

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

**Untersuchungen *in vitro* zur therapeutischen Wertigkeit  
von 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinonen im  
Supportivprodukt Avemar**

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

vorgelegt von

Kilian Philipp Johannes Eich  
aus Würzburg

Würzburg, August 2013

**Referent:** Professor Dr. rer. nat. C. Otto

**Korreferent:** Professor Dr. med. R. C. Bargou

**Dekan:** Professor Dr. med. M. Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung: 08.07.2014**

Der Promovend ist Arzt.

**Meinen Eltern  
und  
meinem Bruder**

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Das medizinische Supportivprodukt Avemar.....	1
1.2	Die chemischen Eigenschaften von Benzochinonen und ihre Metabolisierung in der Zelle.....	1
1.3	Weizenkeime, eine natürliche Quelle für Benzochinone .....	4
1.4	Die anti-Tumorwirkung von Avemar.....	6
1.5	Ziele der Arbeit.....	8
<b>2</b>	<b>Fragen</b> .....	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>10</b>
3.1	Zelllinien .....	10
3.2	Zellkulturmedien.....	10
3.3	Nachweis der zytotoxischen Wirkung von Avemar.....	11
3.4	Nachweis der zytotoxischen Wirkung von Benzochinonen .....	14
3.5	Nachweis der protektiven Wirkung von Katalase und N-Acetylcystein .....	15
3.6	Photometrische Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen.....	16
3.7	FDA/PI-Färbung zum Nachweis früher zytotoxischer Effekte von Avemar.....	17
3.8	Auswertung und Statistik.....	18
3.8.1	Berechnung der EC <sub>50</sub> -Werte .....	18
3.8.2	Statistische Testverfahren.....	19
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>20</b>
4.1	Wirkmechanismen von Avemar .....	20
4.2	Wachstumsdynamik maligner und benigner Zellen bei Inkubation mit Avemar.....	24
4.3	Nachweis früher zytotoxischer Effekte von Avemar .....	27
4.4	Vergleich der Wirkmechanismen von Avemar und Benzochinonen.....	28
4.5	Der protektive Effekt von Katalase und N-Acetylcystein gegenüber der von Benzochinonen und Avemar vermittelten Zytotoxizität.....	32
4.6	Übersicht: Vergleich der Wirkmechanismen von Avemar und Benzochinonen .....	36
<b>5</b>	<b>Beantwortung der Fragen</b> .....	<b>38</b>
<b>6</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>40</b>
6.1	Die Wirkung von Avemar auf Tumorzelllinien.....	40
6.2	Die Wirkung von Avemar auf benigne Zelllinien.....	42
6.3	Wirkmechanismen von Benzochinonen und Avemar .....	43
6.4	Weitere potentielle Wirkmoleküle in Avemar .....	49
<b>7</b>	<b>Ausblick</b> .....	<b>51</b>
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>52</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>54</b>
<b>10</b>	<b>Appendix</b> .....	<b>58</b>
	<b>Eigene Publikationen</b> .....	<b>73</b>
	<b>Danksagung und Lebenslauf</b>	

## **Abkürzungen**

---

Asc = Ascorbinsäure

AZ = Ausgangszellzahl

DMBQ = 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinon

FCS = fetal calf serum

FDA = Fluoreszeindiacetat

GSH = Glutathion

KAT = Katalase

NAC = N-Acetylcystein

PBS = phosphate buffered saline

PI = Propidiumjodid

# 1 Einleitung

---

## 1.1 Das medizinische Supportivprodukt Avemar

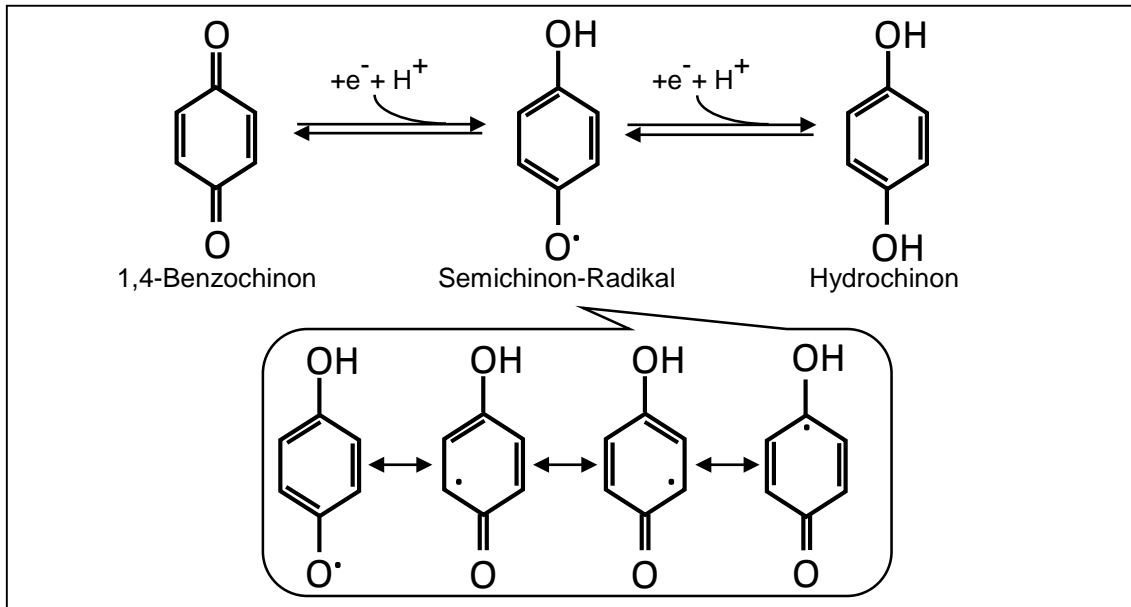
Der fermentierte Weizenkeimextrakt Avemar wird von seinem Hersteller, der ungarischen Biopharma GmbH, als medizinisches Supportivprodukt für onkologische Patienten angeboten ([www.avemar.com](http://www.avemar.com)). Avemar wird in osteuropäischen Ländern, aber auch in den USA und einigen anderen westlichen Ländern vertrieben. Die zahlreichen Eigenschaften von Avemar – sie reichen von entzündungshemmend über antimetastatisch bis zu zytotoxisch – werden in der Literatur vor allem auf den hohen Gehalt an 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinonen zurückgeführt (Boros LG et al., 2005).

## 1.2 Die chemischen Eigenschaften von Benzochinonen und ihre Metabolisierung in der Zelle

Benzochinone gehören zur Gruppe der Chinone und entstehen durch Oxidation von Hydrochinonen, die auch als 1,4-Dihydroxybenzol bezeichnet werden; diese Redoxreaktion ist reversibel (Abb. 1.1). Bei Benzochinonen handelt es sich um cyclische Kohlenstoffverbindungen mit zwei Carbonylgruppen (C=O). Die beiden Doppelbindungen der Carbonylgruppen bilden mit den beiden Doppelbindungen der cyclisch verknüpften Kohlenstoffatome ein konjugiertes System. Durch weitere aromatische Ringe oder Substituenten am Ring entsteht eine Vielzahl an Verbindungen, wie z.B. das 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinon. Die Substituenten am Ringsystem beeinflussen dabei den Chinon-Charakter – d.h. sie beeinflussen die chemischen Reaktionen, die diese Moleküle eingehen (Zeeck A et al., 2005). Die wichtigste biologische Eigenschaft von Benzochinonen ist, dass sie langlebige Semichinonradikale bilden können, die zytotoxisch wirken (Abb. 1.1).

Benzochinone, aber auch Naphto- und Hydrochinone, sind wegen ihrer Redox-Eigenschaften in der Natur weit verbreitet. Sie sind an zahlreichen elementaren Stoffwechselprozessen beteiligt, wie an der oxidativen Phosphorylierung in der

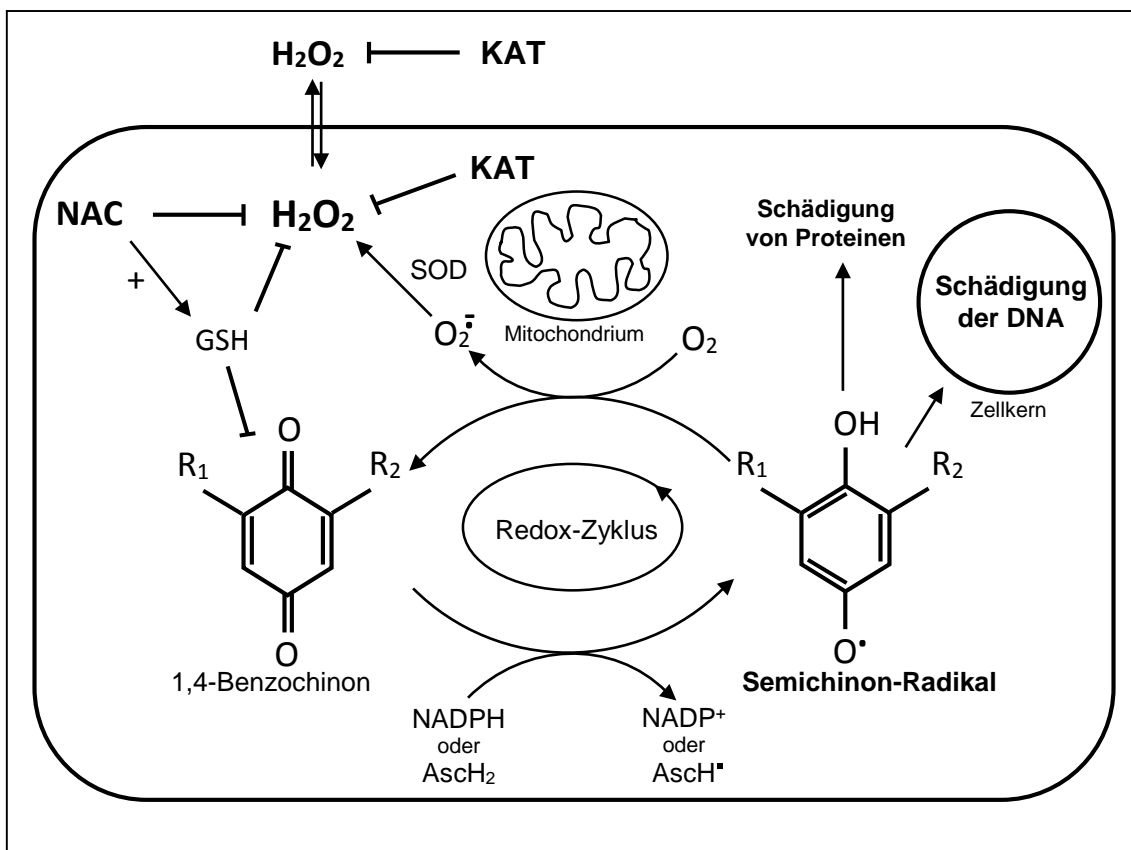
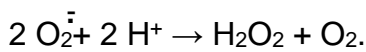
mitochondrialen Atmungskette (Ubichinon oder Coenzym Q), an der Photosynthese (Plastochinon) und als Cofaktor (Phyllochinon oder Vitamin K<sub>1</sub>) an verschiedenen enzymatischen Reaktionen (Thomson RH, 1991).



**Abb. 1.1: Die Redoxreaktion von Benzochinon.** Die Reduktion von Benzochinonen, hier am Beispiel des 1,4-Benzochinons, zum Hydrochinon erfolgt mehrstufig über die Zwischenstufe des Semichinonradikals. Semichinonradikale können dabei überaus langlebig sein – so wurden Halbwertszeiten von bis zu 195 Sekunden (!) gemessen. Der Grund für die Langlebigkeit von Semichinonradikalen ist, dass sie durch Resonanz bzw. Mesomerie stabilisiert werden. Substituenten am Ringsystem beeinflussen die Resonanz und tragen zur Stabilität bei. Unter Mesomerie versteht man in der Chemie das Phänomen, dass durch die Delokalisierung der Elektronen Einfach- und Doppelbindungen nicht mehr existieren und somit die Bindungsverhältnisse im Molekül nicht durch eine einzige Strukturformel darzustellen sind, sondern hierfür mehrere mesomere Grenzformeln notwendig sind. Dies wird durch den Mesomeriepfeil  $\leftrightarrow$  symbolisiert. Die tatsächlichen Bindungsverhältnisse liegen zwischen diesen Grenzformeln. Zur Mesomerie befähigte Moleküle sind energieärmer und damit stabiler als Verbindungen, bei denen keine Mesomerie möglich ist.

Die zytotoxischen Eigenschaften von Benzochinonen wurden intensiv am Menadion (= Vitamin K<sub>3</sub>) untersucht. Von der Zelle aufgenommene Benzochinone werden entweder enzymatisch unter Verbrauch des wasserstoffübertragenden Coenzym NADPH, das an zahlreichen Redoxreaktionen in der Zelle beteiligt ist, oder nicht-enzymatisch, wie z. B. durch Ascorbinsäure, reduziert. So gebildete Semichinonradikale (Abb. 1.1) verursachen einerseits strukturelle und funktionelle Schäden an verschiedensten Makromolekülen in der Zelle, wie Proteinen, Lipiden oder DNA; andererseits lösen sie in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) aus, die

selbst wiederum zytotoxisch wirken (Abb. 1.2). Diese Abfolge von Redoxreaktionen wird auch als Redox-Zyklus bezeichnet. Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wird durch Oxidation der Semichinonradikale zu Benzochinonen ausgelöst, wobei das freie Elektron auf molekularen Sauerstoff übertragen wird (Koster AS, 1991). Dabei entsteht zunächst das Superoxidation, das dann durch die Superoxiddismutase zu Wasserstoffperoxid umgewandelt wird (Abb. 1.2). Hierbei handelt es sich chemisch gesehen um eine Disproportionierungsreaktion, da das Superoxidation ( $O_2^{\cdot-}$ ) sowohl als Oxidations- als auch als Reduktionsmittel in Erscheinung tritt (Abb. 6.1):



**Abb. 1.2: Vereinfachte Darstellung zur Metabolisierung von Benzochinonen in der Zelle.**

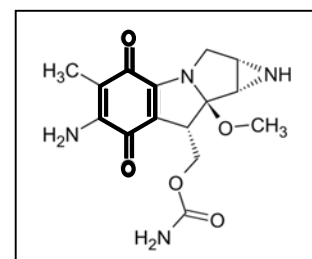
Die zytotoxische Wirkung von Benzochinonen beruht auf der Bildung von langlebigen Semichinonradikalen, die einerseits selbst zellschädigend wirken und andererseits die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies induzieren. Das dabei entstehende Superoxidation ( $O_2^{\cdot-}$ ), dieses Radikal wird auch als Hyperoxidation bezeichnet, wird durch die Superoxiddismutase zu Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) umgewandelt, das ebenfalls die Zelle schädigt. Sowohl das Wasserstoffperoxid-detoxifizierende Enzym Katalase als auch das Glutathion-Vorläufermolekül N-Acetylcystein sind in der Lage, reaktive Sauerstoffspezies unschädlich zu machen, und somit die Zelle vor der toxischen Wirkung von Benzochinonen zu schützen (siehe auch Kapitel 6.3). Die Sulfhydrylgruppe (-SH) des Cystein stellt auch im Glutathion die reaktive Gruppe dar, die



sowohl oxidiert als auch reduziert werden kann. Die Bildung von Semichinonradikalen erfolgt durch den Elektronentransfer von Reduktionsäquivalenten wie NADPH auf Benzochinone. Auch Ascorbinsäure (AsCH<sub>2</sub>) ist in der Lage, als Elektronendonator die Bildung von Semichinonradikalen zu induzieren. AsCH<sup>\*</sup> = Ascorbinsäure-Radikal, GSH = Glutathion, KAT = Katalase, NAC = N-Acetylcystein, SOD = Superoxiddismutase, R<sub>1</sub> = Rest 1, R<sub>2</sub> = Rest 2, „+“ bedeutet „erhöht GSH-Spiegel“, „-“ bedeutet „baut ab“.

Nicht nur die Enzyme Superoxiddismutase und Katalase schützen die Zelle vor der zytotoxischen Wirkung der Semichinonradikale, sondern auch das schwefelhaltige Tripeptid Glutathion, das wichtigste Antioxidans der Zelle (Lushchak VI, 2012). Reduziertes Glutathion (G-SH) und oxidiertes und damit dimerisiertes Glutathion (G-S-S-G) bilden zusammen ein biologisches Redoxsystem, das vor oxidativem Stress schützt. Als Reduktionsmittel gibt Glutathion als Cosubstrat der Glutathion-Peroxidase Elektronen ab und dimerisiert dabei zu Disulfiden (G-S-S-G). Durch diese Reaktion werden auch reaktive Sauerstoffspezies zerstört. Außerdem geht Glutathion mit Chinonen Konjugate ein, was der Bildung von Semichinonradikalen vorbeugt (O'Brien PJ, 1991). Ist der Glutathionspiegel der Zelle jedoch erschöpft, kann die Zelle die Bildung von Semichinonradikalen und reaktiven Sauerstoffspezies nicht mehr verhindern und wird durch sie dauerhaft geschädigt (Koster AS, 1991). Regeneriert wird Glutathion durch das Enzym Glutathion-Reduktase; sie reduziert Glutathion-Disulfid (G-S-S-G) zu Glutathion (2 G-SH) und benötigt hierzu das Coenzym NADPH+H<sup>+</sup> als Elektronendonator.

Die zytotoxischen Eigenschaften von Chinonen werden auch in der medikamentösen Tumorthherapie genutzt. Beispiele sind Daunorubicin, Doxorubicin, Mitomycin C (Abb. 1.3) und Mitoxantron (Powis G, 1989).



**Abb. 1.3: Mitomycin C**

### 1.3 Weizenkeime, eine natürliche Quelle für Benzochinone

In den 1970er Jahren beschäftigte sich Bachur eingehend mit dem Wirkmechanismus von Chinonen. Gelangen freie Semichinonradikale in den Zellkern, so interkalieren sie in die DNA und lösen entweder lokal die Bildung reaktiver

Sauerstoffspezies (ROS) aus oder schädigen selbst, z.B. durch Strangbrüche, die DNA und führen zum Zelltod (Bachur NR et al., 1978). Die Erkenntnisse von Bachur weckten das Interesse des ungarischen Chemikers und Nobelpreisträgers Albert Szent-Györgyi an Benzochinonen. Mitte der 1980er Jahre untersuchte dieser die elektrochemischen und zytotoxischen Eigenschaften von Methoxy-substituierten 1,4-Benzochinonen. Hierzu bestimmte er u.a. ihr Potential zur Bildung freier Radikale mit der Elektronenspinresonanz-Methode; die Radikalbildung wurde dabei mit Ascorbinsäure als Elektronendonator ausgelöst. Die Messungen ergaben, dass von den untersuchten Methoxy-substituierten 1,4-Benzochinonen die 2,5- und 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinone langlebige freie Radikale mit einer Halbwertszeit von 140 bzw. 195 Sekunden bilden. Zusätzlich untersuchte Szent-Györgyi die zytotoxischen Eigenschaften Methoxy-substituierter 1,4-Benzochinone im Tierexperiment. Er injizierte u.a. 2,5- und 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinone zu Ehrlich-Ascites-Tumorzellen in die Bauchhöhle von Mäusen. Ausschließlich für die besonders langlebigen Semichinonradikale der 2,5- und 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinone beobachtete er eine vollständige Eliminierung der Tumorzellen. Aufgrund seiner Beobachtung schlussfolgerte Szent-Györgyi, dass eine positive Korrelation zwischen der Langlebigkeit von Semichinonradikalen und ihrer Zelltoxizität besteht (Pethig R et al., 1983).

Inspiziert von diesen Erkenntnissen suchte der ungarische Chemiker Máté Hidvégi nach einer Möglichkeit, das Potential von 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinonen gezielt für die Tumorthherapie zu nutzen. Hidvégi war bekannt, dass Weizenkeime eine ergiebige Quelle für 2-Methoxy- und 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinone darstellen. Weizenkeime speichern beide Moleküle in Form von Glucosiden, die durch Fermentierung mit Hilfe von Glucosidasen aus ihrer Bindung freigesetzt werden. Der Nachweis freier 2-Methoxy- und 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinone in fermentierten Weizenkeimen gelang Cosgrove bereits in den 1950er Jahren (Cosgrove DJ et al., 1952); ihr Anteil betrug 0,4 mg pro Gramm Trockensubstanz. In den 1990er Jahren optimierte Hidvégi das Verfahren zur Herstellung eines standardisierten Weizenkeimextraktes mit der Bezeichnung Avemar (Hidvégi M et al., 1999).

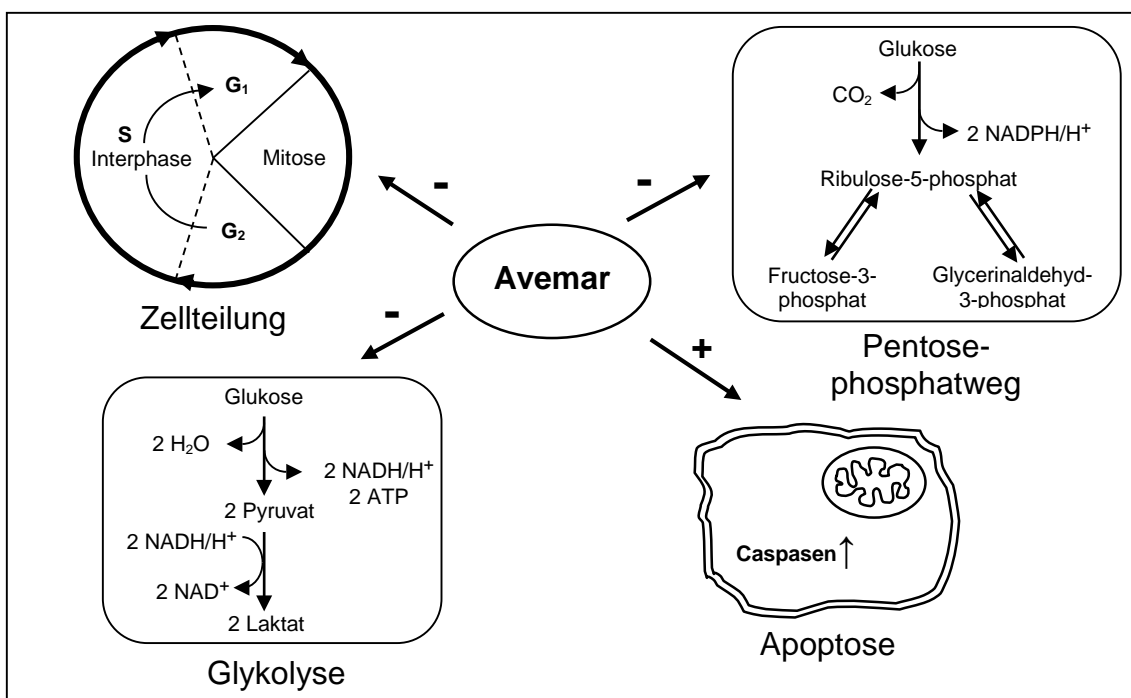
#### 1.4 Die anti-Tumorwirkung von Avemar

Hidvégi's eigene Untersuchungen bestätigten das antikanzerogene Potential von Avemar. So beeinträchtigt Avemar die Vitalität von Tumorzellen *in vitro* (Hidvégi M et al., 1999), aber auch *in vivo* (Hidvégi M et al., 1998; Hidvégi M et al., 1999; Zalatnai A et al., 2001). Auch stellte Hidvégi fest, dass Avemar in Kombination mit gängigen Zytostatika wie 5-Fluorouracil und Dacarbacin synergistisch wirkt (Hidvégi M et al., 1999).

Bereits wenige Jahre nach Hidvégi's optimiertem Herstellungsverfahren von Avemar wurde sein Potential als medizinisches Supportivprodukt auch in klinischen Studien bestätigt. Bei Patienten mit kolorektalem Karzinom, die zusätzlich zu ihrer Therapie einmal täglich 9 g Avemar einnahmen, wurden signifikant weniger Lokalrezidive, Metastasen oder Todesfälle beobachtet als in der Kontrollgruppe. Die Studie war zwar nicht randomisiert, aber die Patienten, die zusätzlich Avemar erhielten, waren im Durchschnitt in einem weiter fortgeschrittenem Tumorstadium (Jakab F et al., 2003). Eindrucksvolle Daten lieferte auch eine randomisierte Phase-II-Studie mit 58 Melanom-Patienten. Alle Patienten befanden sich im UICC-Stadium III mit histologisch gesicherten Lymphknotenmetastasen. Nach der Operation erhielt die Interventionsgruppe neben der Dacarbacin-Monotherapie einmal täglich 8,5 g Avemar über 12 Monate. Interventions- und Kontrollgruppe wurden über einen Zeitraum von 7 Jahren nachbeobachtet. Die Interventionsgruppe schnitt sowohl beim progressionsfreien Überleben als auch beim Gesamtüberleben deutlich besser ab als die Kontrollgruppe (Demidov LV et al., 2008). Auch verbessert Avemar eindeutig die Lebensqualität onkologischer Patienten (Sukkar SG et al., 2008).

Trotz dieser Erfolge sind die Mechanismen der von Avemar ausgelösten Effekte nicht vollständig geklärt. In der Literatur werden dabei verschiedene Möglichkeiten diskutiert. So hemmt Avemar das Enzym Ribonukleotidreduktase, ein Schlüsselenzym bei der *de novo* DNA-Synthese, das für die Umwandlung von Ribonukleotiden zu Desoxyribonukleotiden verantwortlich ist (Illmer C et al.,

2005). Es ist in Tumorzellen hochreguliert, um ihren Bedarf an Desoxyribonucleotiden für die Zellteilung zu decken (Takeda E, Weber G, 1981). Auch die gezielte Hemmung von Enzymreaktionen im oxidativen Teil des Pentosephosphatwegs durch Avemar wird beschrieben. Hierdurch verringert sich der Anteil an den Reduktionsäquivalenten NADPH und an Ribosen; beide sind für die Nukleotid-Biosynthese von elementarer Bedeutung (Comin-Anduix B et al., 2002). Avemar verhindert außerdem die Aufnahme von Glukose durch die Zelle und hemmt Schlüsselenzyme der Glykolyse wie die Hexokinase, aber auch die Laktatdehydrogenase, die die Reduktion von Pyruvat zu Laktat katalysiert (Boros LG et al., 2001; Comin-Anduix B et al., 2002). Zudem induziert Avemar gezielt den Zelltod durch Induktion von Apoptose (Comin-Anduix B et al., 2002; Fajka-Boja R et al., 2002) (Abb. 1.4).



**Abb. 1.4: Avemar im Stoffwechsel der Zelle.** Avemar beeinflusst in vielfältiger Weise den Energie- und Substratstoffwechsel der Zelle mit dem Ergebnis, dass die Zellen in Apoptose übergehen. So wird die Ribonukleotidreduktase gehemmt, ein wichtiges Enzym für die Ribonukleotid-Biosynthese. Die Bildung von Pentosen und NADPH durch den Pentosephosphatweg wird ebenfalls gehemmt, was dazu führt, dass während der S-Phase der Zellteilung nicht genügend Substrate für die DNA-Synthese zur Verfügung stehen. Auch die Glykolyse, ein elementarer Stoffwechselweg zum Abbau von Glukose und zur Energiegewinnung (Stichwort: „anaerobe Glykolyse“ oder „Warburg-Effekt“), wird durch Avemar gehemmt.

Avemar ist zwar reich an 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinonen, doch ist bisher experimentell nicht gesichert, dass diese Benzochinone auch tatsächlich das für Avemar relevante Wirkmolekül repräsentieren. Zudem ist nicht gesichert, dass die in Kapitel 1.4 beschriebenen Effekte von Avemar auch tatsächlich mit einer Benzochinon-vermittelten Induktion von oxidativem Stress zu erklären sind.

### **1.5 Ziele der Arbeit**

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist, den Effekt von Avemar auf Zellwachstum und Zellvitalität an einer Vielzahl humaner maligner Zelllinien zu untersuchen. Dabei ist von besonderem Interesse, ob Avemar die Zellvitalität zeitweilig oder langfristig beeinflusst.

Ein weiteres Ziel ist, den Wirkmechanismus von Avemar aufzuklären. Die Hypothese, dass 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinone wesentlich an der Wirkung von Avemar beteiligt sind, basiert auf der Tatsache, dass Avemar einen hohen Anteil an diesen zytotoxischen Benzochinonen aufweist: nämlich 0,4 mg pro Gramm Trockensubstanz. Die Arbeitshypothese der vorliegenden Arbeit war deshalb, dass Avemar und 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinone vergleichbare zytotoxische Eigenschaften aufweisen. Hierzu gehört die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, aber auch die Möglichkeit, durch Zugabe von Katalase, dieses Enzym zerstört Wasserstoffperoxid, und N-Acetylcystein, einem sogenannten Radikalfänger, die Zellen vor der Benzochinon-vermittelten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zu schützen.

Der Nobelpreisträger Szent-Györgyi fand heraus, dass das Oxidationspotential von Ascorbinsäure ausreicht, Elektronen auf Benzochinone zu übertragen und so die Bildung von Semichinonradikalen auszulösen (Pethig R et al., 1983). Aus diesem Grund ist ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit, die Wirkung von Ascorbinsäure auf Avemar und 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinone hinsichtlich der Bildung von Semichinonradikalen zu untersuchen.

## 2 Fragen

---

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Avemar, einem fermentierten Weizenkeimextrakt, auf maligne und benigne Zelllinien *in vitro* untersucht. Dabei sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Wie beeinflussen unterschiedliche Konzentrationen von Avemar die Vitalität der in dieser Arbeit getesteten malignen und benignen Zelllinien? Werden durch Avemar langfristige Zellschäden induziert und wirkt Avemar selektiv auf Tumorzellen?
2. Der von Benzochinonen induzierte zytotoxische Effekt wird durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) vermittelt. Ist diese Eigenschaft auch für 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinone nachweisbar, die in Avemar mit 0,4 mg pro Gramm Trockensubstanz vorkommen?
3. Sollten die von Avemar induzierten Effekte auf die Zellvitalität tatsächlich durch Benzochinone ausgelöst werden, dann sollten die in Avemar befindlichen 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinone und die chemisch reine Referenzsubstanz 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinon vergleichbare Effekte auf die Zellvitalität aufweisen. Wird diese Annahme durch Daten der Arbeit bestätigt?

### 3 Material und Methoden

---

#### 3.1 Zelllinien

Zwölf humane Tumorzelllinien und drei benigne Zelllinien (zwei humane und eine murine) aus dem Bestand der Arbeitsgruppe für Experimentelle Transplantationsimmunologie der Chirurgischen Klinik I des Universitätsklinikums Würzburg und eine humane Tumorzelllinie (ASPC-1) aus dem Bestand der Pathologie des Universitätsklinikums Würzburg wurden getestet (Tab. 3.1).

Tabelle 3.1: Liste der in dieser Arbeit getesteten Zelllinien.

Zelllinie	Zelllinie
23132/87 (Magenkarzinom)	MDA-MB-468 (Mammakarzinom)
ASPC-1 (Pankreaskarzinom)	SKOV-3 (Ovarialkarzinom)
BT-20 (Mammakarzinom)	U-13898 (Glioblastom)
BxPC-3 (Pankreaskarzinom)	U-251 (Glioblastom)
HRT-18 (Rektumkarzinom)	
HT-29 (Kolonkarzinom)	J 774.2 (Makrophagen, murin)
MCF-7 (Mammakarzinom)	HUVEC (Endothelzellen)
MDA-MB-231 (Mammakarzinom)	NHDF-p (Fibroblasten)

#### 3.2 Zellkulturmedien

Die Zellen wurden mit RPMI 1640 Medium in Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75 cm<sup>2</sup> bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Hierzu wurde das Medium mit folgenden Zusätzen ergänzt (Angaben als Endkonzentration): 10 % fetales Kälberserum (FCS), 100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin, 2 mmol/L L-Glutamin, 50 mmol/L Mercaptoethanol, 1 % nicht-essentielle Aminosäuren (Invitrogen Life Technologies GmbH, Karlsruhe). Zur Kultivierung einiger Zelllinien wurden folgende Spezialmedien verwendet: für Fibroblasten das Fibroblast Growth Medium 2 von PromoCell GmbH, Heidelberg; für Makrophagen das DMEM *low glucose* Medium von Cell Concepts, Freiburg; für Endothelzellen das Endothelial Growth Medium von PromoCell GmbH, Heidelberg;

und für Glioblastomzelllinien das DMEM *high glucose* Medium von Cell Concepts, Freiburg.

### **3.3 Nachweis der zytotoxischen Wirkung von Avemar**

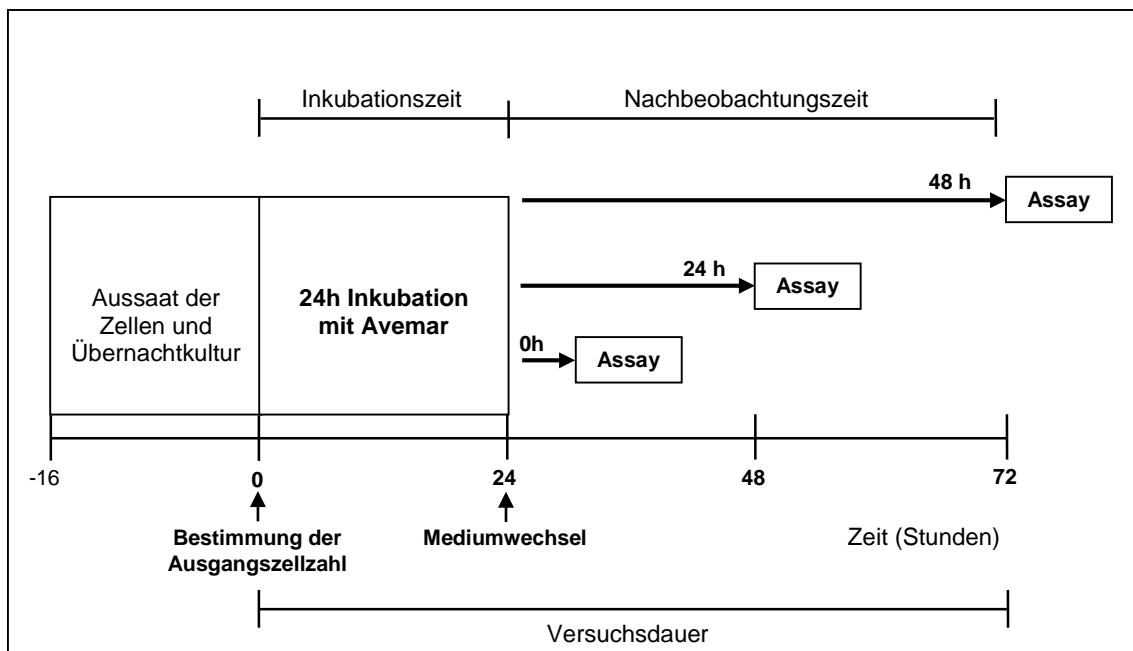
Für die Versuche wurden Zellen verwendet, die in Zellkulturflaschen eine Konfluenz von bis zu 80 % aufwiesen. Nach Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflaschen mit 0,5 % Trypsin-EDTA (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) und Bestimmung der Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer wurden jeweils fünfzehntausend ( $1,5 \times 10^4$ ) Zellen in 200  $\mu$ L Medium pro Vertiefung einer Zellkulturschale mit 96 Vertiefungen ausgesät. Am nächsten Tag wurde der Überstand gegen 200  $\mu$ L frisches Kulturmedium ausgetauscht, in dem Avemar in folgenden Endkonzentrationen vorlag: 0,1; 1; 10 und 50 mg/mL. Die Zellen wurden für 24 Stunden in diesem Medium inkubiert und anschließend das Avemar-haltige Medium gegen Avemar-freies Medium ersetzt. Fibroblasten, Makrophagen, Glioblastom- und Endothelzellen erhielten ihr jeweiliges Spezialmedium; alle anderen Zelllinien wurden in RPMI 1640 Medium kultiviert (Kapitel 3.2). Unmittelbar nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden mit Avemar und nach einer zusätzlichen Kultivierung der Zellen für 24 Stunden (Gesamtkulturdauer von 48 Stunden) bzw. für 48 Stunden (Gesamtkulturdauer von 72 Stunden) ohne Avemar wurde die Anzahl vitaler Zellen mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt (Abb. 3.1). Jede Verdünnungsstufe von Avemar wurde sechsfach angesetzt; d.h. in jeweils sechs Vertiefungen einer Zellkulturschale mit 96 Vertiefungen. Kontrollen waren unbehandelte Zellen und Medium ohne Zellen (Mediumkontrolle zum Nachweis unspezifischer Signale).

Um die drei Wirkqualitäten von Avemar voneinander zu unterscheiden (siehe auch Kapitel 4.1 und Abb. 4.2), wurde in einem eigenen Versuch zusätzlich zum Zeitpunkt des Inkubationsbeginns die Ausgangszellzahl mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt. Anschließend erfolgte die 24-stündige Inkubation mit 10 mg/mL Avemar – erst bei dieser Konzentration waren deutliche Effekte zu sehen – und dann die erneute Bestimmung der Zellzahl mit dem Kristallviolett-Assay (Abb. 3.1). Durch den Vergleich der Zellzahl der behandelten Zellen mit der



Ausgangszellzahl war es möglich eine zytotoxische Wirkung (d.h. die Anzahl vitaler Zellen lag deutlich unter der Ausgangszellzahl), eine zytostatische Wirkung (die Zellzahl blieb auf dem Niveau der Ausgangszellzahl) und eine Wachstumsverzögerung (die Zellzahl war nach Inkubation größer als die Ausgangszellzahl) bei 10 mg/mL Avemar zu unterscheiden. Das Wachstumsverhalten der Zellen in der Nachbeobachtungsphase wurde für die Bestimmung der Wirkqualitäten nicht weiter berücksichtigt.

Das für die vorliegende Arbeit verwendete Avemar wurde freundlicherweise von der Fresenius Kabi Austria GmbH ohne Anspruch auf Gegenleistung zur Verfügung gestellt. Für jeden Versuch wurde eine frische Stammlösung mit einer Konzentration von 100 mg/mL Avemar angesetzt. Avemar löste sich dabei vollständig im Medium; die Lösung wurde über einen 0,2 µm Filter steril filtriert und anschließend entsprechend verdünnt.



**Abb. 3.1: Versuchsaufbau zur Untersuchung zytotoxischer Effekte von Avemar.** Die Anzahl vitaler Zellen wurde direkt nach der Inkubation mit Avemar für 24 Stunden und nach weiteren 24- bzw. 48-Stunden in Kultur ohne Avemar mit dem Kristallviolett-Assay (= Assay; s. hierzu auch Kapitel 3.6) bestimmt. Um zu beurteilen, wie sich die Inkubation mit Avemar auf die Zellzahl auswirkt, wurde ebenfalls der Anteil der Zellen zu Beginn der Inkubation mit Avemar mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt (= Ausgangszellzahl).

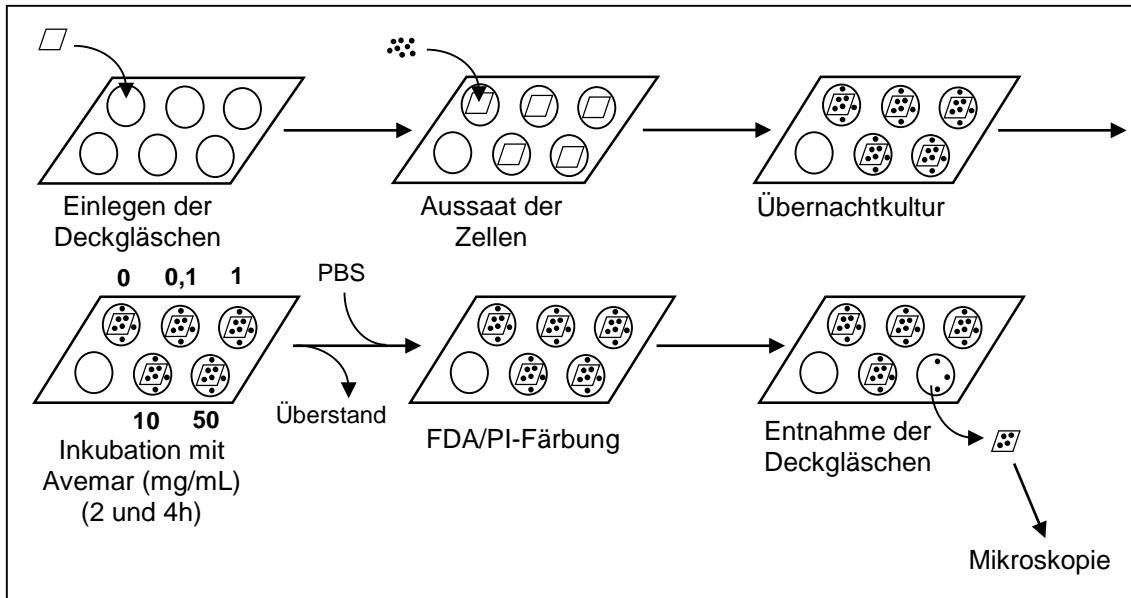
Der in Abb. 3.1 dargestellte Versuchsaufbau ist geeignet, um zytotoxische Effekte von Avemar und 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinonen nachzuweisen. Die Frage aber, wie rasch die Wirkung von Avemar einsetzt, ist mit diesem Versuchsansatz nicht zu klären. Hierzu sind kürzere Inkubationszeiten und andere Nachweismethoden notwendig.

Die Induktion früher zytotoxischer Effekte durch Avemar wurde am Beispiel der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 untersucht. Hierzu wurden  $0,5 \times 10^6$  HT-29-Zellen in 4 mL Medium in einer Zellkulturschale mit 6 Vertiefungen auf jeweils einem Deckgläschen pro Vertiefung ausgesät. Die Zellen wurden am nächsten Tag mit 0,1; 1; 10 und 50 mg/mL Avemar für 2 und 4 Stunden inkubiert; Kontrollen waren unbehandelte Zellen. Nach der Inkubation wurde der Überstand entfernt, jede Vertiefung mit 2 mL PBS einmal gewaschen und mit 2 mL PBS wieder aufgefüllt.

Zur Bestimmung der Vitalität wurden die Zellen mit FDA/PI gefärbt (Kapitel 3.7). Zum Mikroskopieren wurden die Deckgläschen mit den gefärbten Zellen aus den Vertiefungen mit einer Pinzette entnommen und mit der bewachsenen Seite nach unten auf einen Objektträger gelegt (Abb. 3.2). Von jeder Konzentrationsstufe und der Kontrolle wurden zehn zufällig ausgewählte Gesichtsfelder photographiert. Diese Bilder wurden mit dem von Wayne Rasband vom National Institutes of Health entwickelten Open Source Bildverarbeitungsprogramm ImageJ ausgewertet (siehe hierzu Kapitel 3.7).

---

**Abb. 3.2 (S. 14): Nachweis der Induktion früher zytotoxischer Effekte durch Avemar.** Hierzu wurden Zellen der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 (Tab. 3.1) mit Avemar für 2 und 4 Stunden inkubiert und anschließend die Vitalität der Zellen bestimmt. Die Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, die sich in den Vertiefungen einer Zellkulturschale mit 6 Vertiefungen befanden. Am Ende der Inkubation mit Avemar wurden die Zellen mit FDA/PI gefärbt, die Deckgläschen auf einen Objektträger gelegt und mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht (Kap. 3.7). Zehn zufällig ausgewählte Gesichtsfelder wurden photographiert und mit dem Programm ImageJ ausgewertet.



### 3.4 Nachweis der zytotoxischen Wirkung von Benzochinonen

Für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuche wurde eine Konzentration an 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinonen eingesetzt, die der von Avemar entspricht – diese beträgt 0,4 mg/g (Hidvégi M et al., 1999). Bei einer Konzentration von 10 mg/mL Avemar beträgt die Konzentration an 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinonen somit 0,004 mg/mL bzw. 24  $\mu\text{mol/L}$  (bei einem Molekulargewicht von 168,15 g/mol für 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinon). Die Konzentration der Stammlösung an 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinonen (Sigma-Aldrich, 428566-5G) betrug 595  $\mu\text{mol/L}$ . Hierzu wurden 0,1 mg/mL 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinone in Medium gelöst, und anschließend die Lösung mit einem 0,2  $\mu\text{m}$  Filter steril filtriert. Die Stammlösung wurde für jeden Versuchsansatz frisch angesetzt.

Um die Bildung von Semichinonradikalen auszulösen, wurde das Reduktionsmittel Ascorbinsäure eingesetzt. Die molare Konzentration von Ascorbinsäure betrug 2,4 mmol/L und war damit 100-fach höher als die Konzentration an 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinonen. Bei einem Molekulargewicht von 176,12 g/mol für Ascorbinsäure entspricht dies einer Konzentration von 0,42 mg/mL; diese Konzentration an Ascorbinsäure wird von Beck et al. empfohlen (Beck R et al., 2009). Die Stammlösung für Ascorbinsäure wies eine Konzentration von

568 mmol/L (= 100 mg/mL) auf; sie wurde ebenfalls steril filtriert. Nach Aussaat der Zellen in Zellkulturschalen mit 96 Vertiefungen wurde am nächsten Tag der Zellkulturüberstand gegen frisches Medium mit folgenden Zusätzen ausgetauscht (Angaben als Endkonzentration): Avemar (10 mg/mL); Avemar (10 mg/mL) plus Ascorbinsäure (2,4 mmol/L); 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinone (24 µmol/L) und 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinone (24 µmol/L) plus Ascorbinsäure (2,4 mmol/L). Die Zellen wurden für 24 Stunden inkubiert, um anschließend die Anzahl vitaler Zellen mit dem Kristallviolett-Assay zu bestimmen.

### **3.5 Nachweis der protektiven Wirkung von Katalase und N-Acetylcystein**

Um den Mechanismus der Benzochinon-induzierten Zelltoxizität nachzuweisen, nämlich die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, wurden die Zellen zusätzlich mit dem Enzym Katalase bzw. N-Acetylcystein inkubiert (Abb. 1.2). Zu jeweils 24 µmol/L 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinonen – dies entspricht der äquimolaren Konzentration an Benzochinonen von 10 mg/mL Avemar – wurden zwischen 125 und 500 Einheiten Katalase (Sigma-Aldrich, C30-100MG) bzw. 3,6 mmol/L N-Acetylcystein (Sigma-Aldrich, A7250-5G) hinzugegeben. Um die Bildung von Semichinonradikalen auszulösen, enthielt der experimentelle Ansatz zusätzlich 2,4 mmol/L Ascorbinsäure. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurde die Anzahl vitaler Zellen mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt. Die in dieser Arbeit eingesetzten Einheiten an Katalase und die verwendete Konzentration an N-Acetylcystein basieren auf publizierten Daten (Klingelhöffer et al., 2012; Beck R et al., 2009). Die Stammlösung von N-Acetylcystein betrug 613 mmol/L; hierzu wurden 100 mg/mL N-Acetylcystein in Kulturmedium gelöst und steril filtriert. Katalase wurde direkt zu den Zellkulturen gegeben bzw. mit PBS vorverdünnt. Um einen möglichen Einfluss von Katalase und N-Acetylcystein auf die Vitalität der Zellen sämtlicher Zelllinien auszuschließen, wurden diese mit 500 Einheiten Katalase bzw. 3,6 mmol/L N-Acetylcystein inkubiert.

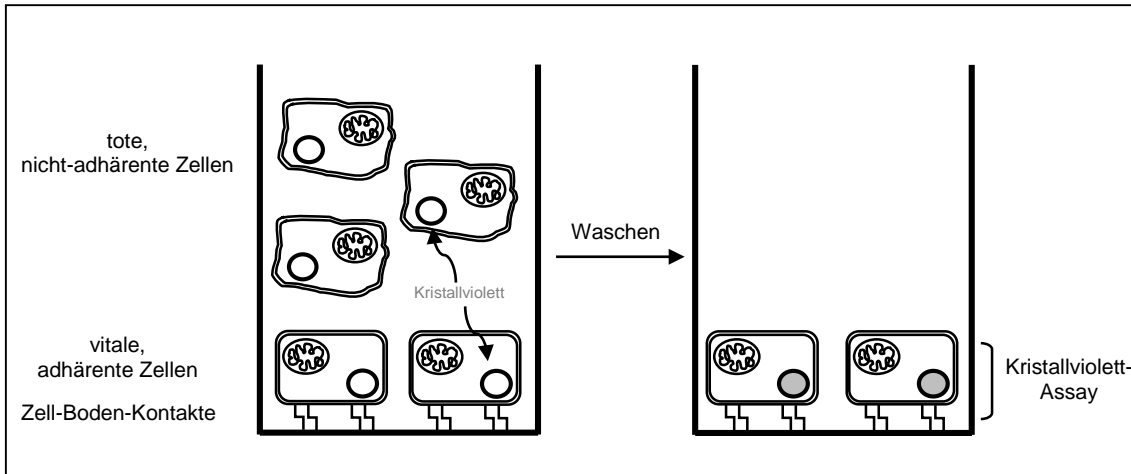
### 3.6 Photometrische Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen

Ein wesentliches Merkmal für die Vitalität einer Zellkultur ist die Zunahme der Zellzahl. Wachstum und Vitalität einer Zellkultur in An- bzw. Abwesenheit von Substanzen mit zytotoxischen Eigenschaften wurden mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt. Dieser Assay, der erstmals von Gillies et al. (Gillies RJ et al., 1986) beschrieben und später von Kueng et al. (Kueng W et al., 1989) für das Mikrotiterplatten-Format mit 96 Vertiefungen modifiziert wurde, basiert auf der photometrischen Messung von Kristallviolett, das die Kerne von Zellen anfärbt. Die Absorption ist dabei direkt proportional zur Anzahl vitaler Zellen. Tote und somit nicht mehr adhärente Zellen werden durch mehrere Waschschriffe entfernt; dieses Vorgehen stellt sicher, dass ausschließlich adhärente und damit vitale Zellen gefärbt werden (Abb. 3.3).

Der Überstand aus den Vertiefungen von Zellkulturschalen mit 96 Vertiefungen wurde verworfen, die Zellen mit jeweils 100 µL Methanol fixiert und die Zellkulturschalen mit 96 Vertiefungen getrocknet. In jede Vertiefung wurden anschließend jeweils 100 µL Kristallviolettlösung gegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wurde verworfen, die Vertiefungen viermal mit Aqua dest. gewaschen und die Zellkulturschalen getrocknet. Anschließend wurden 200 µL 10%-ige Essigsäure in jede Vertiefung gegeben und die Zellkulturschalen für 20 bis 30 Minuten auf einem Schüttler bei max. 200 rpm inkubiert. Im Anschluss wurde die optische Dichte des gelösten Kristallvioletts bei 570 nm im ELISA-Reader (Dynatech) gemessen; diese ist direkt proportional zur Anzahl adhärenter und damit vitaler Zellen. Zur Herstellung der Kristallviolettlösung wurden 0,5 g Kristallviolett mit 25 mL Methanol und 75 mL PBS gelöst.

---

**Abb. 3.3 (S. 17): Messprinzip des Kristallviolett-Assays.** Mit diesem Assay wurden u.a. die zytotoxischen Effekte von Avemar und 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinonen untersucht. Tote und somit nicht mehr adhärente Zellen werden durch mehrere Waschschriffe aus einer Zellkulturschale mit 96 Vertiefungen entfernt, während vitale Zellen am Boden haften bleiben. Das in den Zellkernen gebundene Kristallviolett wird mit Essigsäure in Lösung gebracht und die optische Dichte als Maß für die Anzahl vitaler Zellen bestimmt.



### 3.7 FDA/PI-Färbung zum Nachweis früher zytotoxischer Effekte von Avemar

Um zytotoxische Effekte bereits zu einem früheren Zeitpunkt als mit dem Kristallviolett-Assay zu messen, wurde eine andere Färbemethode angewandt (Abb. 3.2). Dazu wurden die Zellen mit Fluoreszeindiacetat (FDA) und Propidiumjodid (PI) gefärbt. Das lipidlösliche FDA wird im Zytoplasma vitaler Zellen durch eine Esterase in einen grün-fluoreszierenden, nicht-lipidlöslichen Farbstoff gespalten, der sich im Zytoplasma vitaler Zellen anreichert. PI hingegen färbt die Zellkerne avitaler Zellen, die nach Anregung von PI rot fluoreszieren. Dazu wurde 1 mg FDA (Sigma-Aldrich, F7378) mit 1 mL Aceton frisch angesetzt. Anschließend wurden 2,5 µL der Aceton/FDA-Lösung pro mL PBS in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit 6 Vertiefungen hinzugegeben und für 15 Minuten bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden 25 µL PI (Sigma-Aldrich, P4170) zu den Zellen gegeben und diese sofort unter einem Fluoreszenzmikroskop (BX50, Olympus; Hamburg) bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm mikroskopiert (Emissionsfilter: 530 ± 20 nm). Von jeder Probe wurden zehn zufällig ausgewählte Gesichtsfelder photographiert und mit dem von Wayne Rasband vom National Institutes of Health entwickelten Open Source Bildverarbeitungsprogramm ImageJ ausgewertet. Hierzu wurde der Anteil grüner und roter Fläche an der Gesamtfläche des Bildes bestimmt. Das Verhältnis aus grüner Fläche und grüner plus roter Fläche ist ein Maß für die Vitalität der Zellen.

### 3.8 Auswertung und Statistik

Die Anzahl vitaler Zellen in den Testansätzen wurde mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt (siehe Kapitel 3.6). Zur Veranschaulichung der Ergebnisse wurde der Mittelwert der optischen Dichte der Kontrollen als 100 % definiert und die Veränderung bei der Anzahl vitaler Zellen mit der jeweiligen Kontrolle verrechnet. Pro Testansatz wurden sechs Parallelwerte gemessen, die jeweils einzeln mit der Kontrolle verrechnet wurden:

$$\text{Einzelwert in \%} = \frac{\text{Einzelwert der optischen Dichte (OD) eines Testansatzes}}{\text{Mittelwert der optischen Dichte (OD) der Kontrolle}} \times 100$$

Aus den in Prozentwerten umgerechneten sechs Einzelwerten eines Testansatzes wurde jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung berechnet. Sämtliche Berechnungen und graphischen Darstellungen wurden mit Hilfe des Programms Microsoft Excel 2007 durchgeführt.

#### 3.8.1 Berechnung der EC<sub>50</sub>-Werte

Die effektive Konzentration von Avemar, ausgedrückt als EC<sub>50</sub>-Wert, ist die Konzentration an Avemar, die nach einer Inkubation von 24 Stunden zu einem Effekt bei 50 % der Zellen führt. Hierbei kann es sich um einen zytotoxischen bzw. zytostatischen Effekt handeln. Zur Bestimmung der EC<sub>50</sub>-Werte wurde eine von Hills et al. vorgeschlagene Methode angewandt (Huber W et al., 1993). Hierbei wird der EC<sub>50</sub>-Wert in einer halblogarithmischen Darstellung der Konzentration von Avemar auf der X-Achse und der Anzahl vitaler Zellen auf der Y-Achse durch lineare Interpolation zwischen den beiden Konzentrationen ermittelt, die der 50 %-Marke am nächsten liegen. Durch diese beiden Punkte wird eine Gerade gelegt. Die Geradengleichung wird nach X (= Konzentration an Avemar) aufgelöst und dabei Y (= Anzahl vitaler Zellen) gleich 50 % gesetzt und somit die Konzentration errechnet, die bei 50 % der Zellen einen Effekt auslöst. Die EC<sub>50</sub>-Werte wurden mit dem Programm Microsoft Excel 2007 berechnet. War

auch bei der höchsten Avemar-Konzentration von 50 mg/mL kein Effekt bei 50 % der Zellen zu beobachten, so war der  $EC_{50}$ -Wert nicht bestimmbar.

### 3.8.2 Statistische Testverfahren

Folgende statistische Testverfahren wurden angewandt:

- Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) zum Vergleich mehrerer Mittelwerte normalverteilter Daten. Als Post-Hoc-Analyse wurde bei Varianzhomogenität der Daten der Tukey-Test, bei fehlender Varianzhomogenität der Dunnett- $T_3$ -Test angewendet.
- Zweiseitiger t-Test zum paarweisen Vergleich von Mittelwerten normalverteilter Daten.
- Mann-Whitney-U-Test zum Vergleich von Mittelwerten nicht normalverteilter Daten.
- Shapiro-Wilk-Test zur Überprüfung der Daten auf Normalverteilung.
- Levene-Test zur Überprüfung der Daten auf Varianzhomogenität.

Das Signifikanzniveau  $\alpha$  wurde auf 5 % festgesetzt. Sämtliche Berechnungen erfolgten mit dem Programm SPSS 20 von IBM.

Um die Korrelation zwischen  $EC_{50}$ -Wert und Wirkqualität (siehe 4.1) zu berechnen, wurde der Rangkorrelationskoeffizient Kendalls  $Tau_b$  verwendet. Hierbei werden den Daten der beiden Variablen  $EC_{50}$  und Wirkqualität jeweils Ränge zugewiesen und konkordante sowie diskordante Paare gebildet. Anschließend wird das Verhältnis aus der Differenz zwischen konkordanten und diskordanten Paaren und der maximal möglichen Anzahl an Paaren gebildet. Je größer die Anzahl konkordanter Paaren ist, desto größer wird „tau“ oder  $\tau$  (bis max. +1 für eine vollständige Übereinstimmung) bzw. je größer die Anzahl an diskordanten Paaren ist, desto geringer wird die Übereinstimmung (bis max. -1 für keine Übereinstimmung)



## 4 Ergebnisse

---

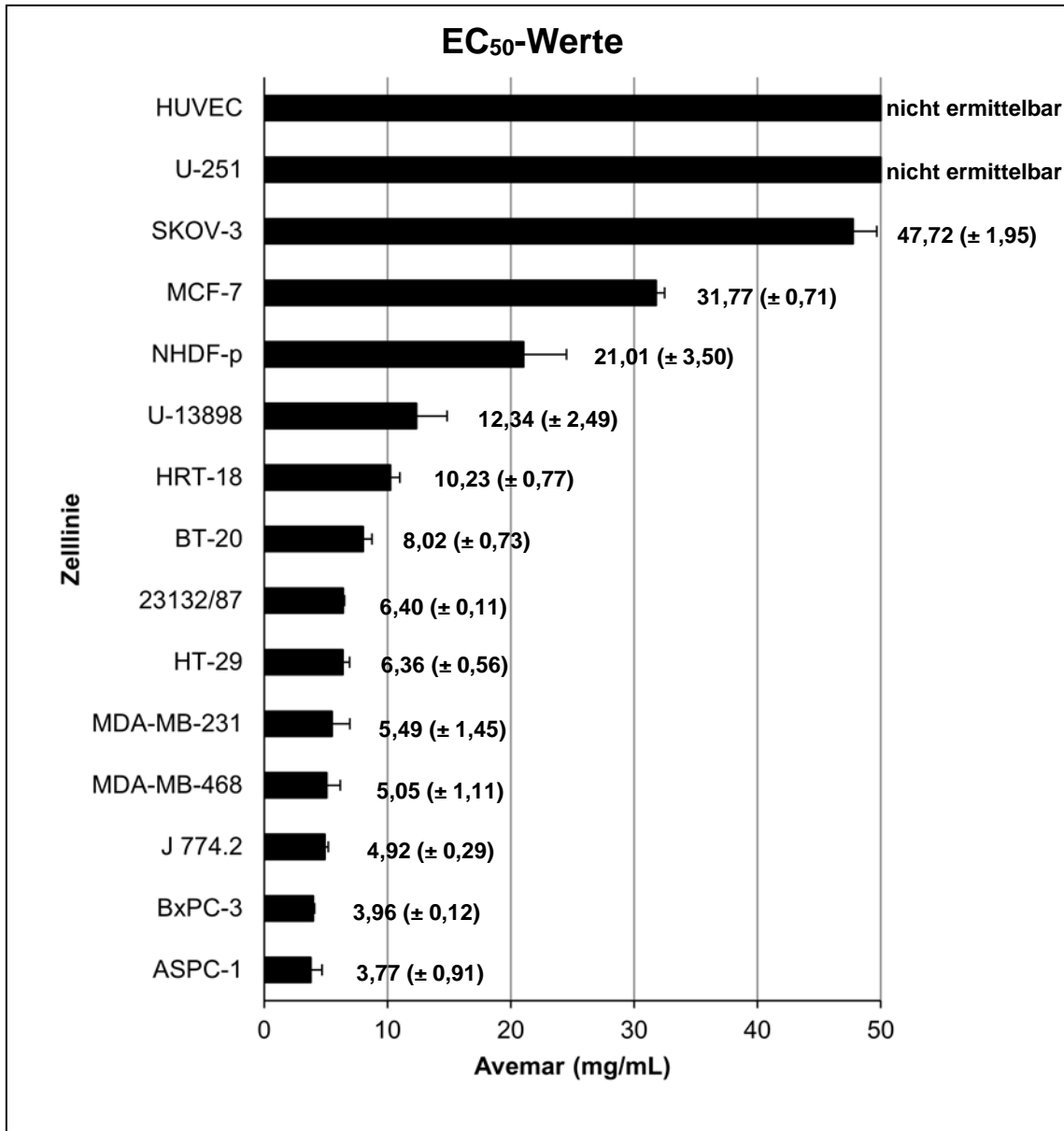
### 4.1 Wirkmechanismen von Avemar

Ein Ziel dieser Arbeit war, die zytotoxischen Effekte von Avemar an zwölf humanen Tumorzelllinien und drei benignen Zelllinien zu untersuchen (Tab. 3.1). Hierzu wurden Konzentrationen von 0,1; 1; 10 und 50 mg/mL Avemar getestet. Die Dauer der Inkubation mit Avemar betrug dabei 24 Stunden.

Das Zellwachstum als ein Maß für die Vitalität einer Zellkultur wurde mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt (Abb. 3.3). Die Anzahl vitaler Zellen wurde zu drei Zeitpunkten bestimmt: unmittelbar am Ende der 24-stündigen Inkubation mit Avemar sowie nach weiteren 24 bzw. 48 Stunden in Kultur ohne Avemar (Abb. 3.1). Tote Zellen verlieren ihre Adhärenz und werden somit von dem Test nicht erfasst.

Avemar wirkte auf die untersuchten Zelllinien unterschiedlich stark, wie die  $EC_{50}$ -Werte belegen (Abb. 4.1). Der  $EC_{50}$ -Wert ist ein Maß für die Empfindlichkeit einer Zelllinie auf Avemar, der ausdrückt, bei welcher Konzentration an Avemar ein Effekt bei 50 % der Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nach 24-stündiger Inkubation zu beobachten ist (Kapitel 3.8.2). Avemar weist drei Wirkqualitäten auf: einen zytotoxischen (bei 6 von 15 Zelllinien), einen zytostatischen (bei 8 von 15 Zelllinien) und ein wachstumsverzögernden Effekt (bei 1 von 15 Zelllinien) (Tab. 4.1). Hierzu wurden die Zellen mit 10 mg/mL Avemar für 24 Stunden inkubiert und anschließend die Anzahl der noch vitalen Zellen mit der Ausgangszellzahl verglichen.

Die Berechnung des Rangkorrelationskoeffizienten Kendalls  $\tau_b$  für die ermittelten  $EC_{50}$ -Werte der einzelnen Zelllinien (Abb. 4.1) zeigt eine gute Korrelation mit den Wirkqualitäten ( $\tau = 0,545$ ,  $p < 0,05$ ). So wirkt Avemar auf Zelllinien mit einem  $EC_{50}$ -Wert unter 6 mg/mL in aller Regel zelltoxisch, während an Zelllinien mit einem hohen  $EC_{50}$ -Wert ( $> 6$  mg/mL) eher zytostatische Effekte zu beobachten sind.



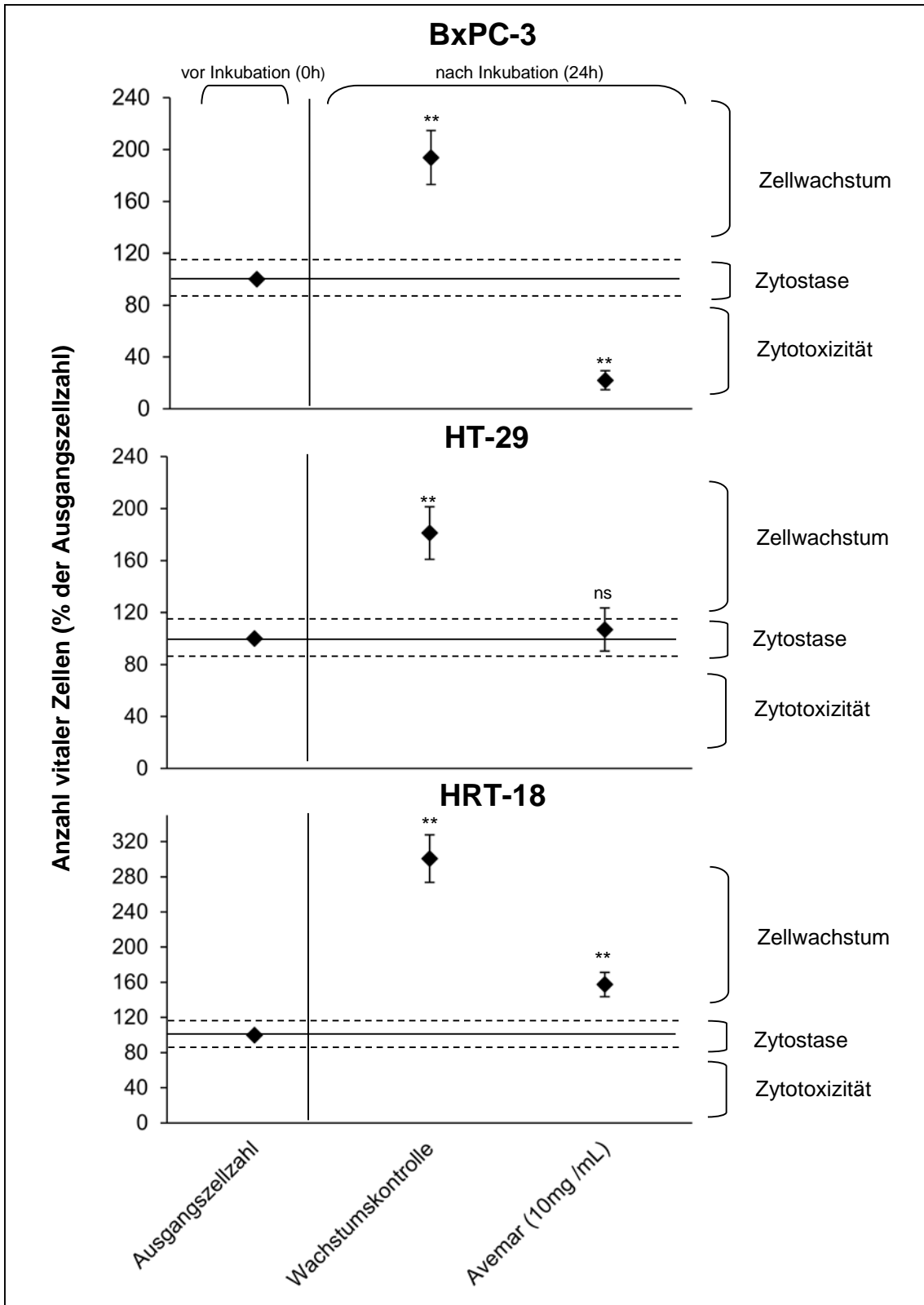
**Abb. 4.1: Die EC<sub>50</sub>-Werte der untersuchten Zelllinien.** Die Zellen wurden für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen an Avemar inkubiert – und zwar von 0,1 bis 50 mg/mL Avemar. Für die beiden Zelllinien HUVEC und U-251 lag der EC<sub>50</sub>-Wert über 50 mg/mL und war daher nicht zu bestimmen. Die EC<sub>50</sub>-Werte sind als Mittelwert mit Standardabweichung für zwei unabhängige Versuche angegeben.

**Tab. 4.1 (S. 22): Die drei Wirkqualitäten von Avemar.** Zusätzlich zu den EC<sub>50</sub>-Werten lassen sich für Avemar die drei Wirkqualitäten zytotoxisch, zytostatisch und verzögertes Zellwachstum unterscheiden. Kriterium für die drei Wirkqualitäten war, ob die Anzahl vitaler Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit 10 mg/mL Avemar im Vergleich zur Ausgangszellzahl (Abb. 3.1) zunahm, abnahm oder gleichblieb.

<b>Zytotoxizität</b> Anzahl vitaler Zellen nach Inkubation < Ausgangszellzahl	<b>Zytostase</b> Anzahl vitaler Zellen nach Inkubation = Ausgangszellzahl	<b>Zellwachstum verzögert</b> Anzahl vitaler Zellen nach Inkubation > Ausgangszellzahl
U-138 98	SKOV-3	HRT-18
MDA-MB-231	HUVEC	
MDA-MB-468	U-251	
J 774.2	MCF-7	
BxPC-3	NHDF-p	
ASPC-1	BT-20	
	23132/87	
	HT-29	

Die in dieser Arbeit identifizierten Wirkqualitäten von Avemar werden in den nachfolgenden Abbildungen für folgende Zelllinien gezeigt: BxPC-3, HT-29 und HRT-18 (Abb. 4.2). Die Daten zu den übrigen Zelllinien finden sich im Anhang (siehe Kapitel 10.1).

Die drei Wirkqualitäten von Avemar wurden identifiziert, indem die Ausgangszellzahl vor Inkubationsbeginn mit Avemar mit den Zellzahlen nach Inkubation mit Avemar verglichen wurde. Hierzu wurde die Ausgangszellzahl gleich 100 % gesetzt. Änderte sich durch Inkubation mit Avemar der Anteil vitaler Zellen nur unwesentlich (um ca. 15 %), so wurde dies als ein zytostatischer Effekt definiert. Nahm dagegen die Anzahl vitaler Zellen um mehr als 15 % ab, so handelte es sich hierbei um einen zytotoxischen Effekt. Nahm bereits während der Inkubation mit Avemar der Anteil vitaler Zellen um mehr als 15 % zu, so handelte es sich um einen wachstumsverzögernden Effekt. Das Wachstumsverhalten der Zellen in der Nachbeobachtungszeit (Abb. 3.1) wurde für die Bestimmung der Wirkqualität nicht berücksichtigt.



**Abb. 4.2:** Die drei Wirkqualitäten von Avemar am Beispiel der drei gastrointestinalen Tumorzelllinien BxPC-3, HT-29 und HRT-18. Durch direkten Vergleich der mit Avemar behandelten Zellen mit der Ausgangszellzahl sind Zytotoxizität (BxPC-3), Zytostase (HT-29) und verzögertes Zellwachstum (HRT-18) zu unterscheiden. Die Daten, die nach einer Inkubation mit Avemar für 24

Stunden ermittelt wurden, sind als Mittelwert mit Standardabweichung für jeweils sechs Parallelwerte angegeben. \*\* $p < 0,01$ , ns= nicht signifikant.

## **4.2 Wachstumsdynamik maligner und benigner Zellen bei Inkubation mit Avemar**

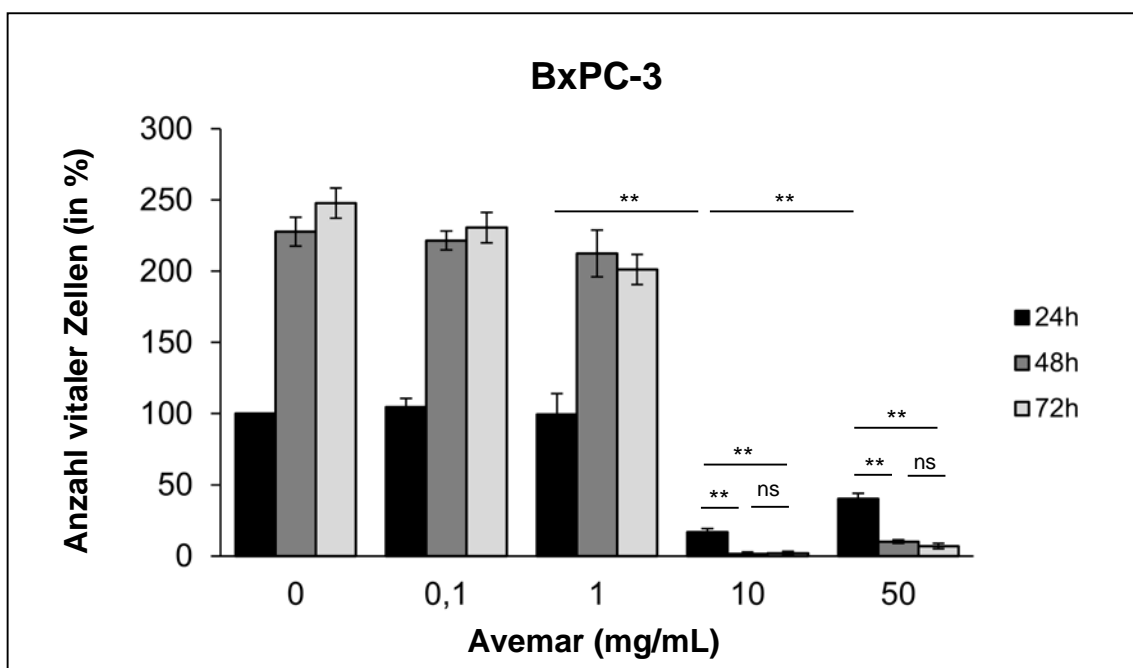
In Kapitel 4.1 sind die  $EC_{50}$ -Werte von Avemar für die einzelnen Zelllinien und die drei Wirkqualitäten Zytotoxizität, Zytostase und verzögertes Zellwachstum aufgeführt. In diesem Kapitel wird die Dynamik zum Einfluss von Avemar auf das Wachstumsverhalten im Detail dargestellt – und zwar an jeweils einer Zelllinie aus den drei Kategorien Zytotoxizität, Zytostase und verzögertes Zellwachstum. Die Auswertungen der übrigen Zelllinien befinden sich im Anhang (Kapitel 10.1). In den Diagrammen sind die Daten als Mittelwert mit Standardabweichung aus jeweils sechs Parallelwerten angegeben. Es handelt sich jeweils um die Darstellung repräsentativer Ergebnisse mehrerer unabhängiger Versuche (zwischen 3 bis 5).

Bevor auf die Daten zur Wachstumsdynamik eingegangen wird, zuerst noch einige Details zu den Auswirkungen der Inkubation mit Avemar, die bei sämtlichen untersuchten Zelllinien beobachtet wurden:

Avemar wies einen deutlichen Effekt ab einer Konzentration von 10 mg/mL auf. In den niedrigeren Konzentrationen 0,1 und 1 mg/mL beeinträchtigte Avemar das Zellwachstum nicht bzw. nur geringfügig.

Bei einer Konzentration von 50 mg/mL Avemar war bei nahezu sämtlichen Zelllinien zwar kein Zellwachstum mehr zu beobachten, doch führte die Erhöhung der Konzentration an Avemar von 10 auf 50 mg/mL nicht in jedem Fall zu einer Steigerung der Wirkstärke. So war bei einigen Zelllinien (ASPC-1, BxPC-3, MDA-MB-468 und J 774.2) die Wirkung von Avemar bei 50 mg/mL geringer als bei 10 mg/mL. Für diese Beobachtung gibt es zurzeit aber keine Erklärung.

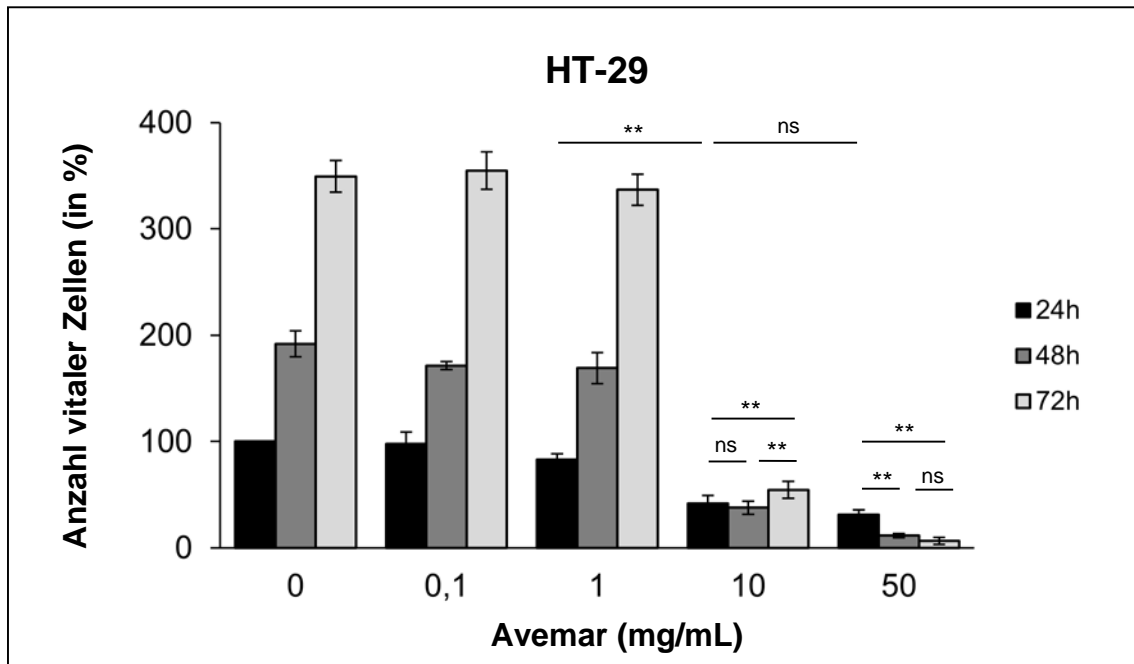
Die **Pankreaskarzinomzelllinie BxPC-3** war neben der zweiten Pankreaskarzinomzelllinie ASPC-1 die empfindlichste Zelllinie, wie der EC<sub>50</sub>-Wert von unter 4 mg/mL Avemar andeutet (3,96 bzw. 3,77 mg/mL Avemar). Bei einer Konzentration von 10 mg/mL Avemar waren in der Nachbeobachtung (Abb. 3.2) kaum vitale Zellen mehr nachweisbar. Avemar wirkte auf die Pankreaskarzinomzelllinie somit eindeutig zytotoxisch (Abb. 4.3 und Tab. 4.1). Bei BxPC-3 war zu beobachten, dass 50 mg/mL Avemar das Zellwachstum weniger stark hemmte als 10 mg/mL Avemar (Abb. 4.3).



**Abb. 4.3: Die Wirkung von Avemar auf die Pankreaskarzinomzelllinie BxPC-3.** Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Avemar für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde Avemar von den Zellen entfernt und diese für weitere 24 bzw. 48 Stunden kultiviert. Nach 24, 48 und 72 Stunden Versuchsdauer wurde jeweils die Anzahl vitaler Zellen mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt (Abb. 3.1). Die prozentuale Zu- bzw. Abnahme vitaler Zellen wurde auf Basis der Kontrolle (dies sind Zellen, die ohne Avemar inkubiert wurden) berechnet. Die nur noch geringfügige Zunahme der Zellzahl zwischen der 48-Stunden- und 72-Stunden-Messung in der Kontrolle ist sicherlich darauf zurückzuführen, dass die Zellen konfluent waren. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung für jeweils sechs Parallelwerte angegeben. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse mehrerer unabhängiger Versuche. \*\*p<0,01, ns= nicht signifikant. Gleiches gilt für die Abb. 4.4 und 4.5.

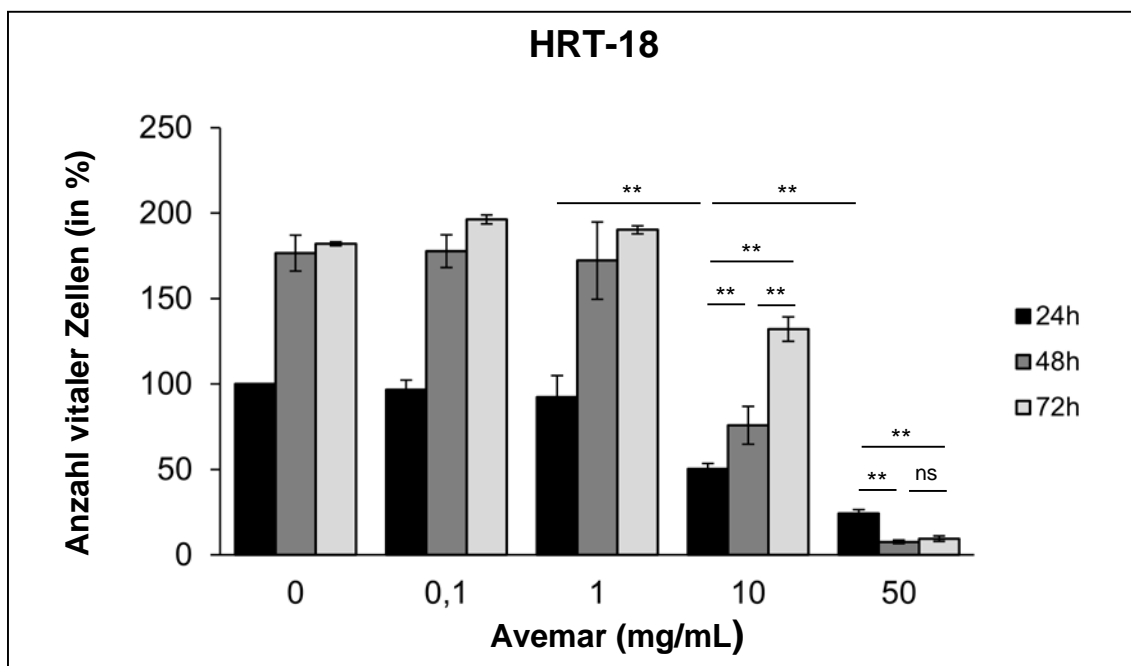
Auf Zellen der **Kolonkarzinomzelllinie HT-29** wirkte Avemar während der 24-stündigen Inkubation mit 10 mg/mL Avemar zytostatisch (Abb. 4.4). Auch in der

Nachbeobachtung für weitere 24 bzw. 48 Stunden ohne Avemar (bei einer Gesamtkulturzeit von 48 bzw. 72 Stunden) nahm der Anteil vitaler Zellen nur unwesentlich zu – auch wenn der Unterschied zwischen der Anzahl vitaler Zellen nach 24 Stunden und 72 Stunden statistisch signifikant ist (Abb. 4.4).



**Abb. 4.4: Die Wirkung von Avemar auf die Kolonkarzinomzelllinie HT-29.** Die Zellen wurden für 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Avemar inkubiert, anschließend wurde Avemar aus den Kulturen entfernt und die Zellen für weitere 24 bzw. 48 Stunden kultiviert. Nach 24, 48 und 72 Stunden Versuchsdauer wurde jeweils die Anzahl vitaler Zellen mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt (Abb. 3.1). Die prozentuale Zu- bzw. Abnahme vitaler Zellen wurde auf der Basis der Kontrolle (dies sind Zellen, die ohne Avemar inkubiert wurden) berechnet. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung für jeweils sechs Parallelwerte angegeben. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse mehrerer unabhängiger Versuche. \*\* $p < 0,01$ , ns= nicht signifikant. Es sei darauf hingewiesen, dass diese Darstellung zur Bestimmung der Wirkqualitäten von Avemar nicht geeignet ist, da als Basis zur Berechnung der Zu- bzw. Abnahme der Zellzahl nicht die Ausgangszellzahl, sondern die Zellzahl nach 24 Stunden in Kultur gewählt wurde.

Eine Avemar-Konzentration von ca. 10 mg/mL führte bei der **Rektumkarzinomzelllinie HRT-18** zu einer verzögerten Zunahme vitaler Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 4.5). Der  $EC_{50}$ -Wert für diese Zelllinie liegt bei 10,23 mg/mL Avemar. Die Zellen erholten sich rasch in der Nachbeobachtung und zeigten ein deutliches Zellwachstum (Abb. 4.5).



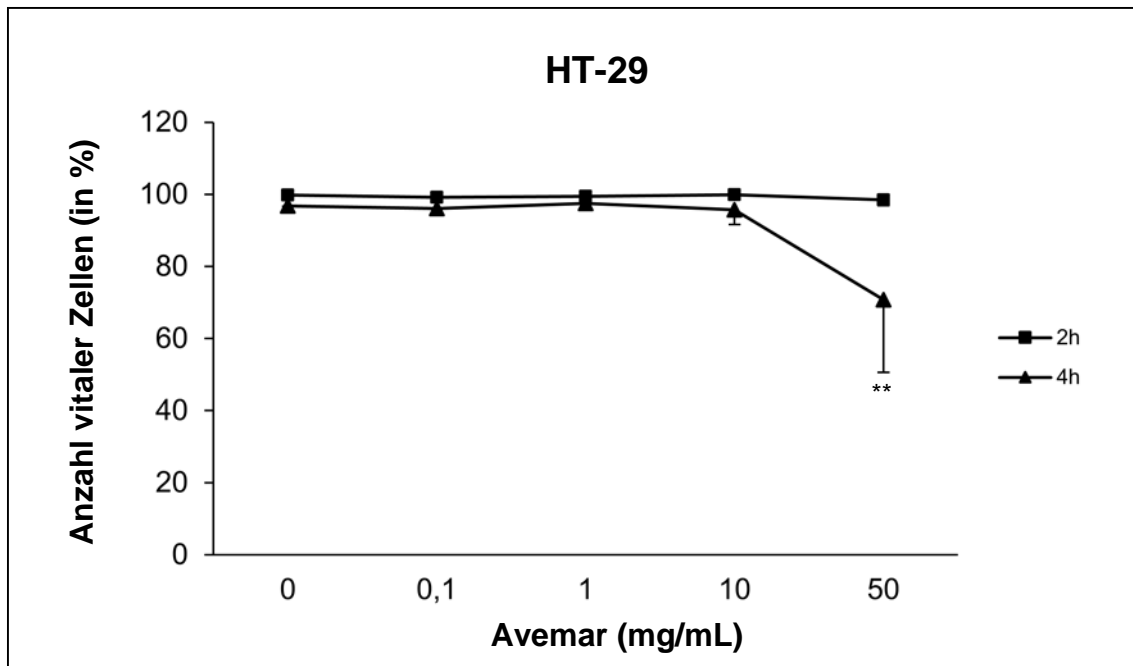
**Abb. 4.5: Die Wirkung von Avemar auf die Rektumkarzinomzelllinie HRT-18.** Die Zellen wurden für 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Avemar inkubiert, anschließend Avemar aus den Kulturen entfernt und die Zellen für weitere 24 bzw. 48 Stunden kultiviert. Nach 24, 48 und 72 Stunden Versuchsdauer wurde jeweils die Anzahl vitaler Zellen mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt (Abb. 3.1). Die prozentuale Zu- bzw. Abnahme vitaler Zellen wurde auf der Basis der Kontrolle (dies sind Zellen, die ohne Avemar inkubiert wurden) berechnet. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung für jeweils sechs Parallelwerte angegeben. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse mehrerer unabhängiger Versuche. \*\*p<0,01, ns= nicht signifikant.

### 4.3 Nachweis früher zytotoxischer Effekte von Avemar

Frühe zytotoxische Effekte von Avemar wurden mit der FDA/PI-Färbung nachgewiesen. Erste zytotoxische Effekte wurden frühestens nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden beobachtet. Zu diesem Zeitpunkt war die Zellvitalität bei einer Konzentration von 50 mg/mL Avemar signifikant verringert (Abb. 4.6).

**Abb. 4.6 (S. 28): Erste zytotoxische Effekte von Avemar zeigen sich bereits nach 4 Stunden Inkubation.** Zellen der Zelllinie HT-29 wurden für 2 und 4 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen an Avemar inkubiert und anschließend mit FDA/PI gefärbt und mikroskopiert. Von jedem der zehn zufällig ausgewählten Gesichtsfelder pro Konzentrationsstufe wurde der Anteil vitaler Zellen bestimmt. Im Diagramm sind jeweils die Mittelwerte mit Standardabweichung aus zehn Einzelwerten angegeben. Während für die zweistündige Inkubation mit Avemar noch keine zytotoxischen Effekte nachzuweisen sind, nimmt die Zellvitalität nach vierstündiger Inkubation bei einer hohen Konzentration von 50 mg/mL Avemar deutlich ab. \*\*p<0,01 bezogen auf die Zellzahl in Avemar-freiem Medium.

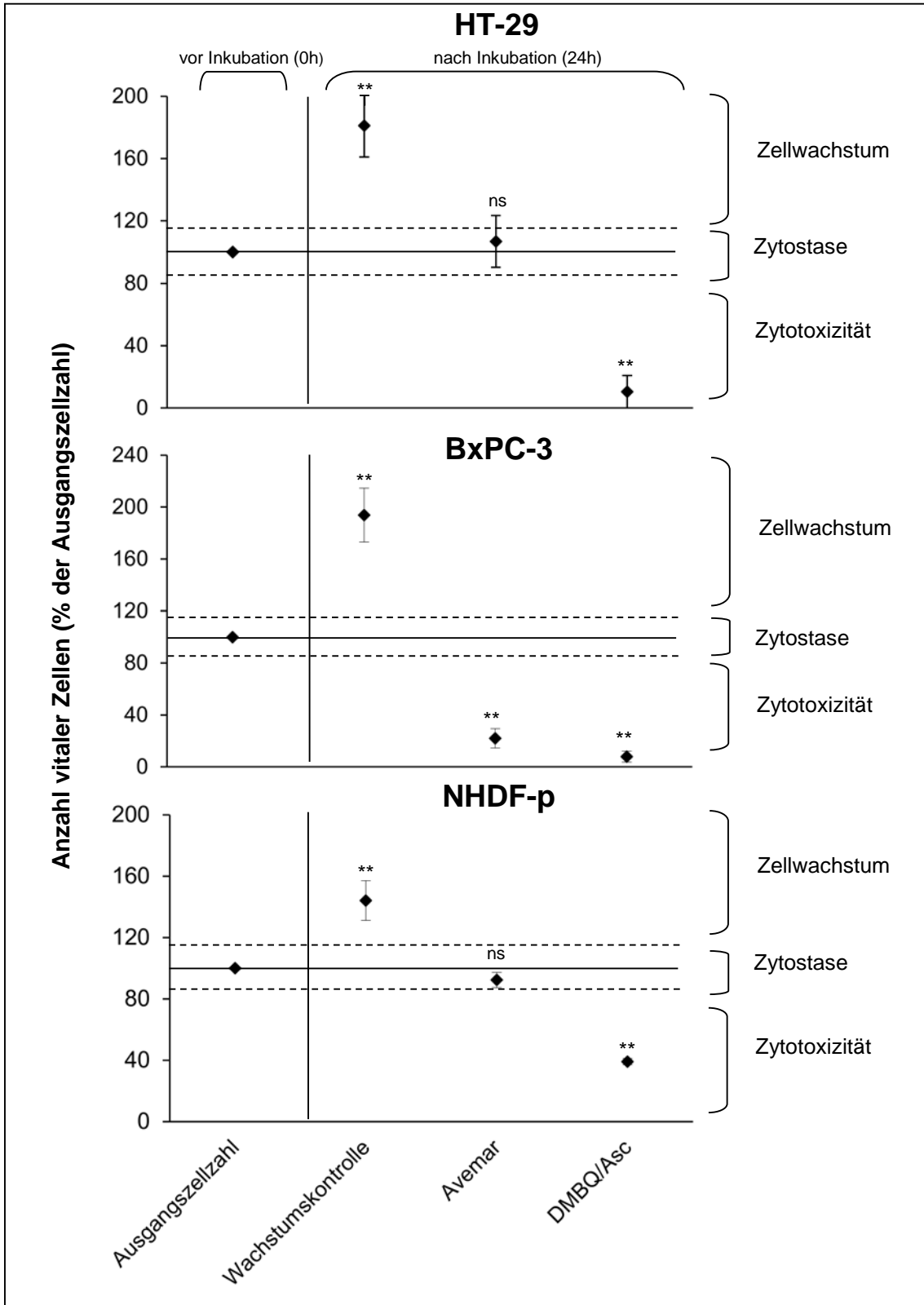




#### 4.4 Vergleich der Wirkmechanismen von Avemar und Benzochinonen

Die zytotoxische Wirkung von Avemar wird auf den hohen Gehalt an 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinonen – und zwar von 0,4 mg pro Gramm Trockensubstanz Avemar – zurückgeführt. Um die Wirkung von Avemar mit der Reinsubstanz 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinon zu vergleichen, wurden verschiedene Zelllinien mit einer Konzentration von 10 mg/mL Avemar und mit der äquimolaren Konzentration an 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinon von 24 µmol/L für 24 Stunden inkubiert. Den 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinonen wurden zusätzlich Ascorbinsäure in einer Konzentration von 2,4 mmol/L als Elektronendonator für die Radikalbildung zugesetzt (s. hierzu auch Kapitel 3.4).

Die Ergebnisse sind für die Zelllinien BxPC-3, HT-29 und NHDF-p in Abb. 4.7 und für ASPC-1 in Abb. 10.25 exemplarisch dargestellt. Die für Avemar beobachteten drei Wirkqualitäten zytotoxisch, zytostatisch und verzögertes Zellwachstum wurden bei der Reinsubstanz 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinon nicht beobachtet; im Gegenteil, bei sämtlichen untersuchten Zelllinien waren 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinone stark zytotoxisch.



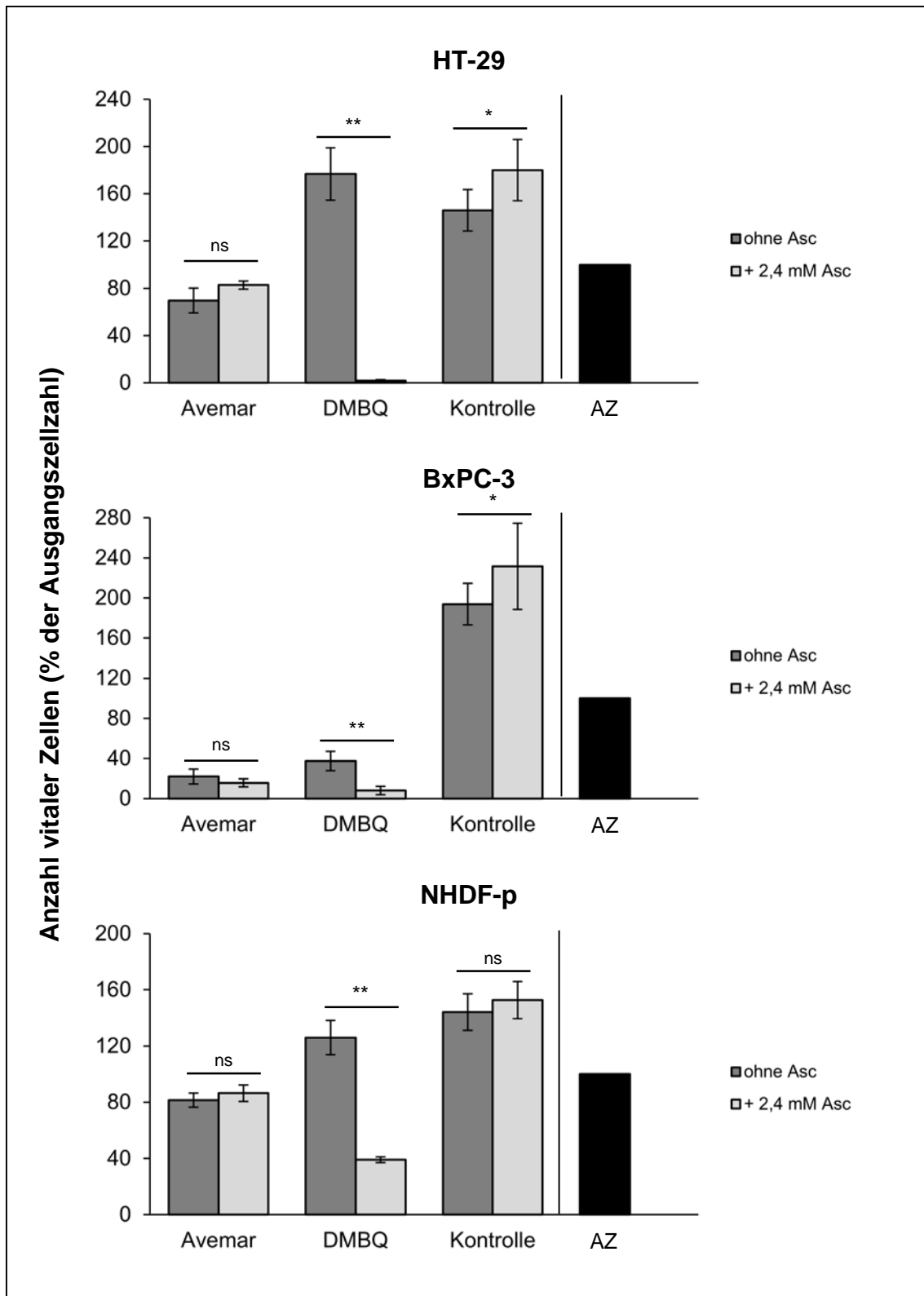
**Abb. 4.7: Vergleich der qualitativen und quantitativen Unterschiede zwischen 10 mg/mL Avemar und der äquimolaren Konzentration an Benzochinonen von 24  $\mu\text{mol/L}$ .** Die Wirkung von Avemar und 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinonen (DMBQ) ist beispielhaft für die drei Zelllinien HT-29, BxPC-3 und NHDF-p gezeigt. Zu Beginn der Inkubation wurde jeweils die Ausgangszellzahl bestimmt und als 100 % definiert. Zur Auslösung der Radikal-Bildung wurde

der Elektronendonator Ascorbinsäure (Asc) (2,4 mmol/L Endkonzentration) zu den Benzochinonen hinzugegeben. Benzochinone sind für alle drei Zelllinien zytotoxisch, während Avemar auf HT-29 und NHDF-p einen zytostatischen Effekt, auf BxPC-3 einen zytotoxischen Effekt ausübt. Der zytotoxische Effekt von Avemar und Benzochinonen auf Fibroblasten (NHDF-p) ist dabei wesentlich geringer als auf die Pankreaskarzinomzelllinie BxPC-3. \*\* $p < 0,01$ , ns = nicht signifikant bezogen auf die Ausgangszellzahl.

Albert Szent-Györgyi erkannte bei seinen Untersuchungen mit Benzochinonen eine positive Korrelation zwischen der Stabilität und damit Langlebigkeit von Semichinonradikalen und ihrer Zelltoxizität (Kapitel 3.1). Insbesondere die Semichinonradikale der 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinone sind extrem langlebig, was ihre ausgeprägte Zytotoxizität gegenüber Zellen sämtlicher in dieser Arbeit getesteten Zelllinien erklärt. Zur Induktion von Semichinonradikalen sind Elektronendonoren wie z.B. Ascorbinsäure mit einem Standardreduktionspotential notwendig, das es ihnen erlaubt, Elektronen auf Benzochinone zu übertragen (Kapitel 1.2).

Die Bedeutung von Ascorbinsäure für die Bildung von Semichinonradikalen wurde in dieser Arbeit berücksichtigt (Abb. 4.8). Dazu wurde eine 100-fach höhere Konzentration an Ascorbinsäure als an 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinonen eingesetzt (Kapitel 3.4). Diese Konzentration an Ascorbinsäure war nicht zytotoxisch (Abb. 4.8), so dass der beobachtete zytotoxische Effekt auf die Bildung von Semichinonradikalen zurückzuführen ist. Von sämtlichen in dieser Arbeit getesteten Zelllinien benötigte einzig die Pankreaskarzinomzelllinie BxPC-3 (Abb. 4.8) keine Ascorbinsäure zur Bildung von Semichinonradikalen. Eine Erklärung für diese Beobachtung kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht gegeben werden; möglicherweise weisen die Zellen dieser Zelllinie einen hohen Anteil an dem wasserstoffübertragenden Coenzym NADPH auf (Kapitel 1.2).

Im Gegensatz zu den Benzochinonen als Reinsubstanz wurde die zytotoxische Wirkung der Benzochinone in Avemar (10 mg/mL) nicht durch Zugabe von Ascorbinsäure in ihrer Wirksamkeit beeinflusst.



**Abb. 4.8: Benzochinone (DMBQ), nicht aber Avemar, benötigen Ascorbinsäure (Asc) zur Induktion eines zytotoxischen Effekts.** Vor Inkubationsbeginn wurde die Ausgangszellzahl (AZ) mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt. Benzochinone ohne Zusatz von 2,4 mmol/L Ascorbinsäure weisen keine zytotoxischen Eigenschaften auf wie beispielhaft für die Zelllinien HT-29 und NHDF-p gezeigt. Lediglich die für Zelllinie BxPC-3, für deren Zellen Avemar

zytotoxisch war, wirkten (vermutlich) die Benzochinone in Avemar bereits ohne Zusatz von Ascorbinsäure zytotoxisch. Die Zugabe von Ascorbinsäure verstärkte die zytotoxische Wirkung der Benzochinone, wodurch sich die Anzahl vitaler Zellen nochmals signifikant verringerte (von ca. 40 % auf unter 10 %). Im Gegensatz zu den Benzochinonen als Reinsubstanz wurden Benzochinone in Avemar nicht durch Zugabe von Ascorbinsäure in ihren zytotoxischen Eigenschaften beeinflusst. Im Gegenteil 2,4 mmol/L Ascorbinsäure wies sogar einen wachstumsfördernden Effekt bei einigen Zelllinien auf. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , ns=nicht signifikant.

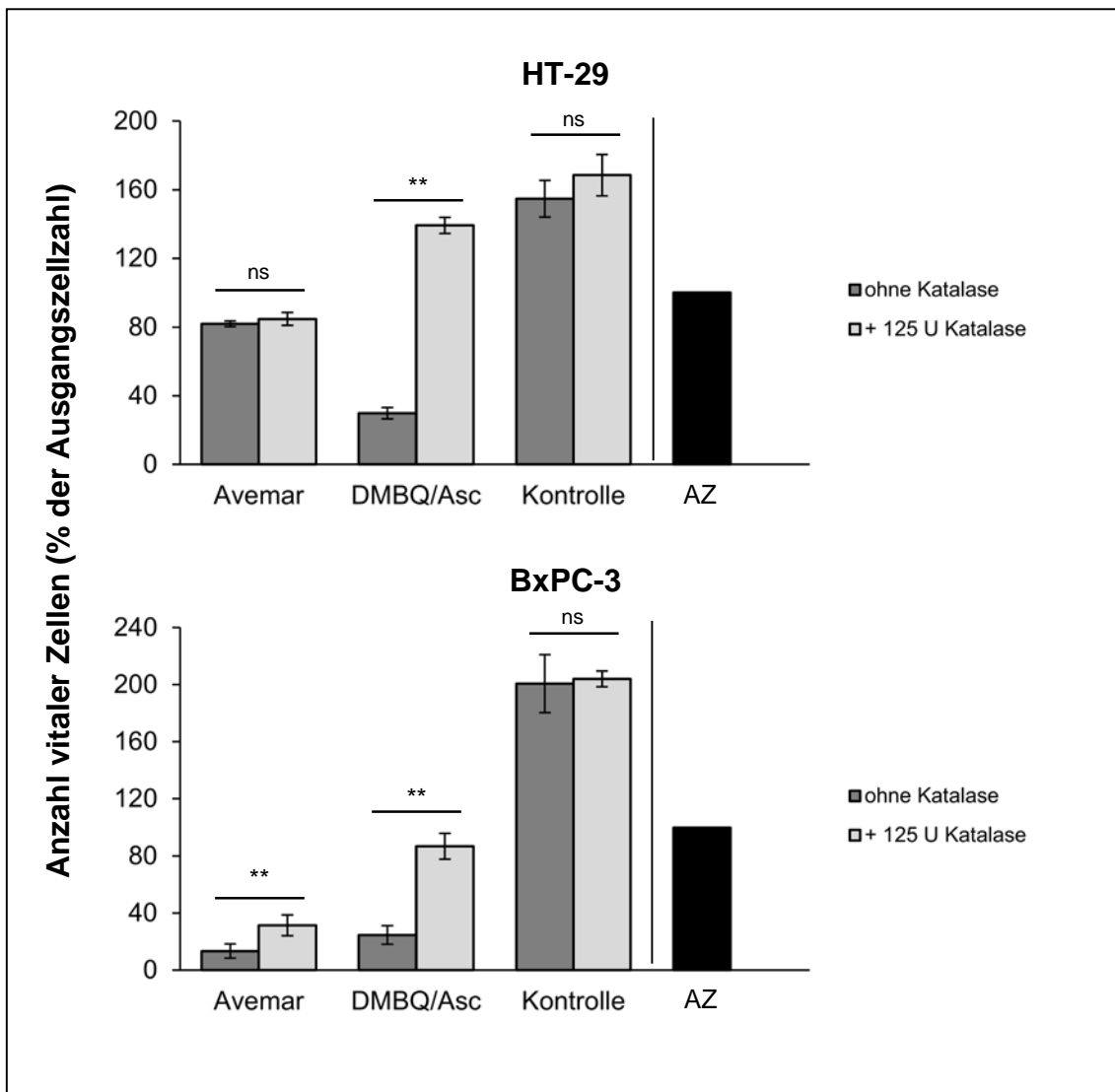
#### **4.5 Der protektive Effekt von Katalase und N-Acetylcystein gegenüber der von Benzochinonen und Avemar vermittelten Zytotoxizität**

Wie in der Einleitung erwähnt, sind an der zytotoxischen Wirkung von Benzochinonen reaktive Sauerstoffspezies wie Wasserstoffperoxid beteiligt, deren Bildung durch Semichinonradikale induziert wird (Abb. 1.2). Um dies auch für 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinone zu zeigen, wurden Zellen unterschiedlicher Zelllinien für 24 Stunden mit 24  $\mu\text{mol/L}$  2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinon unter Zugabe von 2,4 mmol/L Ascorbinsäure inkubiert. Um den möglichen protektiven Effekt von Katalase und N-Acetylcystein nachzuweisen, wurden verschiedene Einheiten an Katalase – und zwar 125, 250 und 500 Einheiten – bzw. 3,6 mmol/L N-Acetylcystein zu den Zellen hinzugegeben.

Da 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinone für die zytotoxische Wirkung von Avemar verantwortlich sein sollen, müssten für Avemar und 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinone vergleichbare zytotoxische Mechanismen nachweisbar sein – nämlich die Bildung von Wasserstoffperoxid (Abb. 1.2). Dementsprechend müsste die Avemar-vermittelte Zytotoxizität sowohl durch das Enzym Katalase als auch durch den Radikalfänger N-Acetylcystein zu beeinflussen sein.

Die Inkubation mit Katalase schützte die Zellen eindeutig vor der zytotoxischen Wirkung der aus 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinonen induzierten Semichinonradikale. Dies deutet darauf hin, dass Semichinonradikale tatsächlich die Bildung von Wasserstoffperoxid induzieren. Der zytotoxische Effekt von Avemar wurde durch die Zugabe von Katalase kaum beeinflusst. Während für Zellen der Zelllinie HT-29 kein Effekt auf die Zellvitalität durch Zugabe von Katalase zu messen war, zeigte die Katalase für Zellen der Zelllinie BxPC-3 einen leichten protektiven

Effekt (Abb. 4.9). Wasserstoffperoxid scheint somit nicht an der zytotoxischen Wirkung von Avemar beteiligt zu sein wie bei den Benzochinonen als Reinsubstanz. Um auszuschließen, dass die Zugabe von Katalase das Wachstum der Zellkultur beeinflusst, wurden die Zelllinien HT-29 und BxPC-3 zur Kontrolle mit 500 U Katalase inkubiert. Zellen, die mit Katalase in Kontakt kamen, wurden in ihrem Wachstum nicht behindert (Abb. 4.9).



**Abb. 4.9: Katalase schützt vor dem zytotoxischen Effekt von 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinonen.** Gezeigt sind die Daten für Zellen der Zelllinien HT-29 und BxPC-3, die jeweils mit 24 µmol/L 1,6-Dimethoxy-1,4-benzochinonen (DMBQ) und 2,4 mmol/L Ascorbinsäure (Asc) bzw. mit 10 mg/mL Avemar inkubiert wurden. Die Anzahl vitaler Zellen wurde mit dem Kristallviolett-Assay gemessen. Katalase selbst beeinflusst weder die Zellvitalität noch das Zellwachstum. Getestet wurden 125, 250 und 500 Einheiten Katalase; gezeigt sind die Ergebnisse für 125 Einheiten Katalase, da die höheren Katalase-Einheiten vergleichbare Ergebnisse lieferten. \*p<0,05, \*\*p<0,01, ns = nicht signifikant.

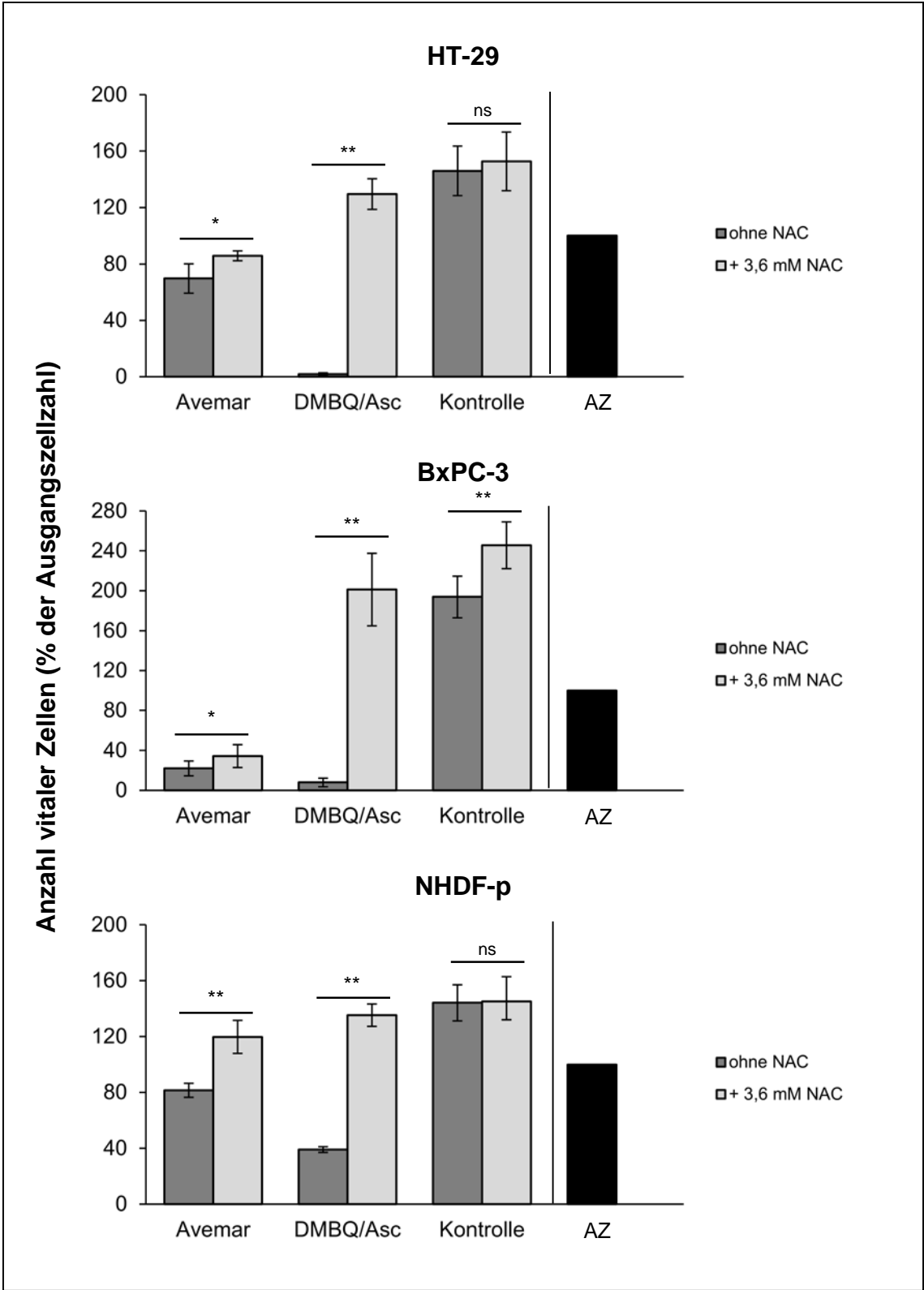
Der Radikalfänger N-Acetylcystein schützte ebenfalls die Zellen vor der zytotoxischen Wirkung von 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinonen (Abb. 4.10). Auch diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass durch Benzochinone reaktive Sauerstoffspezies gebildet werden. N-Acetylcystein ist in der Lage, direkt mit Wasserstoffperoxid zu reagieren und es so unschädlich zu machen (Abb. 6.2).

N-Acetylcystein beeinflusste die zytotoxische Wirkung von Avemar nur geringfügig; auch wenn der protektive Effekt von N-Acetylcystein auf die Erhaltung der Zellvitalität signifikant war (Abb. 4.10). Aufgrund der vorhandenen Daten kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht zweifelsfrei entschieden werden, ob reaktive Sauerstoffspezies für die zytotoxische bzw. zytostatische Wirkung von Avemar von Bedeutung sind.

Um auszuschließen, dass die Zugabe von N-Acetylcystein das Wachstum der Zellkulturen beeinflusst, wurden Zellen der verschiedenen Zelllinien mit 3,6 mmol/L N-Acetylcystein inkubiert. Zellen, die mit N-Acetylcystein in Kontakt kamen, wurden nicht in ihrem Wachstum beschränkt. Auf Zellen der Zelllinie BxPC-3 wirkte N-Acetylcystein sogar wachstumsstimulierend (Abb. 4.10).

---

**Abb. 4.10 (S. 35): N-Acetylcystein (NAC) schützt vor dem zytotoxischen Effekt von 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinonen.** Gezeigt sind die Daten für Zellen der Zelllinien HT-29, BxPC-3 und NHDF-p, die jeweils mit 24 µmol/L 1,6-Dimethoxy-1,4-benzochinonen (DMBQ) und 2,4 mmol/L Ascorbinsäure (Asc) bzw. mit 10 mg/mL Avemar inkubiert wurden. Die Anzahl vitaler Zellen wurde mit dem Kristallviolett-Assay gemessen. Die Kontrollen der drei Zelllinien zeigten deutliches Wachstum während der Versuchsdauer. Eine Konzentration von 3,6 mmol/L N-Acetylcystein schützte die Zellen vollständig vor der toxischen Wirkung der Benzochinone. \*p < 0,05, \*\*p<0,01, ns = nicht signifikant.





#### 4.6 Übersicht: Vergleich der Wirkmechanismen von Avemar und Benzo- chinonen

Für Avemar wurden die drei Wirkqualitäten zytotoxisch, zytostatisch und wachstumsverzögernd nachgewiesen, während 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinone bei sämtlichen getesteten Zelllinien stark zytotoxisch wirkten. Die drei Wirkqualitäten von Avemar wurden bei einer Konzentration von 10 mg/mL Avemar beobachtet, während bei einer Konzentration von 50 mg/mL Avemar der zytotoxische Effekt überwiegte.

Albert Szent-Györgyi erkannte bei seinen Untersuchungen, dass zur Induktion von Semichinonradikalen geeignete Elektronendonoren wie z.B. Ascorbinsäure notwendig sind, um Elektronen auf Benzochinone zu übertragen (Kapitel 1.2). Die Bedeutung der Ascorbinsäure für die Bildung von Semichinonradikalen wird in der vorliegenden Arbeit bestätigt.

Die zytotoxische Wirkung von 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinonen – nicht aber die von Avemar – wird durch Zugabe von Katalase oder N-Acetylcystein gehemmt.

**Tab. 4.3: Durch Avemar induzierte Effekte und Hemmung der durch Avemar induzierten zytotoxischen Effekte durch Antioxidantien.** Dargestellt sind die Ergebnisse für die vier repräsentativen Zelllinien ASPC-1, BxPC-3, HT-29 und NHDF-p (Tab. 3.1). Zusätzlich sind die Ergebnisse zur Wirkung des Elektronendonors Ascorbinsäure auf die Induktion der zytotoxischen Effekte von Avemar dargestellt (s. hierzu auch Abb. 1.2). „Ja“ bedeutet, dass der zytotoxische Effekt von Avemar durch das entsprechende Antioxidans verhindert wird bzw. dass Ascorbinsäure für die entsprechende Wirkung von Avemar notwendig ist. „Nein“ bedeutet kein Effekt. Unterschiede zu Benzochinonen als Rein- bzw. Referenzsubstanz (s. hierzu Tab. 4.4) sind fett hervorgehoben. Vgl. mit Abb. 4.8 – 4.11.

<b>Avemar</b>	<b>Effekt</b>	<b>Ascorbinsäure</b>	<b>NAC</b>	<b>Katalase</b>
<b>ASPC-1</b>	zytotoxisch	<b>Nein</b>	<b>Nein</b>	<b>Nein<sup>*)</sup></b>
<b>BxPC-3</b>	zytotoxisch	<b>Nein</b>	<b>Nein</b>	<b>Nein</b>
<b>HT-29</b>	zytostatisch	<b>Nein</b>	<b>Nein</b>	<b>Nein</b>
<b>NHDF-p</b>	zytostatisch	<b>Nein</b>	<b>Nein</b>	<b>Nein<sup>*)</sup></b>

<sup>\*)</sup> Wurde nicht untersucht, wird aber aufgrund der vorhandenen Daten angenommen.

**Tab. 4.4: Möglichkeiten zur Hemmung der durch 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinone (DMBQ) induzierten zytotoxischen Effekte durch Antioxidantien.** Dargestellt sind die Ergebnisse für die vier repräsentativen Zelllinien ASPC-1, BxPC-3, HT-29 und NHDF-p (Tab. 3.1). Zusätzlich sind die Ergebnisse zur Wirkung des Elektronendonors Ascorbinsäure auf die Induktion der zytotoxischen Effekte von Benzochinonen dargestellt (s. hierzu auch Abb. 1.2). „Ja“ bedeutet, dass der Effekt von DMBQ durch das entsprechende Antioxidans verhindert wird bzw. dass Ascorbinsäure für die zytotoxische Wirkung von DMBQ notwendig ist. „Nein“ bedeutet kein Effekt. Vgl. mit Abb. 4.8 – 4.11.

<b>DMBQ</b>	<b>Effekt</b>	<b>Ascorbinsäure</b>	<b>NAC</b>	<b>Katalase</b>
<b>ASPC-1</b>	zytotoxisch	Ja	Ja	Ja <sup>*)</sup>
<b>BxPC-3</b>	zytotoxisch	Ja	Ja	Ja
<b>HT-29</b>	zytotoxisch	Ja	Ja	Ja
<b>NHDF-p</b>	zytotoxisch	Ja	Ja	Ja <sup>*)</sup>

<sup>\*)</sup> Wurde nicht untersucht, wird aber aufgrund der vorhandenen Daten angenommen.

## 5 Beantwortung der Fragen

---

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Avemar, einem fermentierten Weizenkeimextrakt, auf Zellen maligner und benigner Zelllinien *in vitro* untersucht. Dabei sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- 1. Wie beeinflussen unterschiedliche Konzentrationen von Avemar die Vitalität der in dieser Arbeit getesteten malignen und benignen Zelllinien? Werden durch Avemar langfristige Zellschäden induziert und wirkt Avemar selektiv auf Tumorzellen?**

Avemar beeinflusste das Zellwachstum von 13 der 15 getesteten Zelllinien. Der Einfluss von Avemar wurde mit Hilfe der effektiven Konzentration (EC) quantifiziert. Der  $EC_{50}$ -Wert ist dabei die Konzentration an Avemar, die nach einer Inkubation von 24 Stunden zu einem Effekt bei 50 % der Zellen führt. Hierbei kann es sich um einen zytotoxischen, zytostatischen bzw. wachstumsverzögernden Effekt handeln. Avemar wirkte bei 6 der 15 Zelllinien zytotoxisch; hierzu gehören die beiden Pankreaskarzinomzelllinien ASPC-1 und BxPC-3 mit einem  $EC_{50}$ -Wert von unter 4 mg/mL Avemar und die beiden Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-468 (Tab. 4.1). Avemar wirkte bei 8 der 15 Zelllinien zytostatisch und bei einer Zelllinie wachstumsverzögernd (Tab. 4.1).

Zusätzlich zu den zwölf malignen Zelllinien wurden auch die drei benignen Zelllinien HUVEC, NHDF-p und J 774.3 untersucht (Tab. 3.1). Während HUVEC und NHDF-p einen  $EC_{50}$ -Wert von weit über 10 mg/mL Avemar aufweisen (Abb. 4.1), reagierten die Zellen der murinen Makrophagenzelllinie J 774.3 mit einem  $EC_{50}$ -Wert von 4,9 mg/mL Avemar weitaus empfindlicher auf die Inkubation mit Avemar. Somit ist nicht eindeutig sicher, ob Avemar eine zelltoxische Wirkung auch auf benigne Zelllinien ausübt, zumal in der Literatur kaum Daten zu solchen Untersuchungen an benignen Zelllinien zu finden sind. Umso bemerkenswerter ist es, dass bislang aus den klinischen Studien keine toxischen Nebenwirkungen von Avemar bekannt sind.

- 2. Der von Benzochinonen induzierte zytotoxische Effekt wird durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) vermittelt. Ist diese Eigenschaft auch für 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinone nachweisbar, die in Avemar mit 0,4 mg pro Gramm Trockensubstanz vorkommen?**

Für Zellen sämtlicher in dieser Arbeit getesteten Zelllinien war die chemisch reine Referenzsubstanz 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinon zytotoxisch, verursacht durch langlebige Semichinonradikale, die selbst zytotoxisch wirken bzw. die Bildung von zelltoxischem Wasserstoffperoxid induzieren (Abb. 1.2). Die Zugabe von Katalase (Abb. 4.9) bzw. von N-Acetylcystein (Abb. 4.10 und 10.27) verhinderte die zytotoxischen Eigenschaften der 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinone in Gegenwart geeigneter Elektronendonoren wie Ascorbinsäure, die die Bildung von Semichinonradikalen verstärken bzw. erst ermöglichen.

- 3. Sollten die von Avemar induzierten Effekte auf die Zellvitalität tatsächlich durch Benzochinone ausgelöst werden, dann sollten die in Avemar befindlichen 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinone und die chemisch reine Referenzsubstanz 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinon vergleichbare Effekte auf die Zellvitalität aufweisen. Wird diese Annahme durch Daten der Arbeit bestätigt?**

2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinone als Reinsubstanz waren für sämtliche getesteten Zelllinien zytotoxisch, während die Wirkung von Avemar in Abhängigkeit der untersuchten Zelllinie zytotoxisch, zytostatisch oder wachstumsverzögernd war. Diese drei Wirkqualitäten, die bei einer Konzentration von 10 mg/mL Avemar nachzuweisen sind, wurden bei 50 mg/mL Avemar nicht gefunden. Bei dieser Konzentration an Avemar dominierte der zytotoxische Effekt.

Die zytotoxische Wirkung der 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinone als Reinsubstanz wurde durch Zugabe von Katalase bzw. N-Acetylcystein verhindert. Dagegen wurde die zytotoxische und zytostatische Wirkung von 10 mg/mL Avemar weder durch Katalase noch durch N-Acetylcystein verhindert (Abb. 4.9 und 4.10). Dieses Ergebnis deutet somit darauf hin, dass der zytotoxische und der zytostatische Effekt von Avemar nicht auf den hohen Gehalt an 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinonen zurückzuführen ist.

## 6 Diskussion

---

Die medikamentöse Tumorthherapie wird immer stärker in Richtung einer „targeted therapy“ ausgerichtet, in der so genannte *Biologics* wie monoklonale Antikörper und *small molecules* dominieren. Die Vorteile, eine konventionelle Chemotherapie mit *Biologics* zu kombinieren, liegen eindeutig in der Verminderung der durch Zytostatika ausgelösten Nebenwirkungen, da diese in einer verringerten Dosierung eingesetzt werden können. *Biologics* sind so konzipiert, dass sie gezielt den Signalfluss in der Zelle verhindern bzw. innerhalb der Zelle solche Signalwege blockieren, von denen bekannt ist, dass sie zur Tumorbildung bzw. Metastasierung beitragen. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei der Gruppe der Supportivprodukte in aller Regel um komplexe Stoffgemische mit nicht eindeutig identifizierten Wirkmolekülen. Das Bestreben vieler Patienten, über die leitliniengerechte Tumorthherapie hinaus aktiv gegen ihr Krebsleiden anzugehen, erfordert Supportivprodukte, die die Wirksamkeit der Standardtherapie nicht mindern und deren anti-Tumorwirkung wissenschaftlich belegt ist. Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund relevant, dass zahlreiche Supportivprodukte ein zweifelhaftes Wirkprofil aufweisen und der kommerzielle Erfolg solcher Produkte für die Anbieter im Vordergrund steht. Umso wichtiger ist es, aussichtsreiche Kandidaten mit wissenschaftlicher Sorgfalt auf ihre Wirksamkeit zu prüfen. Avemar gehört zum Kreis aussichtsreicher Kandidaten, weshalb verschiedene Hypothesen zur Wirkweise von Avemar in der vorliegenden Arbeit überprüft wurden. In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, dass die Deutsche Krebshilfe am Klinikum Nürnberg die Arbeitsgruppe „Biologische Krebstherapie“ fördert, die über alternativ- bzw. komplementärmedizinische Verfahren unabhängige Beurteilungen zur Verfügung stellt.

### 6.1 Die Wirkung von Avemar auf Tumorzelllinien

Die Auswahl der in dieser Arbeit untersuchten Konzentrationen an Avemar von 0,1; 1; 10 und 50 mg/mL orientierte sich an publizierten Daten; ebenso eine Inkubationszeit für Avemar von 24 Stunden (Boros LG et al., 2001; Comín-Anduix B et al., 2002; Saiko P et al., 2007 und 2009). Keine eindeutigen Angaben waren

zur Aufbereitung von Avemar für die jeweiligen Zellkulturexperimente zu finden. Für die vorliegende Arbeit wurde Avemar von Fresenius Kabi Austria GmbH bezogen. Für jeden Versuch wurde eine frische Stammlösung mit einer Konzentration von 100 mg/mL Avemar angesetzt. Avemar löste sich dabei vollständig im Medium. Die Stammlösung wurde über einen 0,2 µm Filter steril filtriert und anschließend entsprechend verdünnt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Anzahl vitaler Zellen mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt. Mit diesem Assay wurden für die untersuchten Zelllinien die EC<sub>50</sub>-Werte von Avemar für die Inkubationszeit von 24 Stunden ermittelt (Abb. 4.1). Dabei zeigten die malignen Zelllinien große Unterschiede hinsichtlich ihrer EC<sub>50</sub>-Werte. Diese reichen von 3,77 mg/mL Avemar für ASPC-1 bis zu 47,72 mg/mL Avemar für SKOV-3 (Abb. 4.1). Für die Glioblastomzelllinie U-251 war der EC<sub>50</sub>-Wert nicht zu bestimmen, da dieser über der Konzentration von 50 mg/mL Avemar lag. Insgesamt wiesen acht der zwölf getesteten Tumorzelllinien einen EC<sub>50</sub>-Wert von 10 mg/mL Avemar bzw. darunter auf; für vier Tumorzelllinien wurden EC<sub>50</sub>-Werte von weit über 10 mg/mL Avemar bestimmt.

Zusätzlich zur Bestimmung der EC<sub>50</sub>-Werte wurde das Wachstumsverhalten sämtlicher in dieser Arbeit getesteten Zelllinien bei einer Konzentration von 10 mg/mL Avemar ermittelt. Mit dieser Vorgehensweise wurden drei Wirkqualitäten für Avemar nachgewiesen: eine zytotoxische Wirkung bei 6 von 15 Zelllinien, eine zytostatische Wirkung bei 8 von 15 Zelllinien und eine das wachstumverzögernde Wirkung bei 1 von 15 Zelllinien (Tab. 4.1). Bei diesen Untersuchungen wurden keine Hinweise gefunden, dass Avemar für bestimmte Tumorentitäten ein identisches Wirkprofil aufweist. Zwar war Avemar für die beiden Pankreaskarzinomzelllinien ASPC-1 und BxPC-3 zytotoxisch, doch war die Wirkung von Avemar auf Zellen der vier Mammakarzinomzelllinien sehr unterschiedlich. So war Avemar für MDA-MB-231 und MDA-MB-468 zytotoxisch, für BT-20 und MCF-7 jedoch zytostatisch. Auch war die Wirkung von Avemar auf Zellen gastrointestinaler Tumorzelllinien sehr unterschiedlich: zytostatisch für die

Kolonkarzinomzelllinie HT-29 und wachstumsverzögernd für die Rektumkarzinomzelllinie HRT-18.

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten  $EC_{50}$ -Werte ermöglichen zwar eine Reihenfolge der Zelllinien hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber Avemar *in vitro*, sie lassen aber keine Voraussagen für die *in vivo* Situation zu. So ist nicht geklärt, wie hoch der Anteil an Benzochinonen ist, der nach oraler Aufnahme von Avemar im Blutkreislauf und letztlich im Tumor ankommt. Szent-Gyorgyi injizierte die Benzochinone direkt zu den Tumorzellen in die Bauchhöhle der Maus; pharmakokinetische Untersuchungen führte er nicht durch (Pethig R et al., 1983). Auch beschränkte er seine Untersuchungen auf Ehrlich-Ascites-Tumorzellen, die in der Bauchhöhle als Suspensionszellen wachsen; Untersuchungen von ihm zur Wirkung von Benzochinonen auf solide Tumoren sind nicht bekannt.

## **6.2 Die Wirkung von Avemar auf benigne Zelllinien**

Zusätzlich zu den zwölf malignen Zelllinien wurden auch die drei benignen Zelllinien HUVEC, NHDF-p und J 774.3 untersucht (Tab. 3.1). Während HUVEC und NHDF-p einen  $EC_{50}$ -Wert von weit über 10 mg/mL aufweisen (Abb. 4.1), reagierten die Zellen der murinen Makrophagenzelllinie J 774.3 mit einem  $EC_{50}$ -Wert von 4,9 mg/mL Avemar weitaus empfindlicher auf die Inkubation mit Avemar.

In der Literatur finden sich bislang kaum Daten zu Untersuchungen an benignen Zelllinien. Comín-Anduix et al. überprüften den zytotoxischen Effekt von Avemar an humanen peripheren Blutlymphozyten. Sie stellten dabei fest, dass humane Lymphozyten einen 50-fach höheren  $EC_{50}$ -Wert aufweisen als die ebenfalls von ihnen untersuchten Zellen der T-Zell-Leukämiezelllinie Jurkat (Comín-Anduix et al., 2002). Fajka-Boja et al. zeigten, dass 1 mg/mL Avemar nach einer Inkubation von 24 Stunden zu einem deutlichen Anstieg apoptotischer Zellen bei Zellen der Jurkatzelllinie führte, nicht aber bei humanen peripheren Blutmonozyten (Fajka-Boja et al., 2002).

Die Wirkung von Avemar auf benignen Zelllinien ist somit nicht eindeutig abzuschätzen. Umso bemerkenswerter erscheint es, dass bislang aus den klinischen Studien keine toxischen Nebenwirkungen von Avemar bekannt wurden. Einzig von Übelkeit, Erbrechen sowie Diarrhoe wurde berichtet (Jakab F et al., 2003 und Demidov LV et al., 2008); Nebenwirkungen, die auch von Zytostatika bekannt sind. In toxikologischen Studien zu Avemar an Mäusen und Ratten wurde ein LD<sub>50</sub>-Wert zwischen 2 und 3 g/kg Körpergewicht ermittelt. Die in den klinischen Studien verabreichte Dosis betrug ca. 9 g für eine durchschnittlich 70 kg schwere Person (Heimbach JT et al., 2007).

### **6.3 Wirkmechanismen von Benzochinonen und Avemar**

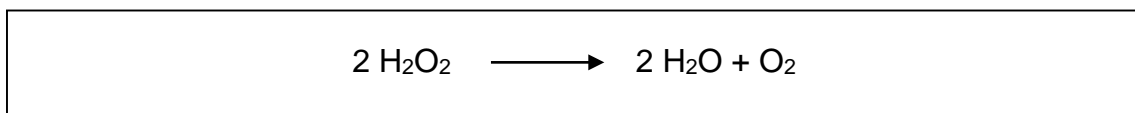
Die Daten der vorliegenden Arbeit führen unweigerlich zu der Frage nach den Mechanismen der von Avemar ausgelösten Effekte. Das Charakteristische an Avemar ist sein hoher Gehalt an 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinonen. Sie sind als Wirkmolekül von Avemar allgemein akzeptiert, auch wenn dies experimentell in keiner Weise gesichert ist. Fajka-Boja et al. werten ihre Ergebnisse, dass sowohl Benzochinone als auch Avemar bei verschiedenen T- und B-Tumorzelllinien Apoptose induzieren, als Hinweis dafür, dass Benzochinone tatsächlich das verantwortliche Wirkmolekül in Avemar darstellen (Fajka-Boja R et al., 2002). Auch die vorliegende Arbeit zeigt, dass sowohl Avemar, als auch die Referenzsubstanz 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinonen das Zellwachstum beeinflussen. Jedoch weisen Avemar und 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinonen völlig unterschiedliche Wirkprofile auf (siehe Tab. 4.3 und 4.4), so dass auch unterschiedliche Wirkmechanismen anzunehmen sind und nicht aufgrund einer vergleichbaren Wirkung von einem kausalen Zusammenhang zwischen dem Gehalt an Benzochinonen und der zytotoxischen Wirkung von Avemar auszugehen ist.

Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wie Wasserstoffperoxid durch Semichinonradikale ist ein wesentliches Merkmal bei der durch Benzochinone vermittelten Zytotoxizität (siehe Kapitel 1.2). Dementsprechend wurden in der vorliegenden Arbeit Benzochinone als Rein- bzw. Referenzsubstanz und Benzo-



chinone in Avemar auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die Bildung von Wasserstoffperoxid zu induzieren. Hierzu erhielten die getesteten Zellen, die entweder mit Benzochinonen bzw. Avemar inkubiert wurden, zusätzlich das Enzym Katalase oder das Glutathion-Vorläufermolekül N-Acetylcystein. Beide Strategien sollten die Zellen vor der zytotoxischen Wirkung von Benzochinonen als Reinstoff und als Bestandteil von Avemar schützen.

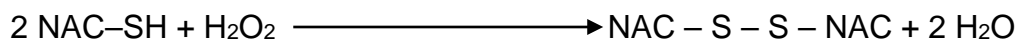
Katalase ist ein in Peroxisomen lokalisiertes Enzym, das die Zelle vor reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wie Wasserstoffperoxid schützt. Diese entstehen in der mitochondrialen Atmungskette beim sogenannten oxidativen Stress, wenn weniger als vier Elektronen auf ein Molekül Sauerstoff übertragen werden. Das Enzym Katalase zerstört Wasserstoffperoxid nach folgender Reaktion (Abb. 6.1):



**Abb. 6.1: Katalase zerstört das Zellgift Wasserstoffperoxid in einer Disproportionierungsreaktion.** In der Summe werden dabei zwei Moleküle Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) zu zwei Molekülen Wasser und einem Molekül Sauerstoff disproportioniert. Chemisch versteht man hierunter, dass der Sauerstoff im Wasserstoffperoxid (Oxidationsstufe -1) sowohl zu molekularem Sauerstoff oxidiert (Oxidationsstufe 0) als auch zu Wasser (Oxidationsstufe -2) reduziert wird.

Von der Zelle aufgenommene Benzochinone induzieren reaktive Sauerstoffspezies (Kapitel 1.2). Zur Unterstützung der zelleigenen Katalase wurde Katalase zu den Zellen hinzugegeben (Abb. 4.9). Da die extrazelluläre Katalase mit einem Molekulargewicht von 250 kDa (Schroeder WA et al., 1964) mit großer Wahrscheinlichkeit nicht in die Zelle gelangt, stellt sich die Frage, wie die protektive Wirkung der extrazellulären Katalase zu erklären ist. Denkbar wäre, dass das in der Zelle gebildete Wasserstoffperoxid im Gleichgewicht mit der Zellaußenseite steht. Das außerhalb der Zelle befindliche Wasserstoffperoxid kann nun von der extrazellulären Katalase abgebaut werden. Das Gleichgewicht zwischen Innen- und Außenseite der Zelle sorgt dafür, dass ständig Wasserstoffperoxid nachdiffundiert, die intrazelluläre Konzentration von Wasserstoffperoxid kontinuierlich abnimmt und so die Zelle vor der toxischen Wirkung von Wasserstoffperoxid geschützt wird (Abb. 1.2).

N-Acetylcystein wurde ebenfalls in der vorliegenden Arbeit eingesetzt, um indirekt die Beteiligung von Wasserstoffperoxid an der toxischen Wirkung von Benzochinonen als Reinsubstanz und als Bestandteil von Avemar nachzuweisen. N-Acetylcystein schützt die Zelle auf zwei Wegen vor reaktiven Sauerstoffspezies. Als Vorläufermolekül von Glutathion (GSH), dem wichtigsten endogenen Antioxidans der Zelle (Kapitel 1.2), unterstützt N-Acetylcystein zum einen die Regeneration von intrazellärem GSH (Cotgreave I et al., 1990). Zum anderen ist N-Acetylcystein in der Lage, mit reaktiven Sauerstoffspezies ohne Beteiligung entsprechender Enzyme direkt zu reagieren (Abb. 1.2 und 6.2) (Gilliessen A et al., 1997).



**Abb. 6.2: N-Acetylcystein zerstört das Zellgift Wasserstoffperoxid in einer Redoxreaktion.** Hierbei wird Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) zu Wasser reduziert und die Thiol-Gruppe (-SH) von N-Acetylcystein (NAC) zu einer Disulfidbrücke (-S-S-) oxidiert. Dabei kann N-Acetylcystein direkt mit Wasserstoffperoxid reagieren.

Sowohl das Enzym Katalase als auch N-Acetylcystein sind in der Lage, die zytotoxische Wirkung der Benzochinone nahezu vollständig zu verhindern. Die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies ist demnach ein wesentlicher Bestandteil der zytotoxischen Wirkung von Benzochinonen. Für Benzochinone aus Avemar wurde dies nicht gezeigt (Abb. 4.9, 4.10 und 10.27). Der zytotoxische, aber auch der zytostatische Effekt von Avemar scheinen somit auf einem Mechanismus zu beruhen, der weitestgehend unabhängig von der durch Benzochinone induzierten Bildung von Semichinonradikalen und reaktiven Sauerstoffspezies ist. Damit ist fraglich, ob der in der Einleitung beschriebene Einfluss von Avemar auf den Energie- und Substratstoffwechsel der Zelle (Abb. 1.3) durch Semichinonradikale bzw. reaktive Sauerstoffspezies ausgelöst wird.

Für Avemar wurden verschiedene Wirkqualitäten beschrieben, die gut mit den  $EC_{50}$ -Werten korrelieren (Kapitel 4.1). Auf sämtliche Zelllinien mit einem  $EC_{50}$ -Wert von unter 6 mg/mL wirkte Avemar zytotoxisch, während bei einem  $EC_{50}$ -Wert von über 6 mg/mL eine zytostatische Wirkung beobachtet wurde (Abb. 4.1 und Tab. 4.1). Hiervon gab es lediglich zwei Ausnahmen (U-138 98 und HRT-18). Dies kann als Hinweis dafür gewertet werden, dass zwischen der Empfindlichkeit der einzelnen Zelllinien gegenüber Avemar und der Avemar-Wirkung ein Zusammenhang besteht. Möglicherweise kommen je nach Empfindlichkeit der Zelllinien Mechanismen zum Tragen, die bei einer empfindlichen Zelllinie zu einem zytotoxischen und bei einer weniger empfindlichen Zelllinie zu einem zytostatischen Effekt führen.

Einen weiteren Hinweis dafür, dass die Bildung von Wasserstoffperoxid nicht wesentlich für die Wirkung von Avemar ist, liefert die Beobachtung, dass die beiden Glioblastomzelllinien U-251 und U-13898 zwar sehr empfindlich auf die Inkubation mit Wasserstoffperoxid reagieren (Klingelhoeffer et al., 2012), gegenüber Avemar aber unempfindlich sind (Abb. 4.1 und Tab. 4.1). Würde der zytotoxische Effekt von Avemar auf die Bildung von Wasserstoffperoxid beruhen, dann wäre zu erwarten gewesen, dass die beiden Glioblastomzelllinien ebenfalls empfindlich auf Avemar reagieren.

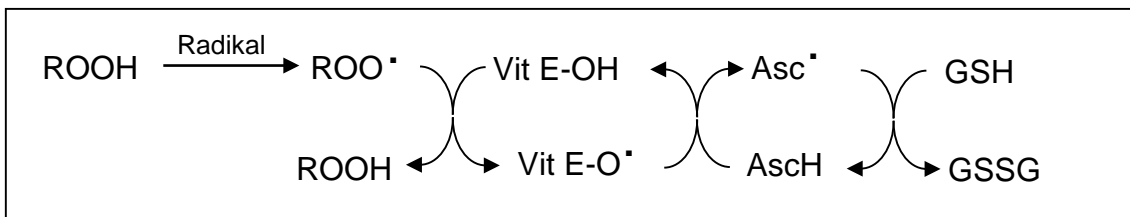
Die zytotoxische Wirkung von Benzochinonen bei der benignen Zelllinie NHDF-p war wesentlich schwächer als bei den Tumorzelllinien HT-29, BxPC-3 und ASPC-1. Dies kann als Hinweis gewertet werden, dass Benzochinone selektiv auf Tumorzellen wirken. Eine Erklärung hierfür könnte die Beobachtung sein, dass in zahlreichen Tumorzelllinien der Anteil antioxidativer Enzyme erheblich geringer ist als in benignen Zelllinien (Oberley TD et al., 1997). Zellen von Tumorzelllinien wären somit anfälliger für die durch Benzochinone induzierten reaktiven Sauerstoffspezies. Solche reaktiven Sauerstoffspezies können zu oxidativen Stress führen, wenn die Zelle nicht mehr in der Lage ist, diese effektiv zu beseitigen (Sies H, 1993).

In der vorliegenden Arbeit wurden Daten von Szent-Gyorgyi bestätigt, dass geeignete Elektronendonoren wie Ascorbinsäure die Bildung von Semichinonradikalen fördern und damit die Zytotoxizität von Benzochinonen beeinflussen. Ein weiterer Weg, der bereits in der Einleitung beschrieben wurde, basiert auf der Oxidation des zelleigenen wasserstoffübertragenden Coenzym NADPH (Kapitel 1.2). Möglicherweise ist ein hoher Anteil an NADPH in der Zelle dafür verantwortlich, dass von sämtlichen in dieser Arbeit getesteten Zelllinien einzig die Pankreaskarzinomzelllinie BxPC-3 (Abb. 4.8) keine Ascorbinsäure zur Bildung von Semichinonradikalen benötigt. Diese Vermutung ist aber noch durch entsprechende Experimente zu bestätigen.

Bei der Interaktion zwischen Benzochinonen und Ascorbinsäure entstehen nicht nur Semichinonradikale, sondern auch Ascorbatradikale (Pethig et al., 1983). Auch diese Radikale führen zwar zu zytotoxischen Schäden (Klingelhöffer C et al., 2012), doch sind hierfür weitaus höhere Konzentrationen erforderlich als in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurden; die Konzentration von 2,4 mmol/L Ascorbinsäure war für sämtliche Zelllinien nicht zytotoxisch.

Im Gegensatz zu den Benzochinonen als Reinsubstanz war die zytotoxische Wirkung von Benzochinonen in Avemar nicht durch Zugabe von Ascorbinsäure zu verstärken. Die Datenlage hierzu ist aber nicht eindeutig. Zwar zeigten Illmer et al., dass durch Zugabe von Ascorbinsäure der EC<sub>50</sub>-Wert von Avemar um bis zu 36 % gesenkt wurde, was mit einer Steigerung der zytotoxischen Wirksamkeit einhergeht (Illmer C et al., 2005). Die Daten dieser Publikation sind aber kritisch zu bewerten, da die von den Autoren gewählten Konzentrationen von 50 und 100 mmol/L Ascorbinsäure zu einer erheblichen Beeinträchtigung der Zellvitalität führen. Daten der eigenen Gruppe bestätigen den zytotoxischen Charakter beider Ascorbinsäure-Konzentrationen (Klingelhöffer et al., 2012). Dass die Autoren dennoch einen synergistischen Effekt zwischen Avemar und Ascorbinsäure diskutieren, begründen sie damit, dass Ascorbinsäure möglicherweise die wirksamen Inhaltsstoffe von Avemar vor Oxidation schützt.

Die Frage, warum Avemar andere Eigenschaften aufweist als die Referenzsubstanz 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinone, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht eindeutig beantwortet werden. Möglicherweise wird die Wirkung der Benzoquinone durch Antioxidantien gehemmt, die wie Vitamin E ebenfalls in Weizenkeimen natürlich vorkommen. Weizenkeime weisen mit 0,3 – 0,74 mg pro Gramm Trockensubstanzen einen hohen Gehalt an Vitamin E auf (Brandolini A et al., 2012), insbesondere an  $\alpha$ -Tocopherol. Vitamin E – unter diesem Begriff werden die verschiedenen Isoformen von Tocopherolen und Tocotrienolen zusammengefasst – ist neben Gluthation ein wichtiges Antioxidans der Zelle. Die wesentliche Schutzfunktion von Vitamin E ist, mehrfach ungesättigte Fettsäuren von Membranlipiden vor der Lipidperoxidation durch freie Radikale zu schützen und damit die Integrität der Plasmamembran aufrechtzuhalten (Abb. 6.3) (Packer L et al., 2001).



**Abb. 6.3: Vitamin E schützt Fettsäuren von Membranlipiden vor der Lipidperoxidation durch freie Radikale.** Bei der Lipidperoxidation reagieren freie Radikale mit Fettsäuren und entfernen ein Elektron aus dem Molekül, wobei ein Fettsäureradikal entsteht. Es wird eine Kettenreaktion in Gang gesetzt, die zur Schädigung der Plasmamembran führt. Vitamin E bietet der Zelle vor dieser Reaktion Schutz, indem es an das Fettsäureperoxy-Radikal ein Elektron abgibt. Dabei wird aus Vitamin E selbst wiederum ein Radikal. Zur Regeneration von Vitamin E wird dieses Radikal durch Ascorbinsäure reduziert. Das hierdurch entstehende Ascorbinsäureradikal wiederum wird durch Glutathion regeneriert. AscH = Ascorbinsäure, Asc<sup>•</sup> = Ascorbinsäureradikal, GSH = Glutathion, GSSG = Glutathiondisulfid, ROOH = Fettsäure, ROO<sup>•</sup> = Fettsäureperoxy-Radikal, Vit E-OH = Vitamin E, Vit E-O<sup>•</sup> = Vitamin E-Radikal.

Zum jetzigen Zeitpunkt spricht nichts gegen die Annahme, dass Avemar ebenfalls einen hohen Gehalt an Vitamin E aufweist und damit theoretisch ebenfalls in der Lage wäre, Semichinonradikale abzufangen und so die zytotoxische Wirkung der Benzoquinone teilweise bzw. vollständig aufzuheben.

## **6.4 Weitere potentielle Wirkmoleküle in Avemar**

Da Benzochinone mit großer Wahrscheinlichkeit nicht das wesentliche Wirkmolekül von Avemar zu sein scheinen, stellt sich die Frage nach weiteren möglichen Kandidaten.

Recherchen ergaben, dass Weizenkeime nicht nur reich an Benzochinonen, sondern auch an Apigenin sind. Apigenin ist ein Molekül, das zu den Flavonen, einer Untergruppe der sekundären Pflanzenstoffe aus der Familie der Flavonoide, gehört. Apigenin kommt in Weizenkeimen vor und wird dort mit einem Gehalt von 2-3 mg pro Gramm Trockensubstanz ebenfalls wie Benzochinone in Form von Glykosiden gespeichert. Dies wurde bereits in den 1960er Jahren nachgewiesen (King HGC, 1962). Flavonoide im Allgemeinen und Apigenin im Speziellen weisen vielfältige biologische Eigenschaften auf. So wirkt Apigenin präventiv auf die Entstehung von Tumoren, hemmt das Wachstum von Tumorzellen und Metastasen und besitzt entzündungshemmende Eigenschaften. Die anti-Tumorwirkung von Apigenin beruht u.a. auf der Induktion von Apoptose und Hemmung der Zellteilung, was auch für Avemar beschrieben ist (Patel D et al., 2007). Es ist also durchaus vorstellbar, dass durch den Fermentierungsprozess bei der Herstellung von Avemar nicht nur Benzochinone, sondern auch Apigenin aus seinen glykosidischen Bindungen in den Weizenkeimen freigesetzt wird und letzteres für die Wirkung von Avemar verantwortlich ist.

Der fermentierte Weizenkeimextrakt Avemar hat sich in verschiedenen klinischen Studien als ein nebenwirkungsarmes und gut verträgliches Nahrungsergänzungsmittel erwiesen. Zahlreiche onkologische Patienten sind überaus motiviert zusätzlich zur leitliniengerechten Therapie weitere Maßnahmen gegen ihr Krebsleiden zu ergreifen. Ein zu begrüßender Schritt zur ganzheitlichen Betreuung solcher onkologischer Patienten wäre sicherlich die Empfehlung von Supportivprodukten, für die ein wissenschaftlicher Nachweis ihrer Wirksamkeit vorliegt.

Zum jetzigen Zeitpunkt ist es nicht möglich, die Wirkmoleküle in Avemar zu benennen, die durch Beeinflussung des Energie- und Substratstoffwechsels zum Zelltod führen (Abb. 1.3). Avemar ist zwar reich an 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinonen, doch legen die Daten der vorliegenden Arbeit den Schluss nahe, dass diese Benzochinone nicht das für Avemar relevante Wirkmolekül repräsentieren.

## 7 Ausblick

---

Es ist erwiesen, dass Ernährung ein wesentlicher Risikofaktor für die Entstehung maligner Erkrankungen sein kann. Dies gilt besonders für das kolorektale Karzinom. Umgekehrt kann sich eine ausgewogene Ernährung präventiv auf die Karzinogenese auswirken. Somit ist es naheliegend, die anti-Tumorwirkung bestimmter, in der Natur vorkommender Stoffe für therapeutische Ansätze zu nutzen. Doch gerade die Vielzahl potentieller Wirkmoleküle in komplexen Stoffgemischen wie Avemar erschwert die eindeutige Identifizierung grundlegender Wirkmechanismen.

In der vorliegenden Arbeit wurden für 10 mg/mL Avemar die drei Wirkqualitäten zytotoxisch, zytostatisch und wachstumsverzögernd nachgewiesen. Damit unterscheidet sich Avemar eindeutig von der zelltoxischen Wirkung einer äquimolaren Konzentration an 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinonen. Deshalb sollte untersucht werden, ob die Beeinflussung des Energie- und Substratstoffwechsels durch Avemar (Abb. 1.3) tatsächlich durch Semichinonradikale bzw. reaktive Sauerstoffspezies ausgelöst wird, oder ob andere Wirkmoleküle hieran beteiligt sind. Ein vielversprechendes Molekül in Weizenkeimen, das für die Avemar-Wirkung verantwortlich sein könnte, ist Apigenin. Der Nachweis von Apigenin in Avemar mit Hilfe analytischer Methoden wäre somit ein wichtiger Schritt zur weiteren Aufklärung der Wirkmechanismen von Avemar.

Das Potential von Avemar liegt sicherlich nicht darin, etablierte Chemotherapien zu verdrängen, sondern vielmehr in seiner synergistischen Wirkung mit Zytostatika. Das Ausbleiben toxischer Effekte durch Avemar macht den Weizenkeimextrakt dabei besonders attraktiv. Deshalb sollte überprüft werden, ob auch ein nicht fermentierter Weizenkeimextrakt ähnliche Effekte wie Avemar aufweist; d.h. ob das Herstellungsverfahren von Avemar überhaupt nötig ist, um den Effekt von Weizenkeimen therapeutisch zu nutzen. Es überrascht, dass dies bisher so noch nicht untersucht wurde.



## 8 Zusammenfassung

---

Avemar ist ein fermentierter Weizenkeimextrakt mit einem hohen Gehalt an 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinonen. Der ungarische Nobelpreisträger Albert Szent-Györgyi zeigte in den 1980er Jahren für diese Benzochinone, dass sie langlebige Semichinonradikale mit starker zytotoxischer Wirkung in Gegenwart geeigneter Elektronendonoren wie Ascorbinsäure bilden. Weizenkeime stellen eine natürliche Quelle für Benzochinone dar, zudem ist eine zytotoxische Wirkung von Avemar auf Tumorzellen belegt. Ebenso wurde die supportive Wirkung von Avemar für onkologische Patienten gezeigt. In der Literatur wird die zelltoxische Wirkung von Avemar als Ergebnis des hohen Anteils an Benzochinonen diskutiert, wobei dies bislang experimentell nicht eindeutig bestätigt ist.

Die Wirkung von Avemar wurde an 12 malignen und 3 benignen Zelllinien *in vitro* untersucht. Dazu wurden Konzentrationen von 0,1; 1; 10 und 50 mg/mL Avemar nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden untersucht. Der Anteil vitaler Zellen wurde mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt. Um Aussagen zur Dauer der Avemarwirkung machen zu können, wurde ebenfalls die Vitalität der Zellen in Avemar-freiem Medium nach einer weiteren Kultivierung für 24 bzw. 48 Stunden bestimmt.

Die zytotoxische Wirkung von Benzochinonen als Rein- bzw. Referenzsubstanz und als Bestandteil von Avemar wurde miteinander verglichen. Während die Referenzsubstanz für sämtliche getesteten Zelllinien stark zytotoxisch war, wies Avemar unterschiedliche Effekte auf. Der Einfluss von Avemar auf die unterschiedlichen Zelllinien wurde mit Hilfe der effektiven Konzentration quantifiziert. Dieser  $EC_{50}$ -Wert ist die Konzentration an Avemar, die nach einer Inkubation von 24 Stunden zu einem Effekt bei 50 % der Zellen führt. Eine Konzentration von 50 mg/mL Avemar war für nahezu sämtliche getesteten Zelllinien zytotoxisch, während eine Konzentration von 10 mg/mL Avemar bei 6 von 15 Zelllinien zytotoxisch, bei 8 von 15 Zelllinien zytostatisch und bei 1 von 15 Zelllinien wachstumsverzögernd wirkte. Zu den Zelllinien mit den niedrigsten  $EC_{50}$ -Werten

von unter 10 mg/mL Avemar gehören die beiden Pankreaskarzinomzelllinien ASPC-1 und BxPC-3 sowie die beiden Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-468. Der zytostatische Effekt von Avemar wurde bei EC<sub>50</sub>-Werten zwischen 6 und 32 mg/mL Avemar beobachtet. Bei diesen Zellen stagnierte der Anteil vitaler Zellen in der Nachbeobachtung oder nahm kontinuierlich weiter ab. Der wachstumsverzögernde Effekt von Avemar wurde bei der Zelllinie HRT-18 mit einem EC<sub>50</sub>-Wert von 10,23 mg/mL Avemar beobachtet.

Zusätzlich zu den zwölf malignen Zelllinien wurden auch die drei benignen Zelllinien HUVEC, NHDF-p und J 774.3 untersucht. Während HUVEC und NHDF-p einen EC<sub>50</sub>-Wert von weit über 10 mg/mL aufweisen (Abb. 4.1), reagieren die Zellen der murinen Makrophagenzelllinie J 774.3 mit einem EC<sub>50</sub>-Wert von 4,9 mg/mL Avemar weitaus empfindlicher auf die Inkubation mit Avemar. Die Wirkung von Avemar auf benignen Zelllinien ist somit nicht eindeutig abzuschätzen. Umso bemerkenswerter sind Daten verschiedener klinischer Studien, die bisher über keine toxischen Nebenwirkungen berichten.

Das Wirkmolekül von Benzochinonen sind Semichinonradikale bzw. reaktive Sauerstoffspezies. Um die Bildung von Semichinonradikalen auszulösen, sind Elektronendonoren wie Ascorbinsäure notwendig. Dies gilt für Benzochinone als Referenzsubstanz, nicht aber für Benzochinone in Avemar. Die zytotoxische Wirkung der Benzochinone als Referenzsubstanz wurde durch Zugabe von Katalase bzw. N-Acetylcystein nahezu vollständig aufgehoben. Katalase und N-Acetylcystein zerstören Wasserstoffperoxid, was bestätigt, dass an der zytotoxischen Wirkung von Benzochinonen Wasserstoffperoxid beteiligt ist. Für Benzochinone in Avemar wurde dies nicht beobachtet. Somit wurde erstmals gezeigt, dass Benzochinone mit großer Wahrscheinlichkeit nicht für die zytotoxische Wirkung von Avemar verantwortlich sind. Die Suche nach dem Hauptwirkmechanismus von Avemar darf deshalb als noch nicht abgeschlossen gelten.

## 9 Literaturverzeichnis

---

- Bachur NR, Gordon SL, Gee MV. **A general mechanism of microsomal activation of quinone anticancer agents to free radical.** *Cancer Research* 1978; 38: 1745-1750.
- Beck R, Verrax J, Dejeans N, Taper H, Calderon PB. **Menadione reduction by pharmacological doses of ascorbate induces an oxidative stress that kills breast cancer cells.** *International Journal of Toxicology* 2009; 28 (1):33-42.
- Boros LG, Lapis K, Szende B, Tömösközi-Farkas R, Balogh Á, 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: 141-147.
- Boros LG, Nichelatti M, Shoenfeld Y. **Fermented wheat germ extract (Avemar) in the treatment of cancer and autoimmune diseases.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 2005; 1051: 529-542.
- Brandolini A, Hidalgo A. **Wheat germ: not only a by-product.** *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 2012; 63 Suppl 1: 71-74.
- 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 in Jurkat T-cell leukemia tumor cells.** *The Journal of Biological Chemistry* 2002; 277 (48): 46408-46414.
- Cosgrove DJ, Daniels DGH, Greer EN, Hutchinson JB, Moran T, Whitehead JK. **Isolation of methoxy- and 2:6 dimethoxy-p-benzoquinone from fermented wheat germ.** *Nature* 1952; 169: 966-967.
- Cotgreave I, Moldéus P, Schuppe I. **The metabolism of N-acetylcysteine by human endothelial cells.** *Biochemical Pharmacology* 1991; 42 (1): 13-16.
- Demidov LV, Manziuk LV, Kharkevitch GY, Pirogova NA, Artamonova EV. **Adjuvant fermented wheat germ extract (Avemar™) nutraceutical improves survival of high risk skin melanoma patients: a randomized pilot phase II clinical study with a 7-year follow-up.** *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* 2008; 23 (4): 477-482.
- Fajka-Boja R, Hidvégi M, Shoenfeld Y, Ion G, Demydenko D, Tömösközi-Farkas R, Vizler Csaba, Telekes A, Resetar A, Monostori É. **Fermented wheat germ extract induces apoptosis and downregulation of major histocompatibility complex class I proteins in tumor T and B cell lines.** *International Journal of Oncology* 2002; 20: 563-570.

- Gillies RJ, Didier N, Denton M. **Determination of cell number in monolayer cultures.** *Analytical Biochemistry* 1986; 159 (1): 109-113.
- Gillissen A, Jaworska M, Orth M, Coffiner M, Maes P, App EM, Cantin AM, Schultze-Werninghaus G. **Nacystelyn, a novel lysine salt of N-acetylcystein, to augment cellular antioxidant defence in vitro.** *Respiratory Medicine* 1997; 91: 159-168.
- Heimbach JT, Sebestyen G, Semjen G, Kennepohl E. **Safety studies regarding a standardized extract of fermented wheat germ.** *International Journal of Toxicology* 2007; 26(3): 253-259.
- Hidvégi M, Rásó E, Tömösközi-Farkas R, Paku S, Lapis K, Szende B. **Effect of Avemar and Avemar+Vitamin C on tumor growth and metastasis in experimental animals.** *Anticancer Research* 1998; 18: 2353-2358.
- 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 Biotherapy and Radiopharmaceuticals* 1999; 14: 277-289.
- Huber W, Koella JC. **A comparison of three methods to estimate EC<sub>50</sub> in studies of drug resistance of malaria parasites.** *Acta Tropica* 1993; 55: 257-261.
- Illmer C, Madlener S, Horvath Z, Saiko P, Losert A, Herbacek I, Grusch M, Krupitza G, Fritzer-Szekeres M, Szekeres T. **Immunologic and biochemical effects of the fermented wheat germ extract Avemar.** *Experimental Biology and Medicine* 2005; 230: 144-149.
- Jakab F, Mayer A, Hoffmann A, Hidvégi M. **First clinical data of a natural immunomodulator in colorectal cancer.** *Hepato-Gastroenterology* 2000; 47: 393-395.
- Jakab F, Shoenfeld Y, Balogh Á, Nichelatti A, Kahán Zs, Lapis K, Mayer Á Sápy P, Szentpétery F, Telekes A, Thurzó L, Vágvölgyi A, Hidvégi M. **A medical nutriment has supportive value in the treatment of colorectal cancer.** *British Journal of Cancer* 2003; 89: 465-469.
- King HGC. **Phenolic compounds of commercial wheat germ.** *Journal of Food Science* 1962; 27 (5): 446-454.
- Klingelhoefter C, Kämmerer U, Koospal M, Mühlhing B, Schneider M, 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: 61-70.
- Koster AS. **Bioreductive activation of quinones: a mixed blessing.** *Pharm Weekbl [Sci]* 1991; 13(3): 123-126.

- Kueng W, Silber E, Eppenberger U. **Quantification of cells cultured on 96-well plates.** *Analytical Biochemistry* 1989; 182 (1): 16-19.
- Lushchak VI. **Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions.** *Journal of Amino Acids* 2012; Volume 2012 (2012), Article ID 736837, 26 pages doi:10.1155/2012/736837
- Packer L, Weber SU, Rimbach G. **Molecular aspects of  $\alpha$ -tocotrienol antioxidant action and cell signaling.** *Journal of Nutrition* 2001; 131: 369-373.
- Mueller T, Jordan K, Voigt W. **Promising cytotoxic activity profile of fermented wheat germ extract (Avenar<sup>®</sup>) in human cancer cell lines.** *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2011; 30: 42-48.
- Oberley TD, Oberley LW. **Antioxidant enzyme levels in cancer.** *Histology and Histo-pathology* 1997; 12(2): 525-535.
- O'Brien PJ. **Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity.** *Chemico-biological Interactions* 1991; 80: 1-41.
- Patel D, Shukla S, Gupta S. **Apigenin and cancer chemoprevention: progress, potential and promise (review).** *International Journal of Oncology* 2007; 30: 233-245.
- Pethig R, Gascoyne PRC, McLaughlin JA, Szent-Györgyi A. **Ascorbate-quinone interactions: electrochemical, free radical and cytotoxic properties.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1983; 80: 129-132.
- Powis G. **Free radical formation by antitumor quinones.** *Free Radical Biology & Medicine* 1989; 6: 63-101.
- Saiko P, Ozsvar-Kozma M, Madlener S, Bernhaus A, Lackner A, Grusch M, Horvath Z, Krupitza G, Jaeger W, Ammer K, Fritzer-Szekeres M, Szekeres T. **Avenar, a nontoxic fermented wheat germ extract, induces apoptosis and inhibits ribonucleotide reductase in human HL-60 promyelocytic leukemia cells.** *Cancer Letters* 2007; 250: 323-328.
- Schroeder WA, Shelton JR, Shelton JB, Olson BM. **Some amino acid sequences in bovine liver catalase.** *Biochim Biophys Acta* 1964; 89: 47-65.
- Sies H. **Strategies of antioxidant defense.** *European Journal of Biochemistry* 1993; 215(2): 213-219.
- Sukkar SG, Cella F, Rovera G, 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 (Avenar).** *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism* 2008; 1: 37-42.

- Takeda E, Weber G. **Role of ribonucleotide reductase in expression in the neoplastic program.** *Life Sci* 1981; 28: 1007-1014.
- Thomson RH. **Distribution of naturally occurring quinones.** *Pharm Weekbl [Sci]* 1991; 13: 70-73.
- Zalatnai A, Lapis K, Szende B, Rásó E, Telekes A, Resetár Á, Hidvégi M. **Wheat germ extract inhibits experimental colon carcinogenesis in F-334 rats.** *Carcinogenesis* 2001; 22 (10): 1649-1652.
- Zeeck A, Grond S, Papastavrou I Zeeck SC. **Chemie für Mediziner.** *Elsevier* 2005; 6. Auflage: 247.

## 10 Appendix

---

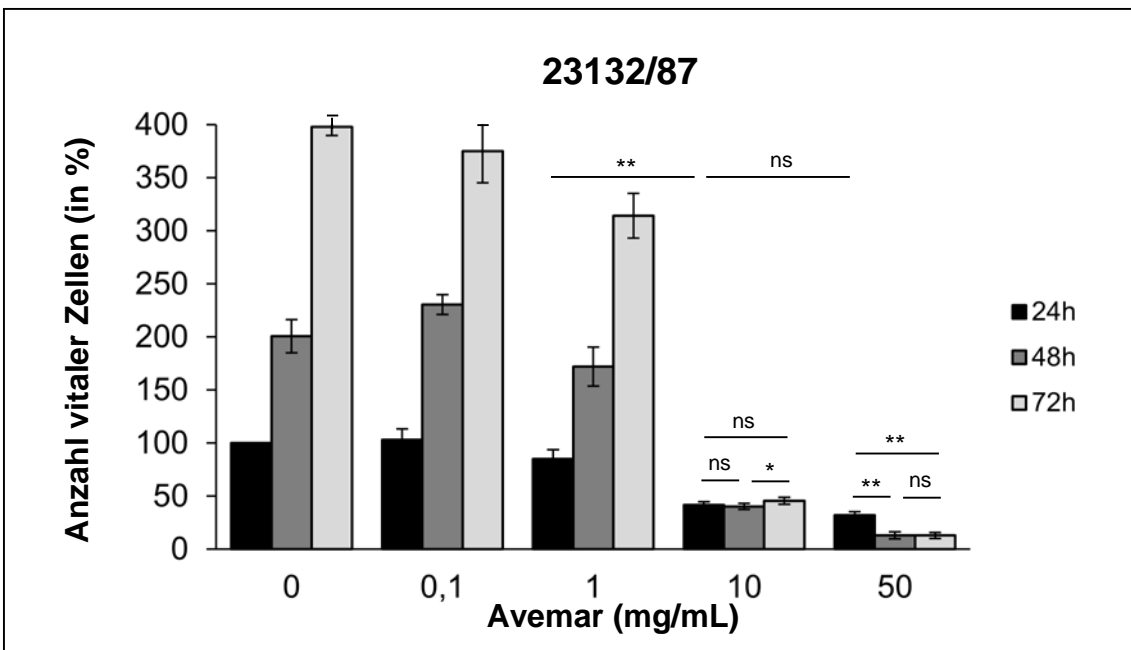
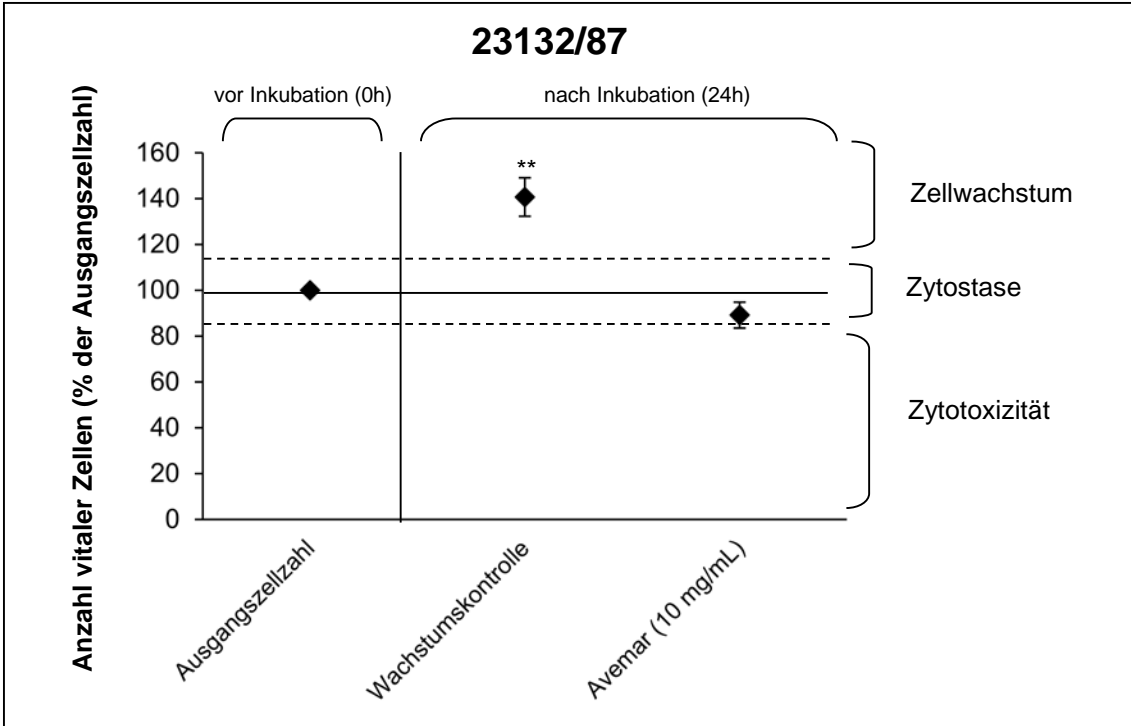
### 10.1 Effekte von Avemar nach einer Inkubation von 24 Stunden

Für die in diesem Kapitel gezeigten Daten gelten folgende Versuchsbedingungen: Die Zellen wurden mit den in den Abbildungen angegebenen Konzentrationen an Avemar für 24 Stunden inkubiert. Danach wurde Avemar aus den Kulturen entfernt und die Zellen für weitere 24 bzw. 48 Stunden kultiviert (Abb. 3.1). Jeweils nach 24, 48 und 72 Stunden Versuchsdauer wurde die Anzahl vitaler Zellen mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt (Kapitel 3.6). Kontrollen, hierbei handelte es sich um unbehandelte Zellen, waren der Basiswert, auf den die prozentuale Zu- und Abnahme vitaler Zellen bezogen wurde.

Um die drei Wirkqualitäten von Avemar zu unterscheiden, wurde die Anzahl vitaler Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit 10 mg/mL Avemar mit der Ausgangszellzahl, die bei Inkubationsbeginn gemessen wurde, verglichen.

Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung aus jeweils sechs Parallelwerten angegeben. Die Abbildungen zeigen repräsentative Ergebnisse von mehreren (n=3) unabhängigen Versuchsansätzen.

Zum Verständnis der Abbildungen sollte beachtet werden, dass jeweils in der oberen Abbildung die Ausgangszellzahl die Referenzgröße darstellt, um die drei Wirkqualitäten zytotoxisch, zytostatisch und verzögertes Zellwachstum nachzuweisen, während in der unteren Abbildung die Zellzahl nach 24 Stunden in Kultur als Referenzgröße herangezogen wurde.



**Abb. 10.1 (oben) und 10.2 (unten): Die Wirkung von Avemar auf Zellen der Magenkarzinomzelllinie 23132/87.** Siehe auch Tab. 4.1 und den Text auf S. 58. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , ns= nicht signifikant.



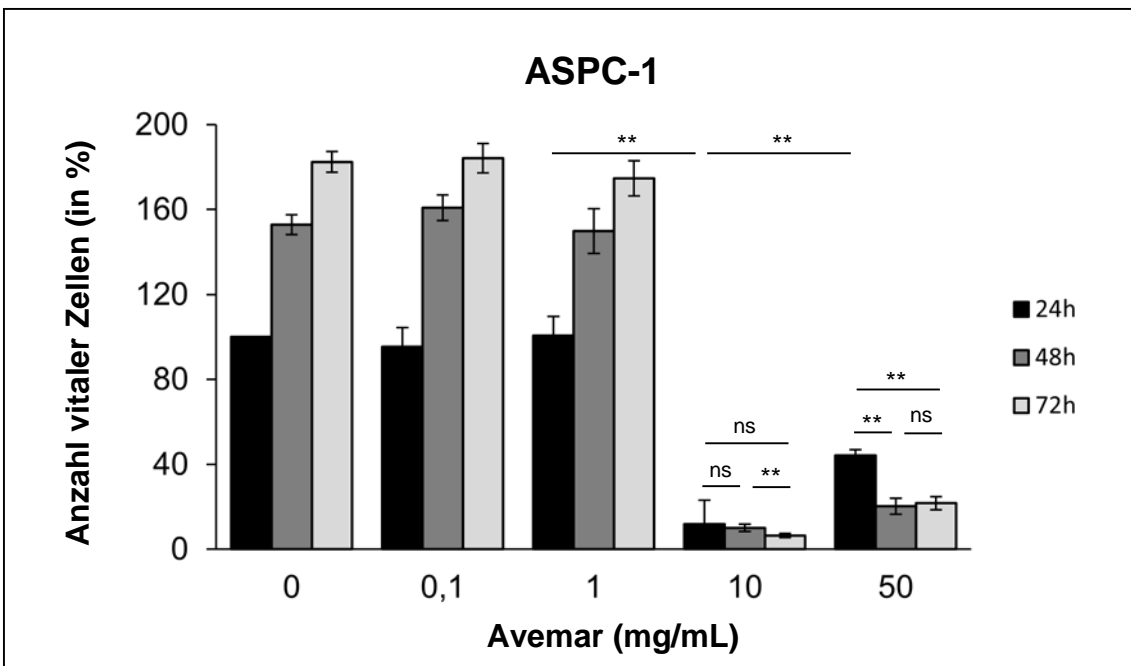
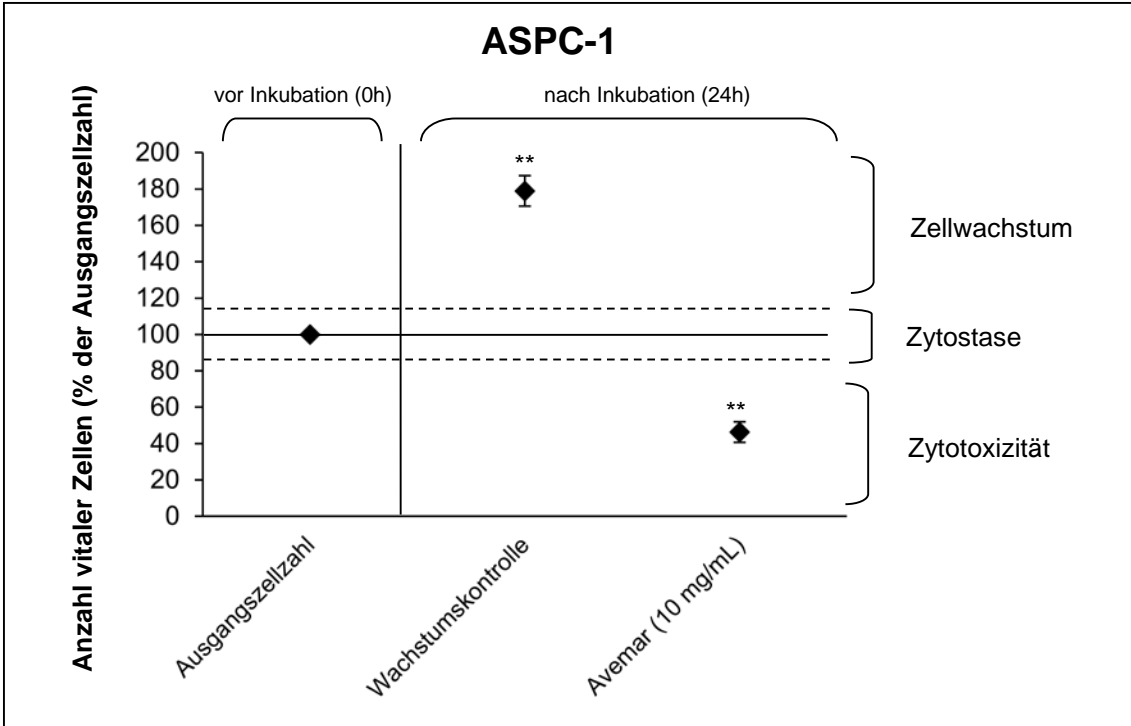


Abb. 10.3 (oben) und 10.4 (unten): Die Wirkung von Avemar auf Zellen der Pankreas-karzinomzelllinie ASPC-1. Siehe auch Tab. 4.1 und den Text auf S. 58. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , ns= nicht signifikant.

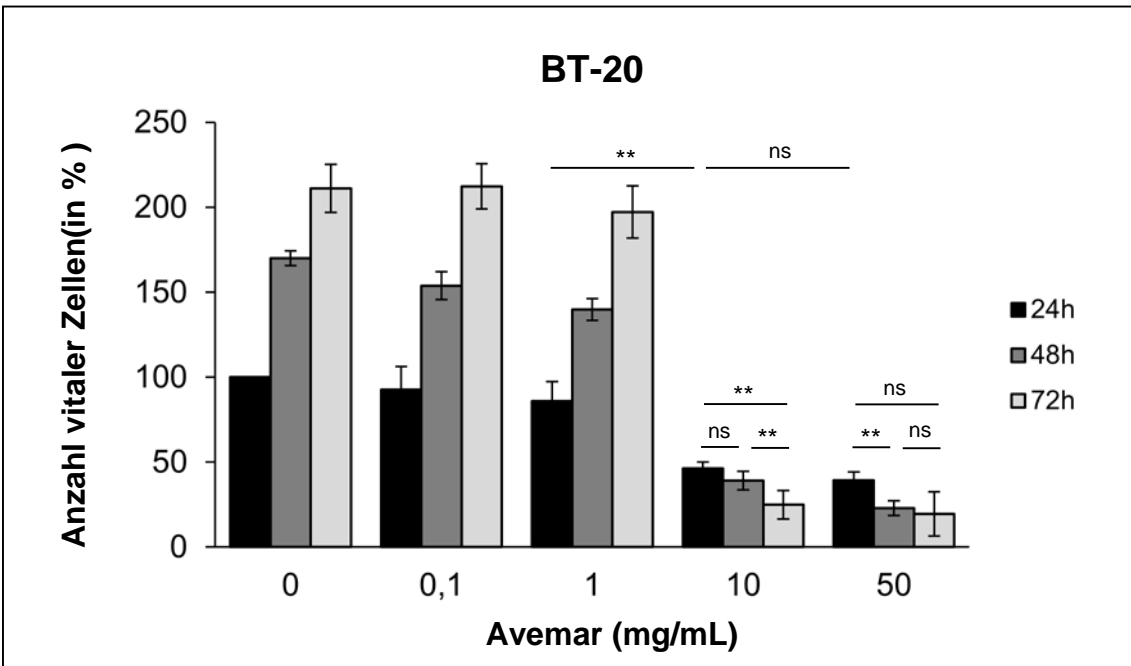
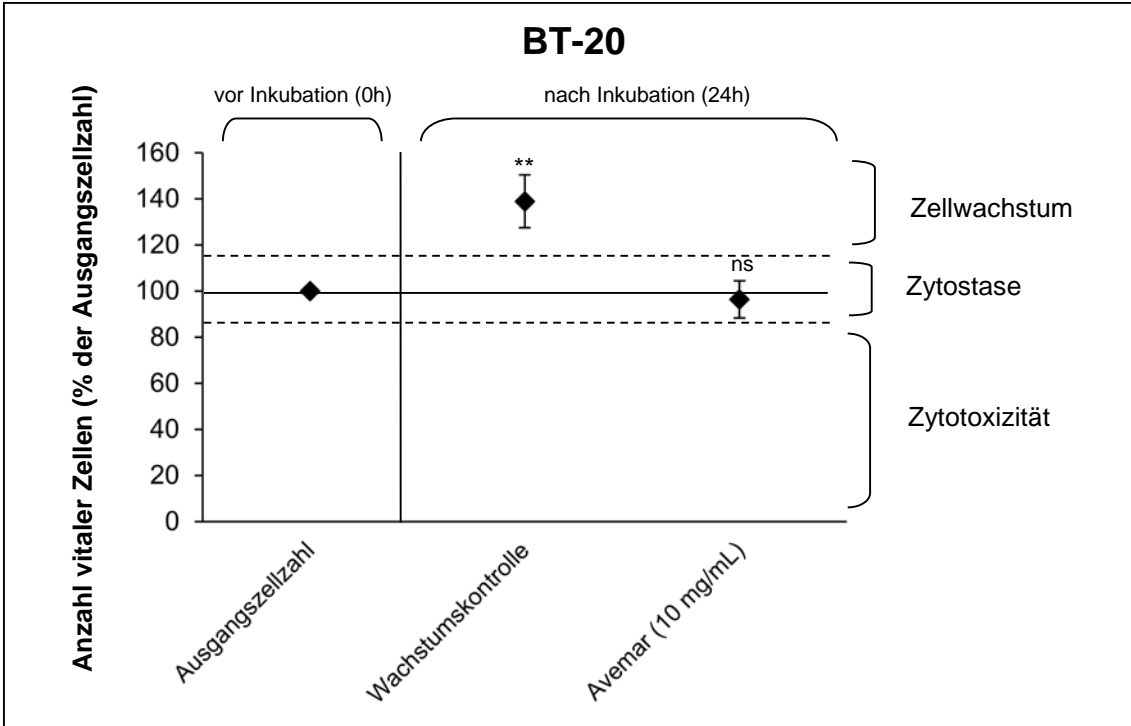


Abb. 10.5 (oben) und 10.6 (unten): Die Wirkung von Avemar auf Zellen der Mammakarzinomzelllinie BT-20. Siehe auch Tab. 4.1 und den Text auf S. 58. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , ns = nicht signifikant.

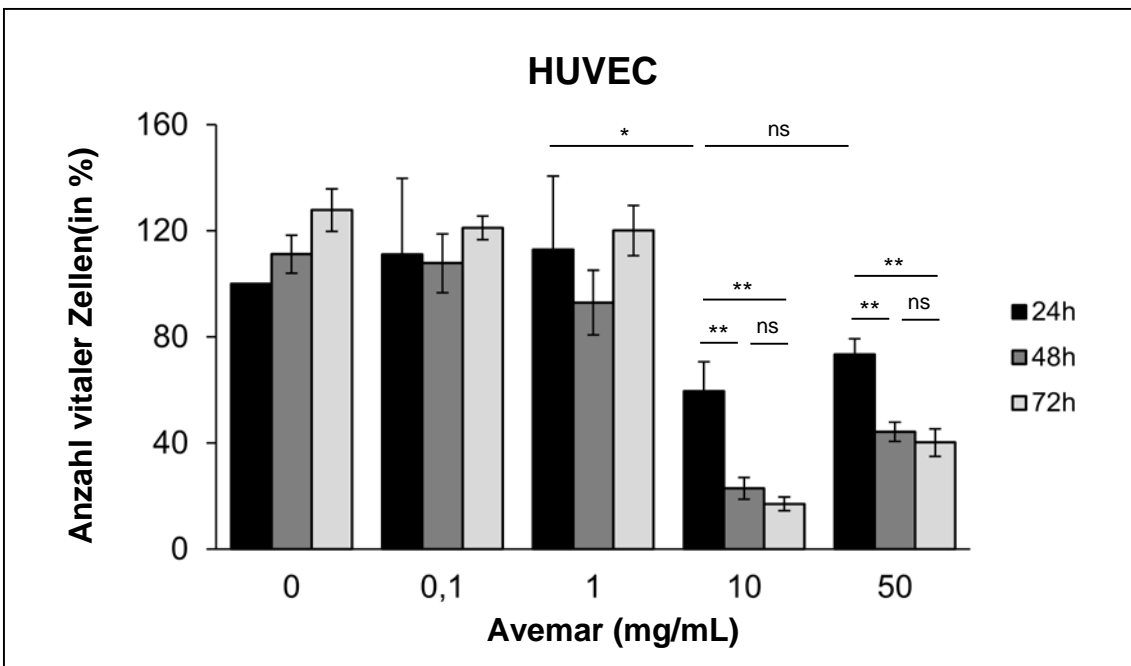
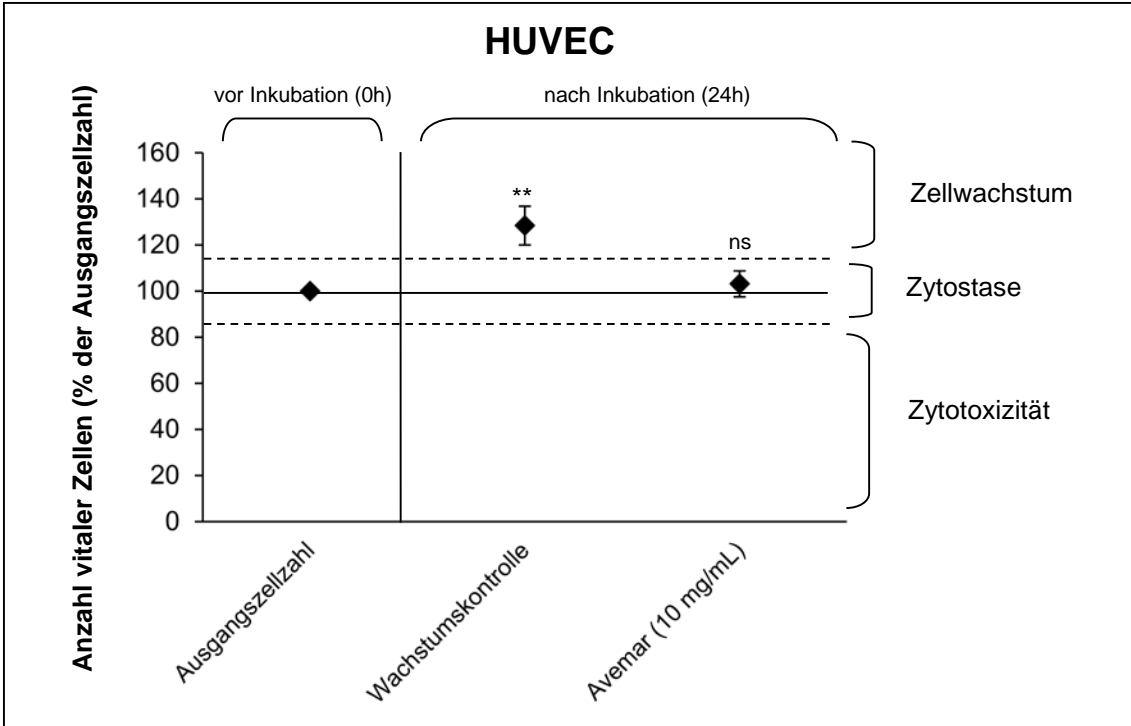


Abb. 10.7 (oben) und 10.8 (unten): Die Wirkung von Avemar auf humane Endothelzellen (HUVEC). Siehe auch Tab. 4.1 und den Text auf S. 58. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , ns= nicht signifikant.

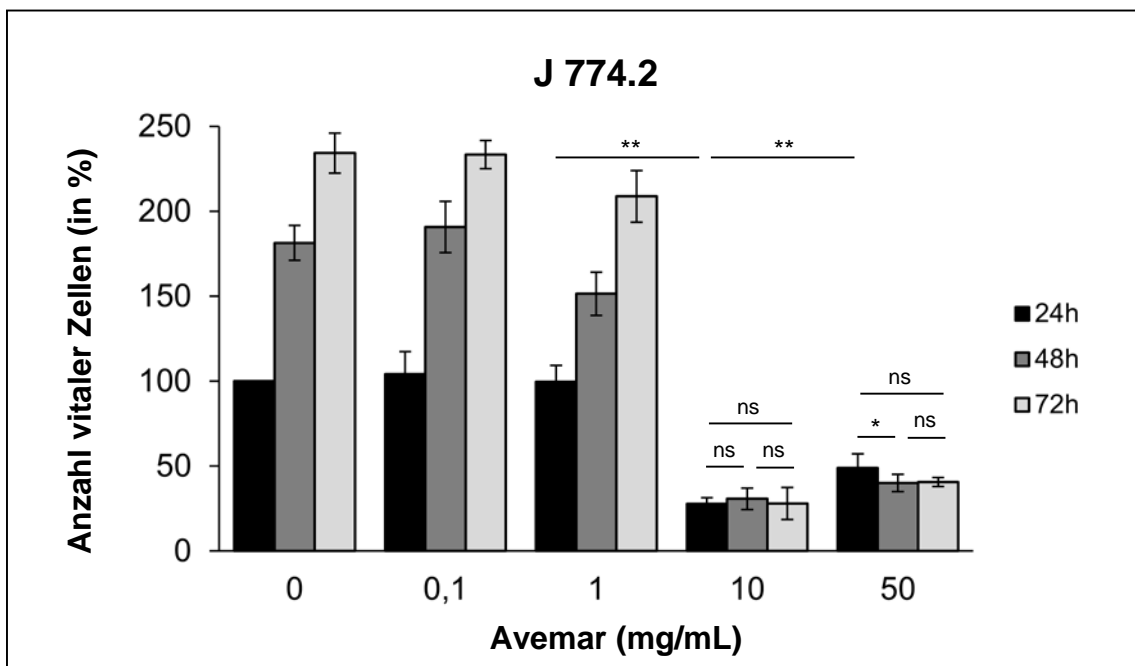
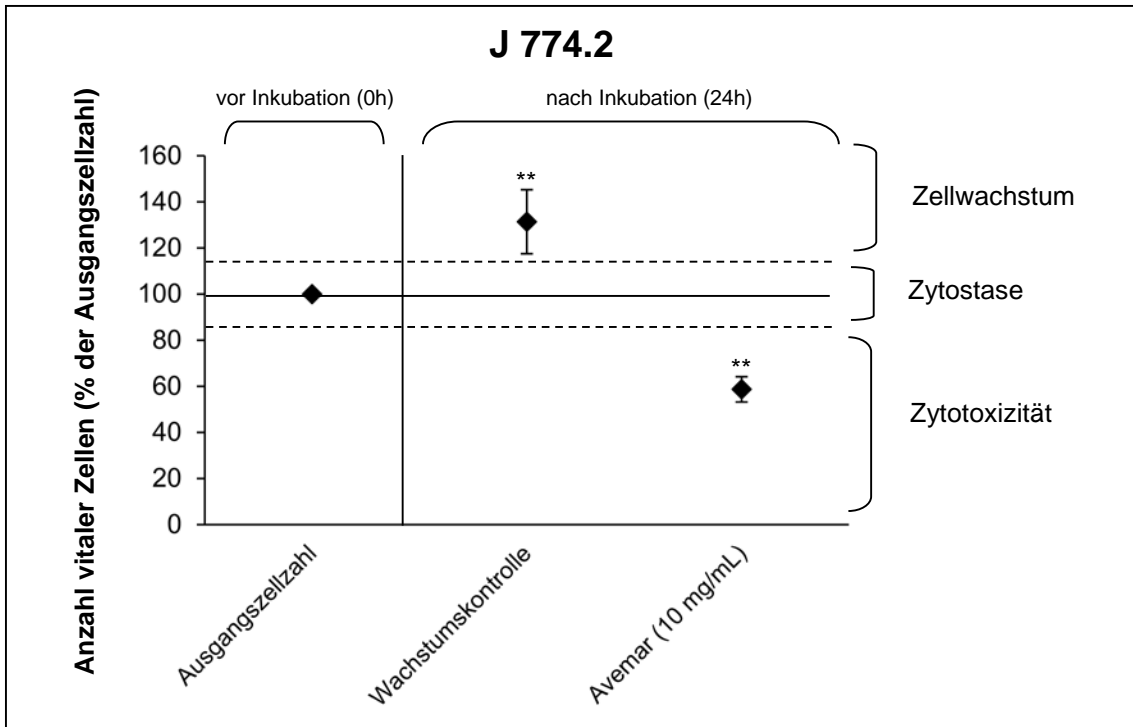


Abb.10.9 (oben) und 10.10 (unten): Die Wirkung von Avemar auf Zellen der murinen Makrophagenzelllinie J 774.2. Siehe auch Tab. 4.1 und den Text auf S. 58. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , ns= nicht signifikant.

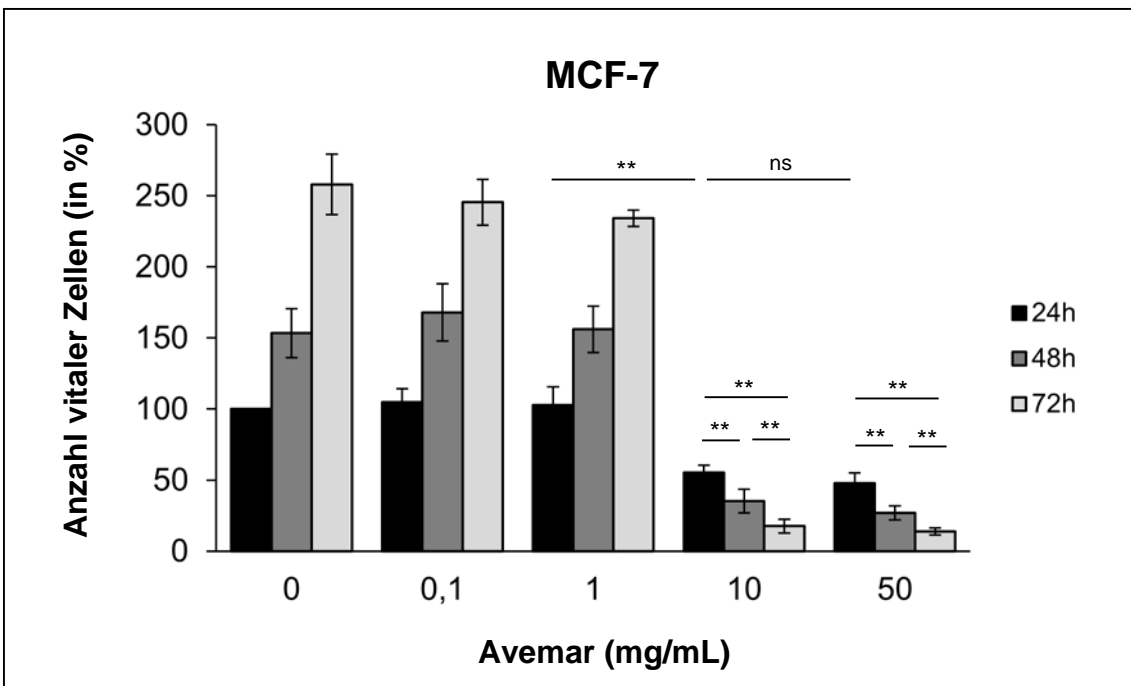
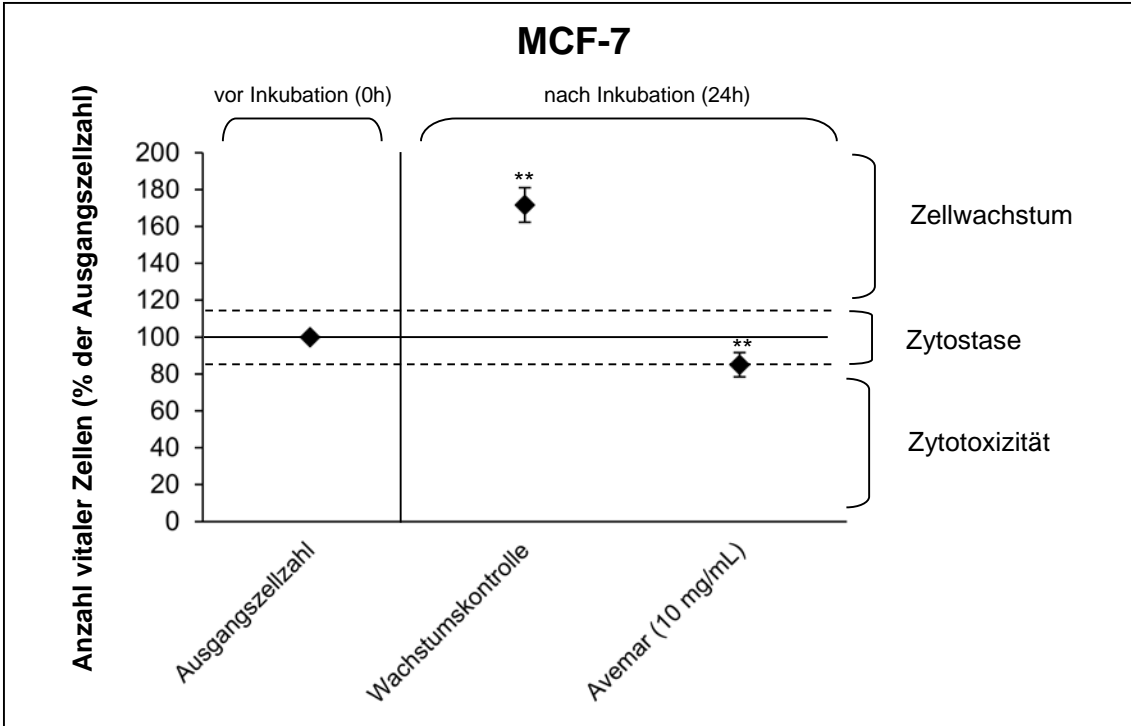


Abb. 10.11 (oben) und 10.12 (unten): Die Wirkung von Avemar auf Zellen der Mammakarzinomzelllinie MCF-7. Siehe auch Tab. 4.1 und den Text auf S. 58. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , ns= nicht signifikant.

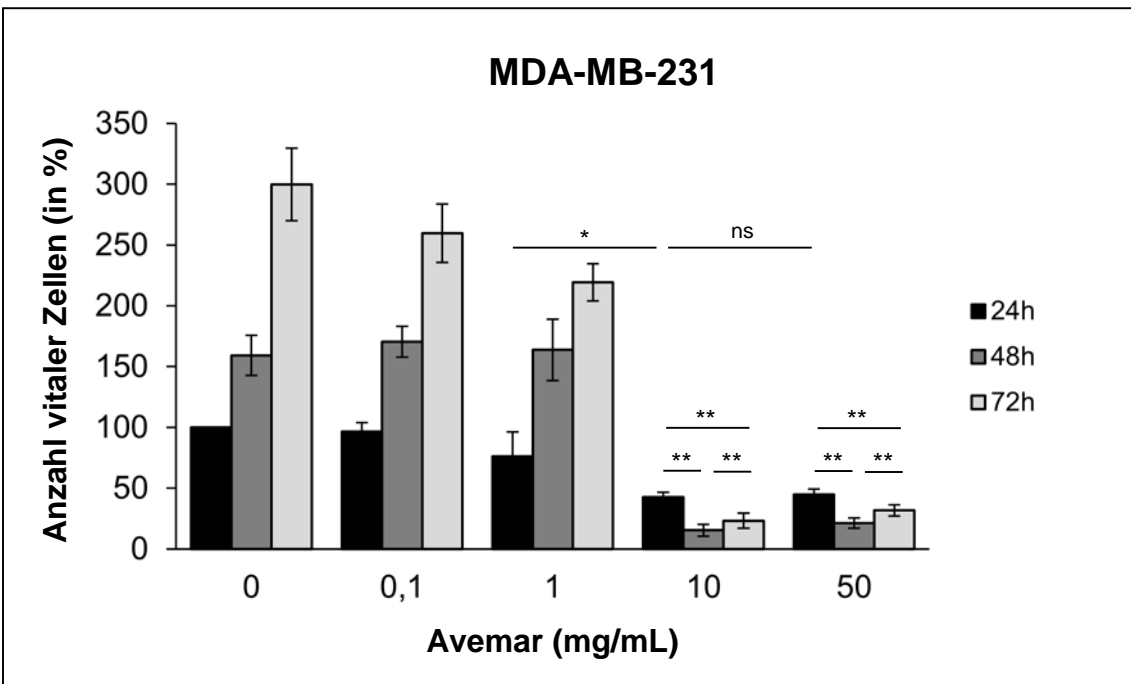
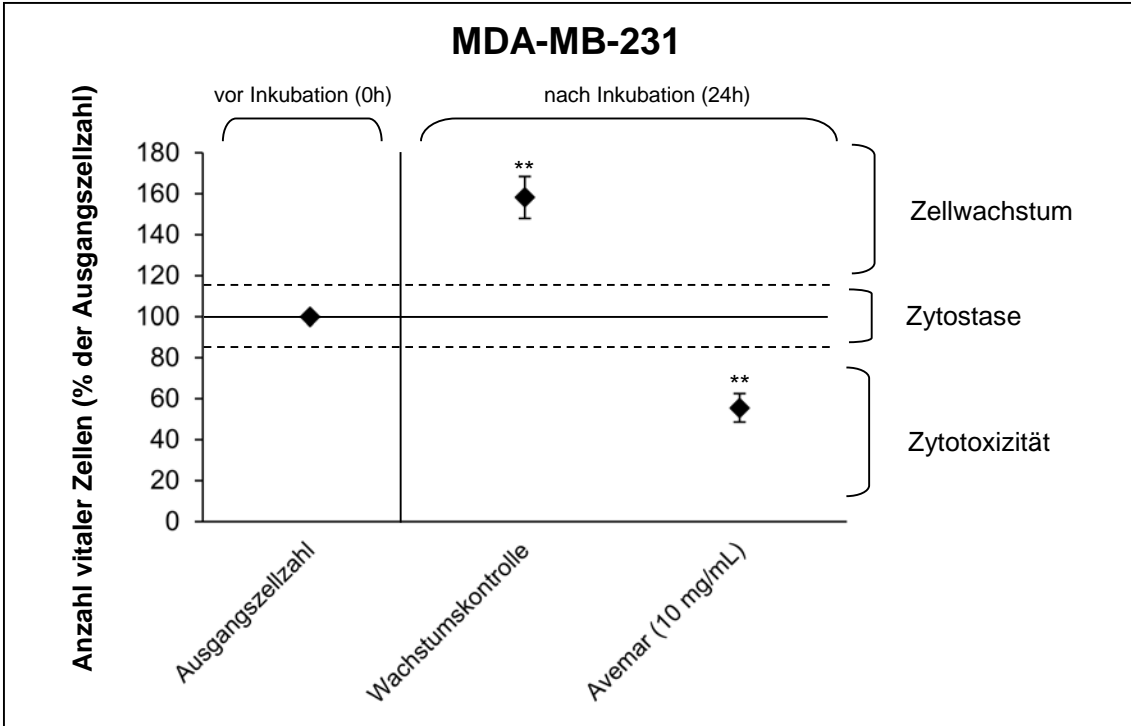


Abb. 10.13 (oben) und 10.14 (unten): Die Wirkung von Avemar auf Zellen der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231. Siehe auch Tab. 4.1 und den Text auf S. 58. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , ns= nicht signifikant.

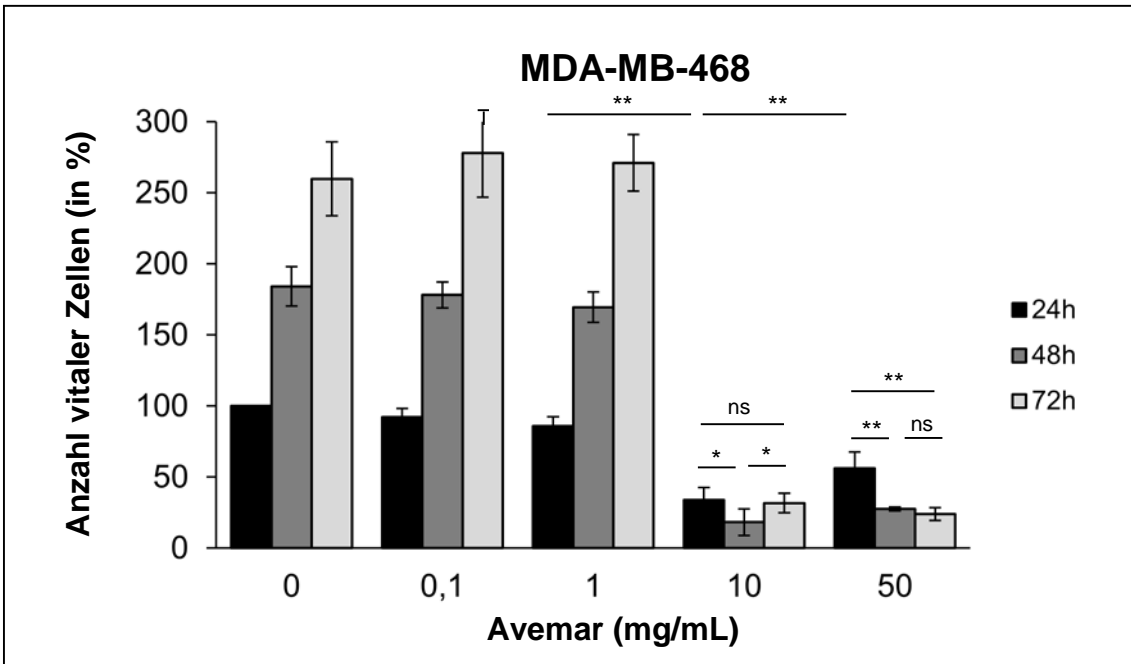
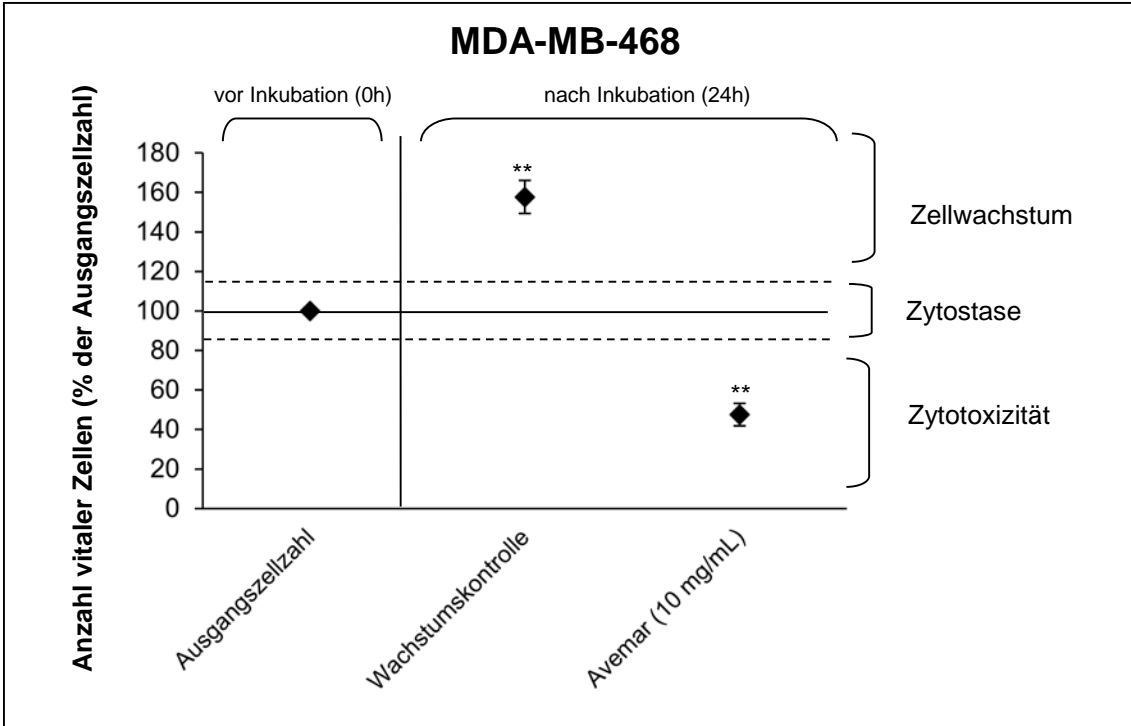
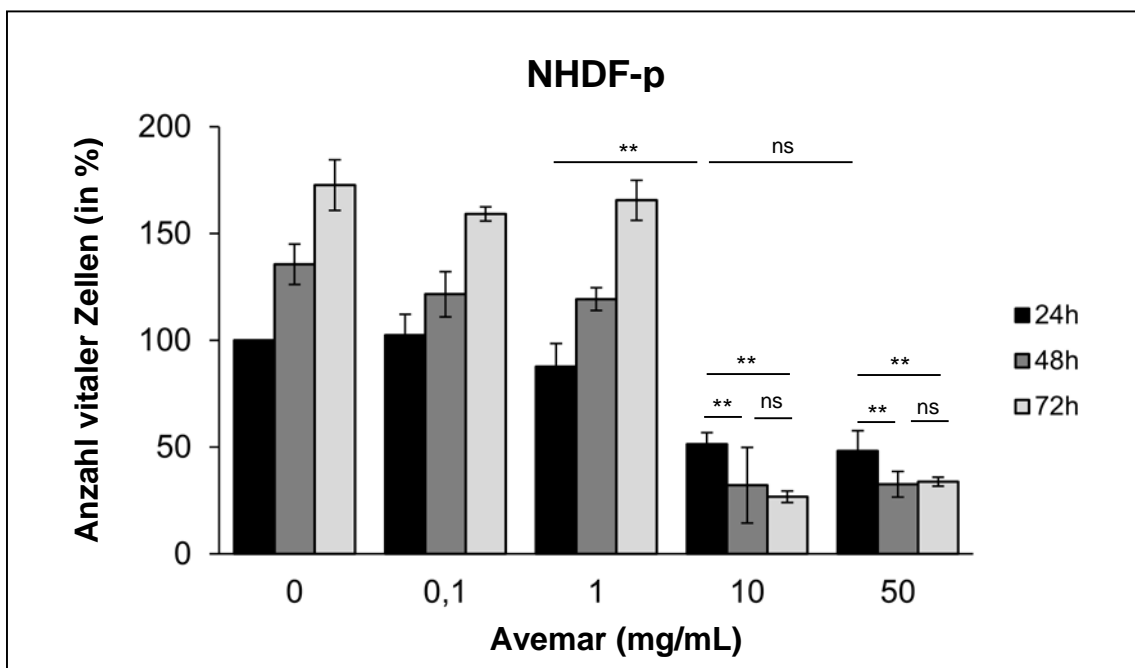
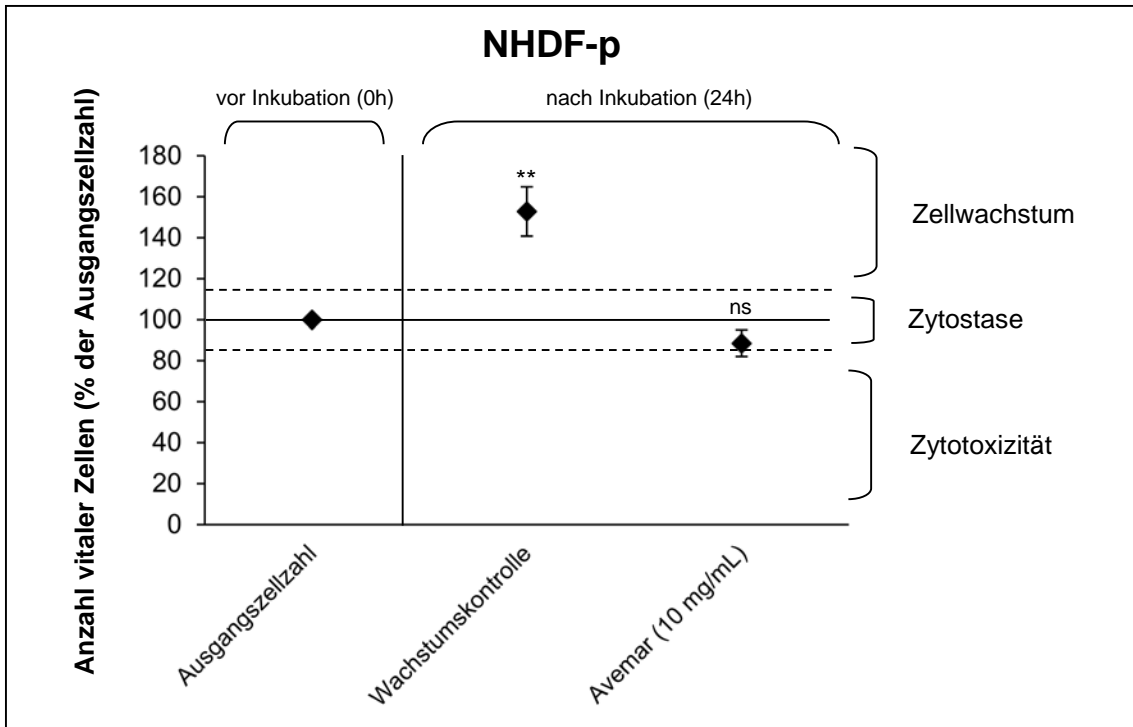
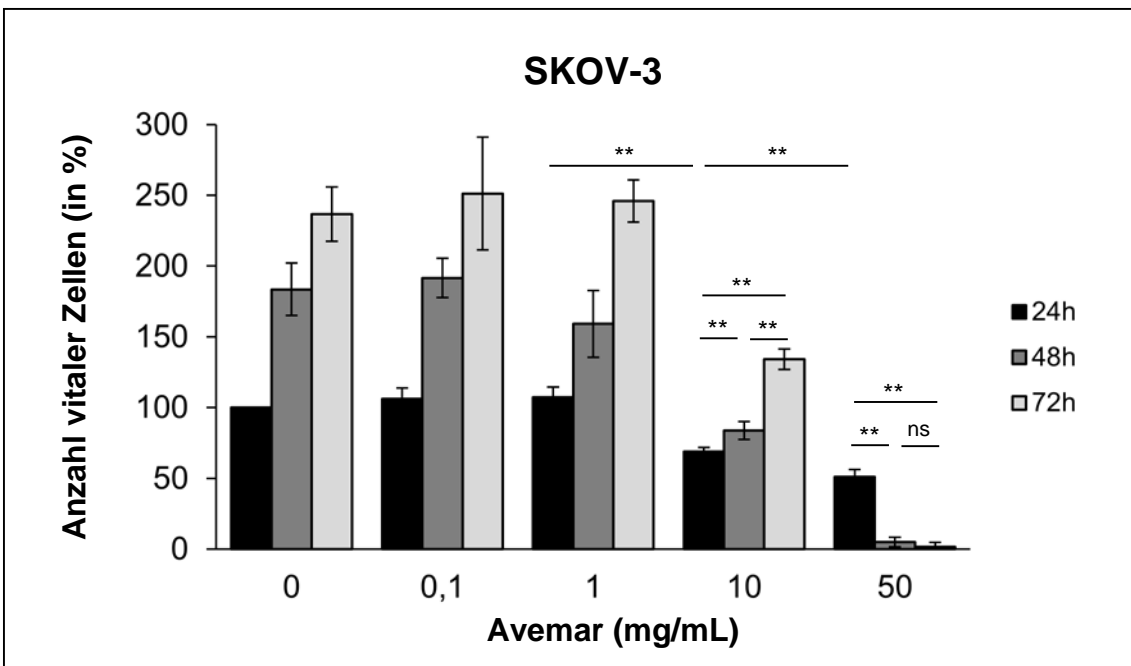
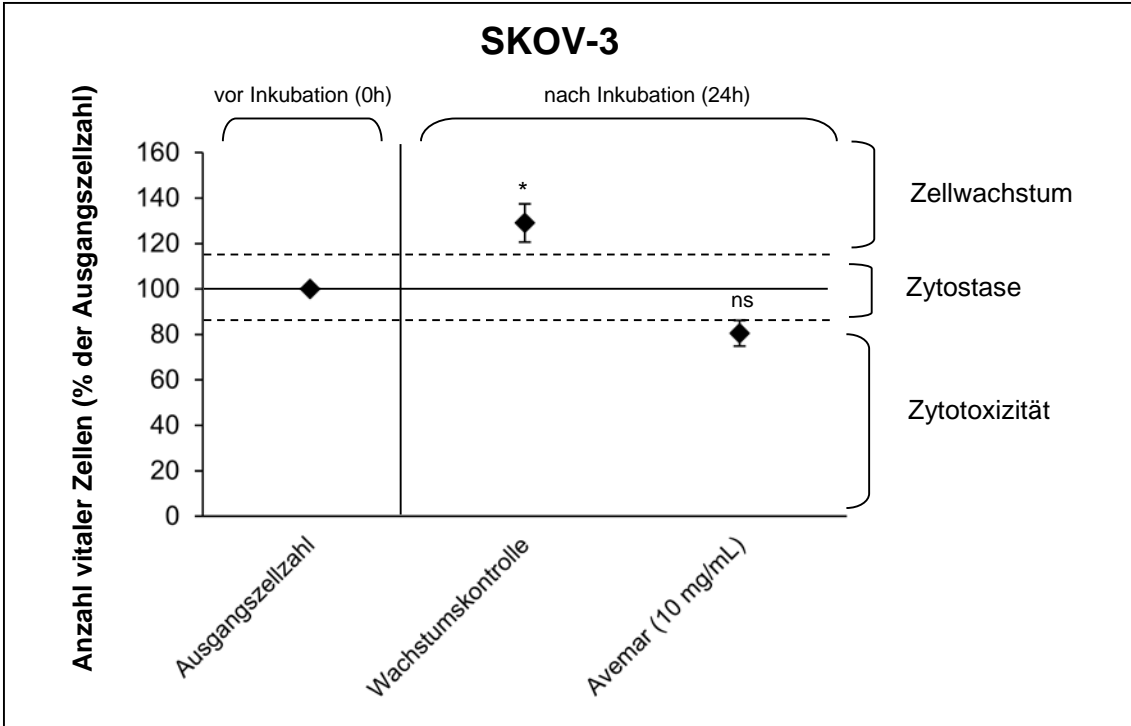


Abb.10.15 (oben) und 10.16 (unten): Die Wirkung von Avemar auf Zellen der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231. Siehe auch Tab. 4.1 und den Text auf S. 58. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , ns= nicht signifikant.

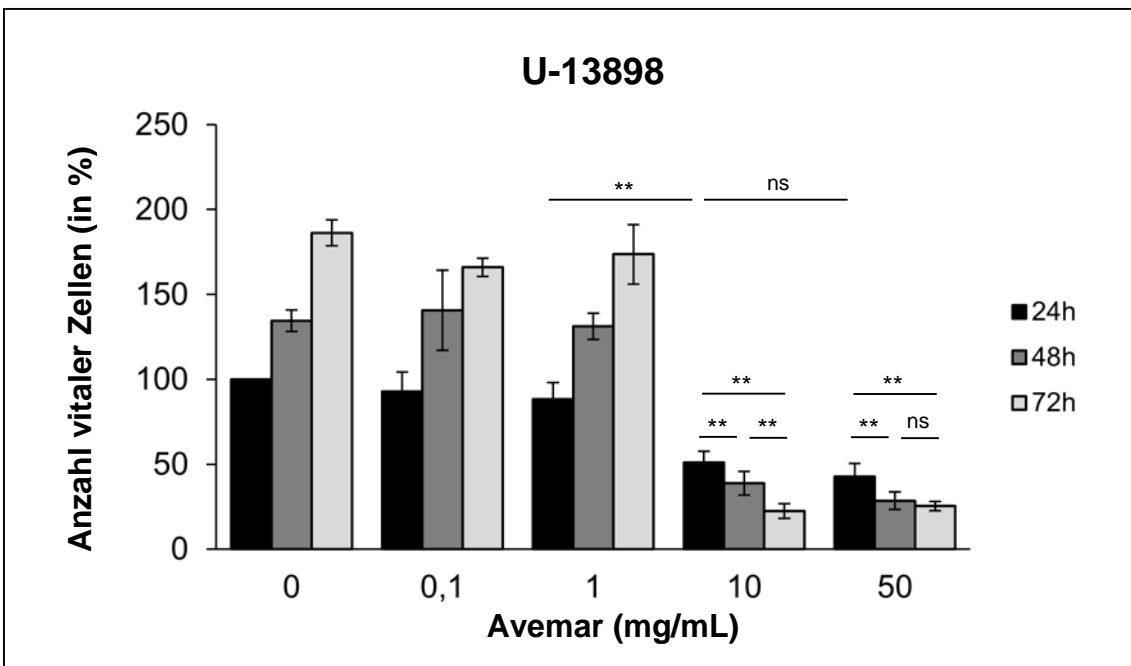
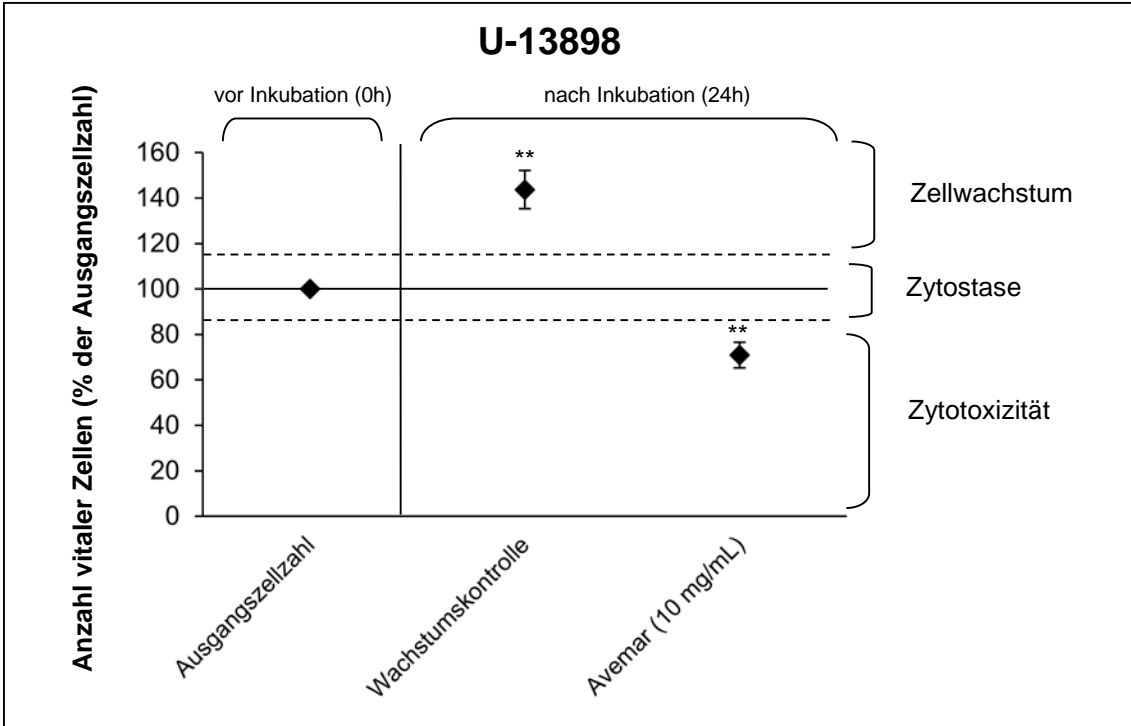


**Abb. 10.17 (oben) und 10.18 (unten): Die Wirkung von Avemar auf Zellen der Fibroblastenzelllinie NHDF-p.** Siehe auch Tab. 4.1 und den Text auf S. 58. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , ns= nicht signifikant.





**Abb. 10.19 (oben) und 10.20 (unten): Die Wirkung von Avemar auf Zellen der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3.** Siehe auch Tab. 4.1 und den Text auf S. 58. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , ns= nicht signifikant. Bei SKOV-3 lag der Anteil vitaler Zellen nach Inkubation mit Avemar bei ca. 80 % und damit im Bereich von Zytotoxizität. Da sich dieser Wert aber nicht signifikant von der Ausgangszellzahl unterschied, wird davon ausgegangen, dass Avemar auf Zellen der SKOV-3-Zelllinie ebenfalls eine zytostatische Wirkung ausübt.



**Abb. 10.21 (oben) und 10.22 (unten): Die Wirkung von Avemar auf Zellen der Glioblastomzelllinie U-13898.** Siehe auch Tab. 4.1 und den Text auf S. 58. \*p<0,05, \*\*p<0,01, ns= nicht signifikant.

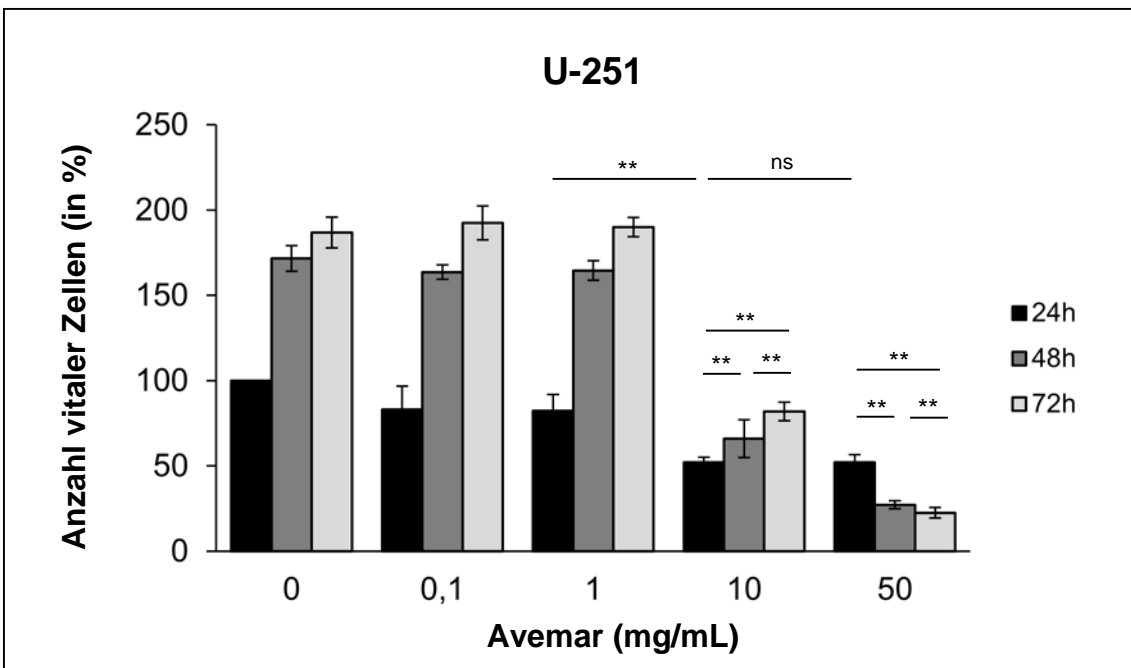
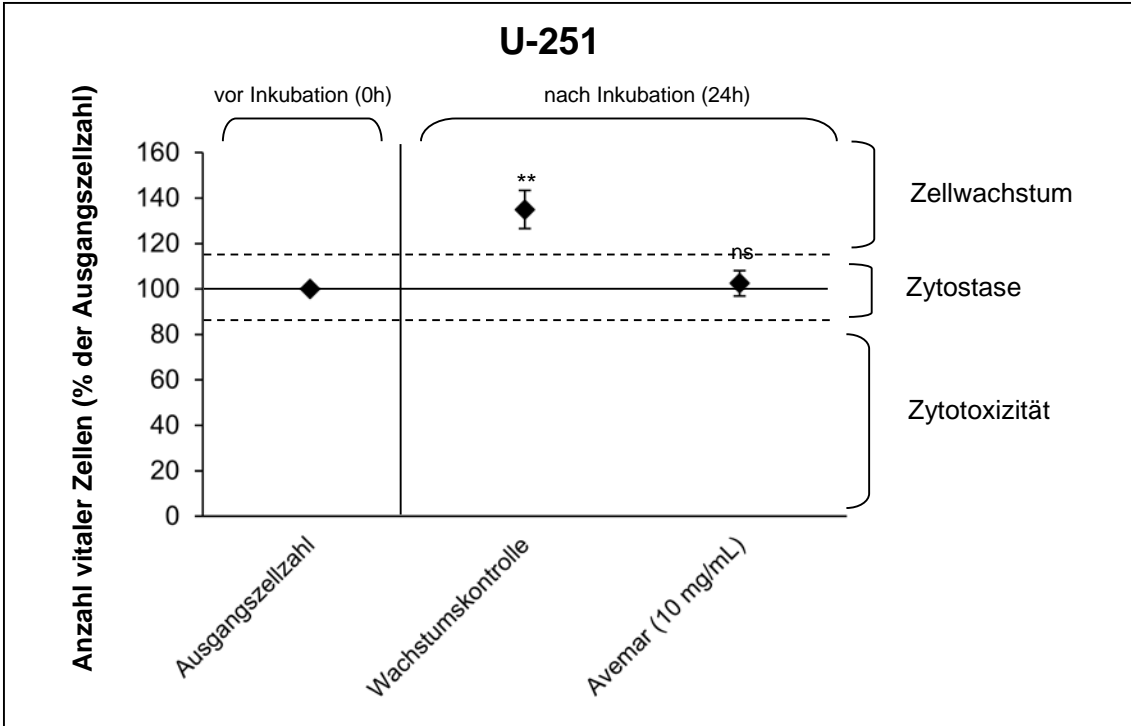


Abb. 10.23 (oben) und 10.24 (unten): Die Wirkung von Avemar auf die Glioblastomzelllinie U 251. Siehe auch Tab. 4.1 und den Text auf S. 58. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , ns= nicht signifikant.

## 10.2 Vergleich der zytotoxischen Effekte von Avemar und Benzochinonen für Zellen der Pankreaskarzinomzelllinie ASPC-1

1

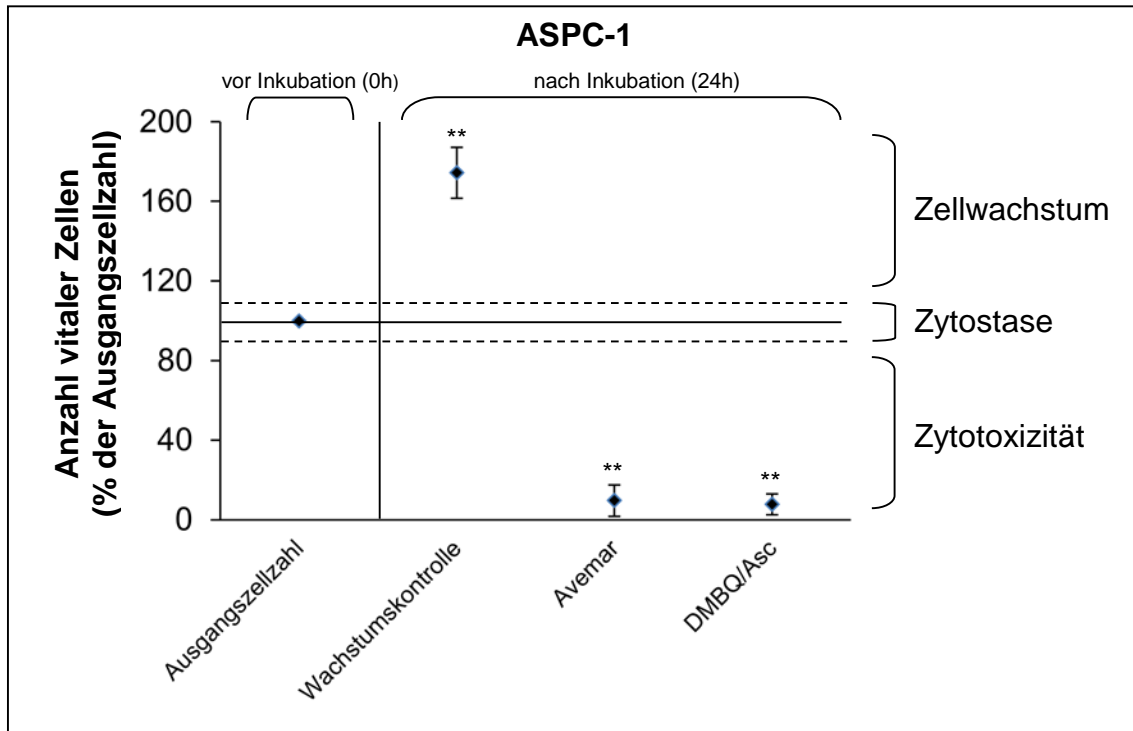
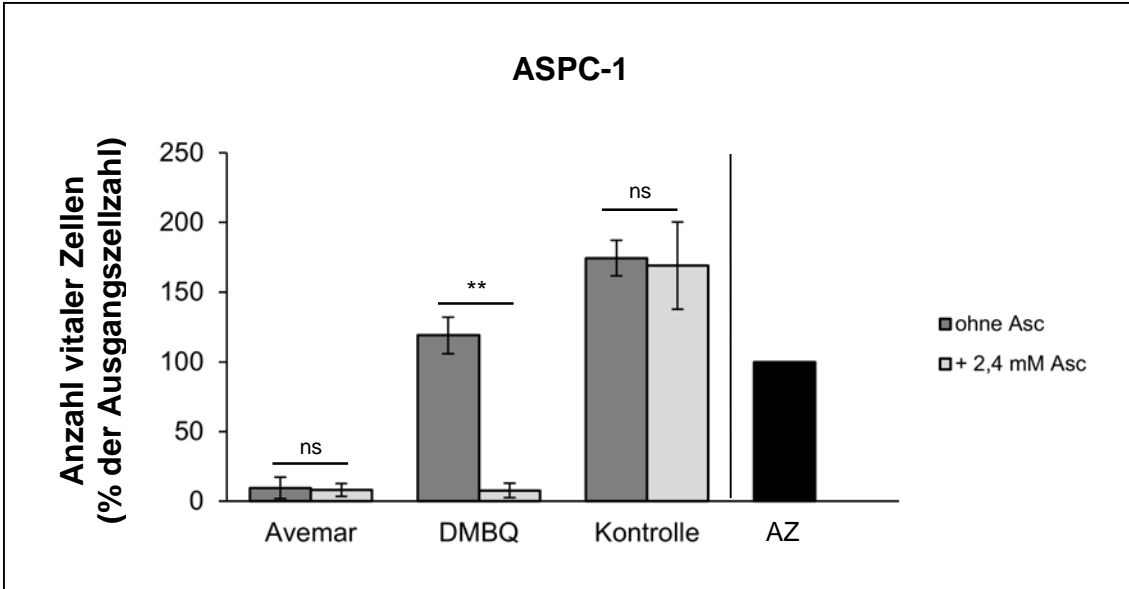
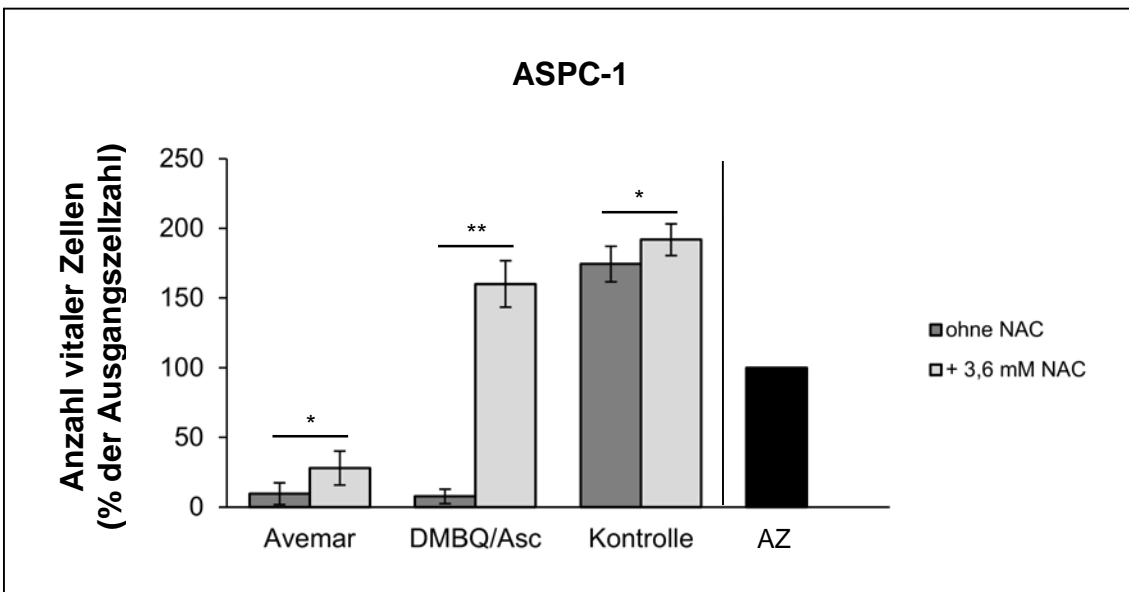


Abb. 10.25: Vergleich der qualitativen und quantitativen Unterschiede zwischen Avemar (10 mg/mL) und einer äquimolaren Konzentration an Benzochinonen (24  $\mu\text{mol/L}$ ). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , ns= nicht signifikant zur Ausgangszellzahl.



**Abb. 10.26: Benzochinone (DMBQ), nicht aber Avemar, benötigen Ascorbinsäure (Asc) zur Induktion eines zytotoxischen Effekts.** Avemar wirkt bereits stark zytotoxisch auf Zellen der Pankreaskarzinomzelllinie ASPC-1. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , ns= nicht signifikant.



**Abb. 10.27: N-Acetylcystein (NAC) schützt vor dem zytotoxischen Effekt von 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinonen (DMBQ).** Dagegen wird Avemar in seiner zytotoxischen Wirkung kaum beeinflusst. AZ=Ausgangszellzahl, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , ns= nicht signifikant.

## Eigene Publikationen

---

**Eich K**, Karaaslan F, Germer C-T, Otto C. INVESTIGATIONS ON THE ANTICANCER EFFECT OF THE NONTOXIC FERMENTED WHEAT GERM EXTRACT AVEMAR. *Langenbecks Arch Surg* 2010; 395: 787 (Abstract).

**Eich K**, Karaaslan F, Pfetzer N, Germer C-T, Otto C. INDUZIEREN ZELLTOXISCHE BENZOCHINONE DEN ANTI-TUMOREFFEKT VON AVEMAR? Poster auf den 14. Chirurgischen Forschungstagen vom 23. – 25. September 2010 in Rostock.

Karaaslan F, **Eich K**, Pfetzer N, Germer C-T, Otto C. UNTERSUCHUNGEN ZUM ANTIKANZEROGENEN POTENTIAL VON BENZOCHINONEN: OXIDATIVER STRESS ALS AUSLÖSER ZELLTOXISCHER EFFEKTE. Vortrag auf der 88. Jahrestagung der Vereinigung Bayerischer Chirurgen e.V. vom 20. – 23. Juli 2011 in München.

**Eich K**, Hahlbrock T, Karaaslan F, Schneider M, Mühling B, Germer C-T, Otto C. THE ANTICANCER EFFECT OF THE NONTOXIC FERMENTED WHEAT GERM EXTRACT AVEMAR ON GASTROINTESTINAL TUMOUR CELL LINES IS MEDIATED BY OXIDATIVE STRESS AND METABOLIC INHIBITION. Vortrag auf den 16. Chirurgischen Forschungstagen vom 4. – 6. Oktober 2012 in Regensburg.

## Danksagung

---

An erster Stelle danke ich in ganz besonderer Weise meinem Betreuer und Doktorvater, Herrn Prof. Dr. rer. nat. Christoph Otto. Seine Betreuung habe ich als exzellent empfunden, nicht nur weil er sich stets Zeit für meine Fragen und Anliegen nahm, sondern auch weil er darum bemüht war, kritisches und hinterfragendes Denken bei mir zu fördern und so meine Herangehensweise an wissenschaftliche Fragestellungen entscheidend geprägt hat.

Desweiteren danke ich Frau Bettina Mühling, Frau Manuela Schneider, Frau Monika Koospal und Frau Sabine Gahn für die tatkräftige Unterstützung im Labor ganz herzlich.

Herrn Prof. Dr. med Christoph-Thomas Germer danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Ein ganz besonderer Dank gilt auch meinen Eltern Monika und Norbert und meinem Bruder Maximilian, die mich stets unterstützt und gefördert haben.