

Aus der
Universitäts-Hautklinik Tübingen
Abteilung für Dermatologische Onkologie

**UNTERSUCHUNG DES SOLUBILISATS NOVASOL®
VINEATROL SOWIE DES NATIVEN WEINREBEN-
EXTRAKTS VINEATROL ALS BIOAKTIVE
NATURSTOFFE IM VERGLEICH ZU RESVERATROL
FÜR DIE BEHANDLUNG DES MALIGNEN MELANOMS**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Traunecker, Rahel Simone

2020

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. C. Garbe

2. Berichterstatter: Professor Dr. F. Stubenrauch

Tag der Disputation: 10.02.2020

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Das maligne Melanom.....	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Risikofaktoren	2
1.1.3	Klinik und Histologie.....	3
1.1.4	Prognose und Stadieneinteilung	6
1.1.5	Diagnostik	9
1.1.6	Therapie des malignen Melanoms	11
1.1.7	Nachsorge.....	16
1.2	Auswahl an Naturstoffen zur Behandlung des malignen Melanoms und anderer Tumorentitäten.....	17
1.2.1	Curcuma/Curcumin	17
1.2.2	Hochdosis Vitamin C, i.v.	18
1.3	Rotwein-Polyphenole.....	20
1.3.1	Resveratrol.....	21
1.3.2	Vineatrol.....	22
1.4	Solubilisierung von Naturstoffen zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit.....	24
1.4.1	Produkt-Mizelle der Firma AQUANOVA AG.....	24
1.5	Zielsetzung der Arbeit.....	26
2	Material und Methoden	28
2.1	Material.....	28
2.1.1	Verwendete Zelllinien.....	28
2.1.2	Chemikalien	29
2.1.3	Medien, (Stamm-)Lösungen, Puffer	30
2.1.4	Verbrauchsmaterialien	31
2.1.5	Kits.....	32

2.1.6	Geräte	32
2.1.7	Software.....	33
2.2	Methodik.....	34
2.3	Zellbiologische Methoden.....	34
2.3.1	Allgemeines	34
2.3.2	Kultivierung von Melanomzellen	34
2.3.3	Einfrieren und Auftauen von Melanomzellen.....	34
2.3.4	Passagieren und Auslegen von Melanomzellen	35
2.3.5	Zählen von Zellen	36
2.3.6	Kultivierung von primären humanen Hepatozyten	36
2.3.7	Behandlung der Zellen.....	37
2.4	Photometrische Methoden.....	38
2.4.1	4-Methylumbelliferyl-Heptanoat (MUH)-Assay	38
2.4.2	Sulforhodamin B-Assay	38
2.4.3	Laktatdehydrogenase-Assay.....	39
2.4.4	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase-Assay	40
2.4.5	CellTiter-Blue®-Viabilitäts-Assay	41
2.4.6	Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse (FACS)	42
3	Ergebnisse	44
3.1	Viabilität und Proliferation der Melanomzellen unter Behandlung mit Vineatrol, Resveratrol, Vineatrol-Solubilisat	44
3.1.1	MUH-Assay nach 24 h, 48 h, 72 h	44
3.1.2	SRB-Assay nach 72 h.....	51
3.1.3	LDH-Assay nach 72 h.....	55
3.2	Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie (FACS).....	59
3.2.1	FACS-Analyse mit BLM Zellen für 72 h	60
3.2.2	FACS-Analyse mit SK-MEL-28 Zellen für 72 h	61
3.2.3	FACS-Analyse mit LOX-IMVI Zellen für 72 h	62

3.3	Toxizitätsprüfung der zu untersuchenden Substanzen an primären humanen Hepatozyten (PHH)	64
3.3.1	CellTiter-Blue®-Assay nach 48 h	64
3.3.2	SRB-Assay nach 48 h	67
3.3.3	LDH-Assay nach 48 h	70
3.3.4	GOT-Assay nach 48 h	74
3.4	Weiterführende Untersuchungen.....	78
3.4.1	Angleich der Konzentrationen von Vineatrol und des Vineatrol-Solubilisats an den jeweiligen Resveratrolgehalt und deren Wirkung auf die Melanomzellen mittels SRB-Assay nach 72 h.....	78
3.4.2	Angleich der Konzentrationen von Vineatrol, Vineatrol-Solubilisat und Leermizelle an den jeweiligen Resveratrolgehalt und deren Wirkung auf die Melanomzellen mittels LDH-Assay nach 72h.....	82
4	Diskussion.....	86
4.1	Zytotoxische Wirkung von Vineatrol im Vergleich zu Resveratrol-Reinstoff	87
4.2	Mögliche Risiken durch Vineatrol/Resveratrol	89
4.3	Rotweinkonsum – eine Möglichkeit zur Krebsprävention?	91
4.4	Vergleichbarkeit von Studienergebnissen bei Einsatz von Stoffgemischen bzw. Pflanzenextrakten	95
4.5	Bioverfügbarkeit von Vineatrol/Resveratrol	95
4.6	Solubilisierung in vitro untersuchbar?	97
4.7	Leermizelle als Kontrolle	98
5	Zusammenfassung und Ausblick	99
6	Abkürzungsverzeichnis	102
7	Abbildungsverzeichnis	104
8	Tabellenverzeichnis	105
9	Literaturverzeichnis	106
10	Erklärung zum Eigenanteil.....	128
11	Danksagung.....	129

1 Einleitung

1.1 Das maligne Melanom

Das maligne Melanom, auch „schwarzer Hautkrebs“ genannt, ist ein hochgradig bösartiger Tumor. Ausgehend von den pigmentbildenden Zellen, den Melanozyten, manifestiert sich das maligne Melanom vor allem an der Haut. In seltenen Fällen tritt es auch an Schleimhäuten, den Meningen oder am Auge (Uvea und Retina) auf. Die Gefährlichkeit des Melanoms ist in der frühzeitigen lymphogenen und hämatogenen Metastasierung begründet und hat daher eine ungünstige Prognose. Für 90 % der Hautkrebs-assoziierten Todesfälle ist das maligne Melanom verantwortlich (Braun-Falco et al., 2005; Moll et al., 2010). Trotz aktueller Durchbrüche in der Therapie des malignen Melanoms in Form von Immuntherapie und zielgerichteter Therapie werden nach wie vor dringend neue Therapiestrategien benötigt, da es sich beim malignen Melanom um ein sehr schwerwiegendes und komplexes Krankheitsbild handelt (Garbe, 2016; Garbe et al., 2011; Garbe et al., 2016).

1.1.1 Epidemiologie

Weltweit nimmt bei der hellhäutigen Bevölkerung Europas und Nordamerikas die Inzidenz des malignen Melanoms beständig zu (4 - 8 % Zuwachs pro Jahr, Verdopplung alle 10 bis 15 Jahre) (Fritsch, 2009). Derzeit verzeichnet es in Mitteleuropa 15 bis 20 Neuerkrankungen pro 100.000/Einwohner pro Jahr. In Australien etwa 50 pro 100.000/Einwohner jährlich (Goebeler, 2017). Menschen mit stärkerer Pigmentierung (Afrika, Asien) erkranken selten und wenn dann nahezu ausschließlich an nicht so stark pigmentierten Körperstellen wie im Schleimhautbereich und palmoplantar (Lodder et al., 2010; Moll et al., 2010). Melanome können in jedem Alter auftreten. Im Kindesalter kommen sie aber sehr selten vor (ca. 0,8/10000) (Fritsch, 2009; Sterry et al., 2010).

In Deutschland erkrankten im Jahre 2014 ca. 21.200 Menschen am malignen Melanom, wobei Frauen und Männer gleich oft betroffen waren. Das maligne Melanom ist die fünfthäufigste Tumorentität unter allen Krebsneuerkrankungen. Die Anzahl der Erkrankten ist seit 2008 rapide angestiegen. Aktuell ist daher

das maligne Melanom die Neoplasie mit der höchsten Steigerungsrate. Eine mögliche Erklärung hierfür ist das im Jahre 2008 eingeführt Hautkrebsscreening und die dadurch bedingte häufigere Diagnosestellung. Bei beiden Geschlechtern hat sich seit 1970 die Inzidenz mehr als verfünffacht. Dagegen haben die Sterberaten im gleichen Zeitraum nur bei den Männern leicht zugenommen und blieben aber im Durchschnitt nahezu konstant ("Krebs in Deutschland für 2013/2014," 2017). Ursache hierfür scheint die unter anderem durch das Hautkrebsscreening bedingte Diagnosestellung in früheren Tumorstadien zu sein (Buettner et al., 2005). Die relativen 5-Jahres-Überlebensraten sind bei frühzeitiger Entdeckung günstig. Für Frauen in Deutschland liegen diese bei 94 %, für Männer bei 91 %, da zwei Drittel aller Melanome in einem noch frühen Tumorstadium (T1) entdeckt werden (Katalinic et al., 2012; "Krebs in Deutschland für 2013/2014," 2017). Bei bereits eingesetzter Metastasierung ist die Prognose oft infaust, aufgrund begrenzter therapeutischer Optionen sinkt die Überlebensrate deutlich (Garbe et al., 2011). Diagnostiziert werden die meisten Melanome im mittleren Lebensalter zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr. Männer erkranken vor allem am Stamm, wohingegen das maligne Melanom bei Frauen vor allem an der unteren Extremität, meistens am Unterschenkel, auftritt (Moll et al., 2010).

1.1.2 Risikofaktoren

Als besonders gefährdet gelten Menschen mit einer hohen Anzahl an melanozytären Nävi, umgangssprachlich sog. „Leberflecken“ und Träger von Melanomvorläufern (sog. dysplastischen Nävi, kongenitale Nävi). Außerdem treten Melanome bei Menschen mit hellem Hauttyp (Typ I, II) deutlich häufiger auf (Garbe et al., 1994; Holly et al., 1987; MacKie et al., 1989). Ein weiterer Risikofaktor ist die Haarfarbe des Patienten. Rothhaarige haben im Vergleich zu Schwarzhaarigen ein 4,7-fach erhöhtes Risiko (Braun-Falco et al., 2005).

Bei etwa 5 bis 10 % der Melanomerkranken ist eine familiäre Häufung zu beobachten. Veränderungen auf den Chromosomenloci 1p, 6q22-27, 7, 9p21 und 10q24-26 werden mit der Entstehung und der Genese des malignen Melanoms in Verbindung gebracht. Abhängig von der Mutation ist das Risiko

unterschiedlich hoch (Braun-Falco et al., 2005; Greene et al., 1985). Neben diesen konstitutionellen Faktoren ist die UV-Belastung der wichtigste exogene Risikofaktor. Vor allem die Sonnenexposition in Jugend und Kindheit und intermittierende Sonnenbelastung mit nachfolgendem Sonnenbrand, typischerweise während der Sommerurlaube, erhöhen das Risiko. Die kumulative UV-Dosis scheint weniger gefährlich zu sein. Melanome treten selten an Körperstellen mit hoher kumulativer UV-Belastung auf (Handrücken, Gesicht). Sie entstehen gehäuft an Stellen, die normalerweise mit Kleidung bedeckt sind wie dem Stamm, aber teilweise hoher UV-Belastung und Sonnenbrand ausgesetzt sind. Die veränderten Freizeitgewohnheiten mit höherer UV-Exposition, insbesondere die Sommerurlaube mit Sonnenbad, haben so während der letzten 50 Jahre zur Zunahme der Melanominzidenz beigetragen (Braun-Falco et al., 2005; Chang et al., 2009; Kulichova et al., 2014; Wiecker et al., 2003). Eine Vermeidung der Sonne im Kinder-/Jugendalter senkt das Melanomrisiko erheblich (Autier & Dore, 1998). Weitere Risikofaktoren sind Defekte der DNA-Reparaturmechanismen wie Xeroderma pigmentosum und / oder der Pigmentierung (Albinismus) (Fritsch, 2009). Umstritten bei der Melanomentstehung ist die Bedeutung toxischer, medikamentöser und endokriner Einflüsse, wie beispielsweise Gravidität und Kontrazeptiva. Verhältnismäßig häufige Spontanremissionen des Primärtumors und aggressive Verläufe bei Immunsupprimierten (medikamentös oder bei HIV-Infektion) weisen auf die Bedeutung immunologischer Faktoren in der Progression dieser Neoplasie hin und sind typische klinische Zeichen für die ausgeprägte Immunogenität des malignen Melanoms (Garbe, 2005; Garbe & Rassner, 2013; Plewig & Degitz, 2013)

1.1.3 Klinik und Histologie

Nur etwa 30 - 40 % der Melanome entstehen in Assoziation mit einem melanozytären Nävus. Die meisten Melanome entstehen de novo auf zuvor klinisch unauffälliger Haut. Sie erscheinen meist als asymmetrische, unregelmäßig begrenzte, bräunlich bis rötlich über bläulich schwärzliche Veränderungen der Haut mit pigmentfreien Anteilen. Selten kommen auch amelanotische, d.h. völlig pigmentfreie Tumore vor. Teilweise sind sie erodiert,

ulzeriert, von Krusten bedeckt oder blutend (Braun-Falco et al., 2005; Goebeler, 2017; Moll et al., 2010).

Klinisch und histologisch ist das Melanom in vier Typen einzuteilen:

- Superfiziell spreitendes Melanom (SSM)
- Noduläres Melanom (NM)
- Lentigo-maligna-Melanom (LMM)
- Akral-lentiginöses Melanom (ALM)

Das **superfiziell spreitende Melanom (SSM)** macht ca. 60 % aller Melanomerkrankungen aus und ist somit der häufigste Typ. Ausgehend von einer makulösen Pigmentläsion mit zum Teil exzentrischem papulösem Anteil beginnt es primär mit einer intraepidermalen horizontalen Ausbreitungsphase. Typisch für das superfiziell spreitende Melanom ist die asymmetrische Form mit farblicher Vielfalt und scharfer, aber unregelmäßiger Begrenzung. Außerdem finden sich bei längerem Bestehen helle, depigmentierte Areale, sog. Regressionszonen. Diese entstehen dadurch, dass der Tumor infolge einer Immunreaktion zurückgedrängt wird. Diese Regressionszonen und das Auftreten von neuen knotigen Anteilen deuten auf ein vertikales, invasives Wachstum hin. Dieses fortgeschrittene Stadium beginnt meist nach 2 bis 4 Jahren. Histologisch charakteristisch sind sog. „pagetoide Melanomzellen“, da die Zellen morphologisch den Zellen des M. Paget ähneln. Dabei handelt es sich um große, runde, atypische Melanozyten mit ausgeprägtem hellem Zytoplasma. Das SSM manifestiert sich vorwiegend bei Menschen im Alter vom 40. bis 60. Lebensjahr; bei Männern vor allem am Rumpf, bei Frauen am Unterschenkel (Egger et al., 2013; Garbe, 2005; Goebeler, 2017; Greenwald et al., 2012; Moll et al., 2010; Sterry, 2010).

Das **noduläre Melanom (NM)** ist mit 20 % der zweithäufigste vorkommende Melanomtyp. Es imponiert als knotiger, exophytischer, meist dunkelbraun bis schwarzer (selten auch rosa oder hautfarbener) Tumor. Häufig ist die Oberfläche erodiert. Die initiale horizontale Ausbreitungsphase fehlt und das

noduläre Melanom zeichnet sich durch ein primär vertikales Wachstum aus. Es kann kleiner als 5 mm sein. Dies erschwert eine frühe Diagnosestellung, weshalb dieser Tumor meist erst bei großer Tumordicke diagnostiziert wird und zu frühzeitiger lymphogener und hämatogener Metastasierung neigt. Es handelt sich hierbei um die aggressivste Form des Melanoms mit der schlechtesten Prognose. Histopathologisch fallen spindelförmige, epitheloide oder pleomorphe Melanozyten auf, die Epidermis und Dermis, teilweise auch die Subkutis, infiltrieren (Garbe, 2005; Goebeler, 2017; Greenwald et al., 2012; Moll et al., 2010; Rosendahl et al., 2014; Sterry, 2010).

Das **Lentigo-maligna-Melanom (LMM)** entsteht nach Jahren aus einer Lentigo maligna (Melanoma in situ) und tritt nahezu ausschließlich an Stellen mit chronischer Lichtexposition, meist im Gesicht älterer Patienten (Altersgipfel >60 Jahre) auf. Es gehört mit ca. 10 % aller Melanome zu den selteneren Melanomtypen und hat eine günstigere Prognose. Klinisch typisch stellt es sich als unregelmäßige, unscharf begrenzte makulöse Pigmentläsion in verschiedenen Brauntönen mit teilweise bis zu schwarzen Anteilen dar. Histopathologisch imponieren Nester atypischer, meist stark pigmentierter Melanozyten, die von der Epidermis ausgehend die Dermis infiltrieren (Garbe, 2005; Goebeler, 2017; Moll et al., 2010; Reed & Shea, 2011; Sterry, 2010).

Das **akral-lentiginöse Melanom (ALM)** kommt vorwiegend palmoplantar, sub- oder periungual vor und macht ca. 5 % aller Melanome aus. Während der intraepidermalen Frühphase zeichnet es sich durch seine inhomogene unscharf begrenzte Pigmentierung aus. In späteren Stadien werden ulzerierte, knotige Anteile beobachtet, was auf invasives Wachstum hindeutet. Das unter den Nägeln (subungual) auftretende ALM beginnt häufig als bräunlicher Fleck, weshalb es zunächst oft für ein Hämatom unter dem Nagel gehalten wird. Es unterscheidet sich von diesem durch die streifige Pigmentierung (Melanonychie), die sich auch auf die Nagelumgebung ausbreiten kann (Hutchinson-Zeichen). Histopathologisch findet sich eine Vielzahl atypischer Melanozyten, die die basale akanthotische Epidermis in Nestern durchsetzen und invasiv in die Dermis vorwachsen. Die Prognose ist ungünstig, da das

akral-lentiginöse Melanom oft lange übersehen und spät diagnostiziert wird. In Deutschland kommt das AML eher selten vor, wohingegen es in Afrika und Asien den Hauptteil an malignen Melanomen (30 bis 70 %) ausmacht (Durbec et al., 2012; Garbe, 2005; Goebeler, 2017; Hudson & Krige, 1993; Kuchelmeister et al., 2000; Mishima & Nakanishi, 1985; Moll et al., 2010; Sterry, 2010).

Darüber hinaus gibt es Sonderformen, die etwa 5 % aller Melanome ausmachen. Dazu gehört das amelanotische maligne Melanom (AMM), das desmoplastische Melanom, das Aderhautmelanom, das Schleimhautmelanom und sogenannte unklassifizierbare maligne Melanome (Garbe et al., 2016; Moll et al., 2010). Das **amelanotische maligne Melanom (AMM)** ist klinisch schwierig zu diagnostizieren, da es meist als klinisch asymptomatische, rosa- oder hautfarbene Plaque oder Knoten erscheint. Da es deshalb oft sehr spät oder nur zufällig erkannt wird, ist die Prognose noch ungünstiger als bei pigmentierten Melanomformen (Adler & White, 1997; Sterry et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit wurden unter anderem zwei Zelllinien untersucht, die aus einem ALM stammen (BLM und LOX-IMVI).

1.1.4 Prognose und Stadieneinteilung

Zur Prognoseeinschätzung und zur Gewährleistung einer stadiengerechten Therapie und Nachkontrolle ist es wichtig den Tumor zu klassifizieren und dessen Ausbreitung abzuschätzen. Etwa 90 % aller Melanome werden zurzeit als Primärtumor ohne erkennbare Metastasierung diagnostiziert. Die tumorspezifische 10-Jahres-Überlebensrate liegt derzeit bei 75 – 85 %. Die wichtigsten prognostischen Faktoren für das primäre Melanom ohne Metastasen sind:

- die vertikale Tumordicke nach Breslow am histologischen Präparat
- das Vorhandensein einer histologisch erkennbaren Ulzeration
- Mitoserate (Anzahl Mitosen/mm²) für dünne Tumore (<1 mm)

Die Tumordicke nach Breslow wird gemessen als die absolute vertikale Tumorausbreitung in Millimetern der Tumoroberfläche oder des Stratum granulosums der Epidermis bis zur tiefsten identifizierbaren Tumorzelle in der Dermis.

Der Invasionslevel nach Clark war bis 2009 prognostischer Bestandteil in der AJCC-Klassifikation und wurde schließlich durch die Bestimmung der Mitoserate ersetzt (Balch et al., 2009; Thompson et al., 2011). Der Clark-Level beschreibt die Eindringtiefe des Tumors in die einzelnen Hautschichten (Level I bis IV). Da die Bestimmung schwierig ist, hat er zunehmend historische Bedeutung. Bei dünnen Tumoren (< oder = 1 mm) kann er aber weiterhin als prognostischer Faktor herangezogen werden (Balch et al., 2001).

Für das maligne Melanom wurde vom American Joint Committee (AJCC) eine TNM-Klassifikation entwickelt, die von der Union for International Cancer Control (UICC) akzeptiert worden ist und eine prognostische Stadieneinteilung erlaubt. Dieser Einteilung liegt die Klassifikation des malignen Melanoms zugrunde. Sie wird stets überarbeitet und aktualisiert, zuletzt im Jahr 2017. Das T steht für Tumor, das N für den regionären Lymphknotenbefall und M für Metastasen (Balch et al., 2009). Anhand der TNM-Klassifikation wird das maligne Melanom in folgende prognostische Stadien eingeteilt (Tabelle 1).

Tabelle 1: Stadieneinteilung des malignen Melanoms

Stadium	Primärtumor (pT)	Regionäre Lymphknotenmetastasen (N)	Fernmetastasen (M)
0	In-situ-Tumoren	Keine	keine
IA	≤ 1,0 mm, keine Ulzeration	Keine	keine
IB	≤ 1,0 mm mit Ulzeration oder Mitoserate/mm ² ≥ 1	Keine	keine
	1,01 – 2,0 mm, keine Ulzeration	Keine	keine

IIA	1,01 – 2,0 mit Ulzeration	keine	keine
	2,01 – 4,0, keine Ulzeration	keine	keine
IIB	2,01 – 4,0 mm mit Ulzeration	keine	keine
	≥ 4,0 mm, keine Ulzeration	keine	keine
IIC	≥ 4,0 mm mit Ulzeration	keine	keine
IIIA	Jede Tumordicke, keine Ulzeration	Mikroskopische Metastasen (klinisch okkult) in bis zu 3 LK	keine
IIIB	Jede Tumordicke mit Ulzeration	Mikroskopische Metastasen (klinisch okkult) in bis zu 3 LK	keine
IIIC	Jede Tumordicke mit Ulzeration	Bis zu drei makroskopische nodale Metastasen oder Satellit(en) oder In-transit- Metastase(n) ohne regionäre Lymphknotenmetastasen	keine
	Jede Tumordicke +/- Ulzeration	Vier oder mehr makroskopische nodale Metastasen oder verbackene Lymphknoten oder Satelliten und/oder In-transit- Metastasen Mit regionären Lymphknotenmetastasen	keine
IV			Fernmetastasen

In Abhängigkeit vom Tumorstadium kann die Therapie stadiengerecht geplant werden und eine Prognose bezüglich der Überlebenszeit gestellt werden.

Das maligne Melanom kann primär lymphogen und primär hämatogen metastasieren. Ungefähr zwei Drittel der Erstmetastasierungen beschränken sich auf das regionäre Lymphabflussgebiet. Dabei werden Satelliten-Metastasen (bis 2 cm um Primärtumor), In-transit-Metastasen (Zweittumoren in der Haut bis zur ersten Lymphknotenstation) und klinisch manifeste/durch Palpation und Diagnostik erkennbare sowie ausschließlich durch Biopsie feststellbare regionäre Lymphknotenmetastasen unterschieden. Beim Auftreten von regionären Metastasen oder Fernmetastasen sinkt die Überlebenszeit deutlich. Die 10-Jahres-Überlebensrate liegt bei Patienten mit Satelliten- und In-transit-Metastasen bei 30 bis 50 %. Bei Vorhandensein von regionären Mikrometastasen beträgt diese 30 bis 70 % und sinkt bei klinisch manifesten Lymphknotenmetastasen auf 20 bis 40 %. Liegen bereits Fernmetastasen vor, beträgt die mediane Überlebenszeit ohne Behandlung etwa 6 bis 9 Monate (Balch et al., 2009; Garbe et al., 2016). Patienten mit Hirnmetastasen haben unbehandelt eine Lebenserwartung von nur 3 bis 5 Monaten (Garbe et al., 2016; Rate et al., 1988).

Sekundäre prognostische Faktoren sind das Alter, das Geschlecht und die Lokalisation des malignen Melanoms. Eine schlechtere Prognose haben Patienten hohen Alters, des männlichen Geschlechts und Patienten mit Melanomen am Stamm, Kopf und Nacken (Garbe, 2005; Green et al., 2012; Joosse et al., 2012; "Leitlinienprogramm Onkologie," 2016).

1.1.5 Diagnostik

Mit Hilfe der Anamnese und des klinischen Befundes kann der Untersuchende die Verdachtsdiagnose eines Melanoms oft stellen. Die betreffende Läsion wird meist auffällig durch rasches Wachstum, Veränderungen in Farbe und Form, Juckreiz, Blutung oder Ulzeration. Zur klinischen Abgrenzung eines malignen Melanoms werden Pigmentläsionen nach der sogenannten ABCDE-Regel beurteilt.

A: Asymmetrie (**A**symmetry) – asymmetrische Form

B: Begrenzung (**B**order) – unregelmäßiger, polyzyklischer Rand mit unscharfer Begrenzung

C: Farbe (**C**olor) – mehrfarbig, inhomogene Pigmentierung

D: Durchmesser (**D**iameter) – Durchmesser > 5 mm

E: Erhabenheit, Vergrößerung (**E**levation / **E**nlargement) – Erhabenheit und/oder rasche Größenzunahme

Auffällige Pigmentläsionen sollen immer im Vergleich mit anderen Pigmentmalen des Patienten betrachtet werden. Bei Unterschieden zu allen anderen („ugly duckling sign“) gelten sie als potentiell melanomverdächtig (Grob & Bonerandi, 1998). Die Dermatoskopie, auch Auflichtmikroskopie genannt, verbessert die Diagnosesicherheit deutlich. Sie ermöglicht die Beurteilung der Pigmentläsion in 10- bis 20-facher Vergrößerung und es gelingt tiefer liegende morphologische Strukturen und Gefäße sichtbar zu machen. Erfahrung und Fachkenntnis des Untersuchers sind essentiell. Mithilfe der Dermatoskopie konnte eine Sensitivität von 89 % und eine Spezifität von 79 % der klinischen Diagnose erreicht werden (Argenziano et al., 1998; Kittler et al., 2002). Anhand Computer-unterstützter Bilddokumentation können Änderungen der Pigmentläsionen im direkten Vergleich im Zeitverlauf leichter erkannt werden. Besteht der klinische Verdacht auf ein Melanom muss dieser durch Exzision und Gewebeuntersuchung gesichert werden. Die Exzision erfolgt abhängig der Tumordicke mit einem entsprechenden Sicherheitsabstand.

Tabelle 2: Empfehlungen zu Sicherheitsabständen

Tumordicke nach Breslow	Sicherheitsabstand
in situ	0,5 cm
<2 mm	1,0 cm
>2 mm	2,0 cm

Nach histologisch erfolgter Diagnosesicherung soll bei invasiven Melanomen ab 1 mm eine Ausbreitungsdiagnostik stattfinden. Hierfür wird eine Röntgenthoraxaufnahme in zwei Ebenen und eine Abdomensonografie durchgeführt. Liegt eine Tumordicke >1 mm, Clark-Level IV, Regression oder Ulzeration vor, wird zusätzlich eine sonografische Untersuchung der Lymphknoten des regionären Abflussgebiets, eine Biopsie des Wächterlymphknotens und eine Labordiagnostik veranlasst (Garbe, 2005; Garbe et al., 2016; Goebeler, 2017; Moll et al., 2010; Sterry, 2010).

1.1.6 Therapie des malignen Melanoms

Nach gesicherter Melanomdiagnose und Stadieneinteilung eines malignen Melanoms erfolgt die Behandlung des Primärtumors und ggf. die der Lymphknoten- und Fernmetastasen. Die bekannte Immunogenität des Melanoms führt dazu, dass der Einsatz von Immuntherapien ein immer wichtiger werdender Bestandteil der Therapie geworden ist.

1.1.6.1 Operative Therapie

Im klinischen Stadium I ist die Therapie primär operativ. Ziel ist es den Primärtumor im Gesunden zu entfernen (Eggermont et al., 2014; Hauschild et al., 2003). Wenn Exzisionsbiopsien technisch möglich sind, sollten diese immer statt Inzisionsbiopsien durchgeführt werden. Da Inzisionsbiopsien histologisch schwieriger zu beurteilen sind und evtl. der Haupttumoranteil nicht abgetragen wurde. Nach histologischer Diagnosesicherung erfolgt ggf. die Nachresektion der Tumorränder mit dem wie in Tabelle 2 dargestellten der Tumordicke (Breslow) entsprechenden Sicherheitsabstand innerhalb von 4 bis 6 Wochen nach Diagnosestellung. In der Regel wird der Eingriff in Lokalanästhesie mit Defektdeckung durchgeführt (Garbe et al., 2016).

Ab Tumordicke von 1,0 mm nach Breslow kann eine Wächterlymphknotenbiopsie (SLND) durchgeführt werden (Cascinelli et al., 1998; Hochwald & Coit, 1998; Sober et al., 2001). Die Wächterlymphknotenbiopsie ist eine Staging-Untersuchung für Patienten, bei denen palpatorisch und sonografisch keine Lymphknotenmetastasen festgestellt werden konnten. Studien zufolge korrelieren die Gesamtüberlebenszeit und die Rezidivfreiheit mit dem

Wächterlymphknotenstatus. Bei befallenem Wächterlymphknoten kann SLND und eine radikale Lymphknotendissektion das krankheitsfreie Überleben verlängern, habe jedoch keine Auswirkung auf das Langzeitüberleben (Morton et al., 1991; Thompson & Shaw, 2007). Bei positivem Wächterlymphknoten soll individuell entschieden werden, ob abhängig von der Tumordicke und der Tumorlast im Wächterlymphknoten eine radikale Lymphknotendissektion angeboten wird, da der Nutzen nach wie vor kontrovers diskutiert wird (Faries et al., 2017; Stadler et al., 2019). Bei regionären Lymphknotenmetastasen (Stadium III) gilt die radikale Lymphadenektomie mit kurativer Indikation als Standardtherapie (Garbe et al., 2016; Morton et al., 1991).

Im Stadium IV (Fernmetastasen) sollte, im Falle von operablen Metastasen, die operative Entfernung der Metastase(n) als Therapie der ersten Wahl angestrebt werden. Eine neoadjuvante Therapie vor chirurgischer Entfernung kann in Betracht gezogen werden (Moschos et al., 2006).

1.1.6.2 Radiotherapie

Die Strahlentherapie wird zur Behandlung des malignen Melanoms nur selten angewandt, v.a. wenn eine operative Versorgung nicht möglich oder nicht sinnvoll ist. Eine adjuvante Strahlentherapie nach Lymphadenektomie kann für Hochrisiko-Patienten zur verbesserten Kontrolle des regionalen Lymphknotenstatus in Betracht gezogen werden (Burmeister et al., 2012). Sind In-transit-Metastasen für einen chirurgischen Eingriff zu ausgedehnt, können diese durch eine alleinige Strahlenbehandlung kontrolliert werden (Olivier et al., 2007). Mit lokaler Strahlentherapie kann bei Knochenmetastasen eine effektive Palliation erreicht werden. Die Hauptindikationen zur palliativen Bestrahlung sind Schmerzen, Stabilitätsverlust (Frakturrisiko), Kompression des Spinalkanals mit oder ohne neurologischen Symptome (Kirova et al., 1999; Rate et al., 1988).

1.1.6.3 Adjuvante Therapie

Patienten ohne nachweisbare Makrometastasen, aber hohem Risiko auf das Vorhandensein von Mikrometastasen, wird eine adjuvante Therapie angeboten. Bei Patienten mit einer Tumordicke von >1,5 mm und/oder bei Patienten mit

Stadium II und III (nach der AJCC Klassifikation) wurde in veröffentlichten Studien eine adjuvante Therapie durchgeführt (Garbe et al., 2016).

▪ **Adjuvante zytotoxische Chemotherapie**

Eine adjuvante Chemotherapie in Stadium II und III zeigte laut verschiedener Studien keinen therapeutischen Vorteil. Daher besteht bisher keine Indikation für die systemische zytotoxische Chemotherapie in der adjuvanten Therapie (Eggermont et al., 2014; Garbe et al., 2010).

▪ **Adjuvante Immunotherapie mit Interferon-alpha**

Interferon-alpha ist die erste Substanz in der adjuvanten Therapie bei Behandlung des malignen Melanoms, die eine signifikante Verbesserung der Rezidivfreiheit der Behandelten bewirkt, auch wenn Interferon-alpha mit hoher Toxizität einhergeht (Eggermont et al., 2008; Garbe et al., 2008; Pehamberger et al., 1998). Adjuvante Interferontherapie wird in einigen europäischen Ländern für Patienten mit operativ behandeltem Stadium II und III Melanomen angeboten. Wegen des nur geringen Vorteils im Hinblick auf das Gesamtüberleben, der signifikanten Toxizität und den damit einhergehenden Nebenwirkungen, wird es nicht generell eingesetzt (Garbe et al., 2016).

1.1.6.4 Zielgerichtete Therapie mit BRAF/MEK Inhibitoren

Eine weitere Möglichkeit der Behandlung des metastasierten malignen Melanoms ist die zielgerichtete Therapie. Ungefähr 45 % der Melanom-Patienten haben eine aktivierende BRAF V600 Mutation, gegen die verschiedene hochselektive Inhibitoren entwickelt wurden. Bei Vorliegen einer BRAF-Mutation wird der RAF-MEK-ERK-Signaltransduktionsweg konstitutiv aktiviert. Die BRAF-Inhibitoren Vemurafenib und Dabrafenib zeigen eine hohe Tumoransprechrates von etwa 50 % bei Behandlung von Patienten mit V600E Mutation, eine signifikante Verlängerung der rezidivfreien Überlebenszeit und der Gesamtüberlebenszeit im Vergleich zur Behandlung mit Dacarbazin (DTIC), einem Zytostatikum aus der Gruppe der Alkylantien (Chapman et al., 2011; Sosman et al., 2012). Aufgrund der Entwicklung verschiedener Resistenzmechanismen ist der Therapieerfolg nicht von Dauer. Um diese

Resistenzentwicklung zu verhindern, werden die BRAF-Inhibitoren zusammen mit MEK-Inhibitoren eingesetzt (Vemurafenib + Cobimetinib oder Dabrafenib + Cobimetinib), da durch diese Kombination der RAF-MEK-ERK-Signalweg auf zwei Stufen blockiert wird (Garbe et al., 2016). Bei Kombination kommt es weniger häufig zu Hyperkeratosen und Zweitmalignomen (wie Plattenepithelkarzinomen und andere Malignome) als bei alleinigem Einsatz von BRAF-Inhibitoren. Nebenwirkungen bei Kombination sind beispielsweise die Pyrexie, Diarrhöen, Übelkeit, Photosensitivität und Retinopathien (Garbe, 2016; Robert et al., 2015).

In klinischen Studien wurde der Einsatz von BRAF- und MEK-Inhibitoren wie Dabrafenib und Trametinib als neoadjuvante und adjuvante Therapie untersucht. Die Behandlung mit der Kombination zeigte eine signifikant verbesserte rezidivfreie Überlebensrate der Patienten im Vergleich zu standardmäßig behandelten, chirurgisch resezierbaren Hochrisiko Stadium III-IV Melanomen (Amaria et al., 2018; Garbe, 2016; Gutzmer, 2014). Im Jahr 2018 wurde die Kombination von Dabrafenib mit Trametinib als adjuvante Therapie für Patienten mit einer BRAF V600 Mutation im Stadium III nach vollständiger Resektion zugelassen (Long et al., 2017).

1.1.6.5 Immuntherapie mit CTLA-4 oder PD-1 Antikörper („Checkpoint-Inhibitoren“)

Bei Patienten mit nicht resezierbaren Metastasen soll die Möglichkeit des Einsatzes einer Immuntherapie mit „Checkpoint-Inhibitoren“ geprüft werden. Bei der Anwendung sogenannter „Checkpoint-Inhibitoren“ wird das körpereigene Immunsystem therapeutisch genutzt. Die T-Zell-Aktivität wird durch aktivierende und hemmende Signale kontrolliert. Aktivierte T-Zellen sorgen für eine verbesserte Tumorabwehr. Die sogenannten „Checkpoints“ regeln die Aktivität der T-Zellen. Eine Bindung an diese „Checkpoints“ führt zu einer verminderten T-Zell-Aktivität. Mit Hilfe von therapeutischen Antikörpern werden diese hemmenden Signale auf die T-Zellen blockiert, wodurch die Aktivität dieser steigt. Beim Melanom werden bisher zwei dieser „Checkpoint“-Moleküle inhibiert: „cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4“ (CTLA-4), und

„programmed cell death protein 1“ (PD-1). Eine derart verstärkte Immunantwort bringt deutliche immunvermittelte Nebenwirkungen (u.a. Kolitis, Dermatitis, Hypophysitis, Thyreoditis, Hepatitis) mit sich (Kahler et al., 2016).

Der CTLA-4 Inhibitor Ipilimumab wurde 2011 zur Behandlung des metastasierten Melanoms (Stadium IV) zugelassen. Im Jahr 2015 erhielten auch zwei Inhibitoren des PD-1 ihre Zulassung: Nivolumab und Pembrolizumab. Seit Mai 2016 ist die Kombination Ipilimumab plus Nivolumab zur Behandlung des malignen Melanoms zugelassen. Allerdings scheint die hohe Toxizität der beiden Substanzen in Kombination einschränkend zu sein, auch wenn es Hinweise darauf gibt, dass die Kombination deutlich effektiver ist als die Monotherapie und ein progressionsfreies Überleben von 43 % über 2 Jahre und eine Zwei-Jahresgesamtüberlebensrate von 64 % beobachtet werden konnten (Hassel et al., 2017).

In einer randomisierten Doppelblind-Phase-III-Studie wurde der Einsatz von CTLA-4 Antikörpern als adjuvante Therapie nach operativer Resektion in Stadium III untersucht und eine verbesserte krankheitsfreie Überlebenszeit beobachtet. Daraufhin wurde die Behandlung in den USA für Stadium III Patienten freigegeben. In Europa steht eine Empfehlung bisher aus (Eggermont et al., 2015; Garbe, 2016; Garbe et al., 2016; Gutzmer, 2014). Im Jahr 2018 wurde der erste PD-1 Inhibitor Nivolumab zur adjuvanten Therapie bei Melanom mit Lymphknotenbeteiligung oder Metastasierung nach vollständiger Resektion zugelassen (Weber et al., 2015). Pembrolizumab wurde 2019 als adjuvante Behandlung für Stadium III Patienten nach operativer Therapie in Europa freigegeben (Eggermont et al., 2018).

1.1.6.6 Onkolytische Immuntherapie mit Talimogen laherparepvec

Bei Talimogen laherparepvec handelt sich um ein onkolytisches, genetisch modifiziertes Herpes-simplex (Typ 1) Virus, das direkt in die Läsion eingespritzt wird (Conry et al., 2018). Die Substanz wird für die Behandlung des fortgeschrittenen Melanoms eingesetzt, das nicht mehr chirurgisch entfernt werden kann, aber noch nicht in Knochen, Gehirn, Lunge oder andere innere Organe metastasiert hat. Wenn sich das Virus im Tumor vermehrt, kann es zum

Untergang der Tumorzellen kommen. Darüber hinaus wird die Immunaktivität erhöht, wodurch sich die Tumorabwehr verstärkt. Im Jahr 2015 wurde Talimogen laherparepvec als erstes onkolytisches Virus für die Behandlung des lokal fortgeschrittenen Melanoms zugelassen (Collichio et al., 2018; Grigg et al., 2016).

1.1.6.7 Chemotherapie und Chemoimmuntherapie in palliativer Zielsetzung

Generell hat die Chemotherapie beim malignen Melanom bislang nur einen geringen Nutzen. Chemotherapie kommt bei Patienten zum Einsatz, die mit zielgerichteten oder Immuntherapien austherapiert wurden und progredient sind. In Ländern, in denen die neuen Therapien nicht verfügbar sind, spielt Chemotherapie weiterhin eine wichtige Rolle (Garbe et al., 2016). Stadium IV Patienten mit Metastasen der Haut, Weichteile, Lymphknoten und Lunge („limited disease“) sprechen besser auf die Therapieschemata an als Patienten mit „extensive disease“ (Metastasen in Leber, Skelett, Gehirn und mit viszerale Metastasen). Es stehen mehrere Substanzen mit vergleichbarer, geringer klinischer Wirksamkeit zur Verfügung. Standardmäßig wird die etablierte systemische Monotherapie mit Dacarbazin (DTIC) eingesetzt. Des Weiteren können Polychemotherapien wie Carboplatin mit Paclitaxel angeboten werden. Die Kombination von Polychemotherapie mit Interferon-alpha und Interleukin 2 wird aufgrund der hohen Toxizität nicht mehr angewendet (Garbe, 2016).

1.1.7 Nachsorge

Klinische Nachsorgeuntersuchungen erfolgen risikoadaptiert in Abhängigkeit des Melanomstadiums über einen Zeitraum von 10 Jahren. Innerhalb der ersten 3 Jahren nach Diagnosestellung treten die meisten Rezidive auf, und das Risiko für die Entstehung eines Zweitmelanoms ist während dieser Zeitspanne am höchsten. Nach 10 Jahren treten nur etwa 5 % der Rezidive auf, weshalb ein Nachsorgezeitraum von 10 Jahren gewählt wurde (Garbe, 2005; Garbe, 2016).

1.2 Auswahl an Naturstoffen zur Behandlung des malignen Melanoms und anderer Tumorentitäten

Tumorerkrankungen gehören heute zu den häufigsten Todesursachen. Weltweit versterben mehr als 6 Millionen Menschen pro Jahr an ihren Folgen. Die konventionelle Krebstherapie bringt starke Nebenwirkungen mit sich und verlängert das durchschnittliche Überleben lediglich um einige Monate bis wenige Jahre. Daher wird intensiv nach effektiven Präventionsmöglichkeiten und alternativen, gut verträglichen Therapiemöglichkeiten gesucht. Unter anderem ist die sogenannte Chemoprävention ein neuer und vielversprechender Ansatz um Tumorerkrankungen vorzubeugen. Hierbei geht es um den Einsatz von natürlichen oder synthetischen Substanzen, einzeln oder in Kombination, um die Karzinogenese zu stoppen, aufzuheben oder hinauszuzögern (He et al., 2008). Darüber hinaus scheinen pflanzliche Nahrungsbestandteile eine ausschlaggebende Rolle bei der Vorbeugung und Behandlung von Krebserkrankungen zu spielen (Miura et al., 2003; Soerjomataram et al., 2010; Zhou et al., 2016). Die Forschung an gut verträglichen Naturstoffen erregt ein zunehmend größeres Interesse und hat in den letzten Jahren stark an Bedeutung gewonnen.

1.2.1 Curcuma/Curcumin

Die Gelbwurzel Kurkuma gehört zu den Ingwergewächsen. Curcumin (Diferuloylmethan) ist ein aus der Wurzel der Kurkumapflanze (*Curcuma longa* Linn.) gewonnenes gelbes bis oranges Pigment und ist seit Tausenden von Jahren Bestandteil der traditionellen indischen und chinesischen Medizin. Umfangreiche Studien der letzten Jahre zeigten, dass Curcumin eine antiinflammatorische Wirkung durch eine Herunterregulation von Entzündungstranskriptionsfaktoren, Enzymen und Zytokinen hat. Da Entzündungsprozesse in den meisten chronischen Krankheiten eine wichtige Rolle spielen, wurde Curcumin für die Behandlung und Prävention dieser untersucht und zeigte vielversprechende Ergebnisse (Aggarwal & Sung, 2009). Seit einigen Jahren ist es besonders für den Bereich der Krebstherapie von Bedeutung (Unlu et al., 2016). Unter anderem hemmt es die Aktivität des Nuklearfaktors κ B (NF- κ B) (Singh & Aggarwal, 1995) und einer Vielzahl anderer relevanter Signalwege für

die Krebsentstehung (Aggarwal et al., 2006; Anto et al., 2002). Klinischen Studien zufolge (Phase I und II) hemmt Curcumin die Karzinogenese in Haut, Magen, Darm und Leber von Mäusen (Cheng et al., 2001) und hat positiven Einfluss bei der Behandlung des Mammakarzinoms (Bayet-Robert et al., 2010). Es zeigt antientzündliche und antineoplastische Wirkung im Hinblick auf die Kolonkarzinomentstehung (Carroll et al., 2011) und wirkt sich über Hemmung des NF- κ B und die dadurch entstehende Apoptoseinduktion und Hemmung des Zellwachstums positiv auf die Behandlung des Pankreaskarzinoms aus (Dhillon et al., 2008). Nebenwirkungen von Curcumin sind nur wenige beschrieben. Insgesamt wird es als gut verträgliche Substanz angesehen. Bei Dosen bis zu 12 g wurden Diarrhö, Übelkeit, Kopfschmerzen sowie eine Erhöhung der alkalischen Phosphatase und Laktatdehydrogenase im Serum beobachtet (Lao et al., 2006; Sharma et al., 2004). Trotz vieler gesundheitsfördernder Eigenschaften schränkt die geringe Bioverfügbarkeit bedingt durch begrenzte intestinale Aufnahme und rascher Metabolisierung den therapeutischen Einsatz stark ein (Schiborr et al., 2014).

1.2.2 Hochdosis Vitamin C, i.v.

In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass hohe Dosen von Vitamin C (Ascorbinsäure) sowohl in vitro als auch in vivo zytotoxisch auf Krebszellen wirken, ohne die gesunden Zellen zu schädigen (Chen et al., 2005; Chen et al., 2008; Du et al., 2010; Padayatty et al., 2006). Die Zytotoxizität von hohen Dosen Vitamin C wird über die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies wie Ascorbylradikale und Wasserstoffperoxid vermittelt (Sinnberg et al., 2014). Besonders auf Melanomzellen scheint Vitamin C toxisch zu wirken (Bram et al., 1980). Interessanterweise weisen Melanompatienten in Stadium IV einen Vitamin C Mangel auf, welcher durch Polychemotherapie und Immuntherapie verstärkt wird (Schleich et al., 2013). Die maximalen Plasmaspiegel bei oraler Einnahme, die bisher beschrieben wurden, betragen 220 μ mol/L (etwa 3 g alle 4 Stunden), während bei intravenöser Gabe von 50 g ein Spiegel von 13.400 μ mol/L erreicht wird (Padayatty et al., 2004). Nur bei intravenöser Gabe ist es möglich, die benötigte Menge an Vitamin C zu erreichen, um zytotoxisch auf die Krebszellen zu wirken (Verrax & Calderon, 2009). Die Studienlage ist sehr

heterogen, was mitunter darauf zurückzuführen ist, dass manche Studien die Wirkung bei oraler Gabe und andere bei intravenöser Gabe untersucht haben (Duconge et al., 2008; Padayatty et al., 2004).

Darüber hinaus wurde die direkte Wirkung von Vitamin C auf die zelluläre DNA des malignen Melanoms durch epigenetische Mechanismen nachgewiesen. Diese wiederum beeinflussen die Expression von microRNAs (miRNA). Diese miRNAs weisen unter anderem tumorsuppressive Eigenschaften auf (Lovat et al., 2011). Bei Gabe hoher Dosen von Vitamin C wird die DNA-Methylierung gehemmt, wodurch die miRNA Expression erhöht. Daraus lässt sich schließen, dass Vitamin C in hohen Dosen für Melanompatienten vielversprechend zu sein scheint (Venturelli et al., 2014).

1.2.2.1 Prenylflavonoide aus Hopfen

Ernährung spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Prävention von Tumorerkrankungen. Besonders sekundäre Pflanzenstoffe werden im Hinblick auf ihre tumorpräventiven Eigenschaften untersucht (Fulda, 2010; Ollberding et al., 2012). Prenylflavonoide gehören zu der großen Gruppe polyphenolischer Verbindungen, die als Flavonoide bezeichnet werden. Zur Familie der Flavonoide werden Flavone, Flavonole, Flavanone, Isoflavone, Flavan-3-ole und Anthocyane gezählt (Miranda et al., 1999). Flavonoide sind die größte Gruppe der sekundären Pflanzenstoffe (Kuhnau, 1976) und spielen eine wichtige Rolle im Abwehrsystem der Pflanze (Winkel-Shirley, 2001). Eine besonders hohe Konzentration an Prenylflavonoiden befindet sich im Hopfen (*Humulus lupulus*; Familie der Cannabaceae) und somit auch in Bier. Prenylflavonoide und prenylierte Chalkone wie Xanthohumol, Isoxanthohumol, 8- und 6- Prenylnaringenin (8-PN und 6-PN) sind die wesentlichen Bestandteile (Dhooghe et al., 2010). Prenylflavonoide und Chalkone aus dem Hopfen zeigen antioxidative Wirkung, blockieren Enzyme, die den Metabolismus der Karzinogenese beeinflussen und haben entzündliche, antikoagulative, antivirale, anthelminthische und antimikrobielle Eigenschaften. Außerdem behindern sie die Proliferation von Tumorzellen (Gerhauser, 2005; Zanoli & Zavatti, 2008). Besonders Xanthohumol wird eine chemopräventive Wirkung

zugeschrieben, während 8-Prenylnaringenin als eines der bisher stärksten Phytoestrogene gilt (Zanoli & Zavatti, 2008). Doch bevor sie therapeutisch erfolgreich bei Krebspatienten einsetzbar sind, muss die Bioverfügbarkeit der Substanzen verbessert und ihr Metabolismus sowie ihre pharmakologischen Eigenschaften näher untersucht werden (Venturelli et al., 2016). Hierzu wurden bereits Humanstudien an gesunden Probanden durchgeführt und weitere Untersuchungen sind in Planung (Calvo-Castro et al., 2018a).

1.3 Rotwein-Polyphenole

Die mediterrane Diät gilt als ein Beispiel gesunder Ernährung. Studien konnten zeigen, dass sich der Gesundheitszustand im Allgemeinen verbessert und es zu einer signifikanten Senkung der Gesamtmortalität kommt. Diese Beobachtungen gelten insbesondere im Hinblick auf kardiovaskuläre Erkrankungen. Außerdem reduziert sich die Inzidenz und Mortalität von Tumorerkrankungen, Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer (Sofi et al., 2008; Widmer et al., 2015). Die Diät zeichnet sich durch eine hohe Aufnahme von Obst, Gemüse, Nüssen, Olivenöl, Milchprodukten wie Käse und Joghurt und moderate Mengen an Fisch und Fleisch aus, begleitet durch einen moderaten aber regelmäßigen Genuss von Alkohol, vor allem in Form von Wein (Willett et al., 1995). Dem Wein wird hierbei eine besondere Bedeutung hinsichtlich der positiven Gesundheitsaspekte zugemessen. Eine hohe Aufnahme gesättigter Fettsäuren führt normalerweise zu einer hohen Mortalität aufgrund kardiovaskulärer Erkrankungen. Das sogenannte „French Paradoxon“ besagt, dass trotz der hohen Zufuhr gesättigter Fettsäuren und Cholesterin in der mediterranen Ernährung der Konsum von Wein (20-30 g Alkohol/Tag) das Risiko von Herz-Kreislauf-Erkrankungen um mindestens 40 % senkt (Renaud & de Lorgeril, 1992). Bisherige Untersuchungen deuten darauf hin, dass die in Rotwein vorkommenden Polyphenole für die positive Wirkung auf kardiovaskuläre und neoplastische Erkrankungen verantwortlich sind (Clifford et al., 1996; Soleas et al., 1997b). Der Gehalt an Polyphenolen ist im Rotwein durch den Erhalt der Fruchtschale und Kerne bei der Fermentierung höher als in anderen Weinsorten (Waterhouse, 2002). Die Alkoholbildung während der

Fermentierung erleichtert die Löslichkeit und daher die Extraktion der Polyphenole (Gambini et al., 2015).

1.3.1 Resveratrol

Das wichtigste und am intensivsten untersuchte Rotwein-Polyphenol Resveratrol (3,5,4'-Trihydroxystilben) gehört chemisch gesehen zu der Familie der Stilbene. Resveratrol ist ein Phytoalexin und somit ein Bestandteil des Abwehrsystems der Pflanze. Es kommt als trans- und cis- Isomer vor, wobei die cis-Form die biologisch weniger aktive und gleichzeitig auch weniger stabile ist (Trela & Waterhouse, 1996).

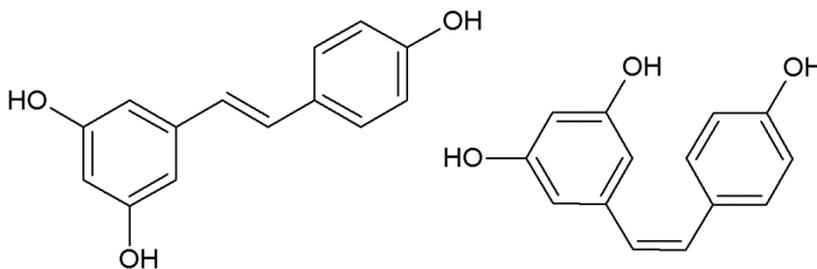


Abbildung 1: Strukturformel von trans- und cis-Resveratrol

Resveratrol kommt in verschiedenen Pflanzen und deren Früchten, wie Weintrauben, Beeren und Erdnüssen vor (Aggarwal et al., 2004). Die höchsten Konzentrationen finden sich in Weintrauben (50-100 µg/g) (Leiro et al., 2004; Li et al., 2006). Es wird zum Schutz der Pflanze vor schädlichen Umwelteinflüssen wie Pilzbefall, UV-Strahlung oder mechanischer Schädigung gebildet (Soleas et al., 1997a). Hohe Konzentrationen finden sich dementsprechend in Reben, deren Abwehrsystem beispielsweise durch wechselhafte Witterungsbedingungen und Pilzbefall stark angeregt wird (Alvarez-Sala Walther et al., 2000). Resveratrol wird mehrfach eine positive bzw. präventive Wirkung auf verschiedene Erkrankungen nachgesagt. Einerseits schützt es vor dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen (Petrovski et al., 2011) und hat antioxidative Eigenschaften (Kawada et al., 1998), gleichzeitig wirkt es entzündlich (Wadsworth & Koop, 1999) und antiproliferativ (ElAttar & Virji,

1999; Jang & Pezzuto, 1999). Resveratrol induziert in verschiedenen Krebszellen spezifisch die Apoptose und ist in der Lage resistente Tumore für Chemotherapeutika zu sensitivieren (Fulda, 2012). Diese vielfältigen Wirkungen lassen sich durch die Modulation wichtiger intrazellulärer Proteine wie NF- κ B, p53, Bcl2 und Sirtuin SIRT1 erklären (Fulda, 2010; Shakibaei et al., 2009).

In den letzten Jahren wurde die epigenetische Modulation als neuer Ansatz der Krebsbehandlung untersucht. Besonders die Veränderung der DNA-assoziierten Histonproteine ist hierbei von Interesse. Resveratrol interagiert mit human Histondeacetylase-Enzymen (HDAC) (Venturelli et al., 2013). Diese Enzymklasse ist an der Entstehung, Aufrechterhaltung aber auch der Behandlung von Tumorerkrankungen beteiligt. Die gezielte pharmakologische Hemmung der HDAC-Enzyme wirkt auf humane Tumorzellen zytostatisch (Ellis et al., 2009; Venturelli et al., 2007). Resveratrol inhibiert die HDAC-Enzyme global, was *in silico*, *in vitro* und *ex vivo* bestätigt wurde. Es zeigt außer der epigenetischen Wirkung ausgeprägte antitumorale Effekte bei gleichzeitig guter Verträglichkeit, auch beim Einsatz hoher Dosen (Venturelli et al., 2013). Resveratrol wird intensiv für den klinischen Einsatz untersucht. Doch trotz vielversprechender Ergebnisse in verschiedenen klinischen Studien, stellt die geringe Bioverfügbarkeit ein großes Problem dar (Berman et al., 2017; Walle, 2011).

1.3.2 Vineatrol

Vineatrol ist ein polyphenolreicher Pflanzenextrakt, der aus jungen Weinrebentrieben gewonnen wird. Es handelt sich hierbei um ein Polyphenol-Gemisch vor allem aus trans-Resveratrol und Resveratrol-Oligomeren, wie beispielweise ϵ -Viniferin, Hopeaphenol und r2-Viniferin, welches im Vergleich zu Resveratrol allein als sowohl stabiler als auch biologisch aktiver beschrieben wurde (Billard et al., 2002; Prokop et al., 2006). Das von der Firma BREKO GmbH zusammen mit der französischen Firma Actichem hergestellte Vineatrol 30 wird in Bordeaux im Südwesten Frankreichs nach Trocknung der Triebe über 6 Monaten und anschließender Alkoholextraktion gewonnen (Informationen bereitgestellt von Breko GmbH). Die Zusammensetzung von

Vineatrol 30 ist in Tabelle 3 aufgeführt (Analysezertifikat der Firma Breko GmbH vom 24.07.2013).

Tabelle 3: prozentualer Anteil der in Vineatrol 30 vorkommenden Derivate (Charge: R19913-01)

Resveratrolgehalt (Monomere und Oligomere)	31,2 %
Trans-Resveratrol	6,0 %
ϵ-Viniferin	11,6 %

Wegen des hohen Gehalts an trans-Resveratrol wurde Vineatrol in Bezug auf potentiell gesundheitsfördernde Eigenschaften untersucht. Insbesondere die Kombination verschiedener Polyphenole könnte additive oder synergistische Effekte im Vergleich zum alleinigen Einsatz von Resveratrol bewirken (Billard et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass Vineatrol antioxidative (Muller et al., 2009) und antientzündliche (Esatbeyoglu et al., 2016; Minagawa et al., 2015) Effekte aufweist und durch die Modulation von kardiovaskulären, metabolischen und inflammatorischen Risikofaktoren präventiv auf die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen wirkt (Romain et al., 2012). Außerdem wurde Vineatrol für die potentielle Behandlung eines Status epilepticus evaluiert. Durch die antioxidative Wirkung von Vineatrol wird die Exzitotoxizität während des Status epilepticus, das heißt die unphysiologische Dauerdepolarisation durch unkontrollierte Freisetzung exzitatorischer Neurotransmitter, reduziert und wirkt protektiv (Gupta & Briyal, 2006). Die antioxidative Wirkung von Vineatrol wird durch die Induktion der Expression antioxidativ wirkender Enzyme wie der Glutathion-Peroxidase und Superoxiddismutase erklärt (Muller et al., 2009). Toxizität oder andere unerwünschte pharmakologische Wirkungen konnten bisher nicht festgestellt werden, weshalb Vineatrol 30 als sicheres Nahrungsergänzungsmittel gilt (Romain et al., 2012). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Vineatrol das Wachstum von Leukämie- (Billard et al., 2002), humanen Kolonkarzinomzelllinien wie SW480 (Marel et al., 2008) und Prostatakarzinomzellen PC-3 und C4-2B (Brizuela et al., 2010) hemmt. Die antitumorale Wirkung von Vineatrol könnte auf einem Zellzyklusarrest in der

frühen S-Phase beruhen, wodurch die Apoptose der Krebszellen eingeleitet wird (Colin et al., 2009; Marel et al., 2008; Walle et al., 2004).

In einigen Studien wurde gezeigt, dass die antioxidative und antitumorale Wirkung von Vineatrol derjenigen von reinem Resveratrol überlegen ist. Dies legt nahe, dass Vineatrol über weitere bioaktive Komponenten verfügt (Billard et al., 2002; Prokop et al., 2006). Trans-Resveratrol, trans- ϵ -Viniferin, r-2-Viniferin, Hopephenol und Miyabenol C wurden als aktive Komponenten identifiziert und könnten entscheidend zur antiproliferativen Wirkung von Vineatrol beitragen (Macke et al., 2012). Es wird vermutet, dass insbesondere die Kombination von trans-Resveratrol mit ϵ -Viniferin maßgeblich für die synergistischen Effekte verantwortlich ist und die antiproliferative Wirkung im Vergleich zur Resveratrol-Einzelsubstanz verstärkt (Colin et al., 2008; Marel et al., 2008).

1.4 Solubilisierung von Naturstoffen zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit

Allgemein gilt für Naturstoffe wie Resveratrol und Vineatrol, dass trotz vielversprechender gesundheitsfördernder Eigenschaften der Einsatz als Therapeutikum durch die geringe Bioverfügbarkeit stark eingeschränkt ist. Viele Naturstoffe, die in vitro interessante Eigenschaften zeigen, können aufgrund der schlechten Bioverfügbarkeit nicht als Therapie in die Klinik übertragen werden (Gambini et al., 2015; Venturelli et al., 2016). Die geringe Bioverfügbarkeit erklärt sich durch schnelle Elimination. Nach der Leberpassage kann nur ein geringer Plasmaspiegel an Resveratrol gemessen werden (Gambini et al., 2015; Walle et al., 2004). Ein weiteres Beispiel für einen Naturstoff mit schlechter Bioverfügbarkeit, aber vielen gesundheitsfördernden Eigenschaften ist, wie in 1.2.1 beschrieben, Curcumin. Um die orale Bioverfügbarkeit zu verbessern, wurde Curcumin in Mizellen verpackt (solubilisiert). So konnte die Bioverfügbarkeit in Studien nachweislich deutlich erhöht werden (Schiborr et al., 2014).

1.4.1 Produkt-Mizelle der Firma AQUANOVA AG

Eine Möglichkeit zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit ist die Nanoverkapselung des Naturstoffs. Die Firma AQUANOVA AG hat sich auf die Solubilisierung, das

heißt die Verpackung von Naturstoffen und Nahrungsinhaltsstoffen in Mizellen, spezialisiert. Solubilisate sind Substanzen, die durch diese Mizellierung in eine wasser- oder fettlösliche Form gebracht werden. Durch Einsatz der patentierten Nanoverkapselungstechnologie erhöht sich die Bioverfügbarkeit von beispielsweise Vitaminen, Fettsäuren und Pflanzenextrakten signifikant (Li et al., 2014; Schiborr et al., 2014). Laut AQUANOVA AG lassen die Produktionsschritte der Solubilisierung die Substanzen chemisch völlig unverändert. Die chemische mizellare Struktur steht im Einklang mit den gültigen ISO- und GMP-Normen.

Die einzelne Mizelle hat einen Durchmesser von ca. 30 nm und ist thermisch, mechanisch und auch in der Magensäure stabil. Die Produkt-Mizellen sind ein optimales Trägersystem für hydrophobe Substanzen, da deren schlechte Löslichkeit die Resorption limitiert. Die intestinale und dermale Resorption der im Inneren der Mizelle vorliegenden Substanz wird erhöht und beschleunigt. Die physiologischen Mechanismen der intestinalen Mizellenbildung bei der Fettverdauung werden nachgeahmt und ermöglichen so eine drastisch höhere Bioverfügbarkeit der jeweiligen Substanz. Studien zufolge konnte durch die Solubilisierung beispielsweise die Bioverfügbarkeit von Coenzym Q10 im Vergleich zur Rohsubstanz deutlich erhöht werden. Durch die verbesserte Resorption und dadurch erhöhte aufgenommene Konzentration der Substanz im Organismus, ist es möglich geringere Konzentrationen der Substanz selbst einzusetzen, was die Ressourcen schont (AQUANOVA AG, n.d.). Für eine Reihe von Vitaminen, Omega-3 Fettsäuren, Isoflavone, Flavonoide und Pflanzenextrakte sind die Solubilisate bereits auf dem Markt und gelten als sicher. Die Produkte sind für die Anwendung im Nahrungsmittelbereich, in Kosmetika und Arzneimitteln geeignet (Hessisches Ministerium für Wirtschaft Verkehr und Landentwicklung, 2006).

AQUANOVA AG stellte für dieses Forschungsprojekt das Solubilisat NovaSOL®Vineatrol auf Kooperationsbasis zur Verfügung.

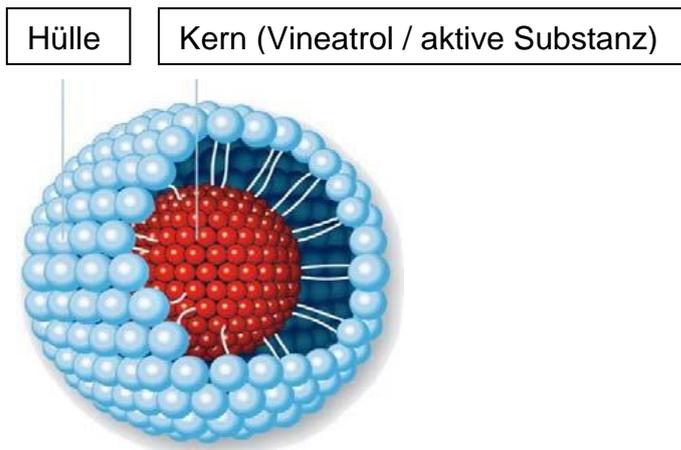


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Mizellarstruktur (Produktmizelle)
wie sie beim Solubilisat NovaSOL®Vineatrol vorliegt (Quelle: AQUANOVA AG).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die Anzahl an Neuerkrankungen des malignen Melanoms ist stark gestiegen und hat sich seit 1970 mehr als verfünffacht. Es ist die Hauterkrankung, die am häufigsten zum Tode führt und durch ihr durchschnittliches mittleres Erkrankungsalter von 54 Jahren ein sehr relevantes medizinisches Problem darstellt (Leiter et al., 2012). Gleichzeitig sind die Möglichkeiten einer Behandlung sehr limitiert, weshalb es von großer Bedeutung ist neue präventive Maßnahmen und Therapieansätze zu untersuchen (Garbe et al., 2011).

Nach aktuellem Kenntnisstand scheinen Nahrungsbestandteile sehr interessant für die Behandlung verschiedener Tumorerkrankungen zu sein (Lambert et al., 2005). Ein Beispiel hierfür ist das in Weintrauben vorkommende Polyphenol Resveratrol, das bereits intensiv auf seine antitumorale Wirkung hin untersucht wurde (Venturelli et al., 2013). Interessanterweise wurde das Polyphenol-Gemisch Vineatrol, welches u.a. Resveratrol enthält, als stabiler und biologisch aktiver als reines Resveratrol beschrieben (Billard et al., 2002; Prokop et al., 2006). Daher wird eine noch ausgeprägtere antitumorale Wirkung postuliert.

Die Bioverfügbarkeit von Naturstoffen ist häufig gering, was den therapeutischen Effekt deutlich einschränkt. Daher hat die Firma Aquanova AG das Vineatrol-Solubilisat NovaSOL® dem Universitätsklinikum Tübingen zur

Verfügung gestellt, da die „Verpackung“ des Inhaltsstoffs in Mizellen die Bioverfügbarkeit um ein Vielfaches erhöhen kann (Schiborr et al., 2014).

Gegenstand dieser experimentellen Arbeit ist die Untersuchung des Polyphenol-Gemischs Vineatrol30[®] und dessen Solubilsats NovaSOL[®] Vineatrol[®] im direkten Vergleich mit Resveratrol. Dabei soll der Fokus auf der Evaluation der jeweiligen antitumoralen Wirkung im Hinblick auf das maligne Melanom liegen und eine Charakterisierung der Testsubstanzen für einen möglichen klinischen Einsatz erfolgen. Das untersuchte Vineatrol ist der Vineatrol30[®]-Extrakt der Firma Breko GmbH (Charge: R19913-01). Zugunsten des Leseflusses wird dieser im weiteren Verlauf der Arbeit als Vineatrol bezeichnet. Abweichungen hierzu werden explizit im Text erwähnt.

Insbesondere sollen folgende Fragestellungen untersucht werden:

- Hat Vineatrol eine ausgeprägtere antitumorale Wirkung als reines Resveratrol?
- Wie verhält sich natives Vineatrol im Vergleich zu dessen Solubilisat in vitro bezogen auf die antitumorale Wirkung?

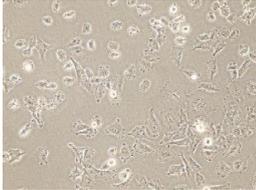
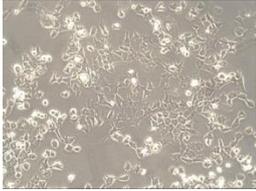
2 Material und Methoden

2.1 Material

Die Materialien wurden im sterilen Zustand von den genannten Firmen bezogen. Abgesehen davon wurde Sterilität durch Autoklavieren mit einem Druck von 2 Bar und einer Temperatur von 121 °C für 20 Minuten sichergestellt. Für den Fall, dass Wasser bei Experimenten zum Einsatz kam, war dieses stets deionisiert und gefiltert (je nach Erfordernissen entsprechend dem Qualitätsstandard für Reinstwasser oder Vollentsalztes Wasser). Abweichungen hierzu werden explizit im Text erwähnt.

2.1.1 Verwendete Zelllinien

Tabelle 4: Charakteristik der verwendeten Melanomzelllinien

Name der Zelllinie	Herkunft	Spezies	Quelle	Morphologie
SK-MEL-28	Malignes Melanom	<i>Homo sapiens</i> , männlich, 51 Jahre	ATCC (HTP-72)	
BLM	Amelanotisches Melanom	<i>Homo sapiens</i> , männlich	ATCC	
LOX-IMVI	Amelanotisches Melanom, gewonnen aus Metastase in axillärem Lymphknoten	<i>Homo sapiens</i> , männlich	ATCC	

Online Datenzugriff der ATCC (American Type Culture Collection): https://www.lgcstandards-atcc.org/en/Products/Cells_and_Microorganisms.aspx (letzter Zugriff 2.05.2017) und ExPASy Bioinformatics Resource Portal <http://web.expasy.org/cellosaurus/> (letzter Zugriff 2.05.2017). Bilder aus der Universitäts-Hautklinik Tübingen.

Für die Experimente wurden die drei Melanomzelllinien SK-MEL-28, BLM und LOX-IMVI verwendet. Hierbei handelt es sich um humane Melanomzellen (dargestellt in Tabelle 4).

2.1.2 Chemikalien

Tabelle 5: verwendete Chemikalien

Verwendete Chemikalien	Firma
Descosept	Dr. Schuhmacher GmbH, Am Roggenfeld, 34323 Malsfeld, Deutschland
DMSO	AppliChem, Ottoweg 4, 64291 Darmstadt, Deutschland
5-Fluorocytosin	Roche, Sandhofer Straße 116, 68305 Mannheim, Deutschland
Essigsäure	Merck, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt, Deutschland
Isopropanol (70 %)	SAV Liquid Production, Hochriesstraße 2, 83126 Flintsbach am Inn, Deutschland
MUH- (4-Methylumbelliferyl-Heptanoat) Reagenz	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Propidiumiodid Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
RNAse A (Ribonuklease-A) Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Secusept	ECOLAB, Saint Paul, Minnesota, Vereinigte Staaten
Sulforhodamin B	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Trichloressigsäure	Carl Roth, Schoemperlenstr. 1-5, 76185 Karlsruhe, Deutschland
TRIS	Carl Roth, Schoemperlenstr. 1-5, 76185 Karlsruhe, Deutschland
Trypan Blau	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten

2.1.3 Medien, (Stamm-)Lösungen, Puffer

Tabelle 6: verwendete Medien, (Stamm-)Lösungen, Puffer

Medium, (Stamm-)Lösung, Puffer	Firma
EDTA Trypsin	Lonza, Basel, Schweiz
Fetal Calf Serum (FCS)	Gibco / Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, Vereinigte Staaten
PBS (phosphate buffered saline)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
PHH (primär humane Hepatozyten) Medium	PD Dr. Thomas Weiß, Zentrum für Leberzellforschung, Franz-Josef-Strauss-Allee 11, 93053 Regensburg, Deutschland
RPMI 1640	Gibco / Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Resveratrol (LOT #G1615)	Santa Cruz Biotechnology, 10410 Finnel Street, Dallas
NovaSOL® Referenz (Referenz Wasser Solubilisat zu NovaSOL® Vineatrol®, #L058.14.LM.02.01)	AQUANOVA AG, Birkenweg 8-10, 64295 Darmstadt, Deutschland
NovaSOL® Vineatrol® (9 %), (2,7 %iges Resveratrol-Solubilisat, LOT #L262.13.DP.0101)	AQUANOVA AG, Birkenweg 8-10, 64295 Darmstadt, Deutschland
Rohstoff Vineatrol® (Resveratrol 30 %, LOT # R19913-01)	Breko GmbH, Hoerneckestraße 3, 28217 Bremen, Deutschland

Folgende Lösungen wurden im Labor gebrauchsfertig wie beschrieben hergestellt:

SRB Farbstoff (0,4 % in 1 % Essigsäure)

SRB	4 g
Essigsäure	10 ml
H ₂ O _{dd}	aufgefüllt bis 1 l

TCA solution (10 %)

TCA	100 g
H ₂ O _{dd}	aufgefüllt bis 1 l

TRIS base

TRIS
H₂O_{dd}
pH

10 mM (1.21 g)
aufgefüllt bis 1 l
10.5

2.1.4 Verbrauchsmaterialien**Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien**

Verbrauchsmaterial	Firma
C-Chip (System Neubauer Improved)	NanoEnTek, Guro-dong, Guro-gu, Seoul, Südkorea
Cellstar-Tubes (15 ml)	Greiner Bio-One, Maybachstraße 2, 72636 Frickenhausen, Deutschland
Combitips advanced (0,5 ml, 2,5 ml, 5 ml)	Eppendorf AG Barkhausenweg 1, 22339 Hamburg, Deutschland
Einfrierröhrchen (1,2 ml)	Corning GmbH, Carl-Billand-Str. 1,67661 Kaiserlautern, Deutschland
Eppendorf Safe Lock Tubes (1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf AG Barkhausenweg 1, 22339 Hamburg, Deutschland
Falcon-Tubes (15 ml und 50 ml)	Corning GmbH, Carl-Billand-Str. 1,67661 Kaiserlautern, Deutschland
Handschuhe	ABENA GmbH, Am Brückle 1, 75038 Oberderdingen, Deutschland
Glaspipetten mit Wattestopfen (230 mm)	Carl Roth, Schoemperlenstr. 1-5, 76185 Karlsruhe, Deutschland
Pasteurpipetten	Wilhelm Ulbrich GdbR, Zum Eichelberg 10, Laborglaswaren, 96050 Bamberg, Deutschland
Pipettenspitzen (1000 µl und 10 µl)	Biozym Scientific GmbH, Steinbrinksweg 27, 31840 Hessisch Oldendorf, Deutschland / Peqlab
Pipettenspitzen (200 µl)	Starlab GmbH, Neuer Höltigbaum 38, 22143 Hamburg, Deutschland
Einmalpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Corning GmbH, Carl-Billand-Str. 1,67661 Kaiserlautern, Deutschland
Zellkulturplatten (96 Well und 24 Well)	TPP Techno Plastic Products AG,

	Zollstraße 7, 8219 Trasadingen, Schweiz
Zellkulturplatte (48 Well)	Corning GmbH, Carl-Billand-Str. 1,67661 Kaiserlautern, Deutschland
Zellkulturflasche (75 cm ²)	TPP Techno Plastic Products AG, Zollstraße 7, 8219 Trasadingen, Schweiz

2.1.5 Kits

Tabelle 8: verwendete Kits

CellTiter-Blue [®] Cell Viability Assay Kit	Promega, Madison, Wisconsin, Vereinigte Staaten
LDH-P Kit	Analyticon Biotechnologies AG, Am Mühlenberg 10, 35104 Lichtenfels, Deutschland
GOT AST Kit	Analyticon Biotechnologies AG, Am Mühlenberg 10, 35104 Lichtenfels, Deutschland

2.1.6 Geräte

Tabelle 9: verwendete Geräte

Gerät	Firma
Autoclav 3850 EL	System GmbH, Konrad-Adenauer-Straße 15, 35440 Linden, Deutschland
Brutschrank 10-05868 (37,0 °C; 4,9 % CO ₂)	Binder GmbH, Im Mittleren Ösch 5, 78532 Tuttlingen, Deutschland
HandyStep	Brand GMBH + CO KG, Otto-Schott-Str. 25, 97877 Wertheim, Deutschland
Kühlschrank (-18 °C, -80 °C, -120 °C)	Liebherr-Werk Biberach GmbH, Memminger Straße 120, 88400 Biberach an der Riß, Deutschland
Laminar Flow Werkbank HERAsafe Kendro	Thermo Fisher Scientific Messtechnik GmbH, Frauenaucher Str. 96, 91056 Erlangen, Deutschland
Lichtmikroskop IMT-2	Olympus, Shinjuku, Tokio, Japan
LSRII FACS BD	BD Biosciences, Tullastr. 8-12

	69126 Heidelberg, Deutschland
Mehrkanal-Pipette	Eppendorf AG Barkhausenweg 1, 22339 Hamburg, Deutschland
Photometer Genios Plus	Tecan Group Ltd., Seestrasse 103 8708 Männedorf / Bioteck AG, Schwertstrasse 6, 8200 Schaffhausen, Schweiz
Pipette Boy	Integra Biosciences AG, Tardisstrasse 201, 7205 Zizers, Schweiz
Pipetten	Eppendorf AG Barkhausenweg 1, 22339 Hamburg, Deutschland
Präzisionswaage MC1 Analytic AC 210S	Sartorius Lab Instruments GmbH & Co.KG, Otto-Brenner-Straße 20, Göttingen 37079, Deutschland
Trockenschrank (40 °C)	Binder GmbH, Im Mittleren Ösch 5, 78532 Tuttlingen, Deutschland
Schüttelwasserbad GFL 1086 (37 °C)	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Schulze-Delitzsch-Straße 4, 30938 Burgwedel, Deutschland
Vibrofix VF1 Electronic	Janke + Kunkel IKA Labortechnik, Janke & Kunkel-Str. 10, 79219 Staufen, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 2.0R	Heraeus Holding GmbH, Heraeusstraße 12-14, 63450 Hanau

2.1.7 Software

Tabelle 10: verwendete Software

Acrobat Reader	Adobe
Endnote	Thomson Reuters
FACSDiva Software	LSRII FACS BD
Graphpad Prism4	Graphpad Software Inc.
Microsoft Excel 2003	Microsoft Cooperations
Microsoft Powerpoint 2007	Microsoft Cooperations
Microsoft Word 2007	Microsoft Cooperations

2.2 Methodik

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Allgemeines

Alle Arbeitsschritte und Tätigkeiten, die unter sterilen Bedingungen durchzuführen sind, wurden an der Herasafe-Sicherheitsbank von der Firma Heraeus durchgeführt. Die Medien und Puffer, die für die Arbeitsschritte an den Zellkulturen verwendet wurden, wurden vor Benutzung im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Gelagert wurden die Medien und Puffer gemäß der Herstellerangaben bei Raumtemperatur (23 °C) oder im Kühlschrank (2-8 °C).

2.3.2 Kultivierung von Melanomzellen

Die Melanom-Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen mit einer Grundfläche von 75 cm² in einem Inkubator (Binder) bei 37 °C, 5 % (v/v) CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 97 % kultiviert. Als Nährstoffquelle für die Zellproliferation wurde RPMI 1640-Medium supplementiert mit 10 % fötalem Rinderserum (FCS), 1 % Penicillin (100 U/ml) und 1 % Streptomycin (100 µg/ml) verwendet.

2.3.3 Einfrieren und Auftauen von Melanomzellen

Für die Kryokonservierung der Zellen wurde das FCS-haltige Medium aus der Zellkulturflasche abgesaugt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, welches anschließend wieder abgesaugt wurde. Dieser Schritt diente dazu, das im Medium vorhandene FCS zu entfernen, da dieses Trypsin hemmt. Anschließend wurden die Zellen mittels Trypsin gelöst und vereinzelt. Die Serin-Protease Trypsin spaltet dabei die für die Adhäsion verantwortlichen Proteine. Daraufhin wurden die Zellen bei 400 g (1400 rpm) für 3 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Nun wurden die Zellen in Einfriermedium bestehend aus DMEM, 20 % FCS und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert und zu je 1 ml in Kryoröhrchen aliquotiert. Daraufhin wurden diese bei einer kontrollierten Abkühlgeschwindigkeit von -1 °C/min in dem Kryoeinfriercontainer „Mr. Frosty“ mit 100 % Isopropanol bei -80 °C eingefroren. Zur langfristigen Lagerung in Tanks mit flüssigem Stickstoff überführt.

Um die tiefgekühlt gelagerten Zellen wieder aufzutauen, wurden diese bei 37 °C im Wasserbad erwärmt und direkt in 10 ml DMEM überführt. Die Zellen wurden anschließend bei 400 g (1400 rpm) für 3 Minuten abzentrifugiert und der Überstand abgegossen. Um das zytotoxische DMSO zu entfernen, wurde erneut mit DMEM resuspendiert. Zur Kultivierung wurden die Zellen in eine Zellkulturflasche ausgelegt und bei 37 °C inkubiert.

2.3.4 Passagieren und Auslegen von Melanomzellen

Die Dichte der Zellen auf dem Boden der Zellkulturflaschen wurde regelmäßig mikroskopisch kontrolliert. Ist der Zellrasen zu dicht, sinkt die Proliferationsrate stark ab, was zum Absterben der Zellen führen kann. Vor Erreichen der fast vollständigen Konfluenz, wurden die Zellen je nach Bedarf auf mehrere Gefäße verteilt oder nur ein Anteil in einem Zellkulturgefäß derselben Größe weiterkultiviert. Hierfür wurde das Medium aus der Zellkulturflasche abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen einmal mit auf 37 °C erwärmtem PBS (10 ml) gewaschen und erneut abgesaugt. Nach dem Waschvorgang wurde Trypsin (1,5 ml) zugegeben und je nach Zelllinie 1-10 Minuten im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen durch vorsichtiges Klopfen der Flasche abgelöst. Um die Trypsinaktivität zu stoppen, wurden die Zellen in Medium suspendiert. Daraufhin wurde im gewünschten Verhältnis gesplittet (SK-MEL-28 meist 1:6, BLM und LOX-IMVI meist 1:8) und nach Zugabe von frischem Medium in insgesamt 14 ml Medium, wie oben beschrieben, weiterkultiviert. Die überschüssigen Zellen wurden verworfen.

Um die Zellen für die Versuche einzusetzen, wurden diese wie bereits beschrieben aus der Kulturflasche gelöst bzw. geerntet. Nach Bestimmung der Zellzahl wurde eine Suspension mit dem für den jeweiligen Versuch gewünschten Zellgehalt hergestellt und diese anschließend für die sich anschließenden Experimente mittels Pipette auf die erforderlichen Zellkulturgefäße verteilt.

2.3.5 Zählen von Zellen

10 µl der Zellsuspension wurden zur Bestimmung der Zellzahl mit dem gleichen Volumen Trypanblau-Lösung vermischt. Der Azofarbstoff Trypanblau wird von lebenden Zellen nicht aufgenommen, weshalb diese sich nicht verfärben und somit für die Auszählung von den toten Zellen unterschieden werden können. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Einweg-Zählkammer (C-Chip Neubauer Improved) durch Auszählen unter dem Mikroskop mit einem 10 x Objektiv im Phasenkontrast und anschließende Mittelwertbildung der vier Großquadrate (Fläche: 1 mm², Tiefe: 0,1 mm) wie folgt ermittelt:

$$\bar{\varnothing} \text{ Zellzahl / Großquadrant} \times 10^4 \times 2 \text{ (Verdünnungsfaktor)} = \text{Zellzahl / ml}$$

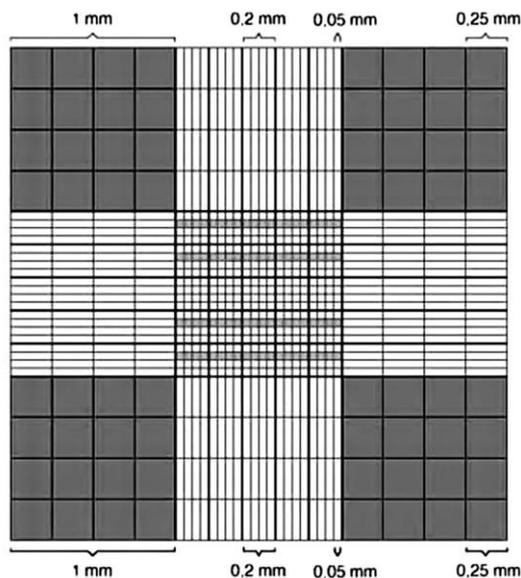


Abbildung 3: Neubauer improved Zählgitter

Quelle: modifiziert nach http://e-learning.studmed.unibe.ch/hemosurf_demo/Demo_E/Lab/count_manual.htm (letzter Zugriff 04.05.2017). Zählweise wie im Text beschrieben. Die dunkelgrau hinterlegten Quadrate stellen die vier Großquadrate dar.

2.3.6 Kultivierung von primären humanen Hepatozyten

Die primären humanen Hepatozyten (PHHs) wurden von PD Dr. Thomas Weiß des Zentrums für Leberzellforschung, Regensburg zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden ausplattiert, auf versiegelten 24 Well Platten verschickt und nach Ankunft in einem Inkubator (Binder) bei 37 °C, 5 % (v/v) CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 97 % kultiviert. Als Nährstoffquelle für die Zellproliferation wurde das mitgelieferte PHH-Medium bestehend aus DMEM-Medium

supplementiert mit 5 % fötalem Rinderserum (FCS), 125 mU/ml Insulin, 60 ng/ml Hydrokortison, 10 ng/ml Glukagon, 100 µg/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin (Weiss et al., 2003) verwendet.

2.3.7 Behandlung der Zellen

Um die verschiedenen Zelllinien mit den vier Testsubstanzen Vineatrol[®], NovaSOL[®] Vineatrol[®], Resveratrol und der Leermizelle in unterschiedlichen Konzentrationen zu behandeln, wurden im ersten Schritt aus der jeweiligen Stammlösung (20 mg/ml Vineatrol in DMSO; 20 mg/ml Resveratrol in DMSO; 222 mg/ml 9% Solubilisat; 222 mg/ml Leermizelle) die benötigten Verdünnungen hergestellt. Für die verschiedenen Versuchsreihen wurden für jede Testsubstanz jeweils die finalen Konzentrationen 40 µg/ml, 20 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml und 2,5 µg/ml eingesetzt. Die Zellen wurden entsprechend der jeweiligen Versuchsanforderung in gewünschter Zahl pro Well ausgelegt und im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium der über Nacht angewachsenen Zellen verworfen. Anschließend wurde die pro Assay festgelegte Menge an Kulturmedium pro Well hinzupipettiert. Danach wurden jeweils 50 µl der gewünschten Verdünnung der Testsubstanzen in den entsprechenden Konzentrationen dazu gegeben. Nach Abschluss der Behandlung wurden die Versuchsplatten für die gewünschte Zeit im Brutschrank inkubiert.

2.4 Photometrische Methoden

2.4.1 4-Methylumbelliferyl-Heptanoat (MUH)-Assay

Dieser fluorometrische Assay beurteilt Zellwachstum und Proliferation basierend auf der Messung des Spaltprodukts des Substrats 4-Methylumbelliferyl-Heptanoat (MUH) (Dotsika & Sanderson, 1987). Das Fluorochrom MUH wird ausschließlich von vitalen Zellen aufgenommen. Zelleigene zytoplasmatische Esterasen verwenden das MUH als Substrat und setzen es zu messbarem 4-Methylumbelliferon um. Die Intensität der gemessenen Fluoreszenz ist proportional zur Menge der vitalen Zellen (Zouboulis et al., 1991). Zunächst wurden die Zellen auf 96-Well-Platten mit 2.500 Zellen mit einem Volumen von 100 µl/Well ausgesät und bei 37 °C in einer 95 % Sauerstoff und 5% CO₂ Atmosphäre bei 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach 24 h wurde das Medium durch 50 µl frisches Zellkulturmedium ersetzt und jeweils 50 µl der vier Testsubstanzen (zweifach konzentriert) in gewünschter Konzentration hinzugegeben. Die Kontrollgruppen wurden stattdessen mit insgesamt 100 µl Zellkulturmedium behandelt. Die einzelnen zu messenden Konzentrationen wurden für jede Substanz jeweils in Triplets pipettiert und dreifach angesetzt, um die unterschiedlichen Effekte nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation bei 37 °C zu vergleichen. Die Versuchsreihen wurden jeweils dreimal als unabhängiges Experiment wiederholt. Vor der Messung wurde das Medium abgenommen und die Wells zweimal mit je 100 µl PBS-Lösung (37 °C) gewaschen. Anschließend wurden 100 µl/Well der MUH-Lösung (50 µl MUH-Stammlösung in 5 ml PBS) dazugegeben und für 1 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte nach der Inkubation mit einer Extinktion von 355 nm und einer Emission von 460 nm am ELISA-Reader.

2.4.2 Sulforhodamin B-Assay

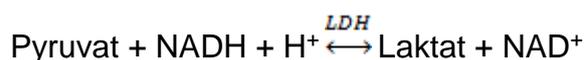
Der Sulforhodamin B (SRB)-Assay bestimmt anhand der vorhandenen Zelldichte die Proliferation der Zellen. Hierbei wird durch Anfärben der Gesamtproteingehalt der Zellen einer Probe bestimmt. Dieser steigt näherungsweise linear mit der Zellzahl an und kann somit als

Surrogatparameter zur Bestimmung der adhärennten Zellen herangezogen werden. Der anionische Farbstoff Sulforhodamin B bindet bei saurem pH-Wert an die basischen Aminosäure-Seitenketten. Bei Veränderung des pH-Wertes von sauer zu basisch, löst sich der Farbstoff und kann photometrisch gemessen werden (Skehan et al., 1990; Vichai & Kirtikara, 2006). Hier wurde anhand des verringerten Proteingehalts pro Well auf den antiproliferativen Effekt der eingesetzten Substanzen geschlossen. Die Zellen wurden auf 48-Well-Platten mit 10.000 Zellen mit einem Volumen von 250 μ l/Well ausgesät. Danach wurden sie über Nacht im Brutschrank inkubiert und am folgenden Tag mit den steigenden Konzentrationen der vier zu untersuchenden Substanzen behandelt. Die einzelnen zu messenden Konzentrationen wurden für jede Substanz jeweils als Duplikate angesetzt. Nach 72 h Inkubation wurden die Platten nach Verwerfen des Mediums zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Platten auf Eis gelagert. Anschließend wurden 100 μ l/Well kalte 10 %ige Trichloressigsäure (TCA)-Lösung zur Fällung der Zellproteine hinzugegeben und für mindestens 30 min im Kühlschrank inkubiert. Danach wurde die Säure abgekippt und die Platten viermal mit vollentsalztem (VE-) Wasser gespült und über Nacht bei 40 °C im Trockenschrank getrocknet. Zur Färbung wurden pro Well 100 μ l Sulforhodamin B-Lösung hinzupipettiert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Platten viermal mit VE-Wasser und zweimal mit 1 %iger Essigsäure gewaschen und dann für etwa 6 h im Trockenschrank getrocknet. Anschließend wurde pro Well 250 μ l 10 mM Tris-Lösung (pH 10,5) zupipettiert. Dadurch steigt der pH-Wert an und der Farbstoff löst sich. Die Platten wurden für 10 min auf den Plattenschüttler gestellt, um in den Wells eine homogene Lösung zu erreichen und den Farbstoff möglichst quantitativ zu lösen. Danach wurde von jedem Well zweimal je 80 μ l in eine 96-Well-Platte pipettiert und die Extinktion im ELISA-Reader bei 550 und 620 nm gemessen.

2.4.3 Laktatdehydrogenase-Assay

Der Laktatdehydrogenase (LDH)-Assay basiert auf der photometrischen Bestimmung der LDH-Aktivität. LDH ist ein Enzym, das in jeder Zelle vorkommt,

bei Zerstörung der Zellmembran als Zeichen des Zelltodes freigesetzt wird und zudem eine hohe Stabilität außerhalb der Zelle aufweist. Der LDH-Assay der Firma Analyticon beinhaltet zwei Reagenzien, die miteinander vermischt werden. Reagenz 1 besteht aus Tris-Puffer, pH 7,5 [80 mmol/l], NaCl [200 mmol/l] und Pyruvat [1,6 mmol/l]. Reagenz 2 ist eine Trockensubstanz und enthält NADH [0,2 mmol/l]. Reagenz 2 wird in Reagenz 1 gelöst und auf Raumtemperatur erwärmt. Die LDH-Aktivität wird durch optische Messung der Oxidation von NADH zu NAD⁺ bei gleichzeitiger Reduktion von Pyruvat zu Laktat bestimmt (Ulmer et al., 1956). LDH katalysiert die Umwandlung von Pyruvat zu Laktat. Der Umsatz von NADH zu NAD⁺ korreliert mit der Konzentration an freigesetztem LDH. Die Reaktion läuft nach folgender Gleichung ab:



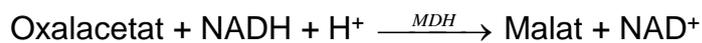
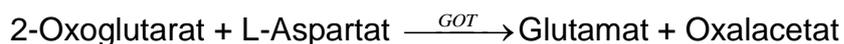
Es wurde sowohl der LDH-Gehalt des Überstands als auch der Gesamt-LDH-Gehalt nach vollständiger Lyse der Zellen gemessen. Die Lyse der Zellen wurde durch Zugabe von 27,5 µl Triton X-100 (10 %ig) in ein vorgesehene Well-Triplet herbeigeführt. Aus jedem Well wurden 10 µl Überstand in eine 96-Well-Platte pipettiert. Zusätzlich wurde eine 1:10 Verdünnung des Überstands der zuvor mit Triton lysierten Zellen in die 96-Well-Platte pipettiert. Anschließend wurden pro Well 200 µl des LDH-Substrats möglichst rasch hinzupipettiert und direkt mit der kinetischen Bestimmung am ELISA-Reader begonnen. Die photometrische Messung erfolgte bei einer Extinktion von 340 nm.

2.4.4 Glutamat-Oxalacetat-Transaminase-Assay

Der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase-Assay (GOT-Assay) dient zur quantitativen Bestimmung der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, auch Aspartat-Aminotransferase genannt. Diese gehört zur Gruppe der Transaminasen. Durch den Transfer von Aminogruppen katalysieren sie Aminosäuren zu den entsprechenden α-Ketosäuren und umgekehrt. Die Aspartat-Aminotransferase (AST) kommt in unserem Körper häufig vor. Hohe

Konzentrationen liegen im Myokard vor, aber auch in Gehirn, Leber, Nieren, im Gastrointestinaltrakt, Fettgewebe und Skelettmuskel finden sich relevante Mengen. Das Enzym kommt im Zytoplasma und in den Mitochondrien der Zellen vor. Bei Zellschädigungen wird AST freigesetzt. Erhöhte Spiegel lassen sich beispielsweise bei Myokardinfarkt, Hepatopathien und Organschädigungen messen. Der GOT-Assay der Firma Analyticon beinhaltet zwei Reagenzien, die miteinander vermischt werden. Reagenz 1 besteht aus Tris-Puffer, pH 7,5 [80 mmol/l] und L-Aspartat [200 mmol/l]. Reagenz 2 ist eine Trockensubstanz und enthält Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) [0,18 mmol/l], LDH [800 U/l], Malatdehydrogenase (MDH) [600 U/l] und Oxoglutarat [12 mmol/l]. Reagenz 2 wird in Reagenz 1 gelöst und auf Raumtemperatur erwärmt.

Die Reaktion läuft nach folgender Gleichung ab:



Wenn Aspartat mit 2-Oxoglutarat und GOT inkubiert wird, kann anhand der Produktionsgeschwindigkeit von Glutamat die Enzymaktivität gemessen werden (Karmen et al., 1955). Aus jedem Well wurden 25 µl des Überstands in eine 96-Well-Platte pipettiert. Anschließend wurden 200 µl des GOT-Substrats möglichst rasch hinzu pipettiert und sofort mit der kinetischen Messung am ELISA-Reader begonnen. Die photometrische Messung der Extinktion erfolgte bei einer Wellenlänge von 340 nm.

2.4.5 CellTiter-Blue®-Viabilitäts-Assay

Der CellTiter-Blue®-Viabilitäts-Assay dient der fluorometrischen Bestimmung des Anteils an lebendigen Zellen. Eine tote Zelle betreibt keine Proteinsynthese mehr im Vergleich zu einer lebenden Zelle mit ausgeprägtem Stoffwechsel. Die unterschiedlichen Stoffwechsellagen der Zellen werden mit Hilfe des im Assay verwendeten Farbstoffs Resazurin bestimmt. Resazurin erscheint tiefblau und hat eine geringe Eigenfluoreszenz. Lebende Zellen sind in der Lage Resazurin zu Resorufin zu reduzieren. Dieses erscheint pink und fluoresziert (579_{Exziation}/584_{Emission}) stark. Abgestorbene Zellen sind nicht in der Lage den

Farbstoff zu verstoffwechseln, weshalb keine Fluoreszenz messbar ist. Durch diese Fluoreszenzveränderung können die unterschiedlichen Stoffwechselzustände der Zellen gemessen und so ein Rückschluss auf ihre Viabilität gezogen werden. Es besteht ein annähernd linearer Zusammenhang zwischen Zellzahl und Fluoreszenz. Allerdings ist es nicht möglich Aussagen über die spezifischen Zelltodformen wie etwa Apoptose oder Nekrose zu treffen. Pro Well mit 400 µl wurden 80 µl CellTiter-Blue® Reagenz (Promega) hinzugegeben, anschließend wurden die Platten für 4 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 100 µl des Überstands zur Messung in eine 96-Well-Platte überführt und die Floreszenz (550_{Exziation}/595_{Emission}) bestimmt.

2.4.6 Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse (FACS)

Um die Wirkung der zu untersuchenden Substanzen auf die Proliferation der Melanomzellen zu untersuchen, wurde eine durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse mittels *Fluorescence activated cell sorting* (FACS) durchgeführt. Die Durchflusszytometrie wird für die quantitative Analyse vieler Zellen in kurzer Zeit genutzt. Die Zellen werden u.a. auf Größe und Granularität untersucht. Grundlage der Untersuchung sind die Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften der Zellen, die zuvor mit verschiedenen Farbstoffen angefärbt wurden. Die vorbereiteten Zellen werden dafür im Durchflusszytometer durch einen Hüllstrom fokussiert. Dabei werden sie so stark beschleunigt, dass sich Aggregate auftrennen und die Zellen einzeln an einem oder mehreren Lasern vorbei fließen. Am Analysepunkt werden Fluoreszenz und Streulicht jeder einzelnen Zelle gemessen. Das emittierte Streulicht wird detektiert und dann ausgewertet. Zur DNA Markierung wurde Propidiumiodid (PI) verwendet, was 1975 zum ersten Mal beschrieben wurde (Krishan, 1975). Von den Melanomzelllinien SK-MEL-28, BLM und LOX-IMVI wurden 25.000 Zellen/Well in 550 µl Zellsuspension in 24-Well-Platten ausgelegt und für 24 h bei 37 °C in einer 95 % Sauerstoff und 5 % CO₂ Atmosphäre bei 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, durch 500 µl frisches Zellkulturmedium ersetzt und wie in 2.3.6. (Behandlung der Melanomzellen) beschrieben, in Duplikaten behandelt. Nach 72 h Inkubation wurden die Überstände in 15 ml konische

Zentrifugenröhrchen überführt. Die adhärennten Zellen wurden mit je 500 µl PBS gewaschen. Dieses wurde ebenfalls in dem entsprechenden konischen Zentrifugenröhrchen gesammelt, um auch die Zellen im Überstand bei der Messung zu berücksichtigen. Nun wurden die Zellen mit 200 µl Trypsin pro Well ein paar Minuten inkubiert und dann ebenfalls in das entsprechende konische Zentrifugenröhrchen überführt. Im Anschluss wurden diese für 5 min bei 1200 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden anschließend vorsichtig dekantiert, die Zellen mit 1 ml kaltem PBS gewaschen und erneut für 5 min bei 1200 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach Entfernung der Überstände, wurden die Zellen mit 1 ml 75 %iger Ethanollösung fixiert und vorsichtig auf einem Vortexer homogenisiert, bevor die Proben für mindestens eine Nacht bei 4 °C gekühlt wurden. Zum Waschen der Zellen wurden pro Tube etwa 2 ml kaltes PBS hinzugegeben und anschließend für 10 min bei 1200 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nun wurden die Überstände vorsichtig abgesaugt und die Zellsuspension nochmals mit 1 ml kaltem PBS gewaschen, vorsichtig gevortext und erneut für 10 min bei 1200 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach vorsichtigem Absaugen der Überstände wurden die Zellen mit 200 µl der Propidiumiodid/RNase Lösung gefärbt, vorsichtig gevortext und für mindestens 20 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Für 10 ml Propidiumiodid/RNase Lösung wurden 500 µl PI + 100 µl RNase + 9,4 ml steriles PBS verwendet. Da die RNase RNA abbaut, wird so eine Verfälschung der DNA-Markierung durch Propidiumiodid verhindert. Der Farbstoff Propidiumiodid ist in der Lage Nukleinsäuren zu markieren. Die Zellmembran vitaler Zellen kann der Farbstoff nicht durchdringen. Durch die Verwendung einer hypotonen Lösung nehmen die Zellen aufgrund eines osmolaren Schocks Schaden, sodass Propidiumiodid in der Lage ist auch die DNA von zuvor vitalen Zellen zu markieren (Krishan, 1975). Die Messung sollte dann bis spätestens 24 h nach Färbung der Zellen erfolgen. Das emittierte Lichtsignal des Propidiumiodids wurde durch die Fluoreszenz im LSRII FACS Gerät gemessen und anschließend wurde die Zellzyklusanalyse mit Hilfe der FACSDiva Software durchgeführt. Die Versuchsreihen wurden dreimal wiederholt.

3 Ergebnisse

3.1 Viabilität und Proliferation der Melanomzellen unter Behandlung mit Vineatrol, Resveratrol, Vineatrol-Solubilisat

3.1.1 MUH-Assay nach 24 h, 48 h, 72 h

Mit Hilfe von MUH-Assays sollte der konzentrationsabhängige Effekt des Extraktes Vineatrol im Vergleich zum Solubilisat und zu Resveratrol auf die humanen Melanom-Zelllinien BLM, SK-MEL-28 und LOX-IMVI in Hinblick auf Zellwachstum und Proliferation untersucht werden. Ziel war dabei Konzentrationen zu definieren, die zur Proliferationshemmung der Tumorzellen führen. Die bei allen Experimenten als Kontrolle mitgeführte mit H₂O beladene Leermizelle wurde im Nachhinein aus den Ergebnissen der Versuche mit den Melanomzelllinien ausgeschlossen und deshalb hier nicht dargestellt. Durch die Wasserbeladung kam es möglicherweise zu einer Inversion der hydrophilen und lipophilen Anteile, wodurch sich die Polarität der Mizelle änderte. Daher handelte es sich um keine adäquate Kontrolle. Auf die grafische Darstellung nach der Behandlungsdauer von 24 h wurde aufgrund fehlender signifikanter Veränderungen des Zellwachstums und der Proliferation unabhängig von der eingesetzten Substanz verzichtet.

Versuchsschema:

Zelllinien	BLM, SK-MEL-28, LOX-IMVI				
Messzeiten	24 h		48 h		72 h
Konzentrationen (µg/ml)	40	20	10	5	2,5
Lebendkontrolle	Medium				
Totkontrolle	1%ig Triton				
Pipettierschema	Triplikate, diese je einmal gemessen, Versuche wurden dreimal wiederholt				

3.1.1.1 MUH-Assay mit BLM-Zellen für 24, 48 und 72 h

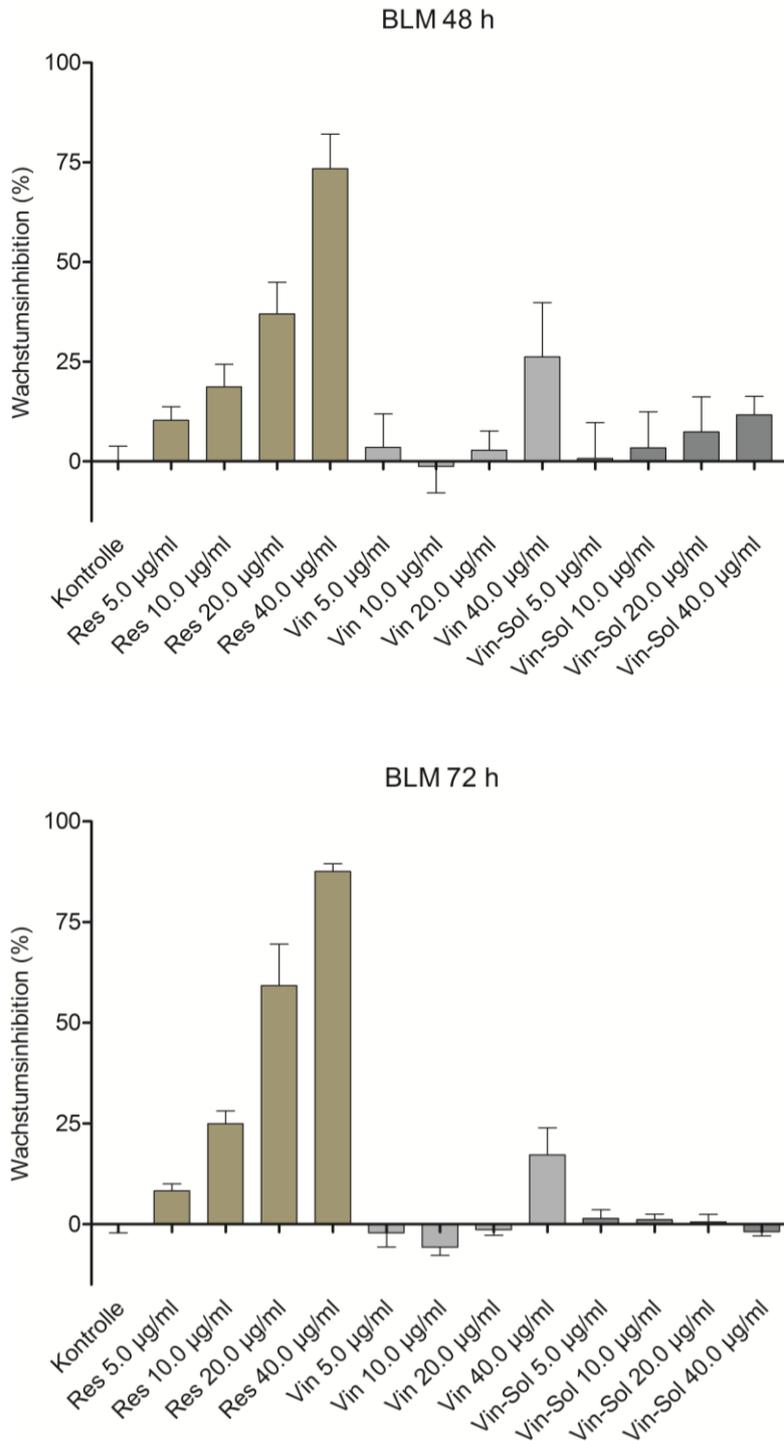


Abbildung 4: MUH-Assay der BLM-Zelllinie

Photometrische Bestimmung der Wachstumshemmung der BLM-Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Dargestellt sind die Behandlungen mit den drei eingesetzten Substanzen verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Die eingesetzten Konzentrationen betragen zwischen 2,5 bis 40 µg/ml. Gezeigt sind die Konzentrationen von 5 bis 40 µg/ml. Die Behandlungsdauer betrug 24 h, 48 h und 72 h. Triton wurde als Totkontrolle verwendet. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 48 h und 72 h und dabei jeweils die Mittelwerte ± SD aus drei unabhängigen Experimenten, jeweils gemessen als Triplikate. MUH (4-Methylumbelliferyl-Heptanoat), Res (Resveratrol), Vin (Vineatrol), Vin-Sol (Vineatrol-Solubilisat).

Das Wachstum der BLM-Zellen wurde nach 48 h Behandlung mit dem Reinstoff Resveratrol bei einer Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$ um ca. 75 % gehemmt. Demgegenüber zeigte die Behandlung mit reinem Vineatrol und dessen Solubilisat selbst in hohen Konzentrationen nur eine geringe antitumorale Wirkung. Nach 48 h Behandlungsdauer lag die antiproliferative Wirkung von Vineatrol unter Einsatz der höchsten Konzentration (40 $\mu\text{g/ml}$) bei etwa 25 %. Die des Solubilisats blieb gleichbleibend gering. Nach der Behandlungsdauer von 72h wurden die BLM-Zellen, die mit Resveratrol behandelt wurden, um etwa 90 % bei einer Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$ und um etwa 55 % bei 20 $\mu\text{g/ml}$ in ihrem Wachstum gehemmt. Das Solubilisat zeigte keinerlei Effekt auf die Proliferation der BLM-Zellen. Vineatrol bewirkte eine Proliferationshemmung um ca. 15 % mit einer Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$. Geringere Konzentrationen wiesen keine signifikante Veränderung auf. Unter Behandlung mit Resveratrol ließ sich stets die deutlichste antitumorale Wirkung feststellen. Diese Wirkung stieg mit dem Einsatz höherer Konzentrationen und der Behandlungsdauer stetig an. Für Vineatrol und das Solubilisat war keine Überlegenheit gegenüber Resveratrol in Bezug auf deren Antitumorwirkung zu verzeichnen.

3.1.1.2 MUH-Assay mit SK-MEL-28-Zellen für 24, 48 und 72 h

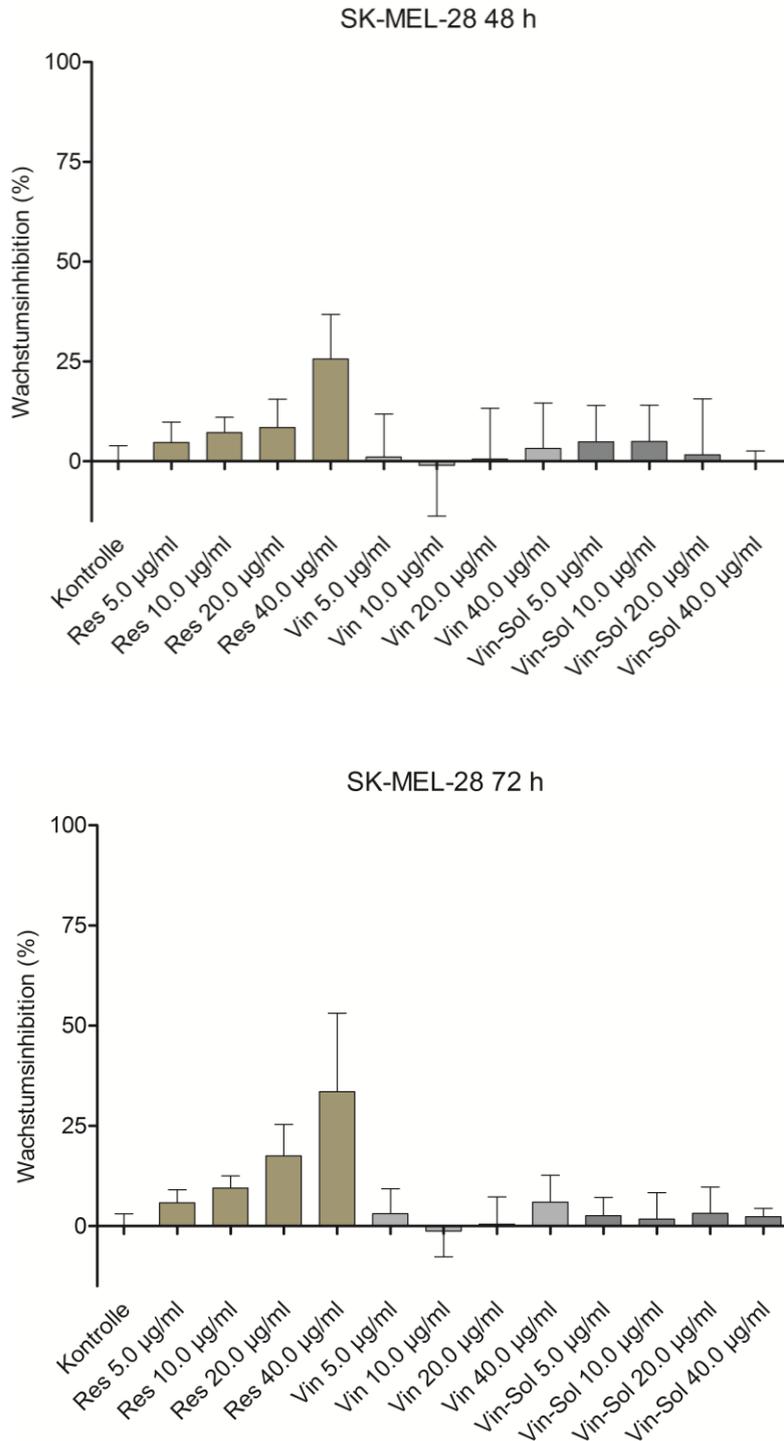
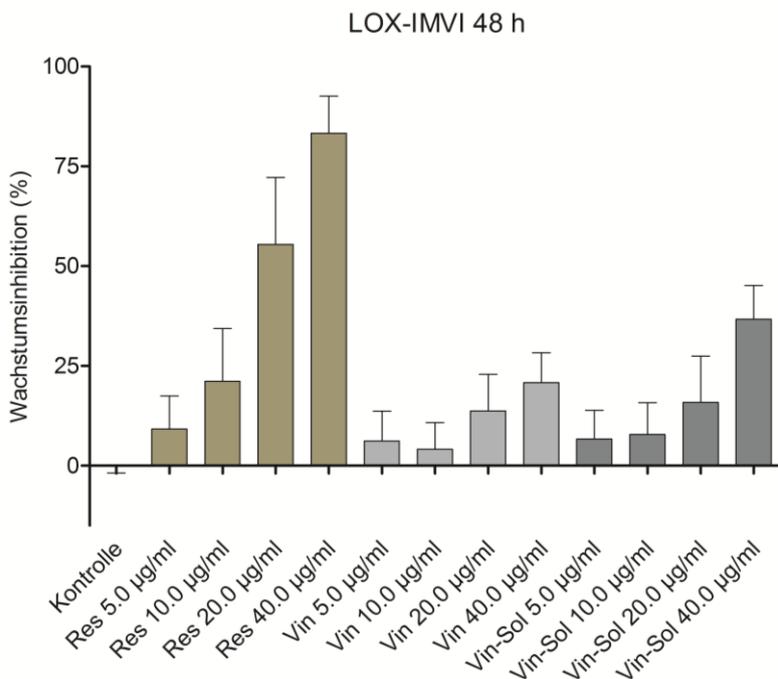


Abbildung 5: MUH-Assay der SK-MEL-28-Zelllinie

Photometrische Bestimmung der Wachstumshemmung der SK-MEL-28-Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Dargestellt sind die Behandlungen mit den drei eingesetzten Substanzen verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Die eingesetzten Konzentrationen betragen zwischen 2,5 bis 40 µg/ml. Gezeigt sind die Konzentrationen von 5 bis 40 µg/ml. Die Behandlungsdauer betrug 48 h und 72 h. Triton wurde als Totkontrolle verwendet. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 48 h und 72 h mit den zugehörigen Mittelwerten \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten, jeweils gemessen als Triplikate. MUH (4-Methylumbelliferyl-Heptanoat), Res (Resveratrol), Vin (Vineatrol), Vin-Sol (Vineatrol-Solubilisat).

Der MUH-Assay zeigte nach 48 h Behandlungsdauer keine signifikanten Veränderungen unabhängig von der Konzentration der Behandlung sowohl mit Vineatrol als auch mit Vineatrol-Solubilisat. Resveratrol bewirkte einen deutlicheren Effekt im Vergleich zu den anderen Substanzen, aber selbst unter Einsatz der höchsten Konzentration (40 µg/ml) wurde nur eine geringe Wachstumshemmung von etwa 25 % erreicht. Geringere Konzentrationen von Resveratrol bewirkten keine nennenswerte Proliferationshemmung der Tumorzellen. Selbst nach 72 h Behandlungsdauer war unabhängig der Höhe der eingesetzten Konzentration keine Veränderung des Wachstumsverhaltens bei Behandlung mit Vineatrol und dem Vineatrol-Solubilisat zu sehen. 40 µg/ml Resveratrol hemmten das Wachstum der Zellen nach 72 h um etwa 30 %, geringere Konzentrationen zeigten keine signifikanten Änderungen. Die Behandlungen schienen die SK-MEL-28-Zellen im Vergleich zu der BLM und der LOX-IM-VI Zelllinie am wenigsten an der Proliferation zu hindern. Dies lässt vermuten, dass SK-MEL-28-Zellen gegenüber der Behandlung resistenter sind.

3.1.1.3 MUH-Assay mit LOX-IMVI-Zellen für 24, 48 und 72 h



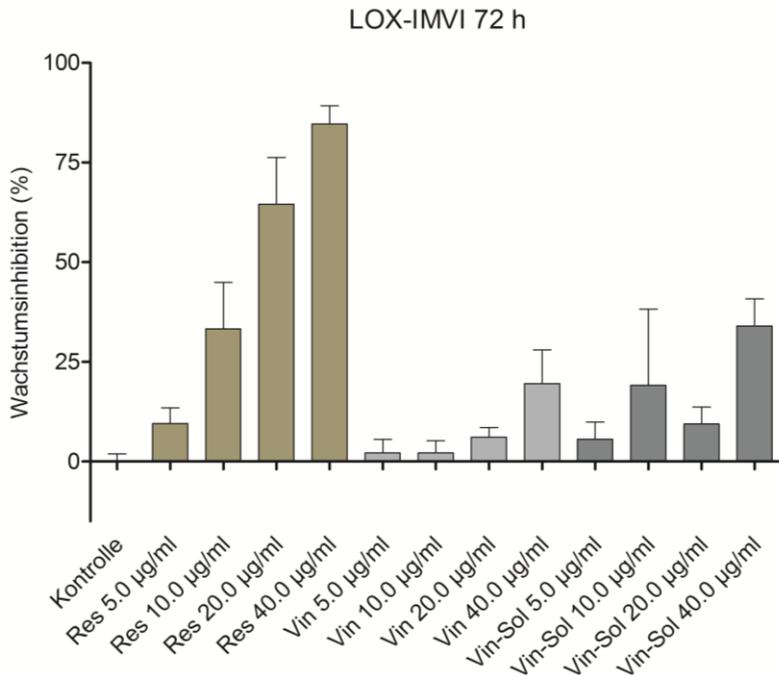


Abbildung 6: MUH-Assay der LOX-IMVI-Zelllinie

Photometrische Bestimmung der Wachstumshemmung der LOX-IMVI-Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Dargestellt sind die Behandlungen mit den drei eingesetzten Substanzen verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Die eingesetzten Konzentrationen betragen zwischen 2,5 bis 40 µg/ml. Gezeigt sind die Konzentrationen von 5 bis 40 µg/ml. Die Behandlungsdauer betrug 48 h und 72 h. Triton wurde als Totkontrolle verwendet. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 48 h und 72 h mit den zugehörigen Mittelwerten \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten, jeweils gemessen als Triplikate. MUH (4-Methylumbelliferyl-Heptanoat), Res (Resveratrol), Vin (Vineatrol), Vin-Sol (Vineatrol-Solubilisat).

Die Auswertung des MUH-Assays ergab, dass die LOX-IMVI-Zelllinie am empfindlichsten auf die zu untersuchenden Substanzen reagierte. Nach einer Behandlungsdauer von 48 h bewirkte Resveratrol mit einer Konzentration von 20 µg/ml eine Wachstumshemmung der Zellen um ca. 50 %. 40 µg/ml Resveratrol hemmten die Proliferation um ca. 80 %. Bereits mit einer Konzentration von 10 µg/ml bewirkte Resveratrol eine Hemmung um etwa 25 %. Die Proliferationshemmung durch das Solubilisat war etwas stärker ausgeprägt als bei reinem Vineatrol. Nach 48 h zeigte sich bei 40 µg/ml ein verringertes Wachstum um ca. 35 %, wohingegen dies bei Behandlung mit reinem Vineatrol in gleicher Konzentration nur um etwa 20 % erreicht werden konnte. Das stärkere Ansprechen der Zellen auf das Solubilisat im Vergleich zu reinem Vineatrol bestätigte sich in den MUH-Assays mit Behandlungsdauer von 72 h. Dennoch wurde selbst bei Einsatz der höchsten Konzentration (40 µg/ml)

des Solubilisats kein höherer Wert als etwa 30 % Wachstumshemmung erreicht. Resveratrol zeigte stets mit Abstand die ausgeprägteste antitumorale Wirkung. Mit längerer Behandlungsdauer (72 h) nahm auch die Wirkung der geringeren Konzentrationen zu. 10 µg/ml bewirkten eine Hemmung der LOX-IMVI-Zellen um ca. 30 %, 20 µg/ml um etwa 70 % und 40 µg/ml um ca. 90 %.

Zusammenfassend zeigte sich bei den untersuchten Melanomzelllinien der stärkste Effekt bezüglich der Proliferationshemmung bei Behandlung mit Resveratrol. Dieser nahm mit Behandlungsdauer und Konzentrationshöhe zu. Die Behandlungen mit sowohl Vineatrol als auch mit Vineatrol-Solubilisat waren dem nicht überlegen.

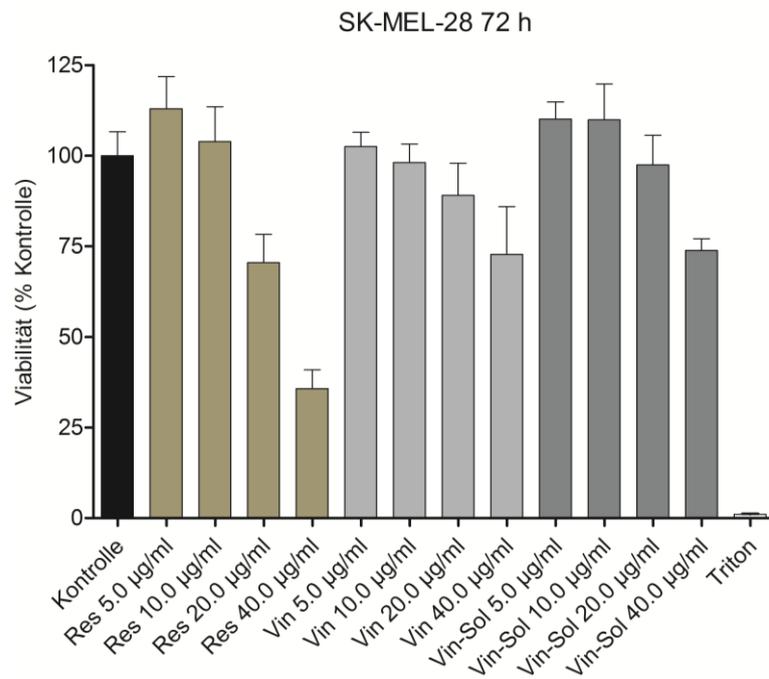
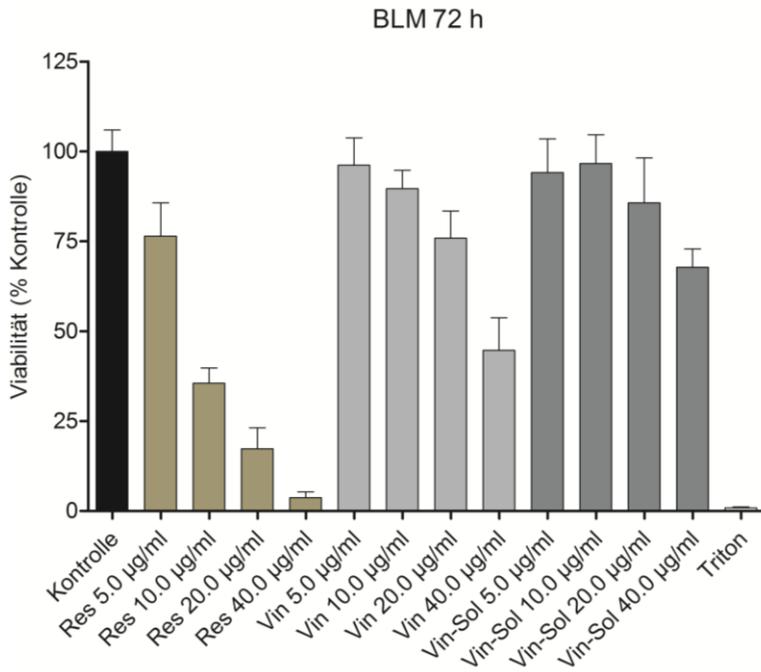
3.1.2 SRB-Assay nach 72 h

Durch SRB-Assays sollte ein konzentrationsabhängiger Einfluss der Reinsubstanz Vineatrol im Vergleich zu dem Solubilisat und zu Resveratrol auf standardisierte humane Melanom-Zelllinien BLM, SK-MEL-28, LOX-IMVI in Hinblick auf die Viabilität untersucht werden. Ziel war dabei die Substanzen und deren nötige Konzentrationen zu definieren, die zu einer Proliferationshemmung führen und die Ergebnisse der MUH-Analysen zu verifizieren.

Versuchsschema:

Zelllinien	BLM, SK-MEL-28, LOX-IMVI				
Messzeit	72 h				
Konzentrationen ($\mu\text{g/ml}$)	40	20	10	5	2,5
Lebendkontrolle	Medium				
Totkontrolle	1%ig Triton				
Pipettierschema	Duplikate, diese je dreimal gemessen, Versuche je dreimal wiederholt				

3.1.2.1 SRB-Assay mit Melanom-Zellen für 72 h



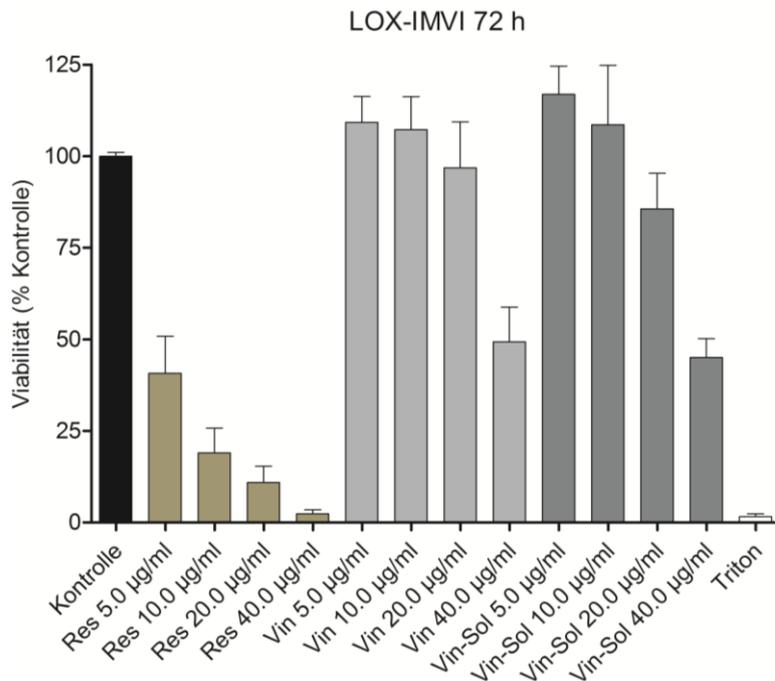


Abbildung 7: SRB-Assay der Zelllinien BLM, SK-MEL-28, LOX-IMVI

Photometrische Bestimmung der Viabilität der Melanomzellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Dargestellt sind die Behandlungen mit den drei eingesetzten Substanzen verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Die eingesetzten Konzentrationen betragen zwischen 2,5 bis 40 µg/ml. Gezeigt sind die Konzentrationen von 5 bis 40 µg/ml. Die Behandlungsdauer betrug 72 h. Triton wurde als Totkontrolle verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten, jeweils gemessen als Duplikate. SRB (Sulforhodamin B), Res (Resveratrol), Vin (Vineatrol), Vin-Sol (Vineatrol-Solubilisat).

Die Viabilität der BLM-Zellen nahm nach 72 h am deutlichsten unter der Behandlung mit Resveratrol ab. Je höher die eingesetzte Konzentration, desto ausgeprägter war die Proliferationshemmung. Bei einer Konzentration von 5 µg/ml nahm die Viabilität der Zellen auf ca. 75 % gegenüber der Kontrolle ab. Dieser Effekt war konzentrationsabhängig bis bei einer Konzentration von 40 µg/ml der Anteil an lebenden Zellen auf etwa 5 % absank. Unter der Behandlung mit Vineatrol verringerte sich der Anteil an lebenden Zellen selbst unter Einsatz der höchsten Konzentration mit 40 µg/ml nur auf ca. 50 %. Niedrigere Vineatrol-Konzentrationen zeigten dagegen keine wesentlichen Veränderungen gegenüber der Kontrolle. Das Solubilisat hatte auch unter Behandlung mit der höchsten Konzentration minimalen Einfluss auf die Viabilität der Zellen. Diese nahm bei Behandlung mit 40 µg/ml um ca. 30 % im Vergleich

zur Kontrolle ab. Für Vineatrol und das Solubilisat ließ sich keine Überlegenheit in Bezug auf die antitumorale Wirkung im Vergleich zu Resveratrol verzeichnen.

Die SRB-Daten zeigen nach 72 h eine Verringerung der Viabilität der SK-MEL-28-Zellen auf etwa 30 % unter Behandlung mit 40 µg/ml Resveratrol und auf etwa 70 % gegenüber der unbehandelten Kontrolle bei Einsatz von 20 µg/ml Resveratrol. Geringere Konzentrationen zeigten keinen signifikanten Effekt. Im Vergleich dazu war der Viabilitätsabfall unter Behandlung mit Vineatrol deutlich geringer. Selbst bei Behandlung mit höchster Konzentration betrug der Anteil an lebenden Zellen noch etwa 75 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Das Vineatrol-Solubilisat hatte bei gleicher Konzentration (40 µg/ml) in etwa die gleiche Auswirkung auf die Viabilität der Zellen. Geringere Konzentrationen sowohl von Vineatrol als auch von Vineatrol-Solubilisat hatten keine nennenswerten Effekte auf die Viabilität der SK-MEL-28 Zellen. Die SK-MEL-28 Zelllinie schien die Behandlungen im Vergleich zu der BLM und der LOX-IM-VI Zelllinie am besten zu tolerieren.

Die grafische Darstellung des SRB-Assays der LOX-IM-VI Zellen zeigt die deutlichsten Veränderungen im Vergleich zu den zwei anderen untersuchten Zelllinien. Am stärksten reagierte diese Zelllinie auf die Behandlung mit Resveratrol. Bei Behandlung mit einer Konzentration von 5 µg/ml war der Anteil an lebenden Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bereits auf unter 50 % gesunken. Mit steigender Konzentration nahm dieser Anteil stetig ab, bis bei 40 µg/ml nahezu alle Zellen tot waren. Bei Behandlung mit Vineatrol in der Konzentration von 40 µg/ml war etwa noch die Hälfte der Zellen lebendig. Die LOX-IMVI Zellen reagierten auch auf die Behandlung mit Vineatrol-Solubilisat. Mit 40 µg/ml war der Anteil an lebenden Zellen auf etwa 50 % gesunken. Die Wirkung von Reinstoff und Solubilisat war somit annähernd gleich. Geringere Konzentrationen zeigten keine signifikanten Effekte.

Zusammenfassend zeigte sich bei den untersuchten Zelllinien der stärkste Effekt in Bezug auf die Viabilität bzw. die Proliferationshemmung bei

Behandlung mit Resveratrol. Die Behandlungen mit Vineatrol und Vineatrol-Solubilisat waren der mit Resveratrol nicht überlegen.

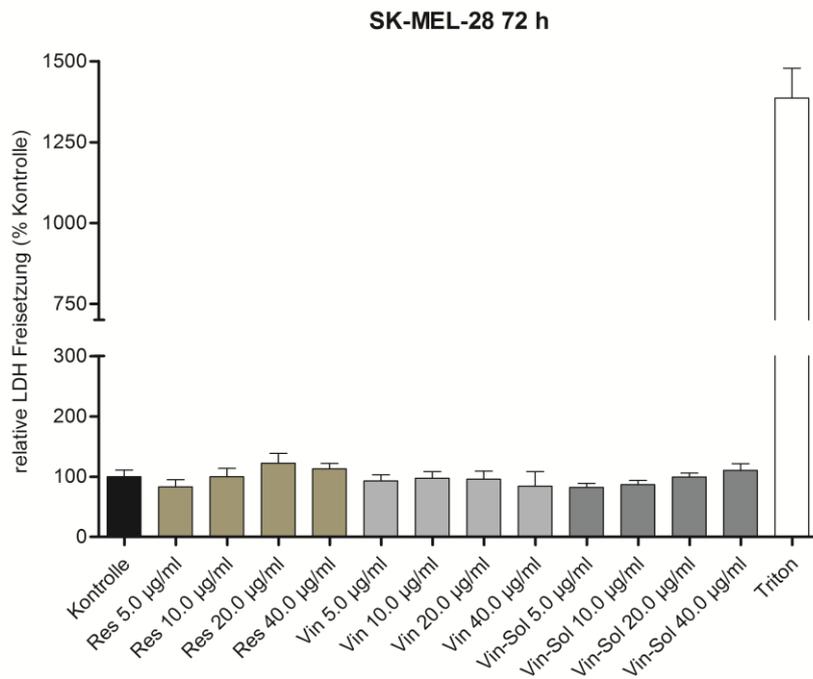
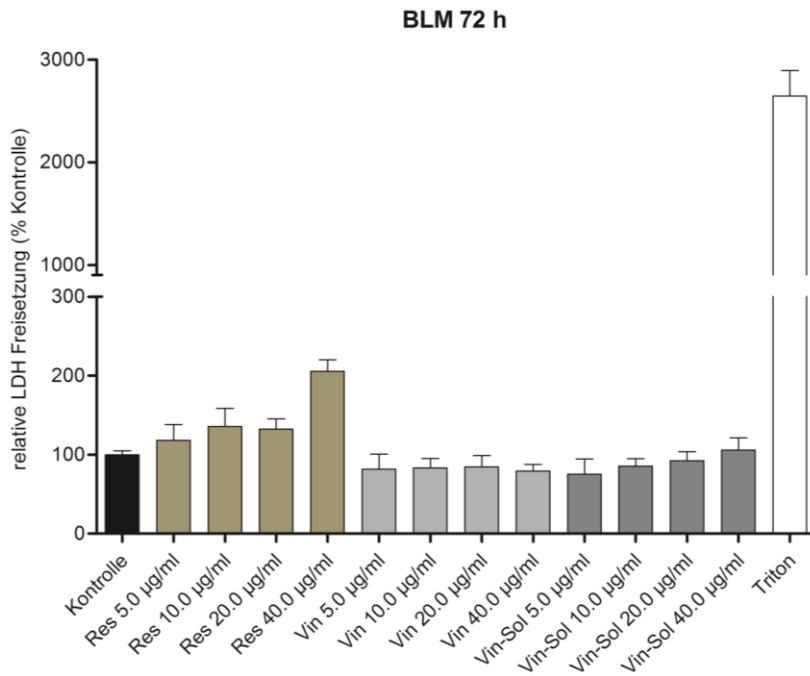
3.1.3 LDH-Assay nach 72 h

In Kombination mit dem beschriebenen SRB-Assay hilft dieser Assay zwischen Proliferationshemmung und / oder einer zusätzlichen Zellschädigung zu unterscheiden. Das Enzym LDH kann als Parameter für Zellschädigung im Überstand gemessen werden, da dieses bei Zerstörung der Zellmembran als Zeichen des Zelltodes freigesetzt wird. Ziel der Versuche war es festzustellen, ob die Testsubstanzen schädigend auf Melanomzellen wirken und die dazugehörigen Konzentrationen zu definieren, die eine Freisetzung von LDH bewirken.

Versuchsschema:

Zelllinie	BLM, SK-MEL-28, LOX-IMVI				
Messzeit	72 h				
Konzentrationen ($\mu\text{g/ml}$)	40	20	10	5	2,5
LDH-Messung	im Überstand				
Lebendkontrolle	Medium				
Totkontrolle	1%ig Triton				
Pipettierschema	Duplikate, diese je einmal gemessen, Versuche je dreimal wiederholt				

3.1.3.1 LDH-Assay mit Melanom-Zellen für 72 h



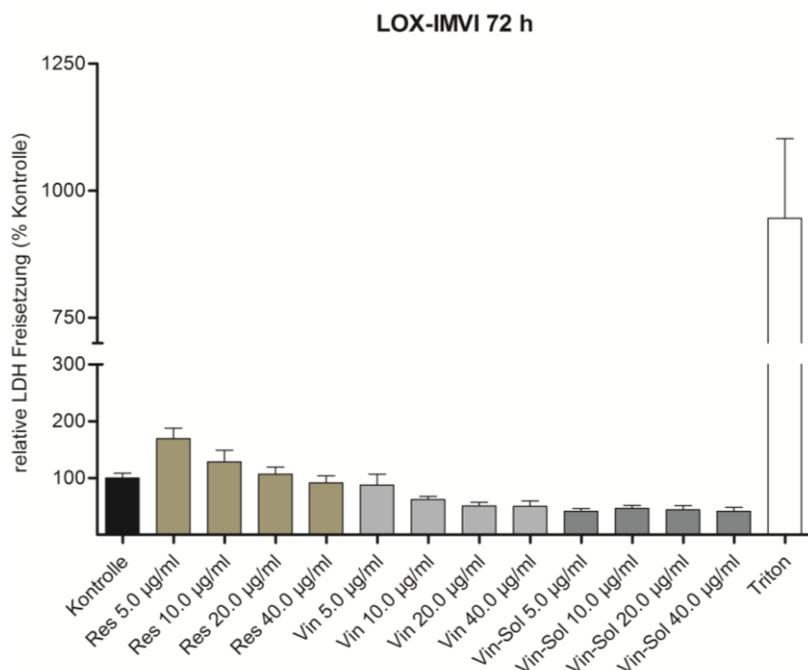


Abbildung 8: LDH-Assay der Zelllinien BLM, SK-MEL-28, LOX-IMVI

Photometrische Bestimmung des relativen LDH-Gehalts (gemessen im Überstand) der Melanomzellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Dargestellt sind die Behandlungen mit den drei eingesetzten Substanzen verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Die eingesetzten Konzentrationen betragen zwischen 2.5 bis 40 µg/ml. Gezeigt sind die Konzentrationen von 5 bis 40 µg/ml. Die Behandlungsdauer betrug 72 h. Triton wurde als Totkontrolle verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten, jeweils gemessen als Duplikate. LDH (Laktatdehydrogenase), Res (Resveratrol), Vin (Vineatrol), Vin-Sol (Vineatrol-Solubilisat).

Die grafische Auswertung des LDH-Assays der BLM-Zellen zeigte bei allen eingesetzten Konzentrationen des reinen Vineatrols als auch bei dessen Solubilisat keine Veränderung der LDH-Menge im Überstand im Vergleich zur Kontrolle. Das heißt es ließ sich keine Membranschädigung der Zelle unter Behandlung feststellen. Die Zellen platzen nicht auf und es kommt zu keiner Nekrose. Bei Behandlung mit Resveratrol ist bei einer Konzentration von 40 µg/ml eine Erhöhung der relativen LDH-Freisetzung von etwa 200 % zu erkennen. Geringere Konzentrationen bewirkten keine signifikante Veränderung des LDH-Wertes im Überstand. Die mit Triton behandelten Zellen zeigten einen LDH-Wert von ca. 2700 % gegenüber der unbehandelten Kontrolle.

Für die SK-MEL-28 Zellen war für keine der drei eingesetzten Substanzen eine Veränderung des relativen LDH-Gehalts im Überstand verglichen mit der

Kontrolle zu sehen. Die Werte der Triton-Kontrolle waren bei etwa 1400 % verglichen mit der Lebendkontrolle.

Die Daten des LDH-Assays der LOX-IMVI Zellen zeigen keinen Anstieg der relativen LDH-Freisetzung bei Behandlung mit sowohl Vineatrol als auch dem Solubilisat. Auch bei Behandlung mit Resveratrol kam es zu keiner signifikanten Änderung der LDH-Menge im Überstand. Bei den Triton-behandelten Zellen war ein LDH-Wert von etwa 950 % gegenüber der Kontrolle messbar.

Zusammenfassend ließ sich bei den Versuchen keine Veränderung der LDH-Freisetzung bei Behandlung mit Vineatrol und dem Solubilisat zeigen. Dies gilt für alle drei Melanomzelllinien. Resveratrol hatte nur geringe Auswirkungen abhängig von Konzentration und Zelllinie. Bei BLM kam es in höchster Konzentration der Resveratrolbehandlung zu einem erhöhten Wert des LDH-Levels im Überstand. Die beiden anderen Zelllinien zeigten keine signifikanten Veränderungen des LDH-Gehalts. Ein Verlust der Membranintegrität trat bei Behandlung mit den drei Testsubstanzen folglich nicht auf, was eine Zellnekrose sehr unwahrscheinlich macht. Daher ist anzunehmen, dass die Zellen bei Behandlung in Apoptose gehen.

3.2 Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie (FACS)

Mit Hilfe der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse (FACS) sollte untersucht werden, ob bei Behandlung der standardisierten humanen Melanomzellen (BLM, SK-MEL-28, LOX-IMVI) mit dem Extrakt Vineatrol, dem Vineatrol-Solubilisat, der Leermizelle und Resveratrol in Abhängigkeit der Konzentration Zeichen einer Apoptose auftreten. Ziel war dabei die Substanzen und deren nötige Konzentrationen zu definieren, die zu Apoptose der Tumorzelllinien führen.

Versuchsschema:

Zelllinien	BLM, SK-MEL-28, LOX-IMVI				
Messzeit	72 h				
Konzentrationen ($\mu\text{g/ml}$)	40	20	10	5	2,5
Lebendkontrolle	Medium				
Pipettierschema	Duplikate, diese je einmal gemessen, Versuche je dreimal wiederholt				

3.2.1 FACS-Analyse mit BLM Zellen für 72 h

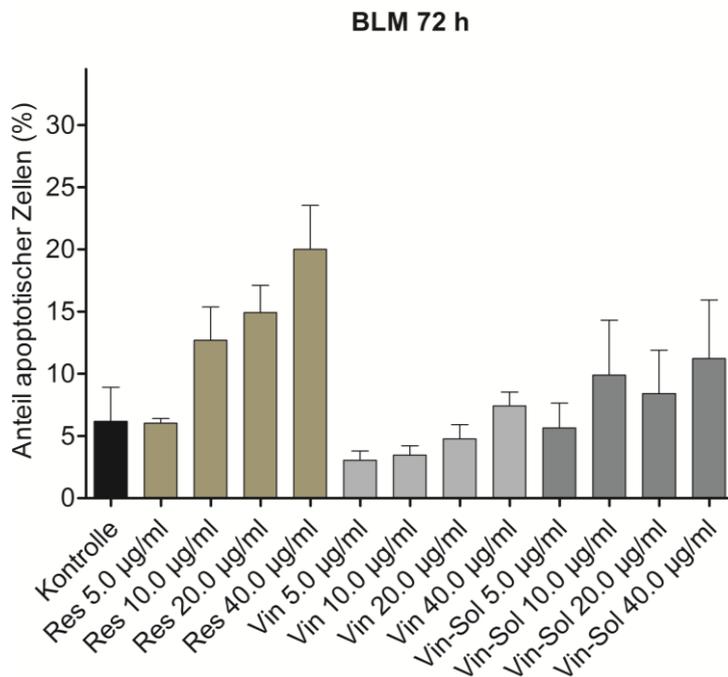


Abbildung 9: FACS-Analyse mit BLM Zellen

Anteil der apoptotischen Zellen an der Gesamtpopulation der BLM-Zellen nach der Behandlung mit Resveratrol, Vineatrol und dessen Solubilisat. Die eingesetzten Konzentrationen betragen zwischen 2,5 bis 40 µg/ml. Dargestellt sind die Konzentrationen von 5 bis 40 µg/ml. Die Behandlungsdauer war 72 h. Dargestellt ist der Anteil der Zellen, die in der sub-G1-Phase vorliegen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten, jeweils gemessen als Duplikate. FACS (fluorescence-activated cell scanning), Res (Resveratrol), Vin (Vineatrol), Vin-Sol (Vineatrol-Solubilisat).

Bei Behandlung der BLM-Zellen mit Resveratrol stieg nach 72 h der Anteil an apoptotischen Zellen mit Erhöhung der Konzentration. Die geringen Konzentrationen (2,5 und 5 µg/ml) bewirkten etwa den gleichen Anteil an apoptotischen Zellen wie die unbehandelte Kontrolle. Dieser betrug etwa 7%. Mit zunehmender Konzentration stieg dieser Anteil auf bis zu ca. 20 % bei Einsatz von 40 µg/ml Resveratrol an. Die Behandlungen mit Vineatrol zeigten nur einen geringen Anstieg des Anteils an apoptotischen Zellen. Selbst bei Behandlung mit der höchsten Konzentration von 40 µg/ml stieg der Anteil nur minimal über den der unbehandelten Kontrolle. Es kam zu keiner nennenswerten Zunahme der Apoptose bei Behandlung mit Vineatrol. Die Behandlung mit dem Solubilisat führte zu keinen eindeutigen Ergebnissen.

3.2.2 FACS-Analyse mit SK-MEL-28 Zellen für 72 h

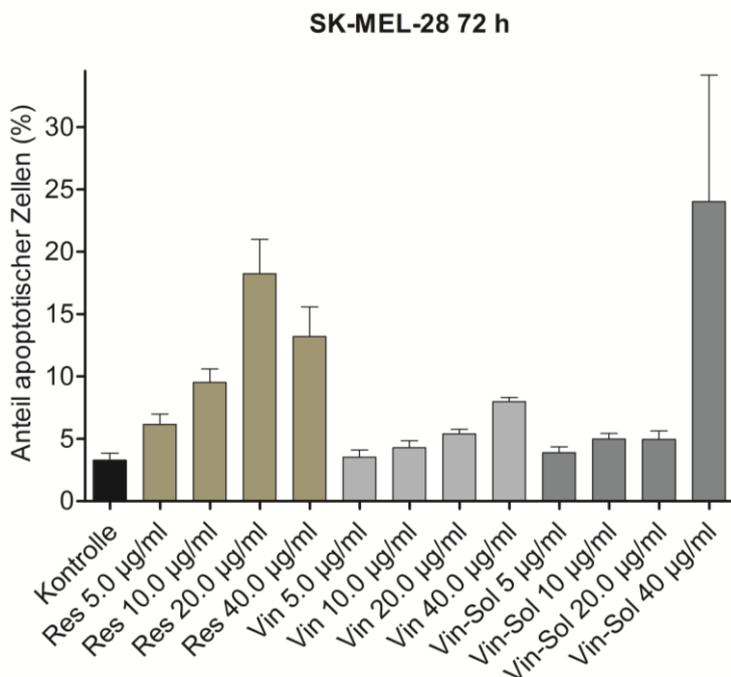


Abbildung 10: FACS-Analyse mit SK-MEL-28 Zellen

Anteil der apoptotischen Zellen an der Gesamtpopulation der SK-MEL-28-Zellen nach der Behandlung mit Resveratrol, Vineatrol und dessen Solubilisat. Die eingesetzten Konzentrationen betragen zwischen 2,5 bis 40 µg/ml. Dargestellt sind die Konzentrationen von 5 bis 40 µg/ml. Die Behandlungsdauer war 72 h. Dargestellt ist der Anteil der Zellen, die in der sub-G1-Phase vorliegen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten, jeweils gemessen als Duplikate. FACS (fluorescence-activated cell scanning), Res (Resveratrol), Vin (Vineatrol), Vin-Sol (Vineatrol-Solubilisat).

Der Anteil an apoptotischen Zellen der SK-MEL-28 unbehandelten Kontrolle lag bei etwa 3 %. Die Behandlung mit Resveratrol erhöhte diesen Anteil konzentrationsabhängig. Bei Einsatz von 10 µg/ml war der prozentuale sub-G1-Anteil bei ungefähr 10 %. Mit 20 µg/ml ließ sich ein Anteil von etwa 17 % feststellen, wohingegen bei Behandlung mit 40 µg/ml dieser auf etwa 13 % abfiel. Die Behandlung mit Vineatrol zeigte nur einen leichten Anstieg des Anteils der apoptotischen Zellen. Selbst bei Behandlung mit der höchsten Konzentration (40 µg/ml) betrug dieser nur etwa 8 %. Die Anteile bei Behandlung mit dem Solubilisat behielten bei Behandlung mit Konzentrationen von 2,5 bis 20 µg/ml etwa das gleiche Niveau von ca. 5 %. Bei Einsatz der höchsten Konzentration von 40 µg/ml kam es zu einem deutlichen Anstieg auf etwa 25 %.

3.2.3 FACS-Analyse mit LOX-IMVI Zellen für 72 h

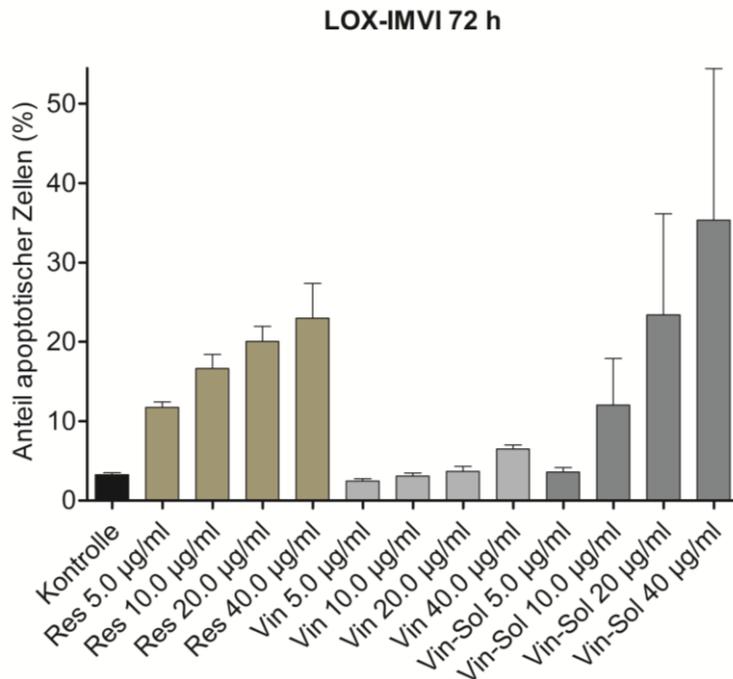


Abbildung 11: FACS-Analyse mit LOX-IMVI Zellen

Anteil der apoptotischen Zellen an der Gesamtpopulation der LOX-IMVI Zellen nach der Behandlung mit Resveratrol, Vineatrol und dessen Solubilisat. Die eingesetzten Konzentrationen betragen zwischen 2,5 bis 40 µg/ml. Dargestellt sind die Konzentrationen von 5 bis 40 µg/ml. Die Behandlungsdauer war 72 h. Dargestellt ist der Anteil der Zellen, die in der sub-G1-Phase vorliegen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten, jeweils gemessen als Duplikate. FACS (fluorescence-activated cell scanning), Res (Resveratrol), Vin (Vineatrol), Vin-Sol (Vineatrol-Solubilisat).

Bei den LOX-IMVI Zellen war der Anteil der Zellen in der sub-G1-Phase nach Behandlung mit Vineatrol gegenüber der Kontrolle nicht bis kaum erhöht. Bei Behandlung mit Resveratrol stieg der Anteil der apoptotischen Zellen mit zunehmender Konzentration. Bei einer Resveratrol-Konzentration von 2,5 µg/ml waren ca. 6 % der Zellen apoptotisch. Dieser Anteil stieg auf bis zu 23 % bei 40 µg/ml Resveratrol. Die Behandlung mit dem Solubilisat in den geringen Konzentrationen (2,5 und 5 µg/ml) führte zu keiner Erhöhung des Anteils im Vergleich zur Lebendkontrolle. Ab Konzentrationen von 10 µg/ml bis 40 µg/ml war eine Erhöhung messbar von ca. 10 % bis 35 %. Die LOX-IMVI Zellen reagierten am deutlichsten auf die Behandlungen mit Resveratrol und dem Solubilisat.

Die Zellzyklusanalyse bestätigte die vorhergegangenen Ergebnisse. Der Apoptose-induzierende Effekt von Resveratrol war ab einer Konzentration von

10 µg/ml messbar. Sowohl Vineatrol als auch dessen Solubilisat hatten keine signifikante Wirkung. Die Ergebnisse bei Behandlung mit dem Solubilisat brachten keine eindeutigen Ergebnisse. Die Zelllinie LOX-IMVI reagierte, wie auch in den vorherigen Assays, im Vergleich zu den beiden anderen Melanomzelllinien am sensibelsten auf die Behandlung und zeigte die deutlichste Apoptose-induzierende Wirkung von Resveratrol.

3.3 Toxizitätsprüfung der zu untersuchenden Substanzen an primären humanen Hepatozyten (PHH)

In der dritten Phase des Projekts wurde die Toxizität der vier Testsubstanzen anhand von PHH überprüft. Diese Zellen stammten von zwei unabhängigen humanen Spendern und wurden von PD Dr. Thomas Weiß des Zentrums für Leberzellforschung, Regensburg zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden ausplattiert auf 24 Well Platten geliefert. Es wurde Resveratrol, Vineatrol und das Vineatrol-Solubilisat getestet. Die bei allen Experimenten als Kontrolle mitgeführte mit H₂O beladene Leermizelle wurde aus oben genannten Gründen (siehe 3.1.1.) im Nachhinein auch aus den Ergebnissen der Versuche mit den PHH-Zellen ausgeschlossen und deshalb hier nicht dargestellt.

3.3.1 CellTiter-Blue®-Assay nach 48 h

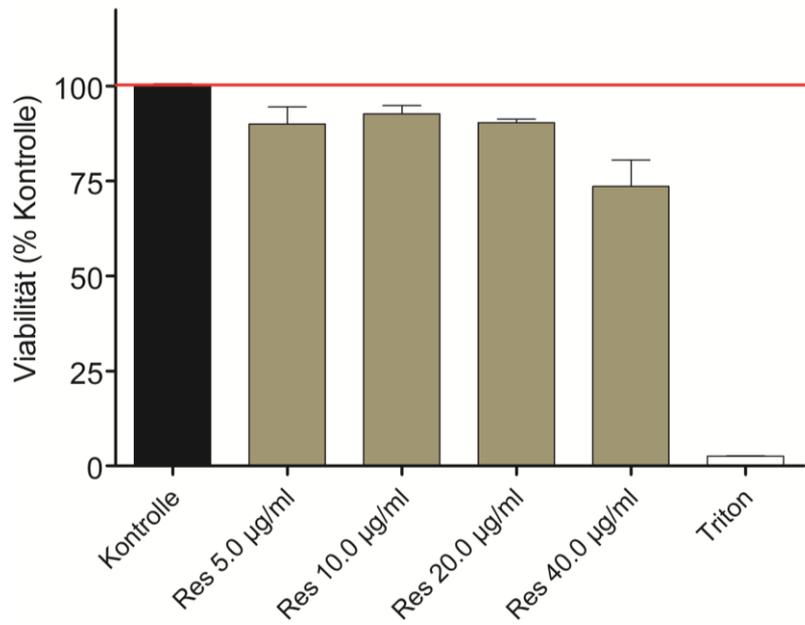
Zur Beantwortung der Frage, ob die Testsubstanzen den Zelltod in Nicht-Tumorzellen induzieren könnten, wurde die Viabilität der PHHs nach 48 h Behandlungsdauer mithilfe des metabolischen CellTiter-Blue®-Zellviabilitäts-Assays bestimmt. Ziel war dabei die Testsubstanzen und deren notwendige Konzentrationen zu definieren, die gesunde humane Leberzellen negativ beeinflussen und zu deren Absterben führen.

Versuchsschema:

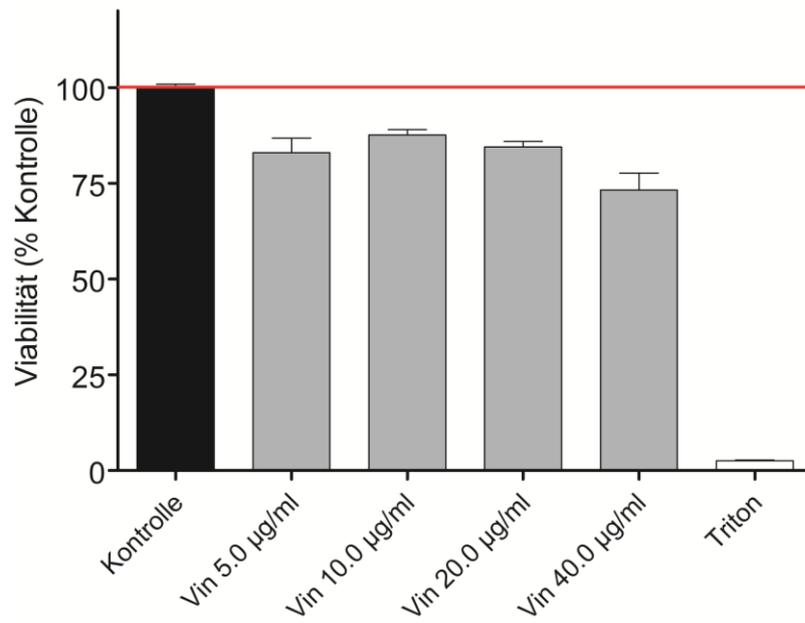
Zelltyp	PHH			
Messzeit	48 h			
Konzentrationen (µg/ml)	40	20	10	5
Lebendkontrolle	Medium			
Totkontrolle	1%ig Triton			
Pipettierschema	Duplikate, diese je einmal gemessen, Versuche je zweimal wiederholt			

3.3.1.1 CellTiter-Blue-Assay mit PHHs für 48 h

CTB Res 48 h



CTB Vin 48 h



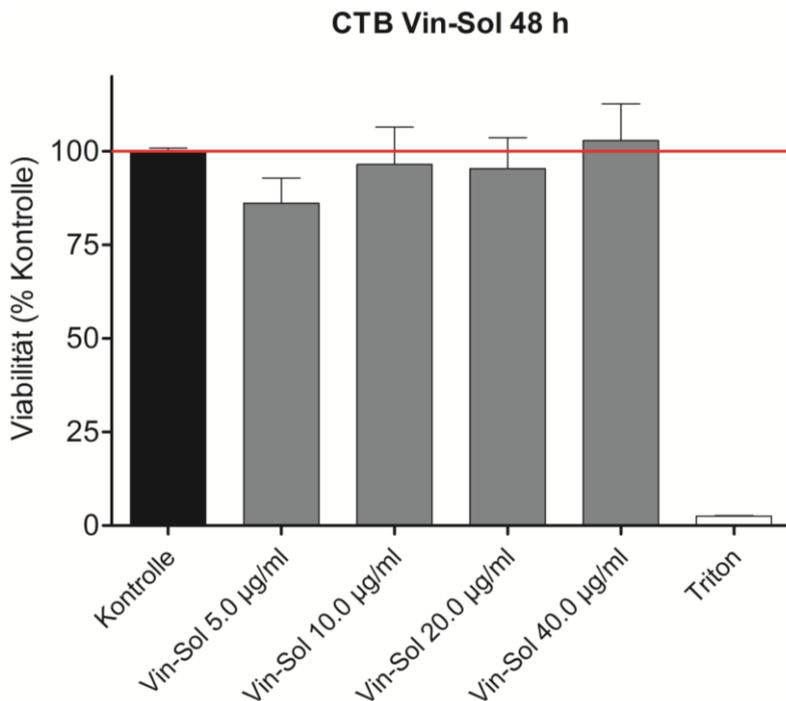


Abbildung 12: CellTiter-Blue®-Assay der PHHs mit Res, Vin, Vin-Sol

Messung der Viabilität der PHHs im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Dargestellt sind die Behandlungen mit den drei eingesetzten Substanzen verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Die eingesetzten Konzentrationen betragen zwischen 5 bis 40 µg/ml. Die Behandlungsdauer betrug 48 h. Triton wurde als Totkontrolle verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus zwei unabhängigen Experimenten, jeweils gemessen als Duplikate. Res (Resveratrol), Vin (Vineatrol), Vin-Sol (Vineatrol-Solubilisat).

Die Behandlung der PHHs mit reinem Vineatrol führte zu einem deutlichen Viabilitätsverlust. Bereits die niedrigste Konzentration von 5 µg/ml verringerte die Viabilität der Zellen auf ca. 88 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Unter Behandlung mit 40 µg/ml betrug der Anteil an lebenden Zellen noch etwa 70 %. Resveratrol zeigte im Vergleich dazu keine signifikante Änderung bezüglich der Viabilitätswerte bis 20 µg/ml, in der höchsten Konzentration (40 µg/ml) aber einen wesentlich stärkeren Abfall auf etwa 75 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Unter Behandlung mit der Leermizelle zeigte sich im CellTiter-Blue®-Assay ein leichter Abfall der Viabilitätswerte auf ca. 85 %. In der grafischen Darstellung des CellTiter-Blue®-Assays zeigte das Solubilisat keine signifikante Veränderung der Viabilität. Bei

Behandlung mit der Leermizelle ließ sich nur ein leichter Viabilitätsverlust im Vergleich zur Lebendkontrolle feststellen.

Zusammenfassend zeigte sich, dass die Behandlung mit Vineatrol ausgeprägte Viabilitätsverluste bei den PHHs mit sich bringt. Resveratrol wird dagegen mit Ausnahme der höchsten Konzentration (40 µg/ml) von den Leberzellen gut vertragen. Auch das Solubilisat wurde von den PHHs gut vertragen. Die Leermizelle bewirkte in allen Konzentrationen nur leichte Veränderungen bezüglich der Viabilität.

3.3.2 SRB-Assay nach 48 h

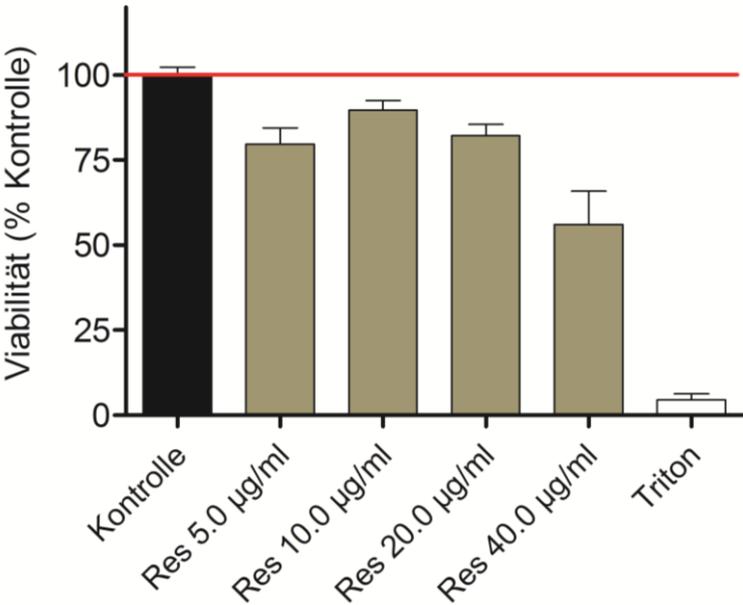
Durch SRB-Assays sollte ein konzentrationsabhängiger Einfluss von reinem Vineatrol im Vergleich zum Solubilisat und zu Resveratrol auf PHHs in Hinblick auf die Viabilität untersucht werden. Ziel war dabei die Stoffe und deren nötige Konzentrationen zu definieren, die humane Zellen negativ beeinflussen und zu einer Proliferationshemmung führen.

Versuchsschema:

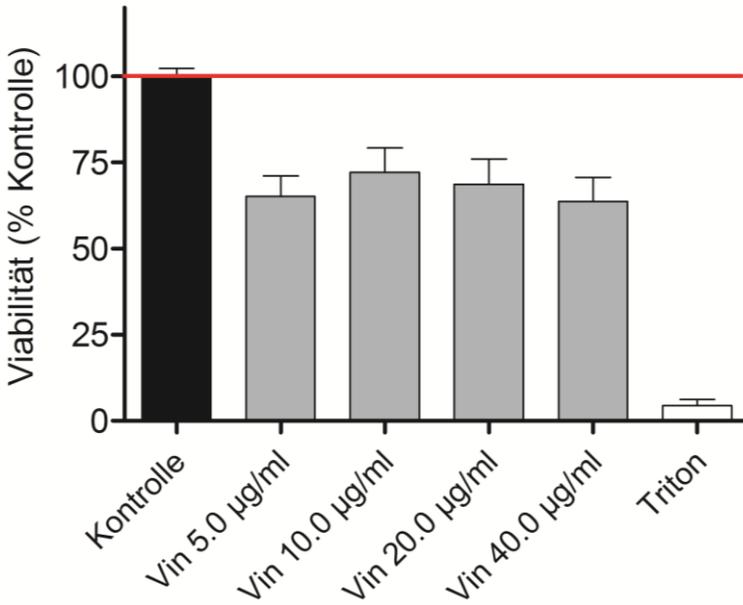
Zelltyp	PHH			
Messzeit	48 h			
Konzentrationen (µg/ml)	40	20	10	5
Lebendkontrolle	Medium			
Totkontrolle	1%ig Triton			
Pipettierschema	Duplikate, diese je dreimal gemessen, Versuche je zweimal wiederholt			

3.3.2.1 SRB-Assay mit PHHs für 48 h

SRB Res 48 h



SRB Vin 48 h



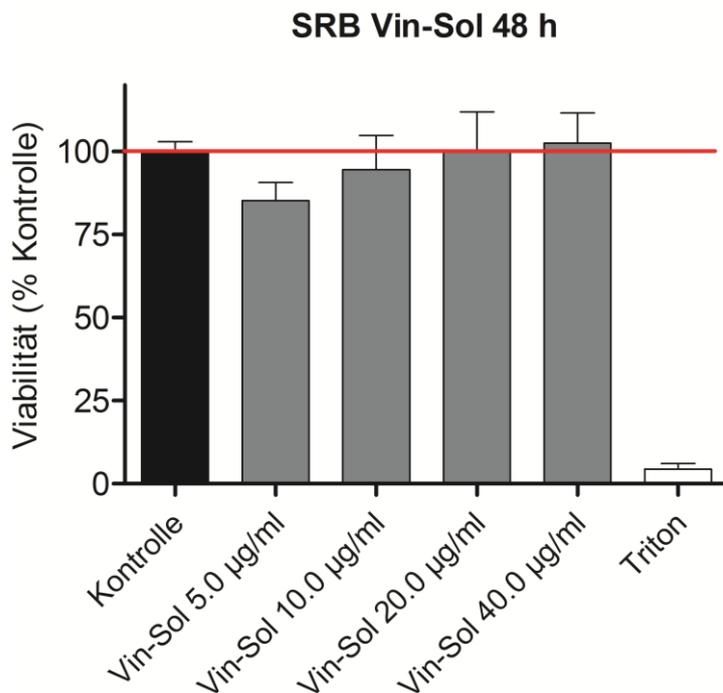


Abbildung 13: SRB-Assay der PHHs mit Res, Vin, Vin-Sol

Photometrische Bestimmung der Viabilität der PHHs im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Dargestellt sind die Behandlungen mit den drei eingesetzten Substanzen verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Die eingesetzten Konzentrationen betragen zwischen 5 bis 40 µg/ml. Die Behandlungsdauer betrug 48 h. Triton wurde als Totkontrolle verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus zwei unabhängigen Experimenten, jeweils gemessen als Duplikate. SRB (Sulforhodamin B), Res (Resveratrol), Vin (Vineatrol), Vin-Sol (Vineatrol-Solubilisat).

Die grafische Darstellung der SRB-Daten zeigt, dass sowohl Vineatrol als auch Resveratrol einen Einfluss auf die Viabilität der PHHs haben. Resveratrol wird bis auf die höchste Konzentration 40 µg/ml besser vertragen als Vineatrol. Unter 40 µg/ml nahm die Viabilität der Zellen auf ca. 55 % gegenüber der Kontrolle ab. Unter Behandlung mit Vineatrol verringerte sich der Anteil an lebenden Zellen um 30-40 %. Die Behandlung mit der Leermizelle, die in den Graphen nicht dargestellt ist, fungierte als zusätzliche Kontrolle und wurde von den PHHs gut vertragen. Die Daten des SRB-Assays zeigten, dass das Solubilisat von Vineatrol besser vertragen wird als reines Vineatrol.

Zusammenfassend zeigte sich bei den PHHs der stärkste Effekt in Bezug auf die Viabilität bzw. die Proliferationshemmung bei Behandlung mit Vineatrol. Die Behandlungen mit sowohl Resveratrol in niedrigen Konzentrationen als auch mit Vineatrol-Solubilisat wurden von den humanen Zellen gut vertragen. In

höheren Konzentrationen wirkte auch Resveratrol toxisch auf die Leberzellen. Die Leermizelle hatte selbst keine nennenswerte Auswirkung auf die Viabilität.

3.3.3 LDH-Assay nach 48 h

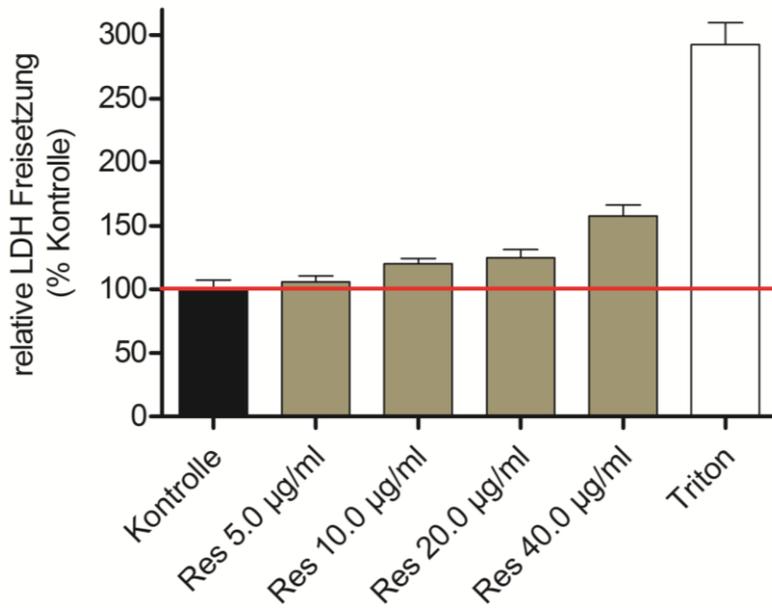
In Kombination mit dem vorhergegangenen SRB-Assay hilft dieser Assay bei der Unterscheidung zwischen Proliferationshemmung und / oder einer zusätzlichen Zellschädigung. Das Enzym LDH kann als Parameter für eine Zellschädigung im Überstand gemessen werden, da dieses bei Zerstörung der Zellmembran als Zeichen des Zelltodes freigesetzt wird. Ziel der Versuche war es festzustellen, ob die Testsubstanzen schädigend auf humane Zellen wirken und die dazugehörigen Konzentrationen zu definieren, die eine Freisetzung von LDH bewirken.

Versuchsschema:

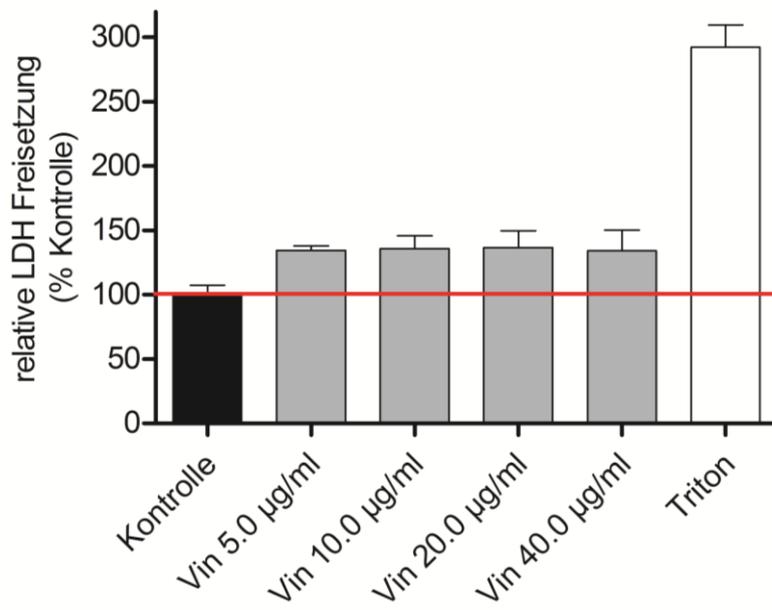
Zelltyp	PHH			
Messzeit	48 h			
Konzentrationen (µg/ml)	40	20	10	5
LDH-Messung	im Überstand			
Lebendkontrolle	Medium			
Totkontrolle	1%ig Triton			
Pipettierschema	Duplikate, diese je einmal gemessen, Versuche je zweimal wiederholt			

3.3.3.1 LDH-Assay mit PHHs für 48 h

LDH Res 48 h



LDH Vin 48 h



LDH Vin-Sol 48 h

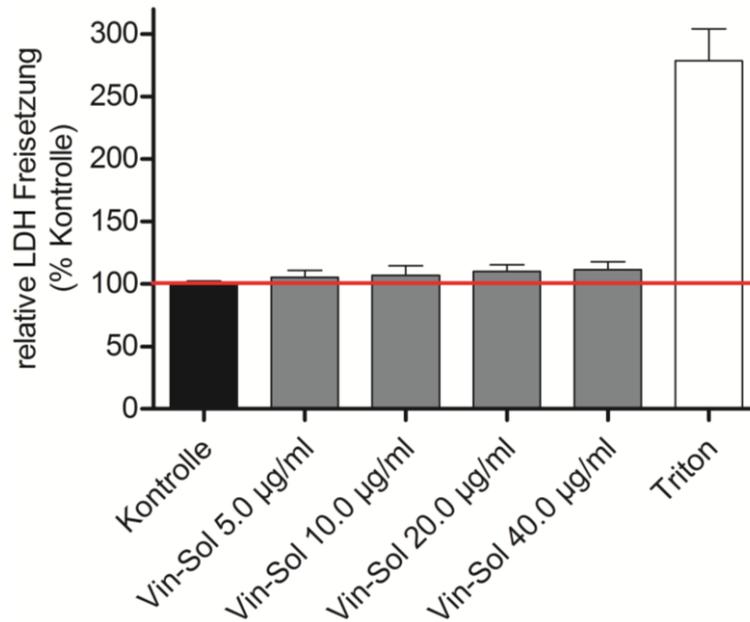


Abbildung 14: LDH-Assay bei PHHs mit Res, Vin, Vin-Sol

Photometrische Bestimmung des relativen LDH-Gehalts (gemessen im Überstand) der PHHs im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Dargestellt sind die Behandlungen mit den drei eingesetzten Substanzen verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Die eingesetzten Konzentrationen betragen zwischen 5 bis 40 µg/ml. Die Behandlungsdauer betrug 48 h. Triton wurde als Totkontrolle verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus zwei unabhängigen Experimenten, jeweils gemessen als Duplikate. LDH (Laktatdehydrogenase), Res (Resveratrol), Vin (Vineatrol), Vin-Sol (Vineatrol-Solubilisat).

Der LDH-Assay mit den PHHs zeigte nach 48 h deutliche Veränderungen der LDH-Freisetzung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Sowohl die höheren als auch die niedrigeren Konzentrationen von Vineatrol bewirkten einen LDH-Anstieg von ca. 140 % gegenüber der Kontrolle. Resveratrol wurde in den niedrigen Konzentrationen gut von den humanen Zellen vertragen. Die höchste Konzentration von 40 µg/ml zeigte hingegen einen erhöhten LDH-Gehalt im Überstand von etwa 155 % gegenüber der Kontrolle. Die Leermizelle wurde gut vertragen. Bei den eingesetzten Konzentrationen (5 µg/ml und 10 µg/ml) ließ sich keine Veränderung in der relativen LDH-Freisetzung im Überstand feststellen. Bei den mit Triton behandelten Zellen betrug der Wert gegenüber der Kontrolle etwa 300 %. In der grafischen Auswertung des LDH-Assays ließ sich nach 48 h Behandlungszeitraum mit dem Solubilisat keine Veränderung des relativen LDH-Gehalts im Überstand feststellen. Die

Leermizelle wurde auch in höheren Konzentrationen (20 µg/ml und 40 µg/ml) von den humanen Zellen gut toleriert. Die mit Triton behandelten Zellen zeigten gegenüber der Kontrolle einen Wert von ca. 275 %.

Zusammenfassend ergeben die Untersuchungen eine Freisetzung von LDH bei Behandlung mit Vineatrol. Das heißt Vineatrol verursacht eine Zellschädigung von humanen Zellen. Das Solubilisat und die Kontrollmizelle werden in allen untersuchten Konzentrationen gut vertragen. Für Resveratrol in niedrigen bis mittleren Konzentrationen gilt dies auch. Die höchste Konzentration (40 µg/ml) verursacht ebenfalls eine Zellschädigung und so eine Erhöhung des relativen LDH-Gehalts im Überstand. Vineatrol zeigte in den vorherigen Assays nicht nur keine Überlegenheit gegenüber Resveratrol in Bezug auf die antitumorale Wirkung, sondern schnitt auch bei der Toxizitätsprüfung an PHHs deutlich schlechter ab.

3.3.4 GOT-Assay nach 48 h

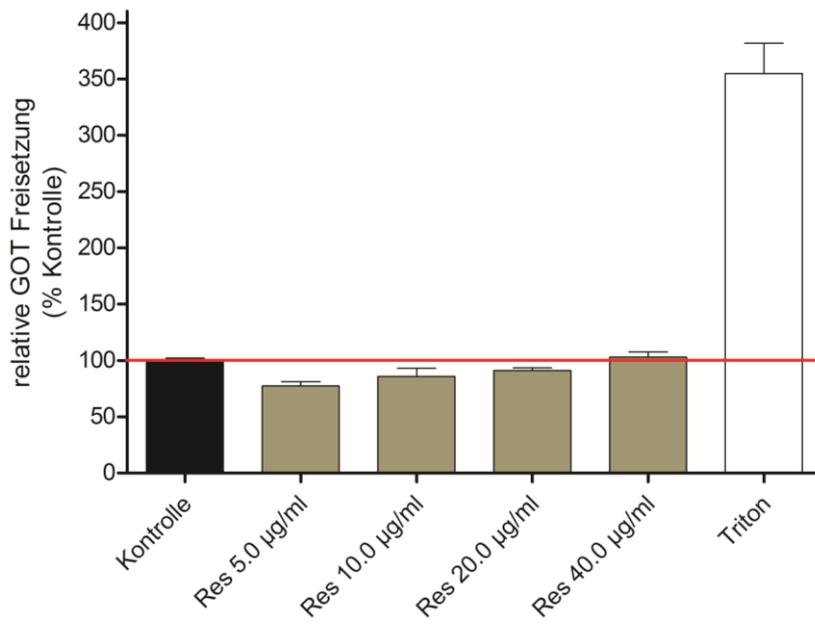
Bei Zelluntergang kommt es zur Freisetzung von zellulären Enzymen, u.a. GOT, welches dadurch als Surrogatmarker für eine Zellschädigung nachgewiesen werden kann. In Kombination mit den vorhergegangenen SRB- und CellTiter-Blue®-Assays kann nun mit Hilfe des GOT-Assays unterschieden werden, ob es sich um reine Proliferationshemmung oder eine zusätzliche Zellschädigung handelt. Ziel der Versuche war es festzustellen, ob die Testsubstanzen schädigend auf humane Zellen wirken und die dazugehörigen Konzentrationen zu definieren, die eine Freisetzung von GOT bewirken.

Versuchsschema:

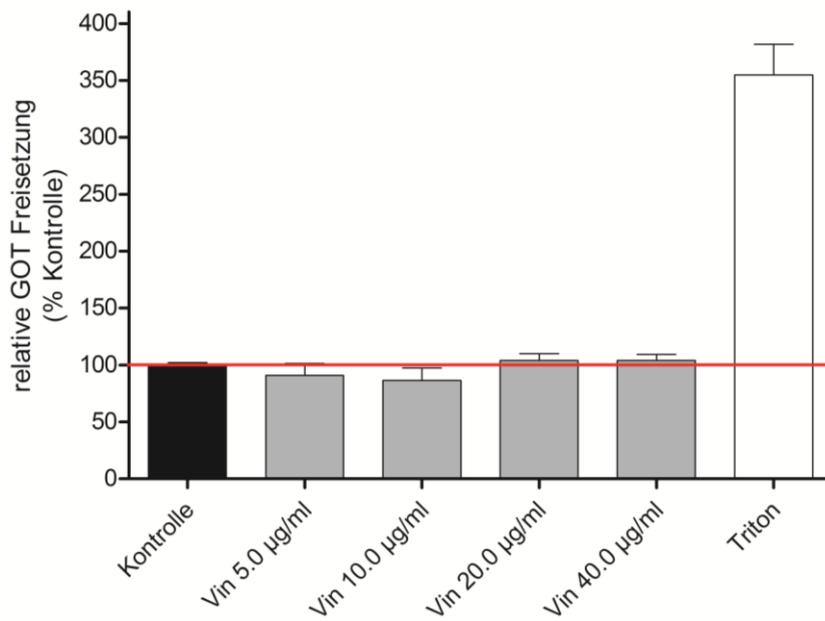
Zelltyp	PHH			
Messzeit	48 h			
Konzentrationen (µg/ml)	40	20	10	5
GOT-Messung	im Überstand			
Lebendkontrolle	Medium			
Totkontrolle	1%ig Triton			
Pipettierschema	Duplikate, diese je einmal gemessen, Versuche je zweimal wiederholt			

3.3.4.1 GOT-Assay mit PHHs für 48 h

GOT Res 48 h



GOT Vin 48 h



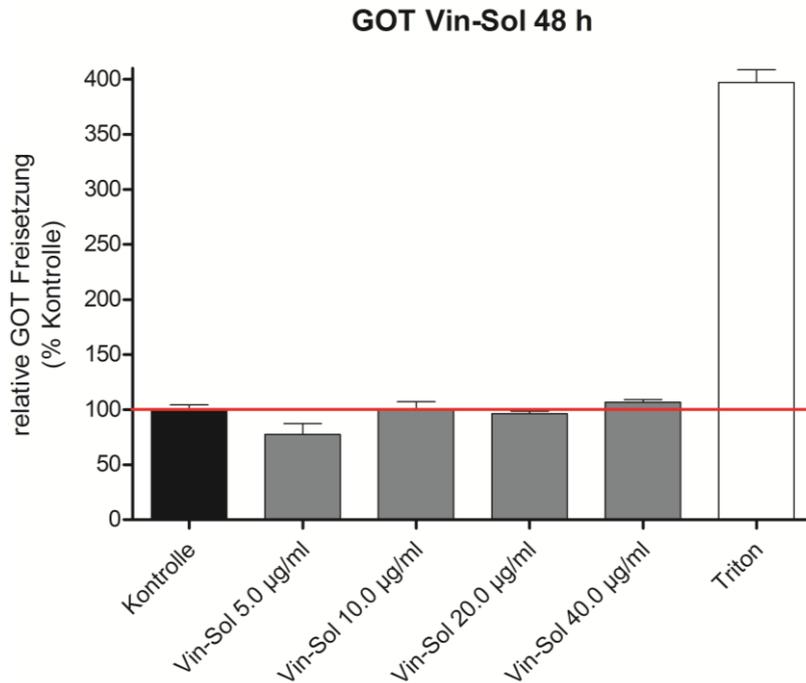


Abbildung 15: GOT-Assay bei PHHs mit Res, Vin, Vin-Sol

Photometrische Bestimmung des relativen GOT-Gehalts (gemessen im Überstand) der PHHs im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Dargestellt sind die Behandlungen mit den drei eingesetzten Substanzen verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Die eingesetzten Konzentrationen betragen zwischen 5 bis 40 µg/ml. Die Behandlungsdauer betrug 48 h. Triton wurde als Totkontrolle verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus zwei unabhängigen Experimenten, jeweils gemessen als Duplikate. GOT (Glutamat-Oxalacetat-Transaminase), Res (Resveratrol), Vin (Vineatrol), Vin-Sol (Vineatrol-Solubilisat).

Die grafische Auswertung des GOT-Assays mit PHHs nach 48 h Behandlungsdauer zeigte einen minimalen Anstieg des GOT-Levels im Überstand bei der Behandlung mit Vineatrol mit einem Maximum bei 20 µg/ml und 40 µg/ml. Resveratrol bewirkte in niedrigen bis mittleren Konzentrationen keine Veränderung der GOT-Freisetzung gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Zu einem minimalen Anstieg der GOT-Konzentration kommt es bei der Behandlung mit 40 µg/ml. Bei Behandlung mit der Leermizelle lässt sich bei 10 µg/ml ein geringer Anstieg in der relativen GOT-Freisetzung feststellen. Bei den mit Triton behandelten Zellen betrug der Wert des freigesetzten GOTs etwa 350 % gegenüber der Kontrolle.

Nach 48 h war bei Behandlung mit dem Solubilisat keine Veränderung der relativen GOT-Freisetzung im Überstand der PHHs feststellbar. Es wurde von den Zellen gut vertragen. Die Leermizelle zeigte hier im Gegensatz zu den

Ergebnissen der vorhergehenden Assays eine erkennbare Erhöhung um bis zu ca. 20 % des GOT-Levels im Überstand. Die Triton-Kontrolle zeigte gegenüber der Lebendkontrolle einen Wert von knapp 400 %.

Zusammenfassend ergaben die Untersuchungen eine leicht erhöhte Freisetzung von GOT bei Behandlung mit Vineatrol. Vineatrol führte demnach zu einer Zellschädigung bei Kontakt mit PHHs. Ein vergleichbarer Effekt zeigte sich bei der höchsten Konzentration (40 µg/ml) von Resveratrol. Niedrigere Konzentrationen wurden von den PHHs gut vertragen. Die Behandlung mit dem Vineatrol-Solubilisat zeigte keine Veränderung der GOT-Freisetzung. In Form der Mizelle schien Vineatrol von den humanen Zellen vertragen werden. Der GOT-Assay ergab leicht erhöhte GOT-Werte im Überstand bei Behandlung mit der Leermizelle.

3.4 Weiterführende Untersuchungen

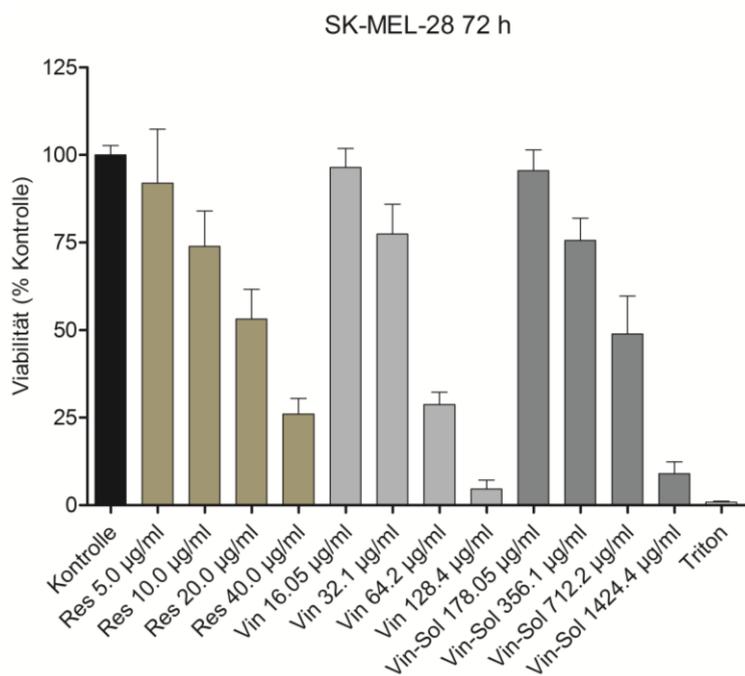
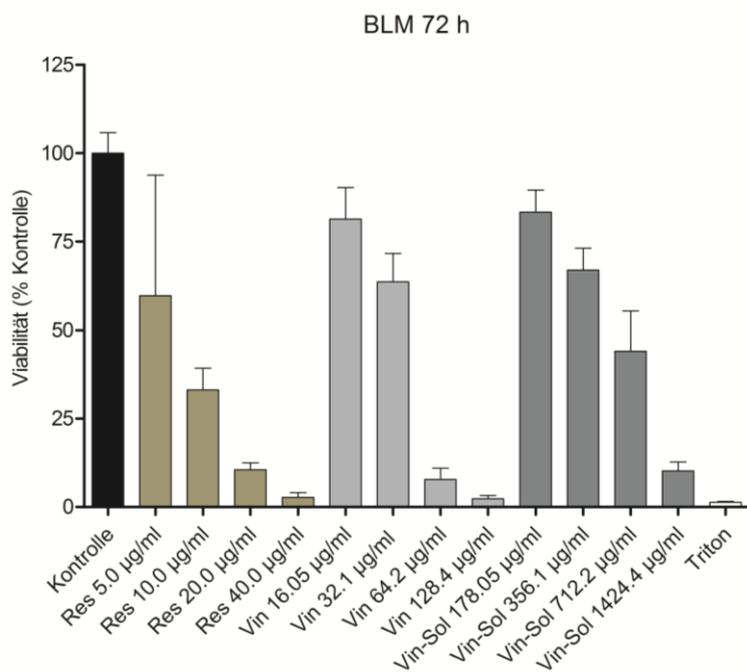
3.4.1 Angleich der Konzentrationen von Vineatrol und des Vineatrol-Solubilisats an den jeweiligen Resveratrolgehalt und deren Wirkung auf die Melanomzellen mittels SRB-Assay nach 72 h

Entgegen aller Erwartungen zeigten die vorhergegangenen Assays eine deutliche Überlegenheit bezüglich der antitumoralen Wirkung von Resveratrol gegenüber Vineatrol und dessen Solubilisat. Daher wurden zur Ergänzung und zur Klärung der Frage, ob der Resveratrolanteil von Vineatrol (31,2 % Resveratrol) und des Solubilisats (2,808 % Resveratrol) die eigentlich wirksame Komponente der Substanzen ist, weitere SRB- und LDH-Assays durchgeführt. Die Konzentrationen von Vineatrol, des Solubilisats und der Leermizelle wurden hierfür auf ihren jeweiligen Resveratrolgehalt angeglichen. Das heißt die ursprünglich eingesetzten Konzentrationen (2,5 bis 40 µg/ml) wurden bei Vineatrol um den Faktor 3,21 erhöht, die Konzentrationen des Solubilisats und der Leermizelle, die hier nicht dargestellt wird, um den Faktor 35,61. So wurde erreicht, dass sich der enthaltende Resveratrolanteil auf 100 % angleich und die Wirkungen direkt mit den reinen Resveratrolbehandlungen vergleichbar waren. Dabei liegen folglich auch alle anderen Extraktbestandteile in entsprechend höherer Konzentration vor.

Versuchsschema SRB-Assay:

Zelllinien	BLM, SK-MEL-28, LOX-IMVI				
Messzeit	72 h				
Konzentrationen Resveratrol (µg/ml)	40	20	10	5	2,5
Konzentrationen Vineatrol (x 3,21 in µg/ml)	128,4	64,2	32,1	16,05	8,025
Konzentrationen Solubilisat/Leermizelle (x 35,61 in µg/ml)	1424,4	712,2	356,1	178,05	89,03
Lebendkontrolle	Medium				
Totkontrolle	1%ig Triton				
Pipettierschema	Duplikate, diese je zweimal gemessen, Versuche je dreimal wiederholt				

3.4.1.1 SRB-Assay mit Melanomzellen bei Konzentrationsangleich 72 h



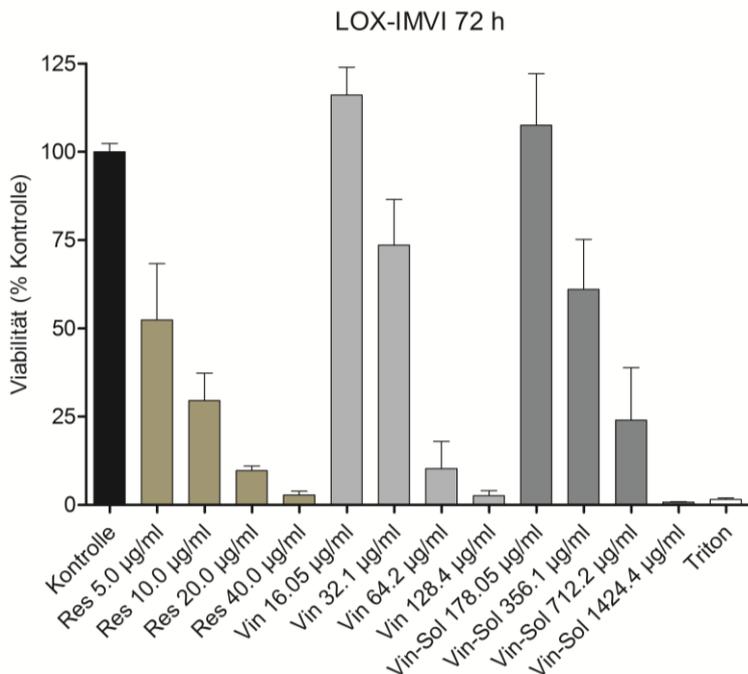


Abbildung 16: SRB-Assay der Zelllinien BLM, SK-MEL-28, LOX-IMVI

Photometrische Bestimmung der Viabilität der Melanomzellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Dargestellt sind die Behandlungen mit den drei eingesetzten Substanzen verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Die eingesetzten Konzentrationen wurden an den jeweiligen Resveratrolgehalt angeglichen und betragen für Resveratrol zwischen 2,5 bis 40 µg/ml. Für Vineatrol 8,025 bis 128,4 µg/ml und für das Solubilisat 89,03 bis 1424,4 µg/ml. Die niedrigste Konzentration aller eingesetzten Substanzen wird hier nicht dargestellt. Die Behandlungsdauer betrug 72 h. Triton wurde als Totkontrolle verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten, jeweils gemessen als Duplikate. SRB (Sulforhodamin B), Res (Resveratrol), Vin (Vineatrol), Vin-Sol (Vineatrol-Solubilisat).

Die eingesetzten Resveratrolkonzentrationen entsprachen denen in den vorhergegangenen SRB-Assays (2,5 bis 40 µg/ml). Die Wirkung von Resveratrol auf die einzelnen Zelllinien blieb unverändert im Vergleich zu den vorhergegangenen SRB-Assays.

Durch den Konzentrationsangleich von Vineatrol an den Resveratrolgehalt nahm die Viabilität der BLM-Zellen mit Zunahme der Konzentration stetig ab. Bei den niedrigeren Konzentrationen (16,05 µg/ml entsprechend 5,0 µg/ml x 3,21 und 8,025 µg/ml entsprechend 2,5 µg/ml x 3,21) zeigte sich eine schwache Verringerung des Anteils der lebenden Zellen. Bei einer Konzentration von 64,2 µg/ml (\cong 20 µg/ml x 3,21) nahm die Viabilität der Zellen auf etwa 10 % gegenüber der Kontrolle ab. Die Auswertung zeigte einen deutlichen Zelluntergang im Vergleich zu den vorhergegangenen Behandlungen. Unter Einsatz der höchsten Konzentration (128,4 µg/ml \cong 40 µg/ml x 3,21) ließen

sich kaum mehr lebende Zellen nachweisen. Bei der Behandlung mit dem Solubilisat zeigte sich nach dem Konzentrationsangleich ein ähnliches Bild. Nach Angleich der Konzentration an den Resveratrolanteil ($\times 35,61$) war eine mit ansteigender Konzentration stetig zunehmende antiproliferative Wirkung des Solubilisats auf die BLM-Zellen messbar. Bei Einsatz der höchsten Konzentration ($1424,4 \mu\text{g/ml} \triangleq 40 \mu\text{g/ml} \times 35,61$) sank der Anteil an lebenden Zellen auf etwa 10 %. Die Behandlung mit Resveratrol bewirkte im Vergleich, trotz der angeglichenen Konzentrationen, den stärksten antiproliferativen Effekt.

Nach 72 h Behandlung der SK-MEL-28 Zellen mit den an die Resveratrolmenge angeglichenen Konzentrationen zeigten sich deutliche Veränderungen der Viabilität der Zellen im Vergleich zu der Kontrolle. Bei Einsatz von $64,2 \mu\text{g/ml}$ ($\triangleq 20 \mu\text{g/ml} \times 3,21$) Vineatrol wurde die Proliferation der Zellen um etwa 70 % gehemmt, unter der Behandlung mit $128,4 \mu\text{g/ml}$ ($\triangleq 40 \mu\text{g/ml} \times 3,21$) sogar um etwa 95 %. Auch die Solubilisatbehandlung zeigte die gewünschten Effekte. Mit Höhe der Konzentration nahm der Anteil an lebenden Zellen im Vergleich zur Kontrolle stetig ab. Bis unter Einsatz der höchsten Konzentration nur noch etwa 10 % der Zellen lebten. Selbst unter Einsatz der höchsten Resveratrolkonzentration ($40 \mu\text{g/ml}$) zeigten sich keine solchen Ergebnisse und der Anteil an lebenden Zellen verringerte sich nur etwa um 75 %. Die SK-MEL-28-Zellen reagierten nach Konzentrationsangleich somit stärker auf die Behandlung mit Vineatrol als auch mit dem Solubilisat. In den vorhergegangenen SRB-Assays zeigten die SK-MEL-28-Zellen die geringsten Veränderungen nach Behandlung mit den Substanzen. Dies lässt sich nach Konzentrationsangleich an Resveratrol für die Vineatrol- und Solubilisat-Behandlung nicht beobachten.

Die grafische Darstellung des SRB-Assays der LOX-IMVI Zellen zeigte wie im vorhergegangenen SRB-Assay auch nach den Behandlungen mit Resveratrolmengenangleich die deutlichsten Veränderungen im Vergleich zu den beiden anderen Zelllinien. Auffällig war die Wirkung bei Behandlung der Zellen mit den niedrigen Konzentrationen ($8,025 \mu\text{g/ml}$ und $16,05 \mu\text{g/ml}$)

Vineatrol; 89,03 µg/ml und 178,05 µg/ml Solubilisat). Laut der Auswertung der Daten zeigte sich dabei eine proliferationsfördernde Wirkung auf die LOX-IMVI-Zellen. Erst bei Einsatz der höheren Konzentrationen verringerte sich der Anteil an lebenden Zellen um etwa 25 % bis 90 % unter Einfluss von Vineatrol, um etwa 40 % bis 95 % bei Behandlung mit dem Solubilisat. Resveratrol wirkte auch in geringen Konzentrationen deutlich antitumoral.

Die Ergebnisse des SRB-Assays nach Angleich der Konzentrationen von Vineatrol und dessen Solubilisat an den jeweiligen Resveratrolgehalt lassen vermuten, dass es sich bei Resveratrol wahrscheinlich um die eigentlich antitumoral wirkende Komponente handelt. Nach Erhöhung der Konzentrationen gemäß der Resveratrolmenge zeigte sich auch bei Vineatrol und Vineatrol-Solubilisat eine deutliche Verringerung der Viabilität der Melanomzellen. Die antitumoralen Effekte waren annähernd gleich. Resveratrol war in seiner Wirkung im Vergleich zu den anderen eingesetzten Substanzen nicht mehr überlegen.

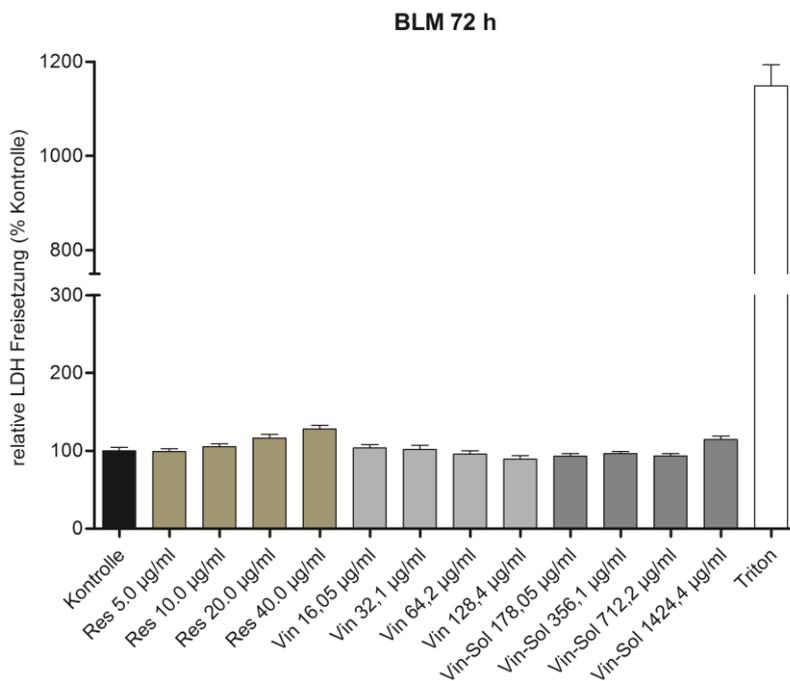
3.4.2 Angleich der Konzentrationen von Vineatrol, Vineatrol-Solubilisat und Leermizelle an den jeweiligen Resveratrolgehalt und deren Wirkung auf die Melanomzellen mittels LDH-Assay nach 72h

In Kombination mit dem vorhergegangenen SRB-Assay hilft dieser Assay zwischen Proliferationshemmung und / oder einer zusätzlichen Zellschädigung zu unterscheiden. Das Enzym LDH kann als Parameter für Zellschädigung im Überstand gemessen werden. Ziel der Versuche war es festzustellen, wie die Testsubstanzen nach Angleich an ihren jeweiligen Resveratrolgehalt auf Melanomzellen wirken und die dazugehörigen Konzentrationen zu definieren, die eine Freisetzung von LDH bewirken und zu prüfen, ob Resveratrol die für die Wirkung ausschlaggebende Komponente des Vineatrolextraktes ist.

Versuchsschema LDH-Assay:

Zelllinien	BLM, SK-MEL-28, LOX-IMVI				
Messzeit	72 h				
Konzentrationen Resveratrol ($\mu\text{g/ml}$)	40	20	10	5	2,5
Konzentrationen Vineatrol (x 3,21 in $\mu\text{g/ml}$)	128,4	64,2	32,1	16,05	8,025
Konzentrationen Solubilisat/Leermizelle (x35,61 in $\mu\text{g/ml}$)	1424,4	712,2	356,1	178,05	89,03
LDH-Messung	Im Überstand				
Lebendkontrolle	Medium				
Totkontrolle	1%ig Triton				
Pipettierschema	Duplikate, diese je einmal gemessen, Versuche je dreimal wiederholt				

3.4.2.1 LDH-Assay mit Melanomzellen bei Konzentrationsgleich 72 h



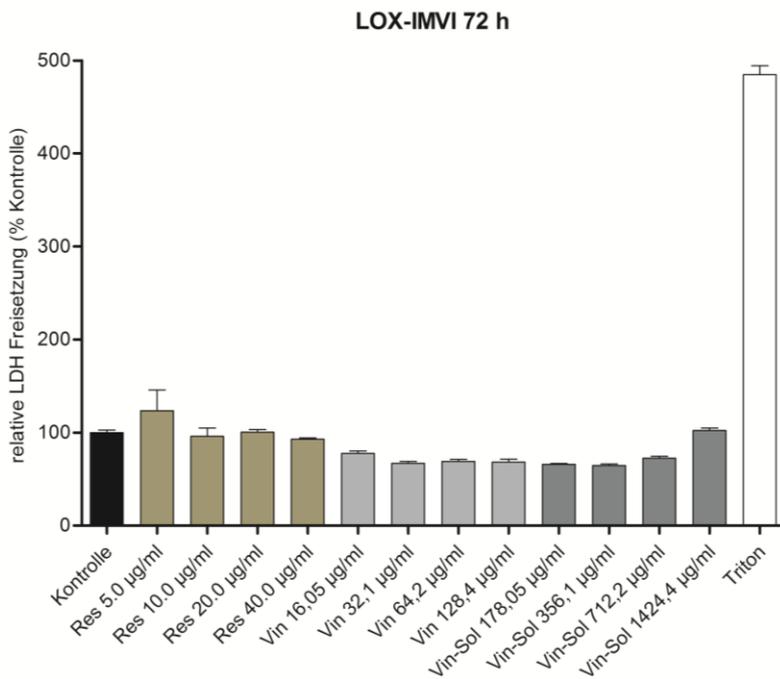
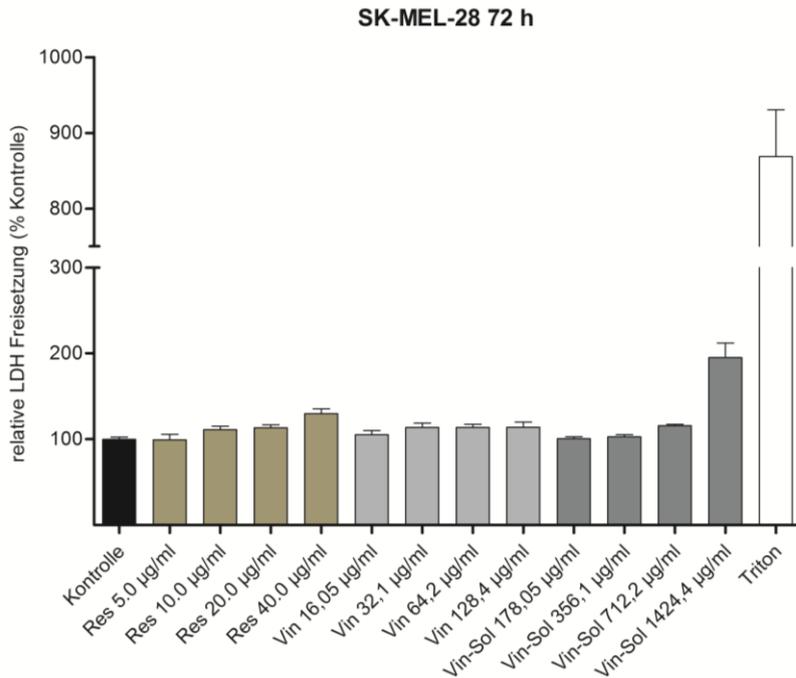


Abbildung 17: LDH-Assay der Zelllinien BLM, SK-MEL-28, LOX-IMVI

Photometrische Bestimmung des relativen LDH-Gehalts (gemessen im Überstand) der Melanomzellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Dargestellt sind die Behandlungen mit den drei eingesetzten Substanzen verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Die eingesetzten Konzentrationen wurden an den jeweiligen Resveratrolgehalt angeglichen und betragen für Resveratrol zwischen 2,5 bis 40 µg/ml. Für Vineatrol 8,025 bis 128,4 µg/ml und für das Solubilisat 89,03 bis 1424,4 µg/ml. Die niedrigste Konzentration aller eingesetzten Substanzen wird hier nicht dargestellt. Die Behandlungsdauer betrug 72 h. Triton wurde als Totkontrolle verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus zwei unabhängigen Experimenten, gemessen als Duplikate. LDH (Laktatdehydrogenase), Res (Resveratrol), Vin (Vineatrol), Vin-Sol (Vineatrol-Solubilisat).

Die grafische Auswertung des LDH-Assays mit den BLM-Zellen zeigte keine signifikante Veränderung der LDH-Menge im Überstand verglichen mit der Kontrolle bei Behandlung sowohl mit dem Reinstoff Vineatrol als auch mit dessen Solubilisat nach Konzentrationsangleich an die Resveratrolmenge. Das heißt es kommt bei dieser Behandlung nicht zum Zelluntergang, die Zellen platzen nicht auf. Bei Behandlung mit Resveratrol kam es unter Einsatz der höchsten Konzentration (40 µg/ml) zu einer Erhöhung der relativen LDH-Freisetzung. Geringere Konzentrationen von Resveratrol ließen keine Wirkung erkennen. Die mit Triton behandelten Zellen zeigten eine LDH-Freisetzung von ca. 1200 % gegenüber der Kontrollgruppe.

Auch die SK-MEL-28 Zellen zeigten unter Behandlung mit Vineatrol nach Konzentrationsangleich keine Veränderung der LDH-Menge im Überstand im Vergleich zur Lebendkontrolle. Unter Behandlung mit der höchsten Konzentration des Solubilisats ($1424,4 \mu\text{g/ml} = 40 \mu\text{g/ml} \times 35,61$) verdoppelte sich die LDH-Menge im Überstand im Vergleich zur Lebendkontrolle. Geringere Konzentrationen ließen keine Veränderung der LDH-Menge im Vergleich zur Kontrolle erkennen. Resveratrol bewirkte keinen bis minimalen Anstieg der LDH-Menge im Überstand. Die Werte der Triton-Kontrolle lagen bei etwa 900 % gegenüber der Lebendkontrolle.

Die Daten des LDH-Assays der LOX-IMVI Zellen zeigten keinen Anstieg der relativen LDH-Freisetzung bei Behandlung mit sowohl Vineatrol als auch dessen Solubilisats. Auch bei Behandlung der Zellen mit Resveratrol kam es zu keiner signifikanten Änderung der LDH-Menge im Überstand. Bei den mit Triton behandelten Zellen war ein LDH-Wert von etwa 500 % gegenüber der Kontrolle messbar.

Zusammenfassend ließ sich bei den LDH-Versuchen mit Angleich der Konzentrationen an den jeweiligen Resveratrolgehalt keine Veränderung der LDH-Freisetzung bei Behandlung mit Vineatrol zeigen. Auffällig war, dass sich unter Behandlung der SK-MEL-28 Zellen mit dem Solubilisat in höchster Konzentration die LDH-Menge im Überstand verdoppelte. Diese Behandlung führte somit zu Membranschädigung bzw. zur Nekrose der Zellen. Resveratrol

hatte nur geringe Auswirkungen. Daher war anzunehmen, dass die Zellen bei Behandlung in die Apoptose gehen.

4 Diskussion

Die Anzahl an Neuerkrankungen des malignen Melanoms ist stark gestiegen und hat sich seit 1970 mehr als verfünffacht. Es ist die Hauterkrankung, die für 90 % der Todesfälle an Hautkrebs verantwortlich ist und durch die frühzeitige lymphogene und hämatogene Metastasierung ein relevantes medizinisches Problem darstellt (Garbe et al., 2011). Das durchschnittliche Erkrankungsalter beträgt nur 54 Jahre (Leiter et al., 2012). Gleichzeitig sind die Möglichkeiten einer Behandlung sehr limitiert, weshalb es von großer Bedeutung ist neue präventive Maßnahmen und Therapieansätze zu untersuchen. Der regelmäßige moderate Konsum von Rotwein scheint sich chemopräventiv auszuwirken (Guerrero et al., 2009; Pedersen et al., 2003). Dies wird auf die im Rotwein vorkommenden Polyphenole zurückgeführt (Clifford et al., 1996; Soleas et al., 1997b). Das in Weintrauben vorkommende Resveratrol wurde in mehreren Studien bereits intensiv auf seine antitumorale Wirkung hin untersucht (Lambert et al., 2005; Venturelli et al., 2013). Das ebenfalls in Wein vorkommende Polyphenol-Gemisch Vineatrol, bestehend aus überwiegend trans-Resveratrol und Resveratrol-Oligomeren, und dessen Wirkung sind bisher nur wenig erforscht. Vineatrol soll jedoch im Vergleich zu reinem Resveratro stabiler und bioaktiver sein (Billard et al., 2002; Prokop et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde der Naturstoff Vineatrol auf die antitumorale Wirkung am malignen Melanom im Vergleich zu Resveratrol untersucht und für den klinischen Einsatz evaluiert. Darüber hinaus wurde durch eine Industriekooperation nanoverkapseltes Vineatrol zur Verfügung gestellt, um die Bioverfügbarkeit zu erhöhen und so einen noch ausgeprägteren antitumoralen Effekt zu erzielen.

4.1 Zytotoxische Wirkung von Vineatrol im Vergleich zu Resveratrol-Reinstoff

Mehrere Studien haben gezeigt, dass trans-Resveratrol antiproliferativ auf verschiedene Tumorzellen wirkt (Aggarwal et al., 2004; ElAttar & Virji, 1999; Jang & Pezzuto, 1999). Mittlerweile konnte auch für Resveratrol-Oligomere wie ϵ -Viniferin und das Polyphenol-Gemisch Vineatrol eine antitumorale Wirkung nachgewiesen werden (Billard et al., 2002; Colin et al., 2008; Marel et al., 2008). Es konnte gezeigt werden, dass Vineatrol konzentrationsabhängig das Wachstum der Hunde-Tumorzelllinien D-GBM und DH82 hemmt. Die in Vineatrol enthaltenen Resveratrol-Oligomere Hopeaphenol und r2-Viniferin wirkten 3- bis 10-mal stärker wachstumshemmend als reines Resveratrol und galten in der Studie von Empl et al. als potente zytotoxische Wirkstoffe auf die genannten Zelllinien und einige humane Zelllinien (Empl et al., 2014; Ha do et al., 2009; Ohyama et al., 1999). Bei isoliertem Einsatz zeigten Hopephenol und r2-Viniferin eine geringere antitumorale Wirkung als im Kontext des Extraktes Vineatrol, weshalb Vineatrol über weitere antiproliferativ wirkende Komponenten verfügen muss, die bisher noch nicht identifiziert sind (Empl et al., 2014). Eine sorgfältige Analyse und Isolation dieser Inhaltsstoffe ist daher von großer Bedeutung, um deren potentielle therapeutische Wirkung zu evaluieren. Andererseits ist der Resveratrol-Gehalt in Vineatrol für einen Großteil der Wirkungen verantwortlich, wobei Vineatrol 10 jedoch eine stärkere antiproliferative Wirkung auf Leukämiezellen zu verzeichnen hat, als bei alleiniger Betrachtung des Resveratrolgehalts zu erwarten wäre und diese größer ist als die von Resveratrol und ϵ -Viniferin zusammen (Billard et al., 2002; Colin et al., 2008). Es wurde gezeigt, dass die anderen in Wein vorkommenden Polyphenole eine vergleichbare oder sogar eine ausgeprägtere apoptotische Wirkung auf humane Leukämiezellen haben als Resveratrol allein (Billard et al., 2002).

In diesem Kontext sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zunächst überraschend, da die postulierten additiven oder sogar synergistischen Effekte der verschiedenen Polyphenole des eingesetzten Vineatrol-Extrakts im Vergleich zu reinem Resveratrol einen stärker antiproliferativen Effekt

gegenüber Tumorzellen erwarten lassen würden. Im Gegensatz zu anderen Untersuchungen konnte in dieser Studie die ausgeprägte antitumorale Wirkung von Vineatrol nicht bestätigt werden. Bei allen durchgeführten Versuchen zeigte Resveratrol stärkere antiproliferative Effekte auf die eingesetzten humanen Melanomzelllinien SK-MEL-28, LOX-IMVI und BLM. Selbst niedrige Resveratrolkonzentrationen wie 5,0 und 10 µg/ml zeigten teilweise eine stärkere Wirkung als die hohen Vineatrolkonzentrationen. Im SRB-Assay konnte beispielsweise gezeigt werden, dass bei Behandlung der LOX-IMVI Zellen mit 5 µg/ml der Anteil an lebenden Zellen auf knapp 50 % reduziert wurde. Der gleiche Effekt war nur mit der höchsten eingesetzten Konzentration (40 µg/ml) von Vineatrol zu erreichen. Während in keinem Versuch eine Überlegenheit von Vineatrol bezüglich der antitumoralen Wirkung zu erkennen war, nahm die antiproliferative Wirkung von Resveratrol in allen durchgeführten Assays mit Behandlungsdauer und Konzentrationshöhe deutlich zu. Erst nach Angleich der Einsatzkonzentrationen an ihren jeweiligen Resveratrolgehalt konnte die antitumorale Wirkung von Vineatrol entsprechend erhöht werden. Dies lässt vermuten, dass Resveratrol die für die Wirkung ausschlaggebende Komponente ist. Dieses Ergebnis entspricht der Studie von Marel et al., die besagt, dass das in Vineatrol enthaltene trans-Resveratrol für die Wirkung auf Proliferation und Zellzyklus verantwortlich sei (Marel et al., 2008) und widerspricht andererseits der Studie von Billard et al. (Billard et al., 2002). In letzterer Studie werden andere Polyphenole als maßgeblich für den antiproliferativen Effekt beschrieben. Ein möglicher Grund für die Diskrepanz zwischen den von Marel et al. und Billard et al. erhobenen Daten kann die unterschiedliche Zusammensetzung des jeweils eingesetzten Vineatrols sein. Erstere setzten einen Extrakt ein, der ca. 16 % trans-Resveratrol enthielt. Letztere verwendeten zwei Vineatrol-Extrakte, in denen Resveratrol 10 % bzw. 25 % des Extrakts ausmachte. Des Weiteren kommt neben dem Gehalt an trans-Resveratrol auch dem eigentlichen Extraktionsverfahren eine zentrale Bedeutung zu, da sich abhängig von diesem die Zusammensetzung des Extraktes maßgeblich verändern kann (Bai et al., 2011; Rajha et al., 2014). Dementsprechend können auch die Eigenschaften der eingesetzten Extrakte

stark voneinander abweichen und es sollte langfristig angestrebt werden einen standardisierten Extrakt für vergleichende Studien zu verwenden (Ong, 2004).

Eine weitere mögliche Ursache für die Diskrepanz der Ergebnisse könnte sein, dass die in dieser Studie verwendeten Melanomzelllinien bzw. die Tumorentität wegen eines speziellen molekularen Mechanismus wie beispielsweise Apoptoseresistenz, eine Veränderung bestimmter Zellzyklusproteine oder der Metabolisierung „resistent“ gegenüber Vineatrol sind und daher nicht die erwartete antitumorale Wirkung zu beobachten war (Empl et al., 2014).

4.2 Mögliche Risiken durch Vineatrol/Resveratrol

Studien zufolge konnten für Vineatrol 30 keine Toxizität oder andere unerwünschte pharmakologische Wirkungen gezeigt werden. Die Dosen, die von Romain et al. eingesetzt (0,04 mg/kg Körpergewicht/Tag, 0,2 mg/kg Körpergewicht/Tag und 1 mg/kg Körpergewicht/Tag) und von den untersuchten Hamstern gut vertragen wurden zeigen, dass die Einnahme von Vineatrol 30 als weitgehend sicher eingestuft werden kann. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass Vineatrol als Antioxidans Herz- und Leberschäden entgegenwirkt (Romain et al., 2012). Eine Toxizitätsuntersuchung zu Vineatrol 30 an Ratten ergab, dass Dosen von bis zu 1000 mg/kg Körpergewicht nicht zu gesteigerter Mortalität führen, keinen Effekt auf Blut- und Urinparameter haben und nicht neurotoxisch wirken (Informationen von Breko GmbH aus Dhokale et al., „Repeated Dose 28 Days Oral Toxicity Study of Vineatrol 30 in Wistar Rat“, 2009).

Resveratrol beeinträchtigt in Konzentrationen, die Apoptose und Wachstumshemmung von Leukämiezellen induzieren, die Viabilität von humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes wie Lymphozyten und Monozyten nicht (Billard et al., 2002). Deutlich höhere Dosen waren notwendig, um einen zytotoxischen Effekt auf diese Zellen auszuüben. Dies gilt nicht für Vineatrol. Vor allem Vineatrol 10 weist den gleichen Effekt auf B-CLL Zellen und gesunde Zellen auf (Billard et al., 2002). Andere Studien zeigten, dass das klonale Wachstum normaler hämatopoetischer Vorläuferzellen bei langfristiger Exposition von Resveratrol gehemmt wird. Dieser Effekt war teilweise

reversibel, wohingegen die apoptotische Wirkung auf die Leukämiezellen irreversibel war. Resveratrol induzierte keine Apoptose in normalen hämatopoetischen Vorläuferzellen, sondern wirkte selektiv apoptotisch auf die Leukämiezellen (Gautam et al., 2000). Auf gesunde Kardiomyozyten hatte Resveratrol keine zytotoxischen Effekte, sondern wirkte sogar protektiv gegenüber Norepinephrin-induzierter Apoptose und induzierte in tumoralen HL1-NB-Zellen den Zelltod (Baarine et al., 2011).

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche mit humanen Leberzellen zeigten eine leichte Hepatotoxizität von Vineatrol. Vineatrol wirkte sich negativ auf die Viabilität der eingesetzten PHHs aus. Resveratrol hingegen wurde mit Ausnahme der höchsten eingesetzten Konzentration (40 µg/ml) gut von den behandelten PHHs vertragen. Resveratrol wurde als protektiv gegenüber Alkohol-induzierten Leberschäden beschrieben (Gomez-Zorita et al., 2012). Die Toxizitätsstudie zu Vineatrol an Ratten ließ keine negativen Effekte von Vineatrol erkennen. Ein Grund hierfür könnte sein, dass sich die Ergebnisse nicht direkt von der Ratte auf den menschlichen Organismus übertragen lassen oder dass Vineatrol in vitro toxische Effekte zeigt, während diese in vivo durch Metabolisierung entfallen. Eine weitere mögliche Erklärung kann die unterschiedliche Zusammensetzung der eingesetzten Vineatrol-Extrakte sein.

Es stellt sich die Frage, welche der Komponenten von Vineatrol für die leicht toxische Wirkung verantwortlich ist. Trans-Resveratrol erwies sich selbst beim Einsatz hoher Konzentrationen (20 mg/kg/Tag) im Tierversuch als sicher (Juan et al., 2002). Die untersuchte Konzentration entspricht der 1000-fachen, die eine Person beim Trinken eines Rotweinglases täglich zu sich nehmen würde und es konnte gezeigt werden, dass selbst die regelmäßige Aufnahme hoher Konzentrationen keine negativen Auswirkungen auf den Organismus der Ratten hatte (Juan et al., 2002). Auch das Dimer ϵ -Viniferin zeigte in einigen Studien antiproliferative und apoptotische Effekte auf Tumorzellen (Billard et al., 2002; Quiney et al., 2004), eine antioxidative Wirkung (Privat et al., 2002) und ist in der Lage die Cytochrom P450 Enzyme zu hemmen (Piver et al., 2003). In vivo

wurde eine protektive Wirkung gegen Leberschäden bei Mäusen nachgewiesen (Oshima et al., 1995). Es scheint als haben trans-Resveratrol und ϵ -Viniferin unterschiedliche Zielstrukturen (Colin et al., 2008). Colin et al. zeigten, dass ϵ -Viniferin in hohen Konzentrationen (60 μ M) nicht nur eine Proliferationshemmung, sondern das Absterben der HepG2-Zellen bewirke und dieser toxische Effekt zweimal so stark war wie unter der Behandlung mit Resveratrol allein. Zur Wirkung von ϵ -Viniferin auf gesunde Zellen gibt es derzeit keine Studien. Aufgrund der unzureichenden Datenlage lässt sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht eindeutig sagen, welcher Bestandteil von Vineatrol toxische Effekte haben könnte oder ob die toxischen Effekte auf die PHHs erst im Zusammenspiel mehrerer Einzelkomponenten zu Tage treten. Dies müsste vor seiner breiten Anwendung als Nahrungsergänzungsmittel zur Tumorprävention erst noch genauer untersucht werden.

Interessant wäre zu wissen, wie sich Vineatrol nach Konzentrationsangleich an den jeweiligen Resveratrolgehalt gegenüber PHHs verhält. Da Resveratrol sich in Studien als sicher erwiesen hat, ist davon auszugehen, dass vom isolierten Reinstoff keine toxische Wirkung zu erwarten ist. Durch die Erhöhung der Konzentration nimmt allerdings dementsprechend auch die Menge der Begleitsubstanzen zu, sodass von einer verstärkten Toxizität ausgegangen werden kann.

4.3 Rotweinkonsum – eine Möglichkeit zur Krebsprävention?

Ein moderater Konsum von Wein wird mit positiven Effekten auf die Gesundheit in Verbindung gebracht (Goldberg et al., 1999). Allerdings sind die negativen Folgen von zu hohem Alkoholkonsum nicht zu vernachlässigen (Goldberg et al., 1999; Kozarevic et al., 1983). Das Risiko für viele chronische Erkrankungen erhöht sich mit steigender täglicher Menge der Alkoholaufnahme deutlich (Rehm et al., 2003). Auch die Entstehung von Tumorerkrankungen wie Brustkrebs kann eine Folge von zu hohem Alkoholkonsum sein (Longnecker et al., 1995; Swanson et al., 1997). Das Trinken von 25 g Alkohol pro Tag ist assoziiert mit einem gesteigerten Risiko für Tumore an folgenden Lokalisationen: Mundhöhle, Pharynx, Larynx, Ösophagus, Magen, Kolon,

Rektum, Leber und Brust (Bagnardi et al., 2001a, 2001b). Dieser Zusammenhang ist allerdings umstritten (Zhang et al., 1999). Die Empfehlungen für den Alkoholkonsum pro Tag sind in den Ländern nicht einheitlich und variieren stark. Die International Alliance for Responsible Drinking (IARD) stellt eine Übersicht zusammen und zeigt, dass die Empfehlungen für Männer von 8 g/Tag bis 60 g/Tag reichen und von 8 g/Tag bis 30 g/Tag für Frauen. In Deutschland gelten folgende Richtwerte: bis zu 24 g/Tag für Männer und bis zu 12 g/Tag für Frauen, wobei mindestens zwei Tage pro Woche Alkoholabstinenz empfohlen wird (International Alliance for Responsible Drinking (IARD), 2019). Epidemiologischen Studien zufolge hat das leicht bis moderate Alkoholtrinken auch positive Auswirkungen auf kardiovaskuläre Erkrankungen (Coronary heart disease, CHD) und andere Krankheitsbilder (Rehm et al., 2003). Die Interaktion zwischen der durchschnittlich konsumierten Menge an Alkohol und der Mortalität durch jegliche Ursachen sowie durch kardiovaskuläre Erkrankungen im Speziellen lässt sich in einer J-Kurve darstellen (Abb. 18) (Cordova & Sumpio, 2009; Corrao et al., 2000). Es zeigt sich, dass im Vergleich zur völligen Abstinenz der geringe bis moderate Alkoholkonsum mit einer geringeren Mortalität einhergeht. Am geringsten ist das Risiko bei einer Alkoholaufnahme von 1-2 Getränken/Tag bzw. 20 g/Tag (Corrao et al., 2000; Rehm et al., 1997). Ein alkoholisches Getränk ist definiert als 15 g Ethanol und entspricht etwa 120 ml Wein (ein halbes Glas), 355 ml Bier oder 30 ml einer 80 %-igen Spirituose (Dufour, 1999) (Cordova & Sumpio, 2009). Ab einer durchschnittlichen Menge von 70 g/Tag liegt das Risiko über dem eines Abstinenten (Corrao et al., 2000).

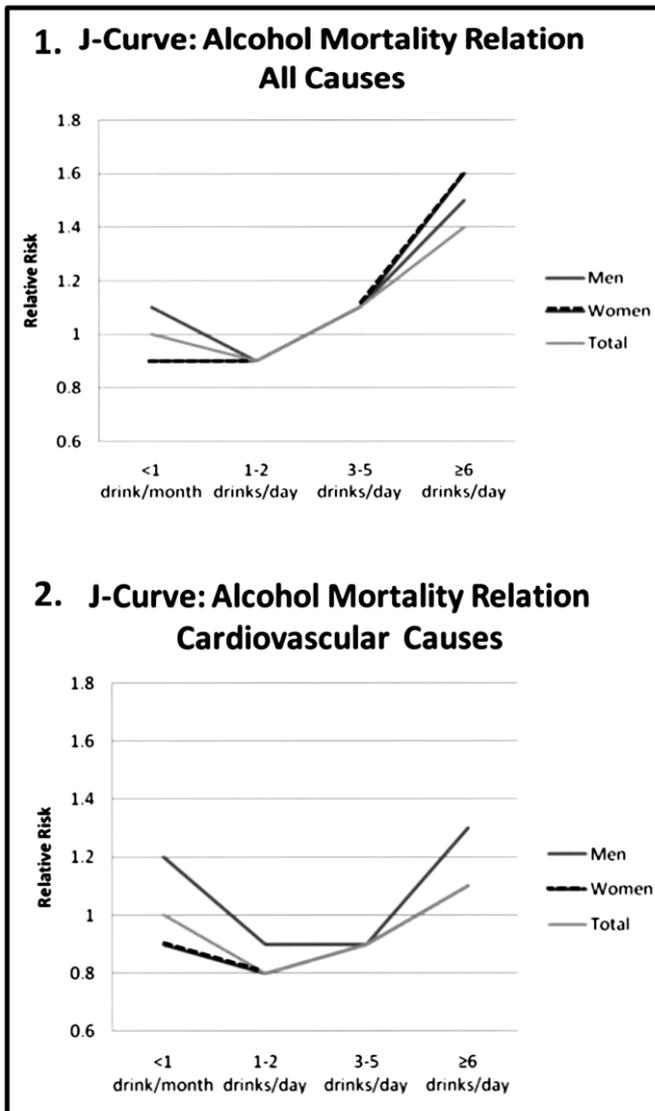


Abbildung 18: Zusammenhang zwischen Alkoholkonsum und Mortalität

Zusammenhang zwischen Alkoholkonsum und der Höhe des Risikos für Todesfälle jeglicher Ursache und durch kardiovaskuläre Erkrankungen im Speziellen, dargestellt in jeweils einer J-Kurve. Ein Getränk (drink) ist definiert als 15 ml Alkohol, was etwa 120 ml Wein, 355 ml Bier oder 30 ml Spirituosen entspricht. Modifiziert nach Cordova & Sumpio, 2009 (Cordova & Sumpio, 2009).

Insbesondere Rotwein wird eine wichtige Rolle bei der Prävention von kardiovaskulären Erkrankungen und anderen chronischen Krankheitsbildern wie Tumorerkrankungen nachgesagt. Vor allem die in Wein zahlreich vorkommenden Polyphenole werden für diese Wirkung verantwortlich gemacht und sind der Grund dafür, dass Wein, insbesondere Rotwein, anderen alkoholischen Getränken wie Bier, Spirituosen und sogar Weißwein in seiner Wirkung überlegen ist (Cordova & Sumpio, 2009). Was allerdings oft nicht in Betracht gezogen wird, ist, dass der Polyphenolgehalt von Wein untereinander

sehr stark variiert und sich je nach Traubensorte, Fermentierungshefe, Bodenzusammensetzung und Witterungsbedingungen unterscheidet (Alvarez-Sala Walther et al., 2000). Eine typische Flasche Rotwein enthält etwa 1,8 g/L Gesamt-Polyphenole. Demgegenüber befinden sich in einer Flasche Weißwein nur etwa 0,2 g/L bis 0,3 g/L (Mukamal et al., 2003). Dementsprechend befinden sich etwa 200 mg Polyphenole in einem Glas Rotwein (Cordova & Sumpio, 2009). Während zu hoher Alkoholkonsum zur Entstehung von Tumoren führen kann (siehe oben), wird Rotweinkonsum mit einer geringeren Inzidenz einiger Tumorerkrankungen in Verbindung gebracht (de Lorimier, 2000). Dies gilt nicht pauschal für Alkoholkonsum, sondern ist abhängig von der jeweiligen Alkoholsorte. Bei Bier und Spirituosen erhöht sich das Risiko der Erkrankung an einem ösophagealen Plattenepithelkarzinom deutlich, während der Konsum von Wein das Risiko aller ösophagealen und gastrischen Tumore um 40 % senkt (Gammon et al., 1997). In vitro konnte nachgewiesen werden, dass Flavonoide das Wachstum von Krebszellen hemmen und sich Resveratrol durch die Hemmung des Gens des Transkriptionsfaktors Cyclooxygenase-2 negativ auf das Tumorwachstum auswirkt (Cordova & Sumpio, 2009). Eine Querschnittsstudie in Dänemark zeigte, dass höherer Weinkonsum mit einer signifikant höheren Aufnahme an gesunden Lebensmitteln wie Früchten, Fisch, gekochtes Gemüse, Salat und Olivenöl einhergeht. Dieser Zusammenhang lässt sich bei Konsumenten anderer alkoholischer Getränke nicht feststellen. Eine derartige Studie lässt allerdings keine kausale Schlussfolgerung zu (Tjonneland et al., 1999). Die genannten Ernährungspräferenzen gehen per se mit einer protektiven Wirkung auf kardiovaskuläre Erkrankungen und Tumorerkrankungen einher (Donaldson, 2004; Eilat-Adar et al., 2013; Trichopoulou et al., 2009). Daher lässt sich epidemiologisch nur schwer mit Sicherheit nachweisen, ob tatsächlich der Weinkonsum die Komponente ist, die sich protektiv auf maligne Erkrankungen auswirkt und ob ein kausaler Zusammenhang zwischen Rotweinverzehr und der Inzidenz maligner und kardiovaskulärer Erkrankungen besteht.

4.4 Vergleichbarkeit von Studienergebnissen bei Einsatz von Stoffgemischen bzw. Pflanzenextrakten

Ein Problem bei Betrachtung der Ergebnisse der verschiedenen Studien mit dem Extrakt Vineatrol stellt die unterschiedliche Zusammensetzung der untersuchten Extrakte dar. Es handelt sich um ein sehr komplexes Stoffgemisch und je nach Extraktionsverfahren, Rohstoffqualität, Anbau, Erntezeitpunkt, aber auch Lagerungs- und Trocknungsbedingungen und Art des Auszugsmittels kann sich die Zusammensetzung des Extrakts ändern (Wurglics & Schubert-Zsilavec, 2004). Durch Standardisierung des Extraktions- und Herstellungsverfahrens eines Stoffgemisches kann eine gleichbleibende Qualität und Zusammensetzung der Extrakte und so eine bessere Vergleichbarkeit erreicht werden (Wiesenauer, 2013). In Studien mit beispielsweise Tebonin wird ein standardisierter Extrakt EGb 761[®] aus Gingko Bilboa Blättern verwendet, dessen Zusammensetzung gut definiert ist (von Boetticher, 2011). Dies ist bei Vineatrol bisher nicht der Fall und sollte in Betracht gezogen werden, damit sich die Ergebnisse der Studien ergänzen und direkt miteinander vergleichbar sind.

4.5 Bioverfügbarkeit von Vineatrol/Resveratrol

Trotz vielversprechender gesundheitsfördernder Wirkungen ist der Einsatz als Therapie durch die häufig geringe Bioverfügbarkeit von Naturstoffen wie Vineatrol und Resveratrol stark limitiert. Viele Naturstoffe mit interessanten Eigenschaften *in vitro* können aufgrund geringer Resorption oder schneller Verstoffwechslung und der dadurch entstehenden schlechten Bioverfügbarkeit im Organismus nicht in die Klinik übertragen werden (Gambini et al., 2015; Goldberg et al., 2003). Die positiven Wirkungen von Vineatrol und Resveratrol, die anhand von Zellkultur-Assays beobachtet worden sind, können nicht ohne weitere Modifikation oder Maßnahmen direkt auf den Menschen übertragen werden. In einer Vielzahl an Studien wurde die Metabolisierung und Bioverfügbarkeit von Resveratrol untersucht. Im Darm wird Resveratrol über passive Diffusion oder über Membrantransporter wie Integrine aufgenommen (Gambini et al., 2015) und liegt im Blut als Glukuronid, Sulfat oder frei vor. Freies Resveratrol kann an Albumin und Lipoproteine gebunden sein (Delmas et al., 2011). Resveratrol unterliegt dem enterohepatischen Kreislauf und wird

schnell zu konjugiertem Sulfat, Glukuronid und anderen Metaboliten verstoffwechselt (Gambini et al., 2015). Die Bioverfügbarkeit von 25 mg oral aufgenommenem Resveratrol ist aufgrund der schnellen und umfangreichen Metabolisierung nahezu Null (< 5 ng/mg) (Walle et al., 2004). Ungefähr 75 % werden über Stuhl und Urin ausgeschieden. Andere Flavonoide wie Quercetin können die Sulfatierung und Glukuronidierung in Leber und Duodenum unterbinden, wodurch die Bioverfügbarkeit gesteigert werden kann (Wenzel & Somoza, 2005). Es ist noch nicht abschließend geklärt, ob die freie Form für die Wirkung ausschlaggebend ist oder auch die Metabolite zum Effekt beitragen und inwieweit das Gewebe in der Lage ist die Metabolite zu speichern und ggf. später wieder in die freie Form umzuwandeln (Walle et al., 2004). Es wurde spekuliert, dass die Resveratrol-Metabolite etwas von der Aktivität behalten (Baur & Sinclair, 2006), da Resveratrol auch in sehr niedrigen Konzentrationen eine messbare Wirkung zu haben scheint (Pearce et al., 2008). Es ist dementsprechend wichtig den genauen Stoffwechselweg von Resveratrol und die genaue Bedeutung der Metabolite aufzuklären (Bode et al., 2013).

Die Konzentrationen, die *in vitro* untersucht werden, können nicht durch Weinkonsum erreicht werden, wohingegen entsprechende Plasmakonzentrationen beim Einsatz von Resveratrol als Nahrungsergänzungsmittel denkbar sind (Gambini et al., 2015). Es werden Nahrungsergänzungen mit 20 bis 50 mg Resveratrol angeboten (Walle et al., 2004). Bei den ersten Humanstudien, die die Absorption und Bioverfügbarkeit von Resveratrol untersuchen, wurden einmalige Dosen von 25 mg oral verabreicht (Gambini et al., 2015).

Sollte wirklich die freie Form von Resveratrol für die Wirkung verantwortlich sein, muss deren Bioverfügbarkeit *in vivo* verbessert werden. Eine Möglichkeit hierfür wäre die Verhinderung bzw. Verlangsamung des Abbaus z.B. durch Zugabe weiterer Flavonoide wie Quercetin (Wenzel & Somoza, 2005). Eine weitere Möglichkeit die orale Bioverfügbarkeit zu erhöhen, ist die Verpackung von Resveratrol in Mizellen (Solubilisierung), eine Herangehensweise, die auch in der vorliegenden Studie ausgewählt und in einer Humanstudie bereits erfolgreich getestet wurde. Die Bioverfügbarkeit von *trans*-Resveratrol wurde

durch die Mizellierung signifikant erhöht ohne Nebenwirkungen zu verursachen. Die Plasmakonzentration war deutlich erhöht im Vergleich zur nativen Form (Calvo-Castro et al., 2018b). Schiborr et al. konnten dies auch erfolgreich für Curcumin nachweisen und zeigten, dass die Solubilisierung keine negativen Effekte auf Leber und Nieren hat (Schiborr et al., 2014). Die Plasmakonzentration konnte durch die Verpackung in Mizellen 10- bis 40-fach erhöht werden (Hagl et al., 2015). Auch andere Studien stellten so eine signifikante Erhöhung der Bioverfügbarkeit fest (Kiran Rompicharla et al., 2017; Lv et al., 2017), Schiborr et al. beschreiben sogar eine Steigerung um den Faktor 185 (Schiborr et al., 2014). Abhängig von der Lipophilie des Wirkstoffs und der dessen Bioverfügbarkeit in nativer Form weist die Mizellierung stark unterschiedliche Effekte auf. Die Mizellierung gilt als sicher und wird auch in hohen Dosen gut toleriert (Kocher et al., 2016).

4.6 Solubilisierung in vitro untersuchbar?

Die Firma AQUANOVA AG entwickelt und produziert diese patentierten Solubilisate. Solubilisate sind Substanzen, die durch eine Verpackung in Mizellen (Mizellierung) in eine wasser- und fettlösliche Form gebracht werden (Hessisches Ministerium für Wirtschaft Verkehr und Landentwicklung, 2006).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen keine relevante Wirkung des Vineatrol-Solubilisats in vitro. In allen Versuchen war kaum ein Effekt auf die Melanomzelllinien festzustellen und wenn, war dieser geringer als bei Einsatz des Vineatrol-Extraktes. Nach der Konzentrationsanpassung an den jeweiligen Resveratrolgehalt zeigten die höheren Konzentrationen eine antiproliferative Wirkung. Dennoch stellt sich die Frage, warum wider Erwarten die ausgeprägtere antitumorale Wirkung ausblieb. Bisherige Studien mit Solubilisaten wurden zumeist in vivo durchgeführt (Calvo-Castro et al., 2018b; Schiborr et al., 2014). Die in dieser Arbeit erhobenen Daten beruhen auf Versuchen mit Melanomzellen in vitro. Es ist möglich, dass die adäquate Wirkung der Solubilisate nur in vivo in Erscheinung tritt und in vitro nicht adäquat abgebildet werden kann. Folglich sollte das Vineatrol-Solubilsat in vivo

am Tiermodell erneut auf seine antitumorale Wirkung hin getestet werden, bevor es beim Menschen zum Einsatz kommt.

4.7 Leermizelle als Kontrolle

Die bei allen Experimenten als Kontrolle mitgeführte mit H₂O beladene Leermizelle wurde im Nachhinein aus den Ergebnissen der Versuche mit den Melanomzelllinien ausgeschlossen und deshalb im Ergebnisteil nicht dargestellt. Durch die Wasserbeladung kam es möglicherweise zu einer Inversion der hydrophilen und lipophilen Anteile, wodurch sich die Polarität der Mizelle änderte. Es handelte sich dementsprechend um keine adäquate Kontrolle, was sich auch an der deutlichen Veränderung des Fließverhaltens der Substanz zeigte (stark erhöhte Viskosität der Leermizelle im Vergleich zu NovaSOL[®]). Selbst unter leichter Erwärmung im Wasserbad ließ sie sich nur unzureichend verflüssigen, was zu Ungenauigkeiten bei der volumetrischen Herstellung der verschiedenen Konzentrationen (2,5 bis 40 µg/ml) mit sich brachte.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Anzahl an Neuerkrankungen des malignen Melanoms ist in den letzten Jahren weltweit stark gestiegen. Das maligne Melanom ist eine sehr aggressive Form von Krebs und bedingt etwa 90% aller durch Hauterkrankungen verursachten Todesfälle. Die Therapiemöglichkeiten sind sehr limitiert, weshalb es wichtig ist neue präventive Maßnahmen und Therapieansätze zu untersuchen. Nach aktuellem Kenntnisstand scheinen Nahrungsbestandteile für die Behandlung verschiedener Tumorerkrankungen interessant zu sein. Die Bioverfügbarkeit von Naturstoffen ist häufig sehr gering, was ihren therapeutischen Effekt deutlich einschränkt. Die Solubilisierung, d.h. die Verpackung des Inhaltsstoffs in Mizellen, soll die Bioverfügbarkeit um ein Vielfaches erhöhen. In der vorliegenden Arbeit wurde das Polyphenol-Gemisch Vineatrol und dessen Solubilisat NovaSOL[®] im Vergleich zu dem in der Weinrebe vorkommenden Polyphenol Resveratrol auf die antitumorale Wirkung am malignen Melanom untersucht. Im Vorfeld wurde von einer deutlich stärkeren antiproliferativen Wirkung ausgegangen, da Vineatrol als stabiler und biologisch aktiver als der Reinstoff Resveratrol gilt.

Der experimentelle Teil der Arbeit war in drei Teile unterteilt. In der ersten Phase wurde die Viabilität und Proliferation der Tumorzelllinien nach Behandlung mit den zu testenden Substanzen mittels MUH-, SRB- und LDH-Assays untersucht. Anschließend wurde eine Zellzyklusanalyse mit Bestimmung des Anteils an apoptotischen Zellen mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Zum Abschluss wurde die Toxizität der Substanzen auf primär humane Hepatozyten (PHH) mit Hilfe von LDH-, GOT-, CellTiter-Blue[®]- und SRB-Assays untersucht.

Bei der Auswertung der verschiedenen Assays wurde deutlich, dass sich die vermeintliche Überlegenheit des Vineatrols in vitro nicht bestätigen lässt. Für Resveratrol konnte in vitro eine deutliche dosis- und zeitabhängige Wirkung auf die untersuchten humanen Melanomzelllinien BLM, LOX-IMVI und SK-MEL-28 nachgewiesen werden. Resveratrol erwies sich ab einem Konzentrations-

bereich beginnend von 5 bis 40 µg/ml als antiproliferativ. Die Behandlung mit Vineatrol erzielte nur bei Einsatz höherer Konzentrationen (20 und 40 µg/ml) eine antiproliferative Wirkung. Diese war allerdings deutlich geringer als die von Resveratrol. Im Vergleich dazu zeigten vor allem die LOX-IMVI Zellen eine hohe Empfindlichkeit gegenüber den Behandlungen, während bei den SK-MEL-28 Zellen kein nennenswerter Effekt auf die Viabilität zu erkennen war. Mithilfe des LDH-Assays und der FACS-Analyse konnte gezeigt werden, dass die Zellen bei Behandlung mit den drei Testsubstanzen keine Membranschädigung erleiden, es also zu keiner Nekrose kommt, sondern die Zellen in Apoptose gehen. Die Toxizitätsprüfung der Substanzen an PHHs ergab, dass eine Behandlung mit Vineatrol ausgeprägte Viabilitätsverluste mit sich bringt. Resveratrol dagegen wird mit Ausnahme der höchsten Konzentration (40 µg/ml) von den gesunden Leberzellen gut vertragen. Für das Vineatrol-Solubilisat NovaSOL® konnte in keinem der durchgeführten Versuche eine nennenswerte Wirkung nachgewiesen werden. Es ist möglich, dass die adäquate Wirkung der Solubilisate nur in vivo in Erscheinung tritt und in vitro nicht erkennbar ist. Folglich sollte das Vineatrol-Solubilisat in vivo am Tiermodell erneut auf seine antitumorale Wirkung hin getestet werden, bevor es beim Menschen zum Einsatz kommt. Ausgehend von den bisherigen Untersuchungen sollten durch weitere Analysen die isolierten Begleitsubstanzen des Extrakts genauer untersucht werden, um so eventuell toxische Substanzen zu identifizieren. Dann wäre es möglich das Extraktionsverfahren so zu ändern, dass diese nur noch vermindert bis gar nicht mehr im Extrakt vorkommen. Bei weiteren Studien mit dem Extrakt Vineatrol sollte außerdem mit einem standardisierten Extrakt gearbeitet werden, um so eine bessere Vergleichbarkeit der verschiedenen Ergebnisse zu ermöglichen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass das Polyphenol-Gemisch Vineatrol dem Polyphenol Resveratrol nicht überlegen ist. Auch wenn bereits zahlreiche Literatur für Resveratrol vorhanden ist, könnte es sich lohnen dieses zu solubilisieren und dessen Wirkung in vivo zu untersuchen. Denn durch die eingeschränkte Bioverfügbarkeit konnten die antitumoralen Wirkungen, die in vitro sichtbar waren, in vivo bisher nicht nachgewiesen werden. Die Erhöhung

der Bioverfügbarkeit durch die Mizellenverpackung ist ein vielversprechender Ansatz um die getesteten Substanzen klinisch einsetzbar zu machen.

6 Abkürzungsverzeichnis

6-PN	6-Prenylnaringenin
8-PN	8-Prenylnaringenin
AJCC	American Joint Committee
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATCC	American Type Culture Collection
CTB	CellTiter-Blue®
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4 (engl.)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (engl.)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. Deoxyribonucleic acid)
DTIC	Dacarbazin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (engl. Ethylendiamintetraacetate)
FACS	Fluorescence activated cell sorting (engl.)
FCS	Fetal Calf Serum (engl.)
GMP	Good Manufacturing Practice (engl.)
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
h	Stunde (lat. hora)
H ₂ O	Wasser
H ₂ O _{dd}	Bidestilliertes Wasser (engl. double distilled water)
HDAC	human Histondeacetylase-Enzymen
IARD	International Alliance for Responsible Drinking
ISO	Internationalen Organisation für Normung
LDH	Laktat-Dehydrogenase
MDH	Malatdehydrogenase
miRNA	microRNA
mM	mol/L (= mol/dm ³)
MUH	4-Methylumbelliferyl-Heptanoat
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NF κB	Nuklearfaktors κB

PBS	phosphate buffered saline
PD-1	programmed cell death protein 1
pH	pondus Hydrogenii (lat.)
PHH	primär humane Hepatozyten
PI	Propidiumiodid
Res	Resveratrol
RNA	Ribonukleinsäure (engl. Ribonucleic acid)
RNAse A	Ribonuklease-A
Rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. revolutions per minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SD	Standardabweichung (engl. Standard deviation)
SLND	Sentinel Lymph Node Dissektion
SRB	Sulforhodamin B
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UICC	Union for International Cancer Control
VE- Wasser	Vollentsalztes Wasser
Vin	Vineatrol
Vin-Sol	Vineatrol-Solubilisat

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel von trans- und cis-Resveratrol	21
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Mizellarstruktur (Produktmizelle) .	26
Abbildung 3: Neubauer improved Zählgitter	36
Abbildung 4: MUH-Assay der BLM-Zelllinie	45
Abbildung 5: MUH-Assay der SK-MEL-28-Zelllinie	47
Abbildung 6: MUH-Assay der LOX-IMVI-Zelllinie	49
Abbildung 7: SRB-Assay der Zelllinien BLM, SK-MEL-28, LOX-IMVI	53
Abbildung 8: LDH-Assay der Zelllinien BLM, SK-MEL-28, LOX-IMVI.....	57
Abbildung 9: FACS-Analyse mit BLM Zellen	60
Abbildung 10: FACS-Analyse mit SK-MEL-28 Zellen	61
Abbildung 11: FACS-Analyse mit LOX-IMVI Zellen.....	62
Abbildung 12: CellTiter-Blue®-Assay der PHHs mit Res, Vin, Vin-Sol.....	66
Abbildung 13: SRB-Assay der PHHs mit Res, Vin, Vin-Sol.....	69
Abbildung 14: LDH-Assay bei PHHs mit Res, Vin, Vin-Sol	72
Abbildung 15: GOT-Assay bei PHHs mit Res, Vin, Vin-Sol.....	76
Abbildung 16: SRB-Assay der Zelllinien BLM, SK-MEL-28, LOX-IMVI	80
Abbildung 17: LDH-Assay der Zelllinien BLM, SK-MEL-28, LOX-IMVI.....	84
Abbildung 18: Zusammenhang zwischen Alkoholkonsum und Mortalität	93

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung des malignen Melanoms	7
Tabelle 2: Empfehlungen zu Sicherheitsabständen	10
Tabelle 3: prozentualer Anteil der in Vineatrol 30 vorkommenden Derivate (Charge: R19913-01)	23
Tabelle 4: Charakteristik der verwendeten Melanomzelllinien.....	28
Tabelle 5: verwendete Chemikalien	29
Tabelle 6: verwendete Medien, (Stamm-)Lösungen, Puffer	30
Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien.....	31
Tabelle 8: verwendete Kits	32
Tabelle 9: verwendete Geräte	32
Tabelle 10: verwendete Software	33

9 Literaturverzeichnis

- Adler M. J., & White C. R., Jr. (1997). Amelanotic malignant melanoma. *Semin Cutan Med Surg*, 16(2), 122-130.
- Aggarwal B. B., Bhardwaj A., Aggarwal R. S., Seeram N. P., Shishodia S., & Takada Y. (2004). Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res*, 24(5A), 2783-2840.
- Aggarwal B. B., & Sung B. (2009). Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. *Trends Pharmacol Sci*, 30(2), 85-94. doi:10.1016/j.tips.2008.11.002
- Aggarwal S., Ichikawa H., Takada Y., Sandur S. K., Shishodia S., & Aggarwal B. B. (2006). Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates expression of cell proliferation and antiapoptotic and metastatic gene products through suppression of I κ B α kinase and Akt activation. *Mol Pharmacol*, 69(1), 195-206. doi:10.1124/mol.105.017400
- Alvarez-Sala Walther L. A., Slowing Barillas K., Gomez-Serranillos Cuadrado P., Torres Segovia F., Valderrama Rojas M., & Millan Nunez-Cortes J. (2000). [Variability of polyphenol content in different types of wine and its potential application in the understanding of its biologic effects]. *Med Clin (Barc)*, 114(9), 331-332.
- Amaria R. N., Prieto P. A., Tetzlaff M. T., Reuben A., Andrews M. C., Ross M. I., . . . Wargo J. A. (2018). Neoadjuvant plus adjuvant dabrafenib and trametinib versus standard of care in patients with high-risk, surgically resectable melanoma: a single-centre, open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 19(2), 181-193. doi:10.1016/S1470-2045(18)30015-9
- Anto R. J., Mukhopadhyay A., Denning K., & Aggarwal B. B. (2002). Curcumin (diferuloylmethane) induces apoptosis through activation of caspase-8, BID cleavage and cytochrome c release: its suppression by ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-xl. *Carcinogenesis*, 23(1), 143-150.
- AQUANOVA AG. (n.d.). Produkt Micelle. Retrieved from https://www.aquanova.de/Produkt_Micelle. Last accessed January 28, 2019.
- Argenziano G., Fabbrocini G., Carli P., De Giorgi V., Sammarco E., & Delfino M. (1998). Epiluminescence microscopy for the diagnosis of doubtful melanocytic skin lesions. Comparison of

- the ABCD rule of dermatoscopy and a new 7-point checklist based on pattern analysis. *Arch Dermatol*, 134(12), 1563-1570.
- Autier P., & Dore J. F. (1998). Influence of sun exposures during childhood and during adulthood on melanoma risk. EPIMEL and EORTC Melanoma Cooperative Group. European Organisation for Research and Treatment of Cancer. *Int J Cancer*, 77(4), 533-537.
- Baarine M., Thandapilly S. J., Louis X. L., Mazue F., Yu L., Delmas D., . . . Latruffe N. (2011). Pro-apoptotic versus anti-apoptotic properties of dietary resveratrol on tumoral and normal cardiac cells. *Genes Nutr*, 6(2), 161-169. doi:10.1007/s12263-011-0232-z
- Bagnardi V., Blangiardo M., La Vecchia C., & Corrao G. (2001a). Alcohol consumption and the risk of cancer: a meta-analysis. *Alcohol Res Health*, 25(4), 263-270.
- Bagnardi V., Blangiardo M., La Vecchia C., & Corrao G. (2001b). A meta-analysis of alcohol drinking and cancer risk. *Br J Cancer*, 85(11), 1700-1705. doi:10.1054/bjoc.2001.2140
- Bai Q. Q., Liu Y. F., Guo M., Zhao J. X., Zhang T. C., & Di D. L. (2011). [Study on extraction process of available components of tea]. *Zhong Yao Cai*, 34(9), 1438-1441.
- Balch C. M., Gershenwald J. E., Soong S. J., Thompson J. F., Atkins M. B., Byrd D. R., . . . Sondak V. K. (2009). Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*, 27(36), 6199-6206. doi:10.1200/JCO.2009.23.4799
- Balch C. M., Soong S. J., Gershenwald J. E., Thompson J. F., Reintgen D. S., Cascinelli N., . . . Morabito A. (2001). Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol*, 19(16), 3622-3634. doi:10.1200/JCO.2001.19.16.3622
- Baur J. A., & Sinclair D. A. (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov*, 5(6), 493-506. doi:10.1038/nrd2060
- Bayet-Robert M., Kwiatkowski F., Leheurteur M., Gachon F., Planchat E., Abrial C., . . . Chollet P. (2010). Phase I dose escalation trial of docetaxel plus curcumin in patients with advanced and metastatic breast cancer. *Cancer Biol Ther*, 9(1), 8-14.

- Berman A. Y., Motechin R. A., Wiesenfeld M. Y., & Holz M. K. (2017). The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials. *NPJ Precis Oncol*, 1. doi:10.1038/s41698-017-0038-6
- Billard C., Izard J. C., Roman V., Kern C., Mathiot C., Mentz F., & Kolb J. P. (2002). Comparative antiproliferative and apoptotic effects of resveratrol, epsilon-viniferin and vine-shots derived polyphenols (vineatrols) on chronic B lymphocytic leukemia cells and normal human lymphocytes. *Leuk Lymphoma*, 43(10), 1991-2002. doi:10.1080/1042819021000015952
- Bode L. M., Bunzel D., Huch M., Cho G. S., Ruhland D., Bunzel M., . . . Kulling S. E. (2013). In vivo and in vitro metabolism of trans-resveratrol by human gut microbiota. *Am J Clin Nutr*, 97(2), 295-309. doi:10.3945/ajcn.112.049379
- Bram S., Froussard P., Guichard M., Jasmin C., Augery Y., Sinoussi-Barre F., & Wray W. (1980). Vitamin C preferential toxicity for malignant melanoma cells. *Nature*, 284(5757), 629-631.
- Braun-Falco O., Plewig G., Wolff H. H., & Landthaler M. (2005). *Maligne Melanome*. (Vol. 5. Auflage). Heidelberg: Verlag Springer.
- Brizuela L., Dayon A., Doumerc N., Ader I., Golzio M., Izard J. C., . . . Cuvillier O. (2010). The sphingosine kinase-1 survival pathway is a molecular target for the tumor-suppressive tea and wine polyphenols in prostate cancer. *FASEB J*, 24(10), 3882-3894. doi:10.1096/fj.10-160838
- Buettner P. G., Leiter U., Eigentler T. K., & Garbe C. (2005). Development of prognostic factors and survival in cutaneous melanoma over 25 years: An analysis of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society. *Cancer*, 103(3), 616-624. doi:10.1002/cncr.20816
- Burmeister B. H., Henderson M. A., Ainslie J., Fisher R., Di Iulio J., Smithers B. M., . . . Thompson J. F. (2012). Adjuvant radiotherapy versus observation alone for patients at risk of lymph-node field relapse after therapeutic lymphadenectomy for melanoma: a randomised trial. *Lancet Oncol*, 13(6), 589-597. doi:10.1016/S1470-2045(12)70138-9
- Calvo-Castro L. A., Burkard M., Sus N., Scheubeck G., Leischner C., Lauer U. M., . . . Frank J. (2018a). The Oral Bioavailability of 8-Prenylnaringenin from Hops (*Humulus Lupulus* L.) in Healthy Women and Men is Significantly Higher than that of its

- Positional Isomer 6-Prenylnaringenin in a Randomized Crossover Trial. *Mol Nutr Food Res*. doi:10.1002/mnfr.201700838
- Calvo-Castro L. A., Schiborr C., David F., Ehrh H., Voggel J., Sus N., . . . Frank J. (2018b). The Oral Bioavailability of Trans-Resveratrol from a Grapevine-Shoot Extract in Healthy Humans is Significantly Increased by Micellar Solubilization. *Mol Nutr Food Res*, 62(9), e1701057. doi:10.1002/mnfr.201701057
- Carroll R. E., Benya R. V., Turgeon D. K., Vareed S., Neuman M., Rodriguez L., . . . Brenner D. E. (2011). Phase IIa clinical trial of curcumin for the prevention of colorectal neoplasia. *Cancer Prev Res (Phila)*, 4(3), 354-364. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-10-0098
- Cascinelli N., Morabito A., Santinami M., MacKie R. M., & Belli F. (1998). Immediate or delayed dissection of regional nodes in patients with melanoma of the trunk: a randomised trial. WHO Melanoma Programme. *Lancet*, 351(9105), 793-796.
- Chang Y. M., Barrett J. H., Bishop D. T., Armstrong B. K., Bataille V., Bergman W., . . . Newton-Bishop J. A. (2009). Sun exposure and melanoma risk at different latitudes: a pooled analysis of 5700 cases and 7216 controls. *Int J Epidemiol*, 38(3), 814-830. doi:10.1093/ije/dyp166
- Chapman P. B., Hauschild A., Robert C., Haanen J. B., Ascierto P., Larkin J., . . . Group B.-S. (2011). Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med*, 364(26), 2507-2516. doi:10.1056/NEJMoa1103782
- Chen Q., Espey M. G., Krishna M. C., Mitchell J. B., Corpe C. P., Buettner G. R., . . . Levine M. (2005). Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(38), 13604-13609. doi:10.1073/pnas.0506390102
- Chen Q., Espey M. G., Sun A. Y., Pooput C., Kirk K. L., Krishna M. C., . . . Levine M. (2008). Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(32), 11105-11109. doi:10.1073/pnas.0804226105
- Cheng A. L., Hsu C. H., Lin J. K., Hsu M. M., Ho Y. F., Shen T. S., . . . Hsieh C. Y. (2001). Phase I clinical trial of curcumin, a

- chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Res*, 21(4B), 2895-2900.
- Clifford A. J., Ebeler S. E., Ebeler J. D., Bills N. D., Hinrichs S. H., Teissedre P. L., & Waterhouse A. L. (1996). Delayed tumor onset in transgenic mice fed an amino acid-based diet supplemented with red wine solids. *Am J Clin Nutr*, 64(5), 748-756.
- Colin D., Gimazane A., Lizard G., Izard J. C., Solary E., Latruffe N., & Delmas D. (2009). Effects of resveratrol analogs on cell cycle progression, cell cycle associated proteins and 5fluorouracil sensitivity in human derived colon cancer cells. *Int J Cancer*, 124(12), 2780-2788. doi:10.1002/ijc.24264
- Colin D., Lancon A., Delmas D., Lizard G., Abrossinow J., Kahn E., . . . Latruffe N. (2008). Antiproliferative activities of resveratrol and related compounds in human hepatocyte derived HepG2 cells are associated with biochemical cell disturbance revealed by fluorescence analyses. *Biochimie*, 90(11-12), 1674-1684. doi:10.1016/j.biochi.2008.06.006
- Collichio F., Burke L., Proctor A., Wallack D., Collichio A., Long P. K., & Ollila D. W. (2018). Implementing a Program of Talimogene laherparepvec. *Ann Surg Oncol*. doi:10.1245/s10434-018-6361-5
- Conry R. M., Westbrook B., McKee S., & Norwood T. G. (2018). Talimogene Laherparepvec: First in Class Oncolytic Virotherapy. *Hum Vaccin Immunother*, 0. doi:10.1080/21645515.2017.1412896
- Cordova A. C., & Sumpio B. E. (2009). Polyphenols are medicine: Is it time to prescribe red wine for our patients? *Int J Angiol*, 18(3), 111-117.
- Corrao G., Rubbiati L., Bagnardi V., Zambon A., & Poikolainen K. (2000). Alcohol and coronary heart disease: a meta-analysis. *Addiction*, 95(10), 1505-1523.
- de Lorimier A. A. (2000). Alcohol, wine, and health. *Am J Surg*, 180(5), 357-361.
- Delmas D., Aires V., Limagne E., Dutartre P., Mazue F., Ghiringhelli F., & Latruffe N. (2011). Transport, stability, and biological activity of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci*, 1215, 48-59. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05871.x
- Dhillon N., Aggarwal B. B., Newman R. A., Wolff R. A., Kunnumakkara A. B., Abbruzzese J. L., . . . Kurzrock R. (2008). Phase II trial of curcumin in patients with advanced

- pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*, 14(14), 4491-4499. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0024
- Dhooghe L., Naessens T., Heyerick A., De Keukeleire D., Vlietinck A. J., Pieters L., & Apers S. (2010). Quantification of xanthohumol, isoxanthohumol, 8-prenylnaringenin, and 6-prenylnaringenin in hop extracts and derived capsules using secondary standards. *Talanta*, 83(2), 448-456. doi:10.1016/j.talanta.2010.09.041
- Donaldson M. S. (2004). Nutrition and cancer: a review of the evidence for an anti-cancer diet. *Nutr J*, 3, 19. doi:10.1186/1475-2891-3-19
- Dotsika E. N., & Sanderson C. J. (1987). A fluorometric assay for determining cell growth in lymphocyte proliferation and lymphokine assays. *J Immunol Methods*, 105(1), 55-62.
- Du J., Martin S. M., Levine M., Wagner B. A., Buettner G. R., Wang S. H., . . . Cullen J. J. (2010). Mechanisms of ascorbate-induced cytotoxicity in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*, 16(2), 509-520. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-1713
- Duconge J., Miranda-Massari J. R., Gonzalez M. J., Jackson J. A., Warnock W., & Riordan N. H. (2008). Pharmacokinetics of vitamin C: insights into the oral and intravenous administration of ascorbate. *P R Health Sci J*, 27(1), 7-19.
- Dufour M. C. (1999). What is moderate drinking? Defining "drinks" and drinking levels. *Alcohol Res Health*, 23(1), 5-14.
- Durbec F., Martin L., Derancourt C., & Grange F. (2012). Melanoma of the hand and foot: epidemiological, prognostic and genetic features. A systematic review. *Br J Dermatol*, 166(4), 727-739. doi:10.1111/j.1365-2133.2011.10772.x
- Egger M. E., Stepp L. O., Callender G. G., Quillo A. R., Martin R. C., 2nd, Scoggins C. R., . . . McMasters K. M. (2013). Outcomes and prognostic factors in superficial spreading melanoma. *Am J Surg*, 206(6), 861-867; discussion 867-868. doi:10.1016/j.amjsurg.2013.09.003
- Eggermont A. M., Chiarion-Sileni V., Grob J. J., Dummer R., Wolchok J. D., Schmidt H., . . . Testori A. (2015). Adjuvant ipilimumab versus placebo after complete resection of high-risk stage III melanoma (EORTC 18071): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 16(5), 522-530. doi:10.1016/S1470-2045(15)70122-1

- Eggermont A. M., Spatz A., & Robert C. (2014). Cutaneous melanoma. *Lancet*, 383(9919), 816-827. doi:10.1016/S0140-6736(13)60802-8
- Eggermont A. M., Suci S., Santinami M., Testori A., Kruit W. H., Marsden J., . . . Group E. M. (2008). Adjuvant therapy with pegylated interferon alfa-2b versus observation alone in resected stage III melanoma: final results of EORTC 18991, a randomised phase III trial. *Lancet*, 372(9633), 117-126. doi:10.1016/S0140-6736(08)61033-8
- Eggermont A. M. M., Blank C. U., Mandala M., Long G. V., Atkinson V., Dalle S., . . . Robert C. (2018). Adjuvant Pembrolizumab versus Placebo in Resected Stage III Melanoma. *N Engl J Med*, 378(19), 1789-1801. doi:10.1056/NEJMoa1802357
- Eilat-Adar S., Sinai T., Yosefy C., & Henkin Y. (2013). Nutritional recommendations for cardiovascular disease prevention. *Nutrients*, 5(9), 3646-3683. doi:10.3390/nu5093646
- ElAttar T. M., & Virji A. S. (1999). Modulating effect of resveratrol and quercetin on oral cancer cell growth and proliferation. *Anticancer Drugs*, 10(2), 187-193.
- Ellis L., Atadja P. W., & Johnstone R. W. (2009). Epigenetics in cancer: targeting chromatin modifications. *Mol Cancer Ther*, 8(6), 1409-1420. doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-0860
- Empl M. T., Macke S., Winterhalter P., Puff C., Lapp S., Stoica G., . . . Steinberg P. (2014). The growth of the canine glioblastoma cell line D-GBM and the canine histiocytic sarcoma cell line DH82 is inhibited by the resveratrol oligomers hopeaphenol and r2-viniferin. *Vet Comp Oncol*, 12(2), 149-159. doi:10.1111/j.1476-5829.2012.00349.x
- Esatbeyoglu T., Ewald P., Yasui Y., Yokokawa H., Wagner A. E., Matsugo S., . . . Rimbach G. (2016). Chemical Characterization, Free Radical Scavenging, and Cellular Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of a Stilbenoid-Rich Root Extract of *Vitis vinifera*. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 8591286. doi:10.1155/2016/8591286
- Faries M. B., Thompson J. F., Cochran A. J., Andtbacka R. H., Mozzillo N., Zager J. S., . . . Elashoff R. M. (2017). Completion Dissection or Observation for Sentinel-Node Metastasis in Melanoma. *N Engl J Med*, 376(23), 2211-2222. doi:10.1056/NEJMoa1613210
- Fritsch P. (2009). *Melanom*. Heidelberg: Springer Verlag.

- Fulda S. (2010). Resveratrol and derivatives for the prevention and treatment of cancer. *Drug Discov Today*, 15(17-18), 757-765. doi:10.1016/j.drudis.2010.07.005
- Fulda S. (2012). Regulation of cell death and survival by resveratrol: implications for cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem*, 12(8), 874-879.
- Gambini J., Ingles M., Olaso G., Lopez-Grueso R., Bonet-Costa V., Gimeno-Mallench L., . . . Borrás C. (2015). Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 837042. doi:10.1155/2015/837042
- Gammon M. D., Schoenberg J. B., Ahsan H., Risch H. A., Vaughan T. L., Chow W. H., . . . Fraumeni J. F., Jr. (1997). Tobacco, alcohol, and socioeconomic status and adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia. *J Natl Cancer Inst*, 89(17), 1277-1284.
- Garbe C. (2005). *Interdisziplinäre Leitlinien zur Diagnostik und Behandlung von Hauttumoren*. Stuttgart, New York, Delhi, Rio Thieme Verlagsgruppe.
- Garbe C. (2016). *Melanom: aktualisierte Therapieempfehlungen der S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms, mit Fokus auf das fernmetastasierte Stadium*. Thieme Stuttgart;New York: Thieme.
- Garbe C., Buttner P., Weiss J., Soyer H. P., Stocker U., Kruger S., . . . et al. (1994). Risk factors for developing cutaneous melanoma and criteria for identifying persons at risk: multicenter case-control study of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society. *J Invest Dermatol*, 102(5), 695-699.
- Garbe C., Eigentler T. K., Keilholz U., Hauschild A., & Kirkwood J. M. (2011). Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects. *Oncologist*, 16(1), 5-24. doi:10.1634/theoncologist.2010-0190
- Garbe C., Peris K., Hauschild A., Saiag P., Middleton M., Bastholt L., . . . Treatment of C. (2016). Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline - Update 2016. *Eur J Cancer*, 63, 201-217. doi:10.1016/j.ejca.2016.05.005
- Garbe C., Peris K., Hauschild A., Saiag P., Middleton M., Spatz A., . . . Eggermont A. (2010). Diagnosis and treatment of

- melanoma: European consensus-based interdisciplinary guideline. *Eur J Cancer*, 46(2), 270-283. doi:10.1016/j.ejca.2009.10.032
- Garbe C., Radny P., Linse R., Dummer R., Gutzmer R., Ulrich J., . . . Hauschild A. (2008). Adjuvant low-dose interferon {alpha}2a with or without dacarbazine compared with surgery alone: a prospective-randomized phase III DeCOG trial in melanoma patients with regional lymph node metastasis. *Ann Oncol*, 19(6), 1195-1201. doi:10.1093/annonc/mdn001
- Garbe C., & Rassner G. (2013). *Dermatologie: Leitlinien und Qualitätssicherung für Diagnostik und Therapie Berichte von der 39. Tagung der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. Springer Berlin Heidelberg.
- Gautam S. C., Xu Y. X., Dumaguin M., Janakiraman N., & Chapman R. A. (2000). Resveratrol selectively inhibits leukemia cells: a prospective agent for ex vivo bone marrow purging. *Bone Marrow Transplant*, 25(6), 639-645. doi:10.1038/sj.bmt.1702189
- Gerhauser C. (2005). Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *Eur J Cancer*, 41(13), 1941-1954. doi:10.1016/j.ejca.2005.04.012
- Goebeler M. H., H. (2017). *Basiswissen Dermatologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.
- Goldberg D. M., Soleas G. J., & Levesque M. (1999). Moderate alcohol consumption: the gentle face of Janus. *Clin Biochem*, 32(7), 505-518.
- Goldberg D. M., Yan J., & Soleas G. J. (2003). Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clin Biochem*, 36(1), 79-87.
- Gomez-Zorita S., Fernandez-Quintela A., Macarulla M. T., Aguirre L., Hijona E., Bujanda L., . . . Portillo M. P. (2012). Resveratrol attenuates steatosis in obese Zucker rats by decreasing fatty acid availability and reducing oxidative stress. *Br J Nutr*, 107(2), 202-210. doi:10.1017/S0007114511002753
- Green A. C., Baade P., Coory M., Aitken J. F., & Smithers M. (2012). Population-based 20-year survival among people diagnosed with thin melanomas in Queensland, Australia. *J Clin Oncol*, 30(13), 1462-1467. doi:10.1200/JCO.2011.38.8561
- Greene M. H., Clark W. H., Jr., Tucker M. A., Kraemer K. H., Elder D. E., & Fraser M. C. (1985). High risk of malignant melanoma

- in melanoma-prone families with dysplastic nevi. *Ann Intern Med*, 102(4), 458-465.
- Greenwald H. S., Friedman E. B., & Osman I. (2012). Superficial spreading and nodular melanoma are distinct biological entities: a challenge to the linear progression model. *Melanoma Res*, 22(1), 1-8. doi:10.1097/CMR.0b013e32834e6aa0
- Grigg C., Blake Z., Gartrell R., Sacher A., Taback B., & Saenger Y. (2016). Talimogene laherparepvec (T-Vec) for the treatment of melanoma and other cancers. *Semin Oncol*, 43(6), 638-646. doi:10.1053/j.seminoncol.2016.10.005
- Grob J. J., & Bonerandi J. J. (1998). The 'ugly duckling' sign: identification of the common characteristics of nevi in an individual as a basis for melanoma screening. *Arch Dermatol*, 134(1), 103-104.
- Guerrero R. F., Garcia-Parrilla M. C., Puertas B., & Cantos-Villar E. (2009). Wine, resveratrol and health: a review. *Nat Prod Commun*, 4(5), 635-658.
- Gupta Y. K., & Briyal S. (2006). Protective effect of vineatrol against kainic acid induced seizures, oxidative stress and on the expression of heat shock proteins in rats. *Eur Neuropsychopharmacol*, 16(2), 85-91. doi:10.1016/j.euroneuro.2005.07.004
- Gutzmer R. (2014). Malignes Melanom: Durchbruch in der Therapie. *Deutsches Ärzteblatt*.
- Ha do T., Chen Q. C., Hung T. M., Youn U. J., Ngoc T. M., Thuong P. T., . . . Bae K. (2009). Stilbenes and oligostilbenes from leaf and stem of *Vitis amurensis* and their cytotoxic activity. *Arch Pharm Res*, 32(2), 177-183. doi:10.1007/s12272-009-1132-2
- Hagl S., Kocher A., Schiborr C., Kolesova N., Frank J., & Eckert G. P. (2015). Curcumin micelles improve mitochondrial function in neuronal PC12 cells and brains of NMRI mice - Impact on bioavailability. *Neurochem Int*, 89, 234-242. doi:10.1016/j.neuint.2015.07.026
- Hassel J. C., Heinzerling L., Aberle J., Bahr O., Eigentler T. K., Grimm M. O., . . . Gutzmer R. (2017). Combined immune checkpoint blockade (anti-PD-1/anti-CTLA-4): Evaluation and management of adverse drug reactions. *Cancer Treat Rev*, 57, 36-49. doi:10.1016/j.ctrv.2017.05.003

- Hauschild A., Rosien F., & Lischner S. (2003). Surgical standards in the primary care of melanoma patients. *Onkologie*, 26(3), 218-222. doi:10.1159/000071616
- He S., Sun C., & Pan Y. (2008). Red wine polyphenols for cancer prevention. *Int J Mol Sci*, 9(5), 842-853. doi:10.3390/ijms9050842
- Hessisches Ministerium für Wirtschaft Verkehr und Landentwicklung. (2006). AQUANOVA AG – Kristallklare Lösungen für den Food-, Kosmetik- und Pharmasektor. Retrieved from https://www.aquanova.de/media/public/publikationen2006/hessen-nanotech_NEWS_6_2006_de.pdf. Last accessed January 28, 2019.
- Hochwald S. N., & Coit D. G. (1998). Role of elective lymph node dissection in melanoma. *Semin Surg Oncol*, 14(4), 276-282.
- Holly E. A., Kelly J. W., Shpall S. N., & Chiu S. H. (1987). Number of melanocytic nevi as a major risk factor for malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol*, 17(3), 459-468.
- Hudson D. A., & Krige J. E. (1993). Plantar melanoma in black South Africans. *Br J Surg*, 80(8), 992-994.
- International Alliance for Responsible Drinking (IARD). (2019). Drinking guidelines: General population. Retrieved from <http://www.iard.org/resources/drinking-guidelines-general-population/>. Last accessed January 28, 2019.
- Jang M., & Pezzuto J. M. (1999). Cancer chemopreventive activity of resveratrol. *Drugs Exp Clin Res*, 25(2-3), 65-77.
- Josse A., Collette S., Suci S., Nijsten T., Lejeune F., Kleeberg U. R., . . . de Vries E. (2012). Superior outcome of women with stage I/II cutaneous melanoma: pooled analysis of four European Organisation for Research and Treatment of Cancer phase III trials. *J Clin Oncol*, 30(18), 2240-2247. doi:10.1200/JCO.2011.38.0584
- Juan M. E., Vinardell M. P., & Planas J. M. (2002). The daily oral administration of high doses of trans-resveratrol to rats for 28 days is not harmful. *J Nutr*, 132(2), 257-260.
- Kahler K. C., Hassel J. C., Heinzerling L., Loquai C., Mossner R., Ugurel S., . . . für das Komitee "Kutane Nebenwirkungen" der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische O. (2016). Nebenwirkungsmanagement bei Immun-Checkpoint-Blockade durch CTLA-4- und PD1-Antikörper beim metastasierten

- Melanom. *J Dtsch Dermatol Ges*, 14(7), 662-683.
doi:10.1111/ddg.13047_g
- Karmen A., Wroblewski F., & Ladue J. S. (1955). Transaminase activity in human blood. *J Clin Invest*, 34(1), 126-131.
doi:10.1172/JCI103055
- Katalinic A., Waldmann A., Weinstock M. A., Geller A. C., Eisemann N., Greinert R., . . . Breitbart E. (2012). Does skin cancer screening save lives?: an observational study comparing trends in melanoma mortality in regions with and without screening. *Cancer*, 118(21), 5395-5402.
doi:10.1002/cncr.27566
- Kawada N., Seki S., Inoue M., & Kuroki T. (1998). Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin, and N-acetylcysteine, on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and Kupffer cells. *Hepatology*, 27(5), 1265-1274.
doi:10.1002/hep.510270512
- Kiran Rompicharla S. V., Trivedi P., Kumari P., Ghanta P., Ghosh B., & Biswas S. (2017). Polymeric micelles of suberoylanilide hydroxamic acid to enhance the anticancer potential in vitro and in vivo. *Nanomedicine (Lond)*, 12(1), 43-58.
doi:10.2217/nnm-2016-0321
- Kirova Y. M., Chen J., Rabarijaona L. I., Piedbois Y., & Le Bourgeois J. P. (1999). Radiotherapy as palliative treatment for metastatic melanoma. *Melanoma Res*, 9(6), 611-613.
- Kittler H., Pehamberger H., Wolff K., & Binder M. (2002). Diagnostic accuracy of dermoscopy. *Lancet Oncol*, 3(3), 159-165.
- Kocher A., Bohnert L., Schiborr C., & Frank J. (2016). Highly bioavailable micellar curcuminoids accumulate in blood, are safe and do not reduce blood lipids and inflammation markers in moderately hyperlipidemic individuals. *Mol Nutr Food Res*, 60(7), 1555-1563. doi:10.1002/mnfr.201501034
- Kozarevic D., Vojvodic N., Gordon T., Kaelber C. T., McGee D., & Zukel W. J. (1983). Drinking habits and death. The Yugoslavia cardiovascular disease study. *Int J Epidemiol*, 12(2), 145-150.
- Krebs in Deutschland für 2013/2014. (2017). 3.11 *Malignes Melanom der Haut* (Vol. 11. Auflage). Berlin: Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.
- Krishan A. (1975). Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J Cell Biol*, 66(1), 188-193.

- Kuchelmeister C., Schaumburg-Lever G., & Garbe C. (2000). Acral cutaneous melanoma in caucasians: clinical features, histopathology and prognosis in 112 patients. *Br J Dermatol*, 143(2), 275-280.
- Kuhnau J. (1976). The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet*, 24, 117-191.
- Kulichova D., Danova J., Kunte C., Ruzicka T., & Celko A. M. (2014). Risk factors for malignant melanoma and preventive methods. *Cutis*, 94(5), 241-248.
- Lambert J. D., Hong J., Yang G. Y., Liao J., & Yang C. S. (2005). Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *Am J Clin Nutr*, 81(1 Suppl), 284S-291S.
- Lao C. D., Ruffin M. T. t., Normolle D., Heath D. D., Murray S. I., Bailey J. M., . . . Brenner D. E. (2006). Dose escalation of a curcuminoid formulation. *BMC Complement Altern Med*, 6, 10. doi:10.1186/1472-6882-6-10
- Leiro J., Arranz J. A., Parama A., Alvarez M. F., & Sanmartin M. L. (2004). In vitro effects of the polyphenols resveratrol, mangiferin and (-)-epigallocatechin-3-gallate on the scuticociliate fish pathogen *Philasterides dicentrarchi*. *Dis Aquat Organ*, 59(2), 171-174. doi:10.3354/dao059171
- Leiter U., Buettner P. G., Eigentler T. K., Brocker E. B., Voit C., Gollnick H., . . . Garbe C. (2012). Hazard rates for recurrent and secondary cutaneous melanoma: an analysis of 33,384 patients in the German Central Malignant Melanoma Registry. *J Am Acad Dermatol*, 66(1), 37-45. doi:10.1016/j.jaad.2010.09.772
- Leitlinienprogramm Onkologie. (2016). *Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms. Kurzversion 2.0*: Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF.
- Li X., Chen T., Xu L., Zhang Z., Li L., & Chen H. (2014). Preparation of curcumin micelles and the in vitro and in vivo evaluation for cancer therapy. *J Biomed Nanotechnol*, 10(8), 1458-1468.
- Li X., Wu B., Wang L., & Li S. (2006). Extractable amounts of trans-resveratrol in seed and berry skin in *Vitis* evaluated at the germplasm level. *J Agric Food Chem*, 54(23), 8804-8811. doi:10.1021/jf061722y

- Lodder J. V., Simson W., & Becker P. J. (2010). Malignant melanoma of the skin in black South Africans: a 15-year experience. *S Afr J Surg*, 48(3), 76-79.
- Long G. V., Hauschild A., Santinami M., Atkinson V., Mandala M., Chiarion-Sileni V., . . . Kirkwood J. M. (2017). Adjuvant Dabrafenib plus Trametinib in Stage III BRAF-Mutated Melanoma. *N Engl J Med*, 377(19), 1813-1823. doi:10.1056/NEJMoa1708539
- Longnecker M. P., Newcomb P. A., Mittendorf R., Greenberg E. R., Clapp R. W., Bogdan G. F., . . . Willett W. C. (1995). Risk of breast cancer in relation to lifetime alcohol consumption. *J Natl Cancer Inst*, 87(12), 923-929.
- Lovat F., Valeri N., & Croce C. M. (2011). MicroRNAs in the pathogenesis of cancer. *Semin Oncol*, 38(6), 724-733. doi:10.1053/j.seminoncol.2011.08.006
- Lv L., Liu C., Li Z., Song F., Li G., & Huang X. (2017). Pharmacokinetics of Quercetin-Loaded Methoxy Poly(ethylene glycol)-b-poly(L-lactic acid) Micelle after Oral Administration in Rats. *Biomed Res Int*, 2017, 1750895. doi:10.1155/2017/1750895
- Macke S., Jerz G., Empl M. T., Steinberg P., & Winterhalter P. (2012). Activity-guided isolation of resveratrol oligomers from a grapevine-shoot extract using countercurrent chromatography. *J Agric Food Chem*, 60(48), 11919-11927. doi:10.1021/jf3030584
- Mackie R. M., Freudenberger T., & Aitchison T. C. (1989). Personal risk-factor chart for cutaneous melanoma. *Lancet*, 2(8661), 487-490.
- Marel A. K., Lizard G., Izard J. C., Latruffe N., & Delmas D. (2008). Inhibitory effects of trans-resveratrol analogs molecules on the proliferation and the cell cycle progression of human colon tumoral cells. *Mol Nutr Food Res*, 52(5), 538-548. doi:10.1002/mnfr.200700185
- Minagawa T., Okui T., Takahashi N., Nakajima T., Tabeta K., Murakami S., & Yamazaki K. (2015). Resveratrol suppresses the inflammatory responses of human gingival epithelial cells in a SIRT1 independent manner. *J Periodontal Res*, 50(5), 586-593. doi:10.1111/jre.12238
- Miranda C. L., Stevens J. F., Helmrich A., Henderson M. C., Rodriguez R. J., Yang Y. H., . . . Buhler D. R. (1999). Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids

- from hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines. *Food Chem Toxicol*, 37(4), 271-285.
- Mishima Y., & Nakanishi T. (1985). Acral lentiginous melanoma and its precursor--heterogeneity of palmo-plantar melanomas. *Pathology*, 17(2), 258-265.
- Miura D., Miura Y., & Yagasaki K. (2003). Hypolipidemic action of dietary resveratrol, a phytoalexin in grapes and red wine, in hepatoma-bearing rats. *Life Sci*, 73(11), 1393-1400.
- Moll I., Jung E. G., Augustin M., Bahmer F. A., Bahmer J., & Bayerl C. (2010). *7.3 Malignes Melanom* (7.Auflage ed.). Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Morton D. L., Wanek L., Nizze J. A., Elashoff R. M., & Wong J. H. (1991). Improved long-term survival after lymphadenectomy of melanoma metastatic to regional nodes. Analysis of prognostic factors in 1134 patients from the John Wayne Cancer Clinic. *Ann Surg*, 214(4), 491-499; discussion 499-501.
- Moschos S. J., Edington H. D., Land S. R., Rao U. N., Jukic D., Shipe-Spotloe J., & Kirkwood J. M. (2006). Neoadjuvant treatment of regional stage IIIB melanoma with high-dose interferon alfa-2b induces objective tumor regression in association with modulation of tumor infiltrating host cellular immune responses. *J Clin Oncol*, 24(19), 3164-3171. doi:10.1200/JCO.2005.05.2498
- Mukamal K. J., Conigrave K. M., Mittleman M. A., Camargo C. A., Jr., Stampfer M. J., Willett W. C., & Rimm E. B. (2003). Roles of drinking pattern and type of alcohol consumed in coronary heart disease in men. *N Engl J Med*, 348(2), 109-118. doi:10.1056/NEJMoa022095
- Muller C., Ullmann K., Wilkens A., Winterhalter P., Toyokuni S., & Steinberg P. (2009). Potent antioxidative activity of Vineatrol30 grapevine-shoot extract. *Biosci Biotechnol Biochem*, 73(8), 1831-1836.
- Ohyama M., Tanaka T., Ito T., Iinuma M., Bastow K. F., & Lee K. H. (1999). Antitumor agents 200. Cytotoxicity of naturally occurring resveratrol oligomers and their acetate derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*, 9(20), 3057-3060.
- Olivier K. R., Schild S. E., Morris C. G., Brown P. D., & Markovic S. N. (2007). A higher radiotherapy dose is associated with more durable palliation and longer survival in patients with metastatic melanoma. *Cancer*, 110(8), 1791-1795. doi:10.1002/cncr.22988

- Ollberding N. J., Lim U., Wilkens L. R., Setiawan V. W., Shvetsov Y. B., Henderson B. E., . . . Goodman M. T. (2012). Legume, soy, tofu, and isoflavone intake and endometrial cancer risk in postmenopausal women in the multiethnic cohort study. *J Natl Cancer Inst*, 104(1), 67-76. doi:10.1093/jnci/djr475
- Ong E. S. (2004). Extraction methods and chemical standardization of botanicals and herbal preparations. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 812(1-2), 23-33. doi:10.1016/j.jchromb.2004.07.041
- Oshima Y., Namao K., Kamijou A., Matsuoka S., Nakano M., Terao K., & Ohizumi Y. (1995). Powerful hepatoprotective and hepatotoxic plant oligostilbenes, isolated from the Oriental medicinal plant *Vitis coignetiae* (Vitaceae). *Experientia*, 51(1), 63-66.
- Padayatty S. J., Riordan H. D., Hewitt S. M., Katz A., Hoffer L. J., & Levine M. (2006). Intravenously administered vitamin C as cancer therapy: three cases. *CMAJ*, 174(7), 937-942. doi:10.1503/cmaj.050346
- Padayatty S. J., Sun H., Wang Y., Riordan H. D., Hewitt S. M., Katz A., . . . Levine M. (2004). Vitamin C pharmacokinetics: implications for oral and intravenous use. *Ann Intern Med*, 140(7), 533-537.
- Pearce V. P., Sherrell J., Lou Z., Kopelovich L., Wright W. E., & Shay J. W. (2008). Immortalization of epithelial progenitor cells mediated by resveratrol. *Oncogene*, 27(17), 2365-2374. doi:10.1038/sj.onc.1210886
- Pedersen A., Johansen C., & Gronbaek M. (2003). Relations between amount and type of alcohol and colon and rectal cancer in a Danish population based cohort study. *Gut*, 52(6), 861-867.
- Pehamberger H., Soyer H. P., Steiner A., Kofler R., Binder M., Mischer P., . . . Wolff K. (1998). Adjuvant interferon alfa-2a treatment in resected primary stage II cutaneous melanoma. Austrian Malignant Melanoma Cooperative Group. *J Clin Oncol*, 16(4), 1425-1429. doi:10.1200/JCO.1998.16.4.1425
- Petrovski G., Gurusamy N., & Das D. K. (2011). Resveratrol in cardiovascular health and disease. *Ann N Y Acad Sci*, 1215, 22-33. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05843.x
- Piver B., Berthou F., Dreano Y., & Lucas D. (2003). Differential inhibition of human cytochrome P450 enzymes by epsilon-viniferin, the dimer of resveratrol: comparison with resveratrol

- and polyphenols from alcoholized beverages. *Life Sci*, 73(9), 1199-1213.
- Plewig G., & Degitz K. (2013). *Fortschritte der praktischen Dermatologie und Venerologie*: Springer Berlin Heidelberg.
- Privat C., Telo J. P., Bernardes-Genisson V., Vieira A., Souchard J. P., & Nepveu F. (2002). Antioxidant properties of trans-epsilon-viniferin as compared to stilbene derivatives in aqueous and nonaqueous media. *J Agric Food Chem*, 50(5), 1213-1217.
- Prokop J., Abrman P., Seligson A. L., & Sovak M. (2006). Resveratrol and its glycon piceid are stable polyphenols. *J Med Food*, 9(1), 11-14. doi:10.1089/jmf.2006.9.11
- Quiney C., Dauzonne D., Kern C., Fourneron J. D., Izard J. C., Mohammad R. M., . . . Billard C. (2004). Flavones and polyphenols inhibit the NO pathway during apoptosis of leukemia B-cells. *Leuk Res*, 28(8), 851-861. doi:10.1016/j.leukres.2003.12.003
- Rajha H. N., Ziegler W., Louka N., Hobaika Z., Vorobiev E., Boechzelt H. G., & Maroun R. G. (2014). Effect of the drying process on the intensification of phenolic compounds recovery from grape pomace using accelerated solvent extraction. *Int J Mol Sci*, 15(10), 18640-18658. doi:10.3390/ijms151018640
- Rate W. R., Solin L. J., & Turrisi A. T. (1988). Palliative radiotherapy for metastatic malignant melanoma: brain metastases, bone metastases, and spinal cord compression. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 15(4), 859-864.
- Reed J. A., & Shea C. R. (2011). Lentigo maligna: melanoma in situ on chronically sun-damaged skin. *Arch Pathol Lab Med*, 135(7), 838-841. doi:10.1043/2011-0051-RAIR.1
- Rehm J., Gmel G., Sempos C. T., & Trevisan M. (2003). Alcohol-related morbidity and mortality. *Alcohol Res Health*, 27(1), 39-51.
- Rehm J. T., Bondy S. J., Sempos C. T., & Vuong C. V. (1997). Alcohol consumption and coronary heart disease morbidity and mortality. *Am J Epidemiol*, 146(6), 495-501.
- Renaud S., & de Lorgeril M. (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, 339(8808), 1523-1526.
- Robert C., Karaszewska B., Schachter J., Rutkowski P., Mackiewicz A., Stroiakovski D., . . . Schadendorf D. (2015). Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and

- trametinib. *N Engl J Med*, 372(1), 30-39. doi:10.1056/NEJMoa1412690
- Romain C., Gaillet S., Carillon J., Vide J., Ramos J., Izard J. C., . . . Rouanet J. M. (2012). Vineatrol and cardiovascular disease: beneficial effects of a vine-shoot phenolic extract in a hamster atherosclerosis model. *J Agric Food Chem*, 60(44), 11029-11036. doi:10.1021/jf303549t
- Rosendahl C., Hishon M., Cameron A., Barksdale S., Weedon D., & Kittler H. (2014). Nodular melanoma: five consecutive cases in a general practice with polarized and non-polarized dermatoscopy and dermatopathology. *Dermatol Pract Concept*, 4(2), 69-75. doi:10.5826/dpc.0402a15
- Schiborr C., Kocher A., Behnam D., Jandasek J., Toelstede S., & Frank J. (2014). The oral bioavailability of curcumin from micronized powder and liquid micelles is significantly increased in healthy humans and differs between sexes. *Mol Nutr Food Res*, 58(3), 516-527. doi:10.1002/mnfr.201300724
- Schleich T., Rodemeister S., Venturelli S., Sinnberg T., Garbe C., & Busch C. (2013). *Decreased Plasma Ascorbate Levels in Stage IV Melanoma Patients* (Vol. 01).
- Shakibaei M., Harikumar K. B., & Aggarwal B. B. (2009). Resveratrol addiction: to die or not to die. *Mol Nutr Food Res*, 53(1), 115-128. doi:10.1002/mnfr.200800148
- Sharma R. A., Euden S. A., Platton S. L., Cooke D. N., Shafayat A., Hewitt H. R., . . . Steward W. P. (2004). Phase I clinical trial of oral curcumin: biomarkers of systemic activity and compliance. *Clin Cancer Res*, 10(20), 6847-6854. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0744
- Singh S., & Aggarwal B. B. (1995). Activation of transcription factor NF-kappa B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane) [corrected]. *J Biol Chem*, 270(42), 24995-25000.
- Sinnberg T., Noor S., Venturelli S., Berger A., Schuler P., Garbe C., & Busch C. (2014). The ROS-induced cytotoxicity of ascorbate is attenuated by hypoxia and HIF-1alpha in the NCI60 cancer cell lines. *J Cell Mol Med*, 18(3), 530-541. doi:10.1111/jcmm.12207
- Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., . . . Boyd M. R. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst*, 82(13), 1107-1112.

- Sober A. J., Chuang T. Y., Duvic M., Farmer E. R., Grichnik J. M., Halpern A. C., . . . Guidelines/Outcomes C. (2001). Guidelines of care for primary cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol*, 45(4), 579-586. doi:10.1067/mjd.2001.117044
- Soerjomataram I., Oomen D., Lemmens V., Oenema A., Benetou V., Trichopoulou A., . . . de Vries E. (2010). Increased consumption of fruit and vegetables and future cancer incidence in selected European countries. *Eur J Cancer*, 46(14), 2563-2580. doi:10.1016/j.ejca.2010.07.026
- Sofi F., Cesari F., Abbate R., Gensini G. F., & Casini A. (2008). Adherence to Mediterranean diet and health status: meta-analysis. *BMJ*, 337, a1344. doi:10.1136/bmj.a1344
- Soleas G. J., Diamandis E. P., & Goldberg D. M. (1997a). Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clin Biochem*, 30(2), 91-113.
- Soleas G. J., Diamandis E. P., & Goldberg D. M. (1997b). Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. *J Clin Lab Anal*, 11(5), 287-313.
- Sosman J. A., Kim K. B., Schuchter L., Gonzalez R., Pavlick A. C., Weber J. S., . . . Ribas A. (2012). Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *N Engl J Med*, 366(8), 707-714. doi:10.1056/NEJMoa1112302
- Stadler R., Leiter U., & Garbe C. (2019). Lack of survival benefit in sentinel lymph node-positive melanoma with immediate complete lymphadenectomy - a review. *J Dtsch Dermatol Ges*, 17(1), 7-13. doi:10.1111/ddg.13707
- Sterry W., Burgdorf W., & Paus R. (2010). *23.4 Malignes Melanom* (Vol. 6. Auflage). Stuttgart, New York, Delhi, Rio Thieme Verlagsgruppen.
- Sterry W. B., Walter; Paus, Ralf (2010). *Checkliste Dermatologie* (Vol. 6. Auflage). Stuttgart, New York, Delhi, Rio: Georg Thieme Verlag.
- Swanson C. A., Coates R. J., Malone K. E., Gammon M. D., Schoenberg J. B., Brogan D. J., . . . Brinton L. A. (1997). Alcohol consumption and breast cancer risk among women under age 45 years. *Epidemiology*, 8(3), 231-237.
- Thompson J. F., & Shaw H. M. (2007). Sentinel node mapping for melanoma: results of trials and current applications. *Surg Oncol Clin N Am*, 16(1), 35-54. doi:10.1016/j.soc.2006.10.013
- Thompson J. F., Soong S. J., Balch C. M., Gershenwald J. E., Ding S., Coit D. G., . . . Sondak V. K. (2011). Prognostic

- significance of mitotic rate in localized primary cutaneous melanoma: an analysis of patients in the multi-institutional American Joint Committee on Cancer melanoma staging database. *J Clin Oncol*, 29(16), 2199-2205. doi:10.1200/JCO.2010.31.5812
- Tjonneland A., Gronbaek M., Stripp C., & Overvad K. (1999). Wine intake and diet in a random sample of 48763 Danish men and women. *Am J Clin Nutr*, 69(1), 49-54.
- Trela B. C., & Waterhouse A. L. (1996). Resveratrol: Isomeric Molar Absorptivities and Stability. *J Agric Food Chem*, 44(5), 1253-1257. doi:10.1021/jf9504576
- Trichopoulou A., Bamia C., & Trichopoulos D. (2009). Anatomy of health effects of Mediterranean diet: Greek EPIC prospective cohort study. *BMJ*, 338, b2337. doi:10.1136/bmj.b2337
- Ulmer D. D., Vallee B. L., & Wacker W. E. (1956). Metalloenzymes and myocardial infarction. II. Malic and lactic dehydrogenase activities and zinc concentrations in serum. *N Engl J Med*, 255(10), 450-456.
- Unlu A., Nayir E., Dogukan Kalenderoglu M., Kirca O., & Ozdogan M. (2016). Curcumin (Turmeric) and cancer. *J BUON*, 21(5), 1050-1060.
- Venturelli S., Armeanu S., Pathil A., Hsieh C. J., Weiss T. S., Vonthein R., . . . Bitzer M. (2007). Epigenetic combination therapy as a tumor-selective treatment approach for hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 109(10), 2132-2141. doi:10.1002/cncr.22652
- Venturelli S., Berger A., Bocker A., Busch C., Weiland T., Noor S., . . . Bitzer M. (2013). Resveratrol as a pan-HDAC inhibitor alters the acetylation status of histone [corrected] proteins in human-derived hepatoblastoma cells. *PLoS One*, 8(8), e73097. doi:10.1371/journal.pone.0073097
- Venturelli S., Burkard M., Biendl M., Lauer U. M., Frank J., & Busch C. (2016). Prenylated chalcones and flavonoids for the prevention and treatment of cancer. *Nutrition*, 32(11-12), 1171-1178. doi:10.1016/j.nut.2016.03.020
- Venturelli S., Sinnberg T. W., Berger A., Noor S., Levesque M. P., Bocker A., . . . Busch C. (2014). Epigenetic impacts of ascorbate on human metastatic melanoma cells. *Front Oncol*, 4, 227. doi:10.3389/fonc.2014.00227
- Verrax J., & Calderon P. B. (2009). Pharmacologic concentrations of ascorbate are achieved by parenteral administration and

- exhibit antitumoral effects. *Free Radic Biol Med*, 47(1), 32-40. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.02.016
- Vichai V., & Kirtikara K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat. Protocols*, 1(3), 1112-1116.
- von Boetticher A. (2011). Ginkgo biloba extract in the treatment of tinnitus: a systematic review. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 7, 441-447. doi:10.2147/ndt.s22793
- Wadsworth T. L., & Koop D. R. (1999). Effects of the wine polyphenolics quercetin and resveratrol on pro-inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macrophages. *Biochem Pharmacol*, 57(8), 941-949.
- Walle T. (2011). Bioavailability of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci*, 1215, 9-15. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05842.x
- Walle T., Hsieh F., DeLegge M. H., Oatis J. E., Jr., & Walle U. K. (2004). High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos*, 32(12), 1377-1382. doi:10.1124/dmd.104.000885
- Waterhouse A. L. (2002). Wine phenolics. *Ann N Y Acad Sci*, 957, 21-36.
- Weber J., Grob J.-J., Margolin K. A., Ascierto P. A., Sznol M., Ott P. A., . . . Hodi F. S. (2015). A Phase III study (CheckMate 238) of adjuvant immunotherapy with nivolumab (NIVO) versus ipilimumab (IPI) after complete resection of stage IIIb/c or stage IV melanoma (MEL) in patients (pts) at high risk for recurrence. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 3(S2). doi:10.1186/2051-1426-3-s2-p166
- Weiss T. S., Pahernik S., Scheruebl I., Jauch K. W., & Thasler W. E. (2003). Cellular damage to human hepatocytes through repeated application of 5-aminolevulinic acid. *J Hepatol*, 38(4), 476-482.
- Wenzel E., & Somoza V. (2005). Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Mol Nutr Food Res*, 49(5), 472-481. doi:10.1002/mnfr.200500010
- Widmer R. J., Flammer A. J., Lerman L. O., & Lerman A. (2015). The Mediterranean diet, its components, and cardiovascular disease. *Am J Med*, 128(3), 229-238. doi:10.1016/j.amjmed.2014.10.014
- Wiecker T. S., Luther H., Buettner P., Bauer J., & Garbe C. (2003). Moderate sun exposure and nevus counts in parents are associated with development of melanocytic nevi in childhood:

- a risk factor study in 1,812 kindergarten children. *Cancer*, 97(3), 628-638. doi:10.1002/cncr.11114
- Wiesenauer M. (2013). *PhytoPraxis* (Vol. 5. Auflage). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Willett W. C., Sacks F., Trichopoulou A., Drescher G., Ferro-Luzzi A., Helsing E., & Trichopoulos D. (1995). Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *Am J Clin Nutr*, 61(6 Suppl), 1402S-1406S.
- Winkel-Shirley B. (2001). It takes a garden. How work on diverse plant species has contributed to an understanding of flavonoid metabolism. *Plant Physiol*, 127(4), 1399-1404.
- Wurglics M., & Schubert-Zsilavecz M. (2004). Johanniskraut – von Inhaltsstoffen und anderen Unwägbarkeiten.
- Zanoli P., & Zavatti M. (2008). Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *J Ethnopharmacol*, 116(3), 383-396. doi:10.1016/j.jep.2008.01.011
- Zhang Y., Kreger B. E., Dorgan J. F., Splansky G. L., Cupples L. A., & Ellison R. C. (1999). Alcohol consumption and risk of breast cancer: the Framingham Study revisited. *Am J Epidemiol*, 149(2), 93-101.
- Zhou Y., Li Y., Zhou T., Zheng J., Li S., & Li H. B. (2016). Dietary Natural Products for Prevention and Treatment of Liver Cancer. *Nutrients*, 8(3), 156. doi:10.3390/nu8030156
- Zouboulis C. C., Garbe C., Krasagakis K., Kruger S., & Orfanos C. E. (1991). A fluorometric rapid microassay to identify anti-proliferative compounds for human melanoma cells in vitro. *Melanoma Res*, 1(2), 91-95.

10 Erklärung zum Eigenanteil

Die vorliegende Arbeit wurde ab September 2014 im Rahmen des IZKF-Promotionskollegs in der Universitäts-Hautklinik Tübingen, Abteilung für Dermatologische Onkologie in Kooperation mit dem Universitätsklinikum Tübingen, Abteilung für Innere Medizin I sowie der Abteilung für Vegetative und Klinische Physiologie unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Claus Garbe, Herrn PD Dr. Christian Busch und Herrn Dr. Dr. Sascha Venturelli durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. Christian Busch, Herrn Dr. Dr. Sascha Venturelli und Herrn Dr. Markus Burkard.

Die Versuche wurden von mir eigenständig durchgeführt (nach Einarbeitung durch Dr. Markus Burkard und die Labormitarbeiterinnen Frau Dr. med. Susanne Berchtold, Frau Irina Smirnow und Frau Andrea Schenk). Die Durchflusszytometrie wurde zusammen mit Frau Dr. Heike Niessner durchgeführt.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig (nach Anleitung durch Herrn PD Dr. Christian Busch, Herrn Dr. Dr. Sascha Venturelli und Herrn Dr. Markus Burkard) verfasst und keine weiteren, als die von mir angegebenen Quellen, verwendet zu haben.

Tübingen, den

Rahel Traunecker

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all den Menschen bedanken, die mich bei meiner Dissertation unterstützt und auf unterschiedliche Weise zu deren guten Gelingen beigetragen haben.

Herrn Professor Dr. Claus Garbe danke ich für die Überlassung des spannenden Themas, seine Vertretung gegenüber der Medizinischen Fakultät, die gute Betreuung in seiner Abteilung sowie für die Übernahme des Gutachtens.

Herrn PD Dr. Christian Busch und Herrn Dr. Dr. Sascha Venturelli danke ich für die stetige Unterstützung, die Inspiration, die uneingeschränkte Diskussionsbereitschaft, die gewissenhafte Planung der Experimente und die intensive Betreuung sowohl während meiner Zeit im Labor als auch danach.

Herrn Prof. Dr. Ulrich M. Lauer danke ich für die Zustimmung zur Durchführung dieser Arbeit, für die Bereitstellung der Laborausstattung und Räumlichkeiten.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Markus Burkard für seine intensive Betreuung, seine Hilfsbereitschaft in allen Fragen, die gewissenhafte und hervorragende Einarbeitung in die Labortätigkeit und die Korrektur meiner Arbeit. Er hat mich stets mit außerordentlichem Engagement unterstützt und ich konnte sehr viel von ihm lernen.

Ich danke Herrn Christian Leischner für all die guten Ratschläge, die stete Hilfsbereitschaft, die anregenden Diskussionen und dass er jederzeit ein offenes Ohr für mich hatte.

Ich bedanke mich herzlich bei Frau Dr. Susanne Berchthold für ihre Unterstützung, ihre Hilfsbereitschaft und für ihre Anregungen für mein wissenschaftliches Arbeiten.

Ein großes Dankeschön möchte ich auch an Frau Andrea Schenk, Frau Irina Smirnow und Frau Christine Geisler für die schöne und lehrreiche Zeit im Labor, die guten Ratschläge und die Hilfe in allen Fragen aussprechen.

Ich danke Frau Dr. Heike Niessner und Herrn Dr. Tobias Sinnberg herzlich für die gute Zusammenarbeit und die Unterstützung bei den FACS-Versuchen.

Ich bedanke mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Lauer für die nette Arbeitsatmosphäre, die freundliche Aufnahme, die vielen Anregungen und für die stete Unterstützung. Zudem danke ich herzlich den anderen Doktoranden der Arbeitsgruppe für die Denkanstöße und die gute Zusammenarbeit.

Ich danke dem Promotionskolleg, besonders Frau Prof. Dr. Marlies Knipper, Frau Dr. Inka Montero und Frau Pia-Sarah Henger für die anregenden Seminare, die Unterstützung in jeglichen Fragen und für die Möglichkeit Freunde und Kollegen durch das Programm kennenzulernen.

Ich danke der Firma AQUANOVA AG, besonders Herrn Dariush Behnam, für die Industriekooperation und Bereitstellung des Solubilisats NovaSOL® Vineatrol für die Versuche.

Ich bedanke mich bei Herrn Wolfgang Lorsch der Firma Breko GmbH für die Bereitstellung von Infomaterial und seine freundliche Hilfsbereitschaft. Herrn Dr. Michael Empl danke ich für die hilfreiche Diskussion und den regen Austausch.

Meinen Lieben aus dem Sachsenhaus danke ich für die tatkräftige Unterstützung, die anregenden Diskussionen und die schönen Pausen. Herzlichen Dank gilt Andi für seine Hilfe bei der Formatierung dieser Arbeit.

Meiner lieben Freundin Lisa möchte ich für das gegenseitige Begleiten und Motivieren während des gesamten Studiums und des Schreibprozesses unserer Doktorarbeiten danken.

Besonderen Dank gilt meinen Eltern, meinen Großeltern, meinen Geschwistern David, Hanna mit Daniel, Jonas, Naemi, Timon und meinem Partner Ruben. Danke für eure uneingeschränkte, vielseitige Unterstützung, eure Liebe und eure Geduld. Ohne euch hätte ich all das nicht so gut hinbekommen und wäre diese Arbeit so nicht möglich gewesen.