verbesserung der Bioverfügbarkeit von Curcuminoiden bei Kombination mit Piperin [1, 19, 27]. Allerdings wiesen Mir *et al.* 2018 bei zwei Krebspatientinnen eine deutliche Senkung des Spiegels von Everolimus (Afinitor<sup>®</sup>) unter die therapeutische Dosis nach der Gabe von Curcuma mit Piperin nach [104].

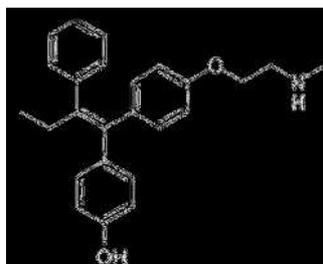
Piperin wie auch Curcuma weisen Wechselwirkungen mit Cytochrom-P450-Isoenzymen und damit Konzentrationsänderungen verschiedener Medikamente auf. So erhöhte sich in der Studie von Bedada *et al.* 2016 die maximale Plasmakonzentration von Diclofenac aufgrund der durch Piperin vermittelten CYP2C9-Hemmung [17]. Alhumayyd *et al.* belegten 2014 eine Steigerung der maximalen Plasmakonzentration von Domperidon durch Piperin. Hierbei führte die orale Gabe von 20 mg Domperidon pro kg KG mit Piperin bei Ratten zu einer Steigerung der maximalen Plasmakonzentration. Diese erhöhte sich bei 30 mg Piperin oral pro kg KG von  $0,8 \pm 0,04$  g/ml auf  $1,13 \pm 0,02$  g/ml ( $p < 0,05$ ) und bei 60 mg Piperin oral pro kg KG auf  $1,6 \pm 0,03$  g/ml ( $p < 0,001$ ) [2]. Bei der Gabe sowohl von Curcuma als auch von schwarzem Pfeffer ist somit auf die zusätzliche Medikation und mögliche Wechselwirkungen zu achten und dies bei Verabreichung zu bedenken.

### 3.1.2.3 Tamoxifen und Endoxifen

Durch die antagonistische Wirkung an ER-positiven Brustkrebszellen wird Tamoxifen (Abb. 7a) in der adjuvanten Hormontherapie vor allem in der Prämenopause verwendet [18]. In der Postmenopause sind Aromatasehemmer wiederum Standard [71, 76, 80]. Bei prämenopausalen Frauen wird eine fünfjährige tägliche Gabe von 20 mg Tamoxifen empfohlen [76], da diese Therapiedauer mit dem selektiven SERM erwiesenermaßen deutlich effektiver ist als eine ein- bis zweijährige Behandlung [44]. Eine fünfjährige adjuvante Gabe von Tamoxifen senkt das 5-Jahres-Rezidivrisiko bei ER-positiven Karzinomen um 11,5 %, das 15-Jahres-Rezidivrisiko um 13,4 %. Zudem ist die Mortalitätsrate nach fünf Jahren um 3,2 % und nach 15 Jahren um 7,9 % [76] beziehungsweise 9 % reduziert [71]. Vor allem in Kombination mit einer Chemotherapie sinkt die Mortalität deutlich [71]. Eine fünfjährige Tamoxifen-Einnahme von unter 50-jährigen Patientinnen mit ER-positivem Karzinom nach einer Chemotherapie mit Anthrazyklinen senkt die Sterberate in den folgenden 15 Jahren um fast 60 % [18, 44]. Allerdings muss die geringere Wirksamkeit bei simultaner Gabe beachtet werden [76].



**Abb. 7a:** Strukturformel von Tamoxifen [64].



**Abb. 7b:** Strukturformel von Endoxifen [70].

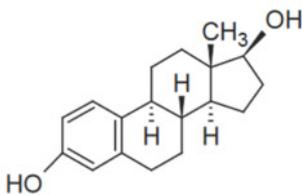
Fisher *et al.* belegten 2005 in einer Studie mit 13.388 Frauen mit erhöhtem Mammakarzinom-Risiko nach fünfjähriger Tamoxifen-Therapie und einem Beobachtungszeitraum von sieben Jahren eine Inzidenz von 2,5 % gegenüber 4,3 % (Placebogabe) bei rezeptorpositiven invasiven Karzinomen. Demgegenüber hat Tamoxifen keinen Einfluss auf die Inzidenz von rezeptornegativen Tumoren [54]. Gleichzeitig erhöht Tamoxifen das Risiko für Endometriumkarzinome [18, 54], zudem treten sexuelle Funktionsstörungen, Hitzewallungen, vaginaler Ausfluss [76], tiefe Beinvenenthrombosen und thromboembolische Ereignisse wie zum Beispiel Apoplexe häufiger auf [54, 71, 76]. In Deutschland gibt es bisher keine Zulassung zur Chemoprävention [76].

Tamoxifen wird in der Leber durch CYP3A4 und CYP2D6 über N-Desmethyl-Tamoxifen oder 4-Hydroxytamoxifen zu Endoxifen (Abb. 7b), dem aktiven Metaboliten, umgewandelt [76, 149]. Um die Wirkung des Tamoxifens unbeabsichtigt weder zu verringern noch zu verstärken, muss auf CYP-Inhibitoren und CYP-Induktoren in der Medikation geachtet werden. CYP2D6 scheint durch Curcumin und Piperin inhibiert zu werden, vor allem bei ausgeprägtem CYP2D6-Metabolismus. Dies zeigten Hussaarts *et al.* 2019 an Probanden, die eine 7,7 % niedrigere Endoxifen AUC (0-24 h), also eine niedrigere Bioverfügbarkeit, nach der täglichen Einnahme von durchschnittlich 20 mg Tamoxifen und dreimal täglich 1200 mg Curcumin aufwiesen im Vergleich zu Probanden, die ausschließlich Tamoxifen zu sich nahmen. Die zusätzliche Gabe von 10 mg Piperin dreimal täglich führte zu einer Verringerung um 12,4 % der Endoxifen AUC. So konnte gezeigt werden, dass durch Curcumin- und Piperingabe deutlich weniger Tamoxifen zu Endoxifen metabolisiert wird. Dies

könnte dazu führen, dass die therapeutische Konzentration nicht erreicht wird. Auffallend war eine ebenfalls niedrigere Tamoxifen-Konzentration, die damit zu erklären wäre, dass Curcumin P-Glykoprotein induziert und somit durch Ausschleusen der Stoffe aus den Zellen in den Darm weniger in die Blutbahn gelangt [70].

#### 3.1.2.4 Estradiol

Mit Estron und Estriol wird Estradiol (Abb. 8) zu den Estrogenen gezählt [66, 154], die wiederum zu den Steroidhormonen gehören. Die Freisetzung von Estradiol erfolgt über die Ausschüttung von Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) im Hypothalamus. Dadurch wird die Synthese von FSH und LH im Hypophysenvorderlappen aktiviert, letzteres wirkt auf die Entstehung des Gelbkörpers, FSH hingegen fördert die Follikelreifung. Im Ovar, hauptsächlich in den Theca-interna- und den Granulosazellen, aber auch in den Nebennieren, im Hoden und in der Plazenta erfolgt die Steroidbiosynthese. Aus Cholesterol entsteht über Testosteron Estradiol, katalysiert durch die Aromatase [66, 154]. Zudem erfolgt die Synthese aus Testosteron auch im Fettgewebe, infolgedessen zählt Adipositas wie bereits beschrieben zu den Risikofaktoren des Mammakarzinoms [76].



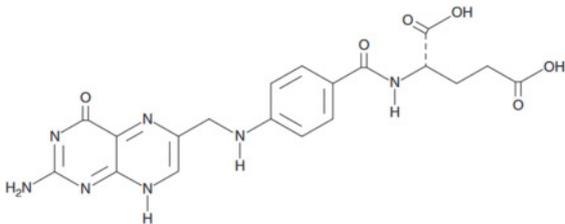
**Abb. 8:** Strukturformel von Estradiol [64].

Estradiol induziert bei der Frau die Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale, reguliert den Zyklus und die Motilität der Gebärmutter. Zudem unterliegen die Kontrolle des Eitransports sowie das Wachstum der Uterusschleimhaut dem Estradiol. Außerdem spielt es in der Schwangerschaft eine große Rolle, erhöht allerdings nach mehrjähriger alleiniger Gabe, zum Beispiel als postmenopausale Hormontherapie, das Risiko eines Endometrium- und auch Ovarialkarzinoms [154]. In der Literatur ist zudem ein vermehrtes Auftreten von Mammakarzinomen unter Estradiol beschrieben [51, 53, 63]. Über die Bindung an ER $\alpha$  und ER $\beta$  entfaltet das Estradiol seine Wirkung. Vor allem im Uterus, in den Mammae und der Vagina, aber auch im Hypothalamus, in den Knochen und der glatten Muskulatur ist ER $\alpha$  zu finden. ER $\beta$  wird dagegen besonders im Ovar, im Herz, in der Lunge und in einigen Hirnregionen, aber auch in Thymus und Milz exprimiert. Ein Großteil des Transports des Estradiols erfolgt über das SHBG, das Sexualhormon-bindende Globulin. Nur 1 % des Estradiols liegt frei vor [154].

#### 3.1.2.5 Folsäure

Als wichtiger Bestandteil der Familie der B-Vitamine ist Folsäure (Abb. 9), auch Vitamin B $_9$  [56], hitzeempfindlich und wasserlöslich und findet sich vor allem in Vollkornprodukten, Milch sowie in

Obst mit orangefarbenem Fruchtfleisch und Gemüse [56, 128, 137]. Ein Mangel in der Schwangerschaft sollte unter anderem durch Supplementierung unbedingt vermieden werden, da er zu Neuralrohrfehlbildung (Spina bifida) [33, 46, 137], Herzanomalien und kognitiven Einschränkungen des Kindes führen kann [33, 137]. Schwangere haben durch ihren erhöhten, etwa verdoppelten täglichen Bedarf an Folsäure (circa 0,8 mg) ein besonders hohes Risiko für einen Folsäuremangel, da sich vermehrt Zellen teilen und Folsäure essenziell für die DNA-Synthese ist [66, 137]. Ein weiteres Symptom des Mangels ist die megaloblastäre Anämie, da Folsäure für die Bildung von Erythrozyten von großer Bedeutung ist [43, 46, 137]. Auch viele andere biochemische Vorgänge sind abhängig von Folsäure, wie zum Beispiel die Purin- und Pyrimidin-Synthese sowie die Entstehung von Methionin aus Homocystein. Dadurch steigt der Homocystein-Anteil unter einem Folsäure-Mangel an und führt zu einer Risikosteigerung von kardiovaskulären und cerebrovaskulären Erkrankungen [24, 46, 100]. Zudem kann eine Minderversorgung zu DNA-Schäden unter anderem durch Strangbrüche, zu gehäuften Mutationsraten sowie zu fehlerhaften Reparaturmechanismen führen [14, 33]. Somit ist die Folge eines Mangels eine Risikosteigerung für die Entstehung veränderter Zellen, die wiederum zu Karzinomen führen können [14].



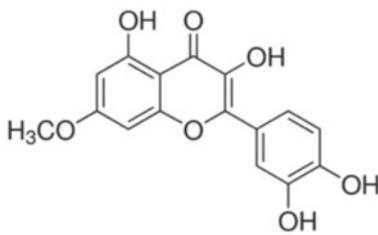
**Abb. 9:** Strukturformel von Folsäure [33].

Verschiedene Karzinome wie zum Beispiel das kolorektale Karzinom, aber auch Brust- und Prostatakrebs korrelieren mit einem Folsäuremangel [46]. 2018 wiesen Kim *et al.* eine signifikante ( $p = 0,006$ ) protektive Wirkung von Folsäure vor möglichen Mammakarzinomen mit einer Mutation des BRCA1-Gens nach [78]. Insgesamt finden sich in der Literatur allerdings widersprüchliche Aussagen bezüglich der Folsäurewirkung auf verschiedene Karzinome [14]. So konnten Vollset *et al.* 2013 einen Zusammenhang zwischen Folsäuremenge und Krebsentwicklung in den ersten fünf Jahren der Behandlung ausschließen [164]. Ebbing *et al.* wiesen 2009 einen Zusammenhang zwischen einer täglichen Folsäuregabe von 0,8 mg kombiniert mit Vitamin B12 (0,4 mg/d) und einem Anstieg der Krebsinzidenz und -mortalität nach [47]. Demgegenüber scheint eine erhöhte Folsäure-Einnahme mit einem verminderten Risiko für Ovarialkarzinome assoziiert zu sein. Auch die positive Wirkung auf Endometriumkarzinome ist in verschiedenen Studien belegt [14, 159, 174].

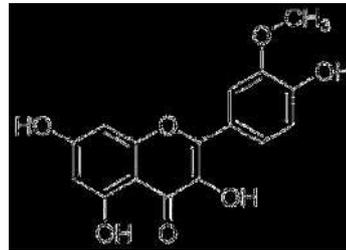
### 3.1.2.6 Rhamnetin und Isorhamnetin

Rhamnetin (Abb. 10a) sowie dessen Isomer Isorhamnetin (Abb. 10b) [34] gehören wie auch Quercetin zu den Flavonoiden. Beide werden mit Stärke und den ätherischen Ölen, welche die Alkaloide Piperin, Piperettin und Piperilin enthalten, zu den Inhaltsstoffen des schwarzen Pfeffers gezählt [50, 128]. Rhamnetin wird auch als 7-Methoxyquercetin bezeichnet und ist wie auch

Isorhamnetin (3-Methylquercetin) ein Metabolit des Quercetins [68, 89, 140], wobei es eine höhere Bioverfügbarkeit und eine stärkere proapoptotische Wirkung im Vergleich zu Quercetin zeigt [89].



**Abb. 10a:** Strukturformel von Rhamnetin [85].



**Abb. 10b:** Strukturformel von Isorhamnetin [171].

Rhamnetin als auch Isorhamnetin sind in den Früchten des Sanddorns (*Hippophae rhamnoides*) enthalten [58, 85], Rhamnetin darüber hinaus im Feld-Beifuß [89]. Isorhamnetin wurde zudem in Gemüse, Kräutern und in Früchten wie Goji-Beeren detektiert sowie in langjährigen Heilpflanzen wie Ginkgo biloba [68, 85], dessen Blätter zur Behandlung kardiovaskulärer und neurologischer Erkrankungen eingesetzt werden [50], wobei Flavonoiden die Hauptwirkung zugesprochen wird [50]. So konnten dem Isorhamnetin viele pharmakologische Eigenschaften, wie zum Beispiel eine antiinflammatorische, antikanzerogene, antioxidative sowie antibakterielle und –virale Wirkung, aber auch neurodegenerative Prävention nachgewiesen werden [58, 140].

Seo *et al.* zeigten 2016 *in vitro* eine Proliferationshemmung von Krebszellen durch Isorhamnetin [140]. Eine antiproliferative und proapoptotische Wirkung auf MCF-7-Zellen, aber auch auf weitere Mammakarzinomzellen belegten Hu *et al.* 2015 [68]. Auch Shi *et al.* wiesen 2012 eine Hemmung der Proliferation durch Isorhamnetin bei einer ösophagealen Krebszelllinie nach einer 72 h-Behandlung nach [144].

Auch Rhamnetin wirkt antibakteriell und antiviral, antioxidativ, antiinflammatorisch sowie antikanzerogen [101]. So belegten Lan *et al.* 2016 eine antiproliferative Wirkung des Rhamnetins sowie einen poapoptotischen Effekt auf MCF-7-Zellen. Eine Konzentration von 25 µM Rhamnetin führte innerhalb einer Inkubation von 48 h bei 37 °C hoch-signifikant zu einer Senkung der Zellviabilität auf ca. 53 % und nach 72 h auf etwa 40 % [85].

### 3.1.3 Geräte, Materialien und Chemikalien

**Tab. 2:** Geräte und Software

Gerät / Software	Hersteller (Land)
Pipetten (Research)	Eppendorf (Deutschland)
Multipipette (Plus)	Eppendorf (Deutschland)
Batteriebetriebene Pipette (Pipetus)	Hirschmann Laborgeräte (Deutschland)
Mikrowelle (Discover SP)	CEM GmbH (Deutschland)
Schüttelinkubator (ZLE 164)	Amersham (UK)
Sicherheitswerkbank (Hera Safe) Klasse	Heraeus Holding GmbH (Deutschland)
Vakuum-Konzentrator Zentrifuge (Concentrator 5301)	Eppendorf (Deutschland)

<b>Zentrifuge (Universal 320R)</b>	Hettich (Deutschland)
<b>Zentrifuge (Biofuge pico)</b>	Heraeus Holding GmbH (Deutschland)
<b>Mikroskop (AxioStar Plus)</b>	Zeiss (Deutschland)
<b>Mikroskop (Axiovert 40 C)</b>	Zeiss (Deutschland)
<b>Brutschrank (Function Line; 37 °C, wasserdampfgesättigte Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub>)</b>	Heraeus Holding GmbH (Deutschland)
<b>Gefrierschrank (-20 °C)</b>	Liebherr Premium (Deutschland)
<b>Kühlschrank (4 °C)</b>	Liebherr Premium (Deutschland)
<b>Gefrierschrank (-80 °C)</b>	Heraeus Holding GmbH (Deutschland)
<b>Waage (Sartorius Basic)</b>	Sartorius AG (Deutschland)
<b>Waage (BP 210 S)</b>	Sartorius AG (Deutschland)
<b>Rollenmischer (RM 5)</b>	Hecht (Deutschland)
<b>pH-Glaselektrode Orion 3-Star</b>	Thermo Scientific (USA)
<b>Vortexer (Reax 2000)</b>	Heidolph (Deutschland)
<b>Vortexer (Vortex-Genie 1)</b>	Scientific Industries (USA)
<b>ELISA Microplate Reader (Model 680)</b>	Bio-Rad (USA)
<b>Multimode Reader (GloMax Discover)</b>	Promega (USA)
<b>Ultraschallbad (Emmi-H22)</b>	EMAG (Deutschland)
<b>HPLC-Apparatur</b>	Knauer (Deutschland)
<b>HPLC-Säule</b>	Knauer (Deutschland)
<b>HPLC-Injektionsspritze (100 µl)</b>	Knauer (Deutschland)
<b>HPLC-Software (ClarityChrom<sup>®</sup>)</b>	Knauer (Deutschland)
<b>Plattenrüttler (TPM-2)</b>	Sarstedt (Deutschland)
<b>Filter 0,2 µm minisart plus</b>	Sartorius (Deutschland)
<b>Filter 0,2 µm</b>	(Deutschland)
<b>Excel 2010</b>	Microsoft (USA)
<b>Citavi 6, Literaturverwaltung</b>	Swiss Academic Software (Schweiz)
<b>SPSS<sup>®</sup> Version 6.8</b>	IBM (USA)
<b>Handmörser</b>	

Tab. 3: Materialien

<b>Material</b>	<b>Hersteller (Land)</b>
<b>24-Well Zellkultur Testplatte, transparent</b>	TPP (Techno Plastic Products AG) (Schweiz)
<b>96-Well-Zellkultur-Testplatte, transparent</b>	Greiner bio-one (Deutschland)
<b>96-Well-Zellkultur-Testplatte, weiß, intransparent</b>	Promega (USA)
<b>Pipettenspitzen 0,5-5000 l</b>	Eppendorf (Deutschland)
<b>Aufsätze Multipipette 25-200 l</b>	Eppendorf (Deutschland)
<b>Bürker-Zählkammer (Tiefe 0,1 mm, 0,0025 mm<sup>2</sup>)</b>	Poly-Optik (Deutschland)
<b>50 ml Zentrifugenröhrchen</b>	Greiner bio-one (Deutschland)
<b>1,5 ml Zentrifugenröhrchen</b>	Greiner bio-one (Deutschland)

<b>0,2 ml SoftTubes</b>	Biozym Scientific (Deutschland)
<b>Zellkulturflaschen (550 ml, 250 ml, 50 ml)</b>	Greiner bio-one (Deutschland)
<b>Serologische Pipette (10 ml, 25 ml)</b>	Greiner bio-one (Deutschland)
<b>Flächendesinfektionsmittel Bacillol AF</b>	Bode Chemie (Deutschland)
<b>Parafilm</b>	Bemis Company (USA)
<b>Magnetrührstäbchen, zylindrisch</b>	
<b>3 ml Kunststoffpipette</b>	
<b>Röhrchenständer</b>	

Tab. 4: Chemikalien und Substanzen

<b>Chemikalie / Substanz</b>	<b>Hersteller (Land)</b>
<b>Curcuma, gemahlen (Weißblechdose)</b>	FUCHS Gewürze (Deutschland)
<b>Pfefferkörner, schwarz (MHD 03.2023)</b>	H·E·S, Hallesche Essig- und Senffabrik (Deutschland)
<b>Nährmedium für MCF-7-Zellen: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM): mit Phenolrot, 10 % FKS, 4,5 g/l Glucose, L- Glutamin, 2 ml/l Penicillin/Streptomycin (10 mg/ml), 5 ml/l Amphotericin B (250 µg/ml)</b>	CC-Pro (Deutschland)
<b>Nährsalzlösung Neutralrot-Test: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM): mit 4,5 g/l Glucose, ohne Phenolrot, ohne L-Glutamin, ohne Zusätze</b>	CC-Pro (Deutschland)
<b>Nährmedium für MCF-12a-Zellen: DMEM/Ham's F-12 (Verhältnis 1:1): mit 5 % Horse Serum, 2 ml/l Penicillin/Streptomycin (10 mg/ml), 5 ml/l Amphotericin B (250 µg/ml), ohne FKS</b>	CC-Pro (Deutschland)
<b>FKS (Fetales Kälberserum)</b>	CC-Pro (Deutschland)
<b>Horse Serum</b>	CC-Pro (Deutschland)
<b>HCl</b>	Carl Roth (Deutschland)
<b>Trypanblau (Trypan Blue Solution 0,4 %) (CAS-Nr.: 72-57-1)</b>	Sigma-Aldrich (Deutschland)
<b>Trypsin-EDTA</b>	CC-Pro (Deutschland)
<b>Quercetin (CAS-Nr.: 117-39-5)</b>	Sigma-Aldrich (Deutschland)
<b>Tamoxifen citrate salt (CAS-Nr.: 54965-24-1)</b>	Sigma-Aldrich (Deutschland)
<b>Endoxifen Hydrochloride Hydrate</b>	Sigma-Aldrich (Deutschland)
<b>Eugenol (CAS-Nr.: 97-53-0)</b>	Sigma-Aldrich (Deutschland)
<b>Demethoxycurcumin (CAS-Nr.: 22608-11-3)</b>	Sigma-Aldrich (Deutschland)
<b>Piperin (CAS-Nr.: 94-62-2)</b>	Carl Roth (Deutschland)
<b>Curcumin (CAS-Nr.: 458-37-7)</b>	Sigma-Aldrich (Deutschland)
<b>Kaffeesäure (CAS-Nr.: 331-39-5)</b>	Carl Roth (Deutschland)
<b>Rhamnetin (CAS-Nr.: 90-19-7)</b>	Carl Roth (Deutschland)

<b>Daidzein (CAS-Nr.: 486-66-8)</b>	Carl Roth (Deutschland)
<b>Bisdemethoxycurcumin (CAS-Nr.: 33171-05-0)</b>	Sigma-Aldrich (Deutschland)
<b>Isorhamnetin-3-rutinosid (CAS-Nr.: 604-80-8)</b>	Carl Roth (Deutschland)
<b><math>\beta</math>-Estradiol (CAS-Nr.: 50-28-2)</b>	Sigma-Aldrich (Deutschland)
<b>Folsäure (CAS-Nr.: 59-30-3)</b>	Sigma-Aldrich (Deutschland)
<b>DMSO (CAS-Nr.: 67-68-5)</b>	Carl Roth (Deutschland)
<b>PBS Dulbecco</b>	Biochrom (Deutschland)
<b>Formafix 4 %</b>	Grimm MED Recycling GmbH (Deutschland)
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Wasserstoffperoxid 35 %)</b>	Carl Roth (Deutschland)
<b>LinRed IHC (Substratkit für Peroxidase)</b>	Linaris (Deutschland)
<b>ImmPRESS Universal Polymer Kit Peroxidase (IHC) (Horse Anti-Mouse/Rabbit IgG, Normal Horse Serum (2,5 %))</b>	Vector Laboratories (USA)
<b>70 %-Ethanol</b>	Carl Roth (Deutschland)
<b>99 %-Ethanol</b>	Carl Roth (Deutschland)
<b>ER AK</b>	Biozol (Deutschland)
<b>ER AK</b>	GeneTex (USA)
<b>PgR AK</b>	Biozol (Deutschland)
<b>Cerb AK</b>	Biozol (Deutschland)
<b>Cell Proliferation ELISA, BrdU Kit (colorimetric)</b>	Roche (Schweiz)
<b>Assay Buffer (CytoTox)</b>	Promega (Schweiz)
<b>In Vitro Toxicology Assay Kit (NTR)</b>	Sigma-Aldrich (Deutschland)
<b>CellTiter<sup>®</sup>-Glo Buffer</b>	Promega (USA)
<b>pH-Puffer</b>	Thermo Scientific (USA)

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkultivierung

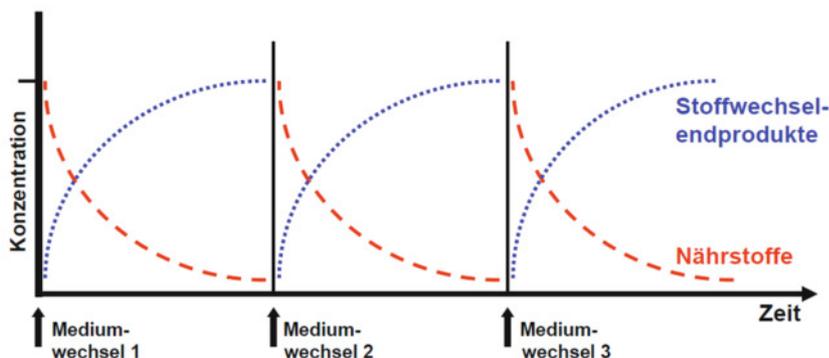
#### Auftauen der Zellen

Die eingefrorenen Zellen wurden nach der Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff (-188 °C) aufgetaut und für die Kultivierung vorbereitet. Nach dem Erwärmen auf Raumtemperatur erfolgte mit 10 ml des entsprechenden Mediums die Überführung in ein Zentrifugenröhrchen sowie das Vortexen. Nach 6 min Zentrifugierung bei 1200 U/min konnte der Überstand abpipettiert und das Pellet mit 5 ml Nährmedium versetzt werden. Um die Zellen voneinander zu lösen, wurde das Zentrifugenröhrchen abermals gevortext und die Suspension in eine kleine sterile 50 ml-Zellkulturflasche überführt. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank.

### Mediumwechsel

Die Wachstumskontrolle und Überprüfung der Zellmorphologie fand unter dem Lichtmikroskop statt. Dreimal wöchentlich wurde das verbrauchte Nährmedium an einer sterilen Werkbank mit einer Pipette abgezogen und die MCF-7-Zellkultur zusätzlich mit 10 ml PBS gespült. Im Anschluss erfolgte, je nach Zellkulturflasche, die Zugabe von 5, 15 oder 25 ml des neuen Mediums.

Der regelmäßige Austausch des Mediums war besonders wichtig, da einige Stoffe von den Zelllinien metabolisiert werden oder sich bei hohen Temperaturen zersetzen, aber für die Zellviabilität und Proliferation von wesentlicher Bedeutung sind. Zudem konnte auf diese Weise zusätzlich die Reinigung von Stoffwechselendprodukten durchgeführt werden (Abb. 11) [10, 60].



**Abb. 11:** zyklische Veränderungen der Nährstoffe und Stoffwechselendprodukte nach Mediumwechsel [60].

### Passagieren

Zeigte sich bei der lichtmikroskopischen Kontrolle eine Konfluenz von 70-90 %, wurde die Kultur steril passagiert und die Zellen in eine größere Kulturflasche umgesetzt. Zunächst erfolgte das Entfernen des Mediums aus der Kulturflasche und das Spülen des Bodens mit PBS. Je nach Größe der Zellkulturflasche wurde mit 0,3 ml, 0,7 ml oder 1,0 ml Trypsin-EDTA und 2,7 ml, 6,3 ml oder 9,0 ml PBS eine Lösung in einem Mischungsverhältnis von 1:10 hergestellt, im Zentrifugenröhrchen gevortext, um eine homogene Phase zu erreichen, und in die Kulturflasche gegeben. Nach 3 min (MCF-7) beziehungsweise 12 min (MCF-12a) bei 37 °C im Brutschrank konnten die Zellen durch leichtes Klopfen vom Flaschenboden vollständig gelöst werden. Die Protease Trypsin bewirkt durch ihre proteolytische Eigenschaft die Spaltung der Peptidbindungen und somit das Lösen der Zelladhärenz, welches durch EDTA, ein  $\text{Ca}^{2+}$ -/Mg-Chelator, verstärkt wird [21]. Mit ca. 4,5 ml, 11,5 ml oder 15,0 ml DMEM + 10 % FKS, abhängig von der Menge der hergestellten Trypsinlösung, konnte die Trypsinierung gestoppt werden. Die zügige Durchführung dieses Schrittes war wichtig, um eine Zellerstörung durch die Trypsinlösung zu verhindern. Mithilfe einer Pipette erfolgte die Überführung der gesamten Lösung in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen. Nach kurzem Vortexen konnte sie 6 min bei 1200 U/min zentrifugiert und der Überstand entgegen dem Zellabsatz abdekantiert werden. Es folgte ein Aufschwemmen des erhaltenen Zellpellets je nach Kulturflaschengröße mit 15-25 ml des jeweiligen zelllinienspezifischen frischen Mediums. Bei Testdurchführungen wurden stattdessen 10 ml des Mediums verwendet. Anschließend erfolgte ein erneutes Vortexen jeder Probe und das Überführen einer definierten Menge der Suspension, abhängig von der zuvor durchgeführten Zellzählung, in die entsprechend größere Flasche und die Kultivierung im Brutschrank bei 37 °C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 %  $\text{CO}_2$ .

### 3.2.2 Herstellung der Ethanol- und Wasserextrakte

Für die Ethanol- als auch für die Wasserextrakte diente das gemahlene Curcuma (Dose) der Firma Fuchs und der gemahlene schwarzer Pfeffer (Mühle) der Firma HES.

In drei verschiedene Reagenzgläser wurde zum einen für Extrakt 1 2,0 g gemahlene Curcuma, für Extrakt 2 2,0 g gemahlener schwarzer Pfeffer und für Extrakt 3 die Kombination beider im Verhältnis 1:1, also jeweils 1,0 g Curcuma und schwarzer Pfeffer, abgewogen und jeweils mit 20 ml 70 %-Ethanol verrührt. Bei drei weiteren Reagenzgläsern mit entsprechend gleichen Inhalten erfolgte das Hinzufügen von je 20 ml Aqua dest. Der besseren Stofflöslichkeit diente im nächsten Schritt die Erhitzung der mit Ethanol versetzten Reagenzgläser aufgrund des niedrigen Siedepunkts von Ethanol bei 60 °C und 80 Watt für 20 min, der mit Wasser versetzten Reagenzgläser bei 80 °C und 100 Watt für 20 min in der Mikrowelle Discover SP von CEM GmbH. Die überstehende Flüssigkeit in den Reagenzgläsern ließ sich abpipettieren und 15 min bei 4030 U/min in der Zentrifuge Universal 320R von Hettich zur Trennung von festen Bestandteilen zentrifugieren. Anschließend erfolgte die Überführung der Flüssigkeit in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße und das Zentrifugieren bei 13.000 U/min über 5 min in der Zentrifuge Biofuge pico von Heraeus Holding GmbH. Es folgte die Filtrierung der überstehenden Flüssigkeit mit einem 0,2 µm-Filter von SYR beziehungsweise Sartorius und eine Einengung mit dem Concentrator 5301 von Eppendorf bei 45 °C auf jeweils 2,0 ml pro Eppendorf-Tube.

Da sich das Curcuma in den Wasserextrakten schlecht löste, erfolgten alle folgenden Versuche mit den Ethanolextrakten.

Zur Testung der Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen fand die Verdünnung der Ethanolextrakte auf folgende Konzentrationen statt (Tab. 5):

**Tab. 5:** Verdünnungsreihe der Extrakte

Verdünnungsstufe	Konzentration	Extraktlösung	70 %-Ethanol
unverdünnt	%		
1:1	%		
1:5	%		
1:10	%		
1:20	%		
1:33	%		

Die Lagerung erfolgte bei -80 °C im Gefrierschrank. Vor jeder Testung wurden die Extrakte aufgetaut und durch Vortexen durchmischt.

### 3.2.3 Herstellung der Kontrollen und Referenzen

#### Kontrollsubstanzherstellung

5,6 mg Tamoxifen, 3,1 mg Endoxifen und 2,7 mg Estradiol dienten als Kontrollsubstanzen und wurden dazu in 1,0 ml, Endoxifen in 500  $\mu$ l, 99 %-Ethanol gelöst. Um dies zu fördern, erfolgte abwechselnd ein Schwenken der Eppendorf-Reaktionsgefäße unter warmem Wasser und ein Durchmischen mit dem Vortex-Genie 1 von Scientific Industries. Zudem wurde Estradiol für die Versuche mit 99 %-Ethanol auf  $1 \times 10^{-6}$  mol/l verdünnt.

Jeweils 500  $\mu$ l 70 %- und 99 %-Ethanol sowie DMSO als auch 99 %-Ethanol mit DMSO (im Verhältnis 1:1) wurden in je ein Eppendorf-Tube pipettiert.

#### Referenzenherstellung

**Tab. 6:** Konzentrationen der für die biochemischen Tests verwendeten Referenzen

Referenzen	Konzentration
Curcumin	mg/ml
Folsäure	mg/ml
Rhamnetin	mg/ml
Isorhamnetin	2,8 mg/ml
Demethoxycurcumin	mg/ml
Bisdemethoxycurcumin	mg/ml

Es erfolgte die Lösung von 0,9 mg Kaffeesäure und 1,0 mg Curcumin in 1,0 ml 99 %-Ethanol und von 1,27 mg Daidzin und 1,5 mg Quercetin in jeweils 1,0 ml 99 %-Ethanol und DMSO im Verhältnis 1:1. 5  $\mu$ l Eugenol wurden zu 495  $\mu$ l 99 %-Ethanol und 1,0 mg Folsäure zu 1,0 ml 99 %-Ethanol hinzugefügt. Um die Löslichkeit der Folsäure zu verbessern, erfolgte an mehreren Tagen abwechselnd der Einsatz im Ultraschallbad und das Vortexen des Eppendorf-Gefäßes. 8,0 mg Rhamnetin und 1,4 mg Isorhamnetin-3-rutinosid ließen sich in 500  $\mu$ l DMSO lösen. 1,69 mg DMC und 1,54 mg BDMC wurden in 1000  $\mu$ l 99 %-Ethanol und DMSO im Verhältnis 1:1 hinzugefügt (Tab. 6).

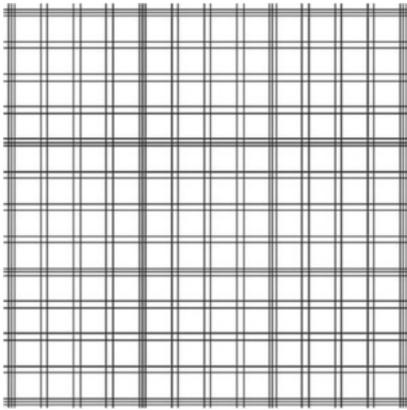
Mit Ausnahme der Folsäure, die im Kühlschrank aufbewahrt wurde, erfolgte die Lagerung aller Referenzen und Kontrollen im Gefrierschrank bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.4 Bestimmung der Lebendzellzahl

Um die Lebendzellzahl vor jeder Versuchsreihe zu bestimmen und somit eine Reproduzierbarkeit zu ermöglichen, erfolgte die Zellzählung mithilfe einer Bürker-Zählkammer (Abb. 12). Deren zwei Zählnetze beinhalten je neun Großquadrate von 1 mm Seitenlänge und  $1 \text{ mm}^2$  Flächeninhalt. Jedes Großquadrat ist wiederum in je  $4 \times 4$  Zählquadrate mit 0,2 mm Kantenlänge und  $0,04 \text{ mm}^2$  Flächeninhalt unterteilt. Die Kammertiefe beträgt 0,1 mm [118].

360  $\mu$ l des jeweiligen Mediums und 20  $\mu$ l Zellsuspension ließen sich in ein 1,5 ml Zentrifugenröhrchen pipettieren und anschließend vortexen. Da Trypanblau durch geschädigte Zellmembranen dringt und entsprechende Zellen blau färbt [136], erfolgte zur Darstellung der avitalen Zellen die

Zugabe von  $20 \mu\text{l}$  des Farbstoffs und ein weiteres Vortexen, sodass ein Mischungsverhältnis der Zellen von 1:20 entstand.  $20 \mu\text{l}$  der Lösung,  $10 \mu\text{l}$  je Zählnetz, wurden luftblasenfrei in eine Bürker-Zählkammer überführt. Durch seine Größe dringt Trypanblau ( $M = 960,8 \text{ g/mol}$ ) nicht in vitale Zellen ein, sodass diese leuchtend hell unter dem Lichtmikroskop erscheinen und ausgezählt werden können [136].



**Abb. 12:** Zählnetz einer Bürker-Zählkammer unter mikroskopischer Sicht [30].

Die Berechnung der Zellzahl erfolgte anhand der folgenden Formel:

$$Z \times 10 \times 10 = \text{vitale Zellen / ml}$$

$Z$  = gezählte Zellen aus zwei unterschiedlichen Großquadraten je Zählkammer

$10$  = Verdünnungsfaktor von 10

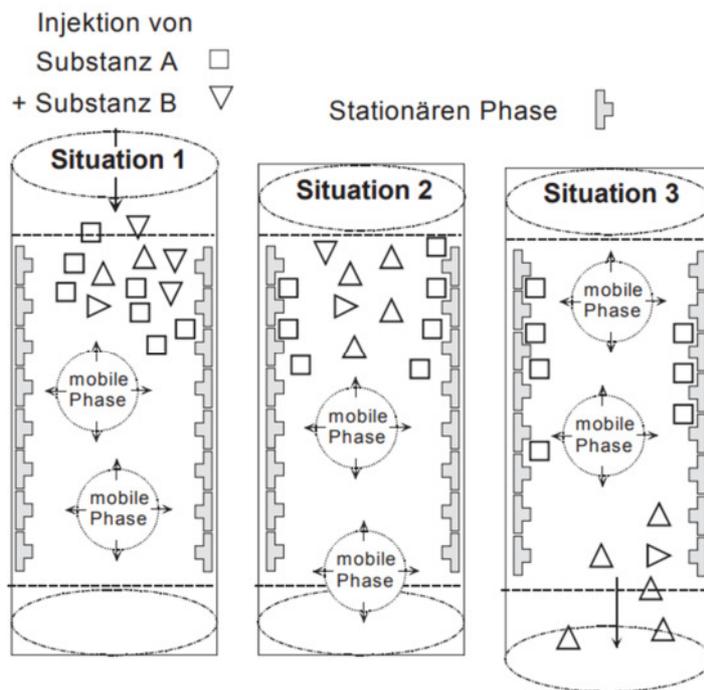
$10$  = Kammerfaktor

Um die Zellzahl pro ml zu errechnen, werden die Kammermaße (Kammertiefe  $0,1 \text{ mm}$  x Fläche  $1 \text{ mm}^2 = 0,1 \text{ mm}^3 = 0,1 \mu\text{l}$ ) mit dem Kammerfaktor ( $10$ ) multipliziert ( $0,1 \mu\text{l} \times 10 = 1 \text{ ml}$ ).

Die entsprechende Zellkonzentration des jeweiligen durchzuführenden Tests konnte anschließend durch Zugabe des zelllinienspezifischen Nährmediums erreicht werden.

### 3.2.5 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

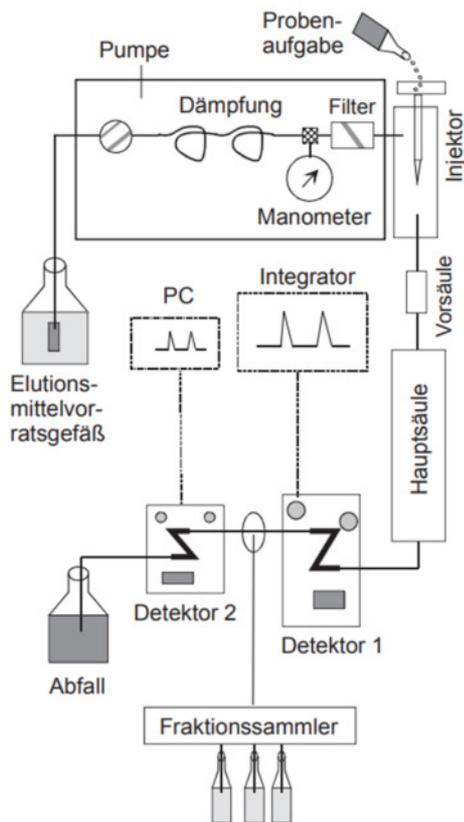
Mithilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), einem analytischen Trennverfahren, erfolgte die Untersuchung der Ethanolextrakte und die graphische Darstellung der Menge der Inhaltsstoffe.



**Abb. 13:** Schematische Darstellung der Trennsäule der HPLC mit stationärer und mobiler Phase [56].

Im Vergleich zu der klassischen Säulenflüssigchromatographie bietet die HPLC eine Verbesserung der Technik und der Materialien. So ist die Apparatur mit Hochdruckpumpen, besonderen Säulenfülltechniken sowie einer Säule aus Stahl oder stabilem Glas mit einer Säulendimension im cm- bis mm-Bereich ausgestattet. Dadurch können Probemengen im pg- bis  $\mu\text{g}$ -Bereich untersucht und kleinste Moleküle (3-10  $\mu\text{m}$ ) in einigen Sekunden bis Minuten detektiert werden. Das Prinzip beruht auf Wechselwirkungen zwischen den Substanzen und den zwei Hilfsphasen der Trennsäule (Abb. 13). Unterschieden wird bei der Umkehrphasenchromatographie die mobile Phase, zum Beispiel aus den beiden polaren Flüssigkeiten Aqua dest. und DMSO, und die stationäre Phase, die aus einer hydrophoben Kohlenstoffsäule (C 18) bestehen kann [56].

Abbildung 14 zeigt den Aufbau der HPLC-Apparatur schematisch. Durch die Hochdruckpumpe wird die mobile Phase mit einem Säulenvordruck von ca. 2-20 MPa in den Injektor befördert. Anschließend werden bis zu 20  $\mu\text{l}$  der zu analysierenden Substanz in Richtung Vorsäule gepumpt. Um Schäden an der Trennsäule zu verhindern, hält die Vorsäule Verunreinigungen zurück. Mit einer Fließgeschwindigkeit von ca. 0,3 – 2,0 ml/min gelangen die Substanzen zur Trennsäule. Daraufhin verlassen die Analyten die Säule, abhängig vom jeweiligen Bindungsverhalten zu den Phasen zu unterschiedlichen Zeiten. Erfolgt eine starke Anziehung zur mobilen Phase, zum Beispiel bei hydrophilen Stoffen, so verlässt die Substanz die Säule früher als nach Bindung an die stationäre Phase bei unpolaren Substanzen. Über Detektoren wird dies anschließend registriert und per Computer ein Chromatogramm erstellt. Die Signalstärke in Form von verschiedenen hohen Peaks, abhängig zur Konzentration, wird dabei in Abhängigkeit von der Retentionszeit dargestellt. Jede Substanz hat im Chromatogramm einen charakteristischen Zeitpunkt und kann somit identifiziert werden. Die Elutionsflüssigkeit wird letztendlich in einen Fraktionssammler geleitet [56].



**Abb. 14:** Aufbau der HPLC-Apparatur [56].

Substanzen mit ähnlichem Bindungsverhalten erfasst der Detektor fast zeitgleich. Diese können daher auf dem Chromatogramm kaum unterschieden werden. Um dies zu vermeiden, werden sowohl Aqua dest. als auch DMSO als mobile Phase verwendet, womit ein Elutionsgradient eingestellt wird. Zunächst wird Aqua dest. eingesetzt und nach einigen Minuten das hochwirksame Lösungsmittel DMSO hinzugefügt. Es übernimmt im Verlauf vollständig die mobile Phase. So können stark bindende Moleküle gelöst und im Anschluss kann die Retentionszeit bestimmt werden. Zur Vermeidung von Schäden an der Trennsäule wurde auf Anraten der Firma Knauer 10 %-Methanol dem Aqua dest. und 10 %-Aqua dest. dem DMSO hinzugefügt [96].

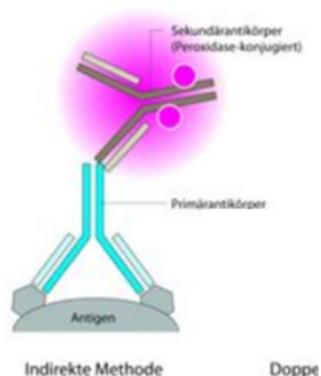
Prozedere:

1. Hochfahren des Computers und der HPLC-Apparatur
2. Starten des Steuerungsprogramms ClarityChrom<sup>®</sup> (Knauer)
3. Ablaufhahn nach unten stellen, Behälter für Abfälle darunter schieben
4. Betätigung der „Purge“-Funktion zum Durchspülen der Pumpe
5. vor dem Start eines Messtages: Erhebung des Leerwerts zur späteren Berechnung der gewonnenen Daten über ClarityChrom<sup>®</sup>
6. mehrmaliges Spülen der Probenspritze mit 99 %-Ethanol
7. Abgabe von 20 µl des Extraktes mithilfe der Injektionsspritze in die Injektionsschleife
8. Beginn der Messung über die Punkte `Analysis` `Run Single`

9. Drehen des Hebels zur Aufnahme des Extraktes in die HPLC-Säule nach 3 min auf `Inject`
10. Zurückstellen des Hebels auf `Load` nach weiteren 2 min
11. Beenden der Messung nach 40 min unter `Analysis`    `Stop`
12. Speicherung der Ergebnisse als PDF- und PRM-Datei
13. Beenden von ClarityChrom<sup>®</sup> und Herunterfahren der HPLC-Apparatur und des Computers

### 3.2.6 Immunhistochemie (IHC)

Um die ER und als auch die PgR der Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MCF-12a nachzuweisen, erfolgte die Durchführung einer immunhistochemischen Untersuchung. Dafür wurde das ImmPRESS Universal Kit von Vector Laboratories, USA, und LinRed von Linaris, Deutschland, verwendet. Das Ergebnis dieses Tests ist von großer Bedeutung für die Prognose und die Therapie des Mammakarzinoms (1.2.1 Definition). Dabei wird das Zielantigen, hier der Rezeptor, von dem primären AK gebunden. Der sekundäre AK, an den das Meerrettich-Peroxidase-Mikropolymer angeheftet ist, konjugiert an den Primärantikörper-Antigen-Komplex (Abb. 15) [161, 162].



**Abb. 15:** Prinzip der Immunhistochemie. Indirekte Methode: Bindung des sekundären Antikörpers (Peroxidase-konjugiert) an den Primärantikörper-Antigen-Komplex [105].

Durch diese Kopplung kommt es zur Aktivierung der Peroxidase. Durch die Zugabe des LinRed wird das Vorliegen der entsprechenden Rezeptoren nachgewiesen und durch eine Rotfärbung sichtbar gemacht [161, 162].

Prozedere:

Tag 1:

- Zellzählung
- Verdünnung der Zellsuspension auf 300.000 Zellen / ml mit entsprechendem Nährmedium
- Aussaat von 300  $\mu$ l / Well auf einer 24 Well-Platte
- Schüttelinkubator für 30 s

- Inkubation für 24 h im Brutschrank bei 37 °C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5,0 % CO<sub>2</sub>
- bei ausreichend Wachstum und zelltypischer Morphologie Tag 2

#### Tag 2:

- Dekantieren des Mediums und dreimaliges Spülen der Wells mit jeweils mindestens 300 µl / Well mit PBS - der Boden der Wells muss bedeckt sein
- Fixierung mit 300 µl Formafix 4 % / Well für 30 min bei RT
- erneutes dreimaliges Spülen mit PBS
- Verdünnung von 15 µl 35 % H<sub>2</sub>O mit 1485 µl Leitungswasser
- Inkubation für 30 min mit 300 µl 0,3 % H<sub>2</sub>O / Well
- Zweimaliges Waschen mit PBS, jeweils 5 min einwirken lassen und zwischendurch leicht schwenken
- Hinzugabe von 4 Tropfen (200 µl) Pferdeserum / Well (Normal Horse Serum, 2,5 % von Vector Laboratories), Inkubation für 20 min bei RT
- Verdünnung der AK laut Beipackzettel mit PBS (ER -AK: 1:40, ER - und PgR-AK: 1:200)
- Abpipettieren des Horse Serums, außer bei der Negativkontrolle
- Pipettieren von je 100 µl des Primärantikörpers in das jeweilige Well
- Inkubation für 24 h im Kühlschrank bei 4 °C

#### Tag 3:

- Dekantieren der AK
- dreimaliges Spülen mit PBS
- Zugabe von 4 Tropfen Sekundärantikörper / Well (ImmPRESS - HRP Universal Polymer Reagenz; Horse Anti-Mouse / Rabbit IgG von Vector Laboratories)
- Inkubation für 30 min bei RT
- erneutes dreimaliges Spülen mit jeweils 300 µl PBS
- Hinzugabe von 200 µl LinRed-Substrat / Well
- Inkubation für 10-30 min bei RT in Dunkelheit bis zur intensiven Farbreaktion
- Dekantieren der Sekundärantikörper
- Abstoppen der Farbreaktion mit 300 µl H<sub>2</sub>O / Well
- Betrachtung durch das Mikroskop und Dokumentation in Form von Fotos

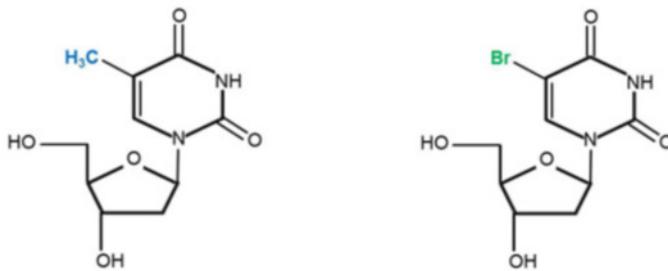
### 3.2.7 Testverfahren

#### 3.2.7.1 BrdU-Zellproliferationstest

Durch den kolorimetrischen BrdU-Immunoassay erfolgt die quantitative Beurteilung der Zellproliferation, beruhend auf der Syntheserate der DNA mittels Messung der Menge des Bromodesoxyuridins (BrdU) in derselben.

Das Pyrimidinanalogon BrdU wird während der Proliferation anstelle der Base Thymidin in die sich replizierende DNA eingebaut (Abb. 16). Um die Bindung des anti-BrdU-POD-AKs an BrdU und dessen Detektion zu ermöglichen, erfolgt eine Fixierung der Zellen und eine Denaturierung der DNA mittels FixDenat. Die an den AK gebundene Peroxidase löst mit der hinzugefügten Substratlösung (Tetramethylbenzidin) einen blauen Farbumschlag aus. Die Farbreaktion und somit das Absorptionsvermögen lässt sich durch den ELISA Microplate Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm messen und korreliert mit der Menge der proliferierenden Zellen [130].

Verwendet wurde das Cell Proliferation ELISA, BRdU Kit (colorimetric) der Firma Roche.



**Abb. 16:** Chemische Struktur von Thymidin (links) und dem Analogon Bromodesoxyuridin [22].

Die üblichen Kontrollen wurden unter anderem mit Tamoxifen und Estradiol durchgeführt, sowie vier Wells als Background-Kontrolle mit jeweils 100  $\mu$ l / Well Medium und Zellen, ohne BrdU-Reagenz-Zugabe. Dies diente als Kontrolle, ob eine unspezifische Bindung des anti-BrdU-POD-AKs an die Zellen bei Abwesenheit des BrdUs erfolgte [130].

Prozedere:

Tag 1:

- Zellzählung
- Verdünnung der Zellsuspension mit entsprechendem Nährmedium (MCF-7 auf 300.000 Zellen / ml und MCF-12a auf 200.000 Zellen / ml)
- Aussaat von 100  $\mu$ l / Well auf 96 Well-Platten nach Plan
- Schüttelinkubator für 30 s
- Inkubation für 24 h im Brutschrank bei 37 °C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5,0 % CO<sub>2</sub>
- bei ausreichend Wachstum und zelltypischer Morphologie Tag 2

Tag 2:

- Auftauen und Vortexen der Extrakte, Referenzen und Kontrollen
- Zugabe von 1  $\mu$ l / Well nach Plan
- Schüttelinkubator für 30 s
- Inkubation für 24 h im Brutschrank bei 37 °C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5,0 % CO<sub>2</sub>

Tag 3:

- Zugabe von 10  $\mu$ l BrdU Reagenz (mit Medium 1:100 verdünnt) / Well, außer Background
- Schüttelinkubator für 30 s
- Inkubation für 3 h (MCF-7) beziehungsweise 4 h (MCF-12a) im Brutschrank bei 37 °C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5,0 % CO<sub>2</sub>
- Abklopfen des Mediums
- Zugabe von 200  $\mu$ l FixDenat / Well, Inkubation für 30 min bei RT
- Abklopfen
- Zugabe von 100  $\mu$ l Anti-BrdU-POD (mit Antibody dilution solution im Verhältnis 1:100) / Well, Inkubation für 60 min bei RT
- Abklopfen
- Dreimaliges Waschen mit 200  $\mu$ l Waschlösung (mit Aqua Dest 1:10 verdünnt) / Well
- Abklopfen nach jeder Waschung
- Hinzugabe von 100  $\mu$ l Substratlösung (Tetramethylbenzidin) / Well
- 5-15 min Inkubation bei RT bis zur gleichmäßigen Blaufärbung
- Stoppen der Reaktion mit 25  $\mu$ l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / Well (Gelbfärbung)
- Schüttelinkubator für 30 s
- Messung mittels ELISA bei 450 nm Wellenlänge und 620 nm Referenzlänge

### 3.2.7.2 CytoTox-Glo<sup>®</sup>-Test

Mithilfe des Zytotoxizitäts-Tests CytoTox-Glo<sup>®</sup>, einem Lumineszenz-Test, erfolgt die Detektion der Menge toter Zellen. Durch das luminogene AFF-Glo<sup>™</sup> Substrat (alanyl-alanyl-phenylalanyl-aminoluziferin) wird die Aktivität einer Protease, freigegeben von toten Zellen, ermittelt. Dies ist nur bei beschädigter Zellmembran möglich, sodass die Menge lebender Zellen nicht gemessen werden kann. Das lumineszierende Signal erfolgt wie bei dem CellTiter-Glo<sup>®</sup>-Test durch eine temperaturstabile Luziferase (Aminoluziferin) [121].

Prozedere:

Tag 1:

- Zellzählung
- Verdünnung der Zellsuspension mit entsprechendem Nährmedium (MCF-7 auf 300.000 Zellen / ml und MCF-12a auf 200.000 Zellen / ml)
- Aussaat von 100  $\mu$ l / Well auf 96 Well-Platten nach Plan
- Schüttelinkubator für 30 s
- Inkubation für 24 h im Brutschrank bei 37 °C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5,0 % CO<sub>2</sub>
- bei ausreichend Wachstum und zelltypischer Morphologie Tag 2

Tag 2:

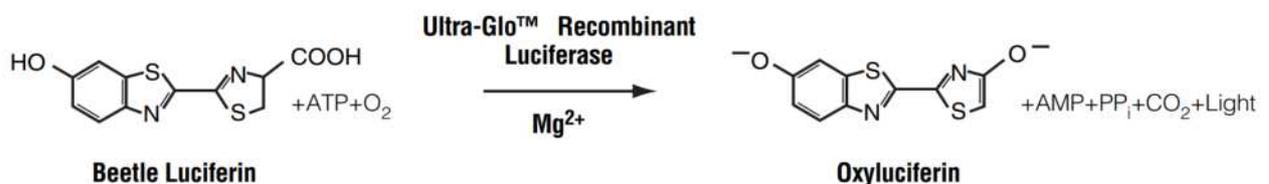
- Auftauen und Vortexen der Extrakte, Referenzen und Kontrollen
- Zugabe von 1 l / Well nach Plan
- Schüttelinkubator für 30 s
- Inkubation für 24 h im Brutschrank bei 37 °C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5,0 % CO

Tag 3:

- Hinzugabe von 50 l CytoTox Reagenz 1 / Well
- Plattenrüttler für 2 min bei 500 U/min
- Inkubation für 15 min bei RT
- Umpipettieren der Well-Platten auf Well-Platten für die Auswertung
- Messung am Multimode Reader GloMax Discover von Promega, Programm: CytoTox-Glo®
- Pipettieren zurück auf die Originalplatten
- Hinzugabe von 50 l CytoTox Reagenz 2 / Well
- Plattenrüttler für 2 min bei 500 U/min
- Inkubation für 15 min bei RT
- Umpipettieren der Well-Platten auf neue Well-Platten für die Auswertung
- erneute Messung am Multimode Reader GloMax Discover

### 3.2.7.3 CellTiter-Glo®-Test (ATP-Lumineszenztest)

Der CellTiter-Glo® Lumineszenz-Test detektiert das vorhandene ATP, das direkt proportional metabolisch aktive Zellen anzeigt. So wird die Anzahl lebensfähiger Zellen ermittelt. Das Reagenz führt eine Zellyse herbei und infolge lumineszierender Signale durch eine temperaturstabile Luziferase wird die Menge des freigewordenen ATPs angezeigt (Abb. 17) [120].



**Abb. 17:** Reaktionsschema des CellTiter-Glo® Lumineszenz-Tests: Über eine Oxygenierung von Luciferin entsteht Oxyluciferin. Die Reaktion wird durch die Luciferase katalysiert und findet mit Beteiligung von Magnesium, Sauerstoff und ATP statt [120].

Prozedere:

Tag 1:

- Zellzählung
- Verdünnung der Zellsuspension mit entsprechendem Nährmedium (MCF-7 auf 600.000 Zellen / ml und MCF-12a auf 400.000 Zellen / ml)
- Aussaat von 50  $\mu$ l / Well auf 96 Well-Platten nach Plan
- Schüttelinkubator für 30 s
- Inkubation für 24 h im Brutschrank bei 37 °C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5,0 % CO<sub>2</sub>
- bei ausreichend Wachstum und zelltypischer Morphologie Tag 2

Tag 2:

- Auftauen und Vortexen der Extrakte, Referenzen und Kontrollen
- Zugabe von 0,5  $\mu$ l / Well nach Plan
- Schüttelinkubator für 30 s
- Inkubation für 24 h im Brutschrank bei 37 °C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5,0 % CO<sub>2</sub>

Tag 3:

- Hinzugabe von 50  $\mu$ l CytoTox Reagenz / Well
- Plattenrüttler für 2 min bei 500 U/min
- Inkubation für 28 min bei RT
- Umpipettieren auf intransparente, weiße Well-Platten für die Auswertung
- Messung am Multimode Reader GloMax Discover von Promega, Programm: CellTiter-Glo<sup>®</sup>

#### 3.2.7.4 Neutralrot-Test (NRU-Test)

Durch die aktive Aufnahme des Neutralrot-Farbstoffes und die Speicherung in Lysosomen können vitale Zellen detektiert werden (Abb. 18). Somit bildet der Test das Ausmaß der Zellviabilität und somit auch der Zytotoxizität ab [146]. Tote Zellen nehmen weder Neutralrot auf noch speichern sie es, da sie keine funktionsfähigen Lysosomen besitzen [60]. Das anschließende Waschen beseitigt nicht aufgenommenen Farbstoff. Ein angesäuertes Ethanolgemisch löst den Farbstoff aus den Zellen, der in der ELISA-Messung detektiert wird [96, 146].



**Abb. 18:** Lichtmikroskopische Aufnahme der MCF-7-Zellen während des NRU-Tests mit Kristallbildung. Vergrößerung: 20fach.

Prozedere:

Tag 1:

- Zellzählung
- Verdünnung der Zellsuspension mit entsprechendem Nährmedium (MCF-7 auf 600.000 Zellen / ml und MCF-12a auf 400.000 Zellen / ml)
- Aussaat von 100  $\mu$ l / Well auf 96 Well-Platten nach Plan
- Schüttelinkubator für 30 s
- Inkubation für 24 h im Brutschrank bei 37 °C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5,0 % CO<sub>2</sub>
- bei ausreichend Wachstum und zelltypischer Morphologie Tag 2

Tag 2:

- Auftauen und Vortexen der Extrakte, Referenzen und Kontrollen
- Zugabe von 1  $\mu$ l / Well nach Plan
- Schüttelinkubator für 30 s
- Inkubation für 24 h im Brutschrank bei 37 °C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5,0 % CO<sub>2</sub>

Tag 3:

- Abmessen von 15 ml Medium (DMEM ohne Zusätze)
- Messung des pH-Werts und Absenkung auf 7,2 durch Zugabe von HCl
- Hinzugabe von 450  $\mu$ l Neutral Red Solution (3 %-Verdünnung)
- Abziehen des Mediums der Well-Platten
- Verteilung von 3 % NRU-Reagenz mit 100  $\mu$ l / Well auf die Platten

- Inkubation für 60 min im Brutschrank bei 37 °C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5,0 % CO
- Überprüfung im Abstand von 20 min im Mikroskop zwecks Kristallbildung (Abb. 18), bei Vorhandensein von Kristallen weiter mit nächstem Schritt
- erneutes Abziehen des Mediums der Well-Platten
- Spülen mit 200 l PBS / Well
- Absaugen des PBS
- Verteilung von 100 l Neutral Red Assay Solubilization Solution / Well
- Schüttelinkubator für 15 min
- Auswertung mit ELISA Microplate Reader von Bio-Rad bei 570 nm; Referenz 655 nm

### 3.2.7.5 Bestimmung von Glucose- und Laktatkonzentration sowie pH-Wert

Zur Energiegewinnung unter Sauerstoffmangel findet statt der oxidativen Phosphorylierung in den Zellen die anaerobe Glykolyse statt, bei der Glucose über Pyruvat zu Laktat anstatt zu Acetyl-CoA für den Citratzyklus umgewandelt wird. Bei Krebszellen kommt es meist trotz ausreichenden Sauerstoffs nach der Glykolyse zum Abspalten von Laktat. Dies wird als aerobe Glykolyse, auch Warburg-Effekt, bezeichnet und findet oft zusätzlich zur oxidativen Phosphorylierung statt. Vor allem aggressive Karzinomzellen weisen einen erhöhten Glucosebedarf auf der zu einer gesteigerten Energiegewinnung führt [87]. Infolgedessen ist im verwendeten Nährmedium (DMEM) die Glucosekonzentration mit 4,5 g/l im Vergleich zur physiologischen Menge (1 g/l) erhöht [60, 62].

Somit kann durch die extrazelluläre Glucosekonzentration (Verbrauchsmessung) eine Aussage über den Metabolismus der Zellen getroffen werden: Je höher die Glucoseaufnahme und somit der Verbrauch ist, desto größer ist der extrazelluläre Konzentrationsabfall. Dies lässt auf eine ausgeprägte Stoffwechselaktivität schließen [60].

Wird viel Glucose verstoffwechselt und dadurch Laktat als Stoffwechselprodukt produziert, äußert sich dies in einem niedrigen pH-Wert. In diesem Fall kann dies für eine schnelle Proliferation der Zellen sprechen [60]. Aus diesem Grund erfolgte zusätzlich die Bestimmung des pH-Werts mit der pH-Glaselektrode Orion 3-Star von Thermo Scientific. Nach einer Kalibrierung mit den standardisierten Pufferlösungen konnte für jede Zelllinie die pH-Wert-Messung durchgeführt werden. Nach jeder Substanz wurde die pH-Sonde mit destilliertem Wasser gereinigt. Zusätzlich gibt ein typisches Purpurrot des Indikators Phenolrot im Nährmedium (DMEM) Hinweise auf einen physiologischen pH-Wert von 7,4. Wird das Medium mit > 7,6 alkalischer zeigt sich eine violette und bei einem niedrigen pH-Wert unter 7,2 eine orangene bis gelbe Farbe [60].

Prozedere:

Tag 1:

- Zellzählung
- Verdünnung der Zellsuspension auf 300.000 Zellen / ml mit entsprechendem Nährmedium
- Aussaat von 100 l / Well auf 96 Well-Platten nach Plan

- Schüttelinkubator für 30 s
- Inkubation für 24 h im Brutschrank bei 37 °C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5,0 % CO
- bei ausreichend Wachstum und zelltypischer Morphologie Tag 2

Tag 2:

- Auftauen und Vortexen der Extrakte, Referenzen und Kontrollen
- Zugabe von 1 l / Well nach Plan
- Schüttelinkubator für 30 s
- Inkubation für 24 h im Brutschrank bei 37 °C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5,0 % CO

Tag 3:

- Abpipetieren des Mediumüberstands
- Zugabe in Zentrifugenröhrchen (1,5 ml)
- Laboranalytische Untersuchung der Glucose- und Laktatkonzentration

### 3.2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse erfolgte mit Microsoft Excel (2010) und IBM SPSS® (Version 6.8).

Jeder Test (BrdU-, CytoTox-Glo®, CellTiter-Glo®- und NRU-Test) wurde insgesamt drei- bis viermal wiederholt und jeweils eine Drei- oder Vierfachbestimmung durchgeführt, um präzisere Ergebnisse zu erhalten. Mit Microsoft Excel konnte der Mittelwert berechnet und die Standardabweichung (SD) erstellt werden. Der Mittelwert des reinen Nährmediums ließ sich vom jeweiligen Mittelwert der Substanzen subtrahieren und das Verhältnis zur Negativkontrolle (NK), der Zellsuspension, berechnen. Zur Darstellung der Testergebnisse musste der Mittelwert der NK auf 100 % festgelegt werden.

Zur Testung der Signifikanz der Substanzen im Vergleich zur NK erfolgte mit IBM SPSS Statistics eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) und ein Post-Hoc-Test. Zudem konnte die Normalverteilung überprüft werden. Das Signifikanzniveau wurde als  $p = 0,05$  ( ) definiert und signifikante Ergebnisse mit  $p < 0,001$ : \*\* und  $p = 0,001 - 0,05$ : \* dargestellt.

## 4. Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der HPLC und der Immunhistochemie sowie der Testverfahren BrdU-Zellproliferationstest, CytoTox-Glo<sup>®</sup>-, CellTiter-Glo<sup>®</sup>-, NRU-Test und der Stoffwechseluntersuchungen vorgestellt. Die Wirkung der drei Extrakte Curcuma, schwarzer Pfeffer und die Mischung aus beiden Substanzen, alle gelöst in 70 %-Ethanol, auf die Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MCF-12a wird in den Konzentrationen 100 %, 50 %, 20 %, 10 %, 5 % und 3 % verglichen (Tab. 5: Verdünnungsreihe der Extrakte). Als Kontrollstoffe dienen Endoxifen, Tamoxifen und Estradiol. Zudem wird der Einfluss der Referenzen Curcumin, Folsäure, DMC und BDMC, Rhamnetin und Isorhamnetin sowie der Alkohole 70 %- und 99 %-Ethanol, DMSO und 99 %-Ethanol / DMSO auf die beiden Zelllinien untersucht.

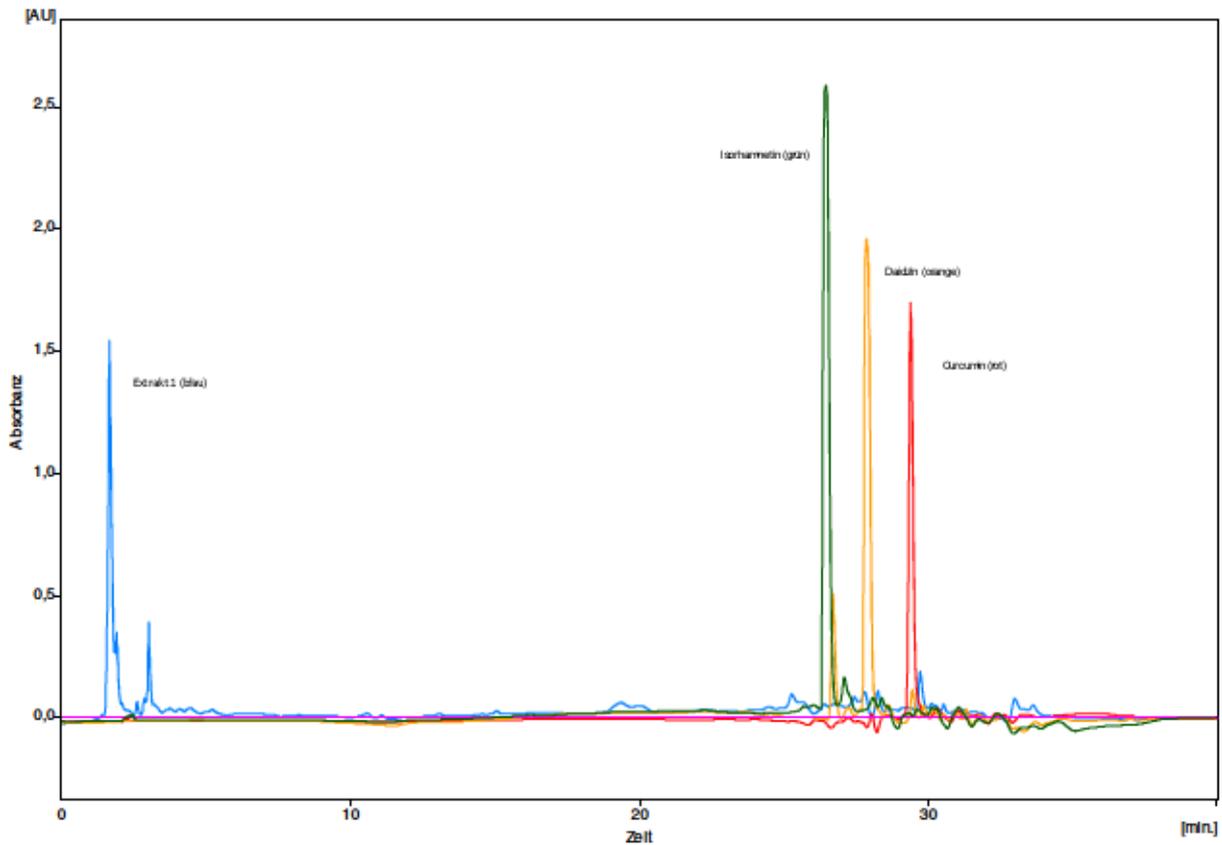
Es erfolgte eine 3x3-fache-Bestimmung bei den CytoTox-Glo<sup>®</sup>- und den CellTiter-Glo<sup>®</sup>-Tests sowie eine 4x4-fache-Bestimmung bei den BrdU-Zellproliferationstests und den NRU-Tests. Die Stoffwechseluntersuchungen wurden aufgrund der Kostspieligkeit bei jeder Zelllinie nur einmal durchgeführt. Für die Immunhistochemie und die Stoffwechseluntersuchungen betrug die Zellzahl 300.000 Zellen / ml. Die Durchführung der BrdU-Zellproliferationstests und der CytoTox-Tests erfolgte mit 300.000 Zellen / ml (MCF-7) beziehungsweise 200.000 Zellen / ml (MCF-12a), bei den CellTiter-Glo<sup>®</sup>- und den NRU-Tests wurde jeweils die doppelte Menge an Zellen pro ml verwendet. Aus den drei beziehungsweise vier Durchführungen der verschiedenen Tests wurde der Durchschnittswert ermittelt.

### 4.1 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

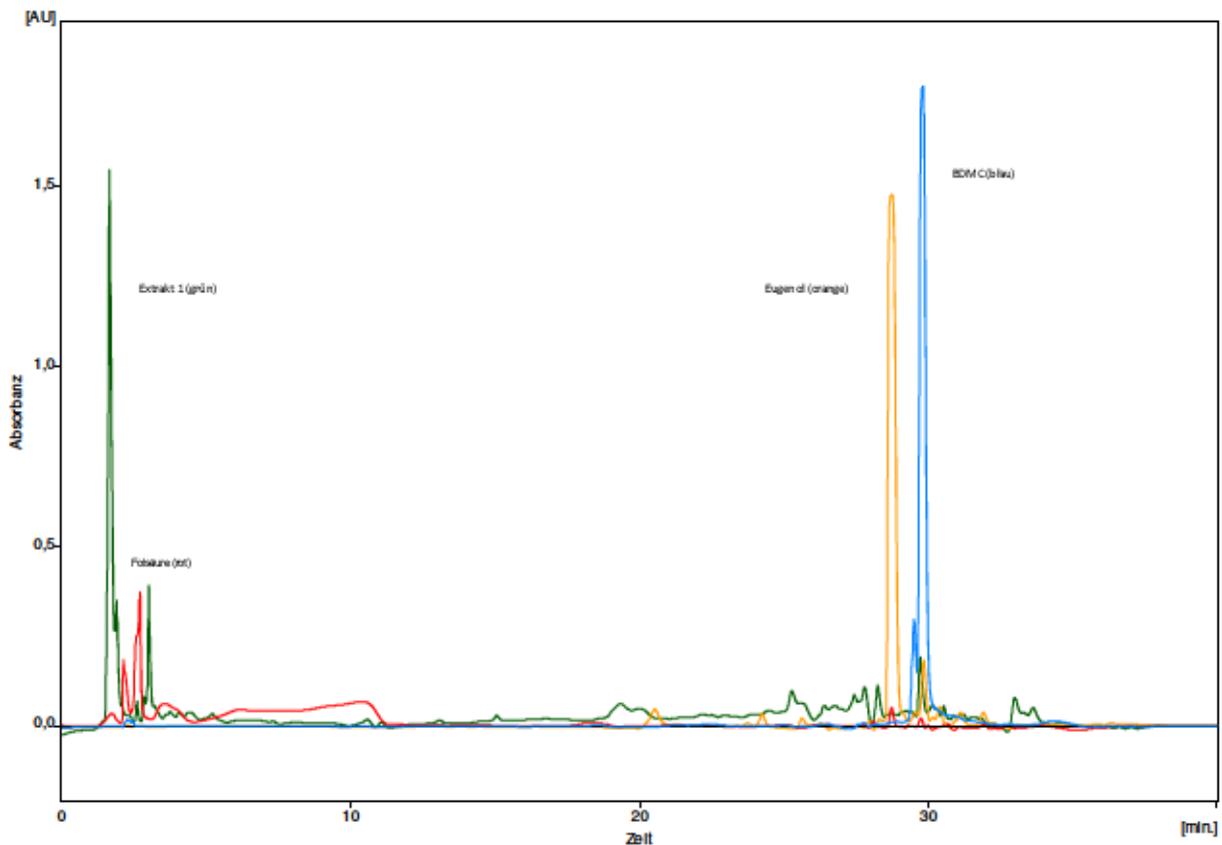
Die folgenden Abbildungen (Abb. 19-30) zeigen die Ergebnisse der HPLC-Analyse, wobei die Absorbanz (AU) in Abhängigkeit der Zeit in min dargestellt ist. Jede Messung wurde zweimal durchgeführt, um Abweichungen zu erkennen und möglichst genaue Ergebnisse zu erhalten. Die Chromatogramme der Extrakte wurden mit jeweils zwei oder drei Graphen der Referenzen übereinandergelegt, um mit übereinstimmenden Peaks zu erkennen, welche Stoffe in den Extrakten enthalten sind.

#### Curcuma in 70 %-Ethanol gelöst

Im Curcuma-Extrakt 1 konnten BDMC, Kaffeesäure und Rhamnetin nachgewiesen werden. Die Retentionszeit beträgt bei BDMC 29,8 min, bei Kaffeesäure 28,2 min und bei Rhamnetin 29,9 min (Abb. 19-22).



**Abb. 19:** Ergebnisse der HPLC in Absorbanz [AU] / Zeit in min: Curcuma in 70 %-Ethanol gelöst (Extrakt 1, blau), Isorhamnetin (grün), Daidzin (orange), Curcumin (rot).



**Abb. 20:** Ergebnisse der HPLC in Absorbanz [AU] / Zeit in min: Curcuma in 70 %-Ethanol gelöst (Extrakt 1, grün), Folsäure (rot), Eugenol (orange), BDMC (blau).

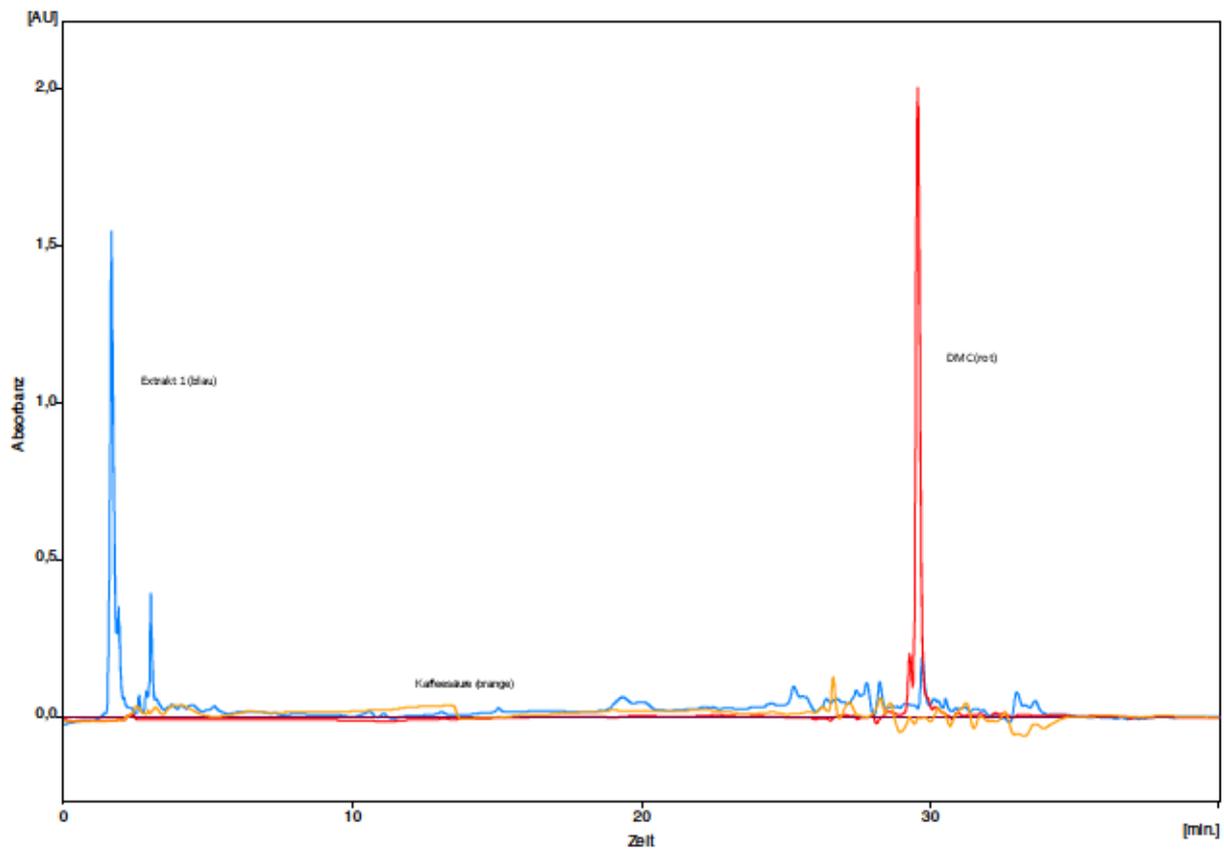


Abb. 21: Ergebnisse der HPLC in Absorbanz [AU] / Zeit in min: Curcuma in 70 %-Ethanol gelöst (Extrakt 1, blau), Kaffeesäure (orange), DMC (rot).

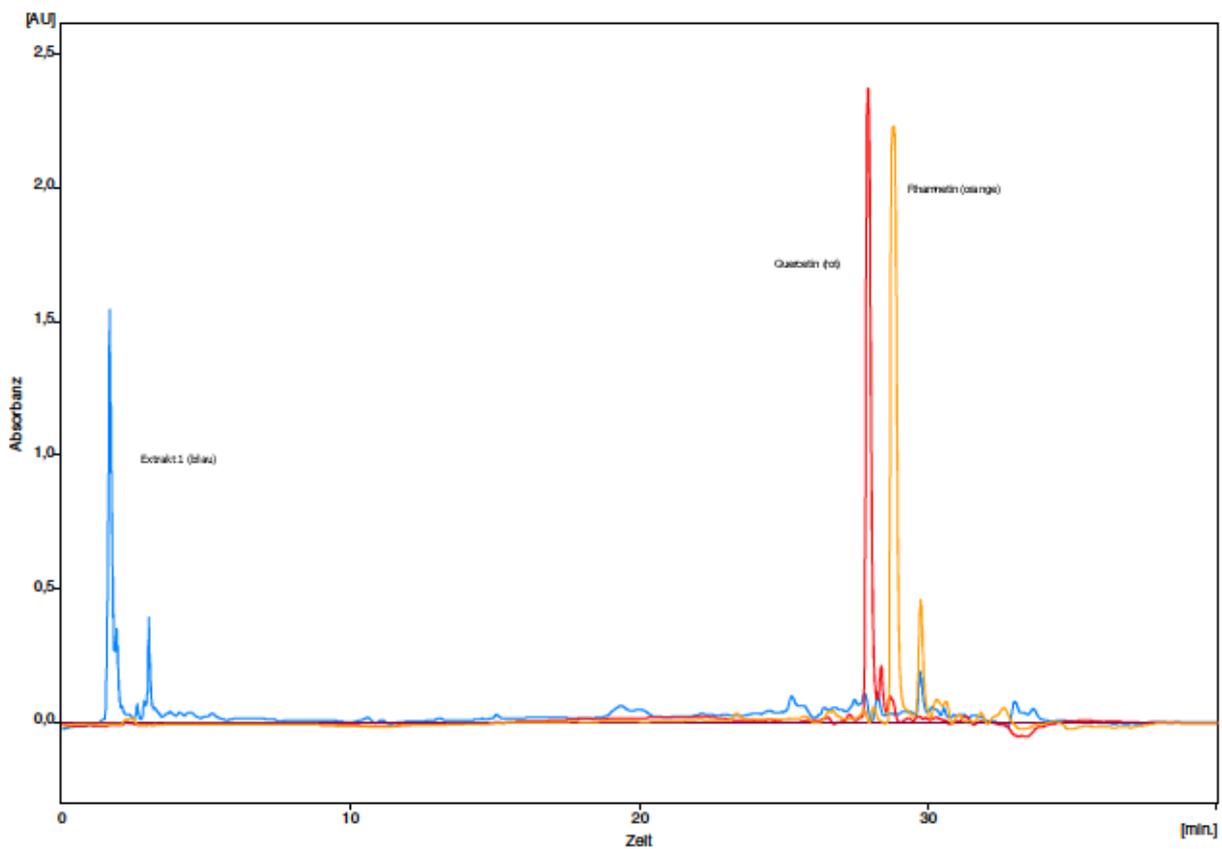
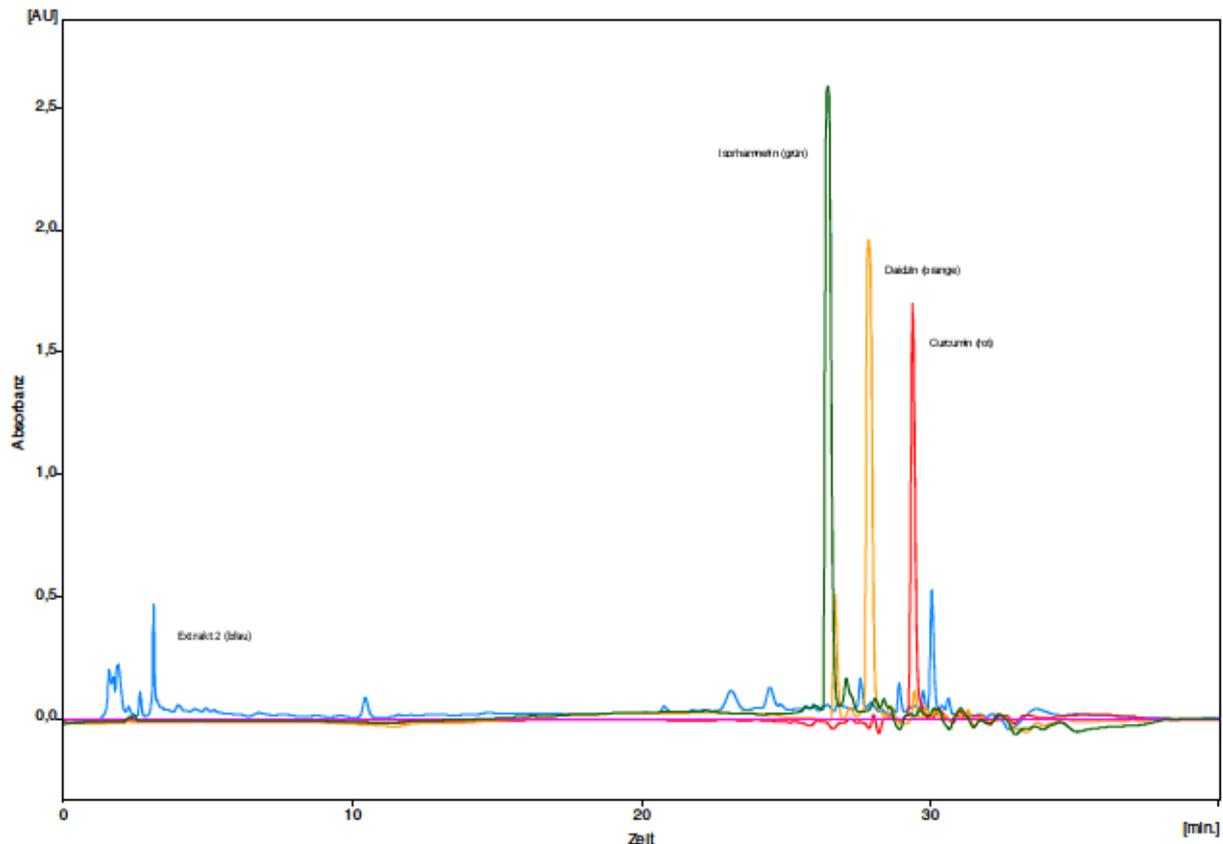


Abb. 22: Ergebnisse der HPLC in Absorbanz [AU] / Zeit in min: Curcuma in 70 %-Ethanol gelöst (Extrakt 1, blau), Quercetin (rot), Rhamnetin (orange).

### Schwarzer Pfeffer in 70 %-Ethanol gelöst

Im Pfeffer-Extrakt 2 konnten Kaffeesäure, Rhamnetin und Folsäure nachgewiesen werden. Die Retentionszeit beträgt bei Kaffeesäure 3,2 min, bei Rhamnetin 29 min und bei Folsäure 3 min (Abb. 23-26).



**Abb. 23:** Ergebnisse der HPLC in Absorbanz [AU] / Zeit in min: schwarzer Pfeffer in 70 %-Ethanol gelöst (Extrakt 2, blau), Isorhamnetin (grün), Daidzin (orange), Curcumin (rot).

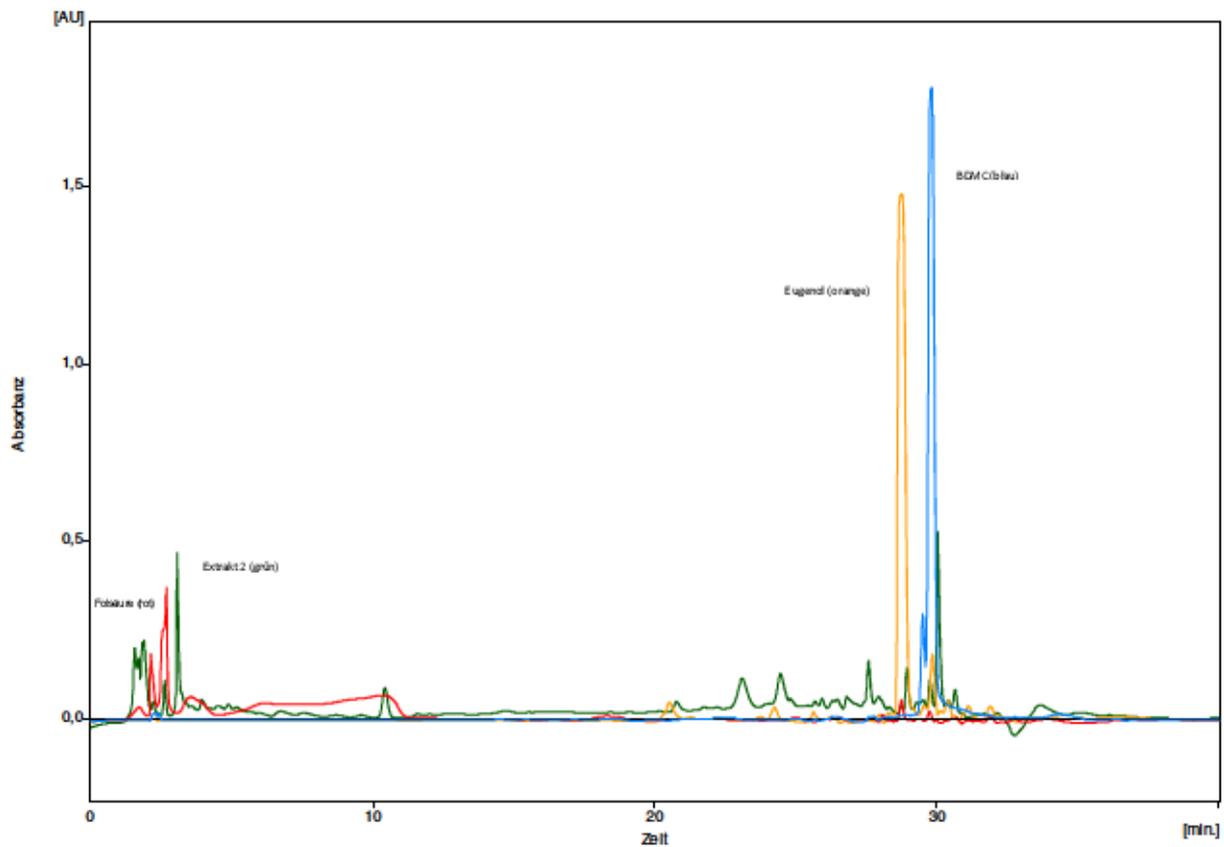


Abb. 24: Ergebnisse der HPLC in Absorbanz [AU] / Zeit in min: schwarzer Pfeffer in 70 %-Ethanol gelöst (Extrakt 2, grün), Folsäure (rot), Eugenol (orange), BDM C (blau).

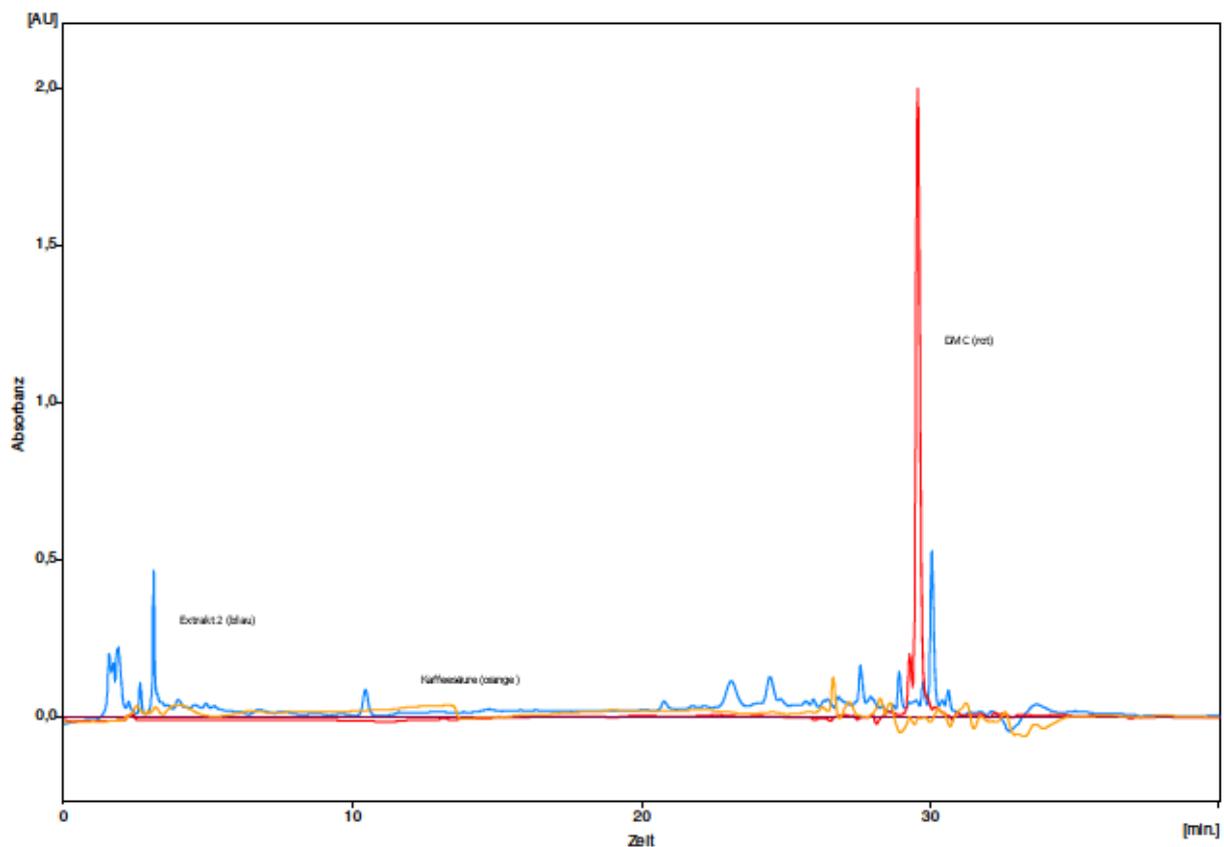
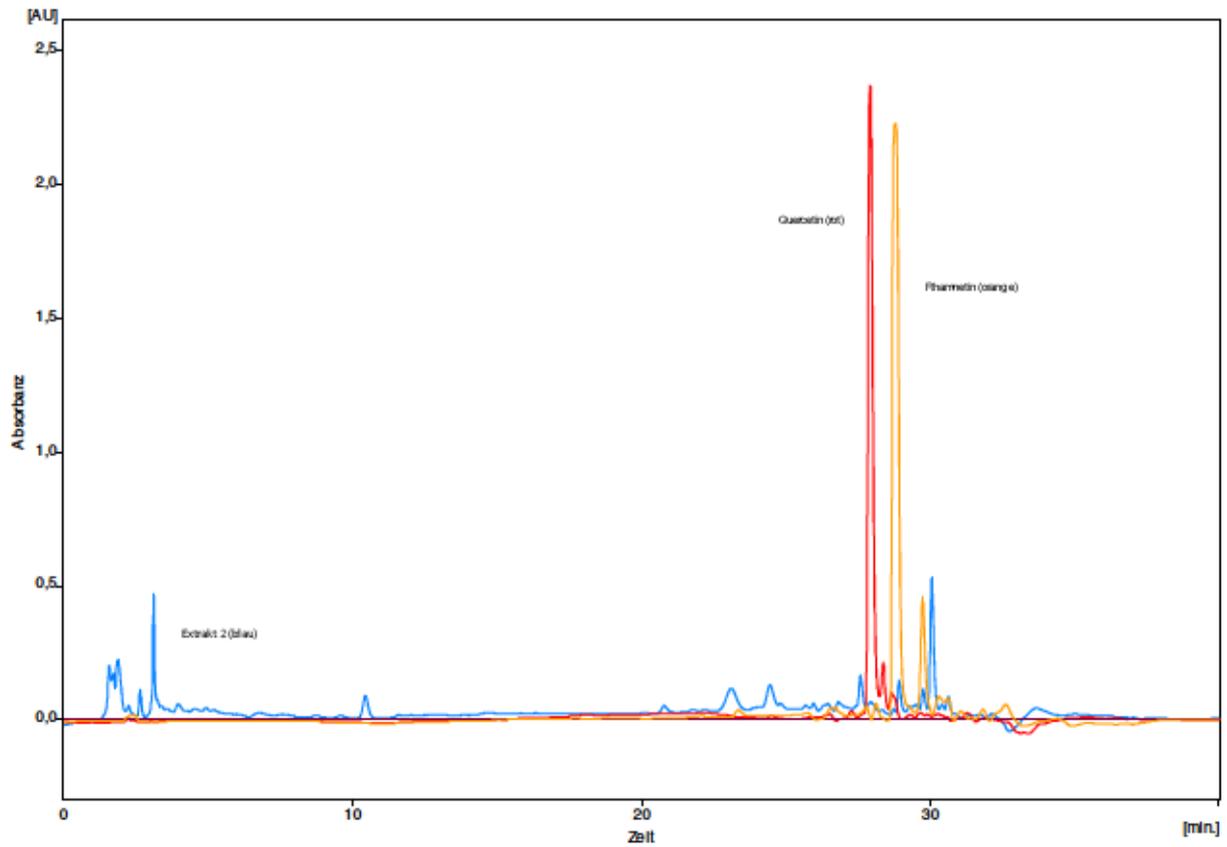


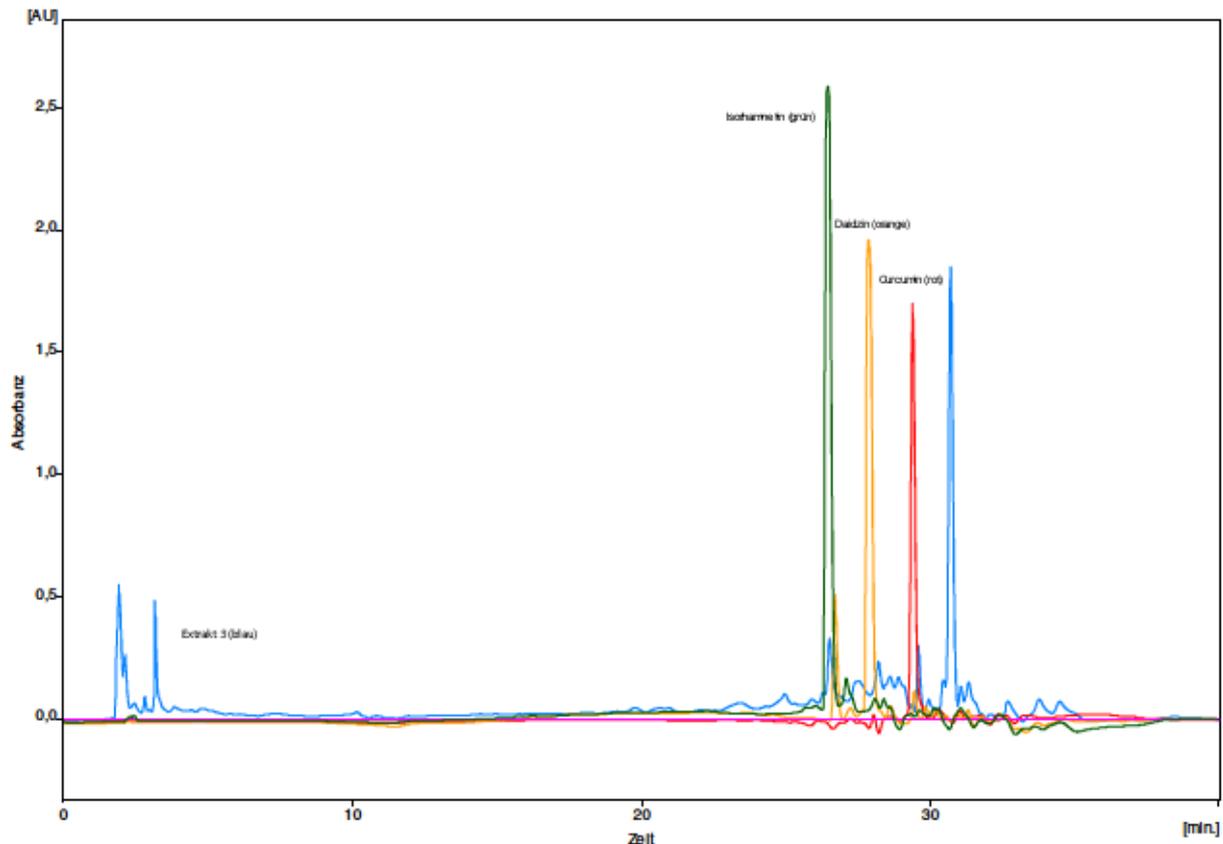
Abb. 25: Ergebnisse der HPLC in Absorbanz [AU] / Zeit in min: schwarzer Pfeffer in 70 %-Ethanol gelöst (Extrakt 2, blau), Kaffeesäure (orange), DMC (rot).



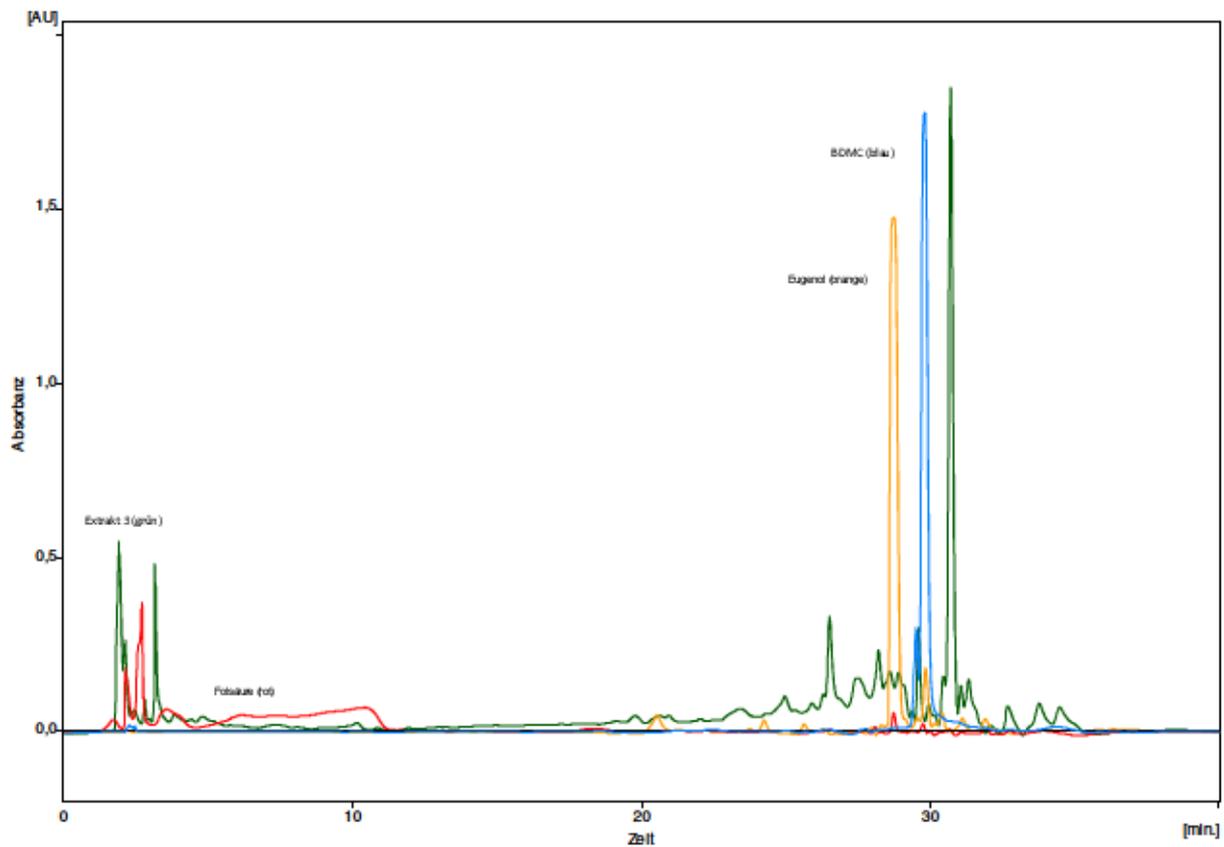
**Abb. 26:** Ergebnisse der HPLC in Absorbanz [AU] / Zeit in min: schwarzer Pfeffer in 70 %-Ethanol gelöst (Extrakt 2, blau), Quercetin (rot), Rhamnetin (orange).

### Curcuma und schwarzer Pfeffer (1:1) in 70 %-Ethanol gelöst

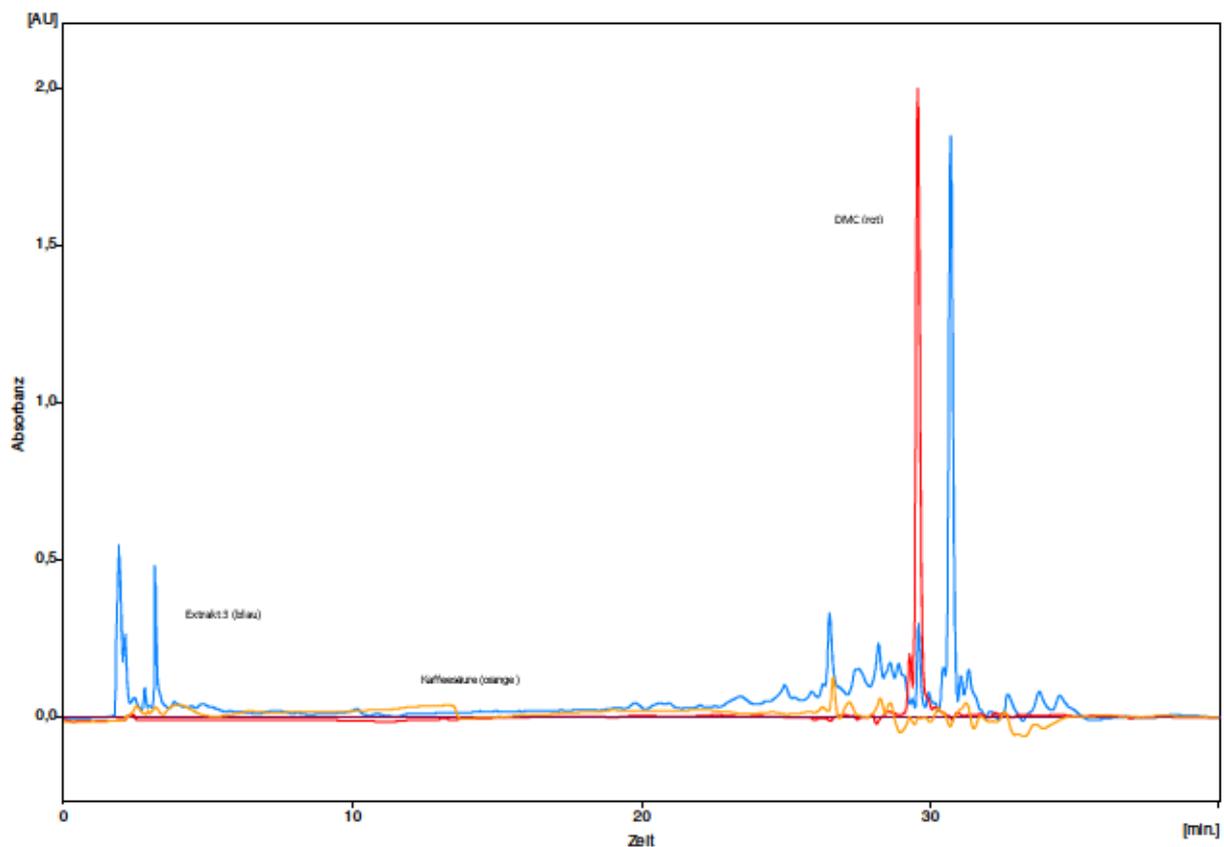
Im Extrakt 3 aus Curcuma und schwarzem Pfeffer konnten Rhamnetin, DMC und Isorhamnetin nachgewiesen werden. Die Retentionszeit beträgt bei Rhamnetin 29 min, bei DMC 29,7 min und bei Isorhamnetin 26,5 min (Abb. 27-30).



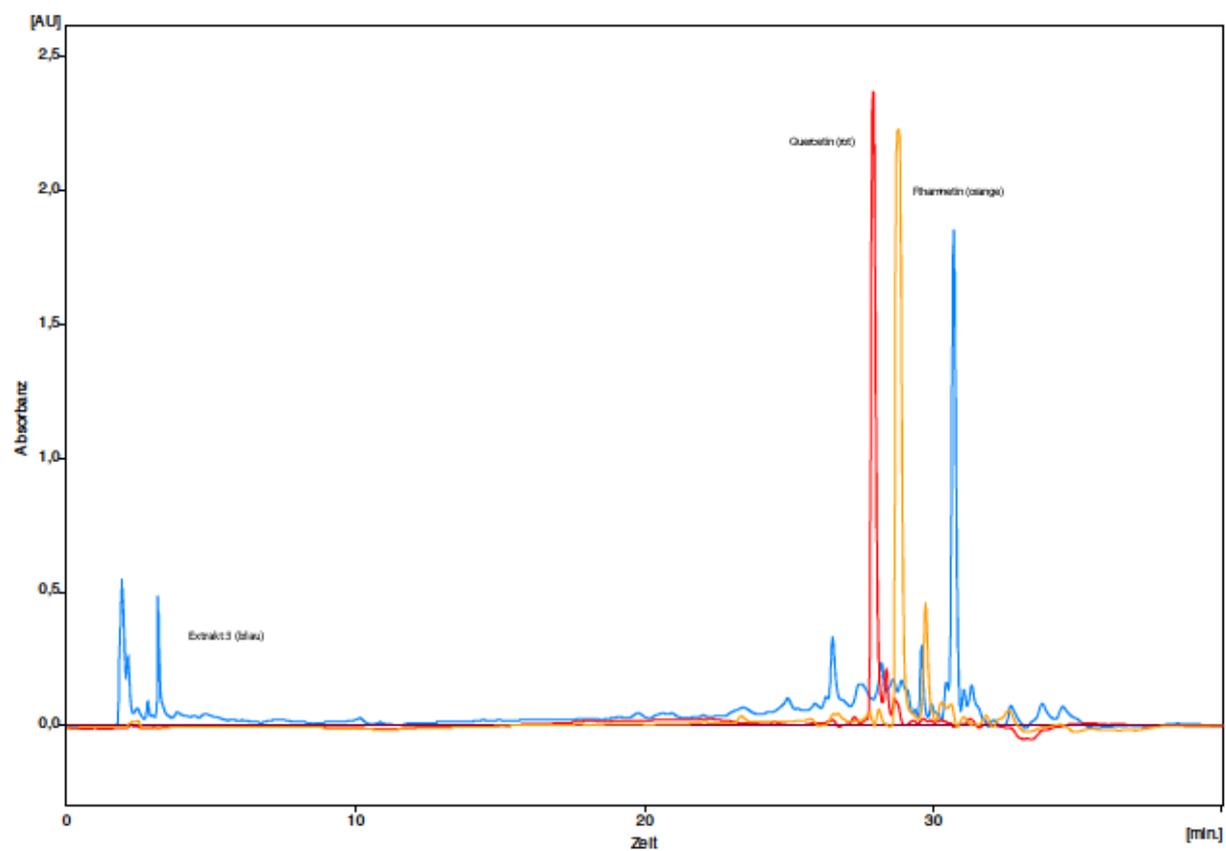
**Abb. 27:** Ergebnisse der HPLC in Absorbanz [AU] / Zeit in min: Curcuma und schwarzer Pfeffer (1:1) in 70 %-Ethanol gelöst (Extrakt 3, blau), Isorhamnetin (grün), Daidzin (orange), Curcumin (rot).



**Abb. 28:** Ergebnisse der HPLC in Absorbanz [AU] / Zeit in min: Curcuma und schwarzer Pfeffer (1:1) in 70 %-Ethanol gelöst (Extrakt 3, grün), Folsäure (rot), Eugenol (orange), BDMC (blau).



**Abb. 29:** Ergebnisse der HPLC in Absorbanz [AU] / Zeit in min: Curcuma und schwarzer Pfeffer (1:1) in 70 %-Ethanol gelöst (Extrakt 3, blau), Kaffeinsäure (orange), DMC (rot).



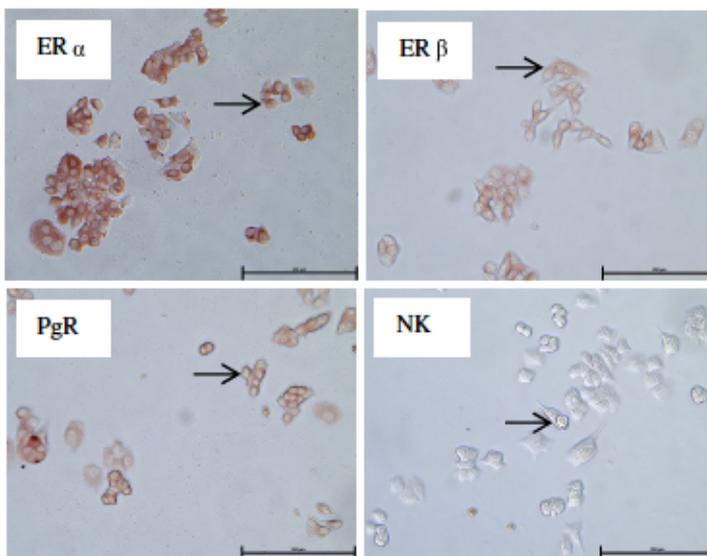
**Abb. 30:** Ergebnisse der HPLC in Absorbanz [AU] / Zeit in min: Curcuma und schwarzer Pfeffer (1:1) in 70 %-Ethanol gelöst (Extrakt 3, blau), Quercetin (rot), Rhamnetin (orange).

## 4.2 Immunhistochemie (IHC)

Die Durchführung der Immunhistochemie erfolgte zum Nachweis der ER  $\alpha$  und  $\beta$ , als auch des PgR. Untersucht wurde der HR-Status der Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MCF-12a. Wird der jeweilige Rezeptortyp durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion detektiert, kommt es zum rötlichen Farbumschlag [161, 162]. Da die Negativkontrolle keine AK enthält, zeigt sich keine Farbreaktion, wodurch Verfälschungen der Ergebnisse unwahrscheinlich sind und die Nachweise bekräftigt werden.

### MCF-7

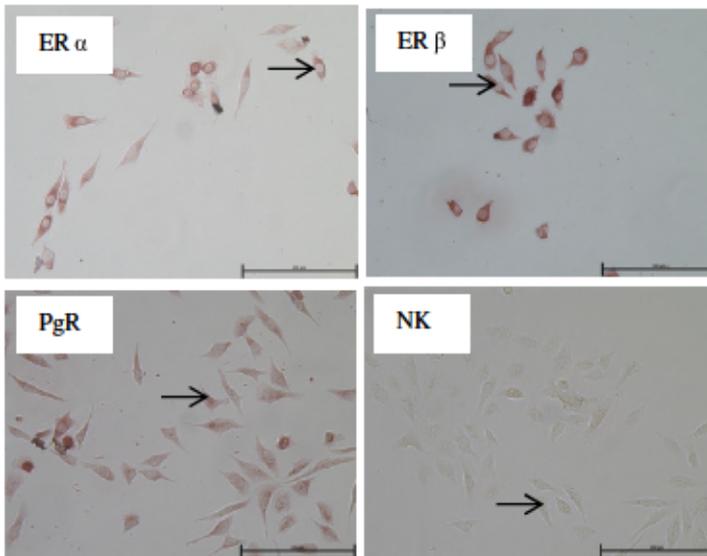
Durch die Rotfärbung konnten in der immunhistochemischen Untersuchung der Zelllinie MCF-7 ER  $\alpha$  und ER  $\beta$  sowie der PgR nachgewiesen werden (Abb. 31).



**Abb. 31:** Lichtmikroskopische Aufnahme der Zelllinie MCF-7 nach immunhistochemischer Reaktion; Rotfärbung = Exprimierung von ER  $\alpha$  und ER  $\beta$ , sowie PgR und NK ohne Farbreaktion; exemplarische Markierung von Zellen mit Pfeilen, Vergrößerung: 20fach.

### MCF-12a

Die Immunhistochemie der Mammakarzinomzelllinie MCF-12a wies wie die Zelllinie MCF-7 durch eine rote Färbung des Zytoplasmas der Zellen ER  $\alpha$  und ER  $\beta$  sowie PgR nach (Abb. 32).



**Abb. 32:** Lichtmikroskopische Aufnahme der Zelllinie MCF-12a nach immunhistochemischer Reaktion; Rotfärbung = Exprimierung von ER  $\alpha$  und ER  $\beta$ , sowie PgR; NK ohne Farbreaktion; exemplarische Markierung von Zellen mit Pfeilen, Vergrößerung: 20fach.

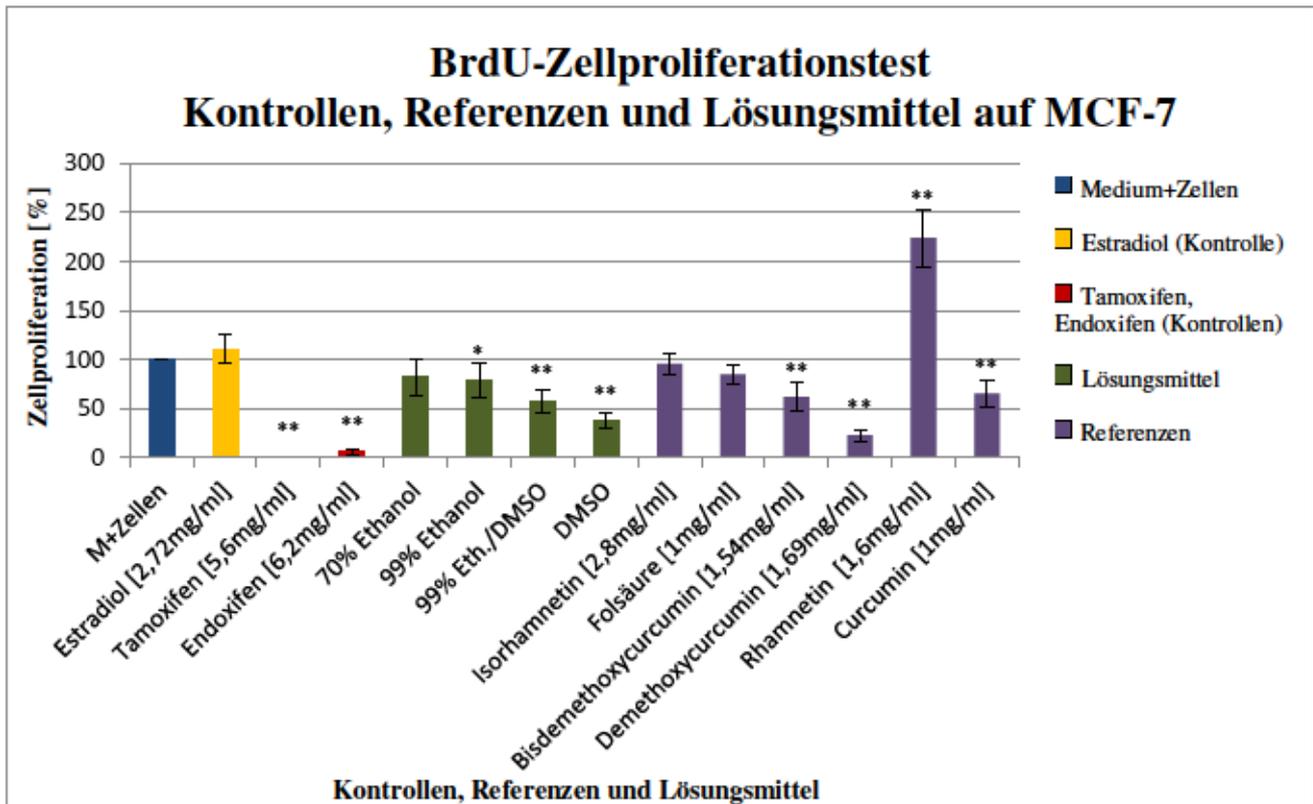
### 4.3 BrdU-Zellproliferationstest

Um den Einfluss verschiedener Substanzen auf die Zellproliferation der Zelllinien MCF-7 und MCF-12a zu bestimmen, wurde der BrdU-Test der Firma Roche durchgeführt. Während der Zellteilung erfolgte der Einbau des Pyrimidinanalogons BrdU statt der Base Thymidin in die DNA. Nach indirekter Antikörperbindung konnte durch die Messung des Absorptionsvermögens durch ELISA nach einer Inkubation von 24 h die Zellproliferation bestimmt werden [130].

Im Folgenden werden die Ergebnisse des BrdU-Proliferationstests der Zelllinien MCF-7 und MCF-12a beschrieben (Abb. 33-36).

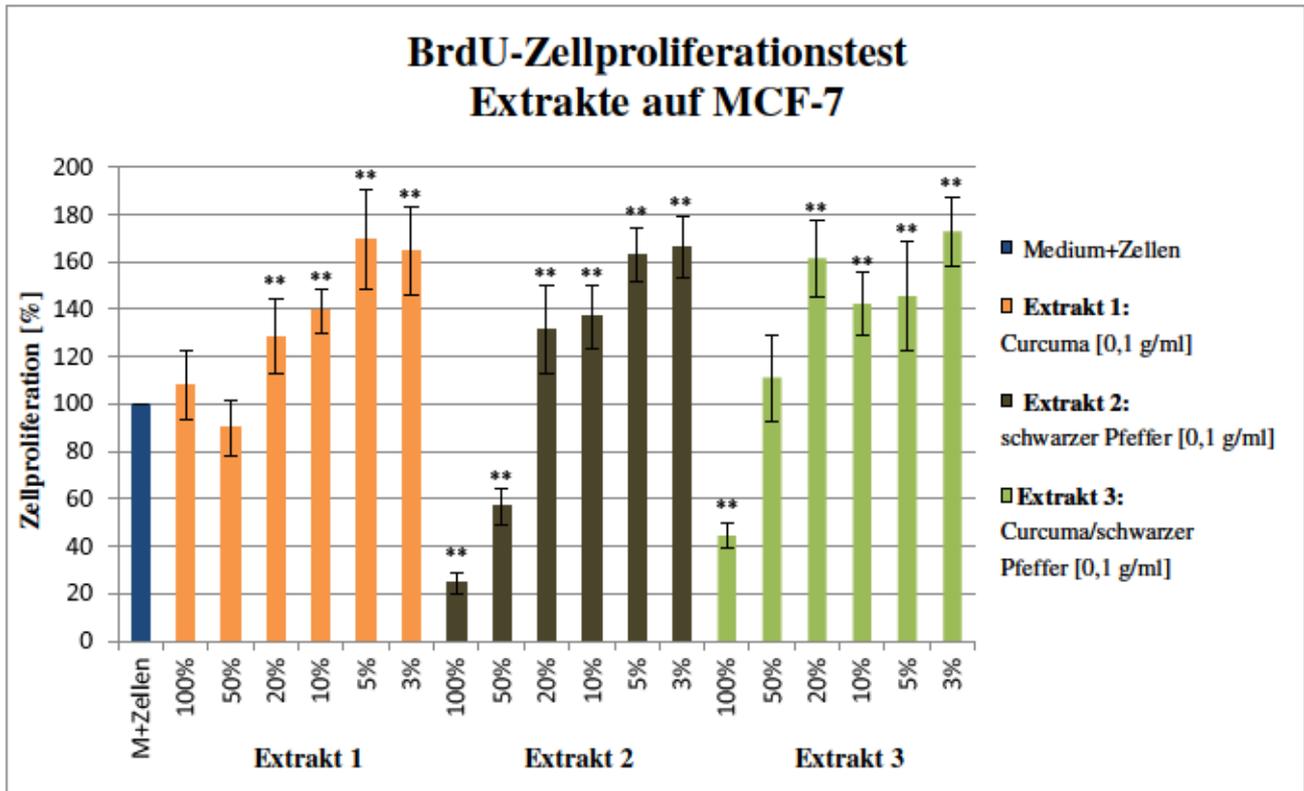
#### MCF-7

Curcumin, DMC und BDMC übten einen hoch-signifikanten ( $p < 0,001$ ) antiproliferativen Einfluss auf die MCF-7-Zellen aus. So reduzierte Curcumin die Proliferation auf 65,3 % (SD = 13 %) und BDMC auf 61,7 % (SD = 14,3 %) im Verhältnis zu den unbehandelten Zellen (Medium und Zellen = 100 %). Die stärkste Wachstumshemmung erfolgte durch DMC mit 22,7 % des Vergleichswerts (SD = 5,8 %). Folsäure und Isorhamnetin sowie 70 %- und 99 %-Ethanol hemmten geringfügig und mit Ausnahme von 99 %-Ethanol nicht-signifikant die Proliferation. 99 %-Ethanol mit DMSO und DMSO allein übten mit 58,3 % und 37,4 % eine hoch-signifikante antiproliferative Wirkung ( $p < 0,001$ ) auf die MCF-7-Zellen aus, Rhamnetin förderte hoch-signifikant ( $p < 0,001$ ) die Proliferation. Die Kontrollen Tamoxifen und Endoxifen zeigten erwartungsgemäß eine hoch-signifikante Hemmung ( $p < 0,001$ ) der MCF-7-Zellproliferation auf 0,3 % und 5,6 %, Estradiol eine Steigerung der Proliferation auf 111 % im Verhältnis zu unbehandelten Zellen (Abb. 33).



**Abb. 33:** BrdU-Proliferationstest MCF-7. Zellproliferation [%]. Einfluss der Referenzen und Kontrollen auf die Proliferation der MCF-7-Zelllinie im Verhältnis zu Medium und Zellen (M+Zellen = 100 %); dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung; signifikante Ergebnisse werden mit  $p < 0,001$ : \*\* und  $p = 0,001 - 0,05$ : \* dargestellt.

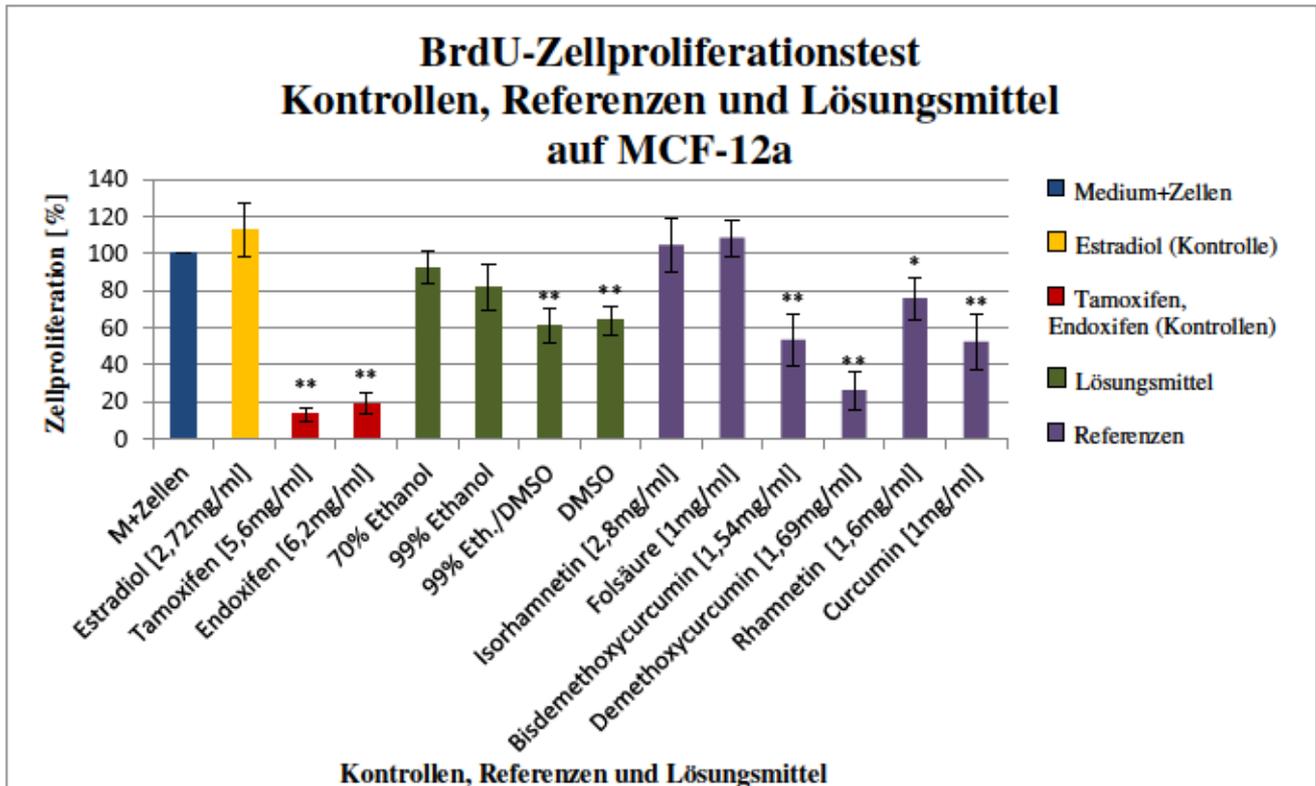
Die unverdünnten Pfeffer- beziehungsweise Curcuma samt Pfeffer-Extrakte 2 und 3 reduzierten hoch-signifikant ( $p < 0,001$ ) die Proliferation der Zellen auf 24,5 % (SD = 4,3 %) und 44,5 % (SD = 5,1 %) im Verhältnis zum Vergleichswert. Bei Abnahme der Konzentration der Extrakte war eine Abnahme des antiproliferativen Einflusses zu erkennen, wobei die 50 %-Verdünnung des Pfeffer-Extraktes 2 ebenfalls noch eine hoch-signifikante ( $p < 0,001$ ) Hemmung der Zellproliferation aufwies (56,8 %). Das Curcuma-Extrakt 1 zeigte keine antiproliferative Wirkung, ebenso Verdünnungen  $\leq 20$  % bei Extrakt 2 und  $\leq 50$  % bei Extrakt 3 (Abb. 34).



**Abb. 34: BrdU-Proliferationstest MCF-7.** Zellproliferation [%]. Einfluss der drei Extrakte auf die Proliferation der MCF-7-Zelllinie im Verhältnis zu Medium und Zellen (M+Zellen = 100 %); Extrakt 1 = Curcuma [0,1 g/ml], Extrakt 2 = schwarzer Pfeffer [0,1 g/ml], Extrakt 3 = Curcuma und schwarzer Pfeffer [jeweils 0,05 g/ml] alle in 70 %-Ethanol gelöst. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung; signifikante Ergebnisse werden mit  $p < 0,001$ : \*\* und  $p = 0,001 - 0,05$ : \* dargestellt.

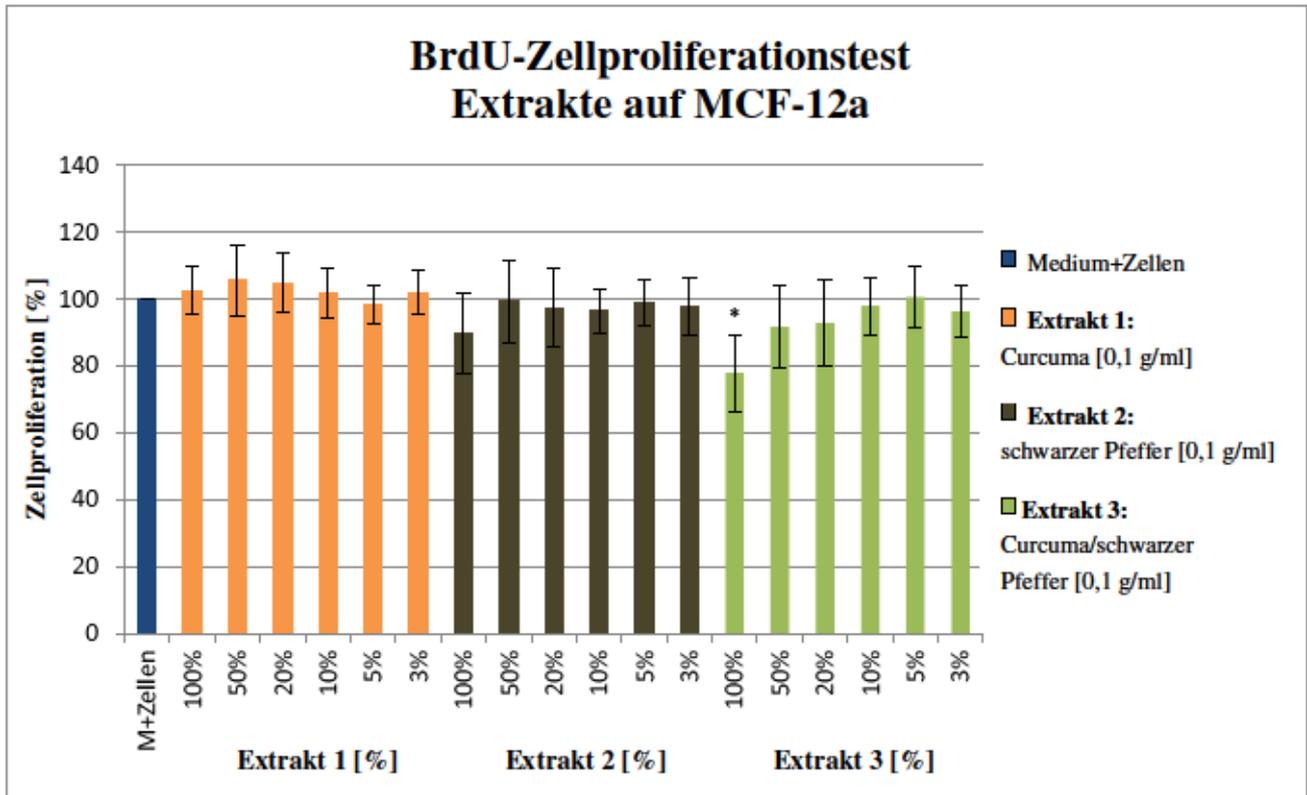
### MCF-12a

In den Vordergrund trat die hoch-signifikante ( $p < 0,001$ ) Reduktion der Proliferation durch Curcumin, DMC und BDMC im Verhältnis zu den unbehandelten Zellen (Medium und Zellen = 100 %). Curcumin zeigte mit 52,5 % (SD = 14,5 %), BDMC mit 53,4 % (SD = 14 %) einen antiproliferativen Einfluss auf die MCF-12a-Zellen. DMC hemmte mit 26,2 % (SD = 10,2 %) das Wachstum am stärksten im Verhältnis zum Vergleichswert. Folsäure und Isorhamnetin wiesen keine Reduktion auf. Allerdings zeigten Rhamnetin sowie 70 %- und 99 %-Ethanol eine geringe antiproliferative Wirkung, Rhamnetin sogar signifikant ( $p = 0,001 - 0,05$ ). 99 %-Ethanol mit DMSO und DMSO allein übten mit 61,3 % beziehungsweise 63,9 % eine hoch-signifikante Hemmung des Wachstums ( $p < 0,001$ ) der MCF-12a-Zellen aus. Die Kontrollen Tamoxifen und Endoxifen zeigten mit 13,4 % und 19 % erwartungsgemäß eine hoch-signifikante hemmende Wirkung auf die Proliferation ( $p < 0,001$ ) der Zellen, Estradiol bewirkte eine Steigerung der Proliferation auf 112,7 % im Verhältnis zu unbehandelten Zellen (Abb. 35).



**Abb. 35:** BrdU-Proliferationstest MCF-12a. Zellproliferation [%]. Einfluss der Referenzen und Kontrollen auf die Proliferation der MCF-12a-Zelllinie im Verhältnis zu Medium und Zellen (M+Zellen = 100 %); dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung; signifikante Ergebnisse werden mit  $p < 0,001$ : \*\* und  $p = 0,001 - 0,05$ : \* dargestellt.

Im Vergleich zum BrdU-Test der MCF-7-Zelllinie wiesen die drei Extrakte keine signifikante Wachstumsreduktion der MCF-12a-Zellen auf. Eine Ausnahme hierbei war das unverdünnte Extrakt 3 aus Curcuma und schwarzem Pfeffer mit einer signifikanten ( $p = 0,001 - 0,05$ ) antiproliferativen Wirkung von 77,9 % (SD = 11,6 %). Alle weiteren Verdünnungen der Extrakte zeigten eine nicht-signifikante Reduktion des Wachstums von bis zu 89 % oder gar keine Wirkung (Abb. 36).



**Abb. 36:** BrdU-Proliferationstest MCF-12a. Zellproliferation [%]. Einfluss der drei Extrakte auf die Proliferation der MCF-12a-Zelllinie im Verhältnis zu Medium und Zellen (M+Zellen = 100 %); Extrakt 1 = Curcuma [0,1 g/ml], Extrakt 2 = schwarzer Pfeffer [0,1 g/ml], Extrakt 3 = Curcuma und schwarzer Pfeffer [jeweils 0,05 g/ml] alle in 70 %-Ethanol gelöst. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung; signifikante Ergebnisse werden mit  $p < 0,001$ : \*\* und  $p = 0,001 - 0,05$ : \* dargestellt.

#### 4.4 CytoTox-Glo®-Test

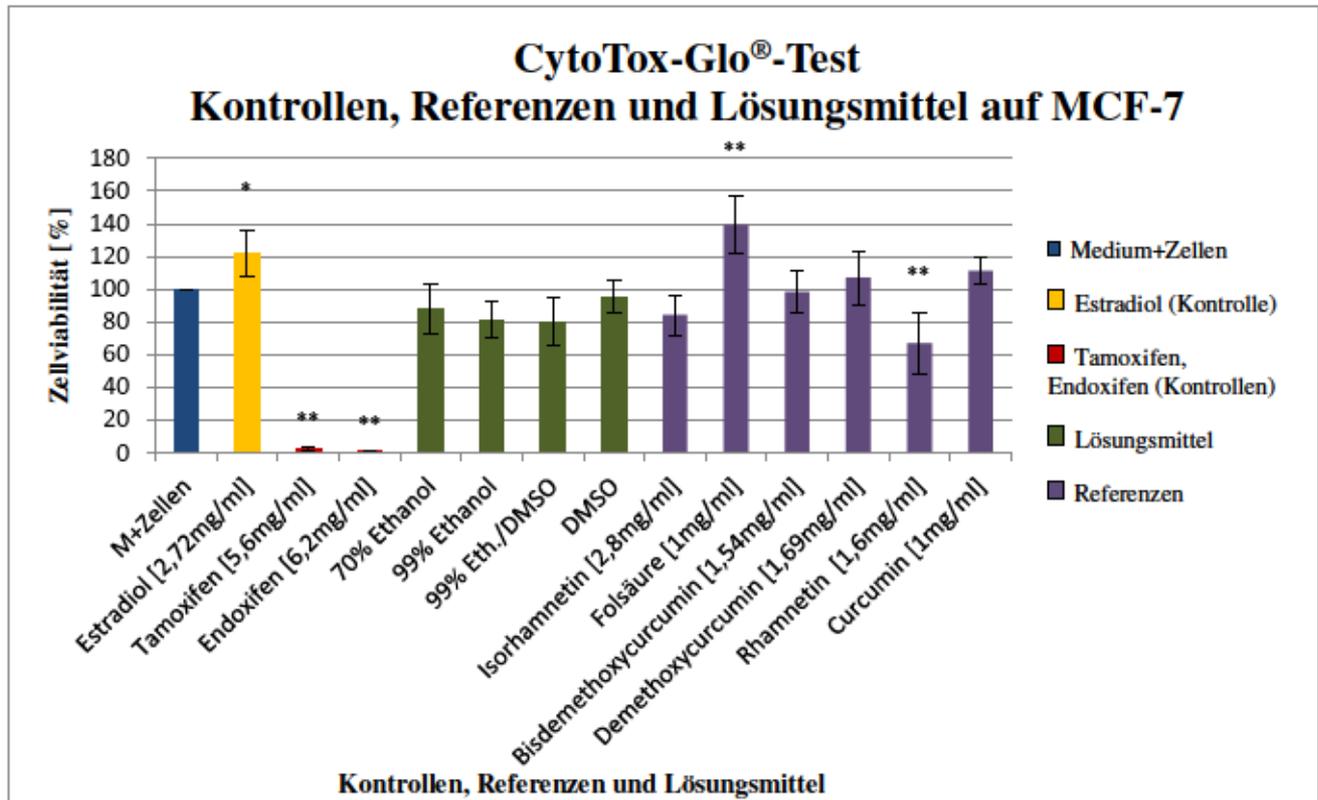
Zur Darstellung der Zellviabilität der Zelllinien MCF-7 und MCF-12a erfolgte die Durchführung des Zytotoxizitäts-Test CytoTox-Glo® von Promega, einem Lumineszenz-Test. Dabei konnte die Menge toter Zellen nach Zugabe der verschiedenen Substanzen detektiert werden, indem die Aktivität der freigegebenen Protease gemessen und die Zellviabilität berechnet wurde [121].

Im Folgenden werden die Ergebnisse des CytoTox-Glo®-Tests der Zelllinien MCF-7 und MCF-12a dargestellt (Abb. 37-40).

##### MCF-7

Rhamnetin zeigte mit 67 % im Verhältnis zu den unbehandelten Zellen (Medium und Zellen = 100 %) eine hoch-signifikante ( $p < 0,001$ ) Hemmung der Zellviabilität (SD = 18,6 %). BDMC und Isorhamnetin sowie die Alkohole wiesen eine leichte, nicht-signifikante Reduktion bis auf 80 % im Verhältnis zu den unbehandelten Zellen (Medium und Zellen = 100 %) auf. Folsäure, Curcumin und DMC führten zu einer Steigerung der Zellviabilität, Folsäure hoch-signifikant ( $p < 0,001$ ). Einen starken, hoch-signifikanten Einfluss ( $p < 0,001$ ) auf die Lebensfähigkeit hatten Tamoxifen und

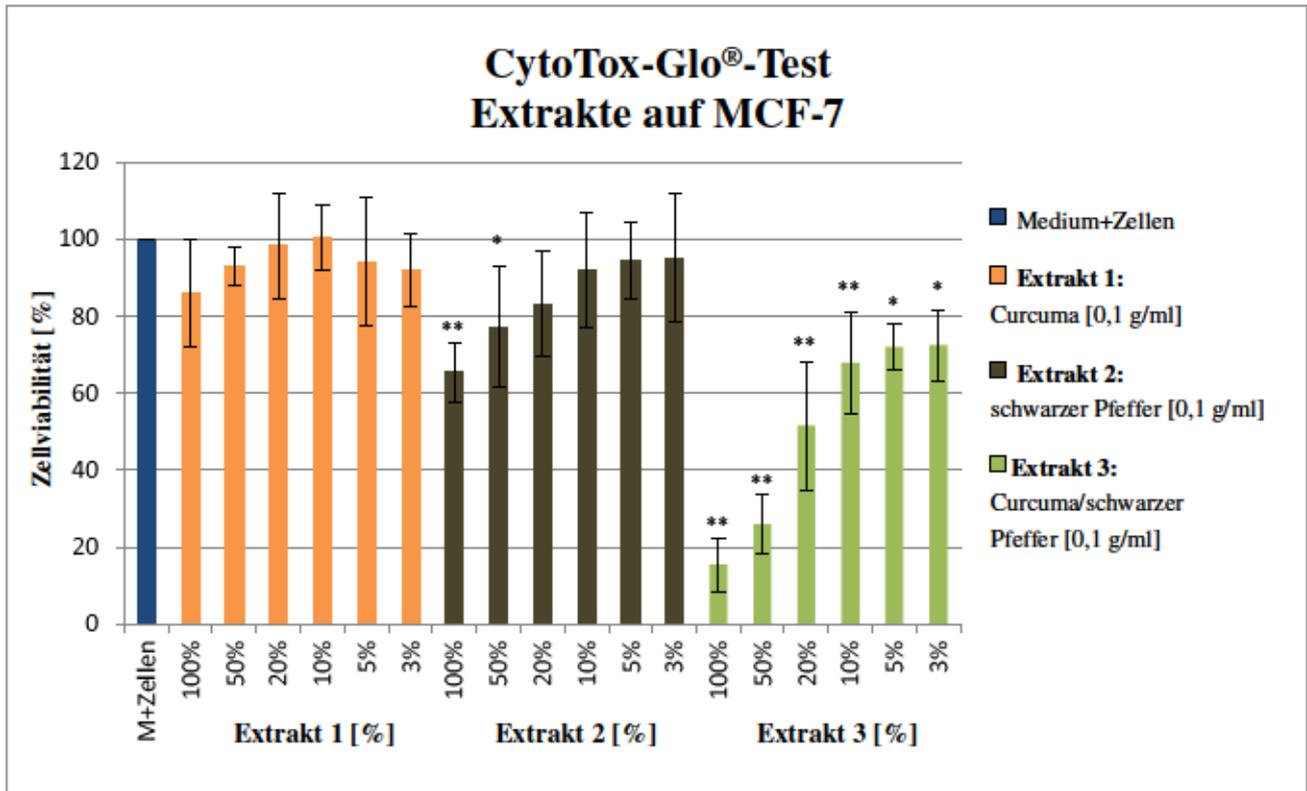
Endoxifen mit 2,8 % (SD = 1,2 %) und 0,8 % (SD = 0,7 %). Unter Estradiolwirkung steigerte sich die Zellviabilität mit 121,6 % (SD = 14,1 %) signifikant ( $p = 0,001 - 0,05$ ) im Verhältnis zum Vergleichswert (Abb. 37).



**Abb. 37:** CytoTox-Glo®-Test MCF-7. Zellviabilität [%]. Einfluss der Referenzen und Kontrollen auf die Zellviabilität der MCF-7-Zelllinie im Verhältnis zu Medium und Zellen (M+Zellen = 100 %); dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung; signifikante Ergebnisse werden mit  $p < 0,001$ : \*\* und  $p = 0,001 - 0,05$ : \* dargestellt.

Extrakt 3 mit Curcuma und schwarzem Pfeffer zeigte den stärksten hemmenden Einfluss auf die MCF-7-Zelllinie, abhängig von der Konzentration. So wies das unverdünnte Extrakt mit 15,4 % (SD = 6,9 %) im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Medium und Zellen = 100 %) eine starke, hoch-signifikante ( $p < 0,001$ ) Reduktion der Zellviabilität auf. Auch die 50 %-, 20 %- und 10%-Verdünnungen des Extraktes übten im Verhältnis zum Vergleichswert einen hoch-signifikanten ( $p < 0,001$ ) hemmenden Effekt aus. So wurde das Wachstum der MCF-7-Zellen auf 25,9 % (SD = 7,8 %), 51,5 % (SD = 16,8 %) und 67,9 % (SD = 13,1 %) reduziert. Die 5 %- und 3 %-Verdünnungen sorgten mit 71,9 % und 72,5 % für eine leichte, signifikante ( $p = 0,001 - 0,05$ ) Reduktion der Lebensfähigkeit der Zellen.

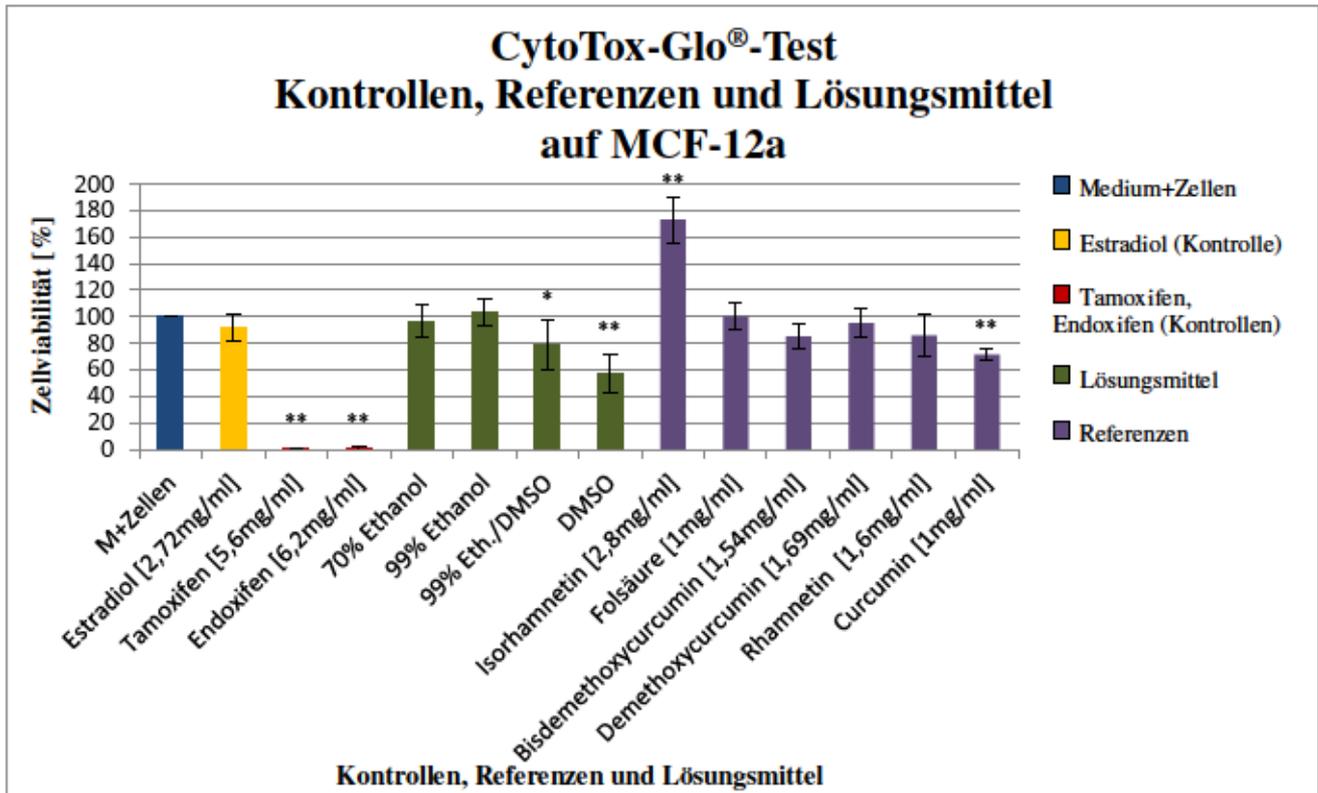
Extrakt 2 mit schwarzem Pfeffer zeigte bei einer 50 %-Verdünnung eine signifikante ( $p = 0,001 - 0,05$ ) Hemmung der Zellviabilität auf 77,1 % (SD = 15,7 %). Unverdünnt reduzierte das Extrakt hoch-signifikant ( $p < 0,001$ ) auf 65,4 % (SD = 7,9 %). Die stärker verdünnten Extrakte des schwarzen Pfeffers sorgten für eine leichte, nicht-signifikante Hemmung auf bis zu 83,1 %. Extrakt 1 mit Curcuma reduzierte die Zellviabilität nur nicht-signifikant leicht oder gar nicht (Abb. 38).



**Abb. 38:** CytoTox-Glo®-Test MCF-7. Zellviabilität [%]. Einfluss der drei Extrakte auf die Zellviabilität der MCF-7-Zelllinie im Verhältnis zu Medium und Zellen (M+Zellen = 100 %); Extrakt 1 = Curcuma [0,1 g/ml], Extrakt 2 = schwarzer Pfeffer [0,1 g/ml], Extrakt 3 = Curcuma und schwarzer Pfeffer [jeweils 0,05 g/ml] alle in 70 %-Ethanol gelöst. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung; signifikante Ergebnisse werden mit  $p < 0,001$ : \*\* und  $p = 0,001 - 0,05$ : \* dargestellt.

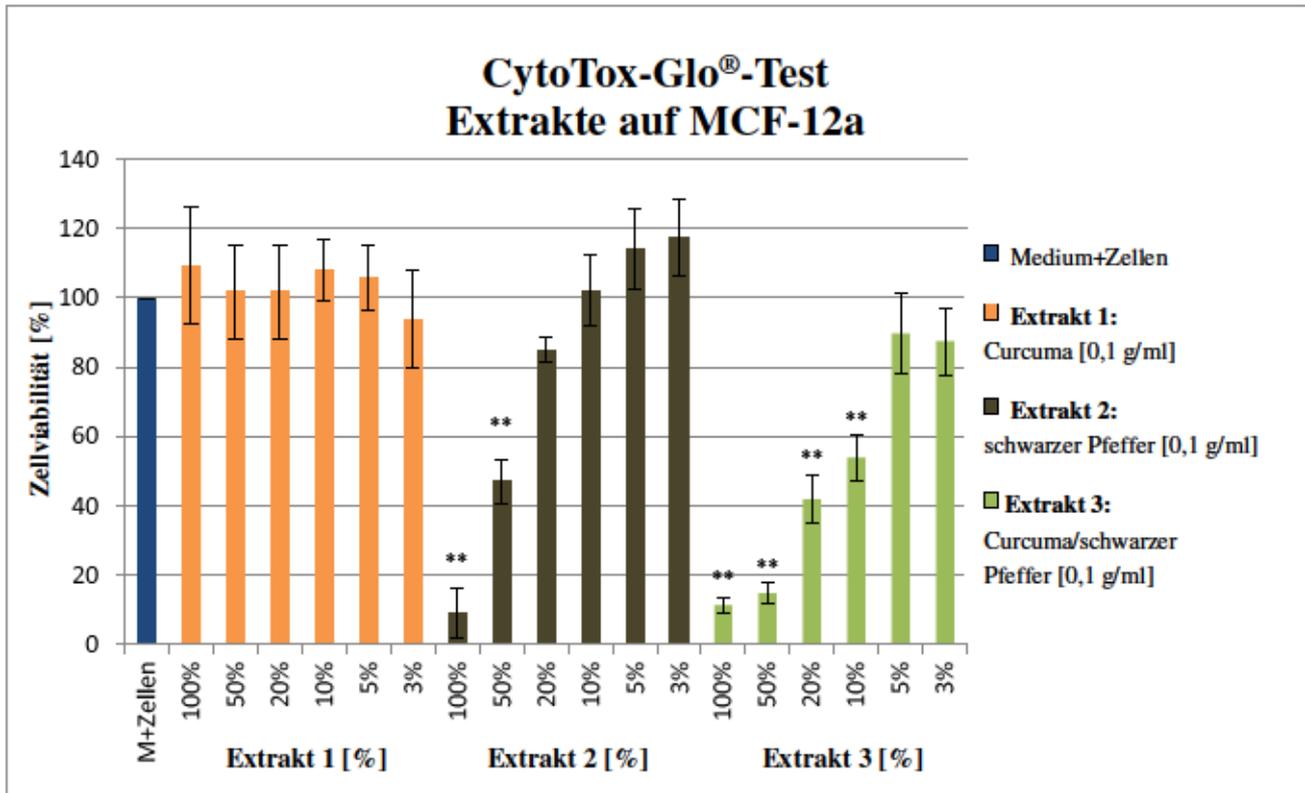
### MCF-12a

Eine starke und zudem hoch-signifikante ( $p < 0,001$ ) Hemmung der Zellviabilität auf 71,2 % wies Curcumin ( $SD = 4,5 \%$ ) auf. Rhamnetin, DMC und BDMC zeigten mit 85,7 %, 95,1 % und 84,8 % dagegen nur eine leichte hemmende Wirkung im Verhältnis zu den unbehandelten Zellen (Medium und Zellen = 100 %). Folsäure übte keine Reduktion der Lebensfähigkeit der MCF-12a-Zellen aus, Isorhamnetin steigerte diese sogar hoch-signifikant ( $p < 0,001$ ). Die Alkohole 70 %- und 99 %-Ethanol wiesen keinen signifikanten Einfluss auf. Dagegen führten 99 %-Ethanol mit DMSO und DMSO allein zu einer Hemmung der Zellviabilität auf 78,9 % (signifikant;  $p = 0,001 - 0,05$ ) und 57,3 % (hoch-signifikant;  $p < 0,001$ ) bei einer  $SD$  von 18,6 % beziehungsweise 14,9 %. Stark hoch-signifikant ( $p < 0,001$ ) wirkten Tamoxifen und Endoxifen, indem sie die Zellviabilität auf 0,7 % ( $SD = 1 \%$ ) beziehungsweise 1,1 % ( $SD = 1,2 \%$ ) reduzierten. Unter Estradiolwirkung konnte die Lebensfähigkeit der Zellen leicht nicht-signifikant auf 91,8 % ( $SD = 9,8 \%$ ) gesenkt werden (Abb. 39).



**Abb. 39:** CytoTox-Glo®-Test MCF-12a. Zellviabilität [%]. Einfluss der Referenzen und Kontrollen auf die Zellviabilität der MCF-12a-Zelllinie im Verhältnis zu Medium und Zellen (M+Zellen = 100 %); dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung; signifikante Ergebnisse werden mit  $p < 0,001$ : \*\* und  $p = 0,001 - 0,05$ : \* dargestellt.

Auch im CytoTox-Glo®-Test der Zelllinie MCF-12a wies Extrakt 1 mit Curcuma keine oder eine geringe, nicht-signifikante Hemmung der Zellviabilität auf. Dagegen zeigten das unverdünnte Extrakt 2 und die 50 %-Verdünnung desselben mit 9,2 % (SD = 7,3 %) und 47,2 % (SD = 6,3 %) eine starke, hoch-signifikante ( $p < 0,001$ ) Wirkung im Verhältnis zum Vergleichswert. Weitere Verdünnungen des Extraktes 2 sowie die 5 %- und 3 %-Verdünnungen des Extraktes 3 aus Curcuma und schwarzem Pfeffer reduzierten die Lebensfähigkeit gering bis gar nicht und ohne Signifikanz. Eine starke Hemmung übten das unverdünnte Extrakt sowie die 50 %-, 20 %- und 10 %-Verdünnungen des Extraktes 3 aus. Die Reduktion der Zellviabilität erfolgte hoch-signifikant ( $p < 0,001$ ) auf 54 % (10 %-Verdünnung) bis zu 11,4 % (unverdünnt). Die SD betrug im unverdünnten Extrakt 3 der Mischung 2 %, bis zu 7 % bei den 50 %- bis 10 %-Verdünnungen (Abb. 40).



**Abb. 40:** CytoTox-Glo®-Test MCF-12a. Zellviabilität [%]. Einfluss der drei Extrakte auf die Zellviabilität der MCF-12a-Zelllinie im Verhältnis zu Medium und Zellen (M+Zellen = 100 %); Extrakt 1 = Curcuma [0,1 g/ml], Extrakt 2 = schwarzer Pfeffer [0,1 g/ml], Extrakt 3 = Curcuma und schwarzer Pfeffer [jeweils 0,05 g/ml] alle in 70 %-Ethanol gelöst. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung; signifikante Ergebnisse werden mit  $p < 0,001$ : \*\* und  $p = 0,001 - 0,05$ : \* dargestellt.

#### 4.5 CellTiter-Glo®-Test (ATP-Lumineszenztest)

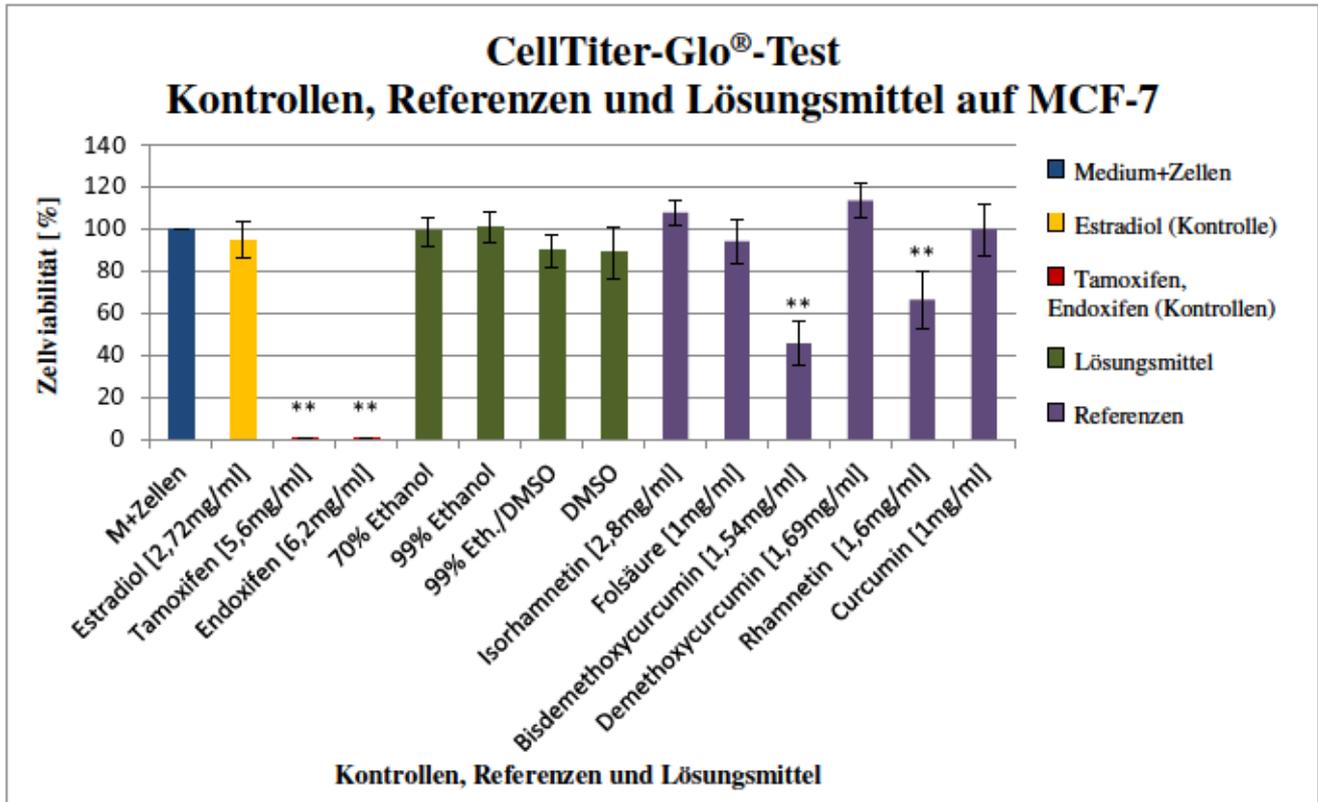
Zur Bestimmung der Zellviabilität unter Einfluss der verschiedenen Substanzen wurde der CellTiter-Glo®-Test von Promega durchgeführt. Der Lumineszenz-Test detektiert das nach Zellyse freigewordene ATP, wodurch metabolisch aktive Zellen dargestellt werden und die Zellebensfähigkeit ermittelt wird [120].

Im Folgenden werden die Ergebnisse des CellTiter-Glo®-Tests der Zelllinien MCF-7 und MCF-12a beschrieben (Abb. 41-44).

##### MCF-7

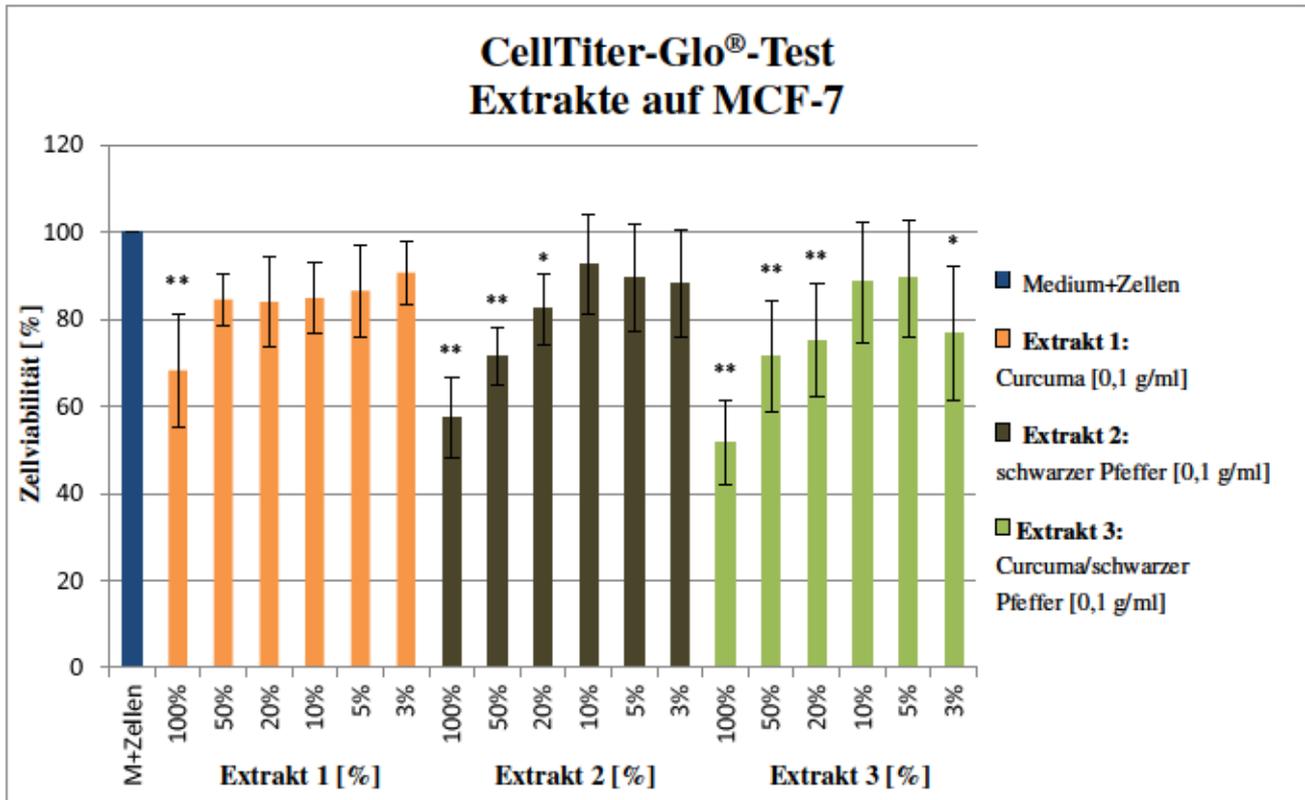
Mit einer hoch-signifikanten ( $p < 0,001$ ) Reduktion der Zellviabilität auf 45,6 % (SD = 10,5 %) beziehungsweise 66,2 % (SD = 13,7 %) wiesen BDMC und Rhamnetin mit Ausnahme von Tamoxifen und Endoxifen den stärksten Einfluss auf die MCF-7-Zelllinie im Verhältnis zu den unbehandelten Zellen (Medium und Zellen = 100 %) auf (Abb. 41). Folsäure, Curcumin, Estradiol sowie die Alkohole DMSO, 70 %-Ethanol sowie 99 %-Ethanol mit DMSO zeigten eine geringe, nicht-signifikante Hemmung. Isorhamnetin, DMC und 99 %-Ethanol führten zu einer leichten, nicht-

signifikanten Zunahme der Zellviabilität im Verhältnis zum Vergleichswert. Tamoxifen und Endoxifen reduzierten hoch-signifikant ( $p < 0,001$ ) die Lebensfähigkeit der Zellen auf 0,05 % (SD = 0,06 %) und 0,16 % (SD = 0,34 %).



**Abb. 41:** CellTiter-Glo®-Test MCF-7. Zellviabilität [%]. Einfluss der Referenzen und Kontrollen auf die Lebensfähigkeit der MCF-7-Zelllinie im Verhältnis zu Medium und Zellen (M+Zellen = 100 %); dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung; signifikante Ergebnisse werden mit  $p < 0,001$ : \*\* und  $p = 0,001 - 0,05$ : \* dargestellt.

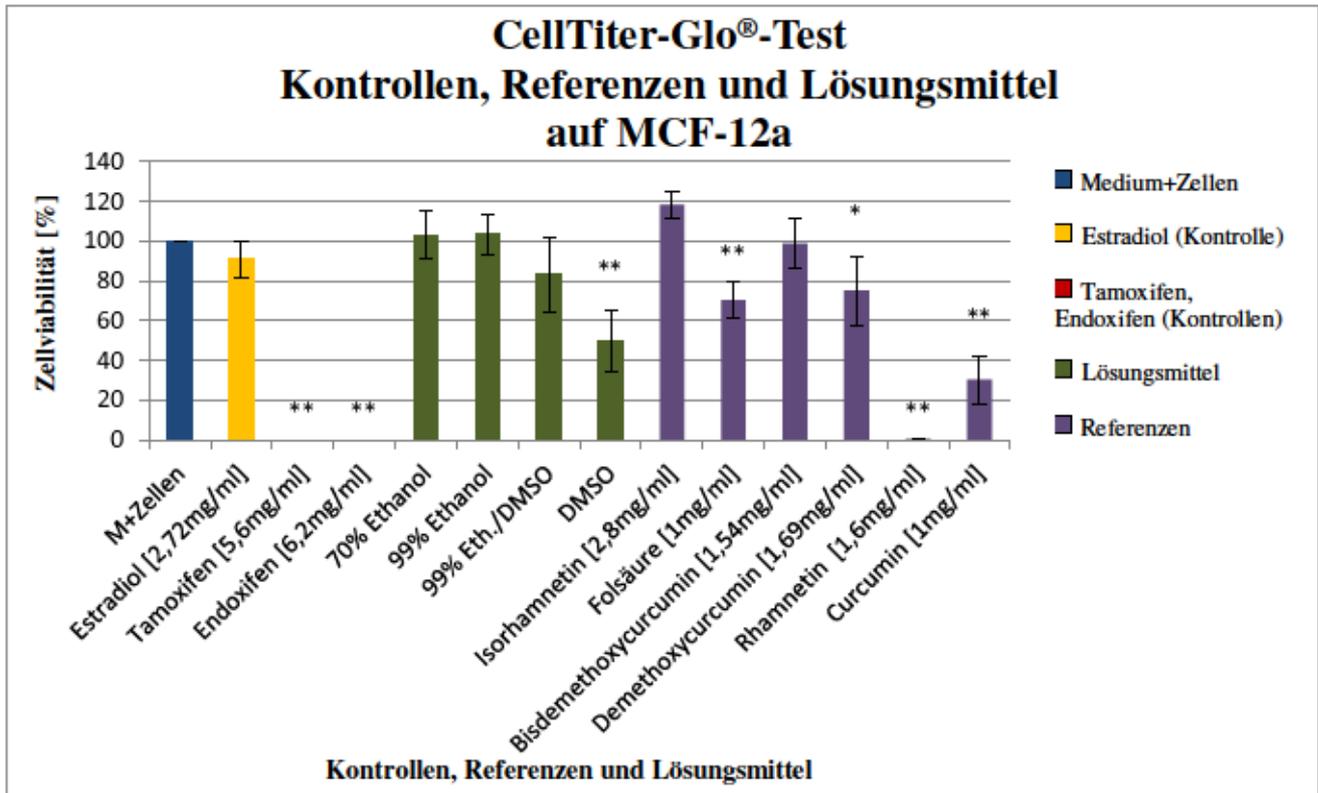
Das unverdünnte Extrakt 1 mit Curcuma zeigte eine hoch-signifikante ( $p < 0,001$ ) Hemmung der Zellviabilität auf 68,2 % (SD = 13 %). Alle weiteren Verdünnungen des Extraktes führten zu einer leichten, nicht-signifikanten Reduktion bis auf 84,2 %. Mit 57 % (SD = 9,3 %) und 71,5 % (SD = 6,7 %) wies Extrakt 2 mit schwarzem Pfeffer unverdünnt und bei 50 %-Verdünnung einen hoch-signifikanten ( $p < 0,001$ ) hemmenden Einfluss auf die Lebensfähigkeit der MCF-7-Zelllinie auf. Die 20 %-Verdünnung reduzierte die Zellviabilität signifikant ( $p = 0,001 - 0,05$ ) auf 82,4 % (SD = 8 %). Die 10 %-, 5 %- und 3 %-Verdünnungen des Extraktes 2 mit schwarzem Pfeffer als auch die 10 %- und 5 %-Verdünnungen des Extraktes 3 aus Curcuma und schwarzem Pfeffer führten zu einer leichten, nicht-signifikanten Hemmung. Mit hoch-signifikanten ( $p < 0,001$ ) Reduktionen der Lebensfähigkeit auf 51,6 % (SD = 9,7 %) und 71,4 % (SD = 12,6 %) zeigten sowohl das unverdünnte Extrakt als auch die 50 %-Verdünnung des Extraktes 3 eine starke Wirkung im Verhältnis zu den unbehandelten Zellen (Medium und Zellen = 100 %). Die 20 %-Verdünnung des Gemischs reduzierte die Zellviabilität ebenfalls hoch-signifikant ( $p < 0,001$ ) auf 75,1 % (SD = 13 %). Bei einer SD von 15,5 % senkte die 3 %-Verdünnung des Extraktes 3 auf 76,8 % signifikant ( $p = 0,001 - 0,05$ ) die Lebensfähigkeit (Abb. 42).



**Abb. 42:** CellTiter-Glo®-Test MCF-7. Zellviabilität [%]. Einfluss der drei Extrakte auf die Lebensfähigkeit der MCF-7-Zelllinie im Verhältnis zu Medium und Zellen (M+Zellen = 100 %); Extrakt 1 = Curcuma [0,1 g/ml], Extrakt 2 = schwarzer Pfeffer [0,1 g/ml], Extrakt 3 = Curcuma und schwarzer Pfeffer [jeweils 0,05 g/ml] alle in 70 %-Ethanol gelöst. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung; signifikante Ergebnisse werden mit  $p < 0,001$ : \*\* und  $p = 0,001 - 0,05$ : \* dargestellt.

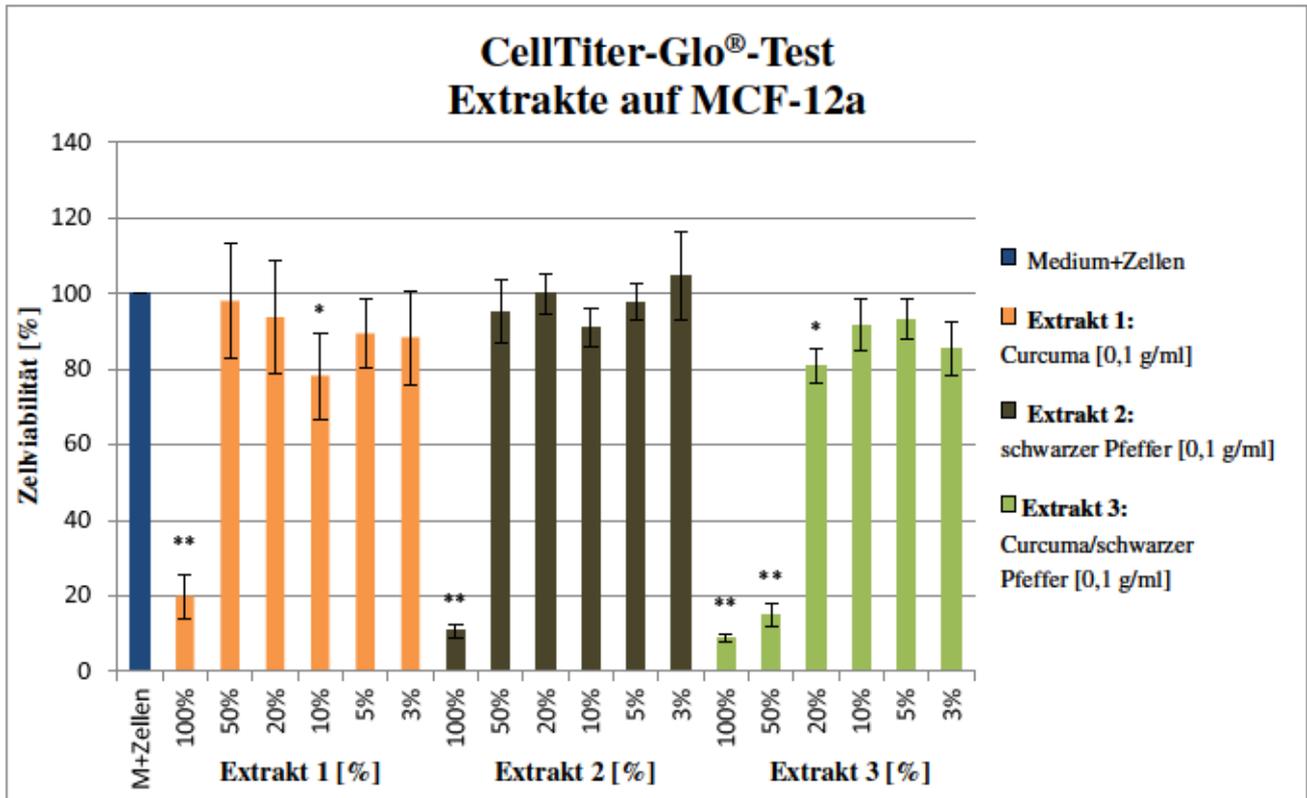
### MCF-12a

Zu einer hoch-signifikanten ( $p < 0,001$ ) Hemmung der Zellviabilität führten Rhamnetin, Folsäure, Curcumin und DMSO im Verhältnis zum Vergleichswert. Bei einer SD von 0,3 % senkte Rhamnetin die Lebensfähigkeit der MCF-12a-Zellen auf 0,63 % sehr stark. Curcumin zeigte eine Reduktion auf 30,2 % (SD = 12,4 %), Folsäure auf 70,4 % (SD = 8,8 %) und DMSO auf 49,7 % (SD = 15,2 %). DMC reduzierte die Zellviabilität signifikant ( $p = 0,001 - 0,05$ ) bei einer SD von 17 % auf 75 %. Zu einer leichten, nicht-signifikanten Hemmung führten BDMC (SD = 12,4 %) und 99 %-Ethanol mit DMSO (SD = 18,9 %). Isorhamnetin sowie die Alkohole 70 %- und 99 %-Ethanol zeigten keine Reduktion der Lebensfähigkeit. Dagegen übten Tamoxifen und Endoxifen einen starken, hoch-signifikanten ( $p < 0,001$ ) hemmenden Einfluss auf 0,1 % (SD = 0,07 %) beziehungsweise 0,06 % (SD = 0,06 %) aus. Estradiol führte bei einer SD von 9 % zu einer nicht-signifikanten Reduktion der Zellviabilität auf 90,7 % (Abb. 43)



**Abb. 43:** CellTiter-Glo®-Test MCF-12a. Zellviabilität [%]. Einfluss der Referenzen und Kontrollen auf die Lebensfähigkeit der MCF-12a-Zelllinie im Verhältnis zu Medium und Zellen (M+Zellen = 100 %); dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung; signifikante Ergebnisse werden mit  $p < 0,001$ : \*\* und  $p = 0,001 - 0,05$ : \* dargestellt.

Alle drei unverdünnten Extrakte hemmten die Zellviabilität stark hoch-signifikant ( $p < 0,001$ ). Extrakt 1 aus Curcuma senkte unverdünnt die Lebensfähigkeit der MCF-12a-Zelllinie auf 19,8 % (SD = 5,7 %). Extrakt 2 aus schwarzem Pfeffer führte zu einer Reduktion auf 10,7 % (SD = 1,7 %). Extrakt 3 aus beiden Stoffen reduzierte die Zellviabilität auf 8,9 % (SD = 1,1 %) im Verhältnis zu den unbehandelten Zellen (Medium und Zellen = 100 %). Die 50 %-Verdünnung des Extraktes 3 zeigte eine hoch-signifikante ( $p < 0,001$ ) Hemmung auf 14,9 % (SD = 3,1 %). Alle weiteren Verdünnungen führten zu einer leichten Reduktion der Lebensfähigkeit, wobei die 10 %-Verdünnung aus Curcuma und die 20 %-Verdünnung aus Curcuma und schwarzem Pfeffer signifikant reduzierten ( $p = 0,001 - 0,05$ ). Eine Ausnahme wies die 3 %-Verdünnung aus schwarzem Pfeffer auf, die eine leichte Zunahme der Zellviabilität zeigte (Abb. 44).



**Abb. 44:** CellTiter-Glo®-Test MCF-12a. Zellviabilität [%]. Einfluss der drei Extrakte auf die Lebensfähigkeit der MCF-12a-Zelllinie im Verhältnis zu Medium und Zellen (M+Zellen = 100 %); Extrakt 1 = Curcuma [0,1 g/ml], Extrakt 2 = schwarzer Pfeffer [0,1 g/ml], Extrakt 3 = Curcuma und schwarzer Pfeffer [jeweils 0,05 g/ml] alle in 70 %-Ethanol gelöst. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung; signifikante Ergebnisse werden mit  $p < 0,001$ : \*\* und  $p = 0,001 - 0,05$ : \* dargestellt.

#### 4.6 Neutralrot-Test (NRU-Test)

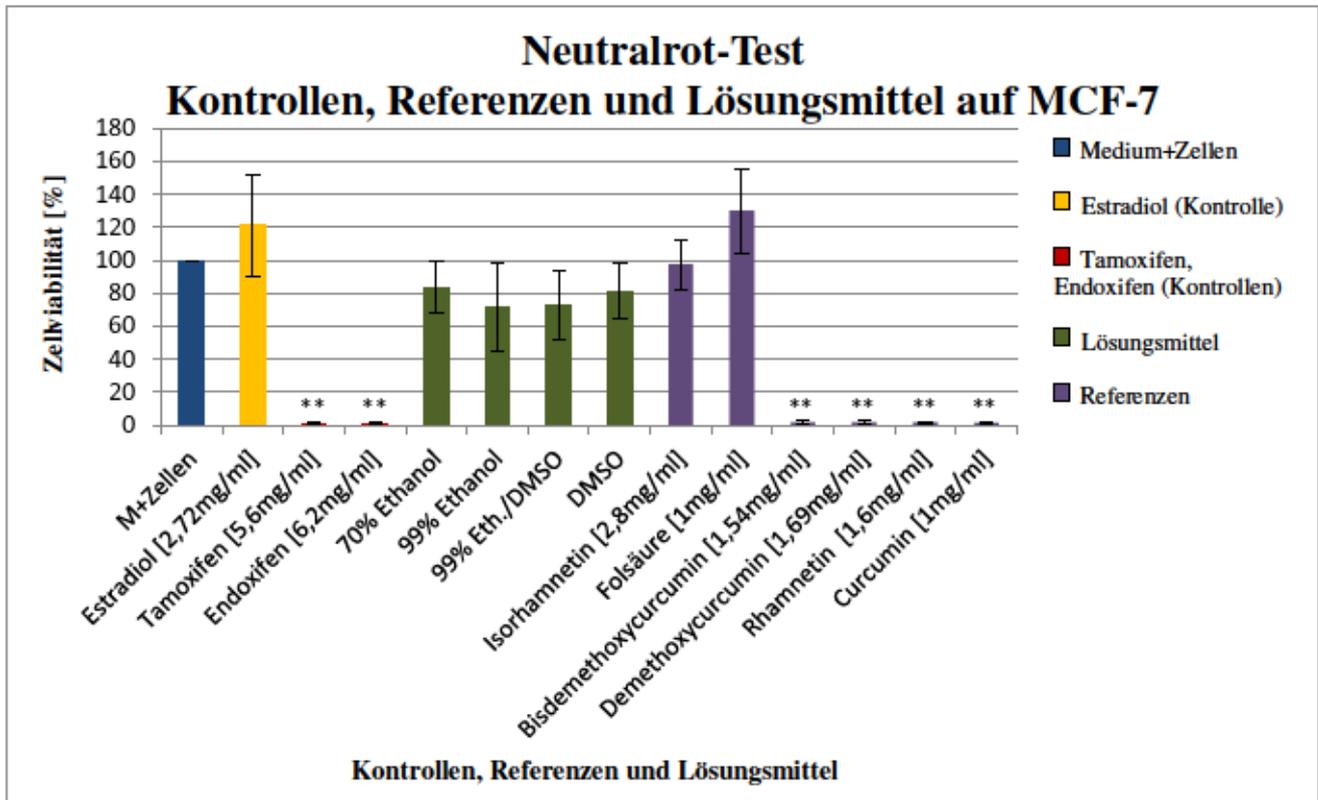
Die Durchführung des NRU-Tests von Sigma-Aldrich erfolgte zur Darstellung der Zellviabilität unter dem Einfluss der verschiedenen Substanzen, da nur vitale Zellen den Neutralrot-Farbstoff aktiv aufnehmen und in Lysosomen speichern können. Nach dem Lösen des Farbstoffes aus den vitalen Zellen wird die freigewordene Menge durch den NRU-Test detektiert [96, 146].

Im Folgenden werden die Ergebnisse des NRU-Tests der Zelllinien MCF-7 und MCF-12a beschrieben (Abb. 45-48).

##### MCF-7

Den stärksten hoch-signifikanten ( $p < 0,001$ ) Einfluss auf die Zellviabilität im Verhältnis zu den unbehandelten Zellen (Medium und Zellen = 100%) übten mit Ausnahme von Tamoxifen und Endoxifen DMC, BDMC, Rhamnetin und Curcumin aus. DMC und BDMC senkten die Zellviabilität auf 1,7 % (SD = 0,8 %). Rhamnetin wies bei einer SD von 0,4 % eine Reduktion der Lebensfähigkeit auf 1,6 % auf. Mit 1,4 % zeigte Curcumin ebenfalls eine stark hemmende Wirkung (SD = 0,2 %). Isorhamnetin führte zu einer leichten, nicht-signifikanten Reduktion der Zellviabilität auf 97 %,

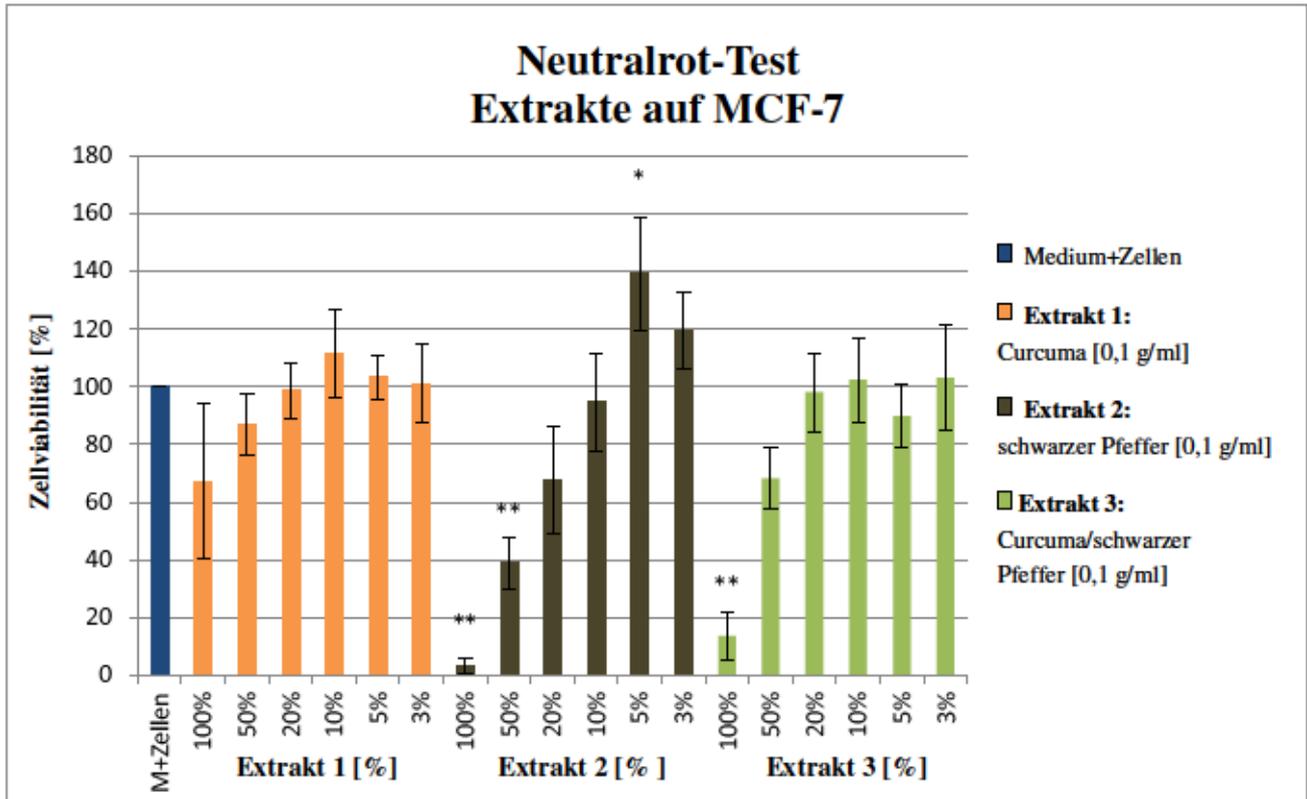
Folsäure steigerte diese nicht-signifikant auf 130,3 %. Die Alkohole 70 %- und 99 %-Ethanol, 99 %-Ethanol mit DMSO und DMSO allein übten mit 83,6 %, 71,9 %, 73,2 % und 81,3 % eine nicht-signifikante hemmende Wirkung aus. Tamoxifen und Endoxifen reduzierten beide stark hochsignifikant ( $p < 0,001$ ) die Zellviabilität auf 1 % (SD = 0,5 %). Estradiol zeigte eine nicht-signifikante Zunahme der Lebensfähigkeit auf 121,4 % (Abb. 45).



**Abb. 45:** Neutralrot-Test MCF-7. Zellviabilität [%]. Einfluss der Referenzen und Kontrollen auf die Zellviabilität der MCF-7-Zelllinie im Verhältnis zu Medium und Zellen (M+Zellen = 100 %); dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung; signifikante Ergebnisse werden mit  $p < 0,001$ : \*\* und  $p = 0,001 - 0,05$ : \* dargestellt.

Im NRU-Test übten die unverdünnten Extrakte 2 und 3 aus schwarzem Pfeffer beziehungsweise aus Curcuma mit schwarzem Pfeffer mit 3,3 % (SD = 2,8 %) und 13,6 % (SD = 8,5 %) die stärkste hochsignifikante ( $p < 0,001$ ) Hemmung der Zellviabilität der MCF-7-Zellen aus (Abb. 46). Auch die 50 %-Verdünnung des Extraktes 2 zeigte eine starke, hoch-signifikante ( $p < 0,001$ ) Reduktion auf 38,8 % (SD = 8,8 %) im Verhältnis zum Vergleichswert. Das unverdünnte Extrakt 1 aus Curcuma sowie dessen 50 %-Verdünnung wiesen mit 67,2 % (SD = 26,8 %) und 86,8 % (SD = 10,6 %) eine nicht-signifikante hemmende Wirkung auf. Die stärker verdünnten Extrakte 1 übten keinen oder einen leichten, nicht-signifikanten Einfluss auf die Lebensfähigkeit der MCF-7-Zellen aus. Mit 67,8 % (SD = 18,6 %) führte die 20 %-Verdünnung mit schwarzem Pfeffer zu einer nicht-signifikanten reduzierenden Wirkung. Auch die 50 %-Verdünnung der Mischung aus schwarzem Pfeffer und Curcuma zeigte eine Hemmung der Zellviabilität auf 68,3 % (SD = 10,5 %) ohne Signifikanz. Stärkere Verdünnungen der Extrakte 2 und 3 reduzierten die Lebensfähigkeit der MCF-7-Zellen nicht oder leicht und dabei nicht-signifikant. Die 5 %-Verdünnung des Extraktes 2 führte

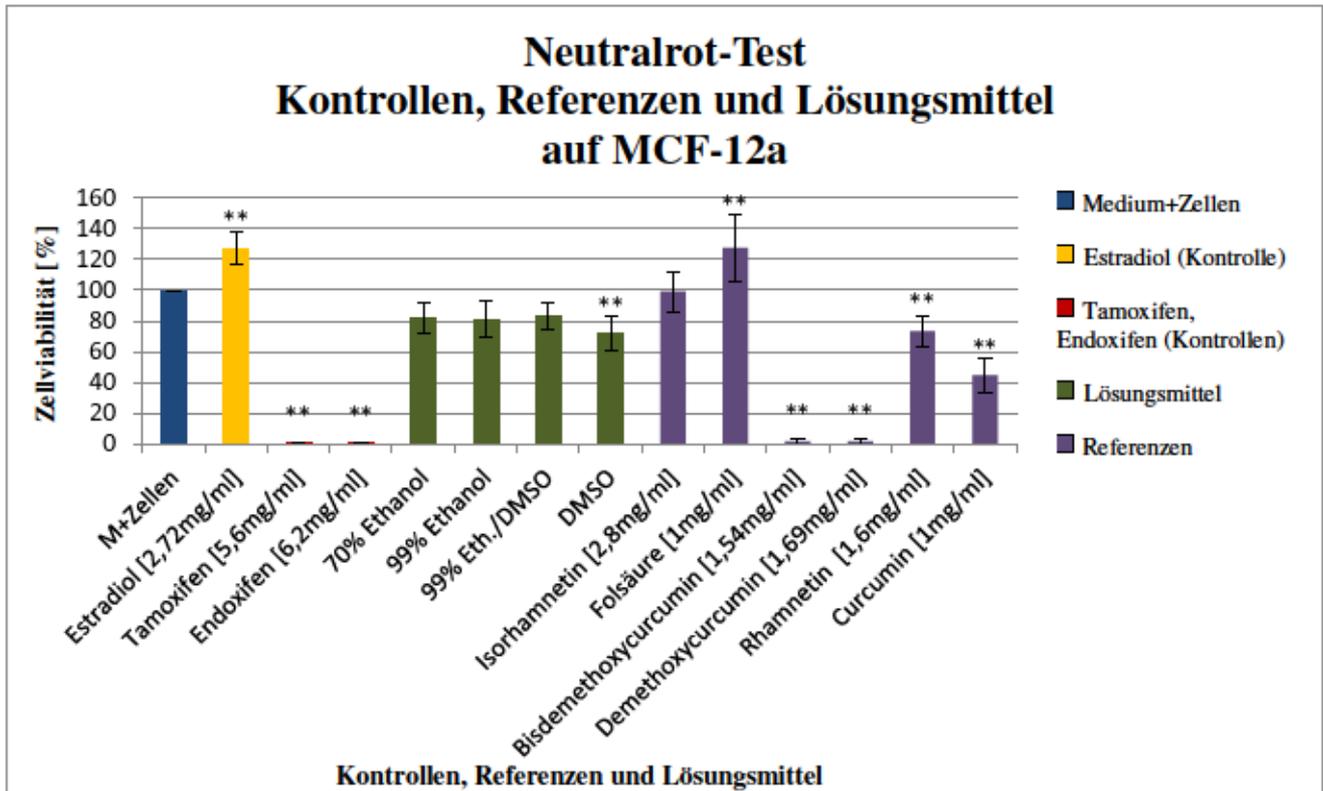
sogar zu einer signifikanten ( $p = 0,001 - 0,05$ ) Steigerung der Zellviabilität auf 139,1 % (SD = 19,5 %).



**Abb. 46:** Neutralrot-Test MCF-7. Zellviabilität [%]. Einfluss der drei Extrakte auf die Zellviabilität der MCF-7-Zelllinie im Verhältnis zu Medium und Zellen (M+Zellen = 100 %); Extrakt 1 = Curcuma [0,1 g/ml], Extrakt 2 = schwarzer Pfeffer [0,1 g/ml], Extrakt 3 = Curcuma und schwarzer Pfeffer [jeweils 0,05 g/ml] alle in 70 %-Ethanol gelöst. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung; signifikante Ergebnisse werden mit  $p < 0,001$ : \*\* und  $p = 0,001 - 0,05$ : \* dargestellt.

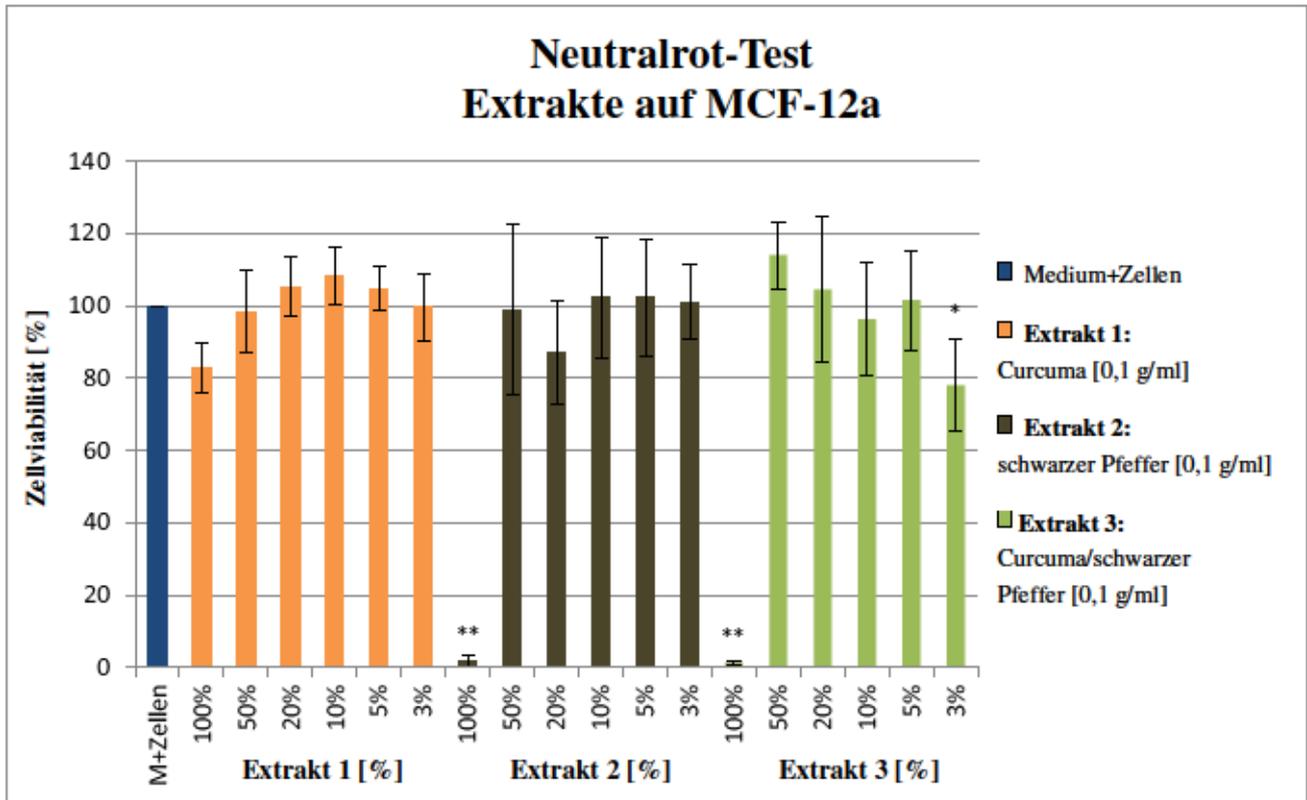
### MCF-12a

Mit jeweils 1,8 % (SD = 1,6 % beziehungsweise 1,5 %), zeigten DMC und BDMC neben Tamoxifen und Endoxifen den stärksten hoch-signifikanten ( $p < 0,001$ ) hemmenden Einfluss auf die Zellviabilität im Verhältnis zu den unbehandelten Zellen (Medium und Zellen = 100 %). Rhamnetin und Curcumin als auch DMSO führten ebenfalls zu einer hoch-signifikanten ( $p < 0,001$ ) Reduktion auf 73,4 % (SD = 10%) und 44,7 % (SD = 11 %) beziehungsweise 72,1 % (SD 10,6 %). Folsäure steigerte hoch-signifikant ( $p < 0,001$ ) die Lebensfähigkeit auf 127,5 %. Eine leichte Senkung wies Isorhamnetin mit 99 % auf. Auch die Alkohole 70 %- und 99 %-Ethanol als auch 99 %-Ethanol mit DMSO zeigten mit 81,9 %, 81,1 % und 83,1 % eine leichte, nicht-signifikante Hemmung. Estradiol führte zu einer hoch-signifikanten ( $p < 0,001$ ) Steigerung auf 127,1 % (SD = 10,8 %). Eine starke, hoch-signifikante ( $p < 0,001$ ) Reduktion der Zellviabilität wiesen Tamoxifen mit 0,9 % (SD = 0,4 %) und Endoxifen mit 0,8 % (SD = 0,2 %) auf (Abb. 47).



**Abb. 47:** Neutralrot-Test MCF-12a. Zellviabilität [%]. Einfluss der Referenzen und Kontrollen auf die Zellviabilität der MCF-12a-Zelllinie im Verhältnis zu Medium und Zellen (M+Zellen = 100 %); dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung; signifikante Ergebnisse werden mit  $p < 0,001$ : \*\* und  $p = 0,001 - 0,05$ : \* dargestellt.

Extrakt 1 aus Curcuma zeigte im NRU-Test auf MCF-12a-Zellen keine oder nur eine leichte, nicht-signifikante Hemmung der Zellviabilität auf bis zu 83 %, wobei das unverdünnte Extrakt die stärkste Wirkung aufwies (SD = 6,9 %). Extrakt 2 aus schwarzem Pfeffer und Extrakt 3 aus Curcuma und schwarzem Pfeffer führten unverdünnt mit 1,7 % (SD = 1,8 %) und 1,4 % (SD = 0,5 %) im Verhältnis zu den unbehandelten Zellen (Medium und Zellen = 100 %) zu einer starken Reduktion der Lebensfähigkeit (Abb. 48). Stärkere Verdünnungen beider Extrakte wiesen nur leichte Einflüsse ohne Signifikanz auf. Eine Ausnahme zeigte die 3 %-Verdünnung des Extraktes 3 mit einer signifikanten ( $p = 0,001 - 0,05$ ) Hemmung der Zellviabilität auf 78 % (SD = 12,7 %).



**Abb. 48:** Neutralrot-Test MCF-12a. Zellviabilität [%]. Einfluss der drei Extrakte auf die Zellviabilität der MCF-12a-Zelllinie im Verhältnis zu Medium und Zellen (M+Zellen = 100 %); Extrakt 1 = Curcuma [0,1 g/ml], Extrakt 2 = schwarzer Pfeffer [0,1 g/ml], Extrakt 3 = Curcuma und schwarzer Pfeffer [jeweils 0,05 g/ml] alle in 70 %-Ethanol gelöst. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung; signifikante Ergebnisse werden mit  $p < 0,001$ : \*\* und  $p = 0,001 - 0,05$ : \* dargestellt.

## 4.7 Zellmetabolismus

Bei Zytotoxizität der Extrakte und Referenzen wurde durch die vermutete gesenkte Stoffwechselaktivität und die verminderte Glykolyse eine erhöhte Glucosekonzentration im Überstand erwartet. Zudem konnte mit einem erhöhten pH-Wert gerechnet werden, da der Warburg-Effekt (aerobe Glykolyse) bei avitalen Zellen nicht stattfinden kann und somit weniger Laktat und ein saures Milieu entsteht.

### 4.7.1 Glucosekonzentration und pH-Wert

Zur Prüfung der Stoffwechsellage und somit der Zellvitalität der MCF-7- und MCF-12a-Zelllinien unter dem Einfluss der Kontrollen und Extrakte wurde der pH-Wert und die extrazelluläre Glucosekonzentration nach 24 h Inkubation gemessen. Durch die einmalige Durchführung konnte keine Signifikanz und SD bestimmt werden.

MCF-7

Die extrazelluläre Glucosemessung der MCF-7-Zelllinie bei Medium und Zellen ergab 24,2 mmol/l. Estradiol führte zu einer leichten Steigerung auf 25,1 mmol/l. Die Glucosekonzentrationen bei Tamoxifen und Endoxifen, die in den bisherigen Tests starke zytotoxische Wirkung zeigten, waren mit 26,3 mmol/l und 27,2 mmol/l erhöht. Auch die 10 %-Verdünnung (26,6 mmol/l) und die 5 %-Verdünnung (26,4 mmol/l) des Extraktes 2 mit schwarzem Pfeffer wiesen eine stark erhöhte Glucosekonzentration auf. Das unverdünnte Extrakt 1 aus Curcuma (24,6 mmol/l), die 20 %- und die 3 %-Verdünnung des Extraktes 2 (beide 24,5 mmol/l), sowie das unverdünnte Extrakt 3 aus Curcuma und schwarzem Pfeffer (24,7 mmol/l) zeigten leichte Steigerungen. Die 50 %- (24,3 mmol/l), 10 %- (24,6 mmol/l), 5 %- (25,1 mmol/l) und 3 %- (25,2 mmol/l) Verdünnungen des Extraktes 3 führten ebenfalls zu Konzentrationserhöhungen (Abb. 49).

Der pH-Wert war konstant im basischen Bereich zwischen 8,41 und 8,64. Er korrelierte zum Teil mit der Glucosekonzentration. Diese war bei der 50 %-Verdünnung des Extraktes 1 vermindert, der pH-Wert sank auf 8,5. Im Gegensatz dazu stieg er auf 8,6 bei der 10 %-Verdünnung des Extraktes 2 mit schwarzem Pfeffer und auch bei der 5 %- und 3 %-Verdünnung des Extraktes 3 (pH = 8,54 und 8,57), parallel zu der Glucosekonzentration (Abb. 49). Auffällig war auch ein ähnlicher, leicht erhöhter pH-Wert der drei unverdünnten Extrakte (pH = 8,53-8,55) im Vergleich zu Tamoxifen (pH-Wert 8,51).

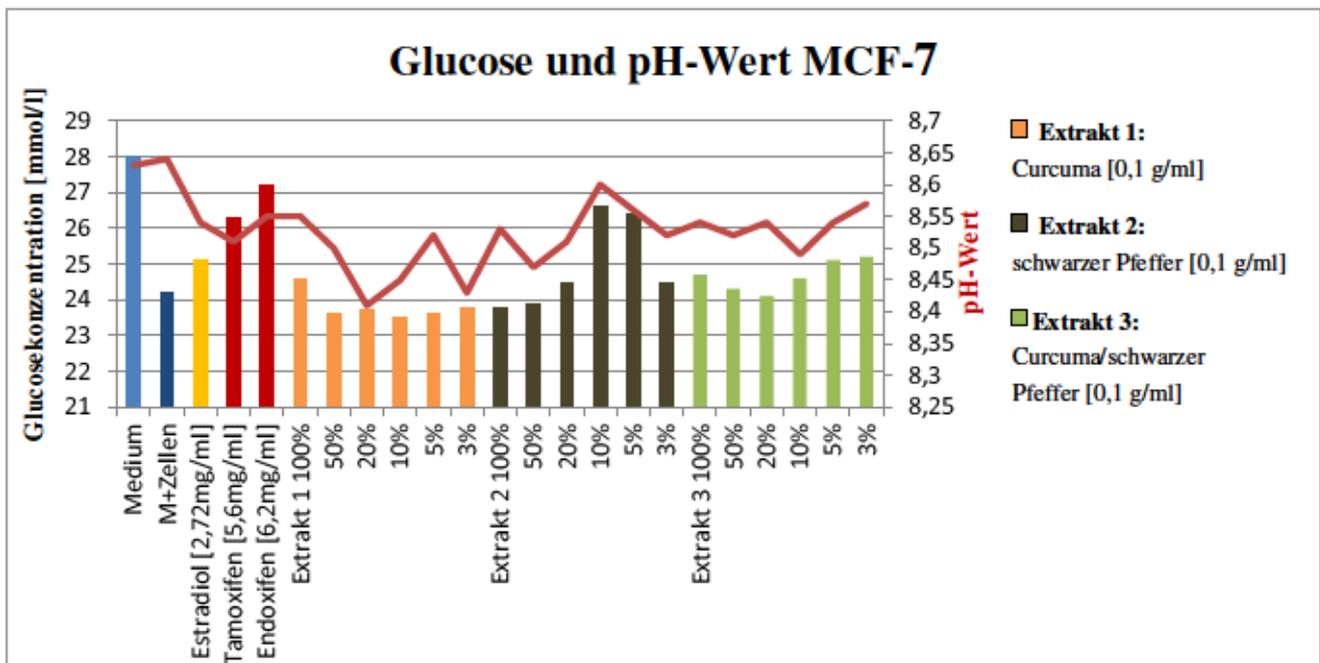
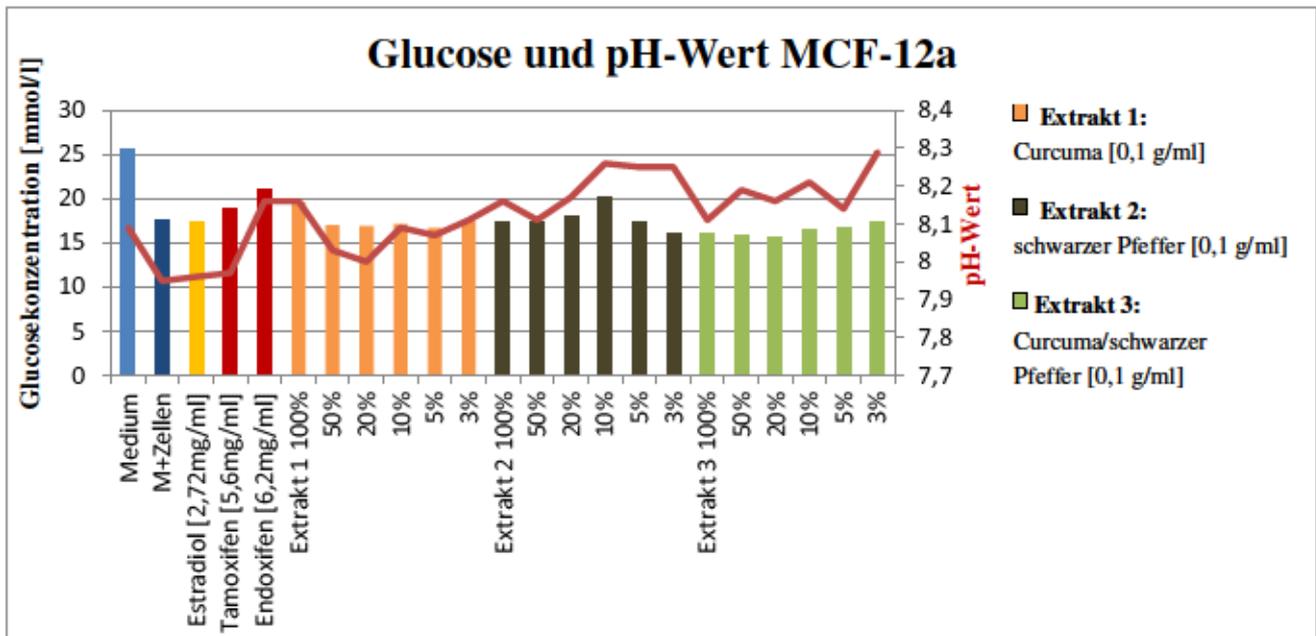


Abb. 49: Einfluss der Kontrollen und Extrakte auf die extrazelluläre Glucosekonzentration und den pH-Wert (rote Linie) im Verhältnis zu Medium und Zellen (M+Zellen = 100 %) nach 24 h; MCF-7-Zellen.

MCF-12a

Medium und Zellen wiesen eine Konzentration von 17,5 mmol/l auf. Tamoxifen und Endoxifen führten mit 18,9 mmol/l beziehungsweise 21,1 mmol/l zu einer Erhöhung. Ebenfalls eine Steigerung der extrazellulären Glucosekonzentration zeigte das unverdünnte Extrakt 1 aus Curcuma (19,6 mmol/l) sowie die 20 %- (18,1 mmol/l) und 10 %- (20,2 mmol/l) Verdünnung des Extraktes 2 aus schwarzem Pfeffer (Abb. 50).

Die pH-Werte des zellfreien Überstands bei den MCF-12a-Zellen lagen ebenfalls im basischen Bereich zwischen 7,95 und 8,29 und über dem pH-Wert der Kontrolle aus Medium und Zellen (pH = 7,95). Bei Endoxifen und dem unverdünnten Extrakt 1, aber auch bei dem unverdünnten Extrakt 2 stieg der pH-Wert auf 8,16 an. Ein Anstieg war ferner bei den 10 %-, 5 %- und 3 %-Verdünnungen des Extraktes 2 (pH = 8,26 beziehungsweise 8,25) und der 3 %-Verdünnung des Extraktes 3 (pH = 8,29) zu beobachten (Abb. 50). Zudem zeigte sich ein ähnlicher pH-Wert der drei unverdünnten Extrakte (pH = 8,16 beziehungsweise 8,11 bei Extrakt 3) im Vergleich zu Endoxifen (pH-Wert 8,16).



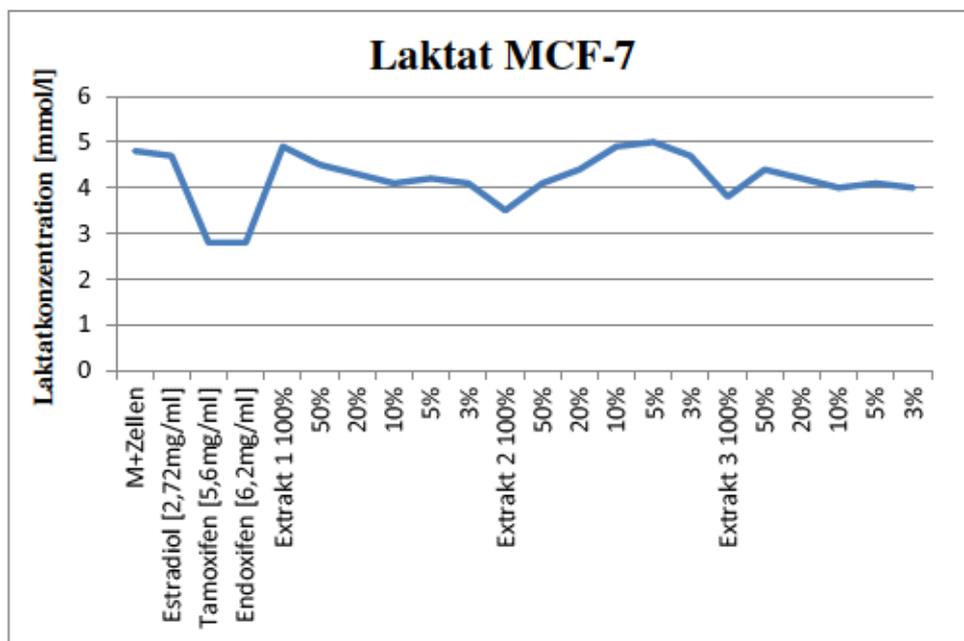
**Abb. 50:** Einfluss der Kontrollen und Extrakte auf die extrazelluläre Glucosekonzentration und den pH-Wert im Verhältnis zu Medium und Zellen (M+Zellen = 100 %) nach 24 h; MCF-12a-Zellen.

### 4.7.2 Laktatkonzentration

Zur Prüfung der Stoffwechsellage und somit der Zellvitalität der MCF-7- und MCF-12a-Zelllinien unter dem Einfluss der Kontrollen und Extrakte wurde die extrazelluläre Laktatkonzentration nach 24 h Inkubation gemessen. Durch die einmalige Durchführung konnte keine Signifikanz und SD bestimmt werden.

#### MCF-7

Die Messung der Laktatkonzentration wies Werte zwischen 2,8 und 5 mmol/l auf, mit 4,8 mmol/l bei Medium und Zellen, wobei die niedrigsten Werte bei Tamoxifen und Endoxifen (beide 2,8 mmol/l) lagen. Auch bei den unverdünnten Extrakten 2 aus schwarzem Pfeffer und 3 aus Curcuma und schwarzem Pfeffer zeigten sich mit 3,5 mmol/l und 3,8 mmol/l niedrige Laktatwerte. Alle weiteren Verdünnungen bewegten sich zwischen 4 und 5 mmol/l, Estradiol wies eine Konzentration von 4,7 mmol/l auf (Abb. 51).

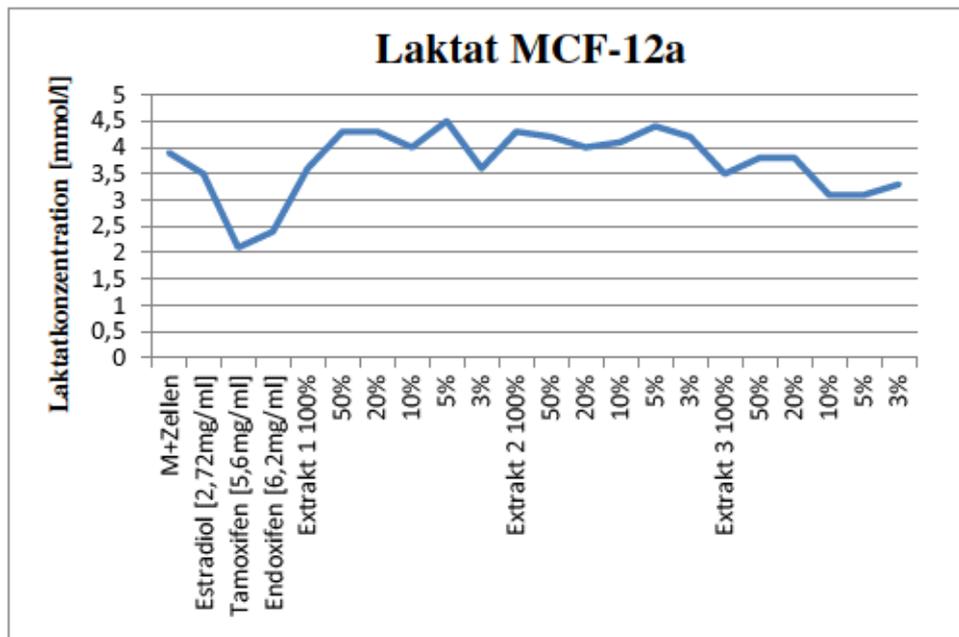


**Abb. 51:** Einfluss der Kontrollen und Extrakte auf die extrazelluläre Laktatkonzentration im Verhältnis zu Medium und Zellen (M+Zellen = 100 %) nach 24 h; MCF-7-Zellen.

MCF-12a

Die extrazelluläre Laktatkonzentration bei Medium und Zellen betrug 3,9 mmol/l.

Auch beim extrazellulären Überstand der MCF-12a-Zellen konnten die niedrigsten Laktatkonzentrationen Tamoxifen und Endoxifen zugeschrieben werden (2,1 und 2,4 mmol/l). Estradiol zeigte eine Konzentration von 3,5 mmol/l. Weitere niedrige Werte waren beim unverdünnten Extrakt 1 aus Curcuma (3,6 mmol/l) und bei allen Verdünnungen des Extraktes 3 aus Curcuma und schwarzem Pfeffer (zwischen 3,1 und 3,8 mmol/l) zu erkennen (Abb. 52).



**Abb. 52:** Einfluss der Kontrollen und Extrakte auf die extrazelluläre Laktatkonzentration im Verhältnis zu Medium und Zellen (M+Zellen = 100 %) nach 24 h; MCF-12a-Zellen.

## 5. Diskussion

Nach dem Bronchialkarzinom ist weiblicher Brustkrebs mit 11,6 % weltweit die zweithäufigste und bei Frauen die häufigste diagnostizierte Krebserkrankung noch vor dem Bronchial- und kolorektalen Karzinom (2018) [25]. In den jeweiligen Ländern unterscheidet sich die Anzahl der Krebsdiagnosen und Organmanifestationen je nach Ernährung, Wohlstand, Alter der Bevölkerung und genetischer Faktoren [18, 25, 71, 76, 139]. Seit vielen Jahren rücken Gewürze, allen voran Curcuma, zur Therapie des Mammakarzinoms zunehmend in den Fokus der Forschung. Mit 75-80 % ist das Curcumin der Hauptbestandteil der Curcuminoide, die zu 3-5 % in dem Ingwergewächs aus Südasien enthalten sind [27, 128]. In der Krebstherapie ist Curcumin Bestandteil zahlreicher Studien, da es proapoptotisch und antiproliferativ und somit zytotoxisch auf Krebszellen wirkt [150]. Die Zugabe von Pfeffer, beziehungsweise von Piperin als einem seiner Hauptbestandteile, scheint die Bioverfügbarkeit zu verbessern [27].

Somit war das Ziel dieser Arbeit die Überprüfung der Hypothese, dass Curcuma-Extrakte in Kombination mit schwarzem Pfeffer-Extrakten, eine signifikante Wirkung auf die MCF-7- und MCF-12a-Zelllinien hinsichtlich einer Verringerung der Zellproliferation, der Zellviabilität und des Zellmetabolismus ausüben. Zudem erfolgte die Kontrolle beider Extrakte einzeln, um Wechselwirkungen und den individuellen Effekt beider Komponenten erkennen und beurteilen zu können. Zusätzlich sollten der Einfluss auf maligne und benigne Brustkrebszellen, aber auch die Wirkintensitäten unterschiedlicher Curcuma- und Pfeffer-Konzentrationen in Extrakt-Verdünnungen bis zu 3 % verglichen werden. Letztendlich galt es, mehr Erkenntnisse in der Mammakarzinom-Therapie mit Curcuma und schwarzem Pfeffer zu sammeln und das Forschungswissen zu erweitern.

Zur Untersuchung der Wirkung *in vitro* auf die maligne MCF-7- und die benigne MCF-12a-Zelllinie, beide ER- und PgR-positiv, dienten drei Extrakte aus Curcuma, schwarzem Pfeffer und beiden Stoffen kombiniert (1:1) jeweils in 70 %-Ethanol gelöst. In verschiedenen Verfahren wurde deren Einfluss auf die Proliferation und Viabilität und somit auf die Zytotoxizität getestet, ebenso auf die unterschiedlichen Stoffwechsellageparameter. Zur Analyse der *in vitro*-Extraktwirkung auf die Mammakarzinomzellen erfolgten mindestens drei Durchführungen je Extrakt und Zelllinie der allgemein üblichen Assays BrdU-Proliferationstest, CytoTox-Glo<sup>®</sup>-, CellTiter-Glo<sup>®</sup>- und NRU-Test. Die mehrmalige Untersuchung erfolgte, um zufällige und fehlerhafte Ergebnisse zu erkennen.

Um Wirkungen der Alkohole auszuschließen, wurden diese ohne Referenzen und Extrakte einzeln untersucht. Zur Kontrolle kamen Tamoxifen, Endoxifen und Estradiol zum Einsatz, zudem erfolgte die Verwendung von Referenzsubstanzen zum Vergleich mit den Extrakten.

Außerdem diente zur Untersuchung der Stoffwechsellage eine einmalige Glucose-, pH-Wert- und Laktat-Messung, um den Glucoseverbrauch der Zellen und die Laktatproduktion zu detektieren und Schwankungen des pH-Werts anzuzeigen.

## 5.1 Material und Methoden

Um den Einfluss von Curcuma und schwarzem Pfeffer auf die Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MCF-12a zu untersuchen, erfolgte die Herstellung der Ethanol-Extrakte aus Curcuma, schwarzem Pfeffer und der Kombination aus beiden Substanzen. Die schlechte Wasserlöslichkeit und die dadurch verminderte Analysierbarkeit sowie reduzierte Wirkung des Curcumas bedingte in Absprache mit Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. habil. Richter und Herrn Prof. Jeschke den Verzicht auf die Verwendung der Wasserextrakte und die Konzentration auf die in 70 %-Ethanol gelösten Substanzen. Dies erfolgte auch im Hinblick auf die aktuelle Literatur, in der eine gesteigerte antioxidative Wirkung des Curcumas in Abhängigkeit zur Ethanolkonzentration beschrieben wird [97].

Die häufige Verwendung von Curcuma-Ethanolextrakten in *in vivo*- und *in vitro*-Studien und die aussagekräftigen Ergebnisse [3, 117, 127] bestätigen die Entscheidung zur alleinigen Analyse und Verwendung der ethanolbasierten Extrakte.

Zusätzlich wurden die Ethanolextrakte jeweils in fünf verschiedenen Verdünnungen hergestellt. Dies diente der Erkennung von dosisabhängigen Ergebnissen. Die unterschiedlichen Bestandteile der Extrakte konnten mithilfe der HPLC, einem effizienten und etablierten analytischen Trennverfahren, nachgewiesen werden [49, 50, 56, 79, 89, 97, 141, 151, 157, 170]. Dieses und gleichwertige Trennverfahren sind zur spezifischen Untersuchung des Curcumas und des schwarzen Pfeffers in einschlägiger Literatur häufig beschrieben und werden zur Analyse des Curcumas in über zwei Drittel der Verfahren regelmäßig angewendet [79, 97, 141, 151, 157]. Auch die Detektion der Flavonoide Quercetin und Rhamnetin mithilfe der HPLC hat sich als zuverlässiges Verfahren etabliert [49, 89].

Die Charakterisierung des HR-Status erfolgte standardmäßig lichtmikroskopisch über die Immunhistochemie, die ein sicheres und erprobtes Verfahren zur Messung von PgR- und ER-Rezeptoren darstellt und somit in vielen Studien, vor allem zur Erforschung des Mammakarzinoms, Anwendung findet [16, 43, 52, 65].

Durch regelmäßige Durchführung der Assays BrdU-Proliferationstest, CytoTox-Glo<sup>®</sup>-, CellTiter-Glo<sup>®</sup>- und NRU-Test zur Messung von Zellviabilität, -proliferation und Zytotoxizität in vorherigen Dissertationen des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik Rostock etablierten sich die Tests als geeignete und sichere Verfahren zur Untersuchung verschiedener Substanzen auf Krebszelllinien, insbesondere auch auf Mammakarzinomzellen.

Die Extraktherstellung erfolgte mit Curcumapulver und gemahlenem schwarzem Pfeffer aus lokalen Supermärkten großer Unternehmen des Lebensmitteleinzelhandels, wodurch deutschlandweit ein müheloser Kauf der verwendeten Extrakte möglich ist.

Zur Untersuchung von malignen als auch benignen Zellen diente die Behandlung der beiden etablierten und disponiblen ER-positiven Brustkrebszelllinien MCF-7 und MCF-12a. Die Wirkung verschiedener Substanzen auf beide Zelllinien wird häufig in *in vitro*-Studien zum Thema Mammakarzinom untersucht [125, 126, 142, 152, 158].

## 5.2 Ergebnisse

### 5.2.1 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Vor allem zur Isolation der Curcuminoide Curcumin, DMC und BDMC gilt die HPLC als Standardverfahren [6, 79, 141, 157, 170]. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte HPLC-Analyse des Curcumas wies BDMC, Kaffeesäure und Rhamnetin nach. Anhand der aktuellen Literatur war dahingegen vor allem die Detektion von Curcumin zu erwarten [97]. Bei Kaffeesäure sowie Quercetin hätten keine Übereinstimmungen der Peaks im Chromatogramm zu sehen sein sollen [97], letzteres ergab auch die vorliegende Untersuchung. Demgegenüber werden in der Literatur allerdings auch von Kaffeesäure-Nachweisen in Curcuma berichtet [49]. Im Chromatogramm des schwarzen Pfeffers zeigten sich Übereinstimmungen der Peaks mit Folsäure, Kaffeesäure und Rhamnetin. In der aktuellen Literatur sind zu dem Thema wenige Erkenntnisse zu finden. So wiesen 2006 Phillips *et al.* in der Flüssigkeitschromatographie Folsäure in rotem und grünen Pfeffer nach [116]. Durch die Ergebnisse der beiden Einzelextrakte waren in der Mischung beider Extrakte deutliche Nachweise der überschneidenden Bestandteile Kaffeesäure und Rhamnetin sowie Folsäure und BDMC erwartet worden. Die Mischung beider Ethanolextrakte wies zwar Rhamnetin nach, zeigte aber auch Überschneidungen mit den Peaks der Inhaltsstoffe DMC und Isorhamnetin. Dagegen erfolgte kein Nachweis der anderen in den Extrakten 1 und 2 detektierten Bestandteile.

### 5.2.2 Immunhistochemie

Da deren Ergebnis eine entscheidende Rolle spielt [71], wurde die etablierte immunhistochemische Überprüfung des PgR und der ER und der Zelllinien MCF-7 und MCF-12a durchgeführt. Es konnte ein eindeutig positiver HR-Status nachgewiesen werden, wodurch die aktuelle Literatur und die Herstellerangaben bestätigt wurden [8, 9, 48, 111, 155]. In diesen wird ein Karzinom mit mindestens zehn Prozent positiver Tumorzellkerne als PgR- oder ER-positiv bezeichnet wird [43]. Wie oben beschrieben (1.2.1. und 1.2.8), ist das Ergebnis essenziell für die Prognose.

### 5.2.3 Einfluss der Extrakte und Referenzen auf Zellproliferation, -viabilität und -stoffwechsel

#### 5.2.3.1 Einfluss der Extrakte und Referenzen auf die Zellproliferation

Innerhalb der Referenzen wiesen Curcumin, DMC und BDMC bezüglich beider Zelllinien eine starke, hoch-signifikante Zellproliferationshemmung ( $p < 0,001$ ) auf. Auch in der Literatur ist ein antiproliferativer Effekt des BDMCs auf Krebszellen beschrieben. So zeigten Li *et al.* 2013 unter BDMC eine Proliferationshemmung der MCF-7-Zellen und eine Aktivierung des Tumorsuppressorgens p53 [90]. Auch Qiu *et al.* wiesen 2020 eine Inhibition der Zellproliferation eines hepatozellulären Karzinoms durch BDMC nach [124]. Die Proliferationshemmung durch DMC wird ebenfalls in der Literatur bestätigt. So beschrieben Ni *et al.* 2012 einen Zellzyklus-Arrest [107] und eine antiproliferative und proapoptotische Wirkung auf Prostatakrebszellen durch DMC, wie auch

Hung *et al.* 2012 [69, 107], wobei letztere auch auf die zytotoxische Wirkung des Curcumins und des BDMCs hinwiesen [69].

In einigen Studien konnte ein antiproliferativer Effekt des Hauptwirkstoffs des Curcumas, des Curcumins, nachgewiesen werden. So belegten Ramachandran *et al.* 1999 *in vitro* bei MCF-7-Mammakarzinomzellen eine Arretierung der G2-Phase nach Curcumingabe und somit eine Hemmung der Proliferation [126]. Auch Mehta *et al.* wiesen 1997 auf die antiproliferative Wirkung des Curcumins durch die Hemmung der ODC hin [11, 102]. Zudem induziert Curcumin *in vitro* eine Hemmung des vascular endothelial growth factor (VEGF) und des basic fibroblast growth factor (b-FGF) sowie eine antiproliferative Wirkung auf ER-positive MCF-7-Zellen, wie 2002 von Shao *et al.* dargestellt wurde [142]. Auch bei ER-negativen Mammakarzinomzellen *in vitro* konnte in der Studie von Bimonte *et al.* 2015 eine Proliferationshemmung und eine Steigerung der Apoptose durch Curcumin aufgezeigt werden. Die Studie bestätigte zudem eine Verminderung des Tumorumfanges und der Angiogenese innerhalb von sechs Wochen nach Curcumingabe *in vivo* [20]. Ein idealer Angriffspunkt scheint auch die Telomerase zu sein, die in den meisten Krebsarten aktiv ist, dagegen in somatischen Zellen kaum oder keine Aktivität zeigt. So veröffentlichten Kim *et al.* 1994, dass alle 94 untersuchten Tumorzelllinien Telomeraseaktivität aufwiesen im Gegensatz zu den somatischen Zellen, die keine Aktivität zeigten [77]. 2002 untersuchten Ramachandran *et al.* die Telomeraseaktivität der MCF-7-Zelllinie nach Curcumingabe. Mit steigender Curcuminkonzentration bis zu 100  $\mu$ M nahm die Telomeraseaktivität im Vergleich zu unbehandelten Zellen um bis zu 93,4 % ab [125].

Die gemeinsame Testung von Curcumin, DMC und BDMC erfolgte in der Studie von Wei *et al.* 2021, die belegte, dass die drei Curcuminoide nicht nur konzentrationsabhängig, sondern auch in Kombination einen synergistischen Effekt in Hinblick auf die zytotoxische Wirkung auf Prostatakarzinomzellen *in vitro* aufwiesen mit einem deutlich intensiveren Effekt als separat eingesetzt oder in Zweierkombinationen. Ein Extrakt aus getrocknetem gemahlenem Curcuma in Methanol wirkte dabei nach Behandlung in einem Ultraschallbad und Zentrifugation am stärksten proliferationshemmend [168].

Allerdings weisen Curcuminoide oral eine sehr niedrige Bioverfügbarkeit auf, die auf die schlechte Wasserlöslichkeit und die daraus resultierende geringe Aufnahme im Magen-Darm-Trakt sowie die schnelle Metabolisierung zurückzuführen ist [27, 134, 141]. Cheng *et al.* untersuchten 2001 über drei Monate 25 Patienten mit Präkanzerosen oder Karzinomen, die oral Curcumin einnahmen, wobei sich die Anfangsdosis von 0,5 g/d stufenweise auf bis zu 8 g/d erhöhte. Trotz der hochdosierten Curcumingabe war die Bioverfügbarkeit mit Serumkonzentrationen von  $0.51 \pm 0.11 \mu\text{M}$  (4 g) und  $1.77 \pm 1.87 \mu\text{M}$  (8 g) sehr gering. Der Höchstwert wurde nach 1-2 h erreicht, in den folgenden 12 h nahm die Konzentration ab. Im Urin konnte kein Curcumin detektiert und bis einschließlich 8 g/d über mehrere Wochen keine Toxizität nachgewiesen werden [36]. Lao *et al.* untersuchten 2006 die einmalige Einnahme oraler Curcuminoid-Dosen zwischen 0,5 g und 12 g, wobei erst ab einer Gabe von 10 g und 12 g ein Serumnachweis detektiert und bei allen Konzentrationen leichte Nebenwirkungen nachgewiesen wurden [86].

Um die Resorption zu erhöhen, wird an vielen Verfahren geforscht, unter anderem an der Kombination von Curcumin mit Piperin, einem Hauptbestandteil des schwarzen Pfeffers. Piperin

hemmt kompetitiv die Metabolisierung des Curcumins, wodurch der Abbau verlangsamt und die Aufnahme gesteigert wird [27]. Um die Wirkung zu untersuchen, erfolgten in der vorliegenden Studie verschiedene Testungen eines in Ethanol gelösten Extraktes aus Curcuma und schwarzem Pfeffer im Verhältnis 1:1, sowohl unverdünnt als auch zu je 50 %, 20 %, 10 %, 5% und 3 % verdünnt. Beide Stoffe wurden zudem separat untersucht, um den individuellen Effekt der Komponenten zu erkennen. Das unverdünnte Extrakt aus schwarzem Pfeffer zeigte eine deutliche, hoch-signifikante Hemmung der Zellproliferation, allerdings nur bei der malignen MCF-7-Zelllinie. Schmidt *et al.* belegten 2020 eine konzentrations- und zeitabhängige zytotoxische Wirkung auf MCF-7-Zellen durch Piperin mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration ( $IC_{50}$ ) von 94.5  $\mu$ M in 24 h, im Vergleich zu 38.3  $\mu$ M in 48 h [135].

Die unverdünnte Mischung des Extraktes aus Curcuma und schwarzem Pfeffer zeigte in der vorliegenden Studie eine starke, hoch-signifikante antiproliferative Wirkung ( $p < 0,001$ ) auf beide Zelllinien. Bisherige Studien wiesen eine bessere Aufnahme und dadurch eine höhere Bioverfügbarkeit des Curcumas beziehungsweise des Curcumins durch die Kombination mit schwarzem Pfeffer nach. So konnten Shoba *et al.* 1997 bei Ratten nach oraler Gabe von 2 g Curcumin pro kg Körpergewicht (KG) über einen Zeitraum von 4 h nur eine leichte Konzentration im Serum messen. Mit zusätzlich 20 mg Piperin pro kg KG erfolgte eine Erhöhung des Serumspiegels 1 h nach Verabreichung von  $1.00 \pm 0.26$  g/ml auf  $1.55 \pm 0.21$  g/ml. Auch bei den Probanden führte die alleinige Gabe von 2 g Curcuminkapseln zu keinem bis kaum einem Nachweis im Serum. Nach einer zusätzlichen Piperineinnahme von 20 mg erhöhte sich der Serumspiegel von  $0.006 \pm 0.005$  g/ml auf bis zu  $0.18 \pm 0.16$  g/ml in den folgenden 45 min. Die relative Bioverfügbarkeit des Curcumins verbesserte sich durch Piperingabe auf 154 % bei Ratten beziehungsweise 2000 % bei Menschen [61]. Weitere Methoden, unter anderem zur Verbesserung der Löslichkeit, sind die Formulierung mit Tensiden oder Emulgatoren sowie die Feinstmahlung des Curcumas und die Verabreichung in Curcumaöl [27]. Schiborr *et al.* maßen 2014 nach Aufnahme von 500 mg mikronisierten Curcuminoiden (410 mg Curcumin, 80 mg DMC und 10 mg BDMC) höhere Plasmaspiegel des Curcumins von durchschnittlich 41,6 nmol/l, des DMCs von 34,5 nmol/l und des BDMCs von 5,1 nmol/l im Vergleich zum Pulver, bei dem die Plasmaspiegel 7,1 nmol/l, 1,5 nmol/l beziehungsweise 0,5 nmol/l betragen [134].

### 5.2.3.2 Einfluss der Extrakte und Referenzen auf die Zellviabilität

In den Viabilitätstestungen dieser Arbeit zeigten Rhamnetin, DMC, BDMC und Curcumin innerhalb der Referenzen eine starke, hoch-signifikante Hemmung ( $p < 0,001$ ) der Lebensfähigkeit der MCF-7- und MCF-12a-Zellen. Letzteres bestätigt das Studienergebnis einer konzentrations- und zeitabhängigen Reduktion der Zellviabilität durch Curcumin von Schmidt *et al.* 2020. So betrug die  $IC_{50}$  innerhalb von 24 h 24,5  $\mu$ M Curcumin und bei einer Behandlung von 48 h 11.4  $\mu$ M [135]. Ramachandran *et al.* zeigten 2002 eine konzentrationsabhängige Zytotoxizität des Curcumins mit 92,9 % apoptotischen MCF-7-Zellen nach einer Behandlung mit 100  $\mu$ M Curcumin. Die  $IC_{50}$  betrug  $26,0 \pm 1,41$   $\mu$ M [125].

Vorangegangene Studien belegen zudem eine Wirkung des DMCs, des Rhamnetins und des BDMCs auf die Lebensfähigkeit der Zellen. So bestätigten Ni *et al.* 2012 unter 20 bis 160  $\mu$ M DMC eine

konzentrations- und zum Teil zeitabhängige Hemmung der Zellviabilität von Prostatakarzinomzellen sowie eine proapoptotische Wirkung und einen G2/M-Phasen-Arrest [107]. Lan *et al.* wiesen 2018 einen proapoptotischen Effekt des Rhamnetins sowie eine Verringerung der Lebensfähigkeit von MCF-7-Zellen nach. Mit einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  Rhamnetin sank diese innerhalb einer Inkubation von 48 h bei 37 °C hoch-signifikant auf ca. 53 % und nach 72 h auf etwa 40 % [85]. Auch Lee *et al.* demonstrierten 2011 eine Induktion der Apoptose durch Rhamnetin auf Brustkrebszellen [89]. Die hemmende Wirkung des BDMCs auf die Viabilität der Zellen eines hepatozellulären Karzinoms belegten Qiu *et al.* 2020 und wiesen eine IC<sub>50</sub> nach 48 h von 59,13  $\mu\text{M}$  nach [124]. Diesen Effekt zeigten Xu *et al.* 2015 bei Zellen des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms, wobei die Lebensfähigkeit der Zellen mit steigender Konzentration und längerer Behandlung des BDMCs abnahm. So führte eine Inkubation zweier Zellreihen über 24 h mit 34,4  $\mu\text{mol/l}$  beziehungsweise 35,7  $\mu\text{mol/l}$  zu einer Halbierung der Zellviabilität. Erfolgte eine Erhöhung der Behandlungsdauer auf 72 h und der Konzentration auf 80  $\mu\text{mol/l}$ , sank die Zellviabilität auf etwa 5 % [173]. Wei *et al.* bestätigten 2021 *in vitro* durch die Kombination von Curcumin, DMC und BDMC eine stärkere, synergistische Hemmung der Zellviabilität von Prostatakarzinomzellen als bei alleiniger Gabe der Stoffe oder in Doppelkombinationen [168].

Des Weiteren belegen die in dieser Arbeit vorliegenden Untersuchungen eine sehr starke, hoch-signifikante Reduktion der Zellviabilität ( $p < 0,001$ ) unter Einfluss des unverdünnten Extraktes 3 aus Curcuma und schwarzem Pfeffer sowie des unverdünnten Extraktes 2 aus schwarzem Pfeffer. Auch die 50 %-, 20 %- und 10 %-Verdünnungen des Extraktes 3 reduzierten in einigen Assays die Zellviabilität. Die zytotoxische Wirkung des Piperins auf MCF-7-Zellen ist bereits oben beschrieben (5.2.1.1). Die gesteigerte Wirkung des Curcumins durch die zusätzliche Gabe von Piperin bestätigt die aktuelle Literatur (5.2.1.1). So wiesen Bhutani *et al.* 2008 durch die Kombination der intra-peritonealen Gabe von 20 mg/kg/KG Curcumin mit 2,5 mg/kg/KG Piperin an Ratten eine Wirkungsverstärkung neurologischer Effekte des Curcumins im Vergleich zur alleinigen Gabe von 40 mg/kg/KG Curcumin nach [19]. Auch die Erhöhung der Bioverfügbarkeit des Curcumins durch Piperin ist Gegenstand einiger Studien [1, 19, 61]. Anand *et al.* zeigten 2007 in einer allerdings nur sehr wenige Probanden umfassenden Studie *in vivo* eine Steigerung der Bioverfügbarkeit des Curcumins nach einer kombinierten Gabe von 2 g Curcumin und 5 mg Piperin. Dabei erhöhte sich die Konzentration des Curcumins in Kombination mit Piperin im Vergleich zur alleinigen Curcumingabe nach 30 min von etwa 1 ng/ml auf 3 ng/ml und nach 60 min von ca. 2,2 ng/ml auf 7 ng/ml [5]. Die Wirkung der Curcuminoide bei zusätzlicher Piperineinnahme untersuchten Panahi *et al.* 2014 bei Patienten mit Osteoarthritis im Knie. Nach sechswöchiger Einnahme von 1500 mg Curcuminoide, aufgeteilt in drei tägliche Dosen und angereichert mit jeweils fast 5 mg Piperin, verbesserten sich sowohl vorhandene Schmerzen als auch die Motorik im Vergleich zur Placebo-kontrolle [113].

Die gesteigerte Wirkung der Bioverfügbarkeit des Curcumins beziehungsweise der Curcuminoide durch Piperin wird auf dessen Hemmung der intestinalen und hepatischen Glucuronidierung durch Reduktion der Aktivität der UDP-Glucuryltransferase und somit eine langsamere Elimination zurückgeführt [61, 148].

### 5.2.3.3 Folsäure

Als weitere Referenz diente Folsäure, ein hitzeempfindliches Vitamin, das in tierischen Produkten, aber auch in Gemüse, Früchten mit orangefarbenem Fruchtfleisch, zum Beispiel Pfirsichen, und Vollkornprodukten enthalten ist [128, 137]. Der tägliche Bedarf an Folsäure beträgt etwa 0,4 mg, bei schwangeren Frauen steigt er auf das Doppelte an, da sich eine größere Menge an Zellen teilt und Folsäure essenziell für die DNA-Synthese und die Bildung der Erythrozyten ist. Folsäuremangel kann zu einer Anämie und in der Schwangerschaft zu einem Neuralrohrdefekt des Kindes führen [66, 137]. So ist Folsäure ein wichtiger Bestandteil der Nukleotid-Biosynthese, gerade sich stark teilende Zellen benötigen das Vitamin. Bis zu 10 mg Folsäure können gespeichert werden, größtenteils in der Leber [66]. Gibson *et al.* belegten 2011 mit einem durchschnittlichen Follow-up von neun Jahren ein vermindertes Risiko einer kolorektalen Karzinom-Erkrankung durch Folsäure-Einnahme, wobei als Kritikpunkt der kurze Beobachtungszeitraum genannt wird [57].

In den hier vorliegenden Assays zeigte Folsäure allerdings nicht die erwartete antiproliferative Wirkung und Hemmung der Zellviabilität mit Ausnahme der Zellviabilitätsmessung der MCF-12a-Zelllinie im CellTiter-Glo<sup>®</sup>-Test. Im Gegensatz zu oben genannten Quellen kamen Qin *et al.* 2013 zu dem Ergebnis, dass Folsäure zu keiner signifikanten Inzidenzsenkung verschiedener Krebsarten wie Brust-, Lungen- oder Prostatakrebs beiträgt [123]. Kim *et al.* belegten 2018 eine signifikante ( $p = 0,006$ ) protektive Wirkung von Folsäure auf BRCA1-induzierte Mammakarzinome [78]. Die Einnahme von Folsäure scheint laut Araghi *et al.* (2019) die Wahrscheinlichkeit einer kolorektalen Karzinom-Erkrankung sogar zu erhöhen. Allerdings erfolgte die Gabe in Kombination mit dem Vitamin B12, sodass die jeweiligen Effekte und etwaige Wechselwirkungen untersucht werden sollten [109]. Auch Charles *et al.* wiesen 2004 bei Schwangeren, die ein Jahr lang täglich 5 mg Folsäure einnahmen, später eine Steigerung der Mortalitätsrate infolge eines Mammakarzinoms nach [35]. Ebbing *et al.* belegten 2009 einen krebsfördernden Effekt einer täglichen Folsäuregabe von 0,8 mg kombiniert mit Vitamin B12 (0,4 mg/d). So stieg die Krebsinzidenz und -mortalität bei Patienten mit ischämischen Herzerkrankungen in Norwegen, einem Land, in dem Folsäure in der Nahrung nicht angereichert wird. Allerdings benennen die Autoren einige Kritikpunkte, unter anderem, dass Folsäure abermals stets mit Vitamin B12 kombiniert und nie alleine verabreicht wurde [47].

### 5.2.3.4 Isorhamnetin

Die Referenz Isorhamnetin zählt zu den Flavonoiden und ist ein direkter Metabolit des Quercetins. Sie ist in Früchten und Pflanzen, besonders in Heilkräutern, enthalten [145, 171]. In der Literatur sind Quercetin und dessen Metabolite wie zum Beispiel Isorhamnetin Gegenstand der Krebsforschung [171]. Shi *et al.* belegten 2012 eine Hemmung der Proliferation einer ösophagealen Krebszelllinie nach einer 72 h-Behandlung mit Isorhamnetin [144]. Der Effekt auf Brustkrebs wurde ebenfalls untersucht: Hu *et al.* wiesen 2015 eine antiproliferative und proapoptotische Wirkung auf MCF-7-Zellen und weitere Mammakarzinomzellen durch Isorhamnetin nach [68]. Auch Wu *et al.* zeigten 2018 eine Reduktion der Zellviabilität und einen zytotoxischen Effekt durch Quercetin und Isorhamnetin, wobei Quercetin im Vergleich zu seinem Metaboliten eine stärkere Wirkung auf die MCF-7-Zellen erkennen ließ. Die konzentrationsabhängige Hemmung der Viabilität wurde mit einer

Menge von maximal 100  $\mu$ M über einen Zeitraum von 48 h untersucht, wodurch diese bei Quercetin auf bis zu 33,1 % und bei Isorhamnetin auf bis zu 34,2 % sank [171]. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Tests zeigten allerdings entgegen der Erwartung keinen signifikanten Einfluss von Isorhamnetin auf die Proliferation und Viabilität der behandelten Zelllinien.

#### 5.2.4 Einfluss der Extrakte auf den Zellstoffwechsel

Die Messungen der Glucosekonzentration als auch des pH-Werts und der Laktatkonzentration im Medium geben Hinweise zum Verbrauch der Zellen während der Glykolyse, des Umbaus der Glucose zu Pyruvat, aus dem die Reduktion zu Laktat folgen kann, und somit zum Zellmetabolismus. Dadurch ließ sich der Einfluss der verschiedenen Extrakte und Kontrollen auf die Vitalität der MCF-7- und MCF-12a-Zellen darstellen.

Jede humane Zelle kann mittels Glykolyse, bei der der Abbau von Glucose zu Pyruvat stattfindet, Energie in Form von ATP oder indirekt über NADH/H<sup>+</sup> gewinnen. Zudem werden Stoffe für Biosynthesen, wie zum Beispiel der Fettsäuren oder des Cholesterins, gebildet. Bei fehlendem Sauerstoff erfolgt über die Laktat-Dehydrogenase der Umbau von Pyruvat zu Laktat, bezeichnet auch als anaerobe Glykolyse. Dagegen verläuft bei ausreichendem Sauerstoffgehalt in den meisten Zellen der Abbau von Pyruvat zu Acetyl-CoA über die Pyruvat-Dehydrogenase. Über den Citratzyklus und die Atmungskette entsteht im Folgenden Energie in Form von ATP, aber auch CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O [66]. Warburg *et al.* beobachteten in den 1920er Jahren einen erhöhten Glucosebedarf von Tumorzellen und trotz ausreichender Sauerstoffversorgung und Mitochondrienvorkommens die Umwandlung von Glucose zu Laktat. Diese Entdeckung wird als Warburg-Effekt bezeichnet [166, 167].

##### 5.2.4.1 Einfluss der Extrakte auf den Glucoseverbrauch der Zellen

Durch die Proliferationshemmung und die verringerte Zellviabilität war eine konzentrationsabhängige Abnahme des Verbrauchs und somit eine Zunahme der extrazellulären Glucosekonzentration mit dem höchsten Anstieg bei Extrakt 3 aus Curcuma und schwarzem Pfeffer zu erwarten.

Eine Zunahme der Glucosekonzentration im Medium des unverdünnten Extraktes 1 aus Curcuma als auch in den Medien einiger verdünnter Extrakte aus schwarzem Pfeffer ließ sich bei beiden Zelllinien beobachten. Das Extrakt 3 aus Curcuma und schwarzem Pfeffer wies in verschiedenen Verdünnungen eine erhöhte Glucosemenge bei den MCF-7-Zellen auf. Allerdings waren Unterschiede in der extrazellulären Glucosekonzentration bei allen Extrakten im Vergleich zu den unbehandelten Zelllinien meist nur minimal und konzentrationsunabhängig. Wei *et al.* wiesen 2021 durch verschiedene Kombinationen von Curcumin, DMC und BDMC eine Hemmung der Glykolyse durch Herabregulation der Enzyme von Prostatakarzinomzellen *in vitro* nach. Die stärkste Wirkung zeigten alle drei Curcuminoide kombiniert [168]. Vaughan *et al.* belegten 2013 durch Curcumin eine Hemmung des durch TNF- $\alpha$  hervorgerufenen vermehrten Warburg-Effekts in MCF-7-Zellen und als Folge dieser eine verminderte Verstoffwechslung zu Laktat [160]. Wie erwartet erfolgte in den Messungen dieser Arbeit zudem ein Anstieg der Laktatkonzentration im Nährmedium unter Tamoxifen und Endoxifen im Vergleich zu unbehandelten Zellen. 2005 belegten Kallio *et al.* den

Eintritt des Zelltodes bei MCF-7-Zellen nach Behandlung mit 5 - 7  $\mu$ M Tamoxifen schon nach weniger als 60 min [75].

#### 5.2.4.2 Einfluss der Extrakte auf den pH-Wert der Zellen

Infolge des Warburg-Effekts wird in den Tumorzellen trotz ausreichender Sauerstoffversorgung über die Glykolyse Glucose zu Laktat umgebaut [166, 167]. Die extrazelluläre Umgebung wird saurer, wodurch der pH-Wert sinkt. Somit ist dieser ebenfalls ein Prädiktor für den Zellmetabolismus.

Durch die Hemmung von Zellviabilität und Proliferation der MCF-7- und MCF-12a-Zelllinien infolge einer Extraktzugabe müssten sich durch die verminderte Glykolyse höhere pH-Werte im Vergleich zu den unbehandelten Zellen einstellen. Die pH-Wert-Messung zeigte bei der MCF-7-Zelllinie keine eindeutigen konzentrationsabhängigen Veränderungen durch die Extraktzugabe. Bei den MCF-12a-Zellen sank der pH-Wert nach der Behandlung mit den Extrakten, allerdings unabhängig von deren Konzentration oder stofflichen Zusammensetzung. Ein Vergleich der Ergebnisse mit aktueller Literatur und eine Diskussion dieser ist aufgrund mangelnder Studien zu pH-Wert-Messungen nach Gabe von Curcuma und schwarzem Pfeffer aktuell nicht möglich.

#### 5.2.4.3 Einfluss der Extrakte auf die Laktatproduktion der Zellen

Die Laktatmessung ermöglicht Rückschlüsse auf die anaerobe Glykolyse und das dadurch entstehende Laktat [166, 167]. Somit gibt diese Untersuchung Hinweise auf die metabolische Aktivität der Zellen.

Die oben genannten Tests wiesen einen antiproliferativen Einfluss eines Teils der Extrakte und eine Hemmung der Zellviabilität der Zelllinien MCF-7 und MCF-12a nach, wodurch die Laktatkonzentration durch die verminderte Glucoseverwertung hätte sinken müssen. Am ehesten wurde dies bei Extrakt 3 aus Curcuma und schwarzem Pfeffer nach Zugabe auf die MCF-7-Zellen deutlich, wodurch die Laktatkonzentration sank und bei allen Verdünnungen unter dem Kontrollwert blieb.

### 5.2.5 Die Kontrollen Tamoxifen, Endoxifen und Estradiol

#### 5.2.5.1 Die SERMs Tamoxifen und Endoxifen

Die Behandlungen der MCF-7- und MCF-12a-Zelllinien mit Tamoxifen und Endoxifen erfolgten als Kontrolle in Erwartung einer starken, signifikanten Hemmung der Zellproliferation und -viabilität. Der SERM Tamoxifen wird in der adjuvanten Hormontherapie, vor allem in der Prämenopause, verwendet und wirkt antagonistisch an ER-positiven Mammakarzinomzellen [18]. Die Tamoxifengabe erfolgt meist mit 20 mg/d fünf Jahre lang. In der Leber wird Tamoxifen vor allem durch CYP2D6 zu Endoxifen und 4-Hydroxytamoxifen, den aktiven Metaboliten, verstoffwechselt [76, 149]. Allerdings ist die Endoxifen-Plasmakonzentration bei Mammakarzinom-Patientinnen, mit einer Tamoxifeneinnahme von 20 mg täglich, mehr als sechsmal so hoch wie die des 4-Hydroxytam-

oxifens [91]. Beide Metaboliten zeigen eine viel höhere Affinität zu den ER als Tamoxifen. 4-Hydroxytamoxifen weist etwa 35 % und Endoxifen ca. 25 % der Rezeptoraffinität von Estradiol auf [74, 91]. Da Tamoxifen über mehrere CYP-Enzyme verstoffwechselt wird, kann eine geringere Enzymaktivität möglicherweise zu einer verminderten Wirksamkeit des Medikaments führen. Grund hierfür können genetische Polymorphismen der CYP-Enzyme, vor allem des CYP2D6, aber auch einige Stoffe, wie zum Beispiel bestimmte Antidepressiva, sein [132, 149].

Bei den beiden Zelllinien MCF-7 und MCF-12a ließ sich durch beide SERMs eine starke, hochsignifikante Proliferationshemmung und eine Reduktion der Viabilität nachweisen, wobei deren Wirkung deutlich stärker war als die der Curcuma- und Pfeffer-Extrakte. Der verminderte Stoffwechsel konnte durch den geringeren Glucoseverbrauch und die niedrige extrazelluläre Laktatkonzentration im Vergleich zu unbehandelten Zellen belegt werden. Dies bestätigt sich in der Literatur durch ebensolche Studienergebnisse einer zytotoxischen, proapoptotischen und antiproliferativen Wirkung [75, 76]. Hussaarts *et al.* belegten 2019 nach der täglichen Einnahme von durchschnittlich 20 mg Tamoxifen und dreimal täglich 1200 mg Curcumin eine Verringerung des Tamoxifenmetabolismus zu Endoxifen, die durch die zusätzliche Gabe von dreimal täglich 10 mg Piperin verstärkt wurde. Somit kann die Kombination der Stoffe zu einem Nichterreichen der therapeutischen Breite führen [70]. Dagegen zeigten Hajigholami *et al.* 2016 durch eine Kombination von Tamoxifen mit Curcumin eine Steigerung der Proliferationshemmung und proapoptotischen Wirkung auf MCF-7-Zellen, die zum Teil auch tamoxifenresistent waren, im Vergleich zu der alleinigen Behandlung mit Tamoxifen [62].

#### 5.2.5.2 Estradiol

Als weitere Kontrolle diente das zu den Estrogenen zählende Estradiol, das durch die GnRH-Freisetzung im Hypothalamus hauptsächlich im Ovar ausgeschüttet wird und mit Estron zu den biologisch aktivsten Formen der Estrogene gezählt wird. Es kontrolliert unter anderem die Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale, zeigt aber auch sexualunspezifische Effekte, zum Beispiel auf den Wasser- und Elektrolythaushalt sowie das Knochenwachstum [66]. Täglich sezerniert eine nicht-schwangere Frau je nach Zyklusphase ca. 25-100 g Estrogene. Postmenopausal sinkt die Menge auf 5-10 g/d. In den letzten Wochen einer Schwangerschaft steigt die Konzentration auf etwa 30 mg/d an [154]. Die Verwendung des Estradiols als Kontrolle erfolgte aufgrund der belegten Erhöhung des Brustkrebsrisikos [32, 39, 51, 53, 63] in der Erwartung einer proliferationssteigernden Wirkung auf ER-positive Brustkrebszellen. In den meisten der hier vorliegenden Assays erfolgte eine Steigerung der Proliferation und Viabilität der MCF-7- und MCF-12a-Zelllinien durch Estradiol. Allerdings zeigten einige wenige Tests auch keine der erwarteten Wirkungen. Liu *et al.* belegten 2002, dass dies durch einen ER  $\beta$ -induzierten inhibitorischen Effekt auf das ER  $\alpha$ -vermittelte Zellwachstum hervorgerufen werden kann [92]. Ein weiterer Grund kann die in der vorliegenden Untersuchung verwendete Estradiolkonzentration sein. So führte in Studien eine erhöhte Konzentration zu einer antiproliferativen Wirkung auf MCF-7-Zellen [138, 169]. In vorliegender Arbeit deuteten die Stoffwechselfparameter eher einen geringen antiproliferativen Effekt des Estradiols an. Bei beiden Zelllinien stieg die extrazelluläre Glucosekonzentration im Vergleich zu den unbehandelten Zellen leicht an oder veränderte sich nicht. Die Laktatkonzentration sowie der

pH-Wert nahmen ab, letzterer stieg zudem bei den MCF-12a-Zellen minimal an, was die oben erwähnten Gründe nahelegt.

### 5.3 Methodenkritik

Die verwendeten malignen MCF-7- und benignen MCF-12a-Zellen sind durch ihre Disponibilität und Kultivierbarkeit häufig Grundlage von *in vitro*-Studien [125, 126, 142, 152, 158]. Allerdings können gerade bei regelmäßig verwendeten Zelllinien wie der weltweit am häufigsten zu Forschungszwecken genutzten Brustkrebszelllinie MCF-7 vor allem nach jahrelanger Lagerung Mutationen im Phänotyp und in der genetischen Ausstattung auftreten, die bisweilen zu Divergenzen führen [28]. So wurden Veränderungen in der Wachstumsrate, der Hormonrezeptorexpression [28, 110] und des Karyotyps [13, 28] bei MCF-7-Zellen aus verschiedenen Laboren nachgewiesen [28, 110]. Um diese Risiken möglichst gering zu halten, kamen für die vorliegenden Untersuchungen ausschließlich Mammakarzinomzellen bis zur 30. Passage zur Verwendung. Außerdem ist der Entnahmeort von Bedeutung, da Zellen für Laboruntersuchungen zum Teil nicht dem Primärtumor, sondern Metastasen angehören und sich so zwar schneller teilen, durch ihre Eigenschaften allerdings weniger klinisch relevant sind [28]. Zudem hätte die Anzahl der Assaydurchführungen erhöht werden können, um die Standardabweichung zu minimieren, was zu präziseren und aussagekräftigeren Ergebnissen führen würde.

Außerdem ist zu beachten, dass je nach Zubereitung die Bioverfügbarkeit des Curcumas *in vivo* sehr unterschiedlich ist [134]. Um die Wirkung des Curcumas zu verstärken, hätten unterschiedliche Zubereitungsformen verwendet werden können.

Da es Hinweise gibt, dass auch Piperin auf die Viabilität der MCF-7-Zellen wirkt, hätte die Substanz ebenfalls als Referenz untersucht werden können [135]. Weitere unterschiedliche Dosierungen des Curcumas und des schwarzen Pfeffers hätten zu mehr vergleichbaren Daten geführt und zu weiteren Ergebnissen in Hinblick auf die dosisabhängige Wirkung der drei Extrakte.

Auch die Zellzählung in der Bürker-Zählkammer bietet mögliches Fehlerpotenzial. So kann eine unzureichende homogene Durchmischung der Zellsuspension zu fehlerhaften Werten führen [60], die wiederum durch unterschiedlich ausgesäte Zellzahlen die anschließenden Tests beeinflussen und zu Messungenauigkeiten führen können. Durch mehrmaliges Vortexen und Durchmischen während des Pipettierens wurde versucht, diese Fehlerwahrscheinlichkeit zu minimieren. Auch im folgenden Schritt der Zellaussaat könnte trotz mehrmaligen Vortexens und Vermischens mit der Pipette eine inhomogene Verteilung der Zellen auf der 96-Well-Platte erfolgt sein. Des Weiteren kann eine Preinkubation von 60 min bei Raumtemperatur vor der eigentlichen Inkubation bei 37 °C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank den Edge Effect und somit Variationen in Zelladhärenz und -wachstum vor allem in äußeren Wells vermeiden [95]. Zu bedenken ist dabei auch die Verteilung der Extrakte und Kontrollen auf der Zellkultur-Testplatte, die ebenfalls beeinflusst werden könnte. Nach Schmidt *et al.* 2020 zeigt eine 48 h-Inkubation eine stärkere Hemmung der Viabilität als 24 h [135], wonach es sinnvoll wäre, die Inkubationszeit zu verlängern.

Zuletzt erfolgte in einigen Arbeiten keine klare und terminologisch korrekte Definition der unterschiedlichen Bezeichnungen. So wurde unter dem Begriff 'Curcumin' in der Literatur oft die Gesamtheit der Curcuminoide oder Curcuma als Ganzes verstanden [27, 86], was die Interpretation der bisherigen Studienlage erschwert.

## 6. Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist die häufigste bösartige Neuerkrankung bei Frauen und hat den größten Anteil an weiblichen Krebstodesursachen. Viele Krebspatienten entscheiden sich für die Einnahme komplementärer oder alternativer Medizin zur Reduzierung von Therapienebenwirkungen, aber auch zur Stressbewältigung und zur Stärkung des Körpers gegen den Krebs. Zudem erfolgte in aktuellen Studien der Nachweis einer antiproliferativen, antiinflammatorischen und zytotoxischen Wirkung sowie einer Erhöhung der Strahlen- und Chemosensitivität von malignen Tumorzellen durch Curcuma beziehungsweise durch die Curcuminoide, allen voran das Curcumin. Zur Steigerung von dessen Bioverfügbarkeit wurde Piperin untersucht und ein positiver Effekt festgestellt.

Diese Arbeit untersucht die Kombination aus Curcuma und schwarzem Pfeffer als auch die Substanzen einzeln hinsichtlich ihrer Wirkung auf die maligne MCF-7- und die benigne MCF-12a-Zelllinie. Durch die Immunhistochemie erfolgte eine Charakterisierung der Rezeptoren, wobei beide den ER und sowie den PgR aufwiesen. Mithilfe der Assays BrdU-Zellproliferationstest, CytoTox-Glo<sup>®</sup>-Test, CellTiter-Glo<sup>®</sup>-Test, NRU-Test sowie der Bestimmung von Glucose-, Laktatkonzentration und pH-Wert konnten die jeweiligen Wirkungen der Extrakte und Referenzen auf die Zellproliferation, die Zellviabilität und den Stoffwechsel *in vitro* untersucht werden. Zudem erfolgte ein Vergleich untereinander, als auch mit den Kontrollen Estradiol und den SERMs Tamoxifen und Endoxifen. Curcumin, DMC und BDMC sowie das unverdünnte Extrakt 3 aus Curcuma und schwarzem Pfeffer, aber zum Teil auch das unverdünnte Extrakt 2 aus schwarzem Pfeffer zeigten einen hoch-signifikanten antiproliferativen Effekt und eine hoch-signifikante Reduktion der Zellviabilität. Zum Teil wies Rhamnetin letzteres ebenfalls auf. Die Stoffwechselergebnisse wiesen nur minimale, uneindeutige und größtenteils konzentrationsunabhängige Unterschiede auf. Im Vergleich zu den Kontrollen Tamoxifen und Endoxifen war die Hemmung der Proliferation und die zytotoxische Wirkung schwächer ausgeprägt.

Die vorliegende Arbeit belegt somit eine antikanzerogene, vielversprechend hoch-signifikante Wirkung der Kombination aus Curcuma und schwarzem Pfeffer, als auch von Curcumin, DMC und BDMC auf benigne und maligne Mammakarzinomzellen und bestätigt somit zum Teil die aktuelle Literatur.

## 7. Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen wie auch zahlreiche weitere Studien den antikanzerogenen Effekt des Curcumas, speziell des Curcumins, des DMCs und des BDMCs, und legen eine erhöhte Bioverfügbarkeit durch schwarzen Pfeffer nahe, wodurch eine verstärkte Wirkung auf die Mammakarzinomzellen erreicht werden kann. Eine potenziell verstärkte Hemmung der Zellviabilität und -proliferation durch Kombination der drei Curcuminoide mit schwarzem Pfeffer sollte exploriert werden [168].

Durch verschiedene Methoden, unter anderem zur Verbesserung der Löslichkeit, ist in der bisherigen Forschung eine Erhöhung der Curcuma-Bioverfügbarkeit erzielt worden [27, 134]. Zum Erreichen einer stärkeren Wirkung sollte zusätzlich die Kombination mit schwarzem Pfeffer eruiert werden. Eine weitere Möglichkeit wäre die kombinierte Gabe mit Tamoxifen, die nicht nur eine Steigerung der Zytotoxizität, sondern auch eine Dosisreduktion des SERMs vermuten lässt. Allerdings weist die aktuelle Literatur auf Wechselwirkungen zwischen Curcuma beziehungsweise Curcumin, Piperin und Medikamenten, unter anderem Tamoxifen, hin. So wiesen Husaarts *et al.* 2019 eine Verringerung des Tamoxifenmetabolismus und ein Nichterreichen der therapeutischen Breite nach [70]. Curcumin selbst scheint bis einschließlich 8 g keine toxischen Effekte auf Erwachsene aufzuweisen, sowohl bei einmaliger als auch bei täglicher Einnahme über mehrere Wochen [36, 86], eine langfristige Wirkung sollte aber untersucht werden. Beide Stoffe weisen allerdings Wechselwirkungen mit Cytochrom-P450-Isoenzymen auf, wodurch die Konzentration verschiedener oraler Krebsmittel, Immunsuppressiva, Analgetika und Antiemetika beeinflusst wird [2, 17, 37, 104].

In weiteren *in vitro*-Studien wären die Wechselwirkungen, gerade in Hinblick auf Chemotherapeutika, zu analysieren, besonders nach einer intravenösen Applikation von Curcumin und Piperin. Durch Umgehung des First-Pass-Effekts der Leber und einer dadurch zu erwartenden erhöhten Bioverfügbarkeit ist diese Form der Verabreichung ebenfalls interessant zu erörtern. *In vivo*-Forschungen zur Plasmakonzentration nach langfristiger Gabe der Substanzen und vor allem deren antikanzerogene Wirkungen sollten in Zukunft durchgeführt werden, da die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit vor dem Hintergrund der *in vitro*-Testung berücksichtigt werden müssen.

## 8. Thesen zur Promotionsschrift

Thema:

Die kumulativen Proliferationswirkungen hormonaktiver Mammakarzinomzellen (MCF-7 und MCF-12a) unter Einwirkung eines Pflanzenextraktes aus Curcuma und schwarzem Pfeffer

- Das Mammakarzinom zählt zu den häufigsten bösartigen Neuerkrankungen der Frau und ist zudem Ursache des häufigsten Krebstodes, bei insgesamt abnehmender Mortalität.
- Zahlreiche verschiedene Faktoren führen zum Auftreten eines Mammakarzinoms.
- Eine unausgewogene, fett- und fleischreiche Ernährung sowie Adipositas zählen unter anderem zu den Risikofaktoren eines Mammakarzinoms.
- Krebszellen weisen einen veränderten Stoffwechsel auf. So findet trotz ausreichender Sauerstoffzufuhr die anaerobe Glykolyse mit Laktatproduktion statt, wobei die Karzinomzellen einen erhöhten Glucosebedarf aufweisen.
- Mammakarzinome werden molekular und histologisch in Subtypen unterteilt.
- Die maligne MCF-7- und die benigne MCF-12a-Zelllinie weisen in der Immunhistochemie die ER und PgR auf.
- Durch diesen Rezeptorstatus sind die Zellen hormonsensibel und können mit Tamoxifen behandelt werden.
- In der Literatur wird *in vitro* ein antiproliferativer, zytotoxischer Effekt des Curcumins nachgewiesen.
- Die Therapie mit Curcuma ist durch die verringerte Bioverfügbarkeit erschwert.
- Studien belegen eine Steigerung der Bioverfügbarkeit der Curcuminoide durch schwarzen Pfeffer beziehungsweise Piperin.
- Zur Untersuchung der Zellproliferation und -viabilität unter Einfluss von Curcuma und schwarzem Pfeffer dienen die Assays BrdU-Zellproliferationstest, CytoTox-Glo<sup>®</sup>-Test, CellTiter-Glo<sup>®</sup>-Test und NRU-Test, sowie die Bestimmung von Glucose-, Laktatkonzentration und pH-Wert.

- 
- Curcuma und schwarzer Pfeffer führen in Kombination *in vitro* zu einer Hemmung der Zellviabilität und zeigen eine antiproliferative Wirkung auf die MCF-7- und MCF-12a-Mammakarzinomzellen.
  - Die Wirkung des Curcumas und des schwarzen Pfeffers ist unabhängig von der Dignität, wodurch die Einsatzmöglichkeiten erweitert sind.
  - Die Kombination aus Curcuma und schwarzem Pfeffer weist einen stärkeren Effekt auf die Mammakarzinomzellen auf als die einzelnen Stoffe.
  - Die Kontrollen Endoxifen und Tamoxifen zeigen hoch-signifikant eine stärkere Wirkung in der Hemmung der Proliferation, der Zellviabilität und des Metabolismus als die Curcuma- und Pfeffer-Extrakte.
  - Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen die Effekte der Extrakte auf die beiden Mammakarzinomzellen *in vitro* nach, lassen allerdings keine ausreichenden Rückschlüsse zur Wirkung *in vivo* zu.
  - Weitere Studien zur Beurteilung des Synergismus der drei Curcuminoide DMC, BDMC und Curcumin mit Piperin sind für die Untersuchung des antitumoralen Effekts von Interesse.
  - Zur Reduzierung der Chemotherapienebenwirkungen wäre die Untersuchung einer Kombination des Curcumas und des schwarzen Pfeffers mit Tamoxifen von Bedeutung.

## 9. Literaturverzeichnis

- [1] Ahmed, T. and Gilani, A.-H. 2014. Therapeutic potential of turmeric in Alzheimer's disease: curcumin or curcuminoids? *Phytotherapy research: PTR* 28, 4, 517–525.
- [2] Alhumayyd, M. S., Bukhari, I. A., Almotrefi, A. A. 2014. Effect of piperine, a major component of black pepper, on the pharmacokinetics of domperidone in rats. *Journal of Physiology and Pharmacology*.
- [3] Al-Jenoobi, F. I., Al-Thukair, A. A., Alam, M. A., Abbas, F. A., Al-Mohizea, A. M., Alkharfy, K. M., and Al-Suwayeh, S. A. 2015. Effect of *Curcuma longa* on CYP2D6- and CYP3A4-mediated metabolism of dextromethorphan in human liver microsomes and healthy human subjects. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics* 40, 1, 61–66.
- [4] Alsammarraie, A. Z., Mubarak, A. A., Alnuaimi, A. S., and Kamal, A. M. 2020. Association of Oral Contraceptives use with Breast Cancer and Hormone Receptor Status in Iraqi Women. *Open Access Maced J Med Sci* 8, B, 1244–1250.
- [5] Anand, P., Kunnumakkara, A. B., Newman, R. A., and Aggarwal, B. B. 2007. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Molecular pharmaceutics* 4, 6, 807–818.
- [6] Ang, L. F., Yam, M. F., Fung, Y. T. T., Kiang, P. K., and Darwin, Y. 2014. HPLC method for simultaneous quantitative detection of quercetin and curcuminoids in traditional chinese medicines. *Journal of Pharmacopuncture* 17, 4, 36–49.
- [7] Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie (AGO) in der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG) e.V. und der Deutschen Krebsgesellschaft (DKG) e.V. 2020. Leitlinien Komplementäre Therapie des Mammakarzinoms (Version 2020.1D).
- [8] ATCC® CRL-10782™. <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-10782.aspx#generalinformation>. Abruf 04.03.2021.
- [9] ATCC® HTB-22™. [https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-22.aspx?geo\\_country=de#generalinformation](https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-22.aspx?geo_country=de#generalinformation). Abruf: 04.03.2021.
- [10] Aumüller and Gerhard. 2020. *Thieme: Duale Reihe - Anatomie*. Duale Reihe. Thieme, Stuttgart, New York.
- [11] B.B. Aggarwal, I.D. Bhatt, H. Ichikawa, K.S. Ahn, G. Sethi, S.K. Sandur, C. Sundaram, N. Seeram, S. Shishodia. 2006. *Curcumin – biological and medicinal properties*. in: P.N. Ravindran, K.N. Babu, K. Sivaraman (Eds.), *Turmeric the Genus Curcuma*, CRC Press, NY, pp. 297-368.
- [12] Bachmann, C. 2016. Neuroprotektive Eigenschaften von Curcumin: Pharmakologische Studien zeigen Wirksamkeit. *Schweiz Z Ganzheitsmed* 28, 5, 259–261.
- [13] Bahia, H., Ashman, J. N. E., Cawkwell, L., Lind, M., Monson, J. R. T., Drew, P. J., and Greenman, J. 2002. Karyotypic variation between independently cultured strains of the cell line MCF-7 identified by multicolour fluorescence in situ hybridization. *International journal of oncology* 20, 3, 489–494.
- [14] Bahmani, F., Rahimi Galougahi, F., Vahedpoor, Z., Jamilian, M., Mahmoodi, S., Baghban, R., Bagherian, T., Zarezade Mehrizi, M., and Asemi, Z. 2018. The Effects of Folic Acid Supplementation on Recurrence and Metabolic Status in Endometrial Hyperplasia: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Archives of Iranian medicine* 21, 10, 452–459.
- [15] Bardaweel, S. K., Akour, A. A., Al-Muhaissen, S., AlSalamat, H. A., and Ammar, K. 2019. Oral contraceptive and breast cancer: do benefits outweigh the risks? A case - control study from Jordan. *BMC women's health* 19, 1, 72.

- [16] Bartlett, J. M. S., Sgroi, D. C., Treuner, K., Zhang, Y., Ahmed, I., Piper, T., Salunga, R., Brachtel, E. F., Pirrie, S. J., Schnabel, C. A., and Rea, D. W. 2019. Breast Cancer Index and prediction of benefit from extended endocrine therapy in breast cancer patients treated in the Adjuvant Tamoxifen-To Offer More? (aTTom) trial. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 30, 11, 1776–1783.
- [17] Bedada, S. K., Boga, P. K., and Kotakonda, H. K. 2016. Study on influence of piperine treatment on the pharmacokinetics of diclofenac in healthy volunteers. *Xenobiotica* 47, 2, 127–132.
- [18] Berek, J. S. and Hacker, N. F., Eds. 2015. *Berek & Hacker's gynecologic oncology*. Wolters Kluwer, Philadelphia.
- [19] Bhutani, M. K., Bishnoi, M., and Kulkarni, S. K. 2009. Anti-depressant like effect of curcumin and its combination with piperine in unpredictable chronic stress-induced behavioral, biochemical and neurochemical changes. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 92, 1, 39–43.
- [20] Bimonte, S., Barbieri, A., Palma, G., Rea, D., Luciano, A., D'Aiuto, M., Arra, C., and Izzo, F. 2015. Dissecting the role of curcumin in tumour growth and angiogenesis in mouse model of human breast cancer. *BioMed research international* 2015, 878134.
- [21] Biocompare: Trypsin-EDTA. <https://www.biocompare.com/26363-Trypsin-EDTA/>. Abruf: 06.03.2021.
- [22] Bio-Rad Laboratories. 2021. *BrdU: Re-Discover the Lab Favorite for Cell Proliferation Analysis*. <https://www.bio-rad-antibodies.com/brdu-bromodeoxyuridine.html>; Abruf: 25.03.2021.
- [23] Bliss, J. M., Kilburn, L. S., Coleman, R. E., Forbes, J. F., Coates, A. S., Jones, S. E., Jassem, J., Delozier, T., Andersen, J., Paridaens, R., van de Velde, C. J. H., Lønning, P. E., Morden, J., Reise, J., Cisar, L., Menschik, T., and Coombes, R. C. 2012. Disease-related outcomes with long-term follow-up: an updated analysis of the intergroup exemestane study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 30, 7, 709–717.
- [24] Blom, H. J. and Smulders, Y. 2011. Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 34, 1, 75–81.
- [25] Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., and Jemal, A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians* 68, 6, 394–424.
- [26] Buckner, C. A., Lafrenie, R. M., Dénoymée, J. A., Caswell, J. M., and Want, D. A. 2018. Complementary and alternative medicine use in patients before and after a cancer diagnosis. *Current oncology (Toronto, Ont.)* 25, 4, e275-e281.
- [27] Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit sowie Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte. 2020. Gemeinsame Expertenkommission zur Einstufung von Stoffen: Stellungnahme zur Einstufung von Produkten, die Curcumin mit verbesserter Bioverfügbarkeit enthalten (Feb. 2020).
- [28] Burdall, S. E., Hanby, A. M., Lansdown, M. R. J., and Speirs, V. 2003. Breast cancer cell lines: friend or foe? *Breast cancer research : BCR* 5, 2, 89–95.
- [29] Cameron, D., Piccart-Gebhart, M. J., Gelber, R. D., Procter, M., Goldhirsch, A., Azambuja, E. de, Castro, G., Untch, M., Smith, I., Gianni, L., Baselga, J., Al-Sakaff, N., Lauer, S., McFadden, E., Leyland-Jones, B., Bell, R., Dowsett, M., and Jackisch, C. 2017. 11 years' follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive early breast cancer: final analysis of the HERceptin Adjuvant (HERA) trial. *The Lancet* 389, 10075, 1195–1205.
- [30] Carl Roth: Zählkammer Bürker. <https://www.carlroth.com/de/de/zaehlkammern/zaehlkammer-buerker-linien-dunkel/p/t730.1>. Abruf: 06.03.2021.

- [31] Castelló, A., Boldo, E., Pérez-Gómez, B., Lope, V., Altzibar, J. M., Martín, V., Castaño-Vinyals, G., Guevara, M., Dierssen-Sotos, T., Tardón, A., Moreno, V., Puig-Vives, M., Llorens-Ivorra, C., Alguacil, J., Gómez-Acebo, I., Castilla, J., Gràcia-Lavedán, E., Dávila-Batista, V., Kogevinas, M., Aragonés, N., Amiano, P., and Pollán, M. 2017. Adherence to the Western, Prudent and Mediterranean dietary patterns and breast cancer risk: MCC-Spain study. *Maturitas* 103, 8–15.
- [32] Cauley, J. A., Lucas, F. L., Kuller, L. H., Stone, K., Browner, W., and Cummings, S. R. 1999. Elevated serum estradiol and testosterone concentrations are associated with a high risk for breast cancer. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Annals of internal medicine* 130, 4 Pt 1, 270–277.
- [33] Cayman Chemical Company. 2019. Product Information Folic Acid.
- [34] Cayman Chemical Company: Rhamnetin. <https://www.caymanchem.com/product/20302/rhamnetin>. Abruf: 27.07.2022.
- [35] Charles, D., Ness, A. R., Campbell, D., Smith, G. D., and Hall, M. H. 2004. Taking folate in pregnancy and risk of maternal breast cancer. *British Medical Journal* Volume 329.
- [36] Cheng, A. L., Hsu, C. H., Lin, J. K., Hsu, M. M., Ho, Y. F., Shen, T. S., Ko, J. Y., Lin, J. T., Lin, B. R., Ming-Shiang, W., Yu, H. S., Jee, S. H., Chen, G. S., Chen, T. M., Chen, C. A., Lai, M. K., Pu, Y. S., Pan, M. H., Wang, Y. J., Tsai, C. C., and Hsieh, C. Y. 2001. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer research* 21, 4B, 2895–2900.
- [37] Clairet, A.-L., Boiteux-Jurain, M., Curtit, E., Jeannin, M., Gérard, B., Nerich, V., and Limat, S. 2019. Interaction between phytotherapy and oral anticancer agents: prospective study and literature review. *Medical oncology (Northwood, London, England)* 36, 5, 45.
- [38] Coates, A. S., Winer, E. P., Goldhirsch, A., Gelber, R. D., Gnant, M., Piccart-Gebhart, M., Thürlimann, B., and Senn, H.-J. 2015. Tailoring therapies—improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 26, 8, 1533–1546.
- [39] Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. 2012. Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *The Lancet Oncology* 13, 11, 1141–1151.
- [40] Cottet, V., Touvier, M., Fournier, A., Touillaud, M. S., Lafay, L., Clavel-Chapelon, F., and Boutron-Ruault, M.-C. 2009. Postmenopausal breast cancer risk and dietary patterns in the E3N-EPIC prospective cohort study. *American journal of epidemiology* 170, 10, 1257–1267.
- [41] Crew, K. D. 2015. Addressing barriers to uptake of breast cancer chemoprevention for patients and providers. *American Society of Clinical Oncology educational book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting*, e50-8.
- [42] Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und medizinische Onkologie e.V. Mammakarzinom der Frau - Leitlinie. Stand 2018. In *Onkopedia Leitlinien*. DOI=10.1016/B978-3-437-21131-7.00002-3.
- [43] Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF. 2020. *Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms (Langversion 4.3)*.
- [44] Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). 2005. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *The Lancet* 365, 9472, 1687–1717.
- [45] Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). 2012. Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100 000 women in 123 randomised trials. *The Lancet* 379, 9814, 432–444.
- [46] Ebara, S. 2017. Nutritional role of folate. *Congenital anomalies* 57, 5, 138–141.

- [47] Ebbing, M., Bønaa, K. H., Nygård, O., Arnesen, E., Ueland, P. M., Nordrehaug, J. E., Rasmussen, K., Njølstad, I., Refsum, H., Nilsen, D. W., Tverdal, A., Meyer, K., and Vollset, S. E. 2009. Cancer incidence and mortality after treatment with folic acid and vitamin B12. *JAMA* 302, 19, 2119–2126.
- [48] Eisen, S. F. and Brown, H. A. 2002. Selective estrogen receptor (ER) modulators differentially regulate phospholipase D catalytic activity in ER-negative breast cancer cells. *Molecular pharmacology* 62, 4, 911–920.
- [49] Elansary, H. O., Szopa, A., Kubica, P., Ekiert, H., Ali, H. M., Elshikh, M. S., Abdel-Salam, E. M., El-Esawi, M., and El-Ansary, D. O. 2018. Bioactivities of Traditional Medicinal Plants in Alexandria. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2018, 1463579.
- [50] Ellnain-Wojtaszek, M. and Zgórk, G. 1999. High-performance liquid chromatography and thin-layer chromatography of phenolic acids from ginkgo biloba l. leaves collected within vegetative period. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 22, 10, 1457–1471.
- [51] Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group. 2013. Sex hormones and risk of breast cancer in premenopausal women: a collaborative reanalysis of individual participant data from seven prospective studies. *The Lancet Oncology* 14, 10, 1009–1019.
- [52] Erić, I., Petek Erić, A., Kristek, J., Koprivčić, I., and Babić, M. 2018. Breast cancer in young women: Pathologic and immunohistochemical features. *Acta clinica Croatica* 57, 3, 497–502.
- [53] Fernandez, S. V. and Russo, J. 2010. Estrogen and xenoestrogens in breast cancer. *Toxicologic pathology* 38, 1, 110–122.
- [54] Fisher, B., Costantino, J. P., Wickerham, D. L., Cecchini, R. S., Cronin, W. M., Robidoux, A., Bevers, T. B., Kavanah, M. T., Atkins, J. N., Margolese, R. G., Runowicz, C. D., James, J. M., Ford, L. G., and Wolmark, N. 2005. Tamoxifen for the prevention of breast cancer: current status of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 study. *Journal of the National Cancer Institute* 97, 22, 1652–1662.
- [55] Fremd, C., Hack, C. C., Schneeweiss, A., Rauch, G., Wallwiener, D., Brucker, S. Y., Taran, F.-A., Hartkopf, A., Overkamp, F., Tesch, H., Fehm, T., Hadji, P., Janni, W., Lüftner, D., Lux, M. P., Müller, V., Ettl, J., Belleville, E., Sohn, C., Schuetz, F., Beckmann, M. M., Fasching, P. A., and Wallwiener, M. 2017. Use of complementary and integrative medicine among German breast cancer patients: predictors and implications for patient care within the PRAEGNANT study network. *Archives of gynecology and obstetrics* 295, 5, 1239–1245.
- [56] Gey, M. H. 2015. *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- [57] Gibson, T. M., Weinstein, S. J., Pfeiffer, R. M., Hollenbeck, A. R., Subar, A. F., Schatzkin, A., Mayne, S. T., and Stolzenberg-Solomon, R. 2011. Pre- and postfortification intake of folate and risk of colorectal cancer in a large prospective cohort study in the United States. *The American journal of clinical nutrition* 94, 4, 1053–1062.
- [58] Gong, G., Guan, Y.-Y., Zhang, Z.-L., Rahman, K., Wang, S.-J., Zhou, S., Luan, X., and Zhang, H. 2020. Isorhamnetin: A review of pharmacological effects. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 128, 110301.
- [59] Gøtzsche, P. C. and Jørgensen, K. J. 2013. Screening for breast cancer with mammography. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 2013, 6, CD001877.
- [60] Gstraunthaler, G. and Lindl, T. 2013. *Zell- und Gewebekultur*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- [61] Guido Shoba, David Joy et al. Influence of Piperine on the Pharmacokinetics of Curcumin in Animals und Huma Volunteers. *Planta Medica* 64 1998.

- [62] Hajigholami, S., Veisi Malekshahi, Z., Bodaghabadi, N., Najafi, F., Shirzad, H., and Sadeghizadeh, M. 2018. Nano Packaged Tamoxifen and Curcumin; Effective Formulation against Sensitive and Resistant MCF-7 Cells. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR* 17, 1, 1–10.
- [63] Hankinson, S. E., Willett, W. C., Manson, J. E., Colditz, G. A., Hunter, D. J., Spiegelman, D., Barbieri, R. L., and Speizer, F. E. 1998. Plasma sex steroid hormone levels and risk of breast cancer in postmenopausal women. *Journal of the National Cancer Institute* 90, 17, 1292–1299.
- [64] Helferich, W. G., Andrade, J. E., and Hoagland, M. S. 2008. Phytoestrogens and breast cancer: a complex story. *Inflammopharmacology* 16, 5, 219–226.
- [65] Holm, J., Yu, N. Y.-L., Johansson, A., Ploner, A., Hall, P., Lindström, L. S., and Czene, K. 2020. Concordance of Immunohistochemistry-Based and Gene Expression-Based Subtyping in Breast Cancer. *JNCI cancer spectrum* 5, 1.
- [66] Horn, F., Blaeschke, F., and Nath, I. 2020. *Biochemie des Menschen. Das Lehrbuch für das Medizinstudium*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- [67] Howlader, N., Altekruse, S. F., Li, C. I., Chen, V. W., Clarke, C. A., Ries, L. A. G., and Cronin, K. A. 2014. US incidence of breast cancer subtypes defined by joint hormone receptor and HER2 status. *Journal of the National Cancer Institute* 106, 5.
- [68] HU, S., HUANG, L., MENG, L., Sun, H., Zhang, W., and XU, Y. 2015. Isorhamnetin inhibits cell proliferation and induces apoptosis in breast cancer via Akt and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Molecular Medicine Reports* 12, 5, 6745–6751.
- [69] Hung, C.-M., Su, Y.-H., Lin, H.-Y., Lin, J.-N., Liu, L.-C., Ho, C.-T., and Way, T.-D. 2012. Demethoxycurcumin modulates prostate cancer cell proliferation via AMPK-induced down-regulation of HSP70 and EGFR. *Journal of agricultural and food chemistry* 60, 34, 8427–8434.
- [70] Hussaarts, K. G. A. M., Hurkmans, D. P., Oomen-de Hoop, E., van Harten, L. J., Berghuis, S., van Alphen, R. J., Spierings, L. E. A., van Rossum-Schornagel, Q. C., Vastbinder, M. B., van Schaik, R. H. N., van Gelder, T., Jager, A., van Leeuwen, R. W. F., and Mathijssen, R. H. J. 2019. Impact of Curcumin (with or without Piperine) on the Pharmacokinetics of Tamoxifen. *Cancers* 11, 3.
- [71] Janni, W., Rack, B. K., Scholz, C., Hancke, K., and Fehm, T., Eds. 2017. *Facharztwissen Gynäkologie*. German Medical Collection 70. Elsevier GmbH, München, Deutschland.
- [72] Jantan, I., Raweh, S. M., Sirat, H. M., Jamil, S., Mohd Yasin, Y. H., Jalil, J., and Jamal, J. A. 2008. Inhibitory effect of compounds from Zingiberaceae species on human platelet aggregation. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 15, 4, 306–309.
- [73] Jin, H., Tu, D., Zhao, N., Shepherd, L. E., and Goss, P. E. 2012. Longer-term outcomes of letrozole versus placebo after 5 years of tamoxifen in the NCIC CTG MA.17 trial: analyses adjusting for treatment crossover. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 30, 7, 718–721.
- [74] Johnson, M. D., Zuo, H., Lee, K.-H., Trebley, J. P., Rae, J. M., Weatherman, R. V., Desta, Z., Flockhart, D. A., and Skaar, T. C. 2004. Pharmacological Characterization of 4-hydroxy-N-desmethyl Tamoxifen, a Novel Active Metabolite of Tamoxifen.
- [75] Kallio, A., Zheng, A., Dahllund, J., Heiskanen, K. M., and Härkönen, P. 2005. Role of mitochondria in tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 10, 6, 1395–1410.
- [76] Kaufmann, M., Costa, S. D., and Scharl, A. 2013. *Die Gynäkologie*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- [77] Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L., Coviello, G. M., Wright, W. E., Weinrich, S. L., and Shay, J. W. 1994. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science (New York, N.Y.)* 266, 5193, 2011–2015.

- [78] Kim, S. J., Zhang, C. X. W., Demsky, R., Armel, S., Kim, Y.-I., Narod, S. A., and Kotsopoulos, J. 2019. Folic acid supplement use and breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: a case-control study. *Breast Cancer Res Treat* 174, 3, 741–748.
- [79] Kotha, R. R. and Luthria, D. L. 2019. Curcumin: Biological, Pharmaceutical, Nutraceutical, and Analytical Aspects. *Molecules* 24, 16.
- [80] Kreienberg, R., Möbius, V., and Kühn, T. 2010. *Mammakarzinom Interdisziplinär*. Springer E-book Collection. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- [81] Kunnumakkara, A. B., Diagaradjane, P., Guha, S., Deorukhkar, A., Shentu, S., Aggarwal, B. B., and Krishnan, S. 2008. Curcumin sensitizes human colorectal cancer xenografts in nude mice to gamma-radiation by targeting nuclear factor-kappaB-regulated gene products. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14, 7, 2128–2136.
- [82] Kunnumakkara, A. B., Guha, S., Krishnan, S., Diagaradjane, P., Gelovani, J., and Aggarwal, B. B. 2007. Curcumin potentiates antitumor activity of gemcitabine in an orthotopic model of pancreatic cancer through suppression of proliferation, angiogenesis, and inhibition of nuclear factor-kappaB-regulated gene products. *Cancer Res* 67, 8, 3853–3861.
- [83] Kuttan, R., Bhanumathy, P., Nirmala, K., and George, M. C. 1985. Potential anticancer activity of turmeric (*Curcuma longa*). *Cancer letters* 29, 2, 197–202.
- [84] Laamiri, F. Z., Bouayad, A., Hasswane, N., Ahid, S., Mrabet, M., and Amina, B. 2015. Risk Factors for Breast Cancer of Different Age Groups: Moroccan Data? *OJOG* 05, 02, 79–87.
- [85] Lan, L., Wang, Y., Pan, Z., Wang, B., Yue, Z., Jiang, Z., Li, L., Wang, C., and Tang, H. 2019. Rhamnetin induces apoptosis in human breast cancer cells via the miR-34a/Notch-1 signaling pathway. *Oncology letters* 17, 1, 676–682.
- [86] Lao, C. D., Ruffin, M. T., Normolle, D., Heath, D. D., Murray, S. I., Bailey, J. M., Boggs, M. E., Crowell, J., Rock, C. L., and Brenner, D. E. 2006. Dose escalation of a curcuminoid formulation. *BMC Complement Altern Med* 6, 1, 10.
- [87] Le, A. 2018. *The Heterogeneity of Cancer Metabolism* 1063. Springer International Publishing, Cham.
- [88] Lebeau, A., Kriegsmann, M., Burandt, E., and Sinn, H.-P. 2014. Invasive Mammakarzinome: Die aktuelle WHO-Klassifikation. *Der Pathologe* 35, 1, 7–17.
- [89] Lee, S., Shin, S. Y., Lee, Y., Park, Y., Kim, B. G., Ahn, J.-H., Chong, Y., Lee, Y. H., and Lim, Y. 2011. Rhamnetin production based on the rational design of the poplar O-methyltransferase enzyme and its biological activities. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 21, 13, 3866–3870.
- [90] Li, Y.-B., Gao, J.-L., Zhong, Z.-F., Hoi, P.-M., Ming-Yuen Lee, S., and Wang, Y.-T. 2013. Bisdemethoxycurcumin suppresses MCF-7 cells proliferation by inducing ROS accumulation and modulating senescence-related pathways. *Pharmacological Reports* 65, 3, 700–709.
- [91] Lim, Y. C., Desta, Z., Flockhart, D. A., and Skaar, T. C. 2005. Endoxifen (4-hydroxy-N-desmethyl-tamoxifen) has anti-estrogenic effects in breast cancer cells with potency similar to 4-hydroxy-tamoxifen. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 55, 5, 471–478.
- [92] Liu, M.-M., Albanese, C., Anderson, C. M., Hilty, K., Webb, P., Uht, R. M., Price, R. H., Pestell, R. G., and Kushner, P. J. 2002. Opposing action of estrogen receptors alpha and beta on cyclin D1 gene expression. *The Journal of biological chemistry* 277, 27, 24353–24360.
- [93] Love, R. R., Duc, N. B., Allred, D. C., Binh, N. C., van Dinh, N., Kha, N. N., van Thuan, T., Mohsin, S. K., Le Roanh, D., Khang, H. X., Tran, T. L., Quy, T. T., van Thuy, N., Thé, P. N., Cau, T. T., Tung, N. D., Huong, D. T., Le Quang, M., Hien, N. N., Le Thuong, Shen, T.-Z., Xin, Y., Zhang, Q., Havighurst, T. C., Yang, Y. F., Hillner, B. E., and DeMets, D. L. 2002. Oophorectomy and tamoxifen adjuvant therapy in premenopausal Vietnamese and Chinese women with operable breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 20, 10, 2559–2566.

- [94] Lüllmann-Rauch, R. and Asan, E. 2019. *Taschenlehrbuch Histologie*. Thieme, Stuttgart.
- [95] Lundholt, B. K., Scudder, K. M., and Pagliaro, L. 2003. A simple technique for reducing edge effect in cell-based assays. *Journal of biomolecular screening* 8, 5, 566–570.
- [96] Marahrens, P. 2019. *Die Wirkung von grünem Tee und Matchatee, sowie ihrer Bestandteile Epigallocatechingallat und Quercetin auf MCF-7- und MDA-MB-231-Brustkarzinomzellen. Inauguraldissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Medizin (Dr. med.)*. Universitätsfrauenklinik Rostock. DOI=10.18453/ROSDOK\_ID00002612.
- [97] Margină, D., Olaru, O. T., Ilie, M., Grădinaru, D., Guțu, C., Voicu, S., Dinischiotu, A., Spandidos, D. A., and Tsatsakis, A. M. 2015. Assessment of the potential health benefits of certain total extracts from *Vitis vinifera*, *Aesculus hippocastanum* and *Curcuma longa*. *Experimental and therapeutic medicine* 10, 5, 1681–1688.
- [98] Matthews, A. K., Sellergren, S. A., Huo, D., List, M., and Fleming, G. 2007. Complementary and alternative medicine use among breast cancer survivors. *Journal of alternative and complementary medicine (New York, N.Y.)* 13, 5, 555–562.
- [99] Mavaddat, N., Barrowdale, D., Andrulis, I. L., Domchek, S. M., Eccles, D., Nevanlinna, H., Ramus, S. J., Spurdle, A., Robson, M., Sherman, M., Mulligan, A. M., Couch, F. J., Engel, C., McGuffog, L., Healey, S., Sinilnikova, O. M., Southey, M. C., Terry, M. B., Goldgar, D., O'Malley, F., John, E. M., Janavicius, R., Tihomirova, L., Hansen, T. V. O., Nielsen, F. C., Osorio, A., Stavropoulou, A., Benítez, J., Manoukian, S., Peissel, B., Barile, M., Volorio, S., Pasini, B., Dolcetti, R., Putignano, A. L., Ottini, L., Radice, P., Hamann, U., Rashid, M. U., Hogervorst, F. B., Kriege, M., van der Luijt, R. B., Peock, S., Frost, D., Evans, D. G., Brewer, C., Walker, L., Rogers, M. T., Side, L. E., Houghton, C., Weaver, J., Godwin, A. K., Schmutzler, R. K., Wappenschmidt, B., Meindl, A., Kast, K., Arnold, N., Niederacher, D., Sutter, C., Deissler, H., Gadzicki, D., Preisler-Adams, S., Varon-Mateeva, R., Schönbuchner, I., Gevensleben, H., Stoppa-Lyonnet, D., Belotti, M., Barjhoux, L., Isaacs, C., Peshkin, B. N., Caldes, T., La Hoya, M. de, Cañadas, C., Heikkinen, T., Heikkilä, P., Aittomäki, K., Blanco, I., Lazaro, C., Brunet, J., Agnarsson, B. A., Arason, A., Barkardottir, R. B., Dumont, M., Simard, J., Montagna, M., Agata, S., D'Andrea, E., Yan, M., Fox, S., Rebbeck, T. R., Rubinstein, W., Tung, N., Garber, J. E., Wang, X., Fredericksen, Z., Pankratz, V. S., Lindor, N. M., Szabo, C., Offit, K., Sakr, R., Gaudet, M. M., Singer, C. F., Tea, M.-K., Rappaport, C., Mai, P. L., Greene, M. H., Sokolenko, A., Imyanitov, E., Toland, A. E., Senter, L., Sweet, K., Thomassen, M., Gerdes, A.-M., Kruse, T., Caligo, M., Aretini, P., Rantala, J., Wachenfeld, A. von, Henriksson, K., Steele, L., Neuhausen, S. L., Nussbaum, R., Beattie, M., Odunsi, K., Sucheston, L., Gayther, S. A., Nathanson, K., Gross, J., Walsh, C., Karlan, B., Chenevix-Trench, G., Easton, D. F., and Antoniou, A. C. 2012. Pathology of breast and ovarian cancers among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2 (CIMBA). *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 21, 1, 134–147.
- [100] McCully, K. S. 2009. Chemical pathology of homocysteine. IV. Excitotoxicity, oxidative stress, endothelial dysfunction, and inflammation. *Annals of clinical and laboratory science* 39, 3, 219–232.
- [101] Medeiros, D. L., Lima, E. T. G., Silva, J. C., Medeiros, M. A., and Pinheiro, E. B. F. 2021. Rhamnetin: a review of its pharmacology and toxicity. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 74, 6, 793–799.
- [102] Mehta, K., Pantazis, P., McQueen, T., and Aggarwal, B. B. 1997. Antiproliferative effect of curcumin (diferuloylmethane) against human breast tumor cell lines. *Anti-cancer drugs* 8, 5, 470–481.
- [103] Memorial Sloan Kettering Cancer Center. 2021. *About Herbs, Botanicals & Other Products: Tumeric*. <https://www.mskcc.org/cancer-care/integrative-medicine/herbs/turmeric>; Abrufl: 15.04.2021.

- [104] Mir, O., Ropert, S., Chamseddine, A. N., and Paci, A. 2018. Curcumin dietary supplements and everolimus-based cancer treatment. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 29, 1, 287–288.
- [105] Morphisto: Laborchemikalien & Histologieservice. 2019. *Immunhistochemie: Einfachmarkierungen mit Chromogenen und Fluorochromen*. <https://www.morphisto.de/service/immunhistochemie/>; Abruf: 25.03.2021.
- [106] Moskowitz, C. S., Chou, J. F., Wolden, S. L., Bernstein, J. L., Malhotra, J., Novetsky Friedman, D., Mubdi, N. Z., Leisenring, W. M., Stovall, M., Hammond, S., Smith, S. A., Henderson, T. O., Boice, J. D., Hudson, M. M., Diller, L. R., Bhatia, S., Kenney, L. B., Neglia, J. P., Begg, C. B., Robison, L. L., and Oeffinger, K. C. 2014. Breast cancer after chest radiation therapy for childhood cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 32, 21, 2217–2223.
- [107] Ni, X., Zhang, A., Zhao, Z., Shen, Y., and Wang, S. 2012. Demethoxycurcumin inhibits cell proliferation, migration and invasion in prostate cancer cells. *Oncology reports* 28, 1, 85–90.
- [108] Nielsen, H. M., Overgaard, M., Grau, C., Jensen, A. R., and Overgaard, J. 2006. Study of failure pattern among high-risk breast cancer patients with or without postmastectomy radiotherapy in addition to adjuvant systemic therapy: long-term results from the Danish Breast Cancer Cooperative Group DBCG 82 b and c randomized studies. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 24, 15, 2268–2275.
- [109] Oliai Araghi, S., Kiefte-de Jong, J. C., van Dijk, S. C., Swart, K. M. A., van Laarhoven, H. W., van Schoor, N. M., Groot, L. C. P. G. M. de, Lemmens, V., Stricker, B. H., Uitterlinden, A. G., and van der Velde, N. 2019. Folic Acid and Vitamin B12 Supplementation and the Risk of Cancer: Long-term Follow-up of the B Vitamins for the Prevention of Osteoporotic Fractures (B-PROOF) Trial. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 28, 2, 275–282.
- [110] Osborne, C. K., Hobbs, K., and Trent, J. M. 1987. Biological differences among MCF-7 human breast cancer cell lines from different laboratories. *Breast Cancer Res Treat* 9, 2, 111–121.
- [111] Paine, T. M., Soule, H. D., Pauley, R. J., and Dawson, P. J. 1992. Characterization of epithelial phenotypes in mortal and immortal human breast cells. *International journal of cancer* 50, 3, 463–473.
- [112] Panahi, Y., Hosseini, M. S., Khalili, N., Naimi, E., Majeed, M., and Sahebkar, A. 2015. Antioxidant and anti-inflammatory effects of curcuminoid-piperine combination in subjects with metabolic syndrome: A randomized controlled trial and an updated meta-analysis. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)* 34, 6, 1101–1108.
- [113] Panahi, Y., Rahimnia, A.-R., Sharafi, M., Alishiri, G., Saburi, A., and Sahebkar, A. 2014. Curcuminoid treatment for knee osteoarthritis: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Phytotherapy research : PTR* 28, 11, 1625–1631.
- [114] Panahi, Y., Saadat, A., Beiraghdar, F., and Sahebkar, A. 2014. Adjuvant therapy with bioavailability-boosted curcuminoids suppresses systemic inflammation and improves quality of life in patients with solid tumors: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Phytotherapy research : PTR* 28, 10, 1461–1467.
- [115] Perez, E. A., Romond, E. H., Suman, V. J., Jeong, J.-H., Davidson, N. E., Geyer, C. E., Martino, S., Mamounas, E. P., Kaufman, P. A., and Wolmark, N. 2011. Four-year follow-up of trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: joint analysis of data from NCCTG N9831 and NSABP B-31. *Journal of Clinical Oncology* 29, 25, 3366–3373.

- [116] Phillips, K. M., Ruggio, D. M., Ashraf-Khorassani, M., and Haytowitz, D. B. 2006. Difference in folate content of green and red sweet peppers (*Capsicum annuum*) determined by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry* 54, 26, 9998–10002.
- [117] Pitasawat, B., Choochote, W., Tuetun, B., Tippawangkosol, P., Kanjanapothi, D., Jitpakdi, A., and Riyong, D. 2003. Repellency of aromatic turmeric *Curcuma aromatica* under laboratory and field conditions. *Journal of vector ecology : journal of the Society for Vector Ecology* 28, 2, 234–240.
- [118] Poly-Optik GmbH aus Thüringen. *Zellenzählkammern; Zählnetzsysteme; Bürker*. <http://www.polyoptik.de/zellenzaehlkammern/>; Abruf: 09.11.2021.
- [119] Prakash, P., Misra, A., Surin, W. R., Jain, M., Bhatta, R. S., Pal, R., Raj, K., Barthwal, M. K., and Dikshit, M. 2011. Anti-platelet effects of *Curcuma* oil in experimental models of myocardial ischemia-reperfusion and thrombosis. *Thrombosis research* 127, 2, 111–118.
- [120] Promega. 2015. Technical Bulletin: CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay. <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-glo-luminescent-cell-viability-assay-protocol.pdf>; Abruf: 12.03.2021.
- [121] Promega. 2017. Technical Bulletin: CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay. <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/cytotox-glo-cytotoxicity-assay-protocol.pdf?la=en>; Abruf: 25.03.2021.
- [122] Qiao, Q., Jiang, Y., and Li, G. 2012. Curcumin improves the antitumor effect of X-ray irradiation by blocking the NF- $\kappa$ B pathway: an in-vitro study of lymphoma. *Anti-cancer drugs* 23, 6, 597–605.
- [123] Qin, X., Cui, Y., Shen, L., Sun, N., Zhang, Y., Li, J., Xu, X., Wang, B., Xu, X., Huo, Y., and Wang, X. 2013. Folic acid supplementation and cancer risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *International journal of cancer* 133, 5, 1033–1041.
- [124] Qiu, C., Liu, K., Zhang, S., Gao, S., Chen, W., Li, D., and Huang, Y. 2020. Bisdemethoxycurcumin Inhibits Hepatocellular Carcinoma Proliferation Through Akt Inactivation via CYLD-Mediated Deubiquitination. *Drug design, development and therapy* 14, 993–1001.
- [125] Ramachandran, C., Fonseca, H. B., Jhabvala, P., Escalon, E. A., and Melnick, S. J. 2002. Curcumin inhibits telomerase activity through human telomerase reverse transcriptase in MCF-7 breast cancer cell line. *Cancer letters* 184, 1, 1–6.
- [126] Ramachandran, C. and You, W. 1999. Differential sensitivity of human mammary epithelial and breast carcinoma cell lines to curcumin. *Breast Cancer Res Treat* 54, 3, 269–278.
- [127] Rao, P. S., Ramanjaneyulu, Y. S., Prisk, V. R., and Schurgers, L. J. 2019. A Combination of *Tamarindus indica* seeds and *Curcuma longa* Rhizome Extracts Improves Knee Joint Function and Alleviates Pain in Non-Arthritic Adults Following Physical Activity. *International Journal of Medical Sciences* 16, 6, 845–853.
- [128] Rimbach, G., Nagursky, J., and Erbersdobler, H. F. 2015. *Lebensmittel-Warenkunde für Einsteiger*. Springer-Lehrbuch. Springer Spektrum, Berlin.
- [129] Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2019. Krebs in Deutschland für 2015/2016, 12. Ausgabe.
- [130] Roche Diagnostics GmbH. 2018. *Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)*. Version August 2018.
- [131] Ruby, A. J., Kuttan, G., Dinesh Babu, K., Rajasekharan, K. N., and Kuttan, R. 1995. Anti-tumour and antioxidant activity of natural curcuminoids. *Cancer letters* 94, 1, 79–83.
- [132] Saladores, P., Mürdter, T., Eccles, D., Chowbay, B., Zgheib, N. K., Winter, S., Ganchev, B., Eccles, B., Gerty, S., Tfayli, A., Lim, J. S. L., Yap, Y. S., Ng, R. C. H., Wong, N. S., Dent, R., Habbal, M. Z., Schaeffeler, E., Eichelbaum, M., Schroth, W., Schwab, M., and Brauch, H. 2015. Tamoxifen metabolism predicts drug concentrations and outcome in premenopausal patients with early breast cancer. *The pharmacogenomics journal* 15, 1, 84–94.

- [133] Samavat, H. and Kurzer, M. S. 2015. Estrogen metabolism and breast cancer. *Cancer letters* 356, 2 Pt A, 231–243.
- [134] Schiborr, C., Kocher, A., Behnam, D., Jandasek, J., Toelstede, S., and Frank, J. 2014. The oral bioavailability of curcumin from micronized powder and liquid micelles is significantly increased in healthy humans and differs between sexes. *Molecular nutrition & food research* 58, 3, 516–527.
- [135] Schmidt, B., Ferreira, C., Alves Passos, C. L., Silva, J. L., and Fialho, E. 2020. Resveratrol, Curcumin and Piperine Alter Human Glyoxalase 1 in MCF-7 Breast Cancer Cells. *International journal of molecular sciences* 21, 15.
- [136] Schmitz, S. 2011. *Der Experimentator: Zellkultur*. Der Experimentator. Spektrum Akad. Verl., Heidelberg.
- [137] Schwegler, J. S. and Lucius, R. 2021. *Der Mensch - Anatomie und Physiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, NewYork.
- [138] Seeger, H., Huober, J., Wallwiener, D., and Mueck, A. O. 2004. Inhibition of human breast cancer cell proliferation with estradiol metabolites is as effective as with tamoxifen. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 36, 5, 277–280.
- [139] Seitz, H. K., Pelucchi, C., Bagnardi, V., and La Vecchia, C. 2012. Epidemiology and pathophysiology of alcohol and breast cancer: Update 2012. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)* 47, 3, 204–212.
- [140] Seo, S., Seo, K., Ki, S. H., and Shin, S. M. 2016. Isorhamnetin Inhibits Reactive Oxygen Species-Dependent Hypoxia Inducible Factor (HIF)-1 $\alpha$  Accumulation. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 39, 11, 1830–1838.
- [141] Setyaningsih, D., Santoso, Y. A., Hartini, Y. S., Murti, Y. B., Hinrichs, W. L. J., and Patramurti, C. 2021. Isocratic high-performance liquid chromatography (HPLC) for simultaneous quantification of curcumin and piperine in a microparticle formulation containing *Curcuma longa* and *Piper nigrum*. *Heliyon* 7, 3, e06541.
- [142] Shao, Z.-M., Shen, Z.-Z., Liu, C.-H., Sartippour, M. R., Go, V. L., Heber, D., and Nguyen, M. 2002. Curcumin exerts multiple suppressive effects on human breast carcinoma cells. *International journal of cancer* 98, 2, 234–240.
- [143] Sharma, S., Kulkarni, S. K., Agrewala, J. N., and Chopra, K. 2006. Curcumin attenuates thermal hyperalgesia in a diabetic mouse model of neuropathic pain. *European Journal of Pharmacology* 536, 3, 256–261.
- [144] Shi, C., Fan, L. Y., Cai, Z., Liu, Y. Y., and Yang, C. L. 2012. Cellular stress response in Eca-109 cells inhibits apoptosis during early exposure to isorhamnetin. *Neoplasia* 59, 4, 361–369.
- [145] Sigma-Aldrich. *Isorhamnetin*; <https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/product/SIGMA/17794>; Abruf: 30.11.2021.
- [146] Sigma-Aldrich Productinformation. In Vitro Toxicology Assay Kit, Neutral Red based. <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/tox4bul.pdf>; Abruf: 12.03.2021.
- [147] Simstein, R., Burow, M., Parker, A., Weldon, C., and Beckman, B. 2003. Apoptosis, chemoresistance, and breast cancer: insights from the MCF-7 cell model system. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* 228, 9, 995–1003.
- [148] Singh, J., Dubey, R. K., and Atal, C. K. 1986. Piperine-mediated inhibition of glucuronidation activity in isolated epithelial cells of the guinea-pig small intestine: evidence that piperine lowers the endogenous UDP-glucuronic acid content. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 236, 2, 488–493.
- [149] Singh, M. S., Francis, P. A., and Michael, M. 2011. Tamoxifen, cytochrome P450 genes and breast cancer clinical outcomes. *Breast (Edinburgh, Scotland)* 20, 2, 111–118.

- [150] Siwak, D. R., Shishodia, S., Aggarwal, B. B., and Kurzrock, R. 2005. Curcumin-induced antiproliferative and proapoptotic effects in melanoma cells are associated with suppression of I $\kappa$ B kinase and nuclear factor  $\kappa$ B activity and are independent of the B-Raf/mitogen-activated/extracellular signal-regulated protein kinase pathway and the Akt pathway. *Cancer* 104, 4, 879–890.
- [151] Song, W., Qiao, X., Liang, W., Ji, S., Yang, L., Wang, Y., Xu, Y., Yang, Y., Guo, D., and Ye, M. 2015. Efficient separation of curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin from turmeric using supercritical fluid chromatography: From analytical to preparative scale. *Journal of separation science* 38, 19, 3450–3453.
- [152] Stander, X. X., Stander, B. A., and Joubert, A. M. 2011. In vitro effects of an in silico-modelled 17 $\beta$ -estradiol derivative in combination with dichloroacetic acid on MCF-7 and MCF-12A cells. *Cell Proliferation* 44, 6, 567–581.
- [153] Strizich, G., Gammon, M. D., Jacobson, J. S., Wall, M., Abrahamson, P., Bradshaw, P. T., Terry, M. B., Teitelbaum, S., Neugut, A. I., and Greenlee, H. 2015. Latent class analysis suggests four distinct classes of complementary medicine users among women with breast cancer. *BMC complementary and alternative medicine* 15, 411.
- [154] Studio, G. & T., Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F. B., and Starke, K. 2017. *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Begründet Von W. Forth, D. Henschler, W. Rummel.* Urban & Fischer Verlag GmbH & Co. KG, Philadelphia.
- [155] Subik, K., Lee, J.-F., Baxter, L., Strzepek, T., Costello, D., Crowley, P., Xing, L., Hung, M.-C., Bonfiglio, T., Hicks, D. G., and Tang, P. 2010. The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast cancer : basic and clinical research* 4, 35–41.
- [156] Sugiyama, Y., Kawakishi, S., and Osawa, T. 1996. Involvement of the  $\beta$ -diketone moiety in the antioxidative Mechanism of Tetrahydrocurcumin. *Biochemical Pharmacology* 52, 4, 519–525.
- [157] Tanaka, K., Kuba, Y., Sasaki, T., Hiwatashi, F., and Komatsu, K. 2008. Quantitation of curcuminoids in curcuma rhizome by near-infrared spectroscopic analysis. *Journal of agricultural and food chemistry* 56, 19, 8787–8792.
- [158] Tseng, E., Scott-Ramsay, E. A., and Morris, M. E. 2004. Dietary organic isothiocyanates are cytotoxic in human breast cancer MCF-7 and mammary epithelial MCF-12A cell lines. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* 229, 8, 835–842.
- [159] Tworoger, S. S., Hecht, J. L., Giovannucci, E., and Hankinson, S. E. 2006. Intake of folate and related nutrients in relation to risk of epithelial ovarian cancer. *American journal of epidemiology* 163, 12, 1101–1111.
- [160] Vaughan, R. A., Garcia-Smith, R., Dorsey, J., Griffith, J. K., Bisoffi, M., and Trujillo, K. A. 2013. Tumor necrosis factor alpha induces Warburg-like metabolism and is reversed by anti-inflammatory curcumin in breast epithelial cells. *International journal of cancer* 133, 10, 2504–2510.
- [161] Vector Laboratories. 2005. DISCOVERY through color. - A Guide to Multiple Antigen Labeling. <https://vectorlabs.com/resources/brochures>; Abruf: 12.03.2021.
- [162] Vector Laboratories. 2018. Immunohistochemistry Guide. <https://vectorlabs.com/resources/brochures>; Abruf: 12.03.2021.
- [163] Voiß, P., Dobos, G., Choi, K.-E., Lange, S., Kümmel, S., and Paul, A. 2017. Lebensstilfaktoren und Komplementärmedizin beim Mammakarzinom. *Gynäkologe* 50, 7, 525–532.

- [164] Vollset, S. E., Clarke, R., Lewington, S., Ebbing, M., Halsey, J., Lonn, E., Armitage, J., Manson, J. E., Hankey, G. J., Spence, J. D., Galan, P., Børnaa, K. H., Jamison, R., Gaziano, J. M., Guarino, P., Baron, J. A., Logan, R. F. A., Giovannucci, E. L., Heijer, M. den, Ueland, P. M., Bennett, D., Collins, R., and Peto, R. 2013. Effects of folic acid supplementation on overall and site-specific cancer incidence during the randomised trials: meta-analyses of data on 50 000 individuals. *The Lancet* 381, 9871, 1029–1036.
- [165] Wahidin, M., Djuwita, R., and Adisasmita, A. 2018. Oral Contraceptive and Breast Cancer Risks: a Case Control Study in Six Referral Hospitals in Indonesia. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 19, 8, 2199–2203.
- [166] Warburg, O. 1924. The Metabolism Of Carcinoma Cells. *The Journal of Cancer Research*.
- [167] Warburg, O., Wind, F., and Negelein, E. 1926. Über den Stoffwechsel von Tumoren im Körper. *Klinische Wochenschrift* 5. Jahrgang Nr. 19.
- [168] Wei, M.-M., Zhao, S.-J., Dong, X.-M., Wang, Y.-J., Fang, C., Wu, P., Song, G.-Q., Gao, J.-N., Huang, Z.-H., Xie, T., and Zhou, J.-L. 2021. A combination index and glycoproteomics-based approach revealed synergistic anticancer effects of curcuminoids of turmeric against prostate cancer PC3 cells. *Journal of ethnopharmacology* 267, 113467.
- [169] Weichselbaum, R. R., Hellman, S., Piro, A. J., Nove, J. J., and Little, J. B. 1978. Proliferation kinetics of a human breast cancer line in vitro following treatment with 17beta-estradiol and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer research* 38, 8, 2339–2342.
- [170] Wichitnithad, W., Jongaroonngamsang, N., Pummangura, S., and Rojsitthisak, P. 2009. A simple isocratic HPLC method for the simultaneous determination of curcuminoids in commercial turmeric extracts. *Phytochemical analysis : PCA* 20, 4, 314–319.
- [171] Wu, Q., Kroon, P. A., Shao, H., Needs, P. W., and Yang, X. 2018. Differential Effects of Quercetin and Two of Its Derivatives, Isorhamnetin and Isorhamnetin-3-glucuronide, in Inhibiting the Proliferation of Human Breast-Cancer MCF-7 Cells. *Journal of agricultural and food chemistry* 66, 27, 7181–7189.
- [172] Xia, X., Pan, Y., Zhang, W.-Y., Cheng, G., and Kong, L.-D. 2006. Ethanolic extracts from *Curcuma longa* attenuates behavioral, immune, and neuroendocrine alterations in a rat chronic mild stress model. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 29, 5, 938–944.
- [173] Xu, J. H., Yang, H. P., Zhou, X. D., Wang, H. J., Gong, L., and Tang, C. L. 2015. Autophagy Accompanied with Bisdemethoxycurcumin-induced Apoptosis in Non-small Cell Lung Cancer Cells. *Biomedical and environmental sciences : BES* 28, 2, 105–115.
- [174] Xu, W.-H., Shrubsole, M. J., Xiang, Y.-B., Cai, Q., Zhao, G., Ruan, Z., Cheng, J., Zheng, W., and Shu, X. O. 2007. Dietary folate intake, MTHFR genetic polymorphisms, and the risk of endometrial cancer among Chinese women. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 16, 2, 281–287.
- [175] Yun, J.-M., Jialal, I., and Devaraj, S. 2011. Epigenetic regulation of high glucose-induced proinflammatory cytokine production in monocytes by curcumin. *The Journal of nutritional biochemistry* 22, 5, 450–458.

## 10. Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich zahlreichen Personen meinen herzlichen Dank für ihre Unterstützung aussprechen, ohne deren Hilfe die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre:

Insbesondere gilt mein Dank meiner Betreuerin, Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. habil. Dagmar-Ulrike Richter, für die Vergabe des interessanten Themas, die kompetente Betreuung dieser Arbeit, vielseitige Unterstützung, die konstruktive Kritik und die hilfreichen Ratschläge.

Ferner danke ich dem Team des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik Rostock für die Bereitstellung der Materialien, die Unterstützung während meiner Labortätigkeit, den herzlichen Umgang und das schöne Arbeitsklima, in dem ich Freude hatte zu arbeiten.

Insbesondere danke ich Frau Bianca Gosch für ihre Ermutigungen, die ständige fachliche und moralische Unterstützung und Hilfe, Anregungen und netten Gespräche.

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

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Frank Weber aus dem Institut für Biostatistik und Informatik in Medizin und Altersforschung Rostock für die geduldige und kompetente Beratung in der statistischen Auswertung meiner Ergebnisse.

Für die Mühe des Korrekturlesens, das Interesse an meiner Dissertation und die aufbauenden Worte möchte ich mich besonders bei Frau Anja Schulte bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern für die mühevollen Durchsicht meiner Dissertation und ihren unaufhörlichen Glauben daran, dass meine Doktorarbeit ein Erfolg wird. Und für ihren uneingeschränkten Rückhalt und die liebevolle Unterstützung auf meinem bisherigen Lebensweg.