

UNIVERSITÄTSFRAUENKLINIK ROSTOCK

DIREKTOR: PROF. DR. MED. HABIL BERND GERBER

WIRKSTOFFTESTUNG VON ZWEI PHYTOEXTRAKTEN AUS ALLIUM SATI-
VUM (KNOBLAUCH) AUF HUMANE ENDOMETRIUMKARZINOMZELLEN DER
LINIEN ISHIKAWA UND RL95-2

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

GUTACHTERINNEN:

PROF. DR. JOHANNES STUBERT, UNIVERSITÄTSFRAUENKLINIK ROSTOCK

DR. NADJA ENGEL, UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

PROF. DR. MICHAEL KEUSGEN, PHILIPPS-UNIVERSITÄT MARBURG

EINGEREICHT VON LENA KOBERT | GEB. AM 27.06.1995 IN BERLIN

JAHR DER EINREICHUNG: 2023

JAHR DER VERTEIDIGUNG: 2023

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00004617

DOKTORARBEIT

UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|-------------|---|-----------|
| I. | EINLEITUNG | 12 |
| | 1.1 DAS ENDOMETRIUMKARZINOM | 12 |
| | 1.1.1 ALLGEMEINES | 12 |
| | 1.1.1 EPIDEMIOLOGIE | 13 |
| | 1.1.2 ÄTIOLOGIE | 14 |
| | 1.1.3 ENDOMETRIUMHYPERPLASIE | 18 |
| | 1.1.4 HISTOPATHOLOGIE UND PATHOGENESE | 18 |
| | 1.1.5 DIAGNOSTIK | 19 |
| | 1.1.6 THERAPIE | 20 |
| | 1.2 ALLIUM SATIVUM | 21 |
| | 1.2.1 BIOAKTIVE INHALTSSTOFFE | 21 |
| | 1.2.2 GESUNDHEITSFÖRDERNDE WIRKUNG VON KNOBLAUCH | 22 |
| | 1.3 POLYPHENOLE | 25 |
| | 1.3.1 EINTEILUNG UND WIRKUNG | 25 |
| | 1.3.2 RESORPTION UND BIOVERFÜGBARKEIT DER POLYPHENOLE | 27 |
| | 1.3.3 LUTEOLIN UND LUTEOLIN-7-GLUCOSIDE | 28 |
| | 1.3.4 KAFFEESÄURE | 29 |
| II. | ZIELSTELLUNG | 30 |
| III. | MATERIAL UND METHODEN | 32 |
| | 3.1 EXTRAKTHERSTELLUNG | 32 |
| | 3.1.1 MIKROWELLENASSISTIERTES EXTRAKTIONSVERFAHREN | 32 |
| | 3.1.2 HERSTELLUNG DER EXTRAKTVERDÜNNUNGEN | 33 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.2 | HERSTELLUNG DER REFERENZEN UND KONTROLLEN | 33 |
| 3.3 | ZELLINIEN | 34 |
| 3.3.1 | RL95-2..... | 34 |
| 3.3.2 | ISHIKAWA..... | 35 |
| 3.4 | ZELLKULTIVIERUNG | 35 |
| 3.4.1 | ANSETZEN DER ZELLKULTUREN..... | 35 |
| 3.4.2 | MEDIUMWECHSEL..... | 36 |
| 3.4.3 | PASSAGIEREN DER ZELLEN..... | 36 |
| 3.5 | ZELLZÄHLUNG | 37 |
| 3.6 | IMMUNHISTOCHEMIE | 38 |
| 3.7 | HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE (HPLC) | 40 |
| 3.8 | IN-VITRO-ZELLTESTS | 43 |
| 3.8.1 | VIABILITÄTSTEST CELL TITER-GLO® | 43 |
| 3.8.2 | BRDU PROLIFERATIONSTEST | 45 |
| 3.8.3 | CYTOTox-GLO™ ZYTOTOXIZITÄTSTEST | 48 |
| 3.8.4 | NEUTRALROT ZYTOTOXIZITÄTSTEST | 50 |
| 3.8.5 | STATISTISCHE AUSWERTUNG..... | 52 |
| 3.9 | ENERGIESTOFFWECHSELMESSUNG | 53 |
| IV. | ERGEBNISSE | 54 |
| 4.1 | HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE | 54 |
| 4.2 | IMMUNHISTOCHEMIE | 57 |
| 4.3 | VIABILITÄTSTEST CELL TITER-GLO® | 59 |
| 4.4 | BRDU – PROLIFERATIONSTEST | 63 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 4.5 | ZYTOTOXIZITÄTSTEST CYTOToX-GLO™ | 67 |
| 4.6 | NEUTRALROT ZYTOTOXIZITÄTSTEST..... | 71 |
| 4.7 | ENERGIESTOFFWECHSELMESSUNG | 75 |
| V. | DISKUSSION..... | 79 |
| 5.1 | ANALYSE DER PHYTOEXTRAKTE MIT DER HPLC | 80 |
| 5.2 | EINFLUSS DER PHYTOEXTRAKTE AUF DIE ZELLVIABILITÄT | 82 |
| 5.2.1 | EINFLUSS DER PHYTOEXTRAKTE AUF DIE ZELLPROLIFERATION | 84 |
| 5.3 | STOFFWECHSELUNTERSUCHUNG | 85 |
| 5.4 | WIRKUNG DER POLYPHENOLE LUTEOLIN, LUTEOLIN-7-GLUCOSIDE UND KAFFEESÄURE | 86 |
| 5.5 | EINFLUSS VON ESTRADIOL UND DER SERM TAMOXIFEN UND ENDOXIFEN..... | 88 |
| VI. | ZUSAMMENFASSUNG | 90 |
| VII. | AUSBLICK..... | 92 |
| VIII. | THESEN | 94 |
| IX. | LITERATURVERZEICHNIS | 96 |
| X. | DANKSAGUNG..... | 121 |
| XI. | SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG | 122 |
| XII. | ANHANG | 123 |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abbildung 1:** Altersstandardisierte Inzidenz und Mortalität des EC weltweit nach Regionen, Abbildung von International Agency for Research on Cancer, 2020, Cancer Today [83]. 13
- Abbildung 2:** Altersspezifische Neuerkrankungen, ICD-10 C54–C55, Deutschland 2017 – 2018 je 100.000, Abbildung aus Krebs in Deutschland, Gebärmutterkörper Zentrum für Krebsregistrierdaten des RKI [195]..... 14
- Abbildung 3:** Eine Auswahl Pharmakologischer Effekte von Knoblauch (*Allium Sativum*) und diskutierter Wirkmechanismen, Abbildung übernommen von El-Saber Batiha et al., 2020 [48]..... 23
- Abbildung 4:** Strukturformeln der Flavanoide Luteolin (3',4',5,7-Tetrahydroxyflavon) und Luteolin-7-Glucoside mit farblich markierten (rot) funktionellen Gruppen. Luteolin besteht aus 2 Phenolringen, mit jeweils 2 Hydroxygruppen, es besitzt eine Carbonylgruppe an C4, sowie eine Doppelbindung zwischen den C-Atomen 2 und 3; Luteolin-7-Glucoside ist an C7 mit einem Glukosemolekül verbunden; Abbildungen von Phenol-Explorer [130]. 28
- Abbildung 5:** Strukturformel der Kaffeesäure (3,4-Dihydroxyzimtsäure) mit farblich markierten (rot) funktionellen Gruppen (2 am Phenolring gebundene Hydroxygruppen und einer Carboxylgruppe), Abbildung der von Phenol-Explorer [130]. 29
- Abbildung 6:** Schematische Darstellung der Immunhistochemischen Antigenmarkierung. Indirekte Farbmarkierung des Antigens durch den sekundären peroxidasegekoppelten Antikörper, der bei Umsetzung des farblosen Substrats eine farbliche Reaktion hervorruft. Abbildung modifiziert nach MORPHISTO – Immunhistochemie [124]...... 38
- Abbildung 7:** Schematische Darstellung des Aufbaus einer HPLC Anlage links mit ihren wichtigsten Komponenten bestehend aus Pumpe , Mischkammer, Injektor, Säule und Detektor; Abbildung modifiziert nach Arnold, Die HPLC-Anlage [52]; Rechts vereinfachte schematische Darstellung der Funktionsweise einer RP-HPLC-Säule, während die polaren Substanzen die Säule mit dem Laufmittelstrom schneller durchlaufen, werden unpolare Substanzen durch Wechselwirkungen mit der stationären Phase aufgehalten und passieren somit später den Detektor, was sich in längeren Retentionszeiten im Chromatogramm widerspiegelt; Abbildung modifiziert nach M. Gey, Instrumentelle Analytik [64]. 42

Abbildung 8: CellTiter-Glo® Luciferase Reaktion. Entstehung des Lumineszenzsignals durch die ATP-abhängige Reaktion von Luciferin zu Oxyluciferin; Abbildung modifiziert nach Promega CellTiter-Glo® Technical Bulletin [141]. 44

Abbildung 9: Strukturunterschiede von Thymidin und BrdU. Farblich markiert ist die Substitution der 5-Methylgruppe des Thymidin durch Brom beim 5'-Bromo-2'-Desoxyuridin, Abbildung von Bio-Rad -BrdU [21]. 45

Abbildung 10: Prinzip des ELISA BrdU-Proliferationsassay. Dargestellt ist die zeitliche Abfolge der Inkorporation des BRDU, der anschließenden Fixierung der Zellen und Denaturierung der DNA, sowie die indirekten Antikörpermarkierung des eingebauten BRDU. Der Farbumschlag entsteht bei der enzymatischen Umsetzung des Substrats (TMB) der antikörpergekoppelten Merrettichperoxidase (HRP) in sein farbiges Produkt; Abbildung modifiziert nach Assay Principle for the CytoSelect™ BrdU Cell Proliferation ELISA Kit, Lubio Science The Reagent Platform [116]. 46

Abbildung 11: Prinzip der Protease-Reaktion des CytoTox-Glo™ Assays. Die Dead-cell Protease spaltet nach Übertritt in den Extrazellularraum eine Aminosäuresequenz (AAF) vom Substrat, sodass Aminoluciferin frei wird. Über die anschließende Luciferin-Luciferase-Reaktion entsteht ein Lumineszenzsignal proportional zur Anzahl toter Zellen in der Kultur; Abbildung modifiziert nach Promega CytoTox-Glo™ Technical Bulletin [32]. 49

Abbildung 12: Chromatogramm der Knoblauchextrakte PE1 (schwarz), PE2 (blau) mit Referenz Folsäure (rot) Zeit [min], Absorbanz [AU]. 55

Abbildung 13: Chromatogramme der Knoblauchextrakte PE1 (schwarz), PE2 (blau) mit Referenz Kaffeesäure (rot) Zeit [min], Absorbanz [AU]. 55

Abbildung 14: Chromatogramme der Knoblauchextrakte PE1 (schwarz), PE2 (blau) mit Referenz Luteolin-7-glukosid (rot) Zeit [min], Absorbanz [AU]. 56

Abbildung 15: Chromatogramme der Knoblauchextrakte PE1 (schwarz), PE2 (blau) mit Referenz Luteolin (rot) Zeit [min], Absorbanz [AU]. 56

Abbildung 16: Immunhistochemische Untersuchung der Zelllinie Ishikawa. A) Östrogenrezeptor alpha positiv; B) Östrogenrezeptor beta positiv; C) Progesteronrezeptor positiv; D) Negativkontrolle: keine farbliche Reaktion. 57

Abbildung 17: Immunhistochemische Untersuchung der Zelllinie RL95-2. A) Östrogenrezeptor alpha positiv; B) Östrogenrezeptor beta positiv; C) Progesteronrezeptor positiv; D) Negativkontrolle: keine farbliche Reaktion. 58

Abbildung 18: Viabilitätstest CellTiter-Glo® der Zelllinien Ishikawa und RL95-2 nach 24 h Inkubation mit dem PE1 (n = 4); Extraktkonzentration [%]; Zellviabilität in [%] in Relation zur Negativkontrolle (Ethanol 70 %); Standardabweichung und Signifikanz sind aufgeführt (Signifikanzniveau $p < 0,05$). 61

Abbildung 19: Viabilitätstest CellTiter-Glo® der Zelllinien Ishikawa und RL95-2 nach 24 h Inkubation mit PE2 (n = 4); Extraktkonzentration [%]; Zellviabilität [%] in Relation zur Negativkontrolle (Ethanol 70 %); Standardabweichung und Signifikanz sind aufgeführt (Signifikanzniveau $p < 0,05$). 61

Abbildung 20: Viabilitätstest CellTiter-Glo® der Zelllinien Ishikawa und RL95-2 nach 24 h Inkubation mit aufgeführten Testsubstanzen (n = 4); Zellviabilität in Relation zur Negativkontrolle, Standardabweichung und Signifikanz sind aufgeführt (Signifikanzniveau $p < 0,05$). 62

Abbildung 21: Viabilitätstest CellTiter-Glo® der Zelllinien Ishikawa und RL95-2 nach 24 h - Lösungsmittelkontrollen (n = 4); Zellproliferation [%] in Relation zu unbehandelten Medium und Zellen; Ethanolkonzentration [%] Standardabweichung und Signifikanz sind mit aufgeführt ($p < 0,05$). 62

Abbildung 22: BrdU-Proliferationstest: der Zelllinien Ishikawa und RL95-2 nach 24 h Inkubation mit dem PE1 (n = 4); Extraktkonzentration [%], Zellproliferation [%] in Relation zur Negativkontrolle (Ethanol 70 %), Standardabweichung und Signifikanz sind mit aufgeführt ($p < 0,05$). 65

Abbildung 23: BrdU-Proliferationstest der Zelllinien Ishikawa und RL95-2 nach 24 h Inkubation mit dem PE2 (n=4); Extraktkonzentration [%], Zellproliferation [%] in Relation zur Negativkontrolle (Ethanol 70 %) Standardabweichung und Signifikanz sind mit aufgeführt ($p < 0,05$). 65

Abbildung 24: BrdU-Proliferationstest der Zelllinien Ishikawa und RL95-2 nach 24 h Inkubation – Referenzen und Kontrollen (n=4); Zellproliferation [%] in Relation zur Negativkontrolle, Standardabweichung und Signifikanz sind mit aufgeführt ($p < 0,05$). 66

Abbildung 25: BrdU-Proliferationstest der Zelllinien Ishikawa und RL95-2 nach 24 h Inkubation – Lösungsmittelkontrollen (n = 4); Zellproliferation [%] in Relation zu unbehandeltem Medium und Zellen; Ethanolkonzentration [%] Standardabweichung und Signifikanz sind mit aufgeführt (p < 0,05)..... 66

Abbildung 26: Zytotoxizitätstest CytoTox-Glo™ der Zelllinien Ishikawa und RL95-2 nach 24 h Inkubation mit dem PE1. (n=4) Extraktkonzentration [%], Zellviabilität [%] in Relation zur Negativkontrolle (Ethanol 70 %) Standardabweichung und Signifikanz sind mit aufgeführt (p < 0,05)..... 69

Abbildung 27: Zytotoxizitätstest CytoTox-Glo™ der Zelllinien Ishikawa und RL95-2 nach 24 h Inkubation mit dem PE2 (n=4), Extraktkonzentration [%], Zellviabilität [%] in Relation zur Negativkontrolle (Ethanol 70 %) Standardabweichung und Signifikanz sind mit aufgeführt (p < 0,05)..... 69

Abbildung 28: Zytotoxizitätstest CytoTox-Glo™ der Zelllinien Ishikawa und RL95-2 nach 24 h Inkubation – Referenzen und Kontrollen (n = 4) Extraktkonzentration [%] Standardabweichung und Signifikanz sind mit aufgeführt (p < 0,05)..... 70

Abbildung 29: Zytotoxizitätstest CytoTox-Glo™ der Zelllinien Ishikawa und RL95-2 nach 24 h Inkubation – Lösungsmittelkontrollen (n = 4). Zellproliferation [%] in Relation zu unbehandeltem Medium und Zellen; Ethanolkonzentration [%] Standardabweichung und Signifikanz sind mit aufgeführt (p < 0,05)..... 70

Abbildung 30: Neutralrot Zytotoxizitätstest der Zelllinien Ishikawa und RL95-2 nach 24 h Inkubation mit dem PE1 (n = 4) Extraktkonzentration [%]; Zellviabilität [%] in Relation zur Negativkontrolle (Ethanol 70 %); Standardabweichung und Signifikanz sind aufgeführt (Signifikanzniveau p < 0,05). 72

Abbildung 31: Neutralrot Zytotoxizitätstest der Zelllinien Ishikawa und RL95-2 nach 24 h Inkubation mit dem PE2, (n=4). Extraktkonzentration [%]; Zellviabilität [%] in Relation zur Negativkontrolle (Ethanol 70 %); Standardabweichung und Signifikanz sind aufgeführt (Signifikanzniveau p < 0,05). 73

Abbildung 32: Neutralrot Zytotoxizitätstest der Zelllinien Ishikawa und RL95-2 nach 24h Inkubation – Referenzen, (n=4). Extraktkonzentration [%]; Zellviabilität [%] in Relation zur Negativkontrolle (Ethanol 70 %); Standardabweichung und Signifikanz sind aufgeführt (Signifikanzniveau $p < 0,05$). 73

Abbildung 33: Neutralrot Zytotoxizitätstest der Zelllinien Ishikawa und RL95-2 nach 24 h Inkubation – Lösungsmittelkontrollen (n = 4), Zellviabilität [%] in Relation zu unbehandelten Medium und Zellen; Ethanolkonzentration [%] Standardabweichung und Signifikanz sind mit aufgeführt ($p < 0,05$). 74

Abbildung 34: Glukose- und Laktatmessung der Zelllinie Ishikawa (20. Passage) nach 24 h Inkubation mit dem PE1 (n = 1); Extraktkonzentration [%], Glukose- und Laktatkonzentration [mmol/l] 75

Abbildung 35: Glukose- und Laktatmessung der Zelllinie Ishikawa (20. Passage) nach 24 h Inkubation mit dem PE2 (n = 1); Extraktkonzentration [%], Glukose- und Laktatkonzentration [mmol/l] 76

Abbildung 36: Glukose- und Laktatmessung der Zelllinie Ishikawa (20. Passage) nach 24 h Inkubation mit Referenzen (n =1); Konzentration [$\mu\text{g/ml}$], Glukose- und Laktatkonzentration [mmol/l] 76

Abbildung 37: Glukose- und Laktatmessung der Zelllinie RL95-2 (19. Passage) nach 24 h Inkubation mit dem PE1, (n=1). Extraktkonzentration [%], Glukose- und Laktatkonzentration [mmol/l]. 77

Abbildung 38: Glukose- und Laktatmessung der Zelllinie RL95-2 (19. Passage) nach 24 h Inkubation mit dem PE2, (n=1). Extraktkonzentration [%], Glukose- und Laktatkonzentration [mmol/l]. 78

Abbildung 39: Glukose- und Laktatmessung der Zelllinie RL95-2 (19. Passage) nach 24 h Inkubation – Referenzen, (n=1). Konzentration [$\mu\text{g/ml}$], Glukose- und Laktatkonzentration [mmol/l]. 78

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Gruppen der Polyphenole aufgelistet mit Nahrungsquellen, durchschnittlicher Zufuhr pro Tag und Gesundheitseffekten aus Zell- und Tierversuchen, Tabelle modifiziert nach DGE 2012, Sekundäre Pflanzenstoffe und ihre Wirkung auf die Gesundheit [40]..... 26

Tabelle 2: Referenz- und Kontrolllösungen aufgeführt mit Konzentration und jeweiligem Lösungsmittel 34

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|---------|---|
| AAF-Glo | Alanyl-Alanyl-Phenylalanyl-Aminoluciferin |
| AGE | Aged garlic Extract |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| ATPasen | Adenosintriphosphatasen |
| AU | Absorbance Units |
| BrdU | Bromdesoxyuridin |
| CA | Karzinom |
| CDK1 | Cyclin-abhängige Kinase 1 |
| CDK2 | Cyclin-abhängige Kinase 2 |
| DAS | Diallylsulfid |
| DADS | Diallylsdisulfid |
| DATS | Diallyltrisulfid |
| DM | Diabetes mellitus |
| DMEM | Dulbecco`s Modified Eagle Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| EC | Endometriumkarzinom |
| EH | Endometriumhyperplasie |
| ELISA | Enzyme linked Immunosorbent Assay |
| FKS | Fetales Kälberserum |
| F12 | Ham`s F12 Medium |
| HCL | Hydrogenchlorid |
| HPLC | High pressure liquid chromatography |
| HRP | Horseradish Peroxidase |
| IARC | International Agency for Research on Cancer |
| IGF-1 | Insuline like Growth Factor 1 |
| MSI | Mikrosatelliteninstabilität |
| OC | Orale Kontrazeptiva |
| RR | Relatives Risiko |
| RT | Raumtemperatur |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PCOS | Polyzystisches Ovarialsyndrom |
| PR | Progesteronrezeptor |
| PTFE | Polyetrafluorethylen |

| | |
|--------------|--------------------------------------|
| SHBG | Sex Hormon Binding Globulin |
| TMB | Tetramethylbenzidin |
| PE1 | Phytoextrakt 1: Bio Knoblauch Morado |
| PE2 | Phytoextrakt 2: Violetter Knoblauch |
| α -ER | alpha Östrogenrezeptor |
| β -ER | beta Östrogenrezeptor |

I. EINLEITUNG

1.1 DAS ENDOMETRIUMKARZINOM

1.1.1 ALLGEMEINES

Das Endometriumkarzinom ist in Industrienationen der häufigste Genitaltumor der Frau. Weltweit wurden im Jahr 2020 417.367 neue Fälle registriert, die Tendenz ist steigend. Bis zum Jahr 2040 wird ein weltweiter Anstieg der Inzidenz um 30,4 % erwartet [83, 85]. Die Entstehung des EC kann in den meisten Fällen auf eine erhöhte kumulative Östrogenexposition, bei gleichzeitig verminderter Opposition durch Progesteron zurückgeführt werden. Eine Hormonersatztherapie in der Menopause, frühe Menarche und eine späte Menopause sind bekannte Risikofaktoren des EC [138]. Des Weiteren ist das EC stark mit metabolischen Faktoren vergesellschaftet. Das Metabolische Syndrom, Bewegungsmangel, bestimmte Ernährungsgewohnheiten aber vor allem Übergewicht erhöhen das Erkrankungsrisiko [22]. Die International Agency for Research on Cancer (IARC) listet das EC weltweit an 2. Stelle der durch Übergewicht verursachten Karzinomerkrankungen hinter dem postmenopausalen Mammakarzinom [84]. Trotz steigender Inzidenzen fällt die Mortalität des EC dank guter Prognose vergleichsweise gering aus. Irreguläre vaginale Blutungen treten bereits in frühen Erkrankungsstadien auf und ermöglichen in der Regel eine frühe Diagnosestellung mit guten kurativen Therapieaussichten [33, 167]. Die Prognose des EC ist sowohl vom Diagnosezeitpunkt, als auch entscheidend vom jeweiligen Subtyp abhängig. Entsprechend ihrer Pathogenese, histopathologischen Charakteristika, sowie klinischem Verlauf lassen sich ECs in zwei Hauptkategorien einteilen. Prognostisch günstig sind die hormonabhängigen, weniger aggressiven Typ-I-Tumoren. Sie machen etwa 80 % der Karzinome aus. Es handelt sich zum Großteil um endometrioide Adenokarzinome, die auf dem Boden einer Endometriumhyperplasie entstehen. Der Altersgipfel liegt bei 55-65 Jahren. Bei den Typ-II-Tumoren handelt es sich in der Regel um hormonunabhängige, schlecht differenzierte seröse oder klarzellige Karzinome. Sie entstehen eher in atrophem Endometrium und zeichnen sich durch eine deutlich schlechtere Prognose aus [14, 45]. In der Therapie der Erkrankung steht für beide Typen die chirurgische Tumorresektion im Vordergrund [120, 167].

1.1.1 EPIDEMIOLOGIE

Das EC steht weltweit an 7. Stelle der Krebsneuerkrankungen bei Frauen und ist damit hinter dem Brust- und dem Zervixkarzinom der dritthäufigste maligne gynäkologische Tumor [83]. Es zeigen sich starke regionale Unterschiede in der Inzidenz des EC (Abbildung 1), angeführt von Nordamerika und Europa mit altersstandardisierten jährlichen Inzidenzen von bis zu 26,2 pro 100.000 Personen (Polen, 2020) [83, 110]. In Deutschland werden laut dem Deutschen Krebsregister des RKI jährlich ca. 10.470 Neuerkrankungen registriert. Das EC steht damit an fünfter Stelle der häufigsten Krebserkrankungen der Frau. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 68 Jahren, die Erkrankungshäufigkeit steigt bis zum 80. Lebensjahr an [49]. Weltweit verstarben im Jahre 2020 laut der IARC 97.370 Frauen am EC. Damit war das EC für 2,2 % der Krebstodesfälle bei Frauen in diesem Jahr verantwortlich [83]. In Deutschland lag im Jahr 2017 die altersstandardisierte Sterberate bei 3,1 pro 100.000 Personen, bei einer Erkrankungsrate von 15,4. Die 5-Jahres- und die 10-Jahres-Überlebensrate betragen jeweils 78 % und 74 % [196].

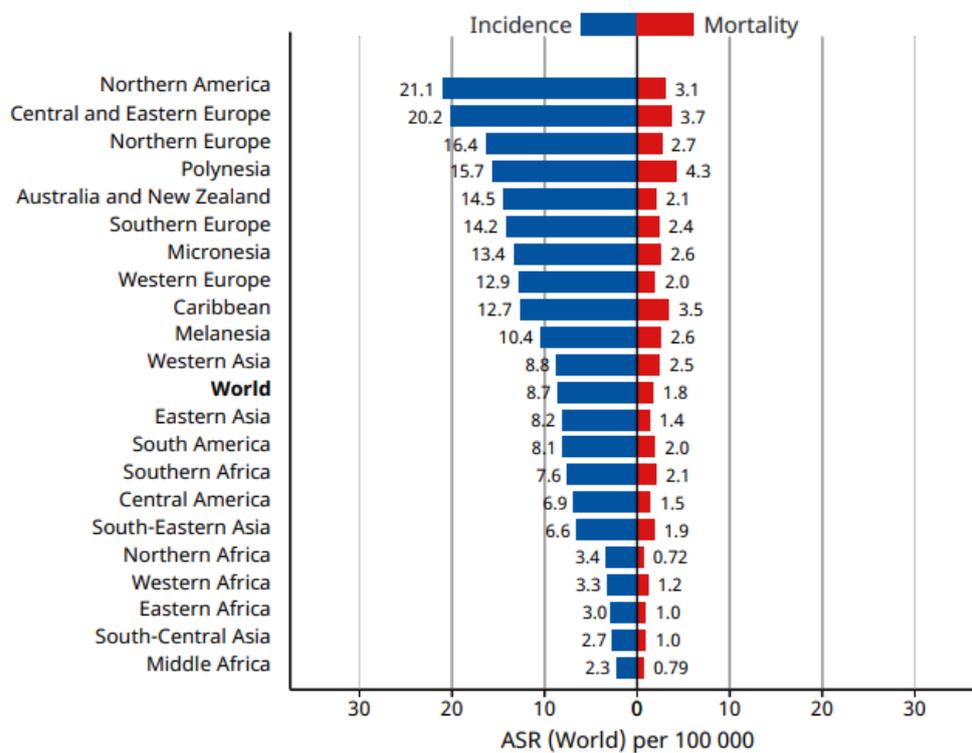


Abbildung 1: Altersstandardisierte Inzidenz und Mortalität des EC weltweit nach Regionen, Abbildung von International Agency for Research on Cancer, 2020, Cancer Today [83].

1.1.2 ÄTIOLOGIE

1.1.1.1 RISIKOFAKTOREN

Alter

Das Risiko an einem EC zu erkranken steigt bis zum Alter von 80 Jahren an (Abbildung 2). Besonders für die selteneren Typ-II-Karzinome stellt ein höheres Lebensalter einen wesentlichen Risikofaktor dar [195].

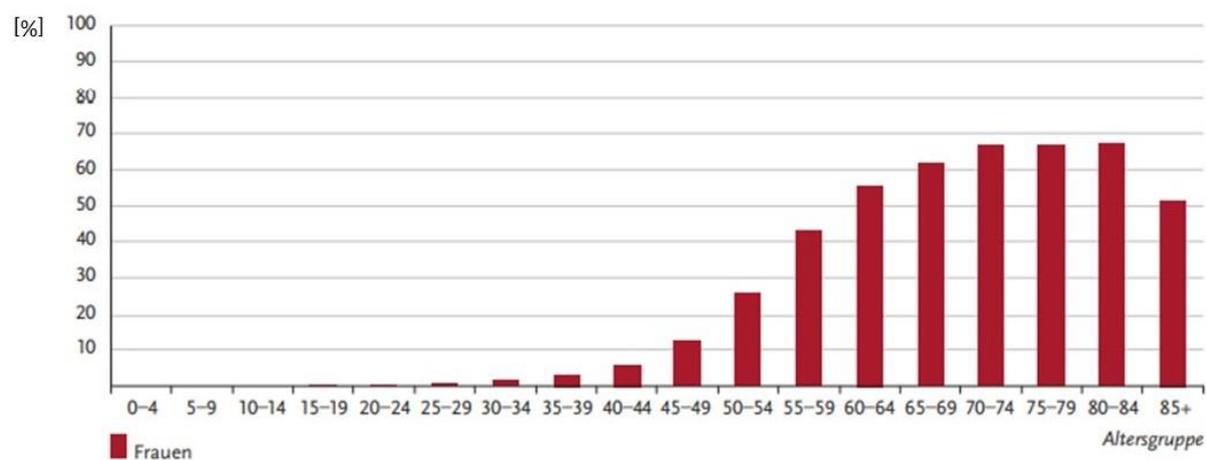


Abbildung 2: Altersspezifische Neuerkrankungen, ICD-10 C54–C55, Deutschland 2017 – 2018 je 100.000, Abbildung aus Krebs in Deutschland, Gebärmutterkörper Zentrum für Krebsregistrierdaten des RKI [195].

Reproduktive Faktoren

Eine späte Menopause und Nulliparität sind reproduktive Faktoren, die das Risiko für ein EC erhöhen. Nullipara wiesen in einer Analyse der Nurses' Health Study Kohorte ein um 24 % erhöhtes Risiko auf an einem EC zu erkranken. Ein Eintritt in die Menopause nach dem 55. Lebensjahr erhöhte das Relative Risiko auf 1,53 [47, 94].

Hormonersatztherapie (HRT)

Die Risiken einer Hormonbehandlung in der Menopause hinsichtlich des EC sind seit stark erhöhter Inzidenzwerte in den 1970er Jahren, die der Verbreitung der HRT folgten, bekannt [104]. Insbesondere Östrogenmonopräparate gehen mit einer signifikanten Erhöhung des Risikos für Typ-I-Karzinome einher [128, 181]. In einer Metaanalyse von Grady et al., betrug das Relative Risiko gegenüber Frauen ohne HRT 2,3 und stieg bei einer Langzeitanwendung (> 10 Jahre) auf 9,5 an. Auch 5 Jahre nach Anwendung war die Erkrankungswahrscheinlichkeit noch erhöht [68]. Bei einer HRT unter Addition von Gestagenen, die der übermäßigen Endometriumstimulation entgegenwirken sollen, ist die Risikoerhöhung von Therapiedauer,

eingesetzten Hormonen, Anzahl an Gestagenanwendungstagen, aber auch vom Körpergewicht bzw. BMI der Frauen abhängig [36, 147, 181]. In der Million Women Study war die Inzidenz des EC unter allen HRT Anwenderinnen bei täglicher Gestageneinnahme am geringsten [181]. Übergewichtige Frauen (BMI > 25 kg/m²) weisen nach HRT Anwendung sogar ein geringeres EC-Risiko gegenüber übergewichtigen Nichtanwenderinnen auf [36, 181].

Tamoxifen

Tamoxifen wird als SERM im Rahmen der adjuvanten endokrinen Therapie des rezeptorpositiven Mammakarzinoms eingesetzt und kann das Risiko für ein EC verdoppeln [25]. Eine lange Therapiedauer (>3 Jahre) ist mit steigendem Risiko und schlechterer Prognose aufgrund des vermehrten Auftretens schlecht differenzierter Karzinome assoziiert [41, 89]. Im Gegensatz zu Tamoxifen senkt Raloxifen, ein SERM ohne hormonelle Wirkung am Endometrium das Risiko an einem EC zu erkranken [41].

Metabolische Faktoren

Insbesondere für die Entstehung der hormonabhängigen ECs spielen metabolische Faktoren eine große Rolle. Übergewicht gilt als einer der führenden Risikofaktoren sowohl für die Endometriumhyperplasie als auch für das EC [189]. Der Anteil der ECs, mit einem attributablen Risiko zu Übergewicht in Europa liegt etwa zwischen 30-50 % und erreicht weltweit bis zu 60 % (Samoa, 2012) [84]. Abdominelle Fettleibigkeit, Gewichtszunahme im Erwachsenenalter, das Metabolische Syndrom, Hypertension und Bewegungsmangel sind ebenfalls als individuelle Faktoren mit einem erhöhten Risiko assoziiert [4, 22, 36, 51, 60, 108, 144]. Die Evidenz eines kausalen Zusammenhangs zwischen Übergewicht und dem EC wurde mehrfach als überzeugend bewertet [4, 108]. Fettgewebe, als endokrines Organ, führt im Körper zu diversen metabolischen und hormonellen Veränderungen, deren Rolle in der Krebsentstehung teilweise gut belegt ist. Dazu gehören erhöhte Spiegel bioverfügbaren Östrogens durch Alterationen im Sexhormonmetabolismus, ebenso wie erhöhte Level proinflammatorischer Cytokine und die Hyperinsulinämie [4, 28, 90, 108, 150].

Diabetes mellitus und Hyperinsulinämie

Der Zusammenhang zwischen Diabetes mellitus, einer gestörten Glukosetoleranz, chronischer Hyperinsulinämie und dem EC ist vielfach untersucht und belegt worden. Das Relative Risiko für Diabetikerinnen an einem EC zu erkranken, wird in Meta-Analysen mit 1,7 - 2,3 angegeben und ist sowohl für den DM Typ I, als für den DM Typ II erhöht [59]. Zudem gibt es Hinweise auf eine erhöhte krebsspezifische Mortalität bei Diabetikerinnen. Die Datenlage dazu

ist bislang jedoch uneinheitlich [17, 59, 112, 198]. Hyperinsulinämie steht höchstwahrscheinlich in kausalem Zusammenhang mit dem EC. Dafür werden unter anderem direkt mitogene Effekte des Insulins, die vermehrte Expression von IGF-1 und die Suppression der SHBG-Synthese in der Leber angeführt, die insgesamt zu einem höheren Anteil bioverfügbarer Östrogene führen [4, 28, 76].

Polyzystisches Ovarialsyndrom (PCOS)

Das PCOS betrifft etwa 5-8 % aller Frauen und geht mit endokrinen, sowie metabolischen Störungen einher [9]. Das Lebenszeitrisiko an einem EC zu erkranken ist bei betroffenen Frauen etwa um ein Dreifaches erhöht [18, 71]. Chronische Oligo- und Anovulation erhöhen das Risiko einer Endometriumhyperplasie, die zu einem EC fortschreiten kann [7]. Übergewicht, eine gestörte Glukosetoleranz, Hypertension und Nulliparität sind bekannte Risikofaktoren des EC, die häufig mit dem PCOS einhergehen. Es ist bislang unklar inwieweit das PCOS selbst unabhängig dieser begleitenden Faktoren das EC-Risiko erhöht [18, 31].

2.1.1.1 PROTEKTIVE FAKTOREN

Reproduktive Faktoren

Reproduktive Faktoren, die mit einer geringeren kumulativen Östrogenexposition und gleichzeitig erhöhter Gestagenexposition assoziiert sind, können das Risiko für ein EC senken. Dazu gehören eine späte Menarche, frühe Menopause und Parität [47, 144]. Insbesondere ein hohes Alter (>40) bei der letzten Geburt geht mit einer erheblichen Risikoreduktion einher [94].

Orale Kontrazeptiva (OC) und Intrauterinpressare (IUD)

Die Einnahme oraler Kontrazeptiva ist in der Literatur einheitlich mit einer signifikanten Senkung des EC Risikos assoziiert. In einer Meta-Analyse der Collaborative Group on Epidemiological Studies on Endometrial Cancer, die Daten von 27 000 Frauen auswerteten, betrug das Relative Risiko nach Pilleneinnahme 0,69 [34]. Die Risikoreduktion steigt mit den Jahren der OC Anwendung und ist auch bis über 30 Jahre danach noch signifikant. Sowohl Typ-I- als auch Typ-II-Karzinome treten nach OC Anwendung seltener auf [34, 157].

Die Anwendung hormoneller, sowie nicht-hormoneller IUDs kann ebenfalls das Risiko für ein EC senken. Ein höherer Wirkungsgrad ist dabei für Hormonelle IUDs, lange Anwendungsdauer, sowie hohes Alter bei erster und letzter Anwendung beschrieben [20, 54, 165].

Diätetische Faktoren

Eine Vielzahl diätetischer Komponenten wird mit einem reduzierten EC-Risiko in Verbindung gebracht. Dazu zählen ein geringer Fettanteil der Nahrung, ein hoher Anteil an Vitamin C, Vitamin E und Betakarotin, Verzicht auf rotes Fleisch und zuckerhaltige Getränke, hoher Konsum von Obst und Gemüse, aber auch Kaffee- und Teegenuss [4, 11, 13, 26, 82, 114, 173, 180]. Ein hoher Ballaststoffgehalt der Nahrung kann laut Berechnungen der Meta-Analyse von Bandera et al., das Relative Risiko für ein EC um 0,82 pro 5 g Ballaststoffe auf 1000 kcal senken [12]. Eine sojareiche Ernährung, insbesondere ein hoher Gehalt an Isoflavonen, Daidzeinen und Genesteinen ist ebenfalls mit einer geringeren Erkrankungswahrscheinlichkeit assoziiert [125, 133].

Körperliche Aktivität

Körperliche Aktivität zeigt dosisabhängig zwischen 0–12 h pro Woche einen mindernden Effekt auf das EC Risiko. Der Effekt ist dabei auch unabhängig vom Einfluss regelmäßiger körperlicher Aktivität auf das Körpergewicht messbar und ist stärker bei übergewichtigen gegenüber normalgewichtigen Frauen ausgeprägt [4, 65, 96, 184].

Zigarettenrauchen

Trotz diverser nachgewiesener krebsregender Effekte, stellt das Rauchen für beide Typen des EC einen protektiven Faktor dar [144, 157]. In einer Metanalyse von Zhou et al., die 10 prospektive und 24 Fall-Kontrollstudien auswerteten, zeigte sich sowohl für aktive, als auch für ehemalige Raucherinnen ein signifikant geringeres Risiko an einem EC zu erkranken. Dieser Effekt betraf jedoch nur postmenopausale Frauen, für sie betrug das Relative Risiko 0,71 [199].

3.1.1.1 HEREDITÄRE ENDOMETRIUMSKARZINOME

Bis zu 5 % der EC sind auf hereditäre Tumorsyndrome zurückzuführen. Ursächlich sind Keimbahnmutationen in Tumorsuppressor-, sowie DNA-Reparaturgenen, wie sie beim Lynch- und beim Cowden-Syndrom zu finden sind. Das autosomal dominant vererbte Lynch-Syndrom ist eins der häufigsten erblichen Tumorsyndrome und ist für etwa 2-4 % der EC-Fälle, bei Betroffenen unter 50 Jahren sogar für etwa 9-10 % der Fälle verantwortlich. Unter den mit dem Lynch-Syndrom assoziierten EC zeigt sich ein erhöhter Anteil an Typ-II-Karzinomen, sowie EC des unteren Uterinsegments. Das mittlere Diagnosealter liegt bei 48 Jahren [29, 115, 186]. Frauen mit dem hereditären Cowden-Syndrom, dessen Ursache eine Keimbahnmutation des PTEN-Gens ist, haben ein Lebenszeitrisiko von bis zu 28 % an einem EC zu erkranken [118,

172]. Unabhängig einer nachgewiesener Keimbahnmutation geht die positive Familienanamnese eines EC oder eines Kolorektalen Karzinoms vor dem 50. Lebensjahr bei mindestens einem bzw. einer erstgradigen Verwandten mit einem erhöhten Risiko für ein EC einher. Eine Familienanamnese bezüglich anderer gynäkologischer Malignome (Mamma-, Ovar-, Zervix-CA) hingegen ist nicht mit einem erhöhten Risiko assoziiert [187].

1.1.3 ENDOMETRIUMHYPERPLASIE

Die Endometriumhyperplasie (EH) ist durch eine Vermehrung endometrialen Drüsengewebes sowie Stromas gekennzeichnet. Sie lässt sich histopathologisch nach der WHO in die Einfache Hyperplasie ohne Atypien und die Atypische Hyperplasie einteilen. Die EH ohne Atypien birgt ein geringes Risiko für die Entwicklung eines ECs (<5 %) [105]. Es handelt sich um eine polyklonale Proliferation von endometrialem Stroma und Drüsengewebe. Die Atypische EH hingegen ist eine Präkanzerose mit hohem Risiko der Progression in ein EC. Bei etwa der Hälfte der Frauen liegt bei Diagnose bereits ein konkordantes Karzinom vor [105, 179].

Der Entstehung einer EH liegt in den meisten Fällen ein Östrogenüberschuss zugrunde. In der reproduktiven Lebensphase erhöhen im Wesentlichen anovulatorische Zyklen, wie sie beim PCOS vorkommen das Risiko für eine EH. In der Postmenopause hingegen sind Übergewicht und eine Hormonersatztherapie die Hauptrisikofaktoren [7]. Das mittlere Diagnosealter der Patientinnen liegt bei 52 Jahren [164].

1.1.4 HISTOPATHOLOGIE UND PATHOGENESE

Das binäre Tumormodell unterscheidet nach histologischen und klinischen Kriterien zwei Tumortypen. Gut differenzierte, endometrioiden Adenokarzinome machen etwa 80 % der EC aus und treten überwiegend in der Perimenopause auf [120, 167]. Sie entstehen in der Regel aus dem Vorläuferstadium der Atypischen EH unter langer Exposition von absolut oder relativ zum Progesteron erhöhten Östrogenspiegeln [14, 167]. Frühe Mutationen, die zu geringeren Anteilen auch bei der Atypischen EH zu finden sind, betreffen die Gene PTEN, K-RAS und β -Catenin, sowie das Mismatch-Reparatursystem. Mutationen im p53 Tumorsuppressorgen treten bei Typ-I-Tumoren insgesamt selten auf. Sie sind jedoch ein wichtiger prognostischer Marker und mit einem schlechten klinischen Outcome assoziiert [14, 45, 119, 120]. Unter den selteneren Typ-II-Tumoren wird eine sehr heterogene Gruppe schlecht differenzierter, meist seröser oder klarzelliger Karzinome zusammengefasst. Sie werden per definitionem als high

grade (G3) Tumore eingestuft. Die Erkrankung tritt überwiegend im Senium auf und ist nicht primär mit hormoneller Stimulation assoziiert [14, 120, 167]. Bekannte Genmutationen der Typ-II-Tumoren umfassen das p53 Tumorsuppressorgen, sie kann in etwa 80 % der Typ-II-Karzinome nachgewiesen werden, das HER2/neu-Gen, sowie die Signalwege von Cyclin E und PIK3CA [14, 53, 100, 160].

Trotz vieler bekannter genetischer und epigenetischer Veränderungen in ECs, bleiben die exakten zellulären Vorgänge, sowie die Rolle von Östrogen in der Karzinogenese weiterhin unklar. Die molekulare Tumortypisierung des EC hat dennoch in den letzten Jahren aufgrund ihrer prognostischen Relevanz und therapeutischen Implikationen vor allem beim endometrioiden EC Eingang in den diagnostischen Algorithmus gefunden [14, 35].

1.1.5 DIAGNOSTIK

Blutungsstörungen sind das führende Symptom des EC und treten in der Regel bereits im Frühstadium auf. Postmenopausale Blutungen treten bei etwa 90 % der Patientinnen entsprechenden Alters auf und ermöglichen in 75 % der Fälle eine Diagnose im FIGO Stadium I [33, 110]. Die Primärdiagnostik des EC erfolgt durch vaginale Sonographie, klinische Untersuchung, sowie differenzialdiagnostische Abstrichzytologie. Wichtige Kriterien zur Beurteilung des vaginalen Ultraschalls und der Einleitung invasiver Diagnostik sind die Endometriumdicke und -morphologie. Bei prämenopausalen Frauen gilt eine Endometriumdicke von > 20 mm als abklärungsbedürftig. Bei postmenopausalen Frauen sind Cut-off Werte von 3 mm, beziehungsweise 5 mm unter HRT oder Tamoxifen etabliert [110, 177]. Zusätzliche Faktoren, die eine invasive Diagnostik zur weiteren Abklärung erfordern sind anamnestische Risikofaktoren wie das LYNCH-Syndrom, Diabetes mellitus und ein BMI von > 30 vor allem bei prämenopausalen Frauen [110, 189]. Der Goldstandard zur Diagnosesicherung eines ECs ist die Hysteroskopie mit fraktionierter Abrasio [74]. Bei gesichertem EC erfolgt die präoperative Ausbreitungsdiagnostik per vaginalem Ultraschall. Sie kann durch Schnittbildgebung zur lokalen Beurteilung, aber auch bei Verdacht auf Fernmetastasierung ergänzt werden [153]. Die Referenzmethode der Ausbreitungsdiagnostik ist das intraoperative Staging mit histopathologischer Sicherung des Befundes [110, 148]. Sie sollte ein Lymphknoten-Staging mit Entfernung makroskopisch, sowie palpatorischer auffälliger Lymphknoten bzw. eine Sentinel-Node-Biopsie umfassen [35]. Bei allen primären EC ist darüber hinaus eine immunhistochemische Bestimmung von p53, sowie der MMR Proteine vorzunehmen. Eine POLE Mutationsanalyse ist zusätzlich bei high grade Tumoren empfohlen [35, 45].

Untersuchungen zur Früherkennung des ECs sind nicht etabliert, da bisher kein Vorteil für das Gesamtüberleben gezeigt werden konnte [110].

1.1.6 THERAPIE

Die Therapie des EC kann in aller Regel kurativ erfolgen. Es stehen zur Behandlung die operative Therapie, die Strahlentherapie und die adjuvante Chemotherapie zu Verfügung. Die operative Therapie sollte stets angestrebt werden, da auch in fortgeschrittenen Stadien ein Überlebensvorteil durch Zytoreduktion erreicht werden kann [16]. In frühen Stadien ist die Hysterektomie mit beidseitiger Adnexektomie die Therapie der Wahl. Die Infiltrationstiefe des Myometriums, der Befall des Zervixstromas, der Parametrien bzw. die Ausbreitung auf Nachbarorgane, der histologische Typ, das Grading sowie der Menopausenstatus entscheiden über die notwendige Radikalität der OP [80, 171]. Im Falle internistischer Inoperabilität stellt auch die primäre Bestrahlung des Tumors eine kurative Behandlungsoption dar. In einer Übersichtsarbeit von van der Stehen-Banasik et al. konnte unter alleiniger Strahlentherapie eine krankheitsspezifische 5-Jahres-Überlebensrate von 78,5 % gezeigt werden [182].

Die Auswahl der adjuvanten Therapie ist abhängig vom Tumorstadium, sowie Tumorigradung und molekularem Subtyp. Die postoperative Bestrahlung des Tumorbetts zur Rezidivprophylaxe ist ab dem FIGO Stadium 1B empfohlen und kann als Brachytherapie oder perkutan durchgeführt werden [45]. Bei organüberschreitendem Wachstum, dem Vorliegen von Lymphknoten- oder Fernmetastasen, bei Typ-II-Karzinomen, sowie p53 mutierten Typ-I-Karzinomen sollte eine adjuvante Chemotherapie erfolgen. Sie kann alternativ zur Bestrahlung oder zusätzlich eingesetzt werden und kann das progressionsfreie, sowie das Gesamtüberleben signifikant verbessern [45, 88].

1.2 ALLIUM SATIVUM

Knoblauch (*Allium sativum*) gehört der Pflanzengattung Lauch an und ist eine der ältesten Kulturpflanzen der Welt. Die 5 bis 7 cm große Zwiebel stellt das Überdauerungsorgan der Pflanze dar. Sie setzt sich aus 5 bis 20 von einer dünnen Hülle umgebenen Zehen zusammen, die sich durch ihren scharf-aromatischen Geschmack und ihren besonderen Nährstoffreichtum auszeichnen [170]. Man geht davon aus, dass Knoblauch seit jeher Teil der menschlichen Ernährung ist. In Überlieferungen und medizinischen Manuskripten beinahe aller antiker Hochkulturen findet er als Gewürz und Heilpflanze Erwähnung. Die Empfehlungen zum therapeutischen Einsatz reichen dabei von Atemwegserkrankungen und Verdauungsbeschwerden über Infektionen und Entzündungen bis hin zu Herzproblemen und Tumoren [170]. Bis heute bleiben die präventiven und therapeutischen Eigenschaften von Knoblauch auf chronische Erkrankungen wie Herz-Kreislauf- und Krebserkrankungen, aber auch Diabetes, Osteoporose und metabolische Störungen Gegenstand intensiver Forschung. Sie werden unter anderem auf die antioxidativen, antiatherogenen, lipidsenkenden und antiinflammatorischen Effekte von Knoblauch und seinen bioaktiven Verbindungen zurückgeführt [6, 86].

1.2.1 BIOAKTIVE INHALTSSTOFFE

Allium sativum enthält eine Vielzahl bioaktiver Inhaltsstoffe zu denen neben Vitaminen und Spurenelementen auch Saponine und Polyphenole aus der Gruppe der sekundären Pflanzenstoffe, sowie Polysaccharide und Organoschwefelverbindungen zählen [159]. Die genaue Zusammensetzung variiert u.a. in Abhängigkeit der Sorte und des Anbaugebiets [136]. Auch die Art der Zubereitung von Knoblauch kann die Bildung bioaktiver Komponenten und deren Bioverfügbarkeit beeinflussen. Das betrifft insbesondere die schwefelhaltigen Verbindungen, die dem Knoblauch sein Aroma verleihen [159]. Ganze, frische Knoblauchzehen enthalten jeweils etwa 10 mg der schwefelhaltigen Aminosäure Alliin und des Alliin-spaltenden Enzyms Alliinase [170]. Wird die zelluläre Matrix von Knoblauch aufgebrochen, reagieren Enzym und Substrat unter der Bildung von Allicin miteinander. Allicin konnten diverse pharmakologische Eigenschaften nachgewiesen werden, die im Wesentlichen auf seiner antioxidativen Aktivität und der Interaktion mit schwefelhaltigen Aminosäuren wie Cystein beruhen [48]. Allicin ist jedoch instabil und wandelt sich schnell in Abhängigkeit von Temperatur, pH-Wert und Lösungsmittel in volatile, lipid- und wasserlösliche schwefelhaltige Verbindungen um. Zu diesen Verbindungen zählen unter anderem die Allylsulfide Diallylsulfid (DAS), Diallyldisulfid (DADS), Diallyltrisulfid (DATS), sowie Ajoene, S-Allyl-Cystein und S-Allyl-Mercaptocystein (SAMC) [3,

159]. Sie lassen sich nach der Aufnahme von Knoblauch sowohl im Blut, als auch in der Ausatemluft und der Perspiration nachweisen und sorgen für den typischen Knoblauchatem [3]. Insgesamt werden den Organoschwefelverbindungen ein Großteil der pharmakologischen Eigenschaften von Knoblauch zugeschrieben. Sie wirken zudem synergistisch mit anderen bioaktiven Komponenten wie den Polysacchariden, Saponinen und Polyphenolen [3]. Knoblauch gehört zu den Gemüsesorten mit den höchsten Polyphenolkonzentrationen. Der Gehalt einer einzigen Knoblauchzehe (3 g) beträgt etwa 2,61 mg [130]. Über 20 verschiedene Verbindungen konnten in Analysen unterschiedlicher Knoblauchsarten nachgewiesen werden, darunter Phenolsäuren und Flavanoide, aber auch diverse den Phytoöstrogenen zugeordnete Verbindungen [19, 126, 130, 159].

1.2.2 GESUNDHEITSFÖRDERNDE WIRKUNG VON KNOBLAUCH

Die Erforschung der Gesundheitseffekte von Knoblauch hat eine lange Tradition. 1858 gelang Louis Pasteur erstmals der direkte Nachweis einer antibakteriellen Wirkung von Knoblauchsaft, die seitdem vielfach belegt worden ist [170]. Sie wird hauptsächlich auf die schwefelhaltigen Verbindungen Allicin, DATS und DADS zurückgeführt. Durch Interaktionen mit Thiolenzymen können diese Verbindungen beispielsweise die bakterielle Zellstruktur schädigen oder in metabolische Prozesse von Mikroben eingreifen. So erweist sich Knoblauch auch gegen einige humanpathogene Pilze, Viren und Protozoen als wirksam [48].

In Abbildung 3 ist eine Übersicht der Wirkeffekte von Knoblauch, sowie in Diskussion stehender Wirkmechanismen. Heute stehen insbesondere die antihypertensiven, antiatherogenen und lipidsenkenden Eigenschaften von *Allium sativum* im Fokus der Forschung [48, 159]. Metaanalysen klinischer Studien zeigen in Assoziation mit der Supplementation von Knoblauchpräparaten eine signifikante Senkung systolischer und diastolischer Blutdruckwerte, des Gesamt- und des LDL-Cholesterins, der Nüchtern glukose, sowie des HbA_{1c} von PatientInnen mit Kardiovaskulären Vorerkrankungen und Diabetes mellitus [103, 158]. Dafür werden unter anderem die Interaktion von Knoblauchverbindungen mit Schlüsselenzymen der Cholesterin- und Lipidsynthese, die Hemmung des Angiotensin Converting Enzyme (ACE) und vermehrte NO- und H₂S-vermittelte Vasodilatation verantwortlich gemacht [86, 107]. Der antidiabetische Effekt von Knoblauch konnte in Tierversuchen auf Stimulation der Insulinsekretion im Pankreas, sowie Steigerung der peripheren Insulinsensitivität zurückgeführt werden [48, 197]. Durch Suppression der LDL-Oxidation könnte Knoblauch außerdem wesentlich zur Senkung des kardio-, sowie neurovaskulären Risikos beitragen [107].

Darüber hinaus konnte Knoblauch und seinen bioaktiven Verbindungen immunmodulatorische, antiinflammatorische, und neuroprotektive Effekten nachgewiesen werden [48]. In einer Metaanalyse randomisierter klinischer Studien stellten Mofrad et al. eine signifikante Senkung der Biomarker chronischer Entzündung CRP, TNF- α und IL-6 durch die Supplementation von Knoblauchpräparaten heraus [40]. Die Aminosäure Allicin könnte durch die Hemmung der Acetylcholinesterase, sowie der Butyrylcholinesterase und konsekutiv erhöhte Spiegel des Neurotransmitters Acetylcholin zur Verbesserung der Symptome des kognitiven Abbaus der Alzheimer Erkrankung beitragen [101].

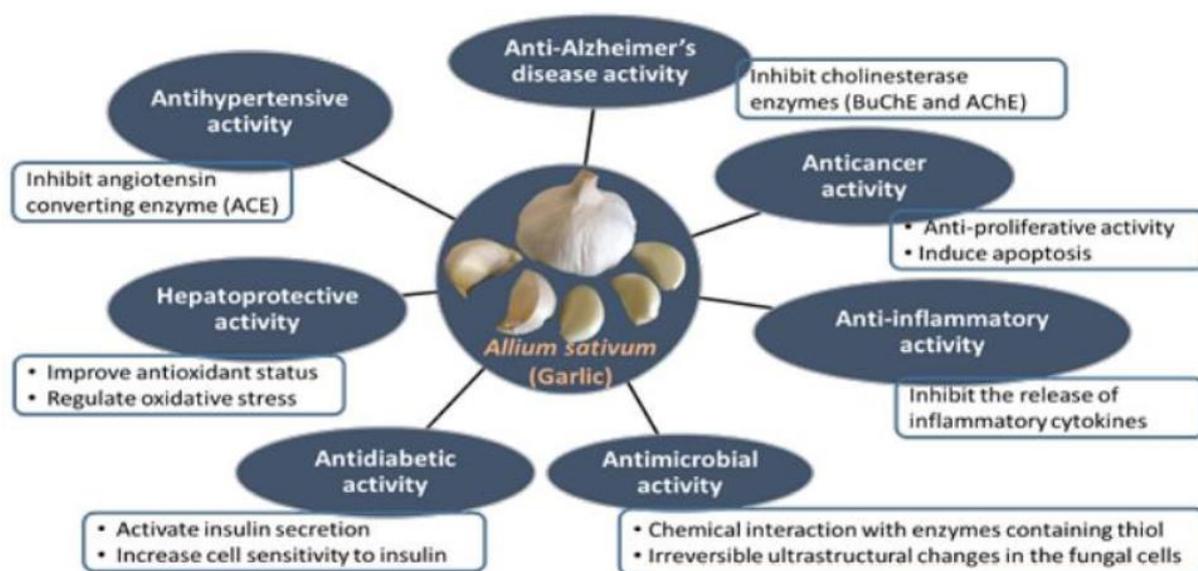


Abbildung 3: Eine Auswahl Pharmakologischer Effekte von Knoblauch (*Allium Sativum*) und diskutierter Wirkmechanismen, Abbildung übernommen von El-Saber Batiha et al., 2020 [48].

Antikancerogene Wirkung

Der Einsatz von Knoblauchpräparaten zur Prävention und Therapie von Tumorerkrankungen wurde in den letzten Jahren vielfach untersucht. Knoblauchreiche Diäten konnten mit einem reduzierten Risiko für diverse Tumorerkrankungen assoziiert werden. In epidemiologischen Studien zeigte insbesondere hoher Konsum von Knoblauch einen protektiven Einfluss auf die Entwicklung eines Magen- und Kolorektalkarzinoms [56, 57, 194]. In Interventionsstudien war die Langzeitsupplementierung von Knoblauchpräparaten außerdem mit einem verringerten Auftreten kolorektaler Adenome und präkanzerösen gastralen Läsionen verbunden [6]. Studien an Zellkulturen und Tiermodellen deuten auf einen inhibitorischen Effekt verschiedener Komponenten aus *Allium sativum* hin, die sowohl die Initiations- als auch die Promotionsphase der Karzinogenese betreffen. Lipid- und wasserlösliche Komponenten aus dem Knoblauch bieten Zellen Schutz vor Karzinogenen indem sie Enzyme stimulieren, die die Aktivierung von Karzinogenen unterdrücken, ihre Exkretion fördern und die Bildung von DNA-Addukten reduzieren [162]. Knoblauchextrakten und vor allem den Allylsulfiden konnte des Weiteren eine proliferationshemmende Wirkung auf diverse humane Karzinomzelllinien, sowie transplantable Tumoren nachgewiesen werden [111, 162]. Dabei zeigte sich, dass Knoblauch nicht nur das unkontrollierte Zellwachstum inhibiert und die Apoptose der Zellen induziert, sondern auch die Migration der Tumorzellen und die Tumorangiogenese hemmen kann. Als Nahrungszusatz beispielsweise in Form einer personalisierten Diät könnte Knoblauch außerdem zur Reduktion von Nebenwirkungen antitumoraler Therapien beitragen [159].

1.3 POLYPHENOLE

1.3.1 EINTEILUNG UND WIRKUNG

Polyphenole sind aromatische Verbindungen aus der Gruppe der Sekundären Pflanzenstoffe. Sie dienen Pflanzen als Lock- und Botenstoffe, als Wachstumsregulatoren oder bieten ihnen Schutz vor Pathogenen und UV-Strahlung [27, 42]. Ihre vielfältigen Funktionen im Pflanzenreich spiegeln sich in ihrer strukturellen Diversität wider. Polyphenole lassen sich in Flavanoide, Phenolsäuren, Stilbene und Lignane einteilen, die jeweils weitere Subklassen und im Fall der Flavanoide > 6500 bekannte Verbindungen umfassen [42]. In pflanzlicher Nahrung sind Polyphenole in großer Vielfalt enthalten und treten insbesondere mit organoleptischen Qualitäten in Erscheinung [39, 168]. Sie sind beispielsweise für die rote, orange oder blaue Färbung verschiedener Obst- und Gemüsesorten verantwortlich oder bilden einen Teil saurer und bitterer Geschmackskomponenten [39].

Polyphenole sind mit einem breiten Spektrum gesundheitsfördernder Eigenschaften assoziiert. In Zell- und Tierversuchen konnten ihnen unter anderem antioxidative, antikanzerogene, antiinflammatorische und neuroprotektive Eigenschaften nachgewiesen werden [39, 42]. Der Konsum polyphenolreicher Lebensmittel wurde in epidemiologischen Studien mit einer Risikoreduktion für Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Lungen-, Brust- und Darmkrebs assoziiert [42, 44, 78]. Auch endokrine Wirkeffekte werden den Polyphenolen zugeschrieben. Die Flavanoide Quercetin, Kaempferol und Luteolin, sowie Lignane und Isoflavone können durch kompetitive Bindung am Östrogenrezeptor sowohl agonistische als auch antagonistische Effekte hervorrufen [39, 42]. Ein hohe Zufuhr dieser als Phytoöstrogene bezeichneten Polyphenole über die Nahrung ist in epidemiologischen Studien vorrangig mit einer geringeren Inzidenz hormonabhängiger Karzinome wie dem Mamma- und dem Prostatakarzinom, aber auch dem EC assoziiert [42, 133, 192].

In Tabelle 1 sind die Untergruppen der Polyphenole mit möglichen Gesundheitseffekten aus in vitro und in vivo Studien zusammengefasst. Zusätzlich sind einige wichtige Nahrungsquellen der jeweiligen Gruppen und die durchschnittliche tägliche Zufuhr aufgeführt.

Um zum Verständnis der Rolle von Polyphenolen in der antikanzerogenen Wirkung von *Allium sativum* beizutragen, wurden die Phytoextrakte in dieser Arbeit mit der HPLC auf enthaltene Polyphenolverbindungen untersucht und verglichen. Aus diesem Grund wird in diesem Kapitel speziell auf die Verbindungen Kaffeesäure, Luteolin und Luteolin-7-glucoside eingegangen.

Tabelle 1: Gruppen der Polyphenole aufgelistet mit Nahrungsquellen, durchschnittlicher Zufuhr pro Tag und Gesundheitseffekten aus Zell- und Tierversuchen, Tabelle modifiziert nach DGE 2012, Sekundäre Pflanzenstoffe und ihre Wirkung auf die Gesundheit [42]

| Polyphenole | Nahrungsquellen | Zufuhr in mg/d | Mögliche Gesundheitseffekte aus Zell- und Tierversuchen |
|--|---|-----------------------|---|
| Flavanoide - Flavanole - Flavonole - Flavanone - Isoflavone - Anthocyanine | Äpfel, Birnen, Trauben, Kir- schen, Pflaumen, Beeren, Zwie- beln, Grünkohl, Auberginen, Soja, Wein, schwarzer und grüner Tee | 50 – 200 | <ul style="list-style-type: none"> • antioxidativ • antithrombotisch • blutdrucksenkend • antiinflammatorisch • immunmodulierend • antibiotisch • neurologische Wirkungen (positiver Einfluss auf kognitive Fähigkeiten) |
| Phenolsäuren - Hydroxybenzoesäuren - Hydroxymethylsäuren | Kaffee, Tee, Voll- kornprodukte, Weißwein, Nüsse | 200 - 300 | <ul style="list-style-type: none"> • antioxidativ • antiinflammatorisch • neuroprotektiv |
| Phytoöstrogene - Isoflavone - Lignane - Coumestane | Getreide, Leinsa- men, Hülsen- früchte insbeson- dere Sojabohnen | < 5 | <ul style="list-style-type: none"> • antioxidativ • immunmodulierend |

1.3.2 RESORPTION UND BIOVERFÜGBARKEIT DER POLYPHENOLE

Die pharmakologische Wirkung einzelner Polyphenole ist *in vitro* und *in vivo* teilweise gut belegt. Die Aktivität der Polyphenole im menschlichen Organismus ist jedoch stark von ihrer Bioverfügbarkeit und der Bildung aktiver Metabolite abhängig [42]. Natürlich vorkommende Polyphenole liegen in Pflanzen hauptsächlich als Glykoside, mitunter auch als Polymere oder Aglykone vor. Erhitzung und Partikelzerkleinerung, die Begrenzung auf physiologische Mengen, ein hoher Fettanteil der Nahrung, sowie ein hoher Gehalt weiterer Polyphenolverbindungen können die Bioverfügbarkeit von Polyphenolen erhöhen. Proteine und Antioxidantien wie Vitamin C und E verringern die Aufnahme hingegen [42]. Die Resorption der Polyphenole findet hauptsächlich im Dünndarm statt. Hydrolasen und Glukosidasen spalten die Zuckerreste der Glykoside ab und setzen lipophile Aglykone frei [58, 156]. Sie gelangen durch passive Diffusion in die Enterozyten. Vor der Passage in die Blutbahn bilden Sulfotransferasen, Glukoronyltransferasen und Catechol-O-Methyltransferasen weitere Metabolite, die zu einem Teil über die Pfortader in die Leber und zum anderen Teil zurück ins Dünndarmlumen gelangen. In der Leber katalysieren Phase-II-Enzyme die Bildung hydrophiler Metabolite, die zu ihren Zielgeweben transportiert werden oder wiederum in den enterohepatischen Kreislauf eintreten [58]. Ein Teil der Polyphenole und ihrer Metabolite wird im Dickdarm resorbiert. Dort stehen Polyphenole in komplexer wechselseitiger Beziehung mit dem Darmmikrobiom. Einerseits hängt die Bioverfügbarkeit, die Quantität und sogar die Aktivität gebildeter Metabolite von der Funktion und Zusammensetzung des individuellen Mikrobioms ab, andererseits können Polyphenole selbst das Bakterienspektrum des Darms beeinflussen [27, 50, 58, 178].

1.3.3 LUTEOLIN UND LUTEOLIN-7-GLUCOSIDE

Luteolin und Lutelon-7-Glukoside gehören zu den Flavanoiden, genauer zur Subklasse der Flavone. Flavone kommen in Pflanzen in der Regel als O-Glykoside vor, so auch Luteolin, das wie in Abbildung 4 dargestellt mit Glukose konjugiert oder seltener auch als Aglykon vorliegen kann. Die Abspaltung des Zuckerrests von Luteolinglykosiden erfolgt in der intestinalen Mukosa. Luteolin wird anschließend glukoronidiert und liegt im Plasma hauptsächlich als Luteolin-7-O-Glucoronide vor [190]. Obwohl Luteolin in vielen Gemüsesorten und Gewürzen zu finden ist, beträgt die tägliche Aufnahme im Durchschnitt unter einem Milligramm [130, 156].

Epidemiologische Studien konnte eine Assoziation zwischen einem hohen Konsum von Flavonoiden und einem verringerten Erkrankungsrisiko für einige häufige Tumorerkrankungen, darunter auch gynäkologischer Karzinome herstellen [78, 156]. In einer prospektive Analyse unter 66.940 Frauen fanden Gates et al. eine Risikoreduktion um 34 % an einem Ovarialkarzinom zu erkranken in der Gruppe mit der höchsten Aufnahme von Luteolin [63]. In Zell- und Tierversuchen konnten Luteolin antikanzinogene und antiinflammatorische Effekte nachgewiesen werden. Unter anderem entfaltet Luteolin eine schützende Funktion vor der Einwirkung karzinogener Stimuli, wie UV-Strahlung und Reaktiver Sauerstoffspezies auf gesunde Zellen. In vitro konnten des Weiteren auch direkte proapoptotische und antiproliferative Mechanismen auf Tumorzellen identifiziert werden [156]. Luteolin-7-glucoside ist ebenfalls mit antiinflammatorischen, antioxidativen und antikanzerogenen Effekten in vitro assoziiert [66, 168].

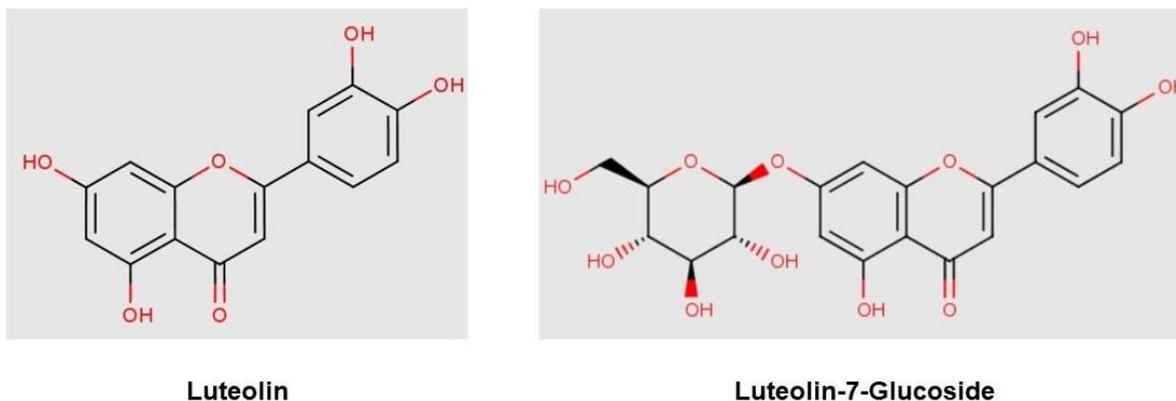
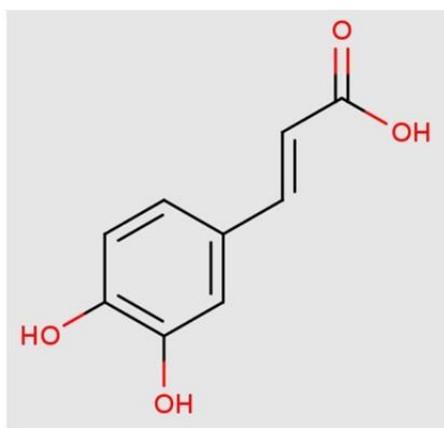


Abbildung 4: Strukturformeln der Flavanoide Luteolin (3',4',5,7-Tetrahydroxyflavon) und Luteolin-7-Glucoside mit farblich markierten (rot) funktionellen Gruppen. Luteolin besteht aus 2 Phenolringen, mit jeweils 2 Hydroxygruppen, es besitzt eine Carbonylgruppe an C4, sowie eine Doppelbindung zwischen den C-Atomen 2 und 3; Luteolin-7-Glucoside ist an C7 mit einem Glukosemolekül verbunden; Abbildungen der Datenbank Phenol-Explorer [130].

1.3.4 KAFFEESÄURE

Kaffeesäure (3,4-Dihydroxycimtsäure) gehört zu den Phenolsäuren, die sich strukturell durch den namensgebenden Phenolring, sowie eine endständige Carboxylgruppe auszeichnen. Wie in Abbildung 5 dargestellt besitzt Kaffeesäure darüber hinaus zwei am Phenolring gebundene Hydroxygruppen. In pflanzlicher Nahrung ist sie weit verbreitet und lässt sich in vielen Obst- und Gemüsesorten, aber auch in Gewürzen und Getränken wie Kaffee, Tee, Wein und Bier nachweisen [130, 140]. Phenolsäuren sind in den letzten Jahren aufgrund ihrer starken antioxidativen Aktivität, ihrer hohen Konzentration in vielen Nahrungsmitteln und ihrer guten intestinalen Resorption zunehmend in das Interesse der Forschung gerückt [140]. Zell- und Tierversuche zeigen neben dem Potential der Kaffeesäure als Antioxidans eine ganze Reihe pharmakologischer Eigenschaften, darunter antiinflammatorische, anxiolytische und neuroprotektive Effekte [98, 140].

Die IARC listet Kaffeesäure als Gruppe-2B-Karzinogen (möglicherweise krebserregend bei Menschen). In Tierversuchen mit Ratten war die Zufütterung einer geringen Dosis Kaffeesäure mit einer erhöhten Inzidenz von Papillomen im Magen und Magenkarzinomen verbunden [72]. Jüngere Untersuchungen zeigen hingegen inhibitorische Effekte von Kaffeesäure auf das Tumorzellwachstum, die Invasivität und die Migration diverser Tumorzelllinien [93, 185]. Bisher liegen keine Hinweise auf einen schädigenden Einfluss bei Menschen vor.



Kaffeesäure

Abbildung 5: Strukturformel der Kaffeesäure (3,4-Dihydroxycimtsäure) mit farblich markierten (rot) funktionellen Gruppen (2 am Phenolring gebundene Hydroxygruppen und einer Carboxylgruppe), Abbildung der Datenbank Phenol-Explorer [130].

II. ZIELSTELLUNG

Das EC ist in Industrienationen der häufigste Genitaltumor der Frau und ist weltweit jährlich für etwa 2,2 % der Krebstodesfälle verantwortlich [83]. Es zeigen sich starke regionale Unterschiede in der Inzidenz, die vor allem in Nordamerika und Teilen Europas erhöht ist. Die Gründe für die Unterschiede in der Inzidenz des EC bei Frauen weltweit, abseits der unterschiedlichen Prävalenzen von Übergewicht und HRT-Anwendung, bleiben weiterhin unklar. Es ist wahrscheinlich, dass genetische Prädispositionen, sowie Lifestyle Faktoren und Ernährungsgewohnheiten eine wichtige Rolle spielen [154]. Neben regelmäßiger Bewegung und der Modifikation des Hauptrisikofaktors Übergewicht konnten auch verschiedene Ernährungsgewohnheiten mit einem verringerten Risiko assoziiert werden. Dazu gehören eine Ballaststoffreiche Ernährung, der regelmäßige Konsum von Obst und Gemüse, sowie von Gemüse der Lauchfamilie im Speziellen [62, 133, 163, 174].

Allium sativum wird seit der Antike als Gewürz- und Heilpflanze genutzt und bleibt bis heute aufgrund seines breiten Spektrums gesundheitsfördernder Eigenschaften im Interesse der Forschung. Mehr als 1000 Publikationen allein im letzten Jahrzehnt widmen sich den diversen Gesundheitseffekten von Knoblauch, der zu den potentesten Lebensmitteln in der Krankheitsprävention zählt. Der Konsum von Knoblauch und Knoblauchpräparaten ist mit einer Risikoreduktion für diverse Tumorentitäten assoziiert und auch in Zell- und Tierversuchen konnte sein antiproliferativer und proapoptotischer Effekt vielfach nachgewiesen werden. Bisherige Untersuchungen stützen sich dabei vor allem auf die Wirkung der schwefelhaltigen Verbindungen im Knoblauch. Jüngere Forschung konzentriert sich jedoch zunehmend auf die Fraktion der Polyphenole. Knoblauch ist eine der Gemüsesorten mit dem höchsten Gehalt an Polyphenolen, die außerdem stabiler im Koch- und Lagerungsprozess sind als die volatilen Organoschwefelverbindungen [106]. Es wird vermutet, dass Polyphenole einen wichtigen Anteil an der tumorpräventiven Wirkung von Obst und Gemüse haben. Ihnen konnte eine Interaktion mit verschiedenen Enzymen und Signalwegen nachgewiesen werden, die in der Initiations- und Proliferationsphase der Karzinogenese eine entscheidende Rolle spielen. Dazu gehören unter anderem Interaktionen mit dem Östrogenrezeptor, die das Wachstum hormonabhängiger Tumoren beeinflussen können [27].

In dieser In-vitro-Pilotstudie soll der Einfluss zweier Phytoextrakte verschiedener Knoblauchsorten auf das Wachstum humaner Endometriumkarzinomzellen untersucht werden. Der Fokus liegt dabei insbesondere auf den enthaltenen Polyphenolverbindungen, die durch Analyse der Extrakte mit der HPLC definiert werden. Die Zellviabilität und Zellproliferation der Endometriumkarzinomzelllinien Ishikawa und RL95-2 soll sowohl unter den Bedingungen der Extrakte in abgestufter Verdünnung, als auch isoliert unter den synthetisch hergestellten Polyphenolen untersucht werden. Dazu werden der CellTiter-Glo® Viabilitätstest, der CytoTox-Glo™ und der Neutralrottest Zytotoxizitätstest zur Bestimmung der Zellviabilität, sowie der BrdU-Zellproliferationstest zur Quantifizierung des Zellwachstums unter den gegebenen Inkubationsbedingungen herangezogen. Als ergänzende Untersuchung des Energiestoffwechsels soll eine Messung der zellulären Glukose- und Laktatspiegel erfolgen. Als Kontrollsubstanzen in allen Versuchen werden Estradiol, sowie die SERMs Tamoxifen und Endoxifen eingesetzt.

III. MATERIAL UND METHODEN

3.1 EXTRAKTHERSTELLUNG

Die Herstellung der Phytoextrakte erfolgte aus zwei Sorten handelsüblichem Knoblauch. Verwendet wurde ein weißer Knoblauch der Sorte Morado aus zertifiziertem Ökolandbau in Spanien und ein violetter Knoblauch aus konventionellem Anbau ebenfalls aus Spanien. Es wurde für jede Knoblauchsorte mit dem Mikrowellenverfahren jeweils ein Extrakt mit Wasser und eines mit 70%igem Ethanol als Lösungsmittel hergestellt. Beide Verfahren wurden analog zueinander durchgeführt. Das Wasserextrakt erwies sich jedoch aufgrund seiner geleeartigen Konsistenz als ungeeignet für die Analyse mit der HPLC und konnte aus diesem Grund nicht weiter für die Wirkstofftestungen verwendet werden.

3.1.1 MIKROWELLENASSISTIERTES EXTRAKTIONSVERFAHREN

Es wurden jeweils fünf getrocknete Knoblauchzehen der beiden Knoblauchsarten geschält, geschnitten und durch eine Knoblauchpresse gepresst. Zur Vergrößerung der Kontaktfläche von Lösungsmittel und Pflanzenmatrix erfolgte die weitere manuelle Zerkleinerung mit einem Steinmörser. Aus der erhaltenen Knoblauchmasse konnten jeweils zweimal 2 g in einem Mikrowellengefäß abgewogen und mit jeweils 20 ml 70%igem Ethanol vermengt werden.

Bei der Mikrowellenassistierten Extraktion wird die Lösung durch elektromagnetische Wellen niedriger Energie in einem geschlossenen Gefäß schonend erhitzt. So gelingt der Übertritt von Inhaltsstoffen aus der Pflanzenmatrix in die Lösung ohne dabei Molekularstrukturen zu verändern oder zu schädigen [64]. Zum Einsatz kam die Discover CEM Mikrowelle, in der die Lösung für 20 min bei 60 °C unter konstanter Durchmischung durch eine integrierten Magnetührung erwärmt wurde. Der flüssige Überstand von insgesamt 37 ml, der eine deutliche gelbe Farbe angenommen hatte, wurde anschließend zentrifugiert, zunächst für 15 min bei 4030 U/min mit der Biofuge Ultrazentrifuge, anschließend für 5 min bei 13.000 U/min mit der Universal 320R Zentrifuge, wobei jeweils der flüssige Überstand abpipettiert und in den nächsten Arbeitsschritt überführt wurde. Um auch kleine Reste fester Knoblauchbestandteile zu entfernen, folgte die Filterung der Lösung durch den Minisart Plus Filter mit einer Porengröße von 0,45 µm. Die Verdichtung der Extrakte gelang mittels des Eppendorf Vacufuge Concentrator 5301. Die Verdunstung der Flüssigkeit wird bei diesem Modell über eine Kombination aus Zentrifugalkraft und der Anlage eines Vakuums bei 45 °C realisiert. Die Einengung des Extrakts erfolgte von 31 ml auf ein Zielvolumen von 2 ml Extrakt pro Knoblauchsorte. Das erhaltene Extrakt der Sorte weißer Bio Knoblauch Morado (PE1) war von satt gelber Farbe, während das Extrakt 2

des violetten Knoblauchs (PE2) eine gelb / grünliche Färbung aufwies. Beide Konzentrate verströmten einen intensiven Knoblauchgeruch. Die Lagerung der Extrakte erfolgte im Gefrierschrank bei - 80 °C.

3.1.2 HERSTELLUNG DER EXTRAKTVERDÜNNUNGEN

Die Verdünnungen der Phytoextrakte wurden vor einer Versuchsreihe in Mengen von jeweils 50 µl durch Hinzugabe der Knoblauchextrakte in ein Reaktionsgefäß mit der entsprechenden Menge 70%igen Ethanol hergestellt. Stoßweises Vortexen sollte die Mischung der Lösungen unterstützen. Nachdem die ursprüngliche Verdünnungsreihe (100 %, 50 %, 20 %, 10 %, 5 %, 3 %) in den ersten Versuchen große Wirksamkeitsunterschiede zwischen der 50%igen Verdünnung und der 20%igen Verdünnung erkennen ließ, wurden die Verdünnungen 45 %, 40 %, 35 % und 25 % hinzugenommen. Die Aufbewahrung der Verdünnungsreihe erfolgte zusammen mit den Extrakten und Referenzen im Tiefkühlschrank bei -80 °C. Vor der Verwendung wurden die Extraktverdünnungen im Warmwasserbad aufgetaut und stoßweise gevortext. Im Folgenden werden die Extrakte des weißen Bio Knoblauchs als Phytoextrakt 1 (PE1) und des violetten Knoblauchs als Phytoextrakt 2 (PE2) bezeichnet. Die Konzentration der Extraktverdünnungen wird mit einem Stern als Zahl hinter der Abkürzung des jeweiligen Extrakts angegeben. Die unverdünnten Extrakte werden demnach als PE1*100 und PE2*100 abgekürzt, die 50%ige Verdünnung dementsprechend als PE1*50 und PE2*50 usw.

3.2 HERSTELLUNG DER REFERENZEN UND KONTROLLEN

Die Herstellung der Referenzen und Kontrollen erfolgte durch Lösung der Rohstoffe in Pulverform. Als Lösungsmittel wurden 70%iger und 99%iger Ethanol sowie eine 1:1 Mischung aus 99%igem Ethanol und DMSO verwendet. Die jeweiligen Konzentrationen, sowie die Wahl des Lösungsmittels folgten laborinternen Standards und sind in Tabelle 2 aufgeführt. Sie beruhten sowohl auf Herstellerangaben als auch auf Erfahrungen mit dem Wirkungsgrad definierter Stoffkonzentrationen aus verwandten Arbeiten. Die Reinstoffe wurden in Pulverform abgewogen und im Lösungsmittel durch Vortexen aufgelöst. Zur Herstellung der Folsäurelösung, waren unterstützend ein dreimaliges Ultraschallbad von jeweils 15 min und mehrmaliges Vortexen notwendig.

Tabelle 2: Referenz- und Kontrolllösungen aufgeführt mit Konzentration und jeweiligem Lösungsmittel

| Wirkstoff | Konzentration in µg / ml | Lösungsmittel |
|---------------------|--------------------------|------------------------|
| Folsäure | 1 | Ethanol 99 % |
| Kaffeensäure | 0,9 | Ethanol 99 % |
| Luteolin | 1,43 | Ethanol 99 % |
| Luteolin-7-glycosid | 2,24 | 1:1 Ethanol 99 % /DMSO |
| Quercetin | 1, 51 | 1:1 Ethanol 99 % /DMSO |
| Kämpferol | 1,43 | 1:1 Ethanol 99 % /DMSO |
| Rutin | 3,05 | 1:1 Ethanol 99 % /DMSO |
| Estradiol | 0,0027 | Ethanol 99 % |
| Tamoxifen | 5,6 | Ethanol 99 % |
| Endoxifen | 6,2 | Ethanol 99 % |

3.3 ZELLINIEN

Die verwendeten Zellreihen entstammten der Human Tumor Cell Banc ATCC und wurden im Labor der Südstadtklinik bis zur Verwendung bei -196 °C kryokonserviert. Es handelt sich in beiden Fällen um humane östrogenrezeptorpositive Endometriumkarzinomzellen mit epithelartigem Wachstum. Die Versuche wurden jeweils mit unterschiedlichen Passagen der Zellen durchgeführt. Dabei wurden keine Zellen jenseits der 30. Passage verwendet, da bei späteren Passagen ein Verlust des positiven Rezeptorstatus und bei den Ishikawa-Zellen außerdem eine zunehmende Entdifferenzierung beobachtet wurde [102, 132].

3.3.1 RL95-2

Bei den RL95-2 Zellen handelt es sich um östrogenrezeptorpositive, mäßig differenzierte Tumorzellen eines adenosquamösen Endometriumkarzinoms Grad 2. Sie besitzen eine epithelartige oder runde Zellmorphologie mit großen, unregelmäßig geformten Nuklei. Östrogenrezeptoren sind sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern vorhanden [8, 37].

3.3.2 ISHIKAWA

Zellen der Linie Ishikawa sind gut differenzierte Tumorzellen eines endometrialen Adenokarzinoms. Insbesondere zur Untersuchung von Typ-I-Endometriumkarzinomen sind Ishikawa Zellen gut etabliert. Sie besitzen sowohl Östrogen- als auch Progesteronrezeptoren und zeigen ein gutes Ansprechen auf Steroidhormone [132, 191]. Die Zellen bilden häufig mosaikartige Strukturen mit der Tendenz sich aufzuschichten [131].

3.4 ZELLKULTIVIERUNG

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in CellStar Filter Top Kulturflaschen in den Größen 25 ml, 50 ml und 75 ml, in denen die Zellen einschichtig adhärent wuchsen. Die Filterdeckel der Flaschen ermöglichen einen sterilen Gasaustausch über eine hydrophobe PTFE-Membran und reduzieren somit das Kontaminationsrisiko. Um Kontaminationen bei der Arbeit mit den Zellen zu vermeiden, erfolgten alle Arbeitsschritte, die mit einer Öffnung der Kulturflaschen, Reaktionsgefäße oder Wellplatten einhergingen, stets unter sterilen Kautelen der HeraSafe Laborabzugshaube.

Als Nährmedium für die Ishikawa Zelllinie wurde DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) und für die RL95-2 Zellen DMEM:F12, eine 1:1 Mischung aus DMEM und Ham's F-12 verwendet. Beide Nährmedien enthielten zusätzlich 10 % Fetales Kälberserum, sowie präventiv antibakterielle und antimykotische Zusätze (2,5 ml Amphotericin B; 1 ml Penicillin-Streptomycin). Das verwendete DMEM zeichnet sich durch seinen hohen Gehalt an Glukose (4,5 g/l), Vitaminen und essentiellen (L-Glutamin 2 mM), sowie nicht-essentiellen Aminosäuren aus [152]. Das DMEM:F12 enthält zusätzlich Insulin (0,005 mg/ml) und den pH-Indikator Phenolrot. Die Lagerung der Zellen erfolgte im Brutschrank unter physiologischen Bedingungen bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂-Gehalt.

3.4.1 ANSETZEN DER ZELLKULTUREN

Die Zelllinien waren bis zur Verwendung bei -196 °C flüssigem Stickstoff in Kulturmedium mit 10 % FKS und DMSO (10 % Zelllinie Ishikawa; 5 % Zelllinie RL95-2) kryokonserviert. Zum schonenden Auftauen der Zellen wurden sie zunächst in ein Eisbad überführt. DMSO, das den Zellen durch Hemmung der Krystallbildung als Gefrierschutzmittel dient, besitzt konzentriert bei Raumtemperatur eine zelltoxische Wirkung. Durch rasche Hinzugabe von Nährmedium nach dem Auftauen konnte eine DMSO-Konzentration von <10 % erreicht werden, die als unbedenklich für die Zellintegrität anzusehen ist [38]. Die erhaltene Zellsuspension wurde bei

1200 U/min für 6 min zentrifugiert und das Zellpellet nach Abkippen des flüssigen Überstands in 6 ml frischem Nährmedium resuspendiert. Die Vereinzelung der Zellen wurde durch stoßweises Vortexen unterstützt. Anschließend konnte die Zellsuspension in eine 25 ml Zellkulturflasche überführt werden.

3.4.2 MEDIUMWECHSEL

Der Austausch des Nährmediums erfolgte alle zwei bis drei Tage. Das verbrauchte, meist sichtbar entfärbte Medium wurde vorsichtig mit einer Pipette abgezogen. Die anschließende Spülung der Zellen mit 5 ml PBS Pufferlösung diente der Entfernung abgestorbener Zellen und Stoffwechselprodukten. Nach dem Abziehen der Pufferlösung konnte die Zellkulturflasche mit neuem Nährmedium gefüllt werden.

3.4.3 PASSAGIEREN DER ZELLEN

Der Zeitpunkt der Subkultivierung der Tumorzellen wurde ohne festes Intervall durch mikroskopische Kontrolle des Wachstumsverhaltens der Zellen festgelegt. Als ideal erwies sich das Passagieren der Zellen vor Erreichen der Konfluenz, bei einer Bedeckung von ca. 80 % der Wachstumsfläche. Der erste Arbeitsschritt bestand im Dekantieren des verbrauchten Nährmediums, sowie der Entfernung abgestorbener Zellen und Zellschrott durch Spülung des Zellenrasens mit PBS-Pufferlösung. Zum Herauslösen der Zellen aus dem Monolayer kam eine EDTA-Trypsinlösung im Verhältnis 1:10 mit PBS verdünnt zum Einsatz. Nach dem gleichmäßigen Aufbringen der Lösung, den Zellrasen bedeckend, erfolgte die Inkubation im Brutschrank im Temperaturoptimum des Trypsins bei 37 °C. Die optimale Trypsinierungszeit wurde dabei durch lichtmikroskopische Kontrolle empirisch ermittelt und betrug 5 min bis 6 min für die Ishikawa-Zelllinie, 4 min bis 5 min für die Zellen der Linie RL95-2. Nach dieser Zeit erschien ein Großteil der Zellen in abgerundeter Form frei in Suspension gebracht. Bei einem Teil der Zellen konnte vorsichtiges Klopfen der Kulturflasche gegen die flache Hand das Ablösen zusätzlich unterstützen. Eine drohende Schädigung der Zellen durch zu lange Einwirkzeiten des Trypsins machte ein zügiges Abstoppen der Trypsinierung durch Hinzugabe von Nährmedium im nächsten Schritt erforderlich. Zur Isolierung der Zellen kam nach Überführung der Zellsuspension in ein keimarmes 45 ml Eppendorf Tube die Ultrazentrifuge bei 12000 U/min für 6 min zum Einsatz. Nach Austausch des Nährmediums gelangten die Zellen des erhaltenen Zellpellets unterstützt durch stoßweises Vortexen erneut in Suspension. Je nach Bedarf konnte jene erhaltene Zellsuspension erneut in eine Kulturflasche überführt und nach lichtmikroskopischer Begutachtung im Brutschrank inkubiert oder für Versuche verwendet werden.

3.5 ZELLZÄHLUNG

Zu Beginn eines jeden Versuches erfolgte die Zellzählung mit der Bürker-Zählkammer. Sie bildete die Grundlage der Herstellung von Zellsuspensionen mit definierten Zellzahlen für einheitliche Versuchsansätze. Wie beim Passagieren wurden die Zellen nach der Trypsinierung zentrifugiert und in einem Reaktionsgefäß in 5 ml Nährmedium resuspendiert. Zur Verdünnung folgte die Mischung von 20 µl der Zellsuspension mit 360 µl frischem Nährmedium. Die anschließende Hinzugabe von 20 µl einer 0,5%igen Trypanblaulösung diente der Unterscheidung von toten und vitalen Zellen bei der Zählung. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff negativer Ladung dessen Anion an intrazelluläre Proteine bindet. Aufgrund seiner Molekülgröße ($M = 960,8 \text{ g/mol}$) kann er die intakte Zellmembran vitaler Zellen nicht überwinden. Er färbt selektiv tote Zellen, bei denen der Verlust der Barrierefunktion der Zellmembran sein Eindringen ermöglicht [152]. Bei der lichtmikroskopischen Betrachtung erscheint das Zytoplasma toter Zellen nach Anfärbung blau und hebt sich deutlich vom hellen Zytoplasma lebender Zellen ab [91]. Da Trypanblau nach langer Einwirkzeit zytotoxisch wirkt, erfolgte die Auszählung zur Vermeidung einer Ergebnisverfälschung innerhalb von 5 min [152]. Die Auszählung folgte einem festen Schema, das in 2 Kammern jeweils 25 Kleinstquadranten berücksichtigte. Jeweils 10 µl der gefärbten Zellsuspension wurden auf den Objektträger der Bürker-Zählkammer aufgetragen, die sich passiv durch Kapillarkräfte in die Vertiefungen verteilten [152]. Die Zellzahl (N) ergab sich aus der Summe vitaler Zellen beider Kammern. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors der Zellsuspension und des Kammerfaktors der Bürker-Zählkammer (10^4) konnte die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension mithilfe folgender Formel berechnet werden:

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

3.6 IMMUNHISTOCHEMIE

Die Immunhistochemie dient dem Nachweis spezifischer Proteine in Zellen oder Gewebsabschnitten. In dieser Arbeit soll sie den von der Zellbank ausgewiesenen Immunrezeptorstatus der Zelllinien Ishikawa und RL95-2 überprüfen. Die Detektion der Zielstrukturen gelingt bei der immunhistochemischen Färbung mithilfe einer indirekten Antikörpermarkierung, die, gekoppelt an ein Enzymsystem, bei der Umsetzung farbloser Substrate einen sichtbaren Farbumschlag erzeugt (Abb. 7). Als Reporterenzym wird in der Regel Meerrettichperoxidase (HRP) verwendet. Gebunden an den Antigen-Antikörper-Komplex erzeugt sie durch Reduktion ihres Substrats eine lokale Farbreaktion [95].

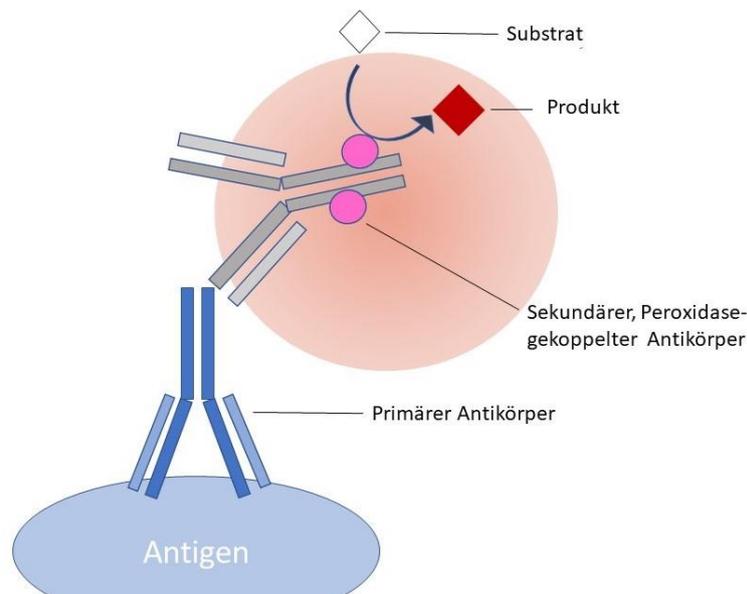


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Immunhistochemischen Antigenmarkierung. Indirekte Farbmarkierung des Antigens durch den sekundären peroxidasegekoppelten Antikörper, der bei Umsetzung des farblosen Substrats eine farbliche Reaktion hervorruft. Abbildung modifiziert nach MORPHISTO – Immunhistochemie [124].

Die immunhistochemische Untersuchung erfolgte unter Anwendung des ImmPRESS™ Universal Reagent Kit der Firma Vector Laboratories und des HRP-Substrate LinRed IHC der Firma LINARIS. Die Primärantikörper wurden als monoklonale Östrogenrezeptor alpha- und beta-, sowie Progesteronrezeptorantikörper erworben und nach laborinternen Standards hinsichtlich der Ressourceneffizienz verdünnt. Der Sekundärantikörper des ImmPRESS™ Rea-

genz ist mit Mikropolymeren der Meerrettichperoxidase konjugiert. Sie setzt das Substrat Diaminobenzidin in sein bräunliches, nicht lösliches Oxidationsprodukt um, das am Ort der Entstehung präzipitiert. Unter dem Lichtmikroskop erscheinen rezeptorpositive Zellen rötlich, während rezeptornegative Bereiche keine farbliche Reaktion aufweisen [95, 183]. Eine zusätzliche Negativkontrolle ohne Inkubation mit einem Primärantikörper sollte bei erfolgreicher Durchführung keine farbliche Reaktion aufweisen.

Zelleigene Peroxidasen, sowie unspezifische Antikörperbindung können die Ergebnisse der Immunhistochemie verfälschen. Aus diesem Grund erfolgte vor Hinzugabe der Antikörper eine Inkubation der fixierten Zellen mit Wasserstoffperoxidlösung zur Hemmung endogener Peroxidasen, sowie Pferdeserum zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungen [183].

Procedere:

1. Bestimmung der Lebendzellzahl und Aussaat von 300 µl/Well einer Zellsuspension von 200.000 Zellen/ml auf 4 Wells einer 24-Well Platte; 24-stündige Inkubation im Brutschrank bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂ -Gehalt
2. Entfernen des Kulturmediums und 3 x Spülen der Zellen mit 300 µl PBS pro Well
3. Fixieren der Zellen mit 300 µl/Well Formafix 4 % für 30 min; danach Entfernung der Fixative, 3 x Waschen mit 300 µl PBS
4. Inkubation der Zellen mit 300 µl 0,3 % H₂O₂ in Leitungswasser für 30 min; Entfernung der Lösung, 2 x Waschen mit PBS, Inkubation mit PBS für 5 min unter leichtem Schwenken, Entfernung des PBS
5. Hinzugabe von 4 Tropfen Pferdeserum pro Well; Inkubation für 20 min bei RT; Entfernen des Pferdeserums bis auf das Well der Negativkontrolle
6. Hinzugabe von 100 µl der Antikörperverdünnungen pro Well (α-ER-Antikörper 1:100 in PBS, monoklonaler Antikörper der Firma Biorbyt, GB; β-ER-Antikörper 1:40 in PBS, monoklonaler Antikörper der Firma GeneTex Inc., USA; PR-Antikörper 1:200 in PBS, monoklonaler Antikörper der Firma Biorbyt, GB); 24-stündige Inkubation im Kühlschrank bei 8 °C

7. Entfernen der Antikörperlösung; 3x Waschen der Zellen mit 300 µl PBS zum Entfernen ungebundener Antikörper
8. Hinzugabe der Sekundärantikörper, 4 Tropfen pro Well des ImmPRESS™ Universal Reagent Anti-Mouse/Rabbit IgG MP-7500; Inkubation für 30 min bei RT; Entfernen des Reagens und 3 x Waschen der Zellen mit 300 µl PBS
9. Hinzugabe von 200 µl/Well des Substrats LinRed IHC; Inkubation für 15 min abgedunkelt bei RT
10. Abstoppen der Reaktion mit Leitungswasser, Entfernen der Flüssigkeit und 1 x Waschen der Zellen mit 300 µl PBS
11. Bedecken des Wellbodens mit PBS zum Schutz der Zellen vor Austrocknung
12. Begutachtung der Zellen unter dem Lichtmikroskop

3.7 HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE (HPLC)

Die HPLC ist ein Trennverfahren, das zur quantitativen und qualitativen Analyse von flüssigen Proben breite Anwendung findet. In Lösung befindliche Stoffe können anhand physikalischer Eigenschaften zwischen einer festen und einer mobilen Phase aufgetrennt werden. In dieser Arbeit soll die HPLC dem qualitativen Nachweis von Polyphenolen in den hergestellten Knoblauchextrakten dienen. Die Trennung nach Polarität und Ladungseigenschaften kann selbst Stoffe strukturähnlicher Gruppen voneinander isolieren. So hat sich die HPLC bereits als gute Nachweismethode von Polyphenolen in pflanzlichen Extrakten bewährt [117, 155].

Der Aufbau einer HPLC-Anlage mit den wichtigsten Komponenten ist in Abbildung 8 schematisch dargestellt. Die HPLC wird von einer Hochdruckpumpe betrieben, die zunächst die Laufmittel aus ihren separaten Behältern über einen Entgaser in die Mischkammer leitet. Hier entsteht das gewünschte Laufmittelgemisch, auch Eluent oder mobile Phase. Über den Injektor wird dem Eluenten die Probe hinzugegeben. Sie fließt mit dem Laufmittelstrom zur HPLC Säule, welche die stationäre Phase darstellt. Die Trennsäule ist mit dicht gepackten, porösen Partikeln gefüllt, deren Endgruppen mit den Probesubstanzen interagieren. Substanzen, die

stärkere Wechselwirkungen mit der stationären Phase eingehen, werden aufgehalten und passieren die Säule somit langsamer als Substanzen mit hoher Affinität zur mobilen Phase [64]. Ein nachgeschalteter Detektor misst den Laufmittelstrom und überträgt die Daten an die auswertende Software. Sie erstellt ein Chromatogramm indem Substanzen mit verschiedenen Retentionszeiten als Signal-Peaks erscheinen und über Referenzmessungen identifiziert werden können.

Die verwendete HPLC Anlage war mit einer Reversed Phase (RP) 18C Kohlenstoffsäule (250 mm x 4 mm) mit Säulenthermostat ausgestattet, das die Temperatur innerhalb der Säule konstant auf 20 °C hält. Die stationäre Phase bilden bei diesem Säulentyp unpolare Kieselgel-Partikel mit langen Kohlenstoffketten (C18) an der Oberfläche. Die Laufmittel der mobilen Phase weisen dagegen einen polaren Charakter auf. Verwendet wurden DMSO mit 10 % Aquabidestilata und Aquabidestilata mit 10 % Methanol. Der Anteil der einzelnen Laufmittel wurde im Verlauf der Analyse im Sinne der Gradiententrennung verändert. Durch Änderung der Elutionsmittelkraft soll so eine präzisere Auftrennung und folglich eine verbesserte Peak-Auflösung gelingen [64]. Die Retentionszeit der Testsubstanzen wurde durch einen UV-Detektor gemessen, der die Absorption des Laufmittelstroms bei einer Wellenlänge von 254 nm bestimmte. Die Auswertung erfolgte durch die ChlarityChrome Software. Sie erstellt ein Chromatogramm, in dem sie die Retentionszeit in Minuten auf der X-Achse gegen die Absorptionsintensität in Absorbance Units (AU) auf der Y-Achse aufträgt.

Es wurden jeweils zwei Durchläufe mit 20 µl Probenaufgabe der beiden Knoblauchextrakte sowie der ausgewählten Referenzsubstanzen Folsäure, Quercetin, Kämpferol, Rutin, Kaffeesäure, Luteolin und Luteolin-7-glykosid durchgeführt. Die Identifikation von Inhaltsstoffen ermöglichte das Übereinanderlegen der Chromatogramme der Extrakte und der Referenzsubstanzen und den Vergleich der jeweiligen Retentionszeiten. Die Sichtung und Verifizierung der Ergebnisse erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Jeschke von der Ludwig-Maximilian-Universität München.

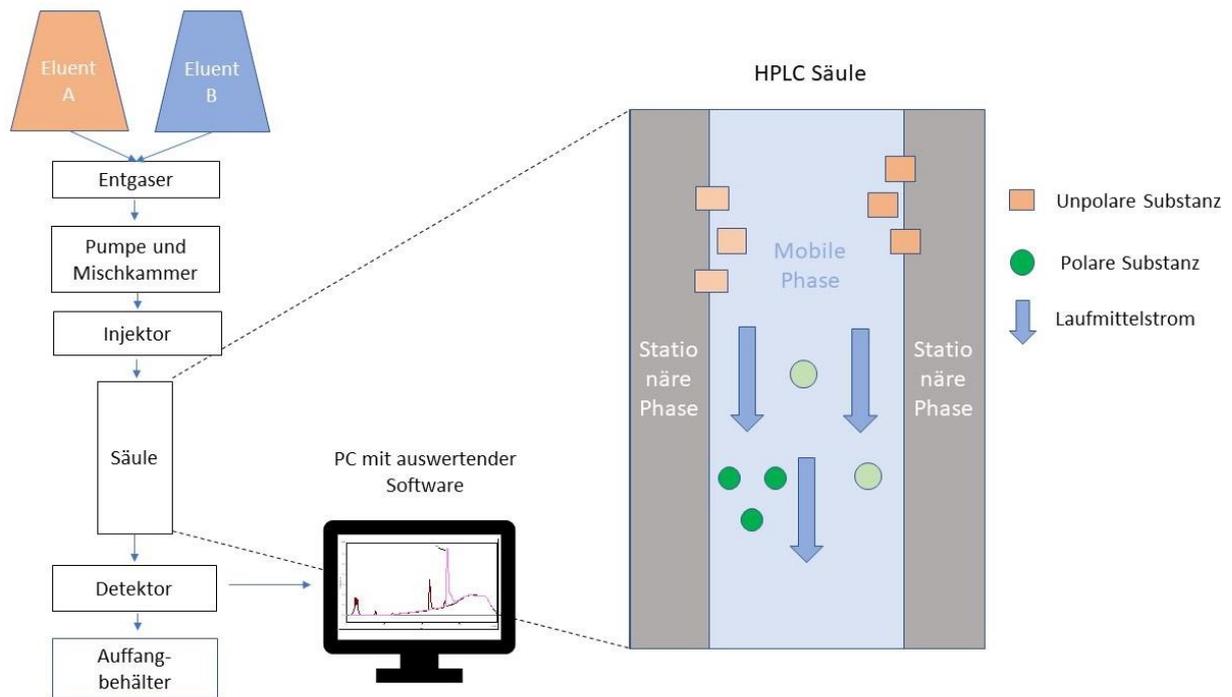


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Aufbaus einer HPLC Anlage links mit ihren wichtigsten Komponenten bestehend aus Pumpe , Mischkammer, Injektor, Säule und Detektor; Abbildung modifiziert nach Arnold, Die HPLC-Anlage [52]; Rechts vereinfachte schematische Darstellung der Funktionsweise einer RP-HPLC-Säule, während die polaren Substanzen die Säule mit dem Laufmittelstrom schneller durchlaufen, werden unpolare Substanzen durch Wechselwirkungen mit der stationären Phase aufgehalten und passieren somit später den Detektor, was sich in längeren Retentionszeiten im Chromatogramm widerspiegelt; Abbildung modifiziert nach M. Gey, Instrumentelle Analytik [64].

3.8 IN-VITRO-ZELLTESTS

Die In-vitro-Zellversuche dienten der Bestimmung der Zellviabilität, der Zellproliferation und des Energiestoffwechsels der Tumorzellen nach Inkubation mit den Phytoextrakten in abgestufter Konzentration, sowie mit den Referenzen und Kontrollen. Sie wurden jeweils an drei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt. Auf Grundlage der Zellzählung mit der Bürker-Zählkammer erfolgte am ersten Tag die Herstellung einer Zellsuspension definierter Konzentration zum Aussäen der Zellen mit der, für den jeweiligen Versuch vorgesehenen Zellzahl pro Well. Für die Zelltests kamen zellbindende CELLSTAR® Mikrotiterplatten mit 96 Well zur Anwendung. Eine gleichmäßige Verteilung der Zellen am Wellboden unterstützte der Einsatz des Plattenrüttlers für 2 min. Im Anschluss wurden die Zellen für 24 h im Brutschrank bei 37 °C wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert und am darauffolgenden Tag lichtmikroskopisch kontrolliert. Die Zellen sollten nach dieser Zeit adhärent wachsen und konfluierend den Boden der Wells bedecken. Es folgte die Zugabe der Extrakte, Extraktverdünnungen, Referenzen und Kontrollen mit einer Konzentration von 1 % pro Well und anschließend die erneute 24-stündige Inkubation im Brutschrank. Für jede Inkubationsbedingung waren beim CellTiter-Glo® Zellviabilitätstest, beim CytoTox-Glo™ Zytotoxizitätstest und bei der Glukose- und Laktatbestimmung jeweils drei Wells vorgesehen. Der BrdU-Proliferationstest und der Neutralrot Zytotoxizitätstest erfolgten als 4-fach-Bestimmung. Zusätzlich zu den Bedingungen waren bei jedem Test jeweils drei bzw. vier Wells für reines Kulturmedium, sowie Zellen mit reinem Kulturmedium ohne die Zugabe einer Bedingung vorgesehen, zu deren Wachstumsverhalten die anderen Wells in Relation gesetzt wurden. Am dritten Tag konnten nach erneuter lichtmikroskopischer Begutachtung der Zellmorphologie die Zelltests wie im Folgenden beschrieben durchgeführt werden.

3.8.1 VIABILITÄTSTEST CELLTITER-GLO®

Die Zellviabilitätsmessung des CellTiter-Glo® von Promega macht sich die Luciferin-Luciferase-Reaktion zunutze, die in Anwesenheit von ATP ein Lumineszenzsignal erzeugt. Das zelluläre ATP, als wichtigster Energieträger der Zellen, dient dabei als Marker intakter, metabolisch aktiver Zellen. Da Zellen bei Verlust ihrer Membranintegrität nicht mehr in der Lage sind ATP zu produzieren und das restliche ATP innerhalb kürzester Zeit von endogenen ATPasen im Zytoplasma abgebaut wird, steht es nicht mehr für die Reaktion zu Verfügung. Das

entstehende Lumineszenzsignal korreliert folglich mit der Anzahl viable Zellen einer Population [92, 176].

Das CellTiter-Glo® Reagenz induziert die Lyse der Zellen, die bei adhärentem Wachstum durch zusätzliches Rütteln der Platten unterstützt werden sollte [141]. Es unterbindet gleichzeitig den Abbau des in den Extrazellularraum übertretenden ATPs durch endogene ATPasen. So kann die Reaktion von Luciferin zu Oxyluciferin, katalysiert durch die rekombinante Luciferase unter Verbrauch des extrazellulären ATP und Sauerstoff ablaufen (Abb. 8). Das Lumineszenzsignal des entstandenen Oxyluciferin kann durch ein Luminometer bestimmt werden und steigt in seiner Intensität linear zur Zellzahl pro Well (bei 0 bis 50.000 Zellen/Well) [141]. Die CellTiter-Glo® Messung weist eine hohe Sensibilität auf und kann weniger als 10 viable Zellen pro Well detektieren [176].

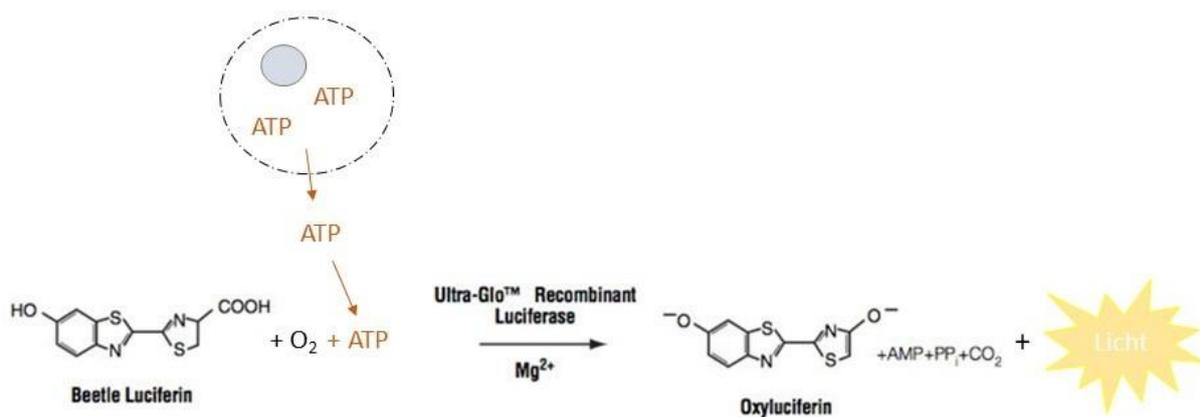


Abbildung 8: CellTiter-Glo® Luciferase Reaktion. Entstehung des Lumineszenzsignals durch die ATP-abhängige Reaktion von Luciferin zu Oxyluciferin; Abbildung modifiziert nach Promega CellTiter-Glo® Technical Bulletin [141].

Procedere:

1. Bestimmung der Lebendzellzahl und Aussaat von 50 µl / Well einer Zellsuspension von 600.000 Zellen / ml in 96-Well Platten; 24-stündige Inkubation im Brutschrank bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂ -Gehalt
2. Hinzugabe von 0,5 µl der Extrakte, Extraktverdünnungen und Referenzen (1:100 Verdünnung); 24-stündige Inkubation im Brutschrank (s.o.)

3. Vorbereitung des CellTiter-Glo® - Reagenz durch Auftauen im Wasserbad (Lagerung der Reagenzien bei -20 °C), Mischen des CellTiter-Glo® -Puffers mit dem Substrat und Mixen auf der Rolle nach Herstellerprotokoll
4. Hinzugabe von 50 µl CellTiter-Glo® - Reagenz pro Well, 2-3 Mischen mit dem Orbital Shaker; Inkubation für 30 min bei RT
5. Überführen des flüssigen Überstandes in Messwellplatten des GloMax Luminometer und Lumineszenzmessung; Messzeit 1 sek.

3.8.2 BRDU PROLIFERATIONSTEST

Die Zellproliferationsrate ist neben der Zellviabilität ein wichtiger Indikator für das Verständnis von Mechanismen, die am Überleben bzw. dem Sterben von Zellen unter bestimmten Umgebungsbedingungen beteiligt sind [1]. Das BrdU-Proliferationsassay ist ein etabliertes Testverfahren, mit dem sich DNA-Synthese während der Zellreplikation detektieren lässt. Zellen, die mit einem BrdU versetztem Medium inkubiert werden, bauen das Thymidinanalogon während der S-Phase des Zellzyklus in ihre DNA ein. Durch Antikörpermarkierung kann das eingebaute BrdU quantifiziert und so die Proliferationsrate der Zellen bestimmt werden.

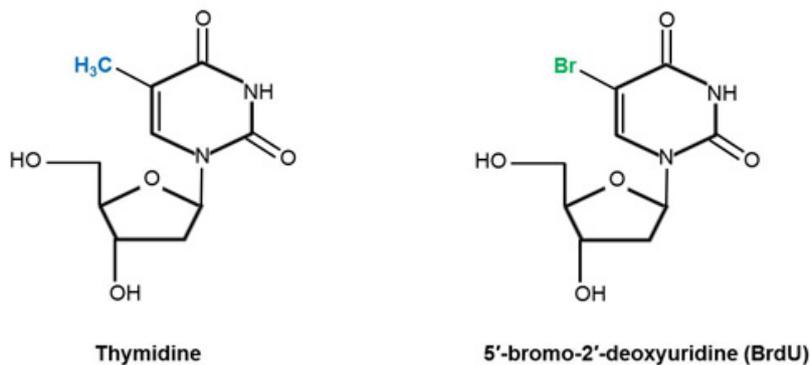


Abbildung 9: Strukturunterschiede von Thymidin und BrdU. Farblich markiert ist die Substitution der 5-Methylgruppe des Thymidin durch Brom beim 5'-Bromo-2'-Desoxyuridin, Abbildung von Bio-Rad -BrdU [21].

Wie in Abbildung 9 dargestellt handelt es sich bei 5'-Bromo-2'-Desoxyuridin um ein halogeniertes Thymidinanalogon. Die sterischen und elektrostatischen Eigenschaften des Brom ähneln denen der 5-Methylgruppe, weshalb enzymatisch nicht zwischen beiden Analoga unterschieden werden kann [113]. Einmal eingebaut, verbleibt das BrdU in der DNA und kann durch Antikörper spezifisch gebunden werden. Voraussetzung dafür ist zunächst die Freilegung des in der Doppelstranghelix maskierten BrdU durch Fixierung und Denaturierung der DNA [113].

Die Quantifizierung des eingebauten BrdU beruhte im durchgeführten Versuch auf dem ELISA-Verfahren und erfolgte unter Verwendung des BrdU Assay Kit von Sigma Aldrich. Bei diesem Verfahren binden nach der primären Antikörpermarkierung enzymgekoppelte Sekundärantikörper indirekt an das eingebaute BrdU (Abb. 10). Bei dem gebundenen Enzym handelt es sich um Meerrettichperoxidase (HRP), die nach Hinzugabe ihres Substrats, Tetramethylbenzidin (TMB), dieses in sein lösliches, blaues Reaktionsprodukt umsetzt und so einen blauen Farbumschlag produziert [134]. Das Hinzufügen von Schwefelsäure stoppt die Reaktion und es kommt erneut zu einem Farbumschlag nach gelb mit einem Absorptionsmaximum bei 450 nm [134]. Die kolorimetrische Messung mittels des Elisa Reader bestimmt anschließend die Absorptionsintensität, die sich proportional zum inkorporierten BrdU verhält.

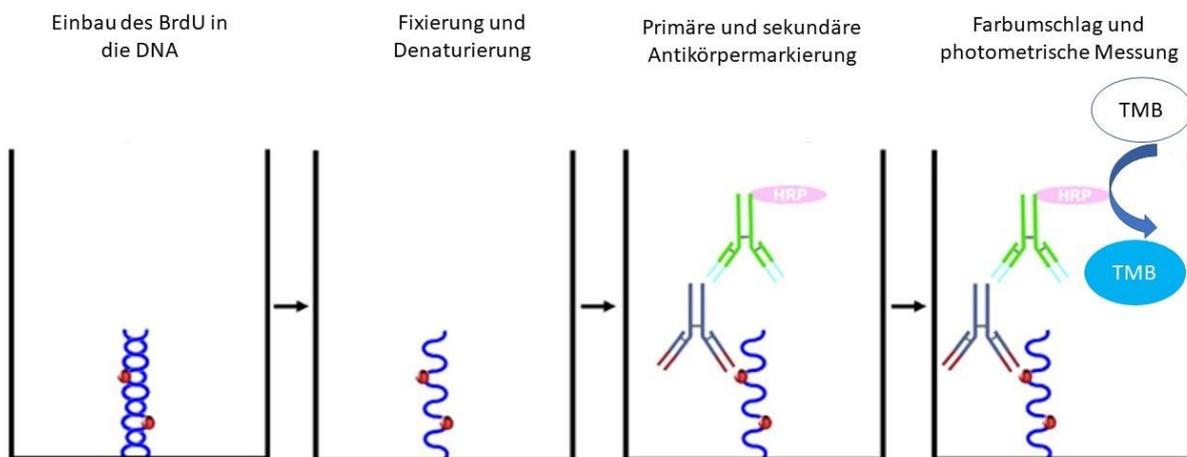


Abbildung 10: Prinzip des ELISA BrdU-Proliferationsassay. Dargestellt ist die zeitliche Abfolge der Inkorporation des BRDU, der anschließenden Fixierung der Zellen und Denaturierung der DNA, sowie die indirekten Antikörpermarkierung des eingebauten BRDU. Der Farbumschlag entsteht bei der enzymatischen Umsetzung des Substrats (TMB) der antikörpergekoppelten Merrettichperoxidase (HRP) in sein farbiges Produkt; Abbildung modifiziert nach Assay Principle for the CytoSelect™ BrdU Cell Proliferation ELISA Kit, Lubio Science The Reagent Platform [116].

Procedere:

1. Bestimmung der Lebendzellzahl und Aussaat von 100 μ l /Well einer Zellsuspension von 300.000 Zellen /ml in 96-Well Platten; 24-stündige Inkubation im Brutschrank bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂ -Gehalt
2. Hinzugabe von 1 μ l der Extrakte, Extraktverdünnungen und Referenzen (1:100 Verdünnung); 24-stündige Inkubation im Brutschrank (s.o.)
3. Hinzugabe von 10 μ l pro Well des BrdU Markierungsreagenz (1:100 Verdünnung der BrdU-Markierungslösung mit dem jeweiligen Kulturmedium), Aussparung der Background Kontrolle, Platten für 30 sek auf den Rüttler, anschließende Inkubation für 3 h im Brutschrank (s.o.)
4. Entfernen des Markierungsreagenz durch Kippen und vorsichtiges Klopfen
5. Fixierung der Zellen und Denaturierung durch Hinzugabe von 200 μ l pro Well der FixDenat-Lösung; Inkubation für 30 min bei RT
6. Entfernung der Fixierlösung durch Drehen und Abklopfen der Wellplatte
7. Auftragen der Anti-BrdU-Peroxidase-Arbeitslösung durch Hinzugabe von 100 μ l pro Well der Anti-BrdU-Peroxidase-Arbeitslösung (1:100 Verdünnung der Anti-BrdU-Peroxidase Stammlösung und der Antikörperverdünnungslösung); Inkubation für 1 h bei RT
8. Entfernen der Arbeitslösung durch Drehen des Wells und Abklopfen der Flüssigkeit; Waschen mit 3 x 200 μ l der Waschlösung (1:10 Verdünnung der Waschlösung mit destilliertem Wasser) und anschließend gründliche Entfernung der Lösung durch Klopfen
9. Hinzufügen von 100 μ l pro Well der Substratlösung; Inkubation bei RT bis eine blaue Farbentwicklung sichtbar ist (ca. 9 – 11 min)

10. Abstoppen der Reaktion mit 25 µl Schwefelsäure (1 Mol/l) pro Well

11. Messung mit dem Elisa Reader bei 450 nm, Reference 620 nm, Mixtime 10 s

3.8.3 CYTOtox-GLO™ ZYTOTOXIZITÄTSTEST

Der CytoTox-Glo™ Zytotoxizitätstest von Promega bestimmt den Anteil lebender und toter Zellen an einer Zellpopulation durch eine sequenzierte Lumineszenzmessung [142]. Er quantifiziert die Aktivität einer intrazellulären Protease, der Dead-cell Protease, die mit einem Aminoluciferin-konjugierten Substrat reagiert [87]. Dabei entsteht, wie in Abbildung 11 veranschaulicht über die Luciferin-Luciferase-Reaktion ein Lumineszenzsignal. Der CytoTox-Glo™ zeigt eine gute Korrelation mit anderen Zellviabilitätstests und kann zum besseren Verständnis dosisabhängiger Toxizität beitragen [32, 142].

Zur Unterscheidung lebender von toten Zellen wird das Charakteristikum der Membranintegrität herangezogen. Kommt es zum Verlust der Membranintegrität, gelangen intrazelluläre Proteine und Enzyme in den Extrazellularraum. Der CytoTox-Glo™ Test misst die extrazelluläre Aktivität einer intrazellulären Aminopeptidase, der Dead-cell Protease. Sie spaltet die kurze Aminosäuresequenz vom AAF-Glo Substrat (Alanyl-Alanyl-Phenylalanyl-Aminoluciferin), sodass Aminoluciferin frei wird [176]. Über die Luciferin-Luciferase-Reaktion mit einer rekombinanten thermostabilen Luciferase entsteht ein Lumineszenzsignal. Im ersten Schritt der zweizeitigen Lumineszenzmessung des CytoTox-Glo™ kann so die Aktivität der Dead cell Protease bestimmt werden. Sie zeigt eine lineare Korrelation mit der Anzahl toter Zellen in einer Population [32]. Im zweiten Schritt werden die Zellen mit einem Lysereagenz behandelt. Die erneute Messung bildet die Totale Lumineszenz der gesamten Zellpopulation ab. Durch Subtraktion der Lumineszenzwerte der ersten Messung von denen der gesamten Zellpopulation lässt sich schließlich der Anteil vitaler Zellen ermitteln [142].

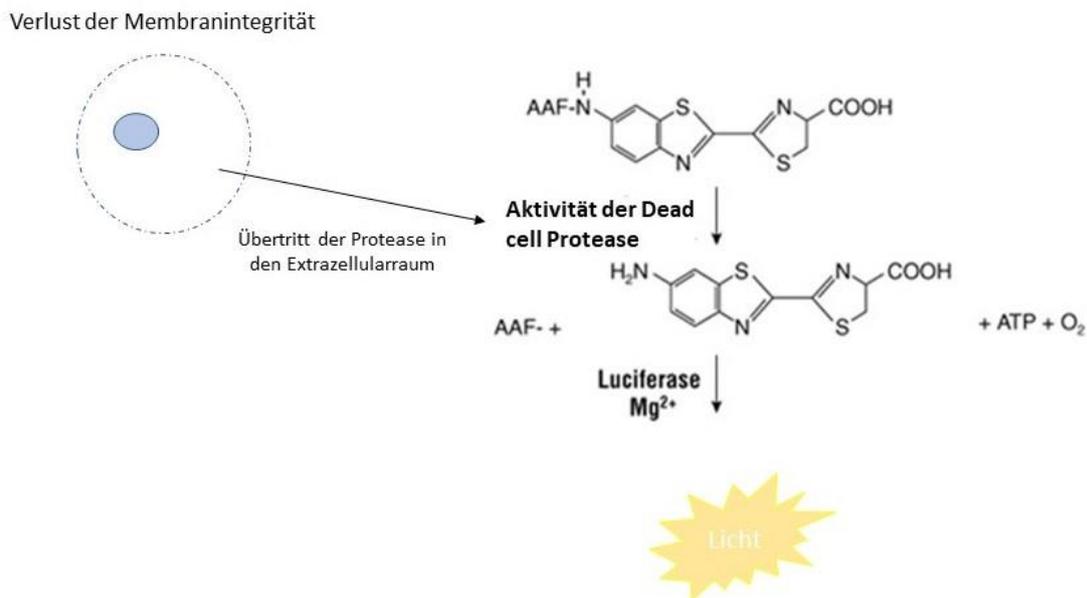


Abbildung 11: Prinzip der Protease-Reaktion des CytoTox-Glo™ Assays. Die Dead-cell Protease spaltet nach Übertritt in den Extrazellulärraum eine Aminosäuresequenz (AAF) vom Substrat, sodass Aminoluciferin frei wird. Über die anschließende Luciferin-Luciferase-Reaktion entsteht ein Lumineszenzsignal proportional zur Anzahl toter Zellen in der Kultur; Abbildung modifiziert nach Promega CytoTox-Glo™ Technical Bulletin [32].

Procedere:

1. Bestimmung der Lebendzellzahl und Aussaat von 100 µl/Well einer Zellsuspension von 300.000 Zellen / ml in 96-Well Platten; 24-stündige Inkubation im Brutschrank bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂ -Gehalt
2. Hinzugabe von 1 µl der Extrakte, Extraktverdünnungen und Referenzen (1:100 Verdünnung); 24-stündige Inkubation im Brutschrank (s.o.)
3. Hinzufügen von 50 µl des CytoTox-Glo™ Reagenz 1; 2-3 min Orbital Shaker; Inkubation 15 min bei RT
4. Überführen des flüssigen Überstandes der Wells in die entsprechenden Wells der Messwellplatten; Lumineszenzmessung mit dem GloMax
5. Rückführung der Flüssigkeit in die ursprünglich vorgesehenen Wells durch Pipettieren

6. Hinzugabe von 50 µl des Lyse-Reagenz (CytoTox-Glo™ Reagenz 2); 2-3 min Orbital Shaker; Inkubation bei RT für 15 min
7. Erneutes Überführen der Flüssigkeit in die entsprechenden Wells der Messwellplatten; Lumineszenzmessung mit dem GloMax Luminometer

3.8.4 NEUTRALROT ZYTOTOXIZITÄTSTEST

Der Neutralrot Zytotoxizitätstest dient ebenfalls der Bestimmung der Zellviabilität der unter definierten Bedingungen inkubierten Zellen. Er beruht auf einer Absorptionsmessung, die die Menge gespeicherten Neutralrot Farbstoffs quantifiziert. Da nur intakte Zellen in der Lage sind den Farbstoff aktiv zu speichern, korreliert die gespeicherte Menge linear mit der Anzahl vitaler Zellen pro Well [149].

Neutralrot (3-Amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine Hydrochlorid) ist ein gut wasserlöslicher, leicht kationischer Farbstoff, der bei physiologischem pH keine Ladung trägt. Er gelangt durch nichtionische Diffusion über die Zellmembran und akkumuliert in den Lysosomen [23, 129]. Diese weisen im Vergleich zum Zytoplasma (pH-Wert 7,2) einen deutlich niedrigen pH-Werts von < 5 auf. Unter diesen Bedingungen erhalten die Neutralrotmoleküle eine positive Ladung. Die Kationen sind von tief roter Farbe, sie können die lysosomale Membran nicht überwinden und binden an anionische Gruppen der Lysosomenmatrix [129, 149].

Die Voraussetzung für die Anreicherung von Neutralrot ist die Fähigkeit der Zelle ihren zytoplasmatischen pH-Wert und den lysosomalen Protonengradienten unter Verbrauch von ATP aufrechtzuerhalten [149, 188]. Geschädigte Zellen, die dazu nicht in der Lage sind, unterscheiden sich in ihrer Konzentration des Farbstoffs nicht vom umgebenden Medium [55]. Um die Menge des gespeicherten Neutralrot durch die Absorptionsmessung quantifizieren zu können, muss der Farbstoff wieder in die Lösung freigegeben werden. Dazu diente der Einsatz einer Solubilisierungslösung aus mit Säure angereichertem Ethanol.

Laborinternen Standards folgend, die aufgrund einer verstärkten Neigung zu Kristallbildung in Vorversuchen vom Herstellerprotokoll abwichen, wurden die Zellen mit 3 % Neutralrotreagenz im Medium mit einem pH-Wert von 7,2 für 45 min inkubiert. Sie wurden anschließend mit dem PBS Puffer gewaschen, unter dem die Zellen eine bessere Anhaftung zeigten als mit der vorgesehenen Assay Fixative. Die Absorptionsmessung erfolgte nach Protokoll bei einer Wellenlänge von 570 nm und einer Referenzlänge von 655 nm.

Procedere:

1. Bestimmung der Lebendzellzahl und Aussaat von 100 μl / Well einer Zellsuspension von 400.000 Zellen / ml in 96-Well Platten; 24-stündige Inkubation im Brutschrank bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO_2 -Gehalt
2. Hinzugabe von 1 μl der Extrakte, Extraktverdünnungen und Referenzen (1:100 Verdünnung); 24-stündige Inkubation im Brutschrank (s.o.)
3. Mediumwechsel auf 100 μl / Well DMEM hell ohne Zusätze, pH 7,2 (pH-Einstellung erfolgte durch Titration mittels 0,1 M HCL) + 3 % 0,33%igem Neutralrotreagenz; Inkubation für 45 min im Brutschrank
4. Entfernung des Kulturmediums und Spülen der Wells mit 200 μl PBS pro Well
5. Auffüllen der Wells mit 100 μl Neutralrot Solubilisierungslösung und 15-minütige Inkubation bei RT auf dem Plattenrüttle
6. Messung am ELISA Reader bei einer Wellenlänge 570 nm und einer Referenzlänge von 655 nm

3.8.5 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Alle aufgeführten In-vitro-Assays wurden jeweils als 3-fach (CellTiter-Glo® Zellviabilitätstest, CytoTox-Glo™ Zytotoxizitätstest) oder als 4-fach-Bestimmung (BrdU-Proliferationstest, Neutralrot Zytotoxizitätstest) durchgeführt. Es waren also für jede Bedingung 3 bzw. 4 Wells vorgesehen. Die Auswertung erfolgte durch die Bildung des Mittelwerts der experimentellen Werte (EW) der jeweiligen Bedingungen. Von diesem Wert wurde stets der Mittelwert der experimentellen Werte des reinen Kulturmediums abgezogen. Sie dienten der Ermittlung der basalen Lumineszenz (CellTiter-Glo®, CytoTox-Glo™), bzw. der Hintergrundabsorbanz (BrdU-Proliferationstest, Neutralrot Zytotoxizitätstest). Der Mittelwert der experimentellen Werte von Medium und unbehandelten Zellen wurde auf 100 % festgelegt. Die Extrakte, Extraktverdünnungen, Referenzen und Kontrollen wurden stets in Relation zu den Werten ihrer jeweiligen Lösungsmittel gesetzt. Wie in Tabelle 2 aufgeführt, waren die Extrakte in 70%igem Ethanol gelöst und wurden ebenfalls in 70%igem Ethanol verdünnt. Estradiol, Tamoxifen, Endoxifen, Folsäure, Kaffeesäure und Luteolin waren in 99%igem Ethanol und Luteolin-7-glucoside in DMSO mit 99 %igem Ethanol gelöst.

Beispielrechnung der Ergebnisse des CellTiter-Glo® - Viabilitätstests:

$$\text{Zellviabilität [\%]} = \frac{(EW - BL)}{(NK - BL)} \times 100$$

EW: Mittelwert der experimentellen Lumineszenz unter Bedingung X

BL: Mittelwert der Basalen Lumineszenz (Kulturmedium)

NK: Mittelwert der Lumineszenz von Zellen + Medium + Lösungsmittelkontrolle

Die statistische Auswertung der Tests erfolgte mit dem Programm Microsoft Office Excel 2019. Alle In-vitro-Zellversuche wurden vierfach ausgeführt, um möglichst valide Ergebnisse zu erzielen. Es wurden jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichung der Versuchswerte berechnet und in Graphen abgetragen. Die Signifikanz der experimentell ermittelten Werte wurde mit dem Student's T-Test berechnet (Signifikanzniveau $p < 0,05$) und mit einem Stern in den Graphen gekennzeichnet.

3.9 ENERGIESTOFFWECHSELMESSUNG

Als ergänzende Untersuchung der Zellviabilität der Endometriumkarzinomzellen wurde nach 24-stündiger Inkubation mit den Phytoextrakten eine einmalige 4-fach-Bestimmung des Glukose- und Laktatgehalts im Nährmedium durchgeführt. Da Tumorzellen unabhängig von der Sauerstoffverfügbarkeit ihren Energiebedarf hauptsächlich durch die sogenannte aerobe Glykolyse decken, bei der Glukose unter Gewinnung von ATP in Pyrovat und anschließend in Laktat umgewandelt wird, kann die Messung der beiden Stoffwechselfparameter Aufschluss über den Zellmetabolismus geben [5].

Die Aussaat, sowie das Beimpfen der Zellen mit den Extrakten und Kontrollbedingungen erfolgte analog zu den In-vitro-Zellversuchen. Es wurden jeweils 100 µl einer Zellsuspension mit 3de00.000 Zellen pro Milliliter auf 96-Well-Platten ausgesät und nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank jeweils 1 µl der Extrakte, Extraktverdünnungen und Referenzen hinzugegeben. Es folgte eine erneute 24-stündige Inkubation der Zellen unter den Testbedingungen. Am dritten Tag wurde das jeweilige Kulturmedium der 4 identischen Ansätze in 1,5 ml Eppendorfröhrchen zusammengeführt. Die anschließende Messung des Glukose- und Laktatkonzentration erfolgte in Glukose- und Laktat-Analysegeräten des ansässigen Labors aus einer Verdünnung von jeweils 20 µl des Überstands in 1 ml Systemlösung.

IV. ERGEBNISSE

4.1 HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE

Mit dem Einsatz der HPLC gelang die Auftrennung der Ethanolextrakte der beiden Knoblauchsorten nach Polarität und Ladungseigenschaften. Im Chromatogramm, das die UV-Absorption [AU] gegen die Zeit [min] aufträgt, spiegeln sich einzelne Inhaltsstoffe als Signalpeaks wider. Die Identifikation der Signalpeaks erfolgte über Referenzanalysen mit ausgewählten, synthetisch hergestellten Verbindungen. Durch das Übereinanderlegen der Graphen der analysierten Extrakte und der Reinstoffe und den Vergleich der Retentionszeiten konnte der qualitative Nachweis einzelner Verbindungen erbracht werden. Die Referenzanalysen wurden mit Quercetin, Rutin, Kaempferol, Folsäure, Kaffeesäure, Luteolin und Luteolin-7-glucoside durchgeführt.

Die Graphen der Phytoextrakte aus violetterem und weißem Bio Knoblauch wiesen in Bezug auf die Verteilung der Signalpeaks keine relevanten Unterschiede auf. Sie werden deshalb im Folgenden zur besseren Anschaulichkeit übereinandergelegt dargestellt (PE1 = schwarz, PE2 = blau). Beide Chromatogramme zeigten eine Häufung von Signalpeaks im polaren Laufbereich. Ein breiter Peak in beiden Extrakten bei 2,1 – 2,9 min konnte nicht identifiziert werden. Der Signalpeak bei 7,9 min (Abb. 12) wurde als Folsäure gewertet, der nächste Peak bei 8,9 min (Abb. 13) konnte als Kaffeesäure identifiziert werden. Über die durchgeführten Referenzanalysen gelang die Identifikation des Signalpeaks bei 22,1 min nicht. Der darauffolgende Peak zeigte eine gute Übereinstimmung mit der Retentionszeit von Luteolin-7-glucoside bei 26,2 min (Abb. 14). Ein sehr kleiner Signalpeak beider Extrakte bei 29,7 min stimmt mit der Retentionszeit von Luteolin überein (Abb. 15). Der Nachweis ist somit als fraglich zu werten.

ERGEBNISSE

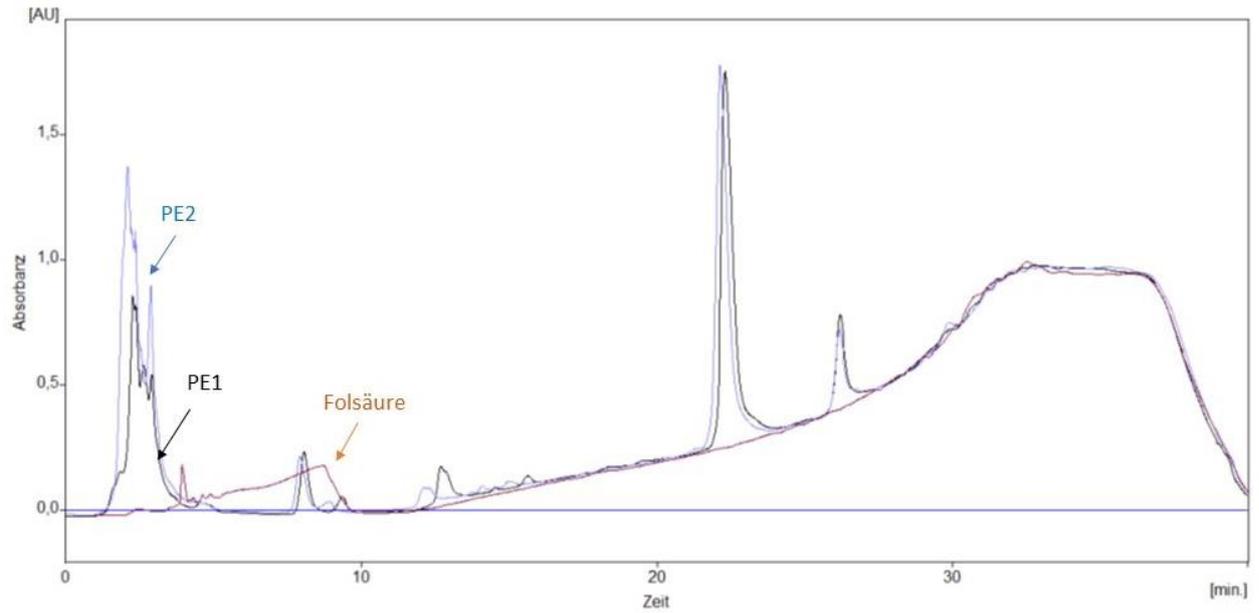


Abbildung 12: Chromatogramm der Knoblauchextrakte PE1 (schwarz), PE2 (blau) mit Referenz Folsäure (rot)
Zeit [min], Absorbanz [AU].

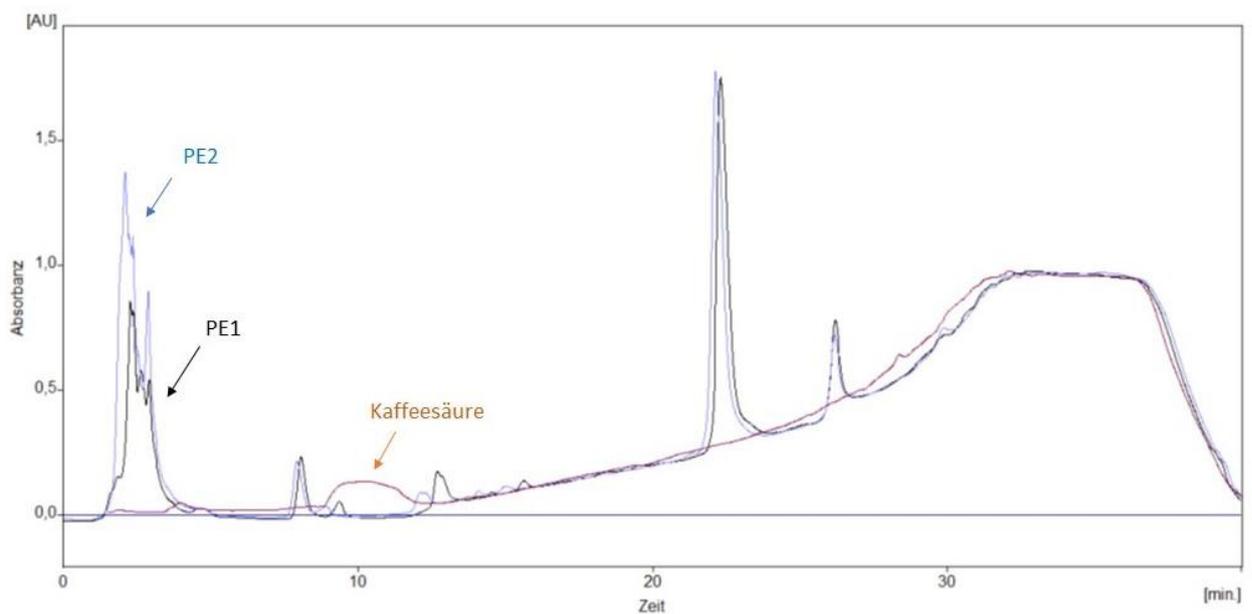


Abbildung 13: Chromatogramme der Knoblauchextrakte PE1 (schwarz), PE2 (blau) mit Referenz Kaffeesäure (rot)
Zeit [min], Absorbanz [AU].

ERGEBNISSE

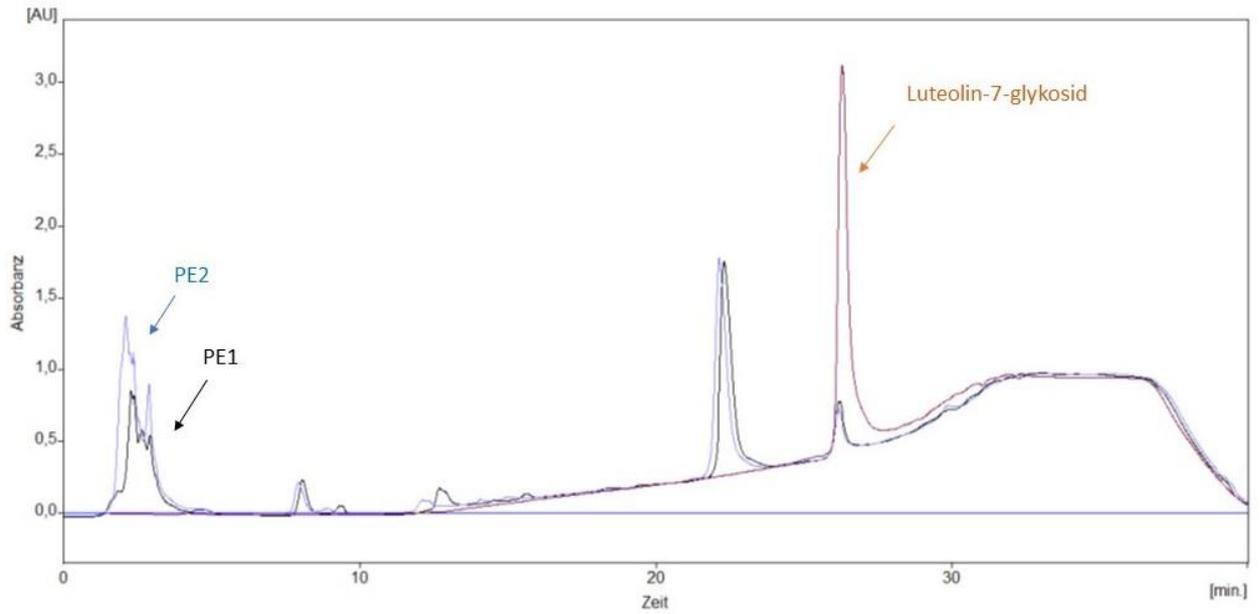


Abbildung 14: Chromatogramme der Knoblauchextrakte PE1 (schwarz), PE2 (blau) mit Referenz Luteolin-7-glykosid (rot) Zeit [min], Absorbanz [AU].

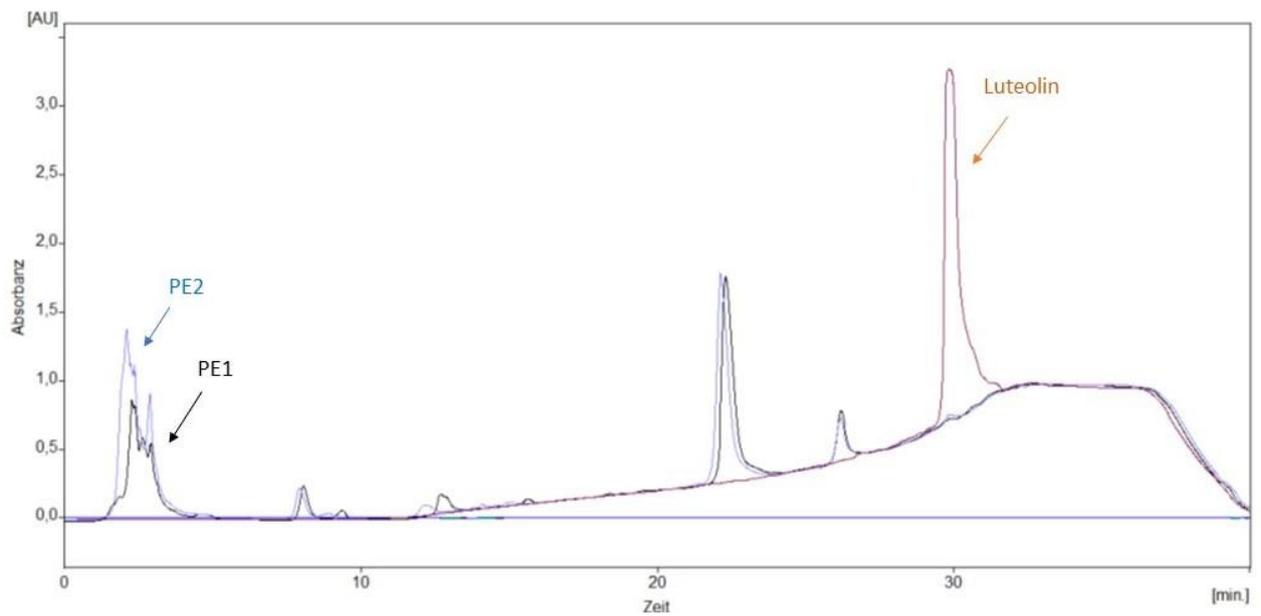


Abbildung 15: Chromatogramme der Knoblauchextrakte PE1 (schwarz), PE2 (blau) mit Referenz Luteolin (rot) Zeit [min], Absorbanz [AU].

4.2 IMMUNHISTOCHEMIE

Die Immunhistochemische Untersuchung diente in dieser Arbeit der Überprüfung des von der Zellbank angegebenen Rezeptorstatus der verwendeten Endometriumkarzinomzelllinien Ishikawa und RL95-2. Rezeptorpositive Zellen weisen bei dieser Methode als Ergebnis der Markierung durch enzymgekoppelte Antikörper eine rotbraune Reaktion des Zytoplasmas auf. Die Beurteilung erfolgte unter dem Lichtmikroskop. Die Angaben der Zellbank bezüglich des positiven Östrogenezeptorstatus konnte bei beiden Zellreihen bestätigt werden.

Ishikawa

Es zeigte sich eine deutlich erkennbare rötliche Reaktion des Zytoplasmas der rezeptorantikörpermarkierten Zellen der Linie Ishikawa (Abb. 16). Die Expression der Östrogenrezeptorsubtypen ER- α und ER- β , sowie des Progesteronrezeptors konnte somit nachgewiesen werden.

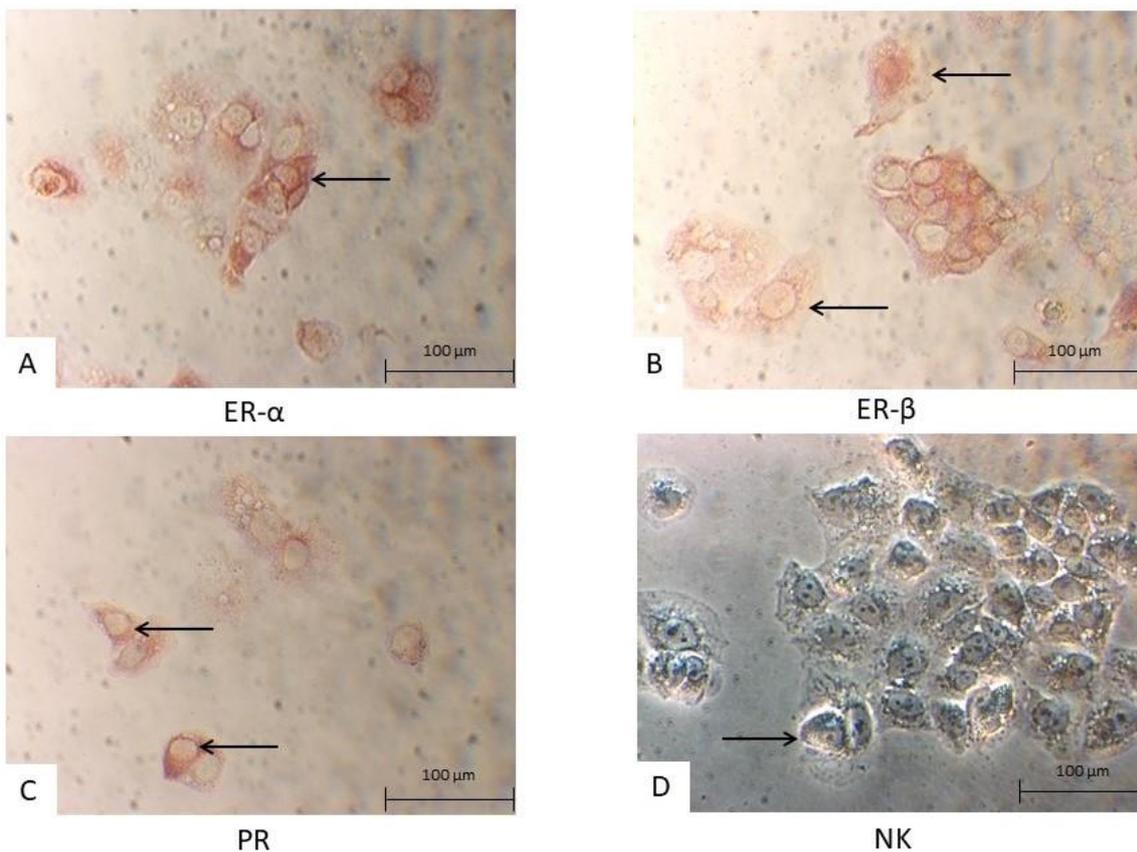


Abbildung 16: Immunhistochemische Untersuchung der Zelllinie Ishikawa. A) Östrogenrezeptor alpha positiv; B) Östrogenrezeptor beta positiv; C) Progesteronrezeptor positiv; D) Negativkontrolle: keine farbliche Reaktion.

RL95-2

Die Zellen der Linie RL95-2 wiesen eine farbliche Reaktion der antikörpermarkierten Zellen auf, die sich unter dem Lichtmikroskop, wie in Abbildung 17 dargestellt, als rötliche Färbung des Zytoplasmas erkennen ließ. Es konnten Östrogenrezeptoren der Subtypen ER- α und ER- β , sowie Progesteronrezeptoren nachgewiesen werden. Eine farbliche Reaktion blieb bei der Negativkontrolle erwartungsgemäß aus.

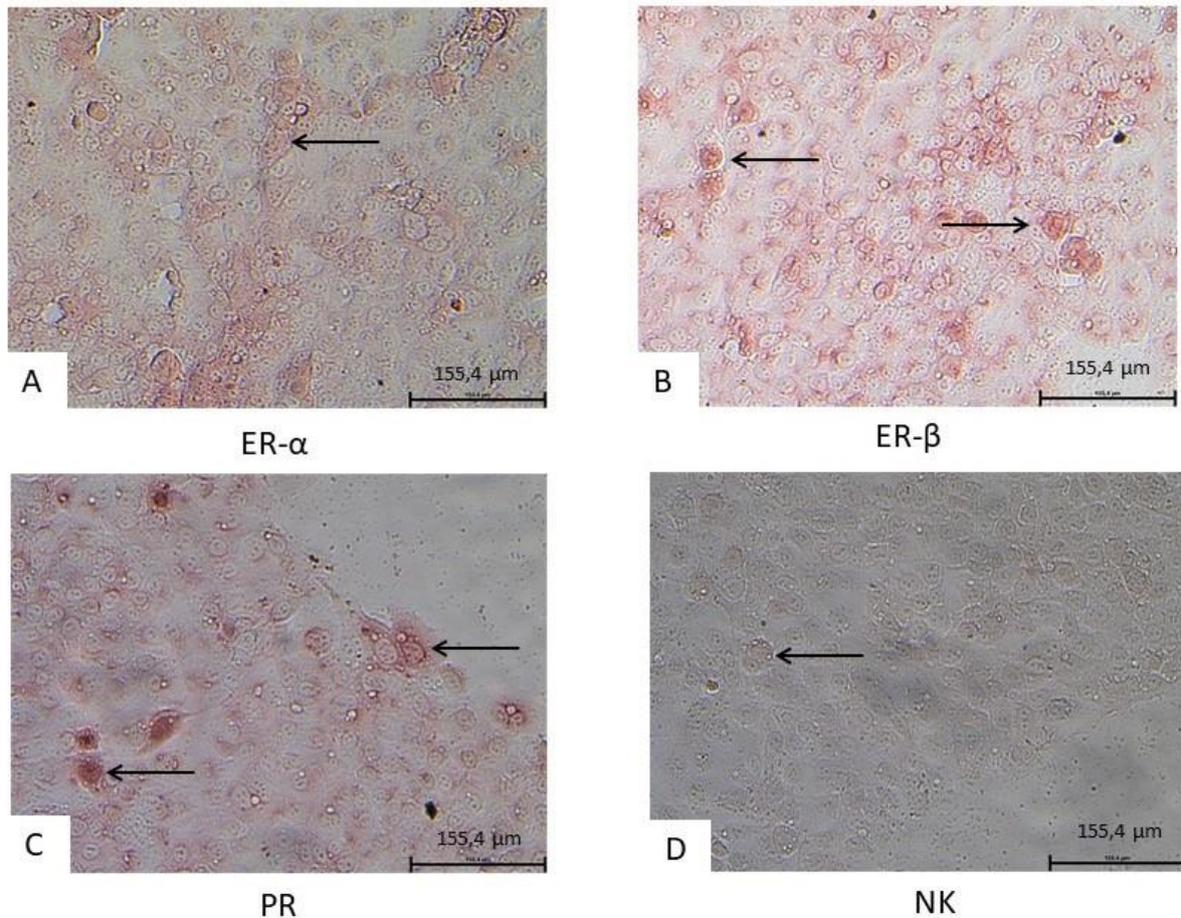


Abbildung 17: Immunhistochemische Untersuchung der Zelllinie RL95-2. A) Östrogenrezeptor alpha positiv; B) Östrogenrezeptor beta positiv; C) Progesteronrezeptor positiv; D) Negativkontrolle: keine farbliche Reaktion.

4.3 VIABILITÄTSTEST CELLTITER-GLO®

Der CellTiter-Glo® Viabilitätstest wurde als Lumineszenzmessung nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit den unverdünnten Phytoextrakten, sowie den Extraktverdünnungen (50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 25 %, 20 %, 10 %, 5 %, 3 %), Referenzen und Kontrollen durchgeführt. Das Lumineszenzsignal des CellTiter-Glo® entsteht in Abhängigkeit der Menge zellulären ATPs und steht damit in linearer Korrelation zur Anzahl lebender, metabolisch aktiver Zellen. Ihr Anteil ist auf der Ordinate als Zellviabilität in Prozent abgetragen. Auf der Abszisse sind die Untersuchungsmedien aufgeführt.

Die Viabilität der Tumorzellen der Zelllinien Ishikawa und RL95-2 war nach 24-stündiger Inkubation mit den Phytoextrakten aus weißem Bio Knoblauch und violetterm Knoblauch in den Konzentrationen 100 %, 50 %, 45 %, 40 % und 35 %, sowie 25 % bei den RL95-2 Zellen signifikant reduziert. Es stellte sich ein dosisabhängiger zytotoxischer Effekt der Phytoextrakte bis zu einer Extraktkonzentration von 35 % auf die Ishikawa-Zellen und 25% auf die RL95-2 Endometriumkarzinomzellen dar (Abb. 18 und 19).

Die Zellpopulation der Linie Ishikawa war nach Inkubation mit den Knoblauchextrakten der Konzentrationen 100 %, 50 % und 45 % um mehr als 85 % reduziert (PE1*100: 9,83 % SD \pm 3,13, $p < 0,001$; PE2*100: 8,18 % SD \pm 2,79, $p < 0,01$; PE1*50: 12,69 % SD \pm 4,93, $p < 0,001$; PE2*50: 10,98 % SD \pm 1,66, $p < 0,001$; PE1*45: 10,66 % SD \pm 1,90, $p < 0,01$; PE2*45: 11,83 % SD \pm 3,34, $p < 0,01$). Eine signifikant geminderte Zellzahl konnte auch unter den Konzentrationen 40 % und 35 % des PE1 (PE1*40: 21,05 % SD \pm 17,65, $p < 0,005$; PE1*35: 57,15 % SD \pm 12,74, $p < 0,01$) und 40 % des PE2 (PE2*40: 21,12 % SD \pm 7,43, $p < 0,01$) gemessen werden. Die Verdünnungen 25 % bis 3 % des PE1 und 35 % bis 3 % des PE2 entfalteten keine zytotoxische Wirkung auf die untersuchten Zellen (Abb. 18 und 19).

Die Inkubation der RL95-2 Zellen mit den unverdünnten und bis auf 35 % verdünnten Knoblauchextrakten führte zu einer signifikanten Reduktion der Zellpopulation auf < 2 % (PE1*100: 0,02 % SD \pm 0,26, $p < 0,001$; PE2*100: 0,04 % SD \pm 0,25, $p < 0,001$; PE1*50: 0,71 % SD \pm 0,85, $p < 0,005$; PE2*50: 0,09 % SD \pm 0,14, $p < 0,005$; PE1*45: 1,11 % SD \pm 1,42, $p < 0,001$; PE2*45: 0,79 % SD \pm 0,15, $p < 0,001$; PE1*40: 0,39 % SD \pm 0,18, $p < 0,01$; PE2*40: 0,28 % SD \pm 0,15, $p < 0,001$; PE1*35: 0,96 % SD \pm 0,72, $p < 0,01$ und PE2*35: 1,90 % SD \pm 1,56, $p < 0,01$). Die 25%igen Verdünnungen der Knoblauchextrakte hatten ebenfalls noch einen signifikant zytotoxischen Effekt auf die RL95-2 Zellen. Sie minderten die Zellzahl auf 37,64 % (PE1*25: SD \pm 13,50, $p < 0,01$) und 56,26 % (PE2*25: SD \pm 17,64, $p < 0,01$)

gegenüber der Negativkontrolle. Wie auch bei der Ishikawa Zelllinie hatten die höheren Extraktverdünnungen 20 % bis 3 % keinen hemmenden Einfluss auf die RL95-2 Zellen (Abb. 18 und 19).

Unter den untersuchten Polyphenolen zeigte einzig Kaffeesäure eine signifikant hemmende Wirkung auf die Zellen der Linie RL95-2 (77,62 % SD \pm 3,47 p < 0,05), nicht jedoch auf die Zelllinie Ishikawa (Abb. 20). Ähnlich regressive Werte waren auch bei der Ishikawa Linie messbar (73,26 % SD \pm 10,46), jedoch wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht (Abb. 20). Beide Zelllinien reagierten mit einer nicht signifikanten Reduktion der Zellpopulation auf die Inkubation mit Luteolin (Ishikawa: 73,84 % SD \pm 9,11; RL95-2: 79,90 % SD \pm 5,68), die Ishikawa Zellen auch auf Luteolin-7-glykosid (78,97 % SD \pm 17,27).

Die Inkubation der Tumorzellen mit Tamoxifen und Endoxifen führte zum Absterben der gesamten Zellpopulation beider Zellreihen (Abb. 20), mit einer signifikanten Reduktion der Zellzahl auf unter 1 % (p < 0,01). Estradiol und Folsäure zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die untersuchten Zellen (Abb. 20). Die Inkubation mit Estradiol bewirkte jedoch einen leichten Anstieg der Zellzahl der RL95-2 Zellen auf 115,16 % (SD \pm 6,89). Die reinen Ethanolkontrollen (Ethanol 70 %, Ethanol 99 %) besaßen keine zytotoxische Wirkung auf die untersuchten Zellreihen (Abb. 21). Die Kontrolle Ethanol 99 % mit DMSO hingegen zeigte eine leichte regressive Wirkung (Abb. 21), die stärker bei den RL95-2 Zellen ausgeprägt war (RL95-2: 78,60 % SD \pm 4,4).

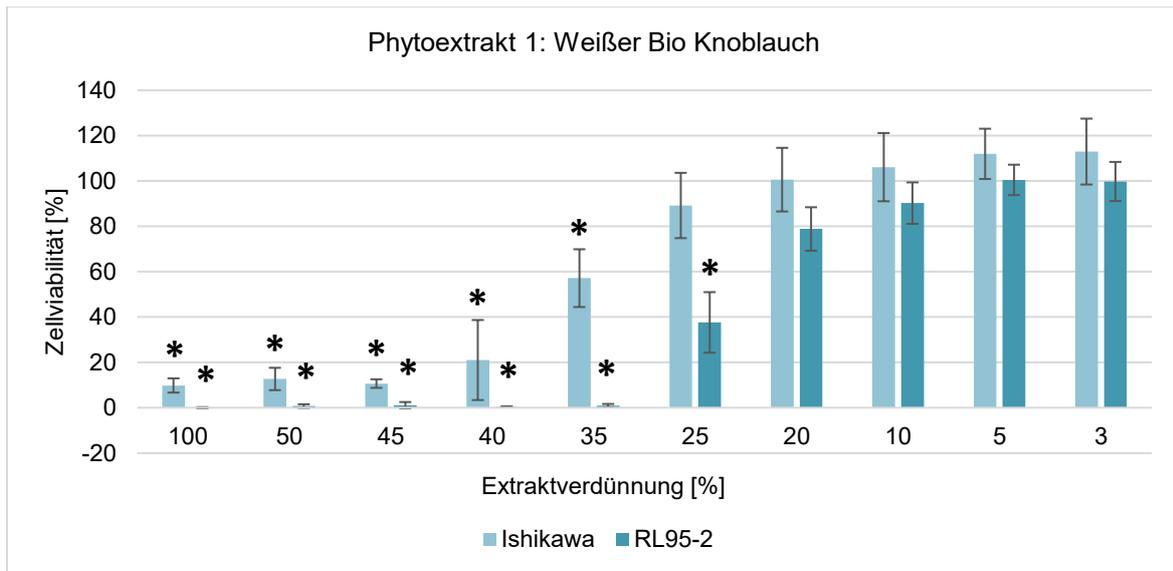


Abbildung 18: Viabilitätstest CellTiter-Glo® der Zelllinien Ishikawa und RL95-2 nach 24 h Inkubation mit dem PE1 (n = 4); Extraktkonzentration [%]; Zellviabilität [%] in Relation zur Negativkontrolle (Ethanol 70 %); Standardabweichung und Signifikanz sind aufgeführt (p < 0,05).

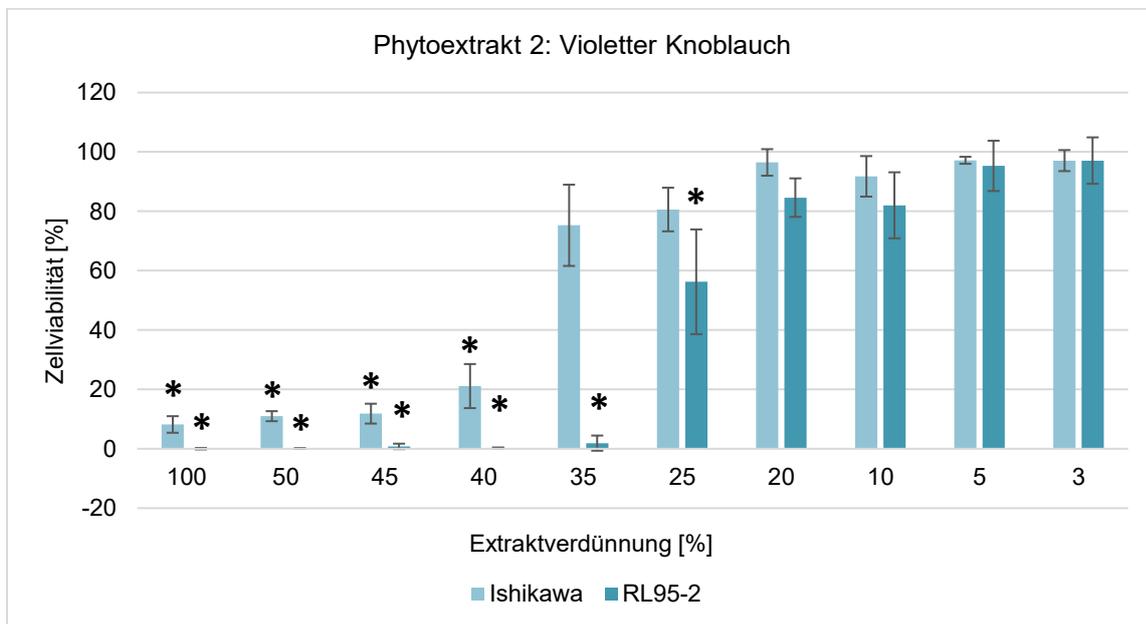


Abbildung 19: Viabilitätstest CellTiter-Glo® der Zelllinien Ishikawa und RL95-2 nach 24 h Inkubation mit PE2 (n = 4); Extraktkonzentration [%]; Zellviabilität [%] in Relation zur Negativkontrolle (Ethanol 70 %); Standardabweichung und Signifikanz sind aufgeführt (p < 0,05).

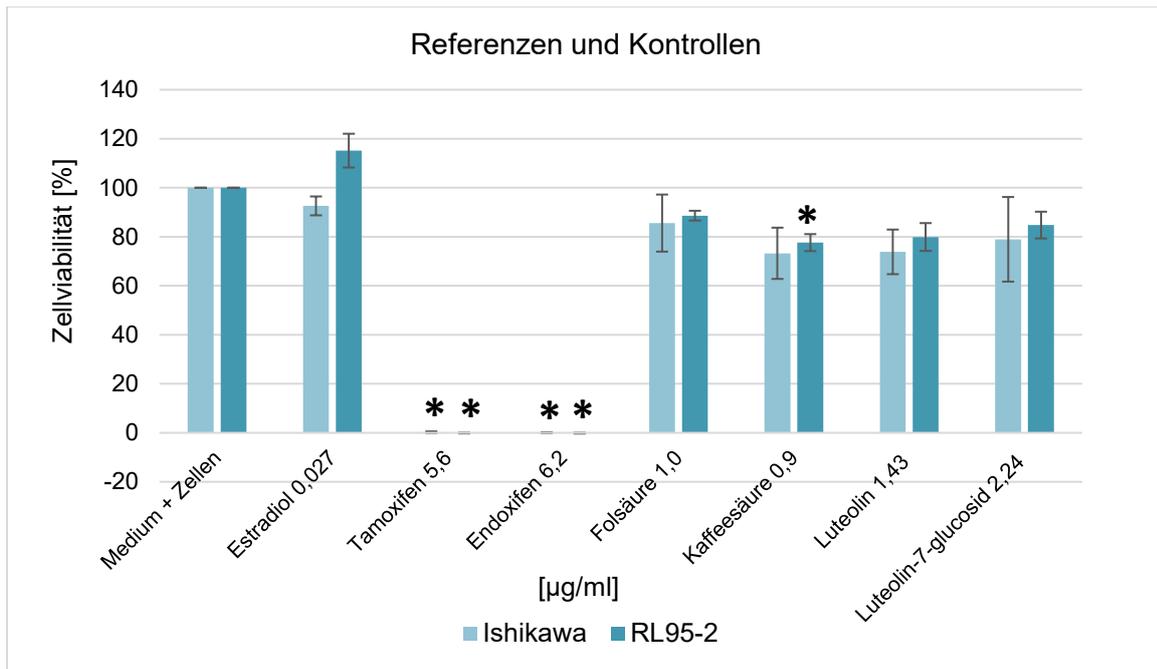


Abbildung 20: Viabilitätstest CellTiter-Glo® der Zelllinien Ishikawa und RL95-2 nach 24 h Inkubation mit aufgeführten Testsubstanzen (n = 4); Zellviabilität [%] in Relation zur Negativkontrolle, Standardabweichung und Signifikanz sind mit aufgeführt (p < 0,05).

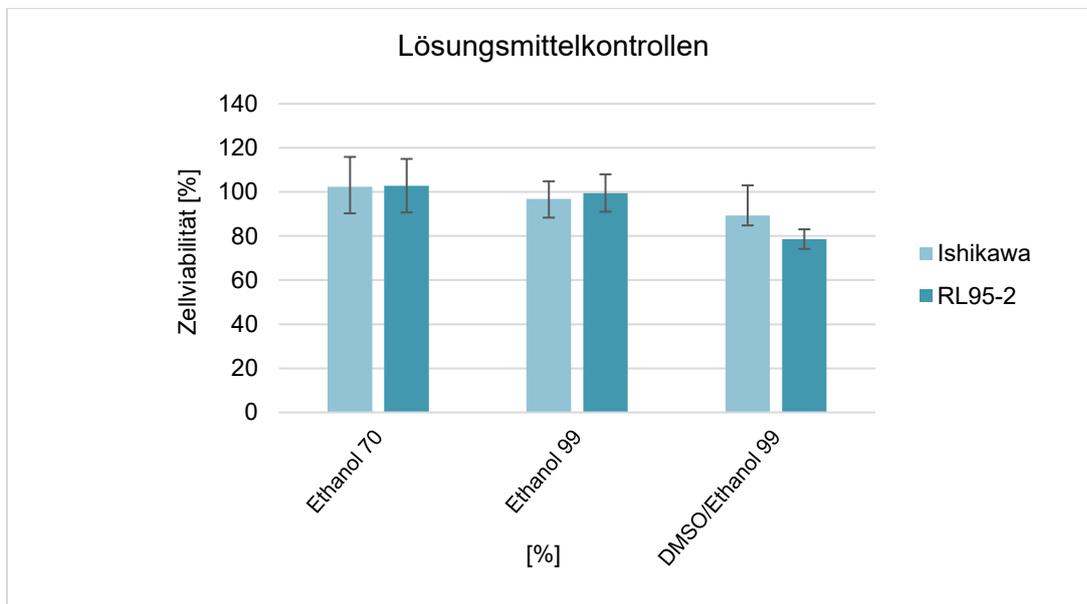


Abbildung 21: Viabilitätstest CellTiter-Glo® der Zelllinien Ishikawa und RL95-2 nach 24 h - Lösungsmittelkontrollen (n = 4); Zellviabilität [%] in Relation zu unbehandeltem Medium und Zellen; Ethanolkonzentration [%] Standardabweichung und Signifikanz sind mit aufgeführt (p < 0,05).

4.4 BRDU – PROLIFERATIONSTEST

Mithilfe des BrdU-Zellproliferationstests gelang die vergleichende Bestimmung der Zellteilungsrate unter den gegebenen Inkubationsbedingungen der Extrakte, Extraktverdünnungen, Referenzen und Kontrollen. Das angewandte Messverfahren bedient sich dafür einer photometrischen Messung, die die Menge eines während der Zellteilung in die DNA inkorporierten Thymidinanalogons quantifiziert. Die Proliferationsrate wurde in Relation zur Negativkontrolle bestimmt und ist auf der Ordinate in Prozent aufgeführt. Auf der Abszisse sind die untersuchten Medien abgetragen, die jeweiligen Extraktkonzentrationen sind dabei in Prozent angegeben.

Die zugeführten Knoblauchextrakte und ihre Verdünnungen bewirkten eine dosisabhängige Hemmung der Zellproliferation der Endometriumkarzinomzellen Ishikawa und RL95-2. Eine signifikant antiproliferative Wirkung auf die Zellen der Linie Ishikawa war bis zu einer 45%igen Verdünnung des PE1 und einer 40%igen Verdünnung des PE2 zu verzeichnen. Bei den RL95-2 Zellen war der hemmende Effekt auf die Zellreplikation bis zu einer Extraktkonzentration von 35 % des PE1 und 25 % des PE2 signifikant messbar (Abb. 22 und 23). Die Ishikawa Zellen reagierten außerdem sensibel auf die zugeführten Polyphenole Kaffeesäure, Luteolin und Luteolin-7-glucoside. Alle drei Stoffe bewirkten eine signifikante Proliferationshemmung, die bei den RL95-2 Zellen nur nach Inkubation mit Luteolin zu beobachten war (Abb. 24).

Die Ishikawa Zellen reagierten gleichermaßen sensibel auf die unverdünnten und die auf 50 % verdünnten Knoblauchextrakte. Die Proliferationsraten sanken auf 15,81 % (PE1*100: SD \pm 11,30, $p < 0,001$) und 14,18 % (PE1*50: SD \pm 11,41, $p < 0,001$) nach Inkubation mit dem Extrakt des weißen Knoblauchs und auf 7,74 % (PE2*100: SD \pm 3,10, $p < 0,001$) und 6,59 % (PE2*50: SD \pm 2,25, $p < 0,005$) nach Inkubation mit dem Extrakt des violetten Knoblauchs. Eine Reduktion des Zellwachstums um etwa die Hälfte bewirkten auch noch die 45%ige und die 40%ige Verdünnung des PE1 (PE1*45: 51,77 % SD \pm 9,93, $p < 0,01$; PE1*40: 54,61 % SD \pm 13,67, $p > 0,05$). Auf dieselben Extraktverdünnungen des PE2 reagierten die Ishikawa Zellen deutlich sensibler, mit signifikant gesenkten Proliferationsraten auf 11,10 % (PE2*45: SD \pm 5,98, $p < 0,01$) und 38,44 % (PE2*40: SD \pm 7,32, $p < 0,01$). Die Extraktverdünnungen 35 % bis 3 % hatten keinen signifikanten Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Ishikawa Zellen (Abb. 22 und 23).

Es zeigte sich ein signifikant antiproliferativer Effekt der Phytoextrakte auf die Zelllinie RL95-2 bis zu einer Extraktkonzentration von 35 % des PE1 und 25 % des PE2. Die Wachstumsraten waren unter diesen Konzentrationen jeweils auf 74,88 % (PE1*35: SD \pm 4,90, $p < 0,05$) und 77,59 % (PE2*25: SD \pm 3,68, $p < 0,05$) im Vergleich zu Negativkontrolle reduziert. Am stärksten ausgeprägt war der regressive Effekt der Extrakte in 100%iger und 50%iger Konzentration. Das unverdünnte Extrakt des weißen Bio Knoblauchs senkte die Proliferationsrate der Zellen auf 12,10 % (PE1*100: SD \pm 2,3, $p < 0,001$), das auf 50 % verdünnte Extrakt noch auf 45,25 % (PE1*50: SD \pm 14,53, $p < 0,05$). Die entsprechenden Wachstumsraten der mit unverdünnten und dem auf 50 % verdünnten Extrakt des violetten Knoblauchs inkubierten Zellen betragen 5,82 % (PE2*100: SD \pm 1,37, $p < 0,001$) und 34,74 % (PE2*50: SD \pm 10,68, $p < 0,01$). Die höheren Verdünnungen der Extrakte (20 %, 10 %, 5 %, 3 %) bewirkten keine messbare Proliferationshemmung der Tumorzellen (Abb. 22 und 23).

Die Inkubation mit Tamoxifen und Endoxifen bewirkte wie in Abbildung 24 dargestellt eine signifikante, beinahe vollständige Wachstumshemmung beider Zelllinien (Tamoxifen: Ishikawa: 2,88 % SD \pm 3,24, $p < 0,001$; RL95-2: 1,18 % SD \pm 0,82, $p < 0,001$; Endoxifen: Ishikawa: 4,03 % SD \pm 2,58, $p < 0,001$ und RL95-2: 6,63 % SD \pm 2,66, $p < 0,001$). Estradiol und Folsäure zeigten keinen Einfluss auf die Proliferationsrate der Zellen (Abb. 24). Kaffeesäure und Luteolin-7-glucoside hatte ebenfalls keinen signifikant messbaren proliferationsmindernden Effekt auf die Zelllinie RL95-2 (Abb. 24). Luteolin hingegen hemmte das Zellwachstum der Ishikawa und RL95-2 Zellen signifikant auf 46,74 % (Ishikawa SD \pm 8,52, $p < 0,001$) und 31,53 % (RL95-2: SD \pm 6,51, $p < 0,001$) (Abb. 24). Auch Kaffeesäure und Luteolin-7-glucoside reduzierten die Proliferation der Ishikawa Zellen signifikant um etwa die Hälfte (Kaffeesäure: 45,30 % SD \pm 14,52, $p < 0,001$; Luteolin-7-glucoside: 57,89 % SD \pm 7,66, $p < 0,001$) (Abb. 24). Die Ethanolkontrollen hatten keinen messbaren Einfluss auf die Zellreplikation der Tumorzellen (Abb. 25).

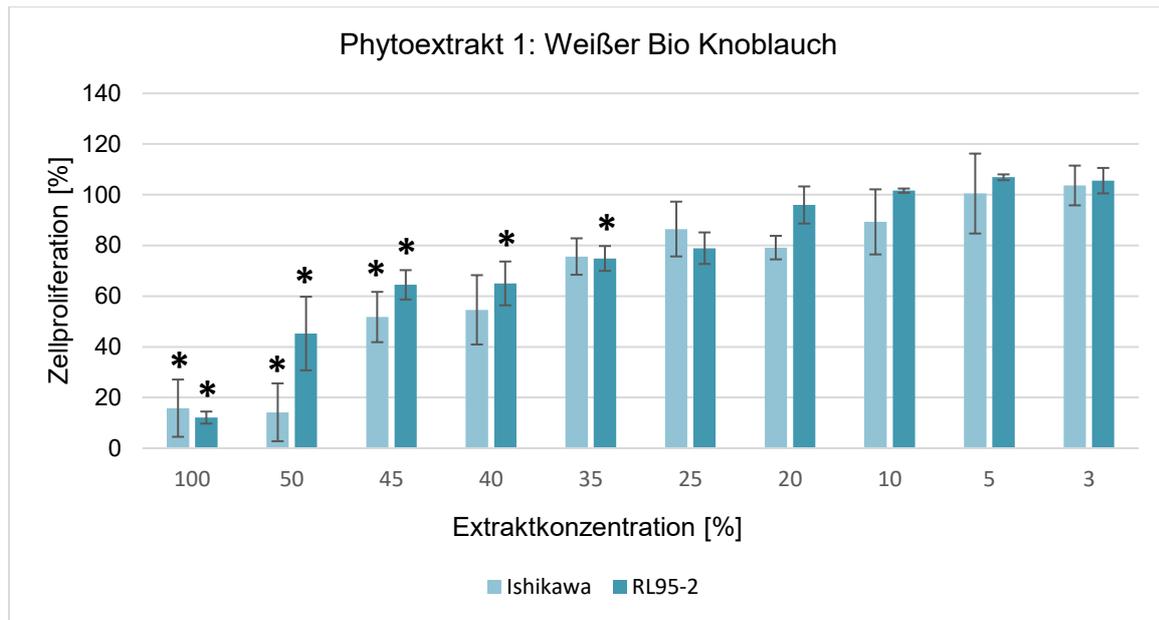


Abbildung 22: BrdU-Proliferationstest: der Zelllinien Ishikawa und RL95-2 nach 24 h Inkubation mit dem PE1 (n = 4); Extraktkonzentration [%], Zellproliferation [%] in Relation zur Negativkontrolle (Ethanol 70 %), Standardabweichung und Signifikanz sind mit aufgeführt (p < 0,05).

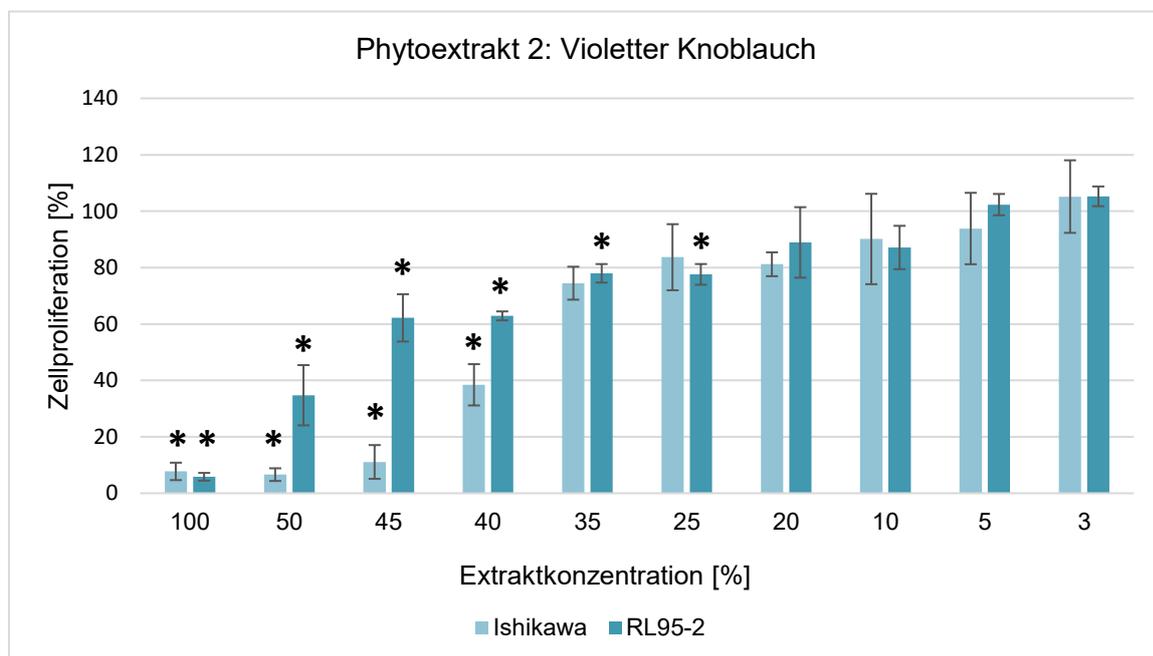


Abbildung 23: BrdU-Proliferationstest der Zelllinien Ishikawa und RL95-2 nach 24 h Inkubation mit dem PE2 (n=4); Extraktkonzentration [%], Zellproliferation [%] in Relation zur Negativkontrolle (Ethanol 70 %) Standardabweichung und Signifikanz sind mit aufgeführt (p < 0,05).

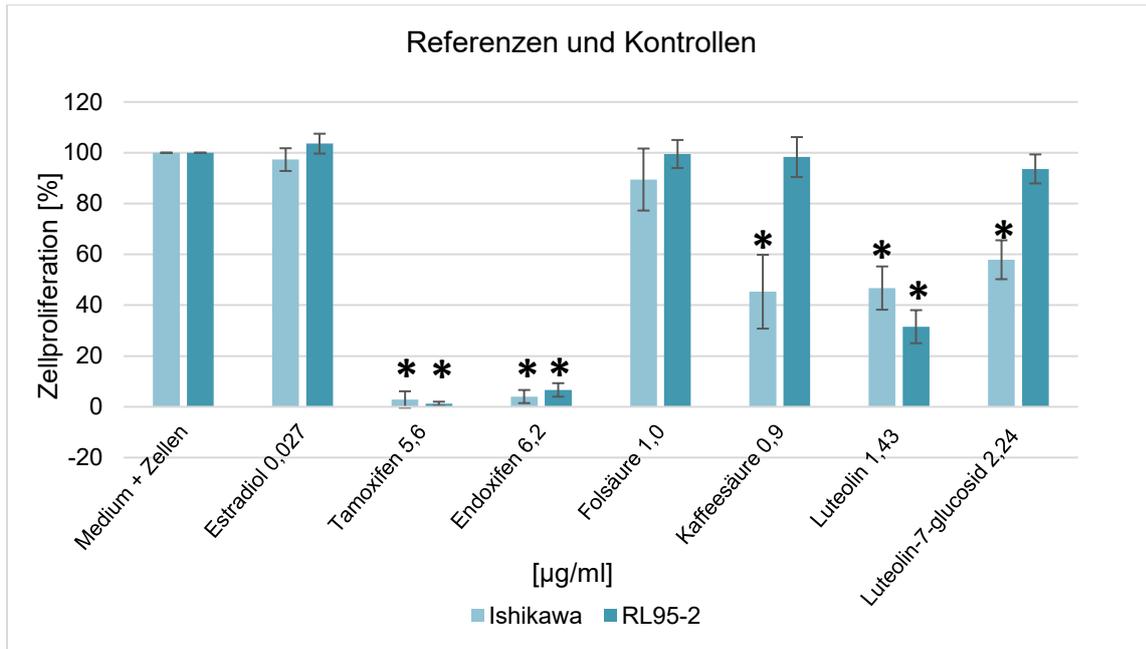


Abbildung 24: BrdU-Proliferationstest der Zelllinien Ishikawa und RL95-2 nach 24 h Inkubation – Referenzen und Kontrollen (n=4); Zellproliferation [%] in Relation zur Negativkontrolle, Standardabweichung und Signifikanz sind mit aufgeführt ($p < 0,05$).

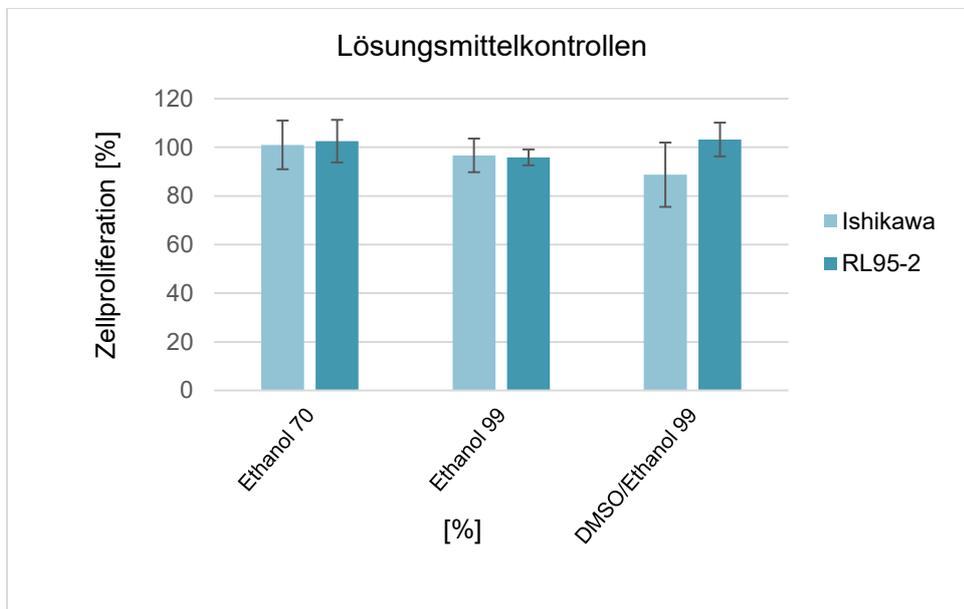


Abbildung 25: BrdU-Proliferationstest der Zelllinien Ishikawa und RL95-2 nach 24 h Inkubation – Lösungsmittelkontrollen (n = 4); Zellproliferation [%] in Relation zu unbehandeltem Medium und Zellen; Ethanolkonzentration [%] Standardabweichung und Signifikanz sind mit aufgeführt ($p < 0,05$).

4.5 ZYTOTOXIZITÄTSTEST CYTOTox-GLO™

Der CytoTox-Glo™ Zytotoxizitätstest bestimmt den Anteil lebender und toter Zellen an einer Zellpopulation, indem er die Aktivität der Dead-cell Protease, einer intrazellulären Aminopeptidase mithilfe einer sequenzierten Lumineszenzmessung quantifiziert. Auf der Ordinate ist die Zellviabilität in Relation zur Negativkontrolle in Prozent aufgetragen. Die Abszisse gibt die untersuchten Medien wieder, die Konzentration der Phytoextrakte ist dabei in Prozent angegeben.

Die Extrakte des weißen Bio Knoblauchs und des violetten Knoblauchs zeigten einen dosisabhängigen zytotoxischen Effekt auf die Endometriumkarzinomzellen Ishikawa und RL95-2. Sie führten bis zu einer Extraktkonzentration von 40 % bei den Ishikawa Zellen und 35 % bei den RL95-2 Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Zellpopulation (Abb. 26 und 27). Die Zellen reagierten ebenfalls sensibel auf die Inkubation mit Luteolin und Luteolin-7-glucoside. Beide Flavone hatten einen signifikant zytotoxischen Effekt auf die Ishikawa Zellen, Luteolin auch auf die Zellen der Linie RL95-2 (Abb. 28).

Wie in den vorangegangenen Zelltests führte die Inkubation der Ishikawa Zellen mit den unverdünnten, sowie den auf 50 % verdünnten Extrakten zum Absterben beinahe der gesamten Zellpopulation (PE1*100: 1,15 % SD ± 1,15, $p < 0,001$; PE2*100: 0,77 % SD ± 0,61, $p < 0,001$; PE1*50: 3,22 % SD ± 4,99, $p < 0,005$; PE2*50: 6,69 % SD ± 8,29, $p < 0,01$). Der zytotoxische Effekt der Phytoextrakte auf die Ishikawa Zellen war bis zu einer Verdünnung der Extrakte auf 40 % signifikant messbar. Die 40%ige Verdünnung des PE1 reduzierte die Zellzahl noch auf 44,86 % (SD ± 12,10, $p < 0,01$), dieselbe Verdünnung des PE2 auf 60,23 % (SD ± 16,93, $p > 0,05$). Die höher verdünnten Knoblauchextrakte 25 % bis 3 % wirkten nicht zytotoxisch auf die Ishikawa Zellreihe (Abb. 26 und 27).

Beide Knoblauchextrakte, insbesondere das des violetten Knoblauchs, zeigten einen stärker ausgeprägten zytotoxischen Effekt auf die RL95-2 Zellen im Vergleich zur Zelllinie Ishikawa. Die Extrakte führten bis zu einer Konzentration von 45 % des PE1 und 35 % des PE2 zu einem Rückgang der RL95-2 Zellpopulation auf weniger als 10 % gegenüber der Negativkontrolle (PE1*100: 0,19 % SD ± 0,35, $p < 0,05$; PE1*50: 0,56 % SD ± 0,59, $p < 0,05$; PE1*45: 7,85 % SD ± 12,19, $p < 0,05$ und PE2*100: 0,26 % SD ± 0,33, $p < 0,05$; PE2*50: 0,65 % SD ± 0,65, $p < 0,05$; PE2*45: 2,08 % SD ± 1,40, $p < 0,05$; PE2*40: 1,23 % SD ± 1,86, $p < 0,05$; PE2*35: 7,15 % SD ± 10,14, $p < 0,01$). Die 40%ige Verdünnung des PE1 reduzierte die Zellpopulation

noch signifikant um etwa 80 % (PE1*40: 21,10 % SD \pm 6,84, $p < 0,05$). Der konzentrationsabhängige zytotoxische Effekt ließ sich bis zu einer Verdünnung der Extrakte auf 20 % darstellen (PE1*35: 61,42 % SD \pm 14,62; PE1*25: 64,43 % SD \pm 5,51; PE2*25: 55,41 % SD \pm 5,31; PE1*20: 71,46% SD \pm 3,73; PE2*20: 73,40 % SD \pm 5,83). Unter den höheren Verdünnungen des PE1 10 %, 5 % und 3 %, sowie ebenfalls der 3%igen Verdünnung des PE2 war ein nicht signifikanter stimulierender Effekt auf die RL95-2 Zellpopulation zu beobachten (PE1*10: 119,15 % SD \pm 19,58; PE1*5: 124,37 % SD \pm 15,62; PE1*3: 126,04 % SD \pm 12,18; PE2*3: 116,87 % SD \pm 12,03) (Abb. 26 und 27).

Die Inkubation der Zellen mit Luteolin führte zu einer signifikanten Reduktion der Tumorzellpopulation um 95 % (Ishikawa: 4,61 % SD \pm 2,10, $p < 0,001$; RL95-2: 4,96 % SD \pm 5,00, $p < 0,05$) (Abb. 28). Luteolin-7-glukosid entfaltete ebenfalls eine zytotoxische Wirkung, die jedoch bei den RL95-2 Zellen das Signifikanzniveau knapp verfehlte (Ishikawa: 39,75 % SD \pm 11,94 $p < 0,01$; RL95-2: 42,61 % SD \pm 7,42) (Abb. 28). Folsäure und Kaffeesäure zeigten keinen Einfluss auf die untersuchten Zellenreihen (Abb 28). Die Inkubation mit Tamoxifen und Endoxifen führte zum Absterben der gesamten Population beider Zelllinien (Abb. 28). Unter Estradiol war ein nicht signifikanter Anstieg der RL95-2 Zellzahl auf 112,66 % (SD \pm 9,22) zu verzeichnen (Abb. 28). Während die Ethanolkontrollen Ethanol 70 % und Ethanol 99 % wie in den Vorversuchen keinen Einfluss auf die Zellen nahmen, reduzierte die Kontrolle Ethanol 99 % / DMSO die Zellzahl beider Zelllinien auf 73 % und erreichte damit bei den Ishikawa Zellen das Signifikanzniveau (Ishikawa: 73,05 % SD \pm 6,10, $p < 0,05$; RL95-2: 73,84 % SD \pm 9,81) (Abb. 29).

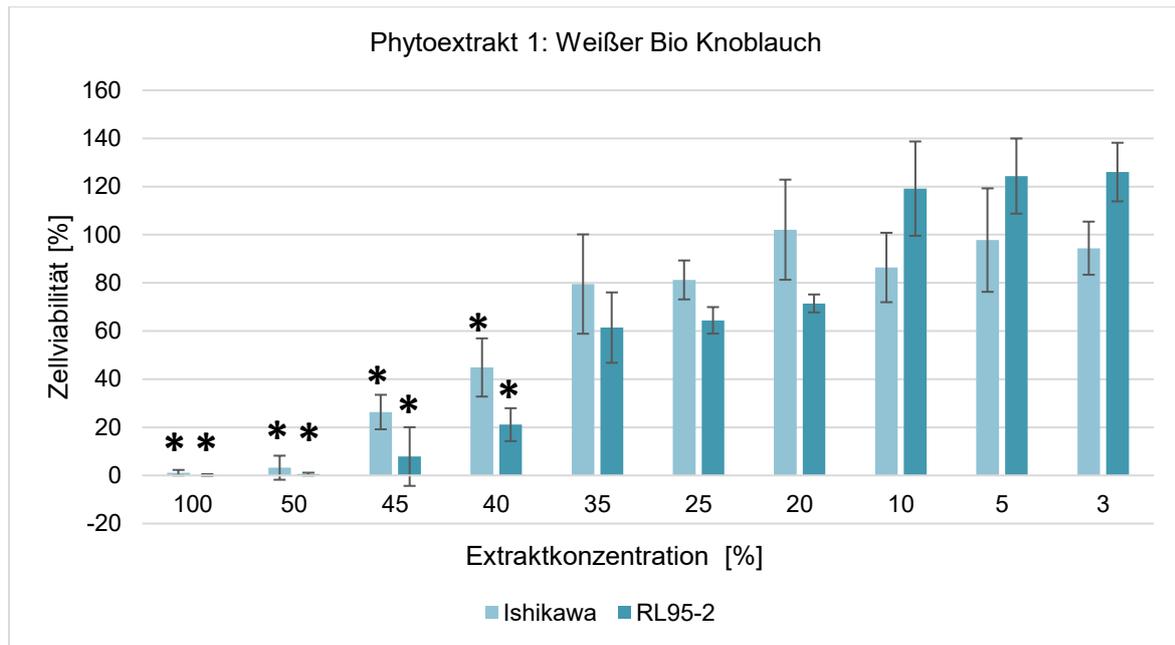


Abbildung 26: Zytotoxizitätstest CytoTox-Glo™ der Zelllinien Ishikawa und RL95-2 nach 24 h Inkubation mit dem PE1. (n=4) Extraktkonzentration [%], Zellviabilität [%] in Relation zur Negativkontrolle (Ethanol 70 %) Standardabweichung und Signifikanz sind mit aufgeführt (p < 0,05).

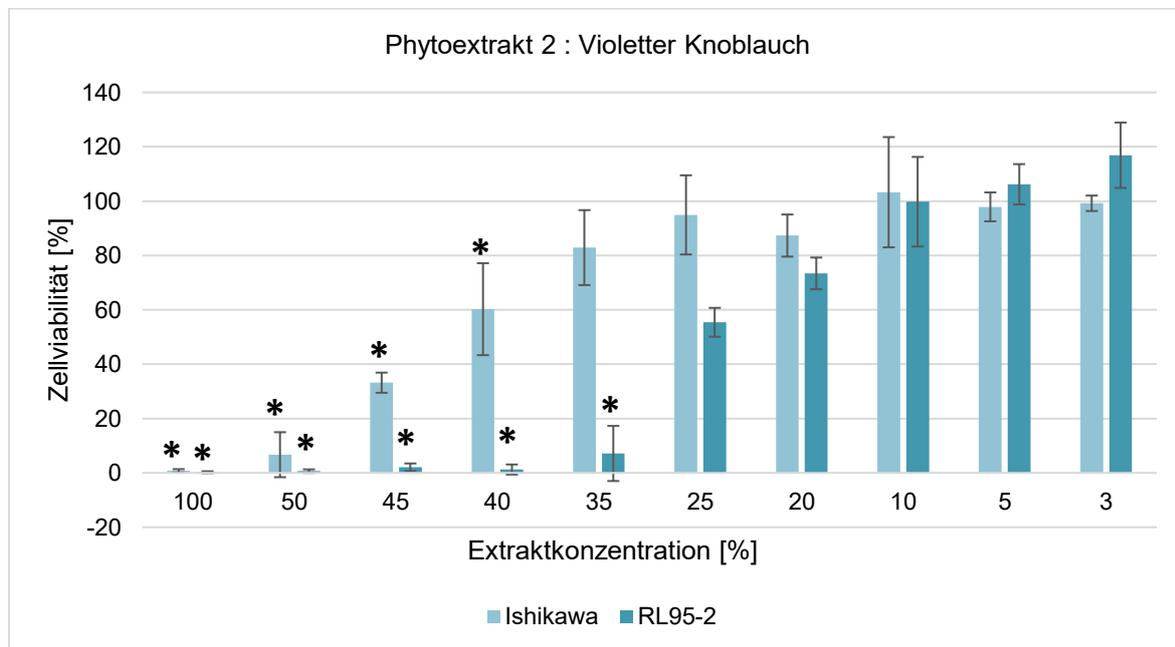


Abbildung 27: Zytotoxizitätstest CytoTox-Glo™ der Zelllinien Ishikawa und RL95-2 nach 24 h Inkubation mit dem PE2 (n=4), Extraktkonzentration [%], Zellviabilität [%] in Relation zur Negativkontrolle (Ethanol 70 %) Standardabweichung und Signifikanz sind mit aufgeführt (p < 0,05).

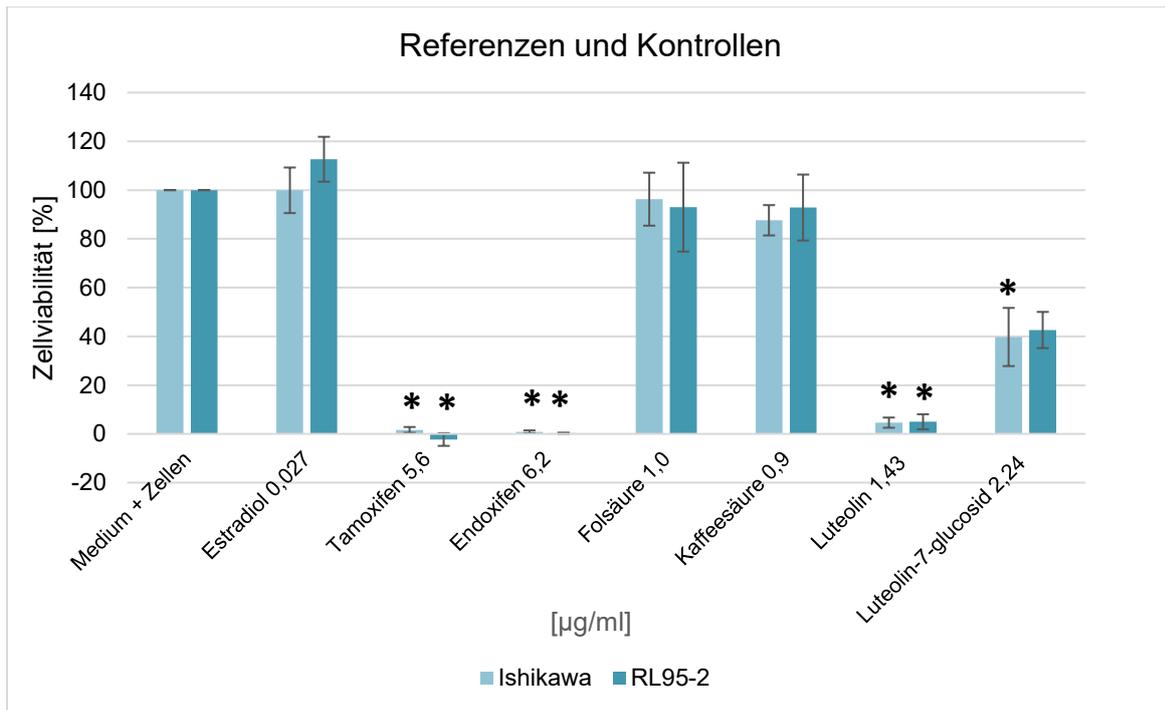


Abbildung 28: Zytotoxizitätstest CytoTox-Glo™ er Zelllinien Ishikawa und RL95-2 nach 24 h Inkubation – Referenzen und Kontrollen (n = 4) Extraktkonzentration [%] Standardabweichung und Signifikanz sind mit aufgeführt (p < 0,05).

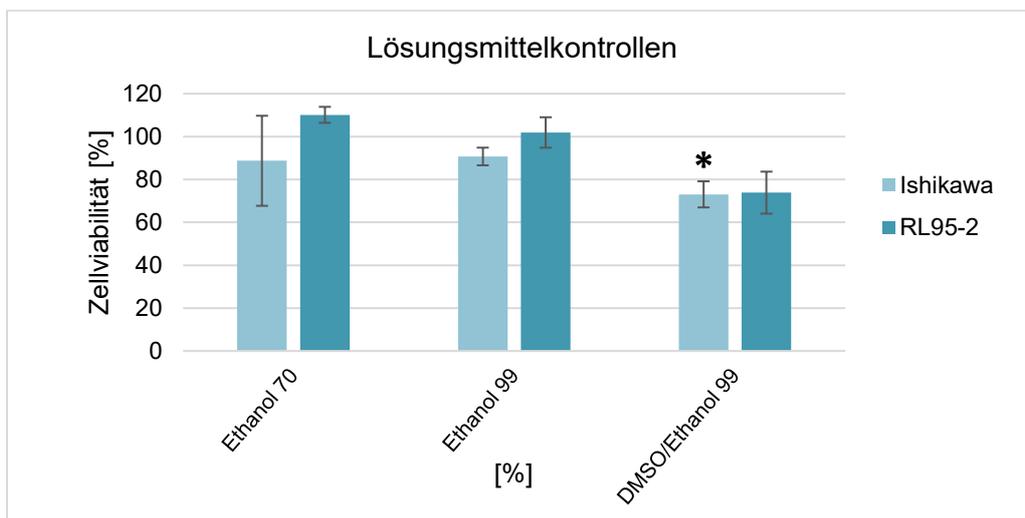


Abbildung 29: Zytotoxizitätstest CytoTox-Glo™ der Zelllinien Ishikawa und RL95-2 nach 24 h Inkubation – Lösungsmittelkontrollen (n = 4). Zellproliferation [%] in Relation zu unbehandeltem Medium und Zellen; Ethanolkonzentration [%] Standardabweichung und Signifikanz sind mit aufgeführt (p < 0,05).

4.6 NEUTRALROT ZYTOTOXIZITÄTSTEST

Der Neutralrot Zytotoxizitätstest ermittelt den Anteil lebender Zellen einer Kultur indem er die Aufnahme und Speicherung des Neutralrotfarbstoffs quantifiziert. Die Zellviabilität ist in Relation zur jeweiligen Negativkontrolle in Prozent auf der Ordinate abgetragen. Auf der Abszisse finden sich die Untersuchungsmedien, die Extraktkonzentrationen dabei ebenfalls in Prozent wider.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des CytoTox-Glo™ und des CellTiter-Glo® Tests zeigte sich nach 24-stündiger Inkubation ein dosisabhängiger zytotoxischer Effekt beider Phytoextrakte auf die Endometriumkarzinomzellen Ishikawa und RL95-2. Ein stärker ausgeprägter Effekt war bei den RL95-2 Zellen zu beobachten, deren Population bis zu einer Extraktkonzentration von 35 % fast vollständig abstarb. Wie in den Vorversuchen hatte die Inkubation der Zellen mit den Extraktverdünnungen 10 %, 5 % und 3 % keinen negativen Einfluss auf die Zellviabilität der untersuchten Zellreihen (Abb. 30 und 31). Tamoxifen, Endoxifen, sowie Luteolin erwiesen sich ebenfalls als signifikant zytotoxisch auf beide untersuchten Zellreihen (Abb. 32).

Die Reduktion der Ishikawa Zellpopulation durch die Phytoextrakte war bis zu einer 40%igen Verdünnung des PE1 (PE1*40: 61,36 % SD ± 12,98, p < 0,05) und 35%igen Verdünnung des PE2 (PE2*35: 68,14 % SD ± 12,10, p < 0,05) signifikant messbar. Den stärksten Effekt hatten die unverdünnten Extrakte, die zum Absterben von > 95 % der Zellen führten (PE1*100: -0,12 % SD ± 11,25 %, p < 0,01; PE2*100: 4,92 % SD ± 7,87 p < 0,001). Die 50%ige und 45%ige Verdünnung bewirkten noch eine Reduktion der Zellzahlen um mehr als die Hälfte (PE1*50: 41,20 % SD ± 12,49, p < 0,005; PE2*50: 32,60 % SD ± 13,47, p < 0,005; PE1*45: 1,95 % SD ± 9,10, p < 0,05; PE2*45: 40,46 % SD ± 8,24, p < 0,001) (Abb. 30 und 31).

Beide Phytoextrakte führten bis zur 35%igen Verdünnung zum Absterben von > 94 % der RL95-2 Zellpopulation (PE1*100: 2,27 % SD ± 3,35, p < 0,05; PE2*100: 5,32 % SD ± 11,79, p < 0,05; PE1*50: 3,12 % SD ± 9,63, p < 0,05; PE2*50: -2,09 % SD ± 3,75, p 0,05; PE1*45: 1,95 % SD ± 9,10, p < 0,05; PE2*45: -0,65 % SD ± 6,78, p < 0,05; PE1*40: -2,67 % SD ± 5,42, p < 0,05; PE2*40: -4,16 SD ± 5,31, p < 0,05; PE1*35: 5,59 % SD ± 9,86, p < 0,05; PE2*35: 4,69 % SD ± 5,54, p < 0,05). Eine nicht signifikante Viabilitätsreduktion war auch noch unter den Extraktverdünnungen 25 % (PE1*25: 30,49 % SD ± 9,94; PE2*25: 40,69 % SD ± 19,09) und 20 % zu beobachten (PE1*20: 60,26 % SD ± 14,61; PE2*20: 60,29 % SD ± 10,12) (Abb. 30 und 31).

Luteolin reduzierte die Zellzahl der Ishikawa Zellen signifikant auf 39,56 % (SD \pm 12,64, $p < 0,05$) und der RL95-2 Zellen auf 10,32 % (SD \pm 9,78, $p < 0,05$) (Abb. 32). Auch Luteolin-7-glucoside zeigte einen nicht signifikanten zytotoxischen Effekt auf beide Zelllinien, deren Populationen es auf 54,18 % (Ishikawa: SD \pm 12,64) und 79,74 % (RL95-2: SD \pm 8,45) reduzierte (Abb. 32). Die Inkubation mit Kaffeesäure, Folsäure und Estradiol hatte keinen Einfluss auf die Viabilität der Ishikawa und RL95-2 Zellen (Abb. 32). Die Ethanolkontrollen erwiesen sich ebenfalls nicht als zytotoxisch (Abb. 33).

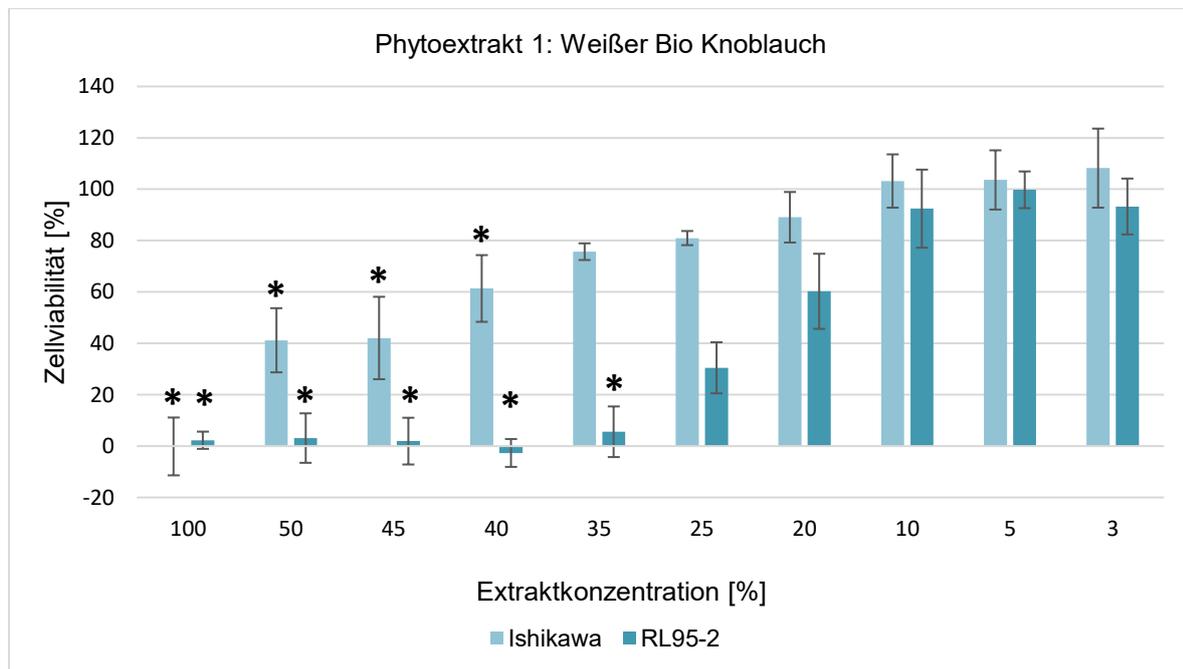


Abbildung 30: Neutralrot Zytotoxizitätstest der Zelllinien Ishikawa und RL95-2 nach 24 h Inkubation mit dem PE1 (n = 4) Extraktkonzentration [%]; Zellviabilität [%] in Relation zur Negativkontrolle (Ethanol 70 %); Standardabweichung und Signifikanz sind aufgeführt (Signifikanzniveau $p < 0,05$).

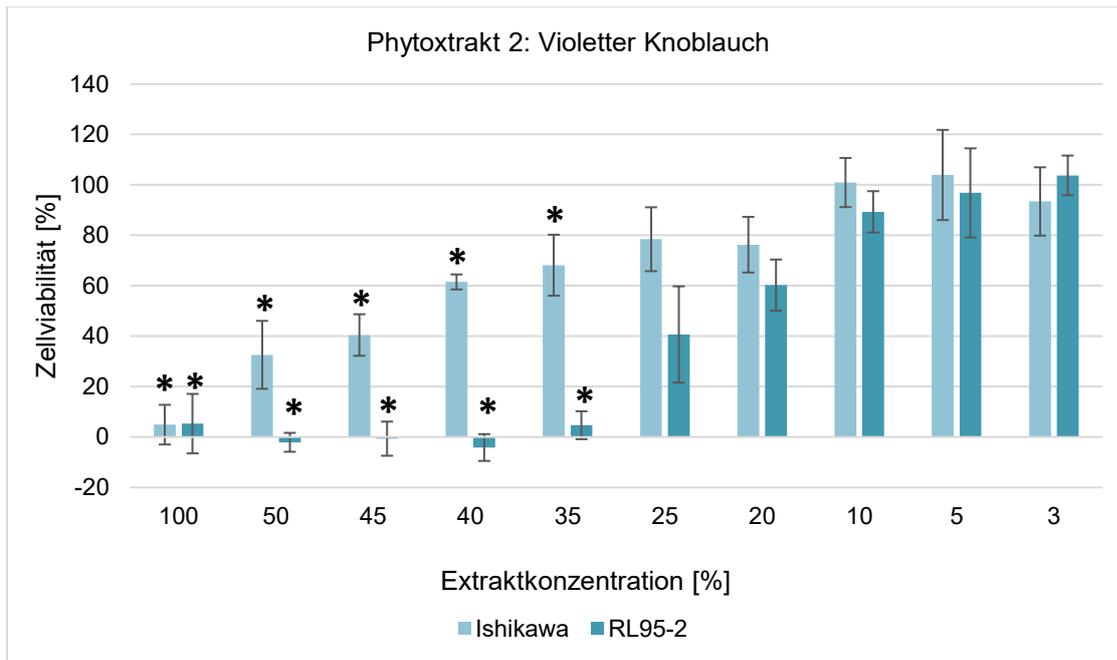


Abbildung 31: Neutralrot Zytotoxizitätstest der Zelllinien Ishikawa und RL95-2 nach 24 h Inkubation mit dem PE2, (n=4). Extraktkonzentration [%]; Zellviabilität [%] in Relation zur Negativkontrolle (Ethanol 70 %); Standardabweichung und Signifikanz sind aufgeführt (Signifikanzniveau $p < 0,05$).

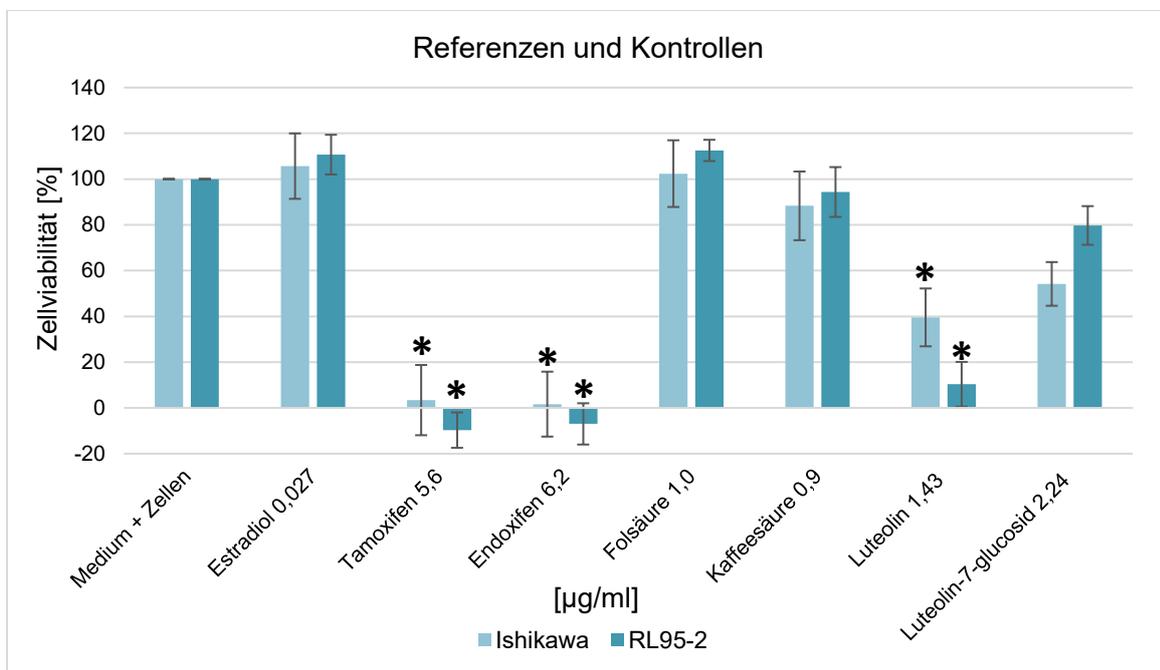


Abbildung 32: Neutralrot Zytotoxizitätstest der Zelllinien Ishikawa und RL95-2 nach 24 h Inkubation – Referenzen, (n=4). Extraktkonzentration [%]; Zellviabilität [%] in Relation zur Negativkontrolle (Ethanol 70 %); Standardabweichung und Signifikanz sind aufgeführt ($p < 0,05$).

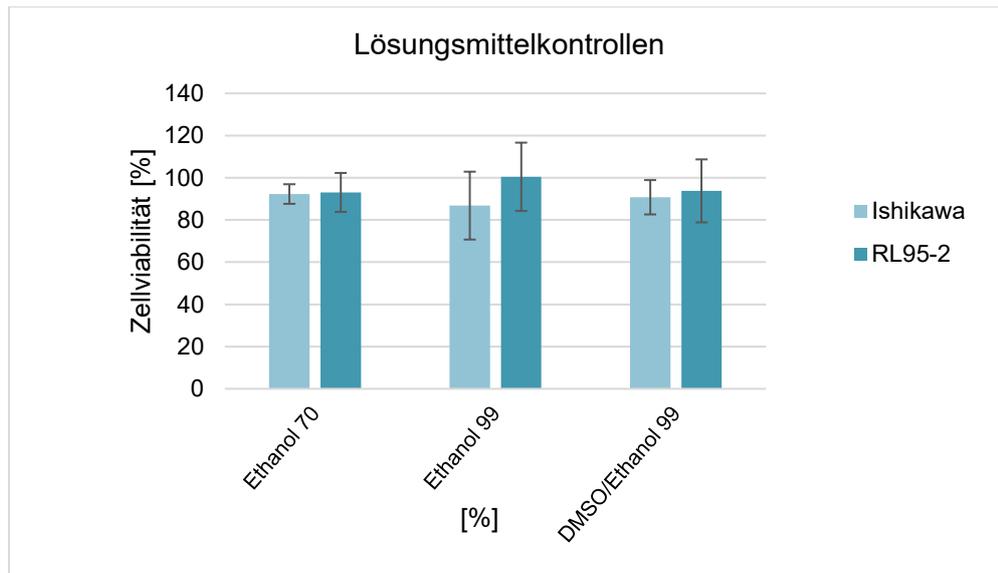


Abbildung 33: Neutralrot Zytotoxizitätstest der Zelllinien Ishikawa und RL95-2 nach 24 h Inkubation – Lösungsmittelkontrollen (n = 4), Zellviabilität [%] in Relation zu unbehandelten Medium und Zellen; Ethanolkonzentration [%] Standardabweichung und Signifikanz sind mit aufgeführt (p < 0,05).

4.7 ENERGIESTOFFWECHSELMESSUNG

Einen Überblick über den Metabolismus der Tumorzellen unter den Inkubationsbedingungen der Phytoextrakte in verschiedenen Konzentrationen gab die Messung der Energiestoffwechselparameter Glukose und Laktat. Da Tumorzellen zur Energiegewinnung Glukose im Rahmen der aeroben Glykolyse zu Laktat verstoffwechseln, kann die Quantifizierung des Glukoseverbrauchs Aufschluss über die Menge lebender, stoffwechselaktiver Zellen in einer Population geben. Die Messung wurde aus Kostengründen für jede Zelllinie einmalig mit einer reduzierten Anzahl von Inkubationsbedingungen durchgeführt. Die Ordinate bildet die Konzentration von Glukose und Laktat in mmol/l ab. Auf der Abszisse sind die untersuchten Medien abgetragen.

Ishikawa

Der Glukosegehalt des reinen Nährmediums der Zelllinie Ishikawa lag bei 28,4 mmol/l. Im Medium der unbehandelten Zellen war er nach 24 h auf 24,8 mmol/l, bei einem Laktatgehalt von 9,3 mmol/l reduziert. Einen geringeren Glukoseverbrauch, wiesen lediglich die mit Endoxifen inkubierten Zellen auf. Der Glukosegehalt im Medium betrug hier 25,6 mmol/l, bei einem Laktatgehalt von 5,5 mmol/l. Reduzierte Laktatspiegel waren auch in den Nährmedien der mit den unverdünnten Extrakten, sowie Tamoxifen inkubierten Zellen messbar. Nach 24-stündiger Inkubation der Ishikawa Zellen mit dem PE1 betrug der Glukosegehalt 23,4 mmol/l bei einer Laktatkonzentration von 6,1 mmol/l, nach Inkubation mit dem PE2 waren es jeweils 23,8 mmol/l und 6,8 mmol/l (Abb. 34 und 35). Das Nährmedium der Kontrolle Tamoxifen enthielt 5,2 mmol/l Laktat (Abb. 36).

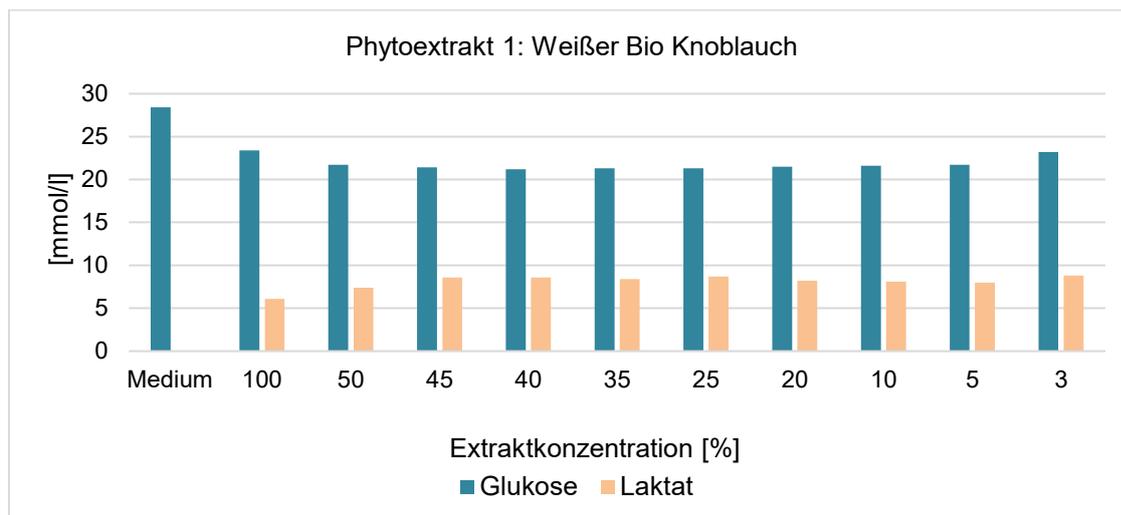


Abbildung 34: Glukose- und Laktatmessung der Zelllinie Ishikawa (20. Passage) nach 24 h Inkubation mit dem PE1 (n = 1); Extraktkonzentration [%], Glukose- und Laktatkonzentration [mmol/l]

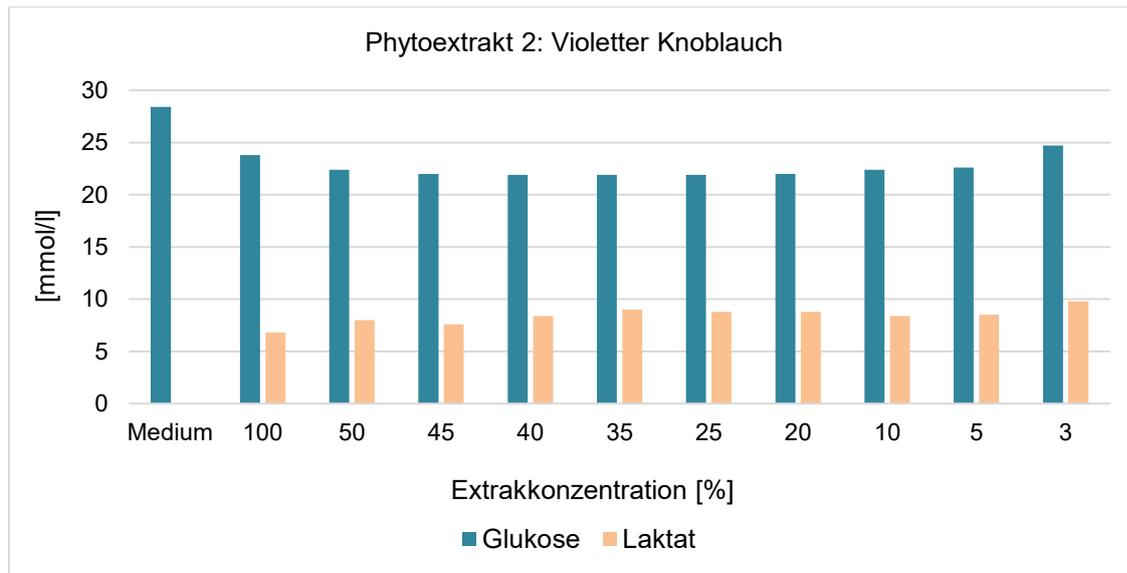


Abbildung 35: Glukose- und Laktatmessung der Zelllinie Ishikawa (20. Passage) nach 24 h Inkubation mit dem PE2 (n = 1); Extraktkonzentration [%], Glukose- und Laktatkonzentration [mmol/l]

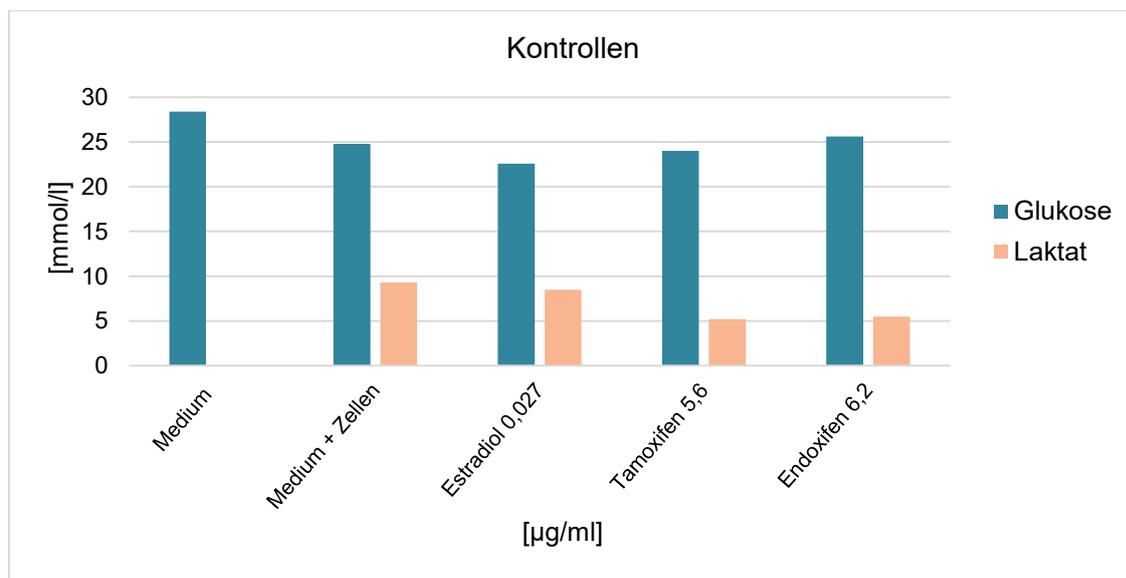


Abbildung 36: Glukose- und Laktatmessung der Zelllinie Ishikawa (20. Passage) nach 24 h Inkubation mit Referenzen (n =1); Konzentration [µg/ml], Glukose- und Laktatkonzentration [mmol/l]

RL95-2

Der Glukosegehalt des reinen Nährmediums der Zelllinie RL95-2 betrug 22,0 mmol/l und war im Nährmedium der unbehandelten Zellen auf 12,5 mmol/l um beinahe die Hälfte reduziert. Der Laktatwert des Mediums unbehandelter Zellen lag nach 24 h bei 14,0 mmol/l. Einen gegenüber dem Wert unbehandelter Zellen deutlich verringerten Glukoseumsatz wiesen die mit den höheren Konzentrationen der Phytoextrakte inkubierten Zellen auf. Die 100%ige, 50%ige und 45%ige Verdünnung des PE1 zeigten einen sichtbar geringeren Glukoseverbrauch von etwa 5 mmol/l in 24 h (PE1*100: 17,4 mmol/L; PE1*50: 17,3 mmol/L; PE1*45: 17,2 mmol/L). Der Laktatgehalt der genannten Bedingungen betrug mit jeweils mit 6,6 mmol/l weniger als die Hälfte des Laktatgehalts des Nährmediums unbehandelter Zellen. Unter den Bedingungen der Extraktkonzentrationen 35 % bis 3 % waren steigende Laktat Spiegel von 10,9 mmol/l auf 14,4 mmol/l, bei Glukosespiegel zwischen 12,7 mmol/l und 13,7 mmol/l zu verzeichnen (Abb. 37 und 38).

Die mit dem Extrakt des Violetten Knoblauchs inkubierten Zellen wiesen gegenüber den unbehandelten Zellen bis zu einer Extraktkonzentration von 35 % einen deutlich verringerten Glukoseumsatz auf (Abb. 38). Der Glukosewert sank mit zunehmender Verdünnung der Extrakte von 18,3 mmol/l (PE2*100) auf 17,4 mmol/l (PE2*35).

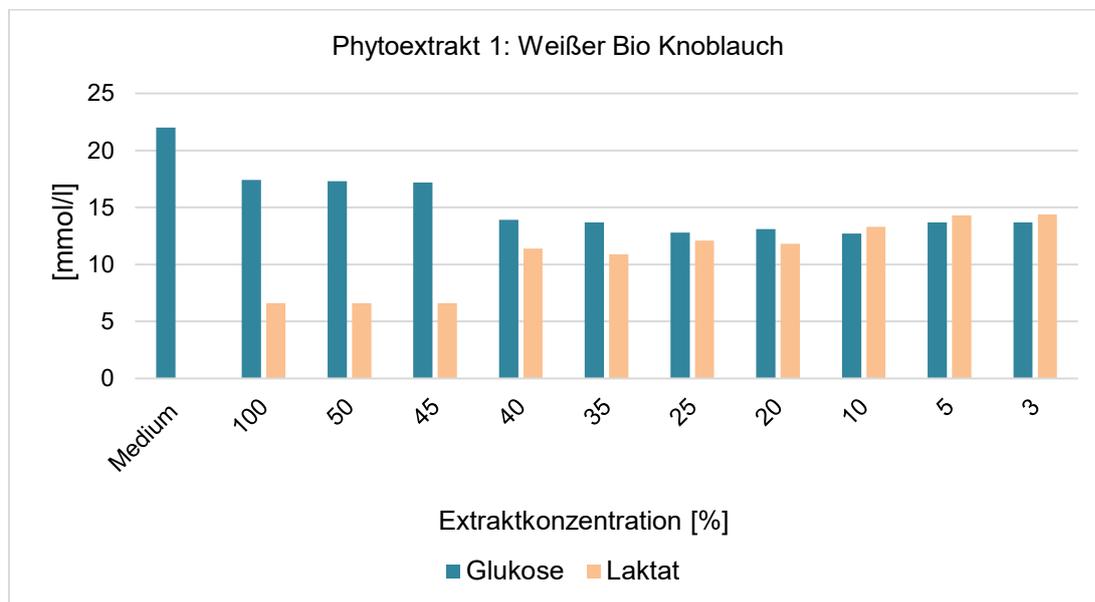


Abbildung 37: Glukose- und Laktatmessung der Zelllinie RL95-2 (19. Passage) nach 24 h Inkubation mit dem PE1, (n=1). Extraktkonzentration [%], Glukose- und Laktatkonzentration [mmol/l].

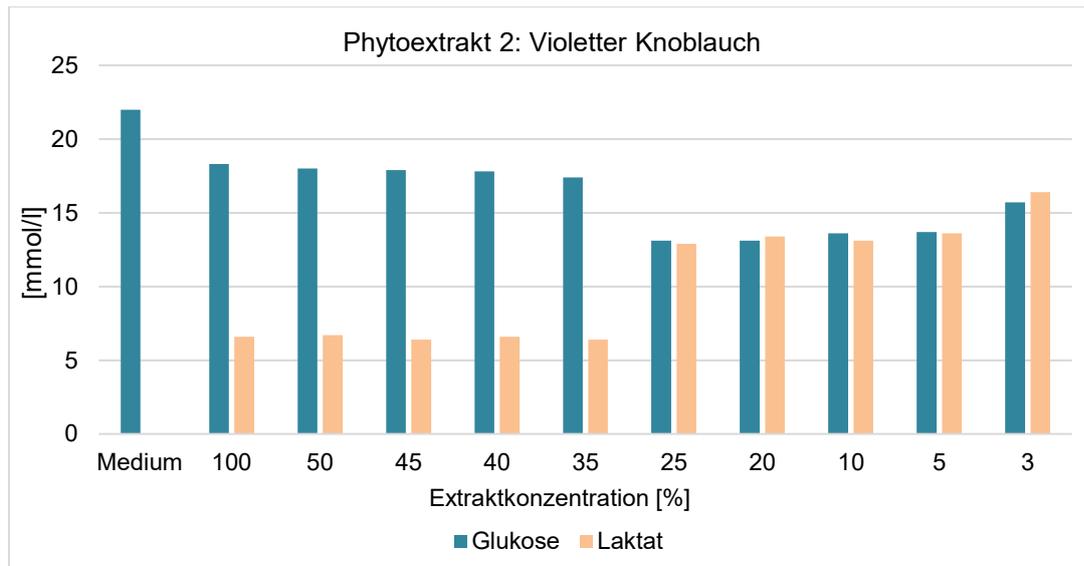


Abbildung 38: Glukose- und Laktatmessung der Zelllinie RL95-2 (19. Passage) nach 24 h Inkubation mit dem PE2, (n=1). Extraktkonzentration [%], Glukose- und Laktatkonzentration [mmol/l].

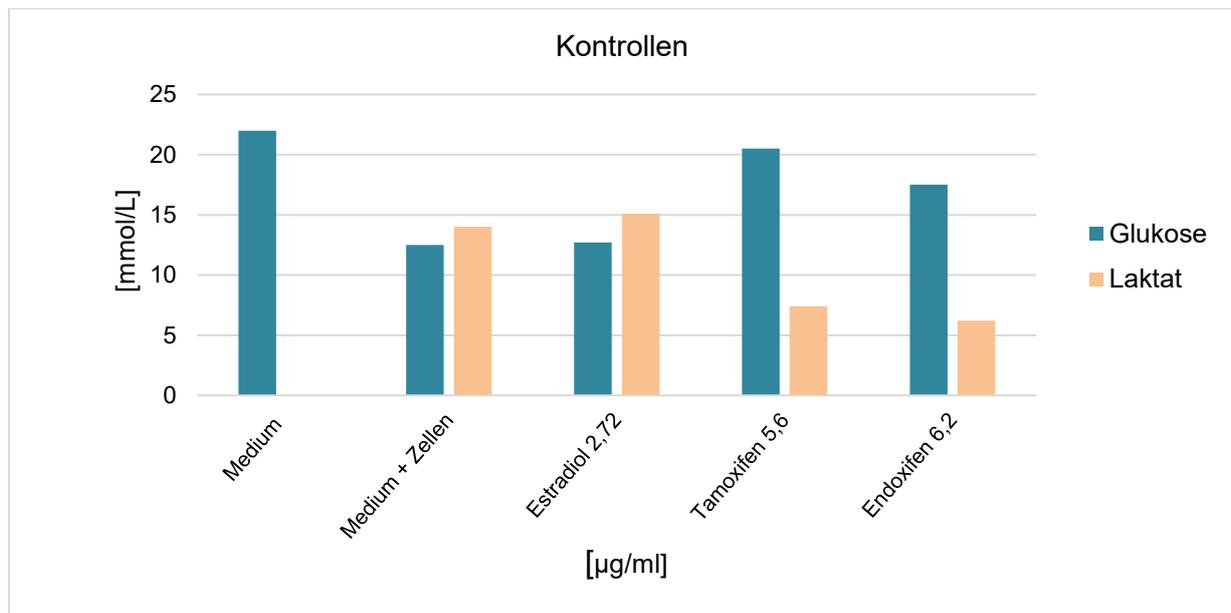


Abbildung 39: Glukose- und Laktatmessung der Zelllinie RL95-2 (19. Passage) nach 24 h Inkubation – Referenzen, (n=1). Konzentration [µg/ml], Glukose- und Laktatkonzentration [mmol/l].

V. DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war die Messung des Einflusses zweier Phytoextrakte aus *Allium sativum* (Knoblauch) auf die Viabilität und das Wachstum humaner Endometriumkarzinomzellen. Dabei sollte die Wirkung der Knoblauchextrakte mit der isolierten Wirkung enthaltener Polyphenole verglichen werden. Für die In-vitro-Versuche wurden die östrogenrezeptorpositiven Zellen der Linien Ishikawa und RL95-2 verwendet. Der von der Zellbank angegebene Rezeptorstatus beider Zelllinien ließ sich durch immunhistochemische Färbung bestätigen. Bei den Ishikawa und RL95-2 Zellen konnten dabei Östrogenrezeptoren der Subtypen ER- α und ER- β , sowie Progesteronrezeptoren nachgewiesen werden.

Die Herstellung der Phytoextrakte erfolgte mit dem Mikrowellenverfahren. Durch die HPLC-Analyse der Knoblauchextrakte konnten die Polyphenole Luteolin-7-Glukosid, Kaffeesäure und fraglich auch Luteolin, sowie Folsäure identifiziert werden. Der isolierte Effekt der definierten Polyphenole, sowie der Effekt der Knoblauchextrakte in unterschiedlichen Konzentrationen auf humane östrogenrezeptorpositive Endometriumkarzinomzellen wurden ermittelt. Die Viabilitätsmessung erfolgte in dieser Arbeit mithilfe des CellTiter-Glo® Viabilitätstest, des CytoTox-Glo™ und des Neutralrot Zytotoxizitätstests. Der CellTiter-Glo® bestimmt die Anzahl lebender Zellen mithilfe einer Lumineszenzmessung anhand des zellulären ATP-Gehalts. Der CytoTox-Glo™ Zytotoxizitätstest bedient sich einer zweizeitigen Lumineszenzmessung, die den Gehalt einer intrazellulären Protease, der Dead-cell Protease im Extrazellularraum als Folge von Zelluntergang detektiert. Die Zellviabilität wird hier durch Abzug des Anteils toter Zellen an der Gesamtpopulation der Zellen errechnet. Der Neutralrottest ermittelt den zytotoxischen Effekt von Testsubstanzen indem er die Menge intakter Zellen anhand ihrer Fähigkeit zur aktiven Speicherung des Farbstoffs Neutralrot über eine Absorptionsmessung quantifiziert. Die Bestimmung der Zellteilungsrate der Tumorzellen unter dem Einfluss der Extrakte und Referenzen gelang mithilfe des BrdU-Zellproliferationstest. Durch Quantifizierung des Einbaus des Thymidinanalogs BrdU in die DNA mithilfe einer Absorptionsmessung kann bei diesem Test auf die Zellreplikation geschlossen werden. Zusätzlichen Aufschluss über einen veränderten Zellmetabolismus der Tumorzellen unter den Extrakten sollte die Messung der Energiestoffwechselfparameter Glukose und Laktat im Medium geben.

5.1 ANALYSE DER PHYTOEXTRAKTE MIT DER HPLC

Die chromatographische Auftrennung der ethanolbasierten Phytoextrakte aus weißem Bio Knoblauch und violettem Knoblauch ergab zwei Chromatogramme mit fast identischen Peak-Profilen. Es konnte kein qualitativer Unterschied in Bezug auf enthaltene Polyphenolverbindungen zwischen den Extrakten der beiden Knoblauchsorten festgestellt werden. In beiden Extrakten konnten Folsäure, Kaffeesäure, sowie Luteolin-7-glucoside und fraglich auch Luteolin nachgewiesen werden. Die Polyphenole Rutin, Quercetin und Kämpferol konnten dahingegen nicht identifiziert werden.

Polyphenole sind eine große und heterogene Gruppe aromatischer Verbindungen, die in Pflanzen unter anderem als Farb- und Aromastoffe enthalten sind. Sie sind an Schutzmechanismen der Pflanzen gegenüber Umweltstressoren beteiligt und dienen ihnen der Anpassung an ihre Umgebung [27, 42]. Der pflanzliche Polyphenolgehalt und seine Zusammensetzung unterliegen dementsprechend sowohl genetischen Faktoren, als auch Umwelt- und Anbaubedingungen [19, 175]. Eine 2014 veröffentlichte Metaanalyse von Barański et al. ergab signifikant höhere Konzentrationen und ein breiteres Spektrum an Polyphenolen in Nutzpflanzen aus ökologischer Landwirtschaft gegenüber Pflanzen aus konventionellem Anbau [15]. Eine Ausnahme bildeten Kaffeesäure, Luteolin und verschiedene Quercetinkonjugate, die keine solche Korrelation zeigten [15]. Auch in dieser Arbeit waren Kaffeesäure, Luteolin und Luteolin-7-glykosid gleichermaßen in beiden Extrakten nachweisbar, während die Analyse bezüglich Quercetin und dem Quercetinglykosid Rutin in beiden Extrakten negativ ausfiel. Ein breiteres Polyphenolspektrum konnte im Extrakt des weißen Knoblauchs aus zertifiziertem Ökolandbau nicht gefunden werden. Zu ähnlichen Ergebnisse kamen Maccelli et al., die in ihrer Analyse ebenfalls keine signifikanten Unterschiede im Polyphenolgehalt von wilden gegenüber kommerziell erworbenen *Allium*spezies feststellten [117].

Kaffeesäure gehört zu den Phenolsäuren, die ubiquitär in pflanzlicher Nahrung in vergleichsweise hohen Konzentrationen vorhanden sind [140]. Der Nachweis von Kaffeesäure in Knoblauch und Knoblauchextrakten wird in der Literatur in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit recht einheitlich beschrieben [19, 67, 97, 126]. Beato et al. fanden überdies eine positive Korrelation der Konzentration von Kaffeesäure in Knoblauch mit der Durchschnittstemperatur der Anbauregion [19]. Weitere Phenolsäuren, die ebenfalls häufig in hohen Konzentrationen in Knoblauch nachgewiesen werden konnten sind Ferulasäure, β -Resorcylnsäure, Protocatechusäure, Vanillinsäure und 4-Hydroxybenzoesäure [19, 67, 117, 126].

Luteolin liegt in den meisten Pflanzen in vergleichsweise geringen Konzentrationen und wie die meisten Flavanoide hauptsächlich als Glykosid vor [156]. In den mit *Allium sativum* verwandten Lauchgewächsen *Allium porrum* (Lauch) und *Allium cepa* (Zwiebel) wurde das Flavonoid bereits nachgewiesen [121, 130]. In dieser Arbeit konnte Luteolin-7-glykosid über Referenzanalysen in beiden Knoblauchextrakten identifiziert werden. Der Nachweis von Luteolin war dahingegen fraglich. In den Chromatogrammen beider Extrakte zeigten sich minimale Peaks bei 29,7 min, die mit der Retentionszeit von Luteolin übereinstimmten. Es ist möglich, dass Luteolin in den untersuchten Proben weißen und violetten Knoblauchs als Aglykon nur in sehr geringen Mengen vorlag, was den Nachweis erschwerte. Auch eine enzymatische oder nicht enzymatische Lyse der glykosidischen Bindung von Luteolin-7-glykosid während des Extraktionsprozesses oder der Aufbewahrung der Extrakte ist denkbar. Dies könnte zu geringen Mengen des Aglykons an der Nachweisgrenze geführt haben. Da die Zuckerreste von Luteolinglykosiden wie bei anderen Flavonoiden im menschlichen Gastrointestinaltrakt vor der Aufnahme abgespalten werden, ist neben der Wirkung von Luteolin-7-glucoside besonders auch die Wirkung des Aglykons Luteolin auf die humanen Endometriumkarzinomzellen von Interesse [156]. Für die In-vitro-Zellversuche wurden aus diesem Grund beide Polyphenole verwendet.

Divergierende Angaben lassen sich in der Literatur zum Gehalt der Flavanoide Quercetin, Rutin und Kaempferol in Knoblauch finden. Während zwei Publikationen Quercetin und das Quercetinglykosid Rutin zu den Polyphenolen mit den höchsten Konzentrationen in verschiedenen polnischen und koreanischen Knoblauchkultivaren zählen und auch Kaempferol in allen untersuchten Proben nachwies, konnten die Flavanoide in zwei anderen Publikationen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit in keiner der analysierten Knoblauchsorten der Mittelmeerregion gefunden werden [19, 67, 117, 126]. Bei Zwiebeln sind signifikante Schwankungen der Flavonoidkonzentration zwischen Vegetationsperioden bekannt [151]. Patil et al. stellten außerdem eine Korrelation zwischen der Quercetinkonzentration in Zwiebeln und der jeweiligen Anbauregion her [135]. Es ist denkbar, dass auch bei den verwendeten Knoblauchsorten ähnliche klimatische Bedingungen im Anbauland Spanien obgleich genetischer Heterogenität und unterschiedlichen Anbaubedingungen in ökologischer und konventioneller Landwirtschaft ein ähnliches Polyphenolspektrum bedingt haben.

Des Weiteren muss ein möglicher Einfluss der Extrakterstellung, sowie der Analysemethode auf das Polyphenolspektrum der Knoblauchextrakte bedacht werden. In dieser Arbeit erfolgte die Herstellung der Phytoextrakte aus rohen, getrockneten Knoblauchzehen mit dem Mikrowellenverfahren. Die Extraktionszeit lag jeweils bei 20 min, bei einer Temperatur von 60 °C.

Sowohl die Extraktionstemperatur, als auch die Wahl des Lösungsmittels können die Effizienz der Extraktion von Polyphenolen wesentlich beeinflussen [27, 166]. Höhere Temperaturen können die Löslichkeit von Polyphenolen und die Stofftransferrate bei der Extraktion erhöhen. Dabei kann es jedoch sowohl zur Hydrolyse und Oxidation einzelner Polyphenole, als auch zum Verlust volatiler Verbindungen kommen [39, 137]. Maccelli et al. beschrieben bereits ab einer Temperatur von über 60°C einen Verlust an bioaktiven Komponenten in ihren hergestellten Knoblauchextrakten [117]. Es ist möglich, dass bedingt durch die Extraktionsmethode das tatsächliche Polyphenolspektrum der untersuchten Knoblauchsorten unterschätzt wurde. Darüber hinaus wurden die Referenzanalysen mit einer begrenzten Anzahl an Proben durchgeführt. Dabei konnten nicht alle Peaks der Chromatogramme identifiziert werden. Es handelt sich also lediglich um eine Näherung an den Polyphenolgehalt der Extrakte.

Als Lösungsmittel wurden in dieser Arbeit 70%iger Ethanol und Wasser gewählt. Die wasserbasierten Knoblauchextrakte konnten aufgrund ihrer geleeartigen Konsistenz nicht für die Zelltests und die HPLC-Analyse verwendet werden. Es ist zu vermuten, dass reines Wasser aufgrund seines polaren Charakters ein unzureichendes Lösungsmittel insbesondere für die lipophilen Komponenten im Knoblauch darstellt. Maccelli et al. untersuchten unterschiedliche Lösungsmittelverhältnisse bei der Herstellung von Knoblauchextrakten. Die optimale Polyphenolausbeute erreichten sie mit einem 12:88 Ethanol-Wasser-Gemisch, das auch höheren Ethanolkonzentrationen (70 %, 99 %) überlegen war [117].

5.2 EINFLUSS DER PHYTOEXTRAKTE AUF DIE ZELLVIABILITÄT

In der Literatur sind proapoptotische und antiproliferative Effekte von Knoblauchextrakten *in vitro* auf diverse humane Tumorzelllinien vielfach beschrieben worden [10, 73, 111, 137, 161, 169]. In einer Untersuchung an HeLa Zervixkarzinomzellen, sowie zwei Blasenkarzinomzellreihen (6537; J82) entfaltete das Extrakt aus rohem Knoblauch sogar die höchste zytotoxische Aktivität unter 21 getesteten Phytoextrakten [111]. Darüber hinaus stellten auch epidemiologische Studien eine Assoziation zwischen einem hohen Konsum von Knoblauch und einer verringerten Inzidenz von Karzinomen, darunter auch dem EC her [61, 62, 114].

In dieser Arbeit zeigte sich eine signifikante Reduktion der Zellviabilität und des Zellwachstums von Ishikawa und RL95-2 Endometriumkarzinomzellen infolge der Inkubation mit zwei ethanolbasierten Phytoextrakten aus weißem und violetterm Knoblauch. Wie in vorangegangenen Untersuchungen an Kolon-, Mamma- und Prostatakarzinomzellen stellte sich dieser Effekt auch bei den Endometriumkarzinomzellen in einer Dosis-Wirkungs-Beziehung dar [10, 169].

In allen Zellviabilitäts- und Zytotoxizitätstests war nach Inkubation der Ishikawa Zellen mit den unverdünnten Extrakten, sowie den auf 50 %, 45 % und 40 % verdünnten Extrakten eine signifikante Reduktion der Zellzahl gegenüber der Negativkontrolle messbar. Bis zu einer Extraktkonzentration von 45 % kam es zu einer Reduktion der Ishikawa Zellpopulation um mindestens die Hälfte. Bei den RL95-2 Zellen konnte eine signifikante Einschränkung der Zellviabilität bis zu einer Extraktverdünnung auf 35 % gemessen werden, unter der sich die Zellpopulation bis auf eine Ausnahme (CytoTox-Glo™: PE1) mehr als halbierte. Die Extraktverdünnungen 10 %, 5 % und 3 % zeigten keinen zytotoxischen Einfluss auf die untersuchten Zellen.

Interessanterweise reagierten die RL95-2 Zellen in allen Zellviabilitäts- und Zytotoxizitätstest sensibler auf die zugeführten Extrakte als die Zellen der Linie Ishikawa. Bis zu einer Extraktkonzentration von 35 % kam es bei den RL95-2 Zellen, bis auf eine Ausnahme im CytoTox-Glo™ in der Inkubation mit dem PE1, zu einer Reduktion der Zellpopulation um > 90 %. Bei den Ishikawa Zellen, war ein solcher Effekt nur nach der Inkubation mit den unverdünnten Extrakten messbar. Die exakten Mechanismen der antikanzerogenen Wirkung von Knoblauchextrakten sind bislang noch nicht vollständig verstanden. Es konnten jedoch bereits einige Signalwege identifiziert werden über die Knoblauch und seine bioaktiven Verbindungen den programmierten Zelltod und den Zellzyklusarrest in Tumorzellen induzieren könnten [122, 169, 193]. Petrovic et al. gelang es quantitative Veränderungen von über 1000 Proteinen in mit ethanolbasiertem Knoblauchextrakt behandelten Tumorzellen nachzuweisen. Die veränderten Proteinspiegel betrafen unter anderem den PI3K/Akt-, den MAPK- und den Wnt-Signalweg, die eine wichtige Rolle im Zellstoffwechsel, der Proliferation und der Regulation des Zellzyklus spielen [137]. Su et al. wiesen an humanen colo 205 Kolonkarzinomzellen eine Apoptoseinduktion über den mitochondrialen Signalweg nach. Die Inkubation der Tumorzellen mit einem Extrakt aus rohem Knoblauch führte in ihrer Arbeit zur Erhöhung der intrazellulären Spiegel der proapoptischen Proteine Bax, Cytochrome C und Caspase 3 [169]. Den Allylsulfiden DADS und DATS konnte darüber hinaus eine wachstumshemmende Wirkung unter anderem durch Downregulation der Protoonkogene β -Catenin und p53, sowie des Östrogenrezeptorsubtyps ER- α nachgewiesen werden [24, 70, 75]. Beide Tumorzelllinien besitzen ihr jeweils eigenes Spektrum genetischer Mutationen, die unter anderem die Gene POLE, PTEN, TP53 und PIK3R1, sowie das Mismatch-Reparatursystem betreffen [43]. Es ist möglich, dass Mutationen der RL95-2 Zellen den Knoblauchextrakten zusätzliche Angriffspunkte bieten, durch die der Zelltod effektiver eingeleitet wird. Des Weiteren zeichnen sich die RL95-2 Zellen mit 22 h bis 34 h durch eine kürzere Replikationszeit aus als die Zellen der Linie Ishikawa [37]. Deren Verdopplungszeit liegt bei niedrigen Passagen, wie der in dieser Arbeit verwendeten 13. - 24.

Passage, bei etwa 36 h [131]. Die Inkubation der Tumorzellen mit den Phytoextrakten und Kontrollen erfolgte in allen in Vitro Tests für 24 h. Möglicherweise wären bei den Ishikawa Zellen ähnliche zytotoxische Effekte unter verlängerten Inkubationszeiten zu beobachten.

Die drei durchgeführten Zellviabilitäts- und Zytotoxizitätstest zeigten weitestgehend übereinstimmende Ergebnisse. Leichte Abweichungen der Zelltests untereinander könnten am ehesten auf schwankende Zellzahlen in den einzelnen Wells zurückzuführen sein. Dafür kommen zwei mögliche methodenbezogene Fehlerquellen infrage. In dieser Arbeit wurde die Zellzählung mit der Bürker-Zählkammer durchgeführt. Für die Messgenauigkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist bei dieser Methode eine ausreichende Vereinzelung der Zellen essenziell. Sowohl die Ishikawa als auch die RL95-2 Zellen besitzen jedoch die Tendenz sich aufzuschichten, Zellcluster und im Falle der RL95-2 Zellen drüsenähnliche Strukturen zu bilden [37, 131]. Um dem Zusammenlagern der Zellen vorzubeugen erfolgte die Passage der Zellen stets vor dem Erreichen der Konfluenz bei etwa 80 % Bedeckung des Nährbodens der Zellkulturflaschen. Eine vollständige Vereinzelung der Zellen bei der Passage war dennoch nicht immer möglich. Dieser Umstand könnte zu Ungenauigkeiten in der Bestimmung der Zellzahl bei der Zellzählung mit der Bürker-Zählkammer geführt haben. Des Weiteren erfolgte das Aussäen der Zellen für die Versuche durch Herstellung einer Zellsuspension definierter Konzentration, die zur Befüllung aller Wells vorgesehen war. Trotz regelmäßigem Einsatz des Vortex ist ein leichtes Absetzen der Zellen im Reaktionsgefäß als mögliche Fehlerquelle, die zu einer schwankenden Zellzahl pro Well geführt haben könnte, nicht auszuschließen.

5.2.1 EINFLUSS DER PHYTOEXTRAKTE AUF DIE ZELLPROLIFERATION

Die Ergebnisse des BrdU Zellproliferationstest stützten im Wesentlichen die Erkenntnisse der Viabilitäts- und Zytotoxizitätstests. Es zeigte sich eine signifikante antiproliferative Wirkung der Knoblauchextrakte auf die Endometriumkarzinomzellen Ishikawa und RL95-2. Wie bei den Zellviabilitätstests war auch beim BrdU Proliferationstest eine Dosis-Wirkungs-Beziehung erkennbar. Die Inkubation der Zellen mit den unverdünnten Extrakten bewirkte eine Reduktion der Proliferationsrate der Ishikawa Zellen um 85 %, der RL95-2 Zellen um mehr als 90 %. Eine signifikante Wachstumsreduktion war infolge der Inkubation der Ishikawa Zellen mit dem PE1 aus weißem Knoblauch bis zu einer Extraktkonzentration von 40 %, bei den RL95-2 Zellen bis zu einer Verdünnung von 35 % zu verzeichnen. Das Extrakt des violetten Knoblauchs wirkte jeweils bis zu einer Konzentration von 35 % bei den Ishikawa Zellen und 25 % bei den Zellen der Linie RL95-2 signifikant wachstumshemmend.

Auch Hirsch et al. konnten bereits die dosisabhängige proliferationshemmende Wirkung eines Knoblauchextrakts auf Ishikawa Endometriumkarzinomzellen, sowie MCF-7 Mammakarzinomzellen und HAT-29 Kolonkarzinomzellen nachweisen. Die Wirkung des wasserbasierten Extrakts aus gelöstem Knoblauchpulver war in ihrer Analyse vergleichbar mit der isolierten Wirkung von Allicin, einer der wichtigsten schwefelhaltigen Verbindungen von verarbeitetem Knoblauch [73]. Diallylsulfid (DADS), eine Organoschwefelverbindung, die bei der Zersetzung von Allicin entsteht und sich durch ihre gelbliche Farbe, sowie einen starken Knoblauchgeruch auszeichnet, entfaltet ihre antikanzerogene Wirkung ebenfalls unter anderem durch eine Hemmung der Tumorzellproliferation. Es konnte gezeigt werden, dass DADS die Expression wichtiger Gene, die für zentrale Proteine der Zellzyklusregulation wie CDK1, CDK2 und Cyclin E kodieren, beeinflusst und so den Zellzyklusarrest von Tumorzellen herbeiführen kann [193]. Diretto et al. fanden in ihrer Analyse violetter und weißer Knoblauchkultivare einen insgesamt höheren Gehalt an Organoschwefelverbindungen in violetterm Knoblauch, sowie höhere Konzentrationen von Allicin und Diallyldisulfid [46]. Unterschiedliche Konzentrationen von Organoschwefelverbindungen in den hergestellten Phytoextrakten dieser Arbeit, mit höheren Konzentrationen im Extrakt des Violetterm Knoblauchs könnten eine mögliche Erklärung für die stärkere proliferationshemmende Wirkung des Extrakts auf die Endometriumkarzinomzellen sein.

5.3 STOFFWECHSELUNTERSUCHUNG

Die Untersuchung der Stoffwechsellparameter Glukose und Laktat im Nährmedium der Tumorzellen unter den definierten Inkubationsbedingungen diente als ergänzende Untersuchung der Zellviabilität. Sie wurde für jede Zelllinie einmalig als Vierfachbestimmung mit einer reduzierten Anzahl von Inkubationsbedingungen durchgeführt. Bei den Ishikawa Zellen ließ sich kaum eine veränderte Stoffwechsellage der mit den Extrakten und Extraktverdünnungen inkubierten Zellen darstellen. Möglicherweise wäre auch hier ein verlängerter Inkubationszeitraum notwendig gewesen. Die Energiestoffwechseluntersuchung der RL95-2 Zellen stütze dagegen die Ergebnisse der vorangegangenen Zelltests. Wie auch beim BrdU-Proliferationstest reagierten die Zellen sensibler auf die Inkubation mit dem Extrakt des violetterm Knoblauchs. Ein geringerer Glukoseverbrauch als Marker reduzierter Zellviabilität war hier bis zur 35%igen Verdünnung des PE2 messbar. Beim Extrakt des weißer Knoblauchs konnte dieser Effekt nur bis zur 45%igen Verdünnung dargestellt werden. Insgesamt sollten die Ergebnisse, da es sich um eine einmalige Messung jedoch mit Vorsicht interpretiert werden.

5.4 WIRKUNG DER POLYPHENOLE LUTEOLIN, LUTEOLIN-7-GLUCOSIDE UND KAFFEESÄURE

Das isolierte Flavanoid Luteolin entfaltet unter den untersuchten Polyphenolen die stärkste zytotoxische Wirkung auf die Endometriumkarzinomzellen Ishikawa und RL95-2. Im CytoTox-Glo™ und Neutralrot Zytotoxizitätstest, sowie im BrdU Proliferationstest zeigte sich eine signifikante Reduktion der Zellzahl sowie der Wachstumsrate der Zellen. Im CellTiter-Glo® Viabilitätstest zeichnete sich hingegen lediglich eine leichte, nicht signifikante regressive Wirkung ab.

Luteolin konnten sowohl in Zell- als auch in Tierversuchen zytotoxische und antiproliferative Effekte auf ein breites Spektrum humaner Karzinomzellen wie Lungen-, Prostata-, Mamma-, Kolon- und sogar Pankreaskarzinomzellen nachgewiesen werden [123, 156, 168]. Luteolin entfaltet seine Wirkung dabei bereits ab vergleichsweise geringen Konzentrationen. Mori et al. zählen Luteolin sogar zu den effektivsten antikanzerogenen Flavanoiden mit einer signifikant zytotoxischen Wirkung ab einer Konzentration von 4 µg/ml auf humane HeLA Zervixkarzinomzellen [123]. In Zellstudien liegt die minimal inhibitorische Konzentration von Luteolin zwischen 0,86 µg/ml und 14,3 µg/ml [81]. Pettit et al. zeigten, dass verschiedene Zelllinien unterschiedlich sensibel auf die Inkubation mit Luteolin reagieren. In ihrer Untersuchung lag die minimal inhibitorische Konzentration von Luteolin auf das Tumorzellwachstum verschiedener Tumorzelllinien bei 2,7 µg/ml bei OVCAR-3 Ovarialkarzinomzellen, bei P388 Leukämiezellen dagegen bei über 10 µg/ml [139]. In dieser Arbeit konnte ein zytotoxischer Effekt von Luteolin im CytoTox-Glo® und im Neutralrot Zytotoxizitätstest, sowie eine signifikant antiproliferative Wirkung im BrdU Proliferationstest gemessen werden. Im CellTiter-Glo® Test war jedoch keine signifikante Reduktion der Zellzahl zu verzeichnen. Da dieser Versuch im Unterschied zu den anderen Zelltests nur mit einer Probenmenge von 0,5 µl der Inkubationsbedingungen durchgeführt wurde, könnte es zu einer geringeren Ausprägung der zytotoxischen Wirkung gekommen sein. Bei den Proben der Knoblauchextrakte war ein solcher Effekt jedoch nicht zu beobachten. Es ist auch möglich, dass die minimale Hemmkonzentration der Ishikawa und RL95-2 Zellen etwas über der verwendeten Konzentration von 1,43 µg/ml liegt.

Die Inkubation der Tumorzellen mit Luteolin-7-glucoside hatte vorrangig auf die Ishikawa Zellen einen zytotoxischen, sowie antiproliferativen Einfluss, der im CytoTox-Glo™, sowie im BrdU-Proliferationstest das Signifikanzniveau erreichte. Eine deutliche Reduktion der Zellviabilität der RL95-2 Zellen auf unter 50 % konnte nur im CytoTox-Glo™ Zytotoxizitätstest gemessen werden. In diesem Test zeigte jedoch auch Ethanol 99 %/ DMSO, das Lösungsmittel

von Luteolin-7-glucoside eine geringe zytotoxische Wirkung auf beide Zelllinien. Die tatsächliche Wirkung des isolierten Polyphenols könnte dementsprechend deutlich geringer ausfallen. Es ist möglich, dass die benötigte Hemmkonzentration von Luteolin-7-glykosid insbesondere bei den RL95-2 Zellen höher liegt als die in dieser Arbeit verwendeten 2,24 µg/ml. In einer Untersuchung von Goodarzi et al. entfaltete Luteolin-7-glucosid unter allen untersuchten Kreuzkümmelflavanoiden die potenteste zytotoxische Wirkung auf MCF-7 Mammakarzinomzellen mit einer halbmaximalen Hemmkonzentration von 3,98 µg/ml [66]. Hwang et al. fanden eine dosisabhängige antiproliferativen Wirkung von Luteolin-7-glykosid auf HepG2 Leberkarzinomzellen, die mit einem Zellzyklusarrest der Tumorzellen in der G₂/M-Phase korrelierte. Eine signifikante Reduktion der Zellpopulation konnten die Autoren ab einer Konzentration von 22,4 µg/ml feststellen [79].

Wie effektiv die Aufnahme von Luteolin in seiner konjugierten Form in die Zellen funktioniert bleibt zukünftig noch zu eruieren. Es könnte sein, dass sich die Ishikawa und RL95-2 Zellen in diesem Punkt unterscheiden. Ein effektiverer Aufnahmemechanismus und eine konsekutiv erhöhte intrazelluläre Konzentration von Luteolin-7-glucoside könnten eine mögliche Erklärung für die stärkere Wirkung des Flavanoids auf die Ishikawa im Vergleich zu den RL95-2 Zellen sein. Stefano et al. wiesen im Cytoplasma von HUVEC Endothelzellen nach Inkubation mit Luteolin-7-glykosid sowohl die glykolysierte als auch die nicht konjugierte Form des Flavons nach [168]. Möglicherweise spielt für die Wirkeffektivität von Luteolin-7-glykosids auch das Konzentrationsverhältnis seiner konjugierten und nicht konjugierten Form in der Zelle eine Rolle.

Die Inkubation der Endometriumkarzinomzellen mit Kaffeesäure (0,9 µg/ml) zeigte zum größten Teil keinen signifikanten Effekt auf die Viabilität der Tumorzellen. Einzig im CellTiter-Glo® Zellviabilitätstest ließ sich eine leichte Reduktion der Tumorzellpopulation beider Zelllinien erkennen, die bei den RL95-2 Zellen das Signifikanzniveau erreichte. Der BrdU-Proliferationstest ergab eine signifikante Reduktion des Zellwachstum der Ishikawa-Zellen auf unter 50 %. Im gleichen Test konnte kein Einfluss auf das Wachstum der RL95-2 Zellen gemessen werden.

Mögliche antiproliferative und proapoptotische Effekte von Kaffeesäure auf humane Karzinomzellen wurden bereits vielfach untersucht. Es konnte ein hemmender Einfluss der Phenolsäure auf eine Reihe von Zelllinien, darunter Maligne Melanomzellen, Fibrosarkomzellen, Leber-, Prostata-, Zervix- und Endometriumkarzinomzellen gefunden werden [77, 93, 146, 185]. Kanimozhi et al. dokumentierten zwischen 5 – 50 µg/ml einen dosisabhängigen zytotoxischen Effekt von Kaffeesäure auf Zervixkarzinomzellen der Linien HeLA und ME-180. Eine signifikant

reduzierte Zellviabilität war in ihren Analysen ab einer Konzentration von 30 µg/ml zu verzeichnen [93]. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Prasad et al. in ihrer Untersuchung an HIT-1080 Fibrosarkomzellen [146]. Huang et al. untersuchten den Einfluss von 11 Polyphenolverbindungen aus dem Ethanolextrakt der Hiobsträne in einer Konzentration von jeweils 200 µg/ml auf die Endometriumkarzinomzelllinien RL95-2 und HEC-1A. Kaffeesäure entfaltete den größten Einfluss auf das Wachstum der Zelllinien unter allen 11 getesteten Polyphenolverbindungen. Auch hier reagierte die RL95-2 Zellen weniger sensibel auf die zugeführte Kaffeesäure als die Zellen der Linie HEC-1A [77]. Sowohl bei Ishikawa-, als auch bei den HEC-1A-Zellen handelt sich um gut differenzierte Tumorzellen niedriger Tumorstadien. Die RL95-Zellen werden hingegen als mäßig differenziert beschrieben. Es ist möglich, dass ein Angriffspunkt der Kaffeesäure mit zunehmender Entdifferenzierung der Tumorzellen verloren geht. Auch eine Zunahme der Resistenz der entdifferenzierten Tumorzellen gegenüber Kaffeesäure ist denkbar. Interessant wäre eine Testung des Effekts von Kaffeesäure auf die Endometriumkarzinomzellen in höheren Konzentrationen als der hier verwendeten, die mit 0,9 µg/ml deutlich unter den Testkonzentrationen vergleichbarer Arbeiten lag.

5.5 EINFLUSS VON ESTRADIOL UND DER SERM TAMOXIFEN UND ENDOXIFEN

Estradiol, Tamoxifen und Endoxifen wurden in dieser Arbeit als Kontrollsubstanzen verwendet. Estradiol sollte auf die östrogenrezeptorpositiven Zelllinien eine leicht stimulierende Wirkung entfalten und diente somit zusätzlich zu den unbehandelten Zellen als Positivkontrolle zur Überprüfung der Ergebnisse der einzelnen Zelltests. Östrogene, darunter besonders das potente β -Estradiol spielen in der Karzinogenese und Proliferation des EC eine wichtige Rolle. Viele Risikofaktoren für das EC wie Übergewicht und die HRT sind mit erhöhten Estradiolspiegeln verbunden [30]. Physiologische Estradiolspiegel prämenopausaler Frauen liegen zwischen 40 - 200 pg/ml und steigen präovulatorisch auf 200-500 pg/ml an. In der Menopause sinken die Werte auf < 20 pg/ml [69]. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Estradiol in einer Konzentration von 10^{-7} mol/l auf die Zellen untersucht, was umgerechnet mit 270 pg/ml etwa dem Östrogenspiegel der späten Follikelphase entspricht. Nach 24-stündiger Inkubation lag die Zellviabilität, sowie die Zellproliferation der Ishikawa und RL95-2 Zellen überwiegend zwischen 100 % und 110%. Es konnte kein signifikanter proliferativer Effekt gemessen werden. Dies deckt sich den Ergebnissen vorangegangener Untersuchungen. Qi et al., die Ishikawa Zellen mit Estradiolkonzentrationen zwischen 10^{-10} und 10^{-6} mol/l inkubierten und die Zellproliferation jeweils nach 24 h, 48 h und 72 h bestimmten, fanden erst nach 72-stündiger Inkubation mit Estradiol in den Konzentrationen 10^{-8} und 10^{-9} mol/l eine signifikante Zellproliferation. Estradiol in der Konzentration von 10^{-7} mol/l zeigte nach 72 h allenfalls eine leichten

proliferativen Effekt [143]. Auch Che et al. untersuchten die Wirkung von Estradiol in der Konzentration 10^{-8} mol/l auf die Zellviabilität von RL95-2 und Ishikawa Zellen. Sie fanden erst nach 5 Tagen einen signifikant stimulierenden Einfluss auf die Zellen [30].

Tamoxifen und Endoxifen gehören zu den Selektiven Östrogenrezeptormodulatoren (SERM), die sich gewebeabhängig durch partiell agonistische und antagonistische Wirkeffekte am Östrogenrezeptor auszeichnen. Tamoxifen stellt dabei die Prodrug von Endoxifen dar und wird im Wesentlichen zur hormonellen Therapie des rezeptorpositiven Mammakarzinoms eingesetzt [25]. Insbesondere die Langzeittherapie mit Tamoxifen ist jedoch mit dem Vorkommen neoplastischer Ereignisse wie dem Endometriumkarzinom assoziiert [25]. Auch benigne hyperplastische Veränderungen am Endometrium können unter Tamoxifentherapie beobachtet werden [127]. In dieser Arbeit zeigten Tamoxifen (5,6 mg/ μ l) und Endoxifen (6,2 mg/ μ l) in den gewählten Konzentrationen eine signifikant zytotoxische Wirkung auf die Endometriumkarzinomzellen der Linien Ishikawa und RL95-2.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Studie wurden zwei ethanolbasierte Knoblauchextrakte aus Weißem Bio Knoblauch und Violettem Knoblauch mithilfe des Mikrowellenverfahrens hergestellt. Durch HPLC-Analyse der Extrakte gelang deren chromatographische Auftrennung und Identifizierung einzelner enthaltener Polyphenole. Beide Extrakte enthielten Kaffeesäure, Luteolin-7-glukosid und Folsäure, die über Referenzanalysen identifiziert wurden. Der Nachweis von Luteolin war dahingegen fraglich. Die vermuteten Polyphenole Quercetin, Rutin und Kaempferol konnten in den hergestellten Extrakten nicht nachgewiesen werden.

Bei den verwendeten Zellreihen handelte es sich um die östrogenrezeptorpositiven Endometriumkarzinomzellen der Linien RL95-2 und Ishikawa. Durch die immunhistochemische Untersuchung konnte der von der Zellbank angegebene Rezeptorstatus bestätigt werden. Beide Zelllinien wiesen Östrogenrezeptoren der Subtypen ER- α und ER- β , sowie Progesteronrezeptoren auf.

Die Wirkung der Knoblauchextrakte auf die Tumorzellen wurde jeweils in abgestufter Extraktverdünnung (100 %, 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 25 %, 20 %, 10 %, 5 %, 3 %) untersucht. Zusätzlich wurde der Effekt von Folsäure, Kaffeesäure, Luteolin und Luteolin-7-glukosid auf die Endometriumkarzinomzellen getestet. Tamoxifen, Endoxifen und β -Estradiol dienten als Kontrollen. Als Zellviabilitäts- bzw. Zytotoxizitätstests wurden der CellTiter-Glo™, der CytoTox-Glo®, sowie der Neutralrot-Test verwendet. Mithilfe des BrdU-Proliferationstests wurde das Zellwachstum der Tumorzellen unter Inkubation mit den Extrakten überprüft. Als ergänzende Untersuchung der Zellviabilität diente die einmalige Energiestoffwechselformung des Nährmediums der Tumorzellen.

In den Zellviabilitäts-, sowie Zytotoxizitätstests zeigte sich eine deutliche konzentrationsabhängige Reduktion der Tumorzellpopulation beider Zellreihen, die in allen Tests unter den Extraktverdünnungen 100 %, 50 %, 45 % und 40 % signifikant messbar war. Teilweise konnte auch unter der 35%igen Verdünnung der Knoblauchextrakte noch eine signifikante Reduktion der Zellzahl verzeichnet werden. Der BrdU-Proliferationstest ergab im Wesentlichen in Übereinstimmung mit den Viabilitätstest eine signifikante Reduktion der Zellproliferation unter den Extraktverdünnungen 100 %, 50 % und 45 % beider Phytoextrakte. In der Tendenz reagierten die RL95-2 Zellen etwas sensibler auf die zugeführten Knoblauchextrakte als die Zellen der Linie Ishikawa. Dies zeichnete sich in den Zelltests durch Erreichen des Signifikanzniveaus

unter höheren Extraktverdünnungen bzw. stärkere Reduktion der Zellzahl unter gleichen Extraktkonzentrationen ab.

Die Stoffwechseluntersuchung stützte die Ergebnisse der vorangegangenen Zelltests vor allem bei der Zelllinie RL95-2. Hier zeichnete sich unter beiden Knoblauchextrakten eine reduzierte Zellstoffwechsellaage bis zu einer Extraktkonzentration von 45 % des PE1 und 35 % des PE2 ab. Die einmalig durchgeführte Untersuchung lieferte bei den Ishikawa Zellen dahingegen keine deutlichen Ergebnisse.

Unter den untersuchten Polyphenolen entfaltete vor allem Luteolin einen zytotoxischen, sowie proliferationshemmenden Effekt auf die Endometriumkarzinomzellen beider Zellreihen. Einzig im CellTiter-Glo® Test konnte keine signifikante zytotoxische Wirkung des isolierten Flavonoids abgebildet werden. Luteolin-7-glykosid zeigte ebenfalls eine gewisse regressive Wirkung vorrangig auf die Zellen der Linie Ishikawa, deren Zellpopulation, sowie Zellreplikation im CytoTox-Glo™, sowie BrdU-Proliferationstest durch Luteolin-7-glykosid signifikant um mehr als 50 % reduziert erschien. Im CytoTox-Glo™ Test wurde jedoch auch ein geringer zytotoxischer Effekt des Lösungsmittels von Luteolin-7-glykosid, das zu gleichen Teilen aus 99%igem und DMSO bestand, auf die Tumorzellen gemessen. Die Wirkung des Flavons auf die untersuchten Zelllinien kann dementsprechend nur eingeschränkt beurteilt werden.

Kaffeensäure zeigte im BrdU-Proliferationstest eine signifikant antiproliferative Wirkung auf die Ishikawa Zellen und im CellTiter-Glo® einen leichten, aber dennoch signifikanten zytotoxischen Effekt auf die Zellen der Linie RL95-2. In den übrigen Zelltests erwies sich Kaffeensäure in der gewählten Konzentration nicht als zytotoxisch auf die untersuchten Tumorzellen. Die Inkubation der Zellen mit Folsäure zeigte keinen Einfluss auf die Zellpopulationen der Ishikawa und RL95-2 Zellen.

Die Kontrollen Tamoxifen und Endoxifen hatten in allen durchgeführten Tests eine starke zytotoxische Wirkung. Unter Estradiol war kaum eine stimulierende Wirkung auf die Endometriumkarzinomzellen zu verzeichnen.

VII. AUSBLICK

Inwieweit sich die Ergebnisse dieser Arbeit in Konzepte zur Prävention und Therapie des EC, aber auch anderer Karzinomerkrankungen integrieren lassen, bleibt zukünftig zu eruieren. Antiproliferative und proapoptotische Effekte von Knoblauchextrakten konnten bereits an diversen humanen Karzinomzelllinien darunter Mamma-, Kolon-, Prostata- und Magenkarzinomzellen nachgewiesen werden [10, 111, 137, 161, 169]. In dieser In-Vitro-Pilotstudie war der hemmende Einfluss zweier Knoblauchextrakte auch auf die östrogenrezeptorpositiven Endometriumkarzinomzellen Ishikawa und RL95-2 darstellbar. Die Wirkung entfaltete sich konzentrationsabhängig und führte insbesondere in den hohen Konzentrationen der Extrakte zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität und Zellproliferation der Tumorzellen. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass Knoblauch, sowie einzelne bioaktive Komponenten wie Alliin zur Reduktion chemotherapieassoziiierter Nebenwirkungen beitragen können [145, 159]. Lee et al. konnten darüber hinaus eine erhöhte zytotoxische Aktivität bei PatientInnen unter Chemotherapie feststellen, die Knoblauch als Bestandteil einer therapiebegleitenden personalisierten Diät erhielten [109]. Ein therapiebegleitender, sowie gezielt präventiver Einsatz von Knoblauch und Knoblauchpräparaten wäre auch beim Endometriumkarzinom denkbar. Durch seine antihypertensive, antioxidative und antiinflammatorische Wirkung könnte Knoblauch auch zur Modulation wichtiger Risikofaktoren des ECs beitragen. Trotz zahlreicher auf dem Markt verfügbarer Knoblauchpräparate ist jedoch noch weitaus mehr Forschung notwendig um effektive Darreichungsformen und wirksame Anwendungskonzepte zu finden.

Bei pflanzlichen Extrakten handelt es sich um Vielstoffgemische, deren Gesundheitseffekte meist weniger auf einzelne Inhaltsstoffe zurückzuführen sind, sondern das Ergebnis synergistischer Wirkung diverser bioaktiver Komponenten darstellen. Das Wissen zu diesen komplexen Interaktionen ist bislang jedoch limitiert. Dabei kann das Vorhandensein bestimmter Inhaltsstoffe, sowie deren Kombination sowohl zur Potenzierung der Wirkung einzelner Substanzen beitragen, als auch deren Aufnahme und Bioverfügbarkeit steigern [27, 99]. Weiterführende Untersuchungen könnten sich insbesondere der kombinierten Wirkung verschiedener im Knoblauch enthaltener Polyphenole widmen, die möglicherweise die Wirkeffektivität der in dieser Arbeit isoliert getesteten Substanzen deutlich übersteigen könnte. Auch die synergistische Wirkung der Polyphenole mit den schwefelhaltigen Verbindungen wie Alliin und den Diallylsulfiden könnte wesentlich zur Erweiterung des Verständnisses der antikanzerogenen Wirkung von Knoblauch beitragen.

Ungeklärt blieb in dieser Arbeit die mögliche Rolle des Östrogenrezeptors in der Wirkung der Extrakte, sowie der Polyphenole. Eine vergleichende Testung östrogenpositiver sowie östrogennegativer Zellen könnte hier weiterführende Ergebnisse liefern. Auch die Untersuchung der Dosis-Wirkungs-Beziehung der Polyphenole Luteolin, Luteolin-7-glucoside und Kaffeesäure auf das Wachstum und die Viabilität von Endometriumkarzinomzellen sollte zur Evaluation des präventiven und therapeutischen Potenzials der Substanzen, sowie zum Ausschluss averser Effekte erfolgen.

VIII. THESEN

1. Das Endometriumkarzinom ist der häufigste Genitaltumor bei Frauen in Industrienationen. Die Inzidenz der Erkrankung ist weltweit steigend.
2. Es gibt Hinweise darauf, dass Lifestyle Faktoren wie Ernährung eine Rolle in der weltweit ungleichen Verteilung der Inzidenz des Endometriumkarzinoms spielen.
3. In epidemiologischen Studien ist der regelmäßige Konsum von Knoblauch mit einer Risikoreduktion für bestimmte Tumorerkrankungen verbunden. Auch das Endometriumkarzinom trat in Assoziation mit erhöhtem Konsum von Lauchgemüse, besonders Zwiebeln und Knoblauch seltener auf.
4. Polyphenole sind mit einer Vielzahl gesundheitsfördernder Eigenschaften, darunter auch einer tumorpräventiven Wirkung assoziiert. Es gibt gute Hinweise darauf, dass Polyphenole zu der antikanzerogenen Wirkung von Obst und Gemüse beitragen.
5. In der HPLC-Analyse der ethanolbasierten Phytoextrakte aus weißem und violetterm Knoblauch gelingt der Nachweis von Folsäure, Kaffeesäure und Luteolin-7-glykosid. Die Flavanoide Quercetin, Rutin und Kaempferol können dahingegen nicht isoliert werden. Der Nachweis von Luteolin in den Extrakten ist fraglich.
6. Der durch die Immunhistochemie überprüfte Hormonrezeptorstatus der Ishikawa und RL95-2 Zellen entspricht den Angaben der Zellbank. Beide Zelllinien weisen sowohl Östrogenrezeptoren der Subtypen ER- α und ER- β , als auch Progesteronrezeptoren auf.
7. Die In-vitro-Zelltests zeigen eine dosisabhängige zytotoxische und antiproliferative Wirkung der ethanolbasierten Extrakte aus getrocknetem Knoblauch auf die Endometriumkarzinomzellen Ishikawa und RL95-2. Besonders in hohen Konzentrationen der Extrakte lässt sich eine signifikante Reduktion der Zellpopulation, sowie des Zellwachstums feststellen.
8. Die Referenz Luteolin (1,43 $\mu\text{g/ml}$) wirkt sowohl zytotoxisch, als auch proliferationshemmend auf die untersuchten Endometriumkarzinomzellen.

9. Luteolin-7-glucoside (2,24 µg/ml) zeigt eine gewisse regressive Wirkung auf die Zellviabilität und die Zellproliferation, die jedoch weiterer Evaluation wahlweise unter Ermittlung der Dosis-Wirkungs-Beziehung von Luteolin-7-glucoside bedarf.
10. Kaffeesäure (0,9 µg/ml) wirkt proliferationshemmend auf die Zellen der Linie Ishikawa.
11. Folsäure (1,0 µg/ml) hat keinen Einfluss auf die Zellviabilität und das Wachstum der Ishikawa und RL95-2 Tumorzellen.
12. Die Kontrollen Tamoxifen (5,6 µg/ml) und Endoxifen (6,2 µg/ml) wirken signifikant zytotoxisch und antiproliferativ auf die Endometriumkarzinomzellen Ishikawa und RL95-2.
13. Die 24-stündige Inkubation der Endometriumkarzinomzellen mit Estradiol (10^{-7} mol/l) hat keine signifikante stimulierende Wirkung.
14. Zum Verständnis und der Evaluation des präventiven und therapeutischen Potentials von *Allium sativum* auf das Endometriumkarzinom, sowie seiner bioaktiven Inhaltsstoffe sind weitere Studien notwendig.

IX. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] ADAN, Aysun ; KIRAZ, Yağmur ; BARAN, Yusuf: *Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays*. In: *Current pharmaceutical biotechnology* 17 (2016), Nr. 14, S. 1213–1221
- [2] AKHTAR, Iqra ; JAVAD, Sumera ; YOUSAF, Zubaida ; IQBAL, Sumera ; JABEEN, Khajista: *Review: Microwave assisted extraction of phytochemicals an efficient and modern approach for botanicals and pharmaceuticals*. In: *Pakistan journal of pharmaceutical sciences* 32 (2019), Nr. 1, S. 223–230
- [3] AMAGASE, Harunobu: *Clarifying the real bioactive constituents of garlic*. In: *The Journal of nutrition* 136 (2006), 3 Suppl, 716S-725S
- [4] AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH: *Diet, nutrition, physical activity and endometrial cancer*. URL <https://www.aicr.org/wp-content/uploads/2020/01/Endometrial-Cancer-2013-Report.pdf>
- [5] ANNIBALDI, Alessandro ; WIDMANN, Christian: *Glucose metabolism in cancer cells*. In: *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 13 (2010), Nr. 4, S. 466–470
- [6] ANSARY, Johura ; FORBES-HERNÁNDEZ, Tamara Yuliett ; GIL, Emilio ; CIANCIOSI, Danila ; ZHANG, Jiaojiao ; ELEXPURU-ZABALETA, Maria ; SIMAL-GANDARA, Jesus ; GIAMPIERI, Francesca ; BATTINO, Maurizio: *Potential Health Benefit of Garlic Based on Human Intervention Studies: A Brief Overview*. In: *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 9 (2020), Nr. 7
- [7] ARMSTRONG, Amy J. ; HURD, William W. ; ELGUERO, Sonia ; BARKER, Nichole M. ; ZANOTTI, Kristine M.: *Diagnosis and management of endometrial hyperplasia*. In: *Journal of minimally invasive gynecology* 19 (2012), Nr. 5, S. 562–571
- [8] ATCC: *RL95-2 Product Information : CRL-1671*. URL <https://www.atcc.org/products/crl-1671#detailed-product-information>
- [9] AZZIZ, Ricardo ; WOODS, Keslie S. ; REYNA, Rosario ; KEY, Timothy J. ; KNOCHENHAUER, Eric S. ; YILDIZ, Bulent O.: *The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population*. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89 (2004), Nr. 6, S. 2745–2749

- [10] BAGUL, Mukta ; KAKUMANU, Srikanth ; WILSON, Thomas A.: *Crude Garlic Extract Inhibits Cell Proliferation and Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis of Cancer Cells In Vitro*. In: *Journal of medicinal food* 18 (2015), Nr. 7, S. 731–737
- [11] BANDERA, Elisa V. ; GIFKINS, Dina M. ; MOORE, Dirk F. ; MCCULLOUGH, Marjorie L. ; KUSHI, Lawrence H.: *ANTIOXIDANT VITAMINS AND THE RISK OF ENDOMETRIAL CANCER: A DOSE-RESPONSE META-ANALYSIS*. In: *Cancer causes & control : CCC* 20 (2008), Nr. 5, S. 699–711
- [12] BANDERA, Elisa V. ; KUSHI, Lawrence H. ; MOORE, Dirk F. ; GIFKINS, Dina M. ; MCCULLOUGH, Marjorie L.: *Association between dietary fiber and endometrial cancer: a dose-response meta-analysis*. In: *The American journal of clinical nutrition* 86 (2007), Nr. 6, S. 1730–1737
- [13] BANDERA, Elisa V. ; KUSHI, Lawrence H. ; MOORE, Dirk F. ; GIFKINS, Dina M. ; MCCULLOUGH, Marjorie L.: *Consumption of animal foods and endometrial cancer risk: a systematic literature review and meta-analysis*. In: *Cancer causes & control : CCC* 18 (2007), Nr. 9, S. 967–988
- [14] BANNO, Kouji ; YANOKURA, Megumi ; IIDA, Miho ; MASUDA, Kenta ; AOKI, Daisuke: *Carcinogenic mechanisms of endometrial cancer: involvement of genetics and epigenetics*. In: *The journal of obstetrics and gynaecology research* 40 (2014), Nr. 8, S. 1957–1967
- [15] BARAŃSKI, Marcin ; SREDNICKA-TOBER, Dominika ; VOLAKAKIS, Nikolaos ; SEAL, Chris ; SANDERSON, Roy ; STEWART, Gavin B. ; BENBROOK, Charles ; BIAVATI, Bruno ; MARKELLOU, Emilia ; GIOTIS, Charilaos ; GROMADZKA-OSTROWSKA, Joanna ; REMBIAŁKOWSKA, Ewa ; SKWARŁO-SOŃTA, Krystyna ; TAHVONEN, Raija ; JANOVSKÁ, Dagmar ; NIGGLI, Urs ; NICOT, Philippe ; LEIFERT, Carlo: *Higher antioxidant and lower cadmium concentrations and lower incidence of pesticide residues in organically grown crops: a systematic literature review and meta-analyses*. In: *The British journal of nutrition* 112 (2014), Nr. 5, S. 794–811
- [16] BARLIN, Joyce N. ; PURI, Isha ; BRISTOW, Robert E.: *Cytoreductive surgery for advanced or recurrent endometrial cancer: a meta-analysis*. In: *Gynecologic oncology* 118 (2010), Nr. 1, S. 14–18

- [17] BARONE, Bethany B. ; YEH, Hsin-Chieh ; SNYDER, Claire F. ; PEAIRS, Kimberly S. ; STEIN, Kelly B. ; DERR, Rachel L. ; WOLFF, Antonio C. ; BRANCATI, Frederick L.: *Long-term all-cause mortality in cancer patients with preexisting diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis*. In: *JAMA* 300 (2008), Nr. 23, S. 2754–2764
- [18] BARRY, John A. ; AZIZIA, Mallika M. ; HARDIMAN, Paul J.: *Risk of endometrial, ovarian and breast cancer in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis*. In: *Human reproduction update* 20 (2014), Nr. 5, S. 748–758
- [19] BEATO, Victor Manuel ; ORGAZ, Francisco ; MANSILLA, Francisco ; MONTAÑO, Alfredo: *Changes in phenolic compounds in garlic (*Allium sativum* L.) owing to the cultivar and location of growth*. In: *Plant foods for human nutrition (Dordrecht, Netherlands)* 66 (2011), Nr. 3, S. 218–223
- [20] BEINING, Robin M. ; DENNIS, Leslie K. ; SMITH, Elaine M. ; DOKRAS, Anuja: *Meta-analysis of intrauterine device use and risk of endometrial cancer*. In: *Annals of epidemiology* 18 (2008), Nr. 6, S. 492–499
- [21] BIO-RAD LABORATORIES: *Cell Proliferation Products and Tips : Tools to Accurately Assess Proliferation*. URL https://www.bio-rad-antibodies.com/brdu-bromodeoxyuridine.html?JSESSIONID_STERLING=FAE844DBA5F572D3C578CBC585D23BE2.ecommerce1&evCntryLang=DE-de&cntry=DE&thirdPartyCookieEnabled=true
- [22] BJØRGE, Tone ; STOCKS, Tanja ; LUKANOVA, Annekatrin ; TRETTLI, Steinar ; SELMER, Randi ; MANJER, Jonas ; RAPP, Kilian ; ULMER, Hanno ; ALMQUIST, Martin ; CONCIN, Hans ; HALLMANS, Göran ; JONSSON, Håkan ; STATTIN, Pär ; ENGELAND, Anders: *Metabolic syndrome and endometrial carcinoma*. In: *American journal of epidemiology* 171 (2010), Nr. 8, S. 892–902
- [23] BORENFREUND, Ellen ; PUERNER, James A.: *A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90)*. In: *Journal of Tissue Culture Methods* 9 (1985), Nr. 1, S. 7–9

- [24] BOTTONE, Frank G. ; BAEK, Seung Joon ; NIXON, Jennifer B. ; ELING, Thomas E.: *Diallyl disulfide (DADS) induces the antitumorigenic NSAID-activated gene (NAG-1) by a p53-dependent mechanism in human colorectal HCT 116 cells*. In: *The Journal of nutrition* 132 (2002), Nr. 4, S. 773–778
- [25] BRAITHWAITE, R. Scott ; CHLEBOWSKI, Rowan T. ; LAU, Joseph ; GEORGE, Suzanne ; HESS, Rachel ; COL, Nananda F.: *Meta-analysis of vascular and neoplastic events associated with tamoxifen*. In: *Journal of general internal medicine* 18 (2003), Nr. 11, S. 937–947
- [26] BRAVI, Francesca ; SCOTTI, Lorenza ; BOSETTI, Cristina ; GALLUS, Silvano ; NEGRI, Eva ; LA VECCHIA, Carlo ; TAVANI, Alessandra: *Coffee drinking and endometrial cancer risk: a metaanalysis of observational studies*. In: *American journal of obstetrics and gynecology* 200 (2009), Nr. 2, S. 130–135
- [27] BRGLEZ MOJZER, Eva ; KNEZ HRNČIČ, Maša ; ŠKERGET, Mojca ; KNEZ, Željko ; BREN, Urban: *Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects*. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 21 (2016), Nr. 7
- [28] CALLE, Eugenia E. ; KAAKS, Rudolf: *Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms*. In: *Nature reviews. Cancer* 4 (2004), Nr. 8, S. 579–591
- [29] CARCANGIU, Maria Luisa ; RADICE, Paolo ; CASALINI, Patrizia ; BERTARIO, Lucio ; MEROLA, Marina ; SALA, Paolo: *Lynch syndrome--related endometrial carcinomas show a high frequency of nonendometrioid types and of high FIGO grade endometrioid types*. In: *International journal of surgical pathology* 18 (2010), Nr. 1, S. 21–26
- [30] CHE, Qi ; XIAO, Xirong ; XU, Jun ; LIU, Miao ; LU, Yongning ; LIU, Suying ; DONG, Xi: *17β-Estradiol promotes endometrial cancer proliferation and invasion through IL-6 pathway*. In: *Endocrine connections* 8 (2019), Nr. 7, S. 961–968
- [31] CHITTENDEN, B. G. ; FULLERTON, G. ; MAHESHWARI, A. ; BHATTACHARYA, S.: *Polycystic ovary syndrome and the risk of gynaecological cancer: a systematic review*. In: *Reproductive BioMedicine Online* 19 (2009), Nr. 3, S. 398–405

- [32] CHO, Ming-Hsuang ; NILES, Andrew ; HUANG, Ruili ; INGLESE, James ; AUSTIN, Christopher P. ; RISS, Terry ; XIA, Menghang: *A bioluminescent cytotoxicity assay for assessment of membrane integrity using a proteolytic biomarker*. In: *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA 22* (2008), Nr. 4, S. 1099–1106
- [33] CLARKE, Megan A. ; LONG, Beverly J. ; DEL MAR MORILLO, Arena ; ARBYN, Marc ; BAKKUM-GAMEZ, Jamie N. ; WENTZENSEN, Nicolas: *Association of Endometrial Cancer Risk With Postmenopausal Bleeding in Women: A Systematic Review and Meta-analysis*. In: *JAMA internal medicine* 178 (2018), Nr. 9, S. 1210–1222
- [34] COLLABORATIVE GROUP ON EPIDEMIOLOGICAL STUDIES ON ENDOMETRIAL CANCER: *Endometrial cancer and oral contraceptives: an individual participant meta-analysis of 27 276 women with endometrial cancer from 36 epidemiological studies*. In: *The Lancet Oncology* 16 (2015), Nr. 9, S. 1061–1070
- [35] CONCIN, Nicole ; MATIAS-GUIU, Xavier ; VERGOTE, Ignace ; CIBULA, David ; MIRZA, Mansoor Raza ; MARNITZ, Simone ; LEDERMANN, Jonathan ; BOSSE, Tjalling ; CHARGARI, Cyrus ; FAGOTTI, Anna ; FOTOPOULOU, Christina ; GONZALEZ MARTIN, Antonio ; LAX, Sigurd ; LORUSSO, Domenica ; MARTH, Christian ; MORICE, Philippe ; NOUT, Remi A. ; O'DONNELL, Dearbhaile ; QUERLEU, Denis ; RASPOLLINI, Maria Rosaria ; SEHOULI, Jalid ; STURDZA, Alina ; TAYLOR, Alexandra ; WESTERMANN, Anneke ; WIMBERGER, Pauline ; COLOMBO, Nicoletta ; PLANCHAMP, François ; CREUTZBERG, Carien L.: *ESGO/ESTRO/ESP guidelines for the management of patients with endometrial carcinoma*. In: *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society* 31 (2021), Nr. 1, S. 12–39
- [36] CROSBIE, Emma J. ; ZWAHLEN, Marcel ; KITCHENER, Henry C. ; EGGER, Matthias ; RE-NEHAN, Andrew G.: *Body mass index, hormone replacement therapy, and endometrial cancer risk: a meta-analysis*. In: *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 19 (2010), Nr. 12, S. 3119–3130
- [37] D L WAY, D S GROSSO, J R DAVIS, E A SURWIT, C D CHRISTIAN: *Characterization of a new human endometrial carcinoma (RL95-2) established in tissue culture*. In: *In vitro* 19 (1983), 3 Pt 1, S. 147–158

- [38] DA VIOLANTE, Georges ; ZERROUK, Naima ; RICHARD, Isabelle ; PROVOT, Gérard ; CHAUMEIL, Jean Claude ; ARNAUD, Philippe: *Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures*. In: *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 25 (2002), Nr. 12, S. 1600–1603
- [39] DAI, Jin ; MUMPER, Russell J.: *Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties*. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 15 (2010), Nr. 10, S. 7313–7352
- [40] DAROOGHEGI MOFRAD, Manije ; MILAJERDI, Alireza ; KOOHDANI, Fariba ; SURKAN, Pamela J. ; AZADBAKHT, Leila: *Garlic Supplementation Reduces Circulating C-reactive Protein, Tumor Necrosis Factor, and Interleukin-6 in Adults: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials*. In: *The Journal of nutrition* 149 (2019), Nr. 4, S. 605–618
- [41] DEMICHELE, Angela ; TROXEL, Andrea B. ; BERLIN, Jesse A.: *Impact of Raloxifene or Tamoxifen Use on Endometrial Cancer Risk: A Population-Based Case-Control Study*. In: *Journal of Clinical Oncology* 26 (2008), Nr. 25, S. 4151–4159
- [42] DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR ERNÄHRUNG E.V.: *Fachinformationen : Sekundäre Pflanzenstoffe und ihre Wirkung auf die Gesundheit*. URL <https://www.dge.de/wissenschaft/weitere-publikationen/fachinformationen/sekundaere-pflanzenstoffe-und-ihre-wirkung/>. – Aktualisierungsdatum: 12/2014 – Überprüfungsdatum 2022-02-08
- [43] DEVOR, Eric J. ; GONZALEZ-BOSQUET, Jesus ; THIEL, Kristina W. ; LESLIE, Kimberly K.: *Genomic characterization of five commonly used endometrial cancer cell lines*. In: *International journal of oncology* 57 (2020), Nr. 6, S. 1348–1357
- [44] DGE: *12. Ernährungsbericht, Kapitel 5 - Prävention durch Ernährung*. URL <https://www.dge.de/wissenschaft/ernaehrungsberichte/ernaehrungsbericht-2012/kapitel-5/>
- [45] DGGG ; DKG: *S3-Leitlinie Endometriumkarzinom (2022)*. URL https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Endometriumkarzinom/Version_2/LL_Endometriumkarzinom_Langversion_2.0.pdf

- [46] DIRETTO, Gianfranco ; RUBIO-MORAGA, Angela ; ARGANDOÑA, Javier ; CASTILLO, Purificación ; GÓMEZ-GÓMEZ, Lourdes ; AHRAZEM, Oussama: *Tissue-Specific Accumulation of Sulfur Compounds and Saponins in Different Parts of Garlic Cloves from Purple and White Ecotypes*. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 22 (2017), Nr. 8
- [47] DOSSUS, Laure ; ALLEN, Naomi ; KAAKS, Rudolf: *Reproductive risk factors and endometrial cancer: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*. In: *International journal of cancer* 127 (2010), Nr. 2, S. 442–451
- [48] EL-SABER BATIHA, Gaber ; MAGDY BESHBIHY, Amany ; G WASEF, Lamiaa ; ELEWA, Yaser H. A. ; A AL-SAGAN, Ahmed ; ABD EL-HACK, Mohamed E. ; TAHA, Ayman E. ; M ABD-ELHAKIM, Yasmina ; PRASAD DEVKOTA, Hari: *Chemical Constituents and Pharmacological Activities of Garlic (Allium sativum L.): A Review*. In: *Nutrients* 12 (2020), Nr. 3
- [49] EPEDEMIOLOGISCHES KREBSREGISTER E.V. (GEKID), ZENTRUM FÜR KREBSREGISTRIERDATEN: *Endometriunkarzinom*. URL <file:///C:/Users/lenak/OneDrive/Dokumente/Doktorarbeit/Grafiken/EC%20DE%20nach%20Altersgruppen.pdf>
- [50] ESPÍN, Juan Carlos ; GONZÁLEZ-SARRÍAS, Antonio ; TOMÁS-BARBERÁN, Francisco A.: *The gut microbiota: A key factor in the therapeutic effects of (poly)phenols*. In: *Biochemical pharmacology* 139 (2017), S. 82–93
- [51] ESPOSITO, Katherine ; CHIODINI, Paolo ; COLAO, Annamaria ; LENZI, Andrea ; GIUGLIANO, Dario: *Metabolic syndrome and risk of cancer: a systematic review and meta-analysis*. In: *Diabetes care* 35 (2012), Nr. 11, S. 2402–2411
- [52] EVA ARNOLD: *Die HPLC-Anlage: einfach erklärt*. URL <https://mpl.loesungsfabrik.de/blog/hplc/hplc-anlage-einfach-erklaert>

- [53] FADER, Amanda N. ; ROQUE, Dana M. ; SIEGEL, Eric ; BUZA, Natalia ; HUI, Pei ; ABDELGHANY, Osama ; CHAMBERS, Setsuko ; SECORD, Angeles Alvarez ; HAVRILESKY, Laura ; O'MALLEY, David M. ; BACKES, Floor J. ; NEVADUNSKY, Nicole ; EDRAKI, Babak ; PIKAART, Dirk ; LOWERY, William ; ELSAHWI, Karim ; CELANO, Paul ; BELLONE, Stefania ; AZODI, Masoud ; LITKOUHI, Babak ; RATNER, Elena ; SILASI, Dan-Arin ; SCHWARTZ, Peter E. ; SANTIN, Alessandro D.: *Randomized Phase II Trial of Carboplatin-Paclitaxel Compared with Carboplatin-Paclitaxel-Trastuzumab in Advanced (Stage III-IV) or Recurrent Uterine Serous Carcinomas that Overexpress Her2/Neu (NCT01367002): Updated Overall Survival Analysis*. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 26 (2020), Nr. 15, S. 3928–3935
- [54] FELIX, Ashley S. ; GAUDET, Mia M. ; LA VECCHIA, Carlo: *Intrauterine devices and endometrial cancer risk: a pooled analysis of the Epidemiology of Endometrial Cancer Consortium*. In: *International journal of cancer* 136 (2015), Nr. 5, E410-22
- [55] FILMAN, D. J. ; BRAWN, R. J. ; DANDLIKER, W. B.: *Intracellular supravital stain delocalization as an assay for antibody-dependent complement-mediated cell damage*. In: *Journal of Immunological Methods* 6 (1975), Nr. 3, S. 189–207
- [56] FLEISCHAUER, A. T. ; ARAB, L.: *Garlic and cancer: a critical review of the epidemiologic literature*. In: *The Journal of nutrition* 131 (2001), 3s, 1032S-40S
- [57] FLEISCHAUER, A. T. ; POOLE, C. ; ARAB, L.: *Garlic consumption and cancer prevention: meta-analyses of colorectal and stomach cancers*. In: *The American journal of clinical nutrition* 72 (2000), Nr. 4, S. 1047–1052
- [58] FRAGA, César G. ; CROFT, Kevin D. ; KENNEDY, David O. ; TOMÁS-BARBERÁN, Francisco A.: *The effects of polyphenols and other bioactives on human health*. In: *Food & function* 10 (2019), Nr. 2, S. 514–528
- [59] FRIBERG, E. ; ORSINI, N. ; MANTZOROS, C. S. ; WOLK, A.: *Diabetes mellitus and risk of endometrial cancer: a meta-analysis*. In: *Diabetologia* 50 (2007), Nr. 7, S. 1365–1374
- [60] FRIEDENREICH, Christine ; CUST, Anne ; LAHMANN, Petra: *Anthropometric factors and risk of endometrial cancer: the European prospective investigation into cancer and nutrition*. In: *Cancer causes & control : CCC* 18 (2007), Nr. 4, S. 399–413

- [61] GALEONE, Carlotta ; PELUCCHI, Claudio ; DAL MASO, Luigino ; NEGRI, Eva ; MONTELLA, Maurizio ; ZUCCHETTO, Antonella ; TALAMINI, Renato ; LA VECCHIA, Carlo: *Allium vegetables intake and endometrial cancer risk*. In: *Public health nutrition* 12 (2009), Nr. 9, S. 1576–1579
- [62] GALEONE, Carlotta ; PELUCCHI, Claudio ; LEVI, Fabio ; NEGRI, Eva ; FRANCESCHI, Silvia ; TALAMINI, Renato ; GIACOSA, Attilio ; LA VECCHIA, Carlo: *Onion and garlic use and human cancer*. In: *The American journal of clinical nutrition* 84 (2006), Nr. 5, S. 1027–1032
- [63] GATES, Margaret A. ; TWOROGER, Shelley S. ; HECHT, Jonathan L. ; VIVO, Immaculata de ; ROSNER, Bernard ; HANKINSON, Susan E.: *A prospective study of dietary flavonoid intake and incidence of epithelial ovarian cancer*. In: *International journal of cancer* 121 (2007), Nr. 10, S. 2225–2232
- [64] GEY, Manfred H.: *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik*. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2015
- [65] GIERACH, Gretchen L. ; CHANG, Shih-Chen ; BRINTON, Louise A. ; LACEY, James V. ; HOLLENBECK, Albert R. ; SCHATZKIN, Arthur ; LEITZMANN, Michael F.: *Physical activity, sedentary behavior, and endometrial cancer risk in the NIH-AARP Diet and Health Study*. In: *International journal of cancer* 124 (2009), Nr. 9, S. 2139–2147
- [66] GOODARZI, Saied ; TABATABAEI, Mir Javad ; MOHAMMAD JAFARI, Razieh ; SHEMIRANI, Farzaneh ; TAVAKOLI, Saeed ; MOFASSERI, Mansur ; TOFIGHI, Zahra: *Cuminum cyminum fruits as source of luteolin- 7-O-glucoside, potent cytotoxic flavonoid against breast cancer cell lines*. In: *Natural product research* 34 (2020), Nr. 11, S. 1602–1606
- [67] GORINSTEIN, Shela ; LEONTOWICZ, Hanna ; LEONTOWICZ, Maria ; NAMIESNIK, Jacek ; NAJMAN, Kasia ; DRZEWIECKI, Jerzy ; CVIKROVÁ, Milena ; MARTINCOVÁ, Olga ; KATRICH, Elena ; TRAKHTENBERG, Simon: *Comparison of the main bioactive compounds and antioxidant activities in garlic and white and red onions after treatment protocols*. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 56 (2008), Nr. 12, S. 4418–4426
- [68] GRADY, D. ; GEBRETSADIK, T. ; KERLIKOWSKA, K. ; ERNSTER, V. ; PETITTI, D.: *Hormone replacement therapy and endometrial cancer risk: A meta-analysis*. In: *Obstetrics & Gynecology* 85 (1995), Nr. 2, S. 304–313

- [69] GRUBER, Christian J. ; TSCHUGGUEL, Walter ; SCHNEEBERGER, Christian ; HUBER, Johannes C.: *Production and actions of estrogens*. In: *The New England journal of medicine* 346 (2002), Nr. 5, S. 340–352
- [70] HAHM, Eun-Ryeong ; SINGH, Shivendra V.: *Diallyl trisulfide inhibits estrogen receptor- α activity in human breast cancer cells*. In: *Breast cancer research and treatment* 144 (2014), Nr. 1, S. 47–57
- [71] HAOULA, Zeina ; SALMAN, Maisa ; ATIOMO, William: *Evaluating the association between endometrial cancer and polycystic ovary syndrome*. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 27 (2012), Nr. 5, S. 1327–1331
- [72] HIROSE, M. ; TAKESADA, Y. ; TANAKA, H. ; TAMANO, S. ; KATO, T. ; SHIRAI, T.: *Carcinogenicity of antioxidants BHA, caffeic acid, sesamol, 4-methoxyphenol and catechol at low doses, either alone or in combination, and modulation of their effects in a rat medium-term multi-organ carcinogenesis model*. In: *Carcinogenesis* 19 (1998), Nr. 1, S. 207–212
- [73] HIRSCH, K. ; DANILENKO, M. ; GIAT, J. ; MIRON, T. ; RABINKOV, A. ; WILCHEK, M. ; MIRELMAN, D. ; LEVY, J. ; SHARONI, Y.: *Effect of purified allicin, the major ingredient of freshly crushed garlic, on cancer cell proliferation*. In: *Nutrition and cancer* 38 (2000), Nr. 2, S. 245–254
- [74] HUANG, Gloria S. ; GEBB, Juliana S. ; EINSTEIN, Mark H. ; SHAHABI, Shohreh ; NOVETSKY, Akiva P. ; GOLDBERG, Gary L.: *Accuracy of preoperative endometrial sampling for the detection of high-grade endometrial tumors*. In: *American journal of obstetrics and gynecology* 196 (2007), Nr. 3, 243.e1-5
- [75] HUANG, Jing ; YANG, Bing ; XIANG, Tingxiu ; PENG, Weiyan ; QIU, Zhu ; WAN, Jingyuan ; ZHANG, Li ; LI, Hongyuan ; LI, Hongzhong ; REN, Guosheng: *Diallyl disulfide inhibits growth and metastatic potential of human triple-negative breast cancer cells through inactivation of the β -catenin signaling pathway*. In: *Molecular nutrition & food research* 59 (2015), Nr. 6, S. 1063–1075
- [76] HUANG, Yi ; CAI, Xiaoyan ; QIU, Miaozen ; CHEN, Peisong ; TANG, Hongfeng ; HU, Yunzhao ; HUANG, Yuli: *Prediabetes and the risk of cancer: a meta-analysis*. In: *Diabetologia* 57 (2014), Nr. 11, S. 2261–2269

- [77] HUANG, Yun-Ju ; CHANG, Chih-Chao ; WANG, Yun-Ya ; CHIANG, Wen-Chang ; SHIH, Yin-Hwa ; SHIEH, Tzong-Ming ; WANG, Kai-Lee ; ALI, Mohamed ; HSIA, Shih-Min: *Adlay Testa (Coix lachryma-jobi L. var. Ma-yuen Stapf.) Ethanolic Extract and Its Active Components Exert Anti-Proliferative Effects on Endometrial Cancer Cells via Cell Cycle Arrest*. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 26 (2021), Nr. 7
- [78] HUI, Chang ; QI, Xie ; QIANYONG, Zhang ; XIAOLI, Peng ; JUNDONG, Zhu ; MANTIAN, Mi: *Flavonoids, flavonoid subclasses and breast cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies*. In: *PloS one* 8 (2013), Nr. 1, e54318
- [79] HWANG, Yu-Jin ; LEE, Eun-Ju ; KIM, Haeng-Ran ; HWANG, Kyung-A: *Molecular mechanisms of luteolin-7-O-glucoside-induced growth inhibition on human liver cancer cells: G2/M cell cycle arrest and caspase-independent apoptotic signaling pathways*. In: *BMB reports* 46 (2013), Nr. 12, S. 611–616
- [80] IMESCH, Patrick ; FEHR, Mathias K. ; FINK, Daniel: *Maligne epitheliale Tumoren des Corpus uteri (einschließlich des Karzinosarkoms)*. In: PETRU, Edgar; FINK, Daniel; KÖCHLI, Ossi R.; LOIBL, Sibylle (Hrsg.): *Praxisbuch Gynäkologische Onkologie*. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2019, S. 39–57
- [81] IMRAN, Muhammad ; RAUF, Abdur ; ABU-IZNEID, Tareq ; NADEEM, Muhammad ; SHARIATI, Mohammad Ali ; KHAN, Imtiaz Ali ; IMRAN, Ali ; ORHAN, Ilkay Erdogan ; RIZWAN, Muhammad ; ATIF, Muhammad ; GONDAL, Tanweer Aslam ; MUBARAK, Mohammad S.: *Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agent: A review*. In: *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 112 (2019), S. 108612
- [82] INOUE-CHOI, Maki ; ROBIEN, Kim ; MARIANI, Andrea ; CERHAN, James R. ; ANDERSON, Kristin E.: *Sugar-sweetened beverage intake and the risk of type I and type II endometrial cancer among postmenopausal women*. In: *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 22 (2013), Nr. 12, S. 2384–2394

- [83] INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER: *Cancer today : Estimated Numbers of in 2020, worldwide, Females, all ages*. URL https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=2&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1
- [84] INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER: *Cancer Attributable to Obesity*. URL <https://gco.iarc.fr/causes/obesity/tools-map>
- [85] INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER: *Cancer tomorrow*. URL https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/tables?types=0&sexes=2&mode=cancer&group_populations=1&multiple_populations=1&multiple_cancers=1&cancers=24&populations=991_992_993_994_995_996&num_path=3
- [86] JIANG, T. Alan: *Health Benefits of Culinary Herbs and Spices*. In: *Journal of AOAC International* 102 (2019), Nr. 2, S. 395–411
- [87] JO, Hwa Yeon ; KIM, Yona ; PARK, Hyung Woo ; MOON, Hyo Eun ; BAE, Seongtae ; KIM, JinWook ; KIM, Dong Gyu ; PAEK, Sun Ha: *The Unreliability of MTT Assay in the Cytotoxic Test of Primary Cultured Glioblastoma Cells*. In: *Experimental neurobiology* 24 (2015), Nr. 3, S. 235–245
- [88] JOHNSON, Nick ; BRYANT, Andrew ; MILES, Tracie ; HOGBERG, Thomas ; CORNES, Paul: *Adjuvant chemotherapy for endometrial cancer after hysterectomy*. In: *The Cochrane database of systematic reviews* (2011), Nr. 10, CD003175
- [89] JONES, Michael E. ; VAN LEEUWEN, Flora E. ; HOOGENDOORN, Wilhelmina E. ; MOURITS, Marian Je ; HOLLEMA, Harry ; VAN BOVEN, Hester ; PRESS, Michael F. ; BERNSTEIN, Leslie ; SWERDLOW, Anthony J.: *Endometrial cancer survival after breast cancer in relation to tamoxifen treatment: pooled results from three countries*. In: *Breast cancer research : BCR* 14 (2012), Nr. 3, R91

- [90] KAAKS, Rudolf ; LUKANOVA, Annetatrin ; KURZER, Mindy S.: *Obesity, endogenous hormones, and endometrial cancer risk: a synthetic review*. In: *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 11 (2002), Nr. 12, S. 1531–1543
- [91] KAMILOGLU, Senem ; SARI, Gulce ; OZDAL, Tugba ; CAPANOGLU, Esra: *Guidelines for cell viability assays*. In: *Food Frontiers* 1 (2020), Nr. 3, S. 332–349
- [92] KANGAS, L. ; GRÖNROOS, M. ; NIEMINEN, A. L.: *Bioluminescence of cellular ATP: a new method for evaluating cytotoxic agents in vitro*. In: *Medical biology* 62 (1984), Nr. 6, S. 338–343
- [93] KANIMOZHI, G. ; PRASAD, N. R.: *Anticancer Effect of Caffeic Acid on Human Cervical Cancer Cells*. In: Victor R. Preedy (Hrsg.): *Coffee in Health and Disease Prevention* : Elsevier, 2015, S. 655–661
- [94] KARAGEORGI, Stalo ; HANKINSON, Susan E. ; KRAFT, Peter ; VIVO, Immaculata de: *Reproductive factors and postmenopausal hormone use in relation to endometrial cancer risk in the Nurses' Health Study cohort 1976-2004*. In: *International journal of cancer* 126 (2010), Nr. 1, S. 208–216
- [95] KENNETH MURPHY, Casey Weaver: *Janeway Immunologie*. 9. Aufl. : Springer, 2018
- [96] KEUM, NaNa ; JU, Woong ; LEE, Dong Hoon ; DING, Eric L. ; HSIEH, Chung C. ; GOODMAN, Julie E. ; GIOVANNUCCI, Edward L.: *Leisure-time physical activity and endometrial cancer risk: dose-response meta-analysis of epidemiological studies*. In: *International journal of cancer* 135 (2014), Nr. 3, S. 682–694
- [97] KIM, Ji-Sang ; KANG, Ok-Ju ; GWEON, Oh-Cheon: *Comparison of phenolic acids and flavonoids in black garlic at different thermal processing steps*. In: *Journal of Functional Foods* 5 (2013), Nr. 1, S. 80–86
- [98] KIM, Jiyoung ; LEE, Ki Won: *Coffee and its Active Compounds are Neuroprotective*. In: Victor R. Preedy (Hrsg.): *Coffee in Health and Disease Prevention* : Elsevier, 2015, S. 423–427

- [99] KOK, Theo M. de ; VAN BREDA, Simone G. ; MANSON, Margaret M.: *Mechanisms of combined action of different chemopreventive dietary compounds: a review*. In: *European journal of nutrition* 47 Suppl 2 (2008), S. 51–59
- [100] KUHN, Elisabetta ; WU, Ren-Chin ; GUAN, Bin: *Identification of molecular pathway aberrations in uterine serous carcinoma by genome-wide analyses*. In: *Journal of the National Cancer Institute* 104 (2012), Nr. 19, S. 1503–1513
- [101] KUMAR, Suresh: *Dual inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes by allicin*. In: *Indian journal of pharmacology* 47 (2015), Nr. 4, S. 444–446
- [102] KURAMOTO, Hiroyuki (Hrsg.); NISHIDA, Masato (Hrsg.): *Cell and Molecular Biology of Endometrial Carcinoma*. Tokyo : Springer Japan, 2003
- [103] KWAK, Jin Sook ; KIM, Ji Yeon ; PAEK, Ju Eun ; LEE, You Jin ; KIM, Haeng-Ran ; PARK, Dong-Sik ; KWON, Oran: *Garlic powder intake and cardiovascular risk factors: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials*. In: *Nutrition research and practice* 8 (2014), Nr. 6, S. 644–654
- [104] LACEY, James V. ; CHIA, Victoria M. ; RUSH, Brenda B.: *Incidence rates of endometrial hyperplasia, endometrial cancer and hysterectomy from 1980 to 2003 within a large pre-paid health plan*. In: *International journal of cancer* 131 (2012), Nr. 8, S. 1921–1929
- [105] LACEY, James V. ; SHERMAN, Mark E. ; RUSH, Brenda B. ; RONNETT, Brigitte M. ; IOFFE, Olga B. ; DUGGAN, Máire A. ; GLASS, Andrew G. ; RICHESSON, Douglas A. ; CHATTERJEE, Nilanjan ; LANGHOLZ, Bryan: *Absolute risk of endometrial carcinoma during 20-year follow-up among women with endometrial hyperplasia*. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 28 (2010), Nr. 5, S. 788–792
- [106] LANZOTTI, Virginia: *The analysis of onion and garlic*. In: *Journal of Chromatography A* 1112 (2006), 1-2, S. 3–22
- [107] LAU, B. H.: *Suppression of LDL oxidation by garlic*. In: *The Journal of nutrition* 131 (2001), 3s, 985S-8S
- [108] LAUBY-SECRETAN, Béatrice ; SCOCCIANTI, Chiara ; LOOMIS, Dana ; GROSSE, Yann ; BIANCHINI, Franca ; STRAIF, Kurt: *Body Fatness and Cancer--Viewpoint of the IARC Working Group*. In: *The New England journal of medicine* 375 (2016), Nr. 8, S. 794–798

- [109] LEE, Ga-Yi ; LEE, Jong Jyun ; LEE, Seung-Min: *Antioxidant and Anticoagulant Status Were Improved by Personalized Dietary Intervention Based on Biochemical and Clinical Parameters in Cancer Patients*. In: *Nutrition and cancer* 67 (2015), Nr. 7, S. 1083–1092
- [110] LEITLINIENPROGRAMM ONKOLOGIE: *S3-Leitlinie, Diagnostik, Therapie und Nachsorge der Patientinnen mit Endometriumkarzinom : Leitlinie (Langversion)*. Version 1.0 - April 2018. URL https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Endometriumkarzinom/LL_Endometriumkarzinom_Langversion_1.0.pdf
- [111] LI, Zhiming ; LE, Wenjun ; CUI, Zheng: *A novel therapeutic anticancer property of raw garlic extract via injection but not ingestion*. In: *Cell death discovery* 4 (2018), S. 108
- [112] LIAO, Caiyun ; ZHANG, Dongyu ; MUNGO, Chemtai ; TOMPKINS, D. Andrew ; ZEIDAN, Amer M.: *Is diabetes mellitus associated with increased incidence and disease-specific mortality in endometrial cancer? A systematic review and meta-analysis of cohort studies*. In: *Gynecologic oncology* 135 (2014), Nr. 1, S. 163–171
- [113] LIBOSKA, Radek ; LIGASOVÁ, Anna ; STRUNIN, Dmytro ; ROSENBERG, Ivan ; KOBERNA, Karel: *Most anti-BrdU antibodies react with 2'-deoxy-5-ethynyluridine -- the method for the effective suppression of this cross-reactivity*. In: *PloS one* 7 (2012), Nr. 12, e51679
- [114] LITTMAN, A. J. ; BERESFORD, S. A. ; WHITE, E.: *The association of dietary fat and plant foods with endometrial cancer (United States)*. In: *Cancer causes & control : CCC* 12 (2001), Nr. 8, S. 691–702
- [115] LU, Karen H. ; SCHORGE, John O. ; RODABAUGH, Kerry J. ; DANIELS, Molly S. ; SUN, Charlotte C. ; SOLIMAN, Pamela T. ; WHITE, Kristin G. ; LUTHRA, Rajyalakshmi ; GERSHENSON, David M. ; BROADDUS, Russell R.: *Prospective Determination of Prevalence of Lynch Syndrome in Young Women With Endometrial Cancer*. In: *Journal of Clinical Oncology* 25 (2007), Nr. 33, S. 5158–5164
- [116] LUBIO SCIENCE THE REAGENT PLATFORM: *BRDU CELL PROLIFERATION ASSAY*. URL <https://www.lubio.ch/supplier/cell-biolabs/>
- [117] MACCELLI, Alessandro ; CESA, Stefania ; CAIRONE, Francesco: *Metabolic profiling of different wild and cultivated Allium species based on high-resolution mass spectrometry, high-performance liquid chromatography-photodiode array detector, and color analysis*. In: *Journal of mass spectrometry : JMS* 55 (2020), Nr. 11, e4525

- [118] MAHDI, Haider ; MESTER, Jessica L. ; NIZIALEK, Emily A. ; NGEOW, Joanne ; MICHENER, Chad ; ENG, Charis: *Germline PTEN, SDHB-D, and KLLN alterations in endometrial cancer patients with Cowden and Cowden-like syndromes: an international, multicenter, prospective study*. In: *Cancer* 121 (2015), Nr. 5, S. 688–696
- [119] MATIAS-GUIU, X. ; CATASUS, L. ; BUSSAGLIA, E. ; LAGARDA, H. ; GARCIA, A. ; PONS, C. ; MUÑOZ, J. ; ARGÜELLES, R. ; MACHIN, P. ; PRAT, J.: *Molecular pathology of endometrial hyperplasia and carcinoma*. In: *Human Pathology* 32 (2001), Nr. 6, S. 569–577
- [120] MERRITT, Melissa A. ; CRAMER, Daniel W.: *Molecular pathogenesis of endometrial and ovarian cancer*. In: *Cancer biomarkers : section A of Disease markers* 9 (2010), 1-6, S. 287–305
- [121] MIEAN, K. H. ; MOHAMED, S.: *Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants*. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 49 (2001), Nr. 6, S. 3106–3112
- [122] MODEM, Suhasini ; DICARLO, Stephen E. ; REDDY, Thipparthi R.: *Fresh Garlic Extract Induces Growth Arrest and Morphological Differentiation of MCF7 Breast Cancer Cells*. In: *Genes & cancer* 3 (2012), Nr. 2, S. 177–186
- [123] MORI, Akihisa ; NISHINO, Chikao ; ENOKI, Nobuyasu ; TAWATA, Shinkichi: *Cytotoxicity of plant flavonoids against HeLa cells*. In: *Phytochemistry* 27 (1988), Nr. 4, S. 1017–1020
- [124] MORPHISTO: *Laborchemikalien&Histologieservice*. URL <https://www.morphisto.de/service/immunhistochemie/>
- [125] MYUNG, S-K ; JU, W. ; CHOI, H. J. ; KIM, S. C.: *Soy intake and risk of endocrine-related gynaecological cancer: a meta-analysis*. In: *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology* 116 (2009), Nr. 13, S. 1697–1705
- [126] NAGELLA, Praveen ; THIRUVENGADAM, Muthu ; AHMAD, Ateeque ; YOON, Jae-Yeon ; CHUNG, Ill-Min: *Composition of Polyphenols and Antioxidant Activity of Garlic Bulbs Collected from Different Locations of Korea*. In: *Asian Journal of Chemistry* 26 (2014), Nr. 3, S. 897–902
- [127] NEIS, K. J. ; BRANDNER, P. ; SCHLENKER, M.: *Tamoxifen-induced hyperplasia of the endometrium*. In: *Contributions to gynecology and obstetrics* 20 (2000), S. 60–68

- [128] NELSON, Heidi D. ; HUMPHREY, Linda L. ; NYGREN, Peggy ; TEUTSCH, Steven M. ; ALLAN, Janet D.: *Postmenopausal hormone replacement therapy: scientific review*. In: *JAMA* 288 (2002), Nr. 7, S. 872–881
- [129] NEMES, Z. ; DIETZ, R. ; LÜTH, J. B. ; GOMBA, S. ; HACKENTHAL, E. ; GROSS, F.: *The pharmacological relevance of vital staining with neutral red*. In: *Experientia* 35 (1979), Nr. 11, S. 1475–1476
- [130] NEVEU, V. ; PEREZ-JIMÉNEZ, J. ; VOS, F. ; CRESPIY, V. ; DU CHAFFAUT, L. ; MENNEN, L. ; KNOX, C. ; EISNER, R. ; CRUZ, J. ; WISHART, D. ; SCALBERT, A.: *Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods*. In: *Database : the journal of biological databases and curation* 2010 (2010), bap024
- [131] NISHIDA, M. ; KASAHARA, K. ; KANEKO, M. ; IWASAKI, H. ; HAYASHI, K.: *Establishment of a new human endometrial adenocarcinoma cell line, Ishikawa cells, containing estrogen and progesterone receptors*. In: *Nihon Sanka Fujinka Gakkai zasshi* 37 (1985), Nr. 7, S. 1103–1111
- [132] NISHIDA, Masato: *The Ishikawa cells from birth to the present*. In: *Human cell* 15 (2002), Nr. 3, S. 104–117
- [133] OLLBERDING, Nicholas J. ; LIM, Unhee ; WILKENS, Lynne R. ; SETIAWAN, Veronica Wendy ; SHVETSOV, Yurii B. ; HENDERSON, Brian E. ; KOLONEL, Laurence N. ; GOODMAN, Marc T.: *Legume, soy, tofu, and isoflavone intake and endometrial cancer risk in postmenopausal women in the multiethnic cohort study*. In: *Journal of the National Cancer Institute* 104 (2012), Nr. 1, S. 67–76
- [134] PALLADINO, Pasquale ; TORRINI, Francesca ; SCARANO, Simona ; MINUNNI, Maria: *3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as multi-colorimetric indicator of chlorine in water in line with health guideline values*. In: *Analytical and bioanalytical chemistry* 412 (2020), Nr. 28, S. 7861–7869
- [135] PATIL, B. S. ; PIKE, L. M. ; HAMILTON, B. K.: *Changes in quercetin concentration in onion (*Allium cepa* L.) owing to location, growth stage and soil type*. In: *New Phytologist* 130 (1995), Nr. 3, S. 349–355

- [136] PETROPOULOS, Spyridon ; FERNANDES, Ângela ; BARROS, Lillian ; CIRIC, Ana ; SOKOVIC, Marina ; FERREIRA, Isabel C. F. R.: *Antimicrobial and antioxidant properties of various Greek garlic genotypes*. In: *Food Chemistry* 245 (2018), S. 7–12
- [137] PETROVIC, Voin ; NEPAL, Anala ; OLAISEN, Camilla ; BACHKE, Siri ; HIRA, Jonathan ; SØGAARD, Caroline K. ; RØST, Lisa M. ; MISUND, Kristine ; ANDREASSEN, Trygve ; MELØ, Torun M. ; BARTSOVA, Zdenka ; BRUHEIM, Per ; OTTERLEI, Marit: *Anti-Cancer Potential of Homemade Fresh Garlic Extract Is Related to Increased Endoplasmic Reticulum Stress*. In: *Nutrients* 10 (2018), Nr. 4
- [138] PETRU, Edgar (Hrsg.); FINK, Daniel (Hrsg.); KÖCHLI, Ossi R. (Hrsg.); LOIBL, Sibylle (Hrsg.): *Praxisbuch Gynäkologische Onkologie*. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2019
- [139] PETTIT, George R. ; HOARD, Michael S. ; DOUBEK, Dennis L. ; SCHMIDT, Jean M. ; PETTIT, Robin K. ; TACKETT, Larry P. ; CHAPUIS, Jean-Charles: *Antineoplastic agents 338. The cancer cell growth inhibitory. Constituents of Terminalia arjuna (Combretaceae)*. In: *Journal of Ethnopharmacology* 53 (1996), Nr. 2, S. 57–63
- [140] PIAZZON, A. ; VRHOVSEK, U. ; MASUERO, D. ; MATTIVI, F. ; MANDOJ, F. ; NARDINI, M.: *Antioxidant activity of phenolic acids and their metabolites: synthesis and antioxidant properties of the sulfate derivatives of ferulic and caffeic acids and of the acyl glucuronide of ferulic acid*. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 60 (2012), Nr. 50, S. 12312–12323
- [141] PROMEGA: *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay : Instructions for Use of Products*. URL <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-glo-luminescent-cell-viability-assay-protocol.pdf>
- [142] PROMEGA: *CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay : Technical Bulletin*. URL <file:///C:/Users/lenak/Downloads/CytoTox%20Glo%20Cytotoxicity%20Assay%20TB359.pdf>
- [143] QI, Yue ; TAN, Mingzi ; ZHENG, Mingjun ; JIN, Shan ; WANG, Huimin ; LIU, Juanjuan ; WANG, Peiyao ; NIE, Xin ; GAO, Lingling ; LIN, Bei: *Estrogen/estrogen receptor promotes the proliferation of endometrial carcinoma cells by enhancing hMOF expression*. In: *Japanese journal of clinical oncology* 50 (2020), Nr. 3, S. 241–253

- [144] RAGLAN, Olivia ; KALLIALA, Ilkka ; MARKOZANNES, Georgios ; CIVIDINI, Sofia ; GUNTER, Marc J. ; NAUTIYAL, Jaya ; GABRA, Hani ; PARASKEVAIDIS, Evangelos ; MARTIN-HIRSCH, Pierre ; TSILIDIS, Kostas K. ; KYRGIU, Maria: *Risk factors for endometrial cancer: An umbrella review of the literature*. In: *International journal of cancer* 145 (2019), Nr. 7, S. 1719–1730
- [145] RAISUDDIN, Sheikh ; AHMAD, Shahazad ; FATIMA, Mahwash ; DABEER, Sadaf: *Toxicity of anticancer drugs and its prevention with special reference to role of garlic constituents*, 2018 (7)
- [146] RAJENDRA PRASAD, N. ; KARTHIKEYAN, A. ; KARTHIKEYAN, S. ; REDDY, Bandugula Venkata: *Inhibitory effect of caffeic acid on cancer cell proliferation by oxidative mechanism in human HT-1080 fibrosarcoma cell line*. In: *Molecular and cellular biochemistry* 349 (2011), 1-2, S. 11–19
- [147] RAZAVI, Pedram ; PIKE, Malcolm C. ; HORN-ROSS, Pamela L. ; TEMPLEMAN, Claire ; BERNSTEIN, Leslie ; URSIN, Giske: *Long-term postmenopausal hormone therapy and endometrial cancer*. In: *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 19 (2010), Nr. 2, S. 475–483
- [148] REI, Mariana ; RODRIGUES, Inês ; CONDEÇO, Pedro ; IGREJA, Fernando ; VERÍSSIMO, Carlos ; MENDINHOS, Gustavo: *Endometrial cancer: Preoperative versus intraoperative staging*. In: *Journal of gynecology obstetrics and human reproduction* (2019), S. 101647
- [149] REPETTO, Guillermo ; DEL PESO, Ana ; ZURITA, Jorge L.: *Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity*. In: *Nature protocols* 3 (2008), Nr. 7, S. 1125–1131
- [150] REXRODE, Kathryn M. ; PRADHAN, Aruna ; MANSON, Joann E. ; BURING, Julie E. ; RIDKER, Paul M.: *Relationship of total and abdominal adiposity with CRP and IL-6 in women*. In: *Annals of epidemiology* 13 (2003), Nr. 10, S. 674–682
- [151] RODRIGUES, A. S. ; PÉREZ-GREGORIO, M. R. ; GARCÍA-FALCÓN, M. S. ; SIMAL-GÁNDARA, J. ; ALMEIDA, D.P.F.: *Effect of meteorological conditions on antioxidant flavonoids in Portuguese cultivars of white and red onions*. In: *Food Chemistry* 124 (2011), Nr. 1, S. 303–308

- [152] SABINE SCHMITZ: *Der Experimentator: Der Experimentator*. 3. Aufl. : Spektrum, 2011
- [153] SAVELLI, L. ; CECCARINI, M. ; LUDOVISI, M. ; FRUSCELLA, E. ; IACO, P. A. de ; SALIZZONI, E. ; MABROUK, M. ; MANFREDI, R. ; TESTA, A. C. ; FERRANDINA, G.: *Preoperative local staging of endometrial cancer: transvaginal sonography vs. magnetic resonance imaging*. In: *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 31 (2008), Nr. 5, S. 560–566
- [154] SCHOTTENFELD, David: *CANCER Epidemiology and Prevention*. 3. Aufl. : OXFORD University Press, 2006
- [155] SEAL, Tapan: *Quantitative HPLC analysis of phenolic acids, flavonoids and ascorbic acid in four different solvent extracts of two wild edible leaves, Sonchus arvensis and Oenanthe linearis of North-Eastern region in India*. In: *Journal of Applied Pharmaceutical Science* (2016), S. 157–166
- [156] SEELINGER, Günter ; MERFORT, Irmgard ; WÖLFLE, Ute ; SCHEMP, Christoph M.: *Anti-carcinogenic effects of the flavonoid luteolin*. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 13 (2008), Nr. 10, S. 2628–2651
- [157] SETIAWAN, Veronica Wendy ; YANG, Hannah P.: *Type I and II endometrial cancers: have they different risk factors?* In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 31 (2013), Nr. 20, S. 2607–2618
- [158] SHABANI, Ehsan ; SAYEMIRI, Korosh ; MOHAMMADPOUR, Mohammadtaghi: *The effect of garlic on lipid profile and glucose parameters in diabetic patients: A systematic review and meta-analysis*. In: *Primary care diabetes* 13 (2019), Nr. 1, S. 28–42
- [159] SHANG, Ao ; CAO, Shi-Yu ; XU, Xiao-Yu ; GAN, Ren-You ; TANG, Guo-Yi ; CORKE, Harold ; MAVUMENGWANA, Vuyo ; LI, Hua-Bin: *Bioactive Compounds and Biological Functions of Garlic (Allium sativum L.)*. In: *Foods (Basel, Switzerland)* 8 (2019), Nr. 7
- [160] SHERMAN, Mark E. ; BUR, Martin E. ; KURMAN, Robert J.: *p53 in endometrial cancer and its putative precursors: Evidence for diverse pathways of tumorigenesis*. In: *Human Pathology* 26 (1995), Nr. 11, S. 1268–1274

- [161] SHIN, Seung-Shick ; SONG, Jun-Hui ; HWANG, Byungdoo ; NOH, Dae-Hwa ; PARK, Sung Lyea ; KIM, Won Tae ; PARK, Sung-Soo ; KIM, Wun-Jae ; MOON, Sung-Kwon: *HSPA6 augments garlic extract-induced inhibition of proliferation, migration, and invasion of bladder cancer EJ cells; Implication for cell cycle dysregulation, signaling pathway alteration, and transcription factor-associated MMP-9 regulation*. In: *PLoS one* 12 (2017), Nr. 2, e0171860
- [162] SHIRIN, H. ; PINTO, J. T. ; KAWABATA, Y. ; SOH, J. W. ; DELOHERY, T. ; MOSS, S. F. ; MURTY, V. ; RIVLIN, R. S. ; HOLT, P. R. ; WEINSTEIN, I. B.: *Antiproliferative effects of S-allylmercaptocysteine on colon cancer cells when tested alone or in combination with sulindac sulfide*. In: *Cancer research* 61 (2001), Nr. 2, S. 725–731
- [163] SHU, X. O. ; ZHENG, W. ; POTISCHMAN, N. ; BRINTON, L. A. ; HATCH, M. C. ; GAO, Y. T. ; FRAUMENI, J. F.: *A population-based case-control study of dietary factors and endometrial cancer in Shanghai, People's Republic of China*. In: *American journal of epidemiology* 137 (1993), Nr. 2, S. 155–165
- [164] SOBCZUK, Katarzyna ; SOBCZUK, Anna: *New classification system of endometrial hyperplasia WHO 2014 and its clinical implications*. In: *Przegląd menopauzalny = Menopause review* 16 (2017), Nr. 3, S. 107–111
- [165] SOINI, Tuuli ; HURSKAINEN, Ritva ; GRÉNMAN, Seija ; MÄENPÄÄ, Johanna ; PAAVONEN, Jorma ; PUKKALA, Eero: *Cancer risk in women using the levonorgestrel-releasing intrauterine system in Finland*. In: *Obstetrics and gynecology* 124 (2014), 2 Pt 1, S. 292–299
- [166] SRIDHAR, Adithya ; PONNUCHAMY, Muthamilselvi ; KUMAR, Ponnusamy Senthil ; KAPOOR, Ashish ; VO, Dai-Viet N. ; PRABHAKAR, Sivaraman: *Techniques and modeling of polyphenol extraction from food: a review*. In: *Environmental chemistry letters* 19 (2021), Nr. 4, S. 3409–3443
- [167] STAUBER, Manfred ; WEYERSTAHL, Thomas: *Gynäkologie und Geburtshilfe*. Stuttgart : Georg Thieme Verlag, 2007

- [168] STEFANO, Alessandro de ; CAPORALI, Sabrina ; DI DANIELE, Nicola ; ROVELLA, Valentina ; CARDILLO, Carmine ; SCHINZARI, Francesca ; MINIERI, Marilena ; PIERI, Massimo ; CANDI, Eleonora ; BERNARDINI, Sergio ; TESAURO, Manfredi ; TERRINONI, Alessandro: *Anti-Inflammatory and Proliferative Properties of Luteolin-7-O-Glucoside*. In: *International journal of molecular sciences* 22 (2021), Nr. 3
- [169] SU, Chin-Cheng ; CHEN, Guang-Wei ; TAN, Tzu-Wei ; LIN, Jaung-Gung ; CHUNG, Jing-Gung: *Crude extract of garlic induced caspase-3 gene expression leading to apoptosis in human colon cancer cells*. In: *In vivo (Athens, Greece)* 20 (2006), Nr. 1, S. 85–90
- [170] SUSAN MOYERS: *Garlic in health, history, and world cuisine* : Suncoast Press, 1996
- [171] TAKANO, M. ; OCHI, H. ; TAKEI, Y. ; MIYAMOTO, M. ; HASUMI, Y. ; KANETA, Y. ; NAKAMURA, K. ; KUROSAKI, A. ; SATOH, T. ; FUJIWARA, H. ; NAGAO, S. ; FURUYA, K. ; YOKOTA, H. ; ITO, K. ; MINEGISHI, T. ; YOSHIKAWA, H. ; FUJIWARA, K. ; SUZUKI, M.: *Surgery for endometrial cancers with suspected cervical involvement: is radical hysterectomy needed (a GOTIC study)?* In: *British journal of cancer* 109 (2013), Nr. 7, S. 1760–1765
- [172] TAN, Min-Han ; MESTER, Jessica L. ; NGEOW, Joanne ; RYBICKI, Lisa A. ; ORLOFF, Mohammed S. ; ENG, Charis: *Lifetime cancer risks in individuals with germline PTEN mutations*. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 18 (2012), Nr. 2, S. 400–407
- [173] TANG, Na-Ping ; LI, Hua ; QIU, Yun-Liang ; ZHOU, Guo-Min ; MA, Jing: *Tea consumption and risk of endometrial cancer: a metaanalysis*. In: *American journal of obstetrics and gynecology* 201 (2009), Nr. 6, 605.e1-8
- [174] TAO, M. H. ; XU, W. H. ; ZHENG, W. ; GAO, Y. T. ; RUAN, Z. X. ; CHENG, J. R. ; XIANG, Y. B. ; SHU, X. O.: *A case-control study in Shanghai of fruit and vegetable intake and endometrial cancer*. In: *British journal of cancer* 92 (2005), Nr. 11, S. 2059–2064
- [175] TARASCOU, I. ; SOUQUET, J. M. ; MAZAURIC, J. P. ; CARRILLO, S. ; COQ, S. ; CANON, F. ; FULCRAND, H. ; CHEYNIER, V.: *The hidden face of food phenolic composition*. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 501 (2010), Nr. 1, S. 16–22
- [176] TERRY L RISS, PHD, 1,* RICHARD A MORAVEC, BS,1 ANDREW L NILES, MS,1 SARAH: *The Assay Guidance Manual*. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/>. – Aktualisierungsdatum: updated july 2016

- [177] TIMMERMANS, Anne ; OPMEER, Brent C. ; KHAN, Khalid S. ; BACHMANN, Lucas M. ; EPSTEIN, Elisabeth ; CLARK, T. Justin ; GUPTA, Janesh K. ; BAKOUR, Shagaf H. ; VAN DEN BOSCH, Thierry ; VAN DOORN, Helena C. ; CAMERON, Sharon T. ; GIUSA, M. Gabriella ; DESSOLE, Stefano ; DIJKHUIZEN, F. Paul H. L. J. ; RIET, Gerben ter ; MOL, Ben W. J.: *Endometrial thickness measurement for detecting endometrial cancer in women with postmenopausal bleeding: a systematic review and meta-analysis*. In: *Obstetrics and gynecology* 116 (2010), Nr. 1, S. 160–167
- [178] TOMÁS-BARBERÁN, Francisco A. ; SELMA, María V. ; ESPÍN, Juan C.: *Interactions of gut microbiota with dietary polyphenols and consequences to human health*. In: *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 19 (2016), Nr. 6, S. 471–476
- [179] TRIMBLE, Cornelia L. ; KAUDERER, James ; ZAINO, Richard ; SILVERBERG, Steven ; LIM, Peter C. ; BURKE, James J. ; ALBERTS, David ; CURTIN, John: *Concurrent endometrial carcinoma in women with a biopsy diagnosis of atypical endometrial hyperplasia: a Gynecologic Oncology Group study*. In: *Cancer* 106 (2006), Nr. 4, S. 812–819
- [180] UCCELLA, S. ; MARIANI, A. ; WANG, A. H. ; VIERKANT, R. A. ; CLIBY, W. A. ; ROBIEN, K. ; ANDERSON, K. E. ; CERHAN, J. R.: *Intake of coffee, caffeine and other methylxanthines and risk of Type I vs Type II endometrial cancer*. In: *British journal of cancer* 109 (2013), Nr. 7, S. 1908–1913
- [181] VALERIE BERAL, DIANA BULL, GILLIAN REEVES, MILLION WOMEN STUDY COLLABORATORS: *Endometrial cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study*. In: *The Lancet* 365 (2005), Nr. 9470, S. 1543–1551
- [182] VAN DER STEEN-BANASIK, E. ; CHRISTIAENS, M. ; SHASH, E. ; COENS, C. ; CASADO, A. ; HERRERA, F. G. ; OTTEVANGER, P. B.: *Systemic review: Radiation therapy alone in medical non-operable endometrial carcinoma*. In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 65 (2016), S. 172–181
- [183] VECTOR LABORATORIES: *ImmPRESS Universal Reagent Kit : Anti-Mouse/Rabbit IgG. INSTRUCTIONS FOR IMMUNOHISTOCHEMICAL STAINING*. URL <https://www.lsbio.com/GenericProductDocuments/Vector%20Labs/DS-MP-7500.pdf>

- [184] VOSKUIL, Dorien W. ; MONNINKHOF, Evelyn M. ; ELIAS, Sjoerd G. ; VLEMS, Femke A. ; VAN LEEUWEN, Flora E.: *Physical activity and endometrial cancer risk, a systematic review of current evidence*. In: *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 16 (2007), Nr. 4, S. 639–648
- [185] WENG, Chia-Jui ; YEN, Gow-Chin: *Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives*. In: *Cancer treatment reviews* 38 (2012), Nr. 1, S. 76–87
- [186] WESTIN, Shannon N. ; LACOUR, Robin A. ; URBAUER, Diana L. ; LUTHRA, Rajyalakshmi ; BODURKA, Diane C. ; LU, Karen H. ; BROADDUS, Russell R.: *Carcinoma of the lower uterine segment: a newly described association with Lynch syndrome*. In: *Journal of Clinical Oncology* 26 (2008), Nr. 36, S. 5965–5971
- [187] WIN, Aung Ko ; REECE, Jeanette C. ; RYAN, Shae: *Family history and risk of endometrial cancer: a systematic review and meta-analysis*. In: *Obstetrics and gynecology* 125 (2015), Nr. 1, S. 89–98
- [188] WINCKLER, Jürgen: *Vitalfärbung von Lysosomen und anderen Zellorganellen der Ratte mit Neutralrot Vital Staining of Lysosomes and Other Cell Organelles of the Rat with Neutral Red*. In: *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* 6 (1974), Nr. 3, III-89
- [189] WISE, Michelle R. ; JORDAN, Vanessa ; LAGAS, Alice ; SHOWELL, Marian ; WONG, Nicole ; LENSEN, Sarah ; FARQUHAR, Cynthia M.: *Obesity and endometrial hyperplasia and cancer in premenopausal women: A systematic review*. In: *American journal of obstetrics and gynecology* 214 (2016), Nr. 6, 689.e1-689.e17
- [190] WITTEMER, S. M. ; PLOCH, M. ; WINDECK, T. ; MÜLLER, S. C. ; DREWELow, B. ; DERENDORF, H. ; VEIT, M.: *Bioavailability and pharmacokinetics of caffeoylquinic acids and flavonoids after oral administration of Artichoke leaf extracts in humans*. In: *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 12 (2005), 1-2, S. 28–38
- [191] WORMKE, Mark ; CASTRO-RIVERA, Emely ; CHEN, Ichen ; SAFE, Stephen: *Estrogen and aryl hydrocarbon receptor expression and crosstalk in human Ishikawa endometrial cancer cells*. In: *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 72 (2000), Nr. 5, S. 197–207

- [192] XIE, Qi ; CHEN, Ming-Liang ; QIN, Yu ; ZHANG, Qian-Yong ; XU, Hong-Xia ; ZHOU, Yong ; MI, Man-Tian ; ZHU, Jun-Dong: *Isoflavone consumption and risk of breast cancer: a dose-response meta-analysis of observational studies*. In: *Asia Pacific journal of clinical nutrition* 22 (2013), Nr. 1, S. 118–127
- [193] Yi, Lan ; SU, Qi: *Molecular mechanisms for the anti-cancer effects of diallyl disulfide*. In: *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 57 (2013), S. 362–370
- [194] YUN, Hyung-Mun ; BAN, Jung Ok ; PARK, Kyung-Ran ; LEE, Chong Kil ; JEONG, Heon-Sang ; HAN, Sang Bae ; HONG, Jin Tae: *Potential therapeutic effects of functionally active compounds isolated from garlic*. In: *Pharmacology & therapeutics* 142 (2014), Nr. 2, S. 183–195
- [195] ZENTRUM FÜR KREBSREGISTRIERDATEN: *Krebs in Deutschland I Gebärmutterkörperkrebs*. URL https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2021/kid_2021_c54_c55_gebaermutterkoerper.pdf?__blob=publicationFile
- [196] ZENTRUM FÜR KREBSREGISTRIERDATEN: *Gebärmutterkörperkrebs (Endometriumkarzinom)*. URL <https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Gebaermutterkoerperkrebs/gebaermutterkoerperkrebs.html>
- [197] ZHAI, Baiqiang ; ZHANG, Chuanhai ; SHENG, Yao ; ZHAO, Changhui ; HE, Xiaoyun ; XU, Wentao ; HUANG, Kunlun ; LUO, Yunbo: *Hypoglycemic and hypolipidemic effect of S-allyl-cysteine sulfoxide (alliin) in DIO mice*. In: *Scientific reports* 8 (2018), Nr. 1, S. 3527
- [198] ZHANG, Zhi-Hua ; SU, Pu-Yu ; HAO, Jia-Hu ; SUN, Ye-Huan: *The role of preexisting diabetes mellitus on incidence and mortality of endometrial cancer: a meta-analysis of prospective cohort studies*. In: *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society* 23 (2013), Nr. 2, S. 294–303
-
- [199] ZHOU, Bo ; YANG, Li ; SUN, Qingmin ; CONG, Rihong ; GU, Haijuan ; TANG, Naping ; ZHU, Huaijun ; WANG, Bin: *Cigarette smoking and the risk of endometrial cancer: a meta-analysis*. In: *The American journal of medicine* 121 (2008), Nr. 6, 501-508.e3

X. DANKSAGUNG

Ich möchte an dieser Stelle meiner Doktormutter Frau Priv.-Doz. Dr. Dagmar-Ulrike Richter für ihre umfassende Unterstützung über die gesamte Zeit des wissenschaftlichen Arbeitens im Labor, sowie des Schreibens dieser Arbeit meinen besonderen Dank aussprechen. Ich bedanke mich ebenfalls herzlich bei dem Team des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik Rostock für die hervorragende Unterstützung während meiner Labortätigkeit, sowie Professor Dr. Udo Jeschke für seine Hilfe in der Beurteilung der Ergebnisse der HPLC.

Meiner Familie, meinen Freunden und insbesondere meinem Vater möchte ich dafür danken mich über die gesamte Zeit so liebevoll begleitet zu haben.

XI. SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

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

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

Berlin

(Abgabedatum)

(Vollständige Unterschrift)

XII. ANHANG

Geräte und Material

| Laborgerät | Modell | Hersteller |
|------------------------------|---|---------------------------------|
| Sterilbank | HeraSafe™ | Kendro Laboratory Products |
| Brutschrank | FunctionLine | Heraeus Instruments GmbH, DE |
| Lichtmikroskop | Axiovert 40 C | Carl Zeiss AG, DE |
| Lichtmikroskop | Axiostar Plus | Carl Zeiss AG, DE |
| Mikroskop-Kamera | Leica DMI8 | Leica Camera AG, DE |
| HPLC | Smartline Manager 5000 Smartline Pump 1000 Smartline UV-Detektor 2500 (254 nm) Smartline RI-Detektor Smartline Column Thermostat HPLC-Vertex-Säule 250 x 4 mm, Eurospher 100-5 C 18 mit integrierter Vorsäule | Knauer, DE |
| HPLC- Software | ClarityChrome V 2.6 | Knauer |
| Mikrowellenprogramm-Software | Discover SP | CEM GmbH, DE |

ANHANG

| | | |
|-------------------------|--------------------------------------|--|
| Microsoft Exel | | Microsoft, USA |
| Microsoft Word | | Microsoft, USA |
| GloMax | GloMax Explorer | Promega, USA |
| Zentrifuge | Universal 320 R; ohne Bremse | Hettich AG, |
| Ultrazentrifuge | Biofuge pico | Heraeus Instruments GmbH |
| Kühlschrank | Liebherr Premium | Liebherr-International Deutschland GmbH, DE |
| Gefrierschrank | (- 20 °C) | Liebherr-International Deutschland GmbH, DE |
| Gefrierschrank | (- 80 °C) Herafreeze HFU586 PLUS-V14 | Heraeus Instruments GmbH, DE |
| Stickstoff-Kühlbehälter | -196 °C, Crystage System K Series | Worthington Industries, USA |
| Labormikrowelle | CEM Discover SP | CEM GmbH, DE |
| Rüttler | 25 °C | Amersham |
| Orbital Shaker | TPM-2 | SARSTEDT |
| Dampfsterilisator | Sterilab 25l , 2017-02_V2.00 | MMM Group |
| Waage | Sartorius Basic | Sartorius AG, DE |

ANHANG

| | | |
|------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| Feinwaage | Sartorius BP210 S-OCE | Sartorius AG, DE |
| Rotationsverdampfer | Concentrator 5301 | Eppendorf GmbH, DE |
| Luminometer | GloMax | Promega |
| pH - Elektrode | Orion 3 Star pH Benchtop | Thermo Scientific, USA |
| Vortex | REAX 2000 | Heidolph, DE |
| Rolle | RM 5 | Assistent |
| Pipettierhilfe | Pipetus™ | Hirschmann Laborgeräte GmbH, DE |
| ELISA-Multiwell-Reader | Microplate Reader 680 | Bio-Rad Laboratories Inc. , USA |
| Ultraschallbad | Emmi-H22 | EMAG-Technologies, DE |

Verbrauchsmaterialien

| Chemikalien | Hersteller | Lagerung |
|--|----------------------|----------|
| Händedesinfektionsmittel Sterilium R Classic pure | BODE Chemie GmbH, DE | RT |
| Flächendesinfektion BacilloI R AF | BODE Chemie GmbH, DE | RT |
| Aqua dest. | Eigenherstellung | RT |

ANHANG

| | | |
|--|--------------------------------------|-----------------|
| Ethanol 70% | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE | RT |
| Ethanol 99% | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE | RT |
| Trypsin-EDTA 10x (500 mg / l Trypsin, 2000 mg / l EDTA) | c.c.Pro GmbH, DE | Kühlschrank 4°C |
| Fetales Kälberserum | Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim | Kühlschrank 4°C |
| Amphotericin B (250µg / ml) | c.c.Pro GmbH, DE | Kühlschrank 4°C |
| Penicillin – Streptomycin (10.000 U Penicillin / ml, 10 mg Streptomycin /ml) | PAN™ BIOTECH | Kühlschrank 4°C |
| DMSO | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE | RT |
| PBS | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE | RT |
| Trypanblau Lösung 0,4% | Sigma Aldrich Cooperation, DE | RT |
| Formaldehydlösung FormaFix 4% gepuffert | Grimm MED Recycling GmbH, DE | |
| Wasserstoffperoxid 35% | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE | RT |
| Salzsäure 0,1 M HCL | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE | RT |
| Schwefelsäure 1 M H ₂ SO ₄ | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE | RT |
| Folsäure | Sigma Aldrich Cooperation, DE | RT |

ANHANG

| | | |
|---|---------------------------------------|-----------------|
| Kaffeensäure | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE | Kühlschrank 4°C |
| Luteolin | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE | Kühlschrank 4°C |
| Luteolin-7-glucosid | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE | Kühlschrank 4°C |
| Quercetin | Sigma Aldrich Cooperation, DE | RT |
| Rutin | Sigma Aldrich Cooperation, DE | RT |
| Estradiol | Sigma Aldrich Cooperation, DE | Kühlschrank 4°C |
| Tamoxifen | Sigma Aldrich Cooperation, DE | Kühlschrank 4°C |
| Endoxifen | Sigma Aldrich Cooperation, DE | Kühlschrank 4°C |
| Estrogen Receptor alpha antibody; Monoklonaler Antikörper | Biorbyt, GB | Kühlschrank 4°C |
| Estrogen Receptor beta antibody; Monoklonaler Antikörper | GeneTex, Inc., USA | Kühlschrank 4°C |
| Progesteron antibody; Monoklonaler Antikörper | Biorbyt, GB | Kühlschrank 4°C |
| Horse Serum (5%) | C.C.pro GmbH, DE | Kühlschrank 4°C |
| LineRed IHC (Substratkit für Peroxidase) | Linaris Biologische Produkte GmbH, DE | Kühlschrank 4°C |

ANHANG

| | | |
|--|-------------------------------|-------------------------|
| ImmPRESS™ HRP Universal Antibody (Anti-Mouse IgG/Anti-Rabbit IgG, Peroxidase) | Vector Laboratories, USA | Kühlschrank 4°C |
| CellTiter-Glo® -Glo® Luminescent Cell Viability Assay - Kit | Promega, USA | Gefrierschrank -20°C |
| CytoTox-Glo™™ Cytotoxicity Assay - Kit | Promega, USA | Gefrierschrank -20°C |
| Cell Proliferation ELISA BrdU (calorimetric) | Roche GmbH, Schweiz | Kühlschrank 4°C |
| In Vitro Toxicology Assay Kit Neutral Red Based | Sigma Aldrich Cooperation, DE | Kühlschrank 4°C |

| Nährmedium | Eigenschaften | Zusätze | Hersteller |
|------------|---|--|-------------|
| DMEM | Glukose 4,5 g / L L – Glutamin | 10 % FKS 2,5 ml Amphotericin B 1 ml Penicillin-Streptomycin | c.c.Pro, DE |
| DMEM: F-12 | 1:1 DMEM und F12 L – Glutamin Phenolrot | 10 % FKS 2,5 ml Amphotericin 1 ml Penicillin – Streptomycin Insulin 0,005 mg / ml | c.c.Pro, DE |