

# **Bioverfügbarkeit, Metabolismus und biologische Aktivität von Isoflavonen und deren Metaboliten**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der  
Universität Karlsruhe (TH)  
vorgelegte

DISSERTATION

von

Diplom-Lebensmittelchemikerin

Corinna Rüfer

aus Karlsruhe

Dekan: Prof. Dr. Manfred M. Kappes  
Referent: Prof. Dr. Sabine E. Kulling  
Korreferent: Prof. Dr. Manfred Metzler  
Tag der mündlichen Prüfung: 14.07.2005



Die vorliegende Arbeit wurde zwischen März 2002 und Juli 2005 am Institut für Ernährungsphysiologie der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel am Standort Karlsruhe angefertigt.



***Für meine Eltern***



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Einteilung der Phytoestrogene	2
1.2 Vorkommen und Bedeutung für die Pflanze	3
1.2.1 Vorkommen der Isoflavone	3
1.2.2 Biosynthese der Isoflavone in der Pflanze	5
1.2.3 Funktion der Isoflavone in der Pflanze	5
1.3 Verbreitung in Lebensmitteln und tägliche Aufnahme	6
1.3.1 Verbreitung in Lebensmitteln	6
1.3.2 Tägliche Isoflavonaufnahme	7
1.4 Kinetik und innere Exposition	8
1.4.1 Biokinetik und Bioverfügbarkeit	8
1.4.2 Aufnahmemechanismen	12
1.4.3 Metabolismus	14
1.4.3.1 Metabolismus durch die Darmbakterien	14
1.4.3.2 Phase-I-Metabolismus	17
1.4.3.3 Phase-II-Metabolismus	19
1.4.4 Verteilung	19
1.5 Interindividuelle Variation	21
1.5.1 Alter	21
1.5.2 Ernährung	22
1.5.3 Art der Sojaquelle	23
1.6 Physiologische Eigenschaften der Isoflavone	27
1.6.1 Hormonabhängige und hormonunabhängige Wirkungen in vitro	27
1.6.2 Antioxidative Eigenschaften in vitro und in vivo	29
1.6.3 Hormonabhängige Krebsarten	31
1.6.4 Herzkreislauferkrankungen	34
1.6.5 Klimakterische Beschwerden und Osteoporose	35
1.6.6 Weitere Wirkungen	36
<b>2 Problemstellung</b>	<b>37</b>
<b>3 Experimenteller Teil</b>	<b>39</b>
3.1 Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	39
3.1.1 Geräte	39
3.1.2 Chemikalien	40
3.1.3 Reagenzien für die Zellkultur	43
3.1.4 Zelllinien	43
3.1.5 Verbrauchsmaterialien	43

3.2	Methoden	45
3.2.1	Zellkultivierung	45
3.2.1.1	V79-Zellen	45
3.2.1.2	Caco-2-Zellen	45
3.2.1.3	Humane mononukleäre Zellen des peripheren Bluts	45
3.2.1.4	Subkultivierung der Zellen	46
3.2.1.5	Kryopräservation von Zellen	46
3.2.1.6	Prüfung auf Mycoplasmen	47
3.2.1.7	Isolierung humaner mononukleärer Zellen des peripheren Bluts	47
3.2.2	Untersuchungen zur zellulären Aufnahme von Isoflavonen	48
3.2.2.1	Aufnahme in V79- und Caco-2-Zellen	49
3.2.2.2	Aufnahme in humane mononukleäre Zellen des peripheren Bluts	50
3.2.2.3	Beteiligung von Transportproteinen	50
3.2.2.4	Prüfung auf Cytotoxizität	50
3.2.2.5	Bestimmung des Gesamt-Glutathion-Gehalts in Caco-2-Zellen	51
3.2.2.6	Proteinbestimmung	52
3.2.2.7	Berechnung der Isoflavonkonzentration in den Zellen	52
3.2.2.8	Analytik	53
3.2.2.8.1	Festphasenextraktion	53
3.2.2.8.2	HPLC-Methoden	53
3.2.3	Humanstudie	55
3.2.3.1	Studiendesign und Probandenkollektiv	55
3.2.3.2	Isolierung der Substanzen Daidzein und Daidzin	57
3.2.3.3	Bestimmung der Isoflavone in Urin, Plasma und mononukleären Zellen des peripheren Bluts	58
3.2.3.3.1	Plasma	58
3.2.3.3.2	Urin	59
3.2.3.3.3	Mononukleäre Zellen des peripheren Bluts	60
3.2.3.3.4	GC/MS-Methode	61
3.2.3.3.5	Bestimmung der biokinetischen Kenn- daten	62
3.2.3.4	Bestimmung des Antioxidantienstatus	62
3.2.3.4.1	Bestimmung des Carotinoid- und $\alpha$ -Tocopherol-Gehalts	62
3.2.3.4.2	Bestimmung des Ascorbinsäure-Gehalts	64
3.2.3.5	Triglycerid-Bestimmung	65
3.2.4	Bestimmung des antioxidativen Potenzials der Isoflavone und ihrer Metabolite	66
3.2.4.1	Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay	66
3.2.4.2	$\text{Cu}^{2+}$ -induzierte Lipidperoxidation	68
3.2.4.2.1	Isolierung und Aufreinigung der LDL	70
3.2.4.2.2	Dien-Methode	71
3.2.4.2.3	Methode zur Bestimmung der Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen	72
3.2.5	Statistische Auswertung	73



<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>74</b>
4.1	Untersuchungen zur zellulären Aufnahme von Isoflavonen	74
4.1.1	Überprüfung der Modellrechnung zur Bestimmung der Konzentration in der Zelle	74
4.1.2	Aufnahme in V79-Zellen	74
4.1.3	Aufnahme in Caco-2-Zellen	78
4.1.4	Aufnahme in humane PBMC	81
4.1.5	Beteiligung der Transportproteine MDR1 und MRP am Transport der Isoflavone aus Caco-2-Zellen	83
4.1.6	Beteiligung der Transportproteine MDR1 und MRP am Transport der Isoflavone aus humanen PBMC	87
4.2	Humanstudie	90
4.2.1	Biokinetik	90
4.2.1.1	Bestimmung von Daidzein im Plasma	90
4.2.1.2	Bestimmung der Metabolite von Daidzein im Plasma	93
4.2.2	Ausscheidung der Isoflavone im Urin	99
4.2.2.1	Bestimmung von Daidzein im Urin	99
4.2.2.2	Bestimmung der Metabolite von Daidzein im Urin	101
4.2.3	Bestimmung der Isoflavone in den PBMC	107
4.2.4	Aufnahmemechanismen	109
4.3	Bestimmung des antioxidativen Potenzials der Isoflavone und ihrer Metabolite	111
4.3.1	ORAC-Test	111
4.3.2	Lipidperoxidation	113
4.3.2.1	Dien-Methode	113
4.3.2.2	Methode zur Bestimmung der TBARS	115
4.3.3	Vergleich der Ergebnisse	117
4.3.4	Antioxidative Wirkung in vivo	118
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>120</b>
5.1	Untersuchungen zur zellulären Aufnahme von Isoflavonen	120
5.1.1	Überprüfung der Modellrechnung zur Bestimmung der Substanzkonzentration in der Zelle	120
5.1.2	Konzentrationsabhängige Aufnahme in V79- und Caco-2-Zellen sowie in humane PBMC	121
5.1.3	Zeit- und temperaturabhängige Aufnahme in V79- und Caco-2-Zellen sowie in humane PBMC	123
5.1.4	Zellulärer Phase-II-Metabolismus der Isoflavone	124
5.1.5	Einfluss der Transportproteine MDR1 und MRP auf den Efflux der Isoflavone	126
5.1.6	Theoretische Überlegungen zur Akkumulation der Isoflavone in den untersuchten Zellarten	130
5.2	Bioverfügbarkeit des Isoflavons Daidzein und seines Glucose-Konjugats Daidzin	132
5.2.1	Bestimmung von Daidzein in Plasma und Urin	132
5.2.2	Bildung der bakteriellen und oxidativen Metabolite von Daidzein	137
5.2.3	Interindividuelle Variation	142
5.2.4	Bestimmung der Konzentration der Isoflavone in den PBMC	143
5.2.5	Zusammenhang zwischen dem Transport der Nahrungsfette und dem der Isoflavone	145

5.3	Antioxidative Eigenschaften der Isoflavone und ihrer Metabolite	147
5.3.1	Verwendete Testmethoden	147
5.3.2	Vergleich des antioxidativen Potenzials der Isoflavone und ihrer Metabolite in vitro	148
5.3.3	Antioxidative Wirkung in vivo	153
5.4	Abschließende Betrachtung	158
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>161</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>163</b>
	<b>Publikationsliste</b>	<b>185</b>
	<b>Eigene Präsentationen</b>	<b>186</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>188</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ABAP	2,2'-Azo-bis-(2-amidinopropan)
ABC	ATP-Binding Cassette
ASC	Ascorbinsäure (Vitamin C)
ANOVA	Varianzanalyse
API-ES	Atmospheric Pressure Ionization Electrospray
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Fläche unter der Blutspiegel-Zeit-Kurve bzw. Fläche unter der Kurve
BCA	Biochanin A
BfEL	Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel
BHT	2,6-Di-tert.-Butylhydroxytoluol
Bidest.	Bidestilliert
BMI	Body Mass Index
BSA	Rinderserumalbumin
BSTFA	<i>N,O</i> -Bis-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
Caco-2	Menschliche Adenokarzinomzellen
$C_{max}$	Maximale Plasmakonzentration
CYP	Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase
DAD	Diodenarray-Detektion
DAI	Daidzein
3,4,8- <sup>13</sup> C-DAI	3,4,8- <sup>13</sup> C-Daidzein
DG	Daidzin (Daidzein-7-O-β-D-Glucosid)
DHD	Dihydrodaidzein
DHG	Dihydrogenistein
D-MEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTC	Lösung aus 2,4-Dinitrophenylhydrazin, Thioharnstoff und Kupfersulfat
DTNB	5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure)
EA	Essigsäureethylester
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ER	Estrogen-Rezeptor
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
FCS	Fötale Kälberserum
FORM	Formononetin

## Abkürzungsverzeichnis

---

FRAP	Ferric Reducing Ability of Plasma bzw. Ferric Reducing/Antioxidant Power
GC	Gaschromatographie
GC/MS	Gekoppelte Gaschromatographie/Massenspektrometrie
GEN	Genistein
GLY	Glycitein
GSH	Glutathion
GSSG	Oxidiertes Glutathion, Glutathiondisulfid
HBSS	Hanks' gepufferte Salzlösung
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HPLC/MS	Gekoppelte Hochleistungsflüssigchromatographie/Massenspektrometrie
KG	Körpergewicht
LDL	Lipoproteine geringer Dichte
MDR1	P-Glycoprotein (Multidrug Resistance Protein 1)
MEM	Minimum Essential Medium
MRP	Multidrug Resistance Associated Protein
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse/Ladungs-Verhältnis
n	Probandenzahl
NADPH	reduziertes $\beta$ -Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NMR	Kernresonanz
OAT	Organischer Anionen-Transporter
OATP	Organic Anion Transporting Polypeptide
2-OCH <sub>3</sub> -7-OH-IF	2-Methoxy-7-hydroxyisoflavon
O-DMA	O-Demethylangolensin
1,2,3- <sup>13</sup> C-ODMA	1,2,3- <sup>13</sup> C-O-Demethylangolensin
3'-OH-DAI	3'-Hydroxydaidzein
6-OH-DAI	6-Hydroxydaidzein
8-OH-DAI	8-Hydroxydaidzein
3'-OH-GEN	3'-Hydroxygenistein
6'-OH-ODMA	6'-Hydroxy-O-demethylangolensin
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Bluts
PE	R-Phytoerythrin
PRU	Prunetin
PUFA	Mehrfach-konjugierte Fettsäure

## Abkürzungsverzeichnis

---

QUER	Quercetin
ROO <sup>•</sup>	Peroxyradikal
SDS	Natriumdodecylsulfat
SGLT	Na <sup>+</sup> -Glucose-Cotransporter
SHBG	Sexhormon-bindendes Globulin
SIM	Selected Ion Monitoring
SPE	Festphasenextraktion
SULT	Sulfotransferase
t <sub>1/2</sub>	Halbwertszeit der Elimination
TBARS	Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
t <sub>max</sub>	Zeitpunkt von C <sub>max</sub>
U	Unit
UGT	UDP-Glucuronyltransferase
V79	Lungenfibroblasten des Chinesischen Hamsters



# 1 Einleitung

Die Aufnahme von Phytoestrogenen, insbesondere von Isoflavonen, wird aufgrund epidemiologischer Studien mit der Prävention bestimmter Erkrankungen in Verbindung gebracht. Dazu zählen beispielsweise hormonabhängige Krebserkrankungen, wie Brust- und Prostatakrebs, Osteoporose oder klimakterische Beschwerden. Diese Befunde haben dazu geführt, dass Sojaprodukte als Nahrungsergänzungsmittel sowie als „diätetische Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke“ in Apotheken, Reformhäusern und zum Teil auch in Supermärkten frei erhältlich sind. Zielgruppe sind hauptsächlich Frauen im Klimakterium, die eine Alternative zur Hormonersatztherapie suchen. Die Werbung auf den Verpackungen stellt Isoflavone als wirkungsvolle sowie nebenwirkungsfreie Naturstoffe gegen klimakterische Beschwerden und gesundheitlich vorteilhaft für Herz, Knochen und Brust dar. Es gibt jedoch bisher weder Belege für die positiven Effekte, noch sind mögliche gesundheitlich nachteilige Wirkungen ausreichend untersucht. Vereinzelt wird auch mit der Behandlung und Prophylaxe von Krebserkrankungen wie Brustkrebs bei Frauen und Prostatakrebs beim Mann geworben. Der Öffentlichkeit wenig bekannt sind potenziell negative Effekte, die beispielsweise die Schilddrüse sowie bereits bestehende präkanzerogene Veränderungen bei hormonabhängigen Krebsarten betreffen.

Neben Sojaprodukten werden immer häufiger Nahrungsergänzungsmittel auf Rotklee- oder Kudzu-Basis auf den Markt gebracht. Dies geschieht jedoch ungeachtet der Tatsache, dass weder die Bioverfügbarkeit und der Metabolismus noch die physiologischen Wirkungen der Isoflavone und ihrer Metabolite abschließend geklärt wurden.

Im folgenden Kapitel wird ein Überblick über die vorhandenen Daten zum Vorkommen, zur täglichen Aufnahme, zur Bioverfügbarkeit und zum Metabolismus sowie zur biologischen Aktivität der Isoflavone gegeben.

## 1.1 Einteilung der Phytoestrogene

Phytoestrogene gehören zu der Gruppe der sekundären Pflanzenstoffe, zu denen eine Fülle strukturell sehr unterschiedlicher Verbindungen zählen. Sekundäre Pflanzenstoffe kommen in der Pflanze nur in geringen Mengen vor [1]. Aus chemischer Sicht handelt es sich bei Phytoestrogenen um Polyphenole. Sie sind im Wesentlichen drei Strukturklassen zugeordnet: den Isoflavonen, den Lignanen und den Coumestanen (siehe Abb. 1.1). Phytoestrogene besitzen eine nicht-steroidale Struktur, die der der menschlichen Estrogene (z.B. 17 $\beta$ -Estradiol) ähnelt (siehe Abb. 1.1). Eine gemeinsame biologische Eigenschaft ist ihre estrogene Aktivität, die auch zur ihrer Namensgebung geführt hat. Phytoestrogene wurden durch die „British Working Group on Phytoestrogens“ des „Committee of Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment“ der Food Standard Agency als in Pflanzen vorkommende Verbindungen oder Metabolite definiert, die biologische Effekte in Wirbeltieren hervorrufen und die Wirkungen von endogenen Estrogenen durch Bindung an die Estrogen-Rezeptoren (ER) nachahmen oder modulieren können [2].

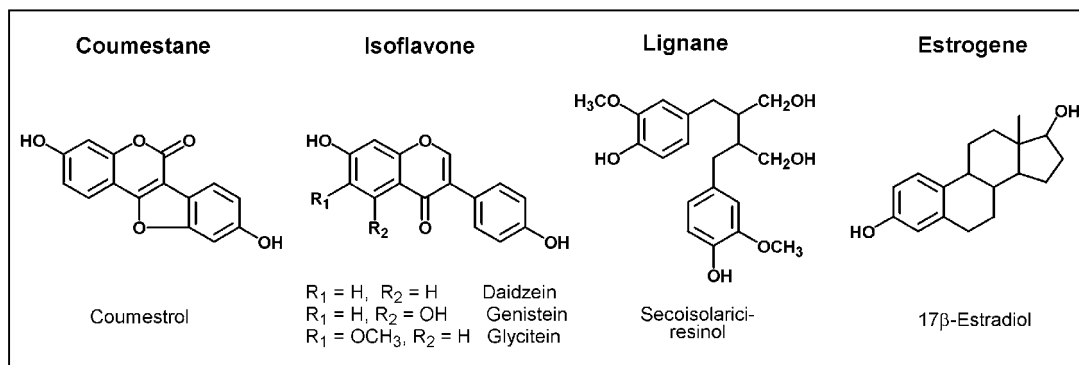


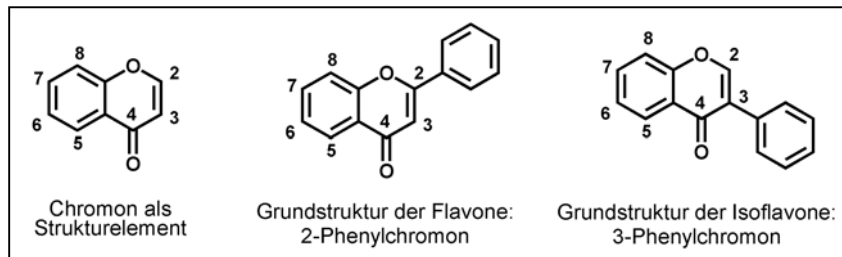
Abb. 1.1: Strukturklassen der Phytoestrogene.



## 1.2 Vorkommen und Bedeutung für die Pflanze

### 1.2.1 Vorkommen der Isoflavone

Isoflavone unterscheiden sich als 3-Phenylchromonderivate von den in der Pflanzenwelt weit verbreiteten Flavonoiden nur durch die Position der Verknüpfung von Chromon- und Phenylring (siehe Abb. 1.2).

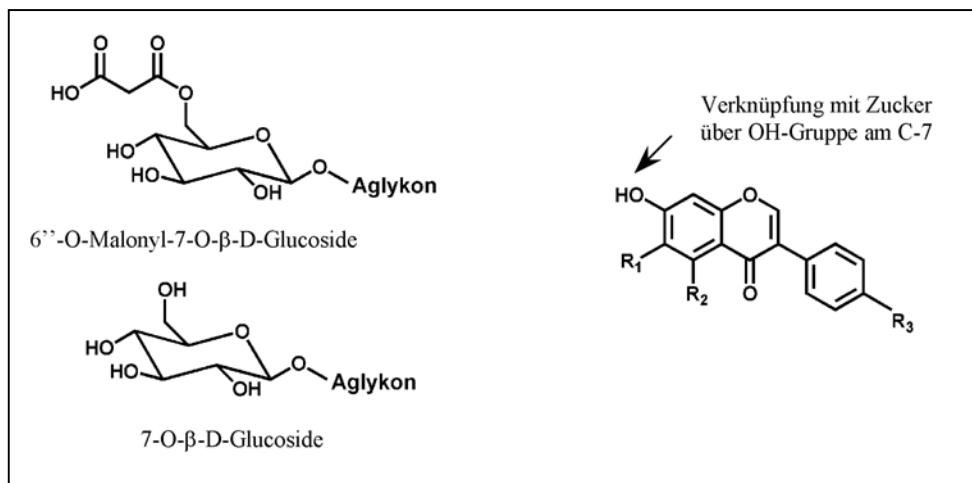


**Abb. 1.2:** Chromon als Strukturelement der Flavone und Isoflavone.

Isoflavone kommen bei den Schmetterlingsblütlern (Leguminosae) vor allem in der Familie der Fabaceae vor [3]. Wichtigstes Nahrungsmittel für die Aufnahme dieser Verbindungen ist die Sojabohne, die die drei Isoflavone Daidzein (DAI), Genistein (GEN), und Glycitein (GLY) etwa im Verhältnis 8 : 10 : 1 enthält (siehe Abb. 1.1). Gentechnisch veränderte Sojabohnen, beispielsweise Roundup Ready<sup>®</sup>, unterscheiden sich hinsichtlich des Isoflavongehalts nicht von herkömmlichen Sorten [4].

Zwei weitere Isoflavone, die vereinzelt in Lebens- und Futtermitteln auftreten, sind Formononetin (FORM) und Biochanin A (BCA). Bei diesen Verbindungen handelt es sich um die 4'-O-Methyl-derivate von DAI und GEN, die man besonders in Klee- und Alfalfasprossen findet.

Isoflavone liegen in der Pflanze meist als Zuckerkonjugate vor. In der Sojabohne dominieren die 6''-O-Malonyl-7-O- $\beta$ -D-Glucoside und die 7-O- $\beta$ -D-Glucoside, während der Anteil der Aglykone relativ niedrig ist (siehe Abb. 1.3). In nativen Sojaprodukten, wie Sojamilch und Tofu, findet sich ein ähnliches Isoflavonmuster wie in der Sojabohne selbst. In wärmebehandelten Produkten, z.B. gerösteten Sojabohnen, ist der Anteil an den 6''-O-Acetyl-7-O- $\beta$ -D-Glucosiden erhöht, da diese aus den hitzelabilen Malonylglucosiden durch Decarboxylierung entstehen [5,6]. Demgegenüber überwiegen in fermentierten Sojaprodukten, wie Miso oder Sojasauce, die Aglykone, weil der Zuckerrest durch die für die Fermentation eingesetzten Mikroorganismen enzymatisch abgespalten wird (siehe Tab. 1.1) [7,8]. Ferner werden in fermentierten Produkten hydroxylierte Verbindungen von DAI und GEN nachgewiesen, zum Beispiel 8-Hydroxygenistein sowie 6- und 8-Hydroxydaidzein (6- und 8-OH-DAI). Deren Bildung wird auf mikrobielle Cytochrom-P450-Enzyme zurückgeführt [9,10].



**Abb. 1.3:** Wichtige Zuckerkonjugate der Isoflavone ( $R_1$ ,  $R_2$  und  $R_3$  = H bzw. OH).

**Tab. 1.1:** Prozentualer Anteil der Isoflavon-Aglykone und -Konjugate von GEN, DAI und GLY in ausgewählten Sojaprodukten (nach Ref. [6] und [11]).

Produkt	% Aglykon	% Glucosid	% Malonylglucosid	% Acetylglucosid
Sojabohne	2,7	57,5	39,4	0,4
Sojamehl	2,2	29,6	66,6	1,6
Geröstete Sojabohnen	6,0	40,5	6,8	46,7
Tofu	20,7	22,0	50,2	7,1
Sojamilch	1,2	31,5	42,5	24,7
Miso	36,5	54,6	5,6	3,1

In der Sojabohne liegen die Isoflavone unterschiedlich verteilt vor: Im Hypokotyl findet man eine fünf- bis sechsfach höhere Konzentration als im Keimblatt. DAI, GLY und ihre Glucoside sind im Hypokotyl angereichert, GEN und seine Derivate liegen dagegen in der Bohne gleichmäßig verteilt vor. Die Samenschale enthält nur geringe Mengen an Isoflavonen [12,13,14].

Obwohl Isoflavone fast ausschließlich in der Sojabohne in nennenswert hohen Konzentrationen auftreten, sind diese Verbindungen inzwischen auf Grund der breiten Verwendung von Sojamehl, -proteinen und -lecithin in einer großen Zahl von Lebensmitteln nachweisbar. Besonders Sojaprotein findet wegen seiner günstigen funktionellen Eigenschaften bei Be- und Verarbeitungsprozessen von Lebensmitteln, beispielsweise zur Stabilisierung von Emulsionen oder zur Erhöhung des Wasserbindungsvermögens und der daraus resultierenden Qualitätssteigerung des Endprodukts, Anwendung. So kommen Isoflavone nicht nur in den traditionellen asiatischen Sojaprodukten, wie Tofu oder Miso, vor, sondern auch in zahlreichen verarbeiteten Produkten, zum Beispiel Backwaren, Soßen, Suppen, Sportlernahrung oder Speiseeis. Nach Angaben der „American Soybean Association“ sind Sojaprodukte mittlerweile in ungefähr 30000 Lebensmitteln enthalten. Für Tierfutter werden Samen, Grünmasse und Sojapresskuchen verwendet. Darüber hinaus bildet die Sojabohne

auch Grundlage für viele industrielle Erzeugnisse, z.B. Lacke, Farben oder Klebstoffe [5,15,16].

### **1.2.2 Biosynthese der Isoflavone in der Pflanze**

Die Biosynthese der Isoflavone erfolgt in Pflanzen über den Shikimatweg. Aus Shikimat, welches nach Kondensation von Erythrose-4-phosphat mit Phosphoenolpyruvat und darauffolgender Zyklisierung entsteht, wird zunächst Chorismat und anschließend Phenylalanin gebildet. Die folgende Desaminierung durch das Enzym Phenyl-Ammonium-Lyase führt zur Zimtsäure, die der Grundkörper der einfachen Phenylpropane ist. Phenylpropane sind der Ausgangspunkt der Biosynthese von Ligninbausteinen, Zimtsäurederivaten und den Flavonoiden. Im letzteren Fall reagiert Cumaryl-Coenzym A, ein hydroxyliertes Zimtsäurederivat, mit drei Molekülen Malonyl-Coenzym A zu Chalkonen, die mittels der Chalkon-Flavanon-Isomerase in die Flavanone überführt werden. Anschließend erfolgt eine Isomerisierung durch die Isoflavon-Synthase zu den Isoflavonen [17,18,19]. Isoflavone sind in höheren Pflanzen weit weniger verbreitet als die Flavonoide. Dies ist darauf zurückzuführen, dass vielen Pflanzen die Isoflavon-Synthase fehlt [7].

### **1.2.3 Funktion der Isoflavone in der Pflanze**

Isoflavone werden in allen Teilen der Pflanze gebildet und sind an dem pflanzlichen Abwehrsystem, der Signaltransduktion und Zell-Zell-Kommunikation beteiligt. So lösen Isoflavone u.a. in den Wurzeln der Sojapflanze eine Symbiose mit Stickstoff-fixierenden Bakterien, den Knöllchenbakterien (*Rhizobien*), aus, die zur Stickstoff-Fixierung führt. Dabei wird zunächst der Stickstoff der Luft gebunden und anschließend zu löslichen, für die Pflanzen verwertbaren Ammoniumverbindungen reduziert [20,21]. Darüber hinaus dienen Isoflavone den Pflanzen als induzierbare Abwehrtoxine, so genannte Phytoalexine. Hierbei handelt es sich um niedermolekulare Verbindungen, die von der Pflanze synthetisiert und akkumuliert werden, wenn diese mit Mikroorganismen (Viren, Bakterien, Pilzen) oder Stress-auslösenden Umweltfaktoren (Chemikalien, UV-Licht, mechanischen Schäden) konfrontiert wird. Ihre Schutzwirkung entfalten sie durch antivirale, bakterizide und fungizide Effekte [22].

### 1.3 Verbreitung in Lebensmitteln und tägliche Aufnahme

#### 1.3.1 Verbreitung in Lebensmitteln

Die Sojabohne liefert den größten Beitrag an Isoflavonen für die Ernährung des Menschen. Darüber hinaus sind Lebensmittel, die aus Sojabohnen hergestellt werden, beispielsweise Miso oder Tempeh, ebenfalls von Bedeutung. Sojaöl hingegen enthält nur Spuren an Isoflavonen, da die hydrophilen Isoflavon-Glucoside sich nicht im lipophilen Öl anreichern [4,6,15,23,24,25]. Die Konzentrationen der Isoflavone in den Produkten können jedoch beträchtlich schwanken, da der Isoflavongehalt von der Sorte, der geographischen Lage der Anbauggebiete, dem Erntezeitpunkt und sonstigen Umwelteinflüssen abhängig ist. Jeder Faktor führt zu einer Variation der Isoflavonkonzentration um das Zwei- bis Dreifache [23,26]. In Obst, Gemüse und Nüssen sind nur geringe Mengen an Isoflavonen enthalten [27,28]. Tab. 1.2 gibt einen Überblick.

**Tab. 1.2:** Isoflavongehalte in Lebensmitteln (mg/kg Nassgewicht) [4,15,24,25,27,28, 29].

Lebensmittel	Genistein	Daidzein	Glycitein
Sojabohne	648 - 954	240 - 600	79 - 107
Sojamilch [mg/L]	52 - 168	26 - 126	1 - 16
Tofu	80 - 112	63 - 106	23 - 29
Miso	62 - 398	47 - 363	12 - 53
Sojaöl	0 - 3	0 - 0,8	k. A.
Sojasauce [mg/L]	1 - 3	5 - 9	1 - 2
Sojamehl	1013 - 1453	412 - 1092	149 - 212
Sojaproteinisolat	635 - 1106	200 - 540	154 - 221
Tempeh	294 - 422	176 - 405	21 - 38
Natto	215 - 425	160 - 315	69 - 130
Sojakäse (Cheddar)	9 - 83	0 - 62	20 - 52
Sojanudeln	37 - 56	9 - 15	19 - 39
Säuglingsnahrung	73 - 388	27 - 352	33 - 88
Obst, Gemüse, Nüsse	0 - 0,2		

k. A. = keine Angaben

FORM und BCA spielen bei der menschlichen Ernährung nur eine untergeordnete Rolle. FORM findet man hauptsächlich in Klee- und Alfalfasprossen (bis 0,4 mg/kg), BCA in Garbanzobohnen (0,14 mg/kg), Kleesprossen (75 µg/kg) und Alfalfasprossen (7 µg/kg) [24].

### 1.3.2 Tägliche Isoflavonaufnahme

Die tägliche Aufnahme an Isoflavonen ist abhängig von der Art und Zusammensetzung der konsumierten Lebensmittel. Soja spielt seit Jahrhunderten eine große Rolle in der Ernährung der Asiaten, und zwar sowohl als Lebensmittel als auch als Heilmittel [30]. Die tägliche Aufnahme an Isoflavonen in der asiatischen Bevölkerung wird auf 30 bis 50 mg pro Tag geschätzt, so dass Plasma-Gesamt-Isoflavonkonzentrationen (Summe aus DAI, GEN und Equol) von durchschnittlich 870 nM erreicht werden [31,32,33,34]. Die Isoflavonaufnahme in der Bevölkerung der westlichen Industrienationen ist dagegen deutlich niedriger: Das VENUS (Vegetal Estrogens in Nutrition and Skeleton) - Projekt ermittelte eine mittlere Aufnahme von 726 µg Isoflavonen pro Tag in Irland, 554 µg/d in Italien, 913 µg/d in den Niederlanden und 718 µg/d in Großbritannien [35]. Daten aus der Framingham-Studie ergaben eine mittlere Aufnahme von 154 µg Isoflavone pro Tag in der amerikanischen Bevölkerung [36]. Clarke et al. und Ritchie et al. stellten bei Briten eine tägliche Aufnahme an Isoflavonen von etwa 3 mg fest [37,38]. In den beiden zuletzt genannten Studien wurden viele verarbeitete Produkte miteinbezogen, beispielsweise Fleisch- und Fischprodukte, Backwaren sowie Zerealien. Bei vegetarischer oder veganer Ernährung kann die Aufnahme an Isoflavonen bis zu 75 mg betragen [39,40]. Die Einnahme von Nahrungsergänzungsmitteln auf Soja-Basis, die bei Frauen in der Postmenopause zur Linderung von Wechseljahrsbeschwerden eingesetzt werden, lässt diese Werte ebenfalls deutlich ansteigen. Einige Studien konnten zwar zeigen, dass der auf der Packung angegebene Gehalt in der Regel höher ist als der tatsächlich enthaltene [41,42,43], dennoch kann die tägliche Aufnahme an Phytoestrogenen bei Einnahme dieser Präparate auf Soja-Basis bis zu 100 mg betragen. Eine herkömmliche westliche Ernährungsweise führt zu Plasmakonzentrationen von durchschnittlich ungefähr 10 nM [44,45]. Säuglinge, die mit Anfangs- oder Folgenahrung auf Sojaproteinbasis ernährt werden, nehmen täglich etwa 22 bis 45 mg Isoflavone auf, was 6 bis 11 mg/kg Körpergewicht entspricht und zu Plasmakonzentrationen der Isoflavone von bis zu 4 µM führt. Dies ist in etwa die zehnfache Dosis, die bei Frauen in der Prämenopause zu einer Verlängerung des Menstruationszyklus und der folliculären Phase führt bzw. die bei Frauen zur Linderung von Wechseljahrsbeschwerden eingesetzt wird [46]. Die Plasma-Isoflavonkonzentrationen bei den mit Sojaprodukten ernährten Säuglingen liegt somit um den Faktor 10000 höher als die Plasmaspiegel des endogenen Steroidhormons 17β-Estradiol (< 290 pM). Säuglinge, die mit Muttermilch gestillt werden, erhalten dagegen weniger als 0,01 mg Isoflavone pro Tag (Plasmakonzentration etwa 20 nM) [47]. Bei traditionell asiatischer Ernährungsweise liegt der Isoflavongehalt der Muttermilch weniger als zehnfach höher, die Dosis für das Baby ist somit im Vergleich zur Aufnahme Soja-haltiger Säuglingsnahrung sehr niedrig [47].

## 1.4 Kinetik und innere Exposition

Bisher konnten Resorption, Verteilung, Metabolismus und Exkretion von Isoflavonen noch nicht abschließend geklärt werden. Die meisten Informationen liegen zu DAI und GEN vor, nur sehr wenige Daten gibt es zu GLY.

### 1.4.1 Biokinetik und Bioverfügbarkeit<sup>1</sup>

In einer großen Zahl an Studien wurden die Biokinetik und Bioverfügbarkeit von Isoflavonen sowohl am Menschen als auch am Tier untersucht. Viele der bekannten Tierexperimente sind auf Grund der verwendeten pharmakologischen Dosen schwierig zu interpretieren. Tab. 1.3 gibt einen Überblick über die Ergebnisse aus Humanstudien zur Aufnahme von Isoflavonen nach Gabe einer Einmaldosis eines Soja-haltigen Lebensmittels, eines Extrakts oder einer Reinsubstanz.

Einige Humanstudien geben Hinweise darauf, dass Isoflavone sehr schnell resorbiert werden. Rowland und Mitarbeiter konnten 15 min nach einmaliger Gabe von Sojaprotein bereits einen Anstieg an Isoflavonen im Plasma nachweisen [48]. Maximale Konzentrationen werden nach sechs bis neun Stunden erreicht (siehe Tab. 1.3). Einige Autoren berichten über einen nicht-linearen Anstieg der Plasma-Maximalkonzentrationen und der Flächen unter den Blutspiegel-Zeit-Kurven (AUC) nach Verabreichung einer Einmaldosis [49,50,51,52], woraus geschlossen werden kann, dass die Resorption der limitierende Faktor ist und einer Sättigung unterliegt. Andere Studien zeigen hingegen eine lineare Zunahme bei Gabe steigender Dosen [53,54,55]. Die Plasmakurven weisen in den meisten Studien einen biphasischen Verlauf auf, wobei im zweiten Peak die Maximalkonzentration detektiert wird [41,51,52,56,57,58,59]. Diese Erscheinung ist typisch für Substanzen, die einem enterohepatischen Kreislauf unterliegen (siehe unten). Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass zunächst eine geringe Resorption im Magen-Duodenum-Jejunum-Bereich und anschließend eine vermehrte im Colon erfolgt. Bei Verabreichung äquimolarer Mengen an DAI und GEN erreicht GEN höhere Plasmakonzentrationen und zeigt eine höhere oder ähnliche Bioverfügbarkeit (ermittelt über die AUC-Werte), da DAI in größerem Umfang einer Umverteilung in die peripheren Gewebe unterliegt, weniger durch Darmbakterien abgebaut wird sowie eine höhere Clearance-Rate besitzt. GLY zeigt die niedrigste Bioverfüg-

---

<sup>1</sup> Der Begriff der Bioverfügbarkeit entstammt der Arzneimittellehre und beschreibt den Anteil der Substanz, der unverändert im systemischen Kreislauf zur Verfügung steht. In der Pharmakologie ist sie ein Maß dafür, wie schnell und in welchem Umfang ein Arzneimittel resorbiert wird und an seinem Wirkort zur Verfügung steht. In der modernen Ernährungsphysiologie wird der Begriff Bioverfügbarkeit benutzt, um das Ausmaß und die Geschwindigkeit, mit der Lebensmittelinhaltsstoffe nach physiologischer Aufnahme über den Gastrointestinaltrakt an ihren Wirkort gelangen, zu beschreiben. In der vorliegenden Arbeit wird der Begriff Bioverfügbarkeit im Sinne der zuletzt genannten Definition verwendet. Für die kinetischen Untersuchungen wird im Gegensatz zur Arzneimittellehre nicht der Begriff Pharmakokinetik sondern Biokinetik verwendet.

barkeit der drei Isoflavone, was jedoch wegen der wenigen vorhandenen Daten noch nicht abschließend geklärt ist [41,52,57,58]. Die Plasmaspiegel fallen nach Erreichen des Maximalwerts nach einer Kinetik erster Ordnung ab. Dabei werden Halbwertszeiten für die Elimination zwischen fünf und neun Stunden ermittelt (siehe Tab. 1.3). 48 Stunden nach einmaliger Isoflavonaufnahme sind die Plasmaspiegel wieder auf das Ausgangsniveau abgesunken [41,59].

Die weitaus größte Menge der Isoflavone wird renal, nur eine geringe Menge biliär ausgeschieden. Für DAI liegt die Wiederfindung im Urin zwischen 20 und 50 %, für GEN zwischen 5 und 20 % und für GLY zwischen 30 und 55 %. Die Wiederfindung im Faezes beim Menschen liegt unter 5 % (siehe Tab. 1.3). Bei Ratten werden hingegen bis zu 20 % gefunden [60]. Dies ist nicht unerwartet, da bei Ratten Substanzen ab einem Molekulargewicht von ungefähr 300 g/mol, bei Menschen erst ab 475 g/mol vorwiegend über die Galle ausgeschieden werden [61]. Das Molekulargewicht der drei Isoflavon-Aglykone liegt zwischen 254 und 284 g/mol, das ihrer Phase-II-Konjugate (siehe Kap. 1.4.3.3) zwischen 334 und 460 g/mol. Im Falle der zweifachen Konjugation mit Glucuronsäure kann es auf bis zu 636 g/mol ansteigen.

Gelangen Isoflavone mit der Gallenflüssigkeit in den Darm, können die Konjugate (siehe Kap. 1.4.3.3) durch Enzyme der Darmflora gespalten und die Aglykone erneut resorbiert werden. Somit unterliegen die Isoflavone - ähnlich den körpereigenen Steroidhormonen - einem enterohepatischen Kreislauf [62,63].

**Tab. 1.3:** Übersicht über Humanstudien, die die Biokinetik von Isoflavonen nach einer Einmalgabe als Lebensmittel, Extrakt oder Reinstanz untersuchen (angegeben sind jeweils die Mittelwerte).

Probanden	Soja- erzeugnis	Dosis	Sammel- periode	t <sub>1/2</sub> (h)	Biokinetische Kenndaten			Wiederfindung (%)		Refe- renz
					C <sub>max</sub> (µM)	t <sub>max</sub> (h)	AUC (µM/h)	Urin	Faezes	
n = 12 prä	Sojamilch- pulver	0,7 mg/kg KG  1,3 mg/kg KG  2,0 mg/kg KG (DAI : GEN = 1,3 : 1,0)	Plasma: 0, 6,5, 24h Urin: 0, 0-24h Faezes: 0- GTT		DAI: 0,79 GEN: 0,74  DAI: 1,22 GEN: 1,07  DAI: 2,24 GEN: 2,15			DAI: 19,6 GEN: 5,3  DAI: 23,7 GEN: 11,0  DAI: 20,8 GEN: 10,0	ges.: 0,8  ges.: 1,0  ges.: 2,8	51
n = 6 ♂	Sojamehl	0,67 mg/kg DAI 0,97 mg/kg GEN	Plasma und Urin: 0-35h	DAI: 4,71 GEN: 5,74	DAI: 3,14 GEN: 4,09	DAI: 7,4 GEN: 8,0		DAI: 6,0 GEN: 22,0		56
n = 7 prä n = 7 ♂	Sojamilch          Sojakeim- linge	1,1 mg/kg KG (DAI : GEN : GLY = 0,9 : 1,0 : 0,2)  1,1 mg/kg KG (DAI : GEN : GLY = 3,3 : 1,0 : 3,1)	Plasma: 0, 6,5, 24h Urin: 0-48h		♀ DAI: 1,04 ♀ GEN: 1,70 ♀ GLY: 0,20  ♂ DAI: 1,29 ♂ GEN: 1,78 ♂ GLY: 0,22  ♀ DAI: 1,63 ♀ GEN: 0,51 ♀ GLY: 0,73  ♂ DAI: 1,16 ♂ GEN: 0,47 ♂ GLY: 0,85			DAI: 48,6 GEN: 27,6 GLY: 55,3       DAI: 43,8 GEN: 29,7 GLY: 54,5		57
n = 6 post	Sojakeim- lingextrakt	1 mg/kg KG Glucoside: (DAI : GEN : GLY = 0,5 : 0,1 : 0,4 )  Aglykone: (DAI : GEN : GLY = 0,4 : 0,1 : 0,5)	Plasma und Urin: 0-34h	DAI: 6,8 GEN: 17,8 GLY: 4,6  DAI: 6,7 GEN: 16,6 GLY: 9,6	DAI: 3,5 GEN: 0,8 GLY: 1,0  DAI: 3,3 GEN: 0,8 GLY: 1,0	DAI: 9,2 GEN: 7,3 GLY: 8,2  DAI: 8,3 GEN: 8,2 GLY: 7,2	DAI: 80 GEN: 21 Gly: 11  DAI: 44 GEN: 20 Gly: 11	DAI: 56 GEN: 20 GLY: 38  DAI: 50 GEN: 18 GLY: 29		58



## Einleitung

n = 7 ♂	Kinako (Sojabohnenpulver gebacken)	26,1 mg DAI 30,2 mg GEN	Plasma: 0-72h Urin: 0-24 h Faezes: 0-3d		DAI: 1,56 GEN: 2,48	DAI: 8 GEN: 8		DAI: 35,8 GEN: 17,6	DAI: 4,4 GEN: 2,5	59
n = 6 prä n = 4 prä n = 6 prä n = 3 prä n = 1 ♂ n = 1 ♂	DAI DAI-Glucosid GEN GEN-Glucosid Rotklee GLY-Glucosid	50 mg 50 mg 50 mg 50 mg 40 mg 25 mg	Plasma: 0-48h	DAI: 9,3 DAI: 4,6 GEN: 6,8 GEN: 7,0 GLY: 8,9	DAI: 0,76 DAI: 1,55 GEN: 1,26 GEN: 1,26 DAI: 0,06 GEN: 0,13 GLY: 0,72	DAI: 6,6 DAI: 9,0 GEN: 9,3 GEN: 9,3 DAI: 12,0 GEN: 2,0 GLY: 4,0	DAI: 11,6 DAI: 17,7 GEN: 16,7 GEN: 18,3 GLY: 2,5			41
n = 8 prä n = 8 prä	[ <sup>13</sup> C] DAI [ <sup>13</sup> C] GEN	0,4 mg/kg KG 0,8 mg/kg KG 0,4 mg/kg KG 0,8 mg/kg KG	Plasma und Urin: 0-72h	DAI: 8,2 DAI: 7,2 GEN: 7,5 GEN: 7,4	DAI: 0,31 DAI: 0,71 GEN: 0,55 GEN: 0,88		DAI: 5,02 DAI: 8,70 GEN: 6,01 GEN: 9,77	DAI: 29,5 DAI: 25,6 GEN: 8,9 GEN: 8,3		52
n = 12 post	Sojaextrakt Getränk aus Sojamehl	7,8 mg DAI 22,6 mg GEN 9,3 mg DAI 10,5 mg GEN	Plasma: 0-32h		DAI: 0,38 GEN: 0,97 DAI: 0,37 GEN: 0,43	DAI: 6,3 GEN: 7,0 DAI: 5,9 GEN: 5,8	DAI: 4,8 GEN: 12,1 DAI: 4,5 GEN: 5,3			64

Abkürzungen: ♂, männlich; ♀, weiblich; C<sub>max</sub>, maximale Plasmakonzentration; GTT, Zeit der Darmpassage (bestimmt als Zeit, die nötig ist, um 1g Karminrot auszuscheiden); KG, Körpergewicht; n, Probandenzahl; post, Frauen nach der Menopause; prä, Frauen vor der Menopause; t<sub>max</sub>, Zeitpunkt von C<sub>max</sub>; t<sub>1/2</sub>, Halbwertszeit der Elimination.

#### 1.4.2 Aufnahmemechanismen

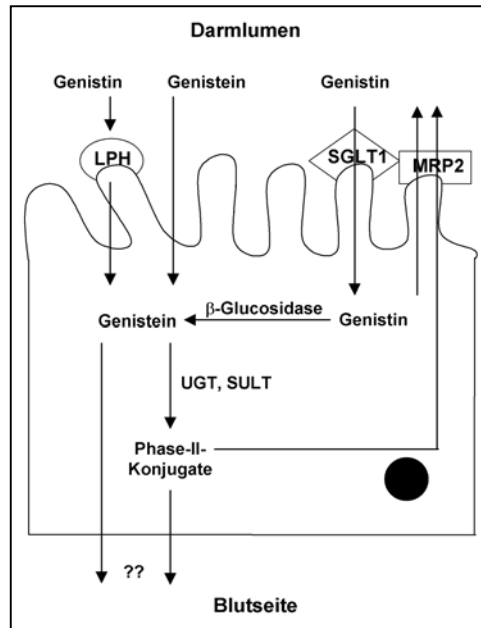
Wie bereits in Kap. 1.2 vorgestellt wurde, liegen Isoflavone in nicht-fermentierten Sojaerzeugnissen v.a. in glycosidisch gebundener Form vor, während in fermentierten Produkten vermehrt die Aglykone zu finden sind. Bei Flavonoiden, beispielsweise Quercetin (QUER), gibt es Hinweise, dass die Glucoside mittels des spezifischen Na<sup>+</sup>-Glucose-Cotransporters SGLT1 aktiv aufgenommen werden können [65,66,67]. Sowohl Glucoside von QUER als auch die Anthocyane konnten im humanen Plasma detektiert werden [68,69]. Isoflavone wurden bei diesen Untersuchungen in der Regel nicht miteinbezogen. Nur Walle & Walle konnten zeigen, dass von SGLT1-überexprimierten CHO-Zellen (Zellen des Eierstocks des Chinesischen Hamsters) etwa doppelt so viel GEN-Glucosid als von den Kontrollzellen aufgenommen wurde [70]. Die Mehrzahl der Ergebnisse deuten allerdings daraufhin, dass eine durch SGLT1-vermittelte Aufnahme der Isoflavone nicht der Fall zu sein scheint. Im in vitro-Zellkulturmodell an menschlichen Adenokarzinomzellen des Dickdarms (Caco-2) konnte gezeigt werden, dass die Glucoside von GEN und DAI nicht die Darmzelle penetrierten, während die Aglykone gut aufgenommen wurden und sogar in der Zelle akkumulierten [71,72]. Auch im Tiermodell am isolierten Rattendünndarm wurde nachgewiesen, dass nur 1,3 % der eingesetzten Dosis an GEN-Glucosid die Darmwand passieren konnte [73]. Darüber hinaus wurden nach Gabe einer Einmaldosis von GEN- bzw. DAI-Glucosid keine Isoflavon-Glucoside im humanen Plasma detektiert [74]. Man geht deswegen davon aus, dass Isoflavone in Form ihrer Aglykone aufgrund ihrer Lipophilie und ihres geringen Molekulargewichts durch passive Diffusion im Darm resorbiert werden, wobei die Resorption hauptsächlich sowohl im Dün- als auch im Dickdarm stattfindet.

Die Hydrolyse der Isoflavon-Glucoside erfolgt entweder im Dickdarm durch bakterielle  $\beta$ -Glucosidasen bzw.  $\beta$ -Glucuronidasen (z.B. von *Lactobazillus*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides* oder *Fusobacterium*) oder durch intestinale cytosolische bzw. Membran-gebundene  $\beta$ -Glucosidasen, beispielsweise durch die Lactase-Phlorizin-Hydrolase [75,76,77,78,79]. Für die Beteiligung zuletzt genannter Enzyme spricht die sehr schnelle Resorption und die Tatsache, dass keimfrei gehaltene Ratten (die keine Darmflora besitzen) nach Gabe von Isoflavon-Glucosiden in Form von Sojaprotein große Mengen an GEN und DAI mit dem Urin ausscheiden [48]. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass eine Hydrolyse der Glucoside im Speichel möglich ist: In einem ex vivo-Modell konnte gezeigt werden, dass 70 % der eingesetzten Dosis an GEN-Glucosid nach 90 min durch humane Speichelproben zu GEN hydrolysiert wurde [80]. Eine saure Hydrolyse der Isoflavon-Glucoside im Magen konnte in vitro und im Tierversuch ausgeschlossen werden [81,82].

Außerdem muss neben einem aktiven Transport in die Zelle die Beteiligung aktiver Transportprozesse aus der Zelle, beispielsweise durch P-Glycoprotein (MDR1) oder durch

die Multidrug Resistance Associated Proteine (MRP), die alle zu den ABC (ATP-Binding Cassette) -Transportproteinen gehören, berücksichtigt werden. Physiologisch dienen die Transporter dem Efflux von Xenobiotika und endogenen cytotoxischen Verbindungen, z.B. Bilirubin-Glucuroniden. Ihre Expression ist am höchsten in Geweben mit Barrierefunktion, wie vor allem dem Darm, der Leber, den Nieren, den Hoden und dem Uterus. Aufgabe der Transportproteine ist es, toxische Substanzen zu eliminieren, um so die Organe und den Fötus zu schützen. Darüber hinaus werden sie auch in vielen Krebszellen exprimiert, was beispielsweise die Wirkung von Chemotherapeutika reduziert und so zur so genannten „Multidrug Resistance“ führt. Darunter versteht man die Resistenz von Krebszellen gegenüber einer Vielzahl von Medikamenten mit unterschiedlicher chemischer Struktur und Wirkung. Durch die Hydrolyse von ATP werden sie gegen den Konzentrationsgradienten aus der Zelle heraustransportiert, so dass der Wirkstoffspiegel unter die gewünschte Konzentration gesenkt wird [83]. Es konnte bisher gezeigt werden, dass Isoflavone diese Proteine hemmen und so der „Multidrug Resistance“ entgegen wirken können [84,85,86,87,88]. Mögliche Inhibierungsmechanismen sind die Vermittlung einer verminderten Expression auf DNA-Ebene, eine kompetitive Bindung an die Substratbindungsstellen mit daraus resultierendem Transport, wie bei Morphin oder Rhodamin 123, eine Bindung ohne Transport, beispielsweise bei Progesteron, eine ATP-Depletion oder eine Inhibierung der Phosphorylierung durch Proteinkinase-Inhibitoren [89,90]. Für Phase-II-Metabolite (siehe Kap. 1.4.3.3) und Glucoside der Flavonoide und Isoflavone konnte nachgewiesen werden, dass sie im Zellkulturmodell mittels MRP2 auf die Seite des Darmlumens ausgeschieden werden [91,92,93,94,95,96]. Die Exkretion der Isoflavone zur Blutseite ist bisher nicht geklärt. In Frage kommen passive Transportmechanismen im Falle der Aglykone und aktive für die in den Enterozyten gebildeten Phase-II-Konjugate, beispielsweise über Transporter der MRP- oder der Organischen Anionen-Transporter (OAT) -Familie.

Abb. 1.4 verdeutlicht die Vorstellung der Aufnahme der Isoflavone in und ihren Transport aus den Enterozyten.



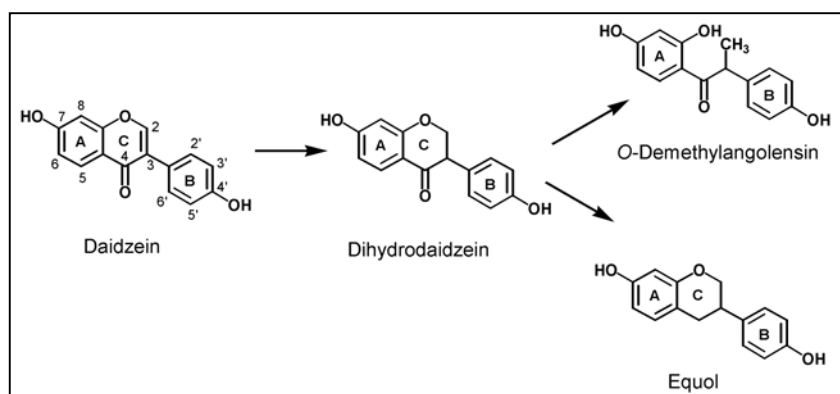
**Abb. 1.4:** Postulierte Transportmechanismen für Isoflavone in und aus Enterocyten (Genistin, GEN-7-O-β-D-Glucosid; LPH, Lactase-Phlorizin-Hydrolase; MRP, Multidrug Resistance Associated Protein; SGLT1, Na<sup>+</sup>-Glucose-Co-transporter; SULT, Sulfotransferase; UGT, UDP-Glucuronyltransferase).

### 1.4.3 Metabolismus

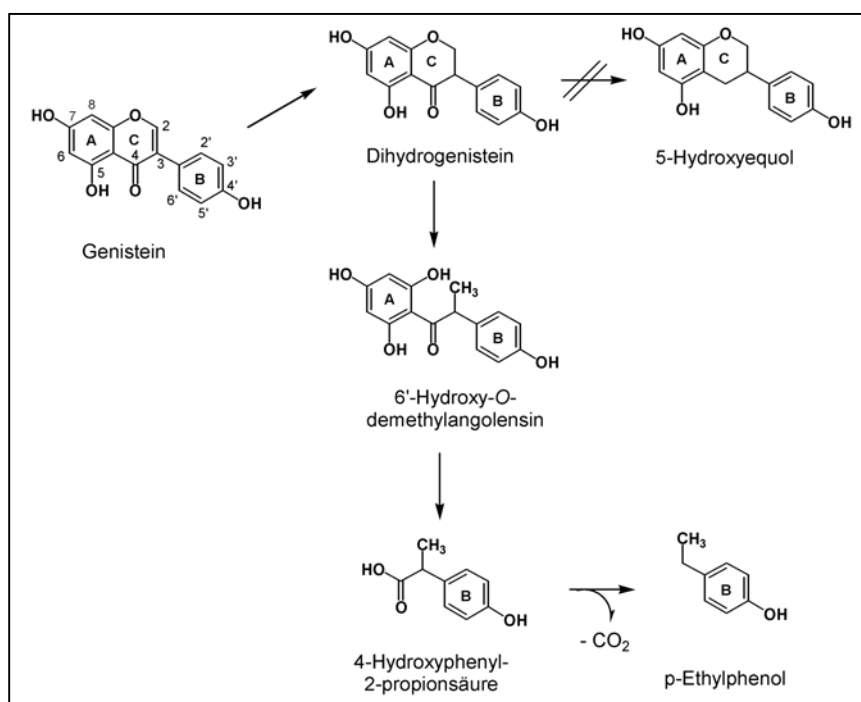
#### 1.4.3.1 Metabolismus durch Darmbakterien

Der Metabolismus der Isoflavone findet sowohl im Darm - durch Enzyme der Darmbakterien - als auch in der Leber statt. Die Metabolisierung durch die Darmbakterien ist für DAI und GEN in vitro und in vivo sowohl am Tier als auch am Menschen umfangreich untersucht worden [97,98,99,100,101,102,103,104]. So wird DAI zunächst zum Isoflavanon Dihydrodaidzein (DHD) reduziert, welches dann entweder durch Spaltung des C-Rings zum α-Methyldeoxybenzoin O-Demethylangolensin (O-DMA) oder unter Erhalt des C-Rings zum Isoflavan Equol verstoffwechselt wird (siehe Abb. 1.5). Nur etwa 1/3 der Bevölkerung der westlichen Industrienationen und 50 % der Asiaten sind in der Lage, Equol zu bilden. Die Einteilung in „Equol-Produzenten“ und „Nicht-Equol-Produzenten“ erfolgt über die Plasmakonzentration bzw. über die ausgeschiedene Menge an Equol mit dem Urin: So haben „Equol-Produzenten“ nach einmaliger Isoflavonaufnahme in Abhängigkeit von der Dosis einen Plasmaspiegel von mehr als 83 nM und scheiden mehr als 1000 nmol Equol pro Tag aus, während „Nicht-Equol-Produzenten“ weniger als 40 nM Equol im Plasma aufweisen und weniger als 250 nmol pro Tag ausscheiden [105,106,107]. Die Equol-Bildung unterliegt sowohl genetischen als auch nicht-genetischen Faktoren. So konnten Frankenfeld et al. zeigen, dass die Fähigkeit, Equol zu produzieren, autosomal dominant vererbt wird. Darüber hinaus spielen Umweltfaktoren, z.B. der Bildungsgrad, bei der Ausbildung des

Phänotyps eine Rolle [108]. DHD und Equol weisen ein asymmetrisches C-Atom am C-3 des C-Rings auf. Die absolute Konfiguration für Equol wurde in vivo als S-(-)-Equol bestimmt [109].



**Abb. 1.5:** Metabolismus von DAI durch Darmbakterien.

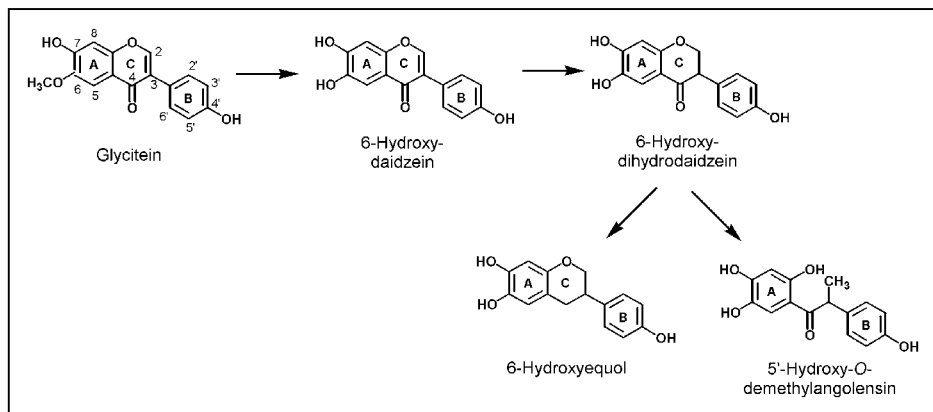


**Abb. 1.6:** Metabolismus von GEN durch Darmbakterien. Der Metabolit 4-Hydroxyphenyl-2-propionsäure konnte bisher nur in Rattenurin und in vitro-Inkubationen mit humaner Faezesflora detektiert werden [102,103].

GEN wird im ersten Schritt - analog zu DAI - zu Dihydrogenistein (DHG) reduziert und weiter zu 6'-Hydroxy-O-demethylangolensin (6'-OH-ODMA) verstoffwechselt. Im Unterschied zum Metabolismus von DAI konnte der analoge Equol-Metabolit 5-Hydroxyequol bislang nicht nachgewiesen werden, da wahrscheinlich die Ketogruppe durch Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung mit der Hydroxylgruppe am C-5 vor Reduktion geschützt wird. Vielmehr kann ein weiterer Abbau über 4-Hydroxyphenyl-2-propionsäure zu p-Ethylphenol erfolgen, das als biologisches Endprodukt angesehen wird. 4-Hydroxyphenyl-2-

propionsäure konnte bisher nur in Rattenurin und in vitro-Inkubationen mit humaner Faezesflora nachgewiesen werden (siehe Abb. 1.6) [102,103].

Der bakterielle Metabolismus von GLY ist bisher wenig untersucht worden. Inzwischen weiß man, dass GLY in vitro sowohl von humaner Faezesflora als auch von bovinem Pansensaft zunächst zu 6-OH-DAI demethyliert, danach zu 6-Hydroxydihydrodaidzein reduziert und anschließend entweder durch Spaltung des C-Rings zu 5'-Hydroxy-O-demethylangolensin oder unter Erhalt des C-Rings zu 6-Hydroxyequol verstoffwechselt wird (siehe Abb. 1.7) [110].



**Abb. 1.7:** Metabolismus von GLY durch Darmbakterien [110].

Im Rattenurin und -faeces konnte nach Gabe von GLY per Schlundsonde 6-OH-DAI und 6-Hydroxydihydrodaidzein detektiert werden [110]. Im menschlichen Urin wurden nach zweiwöchiger Supplementierung mit Sojariegeln Dihydroglycitein, 6-Methoxyequol und 5'-Methoxy-O-demethylangolensin als weitere mögliche bakterielle Metabolite von GLY identifiziert [104]. Diese Metabolite wurden in vitro nicht gebildet [110]. Der Verstoffwechslungsgrad ist jedoch im Vergleich zu GEN und DAI relativ gering: Zhang et al. fanden 55 % der verabreichten Dosis an GLY nach Gabe eines Sojakeimlingextrakts im Urin wieder [57], Setchell und Mitarbeiter berichten über hohe Plasmakonzentrationen von GLY wegen geringer Metabolisierung nach Gabe einer Einmaldosis GLY-Glucosid (siehe Tab. 1.3) [41].

Die Rolle der Faezesflora am Metabolismus von GEN und DAI konnte eindrucksvoll demonstriert werden: So schieden keimfrei gehaltene Ratten bei Gabe von Soja-haltigem Futter keine der oben genannten Metabolite der Isoflavone mit dem Urin aus. Erst nach Kolonialisierung der Ratten mit humaner Faezesflora konnten die entsprechenden Metabolite detektiert werden [111]. Darüber hinaus wurde in vitro die Bildung der Metabolite durch humane Faezesflora mittels Antibiotika-Gabe unterbunden [112]. Die Metabolite treten im Plasma zeitverzögert erst Stunden nach der Soja-Gabe auf. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die nicht resorbierten Isoflavone bzw. die Isoflavone aus dem enterohepatischen Kreislauf erst die Mikroflora des Dickdarms erreichen müssen. So konnte in

einer Studie gezeigt werden, dass erst 24 bis 36 h nach Gabe einer Einmaldosis an DAI die Maximalkonzentration von Equol im Plasma erreicht wird [52,113].

Bisher ist unklar, welche Darmbakterien für den bakteriellen Metabolismus der Isoflavone verantwortlich sind. Hur und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die *Escherichia coli* Stämme HGH6 und HGH21 zur Spaltung der glycosidischen Bindung der Glucoside von DAI und GEN fähig sind. HGH21 und ein gram-positives anaerobes Bakterium (Niu-16) der Pansenflora können die Dihydroverbindungen aus DAI und GEN und der Clostridium Stamm HGH136 O-DMA aus DAI bilden [77,79,114]. Darüber hinaus ist *Eubacterium ramulus* in der Lage, DAI zu O-DMA und GEN zu 6'-OH-ODMA und 4-Hydroxyphenyl-2-propionsäure zu verstoffwechseln sowie die glycosidische Bindung der Glucoside zu spalten [115]. Julong 732, ein gram-negatives anaerobes Bakterium aus menschlichem Faezes, das 93%ige Ähnlichkeit mit *Eggerthella hongkongensis* HKU10 besitzt, ist fähig, DHD, aber nicht DAI, zu S-Equol zu verstoffwechseln [116]. Ein Bakteriengemisch aus *Lactobazillus mucosae* EPI2, *Enterococcus faecium* EPI1, *Finegoldia magna* EPI3 und einer *Veillonella* Spezies ist in der Lage, Equol aus DAI zu bilden, die isolierten Bakterien können dies allerdings nicht [117]. GLY wird in vitro von *Eubacterium limosum* zu der entsprechenden demethylierten Verbindung 6-OH-DAI umgesetzt [118].

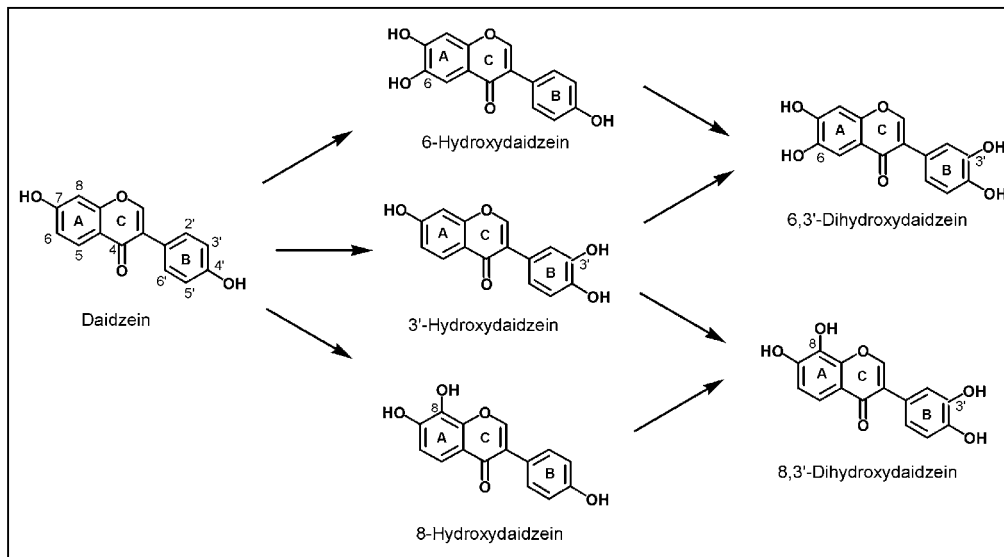
#### 1.4.3.2 Phase-I-Metabolismus

Isoflavone werden nach ihrer Resorption im Zuge des Phase-I-Metabolismus oxidativ durch Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen (CYP) verstoffwechselt. GEN und DAI werden in vitro durch Aroclor-induzierte Rattenlebermikrosomen und Humanlebermikrosomen zu verschiedenen mono-, di- und trihydroxylierten Verbindungen umgesetzt. Im Urin konnten jeweils die 3'-, 6- und 8-monohydroxylierten und die 6,3'- und 8,3'-dihydroxylierten Verbindungen von DAI und GEN nach zweitägigem Sojakonsum detektiert werden [119,120]. Abb. 1.8 stellt schematisch den oxidativen Metabolismus von DAI dar. Für GEN konnten einige an der Hydroxylierung beteiligte biliäre und intestinale CYP identifiziert werden, nämlich CYP 1A1, 1A2, 1B1, 2E1 und 3A4 [121].

GLY wird von Lebermikrosomen Aroclor-induzierter Ratten und Humanlebermikrosomen zu verschiedenen Produkten umgesetzt, wobei zwei monohydroxylierte GLY-Derivate und das Demethylierungsprodukt 6-OH-DAI die Hauptmetabolite darstellen [110]. Im Rattenurin konnte nach Verabreichung von GLY per Schlundsonde 6-OH-DAI, 8- und 3'-Hydroxyglycitein sowie 5,6-Dihydroxydaidzein identifiziert werden [110].

Der Phase-I-Metabolismus von Equol ist erst kürzlich untersucht worden: Equol wird in vitro von Aroclor-induzierten Ratten- und Humanlebermikrosomen zu zahlreichen mono- und

dihydroxylierten Verbindungen verstoffwechselt, wobei 3'- und 8-Hydroxyequol die Hauptprodukte darstellen [122].



**Abb. 1.8:** Oxidativer Metabolismus von DAI durch Humanlebermikrosomen [120].

Die Bedeutung der oxidativen Metabolite ist bisher unklar. Eine Quantifizierung wurde bisher noch nicht durchgeführt, weil Referenzsubstanzen nicht in ausreichender Menge zur Verfügung standen und da die Quantifizierung zusätzlich durch die Vielzahl der gebildeten Produkte erschwert wird. Darüber hinaus muss berücksichtigt werden, dass nicht nur die bakteriellen Metabolite einer Verstoffwechslung durch CYP der Leber unterliegen, wie für Equol gezeigt werden konnte, sondern auch die oxidativen Metabolite einer weiteren Metabolisierung durch die Mikroflora des Darmes unterworfen sein können [122,123]. Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass gerade die oxidativen Metabolite durch ihre Catechol- und Pyrogallolstruktur weit weniger stabil sein dürften als ihre Ausgangsverbindungen und sich so einer Quantifizierung entziehen. Eine grobe Schätzung ergibt, dass im Urin weniger als 10 % des Gesamt-Isoflavongehalts in Form der oxidativen Metabolite vorliegt [120], so dass dem bakteriellen Metabolismus mit etwa 40 % eine größere Bedeutung zukommt [124]. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass Equol nur von ungefähr 30 % der Bevölkerung gebildet wird, während eine oxidative Verstoffwechslung durch CYP vermutlich einen generellen Metabolisierungsweg darstellt.



### **1.4.3.3 Phase-II-Metabolismus**

Isoflavone und ihre Metabolite werden im Zuge des Phase-II-Metabolismus effizient durch UDP-Glucuronyltransferasen (UGT) und Sulfotransferasen (SULT) konjugiert. Es entstehen vorwiegend Monoglucuronide, aber auch Diglucuronide, Mono- und Disulfate sowie Sulfoglucuronide. DAI beispielsweise liegt im menschlichen Urin zu etwa 1,5 bis 3 % in freier Form, zu 80 bis 81 % als Monoglucuronid, zu ungefähr 1 % als Diglucuronid, zu 10 bis 14 % als Sulfoglucuronid, zu etwa 3 % als Monosulfat und zu 0,5 bis 3 % als Disulfat vor [125]. Im Plasma liegt der Anteil der mit Sulfat konjugierten Isoflavone bei 8 bzw. 26 % für GEN und DAI, der der Glucuronide bei 48 bzw. 33 % und der der gemischten Konjugate bei etwa 30 %. Der Anteil der Aglykone beträgt damit nur ungefähr 14 bzw. 11 % [126]. Die Konjugation mit Glucuronsäure- bzw. Sulfat wird als der Hauptentgiftungsweg für die Isoflavone angesehen. Geparden, die mit Soja-haltiger Nahrung gefüttert wurden, litten unter Infertilität und Leberschäden, da sie Isoflavone nicht konjugieren können [127]. Die für die Glucuronidierung und Sulfatierung der Isoflavone und ihrer Metabolite in vitro verantwortlichen Isoenzyme sind UGT 1A1, 1A6, 1A8, 1A9 und 1A10 sowie SULT 1A1, 1A2, 1A3, 1B1, 1E1, 1C2, 2B1a und 2B1b [128,129,130]. Die Konjugation erfolgt vorwiegend an der Hydroxylgruppe am C-7 [128,130,131]. Auf Grund der Expression der Isoenzyme in unterschiedlichen Geweben kann geschlossen werden, dass die Konjugation mit Glucuronsäure und Sulfat sowohl in der Leber als auch bereits im Magen-Darm-Trakt stattfindet. Die Beteiligung der Darmzellen an der Phase-II-Konjugation konnte auch im Tierversuch bestätigt werden. Plasma der Portalvenen enthielt hauptsächlich GEN-Glucuronid, wenn GEN im Dünndarm per Infusion verabreicht wurde [132].

### **1.4.4 Verteilung**

Nach Resorption, Transport via Pfortader in die Leber sowie Metabolismus in Darm und Leber treten die Isoflavone als Konjugate in die systemische Zirkulation ein und können in zahlreichen Körperflüssigkeiten, wie Plasma, Urin, Faezes, Galle, Speichel, Muttermilch, Fruchtwasser oder Plasma der Nabelschnur, nachgewiesen werden [133]. Darüber hinaus wurden in einigen Tierstudien die Konzentrationen an DAI und GEN in Geweben bestimmt, die die Plasmakonzentrationen um ein Vielfaches übersteigen können [134,135,136,137]. Tab. 1.4 gibt einen Überblick über die Gewebekonzentrationen von GEN in einer Tierstudie. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass Isoflavone sowohl die Blut-Hirn-Schranke als auch die Plazenta passieren können [138,139,140]. In Plasma und Urin liegen die Isoflavone und ihre Metabolite hauptsächlich konjugiert vor [125,128], in den Geweben können jedoch die Aglykone überwiegen, wie in Organen von Ratten nachgewiesen wurde (siehe Tab. 1.4) [135].

Csanady et al. ermittelten in vitro einen Gewebe:Blut-Verteilungskoeffizient für DAI von etwa 1,2, so dass auch in menschlichen Geweben mit einer Anreicherung gerechnet werden kann [141]. Beispielsweise konnten im Brustgewebe und im -drüsensekret prämenopausaler Frauen sowie in der Prostataflüssigkeit bei Männern Isoflavone nach Supplementierung mit Soja detektiert werden, wobei im Brustgewebe für GEN und DAI zum Plasma vergleichbare Konzentrationen, für Equol jedoch höhere Konzentrationen gefunden wurden [14,142,143]. In der Prostataflüssigkeit und im Brustdrüsensekret wurden höhere [142,144], im Prostatagewebe etwas niedrigere Konzentrationen an Isoflavonen als im Plasma gemessen [145]. Die Konzentrationen an Isoflavonen des Nabelschnurbluts und des Fruchtwassers bei schwangeren Japanerinnen entsprachen denen des Plasmas [146].

**Tab. 1.4:** Plasma- und Gewebekonzentrationen von GEN in männlichen und weiblichen Sprague-Dawley Ratten (n = 6) nach Gabe von 500 mg GEN/kg Futter nach [135].

Gewebe	Konzentration an Genistein [pmol/mg] (% Aglykon) in männlichen Ratten	Konzentration an Genistein [pmol/mg] (% Aglykon) in weiblichen Ratten
Plasma (140 Tage alte Ratten) <sup>a</sup>	6,0 (< 5 %)	7,9 (< 5 %)
Plasma (21 Tage alte Ratten) <sup>a</sup>	1,9 (< 5 %)	2,1 (< 5 %)
Brustdrüse	0,83 (24 %)	2,39 (49 %)
Schilddrüse	0,41 (25 %)	1,15 (18 %)
Leber	0,67 (34 %)	7,33 (77 %)
Gehirn	0,04 (100 %)	0,06 (50 %)
Prostata	1,09 (45 %)	
Hoden	0,63 (11 %)	
Eierstock		1,07 (80 %)
Gebärmutter		1,42 (100 %)

<sup>a</sup> Plasmakonzentrationen in µM

## 1.5 Interindividuelle Variation

Die Biokinetik und Bioverfügbarkeit der Isoflavone und ihrer Metabolite unterliegen beträchtlichen interindividuellen Schwankungen. So unterscheidet sich die Ausscheidung der Isoflavone DAI und GEN mit dem Urin nach Supplementierung mit Soja bis zu 15-fach [106]. Die Exkretion der Metabolite, wie Equol- bzw. O-DMA, unterliegt sogar noch größeren Schwankungen als die ihrer Muttersubstanzen. Beispielsweise konnten Rowland et al. einen 600-fachen Unterschied in der Equol-Ausscheidung [106] und Karr et al. einen 180-fachen in der O-DMA-Exkretion [147] beobachten. Ein Großteil dieser Unterschiede kann über das verschiedene Ausmaß der Metabolisierung erklärt werden: Wie schon erwähnt ist nur etwa 1/3 der Bevölkerung der westlichen Industrienationen in der Lage, Equol zu bilden [105].

Es gibt eine Reihe von Faktoren, die die Biokinetik und Bioverfügbarkeit von Isoflavonen beeinflussen können. Zu ihnen zählen neben der intestinalen Mikroflora vor allem Geschlecht, Alter, Zusammensetzung der Sojaprodukte, Ernährung und die Dauer der Aufnahme. Auf Alter, Ernährung sowie die Art der Sojaprodukte wird im Folgenden näher eingegangen. Der Einfluss weiterer Faktoren wird in Referenz [148] diskutiert. Inwieweit Unterschiede hinsichtlich der Bioverfügbarkeit bei Asiaten und Kaukasiern bestehen, ist bisher noch ungeklärt. Auch der Einfluss von Polymorphismen bei Transportproteinen, wie den Multidrug Resistance Proteinen (z.B. MDR1) oder den Glucosetransportern (z.B. SGLT1), sowie bei Fremdstoff-metabolisierenden Enzymen, z.B. CYP oder UGT, auf die Bioverfügbarkeit ist noch unklar.

### 1.5.1 Alter

Der Einfluss des Alters auf die Biokinetik und Bioverfügbarkeit ist bisher wenig untersucht worden. Signifikante Unterschiede in Bezug auf den Metabolismus von Isoflavonen gibt es zwischen Neugeborenen und Erwachsenen. Säuglinge weisen niedrigere Equolkonzentrationen im Plasma und Urin auf, was auf die nicht ausgebildete Darmflora zurückgeführt werden kann [149,150,151,152]. Mascarinec und Mitarbeiter beobachteten eine höhere Exkretion von Isoflavonen mit dem Urin bei acht- bis 14-jährigen Mädchen gegenüber erwachsenen Frauen. Dies kann mit einer verstärkten Resorption und/oder einem verminderten Abbau durch die intestinale Darmflora erklärt werden [153]. Zwischen prä- und postmenopausalen Frauen konnten keine Unterschiede bezüglich Biokinetik und Bioverfügbarkeit beobachtet werden [49,154,155]. Faughnan et al. stellten jedoch fest, dass tendenziell mehr postmenopausale (n = 17) im Vergleich zu prämenopausalen Frauen (n = 20) Equol produzieren [154]. Im Gegensatz dazu konnten Frankenfeld et al. bei einer Ana-

lyse von 410 Personen im Alter von zehn bis 96 Jahren zeigen, dass das Alter negativ mit der Fähigkeit, Equol zu bilden, assoziiert ist [108].

### **1.5.2 Ernährung**

Mehrere Gründe sprechen für einen Einfluss der Ernährung auf die Bioverfügbarkeit und den Metabolismus von Isoflavonen. Beispielsweise könnten Nahrungsbestandteile, wie Ballaststoffe, die Isoflavonaufnahme behindern oder die Transitzeit der Darmpassage beschleunigen, so dass weniger Zeit für die Resorption bleibt. Außerdem könnte die Zusammensetzung der Mikroflora des Darms verändert werden, so dass aufgrund veränderter Enzymaktivitäten, z.B. der  $\beta$ -Glucosidase- oder  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität bzw. der Aktivität der Enzyme des bakteriellen Metabolismus, die Fähigkeit zur Metabolisierung beeinflusst wird.

Adlercreutz et al. stellten fest, dass ein hoher Fett- und Fleischkonsum mit einer vermehrten Equol-Ausscheidung zusammenhängt [156]. Dies kann dadurch bedingt sein, dass eine fett- und fleischreiche Ernährung die Ansiedelung der Bakterien, die für die Equol-Produktion verantwortlich sind, begünstigt. In anderen Studien konnte hingegen gezeigt werden, dass die Aufnahme von weniger Fett und mehr Kohlenhydraten zu einer vermehrten Equol-Bildung führt [48,55,106,108,124]. Ein Erklärungsansatz wäre, dass die vermehrte Aufnahme von komplexen Kohlenhydraten die Fermentation im Dickdarm anregt und auf diese Weise verstärkt Equol produziert wird. Dies konnte in vitro bestätigt werden: Bei Inkubationen mit humaner Faecesflora wurde in Kohlenhydrat-reicher Umgebung die intestinale Fermentation stimuliert und vermehrt Equol aus DAI gebildet, während in einer Kohlenhydrat-armen Umgebung praktisch kaum Equol entstand [157].

Der Einfluss einer Ballaststoff-reichen Ernährung wurde von Tew et al. untersucht: Sie stellten niedrigere Plasmaspiegel an GEN und DAI und eine Reduktion der GEN-Ausscheidung mit dem Urin bei einer Ballaststoff-reichen Ernährung fest, die DAI-Exkretion war nicht betroffen [158]. Dies kann über eine Unterbrechung des enterohepatischen Kreislaufs durch Ernährung mit Ballaststoff-reichen Lebensmitteln und daraus resultierender schnellerer Darmpassage erklärt werden [159]. Blakesmith et al. bestätigten diese Ergebnisse: Sie beobachteten eine inverse Korrelation zwischen der Isoflavon-Ausscheidung im Urin und dem Verhältnis der Aufnahme von Proteinen zu Ballaststoffen [160]. Im Gegensatz dazu konnten Lampe et al. und Xu et al. keinen Einfluss von Ballaststoffen, Proteinen und Fett auf die Bioverfügbarkeit von Isoflavonen im Menschen feststellen [161,162].

Im Tierversuch an Ratten wurde eine 37 bzw. 60%ige Zunahme der Bioverfügbarkeit an DAI bzw. GEN nach einmaliger Gabe einer Isoflavon-Glucosid-Präparation per Schlundsonde beobachtet, wenn das Futter 5 % Fructooligosaccharide enthielt [163]. Der Futter-

zusatz erhöhte das Gewicht des Caecum-Inhalts sowie die vorhandene Konzentration an kurzkettigen Fettsäuren und erniedrigte den pH-Wert von 6,8 auf 5,2. Diese Tatsachen lassen auf eine veränderte Bakterienzahl und -aktivität schließen. Darüber hinaus wurden bei Zugabe von Präbiotika GEN und DAI in vitro vor Fermentation durch die humane intestinale Mikroflora geschützt sowie die  $\beta$ -Glucosidase-Aktivität im Darm erhöht [117,164,165]. Humane Interventionsstudien konnten jedoch keinen Zusammenhang zwischen einer veränderten Bioverfügbarkeit und der gleichzeitigen Gabe von Prä- bzw. Probiotika und Isoflavonen zeigen [166,167].

Weitere Studien scheinen notwendig, um die bestehenden widersprüchlichen Ergebnisse zu klären.

### **1.5.3 Art der Sojaquelle**

Es konnte noch nicht abschließend geklärt werden, ob die Zuckerkonjugation der Isoflavone und die Matrix (Isoflavone als Reinsubstanz, Extrakt oder Lebensmittel) die Bioverfügbarkeit und Biokinetik beeinflussen. Bisher wurde erst eine Studie, die die Bioverfügbarkeit eines Extrakts, wie er hauptsächlich in Nahrungsergänzungsmitteln vorkommt, mit der eines Lebensmittels verglichen hat, veröffentlicht [64]. Tab. 1.5 fasst die Ergebnisse und die Schwachpunkte der vorhandenen Studien zusammen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass keine eindeutige Aussage gemacht werden kann, ob die Matrix und die Art der Isoflavone (Aglykone bzw. Zuckerkonjugate) die Bioverfügbarkeit und Biokinetik beeinflussen. Weitere Studien mit größerer Probandenzahl sind nötig, um einen möglichen Einfluss der Lebensmittelmatrix und der Glucose-Konjugation zu klären.

**Tab. 1.5:** Auswirkung der Matrix und der Glucose-Konjugation auf die Bioverfügbarkeit und Biokinetik der Isoflavone.

Sojaerzeugnis und Dosis	Probandenzahl	Ergebnis	Bemerkung	Referenz
Gekochte Sojabohnen (34 mg DAI, 73 mg GEN) oder Tempeh (21 mg DAI, 45 mg GEN)	17 ♂ im Cross-Over-Design	Nach 9 Tagen war die Wiederfindung an DAI bzw. GEN im Urin um 70 bzw. 46 % höher nach Konsum von Tempeh verglichen mit gekochten Sojabohnen ⇒ evtl. bessere Bioverfügbarkeit der Aglykone, die in dem fermentierten Sojaprodukt Tempeh überwiegen	Verabreichung unterschiedlicher Dosen ⇒ Bioverfügbarkeit ist evtl. sättigbar (s. Kap. 1.4.1) Verhältnis der verschiedenen Konjugate und der Aglykone von GEN zu DAI in den Produkten unterschiedlich Keine Biokinetik bestimmt Matrixeffekte evtl. für unterschiedliche Bioverfügbarkeit verantwortlich	168
Tofu (21 mg DAI, 43 mg GEN), TVP (26 mg DAI, 30 mg GEN)	7 ♀ (prä) im Cross-Over-Design	Kein Unterschied in der Wiederfindung der Isoflavone im Urin nach Aufnahme einer Einmaldosis	Verabreichung unterschiedlicher Dosen ⇒ Bioverfügbarkeit ist evtl. sättigbar (s. Kap. 1.4.1) Verhältnis der verschiedenen Konjugate und der Aglykone von GEN zu DAI in den Produkten unterschiedlich Keine Biokinetik bestimmt	158
Sojamilch oder Sojakeimlinge (4,5 µmol/kg KG IF) (DAI : GEN : GLY = 4,4 : 4,8 : 0,8 bzw. 4,8 : 1,3 : 3,9)	7 ♀ (prä) und 7 ♂ im Cross-Over-Design	Kein Unterschied in der Wiederfindung der Isoflavone im Urin nach Aufnahme einer Einmaldosis	Verhältnis der verschiedenen Konjugate und der Aglykone von GEN zu DAI in den Produkten unterschiedlich Keine Biokinetik bestimmt	57
Gekochte Sojabohnen (20 mg DAI, 24 mg GEN), TVP (28 mg DAI, 32 mg GEN), Tofu (37 mg DAI, 43 mg GEN) bzw. Tempeh (22 mg DAI, 30 mg GEN)	10 ♀ (prä) im Cross-Over-Design	Kein Unterschied in der Wiederfindung der Isoflavone im Urin nach Aufnahme einer Einmaldosis	Verabreichung unterschiedlicher Dosen ⇒ Bioverfügbarkeit ist evtl. sättigbar! (siehe Kap. 1.4.1) Verhältnis der verschiedenen Konjugate und der Aglykone von GEN zu DAI in den Produkten unterschiedlich Kleine Probandenzahl wegen niedriger Compliance Keine Biokinetik bestimmt	162
Sojamilch, TVP und Tempeh (0,44 mg/kg KG IF) (DAI : GEN = 2,0 : 3, 1 : 2,0 bzw. 2 : 3)	20 ♀ (prä), 17 ♀ (post) und 20 ♂ im Cross-Over-Design	Kein Unterschied in der Wiederfindung der Isoflavone im Urin nach Aufnahme einer Einmaldosis unter Berücksichtigung der Aglykon- und Glucosid-Gehalte Wiederfindung von GEN im Urin bei Frauen größer	Verhältnis der verschiedenen Konjugate und der Aglykone von GEN zu DAI in den Produkten unterschiedlich Keine Biokinetik bestimmt	154

## Einleitung

		<ul style="list-style-type: none"> <li>- nach Konsum von Sojamilch verglichen mit TVP</li> <li>- Wiederfindung von GEN im Urin bei prämenopausalen Frauen größer nach Konsum von Tempeh verglichen mit Sojamilch</li> <li>- Ausgeschiedene Menge an Equol im Urin von „Equol-Produzenten„ größer nach Konsum von Tempeh verglichen mit TVP und Sojamilch; evtl. durch Schutz der festen Matrix vor Abbau von DAI bevor Erreichen des Colons; keine Auswirkung auf die ausgeschiedene Menge an DAI</li> </ul>		
Sojaextrakt (8 mg DAI, 23 mg GEN) oder Getränk aus Sojamehl (9 mg DAI, 11 mg GEN)	12 ♀ (prä) im Cross-Over-Design	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Größere AUC und <math>C_{max}</math> an DAI nach Verabreichung des Extrakts als Einmaldosis (Dosisbereingt), für GEN hingegen nicht</li> <li>⇒ schlechtere Bioverfügbarkeit von DAI aus dem Lebensmittel, evtl. da die Matrix die Resorption verhindert bzw. vor Resorption bereits im Dünndarm schützt, so dass DAI in größerem Umfang metabolisiert werden kann</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Keine Bestimmung der Wiederfindung im Urin</li> <li>- Keine Bestimmung der bakteriellen Metabolite</li> <li>- Verhältnis der verschiedenen Konjugate und der Aglykone von GEN zu DAI in den Produkten unterschiedlich</li> <li>- Verabreichung unterschiedlicher Dosen ⇒ Bioverfügbarkeit ist evtl. sättigbar! (siehe Kap. 1.4.1)</li> <li>- Keine Bestimmung der weiteren in Soja vorkommenden Glucoside ⇒ evtl. Dosis an DAI im Getränk unterschätzt</li> </ul>	64
Sojasupplement vor und nach Hydrolyse zu den jeweiligen Aglykonen (30 oder 450 mg bzw. 50 oder 760 mg IF) (DAI : GEN = 3 : 2 bzw. 1 : 1)	4 ♀ und 4 ♂ im Cross-Over-Design	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Höhere <math>C_{max}</math> der Isoflavone nach Verabreichung des hydrolysierten Produkts als Einmalgabe</li> <li>⇒ bessere Bioverfügbarkeit der Aglykone</li> <li>- <math>t_{max}</math> für Aglykone früher als für Glucoside</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Keine Berechnung der AUC</li> <li>- Keine Bestimmung der Wiederfindung im Urin</li> <li>- Verhältnis der verschiedenen Konjugate und der Aglykone von GEN zu DAI in den Produkten unterschiedlich</li> </ul>	169
Reinsubstanzen von GEN und DAI und deren Glucoside (je 50 mg)	3-6 ♀ (prä)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Größere AUC und <math>C_{max}</math> nach Verabreichung der Glucoside als Einmaldosis</li> <li>⇒ bessere Bioverfügbarkeit der Glucoside</li> <li>- <math>t_{max}</math> für Aglykone früher als für Glucoside</li> <li>- Equol im Plasma von „Equol-Produzenten“ nur nach Gabe von DAI-Glucosid; evtl. da DAI bereits im Dünndarm resorbiert wird, während DAI-Glucosid erst im Dickdarm glycosidisch gespalten wird und so für die Metabolisierung zu Equol bereit steht</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Verabreichte Dosis an Glucosiden um 30 % niedriger als die der Aglykone, so dass nur Dosisbereinigte AUC berechnet werden können</li> <li>- Keine Bestimmung der Wiederfindung im Urin</li> </ul>	41

## Einleitung

Sojaextrakt vor und nach Hydrolyse zu den Aglykonen (3,6 µmol/kg/KG berechnet als Aglykon) (DAI : GEN : GLY = 7,0 : 0,1 : 1,9 bzw. 5,3 : 0,1 : 3,6)	6 ♀ (post) im Cross-Over-Design	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ähnliche AUC und C<sub>max</sub> für Glucoside und Aglykone und kein Unterschied in der Wiederfindung der Isoflavone im Urin nach Verabreichung der Produkte als Einmaldosis</li> <li>⇒ gleiche Bioverfügbarkeit der Glucoside und Aglykone</li> <li>- t<sub>max</sub> für Glucoside und Aglykone ähnlich</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Verhältnis der verschiedenen Konjugate und der Aglykone von GEN zu DAI in den Produkten unterschiedlich</li> </ul>	58
Reinsubstanzgemisch, das die Aglykone (259 mg IF) bzw. Glucoside enthält (251 mg IF) (DAI : GEN : GLY = 5,0 : 4,3 : 0,6 bzw. 4,1 : 5,3 : 0,6)	15 ♀ im Cross-Over-Design	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ähnliche AUC für Glucoside und Aglykone</li> <li>⇒ gleiche Bioverfügbarkeit der Glucoside und Aglykone</li> <li>- t<sub>max</sub> für Glucoside und Aglykone ähnlich</li> <li>- Equolkonzentration im Plasma von „Equol-Produzenten“ höher nach Gabe des Glucosidpräparats</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Keine Bestimmung der Wiederfindung im Urin</li> <li>- Verhältnis der verschiedenen Konjugate und der Aglykone von GEN zu DAI in den Produkten unterschiedlich</li> </ul>	170
Sojakeimlingextrakt vor und nach Hydrolyse zu den jeweiligen Aglykonen (1,1 bzw. 3,3 µmol/kg KG) (DAI : GEN : GLY = 4,0 : 1,4 : 4,6 bzw. 5 : 1,6 : 3,4)	8 ♀ pro Gruppe	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Kein Unterschied in der Wiederfindung der Isoflavone im Urin nach Aufnahme der Produkte über 7 Tage, Plasmakonzentrationen für das hydrolysierte Produkt nach 7-tägigem Konsum höher</li> <li>⇒ keine Aussage betreffend der Bioverfügbarkeit der Glucoside und Aglykone möglich</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Verabreichung unterschiedlicher Dosen ⇒ Bioverfügbarkeit ist evtl. sättigbar (siehe Kap. 1.4.1)</li> <li>- Keine Biokinetik bestimmt</li> <li>- Verhältnis der verschiedenen Konjugate und der Aglykone von GEN zu DAI in den Produkten unterschiedlich</li> </ul>	171
Sojakeimlingextrakt nach Hydrolyse zu den Aglykonen (12 mg DAI, 16 mg GEN) sowie Sojaextrakt (16 mg DAI, 19 mg GEN)	1 ♂	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Wiederfindung im Urin um 23 % Dosis-bereinigt höher nach Konsum der Glucoside</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Verabreichung unterschiedlicher Dosen ⇒ Bioverfügbarkeit ist evtl. sättigbar (s. Kap. 1.4.1)</li> <li>- Keine Bestimmung der biokinetischen Kenndaten</li> </ul>	82

Abkürzungen: ♂, männlich; ♀, weiblich; IF, Isoflavone (DAI + GEN + GLY); prä, Frauen vor der Menopause; post, Frauen nach der Menopause; TVP, texturiertes Sojaprotein.



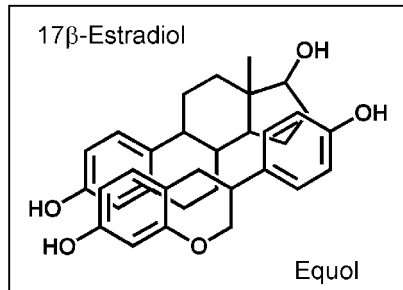
## 1.6 Physiologische Eigenschaften der Isoflavone

Die Bevölkerung der westlichen Industrieländer weist im Vergleich zu den Asiaten eine unterschiedliche Ernährungsweise auf. So kennzeichnet sich die westliche Diät durch eine vermehrte Deckung des Energiebedarfs über tierische Fette und Proteine sowie einem geringeren Verzehr an Vitaminen, Mineralstoffen und Ballaststoffen aus Obst und Gemüse. Die asiatische Kost basiert dagegen auf einem hohen Anteil pflanzlicher Lebensmittel, wobei Sojaprodukte traditionsgemäß einen Bestandteil davon bilden [172]. Das Interesse an Isoflavonen ist in den letzten Jahren erheblich gestiegen, da ein in epidemiologischen Studien beobachteter Zusammenhang zwischen der vorwiegend pflanzlichen, Isoflavonreichen Ernährung der Asiaten und einer daraus resultierenden geringeren Morbidität und Mortalität diskutiert wird [173]. In zahlreichen in vitro Studien wurden antineoplastische, antioxidative, estrogene und antiestrogene sowie cytotoxische Eigenschaften der Isoflavone nachgewiesen, die die positiven Effekte auf die Gesundheit erklären können. Auf die Wirkung der Isoflavone in vitro und in vivo wird in den folgenden Kapiteln eingegangen. Eine ausführliche Abhandlung über die physiologischen Eigenschaften findet sich in Referenz [148]. Es sei darauf hingewiesen, dass die biologischen Wirkungen nicht für alle Isoflavone gleich sind.

### 1.6.1 Hormonabhängige und hormonunabhängige Wirkungen in vitro

Am besten untersucht ist sicherlich die durch die ER vermittelte Wirkung von Isoflavonen. Hierfür stehen zwei ER, die im Cytosol lokalisiert sind,  $ER\alpha$  und  $\beta$ , zur Verfügung. Im Körper liegen diese unterschiedlich verteilt vor:  $ER\alpha$  findet man vor allem in der Brustdrüse und im Uterus, aber auch in der Leber, während  $ER\beta$  vorwiegend in den Eierstöcken, den Hoden, der Prostata sowie im Gastrointestinaltrakt vorkommt [174]. Die Bindung der Isoflavone an  $ER\alpha$  und  $\beta$  kommt durch ihre mit den endogenen Estrogenen vergleichbare Struktur zustande. Der räumliche Abstand zwischen den beiden aromatischen Hydroxylgruppen am C-7 und C-4' der Isoflavone ist nahezu identisch mit dem zwischen den Hydroxylgruppen am C-3 und C-17 von  $17\beta$ -Estradiol (siehe Abb. 1.9) [157]. In Rezeptorbindungsstudien zeigen Isoflavone meist eine um ungefähr drei Größenordnungen geringere Bindungsaffinität zum  $ER\alpha$  als  $17\beta$ -Estradiol, wohingegen die Bindungsaffinität beispielsweise von GEN zum  $ER\beta$  nur um zwei Größenordnungen unter der des  $17\beta$ -Estradiols liegt [175,176,177]. Das im bakteriellen Metabolismus von DAI gebildete S-Equol (siehe Kap. 1.4.3.1) besitzt eine mit GEN vergleichbare Affinität zu  $ER\beta$ , R-Equol hingegen bindet schwächer und bevorzugt an  $ER\alpha$ . Die Bindungsstärke des Razemats liegt zwischen der der beiden Enantiomeren [109,178]. Das estrogene Potenzial nimmt in den meisten in vitro-Testsystemen nach folgender Reihenfolge ab: Equol  $\geq$  GEN  $>$  DAI  $\geq$  GLY [176]. Da

jedoch die Plasmakonzentration an  $17\beta$ -Estradiol (70 bis 200 pM und während des Menstruationszyklus bis 1,5 nM) 1/100 bis 1/1000 der der Isoflavone (siehe Kap. 1.3.2) beträgt [179] und die estrogene Wirkung von GEN bei nur etwa 1/1000 von der von  $17\beta$ -Estradiol liegt, können Isoflavone je nach Konzentration und Anzahl der ER antiestrogene und estrogene Wirkung entfalten [173].



**Abb. 1.9:** Vergleich der chemischen Struktur der Isoflavone, am Beispiel des bakteriellen Metaboliten Equol, und der Estrogene, am Beispiel von  $17\beta$ -Estradiol.

Eine Beeinflussung des Hormonsystems durch Isoflavone kann auch unabhängig von den ER erfolgen. Antiestrogene Effekte werden u.a. durch die Induktion der SHBG (Sexhormon-bindendes Globulin) -Synthese in der Leber hervorgerufen, so dass vermehrt endogene Estrogene gebunden werden können und nicht mehr in der freien, aktiven Form vorliegen [180]. Darüber hinaus hemmen Isoflavone Enzyme der Estrogenbiosynthese, wie die Aromatase oder die  $17\beta$ - und  $3\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase [181,182,183]. Mögliche estrogene Wirkung der Isoflavone, aber nicht ihrer Glucoside, werden durch die Inhibierung der Bindung der endogenen Estrogene an SHBG hervorgerufen [184,185]. Außerdem hemmen Sulfat-Konjugate von DAI Enzyme des Phase-II-Metabolismus [186]. Auf diese Weise stehen mehr freie, aktive Estrogene zur Verfügung. Diese Wirkmechanismen wurden bisher nur in vitro nachgewiesen. Welche physiologische Relevanz diese Effekte in vivo besitzen, ist unklar, da Studien am Menschen bisher zu keinem einheitlichen Ergebnis kamen [187,188,189,190].

Daneben sind für Isoflavone, insbesondere für GEN, in vitro eine Reihe von hormonunabhängigen Wirkmechanismen beschrieben. Dazu zählen die Hemmung der Zellproliferation verschiedener Tumorzelllinien, die Induktion von Apoptose, die Hemmung der Angiogenese, die Hemmung der Topoisomerase II sowie die Inhibierung verschiedener Proteintyrosinkinasen, z.B. der EGF-Rezeptor-Kinase [173,191]. Es stellt sich jedoch die Frage, ob und welche dieser Effekte auch in vivo von Bedeutung sind. So wird beispielsweise in vitro eine Induktion der Apoptose in der Regel erst ab Konzentrationen von mehr als  $50\ \mu\text{M}$  beobachtet. Diese liegen weit über den physiologischen Plasmakonzentrationen (siehe Kap. 1.3.2). Auf der anderen Seite scheint eine Akkumulation in bestimmten Geweben nicht ausgeschlossen bzw. wurde vereinzelt bereits gezeigt (siehe Kap. 1.4.4). Darüber hinaus muss jedoch berücksichtigt werden, dass für MCF-7-Zellen (humane Brustkrebs-

zellen) nur bei hohen verwendeten Konzentrationen eine Proliferationshemmung, bei niedrigen (1 nM bis 10  $\mu$ M) hingegen eine Stimulierung der Zellproliferation nachgewiesen werden konnte [192,193].

### 1.6.2 Antioxidative Eigenschaften in vitro und in vivo

Im Organismus werden bei vielen biochemischen Prozessen aus Sauerstoff ständig freie Radikale, sog. reaktive Sauerstoffspezies, wie z.B. Hydroxyl- und Peroxylradikale, Superoxidradikalanionen, Wasserstoffperoxid und Singulett-Sauerstoff, gebildet. Der Organismus besitzt verschiedene antioxidative Schutzmechanismen, um sich vor diesen schädigenden Oxidantien zu schützen. Dabei wird zwischen enzymatischen und nicht-enzymatischen Mechanismen unterschieden [194,195]. Zu den enzymatischen zählen die Superoxid-dismutase oder die Katalase. Zu den nicht-enzymatischen gehören beispielsweise  $\alpha$ -Tocopherol, Ascorbinsäure (ASC) sowie die Gruppe der Carotinoide und Polyphenole [196]. Überwiegt der Anteil freier Radikale gegenüber den antioxidativen Abwehrmechanismen des Organismus kommt es zu oxidativem Stress [197]. Radikale sind in der Lage, DNA-Schäden hervorzurufen, Proteine zu denaturieren, Enzyme zu inaktivieren oder Lipide oxidativ zu modifizieren [198,199]. Diese Prozesse werden heute in Verbindung mit der Entstehung verschiedener Krankheiten gebracht. Zu diesen zählen u.a. Arteriosklerose, Autoimmunkrankheiten, Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts, des Nervensystems, chronische Entzündungsprozesse, Katarakt und Krebs [200,201,202,203,204].

Die antioxidative Wirkung der Isoflavone erfolgt u.a. über den Transfer von Elektronen bzw. Wasserstoffatomen sowie über die Komplexbildung von Metallionen [205,206,207,208]. Generelle strukturelle Eigenschaften, die die antioxidative Kapazität beeinflussen, sind: Die Methylierung an der Hydroxylgruppe am C-4', wie im Falle von FORM und BCA, reduziert die antioxidative Kapazität ebenso wie die Maskierung der Hydroxylgruppe am C-7 durch Glucose oder Phase-II-Konjugation. Die freie Hydroxylgruppe am C-4' liefert dabei einen größeren Beitrag zum antioxidativen Potenzial als die am C-7. Die bakteriellen Metabolite, wie DHD und O-DMA, zeigen in der Regel ähnliche antioxidative Eigenschaften wie die Muttersubstanzen. Ausnahme ist Equol, das trotz fehlender Doppelbindung in 2,3-Position und der fehlenden 4-Oxo-Gruppe eine höhere antioxidative Wirkung als DAI aufweist. Bei den oxidativen Metaboliten wurde bisher lediglich 8-OH-DAI untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass mit steigender Anzahl an Hydroxylgruppen im Molekül die antioxidative Wirkung zunimmt. Für GEN wurde gefunden, dass das Monoanion bessere Hydroxylradikal-fangende Eigenschaften als das neutrale Molekül aufweist, wobei bei physiologischem pH-Wert beide Formen aufgrund des  $pK_a$ -Werts von 7,2 vorliegen [209]. Arora et al. identifizierten die Strukturen der Reaktionsprodukte von GEN mit Peroxylradikalen [210]. Haupt-

produkte waren 3'-OH-GEN, das auch in vivo gebildet wird [104,120], sowie Addukte an der C-1'-Position von 4'-Oxo-GEN.

Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass Isoflavone durch Proteinbindung oxidative Reaktionen verhindern können. So besitzt eine der Protein-Komponenten der Lipoproteinen geringer Dichte (LDL) - das Apolipoprotein B - spezifische Bindungsstellen für Metallionen, die für die Oxidation der LDL essentiell sind. Isoflavone konkurrieren mit den Metallionen um die Bindung an das Protein und verhindern so die Oxidation [211,212,213]. Weitere Wirkmechanismen umfassen die verminderte Bildung von Stickstoffmonoxid durch Makrophagen, die Verhinderung der Collagen-induzierten Thrombozyten-Aggregation, die Erhöhung der intrazellulären Glutathion-Konzentration in Endothelzellen der Nabelschnurvene oder die Stimulierung der Aktivität antioxidativ wirkender Enzyme, wie die der Katalase oder der Superoxiddismutase, in den Makrophagen von RAW 264.7 Zellen [207,214,215]. Die meisten der in vitro Studien wurden lediglich mit den Soja-Isoflavonen DAI und GEN durchgeführt. Nur sehr wenige untersuchten die möglichen Wirkmechanismen der Metabolite. Des Weiteren muss in Betracht gezogen werden, dass Isoflavone in vivo in der Regel als Phase-II-Konjugate vorliegen (siehe Kap. 1.4.3.3) und so wiederum andere Wirkmechanismen durch Veränderungen bei beispielsweise der Löslichkeit, dem Molekulargewicht oder der Molekülgeometrie eine Rolle spielen.

Die Bedeutung für die in vivo Situation ist unklar. In zahlreichen Studien konnte nach Supplementierung mit Soja-Lebensmitteln oder -Extrakten für zwei bis sechs Wochen nachgewiesen werden, dass sowohl die antioxidative Kapazität des Plasmas als auch Marker des oxidativen Stresses (Oxidation der mehrfach ungesättigten Fettsäuren zu konjugierten Dien-Strukturen in den LDL sowie Bildung von Isoprostanen und Malondialdehyd bei der Lipidperoxidation, oxidative DNA-Schäden usw.) signifikant verringert sind [216,217,218,219,220]. Es gibt aber auch viele Gegenbeispiele, bei denen nach Supplementierung mit Soja-Lebensmitteln oder -Supplementen keine Reduktion der Marker für oxidativen Stress beobachtet werden konnte [219,221,222,223,224]. Außerdem muss die Frage gestellt werden, ob diese Bestimmungen, beispielsweise die  $\text{Cu}^{2+}$ -induzierte Lipidperoxidation ex vivo, gute Vorhersagen für oxidative Schäden in vivo, z.B. bei der Arteriosklerose, bieten. Allgemein wird angenommen, dass die Oxidation der LDL ein Risikofaktor für Arteriosklerose darstellt [225,226]. Anhand von Experimenten mit hyperlipämischen Kaninchen konnte gezeigt werden, dass sowohl  $\alpha$ -Tocopherol als auch Probucol, ein Cholesterin-senkendes Medikament, die Lag-Zeit der Lipidperoxidation ex vivo verlängern konnten. Bei der Reduktion der durch Arteriosklerose hervorgerufenen Läsionen in der Aorta war jedoch nur Probucol beteiligt [227,228]. Abschließend stellt sich nun die Frage, ob Isoflavone in der Lage sind, über antioxidative Effekte (oder auch andere Mechanismen,

siehe Kap. 1.6.1) die Entstehung von Krankheiten, beispielsweise Krebs, zu verhindern oder deren Verlauf zu verzögern, worauf in den folgenden Kapiteln eingegangen wird.

### **1.6.3 Hormonabhängige Krebsarten**

Aus internationalen Krebsstatistiken geht hervor, dass hormonabhängige Krebserkrankungen wie Brust- und Prostatakrebs in asiatischen Ländern, in denen Soja Bestandteil einer traditionellen Ernährung ist, weitaus seltener auftreten als in den westlichen Industrienationen. In den westlichen Industrieländern (z. B. den Niederlanden, Deutschland, Großbritannien, Nordamerika oder Australien) erkranken von je 100000 Frauen und Männern mehr als 80 pro Jahr an Brust- bzw. Prostatakrebs, in Asien sind es jeweils weniger als 20 [229]. So beträgt die Inzidenz, bis zum Alter von 74 Jahren an Brustkrebs zu erkranken, bei weißen Frauen aus San Francisco (USA) 11,9 % und bei Frauen aus Kangwha (Korea) nur 0,76 % [230]. Epidemiologische Studien führen dies u.a. auf die Ernährung zurück. Ein großer Unterschied in der Ernährung der Asiaten verglichen mit der der Bevölkerung der westlichen Industrienationen ist der Verzehr von Sojaprodukten, die reich an Isoflavonen sind (siehe Kap. 1.2.1). Zahlreiche epidemiologische Studien konnten einen Zusammenhang zwischen hohem Sojakonsum und einer erniedrigten Brustkrebsrate zeigen [231,232].

Risikofaktoren für die Entwicklung von Brustkrebs sind das frühe Eintreten der Menstruation, das späte Einsetzen der Menopause, keine oder späte Erst-Schwangerschaften sowie bei postmenopausalen Frauen ein hoher Estrogen-Spiegel [233]. Die präventive Wirkung der Isoflavone wird vor allem darauf zurückgeführt, dass sie antiestrogene Wirkung besitzen (siehe Kap. 1.6.1). Beispielsweise weisen asiatische Frauen einen längeren Menstruationszyklus auf [173], so dass die lebenslange Exposition gegenüber endogenen Estrogenen verringert ist. Auch in einer Interventionsstudie konnte gezeigt werden, dass der Verzehr von 45 mg Isoflavonen pro Tag in Form von texturiertem Sojaprotein über einen Monat eine Verlängerung des Menstruationszyklus, insbesondere der folliculären Phase, nach sich zog [46]. Duncan et al. konnten dieses Ergebnis in einer Interventionsstudie über drei Monate allerdings nicht bestätigen [187]. Darüber hinaus gilt eher ein unregelmäßiger als ein langer Menstruationszyklus als Schutzfaktor vor Brustkrebs [173]. Auch die Wirkung von Isoflavonen auf andere Brustkrebs-Biomarker in vivo, beispielsweise einer vermehrten SHBG-Bildung (siehe Kap. 1.6.1) oder einer verringerten  $16\alpha$ -Hydroxyestron-Konzentration - einem toxischen Metaboliten der endogenen Estrogene - im Plasma und Urin, sind nicht eindeutig [187,188,189,190,234,235,236].

Weiterhin scheint der Zeitpunkt der Sojaeinnahme eine Rolle zu spielen. Tierstudien sowie epidemiologische Studien weisen auf einen Zusammenhang zwischen einer Isoflavonaufnahme im Kindesalter und einem reduzierten Brustkrebsrisiko im Erwachsenenalter hin.

Wu et al. konnten zeigen, dass ein hoher Sojakonsum in der Jugend zu einem verringerten Brustkrebsrisiko führt [237]. Dies kann zumindest zum Teil die Befunde aus Migrationsstudien erklären, dass bei asiatischen Emigranten und ihren Nachkommen sich das Krebsmuster innerhalb von zwei Generationen an das des Einwanderungslands angleicht [238,239]. In Tierstudien konnte gezeigt werden, dass die Inzidenz und Wachstumsrate von durch Dimethylbenzanthracen- sowie N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff-induzierten Mammatumoren durch die Gabe von mit Soja-supplementiertem Futter oder die des isolierten Isoflavons GEN signifikant verringert sind, wenn diese neonatal oder vor Einsetzen der Pubertät stattfindet. Erfolgt die Verfütterung einer Isoflavon-haltigen Diät dagegen erst im Erwachsenenalter, ist die Schutzwirkung nicht mehr vorhanden [240,241,242]. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass GEN aufgrund seiner estrogenen Wirkung eine früh- bzw. vorzeitige Ausdifferenzierung des Brustdrüsengewebes induziert, welches dann auf chemische Kanzerogene weniger empfindlich reagiert.

In anderen tierexperimentellen Studien wurde die Wirkung von Isoflavonen auf bereits vorhandene ER-positive Tumorzellen untersucht und gezeigt, dass das Wachstum der Tumorzellen durch Isoflavone stimuliert und beschleunigt werden kann. Wurden athymischen Nacktmäusen weibliche Brustkrebszellen (MCF-7) implantiert und die Mäuse anschließend mit Sojaproteinisolat oder einer äquivalenten Menge an isoliertem GEN gefüttert, kam es zu einer verstärkten Proliferation der MCF-7-Zellen im Vergleich zur Isoflavon-freien Futterkontrolle. Die in diesen Tierversuchen erreichten Plasmakonzentrationen lagen dabei mit 1 bis 2  $\mu\text{M}$  in einem Konzentrationsbereich, der bei Verzehr von Nahrungsergänzungsmitteln erreicht werden kann (siehe Kap. 1.3.2) [243,244,245]. Ferner wurde die Rolle von GEN in der Initiationsphase der Brustkrebsentstehung im Tierexperiment untersucht. GEN-supplementiertes Futter bewirkte bei vorhandenen, chemisch durch N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff-induzierten Brusttumoren in ovariectomierten Ratten ein schnelleres Wachstum dieser Tumore im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die endogenen Estradiol-Spiegel der Ratten nach Ovariectomie waren dabei mit denen postmenopausaler Frauen zu vergleichen. Die im Plasma der Ratten erzeugte GEN-Konzentration lag bei 3,4  $\mu\text{M}$  [246]. Dies ist in einem Konzentrationsbereich, der auch beim Menschen, vor allem bei der Verwendung hochdosierter Isoflavonpräparate, erreicht werden kann. Eine Einmalgabe von beispielsweise 4 mg pro kg Körpergewicht an GEN bzw. DAI führt zu Plasmaspiegeln von 7 bis 12  $\mu\text{M}$  [49,53,54]. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde ferner gezeigt, dass die biologische Aktivität von Isoflavonen in isolierter Form nicht mit der Wirkung dieser Verbindungen im komplexen Lebensmittel gleichgesetzt werden kann. Untersucht wurde die estrogenen Wirkung eines wenig verarbeiteten Soja-Lebensmittels (Sojamehl) im Vergleich zu einem Sojaextrakt und dem isolierten Soja-Isoflavon GEN. Die verschiedenen Soja-Produkte wurden bezüglich ihres GEN-Gehalts normiert und an athymische, ovariectomierte Nackt-

mäuse mit implantierten MCF-7-Zellen verfüttert. Dabei zeigte die Verfütterung des Sojamehls keinen Einfluss auf das Wachstum der Tumorzellen, während sowohl der Sojaextrakt als auch das isolierte Isoflavon GEN eine Proliferation der MCF-7-Zellen bewirkten [247]. Auch in klinischen Studien konnten Petrakis et al. und Hargreaves et al. zeigen, dass eine vermehrte Aufnahme an Isoflavonen einen estrogenen Stimulus auf das Brustdrüsengewebe prä- und postmenopausaler Frauen ausübt. Nach sechsmonatiger Intervention mit 38 mg GEN in Form eines Sojagetränks wurden bei 30 % der Frauen hyperplastische Zellen im Brustgewebe gefunden [248]. In der anderen Studie wurde beobachtet, dass nach 14-tägiger Aufnahme von 45 mg Isoflavonen die Expression des Estrogen-sensitiven Proteins Presenilin 2 (pS2) im Brustgewebe erhöht war [142]. Darüber hinaus konnten Grace et al. in einer Kohortenstudie an 333 Frauen im Alter von 45 bis 75 Jahren einen Zusammenhang zwischen einem erhöhten Brustkrebsrisiko und einer vermehrten Isoflavon-Ausscheidung im Urin feststellen [249]. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Aufnahme hoher Dosen an Isoflavonen für Frauen mit Brustkrebs, präkanzerogenen Veränderungen in der Brust sowie mit genetischer Disposition kontraindiziert sein könnte.

Die Schutzwirkung von Isoflavonen hinsichtlich Prostatakrebs ist vor allem in unterschiedlichen Tiermodellen untersucht worden. Die Verfütterung eines Sojaproteinisolats führte bei Nacktmäusen mit Immundefizienz mit implantierten LNCaP-Prostatakrebszellen zu einem verzögerten Wachstum der Tumorzellen [250]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass mit GEN supplementiertes Futter die Entwicklung chemisch induzierter Prostatatumore inhibierte [251]. Analoge Ergebnisse wurden in einem transgenen Mausmodell für Prostatakrebs, bei dem Mäuse spontan metastasierende, wenig differenzierte Prostatatumore entwickeln, erhalten [252,253]. Dies könnte erklären, warum bei asiatischen Männern gerade die Inzidenz an aggressiven, wenig differenzierten Prostatatumoren sehr viel niedriger ist als bei Männern in den westlichen Industrienationen, während die Häufigkeit latenter, klinisch nicht in Erscheinung tretender Prostatatumore in beiden Bevölkerungsgruppen ähnlich ist [229]. Als möglicher Mechanismus wird die Induktion von Apoptose diskutiert, da beispielsweise in einer klinischen Studie gezeigt werden konnte, dass bei Männern mit Prostatakrebs die Apoptoserate in den Tumorzellen mit niedriger bis mittlerer Aggressivität nach Aufnahme von 160 mg Isoflavonen in Form eines Rotklee-Extrakts für 20 Tage signifikant erhöht war [254]. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die in den Studien verwendeten Dosen sehr hoch sind und dass die Ergebnisse aus Fallkontroll- und Kohortenstudien keine eindeutigen Hinweise auf eine protektive Wirkung von Isoflavonen in Bezug auf Prostatakrebs liefern [255,256,257,258,259].

Adverse Effekte wurden bisher lediglich in einer Studie beobachtet, bei der die Gabe von Sojaproteinisolat im Futter bei implantierten Androgen-unabhängigen Prostatakrebszellen (AT-1) im Rattenmodell keinen Einfluss auf das Tumorstadium hatte bzw. in der hohen

Konzentration sogar eine beschleunigte Proliferation der Zellen induzierte [260]. Demnach gibt es Hinweise dafür, dass Isoflavone das Wachstum Androgen-abhängiger Prostatakrebszellen in frühen Stadien hemmen können, während eine Schutzwirkung bei fortgeschrittenen und Androgen-unabhängigen Tumoren auf der Grundlage der bisher vorliegenden Daten fraglich ist.

Auch der Einfluss der Isoflavone auf weitere Krebsarten, beispielsweise des Endometriums, wurde untersucht. Newbold et al. konnten zeigen, dass eine neonatale Exposition von CD-1-Mäusen mit GEN (50 mg pro kg Körpergewicht und Tag subkutan) histomorphologische Veränderungen im Uterus verursachte, die zu einem späteren Zeitpunkt zu Adenokarzinomen führten [261]. Beim Menschen ergaben sich bisher aber keine Hinweise für eine solche Wirkung [262,263,264].

Die Effekte der Isoflavone auf weitere Krebsarten werden in Referenz [148] näher beschrieben.

### **1.6.4 Herzkreislauferkrankungen**

Die Ähnlichkeit der Isoflavone mit endogenen Estrogenen (siehe Kap. 1.6.1), die hypocholestämisches Effekte haben [265], sowie die in asiatischen Ländern seltener auftretenden Herzkreislauferkrankungen [266], führte zu der Schlussfolgerung, dass Isoflavone vor koronaren Herzerkrankungen schützen können.

In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von Sojaprotein (meist 20 bis 60 g pro Tag für vier bis zwölf Wochen mit Isoflavongehalten zwischen 50 und 150 mg) zu einer Erniedrigung des LDL-Cholesterins, der Serum-Triglyceride und in einzelnen Studien zu einer Erhöhung des HDL-Cholesterins führte, während die Gabe von isolierten Isoflavonen in äquivalenter Dosis in den meisten Studien keine Verbesserung des Serum-Lipoprotein-Profiles bewirkte [267,268,269,270,271,272,273]. Es ergaben sich in einigen Studien Hinweise dafür, dass Isoflavone die Oxidationsresistenz von LDL erhöhen (siehe Kap. 1.6.2). Darüber hinaus konnte anhand von Tierversuchen und einer Kohortenstudie nachgewiesen werden, dass die Aufnahme von Isoflavonen vor Arteriosklerose schützt [274,275,276]. Der maximale kardioprotektive Effekt ist dennoch nur durch Aufnahme des intakten Sojaproteins zu erreichen und kann nur eingeschränkt auf den Gehalt an Isoflavonen zurückgeführt werden. Auf der Grundlage dieser Studien wurde 1999 von der U.S. Food and Drug Administration ein „Health Claim“ erlaubt, der Sojaprotein (und nicht Isoflavonen) positive Eigenschaften hinsichtlich der Prävention von koronaren Herzerkrankungen bestätigt.



### **1.6.5 Klimakterische Beschwerden und Osteoporose**

Klimakterische Beschwerden und Osteoporose werden durch eine verringerte Konzentration an endogenen Estrogenen hervorgerufen. In epidemiologischen Studien konnte gezeigt werden, dass in asiatischen Ländern die Inzidenz für diese Beschwerden niedriger als in den westlichen Industrieländern ist [277,278]. Da, wie bereits in Kap. 1.6.1 erwähnt, Isoflavone estrogenen Wirkung zeigen, werden sie als Alternative zur Hormonersatztherapie diskutiert.

Klinische Studien zum Einfluss der Isoflavone auf klimakterische Beschwerden wurden an Frauen in der Peri- und Postmenopause durchgeführt, die Isoflavone in einer Dosierung zwischen 50 und 120 mg pro Tag in Form von Sojaproteinisolat oder Sojaextrakten meist über einen Zeitraum von drei bis sechs Monaten aufnahmen. In der Mehrzahl der Studien konnte keine oder keine signifikante Abnahme der typischen klimakterischen Beschwerden, wie Hitzewallungen und Schweißausbrüche, im Vergleich zur Placebo-Behandlung beobachtet werden [279,280,281]. In wenigen Studien wurden die Beschwerden geringfügig reduziert [267,282,283,284]. Als Problem erwies sich, dass häufig bereits in der Placebogruppe eine 20 bis 30%ige Abnahme der Symptome festzustellen war, was das Erkennen eines möglichen Soja- oder Isoflavon-spezifischen Effekts erschwert.

Auch Aussagen zur Osteoporoseprävention durch Soja- bzw. Isoflavonkonsum gestalten sich schwierig. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind lediglich Daten aus Studien verfügbar, die sich über einen relativ kurzen Zeitraum von drei bis zwölf Monaten erstreckten. Diese führten zu keinem einheitlichen Ergebnis und lassen deswegen keine allgemeingültigen Aussagen zu. Bei Frauen vor der Menopause beeinflusste eine Isoflavonaufnahme in der Regel die Knochendichte nicht, während diese bei postmenopausalen Frauen in Abhängigkeit von der eingesetzten Dosis zunahm [285,286,287,288,289,290,291]. Eine positive Veränderung von biochemischen Parametern des Knochenstoffwechsels (u.a. Anstieg der Serum-Osteokalzinkonzentration, Rückgang der N-Telopeptide im Harn) wurde ebenfalls festgestellt [291,292,293]. Da die gemessenen Effekte aber sehr gering waren, stellt sich die Frage nach der klinischen Relevanz. Auf der Grundlage der derzeit vorliegenden Daten ist es deshalb verfrüht, von einer Schutzwirkung der Isoflavone vor Osteoporose zu sprechen. Zur endgültigen Beantwortung dieser Frage sind weitere Studien mit größerem Probandenkollektiven und längeren Untersuchungszeiträumen notwendig.

### 1.6.6 Weitere Wirkungen

Die Schilddrüse stellt ein weiteres Organ dar, auf welches Isoflavone Effekte ausüben. Eine retrospektive Studie an Kindern mit autoimmunbedingten Schilddrüsenerkrankungen lässt auf einen Zusammenhang mit der Verwendung von Sojanahrung im Säuglingsalter schließen [294]. Bei gesunden Erwachsenen, die über drei Monate täglich 30 g Soja aufnahmen, wurde bei der Hälfte der Probanden eine reversible Kropfbildung und eine geringe Erhöhung des TSH-Spiegels diagnostiziert. Darüber hinaus traten bei diesen Probanden hypometabolische Symptome auf [295]. In Ratten konnte ferner gezeigt werden, dass die Gabe von GEN mit dem Futter dosisabhängig die Aktivität der thyroidalen Peroxidase hemmt [296]. Nach Untersuchungen von Divi et al. ist die goitrogene Wirkung darauf zurückzuführen, dass Isoflavone Substrate der thyroidalen Peroxidase sind, d.h. selbst iodiert werden können, und damit als kompetitive Substrate wirken. Außerdem wird bei Iodidmangel von einer direkten Hemmung des Enzyms durch kovalente Bindung der Isoflavone berichtet. Die halbmaximale Hemmung des Enzyms ( $IC_{50}$ ) wird bereits bei einer GEN-Konzentration von 1  $\mu$ M bzw. bei DAI von 5  $\mu$ M erreicht und ist damit physiologisch relevant [297].

Das Immunsystem stellt ein weiteres Organsystem dar, welches durch Isoflavone aufgrund der Expression der ER in den Immunzellen beeinflusst werden kann. In vitro-Ergebnisse zeigen, dass hohe GEN-Konzentration von mehr als 10  $\mu$ M zu einer Hemmung von Immunfunktionen führen, während physiologische Konzentrationen an DAI (0,1 bis 10  $\mu$ M) die Lymphozytenproliferation stimulieren [298,299]. In den bisher durchgeführten Tierversuchen wurden sowohl suppressive als auch stimulierende Effekte beobachtet [300,301,302]. Bei jungen Mäusen mit Ovariectomie wurde bei Ernährung auf Sojabasis (Plasmakonzentrationen 1 bis 4  $\mu$ M) eine Thymusatrophie beobachtet. Die Effekte traten sowohl ER-vermittelt als auch ER-unabhängig auf, da sie nur zum Teil durch den ER-Antagonisten ICI 182,780 gehemmt werden konnten [303]. In einer Humanstudie mit Säuglingen, die über mindestens die ersten zwei Lebensmonate ausschließlich mit Sojamilch ernährt wurden, wurden jedoch keine signifikante Effekte im Phänotyp verschiedener Immunzellen im Vergleich zu gestillten Säuglingen gefunden [304,305].

## 2 Problemstellung

Isoflavone sind sekundäre Pflanzenstoffe mit estrogenen Wirkung und werden überwiegend durch den Verzehr von Soja-haltigen Lebensmitteln aufgenommen. Aufgrund epidemiologischer Studien werden diesen Verbindungen verschiedene gesundheitsfördernde Wirkungen zugeschrieben (siehe Kap. 1.6). Während in asiatischen Ländern mit traditioneller Ernährungsweise vorzugsweise fermentierte Sojaprodukte verzehrt werden, die Isoflavone in freier Form, d. h. als Aglykone, enthalten, sind in westlichen Industrieländern vor allem native Sojaprodukte, z.B. Nahrungsergänzungsmittel, im Handel, bei denen die Glucoside dominieren. Bisher ist nicht abschließend geklärt, welchen Einfluss die Zuckerkonjugation auf die Bioverfügbarkeit und den Metabolismus hat. Des Weiteren sind die molekularen Mechanismen der Aufnahme im Darm weitgehend unbekannt. Man geht davon aus (siehe Kap. 1.4.2), dass Isoflavone wegen ihrer Lipophilie und ihres geringen Molekulargewichts durch passive Diffusion nach vorangehender Hydrolyse der Glucoside im Darm resorbiert werden, wobei die Resorption hauptsächlich im Dün- und Dickdarm stattfindet. Ob und welche aktiven Transportproteine beteiligt sind und ob Isoflavone - wie einige Chemotherapeutika - aktiv aus Zellen herausgeschleust werden, ist bisher wenig untersucht. Darüber hinaus ist bisher nichts über die Aufnahmemechanismen in andere Körperzellen bekannt, die mit Isoflavonen ständig in Kontakt stehen, beispielsweise den mononukleären Zellen des peripheren Bluts. Eine andere offene Frage ist, ob die in Kap. 1.6 diskutierten positiven Effekte, durch die entsprechenden Muttersubstanzen oder die gebildeten Metabolite hervorgerufen werden, da die biologische Aktivität der Isoflavon-Metabolite sehr wenig untersucht ist.

Ziel dieser Arbeit ist es, die molekularen Mechanismen der Aufnahme der Isoflavon-Aglykone Daidzein, Genistein und Glycitein im Zellkulturmodell an unterschiedlichen Zellarten zu untersuchen. Dabei sollen sowohl Konzentrations- als auch zeitabhängige Experimente bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt werden, um Aufschluss über die Art des Transportprozesses zu bekommen. Anschließend sollen aktive Transporter gehemmt werden, um so Aussagen über mögliche beteiligte Proteine zu machen.

Darüber hinaus soll der Einfluss der Zuckerkonjugation auf die Bioverfügbarkeit und Metabolisierung des Isoflavons Daidzein in einer randomisierten Doppelblindstudie im Cross-Over-Design geklärt werden. Das Cross-Over-Design dient dazu, den Einfluss interindividueller Variation zu minimieren. Mit Hilfe der Bestimmung der Konzentrationen an Daidzein und seiner Metabolite in Plasma und Urin sollen die biokinetischen Kenndaten, die Wiederingang im Urin sowie ein potenzieller Einfluss auf den Metabolismus bestimmt werden. Darüber hinaus soll untersucht werden, ob die Plasmakonzentration an Daidzein der Konzentration in den mononukleären Zellen des peripheren Bluts entspricht und inwieweit ein

Zusammenhang zwischen der antioxidativen Kapazität des Plasmas und der Plasmakonzentration an Daidzein und seinen Metaboliten besteht.

Die antioxidative Kapazität der einzelnen Isoflavone und ihrer Metabolite soll dazu zusätzlich in vitro mit drei unterschiedlichen Testsystemen untersucht werden. Dabei soll geklärt werden, ob die Metabolite im Vergleich zu den Ausgangsubstanzen ein unterschiedliches antioxidatives Potenzial besitzen, und welche Wirkmechanismen der antioxidativen Kapazität der Isoflavone zugrunde liegen.

### 3 Experimenteller Teil

#### 3.1 Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

##### 3.1.1 Geräte

Zellkultur:	Autoklav 23 (Melag) Begasungsbrutschrank BB6220 Baureihe 6000 (Heraeus) Einfriergefäß (Nalge Company) Lichtmikroskop DM LS (Leica) Luminometer Luminoskan Ascent (Labsystems) Phasenkontrast-Umkehrmikroskop Eclipse TS100 (Nikon) Sterile Werkbank Lamin Air HB2472 (Heraeus) Zellzählgerät Coulter Counter Modell Z2 (Beckman Coulter)
Zelluläre Aufnahme:	Zellzählgerät Casy <sup>®</sup> 1 TT (Schärfe System) Mikrotiterplatten-Lesegerät Thermomax (Molecular Devices) Vakuum-Zentrifuge Maxy dry plus (Heto) Ultraschallbad Transsonic T570 H (Elma)
Humanstudie:	Festphasenextraktions (SPE)-Station VAC-ELUT (Analytisch International) Vakuum-Pumpe für SPE-Station, Typ N035 (KNF Neuberger)
Antioxidative Kapazität:	Spektralfluorimeter SpectraFluor Plus (Tecan) Spektralphotometer Lambda 15 (Perkin-Elmer) Ultrazentrifuge Optima XL-100K (Beckman)
pH-Messgerät MP220 (Mettler-Toledo)	
Waagen:	Digitalwaage 1265MP (Sartorius) Feinanalysenwaage AE136 (Mettler)
Wasserbäder:	W6 (P-D Industriegesellschaft) (2 - 6 L, 25 - 100 °C) WB22 (Memmert) (10 - 25 L, 25 - 100 °C)
Zentrifugen:	Tischzentrifuge CR422 (Jouan) Tischzentrifuge DW-41BR-230 (Qualitron Inc.) Mikroliterzentrifuge Z160M (Hermle)
HPLC-System 1:	Analytisches Hochdruckgradientensystem von Shimadzu mit Systemcontroller SCL-10A VP, zwei Pumpen LC-10AT VP, Autoinjektor SIL-10AD VP, DAD-Detektor SPD-M10 VP und Shimadzu Class Vp 6.12 zur Datenverarbeitung

HPLC-System 2:	Analytisches Hochdruckgradientensystem HPLC1100 von Agilent Technologies mit binärer Pumpe G1312A, Degasser G1322A, Autoinjektor G1329, Säulenofen G1316A, DAD-Detektor G1315A und massenselektiven Detektor G1946 mit API-ES Ionisationskammer, die Auswertung erfolgte mittels HP Chem Station, Version A.06.03
HPLC-System 3:	Analytisches Niederdruckgradientensystem von Shimadzu mit Systemcontroller SCL-10A VP, Pumpe LC-10AT VP, Niederdruckgradientenfluss-Kontrolleinheit FCV-10AL, Degasser DGU-14A VP, Autoinjektor SIL-10AD VP, Säulenofen CTO-10AS VP, DAD-Detektor SPD-M10 VP und Shimadzu Class Vp 6.12 zur Datenverarbeitung
GC/MS-System:	Anlage von Agilent Technologies mit GC HP6890, Autoinjektor HP 7683 und Quadrupol MS-Detektor HP 5973 mit EI Ionenquelle, die Auswertung erfolgte mittels HP Chem Station, Version B.01.00

### 3.1.2 Chemikalien

Standards:	L(+)-Ascorbinsäure (ASC) (Fluka) β-Carotin (Fluka) β-Cryptoxanthin (Roth) Daidzein (DAI) (TCI Tokyo Casei) Daidzin (Daidzein-7-O-β-D-Glucosid) (DG) (Prof. Dr. P. Winterhalter, Uni Braunschweig, Braunschweig) 3,4,8- <sup>13</sup> C-Daidzein (3,4,8- <sup>13</sup> C-DAI) (Dr. N. Botting, University of St. Andrews, S. Andrews, UK) Dihydrodaidzein (DHD) (Plantech) Dihydrogenistein (DHG) (Plantech) Equol (Plantech) Genistein (GEN) (TCI Tokyo Casei) Glycitein (GLY) (LC Laboratories) 3'-Hydroxydaidzein (3'-OH-DAI) (Plantech) 6-Hydroxydaidzein (6-OH-DAI) (Plantech) 8-Hydroxydaidzein (8-OH-DAI) (Plantech) 3'-Hydroxygenistein (3'-OH-GEN) (Plantech) 6'-Hydroxy-O-demethylangolensin (6'-OH-ODMA) (Plantech) Lutein (Roth) Lycopin (BASF AG, Ludwigshafen) 2-Methoxy-7-hydroxyisoflavon (2-OCH <sub>3</sub> -7-OH-IF) (Prof. Dr. S. Kulling, Universität Potsdam, Nuthetal) O-Demethylangolensin (O-DMA) (Plantech)
------------	---

	1,2,3- <sup>13</sup> C-O-Demethylangolensin (1,2,3- <sup>13</sup> C-ODMA) (Dr. N. Botting, University of St. Andrews, S. Andrews, UK)
	Quercetin (QUER) (Roth)
	α-Tocopherol (Fluka)
	Zeaxanthin (Roth)
Zelluläre Aufnahme:	Bio-Rad DC Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories)
	Rinderserumalbumin (BSA) (Fluka)
	Casyton (isotone Salzlösung) (Schärfe System)
	5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) (Sigma)
	EDTA-Dinatriumsalz (Sigma)
	Glutathion-Reduktase (aus Bäckerhefe), 299 U/mL (Sigma)
	Glutathiondisulfid (GSSG) (Sigma)
	Lysereagenz Zap-Oglobin Lytic Reagent (Beckman Coulter)
	MK 571 (Cayman Chemical Company)
	reduziertes β-Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) (Fluka)
	Spülflüssigkeit Isoton II (Beckman Coulter)
	Tetrabutylammoniumphosphat (Fluka)
	Verapamil (Sigma)
Humanstudie:	Combur-Test <sup>®</sup> , Teststreifen zur Bestimmung von Leukozyten, Nitrit, pH, Protein, Glucose, Ketone, Urobilinogen, Bilirubin und Blut im Urin (Roche Diagnostics GmbH)
	2,4-Dinitrophenylhydrazin (Merck)
	D-Glucarsäure-1,4-lacton (Sigma)
	β-Glucuronidase Typ B-3 (aus Rinderleber), 2630000 Fishman U/g (Sigma)
	β-Glucuronidase Typ H-1 (aus Helix Pomatia), 449000 U/g (Sigma)
	Hautantiseptikum (alkoholisch) Neo-Kodan (Schülke & Mayr)
	Kupfersulfat (Fluka)
	Natriumchlorid (Sigma)
	konzentrierte Schwefelsäure (Merck)
	Sulfatase Typ H-1 (aus Helix Pomatia), 15500 U/g (Sigma)
	Sulfatase Typ V (aus Patella vulgata), 34 U/mg (Sigma)
	Thioharnstoff (Merck)
	Trichloressigsäure (VWR)
	Triethylamin (Fluka)
	Triglyceride GPO-PAP (Roche Diagnostics GmbH)

Antioxidative Kapazität:	2,2'-Azo-bis-(2-amidinopropan) (ABAP) (Polysciences Inc.) 2,6-Di-tert.-Butylhydroxytoluol (BHT) (Sigma) Chelex-100 Ionenaustauscher-Harz (Bio-Rad) Cholesterin CHOD-PAP (Roche Diagnostics GmbH) Kaliumbromid (Fluka) Kupferchlorid (Merck) Natriumdodecylsulfat (SDS) (Sigma) R-Phycoerythrin (PE) (Molecular Probes) 1,1,3,3-Tetraethoxypropan (Fluka) 2-Thiobarbitursäure (VWR) Trifluoressigsäure (VWR) Triton X-100 (Fluka) Trolox (Sigma)
Lösungsmittel:	Aceton (Roth) <i>N,O</i> -Bis-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA) (Fluka) Dichlormethan (VWR) Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma) Essigsäureethylester (EA) (Roth) Ethanol (Roth) Hexan (Roth) Methanol (Roth) Tetrahydrofuran (VWR)
Fließmittel:	Acetonitril (Roth) Ameisensäure (Roth) tert.-Butylmethylether (Riedel-de-Haën) Methanol (Roth)
Gase:	Helium (Messer Griesheim) Stickstoff (Messer Griesheim)



### 3.1.3 Reagenzien für die Zellkultur

Dimethylsulfoxid Hybri-Max<sup>®</sup>, steril filtriert (Sigma)

Fötales Kälberserum (FCS) (Invitrogen Corporation)

L-Glutamin, 200 mM (Invitrogen Corporation)

Kulturmedien: D-MEM mit 4500 mg/L Glucose und 584 mg/L L-Glutamin (Invitrogen Corporation)

RPMI 1640 (Invitrogen Corporation)

MEM HEPES Modifikation (Sigma)

Lymphozytenseparationsmedium, steril filtriert (PAA Laboratories)

MEM nicht-essentielle Aminosäuren (Invitrogen Corporation)

Mycoplasmen-Nachweis MycoAlert<sup>™</sup> (Cambrex)

Penicillin/Streptomycin (5000 U/mL Penicillin G, 5000 µg/mL Streptomycin-Sulfat) (Invitrogen Corporation)

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS) (Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> frei) (Invitrogen Corporation)

Trypanblau-Lösung, 0,4%ig (Sigma)

Trypsin-Lösung, 0,25%ig mit 1 mM EDTA (Invitrogen Corporation)

### 3.1.4 Zelllinien

Caco-2-Zellen (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)

V79-Zellen (wurden freundlicherweise von Prof. Dr. M. Metzler, Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie der Universität Karlsruhe, Karlsruhe, zur Verfügung gestellt)

### 3.1.5 Verbrauchsmaterialien

Accuvette (Beckman Coulter)

Braunüle Vasofix<sup>®</sup> (B. Braun Melsungen AG)

Cellcountergefäße (22 × 65 mm) (Schärfe System)

Gewebekulturflaschen mit kontaminationssicherem Verschluss in den Größen 25 und 75 cm<sup>2</sup> (Costar Corning)

Kryoröhrchen (Nalgene)

Küvetten, 1,5 mL Halbmikro, PS (Brand)

6-Loch Gewebekulturplatten, steril (Nalge Nunc International)

96-Loch-Platten (Greiner Bio-One)

96-Loch-Platten (steril) (Costar Corning)

Mandrin-Vasofix<sup>®</sup>-Vasocan-Braunüle (B. Braun Melsungen AG)

S-Monovette<sup>®</sup>, 9 mL K3E, 1,6 mg EDTA / mL Blut (Sarstedt)

S-Monovette<sup>®</sup>, 4,5 mL Z, zur Serumgewinnung (Sarstedt)

Multi-Adapter für S-Monovette<sup>®</sup> (Sarstedt)

Neubauer-Zählkammer (Hämocytometer) (Optik Labor)

PD-10 Säulen Sephadex<sup>™</sup> G-25 M (Amersham Biosciences Europe GmbH)

Reaktionsgefäße, 1,5 und 2 mL (Eppendorf)

Reaktionsgefäße, 15 und 50 mL (Greiner)

SPE-Kartuschen Sep-Pak<sup>®</sup> Plus C18 (Waters)

Ultrazentrifugenröhrchen Open top ultra clear 6,5 mL (Konrad Beranek)

Venenpunktionsbesteck Venofix<sup>®</sup> (B. Braun Melsungen AG)

Weichgelatinecapseln (Pharmapol-Arzneivertrieb)

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Zellkultivierung**

#### **3.2.1.1 V79-Zellen**

V79-Zellen sind immortalisierte Lungenfibroblasten des männlichen chinesischen Hamsters. Diese Zelllinie wird häufig für toxikologische Untersuchungen eingesetzt, da sie sich durch einen stabilen Karyotyp, eine hohe Klonierungseffizienz und eine kurze Populationsverdoppelungszeit von etwa 12 h auszeichnet [306].

Die Kultivierung von V79-Zellen erfolgte in D-MEM (1 % Penicillin/Streptomycin; 10 % FCS) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank. Wegen ihres schnellen Wachstums mussten V79-Zellen alle zwei bis drei Tage subkultiviert werden (siehe Kap. 3.2.1.4).

#### **3.2.1.2 Caco-2-Zellen**

Bei Caco-2-Zellen handelt es sich um menschliche Adenokarzinomzellen, die aus einem Primär-Dickdarmtumor eines 72-jährigen Kaukasiers gewonnen wurden. Caco-2-Zellen besitzen die Fähigkeit, Differenzierungsmerkmale reifer Darmzellen, beispielsweise von Enterozyten und Mucuszellen, zu exprimieren. Aus diesem Grund werden sie vorwiegend für Experimente, die die Funktion und Differenzierung von Darmzellen betreffen, eingesetzt [307].

Die Kultivierung fand in MEM (1 % Penicillin/Streptomycin; 10 % FCS; 1 % MEM nicht-essentielle Aminosäuren, 1 % L-Glutamin) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank statt. Wegen ihrer langsamen Verdoppelungszeit (etwa 80 h) wurden die Zellen einmal wöchentlich subkultiviert (siehe Kap. 3.2.1.4), jeden zweiten Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

#### **3.2.1.3 Humane mononukleäre Zellen des peripheren Bluts**

Als Ausgangsmaterial zur Isolierung humaner mononukleärer Zellen des peripheren Bluts (PBMC) (Lymphozyten, Monozyten und natürliche Killerzellen) diente mit EDTA anti-coaguliertes Blut von vier weiblichen und zwei männlichen Spendern (zwischen 21 und 28 Jahren, zur Zeit der Blutabnahme gesund) (siehe Kap. 3.2.1.7). Die isolierten PBMC wurden in RPMI 1640-Medium (1 % Penicillin/Streptomycin; 10 % FCS; 1 % L-Glutamin) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank nicht länger als 24 h kultiviert.

#### **3.2.1.4 Subkultivierung der Zellen**

Um optimale Bedingungen zu gewährleisten, müssen V79-Zellen vor und Caco-2-Zellen bei Erreichen des konfluenten Stadiums subkultiviert werden.

Das verbrauchte Medium wurde aus den 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen mit einer Pasteurpipette abgezogen und Mediumreste durch zweimaliges Spülen mit PBS (Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> frei) entfernt. Caco-2-Zellen wurden anschließend mit 5 mL PBS für 5 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach Zugabe von 2 mL 0,25%iger Trypsin/EDTA-Lösung wurden V79-Zellen für 2 min, Caco-2-Zellen für 5 min zur Ablösung in den Brutschrank gestellt. Das Ablösen der Zellen wurde gegebenenfalls durch Klopfen der Flasche an den Handballen unterstützt. Die abgelösten Zellen wurden in 10 mL frischem Medium resuspendiert und 5 min bei 20 °C und 200 x g zentrifugiert. Nach erneutem Resuspendieren in 10 mL Medium wurden die Zellen mittels Hämocytometer (Neubauer-Zählkammer) gezählt (V79-Zellen: 1:5-Verdünnung, Caco-2-Zellen: 1:1-Verdünnung mit 0,4%iger Trypanblau-Lösung). Die Zellkonzentration ergibt sich aus der Multiplikation der ermittelten Zellzahl, dem Verdünnungsfaktor und dem Kammerfaktor (10<sup>4</sup>). Anschließend wurden die Zellen in der gewünschten Zelldichte auf neue 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen bzw. 6-Loch-Gewebekulturplatten verteilt.

#### **3.2.1.5 Kryopräservierung von Zellen**

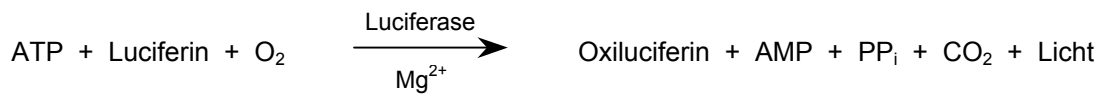
Zellen, die sich im exponentiellen Wachstum befanden, wurden abtrypsiniert, gezählt (siehe Kap. 3.2.1.4) und mit 4 °C kaltem Medium (mit 20 % FCS und 10 % DMSO) so verdünnt, dass zwischen 1 x 10<sup>6</sup> und 3 x 10<sup>6</sup> Zellen pro mL Zellkulturmedium entstanden. Anschließend wurden zügig Aliquots von 1,5 mL in vorgekühlte Kryoröhrchen pipettiert. Die Röhrchen wurden im Einfriergefäß, das mit 2-Propanol gefüllt war, langsam auf -80 °C herabgekühlt (1 °C/min). Am nächsten Tag konnten die Kryoröhrchen zur endgültigen Lagerung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden.

Sollten eingefrorene Zellen wieder in Kultur genommen werden, wurde die Zellsuspension im Kryoröhrchen in einem Wasserbad bei 37 °C rasch aufgetaut und sofort in ein Reaktionsgefäß, welches 20 mL serumhaltiges Medium enthielt, überführt. Anschließend wurde 5 min bei 20 °C und 200 x g zentrifugiert, um das in hohen Konzentrationen cytotoxisch wirkende DMSO zu entfernen. Nach Abgießen des Überstands und Resuspendieren des Zellpellets in 5 mL Zellkulturmedium wurde die Suspension in eine 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche überführt. Nach einer Ruhepause von 24 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

### 3.2.1.6 Prüfung auf Mycoplasmen

V79- und Caco-2-Zellen wurden vor ihrer Verwendung für die folgenden Versuche auf Kontamination mit Mycoplasmen untersucht.

Der Mycoplasmen-Test MycoAlert™ nutzt die Fähigkeit bestimmter mycoplasmatischer Enzyme aus, mit MycoAlert™ Substratreagenz unter ATP-Bildung zu reagieren, welches bioluminometrisch nachgewiesen werden kann (siehe Abb. 3.1). Die Intensität des emittierten Lichts ist proportional der ATP-Konzentration. Das Verhältnis der ATP-Konzentration vor und nach Zugabe des MycoAlert™ Substratreagenzes ist ein Indikator für das Vorhandensein bzw. das Fehlen von Mycoplasmen.



**Abb. 3.1:** Bestimmung der ATP-Konzentration zum Nachweis von Mycoplasmen.

#### Durchführung:

Die Zellen wurden drei Tage lang Antibiotika-frei kultiviert und der Mediumüberstand nach fünfminütiger Zentrifugation bei 20 °C und 200 x g verwendet. MycoAlert™ Reagenz und Substrat wurden gemäß der Anleitung des Herstellers mit MycoAlert™ Puffer verdünnt und bei Zimmertemperatur äquilibriert. 100 µL Probe wurden in eine 96-Loch-Platte gegeben, mit 100 µL MycoAlert™ Reagenz gemischt und für 5 min bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach der Lumineszenz-Messung wurden 100 µL MycoAlert™ Substrat zugegeben, 10 min bei Zimmertemperatur inkubiert und erneut gemessen. Ist die Intensität der zweiten Messung kleiner als die der ersten, sind die Zellen frei von Mycoplasmen. Ist sie größer, liegt eine Kontamination vor. Die Messung erfolgte als Dreifachbestimmung.

### 3.2.1.7 Isolierung humaner mononukleärer Zellen des peripheren Bluts

Die Isolierung humaner PBMC erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation. Dabei wird das Lymphozytenseparationsmedium, eine Zuckerlösung mit der Dichte  $\rho = 1,077 \text{ g/mL}$  (Ficoll 400), mit EDTA antikoaguliertem und mit PBS verdünntem Vollblut überschichtet. Die Dichte ist so gewählt, dass bei der anschließenden Zentrifugation Erythrozyten und Granulozyten, die eine höhere Dichte besitzen, sedimentieren, während sich die PBMC entsprechend ihrer spezifischen Dichte als Zellring in der Interphase zwischen Überstand (bestehend aus Plasma und Thrombozyten) und Ficoll'scher-Lösung ansiedeln. Die Interphase wird mit einer Pasteurpipette in ein neues Reaktionsgefäß überführt, wobei einige Thrombozyten mitabgetragen werden. Bei den anschließenden Waschschrritten mit PBS

sedimentieren die PBMC, die Thrombozyten hingegen befinden sich im Überstand und werden so entfernt.

Durchführung:

Die Isolierung der PBMC erfolgte unter sterilen Bedingungen. Dabei wurden je 9 mL EDTA-Vollblut auf zwei 15 mL-Reaktionsgefäße verteilt und mit je 3 mL PBS vermischt. Je 4 mL Lymphozytenseparationsmedium wurden nun mit dem verdünnten Blut überschichtet und die Probe 20 min bei 20 °C und 400 x g zentrifugiert. Die Interphase bestehend aus den PBMC wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette abgehoben, in einem 15 mL-Reaktionsgefäß vereint und erneut für 10 min bei 20 °C und 400 x g zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit je 20 mL PBS gewaschen und für 10 min bei 20 °C und 400 x g zentrifugiert. Nach Resuspendieren der Zellen in je 2 mL Zellkulturmedium pro 9 mL EDTA-Vollblut erfolgte die Zellzählung am Zellzählgerät Coulter Counter. Dabei wurde die Zellsuspension 500-fach mit 10 mL Spülflüssigkeit Isoton II verdünnt und mit zwei Tropfen des Lysereagens Zap-Oglobin Lytic Reagent zur Zerstörung restlicher Erythrozyten versetzt. Die Messung beruht auf einer Widerstandsänderung zwischen zwei Platinelektroden beim Durchfluss der Zellsuspension. Dabei wird durch die Widerstandsänderung ein Spannungsimpuls erzeugt, der verstärkt und aufgezeichnet wird. Alle Partikel, deren Durchmesser größer als 4,2 µm ist, wurden so erfasst. Die Zellen wurden nun mit Kompletmedium so verdünnt, dass pro 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche etwa 2 x 10<sup>6</sup> Zellen vorlagen.

### **3.2.2 Untersuchungen zur zellulären Aufnahme von Isoflavonen**

Um die Mechanismen der zellulären Aufnahme der Isoflavone zu untersuchen, wurden V79-Zellen (als etabliertes Zellmodell für toxikologische Untersuchungen), Caco-2-Zellen (als Modell für reife Epithelzellen des Darms) und menschliche PBMC (wegen ihres ständigen Kontakts mit den im Plasma vorkommenden Isoflavonen) mit DAI, GEN und GLY inkubiert. Dabei wurden sowohl die Konzentrations- als auch die Zeitabhängigkeit der Aufnahme bei 37 und 4 °C bestimmt. Außerdem wurde untersucht, welcher Anteil sich in den Membranbestandteilen und im Cytosol befindet. Zur Trennung von Cytosol und Membran wurde die Zellsuspension für 30 min bei 10000 x g zentrifugiert. Im Überstand befinden sich die löslichen Bestandteile - das Cytosol und die Mikrosomenfraktion (Bruchstücke der Schläuche des endoplasmatischen Retikulums, Ribosomen und Golgi-Apparat) -, während das Pellet aus Zelltrümmern, der Plasmamembran und Membranen des Zellkerns, der Mitochondrien und Lysosomen besteht [196,308]. Die Trennung von Membran- und Cytosolfraction entfiel jedoch bei der Untersuchung der PBMC, da aufgrund des kleinen Zellvolumens sehr hohe Zellzahlen zur Quantifizierung der intrazellulären Konzentration notwendig sind, die durch die jeweils frische Isolierung nicht erreicht werden konnten. Um die Beteiligung der Transportproteine P-Glycoprotein (MDR1) und der Multidrug Resistance

Associated Proteine (MRP), die in humanen PBMC und Caco-2-Zellen exprimiert werden [309,310,311,312], am Transport der Isoflavone aus den Zellen zu untersuchen, wurden sie mit den Inhibitoren Verapamil bzw. MK 571 [313,314] gehemmt.

Die Reinheit aller verwendeten Testsubstanzen wurde mittels HPLC-Analyse bestätigt. Die Verbindungen DAI, GEN und GLY wurden in DMSO bzw. Verapamil in Methanol gelöst und zur Durchführung der Versuche tausendfach mit Medium so verdünnt, dass die Endkonzentration von DMSO bzw. Methanol im Medium 0,1 % betrug, während MK 571 in PBS gelöst und bei der Ausführung der Versuche hundertfach mit Medium verdünnt wurde. Als Kontrollen dienten Testansätze, die nur 0,1 % DMSO bzw. keine Zellen enthielten.

### **3.2.2.1 Aufnahme in V79- und Caco-2-Zellen**

$10^5$  V79-Zellen (Passage 7 bis 20) bzw.  $10^5$  Caco-2-Zellen (Passage 5 bis 20) wurden pro Loch von 6-Loch-Gewebekulturplatten ausgestreut und für 3 bzw. 13 Tage kultiviert. Nach Entfernen des Mediums und dreimaligem Waschen des Zellrasens mit je 2 mL PBS wurde frisches Medium, welches die Testsubstanz in der gewünschten Konzentration enthielt, zugegeben.

Nach der jeweiligen Inkubationszeit (siehe Kap. 4.1) wurden die Zellen auf morphologische Veränderungen im Mikroskop untersucht und das Medium mit Testsubstanz in einem separaten Reaktionsgefäß gesammelt. Der Zellrasen wurde jeweils dreimal mit 500  $\mu$ L PBS, das 0,1 % BSA enthielt, gewaschen und die Waschflüssigkeit mit dem Medium vereint. Zum Ablösen von der Oberfläche der Zellkulturschalen und zur Lyse der Zellen wurden jeweils 500  $\mu$ L bidest. Wasser zugegeben und die Zellsuspension in einem 1,5 mL-Reaktionsgefäß gesammelt. Um die Zellen vollständig zu entfernen, wurden die Löcher der Gewebekulturplatten mit je 200  $\mu$ L bidest. Wasser gewaschen. Die Lyse der Zellen erfolgte durch einmaliges Einfrieren und Auftauen und 15-minütiger Behandlung im Ultraschallbad.

Zur Trennung von Cytosol und Membran wurde 500  $\mu$ L der Zellsuspension für 30 min bei 10000 x g zentrifugiert. Der Überstand (Cytosol) wurde abgenommen, in einem separaten Reaktionsgefäß gesammelt und das Pellet (Membranfraktion) mit je 100  $\mu$ L bidest. Wasser gewaschen. Bei der anschließenden Extraktion wurde zu Cytosol und Membran jeweils 200  $\mu$ L Natrium-Acetat-Puffer (0,15 M, pH = 5) und je 900  $\mu$ L Methanol gegeben, 15 min im Ultraschallbad extrahiert und in der Vakuum-Zentrifuge zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in je 100  $\mu$ L 50%igen Methanol aufgenommen und zur Quantifizierung mit HPLC-System 1 und zur massenspektrometrischen Analyse mit HPLC-System 2 analysiert (siehe Kap. 3.2.2.8.2).

Um die Zellzahl pro Inkubationsansatz berechnen zu können, wurde mit der restlichen Zellsuspension eine Proteinbestimmung nach Lowry durchgeführt (siehe Kap. 3.2.2.6).

Zur Untersuchung der Konzentration der Testsubstanz und eventuell gebildeter Metabolite im Zellkulturmedium wurde dieses nach Ansäuern mit je 1 mL Natrium-Acetat-Puffer (0,15 M, pH = 5) einer Festphasenextraktion (SPE) unterworfen (siehe Kap. 3.2.2.8.1). Der im Stickstoffstrom eingeeengte Rückstand wurde in 50%igen Methanol aufgenommen und zur Quantifizierung mit HPLC-System 1 und zur massenspektrometrischen Analyse mit HPLC-System 2 (siehe Kap. 3.2.2.8.2) analysiert.

### **3.2.2.2 Aufnahme in humane mononukleäre Zellen des peripheren Bluts**

Die Durchführung der Experimente zur zellulären Aufnahme von Isoflavonen in humane PBMC erfolgte analog zu der Versuchsdurchführung von V79- und Caco-2-Zellen (siehe Kap. 3.2.2.1). Unterschiede ergaben sich dadurch, dass es sich bei den PBMC um Suspensionszellen und nicht um adhärenente Zellen handelt. Ungefähr  $9 \times 10^6$  frisch isolierte PBMC wurden auf die gleiche Weise behandelt wie V79- und Caco-2-Zellen (siehe Kap. 3.2.2.1). Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Zellen 5 min bei 20 °C und 400 x g zentrifugiert und ebenfalls dreimal mit 0,5 mL PBS, das 0,1 % BSA enthielt, gewaschen. Die Zellen wurden in 0,5 mL bidest. Wasser lysiert. Die anschließende Extraktion erfolgte mit 200 µL Natrium-Acetat-Puffer (0,15 M; pH = 5) und 700 µL Methanol. Die weitere Aufarbeitung fand, wie in Kap. 3.2.2.1 beschrieben, statt.

### **3.2.2.3 Beteiligung von Transportproteinen**

Um die Beteiligung von Transportproteinen in PBMC und Caco-2-Zellen am Efflux der Isoflavone zu untersuchen, wurden MDR1 und MRP mit deren Hemmstoffen (Verapamil bzw. MK 571) inhibiert und mit DAI, GEN bzw. GLY co-inkubiert.

$10^5$  Caco-2-Zellen (Passage 10 bis 20) wurden pro Loch von 6-Loch-Gewebekulturplatten ausgestreut und für 13 Tage kultiviert. Im Falle der PBMC wurden etwa  $9 \times 10^6$  frisch isolierte Zellen verwendet. Die Inkubation erfolgte als Co-Inkubation der Isoflavone mit 100 µM Verapamil bzw. MK 571. Als Kontrolle dienten Inkubationen der reinen Isoflavone bei 37 und 4 °C. Lyse und Aufarbeitung der Zellen sowie der Medienrückstände fand wie in Kap. 3.2.2.1 und 3.2.2.2 beschrieben statt.

### **3.2.2.4 Prüfung auf Cytotoxizität**

Um zu gewährleisten, dass die Zellkulturversuche in einem nicht cytotoxischen Konzentrationsbereich durchgeführt wurden, wurden die verwendeten Substanzen auf ihre cytotoxische Wirkung hin untersucht. Die Zellvitalität wurde dabei mittels Trypanblau bestimmt, welches aufgrund seiner Membrandurchlässigkeit nur von den toten Zellen aufgenommen wird und diese blau anfärbt.

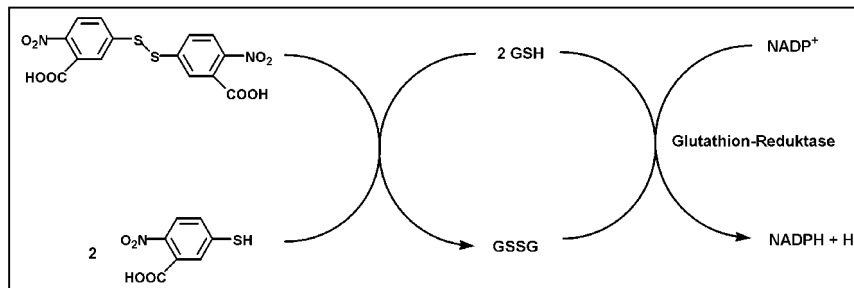


Durchführung:

Pro Loch von 6-Loch-Gewebekulturplatten wurden die in Kap. 3.2.2.1 und 3.2.2.2 angegebenen Zellzahlen ausgestreut und im Falle von V79- und Caco-2-Zellen anwachsen lassen. Anschließend wurden die drei Zellarten mit den Testsubstanzen inkubiert, als Kontrolle dienten Ansätze mit dem entsprechenden Lösungsmittel. Das alte Medium wurde entfernt und durch neues, Testsubstanz-haltiges ersetzt. Nach Ablauf der im Ergebnisteil angegebenen Inkubationszeit wurde im Falle von V79- und Caco-2-Zellen das Medium abgegossen und Mediumreste durch Spülen mit 1 mL PBS entfernt. Die Zellen wurden für 3 bzw. 5 min mit 0,5 mL einer 0,25%igen Trypsin/EDTA-Lösung im Brutschrank inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in 5 mL frischem Medium resuspendiert. Nach gründlichem Vereinzeln der Zellen wurden diese 1:1 mit 0,4%iger Trypanblau-Lösung gemischt und mit Hilfe eines Hämocytometers gezählt. Der prozentuale Anteil der toten Zellen ergibt sich aus dem Anteil der toten Zellen (blau gefärbt) durch die Gesamtzellzahl (tote und lebende Zellen).

**3.2.2.5 Bestimmung des Gesamt-Glutathion-Gehalts in Caco-2-Zellen**

Die Methode beruht auf der Bildung eines bei  $\lambda = 412 \text{ nm}$  photometrisch messbaren Produkts aus 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) nach Reduktion durch Glutathion (GSH). Glutathion-Reduktase recycelt mit Hilfe von NADPH GSH aus seinem oxidierten Zustand (GSSG), wodurch im Reaktionsansatz Gesamt-Glutathion - (GSH und GSSG) - gemessen werden (siehe Abb. 3.2) [315].



**Abb. 3.2:** Gesamt-Glutathion-Bestimmung mit der DTNB-Methode.

Durchführung:

Pro Loch von 6-Loch-Gewebekulturplatten wurde die in Kap. 3.2.2.1 beschriebene Zellzahl an Caco-2-Zellen ausgestreut und kultiviert. Nach Entfernen des Mediums und zweimaligem Waschen des Zellrasens mit PBS wurden die Zellen mit 1 mL 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer mit 1 mM EDTA (pH = 7) von der Oberfläche der Gewebekulturplatten abgelöst. Zur Lyse der Zellen wurde die Zellsuspension einmal eingefroren und aufgetaut und 15 min im Ultraschallbad behandelt. Nach Zentrifugation des Lysats für 10 min bei 15000 x g wurde der Überstand abgenommen und weiter verwendet. Der Reaktionsansatz enthielt 125 µL

Zellüberstand, 225  $\mu\text{M}$  NADPH und 65  $\mu\text{M}$  DTNB in einem Gesamtvolumen von 1 mL. 0,1 U Glutathion-Reduktase wurden zum Starten der Reaktion zugegeben und die lineare Zunahme der Absorption bei  $\lambda = 412 \text{ nm}$  und 30 °C für 120 s aufgenommen. Zur Kalibrierung wurden 1 und 2 nmol GSSG anstelle der Probe verwendet. Der Kontrollansatz enthielt Puffer.

### 3.2.2.6 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde nach einer modifizierten Form des Bio-Rad DC Protein Assays nach Lowry durchgeführt [316]. Die Proteine bilden dabei in alkalischer Lösung mit  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen einen Komplex und reduzieren diese zu  $\text{Cu}^+$ -Ionen (Biuret-Reaktion). Der dabei entstehende Protein- $\text{Cu}^+$ -Komplex reduziert das Folin-Reagenz ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4^-$  und  $\text{Na}_2\text{WO}_4^-$ -Lösung), wodurch ein blauer Farbkomplex entsteht, dessen Absorption bei  $\lambda = 650 \text{ nm}$  spektralphotometrisch gemessen wird.

#### Bio-Rad DC Reagenzien:

Reagenz A: alkalische Kupfertartrat-Lösung

Reagenz B: verdünntes Folin-Reagenz

Reagenz S: SDS-Lösung

Standard: lyophilisiertes BSA (0,2 bis 1,4 mg/mL), in PBS verdünnt

#### Durchführung:

Die Messung erfolgte als Dreifachbestimmung in einer 96-Loch-Platte. Jeweils 5  $\mu\text{L}$  der zu bestimmenden Probe, der Standards bzw. PBS (Leerwert) wurden mit 20  $\mu\text{L}$  Arbeitsreagenz (20  $\mu\text{L}$  Reagenz S in 1 mL Reagenz A) und 200  $\mu\text{L}$  Reagenz B gemischt und die Extinktion nach 15-minütiger Inkubation bei Zimmertemperatur bei  $\lambda = 650 \text{ nm}$  gemessen.

### 3.2.2.7 Berechnung der Isoflavonkonzentration in den Zellen

Um zu überprüfen, ob Isoflavone in der Zelle angereichert werden, wurde eine Modellrechnung aufgestellt. Unter der Annahme kugelförmiger Zellen wurde der Zelldurchmesser mit dem Zellzählgerät Casy<sup>®</sup> TT bestimmt. Grundlage der Durchmesserbestimmung ist die Leitfähigkeitsabnahme eines Elektrolyten aufgrund der als Isolatoren wirkenden Zellen. Der als Isolator wirkende effektive Querschnitt ist von der Größe der Zellen abhängig. Der Durchmesser der V79-Zellen betrug 10,1  $\mu\text{m}$ , der der Caco-2-Zellen 18,1  $\mu\text{m}$  und der der humanen PBMC 7,6  $\mu\text{m}$ . Für kugelförmige Zellen ergab sich daraus ein Zellvolumen von  $5,4 \times 10^{-13} \text{ L}$ ,  $3,1 \times 10^{-12} \text{ L}$  bzw.  $2,3 \times 10^{-13} \text{ L}$ . Die Bestimmung der Zellzahl in der Probe erfolgte über die Proteinbestimmung (siehe Kap. 3.2.2.6). Dafür wurde für jede Zellart eine

Kalibrierung durchgeführt. 1 mg Protein entsprachen bei V79-Zellen  $4,4 \times 10^6$ , bei Caco-2-Zellen  $1,9 \times 10^6$  und bei humanen PBMC  $28,9 \times 10^6$  Zellen. Die Konzentration der Isoflavone in der Zelle konnte so gemäß Gleichung 3.1 bestimmt werden:

$$c = \frac{n}{V \cdot N}$$

$c$  = Konzentration in einer Zelle [M]  
 $n$  = Gesamtmenge an Testsubstanz nach Extraktion und Analyse [mol]  
 $V$  = Volumen einer Zelle [L]  
 $N$  = Zellzahl

**Gl. 3.1:** Gleichung zur Bestimmung der Konzentration an Testsubstanz pro Zelle.

### 3.2.2.8 Analytik

#### 3.2.2.8.1 Festphasenextraktion

Die verwendeten C18-Kartuschen wurden zunächst mit 10 mL Methanol und 10 mL bidest. Wasser vorkonditioniert und nach Applikation der aufzureinigenden Probe mit 5 mL bidest. Wasser gewaschen. Die Elution erfolgte in 5 mL Methanol. Nach Trocknung des Eluats im Stickstoffstrom fand die chromatographische Analyse statt.

Die Wiederfindung für DAI, GEN bzw. GLY betrug zwischen 97 und 100 %.

#### 3.2.2.8.2 HPLC-Methoden

Zur Analytik der Zelllysate und der Medienüberstände wurden zwei HPLC-Systeme verwendet, die im Folgenden näher beschrieben werden. Die Identifizierung der Substanzen erfolgte durch Absorptionsspektren- und Retentionszeitenvergleich mit kommerziell erhältlichen oder enzymatisch hergestellten Referenzsubstanzen [129] sowie durch massenspektrometrische Analyse.

HPLC-System 1: Analytisches Hochdruckgradientensystem von Shimadzu (siehe Kap. 3.1.1).

Säule: Prontosil 120-3-C18-ace-EPS, 150 x 4,0 mm i. D., 3 µm (Bischoff Analysentechnik und -geräte)

Vorsäule: Prontosil 120-3-C18-ace-EPS, 10 x 4,0 mm i. D., 3 µm (Bischoff Analysentechnik und -geräte)

Mobile Phase: A = Acetonitril  
 B = 0,1%ige Ameisensäure in bidest. Wasser

Flussrate: 1,2 mL/min

Injektionsvolumina: 20 - 100 µL

Autoinjektor:	Zimmertemperatur	
Gradient:	0 min	85 % B
	22 min	65 % B
	27 min	50 % B
	40 min	40 % B
DAD:	260 nm	

Bei der Analyse der Medienüberstände wurde zu Eluent B der Ionenpaarbildner Tetrabutylammoniumphosphat (5 mM) zugegeben, um eine ausreichend sensitive Detektion der gebildeten sulfatierten Konjugate durch eine verbesserte Peakform zu gewährleisten. Alle Eluenten wurden vor ihrem Einsatz 10 min im Ultraschallbad entgast.

Die externe Kalibrierung erfolgte für DAI, GEN und GLY zwischen 0,1 bis 100 µM (Injektionsvolumen: 20 µL). Aus 100 mM-Stammlösungen in DMSO wurden Verdünnungen in 50%igen Methanol hergestellt. Die Nachweisgrenze betrug zwischen 51 und 57 pg für DAI, GEN und GLY. Phase-II-Konjugate wurden bei der Quantifizierung als DAI-, GEN- und GLY-Äquivalente behandelt. Dies war aufgrund der geringen Effekte der Konjugation auf die UV-Vis Absorptionsspektren möglich.

<u>HPLC-System 2:</u>	Analytisches Hochdruckgradientensystem von Agilent Technologies (siehe Kap. 3.1.1).	
Säule:	siehe System 1	
Vorsäule:	siehe System 1	
Mobile Phase:	A = Acetonitril	
	B = 0,1%ige Ameisensäure in bidest. Wasser	
Flussrate:	0,8 mL/min	
Injektionsvolumina:	100 µL	
Autoinjektor:	Zimmertemperatur	
Gradient:	0 min	85 % B
	33 min	65 % B
	40 min	50 % B
	60 min	40 % B
DAD:	260 nm	

MS-Bedingungen:	Ionisierungsmodus:	API-ES negativ
	Trocknungsgasfluss:	11 L/min
	Zerstäubedruck:	60 psi
	Trocknungsgastemperatur:	350 °C
	Kapillarspannung:	3500 V
	Fragmentor-Spannung:	100 V
	Massenbereich:	100 - 700
	Scanrate:	1,08 s/Zyklus

Die Analysen erfolgten im Scan- und im SIM-Modus.

### **3.2.3 Humanstudie**

Hauptziel der Humanstudie war es, den Einfluss einer Konjugation mit Glucose auf die Bioverfügbarkeit und Metabolisierung von Isoflavonen durch Gabe des Isoflavons Daidzein (DAI) und seines 7-O- $\beta$ -D-Glucosids Daidzin (DG) zu untersuchen.

#### **3.2.3.1 Studiendesign und Probandenkollektiv**

Das Studiendesign entsprach einer randomisierten Doppelblindstudie im Cross-Over-Design, an der acht Probanden teilnahmen. Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Landesärztekammer Baden-Württemberg geprüft und genehmigt.

Die Studienperiode umfasste insgesamt acht Wochen und setzte sich aus zwei Studienabschnitten zusammen, in denen die Probanden in zwei Gruppen aufgeteilt wurden. Jeder Studienabschnitt stellte eine dreitägige Interventions- mit vorhergehender zweiwöchiger Depletionsphase dar. Während der Depletionsphase und der Intervention war es den Probanden untersagt, Soja-haltige Lebensmittel zu verzehren. In einem der beiden Studienabschnitte erhielten je vier Probanden vor dem Frühstück eine Weichgelatine kapsel mit reinem DAI bzw. DG. Im anderen enthielt die Kapsel das jeweilige andere Produkt. Die Reinsubstanzen wurden von der Arbeitsgruppe Winterhalter (Uni Braunschweig) aus Sojamehl bzw. einem kommerziell erhältlichen Präparat mittels Countercurrent Chromatography isoliert (siehe Kap. 3.2.3.2). Ein Proband beendete die Studie nicht, sondern schied aus persönlichen Gründen vor dem zweiten Studienabschnitt aus.

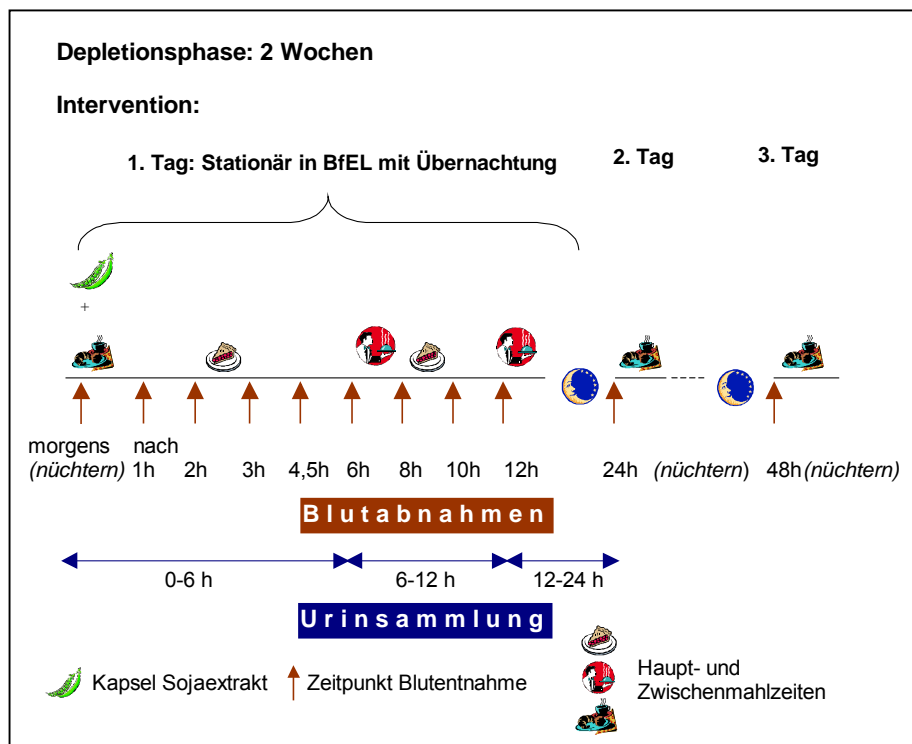
Zur Teilnahme an der Studie wurden nur Probanden zugelassen, die keine infektiösen, chronisch-entzündlichen oder immunologischen Erkrankungen sowie keine Lebensmittelallergien, Fettstoffwechselstörungen oder Tumorerkrankungen aufwiesen. Weitere Ausschlusskriterien waren Rauchen, Medikamenten- und Alkoholabusus, regelmäßige Einnahme von Vitaminpräparaten, vegane oder alternative Ernährungsweise sowie die Einnahme von Antibiotika in den letzten sechs Monaten vor Studienbeginn. Die Probanden waren

männlich, zwischen 21 und 30 Jahren alt und hatten normale Blutdruckwerte (< 140/< 90 mm Hg RR). Bei einer medizinischen Voruntersuchung wurden anthropometrische Messungen und zur Dokumentation des Gesundheitszustandes ein Nüchtern-Blutbild sowie eine Urinuntersuchung durchgeführt. Darüber hinaus wurden die Ernährungsgewohnheiten über einen Fragebogen erfasst. Die zur Charakterisierung des Probandenkollektivs erhobenen anthropometrischen Daten sind in Tab. 3.1 zusammengefasst.

Nach Information über Ziele und Ablauf der Studie sowie einer Aufklärung über mögliche Risiken bei der Einnahme der Isoflavonpräparate und der Blutentnahmen gaben alle Probanden ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Studie schriftlich ab.

**Tab. 3.1:** Anthropometrische Daten der acht Probanden.

Proband	Gewicht [kg]	Größe [m]	BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	Körperfett [%]
1	56,7	1,74	18,7	6,8
2	73,8	1,77	23,6	13,1
3	66,1	1,65	24,3	11,2
4	71,2	1,77	22,9	13,8
5	76,7	1,76	24,7	15,2
6	75,4	1,81	23,0	15,1
7	76,6	1,87	21,9	15,5



**Abb. 3.3:** Studiendesign der Humanstudie.

Das Studiendesign ist in Abb. 3.3 dargestellt. Vor der Einnahme des Isoflavonpräparats (DAI bzw. DG in Form einer Weichgelatine kapsel; Dosis 1 mg pro kg Körpergewicht berechnet als Aglykon-Äquivalente) fand eine zweiwöchige Soja-Depletionsphase statt. Zu diesem Zweck wurde den Probanden eine Soja-Verbotsliste ausgehändigt. Während der Interventionsphase wurden am ersten Interventionstag neun Blutentnahmen vorgenommen, wobei eine vor Aufnahme des Präparats erfolgte (= Nullwert) und die anderen 1, 2, 3, 4½, 6, 8, 10 und 12 h danach stattfanden. Am Morgen des zweiten und dritten Interventionstags erfolgte jeweils eine weitere Blutentnahme vor dem Frühstück. Pro Blutentnahme wurden drei 9 mL-EDTA-Monovetten und eine 4,5 mL-Serum-Monovette befüllt. Urinproben wurden am ersten Interventionstag vor der Einnahme des Isoflavonpräparats und bis 24 h danach auf Eis gesammelt. Am ersten Interventionstag befanden sich die Probanden im Humantrakt der BfEL - Standort Karlsruhe - und erhielten eine kontrollierte, Isoflavonfreie Kost (Frühstück, Mittagessen, Abendessen, zwei Zwischenmahlzeiten, Wasser *ad libitum*), wobei vor allem Lebensmittel mit niedriger antioxidativer Kapazität (arm an Ascorbinsäure (ASC), Tocopherolen, Carotinoiden und anderen Polyphenolen) verwendet wurden.

### **3.2.3.2 Isolierung der Substanzen Daidzein und Daidzin**

Die Isolierung des Isoflavons DAI und seines Glucosids DG erfolgte durch den Arbeitskreis von Prof. Dr. P. Winterhalter (Universität Braunschweig). DAI wurde dabei aus einem kommerziell erhältlichen Produkt (TCI Tokyo Casei) durch High-Speed Countercurrent Chromatography (Gegenstromchromatographie) von Verunreinigungen aufgereinigt. DG wurde mittels High-Speed Countercurrent Chromatography aus Sojamehl in Anlehnung an Degenhardt & Winterhalter [317] isoliert. Beide Substanzen wurden über NMR, LC/DAD- und LC/MS-Messungen charakterisiert. Die Reinheit - bezogen auf alle bei 260 nm absorbierenden Substanzen - betrug 99,4 % für DAI und 98,8 % für DG.

### **3.2.3.3 Bestimmung der Isoflavone in Urin, Plasma und mononukleären Zellen des peripheren Bluts**

#### **3.2.3.3.1 Plasma**

Zur Bestimmung der Gesamt-Isoflavonkonzentration sowie des Anteils der Phase-II-Metabolite wurde das Plasma der einzelnen Blutabnahmen einerseits einer Hydrolyse mit  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase (beide aus *Helix Pomatia*) unterzogen, andererseits wurden die Plasmaproben ohne enzymatische Umsetzung analysiert.

Unmittelbar nach jeder Blutabnahme wurde das mit EDTA antikoagulierte Vollblut für 10 min bei 4 °C und 1850 x g zentrifugiert und das im Überstand gewonnene Plasma für die weitere Aufarbeitung aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

Zu 500  $\mu$ L Plasma nach Gabe von DAI bzw. 250  $\mu$ L nach Gabe von DG wurden die internen Standards (125 bzw. 250 pmol 3,4,8-<sup>13</sup>C-DAI sowie je 100 pmol 1,2,3-<sup>13</sup>C-ODMA und 2-OCH<sub>3</sub>-7-OH-IF) gegeben und die Lösungen für 30 min bei Zimmertemperatur äquilibriert. Um die Proteinbindung der Isoflavone zu reduzieren, wurden zehn Volumina an Triethylammoniumsulfat-Lösung (0,5 M, pH = 5) zugegeben und je 15 min bei Zimmertemperatur sowie bei 64 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung mittels SPE (siehe Kap. 3.2.2.8.1). Für die enzymatische Hydrolyse wurden die Proben in 3 mL Natrium-Acetat-Puffer (0,15 M, pH = 5) gelöst, mit 4000 U  $\beta$ -Glucuronidase und 150 U Sulfatase (beide aus *Helix Pomatia*) versetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben einer Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Essigsäureethylester (EA) unterworfen. Dazu wurde zur Erleichterung der Phasentrennung jeweils 1 mL Ethanol und 200  $\mu$ L gesättigte Kochsalzlösung zugegeben und für 5 min bei 3000 x g zentrifugiert. Die Extraktion mit je 3 mL EA wurde dreimal wiederholt und die vereinigten organischen Extrakte im Stickstoffstrom zur Trockene eingedampft. Anschließend wurden die Proben in 200  $\mu$ L Methanol aufgenommen, davon je 100  $\mu$ L in ein GC-Gläschen überführt und zur Trockene eingeeengt. Die Derivatisierung erfolgte mit 20  $\mu$ L BSTFA. Die Wiederfindung wurde durch Vergleich der erhaltenen Flächen nach Zugabe der internen Standards vor der Derivatisierung und vor der Aufarbeitung des mit DAI und seinen Metaboliten aufgestockten Kontrollplasmas ermittelt. Sie lag für DAI und die quantifizierten Metabolite (siehe Kap. 3.2.3.3.4) zwischen 89 und 103 %.

Ohne enzymatische Umsetzung wurde je 1 mL Plasma verwendet. Die Aufarbeitung erfolgte wie oben beschrieben, allerdings ohne enzymatische Hydrolyse.



Reagenzien:

Triethylammoniumsulfat-Lösung: 50,6 g in 700 mL bidest. Wasser lösen, mit halbkonzentrierter Schwefelsäure auf pH = 5 einstellen und mit bidest. Wasser auf 1 L auffüllen.

**3.2.3.3.2 Urin**

Zur Bestimmung des Anteils der einzelnen Phase-II-Metabolite im Urin wurden die Urinfraktionen einer sequentiellen Hydrolyse mit  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase (beide aus *Helix Pomatia*),  $\beta$ -Glucuronidase (aus Rinderleber) allein bzw. Sulfatase (aus *Patella vulgata*) allein unterzogen sowie der Urin ohne enzymatische Umsetzung analysiert. Die restliche  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität der Sulfatase aus *Patella vulgata* wurde durch Zugabe von D-Glucarsäure-1,4-lacton gehemmt.

Nach jeder Sammelperiode an den Interventionstagen wurde nach Bestimmung des Volumens der Urin fraktionsweise aliquotiert. Um bakteriellen Befall zu verhindern, wurden die Aliquots mit 0,1 % Natriumazid versetzt und anschließend bei -80 °C gelagert. Um starke Verdünnungseffekte durch unterschiedliche Volumina in den einzelnen Urinfraktionen (94 bis 1720 mL) auszugleichen, wurden die Fraktionen mit geringem Volumen vor der weiteren Aufarbeitung mit bidest. Wasser verdünnt.

Zur Aufreinigung wurden nach Zentrifugation für 5 min bei Zimmertemperatur und 3000 x g folgende Volumina verwendet:

0 h:	mit $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase, mit $\beta$ -Glucuronidase, mit Sulfatase, bzw. ohne Enzym:	3 mL
0 - 6 h:	mit $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase, bzw. mit $\beta$ -Glucuronidase: mit Sulfatase, bzw. ohne Enzym:	1 mL 3 mL
6 - 12 h:	mit $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase, bzw. mit $\beta$ -Glucuronidase: mit Sulfatase, bzw. ohne Enzym:	0,5 mL 3 mL
12 - 24 h:	mit $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase, bzw. mit $\beta$ -Glucuronidase: mit Sulfatase, bzw. ohne Enzym:	0,5 mL 3 mL

Nach Zugabe der internen Standards (5 nmol 3,4,8-<sup>13</sup>C-DAI und je 500 pmol 1,2,3-<sup>13</sup>C-ODMA sowie 2-OCH<sub>3</sub>-7-OH-IF) wurden die Lösungen mit 5 mL Natrium-Acetat-Puffer (0,15 M, pH = 5) versetzt. Zur enzymatischen Hydrolyse wurden entweder 4000 U  $\beta$ -Glucuronidase und 150 U Sulfatase aus *Helix Pomatia*, 1000 Fishman U  $\beta$ -Glucuronidase aus Rinderleber oder 150 U Sulfatase aus *Patella vulgata* und 100  $\mu$ M D-Glucarsäure-1,4-lacton zugegeben. Die Proben wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert, dreimal mit EA extrahiert und die vereinigten organischen Extrakte im Stickstoffstrom zur Trockene einge-

dampft. Zur nachfolgenden SPE wurden die Proben in 3 mL Natrium-Acetat-Puffer (0,15 M, pH = 5) gelöst und weiter wie in Kap. 3.2.2.8.1 beschrieben aufgereinigt. Für die GC/MS-Analyse wurden die Proben in 1 mL Methanol angelöst, nach Überführung von je 100 µL in ein GC-Gläschen im Stickstoffstrom zur Trockene eingedampft und mit 20 µL BSTFA derivatisiert. Die Wiederfindung für DAI und die quantifizierten Metabolite (siehe Kap. 3.2.3.3.4) lag zwischen 90 und 99 %.

### **3.2.3.3.3 Mononukleäre Zellen des peripheren Bluts**

Unmittelbar nach jeder Blutabnahme wurde das mit EDTA antikoagulierte Vollblut für 10 min bei 4 °C und 1850 x g zentrifugiert, das im Überstand befindliche Plasma für die weitere Analyse gewonnen (siehe Kap. 3.2.3.3.1) und der Rückstand für die Isolierung der PBMC verwendet. Die entnommene Menge Plasma wurde durch Zugabe von PBS ersetzt, um wieder das Ausgangsvolumen zu erreichen. Die Isolierung aus jeweils 3 EDTA-Röhrchen erfolgte wie in Kap. 3.2.1.7 beschrieben. Nach dem Waschen und Resuspendieren in 6 mL PBS wurden die Zellen gezählt und erneut für 10 min bei 20 °C und 400 x g zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstands wurden die Zellen in 3 mL eiskaltem Einfriermedium (90 % FCS mit 10 % DMSO, jeden Tag frisch hergestellt) resuspendiert, auf 2 Kryoröhrchen verteilt und bei -80 °C bis zur weiteren Aufarbeitung eingefroren.

Nach dem Auftauen wurden die PBMC zur Lyse 20 min im Ultraschallbad behandelt. Nach Zugabe der internen Standards (je 10 pmol 3,4,8-<sup>13</sup>C-DAI, 1,2,3-<sup>13</sup>C-ODMA und 2-OCH<sub>3</sub>-7-OH-IF) und Äquilibration für 30 min wurde das zehnfache Volumen Triethylammoniumsulfat-Lösung zugegeben und für je 15 min bei Raumtemperatur sowie bei 64 °C inkubiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie in Kap. 3.2.3.3.1 für Plasma mit enzymatischer Hydrolyse beschrieben ist. Die Proben wurden in 200 µL Methanol aufgenommen und nach Überführung von je 150 µL in ein GC-Gläschen und Abdampfen im Stickstoffstrom mit 20 µL BSTFA derivatisiert. Die Wiederfindungen entsprachen denen für Plasma (siehe Kap. 3.2.3.3.1).

### 3.2.3.3.4 GC/MS-Methode

Die Derivatisierung erfolgte in Anlehnung an Kulling et al. [119] mit BSTFA, was pro Hydroxylgruppe zu einer Massenerhöhung von 72 führt. Die Proben konnten nach einer zweistündigen Inkubationszeit bei Zimmertemperatur mittels GC/MS analysiert werden.

<u>GC-System:</u>	(siehe Kap. 3.1.1)	
Säule:	Supelco MDN-5S, 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm Filmdicke (Supelco)	
Trägergas:	Helium, Fluss 1,2 mL/min	
Injektortemperatur:	250 °C Splitless	
Injektionsvolumen:	1 µL	
Temperaturprogramm:	Anfangstemperatur: 60 °C Isotherme 1: 2 min Aufheizrate 1: 30 °C/min Temperatur 2: 250 °C Aufheizrate 2: 1 °C/min Temperatur 3: 275 °C Isotherme 2: 5 min	
Ionisierung:	Elektronenstoß bei 70 eV	
Massenanalysator:	Quadrupol	
Ionenquellentemperatur:	230 °C	
Interface-Temperatur:	280 °C	
Quadrupol-Temperatur:	150 °C	
SIM-Modus:	10 - 13 min	m/z 281 und 353
	13 - 14,5 min	m/z 192, 281, 282, 459 und 462
	14,5 - 20 min	m/z 281 und 400
	20 - 25 min	m/z 383, 386, 398 und 401
	ab 25 min	m/z 471 und 486

#### Quantifizierung:

Die Quantifizierung fand im SIM-Modus statt, wobei das Ion mit der höchsten Intensität zur Quantifizierung und das mit der zweithöchsten Intensität zur Bestätigung dienen. Die verwendeten Ionen waren: m/z 398 und 383 für DAI, m/z 401 und 386 für 3,4,8-<sup>13</sup>C-DAI, m/z 281 und 459 für O-DMA, m/z 282 und 462 für 1,2,3-<sup>13</sup>C-ODMA, m/z 386 und 192 für

Equol, m/z 281 und 400 bzw. 472 für DHD, m/z 486 und 471 für 6-, 8- und 3'-OH-DAI, m/z = 281 und 353 für 2-OCH<sub>3</sub>-7-OH-IF.

Die Kalibrierung erfolgte mittels externer Kalibriergeraden, wobei die Mengen der zugesetzten internen Standards (3,4,8-<sup>13</sup>C-DAI, 1,2,3-<sup>13</sup>C-ODMA und 2-OCH<sub>3</sub>-7-OH-IF) denen entsprachen, die bei der Aufarbeitung der Urin-, Plasma- und PBMC-Proben verwendet wurden. Die Nachweisgrenze betrug zwischen 5 und 14 pg für DAI und seine Metabolite, wobei die Nachweisgrenze für DAI und O-DMA bei 5 bzw. 6 pg (3,4,8-<sup>13</sup>C-DAI bzw. 1,2,3-<sup>13</sup>C-ODMA als interne Standards) und für die übrigen Metabolite unter Verwendung von 2-OCH<sub>3</sub>-7-OH-IF als internen Standard zwischen 10 und 14 pg lag.

#### **3.2.3.3.5 Bestimmung der biokinetischen Kenndaten**

Zur Bestimmung der biokinetischen Kenndaten - Fläche unter der Blutspiegel-Zeit-Kurve (AUC), Halbwertszeit der Elimination ( $t_{1/2}$ ), maximale Plasmakonzentration ( $C_{max}$ ), Zeit, um  $C_{max}$  zu erreichen ( $t_{max}$ ) - wurde das Programm PK Solutions™, Version 2.0 (Summit Research Services, 1999) verwendet.

#### **3.2.3.4 Bestimmung des Antioxidantienstatus**

Zur Bestimmung des Antioxidantienstatus wurde das Plasma auf den Gehalt an Carotinoiden,  $\alpha$ -Tocopherol und ASC untersucht.

##### **3.2.3.4.1 Bestimmung des Carotinoid- und $\alpha$ -Tocopherol-Gehalts**

###### Durchführung:

Unmittelbar nach jeder Blutabnahme wurde das mit EDTA antikoagulierte Vollblut für 10 min bei 4 °C und 1850 x g zentrifugiert und das im Überstand gewonnene Plasma für die weitere Aufarbeitung nach Zugabe von 10  $\mu$ L einer 2,6-Di-tert.-Butylhydroxytoluol (BHT) -Lösung (0,5 mg/mL in 50%igen Methanol) aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

500  $\mu$ L Plasma wurden mit 1 mL Kalium-Phosphat-Puffer und 1 mL eiskaltem Ethanol versetzt und die Proben zur Proteinfällung 1 h bei -20 °C inkubiert. Zur Extraktion wurden die Proben mit 2 mL eiskaltem Extraktionsmittel gemischt und für 5 min in ein mit Eis gekühltes Ultraschallbad gestellt. Nach erneutem Mischen wurden die Proben zur Phasentrennung 5 min bei 4 °C und 3000 x g zentrifugiert und die organischen Phasen in ein 15 mL-Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion wurde zweimal mit je 1,5 mL Extraktionsmittel wiederholt und die vereinigten organischen Phasen im Stickstoffstrom zur Trockene eingeeengt. Zur HPLC-Analyse wurde der Rückstand in 200  $\mu$ L eines Aceton-Dichlormethan-Gemischs gelöst und nach erneuter Zentrifugation mit HPLC-System 3 analysiert.

Reagenzien:

Kalium-Phosphat-Puffer:	250 mL 2 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -Lösung mit 62 mg ASC und 62 mg EDTA versetzen.
Extraktionsmittel:	500 mL Hexan und 100 mL Dichlormethan mit 150 mg BHT versetzen.
Aceton-Dichlormethan-Gemisch:	20 mL Aceton mit 2 mg BHT und 2 mL Dichlormethan versetzen.

HPLC-System 3: Analytisches Niederdruckgradientensystem von Shimadzu (siehe Kap. 3.1.1).

Säule: YMC C30, 250 x 4,6 mm i. D, 5 µm (YMC Europe GmbH)

Vorsäule: YMC C30, 10 x 4,0 mm i. D, 5 µm (YMC Europe GmbH)

Mobile Phase: A = tert.-Butylmethylether  
 B = Methanol  
 C = bidest. Wasser

Flussrate: 1,0 mL/min

Injektionsvolumen: 50 µL

Autoinjektor: 10 °C

Säulenofen: 27 °C

Gradient: 0 min 81,0 % B, 4,0 % C  
 70 min 21,1 % B, 4,0 % C

DAD: 292, 450, 472 nm

Die Auswertung erfolgte bei  $\lambda = 450$  nm für Lutein, Zeaxanthin,  $\beta$ -Cryptoxanthin,  $\alpha$ -Carotin und  $\beta$ -Carotin, bei  $\lambda = 472$  nm für all-trans-Lycopin und 5-cis-Lycopin sowie bei  $\lambda = 292$  nm für  $\alpha$ -Tocopherol.

Externe Kalibrierung:

Zur Kalibrierung wurde zunächst eine Konzentrationsbestimmung von Carotinoid- bzw.  $\alpha$ -Tocopherol-Stammlösungen mittels photometrischer Messung durchgeführt. Hierzu wurde eine kleine Menge der Carotinoide zunächst in Tetrahydrofuran angelöst und mit Aceton, das 0,01 % BHT enthielt, verdünnt.  $\alpha$ -Tocopherol wurde entsprechend mit Ethanol behandelt. Zur photometrischen Bestimmung wurde ein Teil der Stammlösungen in Hexan bzw. Ethanol so verdünnt, dass die Extinktion zwischen 0,4 und 0,9 lag. Die Konzentration der Stammlösung wurde über das Lambert-Beer'sche-Gesetz (siehe Gl. 3.2) berechnet. Alle Messungen erfolgten bei der in Tab. 3.2 angegebenen Wellenlänge gegen Hexan für die Carotinoide und gegen Ethanol für  $\alpha$ -Tocopherol. Aus den Stammlösungen wurden für die

Kalibrierung der Carotinoide und von  $\alpha$ -Tocopherol Verdünnungen in Aceton, das 0,01% BHT enthält, hergestellt.

$$c = \frac{E}{\varepsilon \cdot d}$$

$c$  = Konzentration [M]  
 $E$  = Extinktion  
 $\varepsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient [L/mol x cm]  
 $d$  = Schichtdicke [cm]

**Gl. 3.2:** Lambert-Beer'sches-Gesetz.

**Tab. 3.2:** Extinktionskoeffizienten verschiedener Carotinoide [318] und von  $\alpha$ -Tocopherol [319].

Substanz	Wellenlänge [nm]	Extinktionskoeffizient [L/mol x cm]
$\beta$ -Carotin	450 nm	139044
$\alpha$ -Carotin	450 nm	116800
Lycopin	472 nm	185213
Lutein	450 nm	136600
$\beta$ -Cryptoxanthin	450 nm	135700
Zeaxanthin	450 nm	133400
$\alpha$ -Tocopherol	292 nm	3058

### 3.2.3.4.2 Bestimmung des Ascorbinsäure-Gehalts

Die Reaktion beruht auf der  $\text{Cu}^{2+}$ -katalysierten Oxidation von ASC zu Dehydroascorbinsäure bzw. 2,3-Diketogulonsäure. Diese reagieren mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin zu Bis-2,4-Dinitrophenylhydrazonen, welche in konzentrierter Schwefelsäure bei  $\lambda = 520$  nm erfasst werden können. Der Zusatz von Thioharnstoff verhindert die Verfälschung oder Störung der Messung durch andere Chromogene durch die Aufrechterhaltung eines schwach reduzierenden Mediums.

#### Durchführung:

Unmittelbar nach jeder Blutabnahme wurde das Vollblut 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Blutgerinnung vollständig ablaufen zu lassen. Nach Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 1850 x g wurde das im Überstand gewonnene Serum direkt zur Analyse verwendet.

Der Reaktionsansatz erfolgte auf 96-Loch-Platten als Dreifachbestimmung. 250  $\mu\text{L}$  Serum wurden mit 500  $\mu\text{L}$  eiskalter 7,5%iger Trichloressigsäure gemischt und bei 11000 x g für 5 min zentrifugiert. 550  $\mu\text{L}$  des Überstands wurden weiter verwendet. Nach Zugabe von 110  $\mu\text{L}$  DTC-Lösung (siehe unten) und dreistündiger Inkubation bei 37 °C wurden 825  $\mu\text{L}$  65%ige Schwefelsäure zugegeben und die Extinktion bei  $\lambda = 520$  nm gemessen (300  $\mu\text{L}$  pro Loch).

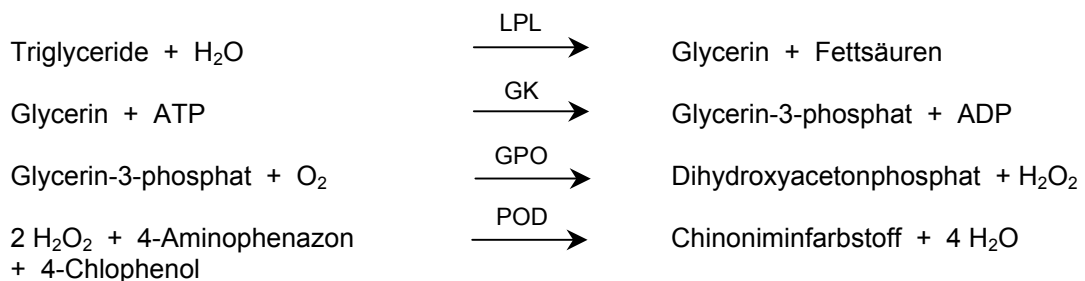
Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über eine Kalibriergerade: Aus einer ASC-Stamm-lösung (2 mg/mL in 5%iger Trichloressigsäure) wurden Standards mit 0, 2, 4, 8, 12 und 16 µg/mL ASC durch Verdünnung mit 5%iger Trichloressigsäure hergestellt. Die Aufarbeitung fand wie oben beschrieben statt.

Reagenzien:

DTC-Lösung: 3,0 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin, 0,4 g Thioharnstoff und 0,05 g Kupfersulfat mit 4,5 M Schwefelsäure auflösen und auf 100 mL auffüllen.

**3.2.3.5 Triglycerid-Bestimmung**

Um die Menge an Triglyceriden im Serum zu bestimmen, wurde eine Triglyceridmessung mit einem enzymatischen Farbttest (GPO-PAP) durchgeführt. Bei der Hydrolyse von Triglyceriden durch die Lipoproteinlipase entstehen Fettsäuren und Glycerin. Letzteres wird durch ATP in einer durch die Glycerinkinase katalysierten Reaktion zu Glycerin-3-phosphat phosphoryliert. Die Oxidation von Glycerin-3-phosphat wird durch die Glycerinphosphat-oxidase katalysiert, wobei Dihydroxyacetonphosphat und Wasserstoffperoxid entstehen. In Anwesenheit von Peroxidase bewirkt das gebildete Wasserstoffperoxid die oxidative Verbindung von 4-Chlorphenol und 4-Aminophenazon zu einem roten Chinoniminfarbstoff, der bei  $\lambda = 490$  nm gemessen wird (siehe Abb. 3.4). Die Extinktionszunahme ist direkt proportional der Triglycerid-Konzentration der Probe.



**Abb. 3.4:** Prinzip der Methode GPO-PAP zur Triglycerid-Bestimmung (LPL = Lipoproteinlipase; GK = Glycerinkinase; GPO = Glycerinphosphatoxidase; POD = Peroxidase).

Durchführung:

Unmittelbar nach jeder Blutabnahme wurde das Vollblut 30 min bei Zimmertemperatur inkubiert, um die Blutgerinnung vollständig ablaufen zu lassen. Nach Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 1850 x g wurde das im Überstand gewonnene Serum aliquotiert und bei -20 °C eingefroren.

Der Reaktionsansatz erfolgte auf 96-Loch-Platten als Dreifachbestimmung. Nach zehnfacher Verdünnung der Proben und des Standards mit isotoner Kochsalzlösung wurden 30 µL Probe bzw. Standard mit 300 µL Triglyceridreagenz gemischt. Als Leerwert diente

300 µL Triglyceridreagenz. Nach fünfminütiger Inkubation bei 37 °C wurde die Extinktion bei  $\lambda = 490$  nm gemessen. Die Konzentration der Triglyceride ergab sich gemäß Gl. 3.3:

$$c = \frac{\text{Sollwert}_{\text{Standard}} \cdot E_{\text{Probe}}}{E_{\text{Standard}}}$$

$c$  = Konzentration der Triglyceride [mg/dL]  
 $\text{Sollwert}_{\text{Standard}} = 44$  mg/dL  
 $E_{\text{Probe}}$  = Extinktion der Probe  
 $E_{\text{Standard}}$  = Extinktion des Standards

**Gl. 3.3:** Formel zur Berechnung der Triglycerid-Konzentration im Serum.

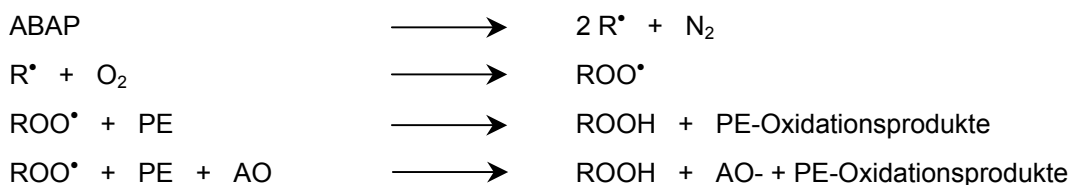
Reagenzien:

Isotone Kochsalzlösung: 8,7 g/L NaCl

**3.2.4 Bestimmung der antioxidativen Kapazität der Isoflavone und ihrer Metabolite**

**3.2.4.1 Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay**

Beim Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) -Test wird die Reaktivität von Antioxidantien gegenüber Peroxylradikalen  $\text{ROO}^\bullet$  fluorimetrisch gemessen. Die Methode wurde in Anlehnung an Cao et al. durchgeführt [320,321,322]. Das Reaktionsprinzip ist in Abb. 3.5 dargestellt. Das als Radikalstarter eingesetzte 2,2'-Azo-bis-(2-amidinopropan) (ABAP) wird thermolytisch unter Abgabe von Stickstoff in Alkylradikale gespalten, die mit gelöstem Sauerstoff zu  $\text{ROO}^\bullet$  reagieren. Diese kontinuierlich gebildeten  $\text{ROO}^\bullet$  zerstören den Fluoreszenzfarbstoff R-Phycoerythrin (PE), was zu einer Fluoreszenzabnahme und im Verlauf der Reaktion zum vollständigen Fluoreszenzverlust führt. In Gegenwart eines Antioxidanz, das einen Teil der gebildeten  $\text{ROO}^\bullet$  abfängt, wird die Fluoreszenzabnahme verzögert. Das Ausmaß der Verzögerung dient als Maß für die antioxidative Wirkung. Als Standard-Antioxidanz dient Trolox, eine zu  $\alpha$ -Tocopherol analoge Verbindung.



**Abb. 3.5:** Prinzip des ORAC-Assays (AO = Antioxidanz;  $\text{R}^\bullet$  = Alkylradikal;  $\text{ROOH}$  = Alkylhydroperoxid).

Mit dem ORAC-Assay sollten einerseits die antioxidative Kapazität der reinen Isoflavone und ihrer Metabolite bestimmt werden, andererseits wurde untersucht, inwieweit eine Korrelation zwischen der antioxidativen Kapazität und der Konzentration an Isoflavonen und

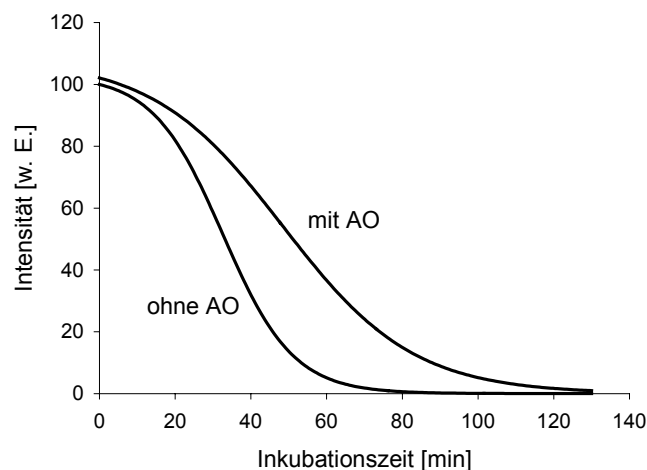


Metaboliten im Plasma besteht. Dabei kam das bei der Humanstudie (siehe Kap. 3.2.3.3.1) gewonnene Plasma zum Einsatz.

Durchführung für Reinsubstanzen:

Der Reaktionsansatz erfolgte auf 96-Loch-Platten als Dreifachbestimmung. Pro Ansatz wurden 15  $\mu\text{L}$  Probe, Standard (0 bis 120  $\mu\text{M}$  Trolox) bzw. Puffer (75 mM Natrium-Phosphat-Puffer, pH = 7,0) als Blindwert und 250  $\mu\text{L}$  15,5 nM PE (in 75 mM Natrium-Phosphat-Puffer, pH = 7,0) vorgelegt und die Reaktion nach fünfminütiger Vorinkubation bei 37 °C durch Zugabe von 35  $\mu\text{L}$  275 mM ABAP (in 75 mM Natrium-Phosphat-Puffer, pH = 7,0) gestartet. Die Reaktion wurde im 37 °C temperierten Spektralfluorimeter im Abstand von 5 min über 150 min bei der Anregungswellenlänge  $\lambda = 485$  nm und der Emissionswellenlänge  $\lambda = 595$  nm verfolgt. Die ABAP-Lösung wurde täglich frisch hergestellt, da eine Lagerung über 7 h hinaus zu Hydrolysereaktionen führt [323]. Für die Herstellung von Stammlösungen wurden die Testsubstanzen in 1/10 des nötigen Volumens mit DMSO angelöst und die Konzentration mit Ethanol so eingestellt, dass sie 10 mM betrug. Für die weitere Verwendung wurden die Lösungen täglich frisch mit Puffer so verdünnt, dass die Fluoreszenzintensitäten im Bereich der Kalibriergerade mit Trolox lagen.

Die beobachteten Fluoreszenzintensitätsverläufe erlauben Rückschlüsse auf die antioxidative Wirkung der Testsubstanzen. In Abb. 3.6 ist der Effekt eines Antioxidanz auf den Intensitätsverlauf dargestellt.



**Abb. 3.6:** Effekt eines Antioxidanz auf den Fluoreszenzintensitätsverlauf im ORAC-Test (AO = Antioxidanz).

Zur Quantifizierung dieser Wirkung wurde die Fläche unter der Kurve (AUC) ermittelt, die sowohl Ausmaß als auch Dauer der Verzögerung der Fluoreszenzabnahme erfasst. Die AUC-Werte sowohl der Trolox-Kalibriergeraden als auch der Testsubstanzlösungen hän-

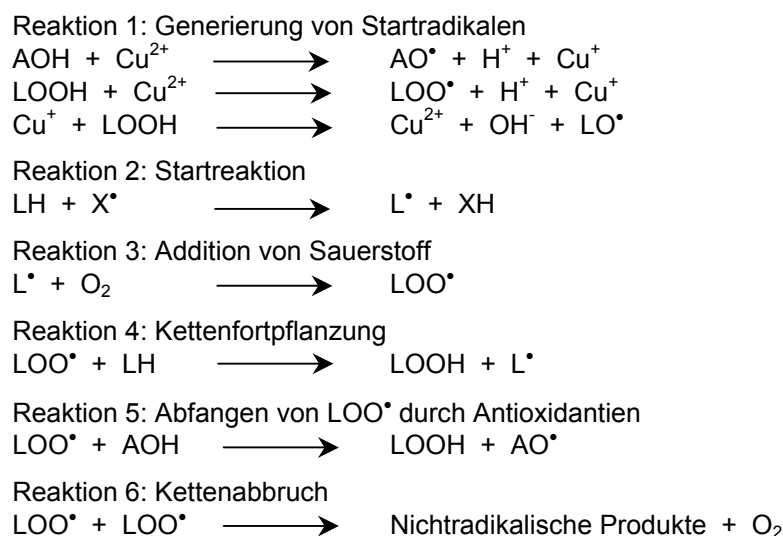
gen nach Abzug der Blindwertfläche linear von der Konzentration ab, so dass die zu 1 mM der jeweiligen Substanz äquivalente Trolox-Konzentration berechnet werden kann (= Trolox-Äquivalent). Je größer dieser Wert ist, desto höher ist die antioxidative Kapazität. Die Werte stellen Mittelwerte aus vier unabhängigen Messungen dar.

#### Durchführung für Plasma:

Das bei der Humanstudie (siehe Kap. 3.2.3.3.1) gewonnene Plasma wurde 125-fach mit 75 mM Natrium-Phosphat-Puffer (pH = 7,0) verdünnt und im ORAC-Test wie oben beschrieben eingesetzt. Die Auswertung erfolgte analog.

### 3.2.4.2 $\text{Cu}^{2+}$ -induzierte Lipidperoxidation

Bei der Lipidperoxidation wird die Zunahme der Oxidation der mehrfach-konjugierten Fettsäuren (PUFA), die ungefähr die Hälfte des Anteils an Fettsäuren in den Lipoproteinen geringer Dichte (LDL) ausmachen, nach Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen verfolgt [324]. Bei der Oxidation handelt es sich um einen radikalischen Prozess, der mit der Abstraktion eines Wasserstoffatoms aus einer PUFA durch ein initiiertes Radikal  $\text{X}^\bullet$  startet (siehe Abb. 3.7, Reaktion 2).

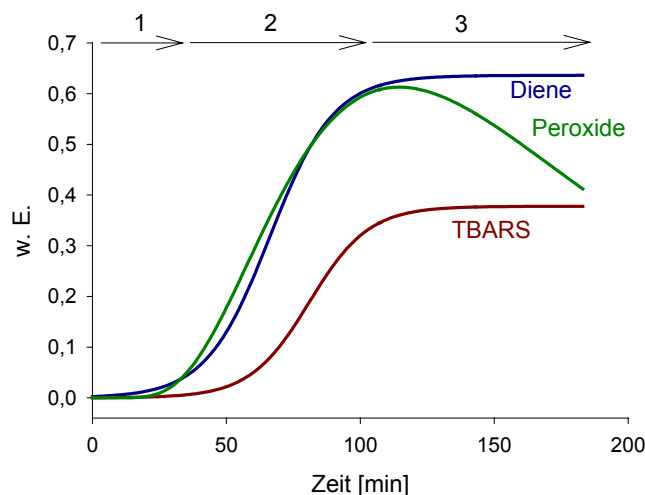


**Abb. 3.7:** Prinzip der Lipidperoxidation (AOH = Antioxidanz; L = PUFA;  $\text{L}^\bullet$  = Lipidradikal;  $\text{LOO}^\bullet$  = Lipidperoxyradikal; LOOH = Lipidhydroperoxid).

Das Ausmaß der Abstrahierung bestimmt die Geschwindigkeit der Startreaktion. Der Mechanismus der Induktion der Lipidperoxidation ist bisher noch nicht verstanden. Man vermutet, dass  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen an Apolipoprotein B gebunden freie Radikale auf der Oberfläche der LDL durch Interaktion mit LDL-assoziierten Antioxidantien (v.a.  $\alpha$ -Tocopherol) bzw. mit schon vorhandenen Lipidhydroperoxiden formen. Bei der Regenerierung der  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen über eine Art Fenton-Reaktion entstehen wiederum Radikale (Reaktion 1) [211,325].

Nach der Initiierung reagiert das Lipidradikal mit Sauerstoff, wodurch ein Lipidperoxyradikal gebildet wird (Reaktion 3). Dieses abstrahiert ein Wasserstoffatom aus einer weiteren PUFA, so dass ein Lipidhydroperoxid und ein neues Lipidradikal entstehen. Bei dieser Reaktion handelt es sich um die Kettenfortpflanzung (Reaktion 4). Die Zahl der Lipide, die zu Hydroperoxiden umgewandelt werden, beruht u.a. auf der Menge an Antioxidanz und der Geschwindigkeit des Kettenabbruchs, bei der Lipidperoxyradikale zu nichtradikalischen Produkten kombinieren (Reaktion 6). Bei letzteren handelt es sich um Aldehyde, Ketone, sekundäre Alkohole mit konjugierten Doppelbindungen, Oxysterole, Sauerstoff und Licht. Wenn im System Antioxidantien enthalten sind, können die Lipidperoxyradikale gemäß Reaktion 5 abgefangen werden, wodurch die Radikalkettenreaktion beendet wird, da die entstehenden Radikale nicht reaktiv genug sind, um die Kettenreaktion fortzupflanzen.

Die  $\text{Cu}^{2+}$ -induzierte Lipidperoxidation wird in drei Phasen eingeteilt: die Induktions-, Propagations- und Zerfallsphase (siehe Abb. 3.8).



**Abb. 3.8:** Kinetik der  $\text{Cu}^{2+}$ -induzierten Oxidation der LDL (1, 2, 3 = Länge der Induktions-, Propagations- bzw. Zerfallsphase).

In der Induktionsphase werden zunächst die natürlich in den LDL vorkommenden Antioxidantien verbraucht, beginnend mit  $\alpha$ -Tocopherol und endend mit  $\beta$ -Carotin. Anschließend erfolgt die Oxidation der PUFA (Propagationsphase), wobei die meisten Lipidhydroperoxide vorhanden sind, wenn 70 bis 80 % der PUFA oxidiert sind. Wenn die Zahl der Lipidhydroperoxide wieder abnimmt, dominieren die Zerfallsprodukte (z.B. Aldehyde, Oxysterole) (Zerfallsphase). Die Oxidation der PUFA kann photometrisch bei  $\lambda = 234 \text{ nm}$  verfolgt werden, da sich durch die Umwandlung der isolierten Doppelbindungen in konjugierte deren Absorptionsspektren ändern. Die Bildung von Sekundärprodukten, z.B. Alde-

hydren, kann nach Reaktion mit 2-Thiobarbitursäure zu den Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS) photometrisch bei  $\lambda = 532 \text{ nm}$  gemessen werden.

### 3.2.4.2.1 Isolierung und Aufreinigung der LDL

#### Isolierung:

Die Isolierung der LDL erfolgte mittels Dichtegradienten-Ultrazentrifugation nach Kleinveld et al. [326]. Dabei wurde mit EDTA antikoaguliertes Blut von vier weiblichen und zwei männlichen Spendern (25 bis 28 Jahre) für 10 min bei 4 °C und 1850 x g zentrifugiert und das im Überstand befindliche Plasma weiter aufgearbeitet. Zunächst wurde die Dichte von je 0,9 mL Plasma durch Zugabe von 0,993 mL Heavy Solution (siehe unten) auf  $\rho = 1,225 \text{ g/mL}$  angehoben und anschließend das schwere Plasma mit 2,5 mL isotoner Kochsalzlösung ( $\rho = 1,006 \text{ g/mL}$ ) überschichtet. Nach zweistündiger Zentrifugation bei 15 °C und 120000 x g befand sich die LDL-Fraktion entsprechend ihrer Dichte in der Interphase zwischen Plasma und Kochsalzlösung. Diese Fraktion wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette abgenommen und zur weiteren Aufreinigung in ein Reaktionsgefäß überführt.

#### Reagenzien:

Isotone Kochsalzlösung: 8,7 g/L NaCl

Heavy Solution: 153 g NaCl, 354 g KBr und 0,1 g EDTA mit bidest. Wasser auf 1 L auffüllen.

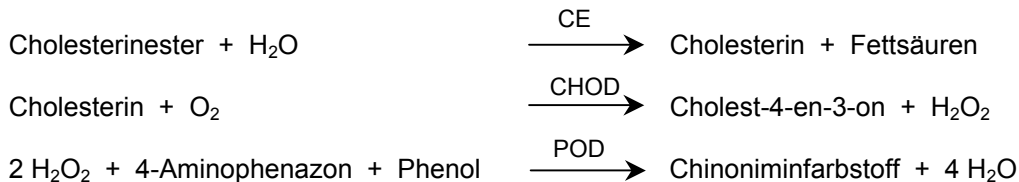
#### Aufreinigung:

Die isolierten LDL mussten zur weiteren Verwendung entsalzt werden. Dazu wurden Entsalzungssäulen (PD-10), die Sephadex™ G-25 Material enthalten, verwendet, um Substanzen mit großem Molekulargewicht ( $MW > 5000 \text{ g/mol}$ ) von solchen mit niedrigem ( $MW < 1000 \text{ g/mol}$ ) durch Austausch des Puffers zu trennen. Die Säulen wurden zunächst mit 20 mL bidest. Wasser und 15 mL PBS konditioniert. Das PBS wurde vorher mit 5 g/L Chelex-100 Ionenaustauscher-Harz behandelt, um Metallionen zu entfernen. Nach Zugabe von 1,1 mL PBS zu 400  $\mu\text{L}$  der isolierten LDL wurde das Gemisch auf die Säule gegeben bis es vollständig im Gel war. Zur Elution wurden 4 mL PBS zugegeben und die ersten 1,5 mL Eluat verworfen. In den letzten 2,5 mL befanden sich die aufgereinigten LDL, die zur Aufbewahrung mit Stickstoff überschichtet wurden. Die Säulen wurden mit 5 mL 2 M NaCl-Lösung und 25 mL PBS gereinigt und mit 5 mL 0,05 % Natriumazid konserviert. Sie können bis zu dreimal wieder verwendet werden.

#### Cholesterin-Bestimmung:

Um die Konzentration an isolierten LDL zu bestimmen, wurde eine Cholesterinmessung mit einem enzymatischen Farbttest (CHOD-PAP) durchgeführt. Bei der Hydrolyse von Cho-

lesterinestern durch die Cholesterinesterase entstehen Fettsäuren und freies Cholesterin. Letzteres wird durch die Cholesterinoxidase zu Cholest-4-en-3-on und Wasserstoffperoxid oxidiert. In Gegenwart von Peroxidase bewirkt das gebildete Wasserstoffperoxid die oxidative Verbindung von 4-Aminophenazon und Phenol, wodurch ein roter Chinoniminfarbstoff entsteht, der photometrisch bei  $\lambda = 546$  nm gemessen wird (siehe Abb. 3.9). Die Farbintensität des gebildeten Farbstoffs ist direkt proportional zur Cholesterin-Konzentration.



**Abb. 3.9:** Prinzip der Methode CHOD-PAP zur Cholesterin-Bestimmung (CE = Cholesterinesterase; CHOD = Cholesterinoxidase; POD = Peroxidase).

Durchführung:

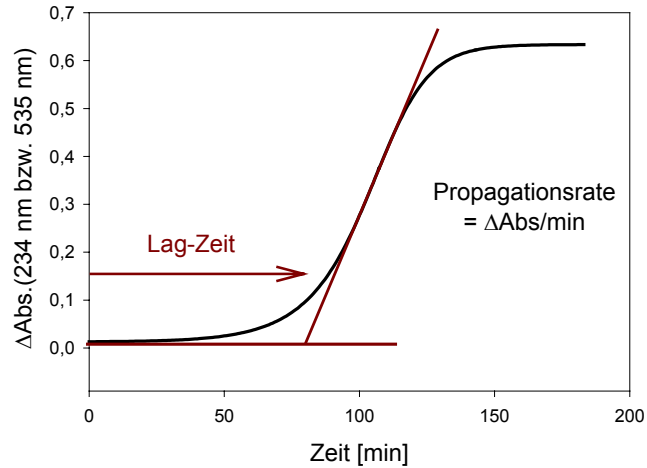
100  $\mu\text{L}$  Probe wurden mit 1 mL Cholesterinreagenz gemischt. Als Leerwert diente 1 mL Cholesterinreagenz. Nach zehnminütiger Inkubation bei Zimmertemperatur wurde die Extinktion bei  $\lambda = 546$  nm gegen den Reagenzienblindwert gemessen. Die Umrechnung der Cholesterin-Konzentration auf die LDL-Konzentration erfolgte unter der Annahme, dass LDL ein mittleres Molekulargewicht von 2,5 MDa und einen Anteil an 31,6 % Cholesterin besitzen [327].

**3.2.4.2.2 Dien-Methode**

Die Oxidation der PUFA wurde in Anlehnung an Esterbauer et al. [328] photometrisch bei  $\lambda = 234$  nm gemessen. Die Methode detektiert die Umwandlung von isolierten in konjugierte Doppelbindungen in den PUFA der LDL. Der Reaktionsansatz erfolgte auf 96-Loch-Platten als Dreifachbestimmung. Dazu wurden 235  $\mu\text{L}$  0,1  $\mu\text{M}$  LDL in PBS mit 5  $\mu\text{L}$  einer ethanolischen Lösung der Antioxidantien in der gewünschten Konzentration (für die Herstellung der Stammlösungen siehe Kap. 3.2.4.1) pro Loch einer 96-Loch-Platte gemischt und die Oxidation mit 10  $\mu\text{L}$  500  $\mu\text{M}$   $\text{CuCl}_2$ -Lösung gestartet. Die Reaktion wurde im 25 °C temperierten Photometer über einen Zeitraum von 180 min im Abstand von je 3 min bei  $\lambda = 234$  nm verfolgt.

Aus den aufgenommenen Daten (Absorption der gebildeten Diene versus Zeit) wurde nach Abzug der initialen Absorption die Dauer der Induktionsphase (Lag-Zeit) berechnet. Diese wurde aus dem Schnittpunkt der Tangente am Punkt der höchsten Steigung mit der Zeitachse bestimmt (siehe Abb. 3.10). Die Lag-Zeit wurde in An- und Abwesenheit der Testsubstanzen berechnet und eine Verlängerung als Prozentsatz bezogen auf die

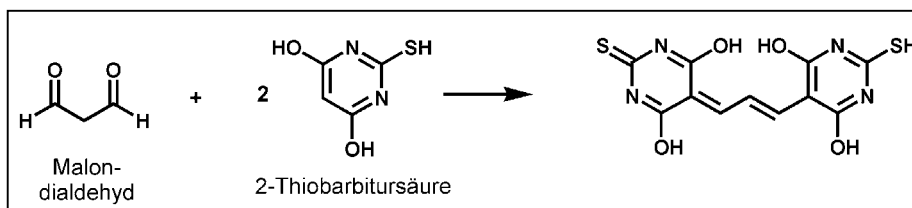
Kontrolle (Lösungsmittel) ausgedrückt. Darüber hinaus wurde die Konzentration der Testsubstanzen  $[\mu\text{M}]$  berechnet, die nötig ist, um eine um 50 % längere Lag-Zeit als die der Kontrolle zu erhalten. Die Werte stellen Mittelwerte aus vier unabhängigen Messungen dar.



**Abb. 3.10:** Bestimmung der Lag-Zeit als Schnittpunkt der Tangente am Punkt der höchsten Steigung mit der Zeitachse.

### 3.2.4.2.3 Methode zur Bestimmung der Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen

Die Bestimmung der Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS) erfolgte in Anlehnung an Wallin et al. [329] photometrisch bei  $\lambda = 532 \text{ nm}$ . Dieser Methode liegt die Reaktion von Aldehyden - die bei der Lipidperoxidation aus den Lipidhydroperoxiden entstehen (siehe Kap. 3.2.4.2) - mit 2-Thiobarbitursäure zu einem roten Addukt zugrunde. Die TBARS sind ein Maß für die Konzentration an Carbonylverbindungen in Fetten. Die Reaktion ist in Abb. 3.11 schematisch für Malondialdehyd, einem der Endprodukte der Lipidperoxidation [330], dargestellt.



**Abb. 3.11:** Reaktion von Malondialdehyd mit 2-Thiobarbitursäure.

#### Durchführung:

3,84 mL 0,1  $\mu\text{M}$  LDL in PBS wurden mit 4  $\mu\text{L}$  einer ethanolischen Lösung der Antioxidantien in der gewünschten Konzentration in einem 15 mL-Reaktionsgefäß gemischt und die Oxidation mit 160  $\mu\text{L}$  500  $\mu\text{M}$   $\text{CuCl}_2$ -Lösung gestartet. Nach Inkubation für 0, 1, 2, 3, 4, 5 und 6 h bei 37 °C erfolgte die Reaktion mit Thiobarbitursäure. Dazu wurden jeweils

0,5 mL-Aliquots der Oxidationsreaktion mit 20  $\mu\text{L}$  einer 10 mM BHT-Lösung in Methanol, 350  $\mu\text{L}$  einer jeweils frisch hergestellten 20%igen Trifluoressigsäure und 500  $\mu\text{L}$  einer 1,4%igen alkalischen Thiobarbitursäure-Lösung versetzt und für 45 min bei 95 °C inkubiert. Zur Reduktion von Trübungen wurde nach dem Abkühlen 100  $\mu\text{L}$  20%ige SDS-Lösung zugefügt. Die Absorption wurde als Differenz zwischen  $\lambda = 532 \text{ nm}$  und  $\lambda = 600 \text{ nm}$  gemessen, um die Lichtstreuung zu reduzieren. Zur Quantifizierung der TBARS wurde eine Kalibriergerade erstellt, für die anstelle der Probe bidest. Wasser sowie vier in bidest. Wasser frisch hergestellte Verdünnungen (0 bis 5  $\mu\text{M}$ ) einer 1,1,3,3-Tetraethoxypropan-Stamm-lösung (100  $\mu\text{M}$ ) eingesetzt wurden. Die Bestimmung der Lag-Zeit erfolgte analog zur Dien-Methode (siehe Kap. 3.2.4.2). Die Werte stellen Mittelwerte aus vier unabhängigen Messungen dar.

### 3.2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm StatView, Version 5.0 (SAS Institute Inc., 1998). Dabei kamen der *ungepaarte t-Test* nach *Student*, die *wiederholte Messungen Varianzanalyse (ANOVA)* sowie die *einfaktorielle ANOVA* mit dem *Post Hoc Test Fisher-PLSD* zum Einsatz. Korrelationen wurden nach *Pearson* berechnet. Die Ergebnisse sind im Falle der Untersuchungen zur zellulären Aufnahme und zur antioxidativen Kapazität von Isoflavonen als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung und bei der Humanstudie zur Untersuchung der Bioverfügbarkeit von DAI und DG als Mittelwerte mit den zugehörigen Wertebereichen angegeben. Das Signifikanzniveau wurde auf 95 % bzw.  $p < 0,05$  festgelegt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Untersuchungen zur zellulären Aufnahme von Isoflavonen

Die Mechanismen der zellulären Aufnahme von Isoflavonen sind bisher noch nicht abschließend geklärt worden (siehe Kap. 1.4.2). Ziel dieser Arbeit war es, die zelluläre Aufnahme und den Metabolismus der drei Isoflavone Daidzein (DAI), Genistein (GEN) und Glycitein (GLY) mit V79-Zellen, Caco-2-Zellen sowie humanen mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMC) zu untersuchen. V79- und Caco-2-Zellen wurden ausgewählt, da sie etablierte Zellmodelle für toxikologische Untersuchungen bzw. für Untersuchungen zur Funktion von Darmzellen sind. Humane PBMC wurden verwendet, da sie nach Isoflavonaufnahme in ständigem Kontakt mit den im Plasma vorkommenden Verbindungen stehen und leicht zugänglich sind. Sowohl die konzentrationsabhängige als auch die zeitabhängige Aufnahme bei 37 und 4 °C sollten bestimmt werden, um Hinweise über die zugrunde liegenden Transportmechanismen zu bekommen. Anschließend sollten aktive Transporter gehemmt werden, um so Aussagen über mögliche beteiligte Proteine zu machen. Um die intrazelluläre Konzentration zweifelsfrei bestimmen zu können, wurde zusätzlich der Anteil der drei Isoflavone in den Membranbestandteilen sowie der Cytosolfraktion bei Inkubationen von V79- und Caco-2-Zellen ermittelt.

Die Zellvitalität betrug bei allen durchgeführten Versuchen stets mehr als 90 %.

#### 4.1.1 Überprüfung der Modellrechnung zur Bestimmung der Konzentration in der Zelle

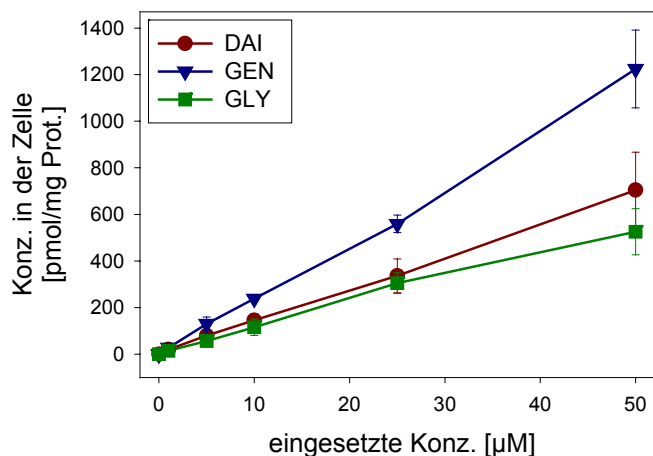
Um die Modellrechnung zur Bestimmung der Konzentration in der Zelle zu überprüfen, wurde die Gesamt-Glutathion-Konzentration (bestehend aus GSH und GSSG) in Caco-2-Zellen bestimmt (siehe Kap. 3.2.2.5) und die Konzentration in der Zelle gemäß Gl. 3.1 berechnet. Aus fünf unabhängigen Bestimmungen wurde eine Gesamt-Glutathion-Konzentration von  $2,3 \pm 0,6$  mM in Caco-2-Zellen erhalten.

#### 4.1.2 Aufnahme in V79-Zellen

In Abb. 4.1 ist die konzentrationsabhängige Aufnahme der drei Isoflavone DAI, GEN und GLY in V79-Zellen nach 15-minütiger Inkubation bei 37 °C dargestellt. Wie aus der Abbildung hervorgeht, besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration in der Zelle und den eingesetzten Konzentrationen. Die aufgenommenen Mengen unterscheiden sich für die drei Isoflavone bei den verwendeten Konzentrationen signifikant (Varianzanalyse (ANOVA);  $p < 0,05$ ). Der prozentuale Anteil der Membranbestandteile beträgt unabhängig von der eingesetzten Konzentration für DAI und GEN  $2,4 \pm 0,3$  % bzw.  $7,4 \pm$



0,2 % (ANOVA;  $p = 0,8839$  für DAI bzw.  $p = 0,9912$  für GEN). Im Falle von GLY gibt es einen nicht signifikanten Anstieg der Membranbestandteile von  $4,7 \pm 2,3$  % auf  $9,4 \pm 7,0$  % über den verwendeten Konzentrationsbereich (siehe Tab. 4.1) (ANOVA;  $p = 0,7012$ ).



**Abb. 4.1:** Konzentrationsabhängige Aufnahme von DAI, GEN bzw. GLY in V79-Zellen nach 15-minütiger Inkubation bei 37 °C. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte mit Standardabweichung. Die in die Zellen aufgenommenen Mengen unterscheiden sich für die drei Isoflavone für die verwendeten Konzentrationen signifikant (ANOVA;  $p < 0,05$ ).

**Tab. 4.1:** Prozentualer Anteil der Isoflavone in den Membranbestandteilen von V79-Zellen nach 15-minütiger Inkubation mit 1, 5, 10, 25 und 50  $\mu\text{M}$  DAI, GEN und GLY bei 37 °C. Aufgelistet sind jeweils die Mittelwerte mit Standardabweichung ermittelt aus vier unabhängigen Bestimmungen für DAI und GEN sowie aus sieben für GLY.

Eingesetzte Isoflavonkonzentration [ $\mu\text{M}$ ]	Isoflavonanteil in den Membranbestandteilen [%]		
	DAI	GEN	GLY
1	$2,4 \pm 0,4$	$8,7 \pm 2,7$	$4,7 \pm 2,3$
5	$3,1 \pm 1,0$	$8,1 \pm 2,3$	$5,7 \pm 3,0$
10	$2,9 \pm 0,1$	$8,3 \pm 1,8$	$7,9 \pm 6,5$
25	$2,7 \pm 0,7$	$8,5 \pm 2,7$	$8,9 \pm 6,6$
50	$2,3 \pm 0,4$	$8,4 \pm 1,5$	$9,4 \pm 7,0$

Wird die Konzentration der Isoflavone in der Zelle mit der in Kap. 3.2.2.7 aufgestellten Modellrechnung (Gl. 3.1) berechnet, so beträgt sie für DAI etwa das Siebenfache, für GEN das Zehnfache und für GLY das Fünffache der eingesetzten Konzentration (siehe Tab. 4.2). Die Konzentration in der Zelle ist also höher als die im umgebenden Medium.

**Tab. 4.2:** Konzentration in V79-Zellen nach 15-minütiger Inkubation mit 1, 5, 10, 25 und 50  $\mu\text{M}$  DAI, GEN bzw. GLY bei 37 °C. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte mit Standardabweichung ermittelt aus vier unabhängigen Bestimmungen für DAI und GEN sowie aus sieben für GLY.

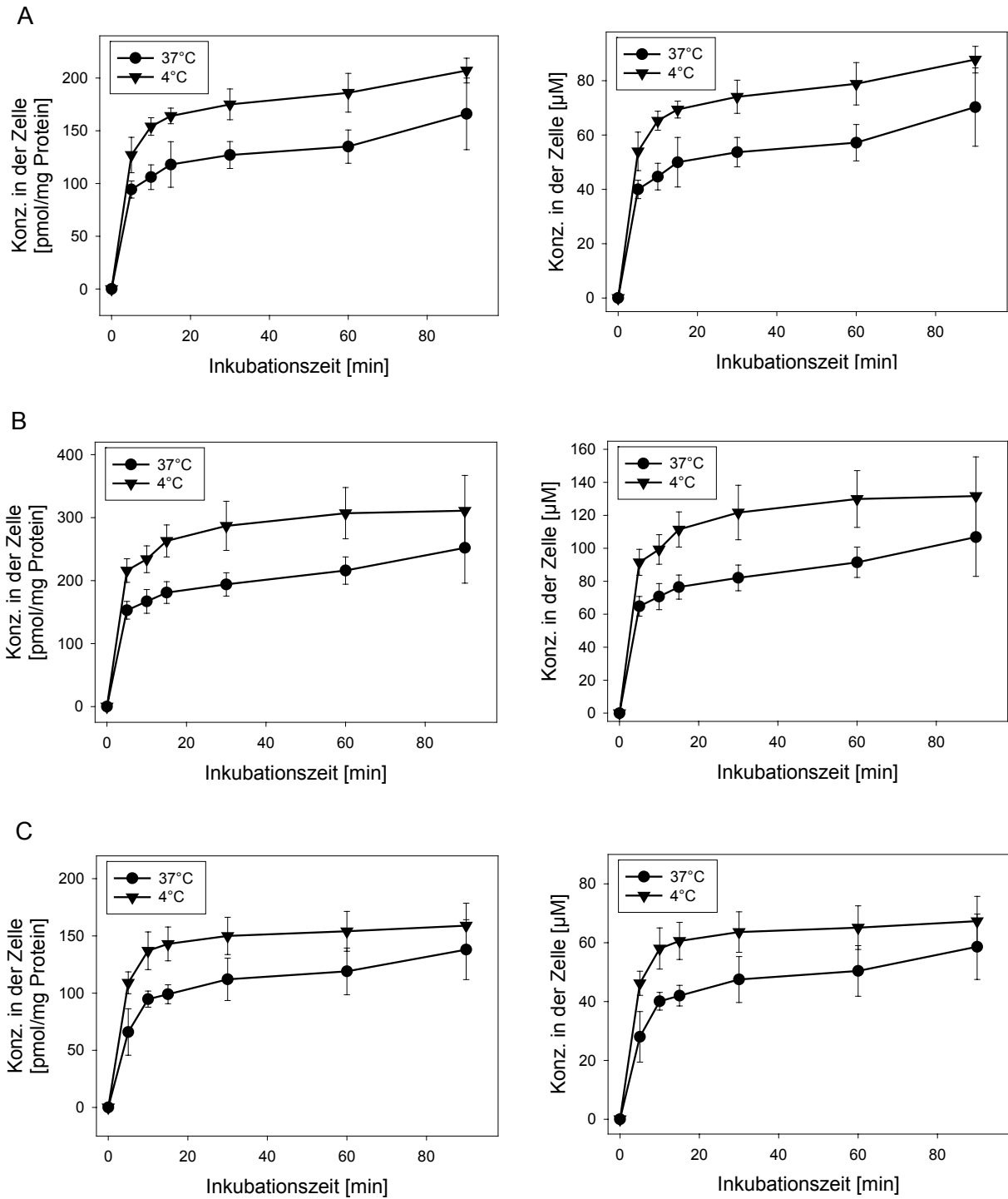
Eingesetzte Isoflavonkonzentration [ $\mu\text{M}$ ]	Intrazelluläre Isoflavonkonzentration [ $\mu\text{M}$ ]		
	DAI	GEN	GLY
0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
1	8,4 $\pm$ 1,4	11,6 $\pm$ 1,7	6,2 $\pm$ 2,8
5	33,5 $\pm$ 6,7	55,1 $\pm$ 12,6	23,9 $\pm$ 3,6
10	61,6 $\pm$ 11,8	100,8 $\pm$ 27,0	48,7 $\pm$ 14,8
25	142,4 $\pm$ 30,7	236,9 $\pm$ 15,9	129,2 $\pm$ 18,8
50	298,5 $\pm$ 68,9	518,7 $\pm$ 70,9	222,6 $\pm$ 38,1

In Abb. 4.2 ist die zeitabhängige Aufnahme von 5  $\mu\text{M}$  DAI, GEN und GLY in V79-Zellen nach Inkubation bei 37 und 4 °C dargestellt. Abgebildet sind sowohl die aufgenommenen Mengen an Isoflavonen pro mg Zellprotein als auch die nach Gl. 3.1 ermittelten Konzentrationen in der Zelle.

Wie aus Abb. 4.2 ersichtlich steigen die Konzentrationen der Isoflavone in der Zelle über die Inkubationszeit an. Die aufgenommenen Mengen sind bei 4 °C größer als bei 37 °C, unterscheiden sich jedoch nicht signifikant (*wiederholte Messungen ANOVA*;  $p = 0,9687$  für DAI,  $p = 0,9302$  für GEN bzw.  $p = 0,4189$  für GLY). Der prozentuale Anteil der Isoflavone in den Membranbestandteilen beträgt unabhängig von der Temperatur für DAI  $4,2 \pm 0,5 \%$ , für GEN  $9,8 \pm 1,3 \%$  und für GLY  $2,4 \pm 0,5 \%$  (*wiederholte Messungen ANOVA*;  $p = 0,8098$  für DAI,  $p = 0,4477$  für GEN bzw.  $p = 0,3833$  für GLY).

HPLC/DAD- und HPLC/MS-Untersuchungen sowohl des Zellkulturmediums als auch der Zelllysate über den gesamten Inkubationszeitraum sowie nach 24 h ergaben keine Hinweise auf die Bildung von Phase-II-Metaboliten. Dies ist nicht unerwartet, da V79-Zellen keine Fremdstoff-metabolisierenden Enzyme besitzen [331].

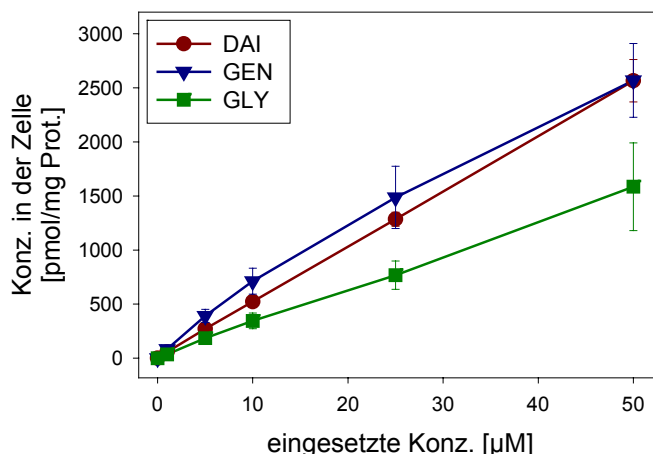
## Ergebnisse



**Abb. 4.2:** Zeitabhängige Aufnahme von DAI (A), GEN (B) und GLY (C) nach Inkubation von V79-Zellen mit 5 µM-Lösungen der drei Isoflavone bei 37 und 4 °C. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der aufgenommenen Mengen an Isoflavonen pro mg Zellprotein sowie der intrazellulären Konzentrationen.

### 4.1.3 Aufnahme in Caco-2-Zellen

Abb. 4.3 zeigt die konzentrationsabhängige Aufnahme von DAI, GEN und GLY in Caco-2-Zellen nach 15-minütiger Inkubation bei 37 °C. Auch hier wird ein linearer Zusammenhang zwischen der aufgenommenen Menge in die Zellen und den verwendeten Konzentrationen beobachtet. Die in der Zelle ermittelten Werte sind für die drei Isoflavone bei den verwendeten Konzentrationen signifikant unterschiedlich (ANOVA;  $p < 0,01$ ).



**Abb. 4.3:** Konzentrationsabhängige Aufnahme von DAI, GEN bzw. GLY in Caco-2-Zellen nach 15-minütiger Inkubation bei 37 °C. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte mit Standardabweichung. Die in die Zellen aufgenommenen Mengen unterscheiden sich für die drei Isoflavone für die verwendeten Konzentrationen signifikant (ANOVA;  $p < 0,01$ ).

**Tab. 4.3:** Prozentualer Anteil der Isoflavone in den Membranbestandteilen von Caco-2-Zellen nach 15-minütiger Inkubation mit 1, 5, 10, 25 und 50  $\mu\text{M}$  DAI, GEN und GLY bei 37 °C. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte mit Standardabweichung ermittelt aus vier unabhängigen Bestimmungen.

Eingesetzte Isoflavonkonzentration [ $\mu\text{M}$ ]	Isoflavonanteil in den Membranbestandteilen [%]		
	DAI	GEN	GLY
1	8,4 $\pm$ 0,7	17,0 $\pm$ 1,5	4,0 $\pm$ 1,1
5	8,4 $\pm$ 0,6	17,3 $\pm$ 2,5	5,0 $\pm$ 1,0
10	8,8 $\pm$ 2,3	17,0 $\pm$ 2,3	6,5 $\pm$ 2,1
25	8,0 $\pm$ 0,5	17,5 $\pm$ 3,1	7,4 $\pm$ 3,5
50	8,3 $\pm$ 2,1	18,0 $\pm$ 3,0	8,3 $\pm$ 2,4

Der prozentuale Anteil der Isoflavone in den Membranbestandteilen beträgt unabhängig von der eingesetzten Konzentration für DAI und GEN 8,4  $\pm$  0,8 % bzw. 17,4  $\pm$  0,6 % (ANOVA;  $p = 0,9752$  für DAI bzw.  $p = 0,9353$  für GEN). Für GLY steigt der Anteil von 4,0  $\pm$  1,1 % auf 8,3  $\pm$  2,4 % über den eingesetzten Konzentrationsbereich an (siehe Tab. 4.3). Allerdings liegt auch hier kein signifikanter Zusammenhang vor (ANOVA;  $p = 0,1723$ ). Wird

die Konzentration der Isoflavone in der Zelle gemäß Gl. 3.1 berechnet, so beträgt sie für DAI ungefähr das Neunfache, für GEN das Zehnfache und für GLY das Sechsfache der eingesetzten Konzentration (siehe Tab. 4.4).

**Tab. 4.4:** Konzentration in Caco-2-Zellen nach 15-minütiger Inkubation mit 1, 5, 10, 25 und 50  $\mu\text{M}$  DAI, GEN bzw. GLY bei 37 °C. Aufgeführt sind jeweils die Mittelwerte mit Standardabweichung ermittelt aus vier unabhängigen Bestimmungen.

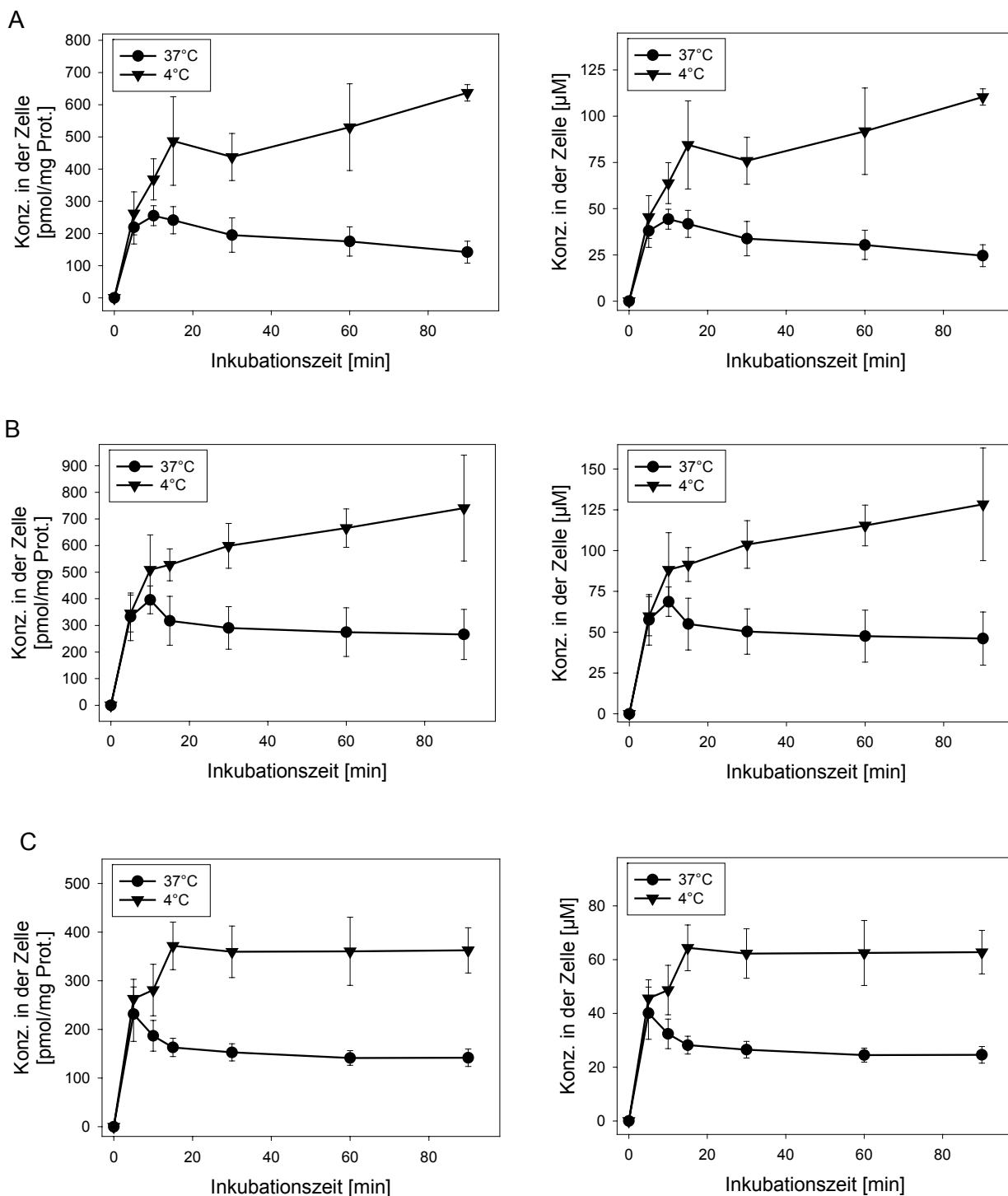
Eingesetzte Isoflavonkonzentration [ $\mu\text{M}$ ]	Intrazelluläre Isoflavonkonzentration [ $\mu\text{M}$ ]		
	DAI	GEN	GLY
0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
1	10,1 $\pm$ 1,5	14,8 $\pm$ 2,3	6,2 $\pm$ 1,6
5	47,0 $\pm$ 4,3	67,8 $\pm$ 10,6	32,3 $\pm$ 6,2
10	90,6 $\pm$ 7,5	123,4 $\pm$ 20,8	59,8 $\pm$ 12,6
25	222,9 $\pm$ 11,3	257,8 $\pm$ 50,0	133,1 $\pm$ 22,8
50	444,8 $\pm$ 34,1	445,3 $\pm$ 59,1	274,9 $\pm$ 70,2

Abb. 4.4 zeigt die zeitabhängige Aufnahme von 5  $\mu\text{M}$  DAI, GEN und GLY in Caco-2-Zellen nach Inkubation bei 37 und 4 °C. Dargestellt sind sowohl die aufgenommenen Mengen an Isoflavonen pro mg Zellprotein als auch die nach Gl. 3.1 berechneten Konzentrationen in der Zelle.

Die aufgenommenen Mengen der drei Isoflavone bei 37 und 4 °C unterscheiden sich für alle drei Verbindungen signifikant (*wiederholte Messungen ANOVA*;  $p \leq 0,0001$  für DAI und GEN bzw.  $p < 0,01$  für GLY). Auffällig ist, dass die Konzentrationen in der Zelle nach zehnmütiger Inkubation bei 37 °C für DAI und GEN und nach fünfminütiger für GLY maximal sind. Bei der Inkubation bei 4 °C hingegen findet man ein ähnliches Bild wie bei der Inkubation der V79-Zellen bei sowohl 37 °C als auch 4 °C, nämlich einen Anstieg der aufgenommenen Menge bis zu einem Grenzwert. Der prozentuale Anteil der Isoflavone in den Membranbestandteilen beträgt unabhängig von der Temperatur für DAI  $5,7 \pm 0,2 \%$ , für GEN  $14,7 \pm 0,7 \%$  und für GLY  $3,1 \pm 0,5 \%$  (*wiederholte Messungen ANOVA*;  $p = 0,6565$  für DAI,  $p = 0,5005$  für GEN bzw.  $p = 0,5017$  für GLY).

HPLC/DAD- und HPLC/MS-Untersuchungen des Zellkulturmediums über den gesamten Inkubationszeitraum sowie nach 24 h ergaben Hinweise darauf, dass Phase-II-Metabolite von Caco-2-Zellen gebildet und in das Zellkulturmedium ausgeschieden werden. Caco-2-Zellen sind dafür bekannt, dass sie Fremdstoff-metabolisierende Enzyme exprimieren [331]. Weitere Experimente, die in Kap. 4.1.5 beschrieben sind, wurden durchgeführt, um diese Befunde besser zu deuten.

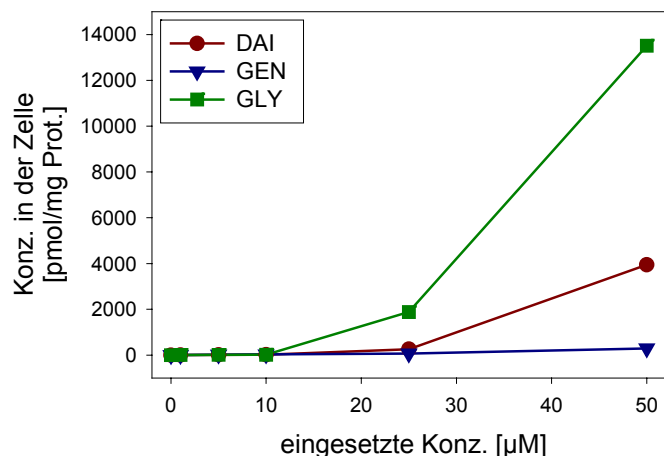
## Ergebnisse



**Abb. 4.4:** Zeitabhängige Aufnahme von DAI (A), GEN (B) und GLY (C) nach Inkubation von Caco-2-Zellen mit 5 µM-Lösungen der drei Isoflavone bei 37 und 4 °C. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der aufgenommenen Mengen an Isoflavonen pro mg Zellprotein sowie der intrazellulären Konzentrationen. Die aufgenommenen Mengen bei 37 und 4 °C unterscheiden sich für alle drei Isoflavone signifikant (*wiederholte Messungen ANOVA*;  $p \leq 0,0001$  für DAI und GEN bzw.  $p < 0,01$  für GLY).

#### .1.4 Aufnahme in humane PBMC

Im Falle der humanen PBMC wurde wegen der benötigten hohen Zellzahlen und der jeweils frischen Isolierung nur Einfachbestimmungen durchgeführt. In Abb. 4.5 ist die konzentrationsabhängige Aufnahme von DAI, GEN und GLY in humane PBMC nach 15-minütiger Inkubation bei 37 °C dargestellt.



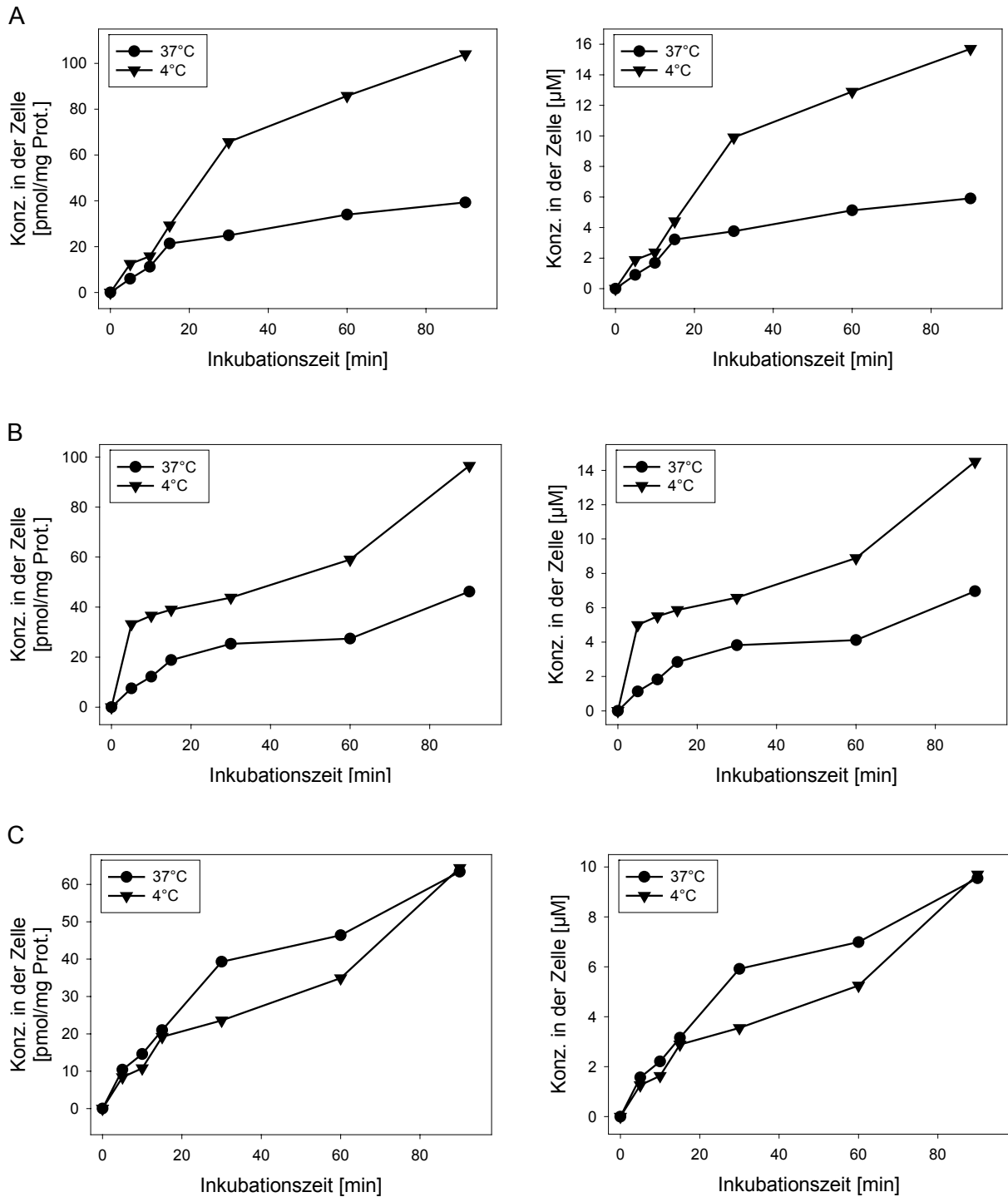
**Abb. 4.5:** Konzentrationsabhängige Aufnahme von DAI, GEN bzw. GLY in humane PBMC nach 15-minütiger Inkubation bei 37 °C.

**Tab. 4.5:** Konzentration in humanen PBMC nach 15-minütiger Inkubation mit 1, 5, 10, 25 und 50 µM DAI, GEN bzw. GLY bei 37 °C.

Eingesetzte Isoflavonkonzentration [µM]	Intrazelluläre Isoflavonkonzentration [µM]		
	DAI	GEN	GLY
0	0,0	0,0	0,0
1	0,8	0,8	1,0
5	2,1	3,0	1,6
10	2,8	4,3	2,5
25	39,1	10,3	283,6
50	594,5	44,3	2035,9

Im Gegensatz zu V79- und Caco-2-Zellen kommt es in den PBMC zu einem exponentiellen Anstieg der Konzentration, wobei von GLY am meisten aufgenommen wird, gefolgt von DAI und GEN. Der Isoflavonanteil in den Membranbestandteilen wurde aufgrund der dafür benötigten sehr hohen Zellzahl nicht bestimmt. Wird die Konzentration der Isoflavone in der Zelle gemäß Gl. 3.1 berechnet, so beträgt sie für DAI maximal das Zwölffache und für GLY das 40-fache der eingesetzten Dosis. Für GEN findet man höchstens die gleiche Konzentration in der Zelle wie im umgebenden Zellkulturmedium (siehe Tab. 4.5). Mögliche Grün-

de für die unterschiedlichen Ergebnisse zur zellulären Aufnahme von Isoflavonen in V79- und Caco-2-Zellen bzw. in PBMC werden in Kap. 5.1 diskutiert.



**Abb. 4.6:** Zeitabhängige Aufnahme von DAI (A), GEN (B) und GLY (C) nach Inkubation von humanen PBMC mit 5 µM-Lösungen der drei Isoflavone bei 37 und 4 °C. Dargestellt sind die aufgenommenen Mengen an Isoflavonen pro mg Zellprotein sowie die Konzentrationen in der Zelle.

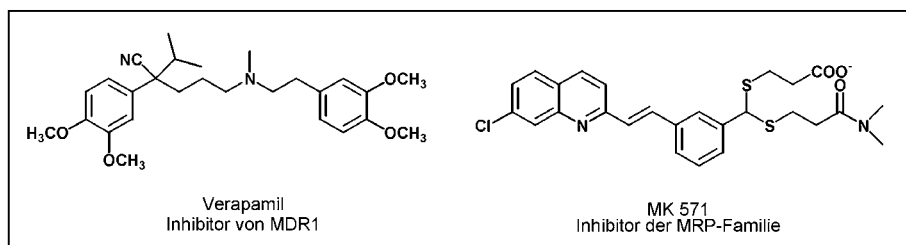


Abb. 4.6 zeigt die zeitabhängige Aufnahme von 5  $\mu\text{M}$  DAI, GEN und GLY in humane PBMC bei 37 und 4 °C. Dargestellt sind sowohl die aufgenommenen Mengen an Isoflavonen pro mg Zellprotein als auch die nach Gl. 3.1 berechneten Konzentrationen in der Zelle. Analog zu V79-Zellen beobachtet man einen Anstieg der Konzentrationen in der Zelle sowohl bei 37 °C als auch bei 4 °C, wobei die aufgenommenen Mengen bei 4 °C die bei 37 °C übersteigen. Da nur Einfachbestimmungen durchgeführt wurden, konnten keine statistischen Berechnungen durchgeführt werden.

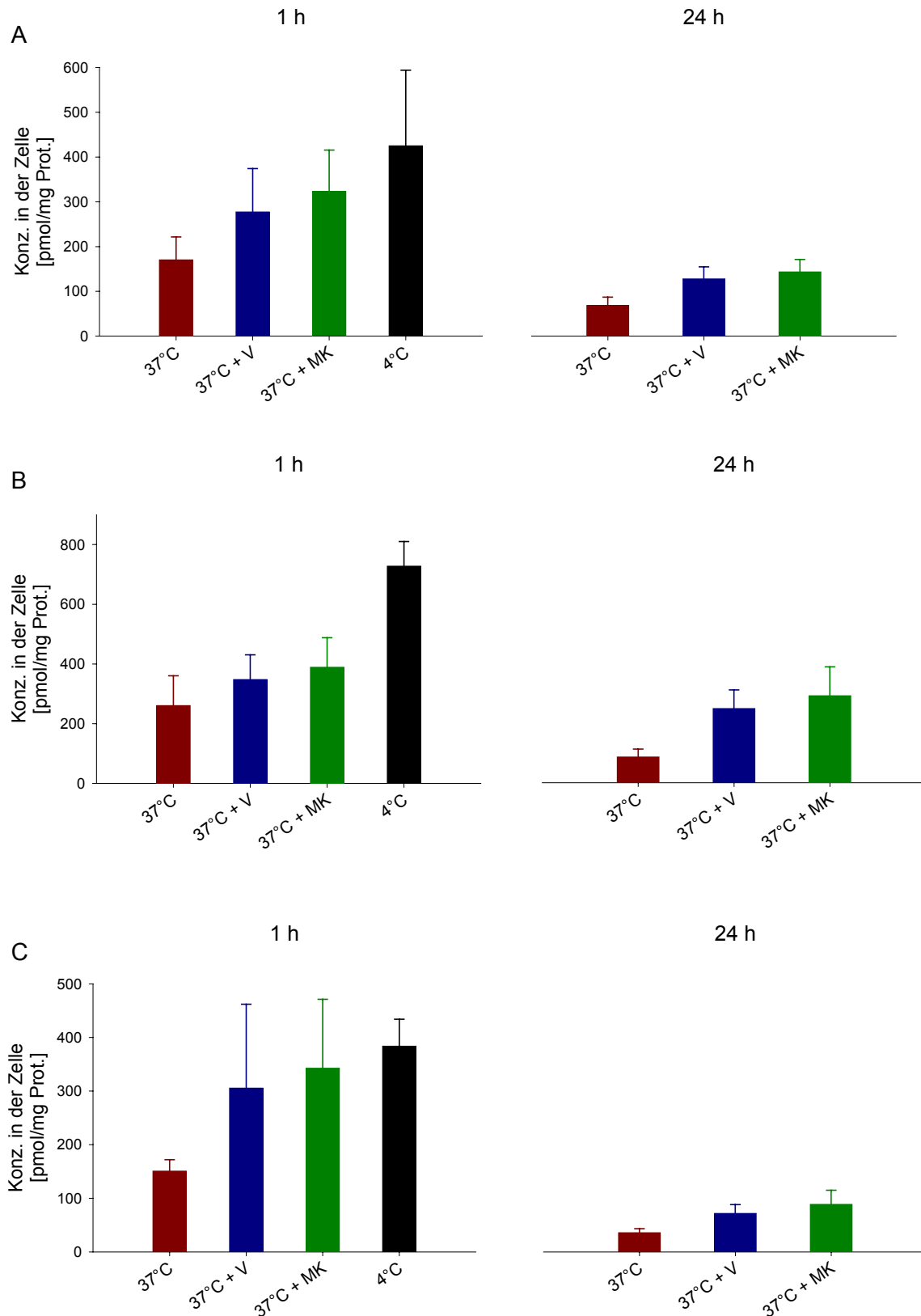
HPLC/DAD- und HPLC/MS-Untersuchungen des Zellkulturmediums über den gesamten Inkubationszeitraum sowie nach 24 h ergaben Hinweise darauf, dass Phase-II-Metabolite von den humanen PBMC gebildet und in das Zellkulturmedium ausgeschieden werden. In humanen PBMC werden wie in Caco-2-Zellen Phase-II-Enzyme, z.B. UDP-Glucuronyltransferasen und Sulfotransferasen, exprimiert [332,333]. Zusätzliche Versuche, die in Kap. 4.1.6 beschrieben sind, wurden durchgeführt, um diese Ergebnisse besser zu verstehen.

#### 4.1.5 Beteiligung der Transportproteine MDR1 und MRP am Transport der Isoflavone aus Caco-2-Zellen

Sowohl die Verläufe der aufgenommenen Mengen an Isoflavonen bei 37 °C als auch die im Zellkulturmedium auftretenden Phase-II-Konjugate lassen auf den Efflux der Isoflavone schließen. Daher wurden weiterführende Experimente durchgeführt, um die Beteiligung der in Caco-2-Zellen exprimierten Transportproteine P-Glycoprotein (MDR1) und der Multidrug Resistance Associated Proteine (MRP) am Efflux der Isoflavone und ihrer Phase-II-Konjugate zu untersuchen [309,310,311]. Dazu wurden sie mit deren Hemmstoffen Verapamil bzw. MK 571 inhibiert (siehe Abb. 4.7) und mit den drei Isoflavonen co-inkubiert. Verapamil wird dabei als relativ spezifischer Hemmstoff für MDR1 angesehen, während MK 571 ein selektiver Inhibitor der MRP-Familie ist [313,314,334]. Als Kontrolle dienten Inkubationen der reinen Isoflavon-Aglykone bei 37 und 4 °C.



**Abb. 4.7:** Strukturformeln von Verapamil und MK 571.



**Abb. 4.8:** In Caco-2-Zellen aufgenommene Mengen an DAI (A), GEN (B) und GLY (C) nach Hemmung von MDR1 und MRP mit je 100  $\mu$ M Verapamil (V) und MK 571 (MK) und Co-Inkubation mit 5  $\mu$ M-Lösungen der drei Isoflavone. Als Kontrollen dienten Inkubationen der reinen Isoflavone für 1 bzw. 24 h sowie bei 4 °C für 1 h. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte mit Standardabweichung.

In Abb. 4.8 sind die aufgenommenen Mengen der drei Isoflavone DAI, GEN und GLY (5 µM) in der Zelle nach Hemmung der Transportproteine MDR1 und MRP dargestellt. Als Kontrolle dienten Inkubationen mit den drei reinen Isoflavon-Aglykonen bei 37 °C sowie bei 4 °C, wobei die Inkubation bei 4 °C wegen cytotoxischer Eigenschaften nur für die einstündige Inkubation durchgeführt wurde. Nach Hemmung von MDR1 und MRP wird eine höhere Konzentration in den Zellen gefunden, wobei die Inhibierung der MRP sowohl nach ein- als auch nach 24-stündiger Inkubationszeit eine größere Rolle spielt. Die Anteile unterscheiden sich bei der 24-stündigen Inkubation zwischen den verschiedenen Versuchsbedingungen für alle drei Isoflavone signifikant (ANOVA;  $p < 0,05$ ), bei der einstündigen Inkubation nur für GEN ( $p < 0,01$ ). Für DAI und GLY können jedoch im *Post Hoc Test Fisher-PSLD* signifikante Unterschiede zwischen den Konzentrationen in der Zelle bei Inkubation mit MK 571 bzw. bei 4 °C verglichen mit der Kontrolle bei 37 °C gefunden werden ( $p < 0,05$ ).

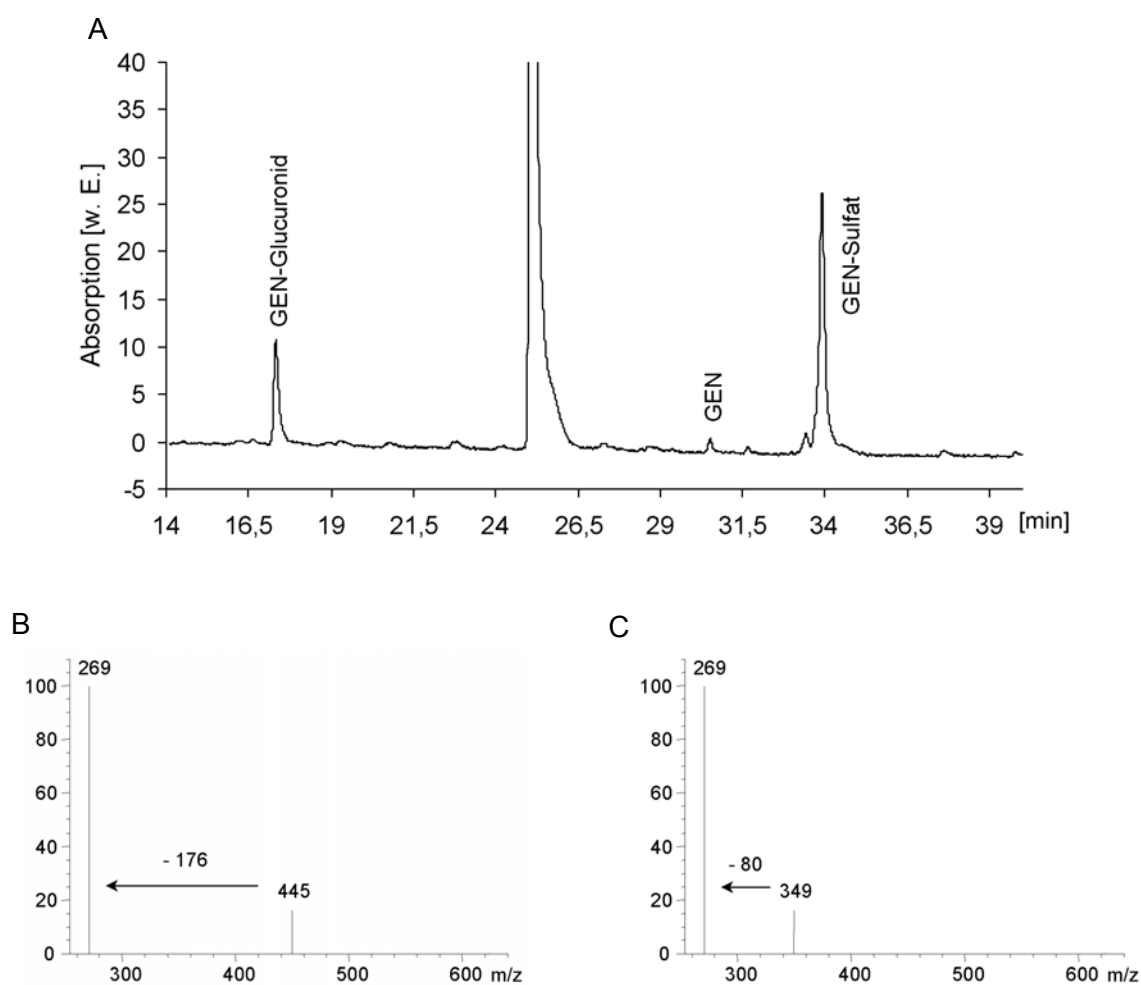
**Tab. 4.6:** Auf die eingesetzte Dosis der Isoflavone (je 5 µM) bezogener Anteil der Phase-II-Konjugate (Glucuronide und Sulfate) im Zellkulturmedium von Caco-2-Zellen nach ein- bzw. 24-stündiger Inkubation. Aufgelistet sind jeweils die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Bestimmungen sowie die Signifikanzniveaus (ANOVA) bezogen auf die Kontrolle bei 37 °C.

37 °C	Isoflavon	1 h Anteil an Glucuronid / Sulfat [%]	24 h Anteil an Glucuronid / Sulfat [%]
	DAI	0,9 ± 0,1 / 6,7 ± 0,4	10,1 ± 0,1 / 82,8 ± 2,4
	GEN	5,1 ± 2,2 / 21,3 ± 7,2	23,9 ± 1,6 / 72,8 ± 1,6
	GLY	4,7 ± 0,3 / 21,4 ± 4,9	14,5 ± 0,8 / 82,1 ± 0,2

37 °C + Verapamil	Isoflavon	1 h Anteil an Glucuronid / Sulfat [%]	24 h Anteil an Glucuronid / Sulfat [%]
	DAI	0,3 ± 0,1 ( $p < 0,05$ )	11,1 ± 0,1 ( $p = 0,1076$ )
		4,9 ± 0,2 ( $p < 0,05$ )	77,5 ± 4,2 ( $p < 0,01$ )
	GEN	2,3 ± 0,1 ( $p = 0,0865$ )	10,5 ± 0,5 ( $p = 0,0647$ )
16,6 ± 0,6 ( $p = 0,3228$ )		65,5 ± 4,3 ( $p < 0,0001$ )	
GLY	3,3 ± 1,1 ( $p = 0,1057$ )	9,1 ± 0,6 ( $p < 0,01$ )	
	8,9 ± 1,8 ( $p = 0,0573$ )	75,7 ± 3,5 ( $p < 0,05$ )	

37 °C + MK 571	Isoflavon	1 h Anteil an Glucuronid / Sulfat [%]	24 h Anteil an Glucuronid / Sulfat [%]
	DAI	0,3 ± 0,1 ( $p < 0,01$ )	4,4 ± 0,3 ( $p = 0,4882$ )
		5,3 ± 0,5 ( $p < 0,05$ )	84,9 ± 0,5 ( $p < 0,0001$ )
	GEN	3,6 ± 0,6 ( $p = 0,3073$ )	16,4 ± 0,2 ( $p = 0,4777$ )
17,6 ± 1,8 ( $p = 0,4243$ )		70,9 ± 3,2 ( $p < 0,01$ )	
GLY	2,3 ± 0,6 ( $p < 0,05$ )	11,4 ± 0,7 ( $p < 0,01$ )	
	8,2 ± 1,4 ( $p < 0,05$ )	73,8 ± 2,1 ( $p < 0,05$ )	

In Tab. 4.6 ist der Anteil der Phase-II-Konjugate (Glucuronide und Sulfate), der im Zellkulturmedium bei Inkubation mit DAI, GEN oder GLY sowie mit Verapamil bzw. MK 571 bestimmt wurde, bezogen auf die eingesetzte Dosis aufgelistet. Nach Hemmung von MDR1 und MRP bei 37 °C konnten im Vergleich zur Kontrolle zum Teil signifikante Unterschiede der Menge an Phase-II-Konjugaten im Medium festgestellt werden (ANOVA; siehe Tab. 4.6). Im Falle der Inkubation bei 4 °C wurden keine Phase-II-Konjugate im Zellkulturmedium detektiert. Darüber hinaus ergaben sich keine Hinweise auf Phase-I-Metabolite sowie Phase-II-Konjugate im Zelllysat. In Abb. 4.9 ist ein repräsentatives HPLC-Chromatogramm des Zellkulturmediums nach 24-stündiger Inkubation mit GEN bei 37 °C mit den dazugehörigen Massenspektren dargestellt.



**Abb. 4.9:** Repräsentatives HPLC-Chromatogramm (A) des Zellkulturmediums von Caco-2-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit 5  $\mu$ M GEN bei 37 °C mit den dazugehörigen Massenspektren für GEN-Glucuronid (B) und -Sulfat (C). Die Massenspektren sind durch den Verlust der Glucuronsäure (m/z 176) bzw.  $\text{SO}_3$  (m/z 80) gekennzeichnet.

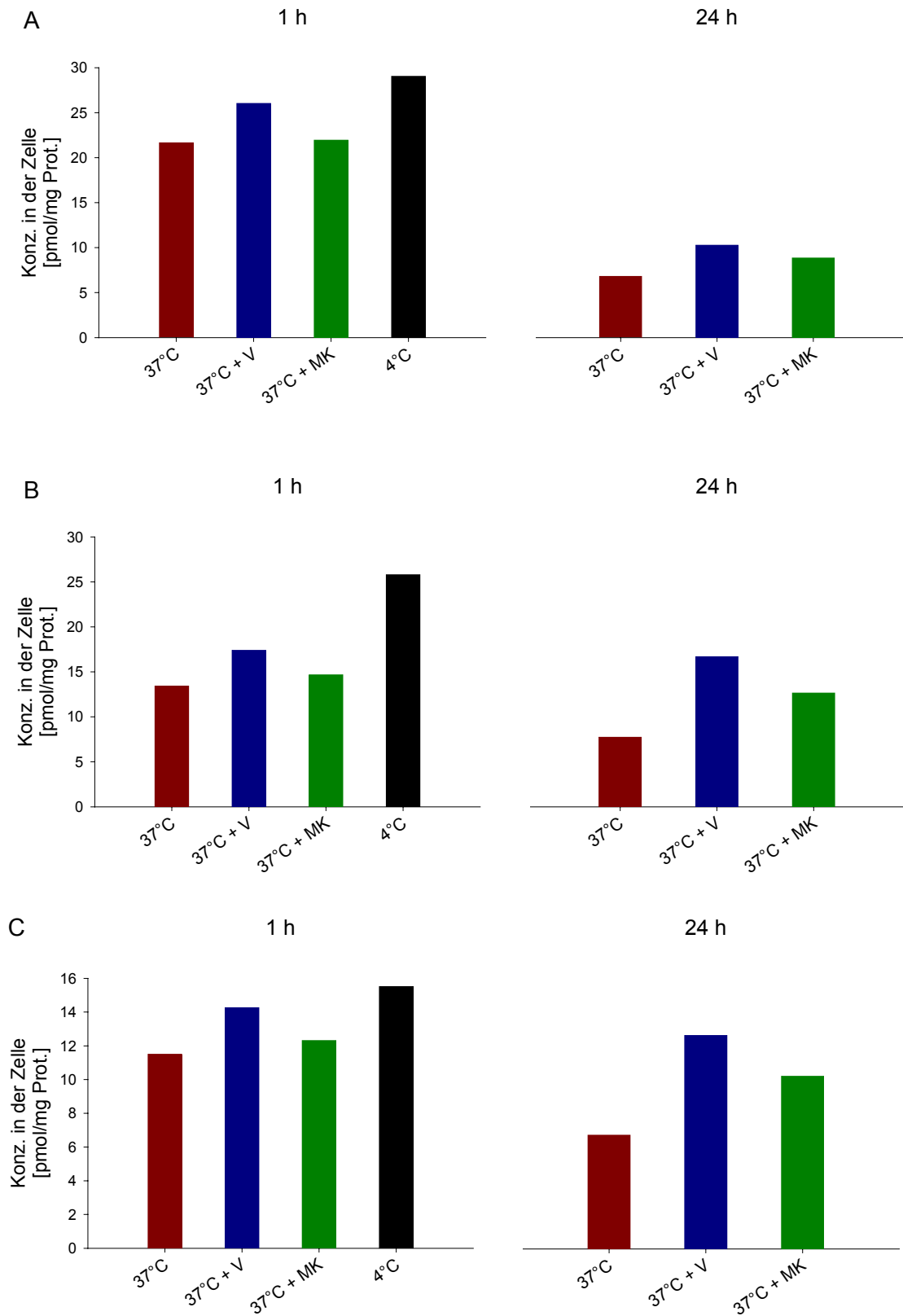
#### **4.1.6 Beteiligung der Transportproteine MDR1 und MRP am Transport der Isoflavone aus humanen PBMC**

Auch im Falle der PBMC wurden weitere Versuche durchgeführt, da die im Zellkulturmedium auftretenden Phase-II-Konjugate auf den Efflux der Isoflavone schließen lassen. Um die Beteiligung der Transportproteine MDR1 und MRP, die in PBMC exprimiert werden [312], zu untersuchen, wurden sie mit Verapamil und MK 571 gehemmt und mit den einzelnen Isoflavonen co-inkubiert. Als Kontrollen dienten auch hier Inkubationen mit den reinen Isoflavonen bei 37 °C bzw. 4 °C. Es wurde aus den bereits in Kap. 4.1.4 erwähnten Gründen nur Einfachbestimmungen durchgeführt.

Abb. 4.10 zeigt die aufgenommene Menge der drei Isoflavone DAI, GEN und GLY (5 µM) in der Zelle nach Hemmung der Transportproteine MDR1 und MRP für 1 und 24 h. Als Kontrolle dienten wiederum Inkubationen mit den drei reinen Isoflavon-Aglykonen bei 37 °C sowie bei 4 °C, wobei die Inkubation bei 4 °C wegen cytotoxischer Eigenschaften nur für die einstündige Inkubation durchgeführt wurde. Wie bei Caco-2-Zellen sind sowohl MDR1 als auch MRP am Efflux der Isoflavone und ihrer Phase-II-Konjugate beteiligt, wobei die Hemmung der MRP geringere Auswirkungen auf die Konzentration in der Zelle sowohl nach der ein- als auch nach der 24-stündigen Inkubationszeit zeigt. Für die Versuche wurden, um die interindividuelle Variation möglichst gering zu halten, nur die PBMC eines einzigen Spenders verwendet.

Im Zellkulturmedium dieses Probanden konnten lediglich die Sulfat-Konjugate detektiert werden. In Tab. 4.7 ist der Anteil der Sulfate bezogen auf die eingesetzte Dosis aufgelistet, der bei Inkubation mit DAI, GEN oder GLY sowie mit Verapamil bzw. MK 571 bestimmt wurde. Im Falle der Inkubation bei 4 °C konnten keine Phase-II-Konjugate im Zellkulturmedium nachgewiesen werden. Phase-I-Metabolite sowie Phase-II-Konjugate im Zelllysat waren wie bei Caco-2-Zellen ebenfalls nicht detektierbar. In Abb. 4.11 ist ein repräsentatives HPLC-Chromatogramm des Zellkulturmediums nach 24-stündiger Inkubation mit GEN bei 37 °C dargestellt.

## Ergebnisse



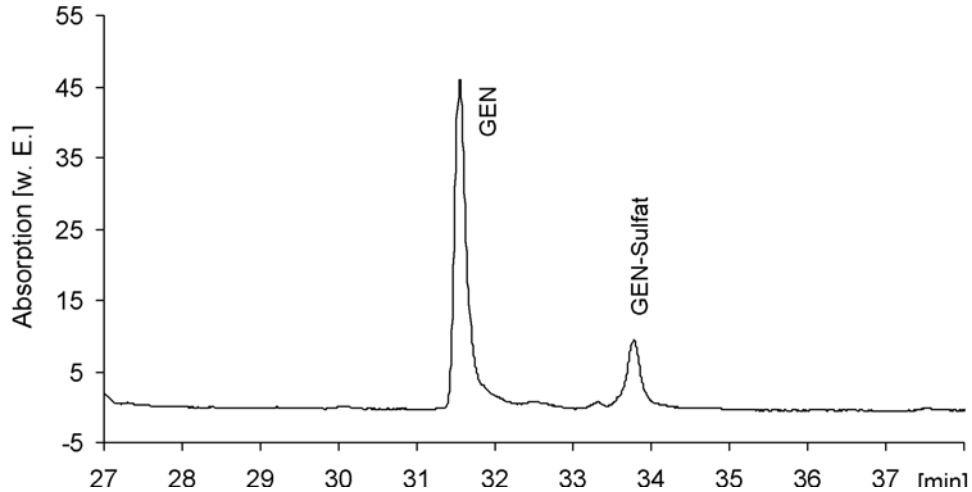
**Abb. 4.10:** In humane PBMC aufgenommene Mengen an DAI (A), GEN (B) und GLY (C) nach Hemmung von MDR1 und MRP mit 100  $\mu$ M Verapamil (V) und MK 571 (MK) und Co-Inkubation mit 5  $\mu$ M-Lösungen der drei Isoflavone. Als Kontrollen dienten Inkubationen der drei reinen Isoflavone alleine für 1 bzw. 24 h sowie bei 4 °C für 1 h.

**Tab. 4.7:** Auf die eingesetzte Dosis der Isoflavone (je 5  $\mu\text{M}$ ) bezogener Anteil der Sulfate im Zellkulturmedium von humanen PBMC nach ein- bzw. 24-stündiger Inkubation.

37 °C	Isoflavon	1 h Sulfat-Anteil [%]	24 h Sulfat-Anteil [%]
	DAI	0,6	20,9
	GEN	1,0	32,8
	GLY	2,0	42,2

37 °C + Verapamil	Isoflavon	1 h Sulfat-Anteil [%]	24 h Sulfat-Anteil [%]
	DAI	0,4	12,0
	GEN	0,6	19,4
	GLY	1,1	31,5

37 °C + MK 571	Isoflavon	1 h Sulfat-Anteil [%]	24 h Sulfat-Anteil [%]
	DAI	0,0	5,7
	GEN	0,0	10,6
	GLY	0,0	12,2



**Abb. 4.11:** Repräsentatives HPLC-Chromatogramm des Zellkulturmediums von humanen PBMC nach 24-stündiger Inkubation mit 5  $\mu\text{M}$  GEN bei 37 °C.

## 4.2 Humanstudie

Hauptziel der Humanstudie war es, den Einfluss der Zuckerkonjugation auf die Bioverfügbarkeit und die Metabolisierung der Isoflavone zu untersuchen. Aus diesem Grund wurden nach Gabe des Isoflavons DAI und seines 7-O- $\beta$ -D-Glucosids Daidzin (DG) die biokinetischen Kenndaten des Plasmas für DAI und dessen bakterielle und oxidative Metabolite Dihydrodaidzein (DHD), O-Demethylangolensin (O-DMA), Equol, 6-Hydroxydaidzein (6-OH-DAI), 3'-Hydroxydaidzein (3'-OH-DAI) sowie 8-Hydroxydaidzein (8-OH-DAI) ermittelt. Außerdem wurden die im Urin ausgeschiedenen Mengen an DAI und seinen Metaboliten quantifiziert. Des Weiteren wurde die Konzentration an DAI in den PBMC der Probanden bestimmt, da die Ergebnisse zur Aufnahme von Isoflavonen in humane PBMC auf eine Anreicherung der Isoflavone in vitro schließen lassen (siehe Kap. 4.1.4).

Aufgrund der großen interindividuellen Variation sind für alle Messwerte sowohl die Mittelwerte als auch die Wertebereiche angegeben. Erstere dienen vor allem dazu, einen Anhaltspunkt zu geben. Für die Bestimmung der biokinetischen Kenndaten wurden jeweils die Werte der Plasmakonzentrationen von DAI und seinen Metaboliten vor der Einnahme des Präparats (0 h) abgezogen.

### 4.2.1 Biokinetik

#### 4.2.1.1 Bestimmung von Daidzein im Plasma

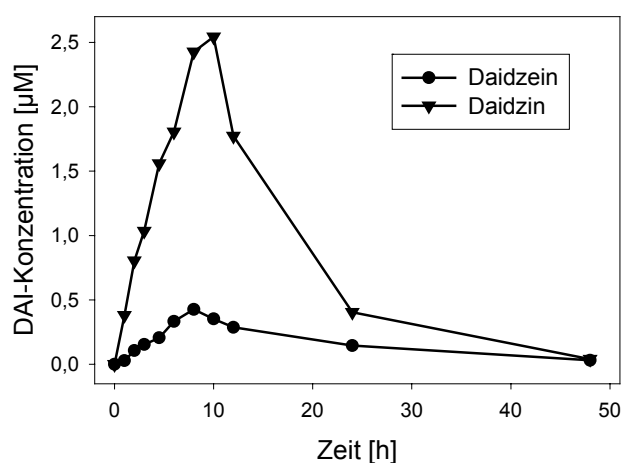
Die mittleren zeitlichen Verläufe der im Plasma bestimmten Konzentrationen von Gesamt-DAI<sup>2</sup> nach Verabreichung einer Einmaldosis an DAI bzw. DG (1 mg pro kg Körpergewicht berechnet als Aglykon-Äquivalente) sind in Abb. 4.12 dargestellt. Die Konzentrationen unterscheiden sich statistisch signifikant (*wiederholte Messungen ANOVA*;  $p < 0,0001$ ). Die Verläufe sind charakterisiert durch einen schnellen Anstieg der DAI-Konzentration im Plasma gefolgt von einer leichten Abnahme nach 3 h und einem erneuten Anstieg bis zur Plasma-Maximalkonzentration ( $C_{max}$ ) von 0,43  $\mu$ M nach Gabe von DAI bzw. 2,54  $\mu$ M nach Verabreichung von DG. Der Zeitpunkt von  $C_{max}$  ( $t_{max}$ ) beträgt 8,3 bzw. 9,1 h. Weiterhin ergab die biokinetische Analyse Eliminationshalbwertzeiten<sup>3</sup> ( $t_{1/2}$ ) von 10,6 h nach Gabe von DAI und 6,4 h nach der von DG und Flächen unter der Blutspiegel-Zeit-Kurve (AUC) von 8,3 bzw. 38,5  $\mu$ M\*h. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.8 zusammengefasst. Die einzelnen zeitlichen Verläufe der Plasmakonzentrationen für die sieben Probanden nach Verabreichung

<sup>2</sup> Unter der Gesamtkonzentration bzw. -menge an DAI bzw. seinen Metaboliten versteht man jeweils die Konzentration oder Menge, die nach Hydrolyse mit  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase erhalten wird (Summe aus Aglykon und Phase-II-Konjugaten).

<sup>3</sup> Die Eliminationshalbwertzeit wurde in dieser Arbeit aus der Gesamt-Plasmakonzentration ermittelt. Dies ist ein gängiges Verfahren [41,58] und wurde aus Gründen der Vergleichbarkeit auch in dieser Arbeit angewendet.



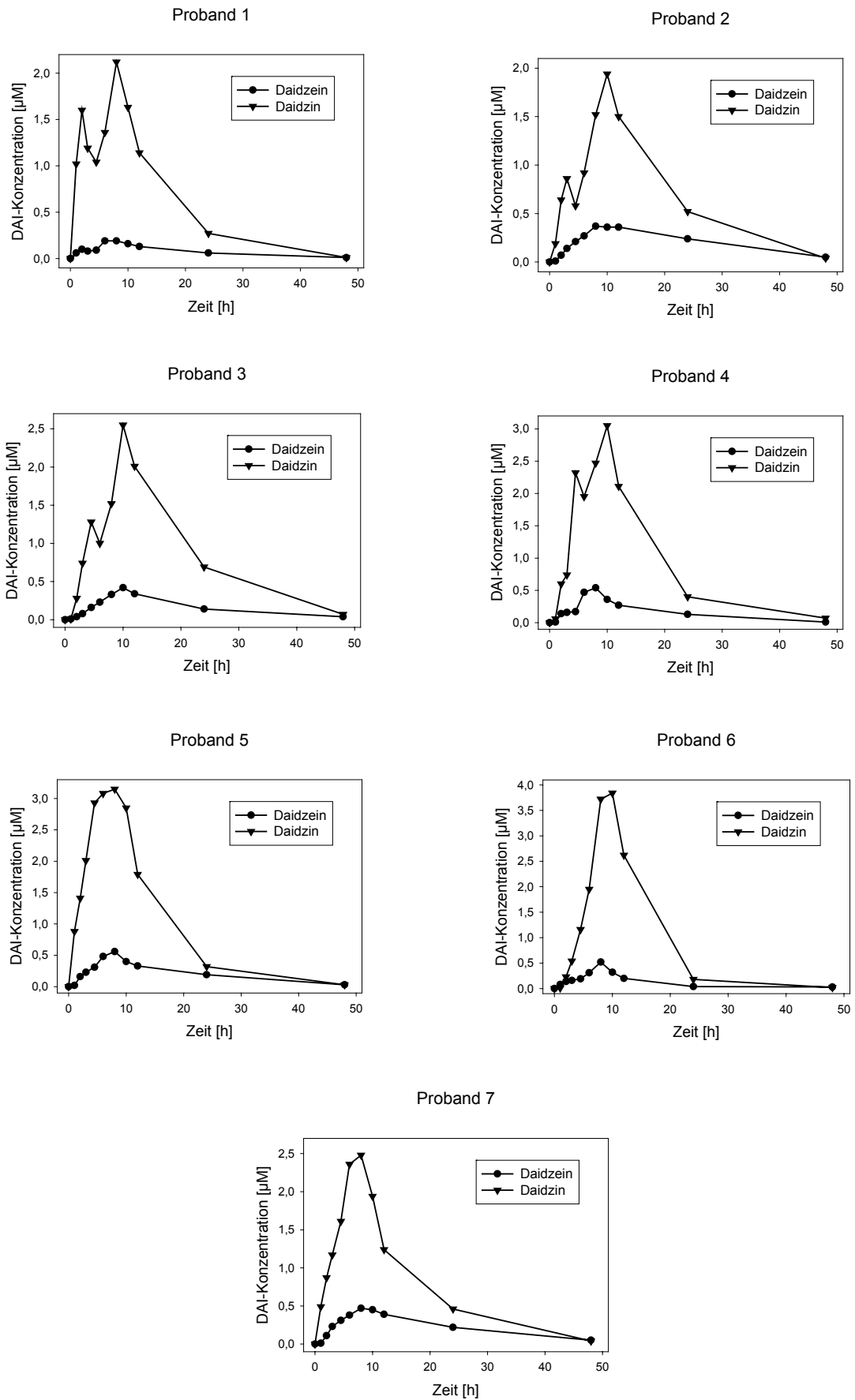
von DAI bzw. DG sind in Abb. 4.13 dargestellt. In Abb. 4.14 sind aus der GC/MS-Analyse rekonstruierte Chromatogramme für DAI und 3,4,8-<sup>13</sup>C-DAI nach enzymatischer Hydrolyse gezeigt. Da Isoflavone durch Elektronenstoß-Ionisierung bei 70 eV fast nicht fragmentieren, sind die Massenspuren der Molekülonen (m/z 398 und 401) charakteristisch. Im Plasma dominieren die Phase-II-Konjugate, der Anteil an freiem DAI ist relativ niedrig. In der ersten Stunde steigt er auf 12,9 % nach Gabe von DAI und 11,0 % nach Einnahme von DG an. Anschließend fällt er auf einen Mittelwert von 3,4 bzw. 3,1 %. Die Werte unterscheiden sich nicht signifikant zwischen den zwei Präparaten (*wiederholte Messungen ANOVA*;  $p = 0,9370$ ).



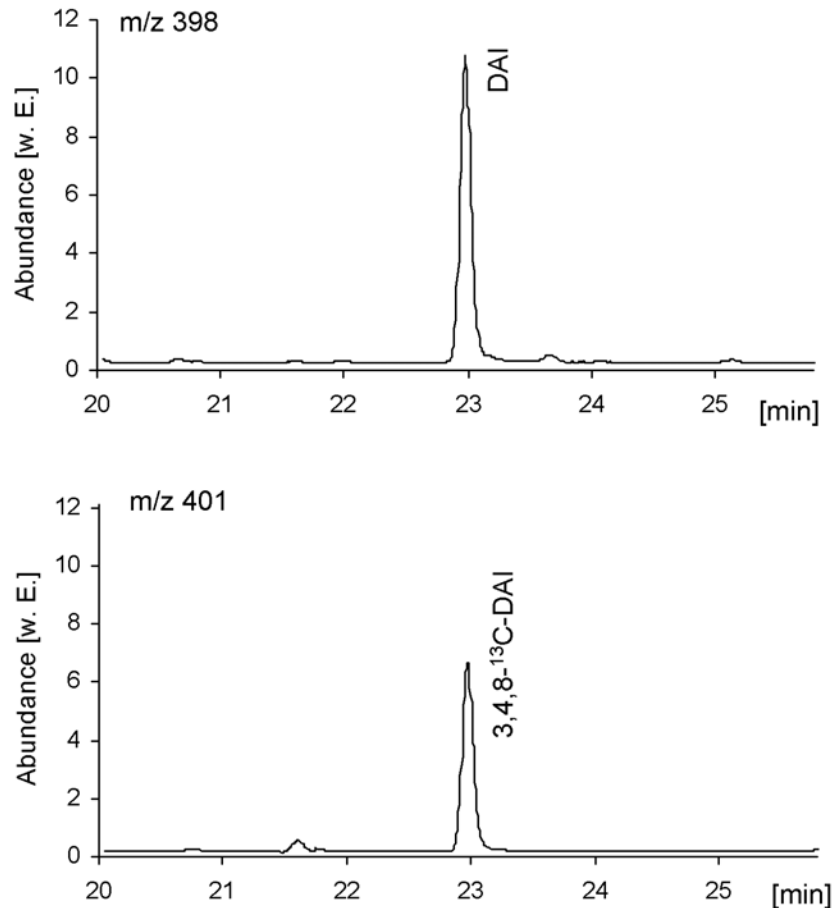
**Abb. 4.12:** Zeitlicher Verlauf der mittleren Plasmakonzentrationen an Gesamt-DAI nach Gabe von DAI bzw. DG (1 mg pro kg KG berechnet als Aglykon-Äquivalente). Die Werte unterscheiden sich statistisch signifikant (*wiederholte Messungen ANOVA*;  $p < 0,0001$ ).

**Tab. 4.8:** Biokinetische Kenndaten für Gesamt-DAI nach Gabe von DAI bzw. DG. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte mit Signifikanzniveau (*ungepaarter t-Test nach Student*) sowie die Wertebereiche.

	Biokinetische Kenndaten	Daidzein	Daidzin	p
DAI	AUC [µM*h]	8,3 (3,6 - 11,6)	38,5 (28,4 - 45,6)	< 0,0001
	C <sub>max</sub> [µM]	0,43 (0,19 - 0,56)	2,54 (1,93 - 3,84)	< 0,0001
	t <sub>max</sub> [h]	8,3 (8 - 10)	9,1 (8 - 10)	= 0,1089
	t <sub>1/2</sub> [h]	10,9 (7,9 - 14,0)	6,4 (4,8 - 7,3)	< 0,05



**Abb. 4.13:** Zeitliche Verläufe der Plasmakonzentration an Gesamt-DAI nach Gabe von DAI bzw. DG für alle Probanden.

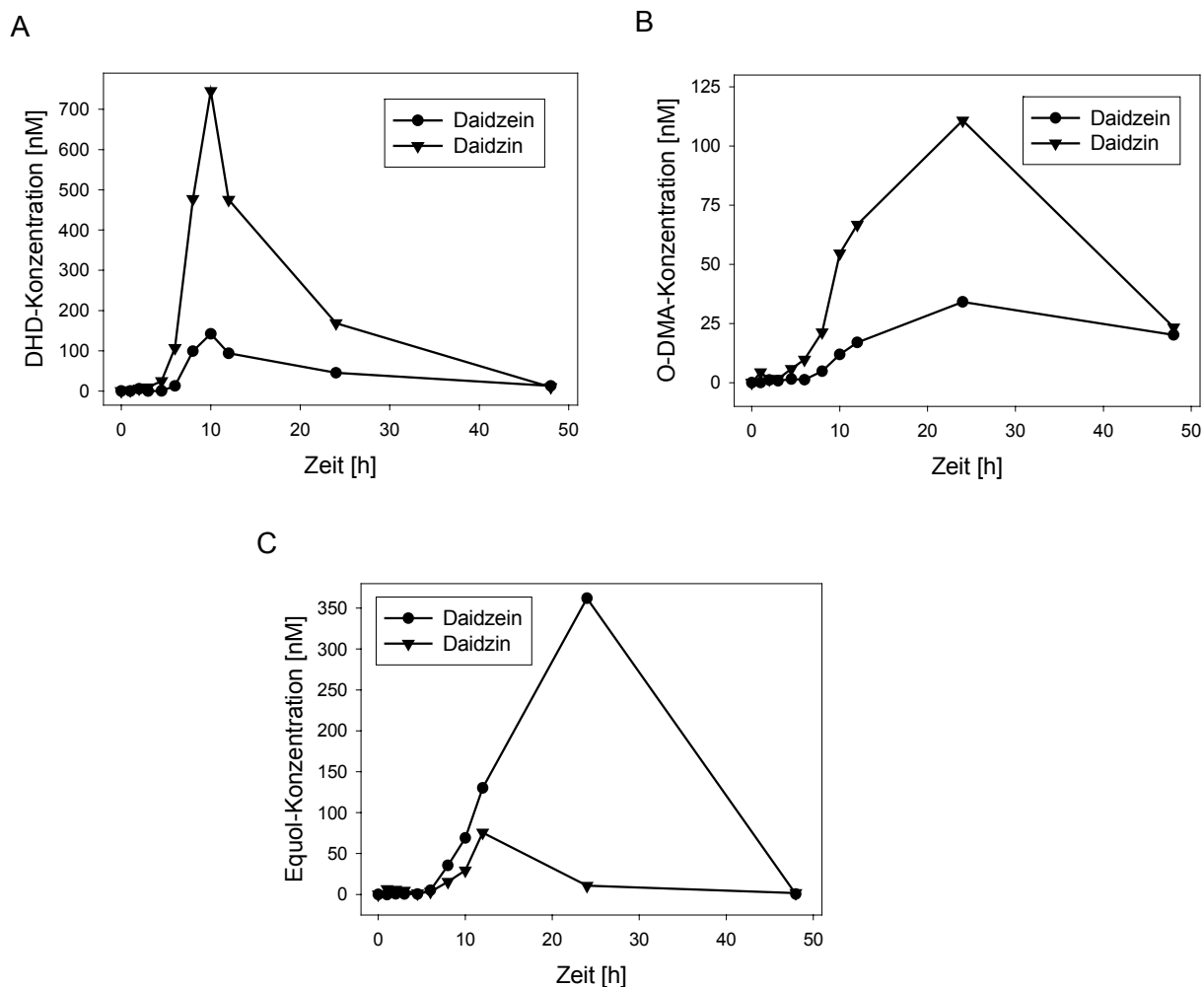


**Abb. 4.14:** GC/MS-Analyse der Blutentnahme von Proband 2 8 h nach Gabe von DAI (nach enzymatischer Hydrolyse). Gezeigt sind die über spezifische Massenspuren rekonstruierten Chromatogramme für DAI (m/z 398) und 3,4,8-<sup>13</sup>C-DAI (m/z 401).

#### 4.2.1.2 Bestimmung der Metabolite von Daidzein im Plasma

In Abb. 4.15 sind die zeitlichen Verläufe der Gesamt-Plasmakonzentrationen für die drei quantifizierten bakteriellen Metabolite DHD, O-DMA und Equol dargestellt. Die nach Gabe von DAI und DG ermittelten Konzentrationen von DHD und O-DMA unterscheiden sich statistisch signifikant (*wiederholte Messungen ANOVA*;  $p < 0,01$  für DHD und  $p < 0,0001$  für O-DMA). Für alle Probanden liegen die Konzentrationen nach Gabe von DG über denen nach Verabreichung von DAI. Gemäß der Definition von Setchell et al., nach der „Equol-Produzenten“ nach einmaliger Isoflavonaufnahme einen Plasmaspiegel an Equol von größer als 83 nM besitzen und mehr als 1000 nmol Equol pro Tag ausscheiden [105], war nur einer der Probanden, Proband 6, ein „Equol-Produzent“. Bei diesem liegen die Plasmakonzentrationen nach Gabe von DAI höher als nach der von DG. Die Plasmakonzentrationen der restlichen sechs Probanden betragen nach enzymatischer Hydrolyse 5,8 bzw. 10,6 nM, wobei nach Einnahme der zwei Präparate eine vergleichbare Konzentration im Plasma er-

mittelt wurde (*wiederholte Messungen ANOVA*;  $p = 0,7424$ ). Im Falle von DHD steigen die Konzentrationen im Plasma nach Gabe der Präparate erst nach 6 h, für O-DMA und Equol (Proband 6) erst nach 8 h an.



**Abb. 4.15:** Zeitliche Verläufe der mittleren Plasmakonzentrationen an Gesamt-DHD (A) und -O-DMA (B) nach Gabe von DAI bzw. DG. Bei Equol (C) handelt es sich um die Plasmawerte für Proband 6. Die Werte von DHD und O-DMA unterscheiden sich nach Gabe von DAI und DG statistisch signifikant (*wiederholte Messungen ANOVA*;  $p < 0,01$  für DHD und  $p < 0,0001$  für O-DMA).

Die Mittelwerte mit Signifikanzniveau sowie die Wertebereiche der biokinetischen Kenndaten ( $C_{\max}$ , AUC,  $t_{\max}$  und  $t_{1/2}$ ) von DHD, O-DMA und Equol für Proband 6 sind in Tab. 4.9 zusammengefasst. Im Falle von DHD ist nach Gabe von DAI  $t_{\max}$  früher,  $C_{\max}$  und die AUC niedriger und  $t_{1/2}$  länger als nach Einnahme von DG. Der Anteil des Aglykons beträgt 20,0 bzw. 11,9 %. Ein ähnliches Bild ergibt sich für O-DMA: Nach Gabe von DAI ist  $t_{\max}$  später, sowohl  $C_{\max}$  als auch die AUC niedriger sowie  $t_{1/2}$  länger. Der Aglykon-Anteil beträgt 11,1 bzw. 5,9 %. Der Verlauf von Equol für Proband 6 im Plasma verhält sich unterschiedlich: So ist nach Verabreichung von DAI  $t_{\max}$  später,  $C_{\max}$  und die AUC höher und  $t_{1/2}$  kürzer. Der Anteil des Aglykons beträgt 3,5 bzw. 2,3 % und im Falle der sechs „Nicht-Equol-Produzenten“ 4,5 bzw. 1,4 %. Die Anteile unterscheiden sich nicht signifikant nach Gabe von DAI

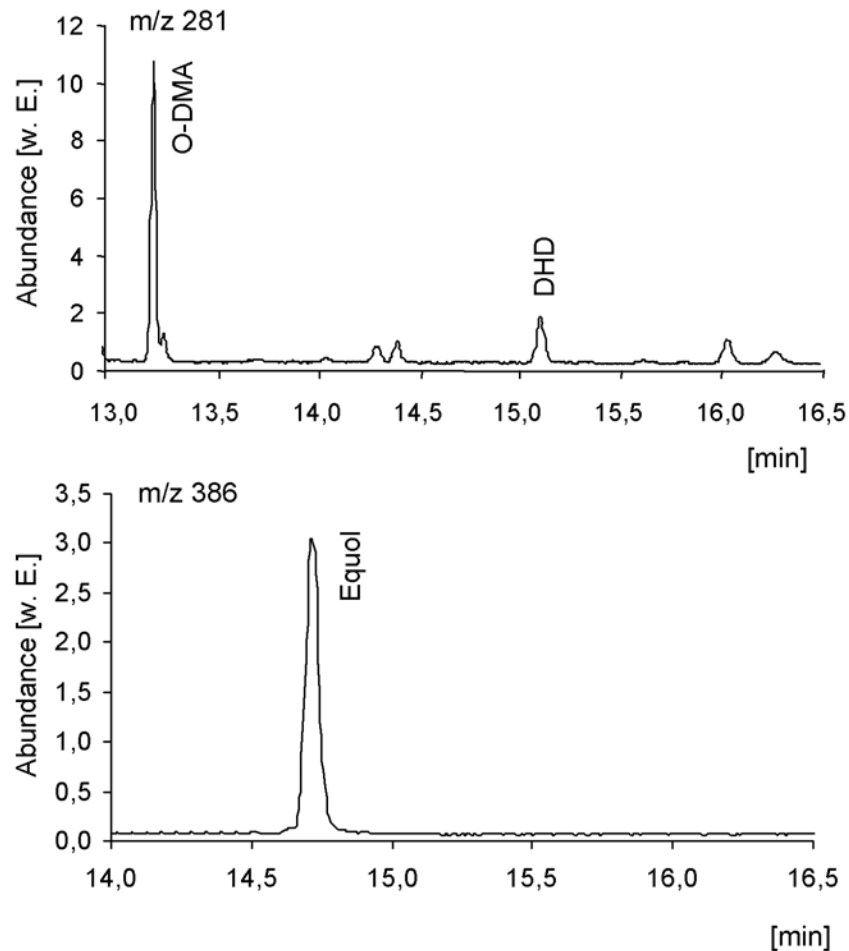
und DG (*wiederholte Messungen ANOVA*;  $p = 0,1771$  für DHD,  $p = 0,8331$  für O-DMA und  $p = 0,3243$  für Equol ohne Proband 6). Abb. 4.16 stellt aus der GC/MS-Analyse rekonstruierte Chromatogramme für DHD, O-DMA und Equol nach enzymatischer Hydrolyse dar. Charakteristisch sind hier die Massenspuren  $m/z$  281 für DHD und O-DMA sowie  $m/z$  386 für Equol.

**Tab. 4.9:** Biokinetische Kenndaten für Gesamt-DHD, -O-DMA und -Equol (Proband 6) nach Gabe von DAI bzw. DG. Für DHD und O-DMA sind jeweils die Mittelwerte mit Signifikanzniveau (*ungepaarter t-Test nach Student*) sowie die Wertebereiche angegeben.

DHD	Biokinetische Kenndaten	Daidzein	Daidzin	p
	AUC [ $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ ]	2,4 (0,1 - 6,4)	8,9 (0,7 - 19,2)	= 0,2420
	$C_{\text{max}}$ [ $\mu\text{M}$ ]	0,14 (0,01 - 0,42)	0,75 (0,02 - 1,70)	< 0,05
	$t_{\text{max}}$ [h]	9,1 (8 - 12)	10,0 (8 - 12)	= 0,2679
	$t_{1/2}$ [h]	10,9 (5,6 - 13,4)	8,8 (5,4 - 21,2)	= 0,4255

O-DMA	Biokinetische Kenndaten	Daidzein	Daidzin	p
	AUC [ $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ ]	1,9 (0,1 - 7,8)	3,5 (0,9 - 9,2)	= 0,3343
	$C_{\text{max}}$ [nM]	34,1 (5,9 - 86,1)	110,8 (32,3 - 238,7)	< 0,05
	$t_{\text{max}}$ [h]	27,5 (24 - 48)	22,3 (12 - 24)	= 0,2046
	$t_{1/2}$ [h]	17,7 (6,9 - 71,3)	11,0 (4,5 - 23,8)	= 0,5117

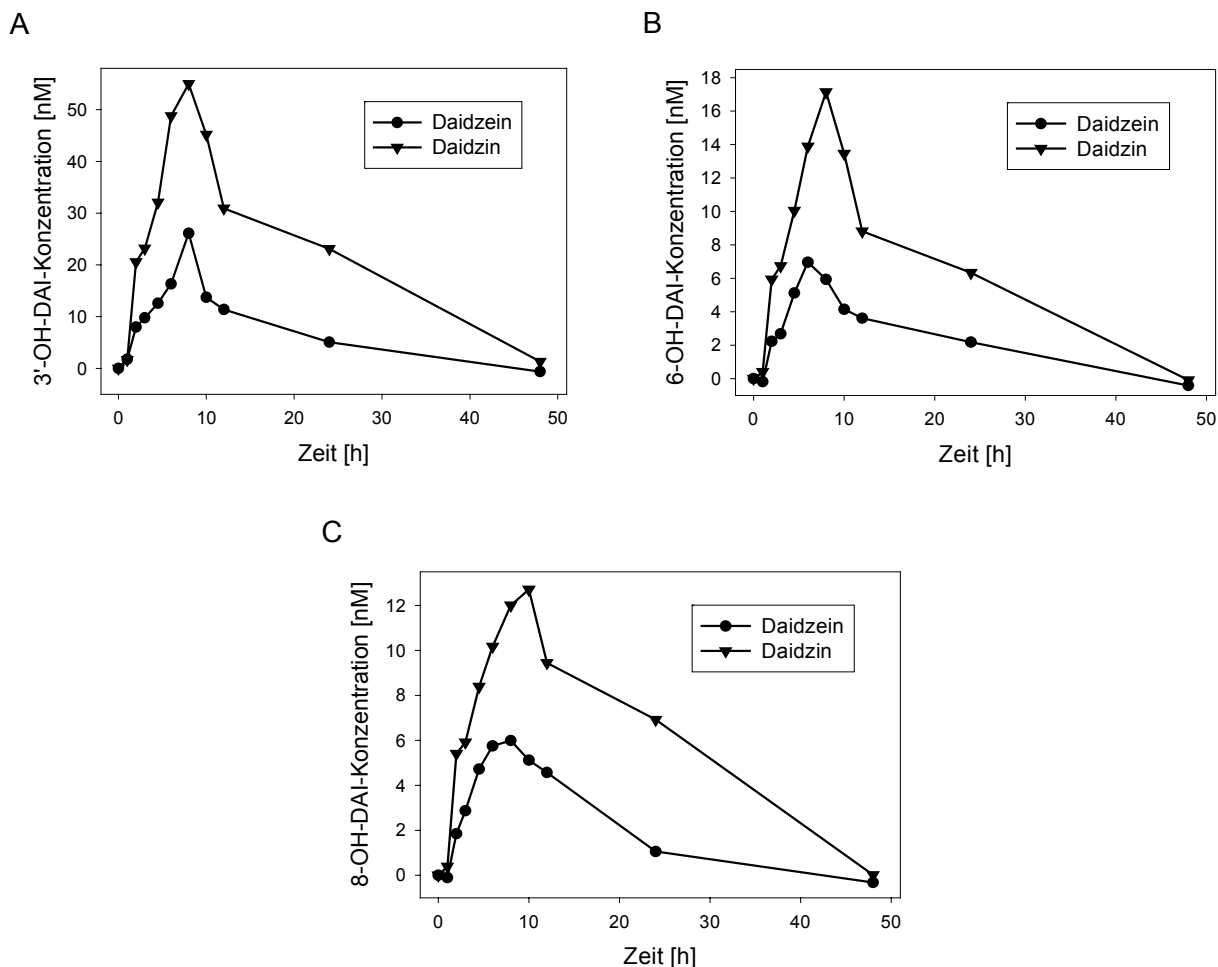
Equol (Proband 6)	Biokinetische Kenndaten	Daidzein	Daidzin
	AUC [ $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ ]	7,7	0,9
	$C_{\text{max}}$ [nM]	362,0	75,6
	$t_{\text{max}}$ [h]	24,0	12,0
	$t_{1/2}$ [h]	2,5	6,9



**Abb. 4.16:** GC/MS-Analyse der Plasmaprobe von Proband 5 10 h nach Gabe von DG bzw. von Proband 6 24 h nach Gabe von DAI (jeweils nach enzymatischer Hydrolyse). Gezeigt sind die über spezifische Massenspuren rekonstruierten Chromatogramme für DHD und O-DMA (m/z 281) sowie Equol (m/z 386).

In Abb. 4.17 sind die Verläufe der Gesamt-Plasmakonzentrationen der drei oxidativen Metabolite 3'-, 6- und 8-OH-DAI dargestellt. Nach Gabe von DG lagen wiederum die Plasmakonzentrationen für alle sieben Probanden zu jeder Zeit über denen nach Verabreichung von DAI. Aufgrund der großen interindividuellen Variabilität sind nur die nach Einnahme von DAI und DG ermittelten Konzentrationen von 6-OH-DAI statistisch signifikant unterschiedlich, für 3'- und 8-OH-DAI besteht eine Tendenz (*wiederholte Messungen ANOVA*;  $p < 0,05$  für 6-OH-DAI,  $p = 0,056$  für 3'-OH-DAI und  $p = 0,081$  für 8-OH-DAI). Die Mittelwerte mit Signifikanzniveau sowie die Wertebereiche der biokinetischen Kenndaten sind in Tab 4.10 zusammengefasst. Alle drei Metabolite können schon nach ein bis zwei Stunden im Plasma detektiert werden. Für 3'-OH-DAI ist nach Gabe von DAI  $t_{\max}$  früher,  $C_{\max}$  und die AUC niedriger sowie  $t_{1/2}$  kürzer, 6-OH-DAI zeigt eine frühere  $t_{\max}$ , eine niedrigere  $C_{\max}$  und AUC und eine kürzere  $t_{1/2}$ . Im Falle von 8-OH-DAI ist nach Einnahme von DAI  $t_{\max}$  genauso lang wie nach Gabe von DG,  $C_{\max}$  und die AUC niedriger und  $t_{1/2}$  ähnlich groß. In Abb. 4.18 ist ein aus der GC/MS-Analyse rekonstruiertes Chromatogramm für 3'-, 6- und 8-OH-DAI nach enzymatischer Hydrolyse dargestellt. Die Anteile der Agly-

kone wurden nicht ermittelt, da sie mit der Nachweisempfindlichkeit der verwendeten Methode nicht bestimmt werden konnten.



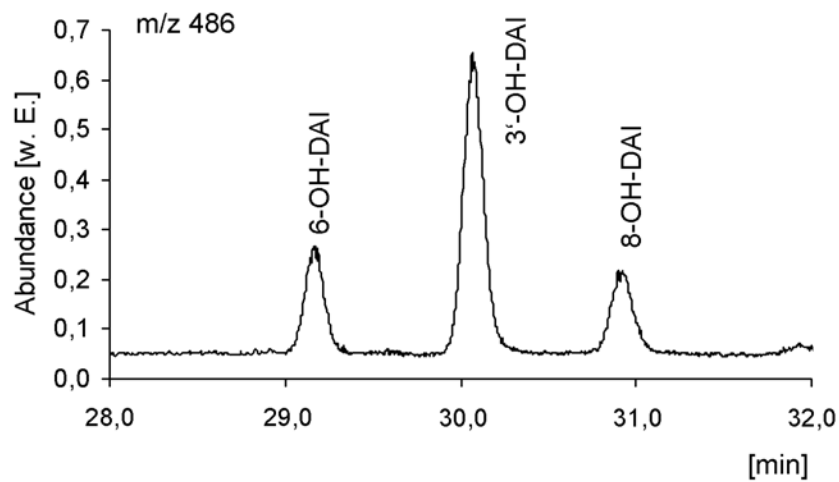
**Abb. 4.17:** Zeitliche Verläufe der mittleren Plasmakonzentrationen an Gesamt-3'-OH-DAI (A), -6- OH-DAI (B) bzw. -8-OH-DAI (C) nach Gabe von DAI bzw. DG. Die Werte von 6-OH-DAI sind nach Gabe von DAI und DG statistisch signifikant unterschiedlich (*wiederholte Messungen ANOVA; p < 0,05*).

**Tab. 4.10:** Biokinetische Kenndaten für Gesamt-3'-, -6- und -8-OH-DAI nach Gabe von DAI bzw. DG. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte mit Signifikanzniveau (*ungepaarter t-Test nach Student*) sowie die Wertebereiche.

	Biokinetische Kenndaten	Daidzein	Daidzin	p
3'-OH-DAI	AUC [nM*h]	336,1 (85,6 - 973,3)	1050,4 (349,6 - 2125,6)	< 0,05
	C <sub>max</sub> [nM]	26,1 (7,0 - 105,0)	55,0 (23,4 - 134,4)	= 0,1541
	t <sub>max</sub> [h]	7,9 (3 - 12)	8,6 (6 - 12)	= 0,6278
	t <sub>1/2</sub> [h]	5,5 (3,2 - 7,2)	7,1 (4,3 - 9,8)	= 0,1297

6-OH-DAI	Biokinetische Kenndaten	Daidzein	Daidzin	p
	AUC [nM*h]	113,9 (42,6 - 286,7)	292,2 (136,3 - 491,5)	< 0,05
	C <sub>max</sub> [nM]	7,0 (3,0 - 16,7)	17,1 (8,8 - 43,7)	= 0,1991
	t <sub>max</sub> [h]	7,8 (4,5 - 12)	9,1 (8 - 12)	= 0,3164
	t <sub>1/2</sub> [h]	5,3 (3,8 - 7,9)	4,7 (4,3 - 5,7)	= 0,2837

8-OH-DAI	Biokinetische Kenndaten	Daidzein	Daidzin	p
	AUC [nM*h]	98,5 (54,4 - 231,1)	284,9 (152,2 - 641,9)	< 0,05
	C <sub>max</sub> [nM]	6,0 (2,9 - 19,4)	12,7 (9,3 - 29,2)	= 0,1159
	t <sub>max</sub> [h]	9,6 (4,5 - 24)	9,7 (8 - 12)	= 0,9584
	t <sub>1/2</sub> [h]	4,9 (3,8 - 6,8)	4,6 (4,0 - 7,0)	= 0,7366



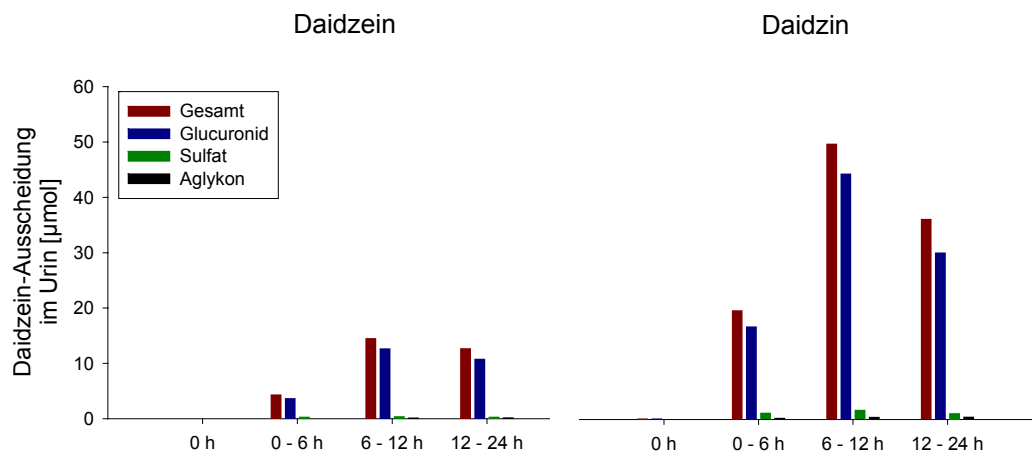
**Abb. 4.18:** GC/MS-Analyse der Plasmaprobe von Proband 8 8 h nach Gabe von DG (nach enzymatischer Hydrolyse). Gezeigt ist ein über die spezifische Massenspur m/z 486 rekonstruiertes Chromatogramm für 3'-, 6- und 8-OH-DAI.



## 4.2.2 Ausscheidung der Isoflavone im Urin

### 4.2.2.1 Bestimmung von Daidzein im Urin

Die nach Einmalgabe von DAI bzw. DG mit dem Urin über den Sammelzeitraum von 24 h ausgeschiedenen Mengen an Gesamt-DAI sind in Abb. 4.19 dargestellt. Nach Verabreichung von DG war die Exkretion im Urin in jedem Zeitintervall bei allen sieben Probanden höher als nach Gabe von DAI. Wie aus Abb. 4.19 ersichtlich wird der größte Teil in der Fraktion von 6 bis 12 h ausgeschieden. Die Exkretion der Gesamtmenge an DAI sowie die des Glucuronids, Sulfats und Aglykons unterscheiden sich nach Einnahme von DAI bzw. DG für alle Sammelperioden signifikant (*ungepaarter t-Test nach Student*;  $p < 0,05$ ). Die Gesamt-Ausscheidung für die 24-stündige Sammelperiode an DAI beträgt 32,7  $\mu\text{mol}$  nach Gabe von DAI und 105,5  $\mu\text{mol}$  nach der von DG, wobei diese Werte sich statistisch signifikant unterscheiden (*ungepaarter t-Test nach Student*;  $p < 0,0001$ ) (siehe Tab. 4.11).

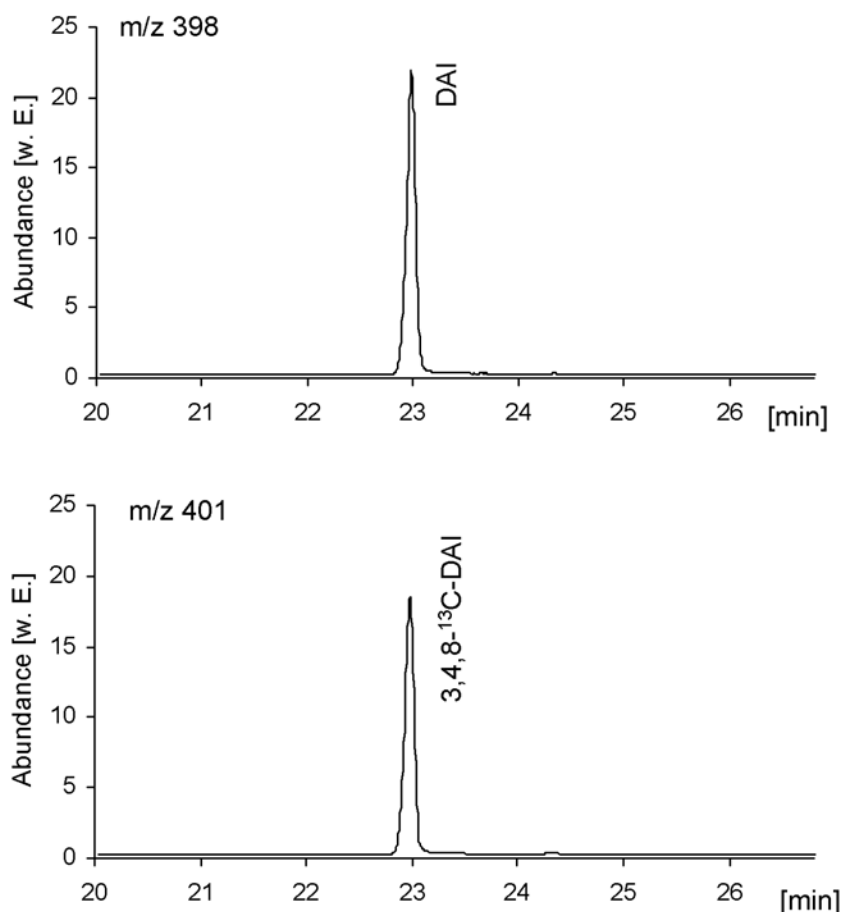


**Abb. 4.19:** Während der einzelnen Sammelperioden ausgeschiedene mittlere Mengen an Gesamt-DAI, DAI-Glucuronid, -Sulfat und als Aglykon im Urin nach Gabe von DAI bzw. DG. Diese Werte unterscheiden sich für alle Zeiträume nach Verabreichung der zwei Präparate signifikant (*ungepaarter t-Test nach Student*;  $p < 0,05$ ).

**Tab. 4.11:** Ausscheidung bzw. Wiederfindung von Gesamt-DAI im Urin über 24 h nach Gabe der zwei Präparate. Angegeben sind die Mittelwerte mit Signifikanzniveau (*ungepaarter t-Test nach Student*) sowie die Wertebereiche.

	Daidzein	Daidzin	p
Menge [ $\mu\text{mol}$ ]	32,7 (20,1 - 49,1)	105,5 (83,4 - 135,2)	< 0,0001
Wiederfindung [%]	11,6 (8,3 - 15,5)	38,9 (29,7 - 46,5)	< 0,0001

Die Wiederfindung liegt für die Muttersubstanz DAI bei 11,6 % nach Aufnahme des Aglykons und bei 38,9 % nach Verabreichung des 7-O- $\beta$ -D-Glucosids. Der Anteil des Glucuronids bzw. Sulfats und des Aglykons wurde durch sequentielle Hydrolyse mit  $\beta$ -Glucuronidase und/oder Sulfatase bestimmt. Der Anteil des Glucuronids beträgt 80,3 % nach Gabe von DAI bzw. 82,3 % nach der von DG, der des Sulfats 8,2 bzw. 6,6 % und der des Aglykons 2,3 bzw. 2,1 %, wobei sich die Anteile nach Einnahme der unterschiedlichen Präparate nicht signifikant unterscheiden (*ungepaarter t-Test* nach *Student*;  $p > 0,25$ ). Insgesamt können 90,8 % der Gesamtmenge an DAI nach Gabe von DAI bzw. 91,1 % nach Einnahme von DG mittels sequentieller Hydrolyse im Vergleich zur Gesamt-Hydrolyse (mit  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase) wiedergefunden werden, wobei sich die prozentualen Anteile für die einzelnen Sammelperioden nach Gabe der zwei Präparate nicht signifikant unterscheiden (*ungepaarter t-Test* nach *Student*;  $p > 0,40$ ).



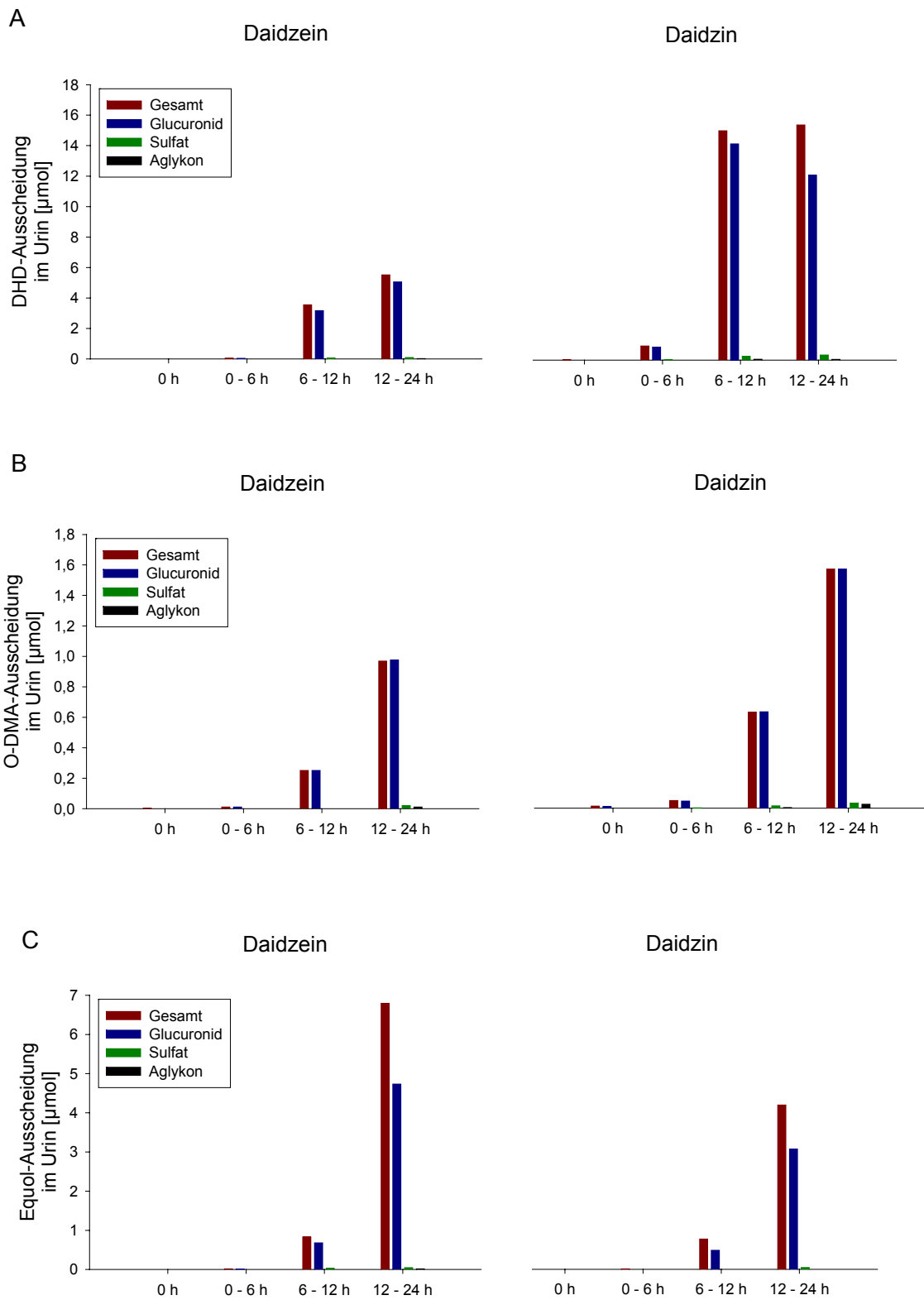
**Abb. 4.20:** GC/MS-Analyse der Sammelperiode von 0 bis 6 h von Proband 2 nach Gabe von DAI nach enzymatischer Hydrolyse mit  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase. Gezeigt sind die über spezifische Massenspuren rekonstruierten Chromatogramme für DAI (m/z 398) und 3,4,8-<sup>13</sup>C-DAI (m/z 401).

In Abb. 4.20 sind die aus der GC/MS-Analyse rekonstruierten Chromatogramme für DAI und 3,4,8-<sup>13</sup>C-DAI nach enzymatischer Hydrolyse mit  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase gezeigt.

#### 4.2.2.2 Bestimmung der Metabolite von Daidzein im Urin

Abb. 4.21 zeigt die Mittelwerte der Gesamt-Exkretion der bakteriellen Metabolite über den Sammelzeitraum von 24 h. Im Gegensatz zu DAI befindet sich der größte Teil der ausgeschiedenen Menge in der Fraktion von 12 bis 24 h. Zu allen Zeitintervallen unterscheiden sich die im Urin ausgeschiedenen Mengen von DHD, O-DMA und Equol im Falle der „Nicht-Equol-Produzenten“ zwischen der Gabe der beiden Präparate nicht signifikant. Gleiches gilt für die Mengen an Glucuroniden, Sulfaten und Aglykonen (*ungepaarter t-Test* nach *Student*;  $p > 0,10$ ).

Die gesamte ausgeschiedene Menge an DHD, O-DMA, Equol für Proband 6 und die sechs „Nicht-Equol-Produzenten“ über 24 h sind in Tab. 4.12 aufgeführt. Die für 24 h bestimmten mittleren Anteile der Phase-II-Metabolite und der Aglykone nach Gabe von DAI bzw. DG finden sich in Tab. 4.13. Insgesamt können für DHD 91,4 bzw. 91,8 %, für O-DMA 100,8 bzw. 102,1 %, für Equol im Falle von Proband 6 81,4 bzw. 77,3 % und für die „Nicht-Equol-Produzenten“ 89,9 bzw. 95,7 % der Gesamtmengen an DHD, O-DMA bzw. Equol mittels sequentieller Hydrolyse im Vergleich zur Gesamt-Hydrolyse wiedergefunden werden. Für DHD, O-DMA und Equol im Falle der sechs „Nicht-Equol-Produzenten“ unterscheiden sich die Werte nicht signifikant (*ungepaarter t-Test* nach *Student*;  $p > 0,15$ ). In Abb. 4.22 sind aus der GC/MS-Analyse rekonstruierte Chromatogramme für DHD, O-DMA und Equol nach enzymatischer Hydrolyse mit  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase gezeigt.



**Abb. 4.21:** Während der einzelnen Sammelperioden ausgeschiedene mittlere Mengen an Gesamt-DHD (A), -O-DMA (B) und -Equol (Proband 6) (C) sowie an Glucuroniden, Sulfaten und Aglykonen im Urin nach Gabe von DAI bzw. DG.

**Tab. 4.12:** Über 24 h im Urin ausgeschiedene Gesamtmengen an DHD, O-DMA und Equol (Proband 6 und „Nicht-Equol-Produzenten“). Angegeben sind die Mittelwerte mit Signifikanzniveau (*ungepaarter t-Test nach Student*) sowie die Wertebereiche.

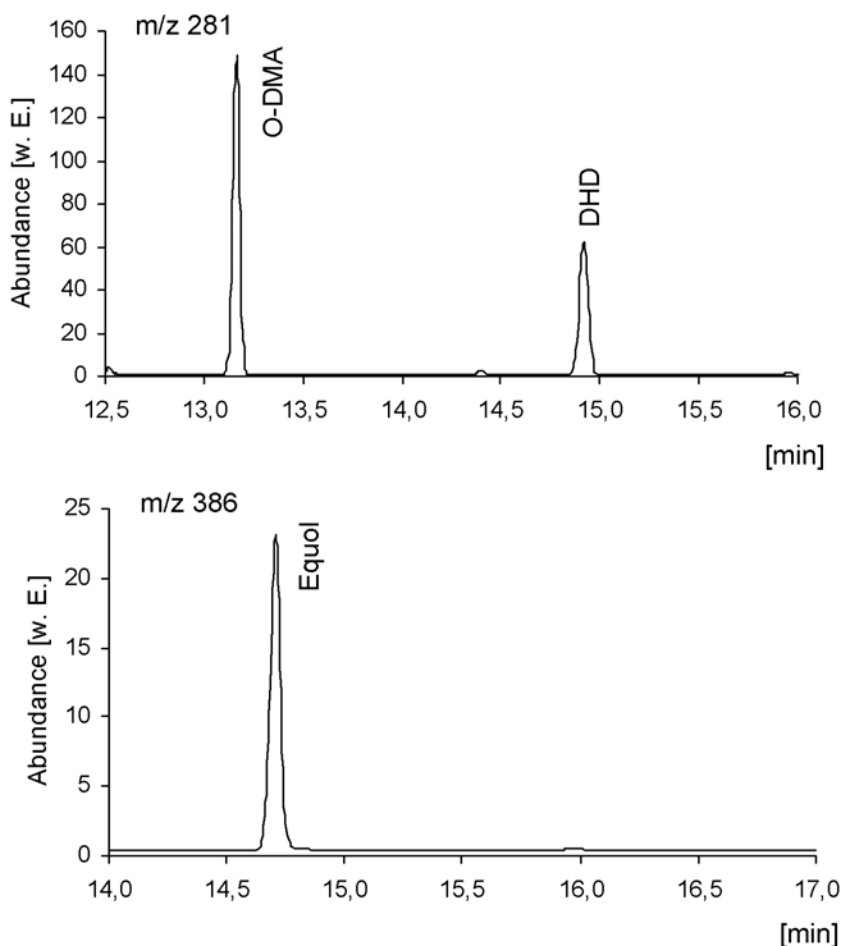
Metabolit	Ausgeschiedene Gesamtmenge [ $\mu\text{mol}$ ]		p
	Daidzein	Daidzin	
DHD	9,11 (0,13 - 25,51)	31,42 (0,29 - 91,20)	= 0,1400
O-DMA	1,23 (0,04 - 2,75)	2,26 (0,04 - 5,27)	= 0,2292
Equol (Proband 6)	7,63	4,97	-
Equol (Proband 6 ausgeschlossen)	0,08 (0,02 - 0,17)	0,06 (0,02 - 0,12)	= 0,5754

**Tab. 4.13:** Über 24 h gemittelte Anteile der Phase-II-Metabolite und der Aglykone nach Gabe von DAI bzw. DG für DHD, O-DMA und Equol (Proband 6 und „Nicht-Equol-Produzenten“). Angegeben sind jeweils die Mittelwerte und Wertebereiche mit Signifikanzniveau (*ungepaarter t-Test nach Student*).

Glucuronid	Metabolit	Glucuronid-Anteil [%]		p
		Daidzein	Daidzin	
	DHD	80,6 (67,9 - 91,4)	80,2 (55,8 - 95,5)	= 0,9525
	O-DMA	84,6 (68,8 - 98,5)	89,9 (83,1 - 97,2)	= 0,2154
	Equol (Proband 6)	74,6	66,1	-
Equol (Proband 6 ausgeschlossen)	79,8 (59,6 - 108,4)	85,7 (73,2 - 93,3)	= 0,4645	

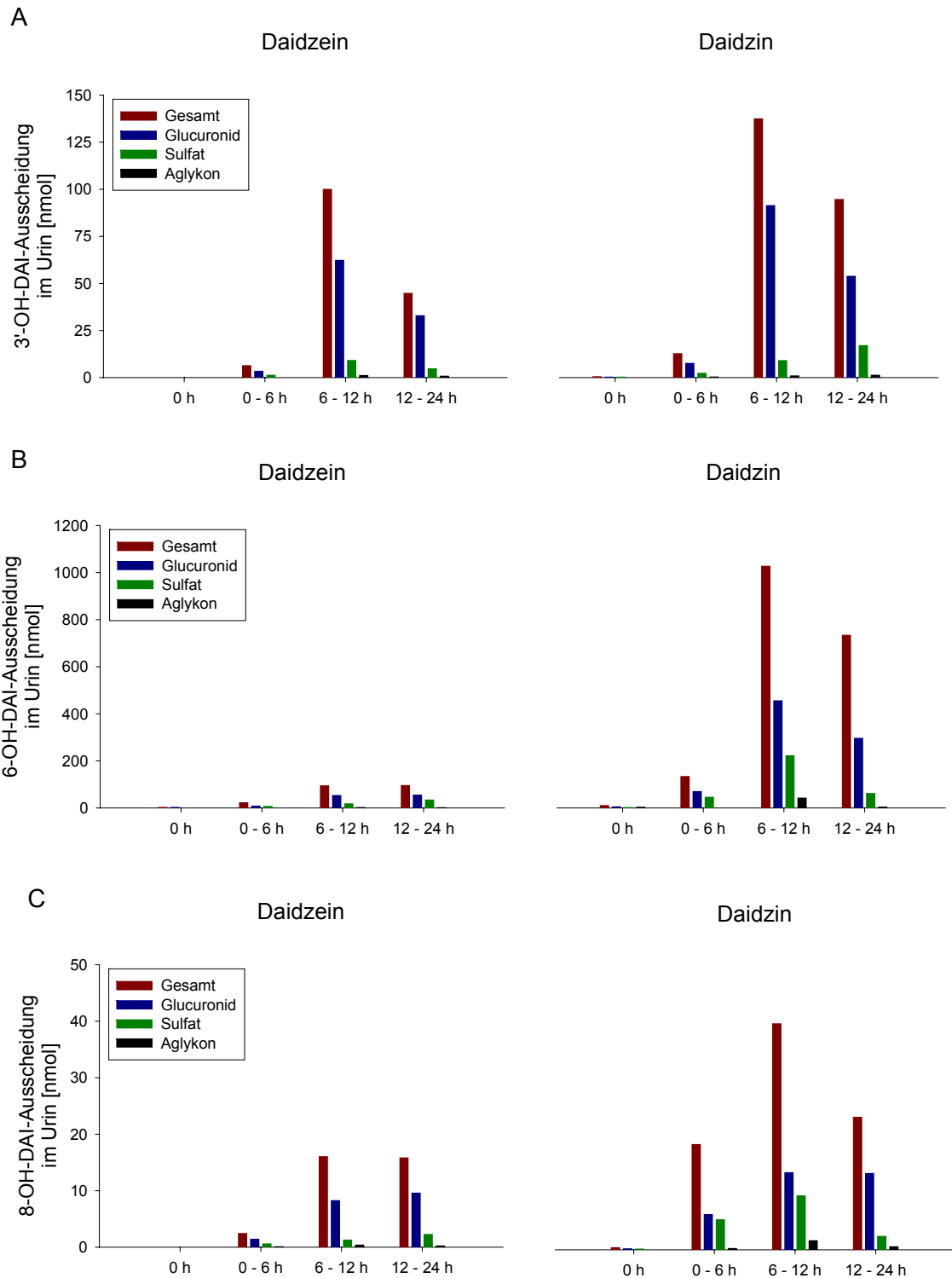
Sulfat	Metabolit	Sulfat-Anteil [%]		p
		Daidzein	Daidzin	
	DHD	9,0 (3,6 - 14,4)	8,8 (2,4 - 18,6)	= 0,9508
	O-DMA	11,2 (7,3 - 18,5)	8,0 (4,3 - 16,0)	= 0,1662
	Equol (Proband 6)	5,3	8,3	-
Equol (Proband 6 ausgeschlossen)	7,3 (2,3 - 18,8)	7,4 (3,5 - 15,7)	= 0,9562	

Aglykon	Metabolit	Aglykon-Anteil [%]		p
		Daidzein	Daidzin	
	DHD	1,8 (1,3 - 2,6)	1,8 (0,4 - 4,4)	= 0,9825
	O-DMA	5,0 (3,4 - 7,2)	4,2 (2,3 - 10,7)	= 0,5413
	Equol (Proband 6)	1,6	2,9	-
Equol (Proband 6 ausgeschlossen)	2,8 (0,8 - 5,5)	2,5 (1,0 - 5,6)	= 0,7602	



**Abb. 4.22:** GC/MS-Analyse der Sammelperiode von 12 bis 24 h von Proband 5 nach Gabe von DG bzw. Proband 7 nach Gabe von DAI nach enzymatischer Hydrolyse mit  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase. Gezeigt sind die über spezifische Massenspuren rekonstruierten Chromatogramme für DHD und O-DMA (m/z 281) sowie Equol (m/z 386).

In Abb. 4.23 sind die im Urin über den Sammelzeitraum von 24 h ausgeschiedenen Mengen der drei oxidativen Metabolite 3'-, 6- und 8-OH-DAI dargestellt. Wie für DAI wird der größte Teil im Zeitraum von 6 bis 12 h ausgeschieden. Nur für 6-OH-DAI unterscheidet sich die ausgeschiedene Gesamtmenge bzw. die des Glucuronids, Sulfats und Aglykons für die Sammelperiode von 6 bis 12 h nach Gabe von DAI bzw. DG signifikant (*ungepaarter t-Test* nach *Student*;  $p < 0,05$ ). Die über 24 h erhaltenen Werte der Gesamt-Ausscheidung an 3'-, 6- und 8-OH-DAI finden sich in Tab. 4.14. Die mittleren Anteile der Phase-II-Metabolite und der Aglykone über 24 h nach Verabreichung von DAI bzw. DG sind in Tab. 4.15 aufgelistet. Insgesamt können für 3'-OH-DAI 83,9 bzw. 88,6 %, für 6-OH-DAI 75,5 bzw. 79,9 % und für 8-OH-DAI 77,1 bzw. 71,8 % der Gesamtmengen an 3'-, 6- bzw. 8-OH-DAI mittels sequentieller Hydrolyse im Vergleich zur Gesamt-Hydrolyse wiedergefunden werden, wobei sich die Werte nach Gabe der zwei Präparate nicht signifikant unterscheiden (*ungepaarter t-Test* nach *Student*;  $p > 0,10$ ). In Abb. 4.24 ist ein aus der GC/MS-Analyse rekonstruiertes Chromatogramm für 3'-, 6- und 8-OH-DAI nach enzymatischer Hydrolyse mit  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase gezeigt.



**Abb. 4.23:** Während der einzelnen Sammelperioden ausgeschiedene mittlere Mengen an Gesamt-3'- (A), -6- (B) und -8-OH-DAI (C) sowie an Glucuroniden, Sulfaten und Aglykonen im Urin nach Gabe von DAI bzw. DG. Diese sind für 6-OH-DAI im Sammelzeitraum von 6 bis 12 h signifikant unterschiedlich (*ungepaarter t-Test nach Student*;  $p < 0,05$ ).

**Tab. 4.14:** Über 24 h im Urin ausgeschiedene Gesamtmenge an 3'-, 6- und 8-OH-DAI. Angegeben sind die Mittelwerte mit Signifikanzniveau (*ungepaarter t-Test* nach *Student*) sowie die Wertebereiche.

Metabolit	Ausgeschiedene Gesamtmenge [µmol]		p
	Daidzein	Daidzin	
3'-OH-DAI	0,03 (0,01 - 0,07)	0,28 (0,02 - 1,06)	= 0,1866
6-OH-DAI	0,27 (0,02 - 0,66)	1,90 (0,28 - 2,68)	< 0,05
8-OH-DAI	0,03 (0,00 - 0,10)	0,07 (0,02 - 0,27)	= 0,3723

**Tab. 4.15** Über 24 h gemittelte Anteile der Phase-II-Metabolite und der Aglykone nach Gabe von DAI bzw. DG für 3'-, 6- und 8-OH-DAI. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte und Wertebereiche mit Signifikanzniveau (*ungepaarter t-Test* nach *Student*).

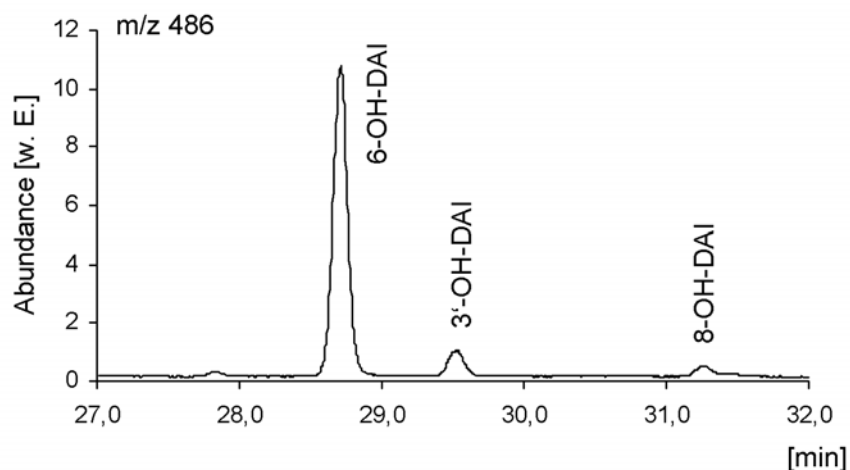
Glucuronid	Metabolit	Glucuronid-Anteil [%]		p
		Daidzein	Daidzin	
	3'-OH-DAI	57,3 (41,3 - 82,3)	54,6 (22,4 - 73,6)	= 0,4588
	6-OH-DAI	47,9 (29,8 - 71,3)	48,1 (38,0 - 61,6)	= 0,7949
8-OH-DAI	57,3 (40,0 - 76,9)	44,8 (22,5 - 63,1)	= 0,1449	

Sulfat	Metabolit	Sulfat-Anteil [%]		p
		Daidzein	Daidzin	
	3'-OH-DAI	20,7 (8,4 - 33,8)	29,9 (13,9 - 66,0)	= 0,1704
	6-OH-DAI	24,2 (12,1 - 36,7)	27,3 (6,5 - 42,9)	= 0,7833
8-OH-DAI	16,8 (9,3 - 23,3)	23,7 (6,8 - 36,2)	= 0,2221	

Aglykon	Metabolit	Aglykon-Anteil [%]		p
		Daidzein	Daidzin	
	3'-OH-DAI	1,5 (0,8 - 3,7)	4,1 (0,3 - 9,9)	= 0,2418
	6-OH-DAI	3,3 (0,7 - 12,2)	4,5 (0,3 - 11,9)	= 0,8142
8-OH-DAI	3,0 (1,4 - 6,2)	3,4 (0,8 - 5,9)	= 0,7870	

Die Gesamtwiederfindung unter Einbeziehung der ausgeschiedenen Mengen an DAI und dessen Metaboliten beträgt nach Gabe von DAI 16,6 % und nach der von DG 53,3 %, wobei sich die Werte signifikant unterscheiden (*ungepaarter t-Test* nach *Student*;  $p < 0,0001$ ).



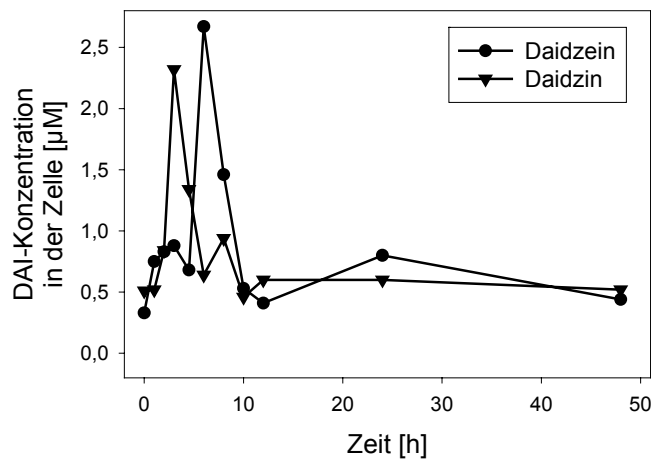


**Abb. 4.24:** GC/MS-Analyse der letzten Sammelperiode (12 bis 24 h) von Proband 2 nach Gabe von DG nach enzymatischer Hydrolyse mit  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase. Gezeigt ist ein über die spezifische Massenspur m/z 486 rekonstruiertes Chromatogramm für 3'-, 6- und 8-OH-DAI.

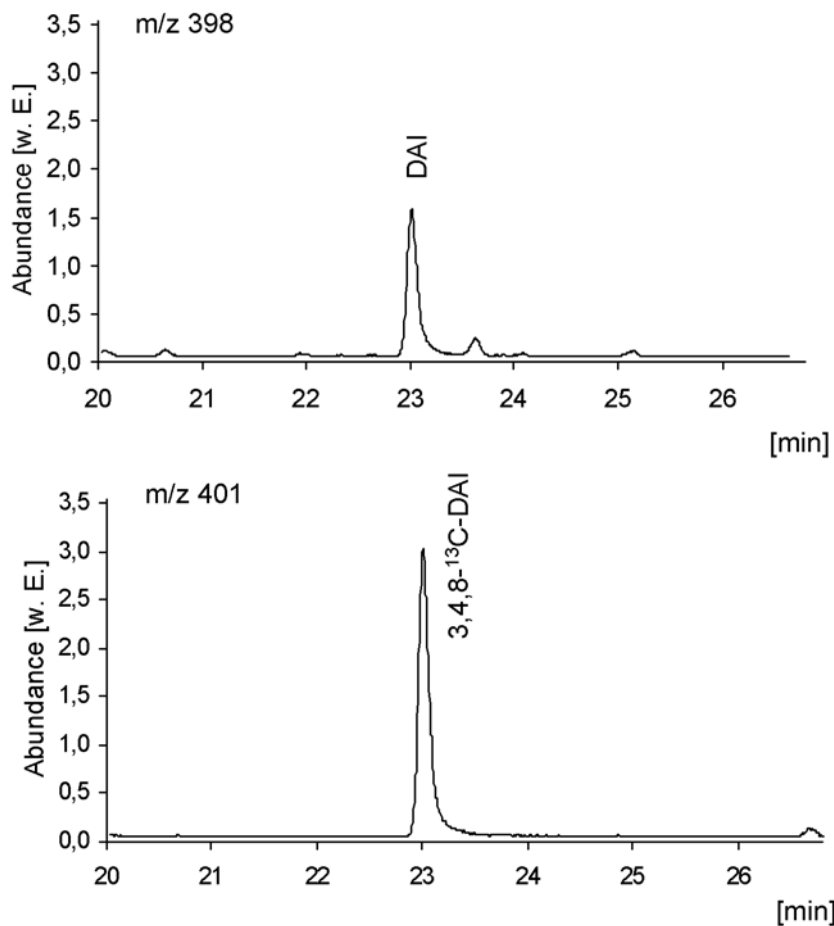
#### 4.2.3 Bestimmung der Isoflavone in den PBMC

Da die Ergebnisse zur Aufnahme von Isoflavonen in humane PBMC auf eine Anreicherung der Isoflavone in vitro schließen ließen (siehe Kap. 4.1.4), wurde die Konzentration an DAI in den PBMC bestimmt und analog Gl. 3.1 berechnet (siehe Kap. 3.2.2.7). Die zeitlichen Verläufe der Konzentration an Gesamt-DAI in den PBMC nach Gabe von DAI bzw. DG sind in Abb. 4.25 dargestellt. Die Werte unterscheiden sich statistisch signifikant (*wiederholte Messungen ANOVA*;  $p < 0,01$ ). Nach Verabreichung von DAI ist der Konzentrationsverlauf charakterisiert durch einen schnellen Anstieg der Gesamt-DAI-Konzentration in den PBMC auf  $0,88 \mu\text{M}$  nach 3 h gefolgt von einer leichten Abnahme und einem erneuten Anstieg bis zur Maximalkonzentration von  $2,67 \mu\text{M}$  nach 6 h. Nach Gabe von DG verhält sich der Verlauf anders: Zunächst erfolgt der Anstieg zur Maximalkonzentration von  $2,32 \mu\text{M}$  nach 3 h und nach einem schnellen Abfall findet man ein späteres Maximum von  $0,94 \mu\text{M}$  nach 8 h. In Abb. 4.26 sind die aus der GC/MS-Analyse rekonstruierten Chromatogramme für DAI und 3,4,8- $^{13}\text{C}$ -DAI gezeigt.

Metabolite konnten mit der Nachweisempfindlichkeit der verwendeten Methode nicht bestimmt werden.



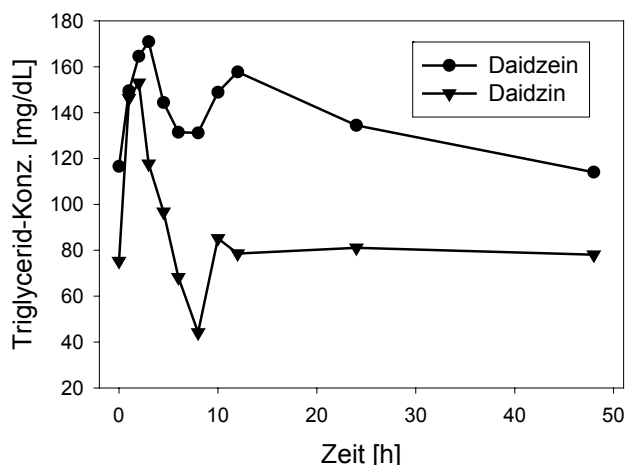
**Abb. 4.25:** Zeitliche Verläufe der mittleren Konzentration an Gesamt-DAI in den PBMC nach Gabe von DAI bzw. DG. Die Werte unterscheiden sich statistisch signifikant (*wiederholte Messungen ANOVA;  $p < 0,01$* ).



**Abb. 4.26:** GC/MS-Analyse der PBMC von Proband 7 3 h nach Gabe von DG. Gezeigt sind die über spezifische Massenspuren rekonstruierten Chromatogramme für DAI ( $m/z$  398) und 3,4,8- $^{13}\text{C}$ -DAI ( $m/z$  401).

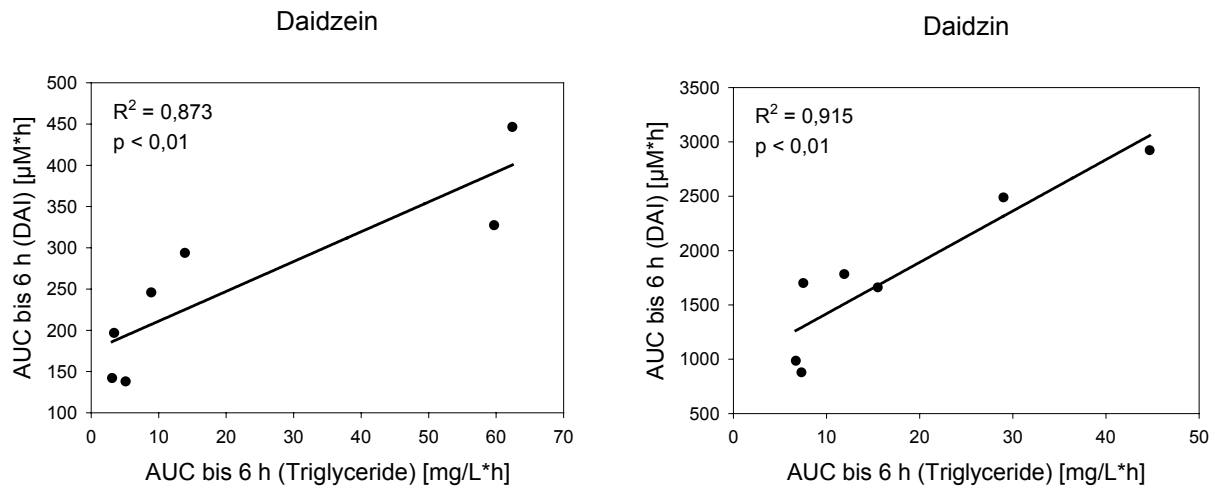
#### 4.2.4 Aufnahmemechanismen

Man geht davon aus, dass Isoflavon-Aglykone wegen ihrer Lipophilie und ihres geringen Molekulargewichts passiv im Darm resorbiert werden. Bisher ist jedoch unklar, ob die Aufnahme der Isoflavone einem ähnlichen Mechanismus unterliegt wie die der Nahrungsfette. Die Möglichkeit, einen eventuell bestehenden Zusammenhang nachzuweisen, ist bei dieser Studie gegeben, da die Probanden direkt nach der Gabe des Isoflavon-Präparats ein standardisiertes Frühstück erhielten. Aus diesem Grund wurde die Triglycerid-Konzentration im Plasma bestimmt. Die Verläufe nach Verabreichung von DAI bzw. DG sind in Abb. 4.27 dargestellt. Die postprandialen Triglycerid-Spiegel sind gekennzeichnet durch ein Maximum, das 3 h nach Aufnahme des Frühstücks auftritt. Im weiteren Verlauf fallen die Triglycerid-Spiegel im Plasma wieder ab. In Folge des Mittagessens, welches 6 h nach Isoflavonaufnahme eingenommen wurde, steigt die Triglycerid-Konzentration wieder an und erreicht nach etwa 10 bis 12 h ein erneutes Maximum. Die zeitlichen Verläufe der Triglycerid-Konzentrationen unterscheiden sich nicht signifikant nach Gabe der zwei Präparate (*wiederholte Messungen ANOVA*;  $p = 0,9804$ ).



**Abb.: 4.27:** Zeitlicher Verlauf der mittleren Triglycerid-Konzentration im Plasma nach Gabe von DAI bzw. DG.

Die Konzentrationsverläufe von Gesamt-DAI im Plasma zeigen in Analogie zu denen der Triglycerid-Spiegel einen biphasischen Verlauf mit einem Maximalwert nach 3 h (siehe Abb. 4.13). Werden die AUC für die Gesamt-DAI- und die Triglycerid-Konzentration im Plasma über die ersten 6 h nach Substanzgabe nach *Pearson* korreliert, erhält man eine gute Übereinstimmung ( $R^2 = 0,873$  mit  $p < 0,01$  bei Gabe von DAI und  $R^2 = 0,915$  mit  $p < 0,01$  bei Gabe von DG). In Abb. 4.28 ist der Zusammenhang dargestellt.

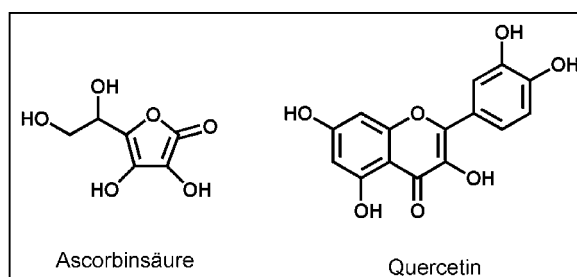


**Abb. 4.28:** Korrelation nach *Pearson* zwischen der AUC für die Gesamt-DAI- und die Triglycerid-Konzentrationen bis 6 h nach Gabe der zwei Präparate.

### 4.3 Bestimmung des antioxidativen Potenzials der Isoflavone und ihrer Metabolite

Die antioxidative Kapazität der Isoflavon-Metabolite ist bisher wenig untersucht (siehe Kap. 1.6.2). Deshalb sollte ihre antioxidative Wirkung mit der von DAI, GEN sowie GLY verglichen werden. Zum Einsatz kamen drei Testsysteme, da aufgrund vieler unterschiedlicher Wirkmechanismen erst so eine Beurteilung des antioxidativen Potenzials möglich ist.

Verwendet wurden die oxidativen und bakteriellen Metabolite von DAI - DHD, O-DMA, Equol, 3', 6- und 8-OH-DAI -, sowie die von GEN, Dihydrogenistein (DHG), 6'-Hydroxy-O-demethylangolensin (6'-OH-ODMA) und 3'-Hydroxygenistein (3'-OH-GEN). Des Weiteren wurden die 4'-Methylderivate von DAI und GEN - Formononetin (FORM), und Biochanin A (BCA) - und das 7-Methylderivat von GEN, Prunetin (PRU), welches wie FORM und BCA in Rotklee vorkommt [335], eingesetzt. Zur besseren Einstufung wurde das antioxidative Potenzial mit dem der bekannten Antioxidantien, dem Flavonoid Quercetin (QUER) und der Ascorbinsäure (ASC), verglichen (siehe Abb. 4.29).



**Abb. 4.29:** Strukturformeln der Referenzsubstanzen ASC und QUER.

#### 4.3.1 ORAC-Test

In Abb. 4.30 sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der im ORAC-Test bestimmten Trolox-Äquivalente dargestellt. Die antioxidative Kapazität ist umso größer, je höher der Wert ist.

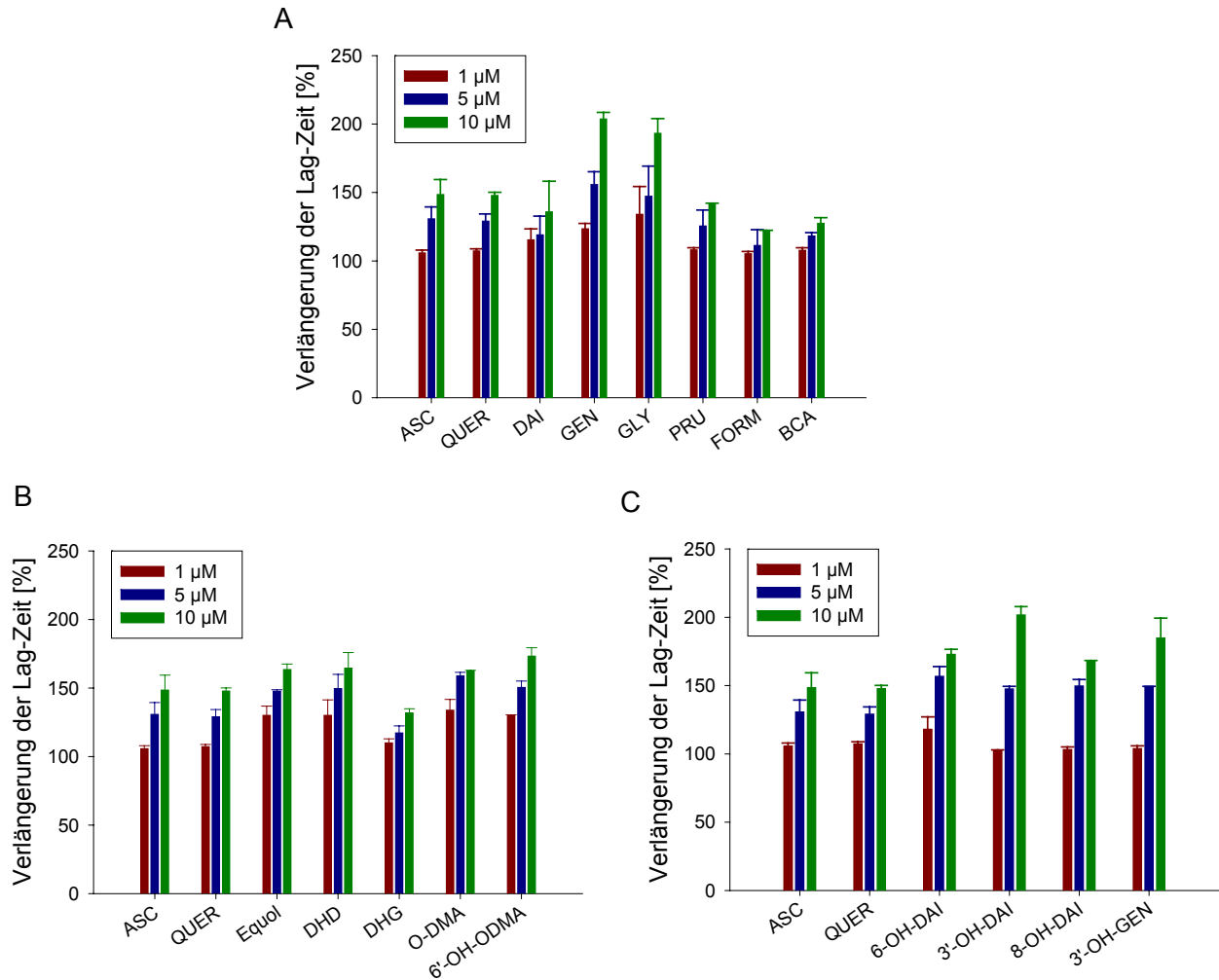
Bis auf FORM weisen alle getesteten Isoflavone und ihre Metabolite eine größere antioxidative Kapazität als ASC auf. Im Falle von 3'-OH-GEN, der Testsubstanz mit der im Rahmen dieses Tests ermittelten höchsten antioxidativen Wirkung, ist sie 16-mal größer als die von ASC. QUER hat eine zu GEN und den oxidativen Metaboliten von DAI (3', 6- und 8-OH-DAI) vergleichbare antioxidative Kapazität.



### 4.3.2 Lipidperoxidation

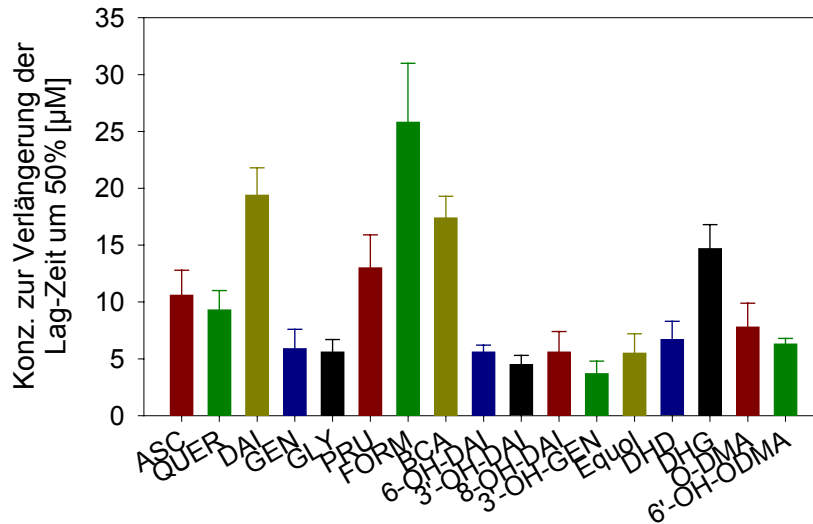
#### 4.3.2.1 Dien-Methode

Abb. 4.31 A bis C zeigt die Verlängerung der Lag-Zeit bei der Hemmung der Bildung von konjugierten Dien-Strukturen durch die natürlich vorkommenden Isoflavone und deren bakteriellen und oxidativen Metaboliten sowie ASC und QUER bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (= 100 %).



**Abb. 4.31:** Mit der Dien-Methode ermittelte Verlängerung der Lag-Zeit der natürlich vorkommenden Isoflavone (A), der bakteriellen (B) und der oxidativen (C) Metabolite im Vergleich zu ASC und QUER. Alle Werte sind auf die Lösungsmittelkontrolle bezogen (= 100 %). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte mit Standardabweichung.

Zum einfacheren Vergleich sind in Abb. 4.32 die Konzentrationen, die nötig sind, die Lag-Zeit im Vergleich zur Kontrolle um 50 % zu verlängern, dargestellt. Je kleiner der Wert ist, desto besser ist ein Antioxidanz wirksam.



**Abb. 4.32:** Konzentrationen der Testsubstanzen sowie von QUER und ASC, die nötig sind, die Lag-Zeit bei der Dien-Methode um 50 % im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle zu verlängern. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte mit Standardabweichung.

Gemäß der Konzentrationen, die nötig sind, die Lag-Zeit um 50 % im Vergleich zur Kontrolle zu verlängern, besitzen in diesem Testsystem ASC und QUER eine vergleichbare antioxidative Wirkung. Nur PRU, DHG, BCA, DAI und FORM zeigen eine geringere antioxidative Kapazität als die beiden Vergleichssubstanzen.

Folgende Reihung wurde mittels Varianzanalyse (ANOVA; Post Hoc Test Fisher-PLSD) ermittelt:

$$3\text{'-OH-GEN} = 3\text{'-OH-DAI} = \text{Equol} = 6\text{-OH-DAI} = 8\text{-OH-DAI} = \text{GLY} = \text{GEN} =$$

$$6\text{'-OH-ODMA} = \text{DHD} = \text{O-DMA} = \text{QUER} = \text{ASC} = \text{PRU} = \text{DHG} = \text{BCA} = \text{DAI} >$$

$$\text{FORM} \quad (** p < 0,01)$$

Beim Vergleich der antioxidativen Wirkung der natürlich vorkommenden Isoflavone sowie der oxidativen und bakteriellen Metaboliten untereinander erhält man mit ANOVA (Post Hoc Test Fisher-PLSD) folgende Wirkungsreihen:



GLY = GEN <sup>\*\*</sup> > PRU <sup>\*</sup> > BCA = DAI <sup>\*\*</sup> > FORM

3'-OH-GEN = 3'-OH-DAI = 6-OH-DAI = 8-OH-DAI

Equol = 6'-OH-ODMA = DHD = O-DMA <sup>\*\*</sup> > DHG (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01)

Wird das antioxidative Potenzial von DAI mit dessen Metaboliten verglichen, ergibt sich folgende Wirkungsreihe (ANOVA; Post Hoc Test Fisher-PLSD):

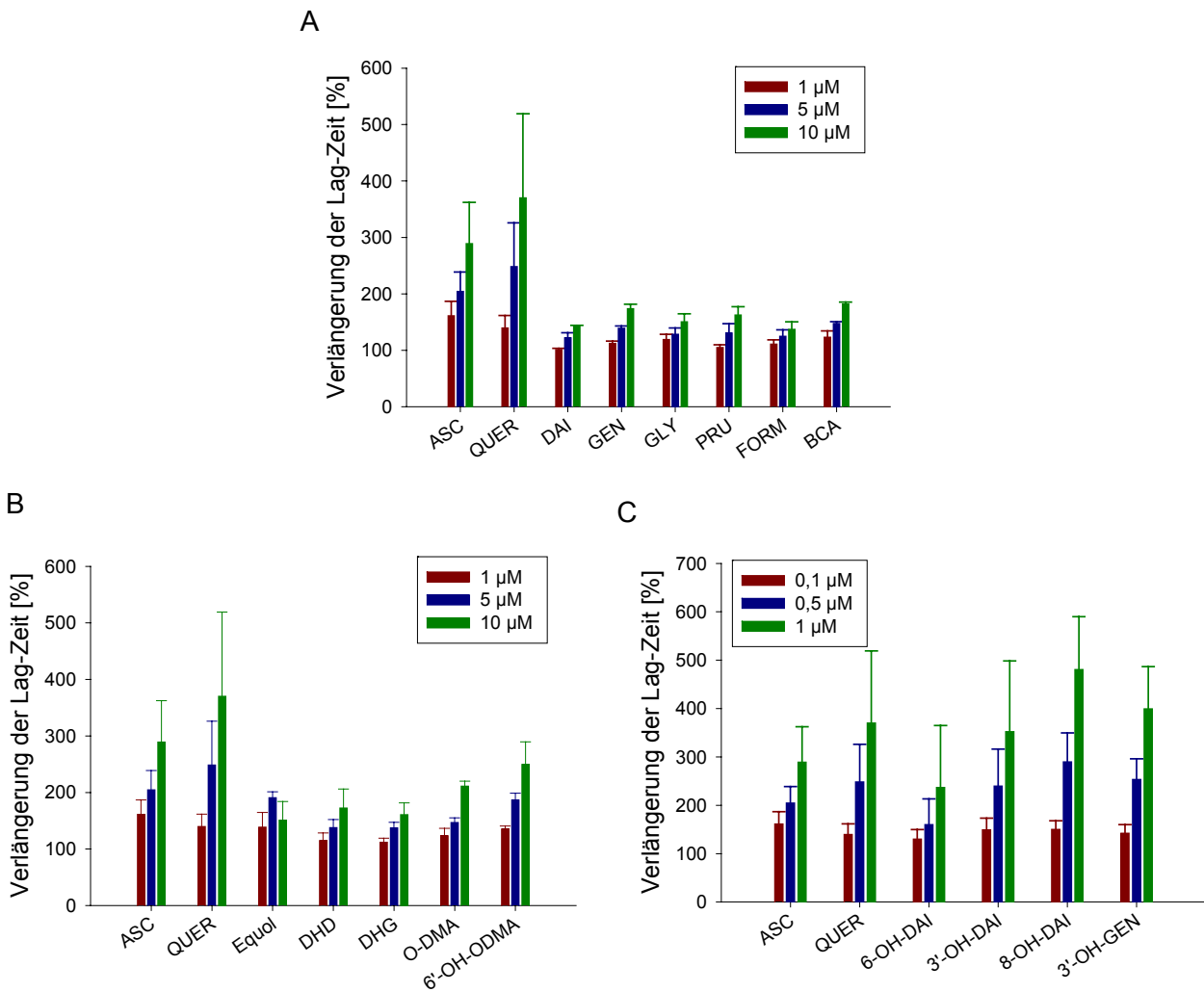
3'-OH-DAI = Equol = 6-OH-DAI = 8-OH-DAI = DHD = O-DMA <sup>\*\*\*</sup> > DAI  
(\*\*\* p < 0,0001)

Auch mit dieser Methode konnte gezeigt werden, dass die oxidativen Metabolite sowie Equol besser antioxidativ wirksam sind als die Muttersubstanzen. FORM zeigt wiederum das schwächste antioxidative Potenzial.

#### 4.3.2.2 Methode zur Bestimmung der TBARS

In Abb. 4.33 A bis C ist die Verlängerung der Lag-Zeit, wie sie bei der Lipidperoxidation mit der TBARS-Methode bestimmt wurde, für die natürlich vorkommenden Isoflavone und deren bakteriellen und oxidativen Metaboliten sowie von ASC und QUER bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (= 100 %) dargestellt. Darüber hinaus zeigt Abb. 4.34 die Konzentrationen, die nötig sind, die Lag-Zeit um 50 % im Vergleich zur Kontrolle zu verlängern. Ein Antioxidanz ist umso besser wirksam, je kleiner der Wert ist.

Beim Vergleich der Konzentrationen, die nötig sind, die Lag-Zeit um 50 % zu verlängern, zeigen sowohl QUER als auch ASC mit dieser Methode eine sehr große antioxidative Wirkung. Nur zwei Substanzen, 3'-OH-GEN und 8-OH-DAI, weisen ein stärkeres antioxidatives Potenzial als QUER auf. Verglichen mit ASC besitzen neben den bereits erwähnten oxidativen Metaboliten noch 3'- und 6-OH-DAI eine größere antioxidative Kapazität.



**Abb. 4.33:** Mit der TBARS-Methode ermittelte Verlängerung der Lag-Zeit der natürlich vorkommenden Isoflavone (A), der bakteriellen (B) und der oxidativen (C) Metabolite im Vergleich zu ASC und QUER. Alle Werte sind auf die Lösungsmittelkontrolle bezogen (= 100 %). Für die Isoflavone und ihre Metabolite wurden die angegebenen Konzentrationen verwendet, für ASC jeweils 1, 5 und 10 µM und für QUER 0,1, 0,5 und 1 µM. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte mit Standardabweichung.

Signifikanzberechnungen mittels Varianzanalyse (ANOVA; *Post Hoc Test Fisher-PLSD*) ergaben folgende Reihung:

$$3\text{'-OH-GEN} = 8\text{-OH-DAI} = \text{QUER} = 3\text{'-OH-DAI} = 6\text{-OH-DAI} = \text{ASC} = 6\text{'-OH-ODMA} = \text{Equol} = \text{O-DMA} = \text{BCA} = \text{DHG} = \text{GEN} = \text{PRU} = \text{GLY} = \text{DHD} = \text{DAI} > \text{FORM}^{**}$$

(\*\* p < 0,01)

Vergleicht man die antioxidative Wirkung der natürlich vorkommenden Isoflavone, der oxidativen und der bakteriellen Metaboliten untereinander, so erhält man mit ANOVA (*Post Hoc Test Fisher-PLSD*) folgende Wirkungsreihen:

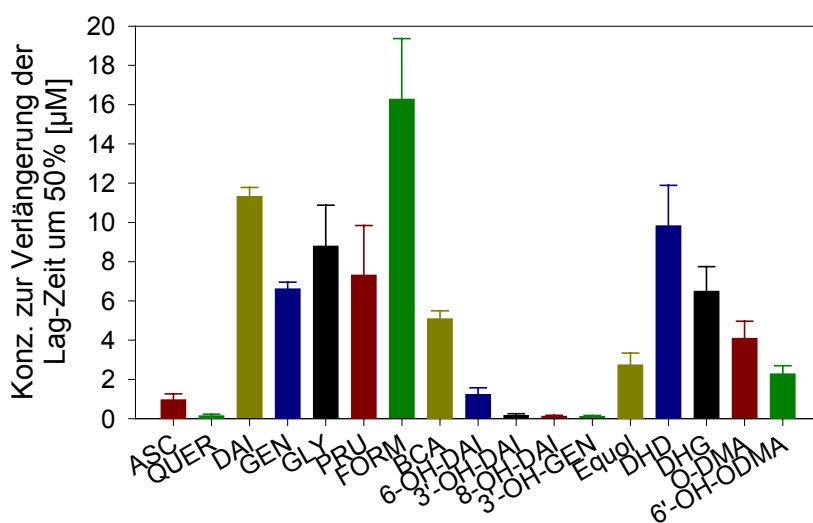
BCA = GEN = PRU = GLY = DAI > FORM<sup>\*\*</sup>

3'-OH-GEN = 8-OH-DAI = 3'-OH-DAI = 6-OH-DAI

6'-OH-ODMA = Equol = O-DMA = DHG > DHD<sup>\*</sup> (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01)

Wird das antioxidative Potenzial von DAI mit dessen Metaboliten verglichen, so ergibt sich folgende Wirkungsreihe (ANOVA; Post Hoc Test Fisher-PLSD):

8-OH-DAI = 3'-OH-DAI = 6-OH-DAI = Equol = O-DMA > DHD = DAI<sup>\*\*\*</sup> (\*\*\*) p < 0,001



**Abb. 4.34:** Konzentrationen der Testsubstanzen sowie von QUER und ASC, die nötig sind, die Lag-Zeit mit der TBARS-Methode im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle um 50 % zu verlängern. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte mit Standardabweichung.

Wiederum kann man zusammenfassen, dass die oxidativen Metabolite von GEN und DAI sowie Equol eine größere antioxidative Wirksamkeit als die Ausgangssubstanzen besitzen und FORM das geringste antioxidative Potenzial zeigt.

### 4.3.3 Vergleich der Ergebnisse

Da die Testsysteme unterschiedliche Endpunkte besitzen (Abfangen von Peroxylradikalen im wässrigen Milieu des ORAC-Test bzw. Abfangen von Peroxylradikalen, Bildung von Metallionen-Komplexen sowie Bindung an Proteine zum Schutz vor oxidativen Reaktionen in lipophiler Umgebung der Lipidperoxidation), ist eine Aussage über das antioxidative Potenzial der Isoflavone und ihrer Metabolite erst durch die Gegenüberstellung der einzelnen Testergebnisse möglich. Tab. 4.16 gibt einen Überblick.

**Tab. 4.16:** Wirkungsreihen der Testsubstanzen bei den drei unterschiedlichen Testmethoden.

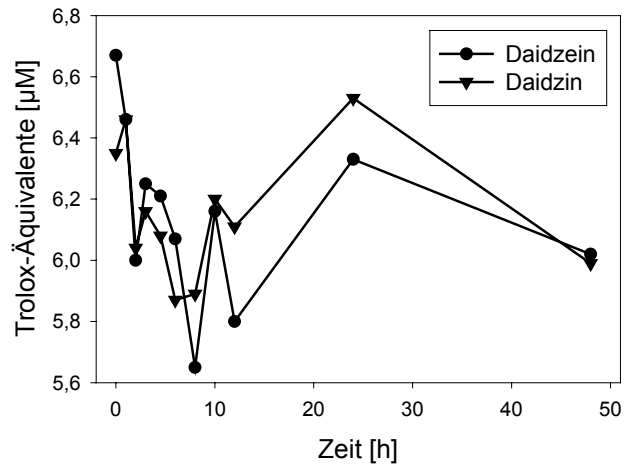
Test	Wirkungsreihen
ORAC	3'-OH-GEN > 8-OH-DAI = Equol = 6-OH-DAI = QUER = GEN > O-DMA = DAI > DHD = 3'-OH-DAI = DHG = 6'-OH-ODMA > BCA > PRU > GLY > FORM = ASC
Dien	3'-OH-GEN = 3'-OH-DAI = Equol = 6-OH-DAI = 8-OH-DAI = GLY = GEN = 6'-OH-ODMA = DHD = O-DMA = QUER = ASC = PRU = DHG = BCA = DAI > FORM
TBARS	3'-OH-GEN = 8-OH-DAI = QUER = 3'-OH-DAI = 6-OH-DAI = ASC = 6'-OH-ODMA = Equol = O-DMA = BCA = DHG = GEN = PRU = GLY = DHD = DAI > FORM

Festzuhalten ist, dass mit allen drei verwendeten Methoden die oxidativen Metabolite von DAI und GEN sowie Equol eine größere antioxidative Wirkung als die Ausgangssubstanzen aufweisen. FORM zeigt sowohl im ORAC-Test als auch bei der Lipidperoxidation das geringste antioxidative Potenzial.

#### 4.3.4 Antioxidative Wirkung in vivo

Um festzustellen, inwieweit Isoflavone und ihre Metabolite in physiologischen Konzentrationen das antioxidative Potenzial in vivo beeinflussen können, wurde die antioxidative Wirkung des Plasmas der Humanstudie mit dem ORAC-Test untersucht (siehe Kap. 3.2.3.3.1 und 3.2.4.1). Dabei sollte ein eventuell bestehender Zusammenhang zwischen einer verbesserten antioxidativen Kapazität und hohen Plasmakonzentrationen an Isoflavonen und ihren Metaboliten geprüft werden. Um falsche Schlussfolgerungen durch natürlicherweise im Plasma vorhandene Antioxidantien auszuschließen, wurde im Plasma der Gehalt an Gesamt-Carotinoiden,  $\alpha$ -Tocopherol und ASC bei den elf Blutentnahmen bestimmt. Die Gesamt-Carotinoid-Konzentration setzt sich aus den Konzentrationen von Lutein, Zeaxanthin,  $\beta$ -Cryptoxanthin,  $\alpha$ -Carotin,  $\beta$ -Carotin sowie all-trans- und 5-cis-Lycopin zusammen (siehe Kap. 3.2.3.4). Die Konzentrationen unterscheiden sich nicht signifikant nach Gabe der zwei Präparate (*wiederholte Messungen ANOVA*;  $p > 0,10$ ).

In Abb. 4.35 sind die zeitlichen Verläufe der Mittelwerte der Trolox-Äquivalente dargestellt. Die Werte unterscheiden sich nicht signifikant nach Gabe von DAI bzw. DG (*wiederholte Messungen ANOVA*;  $p = 0,7848$ ).



**Abb. 4.35:** Zeitlicher Verlauf des antioxidativen Potenzials des Plasmas nach Gabe von DAI bzw. DG (1 mg pro kg KG berechnet als Aglykon-Äquivalente). Dargestellt sind die mit dem ORAC-Test ermittelten mittleren Trolox-Äquivalente.

Korrelationen wurden nach *Pearson* durchgeführt. Es ergaben sich keine Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen hohen Plasmakonzentrationen an DAI und seinen Metaboliten und damit verbundener verbesserter antioxidativer Wirkung des Plasmas.

## 5 Diskussion

### 5.1 Untersuchungen zur zellulären Aufnahme von Isoflavonen

Die Mechanismen der zellulären Aufnahme von Isoflavonen sind bisher noch nicht abschließend geklärt. Man geht davon aus, dass Isoflavone aufgrund ihrer Lipophilie und ihres geringen Molekulargewichts nach Hydrolyse der Glucoside durch passive Diffusion im Darm resorbiert werden. Die Hydrophilie der Glucoside und die damit verbundene fehlende Affinität zur Lipiddoppelschicht der Membranen verhindert eine passive Aufnahme dieser Verbindungen [72]. Darüber hinaus lieferten Zellkultur-, Tier- und Humanstudien bisher keine direkten Hinweise, dass Isoflavon-Glucoside intakt aktiv in die Darmzellen aufgenommen werden können (siehe Kap. 1.4.2) [72,73,74]. Auch die Aufnahmemechanismen der Aglykone bleiben bisher ungeklärt. Oitate et al. konnten eine Akkumulation von Genistein (GEN) in Caco-2-Zellen in vitro nachweisen, ohne den Transportmechanismus eindeutig zu charakterisieren [71].

Ziel dieser Arbeit war es, anhand von konzentrations- und zeitabhängigen Untersuchungen bei verschiedenen Temperaturen und in unterschiedlichen Zellarten sowie durch Hemmung aktiver Transportproteine die Mechanismen der zellulären Aufnahme der drei Soja-Isoflavone, GEN, Daidzein (DAI) und Glycitein (GLY), näher zu bestimmen. Darüber hinaus sollte der zelluläre Metabolismus der drei Substanzen charakterisiert werden. Bei den ausgewählten Zellarten handelte es sich um V79-Zellen, einem etablierten Zellmodell für toxikologische Untersuchungen, sowie Caco-2-Zellen, einem Modell für die Funktion reifer Epithelzellen des Darms. Darüber hinaus wurden humane mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (PBMC) verwendet, da sie nach Isoflavonaufnahme in ständigem Kontakt mit den im Plasma vorkommenden Verbindungen stehen und leicht zugänglich sind.

#### 5.1.1 Überprüfung der Modellrechnung zur Bestimmung der Substanzkonzentration in der Zelle

Die Modellrechnung zur Bestimmung der Substanzkonzentration in der Zelle (Gl. 3.1, Kap. 3.2.2.7) wurde mit Hilfe der Berechnung des Gesamt-Glutathion-Gehalts in Caco-2-Zellen überprüft. Dieser betrug 2,3 mM. Für HT29-Zellen liegt die GSH-Konzentration in Abhängigkeit der Proliferationsrate bei 2 bis 3 mM [336]. Da es sich bei beiden Zellarten um menschliche Adenokarzinomzellen handelt, die aus einem Primär-Dickdarmtumor isoliert wurden, ist ein Vergleich zulässig. Aus der Übereinstimmung wird geschlossen, dass die verwendete Modellrechnung (Gl. 3.1) eine ausreichend genaue Abschätzung der Konzentration in der Zelle erlaubt. Die Berechnung der Konzentration in der Zelle ist Basis für die weitere Diskussion.

### 5.1.2 Konzentrationsabhängige Aufnahme in V79- und Caco-2-Zellen sowie in humane PBMC

Sowohl bei V79- als auch bei Caco-2-Zellen wurde ein linearer Zusammenhang zwischen der aufgenommenen Menge an Isoflavonen in der Zelle und den eingesetzten Konzentrationen beobachtet (siehe Abb. 4.1 und 4.3). Für GEN findet man die stärkste Akkumulation, gefolgt von DAI und GLY (siehe Tab. 4.2 und 4.4). Dies ist durch die höhere Affinität von GEN als von DAI zu Liposomenmembranen bedingt [72,337]. Ein möglicher Erklärungsansatz für diese Befunde ist, dass GEN durch Ausbildung intramolekularer Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Hydroxylgruppe am C-5 und der Ketogruppe am C-4 einen hydrophoberen Charakter aufweist, als aufgrund der drei Hydroxylgruppen zu erwarten ist [338]. Gründe für die auftretende Akkumulation der drei Isoflavone werden in Kap. 5.1.3 und 5.1.6 diskutiert.

Hong et al. und Vaidyanathan & Walle untersuchten die konzentrationsabhängige Aufnahme von Epigallocatechin-3-Gallat und Epicatechin-3-Gallat in HT29- bzw. Caco-2-Zellen [92,94]. Sie konnten im Einklang mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit eine lineare Aufnahme der beiden Substanzen mit zunehmender Konzentration beobachten. Ab einer Konzentration von etwa 100  $\mu\text{M}$  ging der lineare Anstieg jedoch in eine Sättigung über. In dieser Arbeit wurde die konzentrationsabhängige Aufnahme nur bis zu Konzentrationen von 50  $\mu\text{M}$  untersucht, um cytotoxische Effekte auszuschließen. Der lineare Anstieg bei V79- und Caco-2-Zellen mit zunehmenden Konzentrationen deutet daraufhin, dass eine eventuelle Sättigung der Aufnahme erst bei Konzentrationen über 50  $\mu\text{M}$  auftritt.

Die Anteile von DAI und GEN in den Membranbestandteilen wiesen mit steigenden Konzentrationen bei V79- und Caco-2-Zellen keine signifikanten Unterschiede auf (siehe Tab. 4.1 und 4.3). Dies ist in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Hong et al., die ebenfalls bei der Untersuchung des Anteils der Membranfraktion einen konstanten Anteil von 24 % bezogen auf die aufgenommene Menge an Epigallocatechin-3-Gallat in HT29-Zellen über den verwendeten Konzentrationsbereich von 0,5 bis 20  $\mu\text{M}$  fanden [92]. Für GLY hingegen wurde ein konzentrationsabhängiger Anstieg des Anteils in der Membranfraktion beobachtet, der sich allerdings zwischen den einzelnen eingesetzten Konzentrationen nicht signifikant unterschied.

Insgesamt fällt auf, dass der prozentuale Anteil in den Membranfraktionen bei V79- und Caco-2-Zellen relativ klein ist (siehe Tab. 4.1 und 4.3). Der überwiegende Teil der aufgenommenen Isoflavone findet sich somit vermutlich an Proteine gebunden im wässrigen Cytosol, was für GEN und Quercetin (QUER) anhand Fluoreszenz-mikroskopischer Studien bereits gezeigt wurde [339].

Im Unterschied zu V79- und Caco-2-Zellen findet man bei humanen PBMC einen exponentiellen Anstieg der Konzentration in der Zelle und der eingesetzten Konzentration, wobei GLY am stärksten angereichert wird (siehe Abb. 4.5 und Tab. 4.5). Für GEN konnte bis zu einer verwendeten Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  keine Akkumulation beobachtet werden (siehe Tab. 4.5). Der exponentielle Konzentrationsverlauf der Isoflavonaufnahme in PBMC wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben. Denkbar ist, dass GLY und DAI stärker an cytosolische Proteine als GEN gebunden werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass DAI *in vitro* in größerem Umfang an Plasmaproteine bindet als GEN. GLY wurde allerdings in diese Untersuchungen nicht miteinbezogen [340]. Ein weiterer möglicher Grund ist eine Anreicherung in den Membranen der Zellen, die für GLY am stärksten ausfällt, gefolgt von DAI. GEN mit drei Hydroxylgruppen zeigt die schwächste Akkumulation, vermutlich wegen seines hydrophileren Charakters. Dies steht allerdings in Gegensatz zu den Ergebnissen für V79- und Caco-2-Zellen, bei denen GEN wahrscheinlich durch Ausbildung intramolekularer Wasserstoffbrückenbindungen die größte Affinität zu Membranen aufweist und am stärksten angereichert wird (siehe oben). Neben der intramolekularen Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen müssen jedoch auch intermolekulare Wechselwirkungen berücksichtigt werden, die vermutlich im Falle von GLY durch die größere Lipophilie stärker ins Gewicht fallen. Da bei V79- und Caco-2-Zellen im Falle von GLY der Anteil in der Membranfraktion zunahm, liegt die Vermutung nahe, dass die sehr hohe Anreicherung in humanen PBMC durch eine Akkumulation in den Membranen zustande kommt. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre, dass PBMC im Vergleich zu V79- und Caco-2-Zellen ein größeres Membransystem mit einer Vielzahl an Proteinen aufweisen, so dass eine vermehrte Akkumulation in diesem Kompartiment eine Rolle spielen könnte. Interessant wäre es deshalb, den Anteil der Isoflavone in den Membranstrukturen und in der Cytosolfraction der PBMC zu bestimmen, was jedoch wegen der erforderlichen sehr hohen Zellzahlen in dieser Arbeit nicht möglich war. Weitere mögliche Erklärungsansätze sind die Hemmung des Effluxes von GLY bzw. eine verstärkte Ausscheidung von GEN aus den Zellen, worauf in Kap. 5.1.5 eingegangen wird, sowie die Aufnahme von GLY über spezifische Rezeptoren an der Oberfläche der PBMC. Die Bindungsaffinität, beispielsweise zu den membranständigen Estrogen- oder Glucocorticoid-Rezeptoren [341,342], wurde bisher für die drei Isoflavone nicht untersucht. Allerdings bindet GLY schlechter als GEN und vergleichbar mit DAI an die im Cytosol lokalisierten Estrogen-Rezeptoren (ER)  $\alpha$  und  $\beta$  [176,177,343], so dass die Rolle von Rezeptoren fraglich erscheint. Ein aktiver Transport ist aufgrund der Ergebnisse zum Einfluss der Temperatur auf die zelluläre Aufnahme (siehe Kap. 5.1.3) unwahrscheinlich.

Zusammenfassend kann man sagen, dass zwischen der zellulären Aufnahme der Isoflavone in V79- und Caco-2-Zellen und der eingesetzten Konzentration ein linearer Zusam-



menhang besteht, wobei die Substanzen vorwiegend im Cytosol angereichert werden. Für die konzentrationsabhängige nicht-lineare Akkumulation von GLY und die fehlende Anreicherung von GEN in den PBMC gibt es bisher nur Erklärungsansätze, die in Zukunft noch verifiziert werden müssen. Vermutlich spielen eine ausgeprägte Proteinbindung, intermolekulare Wechselwirkungen sowie unterschiedliche Effluxraten der Verbindungen eine Rolle.

### **5.1.3 Zeit- und temperaturabhängige Aufnahme in V79- und Caco-2-Zellen sowie in humane PBMC**

Die zeitliche Aufnahme der Isoflavone in V79-Zellen und PBMC bei 37 °C ist durch einen Anstieg bis zu einem Grenzwert gekennzeichnet (siehe Abb. 4.2 und 4.6), was in Übereinstimmung mit Ergebnissen zur Aufnahme von Epigallocatechin-3-Gallat, Epicatechin-3-Gallat, Flavon und QUER in HT29-, Caco-2- bzw. HepG2-Zellen bei 37 °C steht [92,94, 344,345].

In dieser Arbeit wurde zusätzlich die Aufnahme bei 4 °C untersucht: Bei allen drei verwendeten Zellarten wurde bei dieser Temperatur eine größere Menge an Isoflavonen in die Zelle aufgenommen als bei 37 °C. Dies lässt auf passive Diffusion als Aufnahmemechanismus schließen, da bei tiefen Temperaturen die für einen aktiven Transport nötige Enzymabhängige ATP-Hydrolyse reduziert ist [346]. Ein möglicher Erklärungsansatz für den verstärkten Substanzeinstrom bei 4 °C ist eine veränderte Membranpermeabilität der Zellen, so dass mehr Substanz durch passive Diffusion in die Zellen aufgenommen werden kann.

Bei Caco-2-Zellen findet man nach fünf- bis zehnminütiger Inkubationszeit ein Maximum gefolgt von einem exponentiellen Abfall der Konzentration in der Zelle, wenn die Zellen mit 5 µM DAI, GEN bzw. GLY bei 37 °C inkubiert werden. Bei 4 °C hingegen wird ein zeitabhängiger Anstieg wie bei V79-Zellen und den PBMC beobachtet (siehe Abb. 4.4). Hong et al. untersuchten ebenfalls den Temperatureffekt der zellulären Aufnahme von Epigallocatechin-3-Gallat in HT29-Zellen und konnten feststellen, dass bei 4 °C signifikant mehr Substanz in die Zelle als bei 37 °C aufgenommen wurde und dass dieser Effekt nach 90 min stärker ausgeprägt war als nach 30 min [92]. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit denen aus dieser Arbeit. Hong et al. führten die Befunde auf den aktiven Transport von Epigallocatechin-3-Gallat aus der Zelle zurück und konnten die Beteiligung der Multidrug Resistance Associated Proteine (MRP) zeigen [92]. Analog dazu ist denkbar, dass Isoflavone ebenfalls aktiv aus den Zellen transportiert werden (siehe Kap. 4.1.5 und 4.1.6). Auf die Diskussion dieser Ergebnisse wird in Kap. 5.1.5 näher eingegangen.

Oitate et al. untersuchten die zelluläre Aufnahme von 50 µM GEN in Caco-2-Zellen bei 37 °C und konnten über eine Inkubationsdauer von 30 min einen zeitabhängigen Anstieg beobachten [71]. Ein Grund für die unterschiedlichen Befunde ist wahrscheinlich die ver-

wendete Konzentration: Oitate et al. setzten 50  $\mu\text{M}$ , somit eine zehnfach höhere Konzentration, ein. Denkbar ist, dass durch die hohe Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  die Kapazität der Transportproteine erschöpft ist und es so zu den unterschiedlichen Beobachtungen kommt.

Schlussfolgernd kann man sagen, dass Isoflavone über die Zeit bis zu einem Grenzwert in die Zellen aufgenommen werden, wobei bei V79-Zellen und PBMC keine Unterschiede zwischen den Inkubationen bei 37 und 4 °C bestehen. Die unterschiedlichen Verläufe für Caco-2-Zellen bei 37 und 4 °C deuten auf einen aktiven Efflux der Isoflavone hin.

#### **5.1.4 Zellulärer Phase-II-Metabolismus der Isoflavone**

Die Untersuchung des Zellkulturmediums und der Zelllysate nach Inkubation mit den drei Isoflavonen mittels HPLC/DAD/MS ergab für V79-Zellen keine Hinweise auf die Bildung von Phase-II-Konjugaten (siehe Kap. 4.1.2). Dies bestätigt die fehlende Expression Fremdstoff-metabolisierender Enzyme in den Zellen.

Bei Caco-2-Zellen konnten bereits nach einstündiger Inkubationsdauer sowohl Glucuronsäure- als auch Sulfat-Konjugate nachgewiesen werden (siehe Tab. 4.6). Bei humanen PBMC ergaben sich nur Hinweise auf Sulfat-Konjugate im Zellkulturmedium (siehe Tab. 4.7). In der Literatur ist allerdings beschrieben, dass in PBMC neben Sulfotransferasen auch UDP-Glucuronyltransferasen exprimiert werden [332], wobei die Expression beider Phase-II-Enzyme großen interindividuellen Schwankungen unterliegt (persönliche Mitteilung November 2004: T. Hofmann, B. L. Pool-Zobel, Universität Jena). Da für die Experimente immer die PBMC desselben Spenders verwendet wurden, um interindividuelle Variationen auszuschließen, besteht die Möglichkeit, dass bei anderen Probanden Isoflavon-Glucuronide gebildet werden.

Sowohl bei Caco-2-Zellen als auch bei den PBMC findet man nach einstündiger Inkubationszeit nur einen sehr geringen Anteil der Phase-II-Konjugate im Zellkulturmedium (2 bis 20 %). Nach 24 h liegt bei den Caco-2-Zellen fast die gesamte Menge der eingesetzten Isoflavone, bei den PBMC weniger als 40 % konjugiert vor (siehe Tab. 4.6 und 4.7). PBMC verfügen somit über eine geringere Aktivität der Phase-II-Enzyme als Enterozyten. Dies ist nicht unerwartet, da eine der Hauptfunktionen des Darms seine Barrierefunktion ist, so dass der Körper vor toxischen Substanzen geschützt wird. Im Falle der Inkubation bei 4 °C konnten keine Phase-II-Metabolite im Zellkulturmedium nachgewiesen werden, da die Enzymaktivität bei tiefen Temperaturen erheblich reduziert ist [347].

Chen et al. untersuchten ebenfalls den Metabolismus von DAI, GEN, GLY, Formononetin (FORM), Biochanin A (BCA) und Prunetin (PRU) in Caco-2-Zellen [96]. Sie konnten in Übereinstimmung mit Ergebnissen aus dieser Arbeit zeigen, dass sowohl die Glucuronide

als auch die Sulfate der getesteten Isoflavone gebildet werden. Allerdings wurde ein größerer Anteil an Glucuronsäure-Konjugaten detektiert. Auch Jia et al. wiesen nach, dass FORM und BCA nach vierstündiger Inkubationsdauer in Caco-2-Zellen vorwiegend glucuronidiert werden, Sulfat-Konjugate traten nur in Spuren auf [348]. In einer weiteren Studie von Chen et al. wurde nach zweistündiger Inkubationsdauer von GEN mit Caco-2-Zellen ähnliche Mengen an GEN-Glucuronid und -Sulfat im Zellkulturmedium detektiert [349]. Diese unterschiedlichen Ergebnisse sprechen für eine große Variabilität in der Expression der verschiedenen Phase-II-Enzyme bei den verwendeten Caco-2-Zellen. Mögliche Gründe sind unterschiedlich verwendete Caco-2-Stämme (TC7 im Gegensatz zu Wildtyp), verschiedene Medien (HBSS versus Zellkulturmedium) und eine unterschiedlich lange Kultivierung vor der Durchführung des eigentlichen Experiments von 19 bis 22 Tagen bzw. 13 Tagen. Des Weiteren kann eine fehlende Sensitivität bei der Detektion der Sulfat-Konjugate nach der HPLC-Trennung bei den in der Literatur verwendeten Methoden eine Rolle spielen. Aufgrund der ionisch vorliegenden Struktur der Sulfate musste in dieser Arbeit ein Ionenpaar-bildendes Reagenz (Tetrabutylammoniumphosphat, siehe Kap. 3.2.2.8.2) zugegeben werden, was zu einer verbesserten Peakform der Sulfat-Konjugate und damit verbundener größerer Empfindlichkeit führte. Mit der Literatur übereinstimmende Resultate werden hingegen in Bezug auf die gebildeten Mengen an Phase-II-Konjugaten zu unterschiedlichen Inkubationszeiten gefunden: Nach einstündiger Inkubationszeit wurden nur sehr wenige Glucuronide bzw. Sulfate in das Medium ausgeschieden, nach 24 h lag praktisch die gesamte Menge der eingesetzten Isoflavone konjugiert vor [96]. Sowohl in den Caco-2-Zellen als auch in den PBMC gibt es in dieser Arbeit keine Hinweise auf Phase-II-Konjugate im Zelllysate, was auf einen effektiven Transport aus der Zelle schließen lässt. Die oben erwähnten Autoren untersuchten die Zelllysate nicht auf gebildete Metabolite [96,348,349], so dass kein Vergleich möglich ist.

Der Metabolismus von  $^{14}\text{C}$ -markiertem GEN und seinem methylierten Derivat BCA wurde auch in anderen Zellarten untersucht: Eingesetzt wurden MCF-7-, ZR-75-1 und T47D-Zellen, wobei es sich in allen Fällen um humane Brustkrebszelllinien handelt [350,351]. Die getesteten Zellarten verstoffwechselten GEN zu GEN-Sulfat sowie zu einer nicht näher charakterisierten hydroxylierten und methylierten Form von GEN-Sulfat, BCA wurde zu GEN und den zwei oben genannten Metaboliten von GEN umgesetzt. Im Zelllysate konnten nur Spuren der gebildeten Metabolite mit Radio-HPLC detektiert werden, was den auch in dieser Arbeit nachgewiesenen effektiven Transport der Metabolite aus den Zellen bestätigt.

Auch der Phase-II-Metabolismus anderer Flavonoide wurde bereits in verschiedenen Zellkulturmodellen untersucht. Chrysin wurde in Caco-2-Zellen sowohl glucuronidiert als auch sulfatiert, wobei nach sechsstündiger Inkubationszeit 50 % und nach 24-stündiger nur noch 10 % unverändertes Chrysin vorlag [352]. In einer anderen Arbeit derselben Autoren war

nach lediglich 6 h noch 10 % nicht verstoffwechseltes Chrysin im Zellkulturmedium von Caco-2-Zellen vorhanden [353]. Unterschiede in der Durchführung bestanden allerdings in der 20- bis 31-tägigen Kultivierung verglichen mit der zehntägigen in oben genannter Studie [352,353]. Apigenin wurde in Studien von Chen et al. und Hu et al. im Caco-2-Zellkulturmodell zu in etwa gleichen Teilen glucuronidiert und sulfatiert [349,354]. Darüber hinaus konnten Hu et al. zeigen, dass die Transporterfunktion und damit die Menge an ausgeschiedenem Apigenin-Sulfat und -Glucuronid von den Kultivierungszeiten vor Versuchsbeginn abhängen [354]. Nach 15-tägiger Kultivierung wurde die größte Menge Sulfat und Glucuronid ins Zellkulturmedium exkretiert [354,355]. Daraus kann geschlossen werden, dass Untersuchungen zum Phase-II-Metabolismus in Caco-2-Zellen nur bei Einhaltung derselben Versuchsbedingungen direkt zu vergleichen sind.

Zusammenfassend kann man sagen, dass von verschiedenen Zellarten Phase-II-Konjugate von Isoflavonen und Flavonoiden in unterschiedlichem Ausmaß gebildet werden. Aufgrund der unterschiedlichen Durchführung der Experimente ist ein direkter Vergleich der gebildeten Mengen nicht möglich. Es gibt bisher keine Studien, die den Phase-II-Metabolismus von Isoflavonen in PBMC untersuchen.

#### **5.1.5 Einfluss der Transportproteine MDR1 und MRP auf den Efflux der Isoflavone**

Die Resistenz von Krebszellen gegenüber einer Vielzahl von Medikamenten mit unterschiedlicher chemischer Struktur und Wirkung, u.a. Chemotherapeutika, wird oft durch die Überexpression von in der Plasmamembran verankerten ABC (ATP-Binding Cassette) - Transportproteinen hervorgerufen. Durch die Hydrolyse von ATP werden sie gegen den Konzentrationsgradienten aus der Zelle heraustransportiert, so dass der Wirkstoffspiegel unter die gewünschte Konzentration gesenkt wird. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass Phase-II-Metabolite der Flavonoide Substrate der Multidrug Resistance Associated Proteine (MRP) und von P-Glycoprotein (MDR1) sind [91,92,93,94]. Für Isoflavone konnte bisher nur die Beteiligung der MRP am Efflux der Glucoside bzw. Phase-II-Konjugate nachgewiesen werden [95,96].

In V79-Zellen bestanden wegen der fehlenden Bildung von Phase-II-Konjugaten und der vergleichbaren zellulären Aufnahme der Isoflavone bei 37 und 4 °C keine Hinweise auf die Beteiligung aktiver Transportprozesse. Auch in der Literatur gibt es keine Daten zu der Expression dieser Proteine in V79-Zellen [356]. Aus diesem Grund wurden keine weiteren Experimente durchgeführt.

Bei Caco-2-Zellen fiel der unterschiedliche Konzentrationsverlauf der in die Zellen aufgenommenen Menge an Isoflavonen bei 37 und 4 °C auf. Ein Transport der Isoflavone aus

den Zellen ist somit denkbar. Aus diesem Grund wurde der Einfluss der Transportproteine MDR1 und MRP untersucht. Da zum Teil die zelluläre Aufnahme der Isoflavone in Anwesenheit der Inhibitoren Verapamil bzw. MK 571 (siehe Kap. 4.1.5) um mehr als 100 % erhöht ist (siehe Abb. 4.8), kann geschlossen werden, dass sowohl MDR1 als auch MRP am Transport der Isoflavone bzw. ihrer Phase-II-Konjugate aus den Zellen beteiligt sind. Die Hemmung der Ausscheidung von Isoflavonen aus der Zelle im Falle der Verwendung von MK 571 ist bei allen drei Isoflavonen stärker ausgeprägt (siehe Abb. 4.8). Von den in Caco-2-Zellen bekannten Effluxpumpen der MRP-Familie besitzt MRP2 die größte Bedeutung [309,310,311]. Da jedoch die Menge der exprimierten Transportproteine in dieser Arbeit nicht bestimmt wurde, kann keine quantitative Aussage über die Beteiligung von MDR1 und den einzelnen Vertretern der MRP-Familie gemacht werden.

Chen et al. konnten in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit die Beteiligung der MRP am Transport der Phase-II-Metabolite der Isoflavone aus Caco-2-Zellen zeigen, wobei allerdings nicht die Rolle von MDR1 untersucht wurde [96]. Auch für die Phase-II-Metabolite von u.a. Epigallocatechin-3-Gallat, Apigenin, Chrysin und QUER konnte die Beteiligung der MRP, im Speziellen von MRP2, am Transport der Phase-II-Konjugate nachgewiesen werden [92,93,353,354]. Wie in dieser Arbeit sind die ausgeschiedenen Mengen der Phase-II-Konjugate im Falle der Hemmung der Transportproteine in den meisten Fällen statistisch signifikant unterschiedlich.

Bei PBMC deutete der Nachweis der Phase-II-Konjugate im Zellkulturmedium auf die Beteiligung eines aktiven Transports hin. Aus diesem Grund wurde der Einfluss von MDR1 und MRP, die in humanen PBMC exprimiert werden, untersucht, wobei in PBMC MRP1 von den Vertretern der MRP-Familie die größte Rolle spielt [312]. Es konnte wiederum gezeigt werden, dass diese Proteine am Efflux der Isoflavone beteiligt sind, wobei durch Inhibierung von MDR1 die Ausscheidung stärker gehemmt wurde (siehe Abb. 4.10). Da wie im Falle der Caco-2-Zellen die Menge der exprimierten Proteine nicht bestimmt wurde, kann auch hier keine quantitative Aussage über die Rolle von MDR1 und der Vertreter der MRP gemacht werden. Allerdings lassen die unterschiedlichen Ergebnisse zu Caco-2-Zellen darauf schließen, dass der größere Beitrag bei der Hemmung des Effluxes von MDR1 im Falle der PBMC und von den MRP bei Caco-2-Zellen durch die stärkere Expression des jeweiligen Proteins bedingt ist.

Wie bei den Experimenten zum Metabolismus (siehe Kap. 5.1.4), wurden bei diesen Untersuchungen ebenfalls die Zellen desselben Spenders herangezogen, um interindividuelle Variationen bezüglich des Metabolismus und des Transports von Isoflavonen auszuschließen. Auch hier gibt es noch keine Vergleichswerte für die PBMC aus der Literatur. In den Versuchen zur zeitabhängigen zellulären Aufnahme der Isoflavone konnte erst nach einstündiger Inkubationsdauer (siehe Abb. 4.6) bzw. ab einer Konzentration von 25  $\mu$ M im

Fälle von DAI und GLY eine Akkumulation in den PBMC beobachtet werden, GEN wurde nicht angereichert (siehe Tab. 4.5 und Kap. 5.1.2). Dies kann durch eine Sättigung der Kapazität der am Efflux beteiligten Transportproteine bedingt sein, so dass statt der Ausschleusung eine verstärkte Akkumulation durch Bindung an Zellproteine oder Membranbestandteile erfolgt. Ein weiterer möglicher Erklärungsansatz wäre bei hohen Konzentrationen eine durch GLY vermittelte Hemmung der Transportproteine, vermutlich von MDR1, die bei Caco-2-Zellen aufgrund der geringeren Expression nicht ins Gewicht fällt (siehe oben). Bisher wurde aber die Wirkung von GLY auf MDR1 oder MRP in der Literatur nicht untersucht, so dass keine eindeutigen Schlussfolgerungen möglich sind. Bei der fehlenden Anreicherung von GEN in den PBMC ist eine größere Affinität von GEN und seinen Phase-II-Konjugaten zu MDR1 als zu Vertretern der MRP-Familie, hier vor allem zu MRP1 und 2, denkbar, so dass in Caco-2-Zellen im Gegensatz zu PBMC eine Akkumulation erfolgen kann. Ein Affinitätsvergleich von GEN für diese Proteine wurde bisher in der Literatur allerdings nicht durchgeführt.

Mit den Befunden aus dieser Arbeit können jedoch die unterschiedlichen intrazellulären Konzentrationen in Caco-2-Zellen und PBMC nach einstündiger Inkubation bei 37 bzw. 4 °C nicht vollständig geklärt werden (siehe Abb. 4.8 und 4.10). Möglicherweise sind noch andere Mechanismen beteiligt, die zu den höheren Konzentrationen der Isoflavone in der Zelle bei 4 °C führen. Zum einen spielt die bereits in Kap. 5.1.1 erwähnte höhere Permeabilität der Zellmembran eine Rolle. Zum anderen fällt der fehlende Phase-II-Metabolismus durch Hemmung der Enzyme bei 4 °C ins Gewicht (siehe Kap. 4.1.5 und 4.1.6).

Aufgrund der in der Literatur vorliegenden Studien zur Substratspezifität von MRP liegt die Schlussfolgerung nahe, dass Phase-II-Konjugate der Flavonoide von Vertretern der MRP-Familie transportiert werden, wobei MRP1 dieselben Substanzen bindet wie MRP2 [90,92,93,96,353,354]. Als Substrate dienen Verbindungen, die gute Elektronendonoren sind. In der Regel handelt es sich dabei um anionische Verbindungen oder lipophile Substanzen, die mit Glutathion, Glucuronsäure oder Sulfat konjugiert sind [357,358]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auch die neutralen Verbindungen GEN-O-7- $\beta$ -D-Glucosid und QUER-O-4'- $\beta$ -D-Glucosid von MRP2 aus Caco-2-Zellen transportiert werden [91,95]. Neutrale oder positiv geladene Verbindungen gelten in der Regel nicht als Substrate von MRP1 bzw. 2. Welche Form der Isoflavone bzw. Flavonoide von MDR1 transportiert wird, ist bisher noch unklar. Als strukturelle Merkmale für die Bindung an MDR1 gelten, dass es sich um relativ lipophile, amphiphile Verbindungen handelt, deren Elektronengebende Gruppe, vorzugsweise Sauerstoffatome, 2,5 oder 4,6 Å auseinander liegen müssen [89]. Bei GEN kommen dafür die Hydroxylgruppe am C-5 und die Ketogruppe am C-4 in Frage. MDR1-Substrate können auch positiv geladen sein, wie z.B. Rhodamin 123. Negativ geladene Substanzen werden hingegen nicht transportiert. Weisen Verbindungen

die oben genannten Abstände der Elektronen-gebenden Gruppe in Verbindung mit einer negativ geladenen Gruppe auf, sind sie trotz der negativen Ladung Substrate von MDR1, wie es für Morphin-3-Glucuronid gezeigt werden konnte [89]. Da die meisten MDR1- und MRP-Modulatoren, zu denen auch die Isoflavone gehören [84,85,88], transportiert werden, ist anzunehmen, dass die oben genannten Strukturmerkmale auch für die zu transportierenden Substanzen gelten. Für GEN konnte gezeigt werden, dass nur das Aglykon selbst und nicht die Metabolite durch das Breast Cancer Resistance Protein (BCRP), das MDR1 ähnelt und ebenfalls zu den ABC-Transportproteinen zählt, aus BCRP-transfizierten menschlichen Leukämiezellen (K562) transportiert wird [359,360]. Für Epicatechin-3-Gallat konnte eine Beteiligung von MRP1 und 2 am Transport des Aglykons nachgewiesen werden [94]. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten daraufhin, dass sowohl die Aglykone als auch die Phase-II-Metabolite Substrate von MDR1 und der MRP-Familie, vermutlich hier vor allem von MRP1 und 2, sind, da man nach einstündiger Inkubationsdauer bei 37 °C bei Addition der Konzentrationen in der Zelle nach Hemmung von MDR1 und MRP eine insgesamt höhere Konzentration in der Zelle als bei 4 °C findet.

Untersuchungen zur Bestimmung des geschwindigkeitsbestimmenden Schritts bei der Exkretion der Konjugate konnten zeigen, dass in der Regel die Bildung der Konjugate und nicht die Ausscheidung limitierend ist [96]. Dies gilt auch für Flavonoide, z.B. Apigenin [349,354]. Darüber hinaus geben die Transportproteine die Richtung der Exkretion an, da der Transport, zumindest der hydrophilen Phase-II-Konjugate, aktiver Natur sein muss. So konnte nachgewiesen werden, dass der transzelluläre Transport von Flavon in beiden Richtungen bei 4 °C signifikant niedriger als bei 37 °C ist [344]. Während der apikale Transport beispielsweise durch MDR1 und MRP2 sowie Vertretern der Organischen Anionen-Transporter (OAT) vermittelt ist, wird der basolaterale durch MRP1 und andere Vertreter der MRP-Familie sowie OAT und Organic Anion Transporting Polypeptide (OATP) hervorgerufen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Glucuronide und Sulfate von GEN, DAI, GLY, FORM, BCA und PRU sowie von Apigenin und QUER Substrate für die OAT sind [93,96,354,361,362,363,364]. MDR1 und MRP2 werden vorwiegend in der Leber, in den Nieren und im Darm - also Organen mit Ausscheidungsfunktion - exprimiert, während MRP1 ubiquitär im Körper verteilt vorkommt [90,361]. OAT finden sich überwiegend in Leber-, Nieren- und Gehirnzellen, OATP vor allem in der Leber, den Nieren, dem Gehirn und dem Gastrointestinaltrakt [364,365]. Zusammenfassend kann man sagen, dass das Zusammenwirken der Phase-II-Enzyme und der Transportproteine die Geschwindigkeit und die Richtung der Ausscheidung bestimmen. Dies geschieht allerdings unter der Voraussetzung, dass sich die Substanzen gleichmäßig in der zellulären wässrigen Phase verteilen. Daraus wird ersichtlich, dass Isoflavone nicht nur einem enterohepatischen Kreislauf unterliegen (siehe Kap. 1.4.1), sondern auch einem nur den Darm betreffenden Kreis-

lauf unterworfen sind. Das bedeutet, dass die Konjugate von Isoflavonen bzw. Flavonoiden nach Ausscheidung durch die Enterozyten und intestinaler oder bakterieller Hydrolyse erneut aufgenommen werden können [366].

Schlussfolgernd ist zu sagen, dass Isoflavone und ihre Phase-II-Konjugate Substrate sowohl von MDR1 als auch Vertretern der MRP-Familie sind, wobei die Substratspezifitäten der einzelnen Proteine für Isoflavone nicht vollständig geklärt sind. Der Transport der Isoflavone und ihrer Konjugate aus den Enterozyten ins Blut bleibt unklar.

#### **5.1.6 Theoretische Überlegungen zur Akkumulation der Isoflavone in den untersuchten Zellarten**

Bei allen drei untersuchten Zellarten wurde eine Akkumulation der Isoflavone in der Zelle beobachtet. Dies konnte bereits sowohl für GEN als auch für die Flavonoide QUER und Flavon nachgewiesen werden [71,339,345]. Kuo zeigte anhand von mikroskopischen Studien, dass GEN und QUER im Cytosol und nicht in der Membran angereichert werden [339], was in Übereinstimmung mit den Untersuchungen zur Bestimmung des Membrananteils bei V79- und Caco-2-Zellen in dieser Arbeit ist. Darüber hinaus fanden Jia et al., dass FORM und BCA eine Permeabilität von größer eins im perfundierten Rattendarm aufwiesen, was ebenfalls für eine effektive Absorption der Isoflavone spricht [348]. Da in dieser Arbeit in allen drei verwendeten Zellarten bei 4 °C eine größere Menge an Isoflavonen detektiert werden konnte, ist davon auszugehen, dass Isoflavon-Aglykone durch passive Diffusion aufgenommen werden. Nun stellt sich die Frage, auf welche Weise eine Anreicherung in Zellen mittels passiver Diffusion erreicht werden kann, da diese theoretisch nur bis zum Ausgleich des Konzentrationsgradienten führt. Dabei ist die Bindung der Isoflavone - wie auch im Falle von QUER - an Proteine innerhalb der Zelle aufgrund ihrer großen Affinität denkbar [337,340,367]. Auf diese Art werden die Substanzen dem Gleichgewicht entzogen und der Einstrom in die Zellen entlang des Konzentrationsgradienten ist gewährleistet. Eine andere Möglichkeit besteht jedoch in der Aufnahme durch aktive Transportprozesse, die bei tiefen Temperaturen nicht gehemmt werden. Dies erscheint jedoch aufgrund der Temperaturoptima der Enzymaktivität der ATPasen unwahrscheinlich [346]. Es gibt allerdings einen indirekten Hinweis für die Beteiligung eines aktiven Transporters bei der Aufnahme der Isoflavon-Aglykone, wobei keine Untersuchungen zur Aufnahme bei 4 °C durchgeführt wurden: Oitate et al. konnten zeigen, dass der transzelluläre Transport für GEN in Caco-2-Zellen durch Flavonoide, beispielsweise QUER, Rutin oder Catechin, gehemmt wird. Die Autoren erklären diese Tatsachen mit dem Vorhandensein eines aktiven Transporters für GEN, der auf der apikalen Seite lokalisiert sein muss [71]. Die Mehrzahl der in vitro- und in vivo-Studien deuten jedoch auf eine passive Aufnahme der



Isoflavon-Aglykone hin (siehe Kap. 1.4.2 und 5.1). Die Akkumulation in den unterschiedlichen Zellarten ist vermutlich durch die Bindung an cytosolische Proteine bedingt.

In dieser Arbeit wurde Zellkulturmedium, das 10 % FCS enthielt, anstelle des zumeist eingesetzten HBSS, für die Untersuchungen zur zellulären Aufnahme verwendet. Aufgrund der ausgeprägten Proteinbindung der Isoflavone ist davon auszugehen [141,340], dass bei Einsatz einer Protein-freien Lösung die Akkumulation in die Zellen stärker ausfallen würde. Da aber unter physiologischen Bedingungen viele Proteinquellen, z.B. Albumin im Plasma, vorhanden sind, sind die gewählten Versuchsbedingungen zur Extrapolation auf die in vivo-Situation bezüglich der Anreicherung in Geweben besser geeignet (siehe Kap. 5.2.4 und 5.4).

Schlussfolgernd kann man sagen, dass Isoflavon-Aglykone über passive Diffusion aufgenommen werden. Um weitere Erkenntnisse über die zelluläre Aufnahme der Isoflavone zu bekommen, müssen noch zusätzliche Untersuchungen durchgeführt werden. Wichtig sind Experimente zur Hemmung weiterer aktiver Transportproteine. Darüber hinaus muss die Aufnahme in Zellarten, wie die der Leber und der Nieren, charakterisiert werden, um die Aufnahmemechanismen für andere Organe als den Darm näher zu beleuchten. Dabei muss allerdings bei der Wahl der einzusetzenden Substanzen beachtet werden, dass nach Aufnahme im menschlichen Körper die Isoflavone vorwiegend mit Glucuronsäure und Sulfat konjugiert vorliegen.

## 5.2 Bioverfügbarkeit des Isoflavons Daidzein und seines Glucose-Konjugats Daidzin

Bisher ist nicht abschließend geklärt, welchen Einfluss die Zuckerkonjugation auf die Bioverfügbarkeit und den Metabolismus von Isoflavonen hat. Dieser Gesichtspunkt ist jedoch für die Beurteilung der beobachteten protektiven und negativen Effekte auf die Gesundheit von zentraler Bedeutung. In asiatischen Ländern mit traditioneller Ernährungsweise werden vorzugsweise fermentierte Sojaprodukte verzehrt, die Isoflavone in freier Form, d.h. als Aglykone, enthalten, während in westlichen Industrieländern vor allem native Sojaprodukte im Handel sind, bei denen die Glucoside dominieren. Ziel dieser Arbeit war es, einen umfassenden Überblick über die Bioverfügbarkeit des Isoflavons DAI verglichen mit seinem 7-O- $\beta$ -D-Glucose-Konjugat Daidzin (DG) zu geben. Dazu wurde eine randomisierte Doppelblindstudie im Cross-Over-Design durchgeführt. Das Cross-Over-Design diente dazu, den Einfluss interindividueller Variationen zu minimieren.

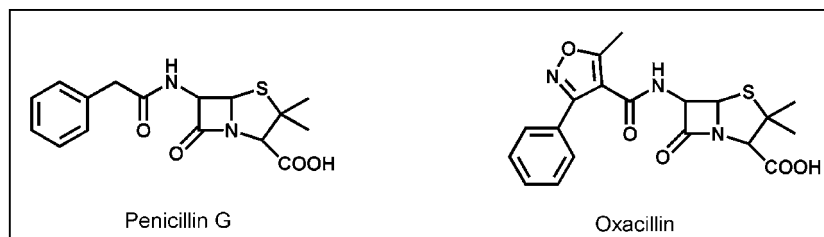
### 5.2.1 Bestimmung von Daidzein in Plasma und Urin

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass für alle Probanden DAI in Form seines Glucosids eine größere Bioverfügbarkeit - ermittelt über die Fläche unter der Blutspiegel-Zeit-Kurve (AUC) - als das Aglykon besitzt (siehe Abb. 4.12 und 4.13 sowie Tab. 4.8). Darüber hinaus war die Wiederfindung an DAI im Urin nach Gabe von DG größer als nach Einnahme von DAI (siehe Tab. 4.11). Die AUC betrug nach Verabreichung von DG durchschnittlich das 4,5-fache und die maximale Plasmakonzentration ( $C_{\max}$ ) das Sechsfache der nach Einnahme von DAI erhaltenen Werte. Diese Ergebnisse stimmen gut mit denen von Setchell et al. überein [41]. Sie fanden eine 1,5-fach größere AUC und eine doppelt so hohe  $C_{\max}$  nach Gabe von DG als nach der von DAI. Allerdings muss dabei berücksichtigt werden, dass die verabreichte Dosis an DG nur 60 % der von DAI betrug. Unter der Annahme einer linearen Zunahme sowohl der AUC als auch der  $C_{\max}$  bei steigender Dosis ergäbe sich eine Dosis-bereinigte 2,5-fach höhere AUC und dreifach höhere  $C_{\max}$ . Da die Studie von Setchell et al. nicht im Cross-Over-Design durchgeführt wurde, sind unter Einbeziehung der interindividuellen Variation die Ergebnisse im Einklang mit den Befunden aus dieser Arbeit [41]. Werden die biokinetischen Kenndaten aller Studien, in denen die Bioverfügbarkeit der Isoflavone untersucht wurden, auf die Einnahme einer Dosis von 1  $\mu\text{mol/kg}$  Körpergewicht normiert, so findet man für DAI im Falle der Glucoside eine etwas höhere  $C_{\max}$  und etwas niedrigere AUC (persönliche Mitteilung Oktober 2004: I. Nielsen, G. Williamson). Da die einzelnen Werte aus den verschiedenen Studien großen Schwankungen unterliegen, ist ein Vergleich nur bedingt aussagekräftig. In der Mehrzahl der Studien, die die Bioverfügbarkeit der Aglykone mit den Glucosiden verglichen haben,

konnte entweder eine bessere Bioverfügbarkeit der Aglykone gegenüber den Glucosiden oder eine ähnliche Bioverfügbarkeit beobachtet werden (siehe Tab. 1.5) [57,58,154,158,168,169,170,171]. Oftmals fehlt jedoch die Bestimmung der Wiederfindung im Urin. Außerdem wurden bei den Studien zum Teil verschiedene Dosen sowie unterschiedliche Verhältnisse der Konjugate und der Aglykone von GEN und DAI in den Produkten verabreicht (siehe Tab. 1.5) [57,58,154,158,168,169,170,171]. Da jedoch nicht bekannt ist, wie die Bioverfügbarkeit von der eingesetzten Dosis abhängt (siehe Kap. 1.4.1) [52,54], sind die Ergebnisse innerhalb einer Studie bei Gabe unterschiedlicher Dosen nur schwer miteinander vergleichbar. Darüber hinaus muss beachtet werden, dass zur Quantifizierung der niedrigen Konzentrationen zu Beginn und am Ende der Intervention eine Analyse-methode verwendet werden muss, die genügend sensitiv ist. Wegen der großen Empfindlichkeit und Spezifität ist die massenspektrometrische Detektion am besten geeignet. Allerdings wurde diese nur in dieser Arbeit und in der Studie von Setchell et al. [41] eingesetzt. In den anderen Studien, in denen eine ähnliche oder höhere Bioverfügbarkeit der Aglykone verglichen mit den Glucosiden nachgewiesen werden konnte, wurde zur Analyse des Plasmas HPLC mit der weniger sensitiven UV-Vis-Detektion verwendet [58,169,170]. Darüber hinaus wurden zum Teil nur Probenvolumina von 50 µL zur Aufarbeitung eingesetzt [58,169,170]. Es scheint jedoch fragwürdig, ob mit dieser geringen Probenmenge und der wenig empfindlichen Analytik die Konzentration der Isoflavone im Plasma ausreichend genau bestimmt werden konnte. Weiterhin muss beachtet werden, dass eine genügende Anzahl an Blutentnahmen durchgeführt wird, da die Bioverfügbarkeit nicht über zwei oder vier Messpunkte, wie im Falle der Studien von Xu et al. und Izumi et al. [51,169], ermittelt werden kann. Mit einer zu geringen Zahl an Blutentnahmen ist sowohl die Bestimmung der  $C_{max}$  und der AUC als auch die der Eliminationshalbwertszeiten ( $t_{1/2}$ ) kritisch, da die Konzentrationsverläufe im Plasma verzerrt sind.

Bei der besseren Bioverfügbarkeit von DG scheint ein aktiver Transportmechanismus nicht beteiligt zu sein, wie bereits in Kap. 1.4.2 erwähnt, da u.a. nach Gabe einer Einmaldosis der Isoflavon-Glucoside keine Glucoside im humanen Plasma detektiert werden konnten [74]. Die Prüfung auf das Vorhandensein von Glucosiden im Plasma in dieser Arbeit war aufgrund der Verwendung der GC/MS nicht möglich. Die Möglichkeit, dass Isoflavon-Glucoside intakt resorbiert werden, im Portalvenenblut auftreten und in der Leber vollständig deglycosiliert werden, besteht. Sie erscheint aber nicht sehr wahrscheinlich, da auch nach Gabe von QUER-Glucosiden und Anthocyanen im humanen Plasma Glucoside detektierbar waren [68,69]. Diese Tatsachen weisen auf eine passive Diffusion des Aglykons nach erfolgter Hydrolyse der glycosidischen Bindung hin (siehe Kap. 1.4.2 und 5.1.6). Ein möglicher Grund der größeren Bioverfügbarkeit von DG ist, dass die glycosidische Gruppe das Aglykon vor dem Abbau durch Darmbakterien schützt, so dass nach erfolgter

Hydrolyse mehr unverändertes DAI aufgenommen werden kann. Das Konzept der Anheftung einer Schutzgruppe an ein Molekül wird häufig in der Pharmakologie, z.B. bei Antibiotika (siehe Abb. 5.1) genutzt, um Substanzen vor Metabolisierung durch Darmbakterien zu schützen und so die Absorption zu erhöhen. Darüber hinaus muss eine Interaktion mit Bestandteilen aus der Nahrung berücksichtigt werden, wie es beispielsweise für Levodopa im Zuge der Behandlung von Parkinson bei gleichzeitiger Aufnahme Protein-reicher Nahrung zu beobachten ist [368]. Im Falle der Isoflavone ist eine vermehrte Proteinbindung der lipophilen Aglykone verglichen mit den hydrophilen Glucosiden denkbar, was für QUER und sein 3-O-Rhamnosylglucosid Rutin gezeigt werden konnte [369]. Die Bindung an Proteine erschwert die Resorption der Aglykone. Da die Probanden in dieser Arbeit direkt nach Verabreichung des Isoflavon-Präparats ein Frühstück erhielten, ist eine Wechselwirkung des Aglykons mit Nahrungsproteinen, die zu einer verminderten Resorption führt, denkbar. Auch eine schlechtere Löslichkeit des Aglykons in der aus Glycoproteinen bestehenden, das Darmlumen auskleidenden Schleimhautschicht (Mucosa) ist möglich [370,371].



**Abb. 5.1:** Prinzip der Anheftung einer Schutzgruppe bei Antibiotika, die zum verminderten Abbau durch Darmbakterien führt. Penicillin G wird durch die Penicillin- $\beta$ -Lactamase abgebaut. Dieses, z.B. von Staphylokokken, exprimierte Enzym öffnet den  $\beta$ -Lactamring des Penicillins und macht es damit unwirksam. Oxacillin kann nicht zerstört werden [372].

Im Vergleich zur Studie von Setchell et al. sind die absoluten Werte für die  $C_{\max}$  und AUC nach Gabe von DAI bei vergleichbarer Dosis niedriger, während nach Verabreichung von DG bei Dosis-bereinigter Aufnahme beide Werte größer sind (siehe Tab. 4.8 und Ref. [41]). Mögliche Gründe können das unterschiedliche Geschlecht der Studienteilnehmer und das Studiendesign sein. In dieser Arbeit nahmen sieben männliche Probanden zwischen 21 und 30 Jahren an einer Studie im Cross-Over-Design teil. Bei Setchell et al. handelte es sich um Frauen, die älter als 18 Jahre waren. Außerdem wurde die Studie nicht im Cross-Over-Design durchgeführt.

In dieser Arbeit wurde nach Gabe von DG tendenziell das Erreichen der Maximalkonzentration ( $t_{\max}$ ) zu einem späteren Zeitpunkt beobachtet, nämlich nach 9,1 h, verglichen mit 8,3 h nach Verabreichung von DAI (siehe Tab. 4.8). Die verzögerte Resorption der Isoflavon-Glucoside kann durch die Hydrolyse der glycosidischen Bindung durch bakterielle oder intestinale  $\beta$ -Glucosidasen bedingt sein. Die Hydrolyse der Glucoside scheint jedoch nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt zu sein, da die Unterschiede der  $t_{\max}$ -Werte

gering sind. Setchell et al. und Izumi et al. konnten eine spätere  $t_{\max}$  bei Gabe der Glucoside ermitteln [41,169]. Es sei jedoch erneut daraufhin gewiesen, dass diese Werte aufgrund der oben genannten Kritikpunkte vorsichtig interpretiert werden sollten. Richelle et al. und Zubik & Meydani fanden hingegen in Einklang mit den Befunden aus dieser Arbeit nicht signifikant unterschiedliche Werte für  $t_{\max}$  bei Verabreichung der Glucoside bzw. Aglykone [58,170]. Schlussfolgernd kann man sagen, dass die Zuckerkonjugation keinen entscheidenden Einfluss auf den Zeitpunkt der  $C_{\max}$  hat.

Die Eliminationshalbwertszeit nach Einnahme von DG ist in dieser Studie signifikant kürzer, nämlich 6,4 h verglichen mit 10,9 h nach Gabe von DAI (siehe Tab. 4.8). Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Setchell et al. überein [41]. Richelle et al. führten zwei Versuche an unterschiedlichen Tagen durch, um die Absorptions- und Eliminationsphase vollständig erfassen zu können, und ermittelten ähnliche  $t_{1/2}$  nach Verabreichung der Aglykone und Glucoside [58]. Die Schwachpunkte dieser Studie liegen einerseits in der intraindividuellen Variation an verschiedenen Versuchstagen, andererseits bei der verwendeten unzureichenden Analytik mittels UV-Vis-Detektion. Allerdings hätten in der vorliegenden Arbeit weitere Blutentnahmen über 48 h hinaus durchgeführt werden müssen, um eine endgültige Aussage zur  $t_{1/2}$  der Glucoside zu treffen. Durch die höhere  $C_{\max}$  und die spätere  $t_{\max}$  nach Gabe von DG konnten nach 48 h noch keine konstanten Plasmakonzentrationen beobachtet werden, um die  $t_{1/2}$  korrekt zu berechnen, so dass vermutlich der Wert für  $t_{1/2}$  unterschätzt wird.

Die Plasmaverläufe zeigen einen sehr schnellen Anstieg der DAI-Konzentration, was in Einklang mit Befunden von Rowland et al. auf eine sehr schnelle Absorption schließen lässt [48]. Darüber hinaus wurde bei den meisten Probanden ein biphasischer Verlauf mit einem Peak nach etwa 3 bis 4,5 h und der  $C_{\max}$  nach ungefähr 9 h beobachtet (siehe Abb. 4.13). Auch in anderen Studien konnte ein derartiger biphasischer Verlauf sowohl nach Gabe von Reinsubstanzen als auch nach Verabreichung von Soja-Lebensmitteln beobachtet werden [41,56,59,170]. Das Auftreten des zweiten Peaks wird häufig in der Literatur über die erneute Resorption der Isoflavon-Aglykone im Zuge des enterohepatischen Kreislaufs erklärt (siehe Kap. 1.4.1) [62,63]. Ein weiterer möglicher Erklärungsansatz für den biphasischen Verlauf ist, dass zunächst eine geringe Resorption im Magen-Duodenum-Jejunum-Bereich und anschließend eine vermehrte im Colon erfolgt. Für DG bedeutet dies, dass die glycosidische Bindung bereits zum Teil im Dünndarm und nachfolgend verstärkt im Dickdarm gespalten wird. Allerdings zeigen die Plasmakonzentrationen nicht bei allen Probanden einen derartigen Verlauf, da vermutlich sowohl die bakterielle als auch die intestinale  $\beta$ -Glucosidase-Aktivität einer ausgeprägten interindividuellen Variation unterliegt, die u.a. abhängig von der Ernährung ist (siehe Kap. 1.5) [158,170]. Zusätzlich muss die

Interaktion mit Bestandteilen aus der Nahrung berücksichtigt werden, die die Resorption bzw. die Hydrolyse im Dünndarm verringern kann (siehe oben).

Die ausgeschiedene Menge an DAI mit dem Urin ist nach Einnahme von DG größer als nach Gabe von DAI und beträgt 106 bzw. 33  $\mu\text{mol}$ , was einer Wiederfindung von 39 bzw. 12 % der eingesetzten Dosis entspricht (siehe Tab. 4.11). Auch Franke et al. konnten eine vermehrte Exkretion der Isoflavone im Urin nach Verabreichung der Glucoside beobachten (siehe Tab. 1.5) [82]. Die ausgeschiedenen Mengen in dieser Arbeit liegen innerhalb der Schwankungsbreite der Werte in der Literatur, die zwischen 8 und 64 % [154,373] bzw. 23 und 114  $\mu\text{mol}$  nach 24 h betragen [58,374]. Die Gründe für die Unterschiede zwischen den Studien sind noch unklar, sie hängen nicht von der Art des Soja-Präparats, der Sammelperiode oder der Dosis ab (siehe Tab. 1.3). Eine mögliche Erklärung ist ein unterschiedlich ausgeprägter Metabolismus durch die Darmflora bzw. die Leber, so dass je nach Individuum mehr oder weniger DAI mit dem Urin ausgeschieden wird. Im Gegensatz zum 4,5-fachen Unterschied in der AUC beträgt die ausgeschiedene Menge nach Gabe von DG nur das Dreifache. Dies kann damit zusammenhängen, dass die Urinsammlung nur über 24 h erfolgte und dass die Exkretion von DAI aufgrund der besseren Bioverfügbarkeit nach Verabreichung von DG nicht abgeschlossen war. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass noch ein beträchtlicher Anteil nach 24 h im Urin ausgeschieden wurde [50, 56,57,59,154]. Eine längere Urinsammlung auf Eis war jedoch nicht praktikabel, da die Probanden den Humantrakt der BfEL nach den Blutentnahmen über einen Zeitraum von 24 h verlassen haben. Darüber hinaus ist ein verminderter Abbau von DAI durch die Darmbakterien nach Gabe von DG denkbar, weil durch die Verknüpfung mit Glucose, wie oben beschrieben, DAI vor bakteriellen Abbau geschützt wird. Auch die teilweise Abtötung der Darmflora nach Antibiotika-Gabe führte zu einer besseren Bioverfügbarkeit der Isoflavone aufgrund eines verminderten Abbaus durch Darmbakterien [82]. Der größte ausgeschiedene Anteil der aufgenommenen Isoflavone im Urin findet sich in der Fraktion zwischen 6 und 12 h, was in Einklang mit den Studien von Watanabe et al. und Zhang et al. ist [57,59]. Dies lässt auf eine effektive renale Clearance schließen.

Die Anteile der Phase-II-Konjugate im Plasma und Urin unterscheiden sich nicht signifikant nach Einnahme von DAI bzw. DG, was auf eine effektive Konjugation durch Phase-II-Enzyme, den UDP-Glucuronyltransferasen und Sulfotransferasen, deutet. Allerdings wird zunächst ein Anstieg des Aglykons im Plasma auf ungefähr 12 % beobachtet, woraus geschlossen werden kann, dass die schnelle Absorption die Kapazität der sowohl im Darm als auch in der Leber lokalisierten Phase-II-Enzyme übersteigt. Der relativ niedrige Anteil der Phase-II-Konjugate von etwa 3 % im Plasma (siehe Kap. 4.2.2.1) ist in guter Übereinstimmung mit der Studie von Setchell et al. Diese ermittelten einen durchschnittlichen Anteil von 2,7 % [41]. Shelnutt et al. bestimmten den Anteil der Glucuronide und Sulfate

über sequentielle Hydrolyse mit  $\beta$ -Glucuronidase und/oder Sulfatase von DAI im Plasma zu 26 bzw. 33 %, den der gemischten Konjugate zu 30 % [126]. Damit beträgt der Anteil des Aglykons ungefähr 11 %, was mit den Ergebnissen von Zhang et al. übereinstimmt [375]. Diese fanden einen Aglykon-Anteil von 18 % nach Gabe von 25 g Sojamilchpulver. Ein möglicher Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse sind große interindividuelle Unterschiede der Aktivität der Phase-II-Enzyme in der Leber und im Darm wegen genetischer Variation und Polymorphismen [376,377].

Die Anteile des DAI-Glucuronids, -Sulfats und des Aglykons machen im Urin in dieser Studie etwa 81, 7 und 2 % aus (siehe Kap. 4.2.2.1). Bei den restlichen 10 % handelt es sich vermutlich um gemischte Konjugate, die durch die Behandlung mit  $\beta$ -Glucuronidase oder Sulfatase allein nicht erfasst werden. Sulfoglucuronide werden durch die Behandlung mit einem der beiden Enzyme nur bis zum Mono-Konjugat gespalten, welches bei der anschließenden Extraktion mit Essigsäureethylester nicht in die organische Phase übergeht und sich so der Analyse entzieht. In anderen Studien wurde ein Anteil von DAI-Glucuroniden (Mono- und Diglucuronid) zwischen 79 und 82 %, von Sulfaten (Mono- und Disulfat) zwischen 4 bis 13 %, von Sulfoglucuroniden zwischen 1 und 14 % und vom Aglykon zwischen 1,5 bis 7 % im Urin gefunden [100,131]. Somit stehen die Ergebnisse dieser Arbeit in guter Übereinstimmung mit der Literatur.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass DAI in Form seines Glucosids besser bioverfügbar ist als in Form des Aglykons. Dies spiegelt sich sowohl in einer höheren AUC und  $C_{\max}$  als auch in einer vermehrten Ausscheidung mit dem Urin wieder. Mögliche Gründe für die bessere Bioverfügbarkeit des Glucosids sind die verringerte Bindung an Nahrungsproteine, die bessere Löslichkeit in der Mucosa sowie der Schutz vor Abbau durch Darmbakterien verglichen mit dem Aglykon. Die Hydrolyse der glycosidischen Bindung ist bei der Aufnahme nicht geschwindigkeitsbestimmend, könnte aber für die tendenzielle Verzögerung von  $t_{\max}$  verantwortlich sein.

### **5.2.2 Bildung der bakteriellen und oxidativen Metabolite von Daidzein**

Sowohl nach Gabe von DAI als auch von DG wurden alle für DAI bekannten bakteriellen Metabolite - Equol, Dihydrodaidzein (DHD) und O-Demethylangolensin (O-DMA) - sowie die monohydroxylierten oxidativen Metabolite - 3'-, 6- und 8-Hydroxydaidzein (3'-, 6- und 8-OH-DAI) - sowohl im Plasma als auch im Urin nachgewiesen. Dihydroxylierte Verbindungen kommen auch nach mehrtägigem Soja-Konsum nur in sehr geringen Mengen im Urin vor [104,120] und konnten deswegen nicht detektiert werden.

Es gibt bisher keine Studie zur Bioverfügbarkeit in der Literatur, in der die oxidativen Metabolite der Isoflavone quantifiziert wurden. Nur wenige bestimmten die bakteriellen Metabo-

lite. Zum Teil liegt es an den fehlenden  $^{13}\text{C}$ -markierten Standards, die im Gegensatz zu anderen internen Standards bei der massenspektrometrischen Analyse zu einer verbesserten Linearität über einen weiten Konzentrationsbereich sowie einer verbesserten Messgenauigkeit und damit verbundenen höheren Empfindlichkeit führen (siehe Kap. 3.2.3.3.4). Darüber hinaus spielen die niedrigen Gehalte in Urin und Plasma eine Rolle, so dass mit der häufig verwendeten UV-Vis-Detektion eine Bestimmung nicht möglich ist.

Zubik & Meydani quantifizierten Equol im Plasma nach Gabe eines Reinsubstanzgemischs der Isoflavone, das die Aglykone bzw. Glucoside enthielt [170]. Sie konnten zeigen, dass erst 4 bis 8 h nach Einnahme der Präparate die Konzentration an Equol im Plasma ansteigt, was in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit steht (siehe Abb. 4.15). Hier wurde 8 h nach Gabe von DAI bzw. DG ein Anstieg der Equol-Konzentration im Plasma beobachtet. Das verzögerte Auftreten wird durch seine vorangehende Bildung durch die Darmflora hervorgerufen (siehe Kap. 1.4.3.1). Zubik & Meydani konnten weiterhin zeigen, dass nach Verabreichung des Glucosid-Präparats signifikant höhere AUC für Equol erhalten werden als nach Gabe der Aglykone [170]. Dies ist in Einklang mit Ergebnissen von Setchell et al., in deren Untersuchung nur nach Einnahme von DG Equol im Plasma der Probanden detektiert werden konnte, nicht aber nach Gabe von DAI [41]. Erklärt wird dieses Phänomen von den Autoren dadurch, dass DAI schon im Dünndarm aufgenommen wird, während DG zur vollständigen hydrolytischen Spaltung in den Dickdarm gelangen muss, so dass hier zusätzlich die Möglichkeit zur Metabolisierung zu Equol durch die Mikroflora besteht. Es sei wieder erwähnt, dass die Studie von Setchell et al. nicht im Cross-Over-Design durchgeführt wurde [41] und dass Zubik & Meydani mit einer wenig empfindlichen Analytik arbeiteten sowie keine Angaben zu der Zahl der „Equol-Produzenten“ machen [170]. In dieser Arbeit wurde eine höhere Plasma-Maximalkonzentration an Equol nach Gabe von DAI beobachtet (siehe Abb. 4.15 und Tab. 4.9). Da nur ein Proband in der Lage war, Equol zu bilden, kann jedoch keine allgemeingültige Aussage gemacht werden, ob bei Verabreichung von DAI im Form seines Aglykons generell vermehrt Equol gebildet wird. Weiterhin kann der zweimonatige Abstand zwischen den zwei Studienphasen eine Rolle spielen. Trotz des Verbots der Einnahme von Antibiotika können andere Faktoren, beispielsweise Stress, unterschiedliche Hygiene, ein verändertes Redoxpotenzial des Darminhalts oder eine unterschiedliche Transitzeit des Darms durch veränderte Ernährungsgewohnheiten, bei diesem Probanden dazu geführt haben, dass seine Fähigkeit, Equol zu bilden, vermindert ist. Auffällig ist, dass die verringerte Equol-Produktion nach Gabe von DG mit einer erhöhten Produktion an DHD und O-DMA einhergeht, was die obige Erklärung stützt. Man kann also nicht davon ausgehen, dass gute „Equol-Produzenten“ keine „O-DMA-Produzenten“ sind, wie von einigen Autoren in der Vergangenheit behauptet wurde [32,168,378]. Slavin et al. und Rowland et al. konnten



diese These ebenfalls widerlegen [55,113]. In dieser Arbeit betrug der Anteil der „Equol-Produzenten“ nur 14 %, was unter dem mit 30 % angegebenen Anteil in den westlichen Industrienationen liegt [55,105]. Allerdings nahmen an dieser Studie nur sieben Probanden teil, so dass kein aussagekräftiger Anteil berechnet werden konnte. In der Studie von Zubik & Meydani betrug die  $C_{max}$  zwischen 200 und 300 nM und bei Setchell et al. zwischen 120 und 360 nM nach 24 h [52,170]. Diese Werte stimmen gut mit denen aus dieser Arbeit überein (80 bis 320 nM nach 12 bis 24 h) (siehe Tab. 4.9). Die frühere  $t_{max}$  von 12 h nach Gabe von DG kann auf die verminderte Equol-Bildungsrate zurückgeführt werden.

Die Quantifizierung von Equol im Urin wurde in mehreren Studien durchgeführt. In Übereinstimmung mit Ergebnissen dieser Arbeit wurde in der Studie von Watanabe et al. der größte Teil an Equol zwischen 12 und 24 h ausgeschieden [59]. Im Gegensatz dazu finden Setchell et al. in zwei Studien Equol vorwiegend nach zwei bis drei Tagen im Urin [50,52]. Die ausgeschiedene Menge an Equol beträgt nach 24 h zwischen 4 und 40  $\mu\text{mol}$  [50,52,59], so dass die Ergebnisse von 5 bzw. 8  $\mu\text{mol}$  aus dieser Arbeit in gutem Einklang mit den Werten aus der Literatur stehen. Da in dieser Arbeit keine weitere Urinsammlung möglich war, wie in Kap. 5.2.1 bereits diskutiert wurde, kann keine Aussage gemacht werden, ob nach 48 h ein zusätzlicher Anteil an Equol ausgeschieden worden ist.

Die Plasmakonzentrationen an Equol betragen für die sechs „Nicht-Equol-Produzenten“ 5,8 bzw. 10,6 nM nach Verabreichung von DAI bzw. DG, wobei sich die Werte nicht signifikant unterscheiden. Adlercreutz et al. bestimmten die Equol-Konzentrationen für omnivore und vegetarische Finninnen zu 0,2 bis 4,2 nM [155,379]. Die etwas höheren Werte aus dieser Arbeit können durch die im Vergleich zu 1993/1994 verbesserte Analytik bedingt sein. Die ausgeschiedene Menge an Equol mit dem Urin der sechs „Nicht-Equol-Produzenten“ über 24 h betrug 84 bzw. 106 nmol, wobei sich die Werte wiederum nicht statistisch signifikant unterscheiden. Auch diese Werte liegen innerhalb der in der Literatur beschriebenen Bandbreite von 33 bis 485 nmol [100,155].

Für einen Vergleich der Plasmakonzentrationen der weiteren bakteriellen sowie der oxidativen Metabolite gibt es keine Literaturangaben. Bei der Bildung der bakteriellen Metabolite DHD und O-DMA fällt auf, dass die Konzentration von DHD bereits nach 6 h, die von O-DMA erst nach 8 h im Plasma ansteigt (siehe Abb. 4.15). Daran ist deutlich zu erkennen, dass die Bildung von O-DMA durch die Mikroflora des Darms über die von DHD läuft (siehe Abb. 1.5). Auch Richelle et al. zeigten, dass DHD erst nach 5 h im Plasma nachweisbar ist [58]. Die maximale Plasmakonzentration von DHD nach Gabe von DG beträgt 0,75  $\mu\text{M}$  (siehe Tab. 4.9) und ist somit höher als die in dieser Arbeit beobachtete  $C_{max}$  von DAI nach Einnahme von DAI. Daher müssen biologische Wirkungen von DHD in Betracht gezogen werden. Bedenkt man zusätzlich, dass DHD durch humane rekombinante UDP-Glucuronyltransferasen des Gastrointestinaltrakts und der Leber *in vitro* zu einem geringeren Umsatz

konjugiert werden [129], ist ein Beitrag von DHD an der biologischen Wirksamkeit der Isoflavone möglich. Im Gegensatz zu Equol liegen für DHD und O-DMA die Konzentrationen nach Gabe von DG über denen nach Verabreichung von DAI. Vermutlich spielt bei der verringerten Bildung von Equol nach Verabreichung von DG eine veränderte Aktivität der Darmflora die entscheidende Rolle (siehe oben). Während die AUC und  $C_{max}$  von DHD und O-DMA jedoch nur um einen Faktor 2 bis 3,5 bzw. 3 bis 5 nach Einnahme von DAI oder DG variieren (siehe Tab. 4.9), beträgt der Unterschied bei DAI das 4,5- bzw. Sechsfache. Daraus kann geschlossen werden, dass auch bei diesen Metaboliten die glycosidische Gruppe das Aglykon zumindest zum Teil vor dem Abbau durch Darmbakterien bewahrt. Wie im Falle von DAI unterschieden sich die  $t_{max}$  für DHD und O-DMA nach Verabreichung von DAI bzw. DG nicht signifikant, so dass die Bildung durch die Darmflora und die Resorption nicht geschwindigkeitsbestimmend sind.

Die Ausscheidung der bakteriellen Metabolite im Urin erfolgt vorwiegend in der Fraktion zwischen 12 und 24 h, also später als die von DAI (siehe Abb. 4.21). Dies kann ebenso, wie das spätere Auftreten im Plasma, mit ihrer vorangehenden Bildung durch die Mikroorganismen des Darms erklärt werden. Die Gesamtmenge an O-DMA im Urin nach 24 h beträgt etwa 1,2 bzw. 2,3  $\mu\text{mol}$  nach Gabe von DAI oder DG, was in Übereinstimmung mit der Studie von Watanabe et al. ist, die nach 24 h ungefähr 1 bis 5  $\mu\text{mol}$  detektieren konnten [59]. Allerdings wurde der Hauptanteil an O-DMA zwischen 24 und 48 h ausgeschieden [59]. Da, wie bereits erwähnt, die Sammlung über weitere Zeiträume nicht möglich war, ist ein direkter Vergleich nicht gegeben. Das spätere Maximum der bakteriellen Metabolite sowohl im Plasma als auch im Urin ist insofern interessant, da verstärkte biologische Aktivitäten bei Personen, die regelmäßig Soja konsumieren, wegen der dadurch erhaltenen konstanten Plasmakonzentrationen zu erwarten sind. Im Vergleich zu DAI konnten für Equol beispielsweise bessere antioxidative Eigenschaften (siehe Kap. 4.3) und eine höhere Bindungsaffinität zu den ER gefunden werden [178]. Equol reduziert im Gegensatz zu DAI die Expression des auf einen estrogenen Stimulus reagierenden Proteins Presenilin 2 (pS2) in vitro [380]. Darüber hinaus kann Equol als Anti-Androgen durch Bindung von  $5\alpha$ -Dihydrotestosteron agieren, was so die Bindung von  $5\alpha$ -Dihydrotestosteron an den Androgenrezeptor verhindert [381].

Bezüglich der Phase-II-Konjugate der bakteriellen Metabolite gibt es nur für O-DMA Vergleichswerte in der Literatur. Adlercreutz et al. konnten nachweisen, dass 97 % als Glucuronid, 2 % als Sulfat und 1 % in freier Form im Urin vorkommt [100]. In dieser Arbeit wurde ein Anteil von 88, 9 bzw. 4 % bestimmt. Aufgrund der interindividuellen Variation und verschiedener analytischer Aufarbeitung ist der Unterschied dieser Werte erklärbar.

Die Plasmaverläufe der oxidativen Metabolite zeichnen sich wie im Falle von DAI durch einen sehr schnellen Anstieg aus. Bereits nach 2 h liegen die Konzentrationen über der Basalkonzentration (siehe Abb. 4.17). Die Isoflavone unterliegen einem First-Pass-Effekt, was bedeutet, dass sie nach der Absorption im Darm direkt über die Pfortader in die Leber transportiert und dort verstoffwechselt werden. So ist es nicht unerwartet, dass bereits 2 h nach Substanzgabe oxidative Metabolite im Plasma detektierbar sind, da die DAI-Konzentrationen im Plasma schon nach 1 h signifikant angestiegen sind. Eine Hydroxylierung bereits im Darm ist ebenfalls denkbar, da Cytochrom P450 abhängige Monooxygenasen (CYP) auch in den Enterozyten lokalisiert sind [382]. Beispielsweise werden CYP 1A1 und 3A4, die beide bei der Hydroxylierung von GEN eine Rolle spielen [121], im Darm exprimiert [382]. Wie bei DAI und den bakteriellen Metaboliten findet man höhere Plasmakonzentrationen nach Gabe von DG (siehe Tab. 4.10), da nach erfolgter Resorption mehr Substrat für CYP vorhanden ist, so dass entsprechend vermehrt oxidative Metabolite gebildet werden können. Die ähnlichen  $t_{\max}$  der oxidativen Metabolite spiegeln die ähnlichen  $t_{\max}$  für DAI wieder. Die Plasmakonzentrationen der oxidativen Metabolite sind allerdings sehr gering im Vergleich zu denen der bakteriellen (siehe Tab. 4.10). Die höchsten werden für 3'-OH-DAI gefunden, gefolgt von 6- und 8-OH-DAI. Im Urin liegt ein unterschiedliches Bild vor: 6-OH-DAI wird im größerem Umfang als 3'- und 8-OH-DAI ausgeschieden (siehe Tab. 4.14). Auch bei Kulling et al. und Heinonen et al. wurde nach mehrtägigem Sojakonsum mehr 6-OH-DAI als 3'- und 8-OH-DAI mit dem Urin exkretiert. Dies wurde allerdings nur über die Verhältnisse der Peakflächen abgeschätzt [104,120]. Darüber hinaus muss zusätzlich berücksichtigt werden, dass in den oben genannten Studien ein Teil von 6-OH-DAI im Urin aus der Demethylierung von GLY stammt [104,120]. Die Verstoffwechslung von GLY erfolgt im Gegensatz zu der von FORM und BCA jedoch nur zu einem geringen Anteil [383,384]. Darüber hinaus fällt auf, dass 24 % der ausgeschiedenen Menge an oxidativen Metaboliten als Sulfat wiedergefunden wird und nur 52 % als Glucuronid (siehe Tab. 4.15). Ein ebenfalls relativ großer Teil von etwa 20 % verbleibt als gemischte Konjugate. Bei den bakteriellen Metaboliten beträgt der Sulfat-Anteil nur 8 %, bei DAI 7 %. Der Anteil der Glucuronide beläuft sich auf 80 bzw. 81 % und der der Aglykone in beiden Fällen auf 2 %, der der gemischten Konjugate liegt somit bei 10 % (siehe Tab. 4.13 und Kap. 4.2.2.1). Bei den endogenen Steroidhormonen beträgt der Sulfat-Anteil im Urin ungefähr 22 % [385,386], was auf eine Ähnlichkeit mit den hydroxylierten Metaboliten von DAI schließen lässt. Da sowohl diphenolische Sulfat-Konjugate als auch Substanzen mit einer Dihydroxylgruppe in ortho- oder para-Stellung eine ausgeprägte Proteinbindung aufweisen [155,387,388,389], liegt die Vermutung nahe, dass die unterschiedliche Menge der oxidativen Metabolite in Plasma und Urin durch eine vermehrte Proteinbindung hervorgerufen wird, so dass sich die Metabolite der quantitativen Analyse entziehen. Darüber hinaus liegen die Molekularge-

wichte der Phase-II-Konjugate (446 g/mol für die Konjugation mit Glucuronsäure bzw. 350 g/mol für die mit Sulfat) in einem Bereich, in dem Substanzen sowohl über die Nieren als auch über die Galle ausgeschieden werden, so dass eine größere Variabilität in der Exkretion mit dem Urin nahe liegt.

Der Anteil der oxidativen Metabolite macht nur etwa 1 % der Gesamtausscheidung im Urin von DAI und seinen Metaboliten aus, wobei beachtet werden muss, dass durch die fehlenden Urinsammelperioden über 24 h hinaus eventuell beträchtliche Mengen in der Bilanz fehlen. Dem bakteriellen Metabolismus kommt dagegen mit ungefähr 25 % des Anteils an der Gesamtmenge eine weitaus größere Bedeutung zu. Allerdings liegt der Anteil unter dem von 40 %, der von Lampe et al. bestimmt wurde [124]. Dies kann neben der nicht abgeschlossenen Ausscheidung von DAI und seinen Metaboliten im Urin durch eine unterschiedliche ausgebildete Darmflora aufgrund der Herkunft und des Alters der Studienteilnehmer (Männer und Frauen, Nord-Amerikaner, 20 bis 40 Jahre) sowie durch Unterschiede im Studiendesign (30 mg DAI und GEN über vier Tage) begründet sein.

Schlussfolgernd kann man sagen, dass nach Gabe von DG mit Ausnahme von Equol vermehrt sowohl oxidative als auch bakterielle Metabolite gebildet werden. Das verzögerte Erscheinen der bakteriellen Metabolite in Plasma und Urin hängt mit ihrer vorangehenden Bildung durch die Darmflora ab. Aufgrund des First-Pass-Effekts der Isoflavone treten die oxidativen Metabolite nur leicht verzögert im Plasma auf. Der bakterielle Metabolismus liefert mit 25 % der Gesamtausscheidung der Isoflavone im Urin einen größeren Beitrag als der oxidative Metabolismus mit nur 1 %.

### **5.2.3 Interindividuelle Variation**

Die interindividuelle Variation der Ausscheidung von DAI mit dem Urin variierte um einen Faktor 2,4 nach Gabe von DAI und 1,6 nach Gabe von DG. Im Falle der bakteriellen Metabolite lag sie für DHD bei einem Faktor von 200 bzw. 320, für O-DMA von 65 bzw. 12 und für Equol bei 360 bzw. 225 unter Einbeziehung aller Probanden. Bei den oxidativen Metaboliten betrug sie für 3'-OH-DAI einen Faktor 70 nach Verabreichung von DAI und 55 nach Gabe von DG, für 6-OH-DAI 35 bzw. 10 und für 8-OH-DAI 13 bzw. 12. Die Gesamtausscheidung der oxidativen Metabolite variierte um einen Faktor 25 nach Verabreichung beider Präparate. Die große Variabilität bei der Ausscheidung der bakteriellen Metabolite und der geringen bei der von DAI wird in anderen Studien bestätigt. Kelly et al. beobachteten einen Unterschied in der exkretierten Menge von einem Faktor 4 für DAI, 17 für O-DMA und 922 für Equol [97]. Rowland et al. fanden eine 66-, 76- bzw. zweifache Variabilität in der Ausscheidung von Equol, O-DMA und DAI [106] und Lampe et al. eine 922-, 13000- bzw. 50-fache [124]. Bei Karr et al. variierte die Exkretion mit dem Urin von DAI um einen Faktor 15 und von O-DMA um 180 [147]. Da die oxidativen Metabolite bisher nicht quantifi-

ziert wurden, ist für sie kein Vergleich möglich. Die geringe Variation bei der Ausscheidung von DAI im Urin in dieser Arbeit deutet auf ein homogenes Probandenkollektiv hin.

Berechnet man die interindividuelle Variation der Bioverfügbarkeit anhand der AUC, so erhält man für DAI einen Faktor von 3,2 nach Gabe von DAI und 1,6 nach Gabe von DG. Für DHD findet man einen Faktor von 90 bzw. 240, für O-DMA einen von 55 bzw. 10. Bei den oxidativen Metaboliten beträgt der Faktor 11 bzw. 5 für 3'-OH-DAI, 7 bzw. 4 für 6-OH-DAI und in beiden Fällen 4 für 8-OH-DAI. Daraus kann geschlossen werden, dass für die bakteriellen Metabolite die interindividuelle Variation über die gesamte Biokinetik (Resorption, Verteilung, Metabolisierung durch die Leber, Ausscheidung) erhalten bleibt. Das bedeutet, dass die Bildung der bakteriellen Metabolite durch die Mikroflora des Darms für die Unterschiede in den Plasma- und Urinkonzentrationen verantwortlich ist (siehe Kap. 1.5). Bei den oxidativen Metaboliten scheinen andere Mechanismen eine Rolle zu spielen, da die interindividuelle Variation bei der AUC kleiner ist als die bei der Exkretion mit dem Urin. Vermutlich fallen Unterschiede in der Expression renaler bzw. biliärer Transporter mehr bei der Variabilität ins Gewicht als die Bildung der oxidativen Metabolite durch CYP des Darms und der Leber. Darüber hinaus liegen die Molekulargewichte der Phase-II-Konjugate in einem Bereich, in dem Substanzen sowohl über die Nieren als auch über die Galle ausgeschieden werden (siehe Kap. 5.2.2), so dass eine größere Variabilität in der Exkretion mit dem Urin nahe liegt. Weiterhin kann die Verteilung in Geweben, vor allem der Aglykone und der Sulfat-Konjugate, eine Rolle spielen. Für Estrogen-Sulfate, z.B. Estron-Sulfat, wird postuliert, dass sie intrazellulär, z.B. im Brustgewebe, ein Depot für freie Estrogene bilden [390,391,392,393].

Schlussfolgernd kann man sagen, dass die interindividuelle Variation bei der Bildung der bakteriellen Metabolite eine größere Rolle spielt als bei der der oxidativen Metabolite. Die großen Unterschiede bei der Ausscheidung im Urin und bei den Plasmakonzentrationen führten dazu, dass teilweise keine signifikanten Unterschiede bei den biokinetischen Kennwerten oder der Ausscheidung im Urin nachgewiesen werden konnten. Für die einzelnen Probanden findet man mit Ausnahme von Equol immer höhere Werte nach Gabe von DG als nach Gabe von DAI (siehe Kap. 4.2.1.2 und 4.2.2.2).

#### **5.2.4 Bestimmung der Konzentration der Isoflavone in den PBMC**

Da die Ergebnisse zur Aufnahme von Isoflavonen in humane PBMC auf eine Anreicherung der Isoflavone in vitro schließen ließen (siehe Kap. 4.1.4), wurde die Konzentration an DAI in den PBMC der Probanden bestimmt. Es sollte festgestellt werden, ob auch in vivo eine Akkumulation in Zellarten erfolgt, die nach Aufnahme von Isoflavonen ständig in Kontakt mit den Verbindungen aus dem Plasma stehen. Als gut zugängliche und leicht isolierbare Zellart wurden die PBMC gewählt.

Es gibt bisher noch keine Studien in der Literatur, die die Konzentration der Isoflavone in den PBMC in vivo quantifizierten. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Konzentration an DAI sowohl nach Gabe von DAI als auch von DG in den PBMC nach 2 h ansteigt (siehe Abb. 4.25). Dies ist im Vergleich zum Anstieg der Plasmakonzentration leicht verzögert. Man findet ähnlich wie im Plasma einen biphasischen Verlauf mit einem Maximum nach 3 h und einem nach 6 bis 8 h. Auffällig ist, dass die Maximalkonzentrationen in den PBMC nach Verabreichung von DAI und DG trotz der signifikant unterschiedlichen Plasmakonzentrationen ähnlich sind. Sie betragen 2,7 bzw. 2,3  $\mu\text{M}$  (siehe Abb. 4.25). Des Weiteren entsprechen die Verläufe der PBMC-Konzentrationen nicht immer denen der Plasmakonzentrationen. Sechs Stunden nach Gabe von DAI findet man die  $C_{\text{max}}$  in den PBMC, nach 8 h im Plasma. Etwa zum Zeitpunkt der  $t_{\text{max}}$  kommt es in den Zellen im Vergleich zur  $C_{\text{max}}$  im Plasma zu einer Anreicherung. Im Falle der Einnahme von DG findet man zum Zeitpunkt des zweiten Maximums nach 8 h in den PBMC keine Anreicherung (2,56 versus 0,94  $\mu\text{M}$ ), zu dem des ersten Maximums nach 3 h hingegen schon (1,05 versus 2,32  $\mu\text{M}$ ). Folglich müssen der Aufnahme in den Darm und in die PBMC unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen. Es muss berücksichtigt werden, dass Isoflavone im Plasma zu mehr als 90 % mit Glucuronsäure bzw. Sulfat konjugiert vorliegen, so dass eine passive Diffusion der Konjugate aufgrund ihrer Hydrophilie in die Zellen nicht möglich ist und eine Anreicherung aufgrund ihrer kleinen Verteilungsvolumina unwahrscheinlich erscheint [394]. Referenzsubstanzen werden benötigt, um die Aufnahme der Konjugate in Körperzellen zu untersuchen. Dabei stellt sich die Frage, ob die Konjugate aktiv in die Zellen transportiert werden, oder ob nur der kleine Anteil der Aglykone passiv aufgenommen werden kann. Letzteres würde bedeuten, dass es zu einer großen Akkumulation kommt, da der Aglykon-Anteil im Plasma durchschnittlich nur 3 % beträgt (siehe Kap. 4.2.1.1). Für Quercetin-7- und -3-Glucuronid konnte gezeigt werden, dass diese in HepG2-Zellen - humanen Leberkrebszellen - aufgenommen und metabolisiert werden [93]. Die Konzentration der Konjugate in den Zellen wurde allerdings nicht bestimmt. Darüber hinaus muss der aktive Transport aus den PBMC zurück in das Plasma berücksichtigt werden (siehe Kap. 4.1.6). Die ähnlichen Konzentrationen in den PBMC nach Gabe von DAI und DG trotz der unterschiedlichen  $C_{\text{max}}$  im Plasma deuten daraufhin, dass ein sehr effektiver Efflux aus den Zellen besteht. Weiterhin können die Bindungsstellen in den Zellen für die Isoflavone, beispielsweise Proteine, gesättigt sein, so dass keine weiteren Isoflavone mehr aufgenommen, bzw. sofort heraustransportiert werden. Eine Bindung an Zellbestandteile wird dadurch bestätigt, dass zur effektiven Extraktion der Isoflavone aus den PBMC eine Behandlung mit  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase durchgeführt werden musste. Die Aktivität der  $\beta$ -Glucuronidase ist allerdings nicht nur auf die Spaltung von Glucuroniden beschränkt, es wird u.a. auch eine Spaltung von Glucosiden beobachtet [74,395].

Vergleicht man die absoluten Konzentrationen im Plasma und in den PBMC, so findet man eine bis zu fünffach höhere Konzentration in den Zellen. Allerdings konnte in vitro erst ab einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  DAI bzw. ab einer 60-minütigen Inkubationsdauer mit 5  $\mu\text{M}$  DAI eine Anreicherung in humanen PBMC beobachtet werden (siehe Tab. 4.5 und Abb. 4.6). Auch in vivo wurde eine Akkumulation erst nach etwa 3 h beobachtet (siehe Abb. 4.25). In der Literatur werden ähnliche Konzentrationen an DAI und Equol im Brustgewebe nach fünftägiger Intervention mit 152 mg Isoflavonen, ungefähr fünffach höhere Konzentrationen im Brustdrüsensekret nach 14-tägiger Gabe von 45 mg Isoflavonen und etwa doppelt so hohe Konzentrationen in der Prostataflüssigkeit bei Chinesen, Portugiesen und Briten gefunden [142,143,144].

Schlussfolgernd ist festzuhalten, dass die Isoflavon-Supplementierung zu einer Anreicherung in bestimmten Zellarten führt, dass aber die Mechanismen und die aufgenommene Menge näher bestimmt werden müssen.

### **5.2.5 Zusammenhang zwischen dem Transport der Nahrungsfette und dem der Isoflavone**

Nach ihrer Aufnahme werden Nahrungsfette zunächst durch das Einwirken der Lipase in Fettsäuren und 2-Monoacylglyceride gespalten. Entscheidend für die Aufnahme der Hydrolyseprodukte ist die Überführung der wenig löslichen langkettigen Fettsäuren und Monoacylglyceride in eine stabile Emulsion im wässrigen Darminhalt. Hierzu werden sie mit konjugierten Gallensäuren und Proteinen zu so genannten gemischten Micellen emulgiert, wobei die hydrophoben Reste nach innen zeigen. Die Micellen dienen als Transportvehikel und dissoziieren unmittelbar nach Kontakt mit einer Darmepithelzelle. Die freien Fettsäuren und Monoacylglyceride können nun passiv bzw. auch Transporter-vermittelt resorbiert werden. Nach nicht-kovalenter Bindung an Fettsäure-bindende Proteine erfolgt die erneute Veresterung am glatten endoplasmatischen Retikulum der Darmepithelzelle und die Inkorporierung in Chylomikronen, wobei die mit den Chylomikronen assoziierten Proteinkomponenten der Komplexierung der Lipide und der Erkennung von Rezeptoren dienen. Die Chylomikronen gelangen durch Exocytose in die Lymphgefäße und von dort in die Zirkulation. Der postprandiale Triglycerid-Anstieg bis etwa 5 h nach Nahrungsaufnahme spiegelt sich in der Menge an Chylomikronen wieder [396,397,398].

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Transport der Nahrungsfette und dem der Isoflavone zu untersuchen, wurden die AUC der Isoflavone und der Triglyceride über den Zeitraum von 6 h berechnet. Bei den Isoflavonen wird für die Mehrzahl der Probanden ein ausgeprägter biphasischer Verlauf der Plasmakonzentrationen mit einem ersten Maximum nach ungefähr 3 h beobachtet (siehe Abb. 4.13). Der Konzentrationsverlauf der Triglyceride weist ebenfalls ein Maximum nach ungefähr 3 h auf (siehe Abb. 4.27), welches

durch die Einnahme eines standardisierten Frühstücks nach der Präparataufnahme hervorgerufen wird. Daher liegt die Vermutung nahe, dass ein Zusammenhang zwischen den AUC besteht und somit ähnliche Mechanismen bei der Aufnahme eine Rolle spielen. Mit Hilfe der durchgeführten Korrelationen nach *Pearson* konnte gezeigt werden, dass sowohl nach Gabe von DAI als auch der von DG ein linearer Zusammenhang zwischen den AUC besteht (siehe Abb. 4.28).

Hydrophobe Fremdstoffe, beispielsweise Carotinoide, werden ebenfalls nach erfolgter Resorption in Chylomikronen verpackt und transportiert [399]. Bei den Isoflavonen wird postuliert, dass der biphasische Verlauf der Plasmakonzentrationen durch den enterohepatischen Kreislauf der Substanzen, bzw. durch eine Resorption im Colon mit vorangehender geringer Resorption im Magen-Duodenum-Jejunum-Bereich hervorgerufen wird. Da es sich bei Isoflavonen aber ebenso nach Abspaltung des Zuckerrests um lipophile Stoffe handelt, kann vermutet werden, dass der Transport zur Leber ähnlichen Mechanismen wie bei anderen lipophilen Stoffen unterliegt. Um die Beteiligung der Lipoproteine am Transport der Isoflavone direkt nachweisen zu können, müssten die einzelnen Lipoproteinfraktionen auf deren Isoflavongehalt untersucht werden, wozu es aber bisher noch keine Daten in der Literatur gibt.



### **5.3 Antioxidative Eigenschaften der Isoflavone und ihrer Metabolite**

Zur Untersuchung der antioxidativen Eigenschaften gibt es viele Testmethoden, die unterschiedliche Endpunkte erfassen [322,400]. Der Einsatz verschiedener Methoden ermöglicht daher eine bessere Abschätzung des antioxidativen Potenzials einer Verbindung. In den zahlreichen bekannten Studien zur antioxidativen Kapazität von Isoflavonen *in vitro* wurden jedoch oft lediglich die natürlich vorkommenden Verbindungen, v.a. GEN und DAI, untersucht. Nicht berücksichtigt wurden meistens die oxidativen und bakteriellen Metabolite. Denkbar ist jedoch, dass sie durch ihre zum Teil hohen Konzentrationen im Plasma (siehe Kap. 4.2.1.2) zur antioxidativen Wirkung der Isoflavone beitragen. Neben der Gegenüberstellung der antioxidativen Kapazitäten der natürlich vorkommenden Isoflavone und ihrer Metabolite mit unterschiedlichen Testmethoden war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die antioxidative Wirksamkeit des Plasmas zu untersuchen, wenn Isoflavone und ihre Metabolite in physiologischen Konzentrationen vorliegen.

#### **5.3.1 Verwendete Testmethoden**

Zur Untersuchung der antioxidativen Kapazität kamen der ORAC-Test und die Lipidperoxidation sowohl mit der Bestimmung der gebildeten konjugierten Dien-Strukturen als auch der von Aldehyden, den Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS), zum Einsatz. In allen drei Testmethoden zeigten die Isoflavone zum Teil ein sehr großes antioxidatives Potenzial, das mit den bekannten Antioxidantien QUER und Ascorbinsäure (ASC) vergleichbar oder sogar größer ist. Aufgrund der unterschiedlichen verwendeten Testmethoden wurden zum Teil geringe Abweichungen in den Wirkungsreihen gefunden (siehe Tab. 4.16), auf die in Kap. 5.3.2 näher eingegangen wird.

Beim ORAC-Test wird die Fähigkeit einer Substanz bestimmt, die Oxidation eines Substrats - in diesem Fall des Proteins R-Phycoerythrin - zu verzögern oder zu verhindern, wenn die als Antioxidanz wirkende Verbindung in wesentlich niedrigeren Konzentrationen als das Substrat vorliegt. Als Oxidanz dienen Peroxylradikale [321,322]. Der ORAC-Test hat gegenüber anderen Methoden, beispielsweise dem Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) -Test oder dem Ferric Reducing Ability of Plasma bzw. Ferric Reducing/Antioxidant Power (FRAP) -Test, den Vorteil, dass durch die Bestimmung der AUC (Fläche unter der Kurve) sowohl die Dauer als auch das Ausmaß der Verzögerung der Oxidation erfasst werden. Trolox, ein Vitamin-E-Analog, dient als Vergleichs-Antioxidanz. Pro Molekül Trolox werden zwei Moleküle Peroxylradikale abgefangen [321,400]. Für die Bestimmung der antioxidativen Kapazität der Isoflavone wurde bisher der ORAC-Test nicht eingesetzt.

Die Oxidation der LDL bei der Lipidperoxidation kann auf drei Arten verzögert bzw. inhibiert werden: Antioxidativ wirksame Substanzen können einerseits Lipidperoxyradikale abfangen, andererseits Metallionen komplexieren sowie durch Proteinbindung an Apolipoprotein B oxidative Reaktionen verhindern (siehe Kap. 1.6.2) [212,213,324,325,401]. In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Endpunkte der Lipidperoxidation bestimmt, die Hemmung der Bildung von konjugierten Doppelbindungen in PUFA und die der TBARS. Im Unterschied zum ORAC-Test wird bei dieser Methode die Wirkung fettlöslicher Antioxidantien erfasst, da LDL vorwiegend aus lipophilen Verbindungen bestehen (78 % Phospholipide, Lipide und Cholesterin) [402]. Eine weitere Möglichkeit, die antioxidative Kapazität hydrophober Substanzen zu testen, sind Methoden in wässriger Phase, die Cyclodextrine zur Verbesserung der Löslichkeit der Testverbindungen verwenden. Die Bestimmung der Oxidation von Lipiden besitzt jedoch in der Pathophysiologie der Arteriosklerose Relevanz und wurde daher in dieser Arbeit eingesetzt [324,403].

Insgesamt kann man sagen, dass mit den verwendeten Testmethoden sowohl die antioxidativen Eigenschaften in lipophiler als auch hydrophiler Umgebung untersucht wurden. Als Oxidanz dienen in beiden Fällen Peroxyradikale, die zu den bedeutendsten Radikalen in biologischen Systemen zählen [404] und etwas weniger reaktiv als Hydroxylradikale sind. Ihre Lebensdauer liegt im Sekunden-, die der Hydroxylradikale dagegen im Nanosekunden-Bereich [405]. Bei der  $\text{Cu}^{2+}$ -induzierten Lipidperoxidation werden neben den Elektronen-gebenden Eigenschaften der Testsubstanzen die komplexbildende Wirkung und das Potenzial zur Verhinderung von Oxidationen durch Bindung an Proteine bestimmt.

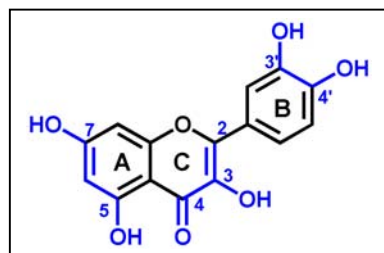
### **5.3.2 Vergleich der antioxidativen Kapazität der Isoflavone und ihrer Metabolite in vitro**

Für die bei der antioxidativen Wirkung der Isoflavone und ihrer Metabolite wichtigen Strukturmerkmale lassen sich mit einigen Ausnahmen die bereits in Kap. 1.6.2 vorgestellten allgemeinen Aussagen treffen (siehe Abb. 4.30, 4.32 und 4.34): Die Einführung zusätzlicher Hydroxylgruppen führt bei den Verbindungen 6-, 3'- und 8-OH-DAI sowie 3'-OH-GEN im Vergleich zu den Ausgangssubstanzen DAI und GEN zu einer Erhöhung der antioxidativen Kapazität. Eine Methylierung, wie sie bei FORM und BCA an der Hydroxylgruppe am C-4', bei GLY an der am C-6 und bei PRU an der am C-7 vorliegt, verringert die antioxidative Wirkung zum Teil drastisch. Durch die Maskierung der Hydroxylgruppe am C-4' und C-6 tritt ein größerer Verlust der antioxidativen Kapazität auf als durch die am C-7. Die Reduktion des Isoflavongerüsts zu DHD und O-DMA bzw. Dihydrogenistein (DHG) und 6'-Hydroxy-O-demethylangolensin (6'-OH-ODMA) hat keinen signifikanten Effekt auf das antioxidative Potenzial. Eine Ausnahme ist Equol, das trotz fehlender Doppelbindung in 2,3-Position und fehlender 4-Oxo-Gruppe eine höhere antioxidative Wirkung als DAI aufweist. Seine

antioxidative Kapazität ist mit der der hydroxylierten Metabolite von GEN und DAI vergleichbar.

Die Wirkungsreihen der untersuchten Substanzen stimmen mit denen anderer Studien, sofern die gleichen Verbindungen untersucht wurden, gut überein. Dabei wurden sowohl unterschiedliche Testmethoden, beispielsweise der TEAC- und FRAP-Test oder die Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie mit Spin-Trapping, als auch gleiche, wie die Dien-Methode bei der Lipidperoxidation, eingesetzt [205,206,207,208,214,406,407,408]. Es wurde ebenfalls beobachtet, dass die Methylierung an der Hydroxylgruppe am C-4' das antioxidative Potenzial gegenüber den demethylierten Verbindungen reduziert [205,206,207,406,407]. Des Weiteren führte die Konjugation mit Glucose bzw. Sulfat an der Hydroxylgruppe am C-7 zu einer Verringerung der antioxidativen Wirkung [206,207,214,406,408]. In dieser Arbeit wurde PRU als Beispielsubstanz einer in C-7-Position konjugierten Verbindung verwendet. Dieses wurde anstelle der Glucose-Konjugate von DAI oder GEN eingesetzt, da die Lipophilie, die für die Bestimmung der antioxidativen Kapazität bei der Lipidperoxidation nötig ist, durch die Methylierung anstelle der Konjugation mit Glucose oder auch Sulfat erhalten bleibt. Bei der Untersuchung von Equol konnte ebenfalls in der Vergangenheit gezeigt werden, dass dieses eine größere antioxidative Wirkung aufweist als DAI und GEN [205,206,207,409]. Weitere getestete bakterielle Metabolite - DHD, DHG und O-DMA - zeigten in Übereinstimmung mit Ergebnissen aus dieser Arbeit eine ähnliche antioxidative Kapazität wie die Ausgangssubstanzen [206,207,409]. Nur Rimbach et al. prüften die Wirkung eines oxidativen Metabolits von DAI, nämlich 8-OH-DAI. Im Einklang mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit wurde gefunden, dass die Einführung zusätzlicher Hydroxylgruppen zu einer verbesserten antioxidativen Kapazität führt [207,409].

Auffällig ist, dass 3'-OH-DAI im ORAC-Test eine signifikant geringere antioxidative Wirkung als DAI, GEN und die anderen oxidativen Metabolite von DAI aufweist. Einen möglichen Erklärungsansatz liefern Bors et al., die die Strukturmerkmale beschrieben haben, die für die Ausübung der Elektronen- bzw. Wasserstoffatom-gebenden Eigenschaften von Flavonoiden wichtig sind [410].



**Abb. 5.2:** Strukturmerkmale (blau gekennzeichnet), die für die ausgeprägten Elektronen-gebenden Eigenschaften bei Flavonoiden wichtig sind [410].

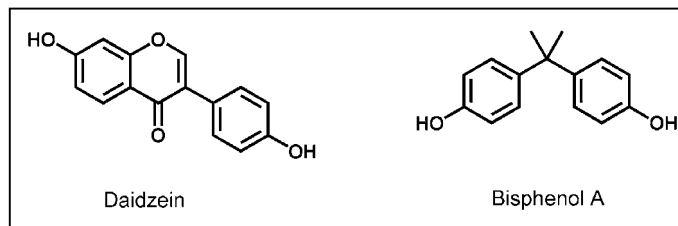
Dazu gehören die 2,3-Doppelbindung in Verbindung mit der 4-Oxo-Gruppe und der 3-Hydroxylgruppe im C-Ring, die 5,7-Dihydroxyl-Struktur im A-Ring und die ortho-Dihydroxyl-Struktur im B-Ring (siehe Abb. 5.2). Bei den Isoflavonen trägt anstelle der Hydroxylgruppe am C-3 der Phenolring zu einer erweiterten Delokalisierung der Elektronen bei.

Vergleicht man nun die antioxidativen Kapazitäten und die Strukturen von GEN sowie 3', 6- und 8-OH-DAI, so fällt auf, dass GEN die von Bors et al. beschriebene 5,7-Dihydroxyl-Struktur im A-Ring und 3'-OH-DAI die ortho-Dihydroxyl-Struktur im B-Ring aufweist, während 6- und 8-OH-DAI eine catecholische Struktur im A-Ring besitzen. Offensichtlich liefern im Falle der Isoflavone eine 5,7-Dihydroxyl- bzw. eine ortho-Dihydroxyl-Struktur im A-Ring einen größeren Beitrag zur antioxidativen Wirkung als eine catecholische Struktur im B-Ring. Warum allerdings 3'-OH-DAI eine signifikant niedrigere antioxidative Kapazität besitzt als DAI, bleibt unklar. Möglicherweise zeigt 3'-OH-DAI einen geringeren hydrophilen Charakter als DAI, so dass in der wässrigen Umgebung des ORAC-Tests seine Fähigkeit, Peroxylradikale abzufangen, verringert ist. Bei der Verhinderung der Bildung von konjugierten Doppelbindungen und der der TBARS bei der Lipidperoxidation hingegen, die im lipophilen Milieu stattfinden, zeigt 3'-OH-DAI eine ähnliche bzw. sogar bessere antioxidative Wirkung als 6- und 8-OH-DAI.

Bei der Dien-Methode der Lipidperoxidation fällt auf, dass GLY eine mit seinem Demethylierungsprodukt 6-OH-DAI vergleichbare antioxidative Wirkung aufweist. Dies kann mit der verbesserten Löslichkeit auf der lipophilen Oberfläche der LDL aufgrund der Methoxygruppe am C-6 zusammenhängen. Auch die Ergebnisse zur zellulären Aufnahme deuten daraufhin, dass GLY aufgrund seiner Lipophilie gut in hydrophoben Medien angereichert werden kann (siehe Kap. 5.1.2). Arora et al. konnten zeigen, dass die Integration der Isoflavone in die Membran zu einer Fluiditätsabnahme und damit verbundener geringerer Suszeptibilität gegenüber der Oxidation von Radikalen führt [337]. Die antioxidativen Wirkungen von beispielsweise Tamoxifen, 17 $\beta$ -Estradiol oder  $\alpha$ -Tocopherol beruhen u.a. auf dieser Eigenschaft [411,412].

Des Weiteren ist die signifikant niedrigere antioxidative Kapazität von DAI verglichen mit den bakteriellen Metaboliten DHD und O-DMA auffällig. Hier ist im Gegenzug eine schlechte Löslichkeit auf der lipophilen Oberfläche der LDL denkbar. Ein weiterer Erklärungsansatz ist die im Vergleich zu DHD und O-DMA starrere Struktur von DAI aufgrund der 2,3-Doppelbindung im C-Ring, so dass DAI schlechter in die LDL penetrieren kann. DAI ist gegenüber Bisphenol A, einem Xenoestrogen (siehe Abb. 5.3), in Fett zehnfach schlechter löslich, was anhand der Fett:Blut-Verteilungskoeffizienten bestimmt wurde [141]. Vergleiche der Fettlöslichkeit von Isoflavonen untereinander gibt es bisher nicht. Darüber hinaus muss berücksichtigt werden, dass bei der Lipidperoxidation neben der Radikal-fan-

genden Wirkung, bei der DAI im ORAC-Test eine mittlere Wirksamkeit zeigt, sowohl die komplexbildenden Eigenschaften mit Metallionen als auch die Protein-bindenden mit Apolipoprotein B eine Rolle spielen. Da die einzelnen Mechanismen bisher noch nicht getrennt untersucht wurden, kann an dieser Stelle nur spekuliert werden: Bisher wurde lediglich für GEN die Komplexbildung von  $\text{Fe}^{2+}$ - und  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen bestimmt [413,414]. Da für eine effektive Komplexbildung zumindest bei den Flavonoiden zwei Substituenten in ortho-Stellung nötig sind, z.B. eine 3',4'-Dihydroxyl-Struktur im B-Ring, eine 3-Hydroxyl-4-Carbonyl-Gruppe im C-Ring oder eine 5-Hydroxyl-4-Carbonyl-Gruppe im B- und C-Ring [415], und weil DAI im Gegensatz zu GEN keine dieser Strukturmerkmale aufweist, ist denkbar, dass die komplexbildende Wirkung für DAI bei der Verhinderung der Lipidperoxidation eine untergeordnete Rolle spielt. DAI zeigt jedoch eine ausgeprägte Proteinbindung: Es liegt *in vitro* zu etwa 80 % an Proteine gebunden vor [141,340]. Somit scheint für DAI nur der Schutzeffekt auf Apolipoprotein B für die Ausübung antioxidativer Eigenschaften von Bedeutung zu sein. Diese zwei letzten Mechanismen könnten bei der großen antioxidativen Kapazität von 3'-OH-DAI eine Rolle spielen. Allerdings gibt es keine Untersuchungen, die eine gute Wirksamkeit gegenüber den beiden zuletzt genannten Wirkmechanismen belegen.



**Abb. 5.3:** Vergleich der Strukturen von DAI und Bisphenol A.

Bei der Verhinderung der Bildung von TBARS im Zuge der Lipidperoxidation fallen die im Vergleich zur Hemmung der Bildung der Dien-Strukturen niedrigeren Konzentrationen auf, die nötig sind, die Lag-Zeit um 50 % zu verlängern (siehe Abb. 4.32 und 4.34). Da bei dieser Testmethode zunächst die Oxidation der PUFA auf der lipophilen Oberfläche der LDL gehemmt wird, müssen bei der Ausübung der antioxidativen Wirkung der Isoflavone zusätzliche Reaktionen, die zur Bildung der TBARS führen, eine Rolle spielen. Denkbar ist beispielsweise eine Inhibierung der Bildung von Malondialdehyd aus Peroxylradikalen mit konjugierten Doppelbindungen, da es sich hierbei um radikalische Prozesse handelt [330]. Somit scheinen die Elektronen- bzw. Wasserstoffatom-gebenden Eigenschaften der Isoflavone stärker ausgeprägt zu sein als die Bildung von Metallionen-Komplexen und Bindung an Proteine zum Schutz vor oxidativen Reaktionen. Weitere Untersuchungen müssen jedoch folgen, um die antioxidativen Eigenschaften der Isoflavone und ihrer Metabolite besser verstehen zu können.

Weiterhin fällt auf, dass bei der Dien- und TBARS-Methode praktisch keine signifikanten Unterschiede mit der Varianzanalyse ANOVA aufgezeigt werden konnten. Probleme bereiten sicherlich die großen Unsicherheiten, die zu diesem Ergebnis führen. Vermutlich trägt die interindividuelle Variation der Oxidationssuszeptibilität der LDL von Spender zu Spender in Abhängigkeit von u.a. den Ernährungsgewohnheiten dazu bei. Die Verwendung der LDL nur eines Spenders würde hier Abhilfe schaffen. Da aber für die Isolierung der LDL jeweils eine Blutentnahme nötig ist, ist dieses nicht zumutbar.

Equol besitzt trotz der fehlenden 2,3-Doppelbindung in Verbindung mit der 4-Oxo-Gruppe, die für eine gute antioxidative Wirkung nach Bors et al. wichtig ist [410], eine vergleichbar hohe antioxidative Kapazität. Eine mögliche Erklärung ist, dass durch die nicht-planare Struktur dem Molekül größere Flexibilität verliehen wird, so dass es leichter in Lipid- oder Proteinsysteme penetrieren und dort vor oxidativer Schädigung schützen kann. Ein anderer Grund ist der Beitrag der Hydroxylgruppen in 7- und 4'-Position an den entgegengesetzten Enden des Moleküls zum antioxidativen Potenzial. Dies wurde bereits für die 3,3'-Position der Estrogene, z.B. bei 17 $\beta$ -Estradiol, gezeigt [416,417].

Im ORAC-Test weist ASC die schwächste antioxidative Wirkung auf, während es bei der Lipidperoxidation eine mit QUER, Equol und den oxidativen Metaboliten vergleichbare Kapazität zeigt. Allgemein gilt, dass ASC ein guter Elektronendonator ist [321,418,419], so dass die Radikal-fangenden Eigenschaften der Isoflavone im ORAC-Test die der von ASC deutlich übersteigen. Bei der Lipidperoxidation hingegen kann ASC die LDL zusätzlich vor Oxidation schützen, in dem es die in den LDL vorkommenden Antioxidantien, v.a.  $\alpha$ -Tocopherol, wieder in den Ausgangszustand reduziert, damit regeneriert und so die Lag-Zeit verlängert [418]. Darüber hinaus kann das Oxidationsprodukt von ASC, die Dehydroascorbinsäure, an Apolipoprotein B binden, was die LDL unempfindlicher gegen Oxidation macht [401].

Mögliche reduzierende Eigenschaften der Isoflavone, die ebenfalls einen Beitrag zur antioxidativen Wirkung liefern können, wurden mittels des FRAP-Tests von Mitchell et al. und Rimbach et al. untersucht [205,409]. Beide Gruppen konnten eine sehr geringe Fe<sup>3+</sup>-reduzierende Wirkung der Isoflavone im Vergleich zu Flavonoiden sowie zu ihren Radikal-fangenden Wirkungen feststellen. Daher kann geschlossen werden, dass die antioxidative Wirkungen der Isoflavone sowohl auf der Abgabe von Elektronen bzw. Wasserstoffatomen als auch der Bindung an Proteine zur Verhinderung von Oxidationsreaktionen bzw. der Bildung von Metallionen-Komplexen beruht.

### 5.3.3 Antioxidative Wirkung in vivo

Um zu untersuchen, inwieweit ein Zusammenhang zwischen antioxidativer Kapazität und hohen Isoflavonkonzentrationen im Plasma besteht, wurde die antioxidative Wirkung des Plasmas aus der Humanstudie mit dem ORAC-Test untersucht. Das antioxidative Potenzial in vivo ist insofern von Bedeutung, da es möglicherweise bei der Prävention von koronaren Herzerkrankungen sowie von Brust-, Prostata- und Darmkrebs eine Rolle spielt (siehe Kap. 1.6) [420,421]. Die durchgeführten Korrelationen nach *Pearson* konnten nach Abgleich mit den im Plasma vorhandenen Antioxidantien, den Carotinoiden,  $\alpha$ -Tocopherol und ASC, keinen Zusammenhang zwischen einer verbesserten antioxidativen Kapazität des Plasma und hohen Isoflavonkonzentrationen aufzeigen (siehe Kap. 4.3.4).

Es gibt bisher keine Studien, die das antioxidative Potenzial von Phytoestrogenen nach Einmalgabe untersuchen. Für Flavonoide konnte nach einmaliger Aufnahme u.a. von Rotwein, grünem und schwarzem Tee, Schokolade bzw. Blaubeeren eine erhöhte antioxidative Kapazität des Plasmas zum Zeitpunkt der Plasma-Maximalkonzentrationen der antioxidativ wirksamen Verbindungen beobachtet werden [422,423,424,425]. Der fehlende Nachweis antioxidativer Wirkung in dieser Arbeit kann durch die Verabreichung unterschiedlicher Präparate bedingt sein: In dieser Arbeit wurde die Reinsubstanz in einer Weichgelenkapsel gegeben, während in den oben erwähnten Studien jeweils die Verbindungen im natürlichen Verband der Lebensmittel verabreicht wurden. Antioxidative Effekte anderer im Lebensmittel enthaltenen Substanzen können so nicht ausgeschlossen werden.

Bei der fehlenden antioxidativen Wirkung der Isoflavone in vivo nach Einmalgabe muss berücksichtigt werden, dass die Konzentrationen, die nötig sind, um in den in vitro-Testmethoden Effekte hervorzurufen, größer als die physiologischen sein können. Für eine Abschätzung des Verhältnisses der physiologischen Plasmakonzentrationen mit der im ORAC-Test eingesetzten Konzentration müssen die Plasmakonzentrationen an ASC herangezogen werden, da die von QUER in dieser Arbeit nicht bestimmt wurden. Die mittlere Plasmakonzentration an ASC betrug in dieser Studie  $89,1 \pm 22,9 \mu\text{M}$ . 3'-OH-GEN ist im ORAC-Test Faktor 16, 3'-OH-DAI, DAI und GEN Faktor 10 besser antioxidativ wirksam als ASC, was bedeutet, dass 3'-OH-GEN eine Konzentration von  $5,6 \mu\text{M}$ , 3'-OH-DAI, DAI und GEN eine von  $8,9 \mu\text{M}$  im Plasma erreichen müssten, um eine ähnliche antioxidative Wirksamkeit wie ASC auszuüben. Die mittleren physiologischen Konzentrationen im Plasma betragen in dieser Studie maximal  $55 \text{ nM}$  für 3'-OH-DAI,  $17 \text{ nM}$  für 6-OH-DAI und  $2,54 \mu\text{M}$  für DAI, was darauf hinweist, dass die zur Ausübung antioxidativer Wirkungen nötigen Konzentrationen deutlich (vier- bis 200-fach) über den physiologischen liegen.

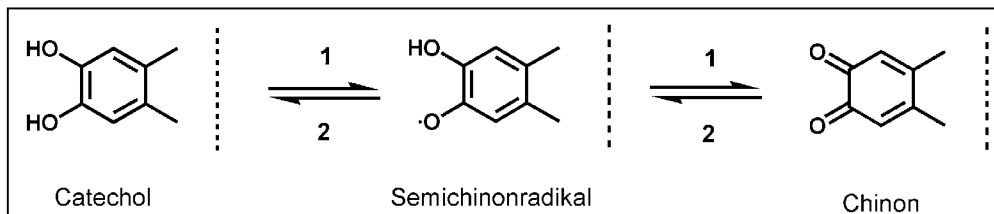
Es muss auch in Betracht gezogen werden, dass im Plasma die Isoflavone zu mehr als 90 % (siehe Kap. 4.2.1) als Phase-II-Konjugate vorliegen. Rimbach und Mitarbeiter konn-

ten zeigen, dass die Konjugation mit Sulfat das antioxidative Potenzial von GEN, DAI und Equol verringert [207,214]. Vermutlich führt die Konjugation mit Glucuronsäure und die gemischte Konjugation mit Glucuronsäure und Sulfat ebenfalls zu einer reduzierten antioxidativen Kapazität, was bisher aber aufgrund des Mangels an Reinsubstanzen noch nicht untersucht werden konnte. Im Plasma liegt der Anteil der mit Sulfat konjugierten Isoflavone bei 8 bzw. 26 % für GEN und DAI, der der Glucuronide bei 48 bzw. 33 % und der der gemischten Konjugate bei etwa 30 % [126,131]. Der Anteil der Aglykone beträgt damit nur etwa 14 bzw. 11 %, in dieser Arbeit nur ungefähr 3 %, so dass die Aglykone bei der Ausübung einer antioxidativen Wirkung mengenmäßig praktisch kaum einen Beitrag liefern. Nur für DHD konnte in vitro eine niedrigere Glucuronidierungseffizienz durch intestinale und biliäre UDP-Glucuronyltransferasen beobachtet werden [129]. Somit kann allein diese Verbindung, deren antioxidatives Potenzial im Vergleich mit anderen Metaboliten mittelmäßig ist (siehe Kap. 4.3), eventuell zu einer in vivo auftretenden Wirkung beitragen.

Zusätzlich zu den bisher erwähnten Eigenschaften muss eine prooxidative Wirkung der Isoflavone berücksichtigt werden. Als möglicher Wirkmechanismus kommt eine enzymatische Oxidation (Cytochrom P450-abhängige Oxidasen, Peroxidasen) von Catecholen zum Semichinonradikalen und ortho-Chinonen in Frage. Letzteres wurde bereits für die oxidativen Metabolite von 17 $\beta$ -Estradiol und einige Flavonoide gezeigt [426,427,428,429]. Das gebildete Chinon kann dann im sog. „Redox-Cycling“, bei dem es sich um einen reversiblen Redoxprozess handelt, wieder durch Reduktasen, wie die NADPH-Cytochrom-c-Reduktase oder NADH-Cytochrom-b<sub>5</sub>-Reduktase, zu einem Semichinonradikal reduziert werden (siehe Abb. 5.4). Dieses überträgt bei der sich anschließenden Autoxidation ein Elektron auf ein Sauerstoffmolekül. Dabei wird zum einen das Chinon regeneriert, zum anderen entsteht ein Superoxidradikalanion. Durch enzymatische und Schwermetall- (vom Typ der Fenton-Reaktion) katalysierte Reaktionen werden andere reaktive Sauerstoffspezies, beispielsweise Wasserstoffperoxid und das Hydroxylradikal, regeneriert. Letztere Reaktionen können möglicherweise ebenfalls direkt beeinflusst werden, wie bereits für Flavonoide in einigen Studien in vitro gezeigt werden konnte [427,430,431,432]: Voraussetzung ist eine komplexbildende Wirkung mit den Schwermetallionen, die sowohl anti- (siehe Kap. 5.3.2) als auch prooxidative Eigenschaften nach sich ziehen kann. Die komplexbildenden Eigenschaften werden bei Flavonoiden, wie bereits in Kap. 5.3.2 erwähnt, durch eine Struktur mit zwei Substituenten in ortho-Stellung hervorgerufen. Die Komplexbildung mit Metallionen kann zu einer Verringerung des Redoxpotenzials im Metall-Substrat-Komplex führen, so dass es zur Reduktion des Metallions kommt [415,433]. Das Ausmaß der pro- oder antioxidativen Wirkung hängt somit vom Redoxpotenzial des Metall-Substrat-Komplexes ab, das wiederum von der Art des Metallions und der Zahl der Hydroxylgruppen der Testsubstanz abhängig ist [431,432,434]. Diese möglichen prooxida-



tiven Reaktionen kommen auch für die oxidativen Metabolite von GEN und DAI in Frage, da sie mindestens drei Hydroxylgruppen und dazu eine catecholische Struktur aufweisen. In den in dieser Arbeit verwendeten *in vitro*-Testmethoden war die antioxidative Wirkung stärker ausgeprägt. *In vivo* unter physiologischen Bedingungen ist denkbar, dass die prooxidative Wirkung durch das Vorhandensein entsprechender Enzyme oder Metallionen zum Tragen kam, was das Auftreten antioxidativer Effekte verhinderte.



**Abb. 5.4:** Oxidation von Catecholen zu den entsprechenden ortho-Chinonen (1 Cytochrom P450-abhängige Oxidasen oder Peroxidasen, 2 z.B. NADPH-Cytochrom-c-Reduktase, NADH-Cytochrom-b<sub>5</sub>-Reduktase).

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass in mit Antioxidant Response Element (ARE) und ER $\alpha$  bzw.  $\beta$ -transfizierten COS 1-Zellen (Nierenzellen des afrikanischen grünen Affen) nach Inkubation mit GEN die Expression des ARE-Gens vermindert war [435]. Das ARE-Gen ist für die ER-vermittelte Regulation der Phase-II-Enzyme, z.B. Glutathion-S-Transferase und Chinon-Reduktase, verantwortlich. Im Gegensatz dazu wurde in ER-negativen Brustkrebszellen (C4-12-5) nach Transfizierung mit ER $\alpha$  bzw.  $\beta$  sowie ARE eine Induktion des ARE-Gens beobachtet, so dass die durch GEN-vermittelte ARE-Regulation zellspezifisch ist. Mögliche prooxidative Wirkungen sind demnach auch auf Gen-regulatorischer Ebene denkbar.

In Langzeitstudien von zwei bis sechs Wochen mit 20 bis 150 mg Isoflavonen konnten - wie bereits in Kap. 1.6.2 erwähnt - positive Effekte auf beispielsweise die antioxidative Kapazität des Plasmas, die Oxidationssuszeptibilität der LDL, die TBARS-Bildung, die Konzentration an Isoprostanen, die ebenfalls ein Marker für die Lipidperoxidation sind, oder die Bildung oxidativer DNA-Basenschäden, beobachtet werden [216,217,218,219,220]. Auch auf Proteinebene konnten positive Wirkungen von Isoflavonen nachgewiesen werden. Eine Konzentration von 2,5  $\mu$ M GEN war in der Lage, die reduzierende Wirkung von Homocystein auf die Konzentration von Annexin V, einem antithrombotisch wirkenden Molekül, dessen Mutationen zu Bluthochdruck führen, in Endothelzellen der Nabelschnur umzukehren. Des Weiteren führte GEN zu einer Hochregulierung des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms 12, das an der Schaumzellbildung beteiligt ist (siehe unten) [436]. Die Verringerung der Oxidation der LDL und der damit verbundenen Marker bestätigt die bereits *in vitro* und *in vivo* gezeigte Inkorporierung von Isoflavonen in LDL-Partikel [216,437,438]. Die Konzentration in den LDL ist jedoch relativ gering: Es wurden weniger als 1 % der Plasmakonzentration

tration an Isoflavonen sowie an QUER in den LDL nachgewiesen [367,437]. Ein möglicher Grund für die dennoch auftretenden antioxidativen Effekte ist eine synergistische Wirkung von ASC oder  $\alpha$ -Tocopherol mit Isoflavonen, die bei der Lipidperoxidation in vitro bereits gezeigt wurde [212,433,439]. Die Konzentrationen, die nötig sind, die Lipidperoxidation signifikant in vitro zu hemmen, betragen nach den Ergebnissen dieser Arbeit weniger als 1  $\mu$ M, so dass in vivo eine Wirkung vorstellbar ist. Auch für die anderen beschriebenen Effekte, beispielsweise die Erhöhung der antioxidativen Kapazität des Plasmas in vivo, können ähnliche Mechanismen als Erklärungsansatz herangezogen werden. Denkbar ist neben der Akkumulation in den Lipoproteinen eine Bindung der Aglykone an Plasma-proteine oder Membranbestandteile der Leukozyten oder Erythrozyten.

Es gibt allerdings auch zahlreiche Studien, in denen keine antioxidative Effekte der Isoflavone beobachtet wurden [219,221,222,223,224]. Eventuell führt ein hohes Ausgangsniveau an anderen Antioxidantien, wie  $\alpha$ -Tocopherol, zu einer Maskierung der Wirkung. Des Weiteren können die Darreichungsform, der Gesundheitszustand und die Enzymausstattung der Probanden oder andere Inhaltsstoffe in Soja, die bei den Präparaten der oben aufgeführten Studien nicht enthalten sind, Unterschiede hervorrufen. Beispielsweise konnten im methanolischen Extrakt von Sojaproteinisolat 136 unterschiedliche sekundäre Pflanzenstoffe nachgewiesen, nur 16 davon waren Isoflavone [440].

Zuletzt stellt sich die Frage, ob ex vivo-Testmethoden, beispielsweise die  $\text{Cu}^{2+}$ -induzierte Lipidperoxidation, gute Vorhersagen vor oxidativen Schäden in vivo, z.B. bei der Arteriosklerose, bieten. Allgemein wird angenommen, dass die Oxidation der LDL ein Risikofaktor für Arteriosklerose darstellt [225,226]. Frühe Stadien sind durch eine Akkumulation von mit Lipiden beladenen Schaumzellen in der Gefäßwand gekennzeichnet. Diese entstehen aus Makrophagen nach Aufnahme oxidierter LDL im subendothelialen Raum. Die oxidierten LDL sind nicht nur aus diesem Grund in den Mittelpunkt des Interesses gerückt, sondern auch da sie cytotoxische Produkte der Lipidperoxidation enthalten, die zur ständigen Irritation des Endothels und damit verbundenen weiteren schädlichen Effekten, beispielsweise dem Tod der Endothelzellen, führen. Es konnte anhand von Experimenten mit hyperlipämischen Kaninchen gezeigt werden, dass sowohl  $\alpha$ -Tocopherol als auch ProbucoI, ein Cholesterin-senkendes Medikament, die Lag-Zeit der Lipidperoxidation ex vivo verlängern. Bei der Reduktion der durch Arteriosklerose hervorgerufenen Läsionen in der Aorta der Tiere war jedoch nur ProbucoI beteiligt (siehe Kap. 1.6.2) [227,228]. Im Gegensatz dazu konnten jedoch katalytisch-aktive  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen an der Stelle der Läsionen nachgewiesen werden [441]. In dieser Arbeit wurde in vitro bereits ab einer Konzentration von 1  $\mu$ M eine ausgeprägte Hemmung der Bildung von konjugierten Dien-Strukturen, und ab 0,1  $\mu$ M eine Verhinderung der Bildung von TBARS beobachtet (siehe Abb. 4.31 und 4.33). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Isoflavone in LDL inkorporiert werden können [437]

und synergistisch mit ASC wirken [212]. So ist denkbar, dass trotz der fehlenden Wirkung im Tiermodell positive Effekte bezüglich Arteriosklerose im Menschen ausgeübt werden können.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Isoflavone und vor allem ihre Metabolite zwar in vitro sehr gute antioxidative Eigenschaften aufweisen, dass aber in vivo noch Studien benötigt werden, die die physiologische Bedeutung dieser Aktivität eindeutig charakterisieren. Darüber hinaus fehlen Studien, die die antioxidative Wirkung der oxidativen und bakteriellen Metabolite in vivo untersuchen. Die oxidativen Metabolite von DAI und GEN - unter Beachtung einer möglichen prooxidativen Wirkung - sowie Equol scheinen potenzielle Kandidaten dafür zu sein.

## 5.4 Abschließende Betrachtung

Die in der Humanstudie aufgenommene Menge an DAI bzw. DG betrug 1 mg pro kg Körpergewicht berechnet als Aglykon, was durchschnittlich 69 mg DAI bzw. 113 mg DG entspricht. Diese Dosis ist mit der Menge vergleichbar, die bei traditionell asiatischer Ernährungsweise täglich aufgenommen wird. Bereits 1 h nach Isoflavonaufnahme konnten im Vergleich zum Kontrollwert erhöhte Konzentrationen an DAI im Plasma gefunden werden. Dies ist nicht unerwartet, da die Verweildauer im Magen bei vorwiegend Kohlenhydrat-haltiger und flüssiger Nahrungsaufnahme bei weniger als 1 h liegt [442]. Unter Annahme eines durchschnittlichen Plasmavolumens von 2,7 L bei Männern [443] und einer vollständigen Resorption der aufgenommenen Menge an DAI bzw. DG, würde man Plasmakonzentrationen von 100  $\mu\text{M}$  erwarten. Die Tatsache, dass die Plasmakonzentration an DAI maximal 2,54  $\mu\text{M}$  (siehe Tab. 4.8) betrug und somit um einen Faktor 40 kleiner als der theoretisch mögliche Maximalwert war, ist ein Indiz dafür, dass mehrere Vorgänge eine Rolle spielen. So konnte beispielsweise in dieser Arbeit gezeigt werden, dass DAI sowohl durch die Mikroflora des Darms als auch durch die Leber umfangreich metabolisiert wird (siehe Kap. 4.2.1.2 und 4.2.2.2). Auch eine Verstoffwechslung zu bisher nicht identifizierten Verbindungen, möglicherweise zu  $\text{CO}_2$ , ist denkbar. Für QUER konnte gezeigt werden, dass 23 bis 81 % der von sechs Probandinnen aufgenommenen Dosis an  $^{14}\text{C}$ -markiertem QUER als  $\text{CO}_2$  ausgeatmet wurde [444]. Weiterhin konnte für Caco-2-Zellen nachgewiesen werden, dass Isoflavone und ihre Metabolite effektiv wieder aus den Zellen ausgeschleust werden (siehe Kap. 4.1.5), und zwar mittels MRP2 auf die Seite des Darmlumens. Darüber hinaus unterliegen die Isoflavone einer Umverteilung und Akkumulation in periphere Gewebe, wie für humane PBMC gezeigt werden konnte (siehe Kap. 4.2.3). Weiterhin muss die Adsorption an Nahrungsbestandteile, z.B. Proteine, und die damit verbundene Verringerung der Resorption berücksichtigt werden, die möglicherweise bei der in dieser Arbeit gefundenen geringeren Bioverfügbarkeit des Aglykons im Vergleich zum Glucosid eine Rolle spielt.

Aufgrund der beobachteten neunfachen Akkumulation in Caco-2-Zellen (siehe Kap. 4.1.3) liegt die Vermutung nahe, dass sehr hohe Konzentrationen an Isoflavonen in den Enterozyten auftreten, die biologische Wirkungen ausüben können. Unter der Annahme eines Magenvolumens von 100 bis 500 mL und einer vollständigen Entleerung des Mageninhalts würde man in den Epithelzellen des Darms bei der in der Humanstudie verabreichten Dosis (siehe oben) eine Konzentration von 4,5 bis 24,3 mM erwarten. Berücksichtigt man die Ergebnisse zur antioxidativen Kapazität aus dieser Arbeit (siehe Kap. 4.3), so sind antioxidative Effekte sowie weitere positive Wirkungen (siehe Kap. 1.6.1) im Darmepithel auf Grund der in vitro nötigen niedrigen Konzentrationen denkbar. Das gleiche gilt aber auch für die potenziellen negativen Effekte, beispielsweise die Induktion der Zellproliferation, die

von DNA-Strangbrüchen, chromosomalen Aberrationen oder Mikrokernen [223,445,446, 447]. Doch nicht nur in vitro führten hohe Konzentrationen zu negativen Wirkungen. Neben der in Tierversuchen beobachteten Stimulation der Proliferation von implantierten Brustkrebszellen und der Induktion von Gebärmutterkrebs (siehe Kap. 1.6.3) [245,247,261] wurden auch unter „physiologischen Bedingungen“, d.h. in Freiland- oder Käfighaltung, nach Gabe von Soja-haltigem Futter Unfruchtbarkeit u.a. bei Schafen, Geparden und Wachteln beobachtet [127,448,449]. Bei anderen Tierarten, z.B. bei Schweinen, Hunden, Ratten oder Welsen, wird Soja als billige Proteinquelle zu Zuchtzwecken seit Jahrzehnten verwendet, und es traten keine negativen Auswirkungen auf. Ein möglicher Grund ist die unterschiedliche Metabolisierung der Isoflavone durch verschiedene Spezies, beispielsweise der fehlende Phase-II-Metabolismus bei Geparden (siehe Kap. 1.4.3.3) [127]. Die physiologische Wirkung von Isoflavonen beim Menschen ist bisher nicht eindeutig geklärt. Es gibt Indizien, die auf negative Effekte nach Gabe von hohen Dosen an Isoflavonen deuten. Beispielsweise führte die zweiwöchige Intervention mit 60 g Sojaprotein zu einem estrogenen Stimulus im Brustgewebe prämenopausaler Frauen [142]. Kinder, die in den 60iger Jahren mit auf Sojamehl basierender Säuglingsnahrung ernährt wurden, litten unter Kropfbildung [294]. Bei gesunden Erwachsenen, die über drei Monate täglich 30 g Soja aufnahmen, wurde bei der Hälfte der Probanden eine reversible Kropfbildung diagnostiziert [295]. Weiterhin ist ein Zusammenhang zwischen dem genotoxischen Potenzial von GEN und akuter infantiler Leukämie denkbar, da die durch GEN hervorgerufenen Chromosomenaberrationen im MLL-Gen den Schäden bei erkrankten Kindern sehr ähnlich sind [450]. Darüber hinaus kann nicht davon ausgegangen werden, dass die im Plasma dominierenden Phase-II-Konjugate der Isoflavone biologisch inaktiv sind. Es konnte gezeigt werden, dass die Glucuronide von DAI und GEN unter Aktivierung der natürlichen Killerzellen immunmodulatorisch wirken [451]. Außerdem unterliegen die Konjugate einem enterohepatischen Kreislauf, so dass durch die hydrolytische Spaltung im Darm eine ständige neue Quelle an aktiven Aglykonen, denen eine größere biologische Wirkung zugeschrieben wird, vorhanden ist.

Nicht nur der enterohepatische Kreislauf kann für die in situ-Generierung von aktiven Aglykonen eine Rolle spielen. Für Estrogen-Sulfate, beispielsweise Estron-Sulfat, wurde gezeigt, dass sie intrazellulär, z.B. im Brustgewebe, vorliegen und so durch rasche Hydrolyse ein Reservoir für freie Estrogene bieten [390,391,392,393]. Der hohe prozentuale Anteil der sulfatierten oxidativen Metabolite (siehe Tab. 4.15) könnte auf einen ähnlichen Mechanismus hindeuten. Die biologische Wirkung der oxidativen Metabolite wurde bisher allerdings noch nicht untersucht.

Aufgrund der möglichen negativen Wirkungen, dem fehlenden Nachweis positiver Effekte auf die Gesundheit und der besseren Bioverfügbarkeit der Isoflavone-Glucoside in Rein-

form (siehe Tab. 4.8) ist die Verabreichung pharmakologischer Dosen für die in der Werbung versprochenen Prävention bestimmter Erkrankungen wissenschaftlich nicht begründet. Aufgrund der relativ kurzen Eliminationshalbwertszeit ist es sinnvoller, die Mengen einer normalen traditionellen asiatischen Ernährung im Verband des Lebensmittels über den Tag verteilt zu sich zu nehmen, um von den bei Asiaten beobachteten positiven Auswirkungen auf die Gesundheit zu profitieren. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere Stoffe in Soja für die in epidemiologischen Studien beobachteten protektiven Effekte bei Asiaten verantwortlich sind. So konnten Badger et al. 136 unterschiedliche sekundäre Pflanzenstoffe aus einem methanolischen Extrakt von Sojaproteinisolat identifizieren, u.a. 15 Saponine, 36 Fettsäuren, 56 Lysophospholipide und nur 16 Isoflavone [440]. Studien, die die Bioverfügbarkeit und biologische Aktivität der Reinsubstanzen mit dem Lebensmittel vergleichen, müssen folgen, um eventuelle Risiken einer Supplementierung besser abschätzen zu können.

## 6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der zellulären Aufnahme von Isoflavonen, dem Einfluss der Zuckerkonjugation auf die Bioverfügbarkeit und den Metabolismus von Isoflavonen sowie der biologischen Aktivität bedeutender Isoflavon-Metabolite.

Dazu wurden zunächst Untersuchungen zu den Mechanismen der zellulären Aufnahme der drei Soja-Isoflavone Daidzein (DAI), Genistein (GEN) und Glycitein (GLY) in verschiedene Zellarten - V79- und Caco-2-Zellen sowie humane mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (PBMC) - durchgeführt. Sowohl durch Analyse der Konzentrations- als auch der zeitabhängigen Aufnahme bei 37 und 4 °C sowie der Hemmung von Effluxpumpen konnten Rückschlüsse auf die zugrunde liegenden Transportmechanismen gezogen werden. Des Weiteren wurde der prozentuale Anteil der drei Isoflavone in den Membranbestandteilen sowie der Cytosolfraktion von V79- und Caco-2-Zellen ermittelt. Zwischen der zellulären Aufnahme und den steigenden eingesetzten Konzentration bestand sowohl bei V79- als auch bei Caco-2-Zellen ein linearer Zusammenhang, wobei die Substanzen vorwiegend im Cytosol und nicht in den Membranen lokalisiert vorlagen. GEN wurde am stärksten in den Zellen akkumuliert (Zehnfach), gefolgt von DAI (etwa Achtfach) und GLY (etwa Sechsfach). In den PBMC wurde hingegen ein exponentieller Anstieg der aufgenommenen Menge beobachtet, wobei GLY am meisten angereichert wurde. Bei der zeitabhängigen Untersuchung der zellulären Aufnahme der Isoflavone wurde ein Anstieg bis zu einem Grenzwert detektiert, wobei bei V79-Zellen und den PBMC keine Unterschiede zwischen den Inkubationen bei 37 und 4 °C gefunden wurden. Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass Isoflavon-Aglykone durch passive Diffusion aufgenommen werden, da die Enzymaktivität der für den aktiven Transport nötigen ATPasen bei tiefen Temperaturen erheblich reduziert ist. Die Akkumulation in den Zellen wird vermutlich durch die ausgeprägte Proteinbindung der Isoflavone hervorgerufen. Caco-2-Zellen zeigen - im Gegensatz zum Konzentrationsanstieg bei 4 °C - bei 37 °C einen exponentiell abfallenden zeitlichen Konzentrationsverlauf. Dieser sowie die Ausscheidung von Phase-II-Konjugaten sowohl bei Caco-2-Zellen als auch bei PBMC ins Zellkulturmedium wurden durch die Effluxpumpen MDR1 sowie die der MRP-Familie hervorgerufen, was durch Co-Inkubation mit den entsprechenden Inhibitoren Verapamil und MK 571 belegt werden konnte.

Darüber hinaus wurde der Einfluss der Zuckerkonjugation auf die Bioverfügbarkeit und den Metabolismus von Isoflavonen untersucht. Dazu wurde eine randomisierte Doppelblindstudie im Cross-Over-Design mit sieben männlichen Probanden durchgeführt. Diese erhielten DAI und sein 7-O- $\beta$ -D-Glucosid (DG) in Form der jeweiligen Reinsubstanz. Die Dosis betrug 1 mg pro kg Körpergewicht berechnet als Aglykon-Äquivalente. Anhand der Bestimmung der nach enzymatischer Hydrolyse mit  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase erhaltenen

Konzentrationen von DAI und seinen Metaboliten in Plasma und Urin wurden die biokinetischen Kenndaten ( $AUC$ ,  $C_{max}$ ,  $t_{max}$ ,  $t_{1/2}$ ) und die Wiederfindung im Urin ermittelt. Auf der Basis der  $AUC$  war DG um einen Faktor 4,5 besser bioverfügbar als DAI (38,5 versus 8,3  $\mu M \cdot h$ ). Die  $C_{max}$  war Sechsfach und die ausgeschiedene Menge im Urin Dreifach größer nach Gabe des Glucosids als nach Verabreichung des Aglykons (2,54 versus 0,43  $\mu M$  bzw. 105,5 versus 32,7  $\mu mol$ ). Der Zeitpunkt der  $C_{max}$  trat nach Gabe von DG nur tendenziell zeitverzögert auf, woraus geschlossen werden kann, dass die Hydrolyse der glycosidischen Bindung nicht geschwindigkeitsbestimmend ist. Ein Zusammenhang zwischen den Plasma-Konzentrationsverläufen von DAI und den Triglyceriden deutet auf einen Transport der Isoflavone in Chylomikronen nach Resorption im Darm hin. Mit Ausnahme von Equol, das nur im Metabolismus von einem Probanden auftrat, wurden alle weiteren quantifizierten Metabolite, Dihydrodaidzein, O-Demethylangolensin sowie 6-, 8- und 3'-Hydroxydaidzein nach Gabe von DG verstärkt gebildet und mit dem Urin ausgeschieden. Die bakteriellen Metabolite (Dihydrodaidzein, O-Demethylangolensin und Equol) erschienen in Plasma und Urin zeitverzögert, da sie erst durch die Darmflora gebildet werden. Die Plasmakonzentrationen der oxidativen Metabolite (6-, 8- und 3'-Hydroxydaidzein) stiegen hingegen kurz nach der von DAI an, weil Isoflavone einem First-Pass-Effekt unterliegen. Die Gesamtwiederfindung im Urin unter Einbeziehung aller quantifizierten Metabolite betrug 53,3 % nach Gabe von DG und 16,6 % nach der von DAI. Die interindividuelle Variation war für DAI selbst sehr klein (ungefähr zweifach), für die Metaboliten allerdings sehr groß (bis zu 360-fach). Der bakterielle Metabolismus lieferte mit 25 % der Gesamtausscheidung im Urin über 24 h einen größeren Beitrag als der oxidative Metabolismus mit nur 1 %. Analog zu den Ergebnissen der zellulären Aufnahme *in vitro* konnte auch *in vivo* eine Anreicherung von DAI in den PBMC beobachtet werden, wobei diese nach Gabe von DAI und DG ähnlich ausfiel.

Zur Charakterisierung der antioxidativen Kapazität der natürlich vorkommenden Isoflavone und ihrer Metabolite *in vitro* wurden drei unterschiedliche Methoden (ORAC-Test, Dien- sowie TBARS-Methode) eingesetzt. In allen drei Testsystemen zeigten die untersuchten Verbindungen eine im Vergleich zu Ascorbinsäure und Quercetin sehr hohe antioxidative Wirkung. Besonders die hydroxylierten Phase-I-Metabolite von DAI und GEN sowie Equol wiesen eine ausgezeichnete antioxidative Wirkung auf. Das antioxidative Potenzial der Isoflavone beruhte vorwiegend auf der Abgabe von Elektronen bzw. Wasserstoffatomen, der Bildung von Metallionen-Komplexen und der Bindung an Proteine zur Verhinderung von Oxidationsreaktionen. Die Verabreichung einer Einmalgabe von DAI und seinem Glucosid im Rahmen der Humanstudie führte zu keiner Verbesserung der antioxidativen Kapazität des Plasmas im Vergleich zur Kontrolle, obwohl hohe Isoflavonkonzentrationen gemessen werden konnten.



## 7 Literaturverzeichnis

- 1 Watzl B, Leitzmann C 1999 Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln, Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart, 2. Auflage, 15
- 2 Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment der British Food Standard Agency 2003 Phytoestrogens and health, 6
- 3 Harbone J 1995 Hormonelle Wechselbeziehungen zwischen Pflanzen und Tieren, Ökologische Biochemie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 123-149
- 4 Rupp H, Zoller O, Zimmerli B 2000 Bestimmung der Isoflavone Daidzein und Genistein in sojahaltigen Produkten, Mitteilung aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene 91: 199-223
- 5 Wiseman H, Casey K, Clarke DB, Barnes KA, Bowey E 2002 Isoflavone aglycon and glucose-conjugate of high- and low-soy U.K. foods in nutritional studies, J. Agric. Food Chem. 50: 1404-1410
- 6 Wang H-J, Murphy PA 1994 Isoflavone content in commercial soybean foods, J. Agric. Food Chem. 42: 1666-1673
- 7 Coward L, Barnes NC, Setchell KDR, Barnes S 1993 Genistein, daidzein, and their  $\beta$ -glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets, J. Agric. Food Chem. 41: 1961-1967
- 8 Liggins J, Bluck L, Runswick S, Atkinson C, Coward W, Bingham S 2000 Daidzein and genistein content of fruits and nuts, J. Nutr. Biochem. 11: 326-331
- 9 Klus K, Barz W 1998 Formation of polyhydroxylated isoflavones from the isoflavones genistein and biochanin A by bacteria isolated from tempeh, Phytochemistry 47: 1046-1048
- 10 Esaki H, Kawakishi S, Morimitsu Y, Osawa T 1999 New potent antioxidative o-dihydroxyisoflavones in fermented Japanese soybean products, Biosci. Biotechnol. Biochem. 63: 1637-1639
- 11 Song T, Barua K, Buseman G, Murphy PA 1998 Soy isoflavones analysis: quality control and new internal standard, Am. J. Clin. Nutr. 68: 1474S-1479S
- 12 Kuodu S, Fleury Y, Welti D, Magnolato D, Uchida T, Kitamura K, Okubo K 1991 Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* Merrill), Agr. Biol. Chem. 55: 2227-2233
- 13 Eldridge AC, Kwolek WF 1983 Soybean isoflavones: effect of environment and variety on composition, J. Agric. Food Chem. 31: 394-396
- 14 Pumford SL, Morton MM, Turkes A, Griffiths K 2002 Determination of the isoflavonoids genistein and daidzein in biological samples by gas chromatography-mass spectrometry, Ann. Clin. Biochem. 39: 281-292
- 15 Horn-Ross PL, Barnes S, Lee M, Coward L, Mandel JE, Koo J, John EM, Smith M 2000 Assessing phytoestrogen exposure in epidemiologic studies: development of a database (United States), Cancer Causes Control 11: 289-298
- 16 Belitz HD, Grosch W, Schieberle P 2001 Lehrbuch der Lebensmittelchemie, Springer Verlag, Berlin, 5. Auflage, 754
- 17 Barz W, Welle R 1992 Biosynthesis and metabolism of isoflavones and pterocarpin phytoalexins in chickpea, soybean and phytopathogenic fungi. In: Stafford HA, Ibrahim RK (Hrsg.) Phenolic metabolism in plants, Plenum Press, New York, London, Vol. 26, 139-165
- 18 Heller W, Forkman G 1994 Biosynthesis of flavonoids. In: Harborne JB (Hrsg.) The flavonoids. Advances in research since 1986, Chapman and Hall, London, 499-536
- 19 Knaggs AR 2001 The biosynthesis of shikimate metabolites, Nat. Prod. Rep. 18: 334-355
- 20 Rolfe BG 1988 Flavones and isoflavones as inducing substances of legume nodulation, Biofactors 1: 3-10
- 21 Kosslak, RM, Bookland R, Barkei J, Raaren HE, Appelbaum ER 1987 Induction of Bradyrhizobium japonicum common nod genes by isoflavones isolated from Glycine max., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7428-7432
- 22 Smith DA, Banks SW 1986 Biosynthesis, elicitation and biological activity of isoflavonoid phytoalexins, Phytochemistry 25: 979-995
- 23 Wang H-J, Murphy PA 1994 Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: effects of variety, crop year, and location, J. Agric. Food Chem. 42: 1674-1677

- 24 USDA-Iowa State University Database on the Isoflavone Content of Foods, Release 1.3 - 2002, <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/isoflav/isoflav.html>
- 25 Kiely M, Faughnan M, Wahala K, Brants H, Mulligan A 2003 Phyto-oestrogen levels in foods: the design and construction of the VENUS database, *Br. J. Nutr.* 89: S19-S23
- 26 Erdman JW Jr, Badger TM, Lampe JW, Setchell KD, Messina M 2004 Not all soy products are created equal: caution needed in interpretation of research results, *J. Nutr.* 134: 1229S-1233S
- 27 Liggins J, Bluck LJC, Runswick S, Atkinson C, Coward WA, Bingham SA 2000 Daidzein and genistein contents of fruits and nuts, *J. Nutr. Biochem.* 11: 326-331
- 28 Liggins J, Bluck LJC, Runswick S, Atkinson C, Coward WA, Bingham SA 2000 Daidzein and genistein contents of vegetables, *Br. J. Nutr.* 84: 717-725
- 29 Nakamura Y, Tsuji S, Tonogai Y 2000 Determination of the levels of isoflavonoids in soybeans and soy-derived foods and estimation of isoflavonoids in the Japanese daily diet, *J. AOAC Int.* 83: 635-650
- 30 Messina M 1995 Modern applications for an ancient bean: soybeans and the prevention and treatment of chronic disease, *J. Nutr.* 152: 567S-569S
- 31 Nagata C, Inaba S, Kawakami N, Kakizoe T, Shimizu H 2000 Inverse association of soy product intake with serum androgen and estrogen concentration in Japanese men, *Nutr. Cancer* 36: 14-18
- 32 Arai YM, Uehara M, Sato Y, Kimira M, Eboshida A, Adlercreutz H, Watanabe S 2000 Comparison of isoflavones among dietary intake, plasma concentration and urinary excretion for accurate estimation of phytoestrogen intake, *J. Epidemiol.* 10: 127-135
- 33 Chen Z, Zheng W, Custer LJ, Dai Q, Shu XO, Jin F, Franke AA 1999 Usual dietary consumption of soy foods and its correlation with the excretion rate of isoflavonoids in overnight urine samples among Chinese women in Shanghai, *Nutr. Cancer* 33: 82-87
- 34 Adlercreutz H, Markkanen H, Watanabe S 1993 Plasma concentrations of phyto-oestrogens in Japanese men, *Lancet* 342: 1209-1210
- 35 van Erp-Baart MAJ, Brants HAM, Kiely M, Mulligan A, Turrini A, Sermonta C, Kilkkinen A, Valsta LM 2003 Isoflavone intake in four different European countries: the VENUS approach, *Br. J. Nutr.* 89: S25-S30
- 36 de Kleijn MJ, van der Schouw YT, Wilson PW, Adlercreutz H, Mazur W, Grobbee DE, Jacques PF 2001 Intake of dietary phytoestrogens is low in postmenopausal women in the United States: the Framingham study (1-4), *J. Nutr.* 131: 1826-1832
- 37 Clarke DB, Lloyd SA 2004 Dietary exposure estimates of isoflavones from the 1998 UK Total Diet Study, *Food Addit. Contam.* 21: 305-316
- 38 Ritchie MR, Morton MS, Deighton N, Blake A, Cummings JH 2004 Plasma and urinary phyto-oestrogens as biomarkers of intake: validation by duplicate diet analysis, *Br. J. Nutr.* 91: 447-457
- 39 Friar PMK, Walker AF 1998 Levels of plant phytoestrogens in the diets of infants and toddlers, MAFF report FS2829
- 40 Clarke DB, Barnes KA, Castle L, Rose M, Wilson LA, Baxter MJ, Price KR, DuPont MS 2003 Levels of phytoestrogens, inorganic trace-elements, natural toxicants and nitrate in vegetarian duplicate diets, *Food Chem.* 81: 287-300
- 41 Setchell KDR, Brown NM, Desai P, Zimmer-Nechemias L, Wolfe BE, Brashear WT, Kirschner AS, Cassidy A, Heubi JE 2001 Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements, *J. Nutr.* 131: 1362S-1375S
- 42 Nurmi T, Mazur W, Heinonen S, Kokkonen J, Adlercreutz H 2002 Isoflavone content of soy based supplements, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28: 1-11
- 43 Howes JB, Howes LK 2002 Content of isoflavone containing preparations, *Med. J. Australia* 176: 135-136
- 44 Adlercreutz H, Fotsis T, Lampe J, Wahala K, Makela T, Brunow G, Hase T 1993 Quantitative determination of lignans and isoflavonoids in plasma of omnivorous and vegetarian women by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry, *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 215: 5-18

- 45 Frankenfeld CL, Patterson RE, Horner NK, Neuhouser ML, Skor HE, Kalhorn TF, Howald WN, Lampe JW 2003 Validation of a soy food-frequency questionnaire and evaluation of correlates of plasma isoflavone concentrations in postmenopausal women, *Am. J. Clin. Nutr.* 77: 674-680
- 46 Cassidy A, Bingham S, Setchell KD 1994 Biological effects of a diet of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal women, *Am. J. Clin. Nutr.* 60: 333-340
- 47 Setchell KDR, Zimmer-Nechemias L, Cai J, Heubi JE 1998 Isoflavone content of infant formulas and the metabolic fate of these phytoestrogens in early life, *Am. J. Clin. Nutr.* 68: 1453S-1461S
- 48 Rowland I, Wiseman H, Sanders T, Adlercreutz H, Bowey E 1999 Metabolism of oestrogens and phyto-oestrogens: role of the gut microflora, *Biochem. Soc. Trans.* 27: 304-308
- 49 Takimoto CH, Glover K, Huang X, Hayes SA, Gallot L, Quinn M, Jovanovic BD, Shapiro A, Hernandez L, Goetz A, Llorens V, Lieberman R, Crowell JA, Poisson BA, Bergan RC 2003 Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of unconjugated soy isoflavones administered to individuals with cancer, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 12: 1213-1221
- 50 Setchell KDR, Brown NM, Desai P, Zimmer-Nechemias L, Wolfe BE, Jakata AS, Creutzinger V, Heubi JE 2003 Bioavailability, disposition, and dose-response effects of soy isoflavones when consumed by healthy women at physiologically typical dietary intakes, *J. Nutr.* 133: 1027-1035
- 51 Xu X, Wang H-J, Murphy PA, Cook L, Hendrich S 1994 Daidzein is a more bioavailable soymilk isoflavone than genistein in adult women, *J. Nutr.* 124: 825-832
- 52 Setchell KDR, Faughnan MS, Avades T, Zimmer-Nechemias L, Wolfe BE, Brashear WT, Desai P, Oldfield MD, Botting NP, Cassidy A 2003 Comparing the pharmacokinetics of daidzein and genistein with the use of [<sup>13</sup>C]labeled tracers in premenopausal women, *Am. J. Clin. Nutr.* 77: 411-419
- 53 Bloedon LT, Jeffcoat AR, Lopaczynski W, Schell MJ, Black TM, Dix KJ, Thomas BF, Albright C, Busby MG, Crowell JA, Zeisel SH 2002 Safety and pharmacokinetics of purified soy isoflavones: single-dose administration to postmenopausal women, *Am. J. Clin. Nutr.* 76: 1126-1137
- 54 Busby MG, Jeffcoat AR, Bloedon LT, Koch MA, Black T, Dix KJ, Heizer WD, Thomas BF, Hill JM, Crowell JA, Zeisel SH 2002 Clinical characteristics and pharmacokinetics of purified soy isoflavones: single-dose administration to healthy men, *Am. J. Clin. Nutr.* 75: 126-136
- 55 Slavin JL, Karr SC, Hutchins AM, Lampe JW 1998 Influence of soybean processing, habitual diet, and soy dose on urinary isoflavonoid excretion, *Am. J. Clin. Nutr.* 68: 1492S-1495S
- 56 King RA, Bursill DB 1998 Plasma and urinary kinetics of the isoflavone daidzein and genistein after a single soy meal in humans, *Am. J. Clin. Nutr.* 67: 867-872
- 57 Zhang Y, Wang GJ, Song TT, Murphy PA, Hendrich S 1999 Urinary disposition of the soybean isoflavones daidzein, genistein and glycitein differs among humans with moderate fecal isoflavone degradation activity, *J. Nutr.* 129: 957-962
- 58 Richelle M, Primore-Merten S, Bodenstab S, Enslin M, Offord EA 2002 Hydrolysis of isoflavone glycosides to aglycones by  $\beta$ -glycosidase does not alter plasma and urine isoflavone pharmacokinetics in postmenopausal women, *J. Nutr.* 132: 2587-2592
- 59 Watanabe S, Yamaguchi M, Sobue T, Takahashi T, Miura T, Arai Y, Mazur W, Wahala K, Adlercreutz H 1998 Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (kinako), *J. Nutr.* 128: 1710-1715
- 60 King RA 1998 Daidzein conjugates are more bioavailable than genistein conjugates in rats, *Am. J. Clin. Nutr.* 68: 1496S-1499S
- 61 Nau H 1994 Toxikokinetik. In: Marquardt H, Schäfer SG (Hrsg.) *Lehrbuch der Toxikologie*, BI-Wissenschaftsverlag, Mannheim, 1. Auflage, 48
- 62 Barnes S, Sfakianos J, Coward L, Kirk M 1996 Soy isoflavonoids and cancer prevention, *Adv. Exp. Med. Biol.* 401: 87-100
- 63 Sfakianos J, Coward L, Kirk M, Barnes S 1997 Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats, *J. Nutr.* 127: 1260-1268
- 64 Anupongsanugool E, Teekachunhatean S, Rojanasthien N, Pongsatha S, Sangdee C 2005 Pharmacokinetics of isoflavones, daidzein and genistein, after ingestion of soy beverage com-

- pared with soy extract capsules in postmenopausal Thai women, *BMC Clin. Pharmacol.* 5: 2-11
- 65 Gee J, DuPont M, Rhodes M, Johnson I 1998 Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway, *Free Radic. Biol. Med.* 25: 19-25
- 66 Hollman PCH, Katan MB 1998 Absorption, metabolism and bioavailability of flavonoids. In: Rice-Evans CA and Packer L (Hrsg.) *Flavonoids in Health and Disease*, Marcel Dekker, New York, 483-522
- 67 Walgren RA, Lin JT, Kinne RK, Walle T 2000 Cellular uptake of dietary flavonoid quercetin 4'-beta-glucoside by sodium-dependent glucose transporter SGLT1, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294: 837-843
- 68 Mullen W, Boitier A, Stewart AJ, Crozier A 2004 Flavonoid metabolites in human plasma and urine after the consumption of red onions: analysis by liquid chromatography with photodiode array and full scan tandem mass spectrometric detection, *J. Chromatogr. A* 1058: 163-168
- 69 Fleschhut J 2004 Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit, zum Metabolismus und zur antioxidativen Wirkung von Anthocyanen, Dissertation, Universität Karlsruhe (TH)
- 70 Walle T, Walle UK 2003 The beta-D-glucoside and sodium-dependent glucose transporter 1 (SGLT1)-inhibitor phloridzin is transported by both SGLT1 and multidrug resistance-associated proteins 1/2, *Drug Metab. Dispos.* 31: 1288-1291
- 71 Oitate M, Nakaki R, Koyabu N, Takanaga H, Matsuo H, Ohtani H, Sawada Y 2001 Transcellular transport of genistein, a soybean-derived isoflavone, across human colon carcinoma cell line (Caco-2), *Biopharm. Drug Dispos.* 22: 23-29
- 72 Murota K, Shimizu S, Miyamoto S, Izumi T, Obata A, Kikuchi M, Terao J 2002 Unique uptake and transport of isoflavone aglycones by human intestinal Caco-2 cells: comparison of isoflavonoids and flavonoids, *J. Nutr.* 132: 1956-1961
- 73 Andlauer W, Kolb J, Furst P 2000 Absorption and metabolism of genistin in the isolated rat small intestine, *FEBS Lett.* 475: 127-130
- 74 Setchell KDR, Brown NM, Zimmer-Nechemias L, Brashear WT, Wolfe BE, Kirschner AS, Heubi JE 2002 Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability, *Am. J. Clin. Nutr.* 76: 447-453
- 75 Day AJ, DuPont MS, Ridely S, Rhodes M, Morgan MRA, Williamson G 1998 Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity, *FEBS Lett.* 436: 71-75
- 76 Day AJ, Canada FJ, Diaz JC, Kroon PA, Mclauchlan R, Faulds CB, Plumb GW, Morgan MR, Williamson G 2000 Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase, *FEBS Lett.* 468: 166-170
- 77 Wilkinson AP, Gee JM, DuPont MS, Needs PW, Mellon FA, Williamson G, Johnson IT 2003 Hydrolysis by lactase phlorizin hydrolase is the first step in the uptake of daidzein glucosides by rat small intestine in vitro, *Xenobiotica* 33: 255-264
- 78 Hur H-G, Lay JO, Beger RD, Freeman JP, Rafii F 2000 Isolation of human intestinal bacteria metabolizing the natural isoflavone glycosides daidzin and genistin, *Arch. Microbiol.* 174: 422-428
- 79 Hur H-G, Beger RD, Heinze TM, Lay JO, Freeman JP, Dore J, Rafii F 2002 Isolation of an anaerobic intestinal bacterium capable of cleaving the C-ring of the isoflavonoid daidzein, *Arch. Microbiol.* 178: 8-12
- 80 Allred CD, Ju YH, Allred KF, Chang J, Helferich WG 2001 Dietary genistin stimulates growth of estrogen-dependent breast cancer tumors similar to that observed with genistein, *Carcinogenesis* 22: 1667-1673
- 81 Piskula MK, Yamakoshi J, Iwai Y 1999 Daidzein and genistein but not their glucosides are absorbed from the rat stomach, *FEBS Lett.* 447: 287-291
- 82 Franke AA, Custer LJ, Hundahl SA 2004 Determinants for urinary and plasma isoflavones in humans after soy intake, *Nutr. Cancer* 50: 141-154
- 83 Ambudkar SV, Kimchi-Sarfaty C, Sauna ZE, Gottesman MM 2003 P-glycoprotein: from genomics to mechanisms, *Oncogene* 22: 7468-7485

- 84 Castro AF, Altenberg GA 1997 Inhibition of drug transport by genistein in multidrug-resistant cells expressing P-glycoprotein, *Biochem. Pharmacol.* 53: 89-93
- 85 Hooijberg JH, Broxterman HJ, Heijn M, Fles DL, Lankelma J, Pinedo HM 1997 Modulation by (iso)flavonoids of the ATPase activity of the multidrug resistance protein, *FEBS Lett.* 413: 344-348
- 86 Lyn-Cook BD, Stottman HL, Yan Y, Blann E, Kadlubar FF, Hammons GJ 1999 The effects of phytoestrogens on human pancreatic tumor cells in vitro, *Cancer Lett.* 142: 111-119
- 87 Zhang S, Morris ME 2003 Effect of the flavonoids biochanin A and silymarin on the p-glycoprotein-mediated transport of digoxin and vinblastine in human intestinal Caco-2 cells, *Pharm. Res.* 20: 1184-1191
- 88 Lania-Pietrzak B, Hendrich AB, Zugaj J, Michalak K 2005 Metabolic O-demethylation does not alter the influence of isoflavones on the biophysical properties of membranes and MRP1-like protein transport activity, *Arch. Biochem. Biophys.* 433: 428-434
- 89 Seelig A 1998 A general pattern for substrate recognition by P-glycoprotein, *Eur. J. Biochem.* 251: 252-261
- 90 Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J 2000 A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins, *J. Natl. Cancer Inst.* 92: 1295-1302
- 91 Walgren RA, Karnaky KJ Jr, Lindenmayer GE, Walle T 2000 Efflux of dietary flavonoid quercetin 4'-beta-glucoside across human intestinal Caco-2 cell monolayers by apical multidrug resistance-associated protein-2, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294: 830-836
- 92 Hong J, Lu H, Meng X, Ryu JH, Hara Y, Yang CS 2002 Stability, cellular uptake, biotransformation, and efflux of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate in HT-29 human colon adenocarcinoma cells, *Cancer Res.* 62: 7241-7246
- 93 O'Leary KA, Day AJ, Needs PW, Mellon FA, O'Brien NM, Williamson G 2003 Metabolism of quercetin-7- and quercetin-3-glucuronides by an in vitro hepatic model: the role of human beta-glucuronidase, sulfotransferase, catechol-O-methyltransferase and multidrug-resistant protein 2 (MRP2) in flavonoid metabolism, *Biochem. Pharmacol.* 65: 479-491
- 94 Vaidyanathan JB, Walle T 2003 Cellular uptake and efflux of the tea flavonoid (-)-epicatechin-3-gallate in the human intestinal cell line Caco-2, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 307: 745-752
- 95 Walle UK, French KL, Walgren RA, Walle T 1999 Transport of genistein-7-glucoside by human intestinal Caco-2 cells: potential role for MRP2, *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 103: 45-56
- 96 Chen J, Lin H, Hu M 2005 Absorption and metabolism of genistein and its five isoflavone analogs in the human intestinal Caco-2 model, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 55: 159-169
- 97 Kelly GE, Nelson C, Waring MA, Joannou GE, Reeder AY 1993 Metabolites of dietary (soya) isoflavones in human urine, *Clin. Chim. Acta* 223: 9-22
- 98 Chang YC, Nair MG 1995 Metabolism of daidzein and genistein by intestinal bacteria, *J. Nat. Prod.* 58: 1892-1896
- 99 Joannou GE, Kelly GE, Reeder AY, Waring M, Nelson C 1995 A urinary profile study of dietary phytoestrogens. The identification and mode of metabolism of new isoflavonoids, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 54: 167-184
- 100 Adlercreutz CH, Goldin BR, Gorbach SL, Hockerstedt KA, Watanabe S, Hamalainen EK, Markkanen MH, Makela TH, Wahala KT, Adlercreutz T 1995 Soybean phytoestrogen intake and cancer risk, *J. Nutr.* 125: 757S-767S
- 101 Heinonen S, Wahala K, Adlercreutz H 1999 Identification of isoflavone metabolites dihydrodaidzein, dihydrogenistein, 6'-OH-O-dma and cis-4-OH-equol in human urine by GC-MS using authentic reference compounds, *Anal. Biochem.* 274: 211-219
- 102 Coldham NG, Howells LC, Santi A, Montesissa C, Langlais C, King LJ, Macpherson DD, Sauer MJ 1999 Biotransformation of genistein in the rat: elucidation of metabolite structure by product ion mass fragmentology, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 70: 169-184
- 103 Coldham NG, Darby C, Hows M, King LJ, Zhang A-Q, Sauer MJ 2002 Comparative metabolism of genistin by human and rat gut microflora: detection and identification of the end-products of metabolism, *Xenobiotica* 32: 45-62

- 104 Heinonen SM, Hikkala A, Wahala K, Adlercreutz H 2003 Metabolism of the soy isoflavones daidzein, genistein and glycitein in human subjects. Identification of new metabolites having an intact isoflavonoid skeleton, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 87: 285-299
- 105 Setchell KDR, Brown NM, Lydeking-Olsen E 2002 The clinical importance of the metabolite equol - a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones, *J. Nutr.* 132: 3577-3584
- 106 Rowland IR, Wiseman H, Sanders TA, Adlercreutz H, Bowey EA 2000 Interindividual variation in metabolism of soy isoflavones and lignans: influence of habitual diet on equol production by the gut microflora, *Nutr. Cancer* 36: 27-32
- 107 Arai Y, Uehara M, Sato Y, Kimira M, Eboshida A, Adlercreutz H, Watanabe S 2000 Comparison of isoflavones among dietary intake, plasma concentration and urinary excretion for accurate estimation of phytoestrogen intake, *J. Epidemiol.* 10: 127-135
- 108 Frankenfeld CL, Atkinson C, Thomas WK, Goode EL, Gonzalez A, Jokela T, Wahala K, Schwartz SM, Li SS, Lampe JW 2005 Familial correlations, segregation analysis, and non-genetic correlates of soy isoflavone-metabolizing phenotypes, *Exp. Biol. Med.* 229: 902-913
- 109 Setchell KDR, Clerici C, Lephart ED, Cole SJ, Heenan C, Castellani D, Wolfe BE, Nechemias-Zimmer L, Brown NM, Lund TD, Handa RJ, Heubi JE 2005 S-Equol, a potent ligand for estrogen receptor beta, is the exclusive enantiomeric form of the soy isoflavone metabolite produced by human intestinal bacterial flora, *Am. J. Clin. Nutr.* 81: 1072-1079
- 110 Rüfer CE, Donauer E, Machowetz A, Metzler M, Kulling SE In vitro and in vivo metabolism of the soy isoflavone glycitein, in Vorbereitung
- 111 Bowey E, Adlercreutz H, Rowland I 2003 Metabolism of isoflavones and lignans by the gut microflora: a study in germ-free and human flora associated rats, *Food Chem. Toxicol.* 41: 631-636
- 112 Atkinson C, Berman S, Humbert O, Lampe JW 2004 In vitro incubation of human feces with daidzein and antibiotics suggests interindividual differences in the bacteria responsible for equol production, *J. Nutr.* 134: 596-599
- 113 Rowland I, Faughnan M, Hoey L, Wahala K, Williamson G, Cassidy A 2003 Bioavailability of phyto-oestrogens, *Br. J. Nutr.* 89: S45-S58
- 114 Wang XL, Shin KH, Hur HG, Kim SI 2005 Enhanced biosynthesis of dihydrodaidzein and dihydrogenistein by a newly isolated bovine rumen anaerobic bacterium, *J. Biotechnol.* 115: 261-269
- 115 Schofer L, Mohan R, Braune A, Birringer M, Blaut M 2002 Anaerobic C-ring cleavage of genistein and daidzein by *Eubacterium ramulus*, *FEMS Microbiol. Lett.* 208: 197-202
- 116 Wang XL, Hur HG, Lee JH, Kim KT, Kim SI 2005 Enantioselective synthesis of S-equol from dihydrodaidzein by a newly isolated anaerobic human intestinal bacterium, *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 214-219
- 117 Decroos K, Vanhemmens S, Cattoir S, Boon N, Verstraete W 2005 Isolation and characterisation of an equol-producing mixed microbial culture from a human faecal sample and its activity under gastrointestinal conditions, *Arch. Microbiol.* 183: 45-55
- 118 Hur H-G, Rafii F 2000 Biotransformation of the isoflavonoids biochanin A, formononetin and glycitein by *Eubacterium limosum*, *FEMS Microbiol. Lett.* 192: 21-25
- 119 Kulling SE, Honig DM, Simat TJ, Metzler M 2000 Oxidative in vitro metabolism of the soy phytoestrogens daidzein and genistein, *J. Agric. Food Chem.* 48: 2910-2919
- 120 Kulling SE, Honig DM, Metzler M 2001 Oxidative metabolism of the soy isoflavones daidzein and genistein in humans in vitro and in vivo, *J. Agric. Food Chem.* 49: 3024-3033
- 121 Roberts-Kirchhoff ES, Crowley JR, Hollenberg PF, Kim H 1999 Metabolism of genistein by rat and human cytochrome P450s, *Chem. Res. Toxicol.* 12: 610-616
- 122 Rüfer CE, Glatt HR, Kulling SE Metabolism of the isoflavan equol, *Drug Metab. Disp., zur Veröffentlichung eingereicht*
- 123 Heinonen SM, Wahala K, Liukkonen KH, Aura AM, Poutanen K, Adlercreutz H 2004 Studies of the in vitro intestinal metabolism of isoflavones aid in the identification of their urinary metabolites, *J. Agric. Food Chem.* 52: 2640-2646
- 124 Lampe JW, Karr SC, Hutchins AM, Slavin JL 1998 Urinary equol excretion with soy challenge: influence of habitual diet, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 217: 335-339

- 125 Adlercreutz H, van der Wildt J, Kinzel J, Attalla H, Wahala K, Makela T, Hase T, Fotsis T 1995 Lignan and isoflavonoid conjugates in human urine, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 52: 97-103
- 126 Shelnutt SR, Cimino CO, Wiggins PA, Ronis MJ, Badger TM 2002 Pharmacokinetics of the glucuronide and sulfate conjugates of genistein and daidzein in men and women after consumption of a soy beverage, *Am. J. Clin. Nutr.* 76: 588-594
- 127 Setchell KDR, Gosselin SJ, Wlesh MB, Johnston JO, Balistreri WF, Kramer LW, Dressler BL, Tarr MJ 1987 Dietary estrogens - a probable cause of infertility and liver disease in captive cheetah, *Gastroenterology* 93: 225-233
- 128 Doerge DR, Chang HC, Churchwell MI, Holder CL 2000 Analysis of soy isoflavone conjugation in vitro and in human blood using liquid chromatography-mass spectrometry, *Drug Metab. Dispos.* 28: 298-307
- 129 Rüfer CE, Meini W, Glatt HR, Kulling SE Phase-II-metabolism of soy isoflavones and their metabolites in vitro, *J. Agric. Food Chem.*, zur Veröffentlichung eingereicht
- 130 Nakano H, Ogura K, Takahashi E, Harada T, Nishiyama T, Muro K, Hiratsuka A, Kadota S, Watabe T 2004 Regioselective monosulfation and disulfation of the phytoestrogens daidzein and genistein by human liver sulfotransferases, *Drug Metab. Pharmacokinet.* 19: 216-226
- 131 Clarke DB, Lloyd AS, Botting NP, Oldfield MF, Needs PW, Wiseman H 2002 Measurement of intact sulfate and glucuronide conjugates in human urine using isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry with [<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]isoflavone internal standards, *Anal. Biochem.* 309: 158-172
- 132 Sfakianos J, Coward L, Kirk M, Barnes S 1997 Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats, *J. Nutr.* 127: 1260-1268
- 133 Lampe JW 2003 Isoflavonoid and lignan phytoestrogens as dietary biomarkers, *J. Nutr.* 133: 956S-964S
- 134 Coldham NG, Sauer MJ 2000 Pharmacokinetics of [C-14]genistein in the rat: gender-related differences, potential mechanisms of biological action, and implications for human health, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 164: 206-215
- 135 Chang HC, Churchwell MI, Delcos KB, Newbold RR, Doerge DR 2000 Mass spectrometric determination of genistein tissue distribution in diet-exposed Sprague-Dawley rats, *J. Nutr.* 130: 1963-1970
- 136 T'ien-Li Y, Hsiu-Yuan C 1977 The metabolic fate of daidzein, *Scientia Sinica* 20: 513-521
- 137 Janning P, Schuhmacher US, Upmeier A, Diel P, Michna H, Degen GH, Bolt HM 2000 Toxicokinetics of the phytoestrogen daidzein in female DA/Han rats, *Arch. Toxicol.* 74: 421-430
- 138 Weber KS, Jacobson NA, Setchell KD, Lephart ED 1999 Brain aromatase and 5 $\alpha$ -reductase, regulatory behaviors and testosterone levels in adult rats on phytoestrogen diets, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 221: 131-135
- 139 Degen GH, Janning P, Diel P, Michna H, Bolt HM 2002 Transplacental transfer of the phytoestrogen daidzein in DA/Han rats, *Arch. Toxicol.* 76: 23-29
- 140 Doerge DR, Churchwell MI, Chang HC, Newbold RR, Delclos KB 2001 Placental transfer of the soy isoflavone genistein following dietary and gavage administration to Sprague Dawley rats, *Reprod. Toxicol.* 15: 105-110
- 141 Csanady GA, Oberste-Frielinghaus HR, Semder B, Baur C, Schneider KT, Filser JG 2002 Distribution and unspecific protein binding of the xenoestrogens bisphenol A and daidzein, *Arch. Toxicol.* 76: 299-305
- 142 Hargreaves DF, Potten CS, Harding C, Shaw LE, Morton MS, Roberts SA, Howell A, Bundred NJ 1999 Two-week soy supplementation has an estrogenic effect on normal premenopausal breast, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84: 4017-4024
- 143 Maubach J, Bracke ME, Heyerick A, Depyere HT, Serreyn RF, Mareel MM, de Keukeleire D 2003 Quantification of soy-derived phytoestrogens in human breast tissue and biological fluids by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B* 784: 137-144
- 144 Morton MS, Chan PS, Cheng C, Blacklock N, Matos-Ferreira A, Abranches-Monteiro L, Correia R, Lloyd S, Griffiths K 1997 Lignans and isoflavonoids in plasma and prostatic fluids in men: samples from Portugal, Hong Kong, and the United Kingdom, *Prostate* 32: 122-128

- 145 Hong SJ, Kim SI, Kwon SM, Lee JR, Chung BC 2002 Comparative study of concentration of isoflavones and lignans in plasma and prostatic tissues of normal and benign prostatic hyperplasia, *Yonsei Med. J.* 43: 236-241
- 146 Adlercreutz H, Yamada T, Wahala K, Watanabe S 1999 Maternal and neonatal phytoestrogens in Japanese women during birth, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 180: 737-743
- 147 Karr SC, Lampe JW, Hutchins AM, Slavin JL 1997 Urinary isoflavonoid excretion in humans is dose dependent at low to moderate levels of soy protein consumption, *Am. J. Clin. Nutr.* 66: 46-51
- 148 Rüfer CE, Kulling SE Phytoestrogene. In: Dunkelberg H, Gebel T, Hartwig A (Hrsg.) *Handbuch der Lebensmitteltoxikologie*, Wiley-VCH, Weinheim, zur Veröffentlichung eingereicht
- 149 Mykkanen H, Tikka J, Pitkanen T, Hanninen O 1997 Fecal bacterial enzyme activities in infants increase with age and adoption of adult-type diet, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 25: 312-316
- 150 Setchell KD, Zimmer-Nechemias L, Cai J, Heubi JE 1997 Exposure of infants to phytoestrogens from soy-based infant formula, *Lancet* 350: 23-27
- 151 Setchell KDR, Zimmer-Nechemias L, Cai J, Heubi JE 1998 Isoflavone content of infant formulas and the metabolic fate of those phytoestrogens in early life, *Am. J. Clin. Nutr.* 68: 1435S-1461S
- 152 Hoey L, Rowland IR, Lloyd AS, Clarke DB, Wiseman H 2004 Influence of soya-based infant formula consumption on isoflavone and gut microflora metabolite concentrations in urine and on faecal microflora composition and metabolic activity in infants and children, *Br. J. Nutr.* 91: 607-616
- 153 Mascarinec G, Oshiro C, Morimoto Y, Hebshi S, Rovotny R, Franke AA 2005 Urinary isoflavone excretion as compliance measure in a soy intervention among young girls: a pilot study, *Eur. J. Clin. Nutr.* 59: 369-375
- 154 Faughnan MS, Hawdon A, Ah-Singh E, Brown J, Millward DJ, Cassidy A 2004 Urinary isoflavone kinetics: the effect of age, gender, food matrix and chemical composition, *Br. J. Nutr.* 91: 567-574
- 155 Adlercreutz H, Fotsis T, Lampe J, Wahala K, Makela T, Brunow G, Hase T 1993 Quantitative determination of lignans and isoflavonoids in plasma of omnivorous and vegetarian women by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry, *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 215: 5-18
- 156 Adlercreutz H, Honjo H, Higashi A, Fotsis T, Hamalainen E, Hasegawa T, Okada H 1991 Urinary excretion of lignans and isoflavonoid phytoestrogens in Japanese men and women consuming a traditional Japanese diet, *Am. J. Clin. Nutr.* 54: 1093-1100
- 157 Setchell KDR, Cassidy A 1999 Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health, *J. Nutr.* 129: 758S-767S
- 158 Tew B-Y, Xu X, Wang H-J, Murphy PA, Hendrich S 1996 A diet high in wheat fiber decreases the bioavailability of soybean isoflavones in a single meal fed to women, *J. Nutr.* 126: 871-877
- 159 Adlercreutz H, Hockerstedt K, Bannwart C, Bloigu S, Hamalainen E, Fotsis T, Ollus A 1987 Effects of dietary components, including lignans and phytoestrogens, on enterohepatic circulation and liver metabolism of estrogens and on sex hormone binding globulin (SHBG), *J. Steroid Biochem.* 27: 1135-1144
- 160 Blakesmith SJ, Lyons-Wall PM, Joannou GE, Petocz P, Samman S 2005 Urinary isoflavonoid excretion is inversely associated with the ratio of protein to dietary fibre intake in young women, *Eur. J. Clin. Nutr.* 59: 284-290
- 161 Lampe JW, Skor HE, Li S, Wahala K, Howald WN, Chen C 2001 Wheat bran and soy protein feeding do not alter urinary excretion of the isoflavan equol in premenopausal women, *J. Nutr.* 131: 740-744
- 162 Xu X, Wang H-J, Murphy PA, Hendrich S 2000 Neither background diet nor type of soy food affects short-term isoflavone bioavailability in women, *J. Nutr.* 49: 3024-3033
- 163 Uehara M, Ohta A, Sakai K, Suzuki K, Watanabe S, Adlercreutz H 2001 Dietary fructooligosaccharides modify intestinal bioavailability of a single dose of genistein and daidzein and affect their urinary excretion and kinetics in blood of rats, *J. Nutr.* 131: 787-795



- 164 Hidaka H, Hirayama M, Tokunaga T, Eida T 1990 The effects of undigestible fructo-oligosaccharides on intestinal microflora and various physiological functions on human health, *Adv. Exp. Med. Biol.* 270: 105-117
- 165 Steer TE, Johnson IT, Gee JM, Gibson GR 2003 Metabolism of the soybean isoflavone glycoside genistin in vitro by human gut bacteria and the effect of prebiotics, *Br. J. Nutr.* 90: 635-642
- 166 Nettleton JA, Greany KA, Thomas W, Wangen KE, Adlercreutz H, Kurzer MS 2004 Plasma phytoestrogens are not altered by probiotic consumption in postmenopausal women with and without a history of breast cancer, *J. Nutr.* 134: 2998-2003
- 167 Bonorden MJ, Greany KA, Wangen KE, Phipps WR, Feirtag J, Adlercreutz H, Kurzer MS 2004 Consumption of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium longum* do not alter urinary equol excretion and plasma reproductive hormones in premenopausal women, *Eur. J. Clin. Nutr.* 58: 1635-1642
- 168 Hutchins AM, Slavin JL, Lampe JW 1995 Urinary isoflavonoid phytoestrogen and lignan excretion after consumption of fermented and unfermented soy products, *J. Am. Diet. Assoc.* 95: 545-551
- 169 Izumi T, Piskula MK, Osawa S, Obata A, Tobe K, Saito M, Kataoka S, Kubota Y, Kikuchi M 2000 Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans, *J. Nutr.* 130: 1695-1699
- 170 Zubik L, Meydani M 2003 Bioavailability of soybean isoflavones from aglycone and glucoside forms in American women, *Am. J. Clin. Nutr.* 77: 1459-1465
- 171 Zheng Y, Lee SO, Verbruggen MA, Murphy PA, Hendrich S 2004 The apparent absorptions of isoflavone glucosides and aglycones are similar in women and are increased by rapid gut transit time and low fecal isoflavone degradation, *J. Nutr.* 134: 2534-2539
- 172 Adlercreutz H, Mazur W 1997 Phyto-oestrogens and Western diseases, *Ann. Med.* 29: 95-120
- 173 Bingham SA, Atkinson C, Liggins J, Bluck L, Coward A 1998 Phyto-oestrogens: where are we now?, *Br. J. Nutr.* 79: 393-406
- 174 Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA 1997 Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta, *Endocrinology* 138: 863-870
- 175 Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA 1998 Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta, *Endocrinology* 139: 4252-4263
- 176 Morito K, Hirose T, Kinjo J, Hirakawa T, Okawa M, Nohara T, Ogawa S, Inoue S, Muramatsu M, Masamune Y 2001 Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta, *Biol. Pharm. Bull.* 24: 351-356
- 177 Kinjo J, Tsuchihashi R, Morito K, Hirose T, Aomori T, Nagao T, Okabe H, Nohara T, Masamune 2004 Interactions of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta (III). Estrogenic activities of soy isoflavone aglycones and their metabolites isolated from human urine, *Biol. Pharm. Bull.* 27: 185-188
- 178 Muthyala RS, Ju YH, Sheng S, Williams LD, Doerge DR, Katzenellenbogen BS, Helferich WG, Katzenellenbogen JA 2004 Equol, a natural estrogenic metabolite from soy isoflavones: convenient preparation and resolution of R- and S-equols and their differing binding and biological activity through estrogen receptors alpha and beta, *Bioorg. Med. Chem.* 12: 1559-1567
- 179 Jordan DC, Flood JG, LaPosata M, Lewandrowski KB 1992 Normal reference laboratory values, *New Engl. J. Med.* 327: 718
- 180 Mousavi Y, Adlercreutz H 1993 Genistein is an effective stimulator of sex hormone-binding globulin production in hepatocarcinoma human liver cancer cells and suppresses proliferation of these cells in culture, *Steroids* 58: 301-304
- 181 Adlercreutz H, Bannwart C, Wahala K, Makela T, Brunow G, Hase T, Arosemena PJ, Kellis JT Jr, Vickery LE 1993 Inhibition of human aromatase by mammalian lignans and isoflavonoid phytoestrogens, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 44: 147-153

- 182 Makela S, Poutanen M, Lehtimaki J, Kostian ML, Santti R, Vihko R 1995 Estrogen-specific 17 beta-hydroxysteroid oxidoreductase type 1 (E.C. 1.1.1.62) as a possible target for the action of phytoestrogens, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 208: 51-59
- 183 Brooks JD, Thompson LU 2005 Mammalian lignans and genistein decrease the activities of aromatase and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase in MCF-7 cells, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 94: 461-467
- 184 Martin ME, Haourigui M, Pelissero C, Benassayag C, Nunez EA 1996 Interactions between phytoestrogens and human sex steroid binding protein, *Life Sci.* 58: 429-436
- 185 Dechaud H, Ravard C, Claustrat F, de la Perriere AB, Pugeat M 1999 Xenoestrogen interaction with human sex hormone-binding globulin (hSHBG), *Steroids* 64: 328-334
- 186 Wong CK, Keung WM 1997 Daidzein sulfoconjugates are potent inhibitors of sterol sulfatase (EC 3.1.6.2), *Biochem. Biophys Res. Commun.* 233: 579-583
- 187 Duncan AM, Merz BE, Xu X, Nagel TC, Phipps WR, Kurzer MS 1999 Soy isoflavones exert modest hormonal effects in premenopausal women, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84: 192-197
- 188 Duncan AM, Merz-Demlow BE, Xu X, Phipps WR, Kurzer MS 2000 Premenopausal equol excretors show plasma hormone profiles associated with lowered risk of breast cancer, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 9: 581-586
- 189 Nettleton JA, Greany KA, Thomas W, Wangen KE, Adlercreutz H, Kurzer MS 2005 The effect of soy consumption on the urinary 2:16-hydroxyestrone ratio in postmenopausal women depends on equol production status but is not influenced by probiotic consumption, *J. Nutr.* 135: 603-608
- 190 Low YL, Taylor JI, Grace PB, Dowsett M, Scollen S, Dunning AM, Mulligan AA, Welch AA, Luben RN, Khaw KT, Day NE, Wareham NJ, Bingham SA 2005 Phytoestrogens exposure correlation with plasma estradiol in postmenopausal women in European Prospective Investigation of Cancer and Nutrition-Norfolk may involve diet-gene interactions, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14: 213-220
- 191 Kurzer MS, Xu X 1997 Dietary phytoestrogens, *Annu. Rev. Nutr.* 17: 353-381
- 192 Zava DT, Duwe G 1997 Estrogenic and antiproliferative properties of genistein and other flavonoids in human breast cancer cells in vitro, *Nutr. Cancer.* 27: 31-40
- 193 Hsieh CY, Santell RC, Haslam SZ, Helferich WG 1998 Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells in vitro and in vivo, *Cancer Res.* 58: 3833-3838
- 194 Halliwell B, Gutteridge JMC 1990 The antioxidants of human extracellular fluids, *Arch. Biochem. Biophys.* 280: 1-8
- 195 McCord JM 1993 Human disease, free radicals and oxidant/antioxidant balance, *Clin. Biochem.* 26: 1273-1280
- 196 Löffler G, Petrides PE 1998 *Biochemie und Pathobiochemie*, 6. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, New, York, Tokyo
- 197 Sies H 1997 Oxidative stress: oxidants and antioxidants, *Exp. Physiol.* 82: 291-295
- 198 Yu BP 1994 Cellular defences against damage from reactive oxygen species, *Physiol. Rev.* 74: 139-162
- 199 Clarkson PM, Thompson HS 2000 Antioxidants: what role do they play in physical activity and health?, *Am. J. Clin. Nutr.* 72: 637-646
- 200 Halliwell B, Gutteridge JMC 1989 Iron toxicity and oxygen radicals, *Baillieres Clin. Haematol.* 2: 195-256
- 201 Fang JL, Vaca CE, Valsta LM, Mutanen M 1996 Determination of DNA adducts of malondialdehyde in humans: effects of dietary fatty acid composition, *Carcinogenesis* 17: 1035-1040
- 202 Chan AC 1998 Vitamin E and atherosclerosis, *J. Nutr.* 128: 1593-1596
- 203 Pawlak W, Kedziora J, Zolynski K, Kedziora-Kornatowska K, Blaszczyk J, Witkowski P, Zieleniewski J 1998 Effect of long term bed rest in men on enzymatic antioxidative defence and lipid peroxidation in erythrocytes, *J. Gravit. Physiol.* 5: 163-164
- 204 Araya J, Rodrigo R, Videla L, Thielmann L, Orellana M, Pettinelli P, Poniachik J 2004 Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n-6/n-3 ratio in relation to hepatic steatosis in non-alcoholic fatty liver disease patients, *Clin. Sci.* 106: 635-643

- 205 Mitchell JH, Gardner PT, McPhail DB, Morrice PC, Collins AR, Duthie GG 1998 Antioxidant efficacy of phytoestrogens in chemical and biological model systems, *Arch. Biochem. Biophys.* 360: 142-148
- 206 Arora A, Nair MG, Strasburg GM 1998 Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system, *Arch. Biochem. Biophys.* 356: 133-141
- 207 Guo Q, Rimbach G, Moini H, Weber S, Packer L 2002 ESR and cell culture studies on free radical-scavenging and antioxidant activities of isoflavonoids, *Toxicology* 179: 171-180
- 208 Turner R, Baron T, Wolfram S, Minihane AM, Cassidy A, Rimbach G, Weinberg PD 2004 Effect of circulating forms of soy isoflavones on the oxidation of low density lipoprotein, *Free Radic. Res.* 38: 209-216
- 209 Zielonka J, Gebicki J, Gryniewicz G 2003 Radical scavenging properties of genistein, *Free Radic. Biol. Med.* 35: 958-965
- 210 Arora A, Valcic S, Cornejo S, Nair MG, Timmermann BN, Liebler DC 2000 Reactions of Genistein with alkylperoxyl, *Chem. Res. Toxicol.* 13: 638-645
- 211 Gieseg SP, Esterbauer H 1994 Low density lipoprotein is saturable by prooxidant copper, *FEBS Lett.* 343: 188-194
- 212 Hwang J, Sevanian A, Hodis HN, Ursini F 2000 Synergistic inhibition of LDL oxidation by phytoestrogens and ascorbic acid, *Free Radic. Biol. Med.* 29: 79-89
- 213 Ferretti G, Bacchetti T, Menanno F, Curatola G 2004 Effect of genistein against copper-induced lipid peroxidation of human high density lipoproteins (HDL), *Atherosclerosis* 172: 55-61
- 214 Rimbach G, Weinberg PD, de Pascual-Teresa S, Alonso MG, Ewins BA, Turner R, Minihane AM, Botting N, Fairley B, Matsugo S, Uchida Y, Cassidy A 2004 Sulfation of genistein alters its antioxidant properties and its effect on platelet aggregation and monocyte and endothelial function, *Biochim. Biophys. Acta* 1670: 229-237
- 215 Choi C, Cho H, Park J, Cho C, Song Y 2003 Suppressive effects of genistein on oxidative stress and NFkappaB activation in RAW 264.7 macrophages, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67: 1916-1922
- 216 Tikkanen MJ, Wahala K, Ojala S, Vihma V, Adlercreutz H 1999 Effect of soybean phytoestrogen intake on low density lipoprotein oxidation resistance, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 3106-3110
- 217 Wiseman H, O'Reilly JD, Adlercreutz H, Mallet AI, Bowey EA, Rowland IR, Sanders TA 2000 Isoflavone phytoestrogens consumed in soy decrease F(2)-isoprostane concentrations and increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans, *Am. J. Clin. Nutr.* 72: 395-400
- 218 Jenkins DJ, Kendall CW, Garsetti M, Rosenberg-Zand RS, Jackson CJ, Agarwal S, Rao AV, Diamandis EP, Parker T, Faulkner D, Vuksan V, Vidgen E 2000 Effect of soy protein foods on low-density lipoprotein oxidation and ex vivo sex hormone receptor activity - a controlled crossover trial, *Metabolism* 49: 537-543
- 219 Djuric Z, Chen G, Doerge DR, Heilbrun LK, Kucuk O 2001 Effect of soy isoflavone supplementation on markers of oxidative stress in men and women, *Cancer Lett.* 172: 1-6
- 220 Chen CY, Bakhiet RM, Hart V, Holtzman G 2005 Isoflavones improve plasma homocysteine status and antioxidant defense system in healthy young men at rest but do not ameliorate oxidative stress induced by 80% VO(2) exercise, *Ann. Nutr. Metab.* 49: 33-41
- 221 Samman S, Lyons Wall PM, Chan GS, Smith SJ, Petocz P 1999 The effect of supplementation with isoflavones on plasma lipids and oxidisability of low density lipoprotein in premenopausal women, *Atherosclerosis* 147: 277-283
- 222 Hodgson JM, Puddey IB, Croft KD, Mori TA, Rivera J, Beilin LJ 1999 Isoflavonoids do not inhibit in vivo lipid peroxidation in subjects with high-normal blood pressure, *Atherosclerosis* 145: 167-172
- 223 Pool-Zobel BL, Adlercreutz H, Gleis M, Liegibel UM, Sittlington J, Rowland I, Wahala K, Rechkemmer G 2000 Isoflavonoids and lignans have different potentials to modulate oxidative genetic damage in human colon cells, *Carcinogenesis* 21: 1247-1252

- 224 Vega-Lopez S, Yeum KJ, Lecker JL, Ausman LM, Johnson EJ, Devaraj S, Jialal I, Lichtenstein AH 2005 Plasma antioxidant capacity in response to diets high in soy or animal protein with or without isoflavones, *Am. J. Clin. Nutr.* 81: 43-49
- 225 Parthasarathy S, Steinberg D, Witztum JL 1992 The role of oxidized low-density lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis, *Annu. Rev. Med.* 43: 219-225
- 226 Steinberg D, Witztum JL 2002 Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis?, *Circulation* 105: 2107-2111
- 227 Fruebis J, Bird DA, Pattison J, Palinski W 1999 Extent of antioxidant protection of plasma LDL is not a predictor of the antiatherogenic effect of antioxidants, *J. Lipid Res.* 38: 2455-2464
- 228 Witting P, Pettersson K, Ostlund-Lindqvist AM, Westerlund C, Wagberg M, Stocker R 1999 Dissociation of atherogenesis from aortic accumulation of lipid hydro(pero)xides in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits, *J. Clin. Invest.* 104: 213-220
- 229 Stewart BW, Kleihues P (Hrsg.) 2003 World cancer report, IARC Press, London, 181-269
- 230 Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Raymond L, Young J (Hrsg.) 1997 Cancer incidence in five continents, IARC Press, Lyon, Vol. 3
- 231 Lee HP, Gourley L, Duffy SW, Esteve J, Lee J, Day NE 1991 Dietary effects on breast-cancer risk in Singapore, *Lancet* 337: 1197-200
- 232 Witte JS, Ursin G, Siemiatycki J, Thompson WD, Paganini-Hill A, Haile RW 1997 Diet and premenopausal bilateral breast cancer: a case-control study, *Breast Cancer Res. Treat.* 42: 243-251
- 233 Henderson BE, Ross RK, Judd HL, Krailo MD, Pike MC 1985 Do regular ovulatory cycles increase breast cancer risk?, *Cancer* 56: 1206-1208
- 234 Xu X, Duncan AM, Merz BE, Kurzer MS 1998 Effects of soy isoflavones on estrogen and phytoestrogen metabolism in premenopausal women, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 7: 1101-1108
- 235 Martini MC, Dancisak BB, Haggans CJ, Thomas W, Slavin JL 1999 Effects of soy intake on sex hormone metabolism in premenopausal women, *Nutr. Cancer* 34: 133-139
- 236 Xu X, Duncan AM, Wangen KE, Kurzer MS 2000 Soy consumption alters endogenous estrogen metabolism in postmenopausal women, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 9: 781-786
- 237 Wu AH, Wan P, Hankin J, Tseng CC, Yu MC, Pike MC 2002 Adolescent and adult soy intake and risk of breast cancer in Asian-Americans, *Carcinogenesis* 23: 1491-1496
- 238 Henderson BE, Ross RK, Pike MC 1991 Toward the primary prevention of cancer, *Science* 254: 1131-1138
- 239 Hoel DG, Davis DL, Miller AB, Sondik EJ, Swerdlow AJ 1992 Trends in cancer mortality in 15 industrialized countries, 1969-1986, *J. Natl. Cancer Inst.* 84: 313-320
- 240 Hilakivi-Clarke L, Onojafe I, Raygada M, Cho E, Skaar T, Russo I, Clarke R 1999 Prepubertal exposure to zearalenone or genistein reduces mammary tumorigenesis, *Br. J. Cancer* 80: 1682-1688
- 241 Cohen LA, Zhao Z, Pittman B, Scimeca JA 2000 Effect of intact and isoflavone-depleted soy protein on NMU-induced rat mammary tumorigenesis, *Carcinogenesis* 21: 929-935
- 242 Lamartiniere CA, Wang J, Smith-Johnson M, Eltoum IE 2002 Daidzein: bioavailability, potential for reproductive toxicity, and breast cancer chemoprevention in female rats, *Toxicol. Sci.* 65: 228-238
- 243 Allred CD, Allred KF, Ju YH, Virant SM, Helferich WG 2001 Soy diets containing varying amounts of genistein stimulate growth of estrogen-dependent (MCF-7) tumors in a dose-dependent manner, *Cancer Res.* 61: 5045-5050
- 244 Allred CD, Ju YH, Allred KF, Chang J, Helferich WG 2001 Dietary genistin stimulates growth of estrogen-dependent breast cancer tumors similar to that observed with genistein, *Carcinogenesis* 22: 1667-1673
- 245 Ju YH, Allred CD, Allred KF, Karko KL, Doerge DR, Helferich WG 2001 Physiological concentrations of dietary genistein dose-dependently stimulate growth of estrogen-dependent human breast cancer (MCF-7) tumors implanted in athymic nude mice, *J. Nutr.* 131: 2957-2962

- 246 Allred CD, Allred KF, Ju YH, Clausen LM, Doerge DR, Schantz SL, Korol DL, Wallig MA, Helferich WG 2004 Dietary genistein results in larger MNU-induced, estrogen-dependent mammary tumors following ovariectomy of Sprague-Dawley rats, *Carcinogenesis* 25: 211-218
- 247 Allred CD, Allred KF, Ju YH, Goepfing TS, Doerge DR, Helferich WG 2004 Soy processing influences growth of estrogen-dependent breast cancer tumors, *Carcinogenesis* 25: 1649-1657
- 248 Petrakis NL, Barnes S, King EB, Lowenstein J, Wiencke J, Lee MM, Miike R, Kirk M, Coward L 1996 Stimulatory influence of soy protein isolate on breast secretion in pre- and postmenopausal women, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 5: 785-794
- 249 Grace PB, Taylor JI, Low YL, Luben RN, Mulligan AA, Botting NP, Dowsett M, Welch AA, Khaw KT, Wareham NJ, Day NE, Bingham SE 2004 Phytoestrogen concentrations in serum and spot urine as biomarkers for dietary phytoestrogen intake and their relation to breast cancer risk in European Prospective Investigation of Cancer and Nutrition-Norfolk, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 13: 698-708
- 250 Bylund A, Zhang JX, Bergh A, Damber JE, Widmark A, Johansson A, Adlercreutz H, Aman P, Shepherd MJ, Hallmans G 2000 Rye bran and soy protein delay growth and increase apoptosis of human LNCaP prostate adenocarcinoma in nude mice, *Prostate* 42: 304-314
- 251 Onozawa M, Kawamori T, Baba M, Fukuda K, Toda T, Sato H, Ohtani M, Akaza H, Sugimura T, Wakabayashi K 1999 Effects of a soybean isoflavone mixture on carcinogenesis in prostate and seminal vesicles of F344 rats, *Jpn. J. Cancer Res.* 90: 393-398
- 252 Mentor-Marcel R, Lamartiniere CA, Eltoum IE, Greenberg NM, Elgavish A 2001 Genistein in the diet reduces the incidence of poorly differentiated prostatic adenocarcinoma in transgenic mice (TRAMP), *Cancer Res.* 61: 6777-6782
- 253 Mentor-Marcel R, Lamartiniere CA, Eltoum IA, Greenberg NM, Elgavish A 2005 Dietary genistein improves survival and reduces expression of osteopontin in the prostate of transgenic mice with prostatic adenocarcinoma (TRAMP), *J. Nutr.* 135: 989-995
- 254 Stephens FO 1997 Phytoestrogens and prostate cancer: a possible preventive role, *Med. J. Aust.* 167: 138-140
- 255 Lee MM, Wang RT, Hsing AW, Gu FL, Wang T, Spitz M 1998 Case-control study of diet and prostate cancer in China, *Cancer Causes Control* 9: 545-552
- 256 Villeneuve PJ, Johnson KC, Kreiger N, Mao Y 1999 Risk factors for prostate cancer: results from the Canadian National Enhanced Cancer Surveillance System. The Canadian Cancer Registries Epidemiology Research Group, *Cancer Causes Control* 10: 355-367
- 257 Kolonel LN, Hankin JH, Whittemore AS, Wu AH, Gallagher RP, Wilkens LR, John EM, Howe GR, Dreon DM, West DW, Paffenbarger RS Jr 2000 Vegetables, fruits, legumes and prostate cancer: a multiethnic case-control study, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 9: 795-804
- 258 Akaza H, Miyanaga N, Takashima N, Naito S, Hirao Y, Tsukamoto T, Fujioka T, Mori M, Kim WJ, Song JM, Pantuck AJ 2004 Comparisons of percent equol producers between prostate cancer patients and controls: case-controlled studies of isoflavones in Japanese, Korean and American residents, *Jpn. J. Clin. Oncol.* 34: 86-89
- 259 Ozasa K, Nakao M, Watanabe Y, Hayashi K, Miki T, Mikami K, Mori M, Sakauchi F, Washio M, Ito Y, Suzuki K, Wakai K, Tamakoshi A, JACC Study Group 2004 Serum phytoestrogens and prostate cancer risk in a nested case-control study among Japanese men, *Cancer Sci.* 95: 65-71
- 260 Cohen LA, Zhao Z, Pittman B, Scimeca J 2003 Effect of soy protein isolate and conjugated linoleic acid on the growth of Dunning R-3327-AT-1 rat prostate tumors, *Prostate* 54: 169-180
- 261 Newbold RR, Banks EP, Bullock B, Jefferson WN 2001 Uterine adenocarcinoma in mice treated neonatally with genistein, *Cancer Res.* 61: 4325-4328
- 262 Hale GE, Hughes CL, Cline JM 2001 Endometrial cancer: hormonal factors, the perimenopausal "window of risk," and isoflavones, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87: 3-15
- 263 Balk JL, Whiteside DA, Naus G, DeFerrari E, Roberts JM 2002 A pilot study of the effects of phytoestrogen supplementation on postmenopausal endometrium, *J. Soc. Gynecol. Investig.* 9: 238-242

- 264 Nikander E, Rutanen EM, Nieminen P, Wahlstrom T, Ylikorkala O, Tiitinen A 2005 Lack of effect of isoflavonoids on the vagina and endometrium in postmenopausal women, *Fertil. Steril.* 83: 137-142
- 265 Sudhir K, Jennings GL, Funder JW, Komesaroff PA 1997 Estrogen enhances basal nitric oxide release in the forearm vasculature in perimenopausal women, *Hypertension* 28: 330-334
- 266 Beaglehole R 1990 International trends in coronary heart disease mortality, morbidity, and risk factors, *Epidemiol. Rev.* 12: 1-15
- 267 Washburn S, Burke GL, Morgan T, Anthony M 1999 Effect of soy protein supplementation on serum lipoproteins, blood pressure, and menopausal symptoms in perimenopausal women, *Menopause* 6: 7-13
- 268 Simons LA, von Konigsmark M, Simons J, Celermajer DS 2000 Phytoestrogens do not influence lipoprotein levels or endothelial function in healthy, postmenopausal women, *Am. J. Cardiol.* 85: 1297-301
- 269 Teede HJ, Dalais FS, Kotsopoulos D, Liang YL, Davis S, McGrath BP 2001 Dietary soy has both beneficial and potentially adverse cardiovascular effects: a placebo-controlled study in men and postmenopausal women, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86: 3053-3060
- 270 Sirtori CR, Lovati MR 2001 Soy proteins and cardiovascular disease, *Curr. Atheroscler. Rep.* 3: 47-53
- 271 Uesugi T, Fukui Y, Yamori Y 2002 Beneficial effects of soybean isoflavone supplementation on bone metabolism and serum lipids in postmenopausal Japanese women: a four-week study, *J. Am. Coll. Nutr.* 21: 97-102
- 272 Dewell A, Hollenbeck CB, Bruce B 2002 The effects of soy-derived phytoestrogens on serum lipids and lipoproteins in moderately hypercholesterolemic postmenopausal women, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87: 118-121
- 273 Zhan S, Ho SC 2005 Meta-analysis of the effects of soy protein containing isoflavones on the lipid profile, *Am. J. Clin. Nutr.* 81: 397-408
- 274 van der Schouw YT, Pijpe A, Lebrun CE, Bots ML, Peeters PH, van Staveren WA, Lamberts SW, Grobbee DE 2002 Higher usual dietary intake of phytoestrogens is associated with lower aortic stiffness in postmenopausal women, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22: 1316-1322
- 275 Adams MR, Golden DL, Franke AA, Potter SM, Smith HS, Anthony MS 2004 Dietary soy beta-conglycinin (7S globulin) inhibits atherosclerosis in mice, *J. Nutr.* 134: 511-516
- 276 Wagner JD, Schwenke DC, Greaves KA, Zhang L, Anthony MS, Blair RM, Shadoan MK, Williams JK 2003 Soy protein with isoflavones, but not an isoflavone-rich supplement, improves arterial low-density lipoprotein metabolism and atherogenesis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23: 2241-2246
- 277 Eden J 1998 Phytoestrogens and the menopause, *Baillieres Clin. Endocrin. Metab.* 12: 581-587
- 278 Ito M, Nishida A, Uetani M, Hayashi K 2001 Osteoporosis in the Japanese population, *Sem. Musculoskel Radiol.* 5: 121-126
- 279 Quella SK, Loprinzi CL, Barton DL, Knost JA, Sloan KA, LaVasseur BI, Swan D, Krupp KR, Miller KD, Novotny PJ 2000 Evaluation of soy phytoestrogens for the treatment of hot flashes in breast cancer survivors: a north central cancer treatment group trial, *J. Clin. Oncol.* 18: 1068-1074
- 280 Knight DC, Howes JB, Eden JA, Howes LG 2001 Effects on menopausal symptoms and acceptability of isoflavone-containing soy powder dietary supplementation, *Climacteric* 4: 13-18
- 281 Van Patten CL, Olivotto IA, Chambers GK, Gelmon KA, Hislop TG, Templeton E, Wattie A, Prior JC 2002 Effect of soy phytoestrogens on hot flashes in postmenopausal women with breast cancer: a randomized, controlled clinical trial, *J. Clin. Oncol.* 20: 1449-1455
- 282 Baber RJ, Templeman C, Morton T, Kelly GE, West L 1999 Randomized placebo-controlled trial of an isoflavone supplement and menopausal symptoms in women, *Climacteric* 2: 85-92
- 283 Van der Weijer PHM, Barentsen R 2002 Isoflavones from red clover (Promensil®) significantly reduce menopausal hot flush symptoms compared with placebo, *Maturitas* 42: 187-193

- 284 Petri Nahas E, Nahas Neto J, De Luca L, Traiman P, Pontes A, Dalben I 2004 Benefits of soy germ isoflavones in postmenopausal women with contraindication for conventional hormone replacement therapy, *Maturitas* 48: 372-380
- 285 Wangen KE, Duncan AM, Merz-Demlow BE, Xu X, Marcus R, Phipps WR, Kurzer MS 2000 Effects of soy isoflavones on markers of bone turnover in premenopausal and postmenopausal women, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85: 3043-3048
- 286 Nagata C, Shimizu H, Takami R, Hayashi M, Takeda N, Yasuda K 2002 Soy product intake and serum isoflavonoid and estradiol concentrations in relation to bone mineral density in postmenopausal Japanese women, *Osteoporos. Int.* 13: 200-204
- 287 Morabito N, Crisafulli A, Vergara C, Gaudio A, Lasco A, Frisina N, D'Anna R, Corrado F, Pizzoleo MA, Cincotta M, Altavilla D, Lentile R, Squadrito F 2002 Effects of genistein and hormone-replacement therapy on bone loss in early postmenopausal women: a randomized double-blind placebo-controlled study, *J. Bone Miner. Res.* 17: 1904-1912
- 288 Anderson JJ, Chen X, Boass A, Symons M, Kohlmeier M, Renner JB, Garner SC 2002 Soy isoflavones: no effects on bone mineral content and bone mineral density in healthy, menstruating young adult women after one year, *J. Am. Coll. Nutr.* 21: 388-393
- 289 Uesugi S, Watanabe S, Ishiwata N, Uehara M, Ouchi K 2004 Effects of isoflavone supplements on bone metabolic markers and climacteric symptoms in Japanese women, *Biofactors* 22: 221-228
- 290 Chen YM, Ho SC, Lam SS, Ho SS, Woo JL 2004 Beneficial effect of soy isoflavones on bone mineral content was modified by years since menopause, body weight, and calcium intake: a double-blind, randomized, controlled trial, *Menopause* 11: 246-254
- 291 Arjmandi BH, Lucas EA, Khalil DA, Devareddy L, Smith BJ, McDonald J, Arquitt AB, Payton ME, Mason C 2005 One year soy protein supplementation has positive effects on bone formation markers but not bone density in postmenopausal women, *Nutr. J.* 23: 8
- 292 Scheiber MD, Liu JH, Subbiah MT, Rebar RW, Setchell KD 2001 Dietary inclusion of whole soy foods results in significant reductions in clinical risk factors for osteoporosis and cardiovascular disease in normal postmenopausal women, *Menopause* 8: 384-392
- 293 Nikander E, Metsa-Heikkila M, Ylikorkala O, Tiitinen A 2004 Effects of phytoestrogens on bone turnover in postmenopausal women with a history of breast cancer, *J. Clin. Endocrin. Metab.* 89: 1207-1212
- 294 Chorazy PA, Himelhoch S, Hopwood NJ, Greger NG, Postellon DC 1995 Persistent hypothyroidism in an infant receiving a soy formula: case report and review of the literature, *Pediatrics* 96: 148-150
- 295 Ishizuki Y, Hirooka Y, Murata Y, Togashi K 1991 The effects on the thyroid gland of soybeans administered experimentally in healthy subjects, *Folia Endocrinol.* 67: 622-629
- 296 Chang HC, Doerge DR 2000 Dietary genistein inactivates rat thyroid peroxidase in vivo without an apparent hypothyroid effect, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 168: 244-252
- 297 Divi RL, Chang HC, Doerge DR 1997 Anti-thyroid isoflavones from soybean: isolation, characterization, and mechanisms of action, *Biochem. Pharmacol.* 54: 1087-1096
- 298 Atluru S, Atluru D 1991 Evidence that genistein, a protein-tyrosine kinase inhibitor, inhibits CD28 monoclonal-antibody-stimulated human T cell proliferation, *Transplantation* 51: 448-50
- 299 Wang W, Higuchi CM, Zhang R 1997 Individual and combinatory effects of soy isoflavones on the in vitro potentiation of lymphocyte activation, *Nutr. Cancer* 29: 29-34
- 300 Regal JF, Fraser DG, Weeks CE, Greenberg NA 2000 Dietary phytoestrogens have anti-inflammatory activity in a guinea pig model of asthma, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 223: 372-378
- 301 Guo TL, McCay JA, Zhang LX, Brown RD, You L, Karrow NA, Germolec DR, White KL Jr 2001 Genistein modulates immune responses and increases host resistance to B16F10 tumor in adult female B6C3F1 mice, *J. Nutr.* 131: 3251-3258
- 302 Guo TL, Zhang XL, Bartolucci E, McCay JA, White KL Jr, You L 2002 Genistein and methoxychlor modulate the activity of natural killer cells and the expression of phenotypic markers by thymocytes and splenocytes in F0 and F1 generations of Sprague-Dawley rats, *Toxicology* 172: 205-215

- 303 Yellayi S, Naaz A, Szewczykowski MA, Sato T, Woods JA, Chang J, Segre M, Allred CD, Helferich WG, Cooke PS 2002 The phytoestrogen genistein induces thymic and immune changes: a human health concern?, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 7616-7621
- 304 Ostrom KM, Cordle CT, Schaller JP, Winship TR, Thomas DJ, Jacobs JR, Blatter MM, Cho S, Gooch WM 3rd, Granoff DM, Faden H, Pickering LK 2002 Immune status of infants fed soy-based formulas with or without added nucleotides for 1 year: part 1: vaccine responses, and morbidity, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 34: 137-144
- 305 Cordle CT, Winship TR, Schaller JP, Thomas DJ, Buck RH, Ostrom KM, Jacobs JR, Blatter MM, Cho S, Gooch WM 3rd, Pickering LK 2002 Immune status of infants fed soy-based formulas with or without added nucleotides for 1 year: part 2: immune cell populations, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 34: 145-153
- 306 Bradley MO, Bhuyan B, Francis MC, Langenbach R, Peterson A, Huberman E 1981 Mutagenesis by chemical agents in V79 Chinese hamster cells: a review and analysis of the literature, *Mutat. Res.* 87: 81-142
- 307 Rousset M 1986 The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation, *Biochimie* 68: 1035-1040
- 308 Hong J, Lu H, Meng X, Ryu J-H, Hara Y, Yang CS 2002 Stability, cellular uptake, biotransformation, and efflux of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate in HT-29 human colon adenocarcinoma cells, *Cancer Res.* 62: 7241-7246
- 309 Gutmann H, Fricker G, Torok M, Michael S, Beglinger C, Drewe J 1999 Evidence for different ABC-transporters in Caco-2 cells modulating drug uptake, *Pharm. Res.* 16: 402-407
- 310 Hirohashi T, Suzuki H, Chu X-Y, Tamai I, Tsuji A, Sugiyama Y 2000 Function and expression of multidrug resistance-associated protein family in human colon adenocarcinoma cells (Caco-2), *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292: 265-270
- 311 Prime-Chapman HM, Fearn RA, Cooper AE, Moore V, Hirst BH 2004 Differential multidrug resistance-associated protein 1 through 6 isoform expression and function in human intestinal epithelial Caco-2 cells, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 311: 476-484
- 312 Meaden ER, Hoggard PG, Khoo SH, Back DJ 2002 Determination of P-gp and MRP1 expression and function in peripheral blood mononuclear cells in vivo, *J. Immunol. Methods* 262: 159-165
- 313 Arias IM, Gatmaitan Z, Mazzanti R, Shu H, Kumamoto Y 1990 Structure and function of P-glycoprotein in the normal liver and intestine, *Princess Takamatsu Symp.* 21: 229-239
- 314 Gekeler V, Ise W, Sanders KH, Ulrich WR, Beck J 1995 The leukotriene LTD4 receptor antagonist MK571 specifically modulates MRP associated multidrug resistance, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208: 345-352
- 315 Anderson ME 1985 Determination of glutathione and glutathione disulphide in biological samples, *Methods Enzymol.* 113: 548-555
- 316 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ 1951 Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193: 265-275
- 317 Degenhardt A, Winterhalter P 2001 Isolation and purification of isoflavones from soy flour by high-speed countercurrent chromatography, *Eur. Food Res. Technol.* 213: 277-280
- 318 Britton G 1995 UV/Visible spectroscopy. In: Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H (Hrsg.) *Carotenoids: Biosynthesis and metabolism*, Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, Vol. 3, 13-148
- 319 Budavari S (Hrsg.) 1996 *The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals*, Merck, Co., Inc., Whitehouse Station, NJ
- 320 Cao G, Alessio HM, Cutler RG 1993 Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants, *Free Radic. Biol. Med.* 14: 303-311
- 321 Cao G, Prior RL 1999 Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples, *Methods Enzymol.* 299: 50-62
- 322 Prior RL, Cao G 1999 In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods, *Free Radic. Biol. Med.* 27: 1173-1181
- 323 Wahl RU, Zeng L, Madison SA, DePinto RL, Shay BJ 1998 Mechanistic studies on the decomposition of water soluble azo-radical-initiators, *J. Chem. Soc.* 23: 2009-2017



- 324 Esterbauer H, Ramos P 1995 Chemistry and pathophysiology of oxidation of LDL, Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 127: 31-64
- 325 Pinchuk I, Lichtenberg D 2002 The mechanism of action of antioxidants against lipoprotein peroxidation, evaluation based on kinetic experiments, Prog. Lipid Res. 41: 279-314
- 326 Kleinveld HA, Hak-Lemmers HL, Stalenhoef AF, Demacker PN 1992 Improved measurement of low-density-lipoprotein susceptibility to copper-induced oxidation: application of a short procedure for isolating low-density lipoprotein, Clin. Chem. 38: 2066-2072
- 327 Ramos P, Giese SG, Schuster B, Esterbauer H 1995 Effect of temperature and phase transition on oxidation resistance of low density lipoprotein, J. Lip. Res. 36: 2113-2128
- 328 Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Rotheneder M 1989 Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein, Free Radic. Res. Commun. 6: 67-75
- 329 Wallin B, Rosengren B, Shertzer HG, Camejo G 1993 Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: its use for evaluation of antioxidants, Anal. Biochem. 208: 10-15
- 330 Janero DR 1990 Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury, Free Radic. Biol. Med. 9: 515-540
- 331 Hornhardt S, Wiebel FJ 1996 Catalogue of cell lines in toxicology & pharmacology, GSF-Bericht 3/96, 41-42 und 164-168
- 332 Gessner T, Dresner JH, Freedman HJ, Gurtoo HL 1978 Presence of glucuronyltransferase activity in human lymphocytes, Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 22: 187-197
- 333 Ribrag V, Massaad L, Janot F, Morizet J, Gouyette A, Chabot GG 1995 Main drug-metabolizing enzyme systems in human non-Hodgkin's lymphomas sensitive or resistant to chemotherapy, Leuk. Lymphoma 18: 303-310
- 334 Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Barnouin K, Kurz G, Keppler D 1996 Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump, Cancer Res. 56: 988-994
- 335 Klejdus B, Vitamvasova-Sterbova D, Kuban V 2001 Identification of isoflavone conjugates in red clover (*Trifolium pratense*) by liquid chromatography-mass spectrometry after two-dimensional solid-phase extraction, Anal. Chim. Acta 450: 81-97
- 336 Kirlin WG, Cai J, Thompson SA, Diaz D, Kavanagh TJ, Jones DP 1999 Glutathione redox potential in response to differentiation and enzyme inducers, Free Radic. Biol. Med. 27: 1208-1218
- 337 Arora A, Byrem TM, Nair MG, Strasburg GM 2000 Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids, Arch. Biochem. Biophys. 373: 102-109
- 338 Setchell KD, Welsh MB, Lim CK 1987 High-performance liquid chromatographic analysis of phytoestrogens in soy protein preparations with ultraviolet, electrochemical and thermospray mass spectrometric detection, J. Chromatogr. 386: 315-323
- 339 Kuo SM 1996 Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells, Cancer Lett. 110: 41-48
- 340 Nagel SC, vom Saal FS, Welshons WV 1998 The effective free fraction of estradiol and xenoestrogens in human serum measured by whole cell uptake assays: physiology of delivery modifies estrogenic activity, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 217: 300-309
- 341 Benten WP, Lieberherr M, Giese G, Wunderlich F 1998 Estradiol binding to cell surface raises cytosolic free calcium in T cells, FEBS Lett. 422: 349-353
- 342 Bartholome B, Spies CM, Gaber T, Schuchmann S, Berki T, Kunkel D, Bienert M, Radbruch A, Burmester GR, Lauster R, Scheffold A, Buttgereit F 2004 Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis, FASEB J. 18: 70-80
- 343 Song TT, Hendrich S, Murphy PA 1999 Estrogenic activity of glycitein, a soy isoflavone, J. Agric. Food Chem. 47: 1607-1610
- 344 Kuo SM 1998 Transepithelial transport and accumulation of flavone in human intestinal Caco-2-cells, Life Sciences 63: 2323-2331
- 345 Boulton DW, Walle UK, Walle T 1999 Fate of the flavonoid quercetin in human cell lines: chemical instability and metabolism, J. Pharm. Pharmacol. 51: 353-359

- 346 Negendank W, Shaller C 1982 Temperature-dependence of ATP level, organic phosphate production and Na,K-ATPase in human lymphocytes, *Physiol. Chem. Phys.* 14: 513-518
- 347 Pechey DT, Graham AB, Wood GC 1978 The phospholipid-dependence of uridine diphosphate glucuronyltransferase. Temperature-dependence of microsomal enzyme activity and thermotropic changes in membrane structure, *Biochem. J.* 175: 115-124
- 348 Jia X, Chen J, Lin H, Hu M 2004 Disposition of flavonoids via enteric recycling: enzyme-transporter coupling affects metabolism of biochanin A and formononetin and excretion of their phase II conjugates, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 310: 1103-1113
- 349 Chen J, Lin H, Hu M 2003 Metabolism of flavonoids via enteric recycling: role of intestinal disposition, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 304: 1228-1235
- 350 Peterson TG, Coward L, Kirk M, Falany CN, Barnes S 1996 The role of metabolism in mammary epithelial cell growth inhibition by the isoflavones genistein and biochanin A, *Carcinogenesis* 17: 1861-1869
- 351 Peterson TG, Ji GP, Kirk M, Coward L, Falany CN, Barnes S 1998 Metabolism of the isoflavones genistein and biochanin A in human breast cancer cell lines, *Am. J. Clin. Nutr.* 68: 1505S-1511S
- 352 Galijatovic A, Otake Y, Walle UK, Walle T 1999 Extensive metabolism of the flavonoid chrysin by human Caco-2 and Hep G2 cells, *Xenobiotica* 29: 1241-1256
- 353 Walle UK, Galijatovic A, Walle T 1999 Transport of the flavonoid chrysin and its conjugated metabolites by the human intestinal cell line Caco-2, *Biochem. Pharmacol.* 58: 431-438
- 354 Hu M, Chen J, Lin H 2003 Metabolism of flavonoids via enteric recycling: mechanistic studies of disposition of apigenin in the Caco-2 cell culture model, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 307: 314-321
- 355 Hu M, Zheng L, Chen J, Liu L, Li Y, Dantzig AH, Stratford RE Jr 1995 Peptide transporter function and prolidase activities in Caco-2 cells: a lack of coordinated expression, *J. Drug Target* 3: 291-300
- 356 Cuff RL, Wade LT, Rychlik B, Jedlitschky GA, Burchell B 2001 Characterisation of glucuronidation and transport in V79 cells co-expressing UGT1A1 and MRP1, *Toxicol. Lett.* 120: 43-49
- 357 Seelig A, Blatter XL, Wohnsland F 2000 Substrate recognition by P-glycoprotein and the multidrug resistance-associated protein MRP1: a comparison, *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 38: 111-121
- 358 Konig J, Nies AT, Cui Y, Leier I, Keppler D 1999 Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance, *Biochim. Biophys. Acta* 1461: 377-394
- 359 Imai Y, Tsukahara S, Asada S, Sugimoto Y 2004 Phytoestrogens/flavonoids reverse breast cancer resistance protein/ABCG2-mediated multidrug resistance, *Cancer Res.* 64: 4346-4352
- 360 Kunta JR, Sinko PJ 2004 Intestinal drug transporters: in vivo function and clinical importance, *Curr. Drug Metab.* 5: 109-124
- 361 Van Asperen J, Van Tellingen O, Beijnen JH 1998 The pharmacological role of P-glycoprotein in the intestinal epithelium, *Pharmacol. Res.* 37: 429-435
- 362 Buchler M, Konig J, Brom M, Kartenbeck J, Spring H, Horie T, Keppler D 1996 cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats, *J. Biol. Chem.* 271: 15091-15098
- 363 Roelofsen H, Hooiveld GJ, Koning H, Havinga R, Jansen PL, Muller M 1999 Glutathione S-conjugate transport in hepatocytes entering the cell cycle is preserved by a switch in expression from the apical MRP2 to the basolateral MRP1 transporting protein, *J. Cell Sci.* 112: 1395-1404
- 364 Marzolini C, Tirona RG, Kim RB 2004 Pharmacogenomics of the OATP and OAT families, *Pharmacogenomics* 5: 273-282
- 365 Sekine T, Cha SH, Endou H 2000 The multispecific organic anion transporter (OAT) family, *Pflugers Arch.* 440: 337-350
- 366 Liu Y, Hu M 2002 Absorption and metabolism of flavonoids in the Caco-2 cell culture model and a perfused rat intestinal model, *Drug Metab. Disp.* 30: 370-377

- 367 Boulton DW, Walle UK, Walle T 1998 Extensive binding of the bioflavonoid quercetin to human plasma proteins, *J. Pharm. Pharmacol.* 50: 243-249
- 368 Welling PG 1996 Effects of food on drug absorption, *Annu. Rev. Nutr.* 16: 383-415
- 369 Rawel HM, Rohn S, Kroll J 2003 Influence of a sugar moiety (rhamnosylglucoside) at 3-O position on the reactivity of quercetin with whey proteins, *Int. J. Biol. Macromol.* 32: 109-120
- 370 Belley A, Keller K, Gottke M, Chadee K 1999 Intestinal mucins in colonization and host defense against pathogens, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60: 10-15
- 371 Deplancke B, Gaskins HR 2001 Microbiol modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer, *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 1131S-1141S
- 372 Mutschler E 2001 *Arzneimittelwirkungen*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 8. Auflage, 788
- 373 Zheng Y, Hu J, Murphy PA, Alekel DL, Franke WD, Hendrich S 2003 Rapid gut transit time and slow fecal isoflavone disappearance phenotype are associated with greater genistein bioavailability in women, *J. Nutr.* 133: 3110-3116
- 374 Xu X, Harris KS, Wang HJ, Murphy PA, Hendrich S 1995 Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in women, *J. Nutr.* 125: 2307-2315
- 375 Zhang Y, Hendrich S, Murphy PA 2003 Glucuronides are the main isoflavone metabolites in women, *J. Nutr.* 133: 399-404
- 376 Burchell B 2003 Genetic variation of human UDP-glucuronosyltransferase: implications in disease and drug glucuronidation, *Am. J. Pharmacogenomics* 3: 37-52
- 377 Glatt HR 2000 An overview of bioactivation of chemical carcinogens, *Biochem. Soc. Trans.* 28: 1-6
- 378 Kelly GE, Joannou GE, Reeder AY, Nelson C, Waring MA 1995 The variable metabolic response to dietary isoflavones in humans, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 208: 40-43
- 379 Adlercreutz H, Fotsis T, Watanabe S, Lampe J, Wahala K, Makela T, Hase T 1994 Determination of lignans and isoflavonoids in plasma by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry, *Cancer Detect. Prev.* 18: 259-271
- 380 Sathyamoorthy N, Wang TT 1997 Differential effects of dietary phyto-oestrogens daidzein and equol on human breast cancer MCF-7 cells, *Eur. J. Cancer* 33: 2384-2389
- 381 Lund TD, Munson DJ, Haldy ME, Setchell KD, Lephart ED, Handa RJ 2004 Equol is a novel anti-androgen that inhibits prostate growth and hormone feedback, *Biol. Reprod.* 70: 1188-1195
- 382 Kaminsky LS, Zhang QY 2003 The small intestine as a xenobiotic-metabolizing organ, *Drug Metab. Dispos.* 31: 1520-1525
- 383 Kulling SE, Lehmann L, Metzler M 2002 Oxidative metabolism and genotoxic potential of major isoflavone phytoestrogens, *J. Chromatogr. B* 777: 211-218
- 384 Tolleson WH, Doerge DR, Churchwell MI, Marques MM, Roberts DW 2002 Metabolism of biochanin A and formononetin by human liver microsomes in vitro, *J. Agric. Food Chem.* 50: 4783-4790
- 385 Hamalainen E, Fotsis T, Adlercreutz H 1991 A gas chromatographic method for the determination of neutral steroid profiles in urine, including studies on the effect of oxytetracycline on these profiles in men, *Clin. Chim. Acta* 199: 205-220
- 386 D'Ascenzo G, Di Corcia A, Gentili R, Mancini R, Mastropasqua R, Nazzari M, Samperi R 2003 Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities, *Sci. Total Environ.* 302: 199-209
- 387 Rohn S, Rawel HM, Kroll J 2002 Inhibitory effects of plant phenols on the activity of selected enzymes, *J. Agric. Food Chem.* 50: 3566-3571
- 388 Rawel HM, Ranters H, Rohn S, Kroll J 2004 Assessment of the reactivity of selected isoflavones against proteins in comparison to quercetin, *J. Agric. Food Chem.* 52: 5263-5271
- 389 Janisch KM, Williamson G, Needs P, Plumb GW 2004 Properties of quercetin conjugates: modulation of LDL oxidation and binding to human serum albumin, *Free Radic. Res.* 38: 877-884

- 390 Pasqualini JR, Gelly C, Nguyen BL, Vella C 1989 Importance of estrogen sulfates in breast cancer, *J. Steroid Biochem.* 34: 155-163
- 391 Santner SJ, Ohlsson-Wilhelm B, Santen RJ 1993 Estrone sulfate promotes human breast cancer cell replication and nuclear uptake of estradiol in MCF-7 cell cultures, *Int. J. Cancer* 54: 119-124
- 392 Raftogianis R, Creveling C, Weinshilboum R, Weisz J 2000 Estrogen metabolism by conjugation, *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 27: 113-124
- 393 Geisler J 2003 Breast cancer tissue estrogens and their manipulation with aromatase inhibitors and inactivators, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 86: 245-253
- 394 Coldham NG, Zhang AQ, Key P, Sauer MJ 2002 Absolute bioavailability of [14C] genistein in the rat; plasma pharmacokinetics of parent compound, genistein glucuronide and total radioactivity, *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 27: 249-258
- 395 Donsimoni R, Legler G, Bourbouze R, Lalegerie P 1988 Study of beta-glucosidase from *Helix pomatia* by active site-directed inhibitors, *Enzyme* 39: 78-89
- 396 Rehner G, Daniel H 1999 *Biochemie der Ernährung*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 302-307
- 397 Thomson AB, Keelan M, Thiesen A, Clandinin MT, Ropeleski M, Wild GE 2001 Small bowel review: normal physiology part 1, *Dig. Dis. Sci.* 46: 2567-2587
- 398 Mu H, Hoy CE 2004 The digestion of dietary triacylglycerols, *Prog. Lipid Res.* 43: 105-133
- 399 Traber MG 2004 The ABCs of vitamin E and beta-carotene absorption, *Am. J. Clin. Nutr.* 80: 3-4
- 400 Rice-Evans CA 2000 Measurement of total antioxidant activity as a marker of antioxidant status in vivo: procedures and limitations, *Free Radic. Res.* 33: S59-S66
- 401 Retsky KL, Freeman MW, Frei B 1993 Ascorbic acid oxidation product(s) protect human low density lipoprotein against atherogenic modification. anti- rather than pro-oxidant activity of vitamin C in the presence of transition metal ions, *J. Biol. Chem.* 268: 1304-1309
- 402 Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Juergens G 1992 The role of lipid peroxidation: mechanism of formation, occurrence and determination. In: Pelfrey C (Hrsg.) *Membrane lipid oxidation*, CRC Press, Boca Raton, 239-268
- 403 Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Deemer EK 2002 Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated beta-cyclodextrin as the solubility enhancer, *J. Agric. Food Chem.* 50: 1815-1821
- 404 Prior RL, Cao G 2000 Analysis of botanicals and dietary supplements for antioxidant capacity: a review, *J. AOAC Int.* 83: 950-956
- 405 Grisham MB 1992 *Reactive metabolites of oxygen and nitrogen in biology and medicine*, RG Landes Company, Austin TX, 47-48
- 406 Ruiz-Larrea MB, Mohan AR, Paganga G, Miller NJ, Bolwell GP, Rice-Evans CA 1997 Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones, *Free Rad. Res.* 26: 63-70
- 407 Arteaga E, Villaseca P, Rojas A, Marshall G, Bianchi M 2004 Phytoestrogens possess a weak antioxidant activity on low density lipoprotein in contrast to the flavonoid quercetin in vitro in postmenopausal women, *Climacteric* 7: 397-403
- 408 Chung HL, Yang L, Xu JZ, Yeung SYV, Huang Y, Chen ZY 2005 Relative antioxidant activity of soybean isoflavones and their glycosides, *Food Chem.* 90: 735-741
- 409 Rimbach G, de Pascual-Teresa S, Ewins BA, Matsugo S, Uchida Y, Minihane AM, Turner R, Vafeiadou K, Weinberg PD 2003 Antioxidant and free radical scavenging activity of isoflavone metabolites, *Xenobiotica* 33: 913-925
- 410 Bors W, Heller W, Michel C, Saran M 1990 Flavonoids as antioxidants: determination of radical scavenging efficacies, *Methods Enzymol.* 186: 343-381
- 411 Urano S, Yano K, Matsuo M 1988 Membrane-stabilizing effect of vitamin E: effect of alpha-tocopherol and its model compounds on fluidity of lecithin liposomes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 150: 469-475
- 412 Clarke R, van den Berg HW, Murphy RF 1990 Reduction of the membrane fluidity of human breast cancer cells by tamoxifen and 17 beta-estradiol, *J. Natl. Cancer Inst.* 82: 1702-1725

- 413 Harper A, Kerr DJ, Gescher A, Chipman JK 1999 Antioxidant effects of isoflavonoids and lignans, and protection against DNA oxidation, *Free Radic. Res.* 31: 149-160
- 414 Record IR, Dreosti IE, McInerney JK 1995 The antioxidant activity of genistein in vitro, *Nutr. Biochem.* 6: 481-485
- 415 Burkitt MJ, Gilbert BC 1990 Model studies of the iron-catalysed Haber-Weiss cycle and the ascorbate-driven Fenton reaction, *Free Radic. Res. Commun.* 10: 265-280
- 416 Maziere C, Auclair M, Ronveaux MF, Salmon S, Santus R, Maziere JC 1991 Estrogens inhibit copper and cell-mediated modification of low density lipoprotein, *Atherosclerosis* 89: 175-182
- 417 Ayres S, Tang M, Subbiah MT 1996 Estradiol-17beta as an antioxidant: some distinct features when compared with common fat-soluble antioxidants, *J. Lab. Clin. Med.* 128: 367-375
- 418 May JM 1999 Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane?, *FASEB J.* 13: 995-1006
- 419 Benzie IF, Chung WY, Strain JJ 1999 "Antioxidant" (reducing) efficiency of ascorbate in plasma is not affected by concentration, *J. Nutr. Biochem.* 10: 146-150
- 420 Tikkanen LJ, Adlercreutz H 2000 Dietary soy-derived isoflavone phytoestrogens. Could they play a role in coronary heart disease prevention?, *Biochem. Pharmacol.* 60: 1-5
- 421 Sarkar FH, Li Y 2004 The role of isoflavones in cancer chemoprevention, *Front Biosci.* 9: 2714-2724
- 422 Duthie GG, Pedersen MW, Gardner PT, Morrice PC, Jenkinson AM, McPhail DB, Steele GM 1998 The effect of whisky and wine consumption on total phenol content and antioxidant capacity of plasma from healthy volunteers, *Eur. J. Clin. Nutr.* 52: 733-736
- 423 Leenen R, Roodenburg AJ, Tijburg LB, Wiseman SA 2000 A single dose of tea with or without milk increases plasma antioxidant activity in humans, *Eur. J. Clin. Nutr.* 54: 87-92
- 424 Rein D, Lotito S, Holt RR, Keen CL, Schmitz HH, Fraga CG 2000 Epicatechin in human plasma: in vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status, *J. Nutr.* 130: 2109S-2114S
- 425 Kay CD, Holub BJ 2002 The effect of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) consumption on postprandial serum antioxidant status in human subjects, *Br. J. Nutr.* 88: 389-398
- 426 Roy D, Liehr JG 1999 Estrogen, DNA damage and mutations, *Mutat. Res.* 424: 107-115
- 427 Metodiewa D, Jaiswal AK, Cenas N, Dickancaite E, Segura-Aguilar J 1999 Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product, *Free Radic. Biol. Med.* 26: 107-116
- 428 Galati G, Chan T, Wu B, O'Brien PJ 1999 Glutathione-dependent generation of reactive oxygen species by the peroxidase-catalyzed redox cycling of flavonoids, *Chem. Res. Toxicol.* 12: 521-525
- 429 Chan TS, Galati G, Pannala AS, Rice-Evans C, O'Brien PJ 2003 Simultaneous detection of the antioxidant and prooxidant activity of dietary polyphenolics in a peroxidase system, *Free Radic. Res.* 37: 787-794
- 430 Loughton MJ, Halliwell B, Evans PJ, Hoult JR 1989 Antioxidant and prooxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. Effects on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation and bleomycin-dependent damage to DNA, *Biochem. Pharmacol.* 38: 2859-2865
- 431 Cao G, Sofic E, Prior RL 1997 Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships, *Free Radic. Biol. Med.* 22: 749-760
- 432 Sugihara N, Arakawa T, Ohnishi M, Furuno K 1999 Anti- and pro-oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with alpha-linolenic acid, *Free Radic. Biol. Med.* 27: 1313-1323
- 433 Buettner GR 1993 The pecking order of the free radicals and antioxidants: lipid peroxidation,  $\alpha$ -tocopherol, and ascorbate, *Arch. Biochem. Biophys.* 300: 535-543
- 434 Yoshida Y, Furtura S, Niki E 1993 Effects of metal chelatin agent on the oxidation of lipids induced by copper and iron, *Biochim. Biophys. Acta* 1210: 81-88
- 435 Ansell PJ, Espinosa-Nicholas C, Curran EM, Judy BM, Philips BJ, Hannink M, Lubahn DB 2004 In vitro and in vivo regulation of antioxidant response element-dependent gene expression by estrogens, *Endocrinology* 145: 311-317

- 436 Fuchs D, de Pascual-Teresa S, Rimbach G, Virgili F, Ambra R, Turner R, Daniel H, Wenzel U 2005 Proteome analysis for identification of target proteins of genistein in primary human endothelial cells stressed with oxidized LDL or homocysteine, *Eur. J. Nutr.* 44: 95-104
- 437 Meng QH, Lewis P, Wahala K, Adlercreutz H, Tikkanen MJ 1999 Incorporation of esterified soybean isoflavones with antioxidant activity into low density lipoprotein, *Biochim. Biophys. Acta* 1438: 69-76
- 438 Kaamanen M, Adlercreutz H, Jauhiainen M, Tikkanen MJ 2003 Accumulation of genistein and lipophilic genistein derivatives in lipoproteins during incubation with human plasma in vitro, *Biochim. Biophys. Acta* 1631: 147-152
- 439 Patel RP, Boersma BJ, Crawford JH, Hogg N, Kirk M, Kalyanaraman B, Parks DA, Barnes S, Darley-Usmar V 2001 Antioxidant mechanisms of isoflavones in lipid systems: paradoxical effects of peroxy radical scavenging, *Free Radic. Biol. Med.* 31: 1570-1581
- 440 Fang N, Yu S, Badger TM 2004 Comprehensive phytochemical profile of soy protein isolate, *J. Agric. Food Chem.* 52: 4012-4020
- 441 Lamb DJ, Mitchinson MJ, Leake DS 1995 Transition metal ions within human atherosclerotic lesions can catalyse the oxidation of low density lipoprotein by macrophages, *FEBS Lett.* 374: 12-16
- 442 Der Brockhaus der Ernährung 2004 F.A. Brockhaus, Mannheim, 2. Auflage
- 443 Silbernagl S, Despopoulos A 2001 Taschenatlas der Ernährung, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 5. Auflage, 88
- 444 Walle T, Walle UK, Halushka PV 2001 Carbon dioxide is the major metabolite of quercetin in humans, *J. Nutr.* 131: 2648-2652
- 445 Wang C, Kurzer MS 1997 Phytoestrogen concentration determines effects on DNA synthesis in human breast cancer cells, *Nutr. Cancer* 28: 236-2347
- 446 Kulling SE, Metzler M 1997 Induction of micronuclei, DNA strand breaks and HPRT mutations in cultured Chinese hamster V79 cells by the phytoestrogen coumestrol, *Food Chem. Toxicol.* 35: 605-613
- 447 Di Virgilio AL, Iwami K, Watjen W, Kahl R, Degen GH 2004 Genotoxicity of the isoflavones genistein, daidzein and equol in V79 cells, *Toxicol. Lett.* 151: 151-162
- 448 Bennetts HW, Underwood EJ, Shier FL 1946 A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia, *Aust. J. Agric. Res.* 22: 131-138
- 449 Leopold AS, Erwin M, Oh J, Browning B 1976 Phytoestrogens: adverse effects on reproduction in California quail, *Science* 191: 98-100
- 450 Abe T 1999 Infantile leukemia and soybeans - a hypothesis, *Leukemia* 13: 317-320
- 451 Zhang Y, Song TT, Cunnick JE, Murphy PA, Hendrich S 1999 Daidzein and genistein glucuronides in vitro are weakly estrogenic and activate human natural killer cells at nutritionally relevant concentrations, *J. Nutr.* 129: 399-405

## Publikationsliste

C. E. Rüfer, S. E. Kulling, Phytoestrogene. In: H. Dunkelberg, T. Gebel, A. Hartwig (Hrsg.) Handbuch der Lebensmitteltoxikologie, Wiley-VCH, Weinheim, zur Veröffentlichung eingereicht.

C. E. Ruefer, C. Gerhauser, N. Frank, H. Becker, S. E. Kulling, In vitro phase-II-metabolism of xanthohumol by human UDP-glucuronosyltransferases and sulfotransferases, *Mol. Nutr. Food Res.*, zur Veröffentlichung eingereicht.

C. E. Rüfer, J. Möseneder, A. Bub, P. Winterhalter, S. E. Kulling, Bioavailability of the soybean isoflavone daidzein in the aglycone and glucoside form. In: R. Rogers (Hrsg.) Proceedings of Euro Food Chem XIII, Plenum Publishers, New York, zur Veröffentlichung eingereicht.

C. E. Rüfer, H.-R. Glatt, S. E. Kulling, Metabolism of the isoflavan equol, *Drug Metab. Disp.*, zur Veröffentlichung eingereicht.

C. E. Rüfer, W. Meinel, H.-R. Glatt, S. E. Kulling, Phase-II-metabolism of soy isoflavones and their metabolites in vitro, *J. Agric. Food Chem.*, zur Veröffentlichung eingereicht.

C. E. Rüfer, D. Donauer, A. Machowetz, M. Metzler, S. E. Kulling, Untersuchungen zum Metabolismus des Isoflavons Glycitein *in vitro* und *in vivo*, *Lebensmittelchemie*, im Druck.

C. E. Ruefer, E. Donauer, A. Machowetz, M. Metzler, S. E. Kulling 2004 Metabolism of the soy isoflavone glycitein in vitro and in vivo, *J. Nutr.* 134: 1287S.

C. E. Rüfer, S. E. Kulling 2004 Phase-II-Metabolismus der Isoflavone durch UDP-Glucuronyltransferasen, *Lebensmittelchemie* 58: 28.

C. E. Rüfer, G. Rechkemmer, S. E. Kulling 2003 Antioxidative Eigenschaften der Isoflavone und ihrer Metabolite, *Lebensmittelchemie* 57: 54.

## Eigene Präsentationen

### Vorträge

C. E. Rüfer, S. E. Kulling, Bioverfügbarkeit und Metabolismus von Daidzein und Daidzein-7-glucosid im Menschen, 4. Arbeitstreffen des DFG Verbundforschungsprogramms „FlavoNet“, Karlsruhe, Mai 2005

C. E. Rüfer, J. Möseneder, A. Bub, P. Winterhalter, S. E. Kulling, Bioverfügbarkeit des Isoflavons Daidzein und seines Glucose-Konjugats Daidzin, 42. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e.V., Kiel, März 2005

C. E. Rüfer, D. Donauer, A. Machowetz, M. Metzler, S. E. Kulling, Untersuchungen zum Metabolismus des Isoflavons Glycitein *in vitro* und *in vivo*, 33. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Bonn, September 2004

C. E. Rüfer, S. E. Kulling, Zur Bioverfügbarkeit von Isoflavonen und zur biologischen Aktivität relevanter Metabolite, Gemeinsamer Workshop der DFG Verbundforschungsprogramme „FlavoNet“ und „LipidNet“, Walberberg, Juli 2004

C. E. Rüfer, S. E. Kulling, Untersuchungen zu Bioverfügbarkeit und Metabolismus von Isoflavonen, 3. Arbeitstreffen des DFG Verbundforschungsprogramms „FlavoNet“, Karlsruhe, Juni 2004

C. E. Rüfer, Bedeutung von sekundären Pflanzenstoffen - Schwerpunkt Phytoestrogene, Mitgliederversammlung des Landesverbandes der Lebensmittelchemiker/innen im öffentlichen Dienst des Freistaats Sachsen, Dresden, April 2004

C. E. Rüfer, S. E. Kulling, Humane Interventionsstudie zur Untersuchung der Bioverfügbarkeit von Isoflavonen, 2. Arbeitstreffen des DFG Verbundforschungsprogramms „FlavoNet“, Potsdam, November 2003

C. E. Rüfer, G. Rechkemmer, S. E. Kulling, Zum antioxidativen Potential wichtiger Isoflavone und deren Metabolite, 40. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e.V., Potsdam, März 2003



## Poster

C. E. Ruefer, W. Meinel, H.-R. Glatt, S. E. Kulling, Phase-I- and -II-metabolism of the soy isoflavone glycitein, 15<sup>th</sup> International Symposium on Microsomes and Drug Oxidation: Chemical Biology in the Postgenomic Era, New Approaches and Applications, Mainz, Juli 2004

C. E. Rüfer, S. E. Kulling, In vitro Glucuronidierung von Isoflavonen mittels UDP-Glucuronyltransferasen, 41. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e.V., Freising-Weihenstephan, März 2004

C. E. Rüfer, S. E. Kulling, Phase-II-Metabolismus der Isoflavone durch UDP-Glucuronyltransferasen, 32. Deutscher Lebensmittelchemikertag, München, Oktober 2003

C. E. Ruefer, E. Donauer, A. Machowetz, M. Metzler, S. E. Kulling, Metabolism of the soy isoflavone glycitein in vitro and in vivo, 8<sup>th</sup> Karlsruhe Nutrition Congress: Phytoestrogens: Benefits and Risks for Human Health, Karlsruhe, Oktober 2003

C. E. Ruefer, E. Donauer, A. Machowetz, M. Metzler, S. E. Kulling, Metabolism of the soy isoflavone glycitein in vitro and in vivo, 5<sup>th</sup> International Symposium on the Role of Soy in Preventing and Treating Chronic Disease, Orlando, FL (USA), September 2003

C. E. Rüfer, G. Rechkemmer, S. E. Kulling, Antioxidative Eigenschaften der Isoflavone und ihrer Metabolite, 31. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Frankfurt, September 2002

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Sabine E. Kulling für die Überlassung des interessanten Themas, die anhaltende Unterstützung, die Freiräume, die sie mir bei der Durchführung der Arbeit gestattete, sowie für die Vermittlung der Freude am wissenschaftlichen Arbeiten.

Den Wissenschaftlern am IEP, allen voran Karlis Briviba, Achim Bub, Jutta Möseneder und Bernhard Watzl, danke ich für die ständige Diskussionsbereitschaft und Unterstützung, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meinen Doktoranden-Kollegen, Stephanie Girrbach, Sandra Gredel, Tina Sicilia, Berenike Stracke usw., möchte ich für die Unterstützung und Freundschaft über die letzten Jahre danken.

Prof. Dr. Peter Winterhalter, Dr. Gerold Jerz und Melanie Stürtz danke ich für die Mühen der Isolierung und Bereitstellung der Isoflavone Daidzein und Daidzin.

Dr. Wolf-Dieter Koller und Ute Wagner möchte ich für die Unterstützung und Hilfe bei Problemen mit der GC/MS danken.

Den Mitarbeitern am IEP, insbesondere Serap Demirel, Eva Hoch, Conny Hodapp, Achim Kraft, Frank Kratzer, Susanne Müller, Ute Stadler-Prayle und Nina Weis, danke ich für die vielen schönen Stunden und Hilfen im Labor.

Allen anderen (ehemaligen) Mitgliedern danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Schließlich möchte ich mich noch ganz besonders bei meiner Familie - meinen Eltern, meinem Bruder und meinem Freund - für die vielfältige Unterstützung, die ständige Aufmunterung über die Jahre sowie für das Lesen dieser Arbeit bedanken.

# Lebenslauf

**Name:** Corinna Rüfer  
**Geburtsdatum:** 28.12.1976  
**Geburtsort:** Karlsruhe  
**Staatsangehörigkeit:** deutsch

## Schulbildung:

1983 - 1987 Johann-Peter-Hebel-Grundschule, Schöllbronn  
1987 - 1996 Albertus-Magnus-Gymnasium, Ettlingen  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

## Studium:

10/96 - 06/01 Studium der Lebensmittelchemie an der Universität Karlsruhe (TH), Karlsruhe  
10/98 Erster Abschnitt der Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker  
12/00 - 06/01 Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. M. Metzler am Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie der Universität Karlsruhe (TH)  
Thema: Untersuchungen zur DNA-schädigenden Wirkung von Isoflavonen mittels Comet Assay und Alkaline Unwinding Technik  
Abschluss: Diplom-Lebensmittelchemiker / Zweiter Abschnitt der Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker

## Dissertation:

seit 03/02 Promotion am Institut für Ernährungsphysiologie der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel am Standort Karlsruhe  
Thema: Bioverfügbarkeit, Metabolismus und biologische Aktivität von Isoflavonen und deren Metaboliten

## Beschäftigungsverhältnisse:

11/00 - 06/01 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie der Universität Karlsruhe (TH), Karlsruhe  
07/01 - 02/02 Research Associate am Department of Cell and Molecular Biology der Life Sciences Division des Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, California, USA  
seit 03/02 Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Ernährungsphysiologie der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel am Standort Karlsruhe