

Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und
Kinderchirurgie
Chirurgische Klinik I
Direktor: Professor Dr. med. C.-T. Germer

**Untersuchungen zum antikanzerogenen Potential von
Benzochinonen: Oxidativer Stress als Auslöser
zelltoxischer Effekte**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Ferdi Karaaslan
aus Kaufbeuren

Würzburg, November 2012

Referent: Prof. Dr. rer. nat. C. Otto
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. H. Wajant
Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 10.07.2013

Der Promovend ist Arzt.

Meinen Eltern

Elide & Salhattin,

meinen Geschwistern

Filiz, Yusuf, Saziye & Feliz.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Chemotherapie in der Onkologie	1
1.2	Oxidativer Stress.....	2
1.3	AVEMAR – ein medizinisches Nahrungsergänzungsmittel.....	7
1.4	Ziele der Arbeit.....	8
2	Fragen	10
3	Material und Methoden	11
3.1	Kulturmedien und Pufferlösung.....	11
3.2	Zelllinien.....	11
3.3	Die in dieser Arbeit untersuchten Stoffgemenge und Substanzen	13
3.4	Bestimmung der Zellvitalität.....	16
3.5	Bradford-Protein-Assay.....	20
3.6	Messung der Laktat-Produktion	21
3.7	Auswertung.....	22
4	Ergebnisse	23
4.1	Nachweis des wachstumshemmenden Effekts von AVEMAR	23
4.2	Untersuchungen zur Induktion von oxidativem Stress durch Benzochinone und AVEMAR.....	32
4.3	Nachweis wachstumshemmender Effekte weiterer Weizenprodukte.....	43
5	Beantwortung der Fragen	51
6	Diskussion	53
6.1	Chinon-vermittelter oxidativer Stress	53
6.2	Bedeutung von Benzochinonen für die zelltoxische Wirkung von AVEMAR	57
6.3	Bedeutung von AVEMAR in der Onkologie.....	59
7	Ausblick	65
8	Zusammenfassung	66
9	Publikationsverzeichnis	68
10	Literaturverzeichnis	69
11	Appendix	76
	Danksagung	
	Lebenslauf	

1 Einleitung

„Cancer is a leading cause of death worldwide and the total number of cases globally is increasing.”

(<http://www.who.int/features/qa/15/en/index.html>)

1.1 Chemotherapie in der Onkologie

Krebs stellt nach kardiovaskulären Erkrankungen die häufigste Todesursache in den Industrienationen dar. Die Weltgesundheitsorganisation WHO rechnet mit einem massiven Anstieg der Krebsinzidenz in den nächsten Jahrzehnten. Betrug die Zahl neuer Krebsfälle im Jahr 2007 weltweit noch ca. 11 Millionen, so werden für das Jahr 2030 mehr als 15 Millionen Neuerkrankungen prognostiziert (<http://www.who.int/features/qa/15/en/index.html>).

Fortschritte in der onkologischen Forschung haben dazu geführt, dass heute effektive und nebenwirkungsärmere Medikamente für die Krebstherapie zur Verfügung stehen (Deininger et al. 2005; Kawai und Akaza 2010). Das Konzept, Krebserkrankungen chemotherapeutisch zu behandeln, fand ihren Anfang in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts. Der deutsche Chemiker und Nobelpreisträger Paul Ehrlich führte erstmals chemische Modifizierungen an bekannten Arsenverbindungen durch, um ihre Nebenwirkung („Giftigkeit“) zu mindern, aber ihre Wirksamkeit zu erhalten. Dieses systematische Vorgehen führte 1909 zur Entdeckung von Salvarsan, einem arsenhaltigen Medikament zur Therapie der Syphilis. Ehrlichs Anstrengungen, mit der Strategie der gezielten chemischen Synthese auch Medikamente zur Krebsbehandlung zu entwickeln, blieben dagegen erfolglos.

Die Entdeckung eines der ersten Chemotherapeutika für die Onkologie beruhte auf einer zufälligen Beobachtung. Soldaten, die im ersten Weltkrieg mit Senfgas in Berührung kamen, wiesen weder im Knochenmark noch in Lymphknoten Immunkzellen auf. Die Behandlung von Lymphomen mit Senfgas erbrachte beeindruckende Ergebnisse. Jedoch wich die anfängliche Euphorie rasch der Ernüchterung, als deutlich wurde, dass die Remissionen nur von begrenzter Dauer waren. Bereits einige Jahre später wurden die ersten wirkungsvollen Fol-

säureantagonisten entwickelt. Methotrexat, ein Resultat dieser Entwicklung, wird auch heute noch regelmäßig in der Onkologie und in der Rheumatologie eingesetzt.

Bis in die 60er Jahre hinein waren allein Chirurgie und Bestrahlung die einzigen etablierten Therapieoptionen in der Onkologie. Mit der Erkenntnis, dass eine rein lokale Therapie, wie sie die Chirurgie und Bestrahlung darstellt, im Hinblick auf unerkannte Mikrometastasen zur Kuration oftmals nicht ausreicht, erlangte die systemisch verabreichte Chemotherapie eine größere Bedeutung. Erstmals wurden solide Tumore, wie das Mammakarzinom oder das kolorektale Karzinom, *adjuvant* (postoperativ) mit Chemotherapeutika behandelt. Das Ergebnis waren deutlich höhere Remissions- und Überlebensraten. Neben diesem adjuvanten Therapiekonzept hat sich heute bei einigen Neoplasien auch der neoadjuvante (präoperative) Einsatz einer Chemotherapie etabliert (DeVita und Chu 2008).

Neben der Entwicklung neuer und wirkungsvollerer Chemotherapeutika verbesserte sich auch die Krebsprävention in den letzten Jahrzehnten (Lippman und Hawk 2009). Ein besseres Verständnis für die molekularen Mechanismen in der Zelle führte zur Identifizierung zahlreicher Auslöser der Kanzerogenese – hierzu gehört auch oxidativer Stress.

1.2 Oxidativer Stress

Der sauerstoffabhängige Stoffwechsel aerober Organismen führt ständig zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies. Hierbei handelt es sich um so genannte Radikale, die ein ungepaartes Elektron aufweisen. Um zu verstehen, warum im aeroben Stoffwechsel Sauerstoffradikale entstehen, ist es notwendig sich zu vergegenwärtigen, mit welcher elementaren chemischen Reaktion Zellen biologische Energie gewinnen. Bei der so genannten Knallgasreaktion, hierbei handelt es sich um eine starke exotherme Reaktion von Wasserstoff mit Sauerstoff ($\text{H}_2 + \frac{1}{2} \text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$), werden pro Mol gebildetes Wasser 285,6 kJ Energie frei. Aerobe Organismen nutzen diese Reaktion zur Energiegewinnung, jedoch unter strikt kontrollierten Bedingungen („biologische Knallgasreaktion“). Der beim Abbau energiereicher Verbindungen entstehende Wasserstoff wird mit Hilfe von

Carriermolekülen, auch Reduktionsäquivalente genannt, in die Mitochondrien transportiert, wo die Elektronen in der inneren Mitochondrienmembran schrittweise auf molekularen Sauerstoff (O_2) übertragen werden. Für die Reduktion von 1 Mol Sauerstoff zu Wasser ist die Übertragung von 2 Mol Wasserstoff (H_2) bzw. 4 Elektronen ($2H_2 \rightarrow 4H^+ + 4e^-$) notwendig. Geschieht die Übertragung der Elektronen auf molekularen Sauerstoff nicht in diesem stöchiometrischen Verhältnis, so entstehen reaktive Sauerstoffspezies an der Atmungskette (Shigenaga et al. 1994). Bis zu 3 % Sauerstoff werden nicht vollständig zu Wasser reduziert und gelangen als Sauerstoffradikale in das Zytosol (Pohl 2011).

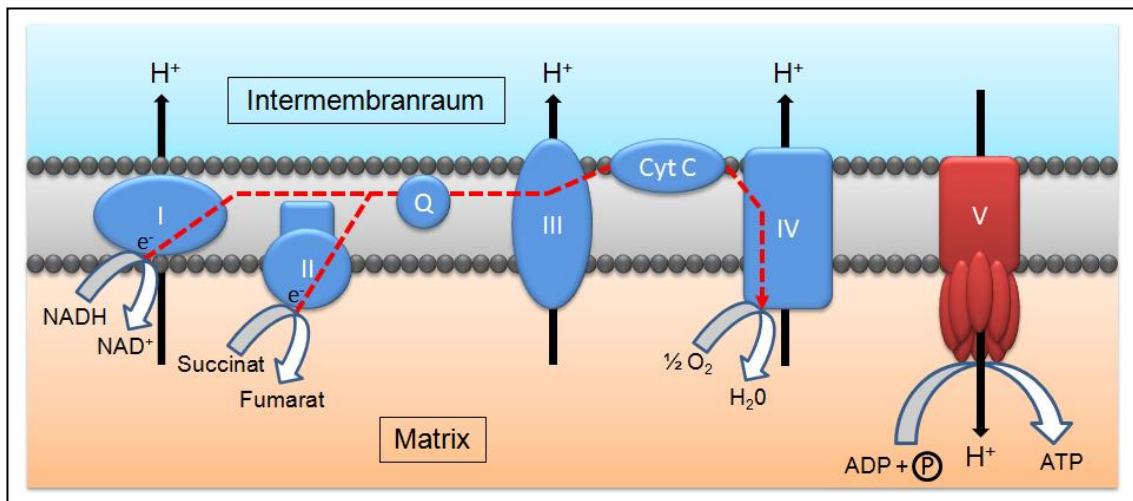


Abb. 1.1: Die oxidative Phosphorylierung an der mitochondrialen Atmungskette. Die oxidative Phosphorylierung bildet in aeroben Zellen den Hauptmotor für die Gewinnung biologischer Energie in Form von ATP. Gleichzeitig stellt die mitochondriale Atmungskette die größte physiologische Quelle für reaktive Sauerstoffspezies dar. Elektronen der Elektronen-Carrier („Reduktionsäquivalente“) NADH und $FADH_2$ werden über den Komplex I (*NADH-Q-Reduktase*) oder den Komplex II (*Succinat-Q-Reduktase*) in die Atmungskette eingeschleust. Der gestrichelte Pfeil zeigt den üblichen Weg der Elektronen entlang der Atmungskette, bis hin zur Bildung von Wasser (H_2O) durch die *Cytochrom-Oxidase* (Komplex IV). Wird der Sauerstoff nicht ausreichend reduziert, entstehen reaktive Sauerstoffspezies. Mit Hilfe der Wasserstoffionen, die über die Komplexe I, III und IV in den Intermembranraum transportiert werden, wird ein Protonen-Gradient aufgebaut, der am Komplex V (*ATP-Synthase* oder „ATP-Pumpe“) die Bildung von ATP auslöst. Zum $FADH_2$: Dieser Elektronen-Carrier wird im Citratzyklus bei der Oxidation von Succinat zu Fumarat durch die Succinat-Dehydrogenase gebildet. Dieses Enzym ist eine Komponente des *Succinat-Q-Reduktase-Komplexes* und das neugebildete $FADH_2$ verlässt den Komplex nicht. Nachgezeichnet nach Brandt 2007.

Radikale beeinträchtigen durch ihre extreme Reaktivität das zelluläre Gefüge und verursachen gravierende Schäden an Proteinen, Lipidmembranen und auch am Erbgut der Zelle. Überschreiten die Schäden ein bestimmtes Ausmaß, werden apoptotische Vorgänge in Gang gesetzt, die zum Zelltod führen. Besonders starke Schäden können zum sofortigen Untergang (Nekrose) der Zelle

führen (Slater et al. 1995). Um sich hiervor effektiv zu schützen, entwickelten die Zellen im Laufe der Evolution zahlreiche antioxidative Mechanismen.

Von oxidativem Stress spricht man, wenn das Gleichgewicht zwischen Radikalbildung und zellulärer Detoxifikation gestört ist (Sies 1991). Bei folgenden pathophysiologischen Situationen wurde eine starke Radikalbildung nachgewiesen: Kanzerogenese (Wiseman und Halliwell 1996; Moriya et al. 2001; Pillai CK und Pillai KS 2002; Hemnani und Parihar 1998) sowie kardiologische und neurologische Erkrankungen (Madamanchi et al. 2005; Nunomura et al. 2007). Bei der amyotrophen Lateralsklerose führt die fehlerhafte Synthese der Superoxiddismutase (Tab. 1.1) zur Schwächung des anti-oxidativen Potentials und damit zu einem vorzeitigen Untergang der Alpha-Motoneuronen und der Betz-Pyramidenzellen im zentralen Nervensystem mit kritischen neurologischen Konsequenzen (Reaume et al. 1996). Oxidativer Stress erfüllt aber auch physiologische Aufgaben im menschlichen Organismus, beispielsweise bei der Immunabwehr durch Makrophagen im Rahmen des „oxidative burst“ (Sies 1991).

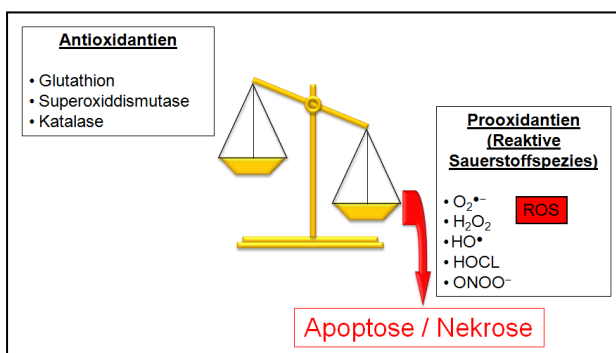


Abb. 1.2: Oxidativer Stress resultiert aus einem Ungleichgewicht zwischen Anti- und Prooxidantien. Überwiegen über einen längeren Zeitraum prooxidative Moleküle die antioxidativen Schutzmechanismen, so wird die Zelle apoptotisch oder bei starker Schädigung nekrotisch. Wichtige Antioxidantien der Zelle sind Glutathion und die Enzyme Superoxiddismutase und Katalase (Tab. 1.1).

Benigne Zellen verfügen über eine Vielzahl verschiedener Mechanismen, um reaktive Sauerstoffspezies zu neutralisieren (Sies 1997). In neoplastischen Zellen hingegen ist die antioxidative Abwehr nur schwach ausgebildet (Oberley TD und Oberley LW 1997), weshalb sie anfälliger für oxidativen Stress sind. Die gezielte Induktion von oxidativem Stress in neoplastischen Zellen wäre somit therapeutisch hoch interessant (McCarty et al. 2010). Ein prooxidativer Zustand ist dabei über zwei Wege zu erreichen: Durch Verstärkung der Radikalbildung, z.B. durch Störung der mitochondrialen Atmung (Pelicano et al. 2003), oder

durch Schwächung der antioxidativen Abwehr (Klingelhöffer et al. 2012). Die selektive Hemmung von Superoxiddismutase (Hileman et al. 2001; Shen et al. 2003; Zhou Y et al. 2003) oder Katalase (Iwai et al. 2003; Klingelhöffer et al. 2012) ist von hoher Wirksamkeit; ebenso die selektive Hemmung der Glutathionsynthese (Maeda et al. 2004). In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass selbst chemoresistente Neoplasien noch empfindlich gegenüber oxidativem Stress reagieren (Schor et al. 2004). Diese Beobachtung eröffnet möglicherweise neue Ansätze zur Entwicklung effektiver Therapien, um das Problem der Chemoresistenz zu überwinden. Jedoch steht der klinische Nutzen der in diesem Abschnitt aufgezählten experimentellen Ansätze noch aus.

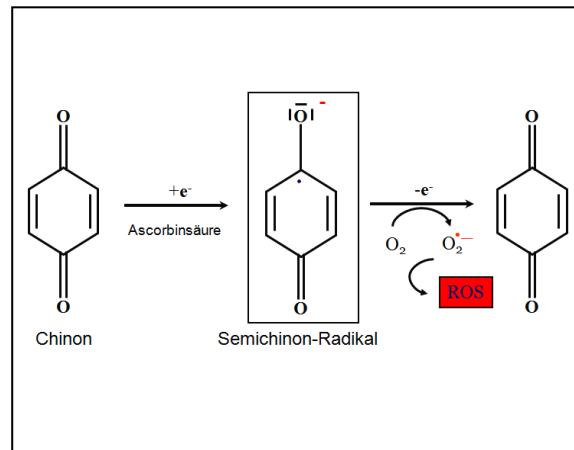
Tab. 1.1: Antioxidativ wirksame biologische Systeme. Gezeigt ist eine Auswahl von antioxidativen Stoffen und Enzymen. Modifiziert nach Sies 1993. G-SH (oder GSH): reduziertes Glutathion; G-S-S-G (oder GSSG): oxidiertes Glutathion.

Typ		Merkmale / Eigenschaften
Nicht-enzymatisch	Alpha-Tocopherol	Schutz der Zellmembranen durch z.B. Unterbrechung der Radikalkette
	Beta-Carotin	Entschärfung des sehr reaktiven Singulett-Sauerstoffs
	Ascorbinsäure	verschiedene antioxidative Funktionen
	Glutathion	verschiedene antioxidative Funktionen
	Flavonoide	Pflanzliche Antioxidantien
Enzymatisch (primär)	Ubiquinol 10	Radikalfänger
	Superoxiddismutase (SOD)	Detoxifikation von Superoxidanionen
	Glutathionperoxidase	Reduktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser unter Verbrauch von GSH
	Katalase	Hämprotein, in Peroxisomen
Enzymatisch (sekundär)	Glutathion-S-Transferase	Konjugationsenzym, katalysiert die Konjugation von GSH an z.B. Xenobiotika
	NAD(P)H: Quinon-Oxidoreduktase (NQO1)	Katalysiert Zwei-Elektronen-Reduktion zur Beseitigung von Chinonradikalen
	Glutathion-Reduktase	Regeneration des GSH-Pools
	Reparatursysteme	DNA Reparatursysteme
		Abbau von oxidierten Proteinen
		Abbau von oxidierten Phospholipiden

Auch in anderen Bereichen der Medizin sind prooxidativ wirksame Substanzen bereits seit vielen Jahren im Einsatz. Zu nennen sind Medikamente gegen Malaria (Tracy und Webster 1996) sowie einige Antibiotika, wie z.B. das Fluorchinolon Ciprofloxacin (Becerra und Albesa 2002). Eine lesenswerte Zusammenfassung zum therapeutischen Potential von oxidativem Stress wurde im Jahre 2005 publiziert (Tandon et al. 2005).

Zu den starken Auslösern von oxidativem Stress zählen die sogenannten Chinone. Hierbei handelt es sich um eine große Gruppe organischer Verbindungen, die als Elektronen- und Protonenüberträger nahezu ubiquitär vorkommen. So befindet sich in der Atmungskette das Ubichinon, im Blut die für die Blutgerinnung sehr wichtigen K-Vitamine (z.B. Menadion) und im Verteidigungssekret des Bombardierkäfers Benzochinone (Eisner et al. 1977; Beheshti und McIntosh 2007).

Abb. 1.3: Chinone bilden langlebige Semichinonradikale. Die Übertragung eines Elektrons von einem Reduktionsmittel (z.B. Ascorbinsäure) führt zur Bildung eines reaktiven Semichinonradikals, das sein überzähliges Elektron auf molekularen Sauerstoff überträgt. Aus den entstehenden Superoxidationen ($O_2^{\bullet-}$) bilden sich weitere reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Abb. 1.2). Ob ein Chinon mit zwei oder einem Elektronen reduziert wird, hängt von dessen funktionellen Gruppen und den elektrochemischen Eigenschaften des eingesetzten Reduktionsmittels ab (Bachur et al. 1978).



Chinone sind Oxidationsprodukte aromatischer Verbindungen, die Redoxzyklen durchlaufen können. Durch Verwendung geeigneter Reduktionsmittel können Semichinonradikale entstehen, die in der Lage sind, Elektronen an passende Elektronenakzeptoren wie beispielsweise molekularen Sauerstoff abzugeben (Abb. 1.3). Das Resultat sind prooxidative Superoxidationen (Halliwell und Gutteridge 1984). Nur langlebige Semichinonradikale sind stabil genug, um zelltoxisch wirken zu können. Vor allem die beiden Benzochinone 2,5-Dimethoxy-1,4-Benzochinone und 2,6-Dimethoxy-1,4-Benzochinone bilden solche stabilen Semichinonradikale mit einer Halbwertszeit von 140 bzw. 195 Sekunden (!)

(Pethig et al. 1983). Ein geeignetes Reduktionsmittel für Chinone ist Vitamin C bzw. dessen biologisch aktive Form Ascorbinsäure. Diese erfüllt im menschlichen Organismus wichtige Funktionen als Elektronendonator bei Redox-Reaktionen oder als Cofaktor für verschiedene Enzyme. Im Gegensatz z.B. zur Ratte können Primaten und somit auch der Mensch Vitamin C nicht synthetisieren; ihnen fehlt das Enzym L-Gulono- γ -lacton-Oxidase. Die dafür zuständige Genregion GLO auf Chromosom 8 mutierte erstmals vor 70 Millionen Jahren und verlor damit seine Funktion (Velázquez und Fernández-Mejía 2004). Der Mensch muss somit Vitamin C über die Nahrung aufnehmen, ein Mangel an Ascorbinsäure würde zu Skorbut führen. Hierbei handelt es sich um eine Kollagensynthesestörung, die bis ins 18. Jahrhundert eine der häufigsten Todesursachen auf Seereisen war (Hodges et al. 1971). Entdeckt wurde Ascorbinsäure zwischen den Jahren 1928 und 1934 von dem ungarischen Nobelpreisträger Albert Szent-Györgyi (Szent-Györgyi 1938; Svirbely und Szent-Györgyi 1932; Zetterström 2009). Zur gleichen Zeit entdeckte auch der Amerikaner Charles Glen King unabhängig von Szent-Györgyi Vitamin C (King und Waugh 1932).

1.3 AVEMAR – ein medizinisches Nahrungsergänzungsmittel

Besonders reich an 2,6-Dimethoxy-1,4-Benzochinonen und 2-Methoxy-Benzochinonen ist das Naturprodukt und medizinische Nahrungsergänzungsmittel (*Medical Nutriment*) AVEMAR. In den letzten Jahrzehnten machte AVEMAR durch den erfolgreichen supportiven Einsatz bei onkologischen Patienten auf sich aufmerksam. Positive Effekte ließen sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachweisen (Johanning und Wang-Johanning 2007). AVEMAR wird durch ein besonderes Fermentierungsverfahren aus Weizenkeimlingen gewonnen, die besonders reich an 2,6-Dimethoxy-1,4-Benzochinonen und 2-Methoxy-Benzochinonen sind. Diese sind jedoch glykosidisch gebunden und somit inaktiv. Um Benzochinone aus ihrer glykosidischen Bindung zu lösen, sind Glykosidasen notwendig, die z.B. im Extrakt von Bierhefe (*Sacharomyces cerevisiae*) vorkommen (Cosgrove et al. 1952; Schmidt S et al. 2011). Im Anschluss an den Fermentierungsprozess wird dem Extrakt das Wasser entzogen und getrocknet. Das wasserlösliche Pulver enthält freie Benzochinone in einer

Konzentration von bis zu 0,04 % (Hidvégi et al. 1999). Hergestellt wird AVE-MAR von der Firma Biopharma Ltd. in Ungarn (www.avemar.com).

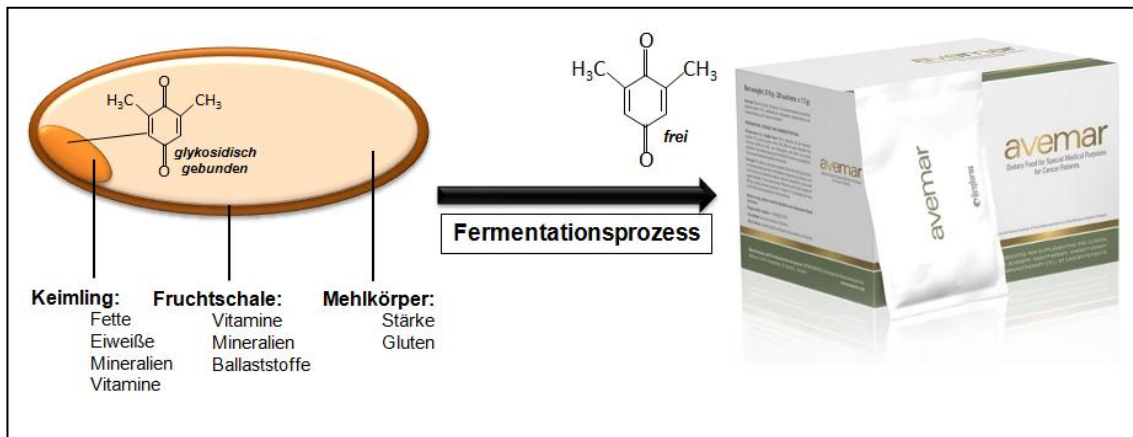


Abb. 1.4: Das Produkt AVEMAR. AVEMAR ist fermentierter Weizenkeimextrakt, der zudem Maltodextrin, Fruktose, Orangenaroma, Siliziumdioxid und Natriumchlorid enthält (www.avemar.com). Links abgebildet ist der schematische Aufbau des Getreidekorns mit den darin enthaltenen, glykosidisch gebundenen 2,6-Dimethoxy-1,4-Benzochinonen. In AVEMAR liegt diese Verbindung in einer Konzentration von 0,04 % vor. Zudem ist der Weizenkeimling reich an Eiweiß, Fettsäuren, Mineralien und Vitaminen (Tocopherol, B-Vitamine). Den größten Anteil des Weizenkorns macht der Mehlkörper mit ca. 80 % aus, der aus Stärke und Gluten besteht und die Energieversorgung des Weizenkorns sicherstellt. Bei der Herstellung von gewöhnlichem Weizenmehl wird nur der Mehlkörper verarbeitet und der Rest des Korns verworfen (Johanning und Wang-Johanning 2007). Weizenkorn: eigener Entwurf. Rechts abgebildet ist das ungarische Verpackungsmuster von AVEMAR (www.avemar.com).

1.4 Ziele der Arbeit

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war, die zelltoxische Wirkung von AVEMAR an verschiedenen Tumorzelllinien zu überprüfen. Bisher publizierte Daten zu AVEMAR basieren lediglich auf Untersuchungen an einzelnen Tumorzelllinien.

Weizenkeimlinge weisen einen natürlich hohen Gehalt an 2,6-Dimethoxy-1,4-Benzochinonen auf. Diese sind glykosidisch gebunden und somit biologisch inaktiv. In AVEMAR sind die glykosidischen Bindungen durch ein spezielles Verfahren aufgelöst (s. oben) und die Benzochinone liegen in freier Form vor. Der hohe Gehalt an Benzochinonen wird zwar für den zelltoxischen Effekt von AVEMAR verantwortlich gemacht, doch wurde dies bisher überraschenderweise nie systematisch untersucht. Deshalb sollte AVEMAR mit der Reinsubstanz 2,6-Dimethoxy-1,4-Benzochinone (Benzochinone) verglichen werden, um so Rückschlüsse auf die Wirkungsweise von AVEMAR zu erhalten. Hierzu wurde die Wirkung von AVEMAR an zwölf malignen Tumorzelllinien überprüft.

Wesentliche Untersuchungen zum Wirkmechanismus von AVEMAR wurden dabei an den vier gastrointestinalen Zelllinien BxPC-3, HT-29, HRT-18 und 23132/87 durchgeführt (Tab. 3.1).

Im Gegensatz zu den Weizenkeimlingen enthält der Mehlkörper keine Benzochinone. Für den Hauptbestandteil des Weizenmehls, dem Gluten, wurden bisher keine zelltoxischen Untersuchungen durchgeführt. Ein weiterer Bestandteil des Weizenmehls sind Weizenlektine (*wheat germ agglutinin*); für diese Glykoproteine gibt es Hinweise auf eine zelltoxische Wirkung. Zusätzlich zum AVEMAR wurden somit auch Weizenmehl, Gluten und Weizenlektine auf ihre zelltoxischen Eigenschaften untersucht.

Die Enzyme Superoxiddismutase, Katalase und Glutathion gehören zu den antioxidativ wirksamen biologischen „Systemen“ einer Zelle (Tab. 1.1). Sollte AVEMAR oxidativen Stress auslösen, dann sollten diese Enzyme bzw. Substanzen der zelltoxischen Wirkung von AVEMAR entgegen wirken. Sie wurden in dieser Arbeit getestet; ihre Wirkungsweise ist in Abb. 1.5 dargestellt.

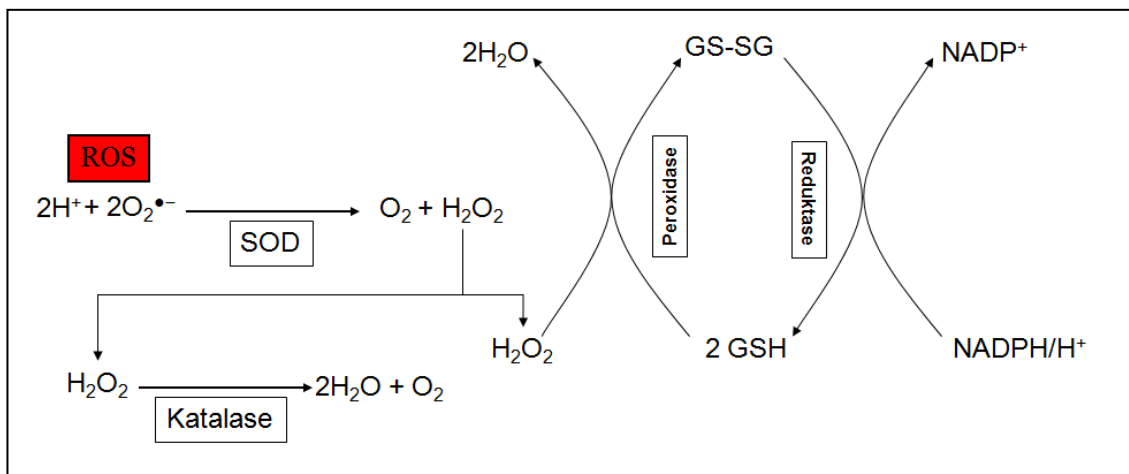


Abb. 1.5: Funktion von Superoxiddismutase, Katalase und Glutathion bei der Abwehr von oxidativem Stress. Entstehende Superoxidanionen ($O_2^{\bullet -}$) werden durch die Superoxiddismutase (SOD) sofort zu molekularem Sauerstoff (O_2) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) katalysiert. Wasserstoffperoxid wird entweder durch Katalase oder Glutathion-Peroxidase (mit Glutathion (GSH) als Elektronendonator) zu Wasser reduziert. Oxidiertes Glutathion (GS-SG) wird in der Zelle laufend mit Hilfe von Reduktionsäquivalenten (NADPH) zu GSH reduziert und der GSH-Pool somit regeneriert.

2 Fragen

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Effekte von AVE-MAR an verschiedenen malignen und benignen Zelllinien zu untersuchen. Hierzu wurden folgende Fragen gestellt:

- 1) Für welche der getesteten Tumorzelllinien ist AVE-MAR zelltoxisch und wodurch wird die Stärke des zelltoxischen Effektes beeinflusst?

- 2) Löst AVE-MAR oxidativen Stress aus und wird dieser von Benzochinonen vermittelt?

- 3) Weisen auch andere Bestandteile des Weizenkorns zelltoxische Effekte auf?

3 Material und Methoden

3.1 Kulturmedien und Pufferlösung

Für den Großteil der Experimente wurde RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 „Dutch Modification“ (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) mit folgenden Zusätzen (in Klammern jeweils die Endkonzentration) verwendet: Penicillin G (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml), 2-Mercaptoethanol (50 µmol/l), 1 mmol/l Natriumpyruvat, 2 mmol/l Glutamin, 11 mol/l Glukose, 1 % nicht-essentielle Aminosäuren (alle Zusätze von Invitrogen GmbH, Karlsruhe) sowie 10 % hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (Cell Concepts GmbH, Umkirch).

Zur Kultivierung von Glioblastomzellen und humanen Fibroblasten wurden folgende Medien verwendet:

Medium für Glioblastom-Zelllinien („DMEM High Glucose“). Für die Kultivierung der Glioblastome wurde Medium mit 25 mmol/l Glukose verwendet (Cell Concepts, Umkirch, Kat.-Nr.: M 1-26F04-I). Die Konzentration der Zusätze war wie oben beschrieben.

Medium für Fibroblasten („Fibroblast Growth Medium 2“). Zur Kultivierung von Fibroblasten wurde Medium mit 5 µg/ml Insulin, 1 ng/ml bFGF, 8 mmol/l Glukose und 2 % hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum verwendet (Endkonzentration in Klammern). Hergestellt wurde das Medium von der Firma PromoCell® (Heidelberg, Kat.-Nr.: C-23020).

PBS („Phosphate buffered saline“). Die Komponenten dieser phosphatgepufferten Salzlösung sind: Natriumchlorid (140 mmol/l), Kaliumchlorid (2,7 mmol/l), Natriumdihydrogenphosphat (7,2 mmol/l) sowie Kaliumhydrogenphosphat (1,47 mmol/l) (Invitrogen GmbH, Karlsruhe).

3.2 Zelllinien

In Tab. 3.1 sind die verwendeten Tumorzelllinien aufgelistet. Sämtliche Zellen wuchsen adhärent und waren frei von Mycoplasmen. Neben den malignen Zelllinien wurden auch Fibroblasten als benigne „Zelllinie“ („Normal Human Dermal Fibroblasts“ oder NHDF-p) der Firma PromoCell® GmbH untersucht.

3.2.1 Zellkultivierung

Alle untersuchten Zelllinien wurden im CO₂-Inkubator (NU-5500 DH Duraflo CO₂, NuAire Inc., Plymouth, U.S.A.) bei Standardbedingungen von 37°C, 5 % CO₂-Atmosphäre und 95 % Luftfeuchtigkeit in Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Kat.-Nr.: 658175) kultiviert. In regelmäßigen Abständen (2-3x pro Woche) wurde das Kulturmedium ausgetauscht bzw. die Zellen "passagiert" (s. hierzu Zellernte).

3.2.2 Zellernte

Die Zellen wurden mit Trypsin / EDTA (0,5 % / 0,22 % in PBS) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) vom Boden der Kulturflaschen abgelöst. Die Zellen wurden in 50 ml PBS für 6 Minuten bei 397 xg zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet in einem definierten Volumen PBS resuspendiert und anschließend die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer (Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen) bestimmt. Hierzu wurden die Zellen mit 0,04 % (Endkonzentration) Trypanblau (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) gefärbt.

Tab. 3.1: Tumor- und Kontrollzelllinien, die in dieser Arbeit untersucht wurden. Alle Zelllinien sind humanen Ursprungs.

Zelllinie	Gewebe	Bezugsquelle
HT-29	Kolon	DSMZ ^{*)} , Kat.-Nr.: ACC 299
23132/87	Magen	DSMZ ^{*)} , Kat.-Nr.: ACC 201
MDA-MB-231	Mamma	ATCC ^{**)} , Kat.-Nr.: HTB-26
MDA-MB-468	Mamma	ATCC ^{**)} , Kat.-Nr.: HTB-132
MCF-7	Mamma	ATCC ^{**)} , Kat.-Nr.: HTB-22
BT-20	Mamma	ATCC ^{**)} , Kat.-Nr.: HTB-19
SKOV-3	Ovar	ATCC ^{**)} , Kat.-Nr.: HTB-77
BxPC-3	Pankreas	ATCC ^{**)} , Kat.-Nr.: CRL-1687
HRT-18	Rektum	ATCC ^{**)} , Kat.-Nr.: CCL-244
U-87	Glioblastom	CLS ^{***)} , Kat.-Nr.: 300367
U-251	Glioblastom	CLS ^{***)} , Kat.-Nr.: 300385
U-13898	Glioblastom	CLS ^{***)} , Kat.-Nr.: 300363
NHDF-p	Dermale Fibroblasten	PromoCell, Kat.-Nr.: C-12350

^{*)} Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig

^{**)} American Type Culture Collection (www.atcc.org); ^{***)} www.cell-lines-service.de

3.2.3 Bestimmung der Verdopplungszeit

Die Verdopplungszeit wurde mit folgender Formel berechnet:

$$g = \frac{\log 2 * \Delta t}{\log N - \log N_0}$$

Abb. 3.1: Formel zur Bestimmung der Verdopplungszeit.

g: Verdopplungszeit

Δt : Dauer der Zellen in Kultur

N_0 : Anzahl der Zellen zum Zeitpunkt t_0

N: Anzahl der Zellen zum Ablesezeitpunkt

3.3 Die in dieser Arbeit untersuchten Stoffgemenge und Substanzen

Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Substanzen in den jeweiligen Zellkulturmedien gelöst und über einen 0,2 μm -Filter steril filtriert. Sofern nicht von Sigma-Aldrich bezogen, wird der Zulieferer genannt.

3.3.1 AVEMAR

AVEMAR ließ sich ohne Probleme bei einer Konzentration von 100 mg/ml in den jeweiligen Medien lösen, ohne dass ein Sediment übrig blieb. Die in der Zellkultur getesteten Konzentrationen von AVEMAR waren 0,1 mg/ml, 1 mg/ml, 10 mg/ml, sowie 50 mg/ml. AVEMAR wurde freundlicherweise von Fresenius Kabi Austria GmbH und Biopharma Ltd. aus Ungarn zur Verfügung gestellt.

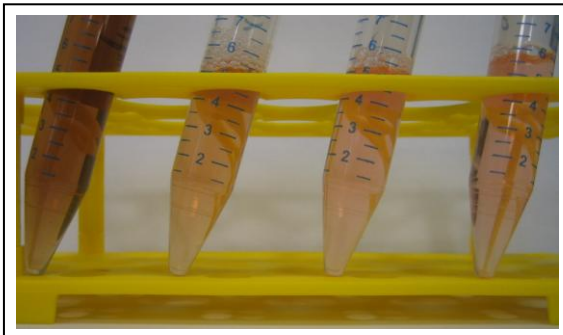


Abb. 3.2: In Kulturmedium gelöstes AVEMAR.

Von links nach rechts: 50 mg/ml, 10 mg/ml, 1 mg/ml und 0,1 mg/ml AVEMAR. Bis zu einer Einwaage von 100 mg/ml war AVEMAR in Zellkulturmedien gut löslich. Die gezeigten Lösungen waren filtriert (Porengröße: 0,2 μm).

3.3.2 2,6-Dimethoxy-1,4-Benzochinone / Ascorbinsäure

2,6-Dimethoxy-1,4-Benzochinone (Benzochinone oder DMBQ) lösten sich relativ schlecht in den Medien, wahrscheinlich wegen der fehlenden Polarität des Benzochinonmoleküls. Um aber keine zellschädigenden Lösungsvermittler wie Methanol oder DMSO einsetzen zu müssen, wurde aus Gründen der Praktikabilität angenommen, dass in der angesetzten Stammlösung (Konzentration 0,1 mg/ml) sämtliche Benzochinone vollständig gelöst waren (Abb. 11.2).

Zur Aktivierung der Benzochinone ist die Zugabe eines adäquaten Reduktionsmittels notwendig (Pethig et al. 1983). In der vorliegenden Arbeit wurde Ascorbinsäure verwendet, die sich gut im Kulturmedium löste, sodass hier ohne Weiteres eine Stammlösung von 100 mg/ml hergestellt werden konnte.

Für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente wurde eine Benzochinon-Konzentration eingesetzt, die der von AVE-MAR entspricht – diese beträgt 0,04 % (Hidvégi et al. 1999). Eine AVE-MAR-Konzentration von 10 mg/ml entspricht somit einer Konzentration an Benzochinonen von 0,004 mg/ml bzw. 24 µmol/l (bei einem Molekulargewicht von 168,15 g/mol für 2,6-Dimethoxy-1,4-Benzochinone). Die molare Konzentration des Reduktionsmittels Ascorbinsäure war 100-fach höher (2,4 mmol/l). Bei einem Molekulargewicht von 176,12 g/mol für Ascorbinsäure entspricht dies einer Konzentration von 0,423 mg/ml. Dieses Verhältnis von Ascorbinsäure zu Chinonen ist in der Literatur beschrieben (Verrax et al. 2007).

3.3.3 Glutathion / Superoxiddismutase / Katalase

In einem Teil der Experimente wurde versucht, Tumorzellen vor dem Einfluss von freien Radikalen durch Zusatz von Radikalfängern bzw. antioxidativ wirkenden Enzymen zu schützen. Dazu zählen reduziertes Glutathion sowie die Enzyme Superoxiddismutase und Katalase. Sollten diese antioxidativ wirkenden Substanzen bzw. Enzyme bei AVE-MAR oder den 2,6-Dimethoxy-1,4-Benzochinonen eine protektive Wirkung zeigen (also die Zellvitalität erhalten), wäre dies ein indirekter Hinweis für die Induktion von oxidativem Stress (Abb. 3.3).

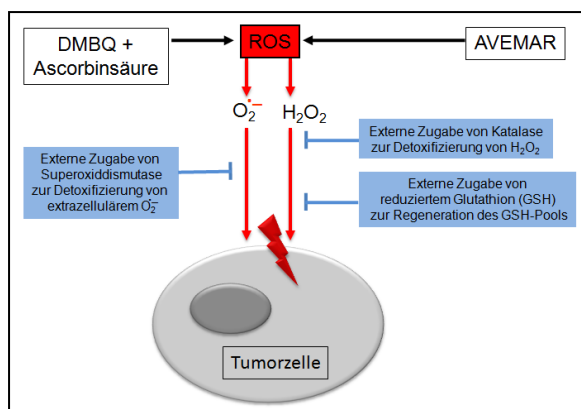


Abb. 3.3: Funktionsweise von Glutathion (GSH), Superoxiddismutase (SOD) und Katalase bei der Inaktivierung reaktiver Sauerstoffspezies. Sollten die drei Radikalfänger in Gegenwart von AVE-MAR die Zellvitalität erhalten, so wäre dies als indirekter Nachweis zu werten, dass AVE-MAR oxidativen Stress auslöst. Von Benzochinonen ist bekannt, dass sie oxidativen Stress induzieren, weshalb sie als Positivkontrolle eingesetzt werden. Glutathion (Kat.-Nr.: G4251), Superoxiddismutase (Kat.-Nr.: S5395) und Katalase (Kat.-Nr.: C30) wurden von Sigma-Aldrich bezogen.

Glutathion wurde in einer Endkonzentration von 1,1 mg/ml bzw. 3,6 mmol/l eingesetzt (das Molekulargewicht von Glutathion beträgt 307,3 g/mol). Diese Konzentration an Glutathion beeinflusste in keinsten Weise die Vitalität der Tumorzellen. Die Konzentration an Superoxiddismutase und Katalase waren in den jeweiligen Experimenten unterschiedlich und sind in den Legenden der entsprechenden Abbildungen angegeben.

3.3.4 Weizenkeimlinge / Weizenmehl / Gluten

Herkömmliche, aus dem Reformhaus erhältliche Weizenkeimlinge wurden zunächst in einem Mörser zerkleinert und anschließend in Lösung gebracht. Die Löslichkeit des Produkts war sehr begrenzt, sodass sich selbst bei einer Stammlösung von 10 mg/ml ein deutliches Sediment am Boden absetzte. Ähnliches wurde bei Weizenmehl Typ 405 und Gluten, hier wurde eine Stammlösung von 100 mg/ml angesetzt, beobachtet. Das Sediment des Glutens war fest und klebrig; Gluten wird nicht ohne Grund auch als Klebereiweiß bezeichnet.

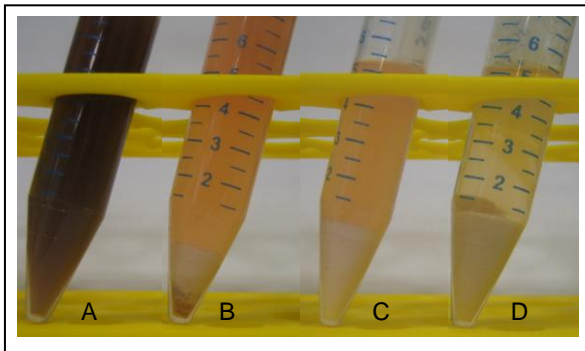


Abb. 3.4: Vergleich unfiltrierter Stammlösungen von 100 mg/ml AVEMAR (A), 10 mg/ml Weizenkeimlingen (B), 100 mg/ml Weizenmehl (C) und 100 mg/ml Gluten (D). Während sich AVEMAR vollständig löst, bleiben bei den Weizenkeimlingen, beim Weizenmehl und Gluten ein deutliches Sediment am Boden zurück. Das Sediment des Glutens war zudem fest und klebrig.

Die Überstände von Weizenkeimlingen, Weizenmehl und Gluten wurden filtriert und jeweils Konzentrationen von 0,1 mg/ml, 1 mg/ml, 10 mg/ml und 50 mg/ml angesetzt.

3.3.5 Wheat germ agglutinin / Weizenlektin

Lektine wurden ebenfalls in Zellkulturmedium in Lösung gebracht und verdünnt (0,05 µg/ml - 50 µg/ml). Der zelltoxische Effekt solcher Verdünnungen ist bereits beschrieben (Loréa et al. 1997).

3.3.6 Berechnung des EC₅₀-Werts

Der EC₅₀-Wert beschreibt die Konzentration einer Substanz, die bei 50% der Zellen einen Effekt, z.B. Wachstumshemmung auslöst. Zur Berechnung des EC₅₀-Werts wurde folgende Formel verwendet (Huber und Koella 1993):

$$\log(EC50) = \log(x1) + \frac{y1 - y0}{y1 - y2} * (\log(x2) - \log(x1))$$

Dabei handelt es sich bei den x-Werten um die Konzentrationen der zu untersuchenden Substanz (dabei muss $x_2 > x_1$ sein), während die y-Werte die optischen Dichten des Kristallviolett-Assays darstellen, die nach 24 Stunden Kulturdauer ermittelt wurden.

y₀ = Kristallviolett-Wert der unbehandelten Zellen

y₁ = Kristallviolett-Wert bei den Zellen, behandelt mit Konzentration x₁

y₂ = Kristallviolett-Wert bei den Zellen, behandelt mit Konzentration x₂

Verringerte sich die Zellvitalität auch bei der höchsten Stoffkonzentration nicht um mehr als 50 %, so war der EC₅₀-Wert nicht bestimmbar.

3.4 Bestimmung der Zellvitalität

Jeweils $1,5 \times 10^4$ Zellen wurden pro Vertiefung einer Zellkulturplatte (96 Vertiefungen, Flachboden) in einem Endvolumen von jeweils 200 µl ausgesät. Von jeder Verdünnungsreihe wurden bis zu 6 Parallelwerte gemessen und, falls möglich, 2 bis 3 unabhängige Versuchswiederholungen durchgeführt. Nach Verteilung der Zellen auf die Platten wurden diese für 16 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach Zusatz der Substanzen wurden die Platten je nach Experiment für 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden inkubiert (Abb. 3.5). Um genaue Aussagen zur Entwicklung der Zellzahl machen zu können, wurde die Zellvitalität zum Zeitpunkt t=0 (Nullkontrolle, vor Zusatz des Stoffes) bestimmt. Dieser Wert gilt als Referenzwert für die einzelnen Messungen.

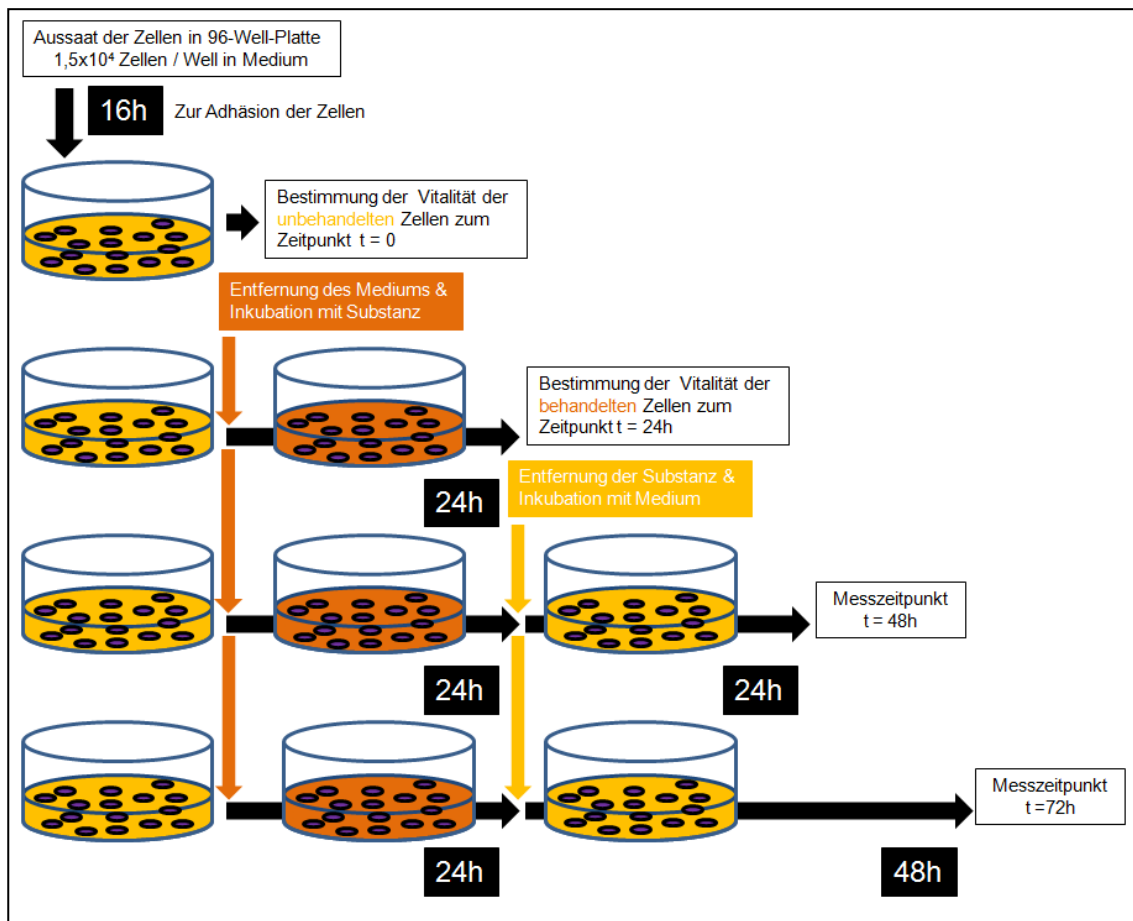


Abb. 3.5: Versuchsaufbau zur Untersuchung AVEMAR-vermittelter zelltoxischer Effekte. Die Inkubation mit AVEMAR betrug 24 Stunden. Anschließend wurde der Überstand entfernt und die Zellen für weitere 24 bzw. 48 Stunden in Medium kultiviert. Ab Zugabe von AVEMAR begann der insgesamt 72 Stunden dauernde Versuch. Für die anderen Substanzen (Benzochinone, Weizenkeimlinge, Weizenmehl, Gluten) endeten die Versuche bereits nach 24 Stunden Inkubation, auf die anschließende Kultivierung der Zellen wurde bei diesen Substanzen verzichtet. Stellvertretend für die verwendeten 96-Well-Platten sind hier einzelne Wells schematisch dargestellt.

3.4.1 Kristallviolett-Assay

Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte in dieser Arbeit zum größten Teil mit der Kristallviolett-Färbung. Dazu wurde zunächst der Überstand abgesaugt und die adhärennten Zellen mit 100 µl Methanol für 10 Minuten fixiert. Anschließend wurde das Methanol entfernt und die Zellen mit jeweils 100 µl Kristallviolettlösung für 10 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt. In vier Waschzyklen mit Aqua dest. wurde der nichtgebundene Farbstoff abgespült und die Platten unter dem Abzug getrocknet. In die trockenen Platten wurde pro Vertiefung jeweils 200 µl 10% Essigsäure zur Lösung des gebundenen Farbstoffs zugegeben und die Platten für 25 Minuten auf einen Schüttler gestellt. Der letzte Schritt bestand in der Quantifizierung der Farbtintensität im ELISA Reader bei 570 nm.

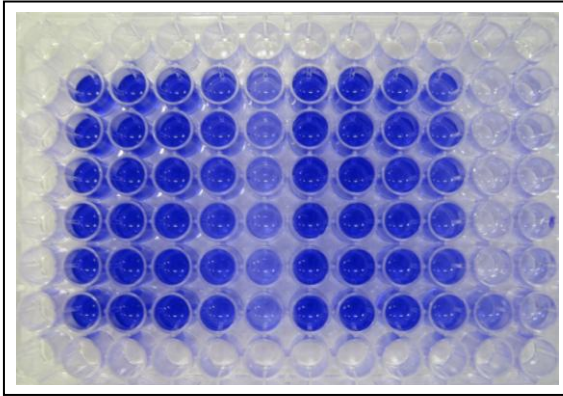


Abb. 3.6: ELISA-Platte nach Kristallviolett-Färbung. Je mehr adhärenente Zellen sich in den Vertiefungen befinden, desto mehr gebundener Farbstoff wird mit der Essigsäure in Lösung gebracht. Die optische Dichte der Farblösung ist proportional zur Zellzahl. Abgebildet ist eine Platte nach Zugabe der 10 %-igen Essigsäure. Diese Platte wird anschließend im ELISA-Reader bei 570 nm gemessen.

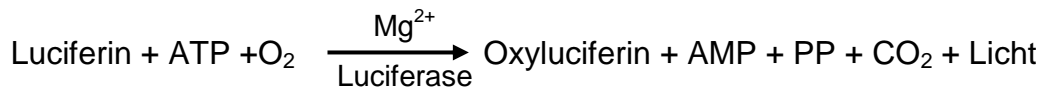
Das Prinzip der Färbung besteht darin, dass das Kristallviolett an die DNA der auf dem Boden fixierten Zellen bindet. Die Menge des gebundenen Kristallvioletts korreliert mit der Anzahl der am Boden verbliebenen Zellen. Zellen, die ihre Adhärenz verloren haben, sind avital und werden während der Färbeprozedur mit dem Überstand entfernt (s. oben). Dass der Kristallviolett-Assay verlässliche Ergebnisse hinsichtlich der Bestimmung der Zellvitalität liefert, wurde in anderen Arbeiten bereits experimentell gezeigt (Flick und Gifford 1984).

Tab. 3.2: Zusammensetzung der Kristallviolettlösung (100 ml).

- 0,5 g Kristallviolett (Sigma-Aldrich)
- 25 ml Methanol (100%)
- 75 ml PBS

3.4.2 ATP-Assay

Eine weitere Möglichkeit zur Quantifizierung der Zellvitalität ist die Bestimmung des ATP-Gehalts der Zellen. Zu diesem Zweck wurde ein handelsüblicher ATP-Assay der Firma Promega (www.promega.de) verwendet. Proliferierende Zellen verfügen über hohe ATP-Spiegel, während apoptotische und nekrotische Zellen niedrige ATP-Spiegel aufweisen. Das Prinzip der Methode basiert auf der folgenden Reaktion:



Zellen wurden in einem Volumen von 50 µl Medium pro Vertiefung in einer weißen 96-Well-Platte vorgelegt und für 16 Stunden inkubiert. Anschließend wurden 50 µl pro Vertiefung der zu untersuchenden Substanzen hinzugefügt und für 24 Stunden bis zur Messung im Inkubator platziert. Der Assay wurde in einem Luminometer gemessen.

3.4.3 xCelligence / RTCA

Das xCelligence-System der Firma Roche GmbH, auch Real Time Cell Analyzer (kurz: RTCA) genannt, ist eine neuartige Methode zur Erfassung von Zellvitalität und Zellproliferation in Echtzeit. Die Zellen werden auf speziellen 96-Well-Platten (E-Platten) ausgesät, in deren Vertiefungen jeweils ein Sensor mit 2 Mikroelektroden integriert ist. Sobald die Zellen am Boden der E-Platte adhären, ändert sich die Impedanz, also der elektrische Widerstand. Dieser ist dabei nicht allein von der Adhärenz, sondern auch von der Qualität der Interaktion und der Morphologie der Zellen abhängig. Die gemessenen Impedanzdaten werden an die RTCA-Kontrolleinheit übertragen, wo sie mit Hilfe einer speziellen Software ausgewertet und in Form des dimensionslosen «Cell Index (CI)» dargestellt werden. Dieser Index lässt Aussagen bezüglich Zellvitalität, Zellzahl, Zellmorphologie und Zelladhäsion zu. Solche Zellanalysen in Echtzeit gewähren einen umfassenderen Einblick in die Wachstumsdynamik von Zellkulturen als Assays, die ausschließlich Endpunktmessungen ermöglichen (Atienza et al. 2005).

Zunächst wurden die Zellen in 100 µl Medium/Well in einer E-Platte vorgelegt und für 16 Stunden im Inkubator belassen. Anschließend wurden die zu untersuchenden Stoffe in 100 µl/Well hinzugefügt und die Echtzeitmessung gestartet.

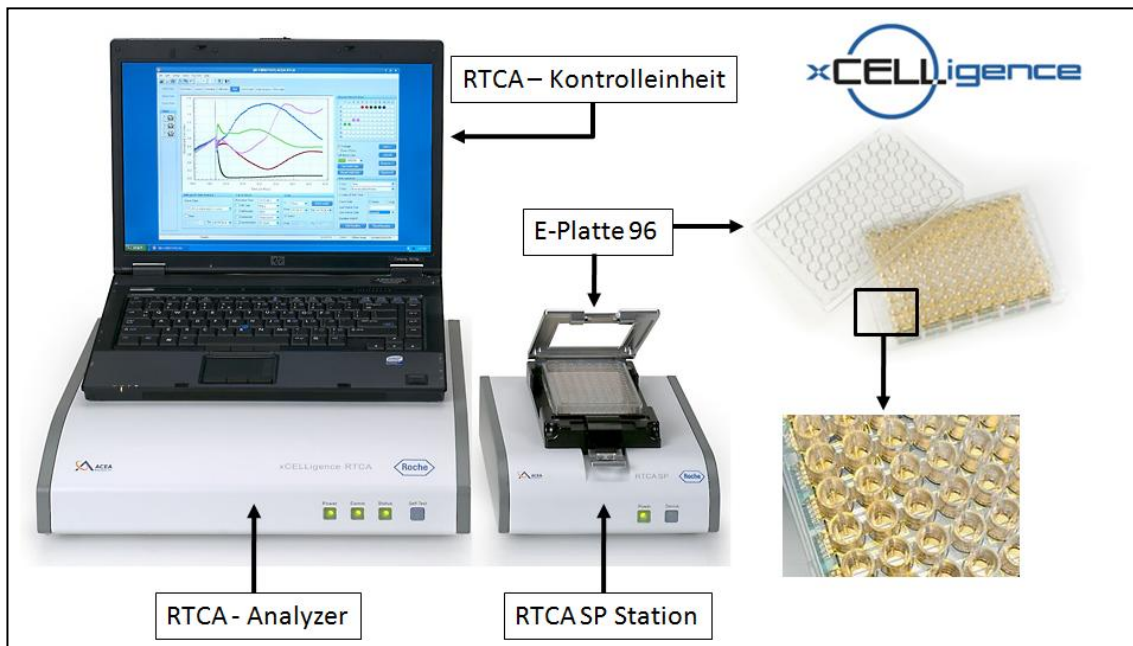


Abb. 3.7: Das xCelligence-System. Rechts ist die E-Platte (E-Platte im „96er Format“) dargestellt, in deren Boden spezielle Mikroelektroden integriert sind, an denen eine Spannung angelegt wird. Die SP Station befindet sich zusammen mit der Fassung für die E-Platte in einem CO₂-Inkubator (NU-5500 DH Duraflow CO₂, NuAire Inc., Plymouth, U.S.A.) bei Standardbedingungen von 37°C, 5 %iger CO₂-Atmosphäre und 95 % Luftfeuchtigkeit. Teilabbildungen vom Hersteller (<http://www.roche-applied-science.com>).

3.5 Bradford-Protein-Assay

Die in dieser Arbeit durchgeführte Proteinbestimmung basiert auf dem von Bradford etablierten Assay (Bradford 1976) und wurde in ELISA-Platten durchgeführt (Proteinkonzentration von 1 bis 25 µg/ml). Für diesen Assay wurde eine Eichkurve erstellt. Hierzu wurde eine Stammlösung mit Albumin (Pierce, Bestell-Nr. 23212) in einer Konzentration von 2 mg/ml mit M-PER (Lysepuffer) verdünnt (Tab. 3.3).

Die untersuchten Stoffe wurden in den entsprechenden Zellkulturmedien ohne FCS und weitere Zusätze gelöst. In einem nächsten Schritt wurden die Standardverdünnungen (Tab. 3.3), die zu untersuchenden Proben und die Negativkontrollen („Leerwerte“) mit Coomassie-Lösung inkubiert. Zu jeweils 5 µl Proteinlösung wurden 250 µl Coomassie-Lösung hinzugegeben, die Platte für 30 Sekunden vorsichtig geschüttelt und im Anschluss 10 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Platte im ELISA Reader bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen.

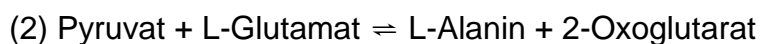
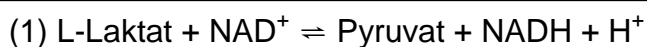
Tab. 3.3: BSA-Standardlösungen zur Proteinbestimmung mit dem Bradford-Assay.

Standard	Lysepuffer	BSA Stammlösung	Konzentration Standard *)
(A) Unverdünnt	0 µl	300 µl	2000
(B) Verdünnt	125 µl	375 µl	1500
(C) Verdünnt	325 µl	325 µl	1000
(D) Verdünnt	175 µl	175 µl	750
(E) Verdünnt	325 µl	325 µl	500
(F) Verdünnt	325 µl	325 µl	250
(G) Verdünnt	325 µl	325 µl	125
(H) Verdünnt	400 µl	325 µl	25

*) µg/ml

3.6 Messung der Laktat-Produktion

Jeweils $1,5 \times 10^4$ Zellen der betreffenden Tumorzelllinie wurden in 100 µl Nährmedium für 24, 48 und 72 Stunden in einer Zellkulturschale mit 96 Vertiefungen (transparent, Flachboden von Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) im CO₂-Inkubator kultiviert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der entnommene Überstand in Reaktionsgefäße (Eppendorf AG, Hamburg) bei -25°C bis zur Messung gelagert. Für die Bestimmung der Laktatkonzentration im Überstand wurde der Laktat-Assay der Firma R-Biopharm AG (Darmstadt, Kat.-Nr.: 10139084035) verwendet, der auf den nachfolgenden Reaktionen beruht:



Das Gleichgewicht der 1. Reaktion liegt zwar auf der Seite von Laktat, doch da Pyruvat mit Hilfe der Glutamat-Pyruvat-Transaminase zu Alanin umgewandelt wird (Reaktion 2), verschiebt sich das Gleichgewicht der 1. Reaktion auf die Seite von Pyruvat. Die Menge an dabei gebildetem NADH, die äquivalent zur Menge an Laktat ist, wurde bei einer Wellenlänge von 340 nm bestimmt. Die photometrischen Messungen erfolgten im Mikroplatten-Lesegerät GENios Plus (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim) und die Messdaten wurde mit dem

Programm XFLUOR4 (Version 4.51) aufgenommen. Als Positivkontrolle wurde jeweils ein Aliquot mit bekannter Laktatmenge sowie ein Aliquot des jeweiligen Nährmediums verwendet. Als Negativkontrolle („Leerwert“ wurde Reinstwasser verwendet. Die zur Herstellung der Reaktionslösungen benötigten Mengen wurden der Anleitung des Laktatassays entnommen, ebenso die Formel¹ zur Berechnung der Laktatmenge aus den gemessenen Extinktionswerten für NADH.

3.7 Auswertung

Die statistische Auswertung sämtlicher Daten erfolgte mit dem Programm Excel 2007 der Firma Microsoft. Bei wiederholt durchgeführten Messungen wurden der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet. Für die statistische Auswertung wurde das Programm GraphPad Prism 6.0 (Statcon, Wizenhausen, Germany) genutzt. Die Daten wurden mit dem „Mann-Whitney-U-Test“ ausgewertet und Unterschiede von $P < 0.05$ wurden als statistisch signifikant gewertet.

¹ Allgemeine Berechnungsformel zur Bestimmung der Laktat-Konzentration durch Messung der Extinktionsdifferenz ΔE [$\Delta E = (E_2 - E_1)_{\text{Probe}} - (E_2 - E_1)_{\text{Leerwert}}$]: $c \text{ (g/L)} = (V * MG / \epsilon * d * v * 1000) * \Delta E$. Testvolumen $V \text{ [mL]} = 0,224 \text{ mL}$, Molekulargewicht MG von Laktat = $90,1 \text{ g/mol}$, Extinktionskoeffizient ϵ von NADH bei $340 \text{ nm} = 6,3 \text{ L/mmole*cm}$ und Probevolumen $v \text{ [mL]} = 0,010 \text{ mL}$ wurden durch den Hersteller vorgegeben. $d \text{ [cm]} =$ Schichtdicke von Test- und Probevolumen. Sie wurde für die ELISA-Platte wie folgt berechnet: $d = V / A = 0,64 \text{ cm}$ mit dem Testvolumen $V (= 0,224 \text{ mL} = 0,224 \text{ cm}^3)$ und der Fläche ($A = 0,35 \text{ cm}^2$) einer Vertiefung einer ELISA-Platte mit 96 Vertiefungen. $E_1 =$ Extinktion vor Starten der Reaktion, E_2 Extinktion nach Ablauf der Reaktion.

4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die zelltoxische Wirkung von AVEMAR, ein aus Weizenkeimlingen hergestelltes Nahrungsergänzungsmittel, auf zwölf malignen und einer benignen Zelllinie (Tab. 3.1) *in vitro* untersucht.

4.1 Nachweis des wachstumshemmenden Effekts von AVEMAR

Als erstes wurde für jede Zelllinie die Konzentration an AVEMAR ermittelt, bei der 50 % der Zellen eine Wachstumshemmung aufweisen (EC_{50}). Hierzu wurden AVEMAR-Konzentrationen von 0,1 mg/ml bis 50 mg/ml für 24 Stunden in den Zellkulturen getestet. Die Ergebnisse hierzu sind in Abb. 4.1 dargestellt.

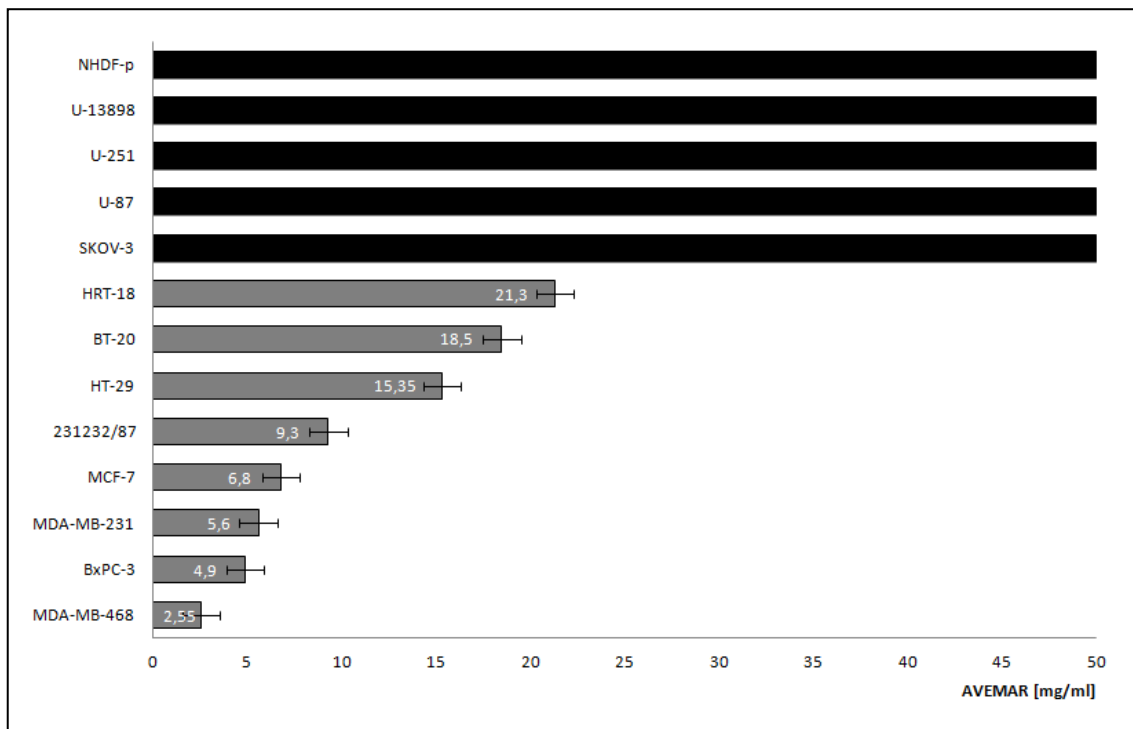


Abb. 4.1: Die EC_{50} -Werte für AVEMAR der in dieser Arbeit getesteten Zelllinien. Hierzu wurden die Zelllinien für 24 Stunden mit AVEMAR in Konzentrationen von 0,1 bis 50 mg/ml inkubiert. Vier maligne Zelllinien und Fibroblasten (NHDF-p) waren so unempfindlich gegenüber AVEMAR, dass für den gewählten Konzentrationsbereich kein EC_{50} -Wert zu bestimmen war. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Hierbei handelt es sich um mindestens zwei Wiederholungen mit jeweils 3 Parallelwerten. Die EC_{50} -Werte für die acht Zelllinien im Einzelnen: MDA-MB-468: $2,55 \pm 0,071$ mg/ml; BxPC-3: $4,9 \pm 0,42$ mg/ml; MDA-MB-231: $5,6 \pm 0,42$ mg/ml; MCF-7: $6,8 \pm 1,13$ mg/ml; 23132/87: $9,3 \pm 0,28$ mg/ml; HT-29: $15,35 \pm 0,21$ mg/ml; BT-20: $18,5 \pm 2,12$ mg/ml; HRT-18: $21,3 \pm 0,42$ mg/ml.

Wie aus Abb. 4.1 ersichtlich, reagierten die untersuchten Zelllinien sehr unterschiedlich auf die Inkubation mit AVEEMAR. So zeigten sich vier der zwölf Tumorzelllinien (33 %) mit einem EC_{50} -Wert von 50 mg/ml äußerst resistent gegenüber der Inkubation mit AVEEMAR, während bei fünf der zwölf Tumorzelllinien (42 %) mit einem EC_{50} -Wert von <10 mg/ml eine Hemmung des Wachstums zu beobachten war. Besonders empfindlich reagierten die Zellen der Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-468, sowie Zellen der Pankreaskarzinomzelllinie BxPC-3; bei ihnen lag der EC_{50} -Wert unter 6 mg/ml AVEEMAR.

Ein positiver Zusammenhang zwischen der Wachstumsgeschwindigkeit der Kulturen und einer möglichen Empfindlichkeit gegenüber AVEEMAR wurde nicht beobachtet. Als Beispiel sei die Zelllinie HRT-18 genannt, die extrem schnell wächst (Verdopplungszeit: $18,85 \pm 3,6$ Stunden) und deren Zellen nahezu unempfindlich auf die Inkubation mit AVEEMAR reagierten. Die Verdopplungszeiten für sämtliche Zelllinien sind im Anhang (Abb. 11.1 B) angegeben.

Um einen unspezifischen Proteineffekt als mögliche Ursache für die Zelltoxizität von AVEEMAR ausschließen zu können, wurden die Tumorzellen mit 10 mg/ml Serumalbumin inkubiert. Der Proteingehalt an Serumalbumin, der 10-mal höher war als der Proteingehalt in 100 mg/ml AVEEMAR (Abb. 11.5), beeinflusste in keinsten Weise Wachstum und Vitalität von Tumorzellen. Die mit Serumalbumin inkubierten Zellen waren in ihrem Wachstum von den Kontrollen nicht zu unterscheiden. Die Ergebnisse der Proteinbestimmungen befinden sich im Anhang (Abb. 11.6).

Die in Abb. 4.1 dargestellten EC_{50} -Werte für AVEEMAR wurden nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden ermittelt. In einem weiteren Versuch sollte die Langzeitwirkung von AVEEMAR an den vier gastrointestinalen Zelllinien BxPC-3, HRT-18, 23132/87 und HT-29 genauer untersucht werden. Dazu wurden die Kulturen nach der 24-stündigen Inkubation mit AVEEMAR bis zu einer Gesamtdauer von 72 Stunden ohne AVEEMAR weiter kultiviert (Abb. 3.5). Mit diesem Vorgehen sollte ein möglicher dauerhafter bzw. irreversibler Schaden in den

Zellen nachgewiesen werden, der durch die Inkubation mit AVEMAR ausgelöst wurde. Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

(1) Die 24-stündige Inkubation mit steigenden AVEMAR-Konzentrationen führte zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Zellvitalität. Kulturen der Magenkarzinomzelllinie 23132/87 und der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 blieben bei 10 mg/ml AVEMAR im Vergleich zur Wachstumskontrolle deutlich im Wachstum zurück und waren bei 50 mg/ml AVEMAR vollständig zerstört (Abb. 4.4 und Abb. 4.5). Zellen der Pankreaskarzinomzelllinie BxPC-3 waren für AVEMAR bei einer Konzentration von 10 mg/ml weitaus empfindlicher als für 50 mg/ml (Abb. 4.2). Die deutlich widerstandsfähigen Zellen der Rektumkarzinomzelllinie HRT-18 starben erst bei einer AVEMAR-Konzentration von 50 mg/ml (Abb. 4.3).

(2) Die sich an die 24-stündige Inkubation mit AVEMAR anschließende Kultivierung der Zellen für weitere 24 bzw. 48 Stunden (ohne AVEMAR) zeigte eindeutig, dass eine AVEMAR-Konzentration von 50 mg/ml die Zellen der vier Zelllinien so stark schädigte, dass sie sich in der anschließenden Kultur ohne AVEMAR nicht mehr erholten. Eine Verringerung der AVEMAR-Konzentration auf 10 mg/ml führte dagegen zu deutlichen Unterschieden im Zellwachstum. Zellen der Rektumkarzinomzelllinie HRT-18 und der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 erlangten nach 48 bzw. 72 Stunden ihre Teilungsaktivität zurück (Abb. 4.3 C und Abb. 4.5 C). Im Gegensatz dazu wurden die Zellen der Pankreaskarzinomzelllinie BxPC-3 dauerhaft durch die 24-stündige Inkubation mit AVEMAR geschädigt (Abb. 4.2 C), während die Zellen der Magenkarzinomzelllinie 23132/87 eine dauerhafte Zystostase aufwiesen (Abb. 4.4 C). Die Laktatmessungen korrelieren sehr gut mit den Ergebnissen des Kristallviolett-Assays. In den Tabellen 4.1 und 4.2 sind die bisherigen Daten zusammengefasst.

Tab. 4.1: Beurteilung der Wirkung von 10 und 50 mg/ml AVEMAR nach 24 Stunden Inkubation.

Zelllinien	Wirkung von AVEMAR	
	10 mg/ml	50 mg/ml
BxPC-3	zelltoxisch	schwach zelltoxisch ^{*)}
HRT-18	schwach zytostatisch	zelltoxisch
23132/87	zytostatisch	zelltoxisch
HT-29	zytostatisch	zelltoxisch

^{*)}Für Zellen der Pankreaskarzinomzelllinie BxPC-3 wurde immer wieder beobachtet, dass 50 mg/ml AVEMAR weniger zelltoxisch waren als 10 mg/ml. Eine Erklärung hierfür kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht gegeben werden. **Begriffsklärung: Zelltoxisch:** Im Vergleich zur Ausgangszellzahl nimmt der Anteil vitaler Zellen um mehr als 40 % ab; **Zytostatisch:** Im Vergleich zur Ausgangszellzahl bleibt der Anteil vitaler Zellen erhalten (ca. 80-100 %); **Schwach zytostatisch:** Im Vergleich zur Ausgangszellzahl nimmt der Anteil vitaler Zellen zwar zu, bleibt aber deutlich (>50 %) hinter der Wachstumskontrolle zurück.

Tab. 4.2: Beurteilung zur Beständigkeit der Wirkung von AVEMAR. Hierzu wurden die Zellen nach der Inkubation mit AVEMAR (für 24 Stunden) für weitere 24 bzw. 48 Stunden ohne AVEMAR kultiviert (s. auch Abb. 3.5).

Zelllinien	Proliferation der Zellen nach Inkubation mit AVEMAR	
	10 mg/ml ^{*)}	50 mg/ml ^{*)}
BxPC-3	Nein	Nein
HRT-18	Ja	Nein
23132/87	Nein	Nein
HT-29	Ja	Nein

^{*)} Vergleiche mit Abb. 4.2 - 4.5.

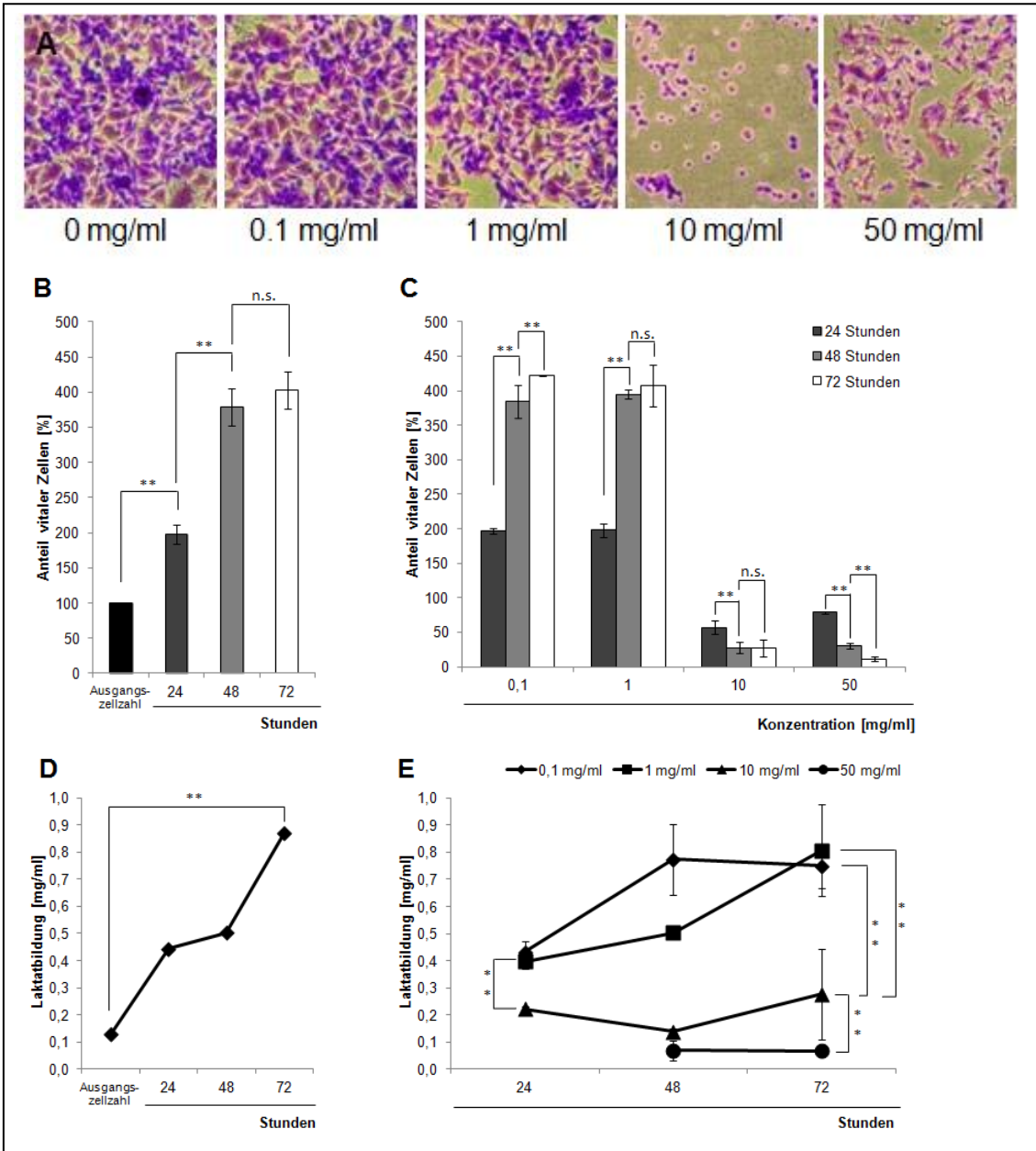


Abb. 4.2: Vitalität von Zellkulturen der Pankreaskarzinomzelllinie BxPC-3 mit und ohne AVEMAR. (A) Auswirkungen unterschiedlicher Konzentrationen von AVEMAR auf die Zellvitalität. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit AVEMAR inkubiert und anschließend die Zellvitalität mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt. Vergrößerung: x200. (B) Zunahme der Zellzahl während einer Kulturdauer von 72 Stunden ohne Inkubation der Zellen mit AVEMAR (= „Wachstumskontrolle“); (C) Änderung der Zellzahl während der Inkubation mit AVEMAR für 24 Stunden und Änderung der Zellzahl innerhalb von weiteren 24 bzw. 48 Stunden *nach* Inkubation mit AVEMAR. Hierzu wurde die AVEMAR-Lösung durch Kulturmedium ersetzt („Rekultivierung“). Der prozentuale Anstieg bzw. Abfall der Zellzahl wurde auf die Ausgangszellzahl berechnet. Zusätzlich zur Bestimmung der Zellzahl wurde auch die Laktatbildung als Maß der Zellvitalität überprüft. (D) Zunahme der Laktatproduktion während der Kulturdauer von 72 Stunden ohne AVEMAR (vergl. mit Abb. 4.2 B) und mit AVEMAR (E, vergl. mit Abb.4.2 C). Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Hierbei handelt es sich um repräsentative Ergebnisse aus jeweils 6 Parallelwerten. ** P < 0.01, n.s. = nicht signifikant.

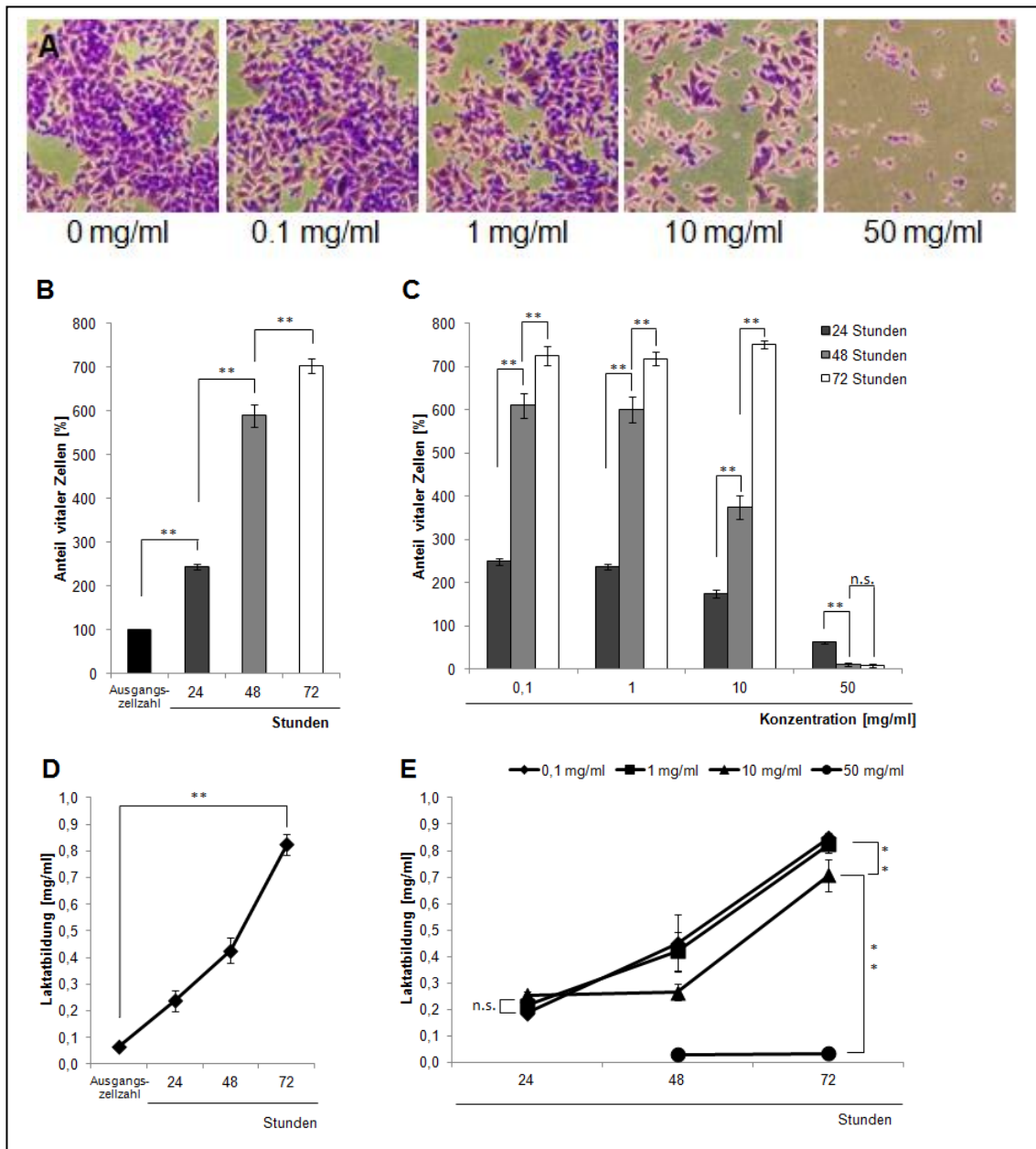


Abb. 4.3: Vitalität von Zellkulturen der Rektumkarzinomzelllinie HRT-18 mit und ohne AVEMAR. (A) Auswirkungen unterschiedlicher Konzentrationen von AVEMAR auf die Zellvitalität. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit AVEMAR inkubiert und anschließend die Zellvitalität mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt. Vergrößerung: x200. (B) Starke Zunahme der Zellzahl während einer Kulturdauer von 72 Stunden ohne Inkubation der Zellen mit AVEMAR (= Wachstumskontrolle“); (C) Änderung der Zellzahl während der Inkubation mit AVEMAR für 24 Stunden und Änderung der Zellzahl innerhalb von weiteren 24 bzw. 48 Stunden nach Inkubation mit AVEMAR. Hierzu wurde die AVEMAR-Lösung durch Kulturmedium ersetzt („Rekultivierung“). Der prozentuale Anstieg bzw. Abfall der Zellzahl wurde auf die Ausgangszellzahl berechnet. Die AVEMAR-Konzentration von 50 mg/ml war irreversibel zelltoxisch im Gegensatz zur AVEMAR-Konzentration von 10 mg/ml. Zusätzlich zur Bestimmung der Zellzahl wurde auch die Laktatbildung als Maß der Zellvitalität überprüft. (D) Zunahme der Laktatproduktion während der Kulturdauer von 72 Stunden ohne AVEMAR (vergl. mit Abb. 4.3 B) und mit AVEMAR (E, vergl. mit Abb.4.3 C). Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Hierbei handelt es sich um repräsentative Ergebnisse aus jeweils 6 Parallelwerten. ** P< 0.01, n.s. = nicht signifikant.

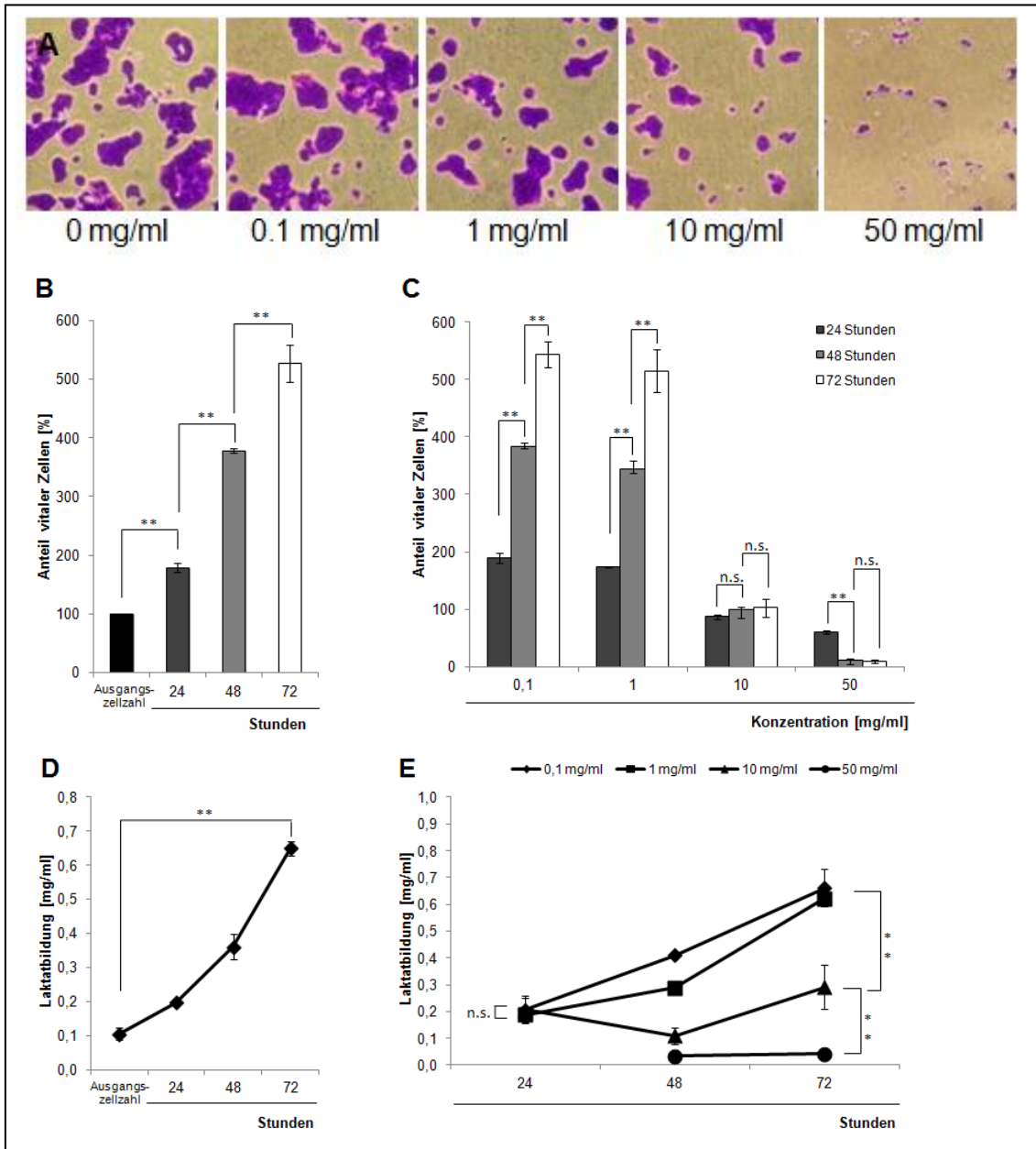


Abb. 4.4: Vitalität von Zellkulturen der Magenkarzinomzelllinie 23132/87 mit und ohne AVEMAR. (A) Auswirkungen unterschiedlicher Konzentrationen von AVEMAR auf die Zellvitalität. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit AVEMAR inkubiert und anschließend die Zellvitalität mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt. Vergrößerung: x200. (B) Zunahme der Zellzahl während einer Kulturdauer von 72 Stunden ohne Inkubation der Zellen mit AVEMAR (= „Wachstumskontrolle“); (C) Änderung der Zellzahl während der Inkubation mit AVEMAR für 24 Stunden und Änderung der Zellzahl innerhalb von weiteren 24 bzw. 48 Stunden nach Inkubation mit AVEMAR. Hierzu wurde die AVEMAR-Lösung durch Kulturmedium ersetzt („Rekultivierung“). Der prozentuale Anstieg bzw. Abfall der Zellzahl wurde auf die Ausgangszellzahl berechnet. Eine AVEMAR-Konzentration von 10 mg/ml war dauerhaft zytostatisch, d.h. eine signifikante Zunahme der Zellzahl wurde nicht beobachtet, während eine AVEMAR-Konzentration von 50 mg/ml eindeutig zelltoxisch war. Zusätzlich zur Bestimmung der Zellzahl wurde auch die Laktatbildung als Maß der Zellvitalität überprüft. (D) Zunahme der Laktatproduktion während der Kulturdauer von 72 Stunden ohne AVEMAR (vergl. mit Abb. 4.4 B) und mit AVEMAR (E, vergl. mit Abb.4.4 C). Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Hierbei handelt es sich um repräsentative Ergebnisse aus jeweils 6 Parallelwerten. ** P < 0,01, n.s. = nicht signifikant.

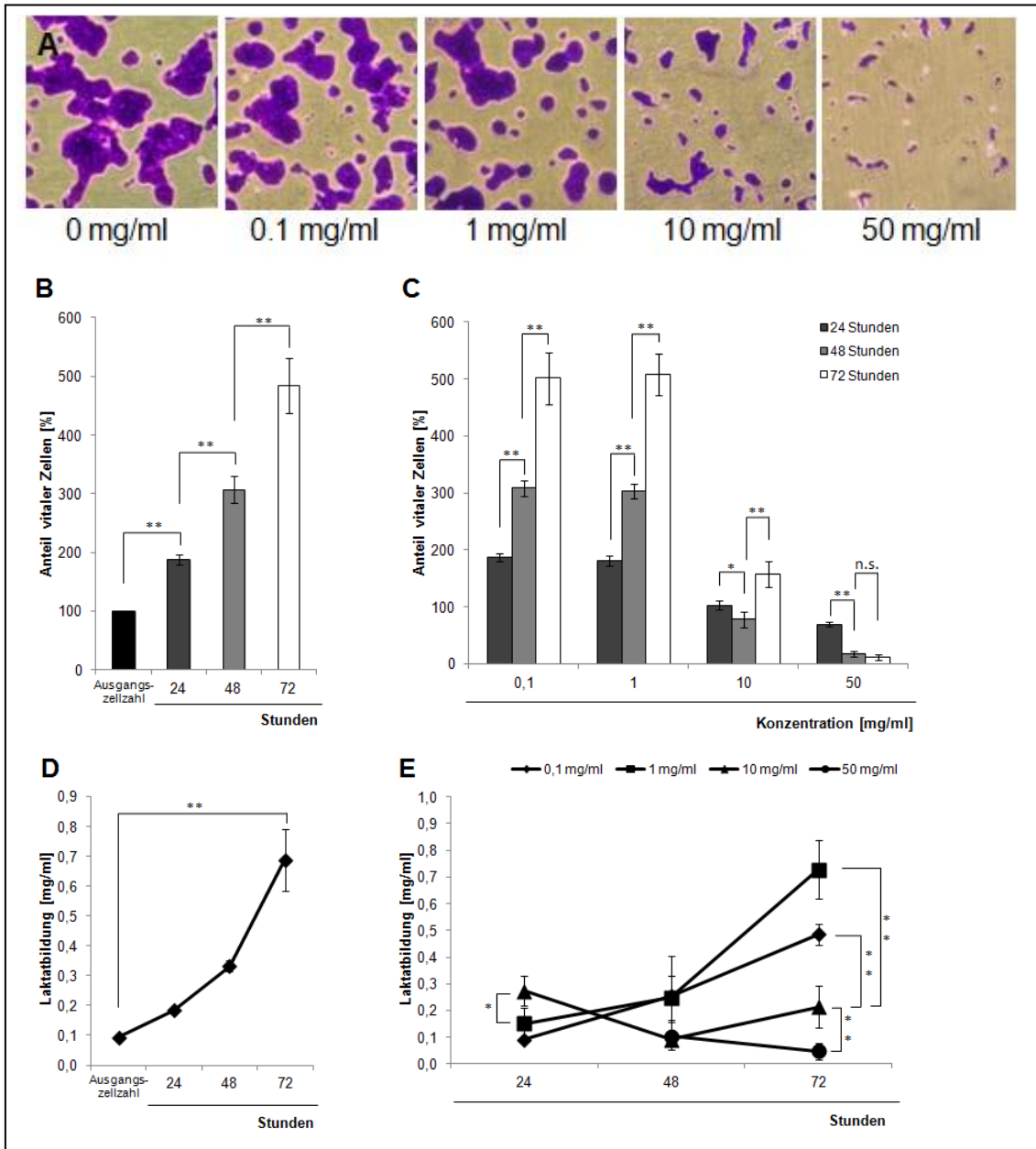


Abb. 4.5: Vitalität von Zellkulturen der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 mit und ohne AVEMAR. (A) Auswirkungen unterschiedlicher Konzentrationen von AVEMAR auf die Zellvitalität. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit AVEMAR inkubiert und anschließend die Zellvitalität mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt. Vergrößerung: x200. (B) Zunahme der Zellzahl während einer Kulturdauer von 72 Stunden ohne Inkubation der Zellen mit AVEMAR (= „Wachstumskontrolle“); (C) Änderung der Zellzahl während der Inkubation mit AVEMAR für 24 Stunden und Änderung der Zellzahl innerhalb von weiteren 24 bzw. 48 Stunden nach Inkubation mit AVEMAR. Hierzu wurde die AVEMAR-Lösung durch Kulturmedium ersetzt („Rekultivierung“). Der prozentuale Anstieg bzw. Abfall der Zellzahl wurde auf die Ausgangszellzahl berechnet. Eine AVEMAR-Konzentration von 10 mg/ml war nur zeitweise zytostatisch, d.h. 48 Stunden nach AVEMAR-Inkubation war eine signifikante Zunahme der Zellzahl zu beobachten (siehe Wert für 72 Stunden), während eine AVEMAR-Konzentration von 50 mg/ml eindeutig zelltoxisch war. Zusätzlich zur Bestimmung der Zellzahl wurde auch die Laktatbildung als Maß der Zellvitalität überprüft. (D) Zunahme der Laktatproduktion während der Kulturdauer von 72 Stunden ohne AVEMAR (vergl. mit Abb. 4.5 B) und mit AVEMAR (E, vergl. mit Abb.4.5 C). Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Hierbei handelt es sich um repräsentative Ergebnisse aus jeweils 6 Parallelwerten. ** P < 0.01, * P < 0.05, n.s. = nicht signifikant.

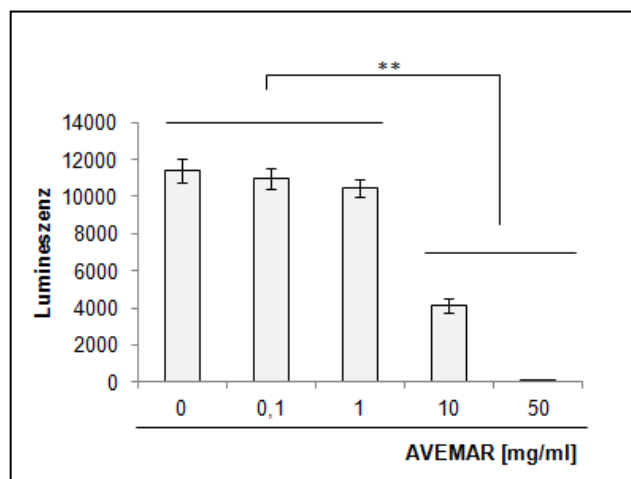
Weitere Untersuchungen mit der Zelllinie HT-29:

Mit der Zelllinie HT-29 wurden weitere Untersuchungen zur Bestimmung der Zellvitalität durchgeführt, hierzu zählten Messungen zum ATP-Gehalt und Messungen in Echtzeit im xCelligence-System.

Auch die Bestimmung der Zellvitalität mit dem ATP-Assay ergab, dass die AVEMAR-Konzentration von 10 mg/ml zu einer deutlichen Abnahme der Zellvitalität führte (Abb. 4.6). In der höchsten Konzentration von 50 mg/ml AVEMAR wurde keine Lumineszenz mehr gemessen, da bei dieser Konzentration sämtliche Zellen zerstört werden, was bereits die Daten vom Kristallviolett-Assay gezeigt haben (Abb. 4.5).

Abb. 4.6: Bewertung der Zellvitalität mit Hilfe eines ATP-Assays.

Zellen der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 wurden für 24 Stunden mit AVEMAR inkubiert und anschließend die Vitalität der Kulturen bestimmt. Bei einer Konzentration von 50 mg/ml AVEMAR war keine Lumineszenz mehr nachweisbar. Siehe hierzu auch die Daten vom Kristallviolett-Assay (Abb. 4.5). Der ATP-Assay beruht darauf, dass der intrazelluläre ATP-Gehalt durch den Zelltod abnimmt. Die Zellen werden lysiert und der ATP-Gehalt wird mit Hilfe der Luciferase-katalysierten Oxidation des Substrats Luciferin bestimmt. Diese Reaktion ist ATP-abhängig, und die entstehende Lumineszenz korreliert mit dem ATP-Gehalt der Zellen und ihrer Vitalität. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Hierbei handelt es sich um repräsentative Ergebnisse aus jeweils 6 Parallelwerten. ** P < 0.01.



Die Echtzeitmessung mit dem xCelligence-System belegt ebenfalls die zelltoxische Wirkung von 50 mg/ml AVEMAR auf Zellen der Kolonkarzinomzelllinie HT-29. (Abb. 4.7). Dieser Effekt war bereits innerhalb der ersten fünf Stunden nach Zugabe von AVEMAR zu beobachten.

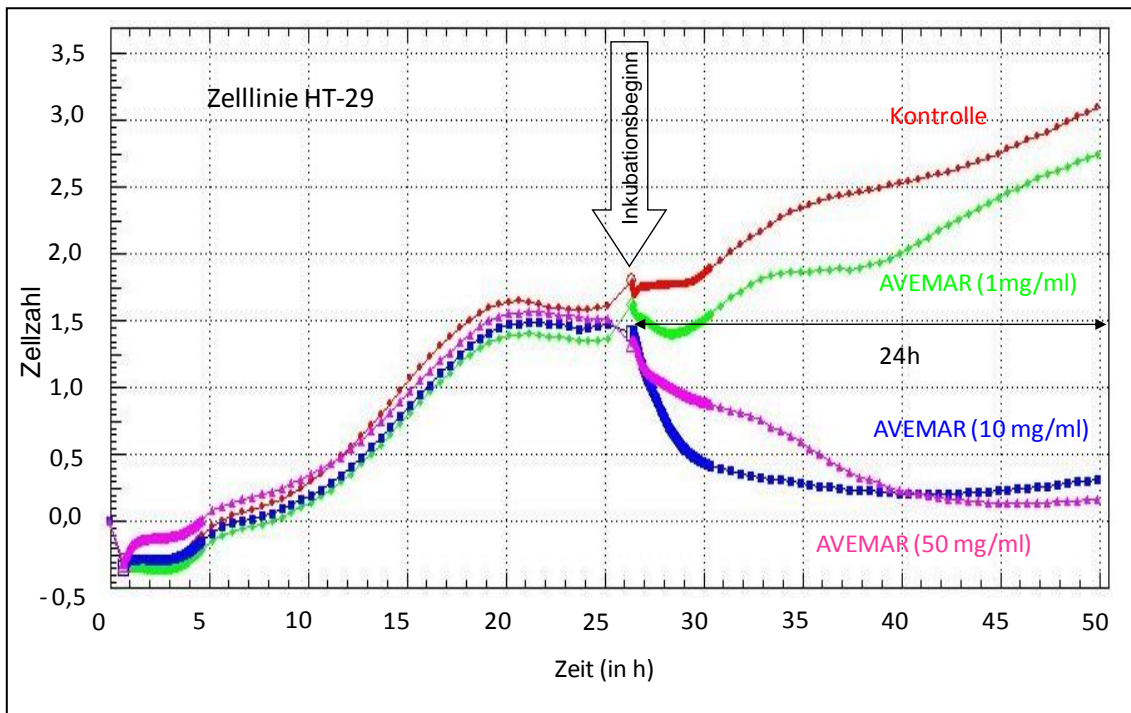


Abb. 4.7: Messungen zur Vitalität in Echtzeit mit dem xCelligence-System. Gezeigt sind die Ergebnisse für die Kolonkarzinomzelllinie HT-29 nach Inkubation mit AVEMAR für 24 Stunden. Ab einer Konzentration von 10 mg/ml verringert sich der Anteil vitaler Zellen. Auch der zelltoxische Effekt von 50 mg/ml ist zu beobachten. Der scheinbar stärkere zelltoxische Effekt der Konzentration 10 mg/ml in den ersten fünf Stunden ist möglicherweise durch eine veränderte Zellmorphologie zu erklären, die ebenfalls die Hauptmessgröße „Impedanz“ beeinflusst (s. Kapitel 3.4.3). Dies wurde aber nicht weiter untersucht.

4.2 Untersuchungen zur Induktion von oxidativem Stress durch Benzochinone und AVEMAR

4.2.1 Quantitativer Vergleich der Zelltoxizität von AVEMAR und 2,6-Dimethoxy-1,4-Benzochinonen

Die zelltoxischen Effekte von AVEMAR und 2,6-Dimethoxy-1,4-Benzochinonen (DMBQ) wurde an den Zelllinien BxPC-3, HRT-18, 23132/87, HT-29 und an Fibroblasten (Abb. 11.4) untersucht. Hierzu wurden äquimolare Konzentrationen an DMBQ eingesetzt: für 10 mg/ml AVEMAR sind dies 24 µmol/l DMBQ. Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

Bei allen vier Zelllinien wiesen die Benzochinone nach einer 24-stündigen Inkubation eine eindeutig höhere Zelltoxizität auf als AVEMAR. Besonders deutlich war dies bei den Zelllinien HRT-18 (Abb. 4.9), 23132/87 (Abb. 4.10) und HT-29 (Abb. 4.11). Der Unterschied zwischen Benzochinonen und AVEMAR fiel bei der Pankreaskarzinomzelllinie BxPC-3 (Abb. 4.8) deutlich geringer aus.

Zur Induktion von Semichinonradikalen benötigen Benzochinone ein Reduktionsmittel; in der vorliegenden Arbeit war dies Ascorbinsäure. Ohne Ascorbinsäure waren Benzochinone bei den meisten Tumorzelllinien, u.a. HRT-18, 23132/87 und HT-29, wirkungslos. Eine Ausnahme war die Pankreaskarzinomzelllinie BxPC-3; hier waren Benzochinone auch ohne Zusatz von Ascorbinsäure zelltoxisch (Abb. 11.7).

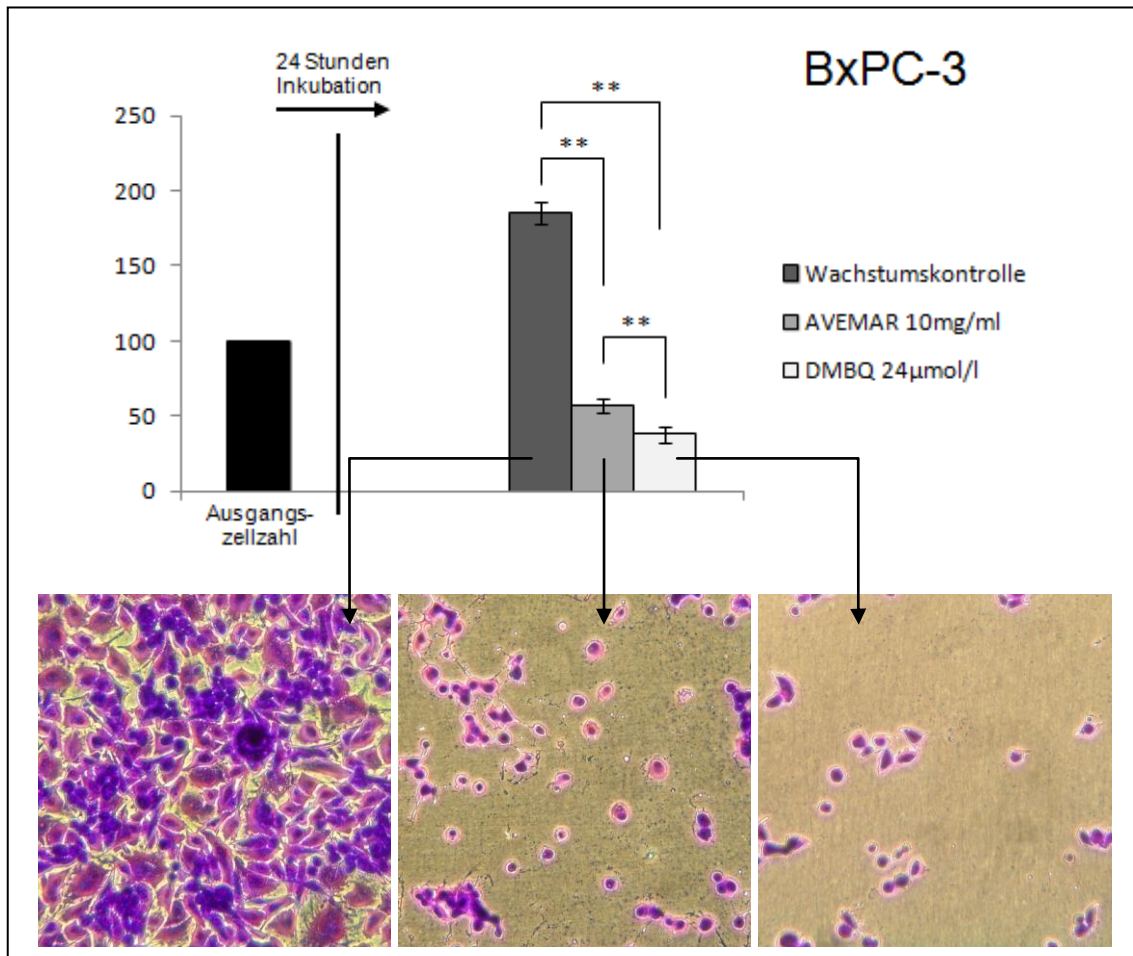


Abb. 4.8: Vergleich der zelltoxischen Effekte von AVEMAR und Benzochinonen (DMBQ) bei der Pankreaskarzinomzelllinie BxPC-3. Im Vergleich zur Ausgangszellzahl führte die 24-stündige Inkubation mit AVEMAR und Benzochinonen zu einer deutlichen Abnahme der Zellviabilität. Die Konzentration an Benzochinonen ist äquimolar zum Gehalt an Benzochinonen in AVEMAR. Den Benzochinonen wurde Ascorbinsäure (2,4 mmol/l) zugesetzt. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Hierbei handelt es sich um repräsentative Ergebnisse aus jeweils 6 Parallelwerten. ** $P < 0.01$. Vergrößerung: x200.

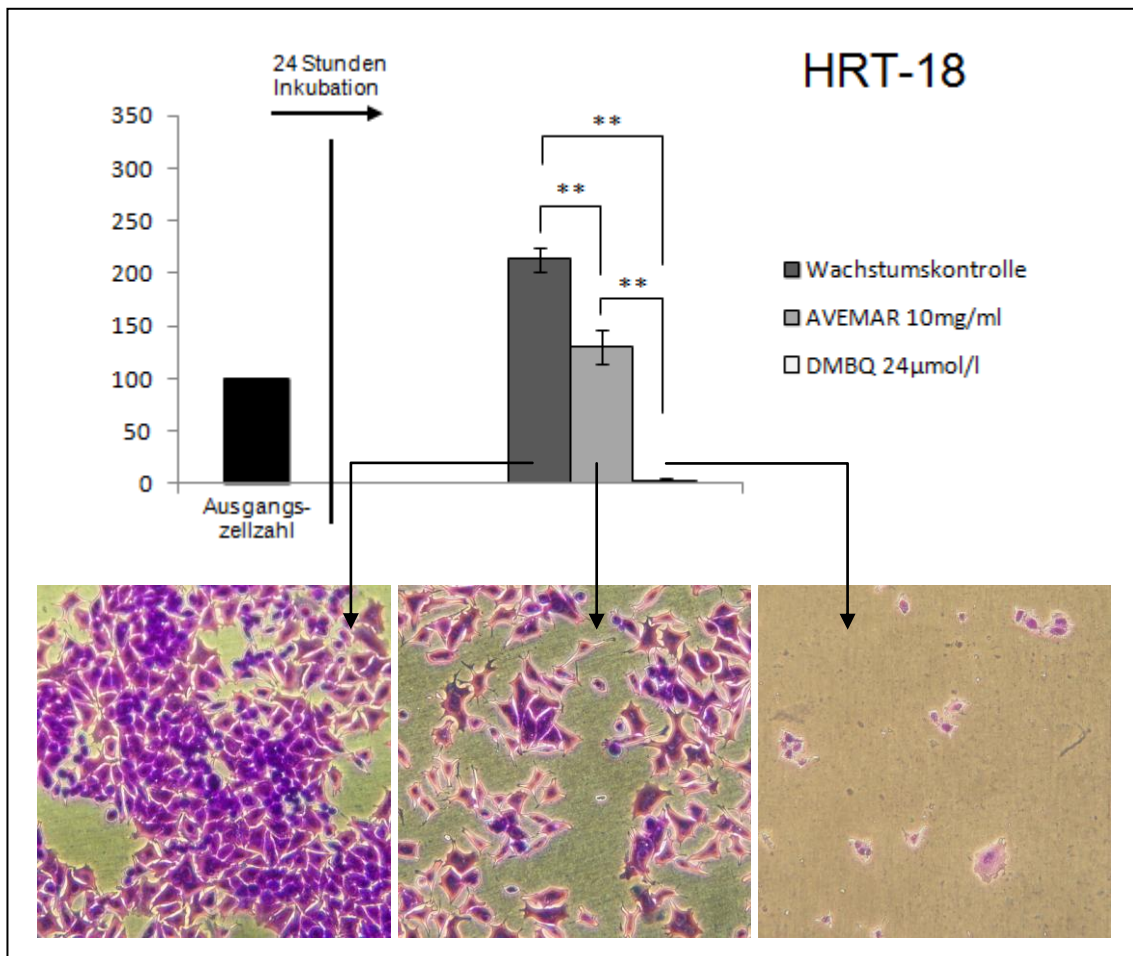


Abb. 4.9: Vergleich der zelltoxischen Effekte von AVEMAR und Benzochinonen (DMBQ) bei der Rektumkarzinomzelllinie HRT-18. Während die Benzochinone zelltoxisch wirken, löst AVEMAR eine schwache Zytostase aus. Dies wird ersichtlich durch den Vergleich mit der Ausgangszellzahl. Die Konzentration an Benzochinonen ist äquimolar zum Gehalt an Benzochinonen in AVEMAR. Den Benzochinonen wurde Ascorbinsäure (2,4 mmol/l) zugesetzt. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Hierbei handelt es sich um repräsentative Ergebnisse aus jeweils 6 Parallelwerten. ** $P < 0.01$. Vergrößerung: x200.

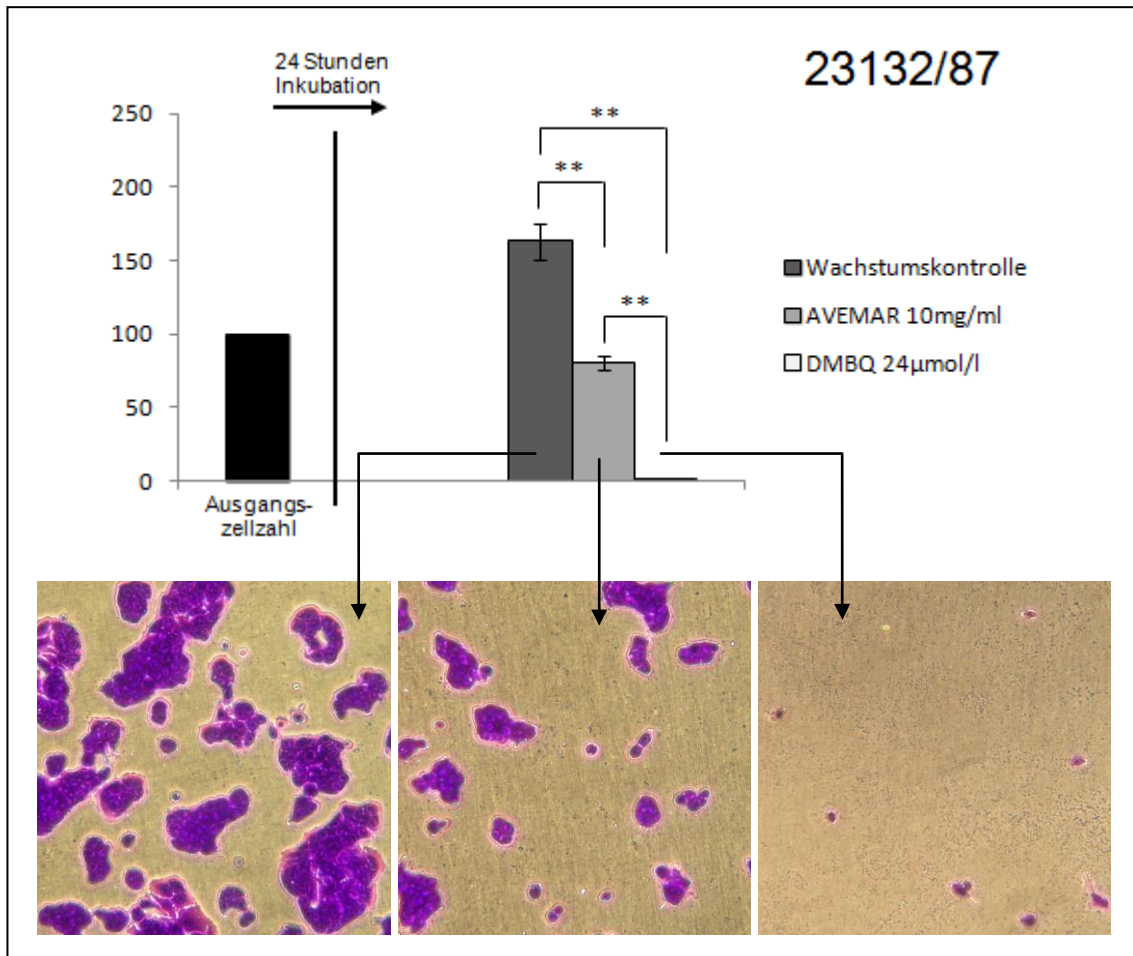


Abb. 4.10: Vergleich der zelltoxischen Effekte von AVEMAR und Benzochinonen (DMBQ) bei der Magenkarzinomzelllinie 23132/87. Während die Benzochinone zelltoxisch wirken, löst AVEMAR eine Zytostase aus. Dies wird ersichtlich durch den Vergleich mit der Ausgangszellzahl. Die Konzentration an Benzochinonen ist äquimolar zum Gehalt an Benzochinonen in AVEMAR. Den Benzochinonen wurde Ascorbinsäure (2,4 mmol/l) zugesetzt. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Hierbei handelt es sich um repräsentative Ergebnisse aus jeweils 6 Parallelwerten. ** $P < 0.01$. Vergrößerung: x200.

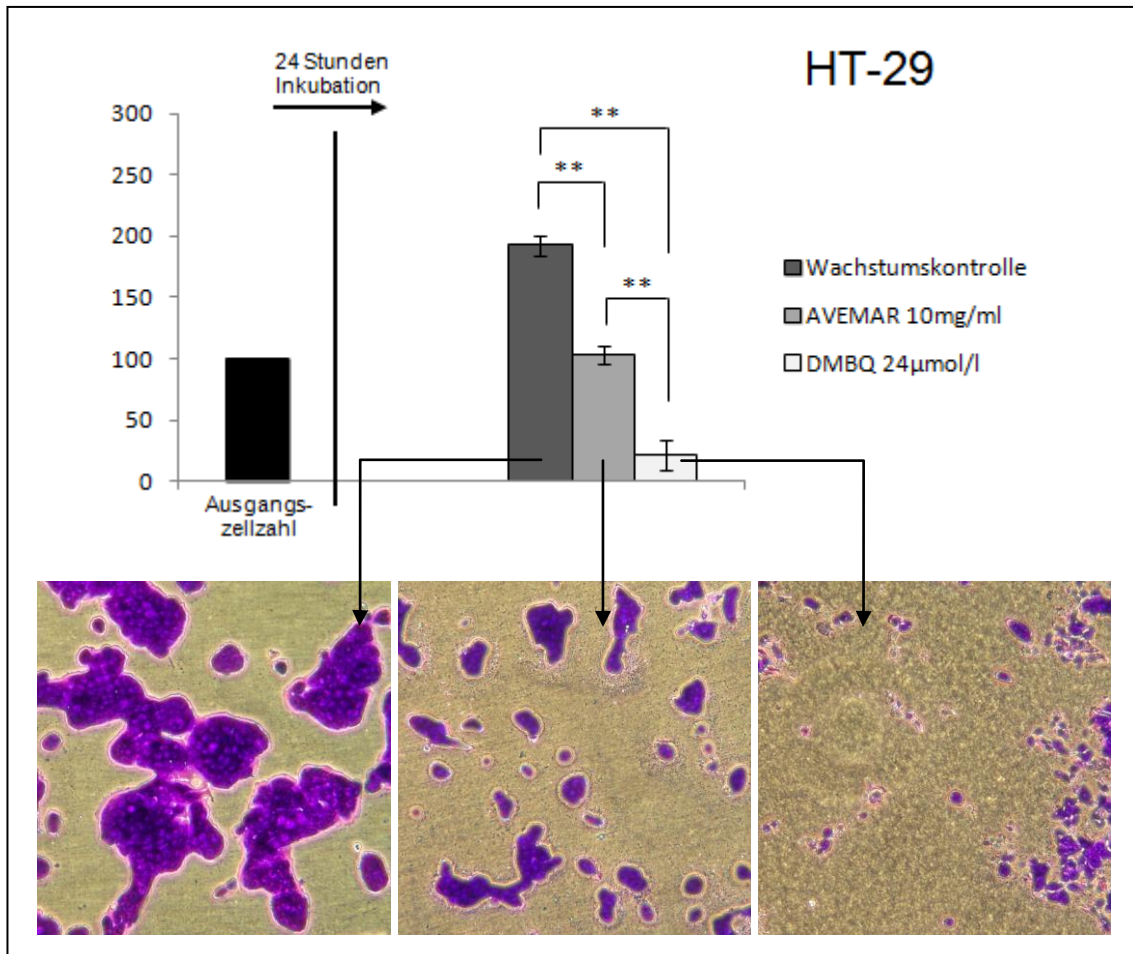


Abb. 4.11: Vergleich der zelltoxischen Effekte von AVEMAR und Benzochinonen (DMBQ) bei der Kolonkarzinomzelllinie HT-29. Während die Benzochinone zelltoxisch wirken, löst AVEMAR eine Zytostase aus. Dies wird ersichtlich durch den Vergleich mit der Ausgangszellzahl. Die Konzentration an Benzochinonen ist äquimolar zum Gehalt an Benzochinonen in AVEMAR. Den Benzochinonen wurde Ascorbinsäure (2,4 mmol/l) zugesetzt. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Hierbei handelt es sich um repräsentative Ergebnisse aus jeweils 6 Parallelwerten. ** $P < 0.01$. Vergrößerung: x200.

Weitere Untersuchungen mit der Zelllinie HT-29:

Die starke zelltoxische Wirkung der Benzochinone ist sowohl im ATP-Assay als auch in der Echtzeit-Messung im xCelligence-System zu beobachten. Die mit Benzochinonen behandelten Zellen emittierten keine Lumineszenz (Abb. 4.12).

Auch in der Echtzeitmessung mit dem xCelligence-System war die starke zelltoxische Wirkung der Benzochinone besonders gut nachzuweisen (Abb. 4.13). Dabei verringerten Benzochinone die Zellvitalität schneller und in einem größeren Ausmaß als AVEMAR.

Abb. 4.12: Bewertung der Zellvitalität mit Hilfe eines ATP-Assays. Zellen der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 wurden für 24 Stunden mit Benzochinonen (DMBQ) inkubiert und anschließend der Assay durchgeführt. Den Benzochinonen wurde Ascorbinsäure (2,4 mmol/l) zugesetzt. Nach einer 24-stündigen Inkubation mit DMBQ ist keine Lumineszenz mehr nachweisbar. Siehe auch Abb. 4.11. Der ATP-Assay beruht darauf, dass der intrazelluläre ATP-Gehalt durch den Zelltod abnimmt. Die Zellen werden lysiert und der ATP-Gehalt wird mit Hilfe der Luciferase-katalysierten Oxidation des Substrats Luciferin bestimmt. Diese Reaktion ist ATP-abhängig, und die entstehende Lumineszenz korreliert mit dem ATP-Gehalt der Zellen und ihrer Vitalität. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Hierbei handelt es sich um repräsentative Ergebnisse aus jeweils 6 Parallelwerten. ** P < 0.01.

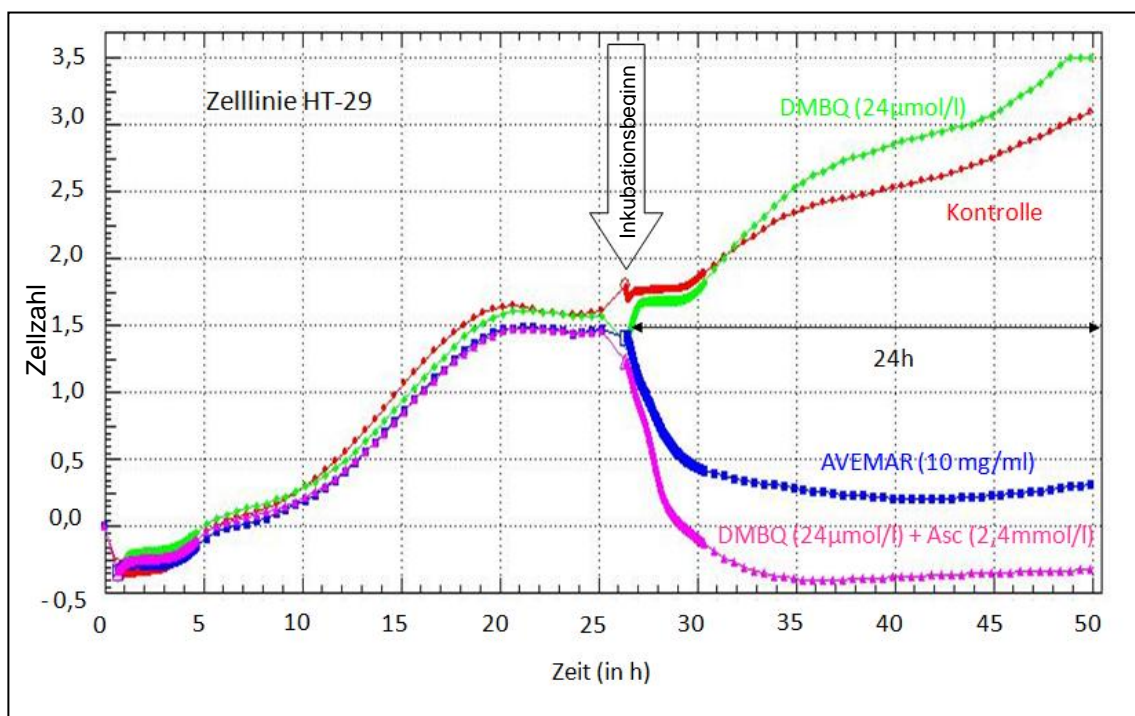
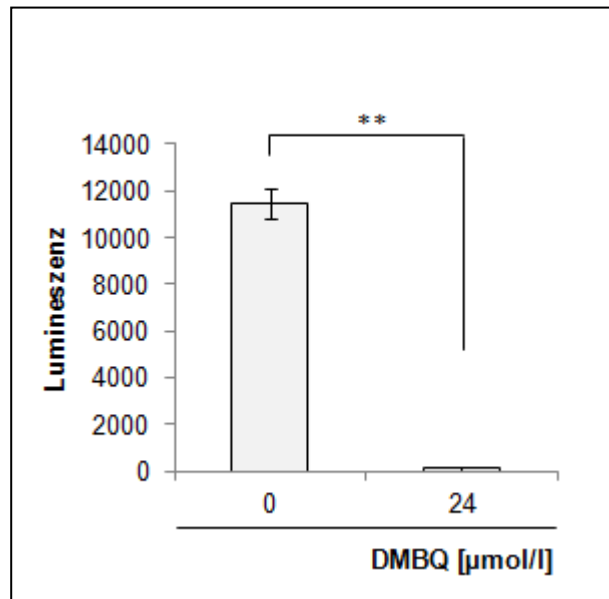


Abb. 4.13: Messungen zur Vitalität in Echtzeit mit dem xCelligence-System. Gezeigt sind die Ergebnisse für die Kolonkarzinomzelllinie HT-29 nach 24-stündiger Inkubation mit Benzochinonen (DMBQ) mit bzw. ohne Ascorbinsäure (Asc) im Vergleich zu AVEMAR (10 mg/ml). Die Bedeutung von Ascorbinsäure zur Bildung reaktiver Semichinonradikale wird aus den Kurvenverläufen ersichtlich (s. auch Abb. 1.3). Zudem ist der für AVEMAR (10 mg/ml) im Kristallviolett beobachtete zytostatische Effekt nachweisbar.

4.2.2 Nachweis von oxidativem Stress

Durch Zugabe antioxidativ wirksamer Substanzen (Abb. 1.5) wurde untersucht, ob der zelltoxische bzw. zytostatische Effekt von AVE-MAR auf der Induktion von oxidativem Stress beruht. Als erstes wurde die Wirksamkeit von reduziertem Glutathion (GSH), ein wichtiges Antioxidans im zellulären Stoffwechsel, untersucht.

Die Zugabe von reduziertem Glutathion (GSH) schützte die vier Zelllinien vor dem Benzochinon-vermittelten zelltoxischen Effekt (Abb. 4.14). Im Gegensatz dazu konnte Glutathion den wachstumshemmenden Effekt von AVE-MAR auf die Zelllinien HRT-18, 23132/87 und HT-29 nicht aufheben bzw. abschwächen (Abb. 4.15).

Bei der Pankreaskarzinomzelllinie BxPC-3 schützte Glutathion vor der toxischen Wirkung sowohl von AVE-MAR als auch von Benzochinonen (Abb. 4.14). Die mikroskopische Auswertung zeigt eindrucksvoll anhand der Zellmorphologie die schützende Wirkung von Glutathion (Abb. 4.14 B und C). Die vorliegenden Daten zur Pankreaskarzinomzelllinie sprechen somit für die Induktion von oxidativem Stress durch 2,6-Dimethoxy-1,4-Benzochinone und AVE-MAR.

Zurzeit ist nicht geklärt, ob das extern zugegebene Glutathion von der Zelle aufgenommen wird. Daten von Martensson et al. deuten darauf hin, dass nur geringe Mengen an intaktem Glutathion von der Zelle aufgenommen werden. Erst die Spaltung von Glutathion in die einzelnen Aminosäuren ermöglicht eine effektive Aufnahme. Innerhalb der Zelle werden dann die Spaltprodukte wieder zu Glutathion zusammengesetzt (Martensson et al. 1990). Andererseits kann die Zelle Glutathion nach außen exportieren (Meister und Anderson 1983).

Der Konzentrationsunterschied zwischen intrazellulärem Glutathion mit 0,5 bis 10 µmol/l (Meister und Anderson 1983) und extrazellulärem Glutathion von 3,6 mmol/l (Abb. 4.14 und 4.15) ist somit erheblich (3.000-fach höher); möglicherweise werden durch diese enormen Konzentrationsunterschiede unspezifische Transportvorgänge ausgelöst.

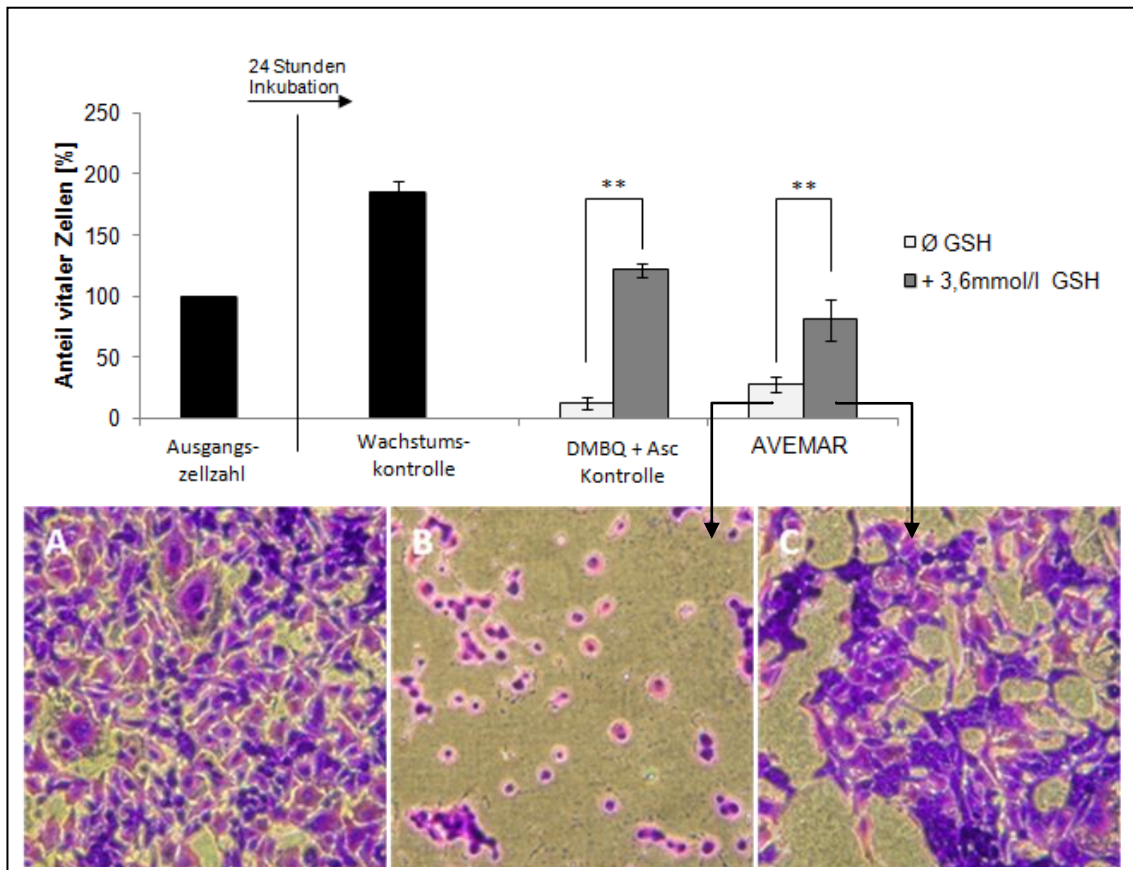


Abb. 4.14: Nachweis zum protektiven Effekt von Glutathion (GSH) auf die Benzochinon- und AVEMAR-induzierte Radikalbildung bei der Pankreaskarzinomzelllinie BxPC-3. Im Diagramm sind die Ergebnisse zur Zellvitalität dargestellt. Benzochinone (DMBQ) wurden als Positivkontrolle eingesetzt, da bekannt ist, dass diese die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (oxidativer Stress) auslösen. Die repräsentativen Aufnahmen zeigen entsprechende Kristallviolett-Färbungen: (A) Wachstumskontrolle; (B) AVEMAR 10 mg/ml; (C) AVEMAR 10 mg/ml + GSH (3,6 mmol/l). Die protektive Wirkung von Glutathion verhindert / verringert den AVEMAR-vermittelten zelltoxischen Effekt. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Hierbei handelt es sich um repräsentative Ergebnisse aus jeweils 6 Parallelwerten. Konzentrationen: AVEMAR 10 mg/ml; DMBQ 24 μ mol/l; Ascorbinsäure 2,4 mmol/l.** $P < 0,01$. Vergrößerung: x200.

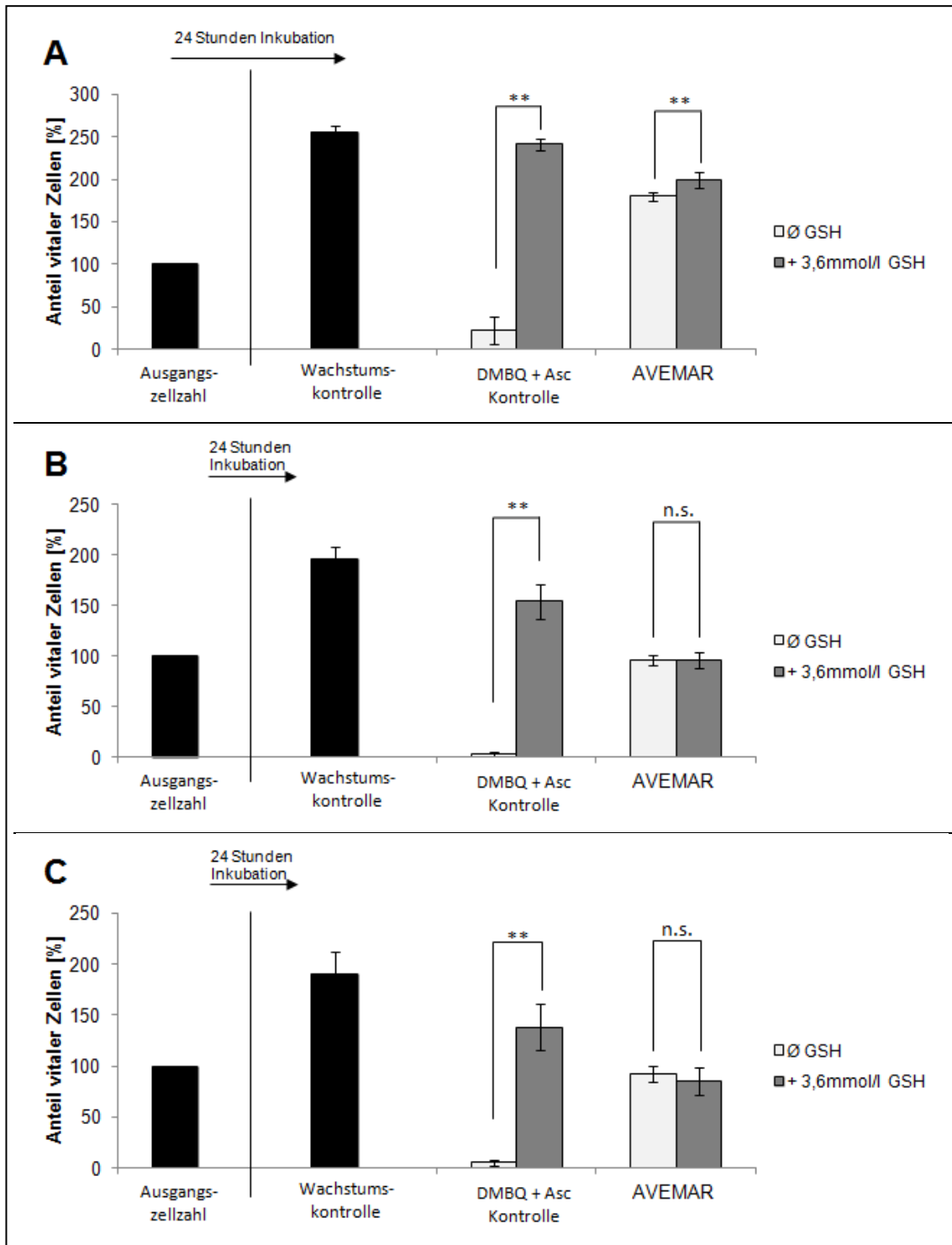


Abb. 4.15: Untersuchungen zum protektiven Effekt von Glutathion (GSH) bei Inkubation mit Benzochinonen und AVEMAR. (A) Rektumkarzinomzelllinie HRT-18; (B) Magenkarzinomzelllinie 23132/87; (C) Kolonkarzinomzelllinie HT-29. Die protektive Wirkung von GSH auf den Benzochinon (DMBQ)-vermittelten zelltoxischen Effekt ist ersichtlich, d.h. die durch DMBQ induzierten Radikale werden von GSH „abgefangen“, während AVEMAR, wenn es zytostatisch wirkt, wohl keine Radikalbildung induziert und GSH somit eine schwache (A) bzw. keine Wirkung (B, C) zeigt. Siehe auch Tab. 4.1 zur „Beurteilung der Wirkung von 10 und 50 mg/ml AVEMAR nach 24 Stunden Inkubation“. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Hierbei handelt es sich um repräsentative Ergebnisse aus jeweils 6 Parallelwerten. Konzentrationen: AVEMAR 10 mg/ml; DMBQ 24 µmol/l; Ascorbinsäure 2,4 mmol/l. ** P < 0.01, n.s. = nicht signifikant.

Die zugegebene Superoxiddismutase hatte sowohl bei den Benzochinonen als auch bei AVEMAR keinen protektiven Effekt. Dies wurde an den beiden Tumorzelllinien BxPC-3 (Abb. 4.16 A) und HT-29 (Abb. 4.16 B) untersucht. Da absolut sicher anzunehmen ist, dass das Enzym SOD-1 die Zellmembran nicht passieren kann und somit extrazellulär verbleibt, kann es die intrazellulär entstehenden Superoxidanionen ($O_2^{\bullet-}$) nicht neutralisieren. Diese sind aufgrund ihrer Ladung nicht fähig, die Membran zu passieren. Zudem sind Superoxidanionen aufgrund ihrer Reaktivität sehr kurzlebig.

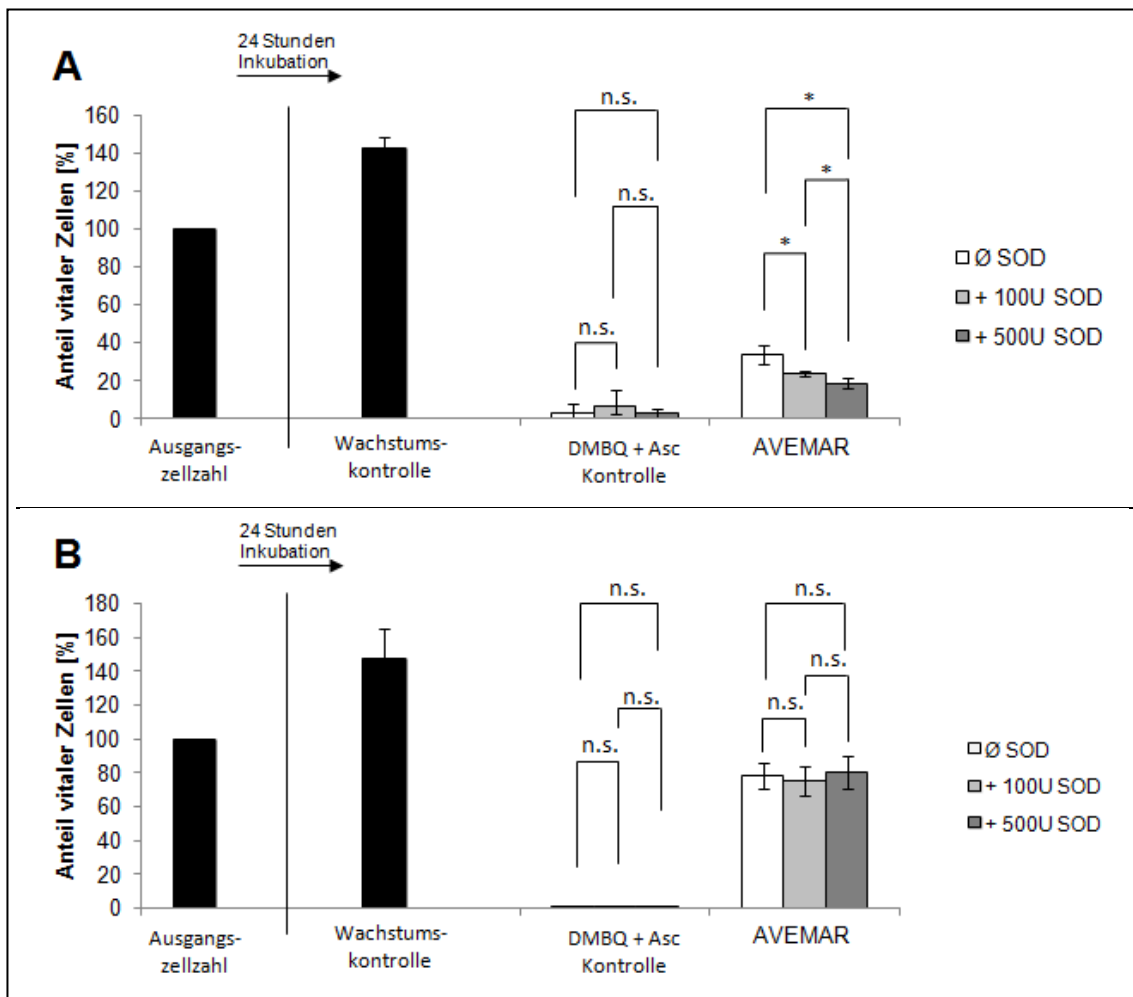


Abb. 4.16: Untersuchungen zum möglichen protektiven Effekt von Superoxiddismutase-1 bei Inkubation mit Benzochinonen (DMBQ) und AVEMAR. (A) Pankreaskarzinomzelllinie BxPC-3; (B) Kolonkarzinomzelllinie HT-29. Die Superoxiddismutase (SOD) war in beiden Fällen ohne protektive Wirkung. Die bei der Zelllinie BxPC-3 beobachtete Abnahme der Zellvitalität mit 100 und 500 U SOD im Vergleich zur Kontrolle ohne SOD ist zwar statistisch signifikant, aber biologisch ohne Relevanz, da der erwartete protektive Effekt der SOD ausblieb. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Hierbei handelt es sich um repräsentative Ergebnisse aus jeweils 6 Parallelwerten. Konzentrationen: AVEMAR 10 mg/ml; DMBQ 24 μ mol/l; Ascorbinsäure 2,4 mmol/l. * $P < 0.05$, n.s. = nicht signifikant.

Wasserstoffperoxid ist aufgrund seiner ausgeglichenen Ladung in der Lage, durch die Zellmembranen zu diffundieren. Extrazelluläre Katalase kann somit das während der Radikalkaskade (Abb. 1.5) gebildete Wasserstoffperoxid zerstören.

Extrazelluläre Katalase weist im Gegensatz zu AVEMAR bei Benzochinonen einen protektiven Effekt auf. (Abb. 4.17). Die protektive Wirkung der Katalase spricht für die Bildung von Wasserstoffperoxid im Rahmen des Benzochinon-vermittelten oxidativen Stresses.

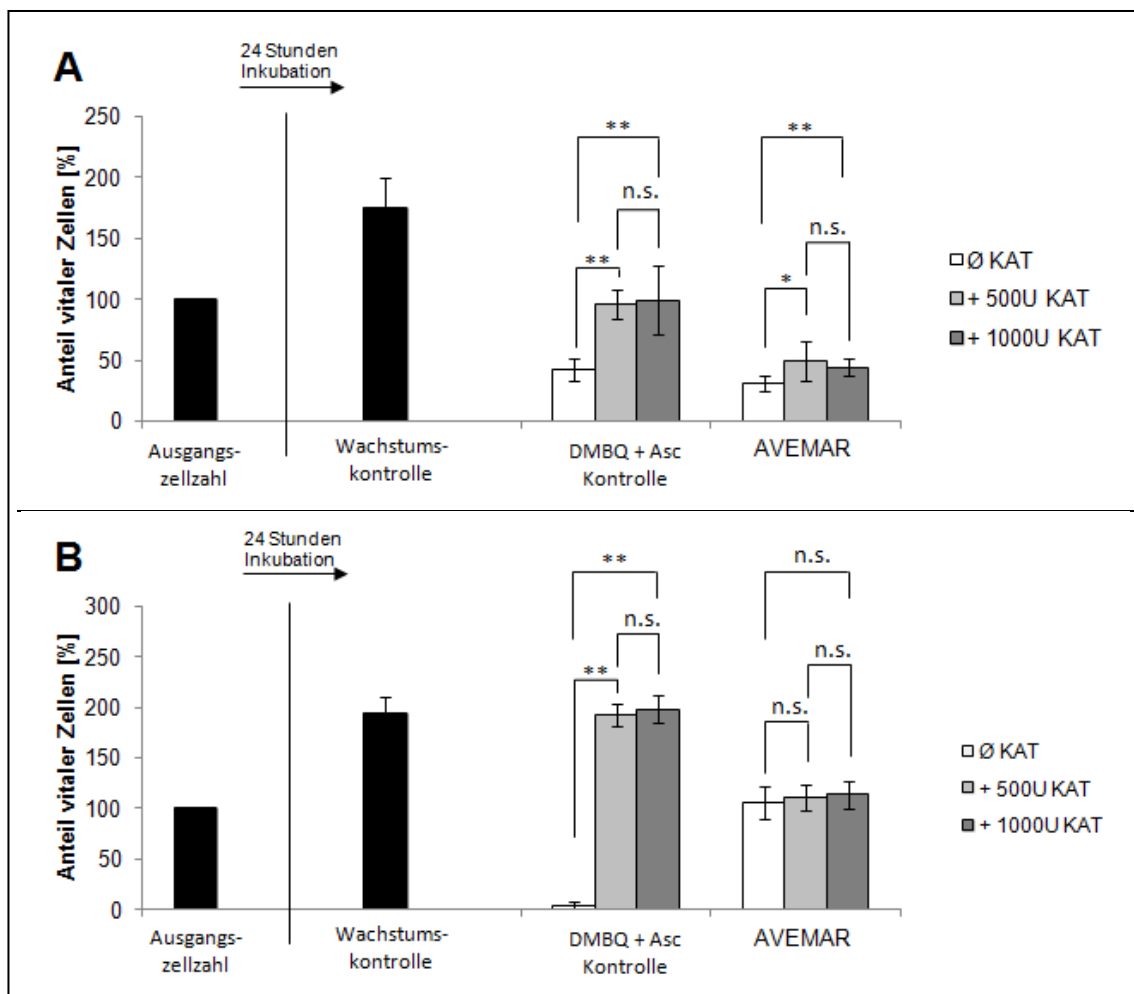


Abb. 4.17: Untersuchungen zum möglichen protektiven Effekt von Katalase (KAT) bei Inkubation mit Benzochinonen (DMBQ) und AVEMAR. (A) Pankreaskarzinomzelllinie BxPC-3; (B) Kolonkarzinomzelllinie HT-29. Katalase (KAT) schützt die Zellen vor dem Benzochinon-vermittelten, zelltoxischen Effekt. Die zytostatische Wirkung von AVEMAR wird durch die Katalase nicht wesentlich beeinflusst, auch wenn ein statistisch signifikanter Unterschied zu beobachten ist; dieser geringe Unterschied hat sicherlich keine biologische Relevanz. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Hierbei handelt es sich um repräsentative Ergebnisse aus jeweils 6 Parallelwerten. Konzentrationen: AVEMAR 10 mg/ml; DMBQ 24 µmol/l; Ascorbinsäure 2,4 mmol/l. ** P < 0.01, * P < 0.05, n.s. = nicht signifikant.

In Tab. 4.3 und Tab 4.4 sind die bisherigen Ergebnisse dieses Kapitels zusammengefasst.

Tab. 4.3: Antagonisierung der zelltoxischen Effekte von AVEMAR durch Antioxidantien. Dabei bedeutet „Ja“, dass der Effekt von AVEMAR durch das entsprechende Antioxidans verhindert wurde; „Nein“ bedeutet kein Effekt. Vergl. mit Abb. 4.14 - 4.17.

AVEMAR	GSH	SOD-1	Katalase
BxPC-3	Ja	Nein	Nein
HRT-18	Nein	Nein^{*)}	Nein^{*)}
23132/87	Nein	Nein^{*)}	Nein^{*)}
HT-29	Nein	Nein	Nein

^{*)} Wurde nicht untersucht, wird aber aufgrund der vorhandenen Daten angenommen.

Tab. 4.4: Antagonisierung der zelltoxischen Effekte von DMBQ durch Antioxidantien. Dabei bedeutet „Ja“, dass der Effekt von AVEMAR durch das entsprechende Antioxidans verhindert wurde; „Nein“ bedeutet kein Effekt. Vergl. mit Abb. 4.14 - 4.17.

DMBQ	GSH	SOD-1	Katalase
BxPC-3	Ja	Nein	Ja
HRT-18	Ja	Nein^{*)}	Ja^{*)}
23132/87	Ja	Nein^{*)}	Ja^{*)}
HT-29	Ja	Nein	Ja

^{*)} Wurde nicht untersucht, wird aber aufgrund der vorhandenen Daten angenommen.

4.3 Nachweis wachstumshemmender Effekte weiterer Weizenprodukte

Neben AVEMAR wurden weitere Weizenprodukte auf mögliche wachstumshemmende Wirkungen hin untersucht. Hierzu zählen die Weizenkeimlinge (aus denen AVEMAR durch Fermentierung gewonnen wird), die auch Weizenlektine (*wheat germ agglutinin*) enthalten sowie gewöhnliches Weizenmehl Typ 405 und das Klebprotein Gluten.

4.3.1 Weizenkeimlinge

Überraschend war das Ergebnis, dass auch zerkleinerte Weizenkeimlinge einen zelltoxischen Effekt aufweisen. Hierzu sind in Abb. 4.18 sämtliche EC₅₀-Werte aller untersuchten Zelllinien dargestellt. Dabei ist zu beobachten, dass andere Zellen empfindlich auf den Extrakt aus Weizenkeimlingen reagierten, als auf

AVEMAR. Von den vier näher untersuchten Zelllinien sind BxPC-3, 23132/87 und HRT-18 als empfindlich einzustufen; Zellen der Zelllinie HT-29 hingegen reagierten unempfindlich auf den Extrakt aus Weizenkeimlingen.

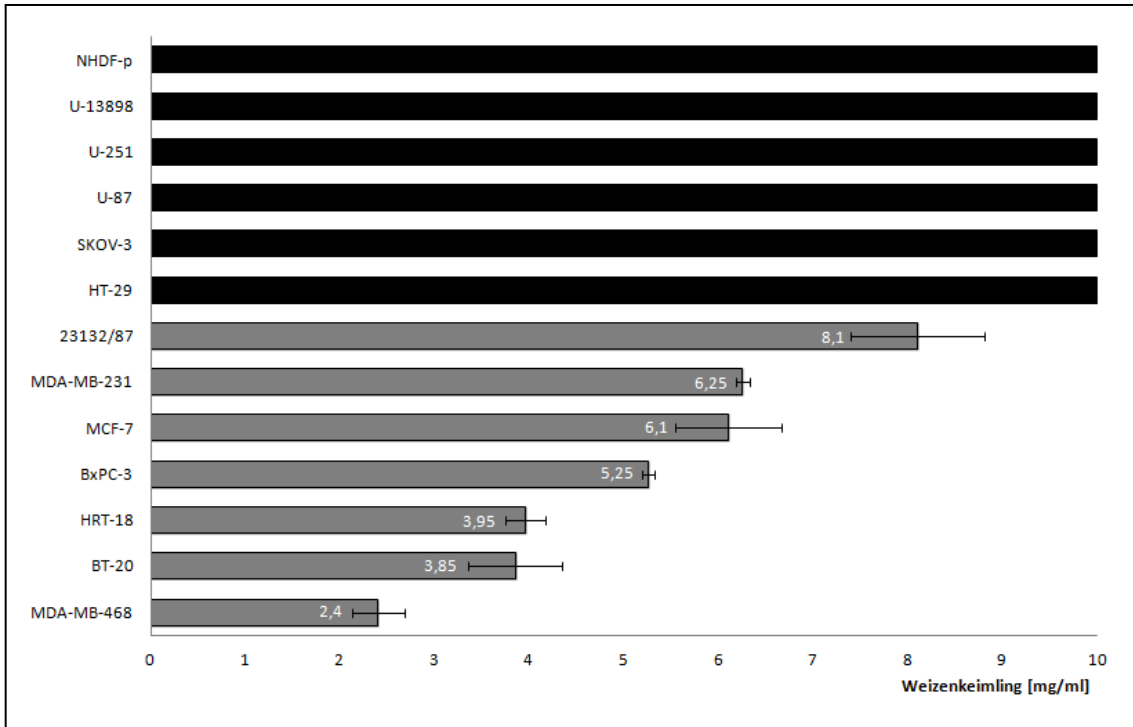


Abb. 4.18: Die EC₅₀-Werte für Weizenkeimlinge der in dieser Arbeit getesteten Zelllinien. Hierzu wurden Weizenkeimlinge gemörsert und anschließend in Medium gelöst (s. auch Kapitel 3.3.4). Die Zelllinien wurden für 24 Stunden mit Konzentrationen an Weizenkeimlingen von 0,1 bis 10 mg/ml inkubiert. Fünf maligne Zelllinien und die Fibroblasten (NHDF-p) waren so unempfindlich gegenüber Weizenkeimlingen, dass kein EC₅₀-Wert bestimmt werden konnte. Zu beachten ist hier die maximale Konzentration von 10 mg/ml. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Hierbei handelt es sich um mindestens zwei Wiederholungen mit jeweils 3 Parallelwerten. Die EC₅₀-Werte für die sieben Zelllinien im Einzelnen: MDA-MB-468: 2,4 ± 0,28 mg/ml; BT-20: 3,85 ± 0,49 mg/ml; HRT-18: 3,95 ± 0,21 mg/ml; BxPC-3: 5,25 ± 0,071 mg/ml; MCF-7: 6,1 ± 0,57 mg/ml; MDA-MB-231: 6,25 ± 0,071 mg/ml; 23132/87: 8,1 ± 0,71 mg/ml.

Die Wirkung des Extrakts aus Weizenkeimlingen wurde für die vier Zelllinien BxPC-3, HT-29, HRT-18, 23132/87 im Vergleich zu AVEMAR genauer untersucht. Beide Stoffe lagen in einer Konzentration von 10 mg/ml vor.

Der zelltoxische Effekt von AVEMAR und Weizenkeimlingen war für die drei Zelllinien BxPC-3, 23132/87 und HT-29 identisch; die Abbildungen befinden sich im Anhang (Abb. 11.8; Abb. 11.9 und Abb. 11.10).

Bei der Rektumkarzinomzelllinie HRT-18 waren die Weizenkeimlinge im Vergleich zu AVEMAR zelltoxischer (Abb. 4.19).

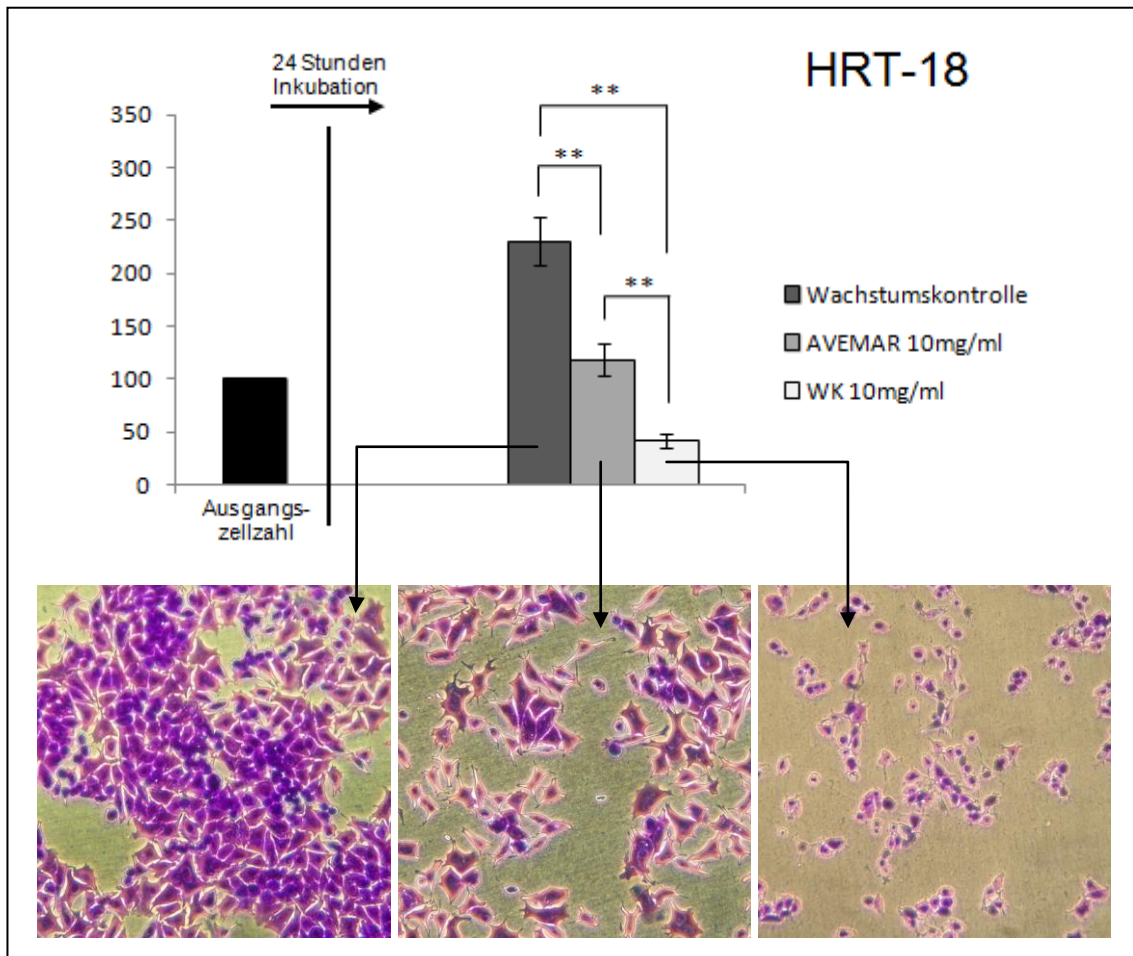


Abb. 4.19: Zelltoxische Effekte von AVEMAR und Weizenkeimlingen (WK) bei der Rektumkarzinomzelllinie HRT-18. Interessant ist das Ergebnis, dass der Extrakt aus Weizenkeimlingen mit 10 mg/ml wesentlich zelltoxischer auf Zellen der Zelllinie HRT-18 wirkt als AVEMAR. Die ebenfalls untersuchten Konzentrationen 0,1 und 1 mg/ml wiesen weder bei HRT-18 noch bei den drei anderen Zelllinien einen nennenswerten Effekt auf (Daten nicht gezeigt). Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Hierbei handelt es sich um repräsentative Ergebnisse aus jeweils 6 Parallelwerten. ** P < 0.01.

Tab. 4.5: Beurteilung der Wirkung von Weizenkeimlingen und AVEMAR nach 24 Stunden Inkubation. Vergl. mit Abb. 4.19 und Abb. 11.8 – 11.10

Zelllinie	Weizenkeimlinge 10 mg/ml	AVEMAR 10 mg/ml
BxPC-3	zelltoxisch	zelltoxisch
HRT-18	zelltoxisch	schwach zytostatisch
23132/87	zytostatisch	zytostatisch
HT-29	zytostatisch	zytostatisch

Begriffsklärung: Zelltoxisch: Im Vergleich zur Ausgangszellzahl nimmt der Anteil vitaler Zellen um mehr als 40 % ab; **Zytostatisch:** Im Vergleich zur Ausgangszellzahl bleibt der Anteil vitaler Zellen erhalten (ca. 80-100 %); **Schwach zytostatisch:** Im Vergleich zur Ausgangszellzahl nimmt der Anteil vitaler Zellen zwar zu, bleibt aber deutlich (>50 %) hinter der Wachstumskontrolle zurück.

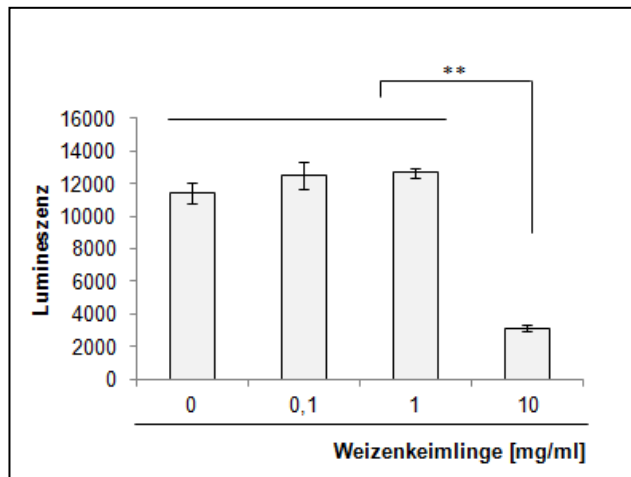
Weitere Untersuchungen mit der Zelllinie HT-29:

Auch im ATP-Assay nahm der Anteil lebender Zellen durch die Inkubation mit Weizenkeimling-Extrakt von 10 mg/ml deutlich ab (Abb. 4.20).

Niedrigere Konzentrationen des Weizenkeimling-Extrakts hatten keinen zelltoxischen Effekt. Zellmorphologische Unterschiede wurden aber trotz unauffälliger Ergebnisse im Kristallviolett-Assay bereits bei einer Konzentration von 1 mg/ml gefunden. Eine deutlich degenerierte und „avitale“ Morphologie der Zellen tritt bei einer Weizenkeimling-Konzentration von 10 mg/ml auf (Abb. 4.21).

Abb. 4.20: Bewertung der Zellvitalität mit Hilfe eines ATP-Assays.

Zellen der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 wurden für 24 Stunden mit Extrakt aus Weizenkeimlingen inkubiert und anschließend die Vitalität der Kulturen bestimmt. Bei einer Weizenkeimling-Konzentration von 10 mg/ml war nur noch ein Bruchteil der Lumineszenz der Kontrolle (0 mg/ml) nachweisbar. Siehe hierzu auch die Daten vom Kristallviolett-Assay (Abb. 4.21). Der ATP-Assay beruht darauf, dass der intrazelluläre ATP-Gehalt durch den Zelltod abnimmt. Die Zellen werden lysiert und der ATP-Gehalt wird mit Hilfe der Luciferase-katalysierten



Oxidation des Substrats Luciferin bestimmt. Diese Reaktion ist ATP-abhängig, und die entstehende Lumineszenz korreliert mit dem ATP-Gehalt der Zellen und ihrer Vitalität. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Hierbei handelt es sich um repräsentative Ergebnisse aus jeweils 6 Parallelwerten. ** $P < 0.01$.

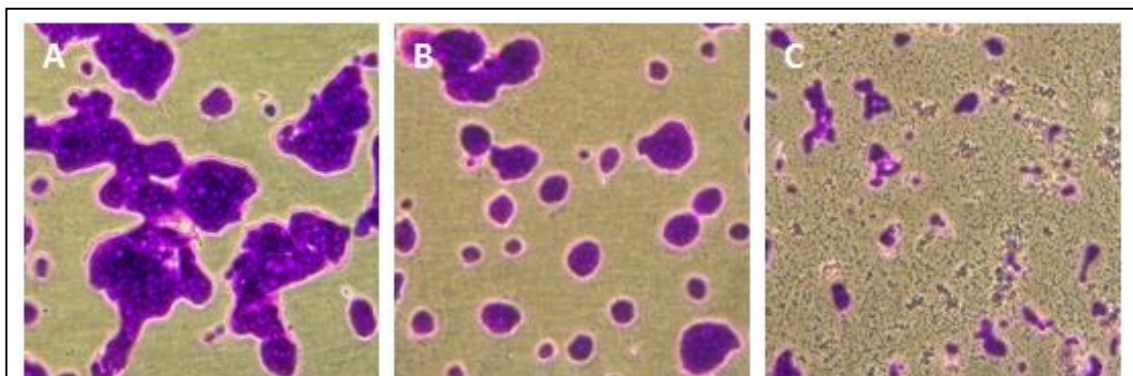


Abb. 4.21: Morphologie der Zelllinie HT-29 nach 24 stündiger Inkubation mit Weizenkeimlingen. Repräsentative Auswahl: (A) 0 mg/ml; (B) 1 mg/ml, (C) 10 mg/ml. Auffällig ist die bereits bei 1 mg/ml auftretende veränderte Zellmorphologie (kleinere Zellkonglomerate).

In der Echtzeitmessung mit dem xCelligence-System (Abb. 4.22) wird deutlich, dass der Effekt der Weizenkeimlinge mit einer gewissen Verzögerung und deutlich langsamer eintritt, als bei AVEMAR (10 mg/ml).

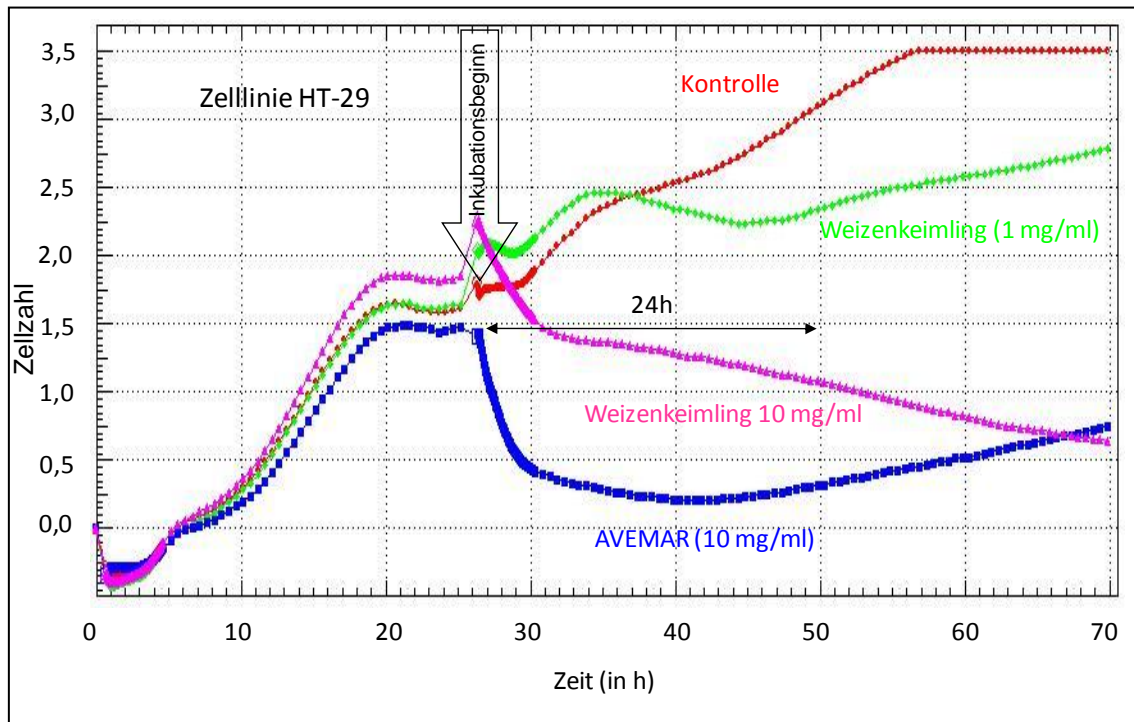


Abb. 4.22: Messungen zur Vitalität in Echtzeit mit dem xCelligence-System. Gezeigt sind die Ergebnisse für die Kolonkarzinomzelllinie HT-29 nach 24-stündiger Inkubation mit Weizenkeimlingen. Im direkten Vergleich zu AVEMAR (10 mg/ml) wird erkennbar, dass ein Effekt der Weizenkeimlinge (10 mg/ml) schwächer und viel später zu beobachten ist.

4.3.2 Weizenlektin (Wheat Germ agglutinin)

Die Wirkung der Weizenlektine auf Zellen der Zelllinie HT-29 wurde mittels Kristallviolett-Färbung, ATP-Assay und xCelligence-System untersucht. Die Kristallviolett-Färbung (Abb. 4.23) und auch die ATP-Messung (Abb. 4.24) zeigen lediglich zytostatische bzw. schwach zelltoxische Effekte von Lektinen erst ab einer Konzentration von 50 µg/ml; die Echtzeitmessungen im xCelligence-System (Abb. 4.25) hingegen lassen bei dieser Konzentration bereits auf starke zelltoxische Effekte schließen.

Morphologisch bilden die Zellen der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 unter dem Einfluss des Weizenlektins nicht länger die für sie typischen großen Konglomerate, sondern kleinere, diffus über den Boden verteilte Inseln (Abb. 4.23). Möglicherweise ist diese diffuse Verteilung Ursache für die diskrepanten Ergebnisse mit dem RTCA-System.

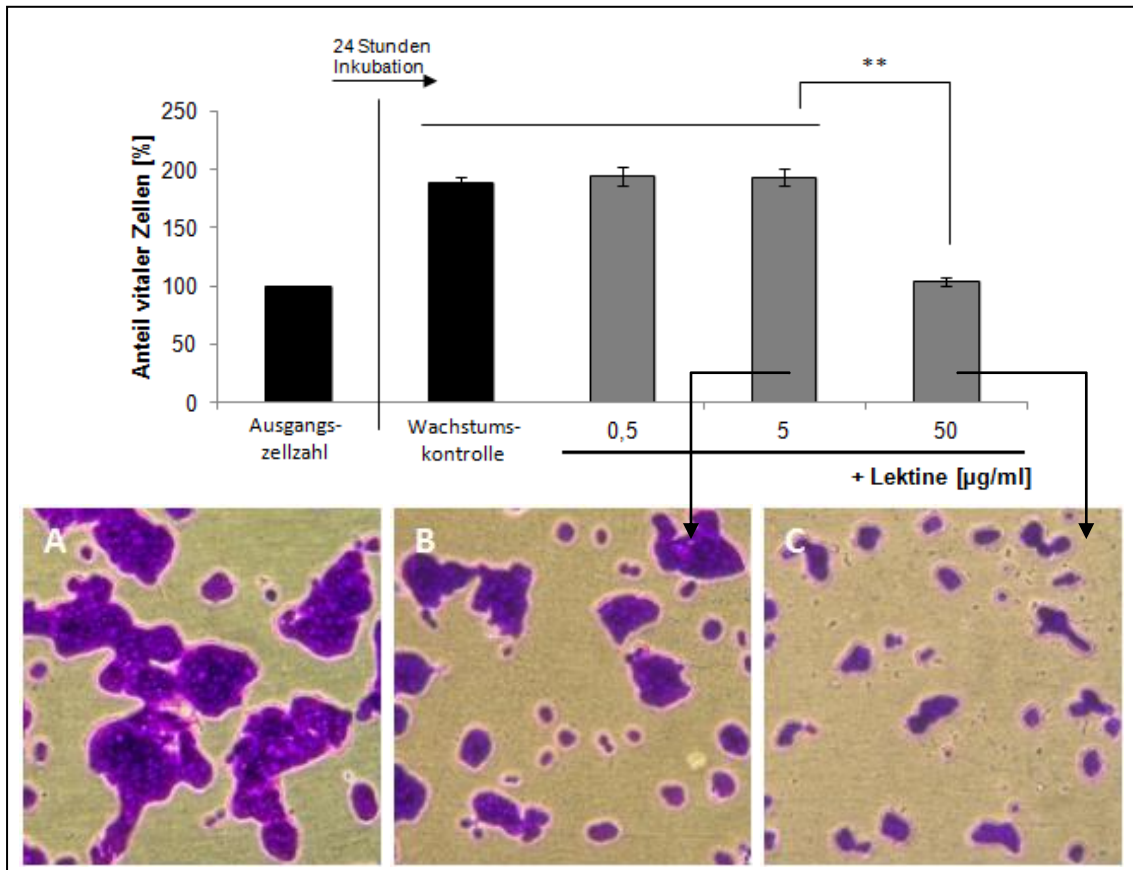
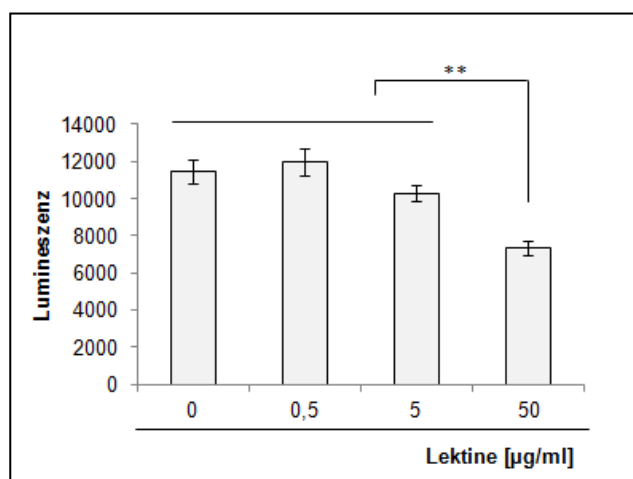


Abb. 4.23: Wirkung von Weizenlektinen auf Zellen der Kolonkarzinomzelllinie HT-29. Repräsentative Auswahl: (A) Wachstumskontrolle; (B) 5 µg/ml Lektine; (C) 50 µg/ml Lektine. Mit der höchsten Lektin-Konzentration (50 µg/ml) wird eine zytostatische Wirkung erreicht. Die Zellen bilden statt großer Konglomerate kleinere, diffus über den Boden verteilte Nester. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Hierbei handelt es sich um repräsentative Ergebnisse aus jeweils 6 Parallelwerten. ** P < 0.01.

Abb. 4.24: Bewertung der Zellvitalität mit Hilfe eines ATP-Assays. Zellen der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 wurden für 24 Stunden mit Weizenlektinen inkubiert und anschließend der Assay durchgeführt. Der ATP-Assay beruht darauf, dass der intrazelluläre ATP-Gehalt durch den Zelltod abnimmt. Die Zellen werden lysiert und der ATP-Gehalt wird mit Hilfe der Luciferase-katalysierten Oxidation des Substrats Luciferin bestimmt. Diese Reaktion ist ATP-abhängig, und die entstehende Lumineszenz korreliert mit dem ATP-Gehalt der Zellen und ihrer Vitalität. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Hierbei handelt es sich um repräsentative Ergebnisse aus jeweils 6 Parallelwerten. ** P < 0.01.



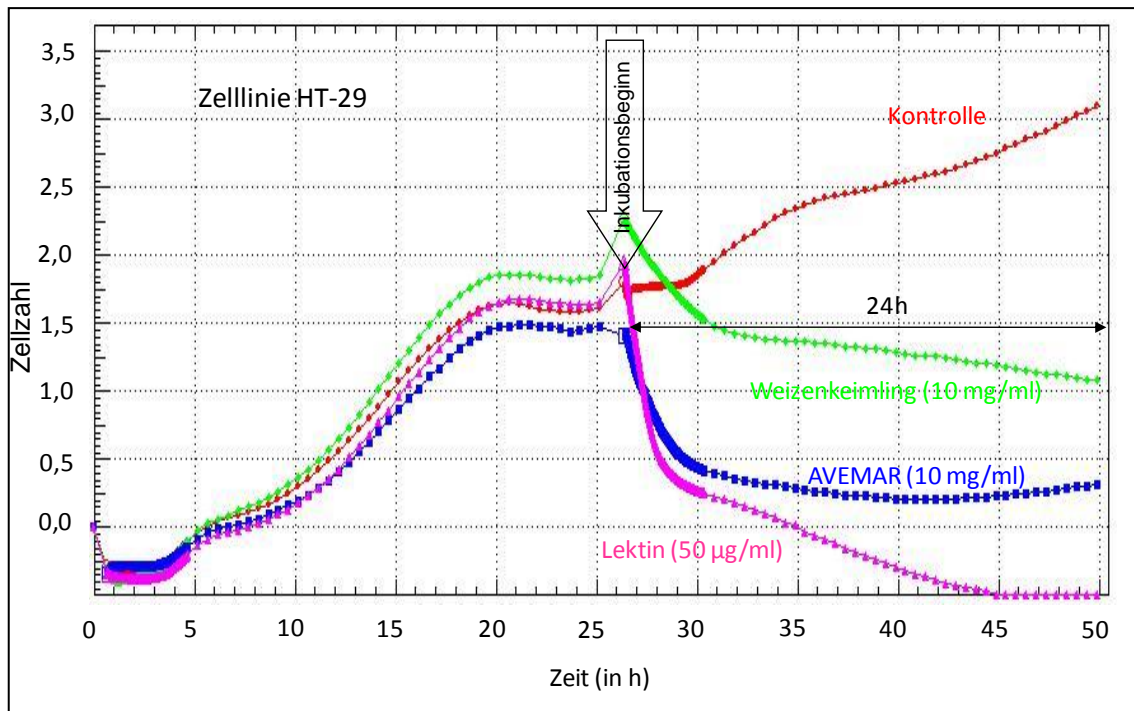


Abb. 4.25: Messungen zur Vitalität in Echtzeit mit dem xCelligence-System. Gezeigt sind die Ergebnisse für die Kolonkarzinomzelllinie HT-29 nach 24-stündiger Inkubation mit Weizenlektinen (50 µg/ml). Im direkten Vergleich zu AVEMAR (10 mg/ml) und den Weizenkeimlingen (10 mg/ml) wird deutlich, dass die Vitalität der Zellen durch die Lektine stark und früh abfällt.

4.3.3 Weizenmehl und Gluten

Neben den Weizenkeimlingen stellt auch Weizenmehl einen wesentlichen Teil des Weizenkorns dar und wurde deshalb aus Gründen der Vollständigkeit als Negativkontrolle ebenfalls auf vitalitätsmindernde Effekte untersucht.

Entgegen der Erwartung sorgte das Weizenmehl bei einigen der Zelllinien für ein deutlich vermindertes Wachstum. Hierzu zählen vor Allem die drei gynäkologischen Tumore MDA-MB-468, MCF-7 sowie BT-20. Bei erstgenannter Zelllinie reichte bereits eine Weizenmehl-Konzentration von $3,35 \pm 0,35$ mg/ml aus, um die Zellvitalität unter 50 % zu senken. Vergleichbare Daten wurden bei der Kontrolle mit reinem Gluten erhoben. Für die vier gastrointestinalen Zelllinien (BxPC-3, HRT-18, 23132/87, HT-29) gilt, dass weder Weizenmehl noch Gluten einen wesentlichen Einfluss auf das Wachstum der Zellen hatten.

In Tab. 4.6 sind die Ergebnisse vom Weizenmehl und AVEMAR vergleichend dargestellt.

Für eine detailliertere Darstellung der in diesem Versuch empfindlichsten Zelllinie MDA-MB-468 und der EC₅₀-Werte wird auf den Anhang verwiesen (Abb. 11.11 und Abb. 11.12).

Tab. 4.6: Beurteilung der Wirkung von Weizenmehl und AVEMAR nach 24 Stunden Inkubation.

Zelllinie	Weizenmehl (10 mg/ml)	Weizenmehl (50 mg/ml)	AVEMAR (10 mg/ml)
BxPC-3	ohne Wirkung	zytostatisch	zelltoxisch
HRT-18	ohne Wirkung	zytostatisch	schwach zytostat.
23132/87	ohne Wirkung	ohne Wirkung	zytostatisch
HT-29	ohne Wirkung	ohne Wirkung	zytostatisch

Begriffsklärung: **Zelltoxisch:** Im Vergleich zur Ausgangszellzahl nimmt der Anteil vitaler Zellen um mehr als 40 % ab; **Zytostatisch:** Im Vergleich zur Ausgangszellzahl bleibt der Anteil vitaler Zellen erhalten (ca. 80-100 %); **Schwach zytostatisch:** Im Vergleich zur Ausgangszellzahl nimmt der Anteil vitaler Zellen zwar zu, bleibt aber deutlich (>50 %) hinter der Wachstumskontrolle zurück.

5 Beantwortung der Fragen

In der vorliegenden Arbeit wurde das medizinische Nahrungsergänzungsmittel AVEMAR an zwölf malignen Tumorzelllinien *in vitro* untersucht. Dabei sollte insbesondere die Eigenschaft von AVEMAR geprüft werden, oxidativen Stress auszulösen. Da das Naturprodukt AVEMAR einen hohen Anteil an zelltoxischen Benzochinonen (0,04 %) aufweist, die in der Lage sind, oxidativen Stress auszulösen, sollte überprüft werden, ob der zelltoxische Effekt von AVEMAR auf der Induktion von oxidativem Stress durch Benzochinone beruht.

1) Für welche der getesteten Tumorzelllinien ist AVEMAR zelltoxisch und wodurch wird die Stärke des zelltoxischen Effektes beeinflusst?

Besonders wirksam war AVEMAR bei den Zelllinien MDA-MB-468 und MDA-MB-231, MCF-7, BxPC-3 sowie 23132/87. Diese Zelllinien weisen einen EC_{50} -Wert von <10 mg/ml auf. Im Gegensatz dazu waren SKOV-3 und die drei Glioblastomzelllinien U-87, U-251 und U-13898 weitestgehend resistent gegenüber der Inkubation mit AVEMAR ($EC_{50} >50$ mg/ml). Die drei Zelllinien BT-20, HT-29 und HRT-18 weisen EC_{50} -Werte zwischen >10 und <25 mg/ml AVEMAR auf (Abb. 4.1). Ein Zusammenhang zwischen der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen und der Wirkung von AVEMAR wurde nicht gefunden. Dies bedeutet, dass schnell wachsende Zellen nicht empfindlicher auf AVEMAR reagieren als langsam wachsende. Ebenso konnte ausgeschlossen werden, dass die Wachstumshemmung von AVEMAR auf unspezifischen Proteineffekten beruht. Hierzu wurden unterschiedliche Proteinkonzentrationen ausgetestet (Abb. 11.5 und Abb. 11.6).

2) Löst AVEMAR oxidativen Stress aus und wird dieser von Benzochinonen vermittelt?

Um die Effekte der Reinsubstanz 2,6-Dimethoxy-1,4-Benzochinon (DMBQ) mit AVEMAR vergleichen zu können, wurden äquimolare Konzentrationen miteinander verglichen. Dabei entspricht die Konzentration an Benzochinonen von 10 mg/ml AVEMAR 24 μ mol/l DMBQ. Im Gegensatz zu 10 mg/ml AVEMAR waren 24 μ mol/l DMBQ für nahezu sämtlich getesteten Tumorzelllinien zelltoxisch.

Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass der AVE-MAR-Effekt nicht ausschließlich auf einem Benzochinon-vermittelten Mechanismus, nämlich der Induktion von oxidativem Stress, beruht. Es ist anzunehmen, dass bei AVE-MAR zwar ebenfalls Radikale entstehen, es sich hierbei aber nicht um reaktive Sauerstoffspezies handelt. Hierfür sprechen der protektive Effekt von Glutathion und die fehlende Wirksamkeit der Katalase bei der Zelllinie BxPC-3 (Tab. 4.3 und Tab. 4.4). Im Gegensatz dazu ließ sich die Benzochinon-induzierte Radikalbildung erfolgreich mit Katalase und Glutathion verhindern. AVE-MAR löst aber nicht nur „radikal-vermittelten“ Stress aus, wie für die Tumorzelllinie BxPC-3 gezeigt, sondern induziert auch zytostatische Effekte, wie sie an den Tumorzelllinien HT-29 und 23132/87 zu beobachten sind (Abb. 4.8 - Abb. 4.11).

3) Weisen auch andere Bestandteile des Weizenkorns zelltoxische Effekte auf?

Zusätzlich zu AVE-MAR wurden weitere Weizenprodukte getestet; hierzu gehören Weizenkeimlinge, handelsübliches Weizenmehl vom Typ 405 und Weizenlektine. Je nach Zelllinie wurde auch für diese Weizenprodukte ein zelltoxischer Effekt *in vitro* beobachtet (Tab. 4.5). Die Ergebnisse überraschen, da für diese Produkte kein wesentlicher zelltoxischer Effekt erwartet wurde und bisher – mit Ausnahme der Lektine – auch nicht beschrieben ist.

Weizenkeimlinge und auch Weizenmehl sollten eigentlich keine zelltoxischen Eigenschaften aufweisen. In Weizenkeimlingen liegen Benzochinone in gebundener und damit inaktiver Form vor. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch gezeigt, dass Weizenkeimlinge zelltoxisch wirken können. Dieser Effekt ist gegenwärtig nicht geklärt und beruht vermutlich auf der Wirkung verschiedener, möglicherweise noch unbekannter Substanzen. Die Wirkung reiner Weizenlektine, die ebenfalls zu den Inhaltsstoffen des Weizenkeimlings gehören, war deutlich schwächer als die der Weizenkeimlinge und scheint somit nicht für die Zelltoxizität der Weizenkeimlinge verantwortlich zu sein.

Weizenmehl, das aus Stärke und Gluten besteht, weist ebenfalls zelltoxische Eigenschaften auf, die möglicherweise durch Gluten vermittelt werden. Wie in dieser Arbeit gezeigt, verfügt auch Gluten über zelltoxische Eigenschaften.

6 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Wirkung von AVEMAR an zwölf humanen, malignen Zelllinien zu untersuchen. Anhand der vier Zelllinien BxPC-3, 23132/87, HRT-18 und HT-29 sollte geklärt werden, ob die Wirkung von AVEMAR auf der Entstehung von Benzochinon-vermitteltem oxidativem Stress beruht oder ob darüber hinaus noch weitere Mechanismen identifizierbar sind. Zudem wurden weitere Weizenprodukte auf etwaige zelltoxische Wirkungen überprüft.

6.1 Chinon-vermittelter oxidativer Stress

Durch das National Cancer Institute (USA) sind seit dem Jahr 1955 mehr als 600.000 natürlich vorkommende und synthetische Stoffe auf ihre antikanzerogene Wirkung untersucht worden; darunter befinden sich 1 500 Verbindungen mit chinoiden Strukturen (Staquet et al. 1983). Zu den antineoplastisch wirksamen Chinonen werden nur diejenigen gezählt, die reaktive bzw. heterozyklische Gruppen (p-Benzochinone) tragen oder in größerem Maße substituiert sind – wie z.B. Anthrachinone / Anthrazykline (Driscoll et al. 1974). Zur letzteren Gruppe zählen beispielsweise Doxorubicin und Daunorubicin, die einen großen Stellenwert in modernen Chemotherapien haben (Piccart-Gebhart 2006). Der Hauptmechanismus jener Strukturen basiert auf der verstärkten Bildung reaktiver Semichinonradikale (Abb. 1.3), die ihrerseits die Bildung von Sauerstoffradikalen (Tab. 6.1) induzieren (Bachur et al. 1978).

ROS	Bezeichnung
HO^\bullet	Hydroxyl-Radikal
$^1\text{O}_2$	Singulett-Sauerstoff
HO_2^\bullet	Hydroperoxyl-Radikal
$\text{O}_2^{\bullet-}$	Superoxid-Radikal
RO^\bullet	Alkoxy-Radikal
ROO^\bullet	Peroxy-Radikal
H_2O_2	Wasserstoffperoxid

Tab. 6.1: Reaktive Sauerstoffspezies. Gezeigt sind reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in der Reihenfolge abnehmender Reaktivität. Je höher die Reaktivität, desto geringer die Lebensdauer des Radikals. Tabelle modifiziert nach Siems 2005.

Wie aus Abb. 6.1 ersichtlich, basieren Daunorubicin und Doxorubicin so wie die in dieser Arbeit untersuchten 2,6-Dimethoxy-1,4-Benzochinone (DMBQ) auf Chinonstrukturen. Der durch DMBQ-vermittelte zelltoxische Effekt beruht auf der Induktion von oxidativem Stress, wie auch Daten der vorliegenden Arbeit zeigen. Hierfür sprechen die Ergebnisse zur protektiven Wirkung von Katalase und Glutathion. DMBQ war für sämtliche in dieser Arbeit getesteten Zelllinien in Kombination mit Ascorbinsäure zelltoxisch. Diese Resultate bestätigen im Wesentlichen Beobachtungen der aktuellen Literatur (Pethig et al. 1983).

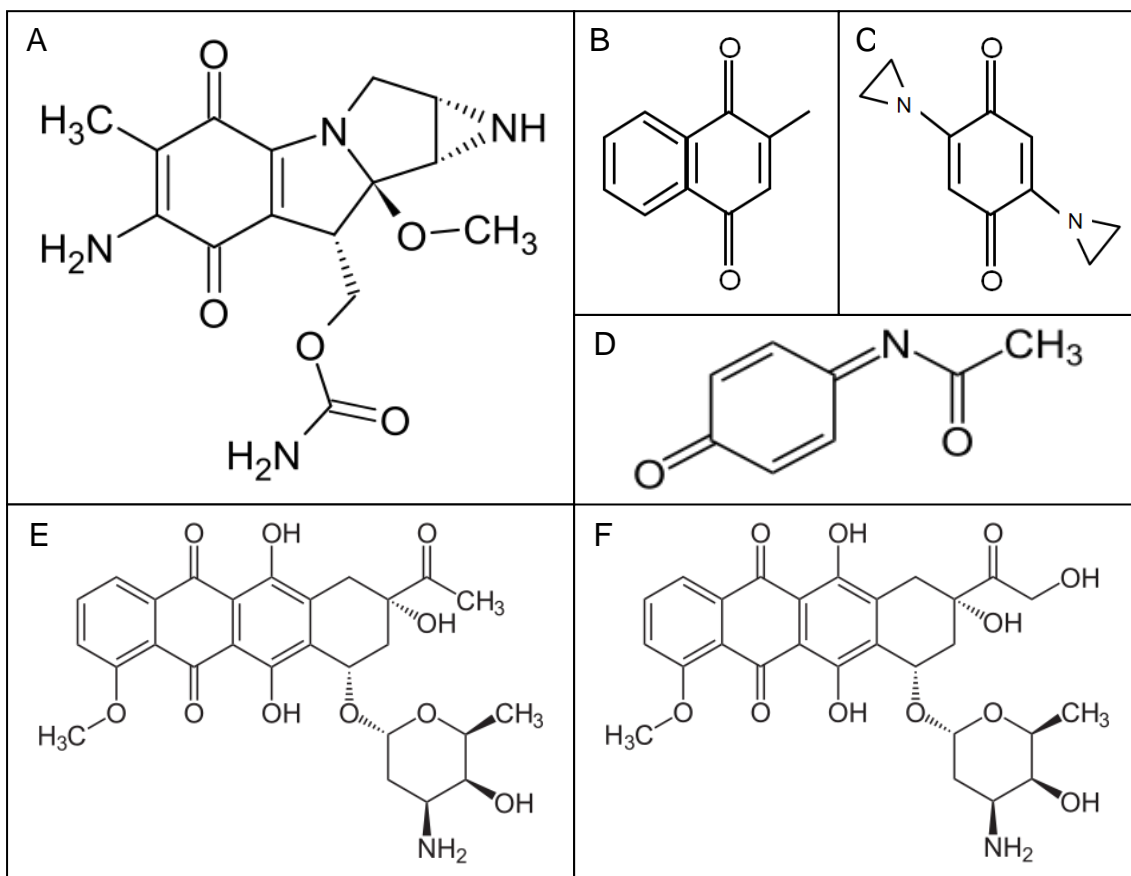


Abb. 6.1: Auswahl zelltoxischer Chinone. (A) Mitomycin C, (B) Menadion, (C) 2,5-Bis-aziridinyl-1,4-benzochinon, (D) der Paracetamol-Metabolit N-Acetyl-p-benzochinonimin, (E) Daunorubicin und (F) Doxorubicin. Sämtliche Substanzen weisen eine Chinonstruktur auf, deren Zelltoxizität durch die Bildung freier Radikale und die Induktion von oxidativem Stress vermittelt wird (O'Brien 1991). Abbildungen aus dem Online-Katalog von Sigma-Aldrich und aus Wikipedia übernommen.

Mit den in dieser Arbeit erzielten Daten wird folgendes Modell (Abb. 6.2) zur Wirkungsweise von 2,6-Dimethoxy-1,4-Benzochinonen vorgeschlagen. Grundlage für dieses Modell ist, dass sowohl Ascorbinsäure als auch Benzochinone von der Zelle aufgenommen werden. Ascorbinsäure wird dabei über die Natri-

um-abhängigen Transporter SVCT1/SVCT2 (*sodium-dependent vitamin C transporter*) oder in der oxidierten Form als Dehydroascorbinsäure über die Hexose-Transporter GLUT 1, GLUT 3 und GLUT 4 in die Zelle transportiert (Savini et al. 2008). Die apolaren Benozochinone gelangen möglicherweise ohne spezielle Transporter in die Zellen. Ascorbinsäure induziert als Elektronendonator die Bildung von Semichinonradikalen, die ihrerseits die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale auslösen (Abb. 6.2). Diese Annahme wird durch den protektiven Effekt von Glutathion und Katalase nach Zugabe zu den Zellen belegt. Während Glutathion in die Zellen transportiert wird (s. unten), bleibt die Katalase mit hoher Wahrscheinlichkeit aufgrund ihres Molekulargewichts von 250 kDa (Schroeder et al. 1964) außerhalb der Zelle; ein Transport der Katalase in die Zelle erscheint unwahrscheinlich. Da Wasserstoffperoxid relativ stabil ist (Tab. 6.1), wird ein Gradient von innen nach außen angenommen, denn nur so ist die Wirksamkeit der Katalase zu erklären. Die fehlende Polarität von Wasserstoffperoxid lässt es durch die Zellmembran nach außen diffundieren.

Die Bildung von Superoxid-Radikalen wird angenommen, konnte in der vorliegenden Arbeit aber experimentell nicht bestätigt werden. Die Superoxiddismutase (Kupfer/Zink-SOD) mit einem Molekulargewicht von 32 kDa (Keele et al. 1971) und somit erheblich kleiner als die Katalase, gelangt auch wie diese nicht ins Zellinnere (Abb. 6.2). Die in der Zelle entstehenden polaren Superoxidanionen sind so reaktiv, dass sie sofort in weniger reaktive Sauerstoffspezies umgewandelt werden (Abb. 1.5 und Tab. 6.1). Die zugegebene Superoxiddismutase bleibt somit wirkungslos. Im Gegensatz dazu schützt die Zugabe von Glutathion die Zellen nachweislich vor oxidativem Stress. Der protektive Effekt von Glutathion gegenüber toxischen Chinonen (beispielsweise Adriamycin) wurde bereits mehrfach gezeigt (Babson et al. 1981).

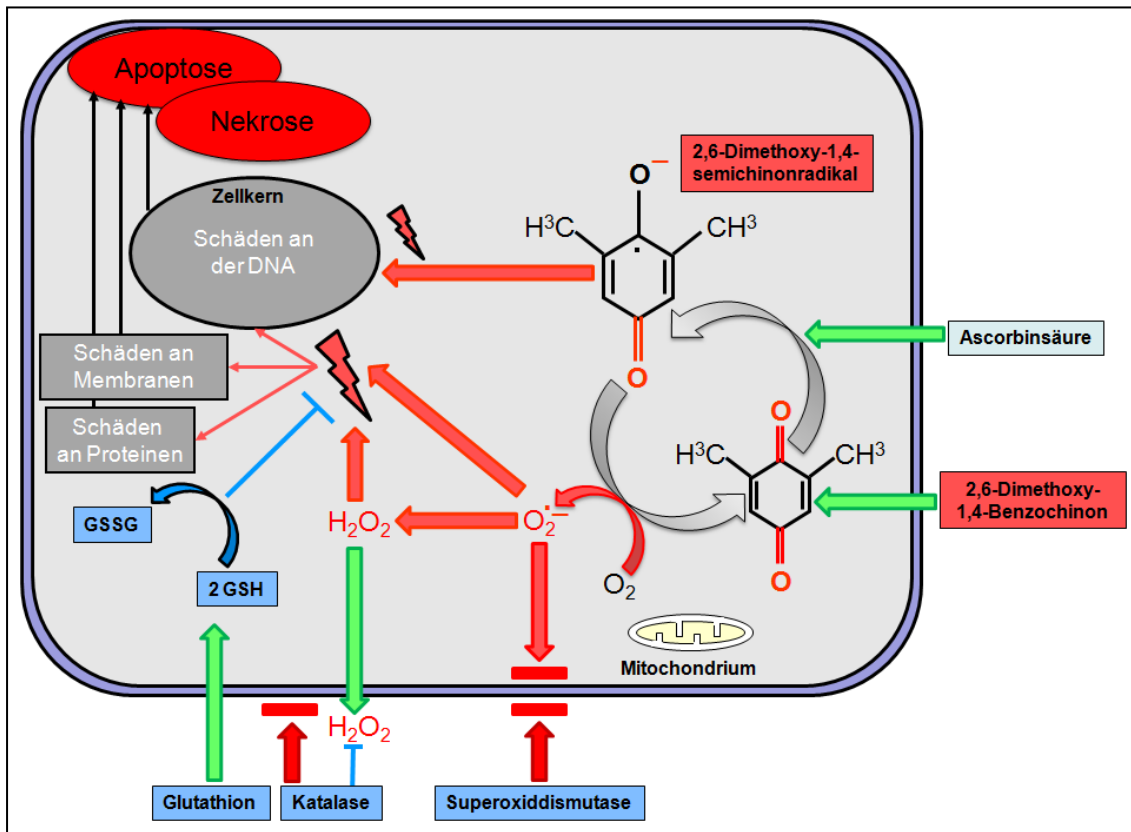
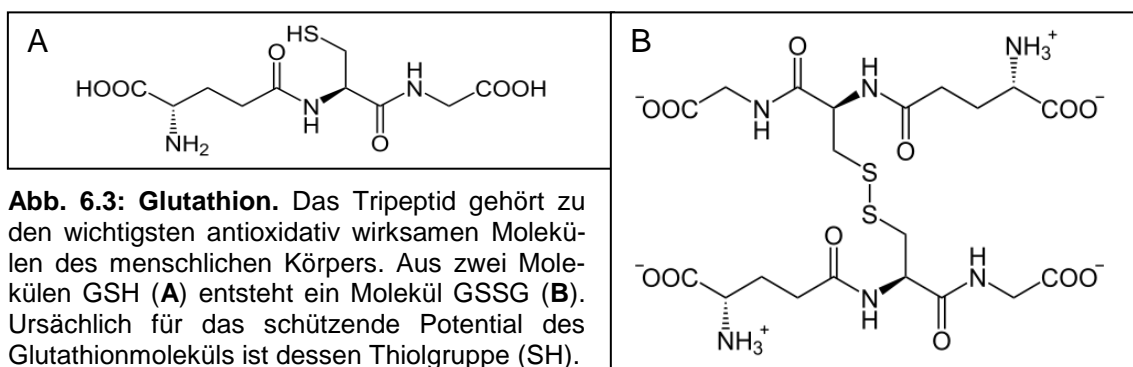


Abb. 6.2: Modell zur Wirkweise von 2,6-Dimethoxy-1,4-Benzochinonen. Nach Aufnahme von Ascorbinsäure und Benzochinonen durch die Tumorzelle kommt es zur intrazellulären Bildung zelltoxischer Semichinonradikale, die die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies auslösen (s. hierzu auch Abb. 1.5 und Tab. 6.1). Zu den Zellen zugegebenes Glutathion und Katalase wirken dem oxidativen Stress entgegen. **Zeichenerklärung:** „⊥“ steht für die Fähigkeit, oxidativen Stress zu verhindern; der „Blitz“ bedeutet die Induktion von Zellschäden durch die reaktiven Sauerstoffspezies; grüner Pfeil: die Substanz ist membrangängig; roter Pfeil mit Querbalken: die Substanz ist nicht membrangängig; rote Pfeile innerhalb der Zelle: Bildung von Sauerstoffradikalen.

Da die Oxidation von Glutathion und die damit verbundene Detoxifikation der reaktiven Sauerstoffspezies enzymatisch vermittelt wird (Abb. 1.5), ist dessen intrazelluläre Aufnahme zwingend erforderlich. Nur so ist sein protektiver Effekt zu erklären (Abb. 6.2). Daten von Martensson et al. deuten darauf hin, dass die intrazelluläre Aufnahme von Glutathion in nur geringem Maße abläuft und es erst nach seiner Spaltung in die einzelnen Aminosäuren von der Zelle aufgenommen wird. Innerhalb der Zelle werden dann die Spaltprodukte wieder zu Glutathion zusammengesetzt (Martensson et al. 1990). Sollte es sich hierbei um den Hauptmechanismus des Glutathiontransports in die Zelle handeln, dann muss es sich hierbei um extrem schnelle Transportvorgänge und/oder enzymatische Reaktionen handeln.

Glutathion (Abb. 6.3) besteht aus den drei Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin und trägt aus diesem Grund auch die Bezeichnung γ -L-Glutamyl-L-cysteinyl-glycin. Der Vollständigkeit halber ist anzumerken, dass es sich hierbei um keine echte Peptidbindung, sondern um eine sogenannte Pseudopeptidbindung handelt. Die Amidbindung wird enzymatisch zwischen Glutaminsäure und Cystein über die γ -Carboxylgruppe statt der α -Carboxylgruppe gebildet (Beutler 1989). Da Glutaminsäure und Glycin zu den nicht-essentiellen Aminosäuren gehören, ist der Vorrat an Cystein der limitierende Schritt der Glutathion-Synthese.



6.2 Bedeutung von Benzochinonen für die zelltoxische Wirkung von AVEMAR

Der Fokus dieser Arbeit lag unter anderem auf dem Nachweis und der Quantifizierung der zelltoxischen Eigenschaft von AVEMAR bei einer Vielzahl unterschiedlicher Tumorzelllinien. Bei allen untersuchten Zelllinien war ein wachstumshemmender Effekt zu beobachten, der je nach Zelllinie unterschiedlich stark ausgeprägt war. Die Stärke der Wirkung von AVEMAR bewegte sich von extrem zelltoxisch bis hin zu weitestgehend unwirksam (Abb. 4.1). Auf eine Beschreibung aller durch AVEMAR verursachten *in vitro* Effekte (Abb. 6.4) wird an dieser Stelle verzichtet und auf ausführliche Publikationen verwiesen (Telekes et al. 2009, Johanning und Wang-Johanning 2007).

In der Literatur wird immer wieder auf Benzochinone, insbesondere 2,6-Dimethoxy-1,4-Benzochinone und 2-Methoxy-1,4-Benzochinone, als aktive Wirksubstanzen von AVEMAR hingewiesen (Hidvégi et al. 1999). Trotz dieser be-

reits seit längerer Zeit behaupteten Vermutung wurde diese aber bisher nie experimentell überprüft.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass der von AVEMAR vermittelte zelltoxische Effekt trotz des hohen Gehalts an freien Benzochinonen nicht ausschließlich auf der Induktion von oxidativem Stress beruht. Ein Hinweis für die Richtigkeit dieser Vermutung ist, dass weder Glutathion (GSH) noch Katalase in der Lage sind, den zytostatischen Effekt von AVEMAR zu verhindern. Nur bei der Pankreaskarzinomzelllinie BxPC-3 - hier wirkt AVEMAR zelltoxisch - war für Glutathion (Abb. 4.14) ein protektiver Effekt zu beobachten. Gleichzeitig war die Katalase überraschenderweise ohne Wirkung, sodass zu vermuten ist, dass in diesem Fall weder Wasserstoffperoxid noch weitere Sauerstoffradikale entstehen. Da aber Glutathion den zelltoxischen Effekt von AVEMAR kompensiert, wird dies als Hinweis gewertet, dass zwar Radikale bzw. toxische Metabolite entstehen, diese aber nicht zu den reaktiven Sauerstoffspezies gehören. Um welche Art von Radikalen es sich hierbei handelt, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht geklärt. Es ist bekannt, dass Chinonvermittelte Zelltoxizität nicht immer zur Auslösung von oxidativem Stress führt. Einige der gering substituierten Benzochinone oxidieren den Glutathion-Pool über die Bildung von Chinon-Glutathion-Komplexen; hierbei kommt es ohne Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zur Schädigung von Zellen (Rossi et al. 1986).

Die beobachtete Diskrepanz bei der Zelltoxizität zwischen AVEMAR (10 mg/ml) und der äquimolaren Konzentrationen an 2,6-Dimethoxy-1,4-Benzochinonen (24 $\mu\text{mol/l}$) widerspricht ebenfalls der Annahme, dass der hohe Anteil an Benzochinonen von 0,04 % im AVEMAR als uneingeschränktes Wirkprinzip von AVEMAR anzusehen ist. Die 2,6-Dimethoxy-1,4-Benzochinone waren durchweg deutlich zelltoxischer als das Naturprodukt AVEMAR. Es ist allerdings anzumerken, dass es grundsätzlich schwierig ist, die Wirkung eines so komplexen Naturproduktes wie AVEMAR auf eine einzige aktive Substanz zurück zu führen, zumal die exakte Zusammensetzung von AVEMAR nicht genau bekannt ist (Telekes et al. 2009).

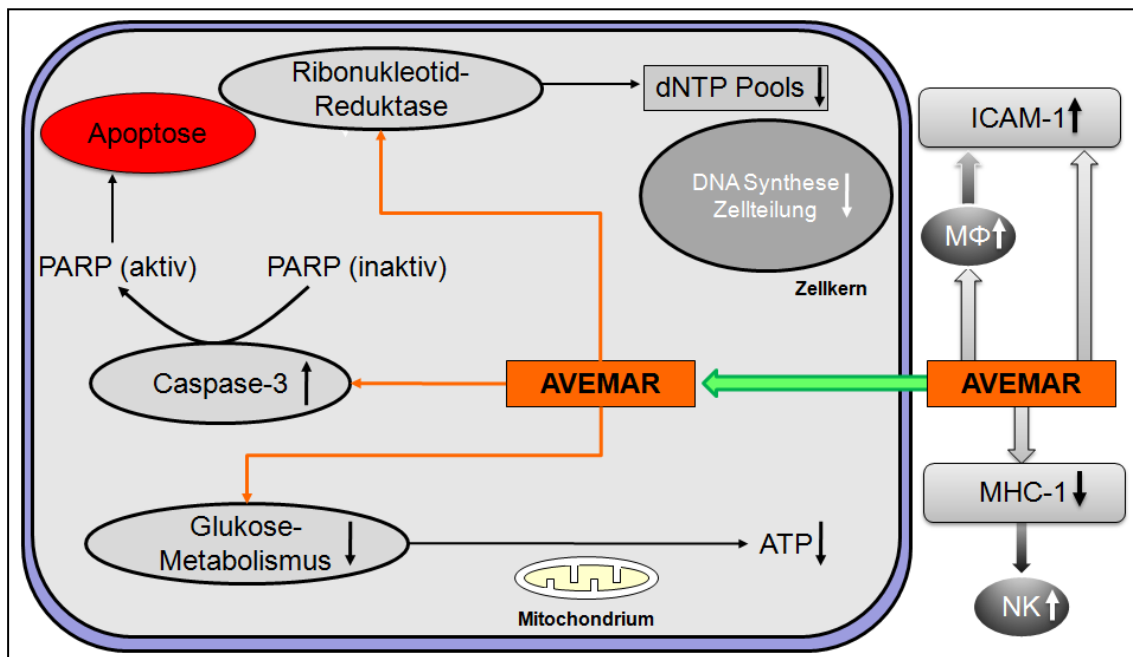


Abb. 6.4: Intrazelluläre und extrazelluläre Effekte von AVEMAR. Die von AVEMAR vermittelten Effekte sind vielfältig, beruhen aller Wahrscheinlichkeit nach aber nicht ausschließlich auf der Induktion von oxidativem Stress. Eine detaillierte Beschreibung aller von AVEMAR vermittelten Effekte ist publiziert (Telekes et al. 2009, Johanning und Wang-Johanning 2007).

6.3 Bedeutung von AVEMAR in der Onkologie

6.3.1 Ernährungsphysiologische Besonderheiten onkologischer Patienten

Ein bei onkologischen Patienten häufig beobachtetes Phänomen ist die im Laufe der Erkrankung auftretende massive Gewichtsabnahme, die als Tumorkachexie bezeichnet wird. Die Ausbildung dieses Syndroms wird zum einen durch die „parasitären“ Eigenschaften des Tumors selbst, zum anderen durch die oft einhergehende verringerte Nahrungsaufnahme begünstigt. Es ist hierbei anzumerken, dass Grad und Geschwindigkeit der Tumorentwicklung unabhängig von der aufgenommenen Nahrungsmenge sind. Der Tumor reguliert seine Nährstoffversorgung durch die Produktion von Botenstoffen, die zum Abbau körpereigener Reserven in Skelettmuskulatur und Organen führen. Welche exakten molekularen Vorgänge die Entwicklung der Tumorkachexie auslösen und fördern, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht vollständig verstanden. Ein aktuelles Modell zur Pathogenese der Tumorkachexie (Abb. 6.5 A) beschreibt die Beteiligung chronisch-entzündlicher Mediatoren an diesem Syndrom, die für die metabolische Entgleisung und den massiven körperlichen Abbau verantwortlich sind (Tisdale 2009).

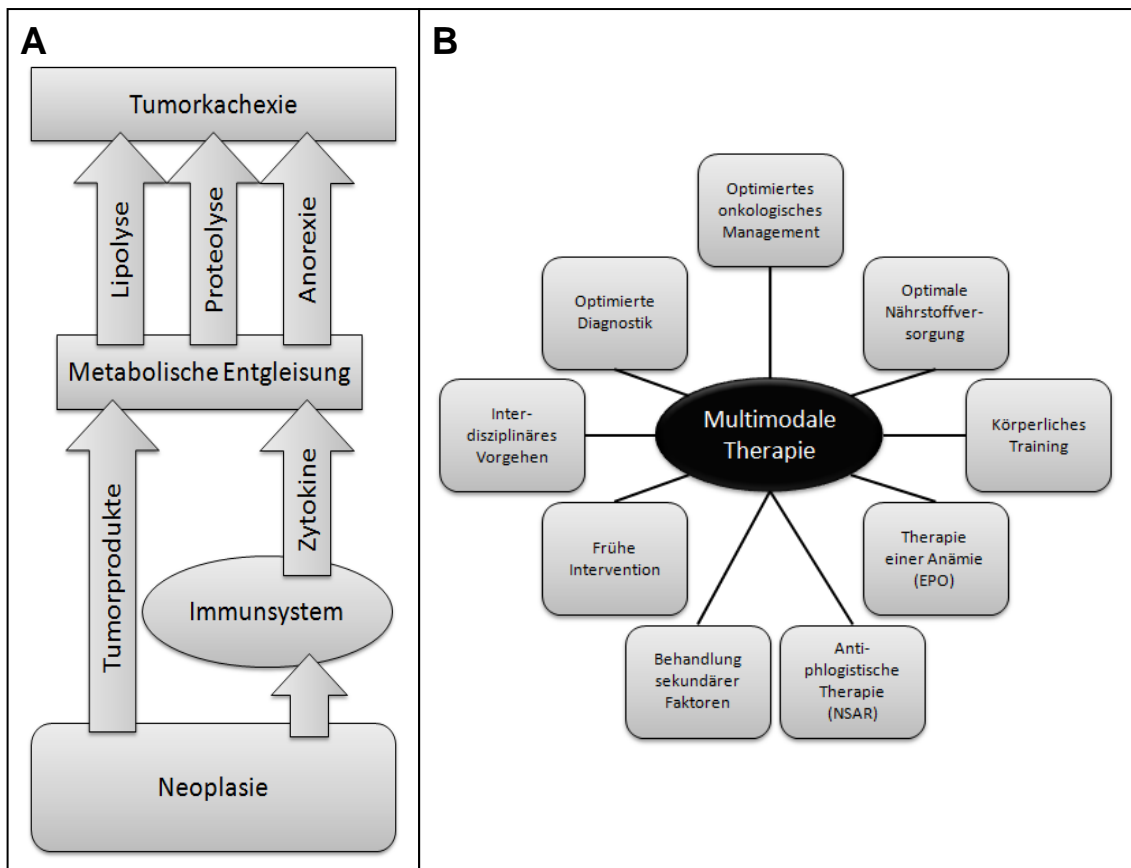


Abb. 6.5: (A) Aktuelles Modell zur Pathogenese der Tumorkachexie (Tisdale 2009) und (B) multimodale Therapiekonzepte zur Tumorkachexie. Modifiziert nach Fearon 2008.

Die Tumorkachexie stellt für das Überleben von Krebspatienten einen wesentlichen prädiktiven Faktor dar. Beispielsweise zeigen Chemotherapien bei diesem Kollektiv eine deutlich schlechtere Wirkung (Bauer und Capra 2005). Die bedenkliche Ernährungssituation bei diesen Patienten führt auch zu einer Verschlechterung der Immunabwehr (Blackburn et al. 1977). Die Behandlung einer manifesten Tumorkachexie ist äußerst schwierig; aus diesem Grund sollte bereits frühzeitig – am besten noch vor Auftreten einer klinisch manifesten Gewichtsabnahme – auf zahlreichen Ebenen simultan interveniert werden. Hierzu sind multifaktorielle Therapieansätze notwendig (Abb. 6.5 B), zu denen auch medizinische Nahrungsergänzungsmittel gehören. Die in der klinischen Praxis eingesetzten Mittel, wie z.B. Fresubin von Fresenius Kabi Deutschland, weisen sowohl eine hohe Energiedichte als auch eine optimale Nährstoffverteilung auf und sind konzipiert worden, um dem Prozess des physischen Verfalls bestmöglich entgegenwirken zu können. Andere Nahrungsergänzungsmittel, wie z.B. AVEMAR, verfügen über antikanzerogene und antiinflammatorische Eigen-

schaften und könnten somit eine ideale Ergänzung für eine supportiv-adjuvante onkologische Therapie darstellen.

6.3.2 AVEMAR als supportives Adjuvanz

Onkologische Patienten mit unterschiedlichen Krebserkrankungen (Kolorektales Karzinom, Melanom, Karzinome des Kopfes und des Halses), die neben ihrer leitliniengerechten Tumorbehandlung täglich die empfohlene Dosis von 9 g AVEMAR pro Tag erhielten, profitierten sowohl bei Lebensqualität als auch im Hinblick auf Überleben von dieser supportiven Maßnahme. Dies wurde durch zahlreiche Studien belegt (Jakab et al. 2003; Demidov et al. 2008; Sukkar et al. 2008), wobei aber nur in der von Demidov et al. initiierten Studie die Patienten randomisiert waren. Die häufig propagierte Tagesdosis von 9 g AVEMAR muss allerdings kritisch betrachtet werden. Eine normalgewichtige Person von 70 kg mit ca. 5 Liter Plasmavolumen erreicht eine Plasmakonzentration von $1,8 \text{ mg/ml}^2$). Dieser Wert liegt somit deutlich unter dem niedrigsten in dieser Arbeit bestimmten EC_{50} -Wert von $2,55 \pm 0,07 \text{ mg/ml}$ (Abb. 4.1). Andererseits wurden die EC_{50} -Werte *in vitro* bestimmt und sind somit nicht ohne weiteres auf die Situation *in vivo* übertragbar.

AVEMAR ist sehr gut mit den üblichen und leitliniengerechten Chemotherapien kombinierbar, ohne dass die Wirksamkeit der Therapie darunter leidet oder verstärkt Nebenwirkungen auftreten; dies wurde bereits erfolgreich gezeigt (Szende et al. 2004). Beispielsweise erhöht AVEMAR die Effizienz von Tamoxifen bei Östrogen-Rezeptor-positiven Mammakarzinomzellen (Marcsek et al. 2004). Selbst bei hohen Dosen von AVEMAR wurden keine wesentlichen toxischen Nebenwirkungen (Mutagenität, Genotoxizität) beobachtet (Heimbach et al. 2007). Dabei wirkt AVEMAR in gewissem Maße selektiv auf maligne Zellen (Comin-Anduix et al. 2002), was auch die wesentlich geringere zelltoxische Wirkung von AVEMAR auf die in dieser Arbeit untersuchten dermalen Fibroblasten (NHDF-p) zeigt (Abb. 11.3).

²⁾ Die Berechnung basiert auf der Annahme einer verlustfreien Resorption von AVEMAR im Darmtrakt. Zudem wurde ein möglicher „*first pass effect*“ vernachlässigt sowie ein Verteilungsvolumen von $<1,0 \text{ Liter/kg}$ (Verhältnis von Gesamtmenge des verabreichten Stoffs zur Plasmakonzentration des entsprechenden Stoffs) angenommen.

Die Herstellung von AVE-MAR erfolgt mittels des „*good manufacturing process*“ (International Application No.: PCT/HU1998/000077). Dieses Verfahren legt im Wesentlichen den Extraktionsvorgang von AVE-MAR aus Weizenkeimlingen fest. Hierdurch werden die in Weizenkeimlingen vorkommenden 2,6-Dimethoxy-1,4-Benzochinone und 2-Methoxy-Benzochinone aus ihrer glykosidischen Bindung gelöst und somit in ihre aktive Form überführt – Voraussetzung für das antikanzerogene Potential von AVE-MAR. Nicht mit diesem Verfahren behandelte Weizenkeimlinge sollten somit keine zelltoxische Wirkung aufweisen. Daten der vorliegenden Arbeit belegen jedoch, dass auch „gewöhnliche“ Weizenkeimlinge zelltoxisch wirken, die je nach Zelllinie sogar stärker wirksam waren als AVE-MAR. Die Interpretation der Ergebnisse ist jedoch nicht abschließend, da auch der Weizenkeimling zahlreiche Wirkmoleküle enthält. Es muss weiterhin bedacht werden, dass sich handelsübliche Weizenkeimlinge je nach Hersteller stark in ihrer Zusammensetzung unterscheiden und die erhobenen Daten zu einem Produkt sich nur in geringem Maße auf andere Weizenkeimprodukte übertragen lassen (Telekes et al. 2009).

Weizenlektine, die ihr zelltoxisches Potential in früheren Arbeiten gezeigt haben (Valentiner et al. 2003; Goldschmidt et al. 1997) und Bestandteil von Weizenkeimlingen sind, können nach den erhobenen Daten nur unzureichend als aktive Substanz für die zelltoxischen Eigenschaften von AVE-MAR oder Weizenkeimlingen herangezogen werden: die zelltoxische Wirkung fiel nach den Ergebnissen der Kristallviolett-Färbung (Abb. 4.23) und ATP-Messung (Abb. 4.24) vergleichsweise schwach aus.

Eine mögliche Erklärung für die zelltoxische Wirkung von Weizenkeimlingen (und auch von AVE-MAR) könnte der hohe Gehalt an Polyphenolen und Flavonoiden sein, die sich vor allem in der Fruchtschale befinden. Dieser Substanzklasse werden antioxidative, antikanzerogene und antiinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben (Dykes und Rooney 2007). Polyphenole (dazu zählen unter anderem auch Benzochinone) und Flavonoide sind Bestandteil von Gemüse, Obst und anderen pflanzlichen Produkten wie z.B. Nüssen. Laut der Deutschen Gesellschaft für Ernährung dienen diese Stoffe den Pflanzen selbst als Wachstumsfaktoren (www.dge.de). Beim Menschen greifen die

Flavonoide und Polyphenole in zahlreiche Stoffwechselfvorgänge ein. Durch ihre antioxidative Wirkung gelten sie als Radikalfänger. Sie schützen das kardiovaskuläre System und beugen der Entstehung einiger Krebserkrankungen vor (Ross und Kasum 2002). Diese Stoffe könnten die Wirksamkeit der beobachteten *in vitro* Zelltoxizität erklären. Eine ausreichende Versorgung mit Polyphenolen könnte die Situation von Krebspatienten verbessern.

6.3.3 Kombination von AVEMAR mit einer ketogenen Diät

Es ist bekannt, dass Kohlenhydrate und vor allem Glukose die Hauptenergiequelle für zahlreiche Tumoren darstellen (Gatenby und Gillies 2004). Somit stellt auch der Glukosestoffwechsel ein potentiell Ziel für onkologische Therapien dar (Mathupala et al. 2009). Für AVEMAR wurde in früheren Publikationen ein Einfluss auf den Glukosestoffwechsel, insbesondere auf die Glykolyse beschrieben (Boros et al. 2001; Comin-Anduix et al. 2002). Die Kombination von AVEMAR mit einer ketogenen Diät könnte den antikanzerogenen Effekt von AVEMAR noch verstärken und somit einen zusätzlichen Benefit für onkologische Patienten bedeuten. Bei dieser Form der Ernährung wird der Anteil an Kohlenhydraten, vor allem Zucker, massiv verringert (<50 g/Tag, pers. Mitteilung Prof. Dr. rer. nat. Ulrike Kämmerer, Universitätsklinikum Würzburg). AVEMAR ließe sich unproblematisch mit einer ketogenen Diät kombinieren, da bei der üblichen Tagesdosis von 9 g AVEMAR nur ca. 6 g Kohlenhydrate aufgenommen werden.

Den Tumorzellen wird mit einer ketogenen Diät die Hauptenergiequelle Glukose entzogen. Zusätzlich werden die Blutspiegel von Insulin und IGF-1 (*insulin-like-growth factor*) verringert, die ansonsten das Tumorstadium stimulieren (Kaaks und Lukanova 2001). Des Weiteren verschiebt sich der Metabolismus in Richtung Fettsäureabbau (β -Oxidation), der eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff erfordert. Da im Tumorgewebe häufig hypoxische Zustände (<10 mmHg) herrschen (Höckel und Vaupel 2001), können Krebszellen nicht ohne Weiteres auf die Energiegewinnung durch Fettsäureabbau zurückgreifen (Grey et al. 1975; Holm et al. 1995). Tumore induzieren zudem häufig eine periphere Insulinresistenz, sodass gesundes Gewebe schlechter mit Glukose versorgt wird (Mulligan und Tisdale 1991). Bei Einhaltung einer ketogenen Diät

wird somit die Energieversorgung der Krebszellen in relativ höherem Maße eingeschränkt, da sich peripheres, gesundes Gewebe problemlos auf den sauerstoffabhängigen Abbau von Fettsäuren umstellen kann. In zahlreichen früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass dieser Substratmangel zu einer Verzögerung des Tumorwachstums führt (Nebeling et al. 1995; Otto et al. 2008; Zhou W et al. 2007) und der Verlust von Fett- und Muskelmasse durch eine kohlenhydratreduzierte und fettreiche Ernährung unter Kontrolle gebracht werden kann (Holm 2007). Zudem kann mit dieser Form der Ernährung die Lebensqualität onkologischer Patienten verbessert werden (Schmidt M et al. 2011). Experimentelle Daten zur Kombination von AVE-MAR mit einer ketogenen Diät stehen allerdings noch aus.

6.3.4 AVE-MAR – Nahrungsergänzungsmittel oder Medikament?

Zum jetzigen Zeitpunkt ist die klinische Studienlage zu AVE-MAR noch sehr begrenzt, um es uneingeschränkt zu empfehlen. Hierzu bedarf es weiterer, vor allem größerer und randomisierter Studien (Mueller und Voigt 2011). Ergebnisse dieser, aber auch früherer *in vitro* Untersuchungen sind sehr viel versprechend und weisen AVE-MAR ein supportives und vielschichtiges antikanzerogenes Potential zu. Gute Verträglichkeit und fehlende Toxizität lassen die Anwendung des rezeptfreien Naturprodukts AVE-MAR zusätzlich zur leitliniengerechten Behandlung als durchaus vertretbar erscheinen.

Es ist bekannt, dass onkologische Patienten überaus motiviert sind, über Chemo- und Strahlentherapie hinausgehend, aktiv gegen ihr Krebsleiden anzukämpfen. Die Empfehlung solcher supportiver Produkte, deren zugrunde liegenden Mechanismen weitestgehend aufgeklärt sind und für die ein wissenschaftlicher Nachweis ihrer Wirksamkeit vorliegt, wäre sicherlich ein großer Fortschritt für die ganzheitliche Betreuung onkologischer Patienten.

7 Ausblick

Ein wesentliches Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist der Nachweis, dass die Wirkung von AVE-MAR nicht ausschließlich auf der Entstehung von Benzochinon-vermitteltem oxidativem Stress beruht. So wird der zytostatische Effekt von AVE-MAR mit großer Wahrscheinlichkeit nicht durch oxidativen Stress ausgelöst. Dies wurde in Experimenten mit verschiedenen Tumorzellen unter Normoxie gezeigt. Somit ist die für den zytostatischen Effekt von AVE-MAR verantwortliche Substanz bzw. Substanzen noch unbekannt. Ein Anhaltspunkt sind die in den Weizenkeimlingen (aus denen AVE-MAR durch Fermentierung gewonnen wird) vorkommenden Polyphenole und Flavonoide, denen eine antikanzerogene Wirkung zugesprochen wird.

Da die Sauerstoffversorgung von Tumoren fluktuiert und somit innerhalb großer Tumoren sowohl normoxische als auch hypoxische Areale vorliegen (Gatenby und Gillies 2004), wäre es für weiterführende Arbeiten interessant, die getesteten Tumorzelllinien ebenfalls unter hypoxischen Bedingungen zu untersuchen. Mit solchen Versuchen ließe sich klären, ob der von AVE-MAR vermittelte Effekt von Sauerstoff abhängig ist. Dies ist gerade unter dem Aspekt interessant, dass zahlreiche Tumoren nahezu ausschließlich anaerobe Glykolyse zur Energiegewinnung betreiben und einer der postulierten Effekte von AVE-MAR die Hemmung der Glykolyse ist.

Für AVE-MAR wurde in früheren Publikationen ein Einfluss auf den Glukosestoffwechsel, insbesondere auf die Glykolyse beschrieben (Boros et al. 2001; Comin-Anduix et al. 2002), weshalb sich möglicherweise die Effektivität von AVE-MAR durch Kombination mit einer ketogenen Diät steigern lässt. Die ketogene Diät schränkt zwar das Kohlenhydratangebot erheblich ein, jedoch sichert der hohe Fettanteil in der Diät die Energiegewinnung, sodass es zu keinem Abbau körpereigener Substanz - in erster Linie von Muskulatur - kommt. Ein solches Ernährungsregime wäre sicherlich geeignet, um in experimentell-klinischen Untersuchungen geprüft zu werden.

8 Zusammenfassung

Die zelltoxische Wirkung von AVEMAR, einem medizinischen Nahrungsergänzungsmittel, wurde erstmalig an einer Vielzahl humaner Tumorzelllinien systematisch untersucht.

Die einzelnen Tumorzelllinien reagierten sehr unterschiedlich auf die Inkubation mit AVEMAR. So weisen vier der zwölf Tumorzelllinien (33 %) einen EC_{50} -Wert von mehr als 50 mg/ml auf und waren somit resistent gegenüber AVEMAR, während fünf der zwölf Tumorzelllinien (42 %) einen EC_{50} Wert von <10 mg/ml aufweisen. Für drei Zelllinien wurde ein EC_{50} -Wert zwischen >10 und <25 mg/ml nachgewiesen. Zwischen der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen und ihrer Empfindlichkeit gegenüber dem AVEMAR-Effekt war kein Zusammenhang zu erkennen; ebenso wurde ausgeschlossen, dass der AVEMAR Effekt auf einer unspezifischen Wirkung beruht.

Zur weiteren Untersuchung wurden vier der zwölf Zelllinien ausgewählt: BxPC-3 (EC_{50} : $4,9 \pm 0,42$ mg/ml); 23132/87 (EC_{50} : $9,3 \pm 0,28$ mg/ml); HT-29 (EC_{50} : $15,35 \pm 0,21$ mg/ml) und HRT-18 (EC_{50} : $21,3 \pm 0,42$ mg/ml). Die Wirkung von 10 mg/ml AVEMAR auf diese vier Zelllinien war nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden: zelltoxisch (BxPC-3), zytostatisch (23132/87 und HT-29) und schwach zytostatisch (HRT-18).

Insbesondere für HRT-18 war der zytostatische Effekt von AVEMAR begrenzt und bereits nach 48 Stunden in Kultur ohne AVEMAR nicht mehr zu beobachten. Im Gegensatz dazu war der zelltoxische Effekt von AVEMAR auf Zellen der Linie BxPC-3 extrem rasch (<24 Stunden) und absolut irreversibel. Dieser zelltoxische Effekt ähnelt der Wirkungsweise von 2,6-Dimethoxy-1,4-Benzochinonen, wobei nicht geklärt ist, ob reaktive Sauerstoffspezies oder andere Formen von Radikalen, z.B. Stickstoffradikale, entstehen. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass ausschließlich Glutathion, welches als Radikalfänger an zahlreichen enzymabhängigen Reduktionsreaktionen beteiligt ist, die zelltoxische Wirkung von AVEMAR kompensieren konnte. Katalase, die die Detoxifikation von Wasserstoffperoxid katalysiert, zeigte in Gegenwart von

AVEMAR keine Wirkung, war aber in Gegenwart von Benzochinonen wirksam. Da bei oxidativem Stress auch Wasserstoffperoxid entsteht, scheint die zelltoxische Wirkung von AVEMAR bei BxPC-3 nicht auf Auslösung von oxidativem Stress zu beruhen, sondern auf der Induktion von Radikalen bzw. toxischen Metaboliten anderer Art.

Der bei den Tumorzelllinien 23132/87 und HT-29 beobachtete, weniger aggressive zytostatische Effekt von AVEMAR basiert nicht auf der Induktion freier Radikale, da Glutathion ohne Wirkung war. Mit der Zytostase einhergehend war eine deutliche Verringerung des intrazellulären ATP-Gehalts um bis zu 60 % bei 10 mg/ml bzw. 100 % bei 50 mg/ml AVEMAR.

Zusätzlich zur Wirkung von AVEMAR wurden weitere Weizenprodukte auf mögliche zelltoxische bzw. zytostatische Effekte getestet und zwar Weizenkeimlinge, handelsübliches Weizenmehl vom Typ 405 und Weizenlektine. Interessanterweise wurde je nach Zelllinie auch für diese Weizenprodukte ein zelltoxischer Effekt *in vitro* nachgewiesen.

AVEMAR weist zelltoxische und zytostatische Effekte auf. Beide Effekte werden nicht über oxidativen Stress vermittelt. Die zelltoxische Wirkung von AVEMAR wird durch Nicht-Sauerstoffradikale bzw. toxische Metabolite vermittelt. Damit wurde der postulierte Hauptmechanismus von AVEMAR - nämlich die Induktion von oxidativem Stress durch Benzochinone - nicht bestätigt.

AVEMAR stellt ein nebenwirkungsarmes, gut verträgliches und günstiges Nahrungsergänzungsmittel dar. Die vorliegende Arbeit, aber auch klinische Studien haben eine Wirksamkeit von AVEMAR gegenüber Tumoren gezeigt. Da zahlreiche onkologische Patienten sehr motiviert sind, neben der Chemo- und Radiotherapie, weitere Maßnahmen gegen ihr Krebsleiden zu ergreifen, sind Empfehlungen von Supportivprodukten, deren zugrunde liegenden Mechanismen weitestgehend aufgeklärt sind und für die ein wissenschaftlicher Nachweis ihrer Wirksamkeit vorliegt, sicherlich ein zu begrüßender Schritt zur ganzheitlichen Betreuung onkologischer Patienten.

9 Publikationsverzeichnis

K. Eich, F. Karaaslan, N. Pfetzer, C.-T. Germer, C. Otto. **Investigations on the anticancer effect of the nontoxic fermented wheat germ extract Avemar.** *Langenbecks Arch Surg* 2010; **395**: 787 (Abstract).

**Untersuchungen zum antikanzerogenen Potential von Benzochinonen:
Oxidativer Stress als Auslöser zelltoxischer Effekte.**

F. Karaaslan, K. Eich, N. Pfetzer, U. Kämmerer, C.-T. Germer, C. Otto

Vortrag auf der 88. Jahrestagung der Vereinigung Bayerischer Chirurgen e.V. vom 20.-23. Juli 2011 in München; ausgezeichnet mit einem Reisestipendium der Firma BRAUN.

10 Literaturverzeichnis

- Atienza JM, Zhu J, Wang X, Xu X, Abassi Y. "Dynamic monitoring of cell adhesion and spreading on microelectronic sensor arrays." *J Biomol Screen* 2005; **10**(8): 795-805.
- Babson JR, Abell NS, Reed DJ. "Protective role of the glutathione redox cycle against adriamycin-mediated toxicity in isolated hepatocytes." *Biochem Pharmacol* 1981; **30**(16): 2299-2304.
- Bachur NR, Gordon SL, Gee MV. "A general mechanism for microsomal activation of quinone anticancer agents to free radicals." *Cancer Res* 1978; **38**(6): 1745-1750.
- Bauer JD, Capra S. "Nutrition intervention improves outcomes in patients with cancer cachexia receiving chemotherapy--a pilot study." *Support Care Cancer* 2005; **13**(4): 270-274.
- Becerra MC, Albasa I. "Oxidative stress induced by ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus*." *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **297**(4): 1003-1007.
- Beheshti N, McIntosh AC. "The bombardier beetle and its use of a pressure relief valve system to deliver a periodic pulsed spray." *Bioinspir Biomim*. 2007; **2**(4): 57-64.
- Beutler E. "Nutritional and metabolic aspects of glutathione." *Annu Rev Nutr* 1989; **9**: 287-302.
- Blackburn GL, Bistrain BR, Maini BS, Schlamm HT, Smith MF. "Nutritional and metabolic assessment of the hospitalized patient." *J Parenter Enteral Nutr* 1977; **1**(1): 11-22.
- Boros LG, Lapis K, Szende B, Tömösközi-Farkas R, Balogh A, Boren J, Marin S, Cascante M, Hidvégi M. "Wheat germ extract decreases glucose uptake and RNA ribose formation but increases fatty acid synthesis in MIA pancreatic adenocarcinoma cells." *Pancreas* 2001; **23**(2): 141-147.
- Bradford MM. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 1976; **72**: 248-254.
- Brandt U. „Redoxreaktionen, Sauerstoff und oxidative Phosphorylierung“ aus *Biochemie und Pathobiochemie*, Springer-Verlag (2007, 8.Auflage): 489-514. DOI: 10.1007/978-3-540-32681-6_15, Print ISBN 978-3-540-32680-9, Online ISBN 978-3-540-32681-6.
- Comin-Anduix B, Boros LG, Marin S, Boren J, Callol-Massot C, Centelles JJ, Torres JL, Agell N, Bassilian S, Cascante M. "Fermented wheat germ extract inhibits glycolysis/pentose cycle enzymes and induces apoptosis through poly(ADP-ribose)

- polymerase activation in Jurkat T-cell leukemia tumor cells." *J Biol Chem* 2002; **277**(48): 46408-46414.
- Cosgrove DJ, Daniels DG, Greer EN, Hutchinson JB, Moran T, Whitehead FK. "Isolation of methoxy- and 2:6-dimethoxy-p-benzoquinone from fermented wheat germ." *Nature* 1952; **169**(4310): 966-967.
- Deininger M, Buchdunger E, Druker BJ. "The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia." *Blood* 2005; **105**(7): 2640-2653.
- Demidov LV, Manziuk LV, Kharkevitch GY, Pirogova NA, Artamonova EV. "Adjuvant fermented wheat germ extract (Avenmar) nutraceutical improves survival of high-risk skin melanoma patients: a randomized, pilot, phase II clinical study with a 7-year follow-up." *Cancer Biother Radiopharm* 2008; **23**(4): 477-482.
- DeVita VT Jr, Chu E. "A history of cancer chemotherapy." *Cancer Res* 2008; **68** (21): 8643-8653
- Driscoll JS, Hazard GF Jr, Wood HB Jr, Goldin A. "Structure-antitumor activity relationships among quinone derivatives." *Cancer Chemother Rep* 1974; **4**(2): 1-362.
- Dykes L, Rooney LW. "Phenolic Compounds in Cereal Grains and Their Health Benefits." *Cereal Foods World* 2007; **52**(3):105-111.
- Eisner T, Jones TH, Hicks K, Silberglied RE, Meinwald J. "Defense-Mechanisms of Arthropods. 53. Quinones and Phenols in Defensive Secretions of Neotropical Opilions." *J Chem Ecol* 1977; **3**(3): 321-329.
- Eisner T, Jones HT, Aneshansley DJ, Tschinkel WR, Silberglied RE, Meinwald J. "Defense mechanisms of arthropods. 57. Chemistry of defensive secretions of bombardierbeetles." *J Insect Physiol* 1977; **23**: 1383-1386.
- Fearon KC. "Cancer cachexia: Developing multimodal therapy for multidimensional problem." *Eur J Cancer* 2008; **44**(8): 1124-1132.
- Flick DA, Gifford GE. "Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor." *J Immunol Methods* 1984; **68**(1-2): 167-175.
- Gatenby RA, Gillies RJ. "Why do cancers have high aerobic glycolysis?" *Nat Rev Cancer* 2004; **4** (11): 891-899
- Goldschmidt D, Gordower L, Berthe JV, Remmelink M, Decaestecker C, Petein M, Salmon I, Kiss R, Danguy A. "Contribution of quantitative lectin histochemistry to characterizing well-differentiated, dedifferentiated and poorly differentiated liposarcomas." *Anal Quant Cytol Histol* 1997; **19**(3): 215-226.
- Grey NJ, Karl I, Kipnis DM. "Physiologic mechanisms in the development of starvation ketosis in man." *Diabetes* 1975; **24**(1): 10-16.
- Halliwell B, Gutteridge JM. "Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease." *Biochem J* 1984; **219**(1): 1-14.

- Heimbach JT, Sebestyen G, Semjen G, Kennepohl E. "Safety studies regarding a standardized extract of fermented wheat germ." *Int J Toxicol* 2007; **26**(3): 253-259.
- Hemnani T, Parihar MS. "Reactive oxygen species and oxidative DNA damage." *Indian J Physiol Pharmacol* 1998; **42**(4): 440-452.
- Hidvégi M, Rásó E, Tömösközi-Farkas R, Szende B, Paku S, Prónai L, Bocsi J, Lapis K. "MSC, a new benzoquinone-containing natural product with antimetastatic effect." *Cancer Biother Radiopharm* 1999; **14**(4): 277-289.
- Hileman EA, Achanta G, Huang P. "Superoxide dismutase: an emerging target for cancer therapeutics." *Expert Opin Ther Targets* 2001; **5**(6): 697-710.
- Hodges RE, Hood J, Canham JE, Sauberlich HE, Baker EM. "Clinical manifestations of ascorbic acid deficiency in man." *Am J Clin Nutr* 1971; **24**(4): 432-443.
- Höckel M, Vaupel P. "Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects." *J Natl Cancer Inst* 2001; **93**(4): 266-276.
- Holm E, Hagmüller E, Staedt U, Schlickeiser G, Günther HJ, Leweling H, Tokus M, Kollmar HB. "Substrate balances across colonic carcinomas in humans." *Cancer Res* 1995; **55**(6): 1373-1378.
- Holm E. Stoffwechsel und Ernährung bei Tumorkrankheiten. Georg Thieme Verlag KG 2007, 1. Auflage; ISBN 978-3131422019
- Huber W, Koella JC. "A comparison of three methods of estimating EC50 in studies of drug resistance of malaria parasites." *Acta Trop* 1993; **55**(4): 257-261.
- Iwai K, Kondo T, Watanabe M, Yabu T, Kitano T, Taguchi Y, Umehara H, Takahashi A, Uchiyama T, Okazaki T. "Ceramide increases oxidative damage due to inhibition of catalase by caspase-3-dependent proteolysis in HL-60 cell apoptosis." *J Biol Chem* 2003; **278**(11): 9813-9822.
- Jakab F, Shoenfeld Y, Balogh A, Nichelatti M, Hoffmann A, Kahán Z, Lapis K, Mayer A, Sápó P, Szentpétery F, Telekes A, Thurzó L, Vágvölgyi A, Hidvégi M. "A medical nutriment has supportive value in the treatment of colorectal cancer." *Br J Cancer* 2003; **89**(3): 465-469.
- Johanning GL, Wang-Johanning F. "Efficacy of a medical nutriment in the treatment of cancer." *Altern Ther Health Med* 2007; **13**(2): 56-63; quiz 64-55.
- Kaaks R, Lukanova A. "Energy balance and cancer: the role of insulin and insulin-like growth factor-I." *Proc Nutr Soc* 2001; **60**(1): 91-106.
- Kawai K, Akaza H. "Current status of chemotherapy in risk-adapted management for metastatic testicular germ cell cancer." *Cancer Sc.* 2010; **101**(1): 22-28.
- Keele BB Jr, McCord JM, Fridovich I. "Further Characterization of Bovine Superoxide Dismutase and Its Isolation from the bovine heart." *J Biol Chem* 1971; **246**(9): 2875-2880.

- King CG, Waugh WA. "The Chemical Nature of Vitamin C." *Science* 1932; **75**(1944): 357-358.
- Klingelhoefter C, Kämmerer U, Koospal M, Mühlhing B, Schneider S, Kapp M, Kübler A, Germer C-T, Otto C. "Natural resistance to ascorbic acid induced oxidative stress is mainly mediated by catalase activity in human cancer cells and catalase-silencing sensitizes to oxidative stress." *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2012, **12**: 61.
- Lippman SM, Hawk ET. "Cancer Prevention: From 1727 to Milestones of the Past 100 Years." *Cancer Res* 2009; **69**(13): 5269-5284.
- Loréa P, Goldschmidt D, Darro F, Salmon I, Bovin N, Gabius HJ, Kiss R, Danguy A. "In vitro characterization of lectin-induced alterations on the proliferative activity of three human melanoma cell lines." *Melanoma Res* 1997; **7**(5): 353-363.
- McCarty MF, Barroso-Aranda J, Contreras F. "Oxidative stress therapy for solid tumors - A proposal." *Med Hypotheses* 2010; **74**(6):1052-1054.
- Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. "Oxidative stress and vascular disease." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; **25**(1): 29-38.
- Maeda H, Hori S, Ohizumi H, Segawa T, Takehi Y, Ogawa O, Kakizuka A. "Effective treatment of advanced solid tumors by the combination of arsenic trioxide and L-buthionine-sulfoximine." *Cell Death Differ* 2004; **11**(7): 737-746.
- Marcsek Z, Kocsis Z, Jakab M, Szende B, Tompa A. "The efficacy of tamoxifen in estrogen receptor-positive breast cancer cells is enhanced by a medical nutriment." *Cancer Biother Radiopharm* 2004; **19**(6): 746-753.
- Martensson J, Jain A, Meister A. "Glutathione is required for intestinal function." *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**(5): 1715-1719.
- Mathupala SP, Ko YH, Pedersen PL. "Hexokinase-2 bound to mitochondria: cancer's stygian link to the "Warburg effect" and a pivotal target for effective therapy." *Semin Cancer Biol.* 2009; **19**(1): 17-24.
- Meister A, Anderson ME. "Glutathione." *Annu Rev Biochem* 1983; **52**: 711-760.
- Moriya K, Nakagawa K, Santa T, Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Miyazawa T, Ishibashi K, Horie T, Imai K, Todoroki T, Kimura S, Koike K. "Oxidative stress in the absence of inflammation in a mouse model for hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis." *Cancer Res* 2001; **61**(11): 4365-4370.
- Mueller T, Voigt W. "Fermented wheat germ extract - nutritional supplement or anticancer drug?" *Nutr J* 2011; **10**:89.
- Mulligan HD, Tisdale MJ. "Metabolic substrate utilization by tumour and host tissues in cancer cachexia." *Biochem J* 1991; **277 (Pt 2)**: 321-326

- Nebeling LC, Miraldi F, Shurin SB, Lerner E. "Effects of a ketogenic diet on tumor metabolism and nutritional status in pediatric oncology patients: two case reports." *J Am Coll Nutr* 1995; **14** (2): 202-208
- Nunomura A, Moreira PI, Lee HG, Zhu X, Castellani RJ, Smith MA, Perry G. "Neuronal death and survival under oxidative stress in Alzheimer and Parkinson diseases." *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2007; **6**(6): 411-423.
- O'Brien PJ. "Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity." *Chem Biol Interact* 1991; **80**(1): 1-41.
- Oberley TD, Oberley LW. "Antioxidant enzyme levels in cancer." *Histol Histopathol* 1997; **12**(2): 525-535.
- Otto C, Kaemmerer U, Illert B, Muehling B, Pfetzer N, Wittig R, Voelker HU, Thiede A, Coy JF. "Growth of human gastric cancer cells in nude mice is delayed by a ketogenic diet supplemented with omega-3 fatty acids and medium-chain triglycerides." *BMC Cancer* 2008; **8**: 122
- Pelicano H, Feng L, Zhou Y, Carew JS, Hileman EO, Plunkett W, Keating MJ, Huang P. "Inhibition of mitochondrial respiration: a novel strategy to enhance drug-induced apoptosis in human leukemia cells by a reactive oxygen species-mediated mechanism." *J Biol Chem* 2003; **278**(39): 37832-37839.
- Pethig R, Gascoyne PR, McLaughlin JA, Szent-Györgyi A. "Ascorbate-quinone interactions: electrochemical, free radical, and cytotoxic properties." *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; **80**(1): 129-132.
- Piccart-Gebhart MJ. "Anthracyclines and the tailoring of treatment for early breast cancer." *N Engl J Med* 2006; **354**(20): 2177-2179.
- Pillai CK, Pillai KS. "Antioxidants in health." *Indian J Physiol Pharmacol* 2002; **46**(1):1-5.
- Pohl U. „Der Sauerstoff im Gewebe: Substrat, Signal und Noxe.“ aus *Physiologie des Menschen*, Springer-Verlag 2011, 31.Auflage: 763-777. DOI 10.1007/978-3-642-01651-6_36, Print ISBN 978-3-642-01650-9, Online ISBN 978-3-642-01651-6.
- Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DF, Wilcox HM, Flood DG, Beal MF, Brown RH Jr, Scott RW, Snider WD. "Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury." *Nat Genet* 1996; **13**(1): 43-47.
- Ross JA, Kasum CM. "Dietary Flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety." *Annu Rev Nutr* 2002; **22**(1): 19-34.
- Rossi L, Moore GA, Orrenius S, O'Brien PJ. "Quinone toxicity in hepatocytes without oxidative stress." *Arch Biochem Biophys* 1986; **251**(1): 25-35.

- Savini I, Rossi A, Pierro C, Avigliano L, Catani MV. "SVCT1 and SVCT2: key proteins for vitamin C uptake." *Amino Acids* 2008; **34**: 347-55.
- Schmidt M, Pfetzer N, Schwab M, Strauss I, Kämmerer U. "Effects of a ketogenic diet on the quality of life in 16 patients with advanced cancer: A pilot trial." *Nutr Metab (Lond)* 2011; **8**(1): 54.
- Schmidt S, Rainieri S, Witte S, Matern U, Martens S. "Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* glucosidase that hydrolyzes flavonoid glucosides." *Appl Environ Microbiol* 2011; **77**(5): 1751-1757.
- Schor NF, Kagan VE, Liang Y, Yan Ch, Tyurina Y, Tyurin V, Nylander KD. "Exploiting oxidative stress and signaling in chemotherapy of resistant neoplasms." *Biochemistry (Mosc)* 2004; **69**(1): 38-44.
- Schroeder WA, Shelton JR, Shelton JB, Olson BM. "Some amino acid sequences in bovine liver catalase." *Biochim Biophys Acta* 1964; **89**: 47-65.
- Shen ZY, Shen WY, Chen MH, Shen J, Zeng Y. "Reactive oxygen species and antioxidants in apoptosis of esophageal cancer cells induced by As₂O₃." *Int J Mol Med* 2003; **11**(4): 479-484.
- Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN. "Oxidative damage and mitochondrial decay in aging." *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; **91**(23): 10771-10778.
- Sies H. "Role of reactive oxygen species in biological processes." *Klin Wochenschr* 1991; **69**(21-23): 965-968.
- Sies H. "Strategies of antioxidant defense." *Eur J Biochem* 1993; **215**(2): 213-219.
- Sies H. "Oxidative stress: oxidants and antioxidants." *Exp Physiol* 1997; **82**(2): 291-295.
- Siems W. *Oxidativer Stress und Pharmaka*. Govi-Verlag 2005, 1. Auflage; ISBN 978-3774110281
- Slater AF, Stefan C, Nobel I, van den Dobbelen DJ, Orrenius S. "Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis." *Toxicol Lett* 1995; **82-83**: 149-153.
- Staquet MJ, Byar DP, Green SB, Rozenzweig M. "Clinical predictivity of transplantable tumor systems in the selection of new drugs for solid tumors: rationale for a three-stage strategy." *Cancer Treat Rep* 1983; **67**(9): 753-765.
- Sukkar SG, Cella F, Rovera GM, Nichelatti M, Ragni G, Chiavenna G, Giannoni A, Ronzani G, Ferrari C. "A multicentric prospective open trial on the quality of life and oxidative stress in patients affected by advanced head and neck cancer treated with a new benzoquinone-rich product derived from fermented wheat germ (Aveamar)." *Med J Nutrition Metab* 2008; **1**:37-42.
- Svirbely JL, Szent-Györgyi A. "The chemical nature of vitamin C." *Biochem J* 1932; **26**(3): 865-70.

- Szende B, Marcsek Z, Kocsis Z, Tompa A. "Effect of simultaneous administration of Avemar and cytostatic drugs on viability of cell cultures, growth of experimental tumors, and survival tumor-bearing mice." *Cancer Biother Radiopharm* 2004; **19**(3): 343-349.
- Szent-Györgyi A. "The Identification of Vitamin C." *Science* 1938; **87**(2253): 214-215.
- Tandon VR, Sharma S, Mahajan A, Bardi GH. "Oxidative Stress: A Novel Strategy in Cancer Treatment." *JK Science* 2005; **7**(1).
- Telekes A, Hegedus M, Chae CH, Vékey K.. "Avemar (wheat germ extract) in cancer prevention and treatment." *Nutr Cancer* 2009; **61**(6): 891-899.
- Tisdale MJ. "Mechanisms of cancer cachexia." *Physiol Rev.* 2009; **89**(2): 381-410.
- Tracy JW, Webster LT Jr. "Drugs used in Chemotherapy of protozoal infections: Malaria." (1996) aus: Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th edition 2001; Hardman JG, Limbird LE, McGraw-Hill, New York: ISBN-13: 978-0071354691
- Valentiner U, Fabian S, Schumacher U, Leathem AJ. "The influence of dietary lectins on the cell proliferation of human breast cancer cell lines in vitro." *Anticancer Res* 2003; **23**(2B): 1197-1206.
- Verrax J, Vanbever S, Stockis J, Taper H, Calderon PB. "Role of glycolysis inhibition and poly(ADP-ribose) polymerase activation in necrotic-like cell death caused by ascorbate/menadione-induced oxidative stress in K562 human chronic myelogenous leukemic cells." *Int J Cancer* 2007; **120**(6): 1192-1197.
- Velázquez A, Fernández-Mejía C. "Vitamin metabolism, genetics and the environment." *World Rev Nutr Diet* 2004; **93**: 164-187.
- Wiseman H, Halliwell B. "Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer." *Biochem J* 1996; **313** (Pt 1): 17-29.
- Zetterström R. "Nobel Prize 1937 to Albert von Szent-Györgyi: identification of vitamin C as the anti-scorbutic factor." *Acta Paediatr* 2009; **98**(5): 915-919.
- Zhou W, Mukherjee P, Kiebish MA., Markis WT, Mantis JG, Seyfried TN. "The calorically restricted ketogenic diet, an effective alternative therapy for malignant brain cancer." *Nutr Metab (Lond)*. 2007; **4**: 5
- Zhou Y, Hileman EO, Plunkett W, Keating MJ, Huang P. "Free radical stress in chronic lymphocytic leukemia cells and its role in cellular sensitivity to ROS-generating anticancer agents." *Blood* 2003; **101**(10): 4098-4104.

11 Appendix

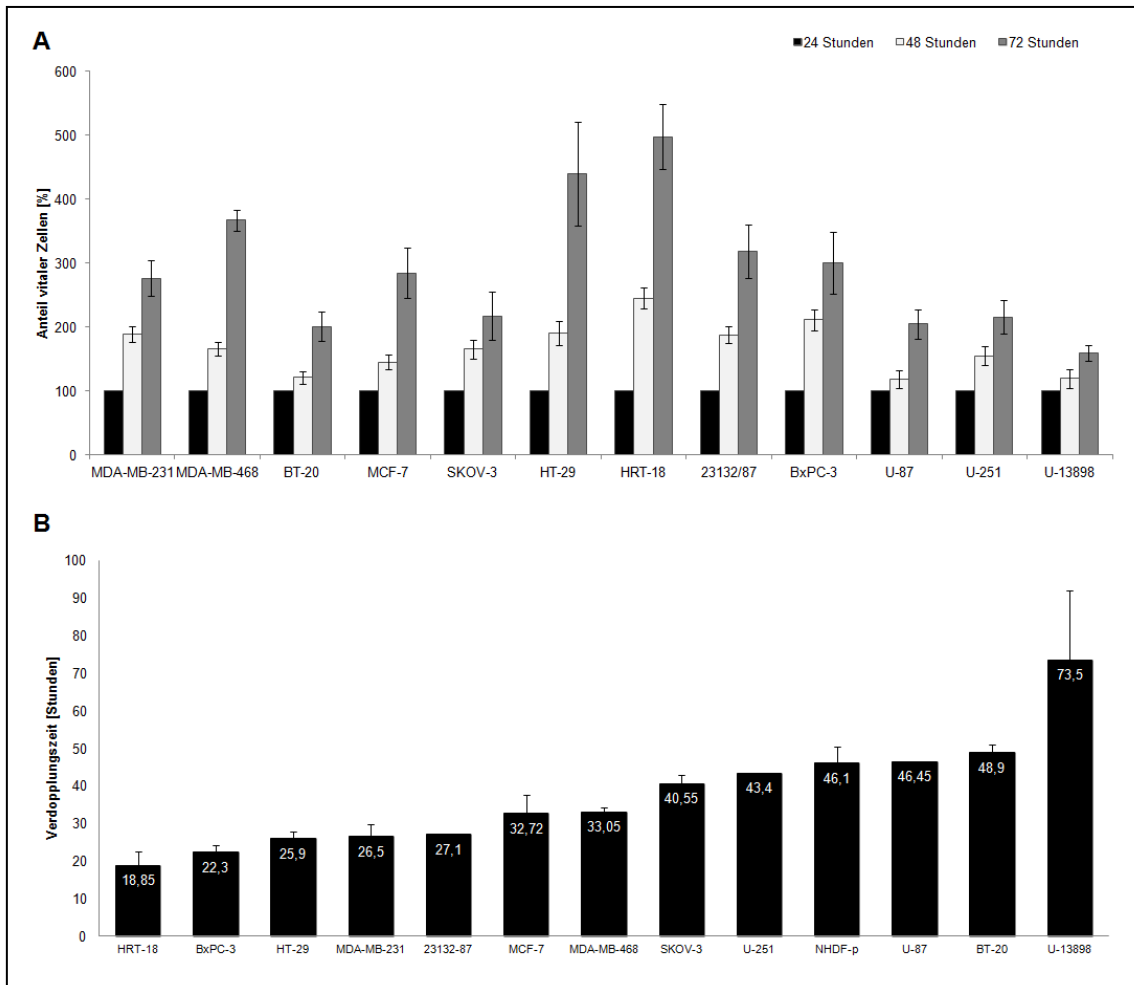


Abb. 11.1: Darstellung von Wachstumskinetik (A) und Verdopplungszeit (B) der getesteten Tumorzelllinien. Die Proliferationsrate der einzelnen Zelllinien wurde mit dem Kristallviolett-Assay photometrisch bestimmt. Als Referenzwert wurde die gemessene Extinktion nach 24-stündiger Inkubation in Kulturmedium definiert. Die Proliferationsraten nach 48- bzw. 72-stündiger Inkubation mit Kulturmedium in Prozent berechnen sich wie folgt: Proliferationsrate = [Extinktionswert (nach 48 h bzw. 72 h) / Extinktionswert (nach 24 h)] * 100. Eine prozentuale Wachstumsrate von > 300 % wurde in dieser Arbeit als ein schnelles Wachstum definiert. Pro Messzeitpunkt wurden jeweils 10 Parallelwerte gemessen. Die zugrunde liegenden Messwerte wurden in Zusammenarbeit mit Kilian Eich erstellt. **(B)** Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Hierbei handelt es sich um mindestens zwei Wiederholungen mit jeweils 5 Parallelwerten.

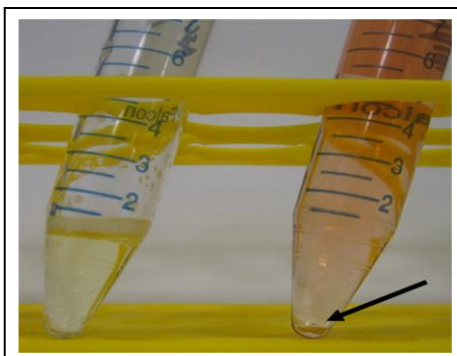


Abb. 11.2: In Kulturmedium gelöste Ascorbinsäure und 2,6-Dimethoxy-1,4-Benzochinone (DMBQ). Linkes Röhrchen: 100 mg/ml Ascorbinsäure, rechtes Röhrchen 0,1 mg/ml DMBQ. Wie von der Molekülstruktur (Abb. 1.3) her zu erwarten, löste sich DMBQ sehr schlecht in wässriger Lösung. Der Pfeil deutet auf das DMBQ-Sediment hin.

Abb. 11.3: Vitalität humaner Fibroblasten (NHDF-p) nach 24 Stunden Inkubation mit AVE-MAR (A) und Weizenlektinen (B). Nur bei der höchsten Konzentration von 50 mg/ml AVE-MAR bzw. 50 µg/ml Weizenlektin zeigt sich ein signifikanter zelltoxischer Effekt. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Hierbei handelt es sich um repräsentative Ergebnisse aus jeweils 6 Parallelwerten. ** P < 0.01.

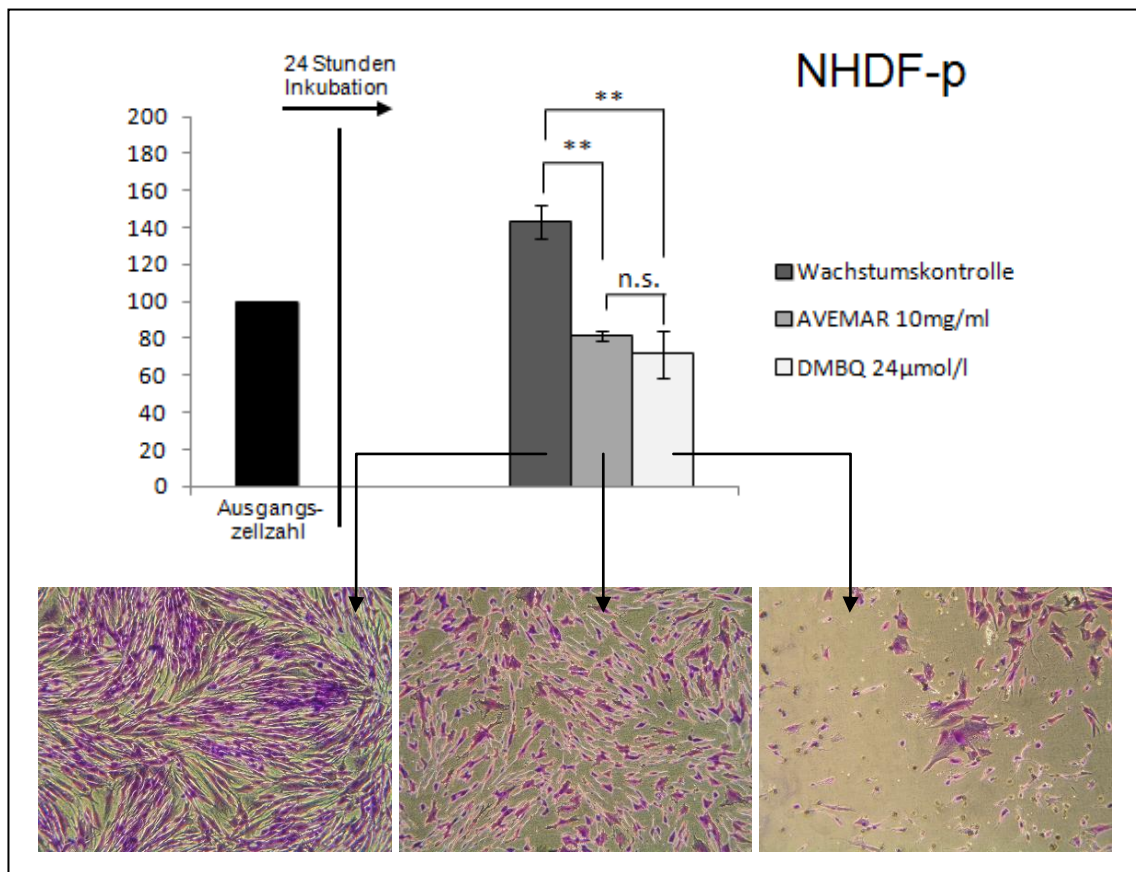
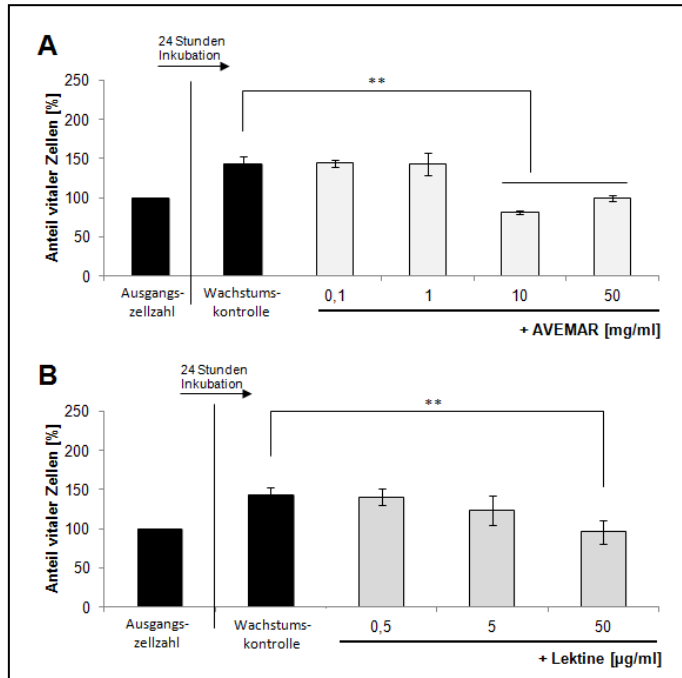


Abb. 11.4: Vergleich der zelltoxischen Effekte von AVE-MAR (10 mg/ml) und Benzochinonen (24 µmol/l) bei Fibroblasten. Zwischen der Wirksamkeit von AVE-MAR und Benzochinonen besteht kein signifikanter Unterschied. Im Vergleich zu malignen Zellen sind Benzochinone bei Fibroblasten nur wenig wirksam. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass Fibroblasten über eine bessere antioxidative Abwehr verfügen als Tumorzellen (Oberley TD und Oberley LW 1997). Den Benzochinonen wurde Ascorbinsäure (2,4 mmol/l) zugesetzt. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Hierbei handelt es sich um repräsentative Ergebnisse aus jeweils 6 Parallelwerten. ** P < 0.01, n.s. = nicht signifikant.

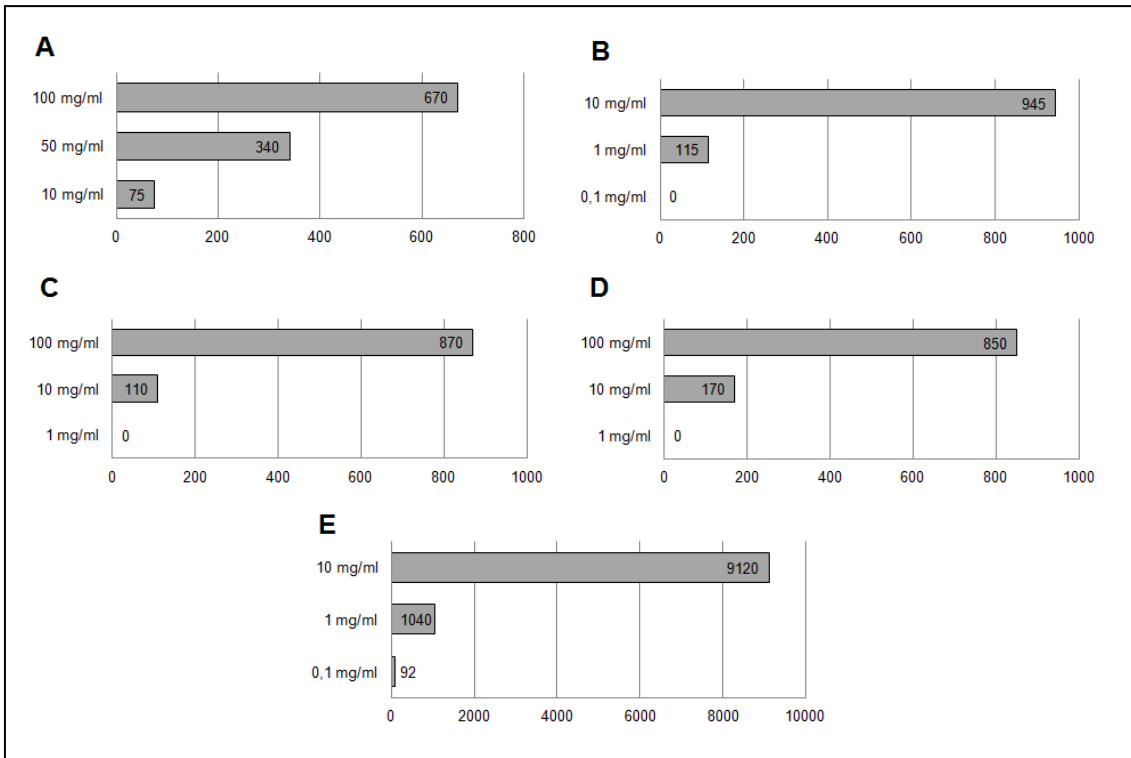


Abb. 11.5: Bestimmung des Proteingehalts von AVEMAR (A), Weizenkeimlingen (B), Weizenmehl (C), Gluten (D) und bovinem Serum-Albumin (E). Auf der Y-Achse ist die Einwaage und auf der X-Achse der entsprechend gemessene Proteingehalt in $\mu\text{g/ml}$ angegeben. So wurde in 50 mg/ml AVEMAR (A) ein Proteingehalt von ca. 340 $\mu\text{g/ml}$ gemessen. Einwaagen an BSA (E) dienten als Kontrolle. Siehe auch Abb. 11.6.

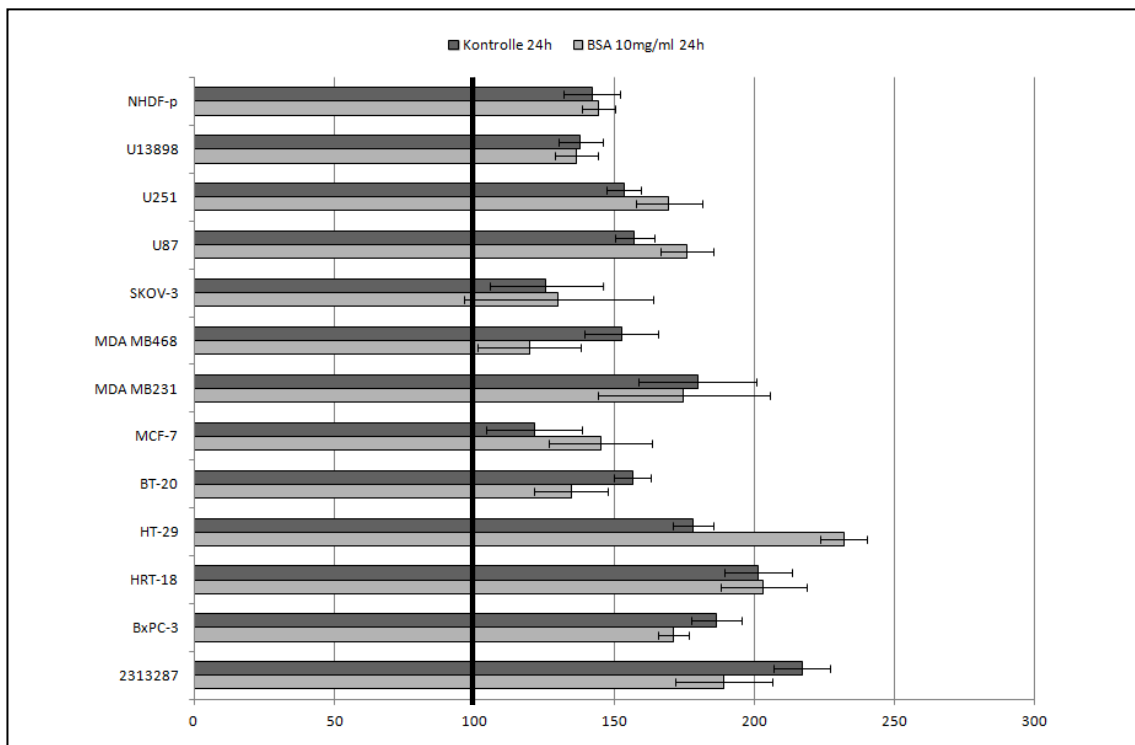


Abb. 11.6 (S. 78): Bestimmung der Zellvitalität mit und ohne BSA. Getestet wurde eine Einwaage an BSA von 10 mg/ml. Die mit dieser Einwaage gemessene Zellvitalität entspricht nahezu der Zellvitalität der Kontrollen (ohne BSA). Die schwarze Linie markiert die Ausgangszellzahl vor Inkubation. Der Proteingehalt wurde mit dem Bradford-Protein-Assay bestimmt (Kapitel 3.5). Siehe auch Abb. 11.5. Hierbei handelt es sich um repräsentative Ergebnisse aus jeweils 6 Parallelwerten.

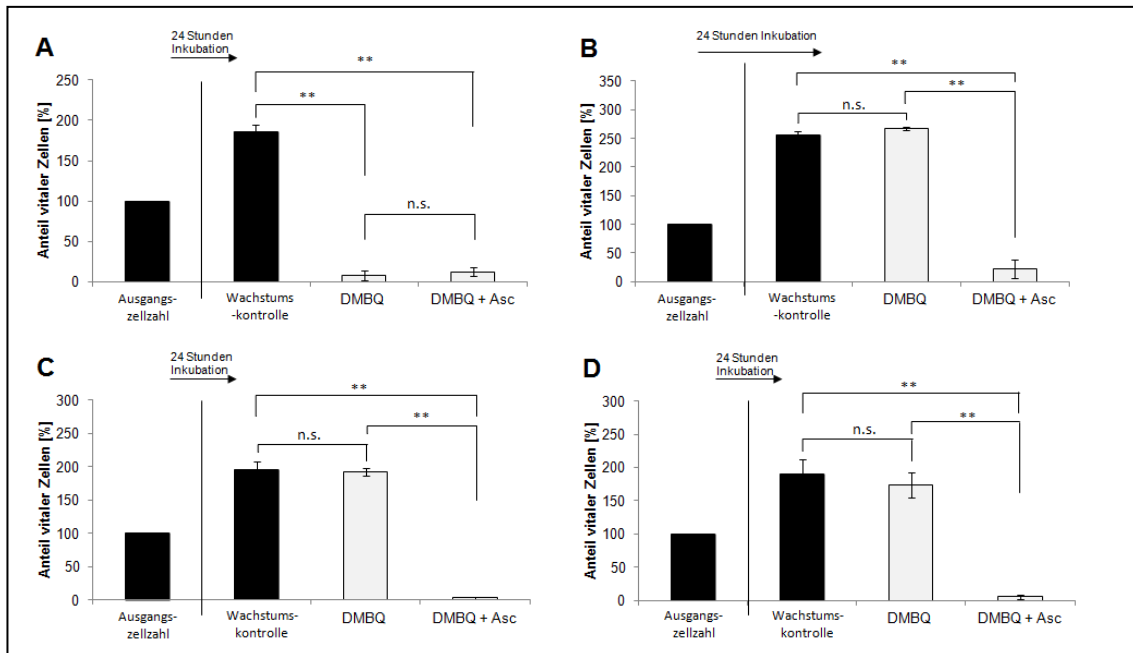


Abb. 11.7: Vergleich der zelltoxischen Wirkung von 2,6-Dimethoxy-1,4-Benzochinone *ohne* und *mit* Ascorbinsäure. Folgende Zelllinien wurden untersucht: **(A)** BxPC-3, **(B)** HRT-18, **(C)** 23132/87 und **(D)** HT-29. Die Konzentration der Benzochinone (DMBQ) betrug 24 $\mu\text{mol/l}$, die der Ascorbinsäure 2,4 mmol/l ; die Inkubationsdauer betrug 24 Stunden. Nur bei der Zelllinie BxPC-3 wirkten die DMBQ auch ohne Ascorbinsäure zelltoxisch. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Hierbei handelt es sich um repräsentative Ergebnisse aus jeweils 6 Parallelwerten. ** $P < 0.01$, n.s. = nicht signifikant.

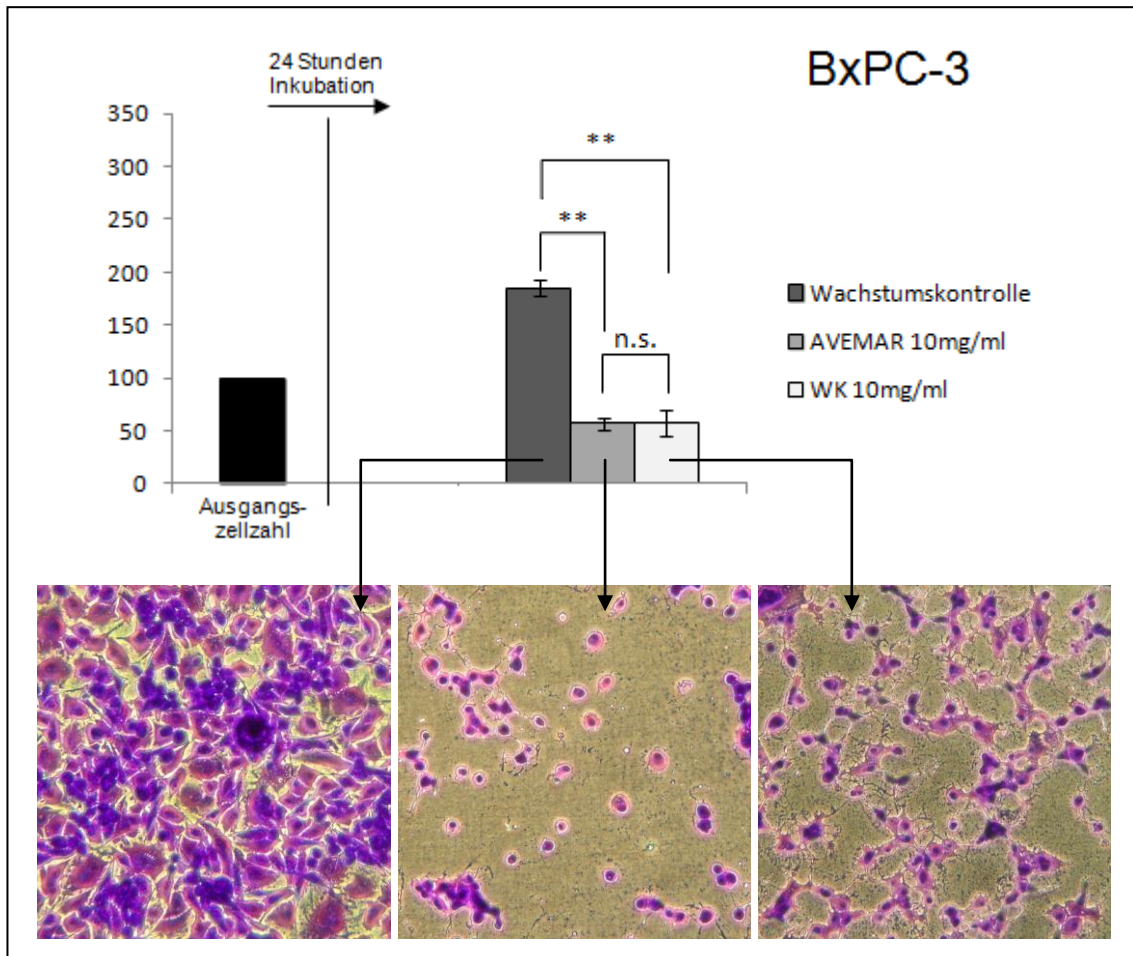


Abb. 11.8: Zelltoxische Effekte von AVEMAR und Weizenkeimlingen (WK) bei der Pankreaskarzinomzelllinie BxPC-3. Der Unterschied zwischen AVEMAR und Weizenkeimlingen (WK) ist nicht signifikant. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Hierbei handelt es sich um repräsentative Ergebnisse aus jeweils 6 Parallelwerten. ** $P < 0.01$, n.s. = nicht signifikant.

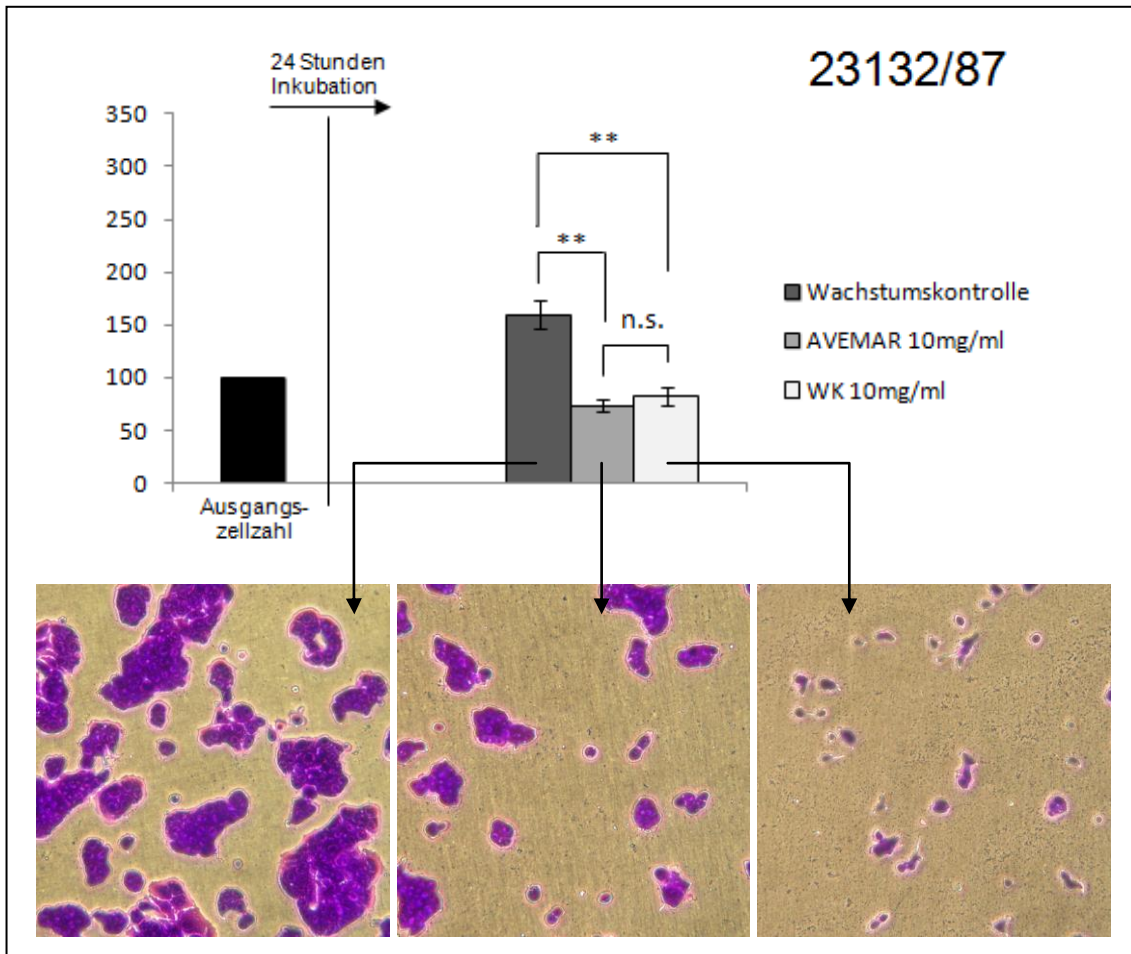


Abb. 11.9: Zelltoxische Effekte von AVEMAR und Weizenkeimlingen (WK) bei der Magenkarzinomzelllinie 23132/87. Der Unterschied zwischen AVEMAR und Weizenkeimlingen (WK) ist nicht signifikant. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Hierbei handelt es sich um repräsentative Ergebnisse aus jeweils 6 Parallelwerten. ** $P < 0.01$, n.s.= nicht signifikant.

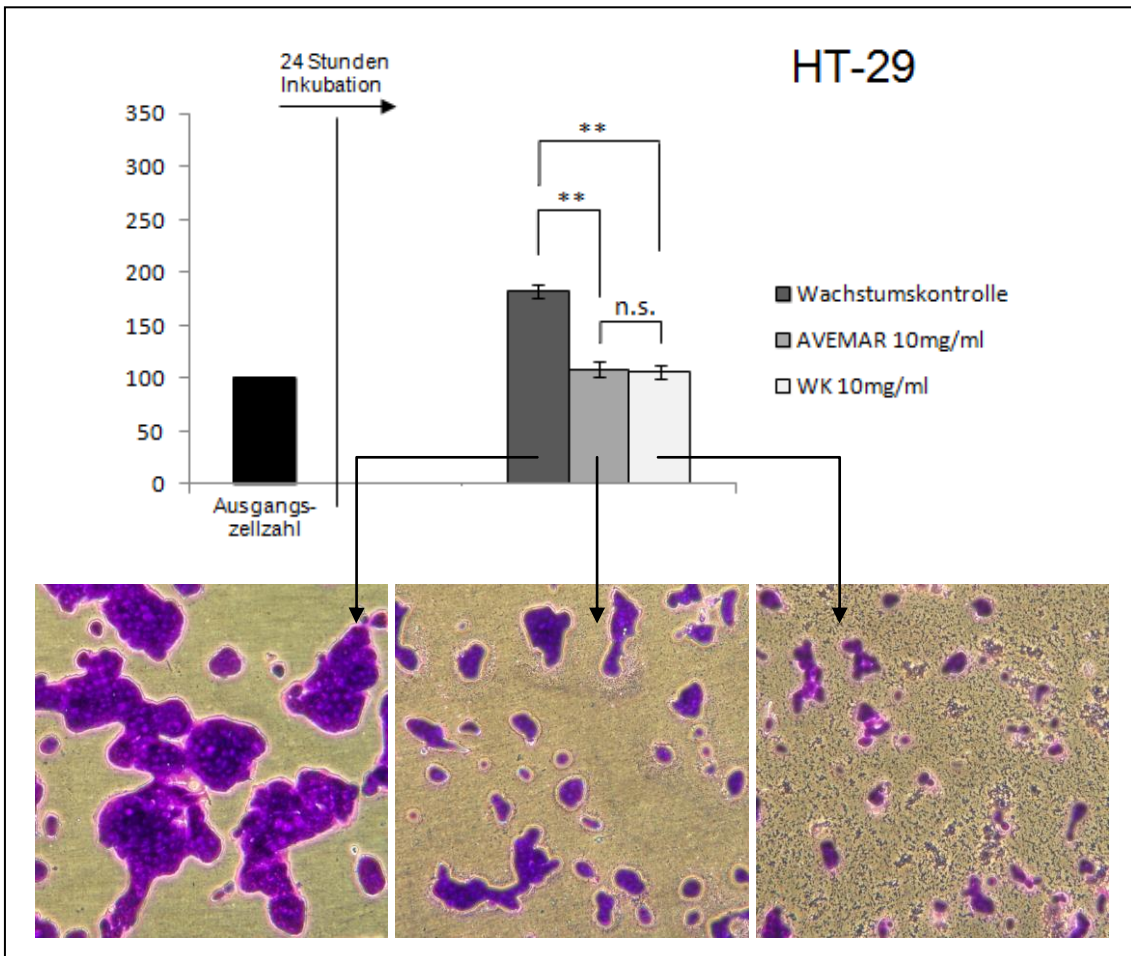


Abb. 11.10: Zelltoxische Effekte von AVEMAR und Weizenkeimlingen (WK) bei der Kolonkarzinomzelllinie HT-29. Der Unterschied zwischen AVEMAR und Weizenkeimlingen (WK) ist nicht signifikant. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Hierbei handelt es sich um repräsentative Ergebnisse aus jeweils 6 Parallelwerten. ** $P < 0.01$, n.s. = nicht signifikant.

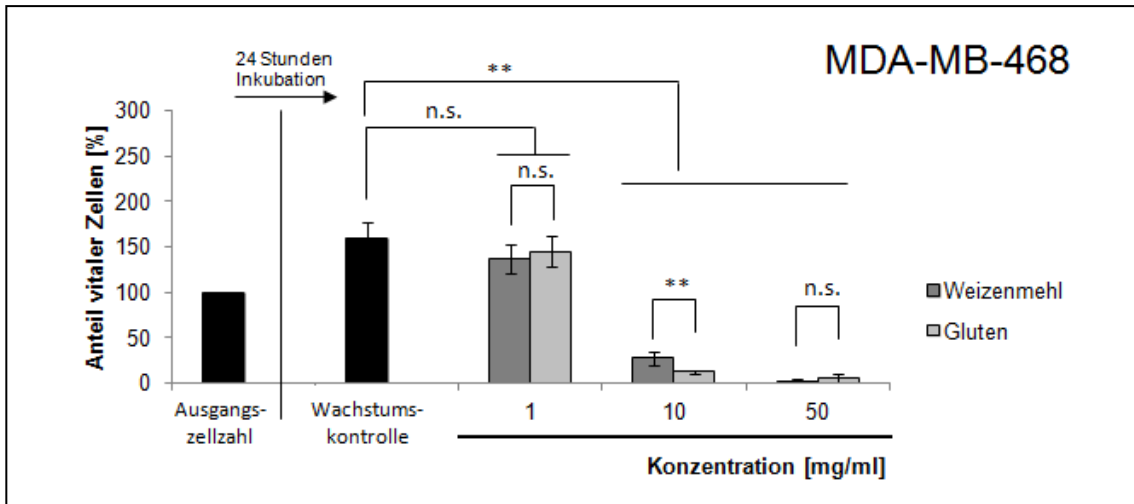


Abb. 11.11: Vergleich der zelltoxischen Effekte von Weizenmehl und Gluten bei der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468. Der Anteil vitaler Zellen ist sowohl bei Weizenmehl als auch bei Gluten nach 24 Stunden Inkubation signifikant verringert. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Hierbei handelt es sich um repräsentative Ergebnisse aus jeweils 6 Parallelwerten. ** $P < 0.01$, n.s. = nicht signifikant.

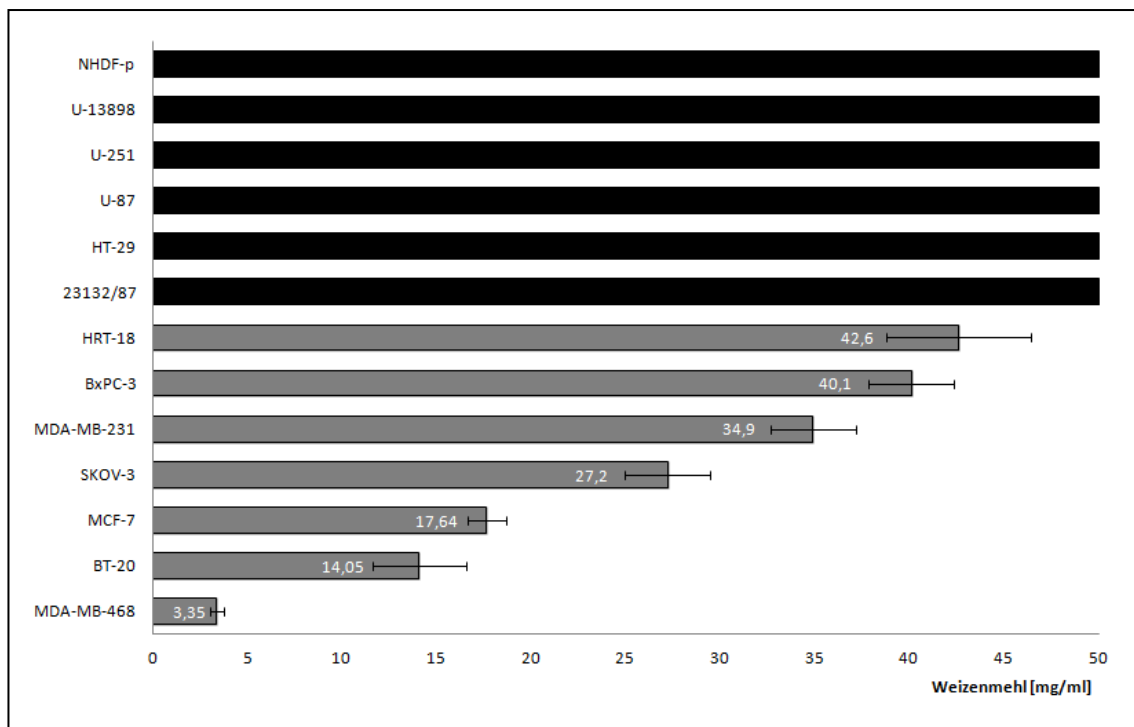


Abb. 11.12: Die EC₅₀-Werte für Weizenmehl der in dieser Arbeit getesteten Zelllinien. Hierzu wurden die Zelllinien für 24 Stunden mit Weizenmehl in Konzentrationen von 0,1 bis 50 mg/ml inkubiert. Fünf maligne Zelllinien und die Fibroblasten (NHDF-p) waren so unempfindlich gegenüber Weizenmehl, dass kein EC₅₀-Wert bestimmt werden konnte. Wider Erwarten hatte handelsübliches Weizenmehl auf einige der Zelllinien eine zelltoxische Wirkung. Besonders empfindlich reagierten gynäkologische Tumoren. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Hierbei handelt es sich um mindestens zwei Wiederholungen mit jeweils 3 Parallelwerten. Die EC₅₀-Werte für die sieben Zelllinien im Einzelnen: MDA-MB-468: $3,35 \pm 0,35$ mg/ml; BT-20: $14,05 \pm 2,47$ mg/ml; MCF-7: $17,64 \pm 1,05$ mg/ml; SKOV-3: $27,2 \pm 2,26$ mg/ml; MDA-MB-231: $34,9 \pm 2,26$ mg/ml; BxPC-3: $40,1 \pm 2,26$ mg/ml; HRT-18: $42,6 \pm 3,82$ mg/ml.

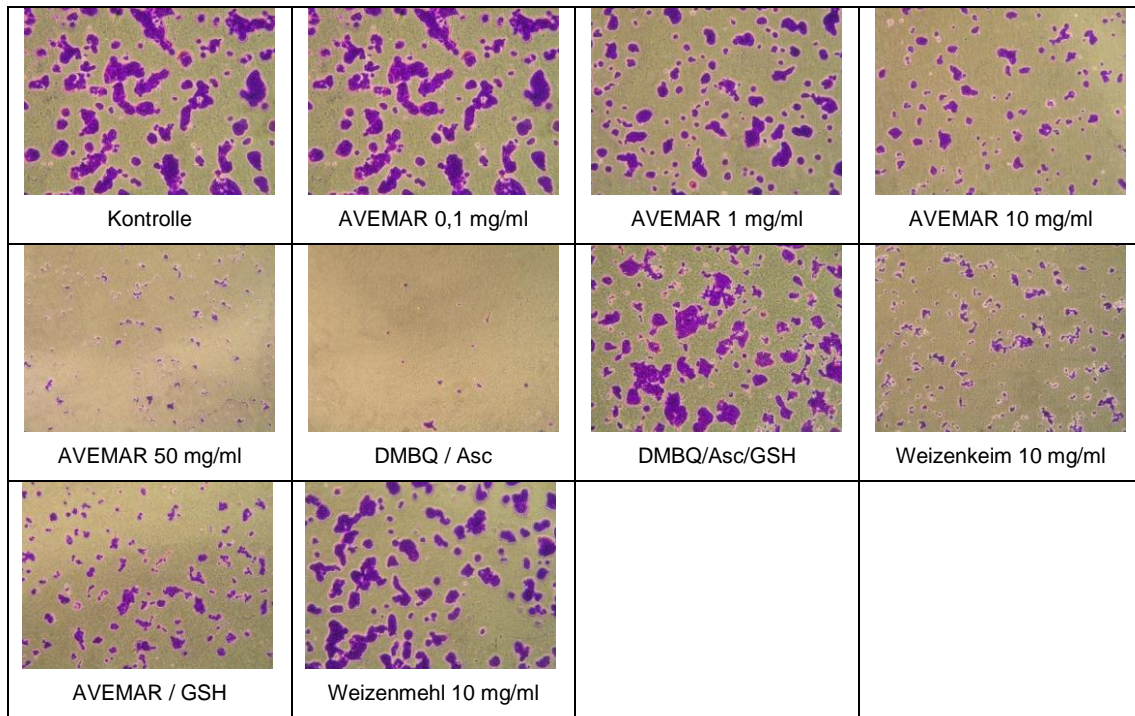


Abb. 11.13: Repräsentative Aufnahmen zum Wachstum von Zellen der Magenkarzinomzelllinie 23132/87 in Gegenwart unterschiedlicher Substanzen. Vergrößerung: 80x.

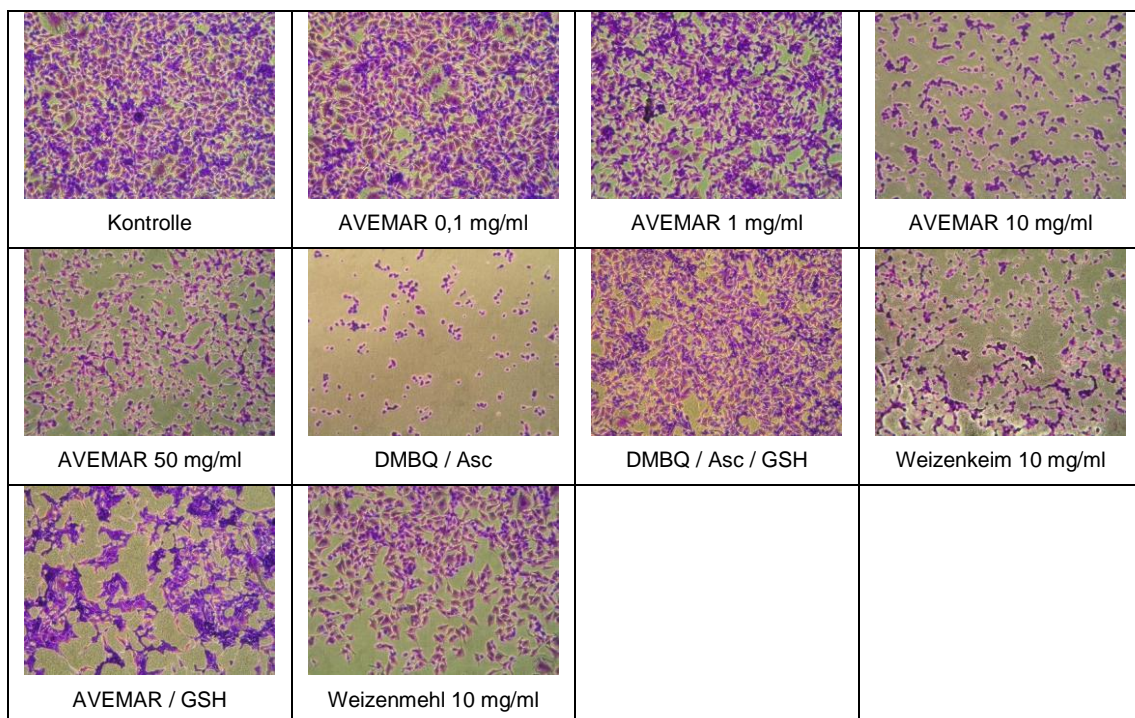


Abb. 11.14: Repräsentative Aufnahmen zum Wachstum von Zellen der Pankreaskarzinomzelllinie BxPC-3 in Gegenwart unterschiedlicher Substanzen. Vergrößerung: 80x.

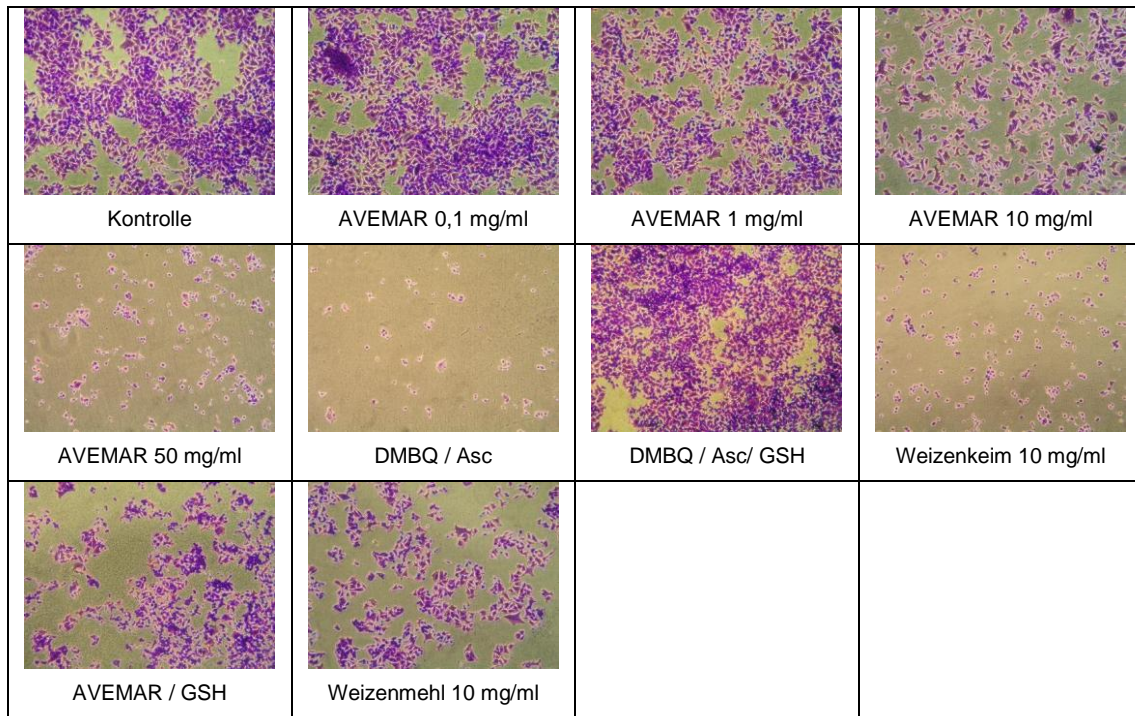


Abb. 11.15: Repräsentative Aufnahmen zum Wachstum von Zellen der Rektumkarzinomzelllinie HRT-18 in Gegenwart unterschiedlicher Substanzen. Vergrößerung: 80x.

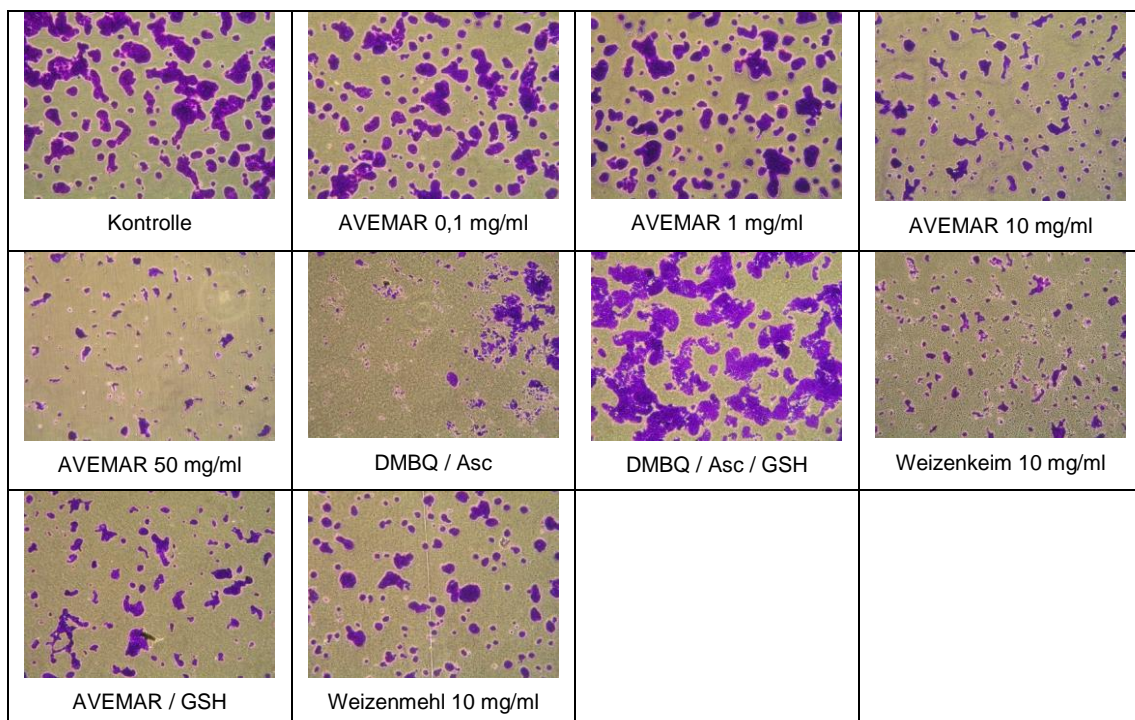


Abb. 11.16: Repräsentative Aufnahmen zum Wachstum von Zellen der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 in Gegenwart unterschiedlicher Substanzen. Vergrößerung: 80x.

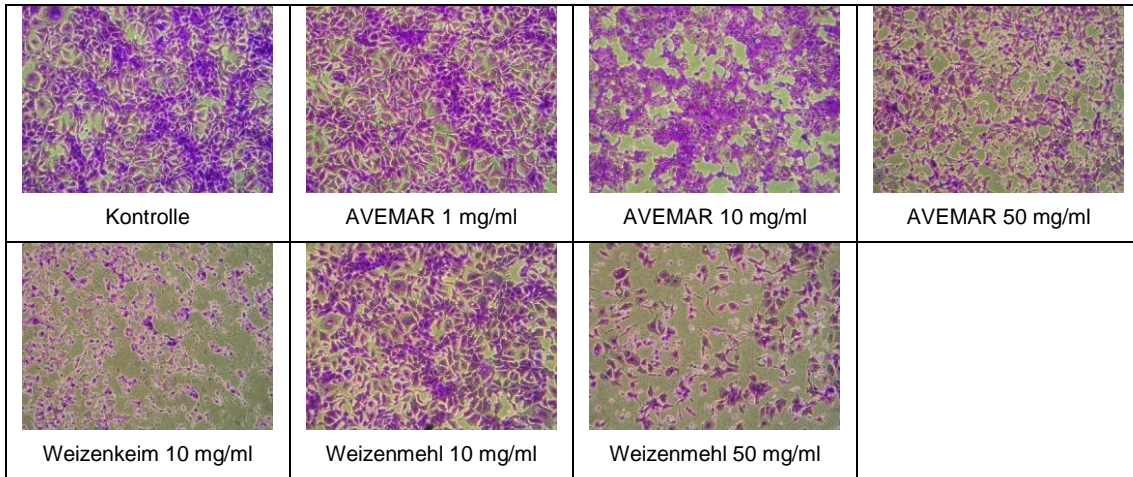


Abb. 11.17: Repräsentative Aufnahmen zum Wachstum von Zellen der Mammakarzinomzelllinie BT-20 in Gegenwart unterschiedlicher Substanzen. Vergrößerung: 80x.

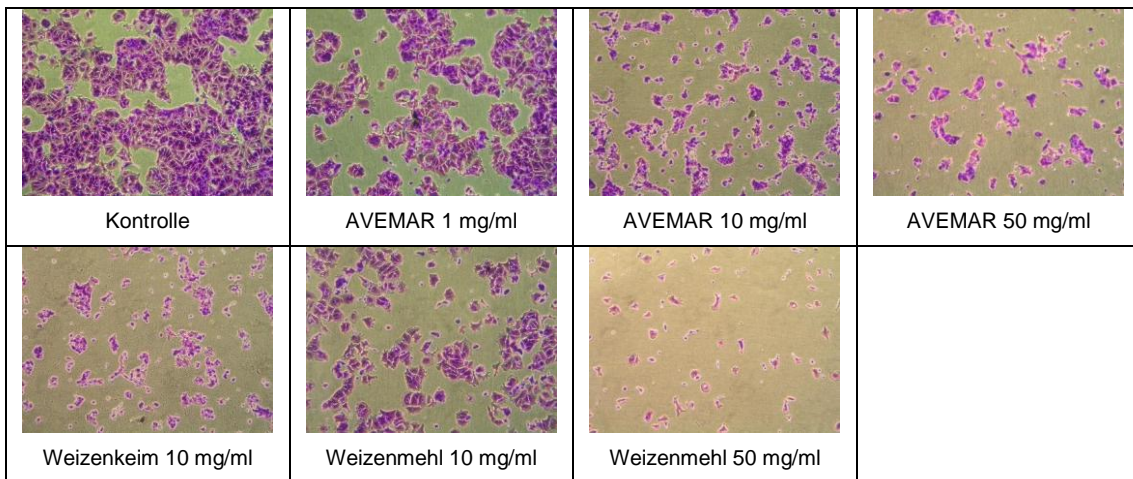


Abb. 11.18: Repräsentative Aufnahmen zum Wachstum von Zellen der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 in Gegenwart unterschiedlicher Substanzen. Vergrößerung: 80x.

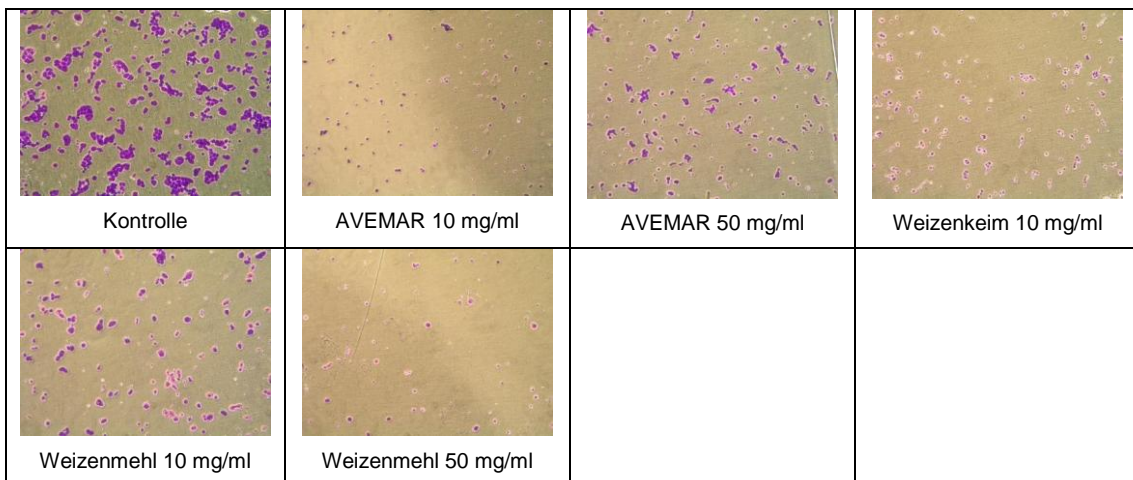


Abb. 11.19: Repräsentative Aufnahmen zum Wachstum von Zellen der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468 in Gegenwart unterschiedlicher Substanzen. Vergrößerung: 80x.

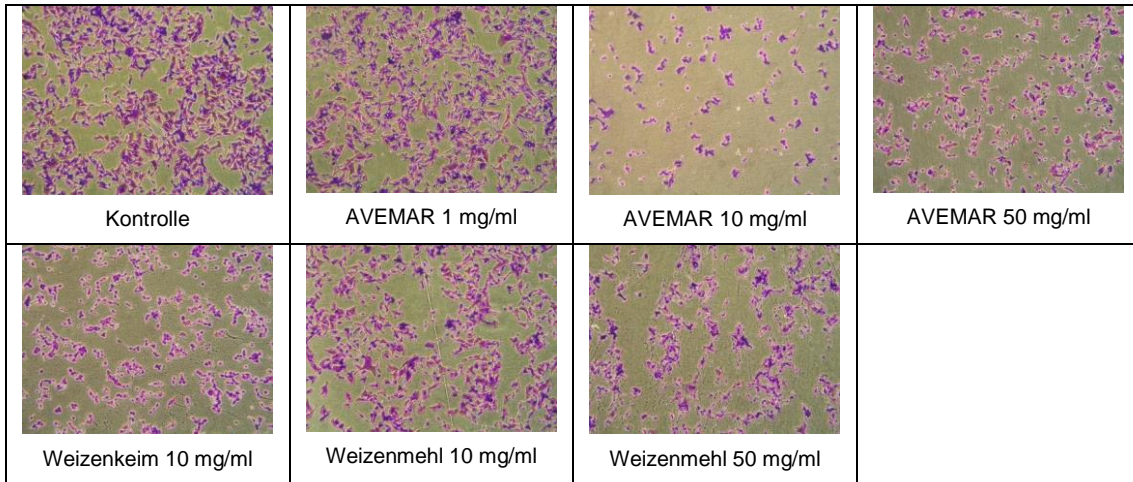


Abb. 11.20: Repräsentative Aufnahmen zum Wachstum von Zellen der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 in Gegenwart unterschiedlicher Substanzen. Vergrößerung: 80x.

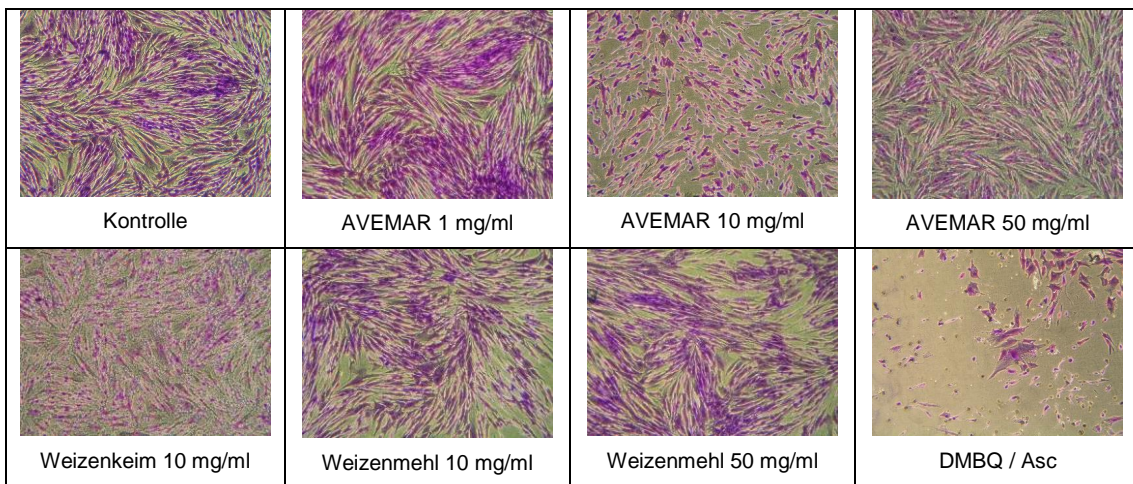


Abb. 11.21: Repräsentative Aufnahmen zum Wachstum von Fibroblastenzellen in Gegenwart unterschiedlicher Substanzen. Vergrößerung: 80x.

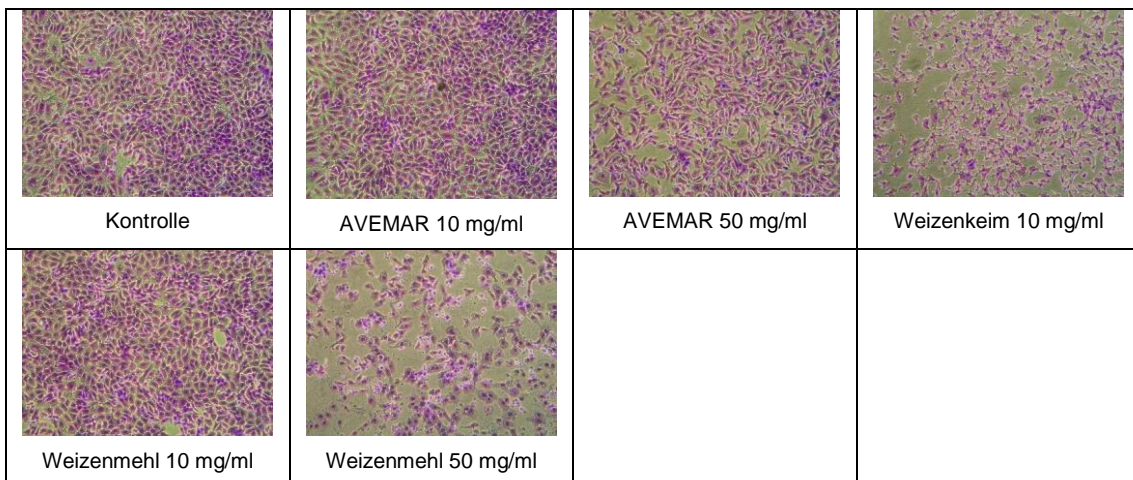


Abb. 11.22: Repräsentative Aufnahmen zum Wachstum von Zellen der Mammakarzinomzelllinie SKOV-3 in Gegenwart unterschiedlicher Substanzen. Vergrößerung: 80x.

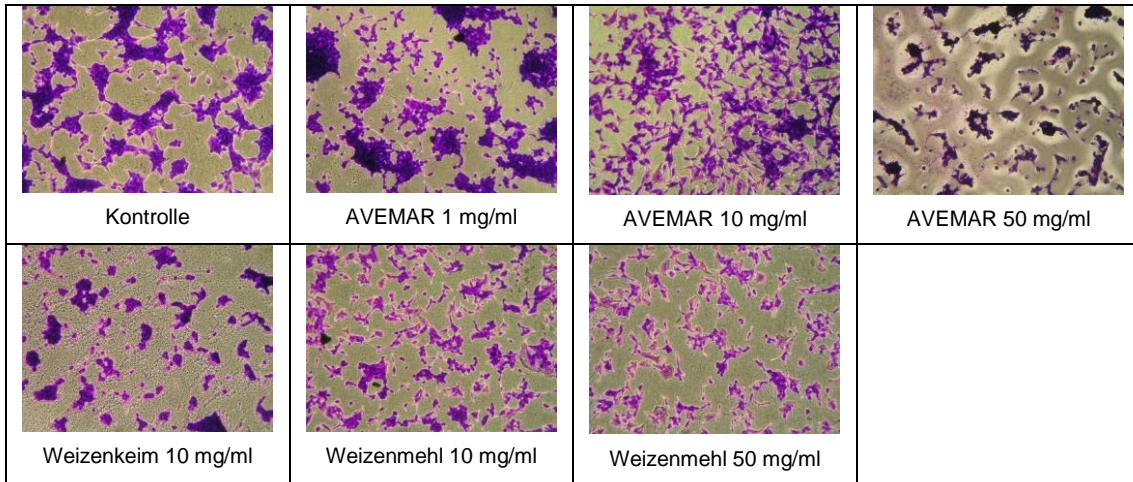


Abb. 11.23: Repräsentative Aufnahmen zum Wachstum von Zellen der Glioblastomzelllinie U-87 in Gegenwart unterschiedlicher Substanzen. Vergrößerung: 80x.

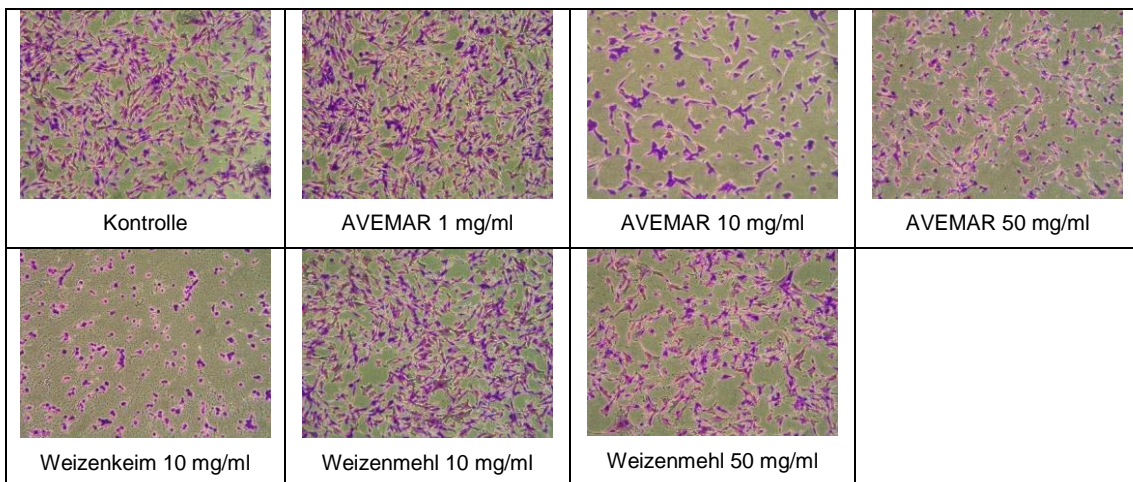


Abb. 11.24: Repräsentative Aufnahmen zum Wachstum von Zellen der Glioblastomzelllinie U-251 in Gegenwart unterschiedlicher Substanzen. Vergrößerung: 80x.

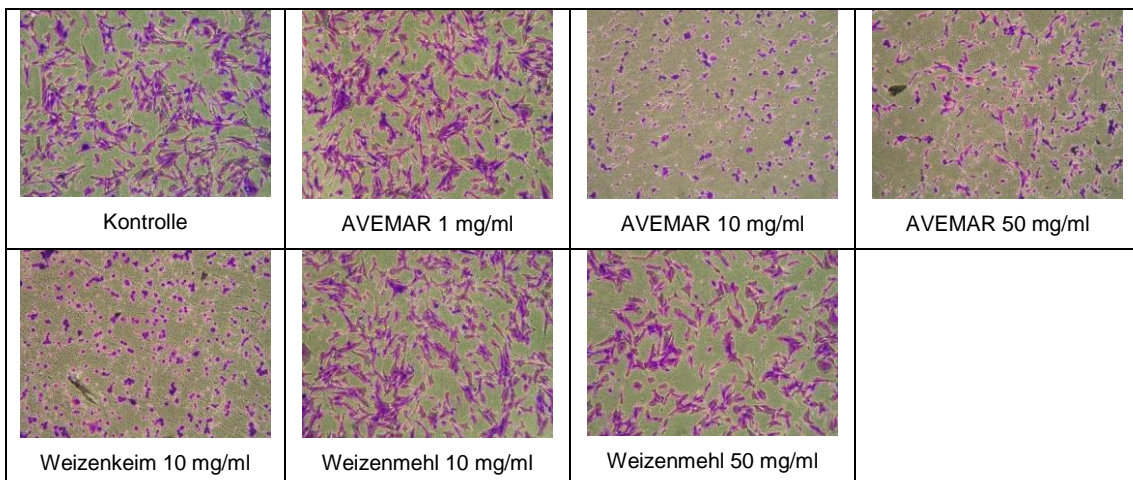


Abb. 11.25: Repräsentative Aufnahmen zum Wachstum von Zellen der Glioblastomzelllinie U-13898 in Gegenwart unterschiedlicher Substanzen. Vergrößerung: 80x.

Danksagung

Als Erstes möchte ich Herrn Professor Dr. med. C.-T. Germer für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes danken.

Einen besonderen Dank möchte ich meinem Betreuer und Doktorvater, Herrn Professor Dr. rer. nat. Christoph Otto für die Bereitstellung des Themas und für die exzellente Betreuung während der gesamten Bearbeitungszeit aussprechen.

Bedanken möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. rer. nat. Ulrike Kämmerer sowie Frau Dr. rer. nat. Dipl. mol. med. Nadja Pfetzer, die einen Teil meiner Experimente betreut haben.

Weiterhin möchte ich Frau Bettina Mühling, Frau Manuela Schneider, Frau Monika Koospal und Frau Sabine Gahn danken, die mich tatkräftig bei der Arbeit im Labor unterstützt haben.