



**Deutsche
Sporthochschule Köln**
German Sport University Cologne

Aus dem Institut für Kreislaufforschung und Sportmedizin
Abteilung Molekulare und Zelluläre Sportmedizin
der Deutschen Sporthochschule Köln
Geschäftsführender Leiter
Univ.-Prof. Dr. Wilhelm Bloch

**Der Einfluss von Sojaisoflavonen auf hormonabhängige
Organe - tierexperimentelle Studien im Modell der
weiblichen Wistar Ratte**

von der Deutschen Sporthochschule Köln
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der Naturwissenschaft

(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Tina Blei

aus

Freital

Köln 2014

Erster Gutachter: **Prof. Dr. Patrick Diel**

Zweiter Gutachter: **Prof. Dr. Günter Vollmer**

Vorsitzender des Promotionsausschusses: Univ.-Prof. Dr. Wilhelm Bloch

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2014

Versicherung gem. § 7 Abs. 2 Nr. 4

Hierdurch versichere ich:

Ich habe diese Arbeit selbständig und nur unter Benutzung der angegebenen Quellen und technischen Hilfen angefertigt; diese hat noch keiner anderen Stelle zur Prüfung vorgelegen. Wörtlich übernommene Textstellen, auch Einzelsätze oder Teile davon, sind als Zitate kenntlich gemacht worden.

Tina Blei

Bei der Aufarbeitung und Auswertung der Untersuchungsmaterialien, habe ich von den nachstehenden aufgeführten Personen Hilfe bekommen:

- 1.) Dr. Sebastian Soukup und Prof. Dr. Sabine Kulling vom Max-Rubner-Institut Karlsruhe, Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel, Institut für Sicherheit und Qualität bei Obst und Gemüse für die Isoflavonanalytik in Serum/Plasma und Futter.

- 2.) Anne Kurrat unterstütze mich bei der histologischen Analyse der Uteri, Vagina und Soleus im Rahmen ihrer Masterarbeit: „Der Einfluss von Isoflavonen auf das endokrine System der weiblichen Ratte“ (TV1). Im dritten Tierversuch erhielt ich Unterstützung von Alexander Franz ebenfalls bei der histologischen Analyse des Uterus, der Vagina und des viszeralen Fettgewebes im Rahmen seiner Bachelorarbeit: „Kombinierte Effekte von Isoflavonen und Nahrungsfetten auf das endokrine System und die Körperzusammensetzung der weiblichen Ratte im intakten und postmenopausalen Modell“.

Erklärung gem. § 7 Abs. 2 Nr. 5

Hierdurch erkläre ich, dass ich die Leitlinien guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Sporthochschule Köln in der aktuellen Fassung eingehalten habe.

Tina Blei

Danksagung

Zunächst bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Diel für die Bereitstellung des interessanten Themas und für die Möglichkeit die Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu dürfen.

Bedanken möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Vollmer für die Hilfe und Unterstützung bei der Vorlage dieser Doktorarbeit.

...und seiner Arbeitsgruppe, die stets ein offenes Ohr für fachliche und die viel wichtigeren nicht- fachlichen Fragen hatten.

Frau Ute Laudenbach-Leschowsky danke ich genauso, wie Annika Voß, Mojgan Ghilav, Bianca Collins und Thomas Dietz für ihre technische Unterstützung im Labor und Tierstall.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen ehemaligen Kollegen des Institutes für Kreislaufforschung und Sportmedizin, Abteilung molekulare und zelluläre Sportmedizin: Carmen Weigt, Jonas Hengevoss, Anne Kurrat, Dennis Müller, Sadrine Tchoukouegno, Lena Willkomm, Alexander Franz, Marta Perczak, Stefan Reitzner, Martina Velders, Stefanie Mosler, Felix Kluxen, Almut Molzberger, Kristin Hu, Wenja Zheng und den anderen lieben Menschen die ich an der DSHS kennenlernen durfte: Uli, meinen Mentoring-Mädels, meiner Kickbox-Connection bestehend aus Eva, Raoul, Naddl, Phillip und unserem Coach Robert.

Auch Clarissa Gerhäuser, meiner Mentorin möchte ich herzlich für Ihre Unterstützung und die Erfahrung des Mentorings danken.

Nicht zu vergessen meine Freunde aus...

...Dresden: Alex und Eva danke fürs offene Ohr und die ein oder andere Feierei.

...Rostock: Günni, Tinchen, Chrissi, Rike, Anja und Frau Vollmar danke, dass ihr mir immer die Sonnenseite aufgezeigt habt und die Spaziergänge am Meer und die Telefonate wenn ich nicht da sein konnte

...Berlin: Maria - tausend Dank für deine immerwieder mantraartigen „Du schaffst das!“ und vielem mehr!

....Heildeberg/Würzburg/Karlsruhe: meine lieben ISOCROSSIES, insbesondere Mary, Katja und Sebastian - wir teil(t)en das gleiche Schicksal, ich werde unsere Meetings und Telefonate vermissen! Selbstverständlich danke ich auch dem ganzen Projektverbund!

...Ettlingen: Danke Eva für deine Mannöverkritik, das strikte mich auf den rechten Weg zurückbringen und „pick your fights“

...Köln: Olga danke für das kleine süße Geschenk namens Lydia und deinen Beistand in der doch sehr schweren Zeit. Sissy und Nina meine Schwimmmädels für die nasse Abwechslung in jeder Hinsicht. Mirko, Geli, Kristina, Niklas,... danke für eure Motivation und die unbeschwerten Stunden im Freundeskreise.

Ganz besonders möchte ich meiner Familie: Opa, Oma, Mutti, Rommy und meinem Freund Dmitri und auch seiner Familie für die Unterstützung in all den Jahren und ihrer Geduld mit mir danken!

Danke Dimi, dass du immer in allen Lagen, Stimmungen, Launen, Phasen, Hochs, Tiefs, schlimmen Stunden, guten Zeiten, schwarzen Löchern für mich da warst und mir immer gut zu gesprochen und mich ausgehalten hast! Dich an meiner Seite zu wissen, gibt mir Kraft und Sicherheit!

DANKE!

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Abstract.....	VII
Zusammenfassung	IX
1 Einleitung	1
1.1 Die weiblichen Sexualhormone	3
1.1.1 Estrogene und ihre physiologische Wirkung	5
1.1.2 Progesteron und seine physiologische Wirkung	6
1.1.3 Die Pubertät	7
1.1.4 Der Reproduktionszyklus der Frau	8
1.1.5 Die Menopause und ihre Folgen	9
1.1.6 Brustkrebs	11
1.2 Steroidhormonrezeptoren.....	12
1.2.1 Wirkmechanismen	13
1.2.2 Estrogenrezeptoren	14
1.2.3 Progesteronrezeptoren.....	15
1.3 Isoflavone.....	17
1.3.1 Vorkommen und Struktur	17
1.3.2 Aufnahme, Metabolismus und Bioverfügbarkeit.....	18
1.3.3 Biologische Wirkung	22
1.3.4 Effekte von Isoflavonen auf den weiblichen Organismus	23
1.4 Nahrungsergänzungsmittel	26
1.4.1 Verwendung von Nahrungsergänzungsmittel.....	27
2 Zielstellung der Arbeit.....	30
3 Material	32
3.1 Verwendete Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien	32
3.2 Verwendete Chemikalien.....	33
3.3 Verwendete Lösungen und Puffer	35
3.4 Organisation und Durchführung der tierexperimentellen Studien.....	37
3.4.1 Verwendeter Sojaextrakt Novasoy® 650	37
3.4.2 Verwendete Diäten.....	38
3.4.3 Experimentelle Designs	40
3.4.4 Organ- und Blutentnahme.....	43
4 Methoden.....	45
4.1 Geschlechtsbestimmung, Pubertätseintritt und Zyklusbestimmung.....	45

4.2	Isoflavonanalytik	47
4.2.1	Extrakt und Futter	47
4.2.2	Plasma/Serum	47
4.3	Laborchemische Parameter	47
4.4	Histologie.....	48
4.4.1	Fixierung, Dehydrierung und Einbettung der Gewebe	48
4.4.2	Ausgießen und Ausrichten der Gewebe.....	49
4.4.3	Herstellung von Paraffindünnschnitten.....	49
4.4.4	Entparaffinieren und Rehydrierung von Gewebeschnitten.....	49
4.4.5	HE-Färbung.....	50
4.4.6	Immunhistochemische Färbung	50
4.4.7	Bildliche Dokumentation der gefärbten Schnittpräparate.....	52
4.4.8	Epithelhöhenmessung	52
4.4.9	Fettzellgrößenbestimmung.....	52
4.4.10	Quantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung.....	53
4.5	Graphische und statistische Auswertung	53
5	Ergebnisse	54
5.1	Lebenslange Exposition gegenüber diätetischen Isoflavonen – TV I: Besteht eine dosisabhängige Wirkung von Isoflavonen auf das weibliche endokrine System?.....	54
5.1.1	Analyse des Sojaextraktes und der verwendeten Diäten	54
5.1.2	Ermittlung der täglichen Nahrungsaufnahme und der Isoflavonexposition	55
5.1.3	Der Einfluss einer lebenslangen Isoflavonexposition auf die Pubertät und den Zyklus der weiblichen Ratte	56
5.1.4	Dosisabhängige Effekte einer lebenslangen Isoflavonexposition auf die Entwicklung im intakten Tier	57
5.1.5	Dosisabhängige Effekte einer lebenslangen Isoflavonexposition auf die Estrogensensitivität im ovariectomierten Tier.....	60
5.2	Akute Supplementation einer isoflavonreichen Diät in der ovariectomierten Ratte – TV II: Ist der Expositionszeitraum mit Isoflavonen entscheidend für die biologische Wirksamkeit, im Speziellen auf die Brustdrüse, der Ratte?	66
5.2.1	Analyse der verwendeten Diät	66
5.2.2	Physiologische Parameter: Körpergewicht und viszerale Fettmasse	66
5.2.3	Die estrogensensitiven Organe: Uterus und Vagina	67
5.2.4	Die Estrogensensitivität der Brustdrüse.....	68
5.3	Lebenslange Exposition gegenüber Isoflavonen in Kombination mit diätetischem	

Fett – TV III: Welche Rolle spielt diätetisch aufgenommenes Fett bei der Wirksamkeit von Isoflavonen?	70
5.3.1 Analyse der verwendeten Diäten	70
5.3.2 Der Einfluss von diätetischem Fett in Kombination mit Isoflavonen auf die Pubertät und den Zyklus	70
5.3.3 Der Einfluss von diätetischem Fett in Kombination mit einer lebenslangen Isoflavonexposition im intakten Tier	72
5.3.4 Der Einfluss von diätetischem Fett in Kombination mit einer lebenslangen Isoflavonexposition auf die Estrogensensitivität im ovariectomierten Tier	77
6 Diskussion	80
6.1 Dosisabhängige Effekte einer lebenslangen IF-Exposition auf die Entwicklung in der weiblichen Wistar Ratte.....	80
6.1.1 Dosiswahl und Exposition	80
6.1.2 Pubertät und Zyklus	83
6.1.3 Dosisabhängige Effekte auf nicht-klassisch estrogensensitive Gewebe.....	85
6.1.4 Dosisabhängige Effekte auf klassisch estrogensensitive Gewebe	86
6.1.5 Dosisabhängige Effekte auf die Brustdrüse	89
6.2 Der Einfluss des Expositionszeitraumes auf die biologische Wirkung von Isoflavonen im ovariectomierten Tier	95
6.3 Der lebenslange Einfluss von diätetischem Fett in Kombination mit Isoflavonen auf die Entwicklung	100
6.3.1 Dosiswahl und Exposition	100
6.3.2 Pubertät und Zyklus	101
6.3.3 Der Lebenslange Einfluss von diätetischem Fett in Kombination mit Isoflavonen auf nicht-klassisch estrogensensitive Gewebe	103
6.3.4 Der lebenslange Einfluss von diätetischem Fett in Kombination mit Isoflavonen auf klassisch estrogensensitive Gewebe	105
6.3.5 Der lebenslange Einfluss von diätetischem Fett in Kombination mit Isoflavonen auf die Brustdrüse	107
7 Schlussfolgerung & Ausblick.....	110
8 Literaturverzeichnis	113
Abbildungsverzeichnis	141
Tabellenverzeichnis	144
Anhang	XI
Curriculum Vitae	XIX

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
%	Prozent
§	Paragraph
°C	Grad Clesius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
A. dest	Aqua destillatum
Abb.	Abbildung
Abs.	Absatz
ADM	Archer Daniels Midland Company
AGD	Anogenitalabstand
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BRCA-1	<i>BReast CAncer 1</i> , Brustkrebsgen 1
AS	Aminosäure
bspw.	beispielsweise
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
ca.	circa
CAS	<i>chemical abstracts service</i>
CHOD	Cholesteroxidase
CRD	<i>conventional rat diet</i> , Standardaufzucht-diät
d	Tag
DAB	Diaminobenzidin
DAD	<i>Diode array detector</i>
Dai	Daidzein
DAPI	4', 6 Diamidino-2-phenylindol
Dtl.	Deutschland
E1	Estron
E2	17β-Estradiol
E3	Estriol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>EGF- Receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ER	<i>estrogenreceptor</i> , Estrogenrezeptor
ERE	<i>estrogen responsive element</i>
etc.	et cetera
EtOH	Ethanol
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
g	Gramm
Gen	Genistein
ggü.	gegenüber

Gly	Glycitein
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
h	Stunde
HDL	<i>High-density lipoprotein</i>
HF	<i>high fat</i> , fettreich
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatografie
HRE	<i>hormone responsive element</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
IDD	<i>Isoflavone depleted diet</i> , Phytoestrogen- und isoflavonarmes Futter
IF	Isoflavon
i.F.v.	in Form von
IHC	Immunhistochemie
i.p.	intraperitoneal, in die Bauchhöhle
IRD	<i>Isoflavone rich diet</i> , isoflavonangereichertes Futter
kg	Kilogramm
KGaA	Kommanditgesellschaft auf Aktien
KGW	Körpergewicht
kJ	Kilojoule
l	<i>Liter</i>
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LF	<i>low fat</i> , fettarm
LH	Luteinisierendes Hormon
M	Molar
MCF-7	<i>Michigan Cancer Foundation-7</i> , Brustkrebs-Zelllinie
m.H.	mit Hilfe
ME	<i>metabolizable energy</i> , Metabolisierbare Energie
mg	Milligramm
min	Minute
mind.	mindestens
MJ	Megajoule
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MNU	Methylnitrosourea
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
n.d.	nicht detektierbar
NaCl	Natriumchlorid
NEM	Nahrungsergänzungsmittel
NRW	Nordrhein-Westfalen
OVX	Ovarektomie bzw. ovariectomiert
P4	Progesteron
PAP	4-Aminophenazon
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung

PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PND	postnataler Tag
ppm	<i>parts per million</i> , Teile von einer Million
pQ-CT	periphere quantitative Computertomographie
PR	Progesteronrezeptor
PR-A	Progesteronrezeptor Isoform A
PR-B	Progesteronrezeptor Isoform B
rcf	<i>relative centrifugal force</i> , relative Zentrifugalkraft
ROI	<i>region of interest</i>
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan, unter die Haut
SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SERM	<i>selective estrogen receptor modulator</i> , selektiver Estrogenrezeptormodulator
sog.	sogenannt
SPE	<i>solid phase extraction</i>
SR	Steroidhormonrezeptor
Tab.	Tabelle
TEB	<i>terminal end bud</i>
TG	Triglyzerid
tgl.	taglich
TV	Tierversuch
u.a.	unter anderem
.N.	uber Nacht
UK	<i>United Kingdom</i>
USA	<i>United States of America</i>
UEH	Uterusepithelhohle
UWW	<i>uterine wet weight</i> , Uterusfeuchtgewicht
VEH	Vaginaepithelhohle
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>
VO	<i>vaginal opening</i> , Tag des Pubertatseintritts
z. B.	zum Beispiel

Abstract

The incidence of breast cancer in Asian countries is approximately three times lower than in western countries. Epidemiological studies showed that the lifestyle and the nutritional habits seem to play an important role in cancer etiology. The traditional Asian diet is rich in soy, which is the main source of the isoflavones (IF) genistein, daidzein and glycitein. Isoflavones are plant-derived compounds with structural similarity to 17β -estradiol and can exert estrogenic effects via binding to estrogen receptor. The aim of this study was to investigate the potential beneficial or adverse health aspects of isoflavones in the female organism, especially in the breast with respect to the impact on the risk of developing breast cancer.

In this work, we investigated the impact of the dose, the time point of exposure and the influence of dietary fat on the action of isoflavones. Three independent animal experiments in the female Wistar rat were conducted. For analysis of a dose response relationship animals received lifelong an isoflavone-depleted diet (IDD) or an isoflavone enriched diet with two different concentrations (IRD50 with 69 ppm and IRD400 with 506 ppm IF aglycone equivalents) for simulating the traditional Asian dietary habits. Body weight development, puberty onset, and the estrus cycle length were determined of growing rats. At the age of 80 days (PND80) proliferative (PCNA) and estrogenic (PR) activity were immunohistochemically analyzed in the mammary gland of intact rats. Body weight, visceral fat mass, adipocyte size, uterine wet weight, uterine and vaginal epithelial height were examined. In order to analyze estrogen sensitivity of the mammary gland IDD, IRD50 and IRD400 rats were ovariectomized at PND80 and treated either with vehicle (OVX) or 17β -estradiol (E2, 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/d). To investigate the short-term effect of isoflavone exposure a second experiment was performed. Adult rats were exposed to IDD or IRD400 from PND 80 for 17 days and an uterotrophic assay was performed as described above. Like in the first experiment the responsiveness of the mammary gland was analyzed. In the last experiment we investigated the influence of dietary fat in combination with a lifelong isoflavone exposure. Therefore in the third experiment we supplemented the IDD and IRD400 with an additional fat source consisting of sunflower oil (40 kJ% energy of fat; IDD HF, IRD HF). In addition animals were subjected to lifelong exposure with one of the low fat diets (9 kJ% energy of fat; IDD LF, IRD LF) and one group per diet was switched to the HF diet at PND 21. The same groups, treatments and parameters were analyzed as mentioned in experiment one.

Lifelong exposure (experiment 1) to IRD400 resulted in decreased proliferative and estrogenic response of the mammary gland in E2 treated animals, which was not achieved through IRD50. We observed a reduced estrogen sensitivity of this organ through a long-term

high isoflavone intake (IRD400). Short-term exposure (experiment 2) of isoflavones resulted in the opposite effect. IRD400 caused an induction of proliferation and a higher estrogenic activity compared to IDD. This result brought about serious concerns in terms of the safety of using soy supplements and, therefore further investigations have to be carried out. Another aspect was the observation of an advanced puberty onset and shortened estrus cycle length in the lifelong IRD exposed animals which led to unwanted side-effects due to increased lifetime estrogen exposure. In addition the main results of the first two animal experiments showed a strong influence of the given dose and the importance of the duration of exposition on isoflavone action and should be taken into consideration. Dietary fat did not influence the proliferative response of isoflavone exposed animals. Furthermore, we observed an induction of serum HDL through IRD in intact animals. This indicates potential mechanisms by which soy isoflavones exert beneficial effects on the fat metabolism. This can probably be used to develop new therapeutic strategies in the prevention of obesity and cardiovascular diseases like arteriosclerosis.

Zusammenfassung

Bisherige epidemiologische Studien zeigen, dass ein erhöhter Sojakonsum mit einem verringerten Brustkrebsrisiko verbunden ist. So liegt die Inzidenz von Brustkrebs in asiatischen Ländern rund dreimal niedriger als in westlichen Ländern. Dies wird auf die traditionell asiatische Ernährungsweise zurückgeführt, die durch eine hohe Aufnahme von Soja und Sojaprodukten charakterisiert ist. Studien belegen, dass die darin enthaltenen Isoflavone Genistein, Daidzein und Glycitein, aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit 17β -Estradiol und dem damit verbundenen estrogenen Wirkpotential in Zusammenhang mit einer Reihe positiver als auch negativer Wirkungen auf die Gesundheit des Menschen stehen. Ziel der vorliegenden Dissertation war es mittels tierexperimenteller Studien zu untersuchen, welchen Einfluss die Dosis, der Expositionszeitraum und ein erhöhter Fettanteil in der Nahrung auf die Wirkung der Isoflavone im weiblichen Organismus, im Speziellen auf die Brustdrüse ausüben.

Für die Beantwortung dieser Fragen wurden 3 Tierversuche (TV) in der weiblichen Wistar-Ratte durchgeführt. Für die Untersuchung einer Dosisabhängigkeit wurden im ersten Tierversuch (TV I) die Tiere lebenslang entweder mit einer isoflavonfreien Diät (IDD) oder einer isoflavonreichen Diät in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (IRD50 mit 69 ppm und IRD400 mit 506 ppm IF-Agkyon-Äquivalent) gefüttert, um eine asiatische Ernährungsgewohnheit zu simulieren. Es wurden entwicklungsbiologisch relevante Parameter (Pubertätseintritt, Menstruationszyklus, Körpergewichtsentwicklung), nicht-klassisch estrogensensitive Gewebe (viszerale Fettmasse) und klassisch estrogensensitive Gewebe (Uterus und Vagina) in 80 Tage alten (PND 80) intakten Tieren und ovariectomierten Tieren am PND97 untersucht. Ebenfalls wurde die proliferative (PCNA) und estrogenen (PR) Aktivität der Brustdrüse immunhistologisch untersucht. Für die Untersuchung der Estrogensensitivität in der Brustdrüse wurde ein Uterotropher Assay durchgeführt. Hierfür wurden die Tiere am PND80 ovariectomiert und nach einem zweiwöchigen hormonal decline anschließend für 3 Tage mit $4 \mu\text{g}/\text{kg KGW}/\text{d}$ 17β -Estradiol (E2) oder Kontrolllösung (OVX) behandelt. Für die Untersuchung des Einflusses des Expositionszeitraumes, erhielten Tiere in TV II zum Zeitpunkt der Ovariectomie (PND80) für 17 Tage entweder die IDD oder die IRD400. Erneut wurde die Responsivität der Brustdrüse im Rahmen eines Uterotrophen Assays untersucht. Inwiefern sich ein erhöhter Anteil an Nahrungsfett auf den Organismus und die Wirkung von Isoflavonen auswirkt, wurde in einem dritten TV (TV III) untersucht. Hierfür wurde der IDD und IRD400 eine zusätzliche Fettquelle in Form von Sonnenblumenöl zugefügt (40 kJ% Energie aus Fett; IDD HF, IRD HF). Zu der lebenslangen Exposition mit

einer der beiden fettarmen Diäten (9 kJ% Energie aus Fett; IDD LF, IRD LF) erfolgte am PND21 für je einen Teil der Tiere der Futterwechsel auf das entsprechende HF-Futter. Es erfolgte die Analyse der gleichen Gruppen und Parameter wie zuvor in TV I beschrieben.

Die Ergebnisse aus den ersten beiden Tierversuchen zeigen einen deutlichen Einfluss sowohl der Dosis als auch des Expositionszeitraumes auf die Wirkung von Isoflavonen. In TV I konnte gezeigt werden, dass eine lebenslange hohe Isoflavonexposition (IRD400) in E2-behandelten Tieren zu einer verringerten proliferativen Antwort und Estrogensensitivität in der Brustdrüse führt. Die veränderte Ansprechbarkeit der Brustdrüse auf E2 könnte demnach die Ursache für das verringerte Brustkrebsrisiko in asiatischen Frauen sein und den protektiven Effekt seitens der Isoflavone erklären. Interessanterweise konnte dies nicht für die geringe Isoflavondosis (IRD50) gezeigt werden. Fand die Substitution von hochdosierten Isoflavonen akut für einen kurzen Zeitraum nach der Ovariectomie statt (TV II), so reagiert die Brustdrüse mit einer erhöhten estrogenen Antwort gekoppelt an eine erhöhte Proliferation. Diese Exposition simulierte die Aufnahme von Isoflavonen in der postmenopausalen Frau und unterstreicht die Relevanz des Expositionszeitraums. Der steigende Isoflavon-Konsum bei postmenopausalen Frauen und damit die Verwendung von Nahrungsergänzungsmitteln auf Soja-Basis sind daher kritisch zu betrachten. Hinzu kommt, dass eine lebenslange Isoflavongabe zu einem früheren Pubertätseintritt in Kombination mit einem verkürzten Zyklus führte (TV I), was einen Hinweis auf unerwünschte Nebeneffekte auf das Reproduktionssystem liefert. Eine frühe Menarche und ein kurzer Menstruationszyklus in der Frau führen zu einer erhöhten Lebenszeitexposition mit Estrogen, das einen kritischen Risikofaktor bei der Brustkrebsentstehung darstellt. Die Abschätzung des gesundheitlichen Nutzens der Einnahme von Isoflavonen ist demnach nur unter einer sehr differenzierten Betrachtungsweise möglich und schließt eine Vielzahl von Faktoren ein, die berücksichtigt werden müssen. Interessanterweise zeigte sich die Wirkung von Isoflavonen durch einen erhöhten Fettanteil in der Nahrung unberührt (TV III). Hier konnte sich keine veränderte Proliferation in der Brustdrüse durch die Substitution mit Fett (HF) feststellen lassen. Einen interessanten Nebenaspekt stellten die erhöhten HDL-Serumspiegel in intakten Tieren durch die IRD dar. So gibt dies Hinweise auf einen potentiell protektiven Effekt der Isoflavone auf den Fettstoffwechsel, der möglicherweise für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze bei der Prävention von Adipositas und Arteriosklerose genutzt werden könnte.

1 Einleitung

Brustkrebs stellt weltweit die häufigste bösartige Krebserkrankung bei der Frau dar. Rund eine Million Neuerkrankungen pro Jahr verzeichnet die Weltgesundheitsorganisation - WHO (Boyle und Levin, 2008). Jedoch gibt es hierbei starke regionale Unterschiede (Forouzanfar et al., 2011). So ist die Inzidenz von Brustkrebs (Abb. 1) in der westlichen Bevölkerung rund dreimal höher als in der asiatischen Bevölkerung (Parkin, 2001; Parkin et al., 2001; World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, 2014).

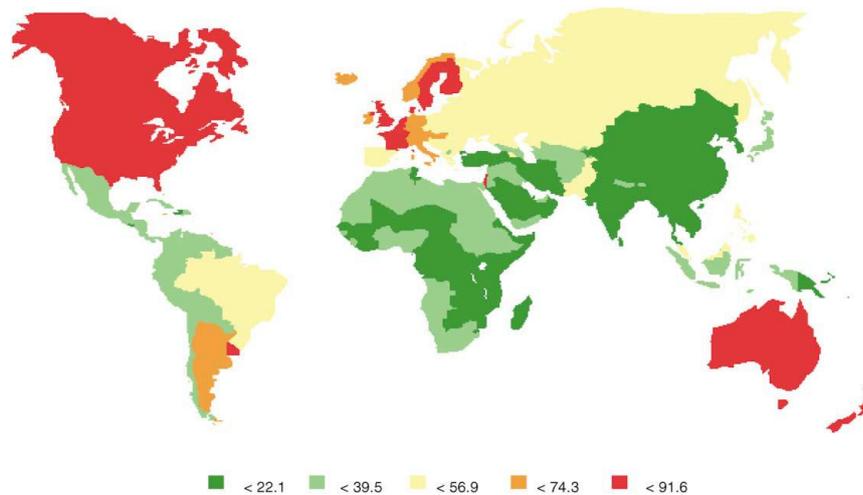


Abbildung 1: Brustkrebsinzidenz weltweit, altersstandardisierte Rate pro 100.000 (alle Altersgruppen), aus Parkin et al., 2001.

Epidemiologisch betrachtet wird dies u.a. auf die traditionell sojareiche Ernährung im asiatischen Raum zurückgeführt. Die in Soja enthaltenen estrogenwirksamen Inhaltsstoffe sind die Isoflavone, die zur Gruppe der Phytoestrogene gehören (Dixon, 2004). Metaanalysen epidemiologischer Studien konnten belegen, dass das Brustkrebsrisiko in asiatischen Frauen negativ mit steigendem Isoflavonkonsum korreliert (Wu et al., 2008; Dong and Qin, 2011; Nagata et al., 2014). Interessanterweise zeigen Migrationsstudien, dass das Brustkrebsrisiko von Asiatinnen, die in die USA auswanderten, sich der dort lebenden Bevölkerung angleicht. Es spielen demnach weniger genetische Faktoren eine Rolle, sondern es lassen sich diese Effekte vielmehr auf die Lebens- und Essgewohnheiten zurückführen (Ziegler et al., 1993). Aus diesem Grund stehen die Isoflavone zunehmend im wissenschaftlichen und öffentlichen Fokus der Gesellschaft und werden seit Jahren hinsichtlich ihrer biologischen Wirksamkeit untersucht. Aufgrund ihrer estrogen-ähnlichen Wirkung werden ihnen neben einem verringerten Risiko für Brustkrebs auch eine Reihe anderer positiver Effekte bezüglich kardiovaskulärer Erkrankungen (Anthony et al., 1998; Gencel et al., 2012), postmenopausaler Osteoporose (Branca, 2003; Taku et al., 2011) und menopausale Beschwerden (Ferrari, 2009)

zugeschrieben (zusammengefasst in Branca and Lorenzetti, 2005). Jedoch ist die Datenlage bezüglich ihrer biologischen Wirkung sehr heterogen, da sich ebenso zahlreiche Studien finden, die die positiven Effekte auf die Gesundheit des Menschen nicht bestätigen können (Sirtori, 2001; Cassidy, 2005; Cassidy and Hooper, 2006; Wuttke et al., 2007; Brink et al., 2008; Eden, 2012; Lagari and Levis, 2014). So stehen Isoflavone auch im Verdacht die Tumorpromotion zu fördern. In tierexperimentellen Studien konnten wachstumsstimulierende Effekte durch das Isoflavon Genistein auf die Brustkrebszelllinie MCF-7 gezeigt werden (Hsieh et al., 1998). In einer cross-over Studie mit 24 prämenopausalen Frauen führte eine sechsmonatige Sojasupplementierung mit 38 mg Isoflavonen pro Tag zu einer verstärkten Bildung von hyperplastischen Epithelzellen in der Brust (Petrakis et al., 1996). Hooper et al. fanden bei der Metaanalyse von randomisiert kontrollierten Studien hingegen keinen Einfluss einer Isoflavonaufnahme auf die Brustdichte, die einen Hinweis auf Veränderungen in der Brust und damit eine Indikator für Brustkrebs darstellt (Hooper et al., 2010). Tierexperimentelle Studien zeigen, dass die Wirkung der Sojaisoiflavone auf die Brust wesentlich vom Entwicklungsstadium und dem Grad der Ausdifferenzierung des Brustdrüsengewebes abhängt (Lamartiniere et al., 2002). Jedoch ist hier die Übertragbarkeit der tierexperimentellen Daten auf den Menschen aufgrund fehlender klinischer Studien sehr schwierig. Eine abschließende Beurteilung hinsichtlich der Wirkung von Isoflavonen auf die weibliche Brust, insbesondere in Bezug auf das Brustkrebsrisiko bei Frauen, ist demnach derzeit nicht möglich (Eisenbrand, 2006; Messina et al., 2006a).

Trotz der unsicheren Datenlage drängen in Europa und den USA immer mehr Isoflavonpräparate in Form von Nahrungsergänzungsmitteln auf den Markt (Barrett, 2006). Sie werden als wirkungsvolle und nebenwirkungsfreie „Wundermittel“ beworben, obwohl der ernährungsphysiologische Nutzen dieser Präparate nicht vollständig belegt ist. Auch konnte gezeigt werden, dass die biologische Wirkung von Isoflavonen in isolierter Form nicht mit der Wirkung eines komplexen Lebensmittels auf Sojabasis gleichzusetzen ist. Allred wies nach, dass die estrogenen Wirkung von Sojamehl deutlich geringer ist, als die eines kommerziell erhältlichen Sojaextraktes bzw. des isolierten Sojaisoiflavons Genistein bei gleichem Isoflavongehalt. In athymischen ovariectomierten Nacktmäusen mit einem MCF-7-Xenograft zeigte sich nur bei der Supplementation mit dem Extrakt und dem isolierten Sojaisoiflavon Genistein eine erhöhte Tumorpheriferation, jedoch nicht bei Gabe des Sojamehls (Allred et al., 2004a).

Aufgrund der sehr komplexen und inhomogenen Effekte werden die biologische Wirksamkeit, der gesundheitliche Nutzen und die Abschätzung des Risikopotentials

regelmäßig von der Europäischen Lebensmittelsicherheitsbehörde (EFSA), dem Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) und der DFG - Senatskommission zur gesundheitlichen Bewertung von Lebensmitteln (SKLM) bewertet. Dies ist notwendig, um einen möglichen Nutzen oder auch adverse Effekte von Isoflavonen näher zu charakterisieren. Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag dazu liefern, zu ermitteln über welche Mechanismen die Isoflavone ihre Wirkung insbesondere auf die Brustdrüse ausüben. Weiterhin soll ein besseres Verständnis der biologischen Wirksamkeit von Sojaisoflavonen in Abhängigkeit der verwendeten Dosis, dem Zeitpunkt der Exposition und der Anwesenheit eines erhöhten Fettanteils in der Nahrung, welcher typisch für die westliche Ernährung ist, geschaffen werden.

1.1 Die weiblichen Sexualhormone

Zu den weiblichen Sexualhormonen gehören die Gestagene, wie das Progesteron (P4), und die Estrogene Estron (E1), 17 β -Estradiol (E2) und Estriol (E3), deren Strukturformeln in Abbildung 2 dargestellt sind. Biochemisch sind sie den Steroidhormonen zugeordnet, die sich in 5 Gruppen unterscheiden lassen; Gestagene, Glucocorticoide und Mineralocorticoide mit 21 C-Atomen, Androgene mit 19 C-Atomen und Estrogene mit 18 C-Atomen. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Regulation von Entwicklungs- und Wachstumsprozessen wie bspw. Reproduktion, Differenzierungsvorgänge, Zellproliferation oder Apoptose.

Der Grundbaustein der Steroidbiosynthese ist das Cholesterol. Aufgrund der geringen Speicherkapazität der Steroidhormone in den endokrinen Drüsen, werden sie bei Bedarf aus dem zellulären Cholesterolvorrat synthetisiert. Nach zweifacher Hydroxylierung und Abspaltung der Seitenkette durch das Enzym Cholesterol-Desmolase (cytochrome P450 - side chain cleavage enzyme, P450 scc) entsteht Pregnenolon. Aus diesem Vorläufermolekül entstehen folgend alle für den Menschen wichtigen Steroidhormone über spezifische Enzyme. Die gebildeten Steroidhormone können aufgrund der lipophilen Eigenschaft der Sterane ungehindert durch die Zellmembran wandern und unmittelbar an ihren spezifischen Rezeptor binden. Der Transport von Steroidhormonen erfolgt im Blutplasma gebunden an spezifische Transportproteine und der Abbau findet in der Leber durch Konjugation von Sulfat oder Glucuronsäure statt (Löffler et al., 2007). So werden Estrogene zu einem großen Teil an sexualhormonbindende Globuline (SHBG) gebunden und nur ein geringer Teil von 2-3% der zirkulierenden Estrogene liegt in der freien, physiologisch aktiven Form vor (Anderson, 1974; Gruber et al., 2002). Hierbei stellt das E2 das bedeutendste und physiologisch wirksamste endogene Estrogen dar. Die beiden anderen endogenen Estrogene E1 und E3 weisen hingegen eine schwächere Wirksamkeit als E2 auf (Kuiper et al., 1997). In der Leber werden die

Estrogene hauptsächlich über Hydroxylierungsreaktionen abgebaut. Hierbei wandeln spezifische Enzyme Estrogen in die Catechol-Estrogene 2-Hydroxy-Estradiol (u.a. CYP1A1) und 4-Hydroxy-Estradiol (u.a. CYP1B1) um. Die entstanden Hydroxymetabolite werden von der Catechol-O-Methyltransferase (COMT) detoxifiziert, da vor allem das 4-Hydroxy-Estradiol potenziell kanzerogen ist und in Bezug mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko steht. So zeigen Frauen mit einer verringerten COMT-Aktivität ein erhöhtes Brustkrebsrisiko (Löffler et al., 2007; Yager, 2012).

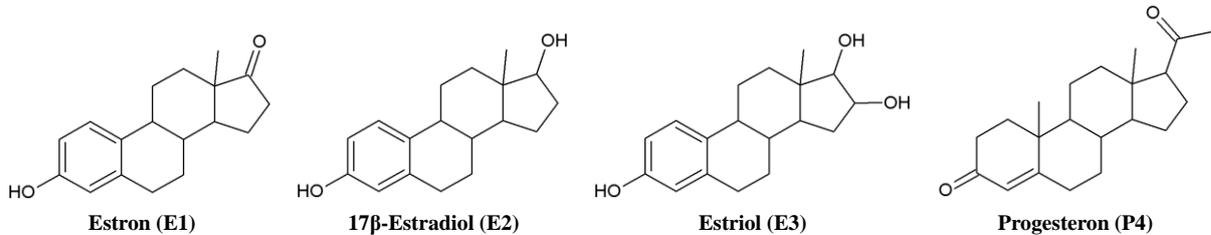


Abbildung 2: Strukturformeln der Steroidhormone der Frau.

In der geschlechtsreifen Frau werden die Steroidhormone hauptsächlich in den Ovarien synthetisiert. Die Synthese der Estrogene und des Progesterons im Ovar ist ein komplexer Vorgang, der in mehreren Schritten abläuft und über den Regelkreis der Hypothalamus-Hypophysen-Ovar-Achse und die Gonadotropine FSH und LH kontrolliert wird. Eine Besonderheit stellt hierbei die Zwei-Zell-Theorie der ovariellen Steroidsynthese dar, bei der die Kooperation zwischen den Granulosazellen und Thekazellen des Follikels notwendig ist (Abb. 3). In den Thekazellen findet hauptsächlich die folliculäre Androgensynthese ausgehend von Pregnenolon statt. Das gebildete Androstendion wird aufgrund der fehlenden Aromataseaktivität der Thekazellen in die Granulosazelle transportiert und dort direkt zu den Estrogenen E1 und E2 aromatisiert (Löffler et al., 2007). Auch in den extragonadalen Geweben, wie der Nebennierenrinde, der Leber, dem Muskel und dem Fettgewebe werden Estrogene gebildet und sind für die basalen Estrogenspiegel in der postmenopausalen Frau zuständig (Gruber et al., 2002; Larionov et al., 2003).

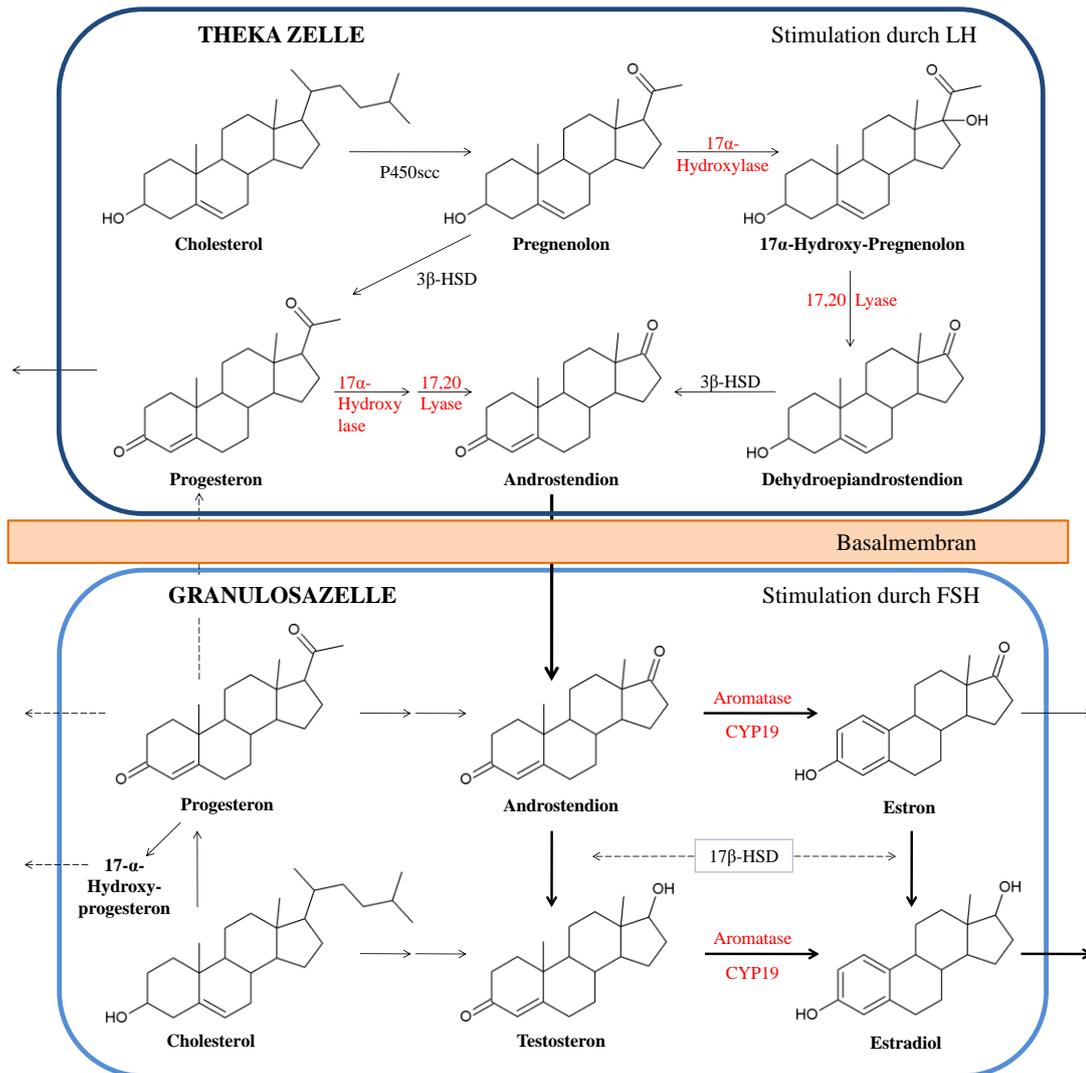


Abbildung 3: Ovarielle Steroidbiosynthese modifiziert nach Löffler et al., 2007. In rot sind diejenigen Enzyme dargestellt, die nur in diesem Kompartiment exprimiert werden.

1.1.1 Estrogene und ihre physiologische Wirkung

Estrogene spielen eine wesentliche Rolle bei der Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale zu Beginn der Pubertät. So induzieren sie die Fetteinlagerungen in Brust und Hüfte und stimulieren das Wachstum der Schamhaare. Weiterhin wirken sie auf eine Reihe estrogensensitiver Gewebe wie die Brustdrüse, den Uterus und das Ovar. Im **Uterus** induzieren Estrogene den Aufbau des Endometriums während des Menstruationszyklus, tragen zur Verlängerung der uterinen Drüsen bei und sorgen für eine verstärkte Kontraktion der Uterusmuskulatur durch ein verstärktes Wachstum und Vermehrung der Muskelfasern. Ebenfalls sorgen sie für eine vermehrte Vaskularisierung. Im **Ovar** fördern die Estrogene die Follikelreifung. In der **Vagina** bewirken Estrogene eine Verdickung der Vaginaschleimhaut und eine vermehrte Abstoßung von glykogenhaltigem Epithel, das die vermehrte Milchsäureproduktion der Döderlein-Bakterien in der Vagina fördert. Dies führt zu dem in der Vagina charakteristisch saurem Milieu (pH 5,5-3,5) und

schützt diese vor Infektionen. In der **Brustdrüse** wirken Estrogene stimulierend auf das Wachstum und die Differenzierung des Gangepithels (duktale Elongation und Verzweigung), sie induzieren die mitotische Aktivität des Gangzylinderepithels und vermitteln das Wachstum des Bindegewebes (Löffler et al., 2007; Silbernagel and Despopoulos, 2012).

Auf extragonadale, nicht-klassisch estrogene Gewebe wie den Knochen, das Fettgewebe und auf das kardiovaskuläre System wirken Estrogene ebenfalls. Im **Knochen** sorgen sie für den Erhalt der Knochenmasse, indem sie den Knochenabbau über die Förderung der Osteoblastentätigkeit hemmen (Chow et al., 1992; Migliaccio et al., 1996; Manolagas, 2000). Sie beeinflussen den **Fettstoffwechsel**, durch Stimulation der Apolipoproteinsynthese, was zu erhöhten Plasmaspiegel von Apolipoprotein B (ApoB) und ApoE führt. Sie senken die Konzentration von LDL und erhöhen die Spiegel von VLDL und HDL, was für einen kardioprotektiven Effekt spricht. So zeigen Frauen im fortpflanzungsfähigen Alter wesentlich seltener **Herz-Kreislauf**erkrankungen wie Arteriosklerose und Bluthochdruck als Männer gleichen Alters. Durch die Senkung der Blutfette und der Cholesterolkonzentration verhindern Estrogene die Ablagerung an den Gefäßwänden und beeinflussen die Vasodilatation (Smolders et al., 2003; Tostes et al., 2003). Auch wirken Estrogene als Antioxidantien und mindern somit die Wirkung von Sauerstoffradikalen, was das Herzinfarkt-Risiko minimiert (Maxwell, 1998; Subbiah, 1998).

1.1.2 Progesteron und seine physiologische Wirkung

Progesteron spielt als Gestagen ebenfalls eine wichtige Rolle in den weiblichen reproduktiven Geweben Uterus, Ovar und Brust und wird im Blut gebunden an Transcortin transportiert. Es ist für den endometrialen Differenzierungsvorgang des **Uterus** zuständig. Das Endometrium wird während der Sekretionsphase zur Dezidua umgebaut und ist für die Implantation des Embryos bereit. Kommt es zur Nidation des Embryos und damit verbunden zur Schwangerschaft, ist Progesteron für die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft verantwortlich und unterdrückt die Kontraktion des Myometriums (Graham and Clarke, 1997). Zum anderen sorgt es auch für Antagonisierung der E2-induzierten Proliferation des Uterusepithels (Lydon et al., 1995; Mulac-Jericevic et al., 2000). Im **Ovar** ist Progesteron unter dem Einfluss von LH für die Freisetzung der Oozyte aus dem Follikel verantwortlich und in der **Vagina** setzt Progesteron die Abschilferung der Oberflächen- und Intermediärzellen herab. In der **Brustdrüse** ist Progesteron entscheidend für die Verzweigung und Differenzierung der Brustdrüse in der postpubertären Phase verantwortlich. Während der Schwangerschaft führt Progesteron zur weiteren duktalem Proliferation und zur lobuloalveolären Differenzierung der Brustdrüse, die notwendig für die Milchsekretion ist.

Auch die vorgeburtliche Suppression der Milchproteinbiosynthese durch Hemmung von Prolaktin und Oxytocin ist Aufgabe von Progesteron.

Nicht nur in den Geschlechtsorganen spielt Progesteron eine wichtige Rolle. In extragonadalen Geweben wie bspw. dem **Fettgewebe** führt Progesteron zu einer verringerten Cholesterol-, HDL- und LDL-Produktion (Löffler et al., 2007; Silbernagel and Despopoulos, 2012). Es ist weiterhin für die Thymusinvolution während der Schwangerschaft und im **kardiovaskulärem System** bei der Regulation der endothelialen und vaskulären glatten Muskelzellproliferation involviert (Lee et al., 1997; Vázquez et al., 1999). Auch scheint Progesteron im **Knochen** und im Gehirn eine Rolle zu spielen, wo es mit dem Schutz vor Knochenmasseverlust und der kognitiven Funktion in Verbindung gebracht wird (Graham and Clarke, 1997).

1.1.3 Die Pubertät

Das Erlangen der Geschlechtsreife (Pubertät) stellt einen wichtigen Schritt in der Entwicklung des weiblichen Organismus dar und tritt bei Mädchen zwischen dem 8. und 14. Lebensjahr ein. Ausgelöst wird dies durch Einsetzen der GnRH Sekretion, dem die Bindung des hypothalamischen Peptidhormons Kisspeptin an seinen Rezeptor Kiss-1 (GPR54) vorausgehen muss. Hierbei setzt der Hypothalamus zunehmende Mengen an GnRH frei, was daraufhin zu einem höheren Spiegel an FSH und später LH führt. Die zunehmende Bildung der Sexualhormone Estrogen und Progesteron in den Gonaden durch die Gonadotropine FSH und LH führt zur Reifung dieser und zur Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale (Leidenberger, 2009). So setzt durch den Estrogenanstieg die Brustentwicklung (Thelarche) ca. 2 Jahre vor der ersten Regelblutung (Menarche) ein (Fredriks et al., 2000).

Der Zeitpunkt für den Eintritt in die Pubertät scheint von vielen nichtgenetischen sozioökonomischen Faktoren abzuhängen, wie zum Beispiel von einer besseren Gesundheit, einer guten Ernährung und möglicherweise einer allgemeinen Zunahme des Körpergewichtes. So lag das mittlere Menarchealter in Westeuropa 1880 bei ~ 16 Jahren und 1960 schon bei ~ 13 Jahren. Bezüglich dieses säkularen Trends wird in Zusammenhang mit einem frühen Menarchealter auch Übergewicht und die Aufnahme von exogenen Hormonen oder Hormonrückständen in der Nahrung (Phytoestrogene, Phthalate, Biphenole, Pestizide und Dioxine) diskutiert. So zeigten Studien, dass Mädchen mit einem erhöhten Body-Mass-Index (BMI) früher in die Pubertät kommen (Wattigney et al., 1999; Juul et al., 2006). Dies spricht für einen funktionellen Zusammenhang zwischen dem Gewicht und der Pubertätsentwicklung. In der gynäkologischen Praxis zeigt sich dieser oft bei aktiven Leistungssportlerinnen, bei denen die Pubertät ausbleibt oder eine Amenorrhö auftritt. Steigt

das Gewicht über eine kritische Grenze wieder an, schreitet die Pubertät fort bzw. der menstruelle Zyklus setzt wieder ein. Es ist bekannt, dass das im Fettgewebe exprimierte Leptin die GnRH-Sekretion stimuliert und damit die reproduktive Funktion beeinflusst (Leidenberger, 2009).

1.1.4 Der Reproduktionszyklus der Frau

Der Zyklus der Frau stellt ein sehr komplexes und fein abgestimmtes System dar, bei dem die Wirkungen von Estrogen und Progesteron synergistisch wirken. Die Zyklusdauer liegt bei 28 Tagen, kann jedoch individuell zwischen 21 und 35 Tagen schwanken. Man unterscheidet den **Menstruationszyklus**, der sich vor allem auf die Veränderungen im Uterus bezieht und den **Ovarialzyklus**, der die Geschehnisse im Ovar beschreibt. Beide sind unumgänglich miteinander verknüpft. Nach der Ovulation in der Mitte des Zyklus und dem Ausbleiben der Befruchtung kommt es zur Regelblutung, bei dem der erste Tag der Regelblutung den ersten Tag des Zyklus definiert. Diese Phase, in der das Endometrium über 2-6 Tage nahezu komplett abgebaut wird, wird als Menstruationsphase bezeichnet. In der darauffolgenden Proliferationsphase wird unter dem Einfluss von E2 das Endometrium neu aufgebaut, regeneriert und damit auf die Aufnahme der Eizelle vorbereitet. Gleichzeitig beginnt mit dem ersten Tag der Regelblutung die Follikelphase. Im Ovar reifen unter dem Einfluss von FSH ca. 20 Follikel heran. Derjenige Follikel der am stärksten auf den FSH Stimulus reagiert wird dominant und produziert zunehmend Estrogene. Der reifende Follikel entwickelt einen flüssigkeitsgefüllten Hohlraum (Antrum), vergrößert sich und wird zum Graafschens Follikel. Es kommt zu einem kontinuierlichen Anstieg des Estradiolspiegels im Blut und die Estrogenproduktion des Follikels steigt am 12. bis 13. Tag stark an. Dies führt zu einer verstärkten LH-Ausschüttung über eine positive Rückkopplung. Die Follikelphase endet mit der Ovulation am 14. Tag, bei der der Follikel und die benachbarte Ovarwand durch die verstärkte LH-Ausschüttung aufreißt und die Eizelle freisetzen. Die sich anschließende luteale Phase ist durch die Entwicklung des Corpus luteum (Gelbkörper) aus dem zurückbleibenden Follikelgewebe und das von ihm sezernierte Progesteron gekennzeichnet. Bezüglich des Uterus wird nun die sekretorische Phase eingeleitet, bei der sich das Endometrium weiterhin verdickt, stärker durchblutet wird und unter dem estrogenen Einfluss Drüsen ausbildet, die ein glykogenreiches Sekret absondern. Kommt es zu keiner Nidation in der zweiwöchigen Sekretionsphase bewirken Progesteron und Estrogen eine Hemmung von GnRH, was zur Degeneration des Corpus luteums (Luteolyse) führt. Dadurch wird ein rascher Abfall der Estrogen- und Progesteronkonzentration im Blutplasma ausgelöst, was zu einer Konstriktion

der Endometriumsgefäße und zur Ischämie führt. Die Uterusschleimhaut wird abgestoßen (Menstruationsblutung) und der Zyklus beginnt erneut (Silbernagel and Despopoulos, 2012). Im Nagetier spricht man von einem estrischen Zyklus, bei dem das Endometrium vom Uterus absorbiert und nicht in Form einer Menstruationsblutung abgestoßen wird. Die Kopulationsbereitschaft ist auf die Estrusphase beschränkt, die während der Ovulation stattfindet. Nur in diesem Zeitfenster erlauben die Veränderungen in der Vagina einen Geschlechtsverkehr. Insgesamt dauert der Zyklus der Ratte im Schnitt 5 Tage und ist u.a. abhängig vom Rattenstamm (Campbell and Reece, 2006).

1.1.5 Die Menopause und ihre Folgen

Die sogenannten Wechseljahre (Klimakterium) stellen den Übergang der durch die Pubertät eingeleiteten reproduktiven Phase in die nichtreproduktive Phase der Frau dar. Das reproduktive Altern der Frau kann in verschiedene Stadien eingeteilt werden. So beschreibt die Prämenopause die reproduktiven Jahre vor der Menopause. Die Perimenopause umfasst den menopausalen Übergang von der späten reproduktiven Phase (~ 2 Jahre vor der Menopause) in die Postmenopause und ist durch einen Abfall der Estrogen- und einem Anstieg der Gonadotropinkonzentration im Serum gekennzeichnet. Es kommt zu Zyklusanomalien bis hin zum permanenten Ausbleiben der Ovulation und Menstruation. Dies bezeichnet die Menopause, die bei Frauen in westlichen Ländern mit ca. 51 Jahren eintritt. Der Zeitraum nach der Menopause wird allgemein als Postmenopause bezeichnet. Aufgrund des Estrogendefizits kommt es zu einer Dysregulation der Hypophysen-Hypothalamus-Ovar-Achse.

Durch das Fehlen der Estrogene bleibt die negative Rückkopplung seitens der Steroide auf GnRH und die Gonadotropine LH und FSH aus, was zu einer erhöhten Serumkonzentration dieser führt. Hierbei erreichen die Serumspiegel ihr Maximum 1-3 Jahre nach der Menopause, wobei der FSH- Spiegel deutlich über dem LH-Spiegel liegt. Dies ist in dem zusätzlichen Inhibindefizit begründet. In der reproduktiven Frau wird unter dem Einfluss von Estrogenen Inhibin in den Granulosazellen des Ovars gebildet, welches die FSH-Sekretion hemmt. Ab dem 35. Lebensjahr kommt es jedoch zu einem hohen atretischen Follikelverlust, der zu einer Abnahme von Inhibin und im Zuge dessen zu einem kontinuierlichen FSH-Anstieg führt. Die Inhibin Spiegel sinken in der Menopause infolge der funktionellen Follikelinsuffizienz ab und die hemmende Wirkung auf FSH bleibt damit aus. Es kommt zur verstärkten FSH-Ausschüttung in Folge des kombinierten Inhibin- und Estrogendefizits. Die estrogeninduzierte SHBG- Synthese ist in der Menopause ebenfalls rückläufig (Leidenberger, 2009; Stute, 2011). Das postmenopausale Ovar leistet demnach keinen relevanten Beitrag mehr zur Gesamtmenge

der im Blutkreislauf zirkulierenden Estrogene. Der E2-Serumspiegel sinkt auf 3-5% des prämenopausalen Levels (Khosla et al., 1998). Der überwiegende Anteil stammt aus der peripheren Aromatisierung von adrenalen und ovariellen Androgenen zu Estrogenen. Den größten Anteil der zirkulierenden Estrogene bildet nun E1 (Longcope et al., 1986; Rannevik et al., 1995). Die durch den Estrogenmangel auftretenden Symptome während der Peri- und Postmenopause werden als klimakterisches Syndrom zusammengefasst und beinhaltet Hitzewallungen, Schweißausbrüche, Schlafstörungen, Stimmungsschwankungen, Konzentrationsstörungen, Libidoverlust und urogenitale Atrophien in Form von Involution der Scheide verbunden mit Trockenheit und Entzündungen oder Harninkontinenz und Zystitis.

Physiologische Folgen der Menopause sind neben einem erhöhten Risiko für Osteoporose und kardiovaskuläre Erkrankungen auch die Brustdrüsenatrophie, bei der der Fettanteil steigt. Studien zeigen, dass die Erkrankungsrate für Arteriosklerose und Bluthochdruck in postmenopausalen Frauen deutlich ansteigt (Baker et al., 2003; Ouyang et al., 2006). Auch der Knochenabbau ist erhöht, was zu einer Störung der Knochenhomöostase (Osteoporose) und in Folge dessen zu einem erhöhten Frakturrisiko führt (Garnero et al., 1996; Riggs et al., 2002). Zur Behandlung von klimakterischen Beschwerden findet die Verabreichung von synthetischen Steroiden im Rahmen einer Hormonersatztherapie (HRT) Anwendung. Hierbei wird für die Behandlung der postmenopausalen Beschwerden wie Hitzewallungen oder urogenitale Atrophie eine Monotherapie mit Estrogenen oder eine Kombination von Estrogen und Gestagen unterschieden. Ein kritischer Punkt stellt jedoch ein damit verbundenes erhöhtes Risiko für die Entwicklung von hormonsensitiven Krebsarten wie Brust- und Endometriumskarzinom dar (Beral et al., 2002; Beral, 2003). So musste gar ein Teil der Studie der „Womens Health Initiative“ (WHI) aus den USA vorzeitig abgebrochen werden, da ein erhöhtes Risiko an Brustkrebs zu erkranken für die Patienten unter einer Estrogen-Progesteron Kombinationstherapie das Fortführen der Studie nicht mehr rechtfertigte (Rossouw et al., 2002). Durch die Vielzahl an Veröffentlichungen, die einen klaren Zusammenhang zwischen einer klassischen HRT und einem erhöhten Brustkrebsrisiko fanden, rückte die Suche nach risikoärmeren Alternativen verstärkt in den Fokus der Gesellschaft. Aufgrund ihrer beschriebenen Wirkung als „selective estrogen receptor modulator“ (SERM) werden die Phytoestrogene generell und insbesondere die Soja-Isoflavone als eine mögliche risikoarme alternative HRT diskutiert.

1.1.6 Brustkrebs

Brustkrebs ist eine der häufigsten krebsbedingten Todesursachen der Frau im 21. Jahrhundert (Boyle and Levin, 2008). Dabei ist die Entstehung dieses hormonsensitiven Karzinoms nur zu einem geringen Prozentsatz auf genetische Ursachen zurückzuführen. Vielmehr spielen neben der Länge des Zeitfensters der Lebensexposition mit Estrogen sozioökonomische Faktoren wie Lebens- und Essgewohnheiten eine Rolle. So zeigen asiatische Frauen eine deutlich geringere Inzidenz an Brustkrebs als in der westlichen Population (Levi et al., 1994; Wu et al., 2013). Epidemiologische Studien führen dies auf die traditionelle isoflavonreiche Ernährungsweise zurück (Lee et al., 1991; Wu and Pike, 1995; Adlercreutz, 2002; Yamamoto et al., 2003; Wu et al., 1998, 2008, 2013). Interessanterweise weisen Asiatinnen die in die USA ausgewandert sind ein gleiches Brustkrebsrisiko auf wie die dort lebende Bevölkerung (Ziegler et al., 1993), die durch eine mögliche Adaption der Essgewohnheiten zustande kommt. Wu et al. zeigte zum einen, dass der Tofukonsum von Einwanderern mit den Aufenthaltsjahren sinkt und dass ein erhöhter Fettgehalt der Nahrung ebenfalls in Zusammenhang mit einer erhöhten Brustkrebsinzidenzrate steht (Wu et al., 1996a, 1998).

Risikofaktoren die mit einem erhöhtem Brustkrebsrisiko in Zusammenhang stehen sind Nulliparität, frühe Menarche, späte Menopause, kurzer Zyklus und ein hoher endogener Estrogenspiegel (Toniolo et al., 1995; Hulka and Moorman, 2001). Alle diese Faktoren führen zu einer höheren Lebenszeitexposition mit E₂, die wiederum in Zusammenhang mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko steht. Aufgrund der stimulatorischen Effekte von E₂ über ihre rezeptor-vermittelten Wirkmechanismen auf die Zellproliferation und ihrer genotoxischen Metabolite, stehen Estrogene in Verdacht Brustkrebs zu induzieren (Mense et al., 2008). Es konnte in einer Untersuchung gezeigt werden, dass erhöhte Estrogenkonzentrationen mit einem erhöhten postmenopausalen Brustkrebsrisiko korrelieren (Toniolo et al., 1995). Ostasiatische Frauen hingegen weisen einen um 20-30% -igen niedrigeren Plasmaestrogenspiegel verglichen zur kaukasischen Bevölkerung auf (Peeters et al., 2003; Sowers et al., 2006) und auch der Zyklus von asiatischen Frauen ist um ca. 2-3 Tage länger (Cassidy et al., 1994; Wu et al., 1996b). Diese Beobachtungen sprechen für ein verringertes Brustkrebsrisiko in der asiatischen Frau. Der Zusammenhang zwischen der Zyklusdauer und dem Brustkrebsrisiko könnte in der ~ 4-fach erhöhten mitotischen Teilungsrate des Brustgewebes in der lutealen Phase liegen (Ferguson and Anderson, 1981; Pike et al., 2004). So sind Frauen mit einem kurzen Zyklus vermehrt der lutealen Phase ausgesetzt. Olsson et al. zeigte in einer retrospektiven Untersuchung, dass Brustkrebspatienten einen ebenfalls signifikant kürzeren Menstruationszyklus aufwiesen als die Kontrollgruppe (Olsson et al.,

1983). Einen weiteren Risikofaktor für die Entstehung von Brustkrebs stellt eine fettreiche Ernährung und ein damit verbundenes Übergewicht dar (Brown and Simpson, 2010; Anderson and Neuhouser, 2012). So zeigten Cecchini und Kollegen, dass ein erhöhter Body-Mass-Index mit einem erhöhten Risiko für Brustkrebs assoziiert ist (Cecchini et al., 2012).

1.2 Steroidhormonrezeptoren

Die Steroidhormonrezeptoren (SR) stellen die Schlüsselstelle für die biologische Wirkung der Steroidhormone dar. Bei ihnen handelt es sich um intrazelluläre Rezeptoren, die für die Signaltransduktion der Steroidhormone in der Zelle verantwortlich sind und somit die biologische Antwort auslösen. Sie zählen zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren NR3 (nuclear receptor subfamily 3) und umfassen unter anderem die Estrogenrezeptoren (ER) und die Progesteronrezeptoren (PR). Der im Cytoplasma vorliegende Rezeptor wird durch die Bindung eines Liganden (z. Bsp. Steroidhormon) aktiviert, transloziert in den Zellkern und wirkt dort als Transkriptionsfaktor (Evans, 1988). Steroidhormonrezeptoren weisen einen strukturell sehr ähnlichen und charakteristischen Aufbau auf, der schematisch in Abbildung 4 dargestellt ist.

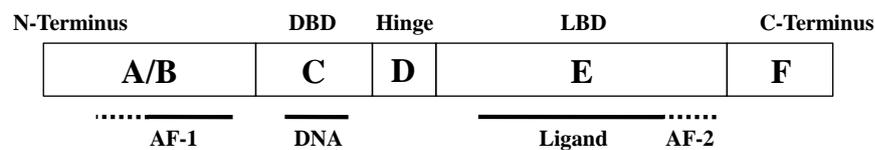


Abbildung 4: Allgemeiner Aufbau der Steroidhormonrezeptoren (Nilsson et al., 2001). Aktivierungsfunktion (AF), DNA-Binde-Domäne (DBD), Liganden-Binde-Domäne (LBD)

Man unterscheidet drei Hauptdomänen. Die variable N-terminale Regulator-domäne (A/B), die eine ligandenunabhängige Aktivierungsfunktion (AF-1) besitzt. Sie ist notwendig für die vollständige transkriptionelle Aktivität des Rezeptors und verantwortlich für die zielgen- und zellspezifische Antwort. Die sich anschließende C-Domäne ist die DNA-Bindedomäne (DBD), welche hochkonserviert ist, zwei asymmetrische Zink- Finger- Motive enthält, für die Rezeptordimerisierung und für die DNA- Bindung an das sog. hormonresponsives Element (HRE) essentiell ist. Am C- Terminus befindet sich abschließend die weniger konservierte Ligandenbindungsdomäne (LBD)- E/F-Domäne. In ihr liegt die Aktivierungsfunktion AF-2, die durch Bindung des Liganden hormonabhängig aktiviert wird. Darüber werden die Dimerisierung des Rezeptors und die Translokation in den Kern möglich. Die AF-2 fungiert als spezifische Bindungsstelle für Co-Aktivatoren und übermittelt so die transkriptionelle Aktivierungsantwort (Barkhem et al., 1998; Nilsson et al., 2001).

1.2.1 Wirkmechanismen

Die Wirkmechanismen der SR sind sehr komplex und hängen von einer Vielzahl an Faktoren ab, wie der molekularen Struktur des Liganden (endogen, synthetisch oder natürlich vorkommender), der Isoform des beteiligten Rezeptors, der Beschaffenheit der Promotorregion des Zielgens (HRE, Bindungsstellen für AP-1 und Sp-1) und dem Vorhandensein spezifischer Co-Regulatoren in der Zielzelle. Hierbei wird nach Liganden-abhängigen und Liganden-unabhängigen Aktivierungen unterschieden. Bei der Liganden-abhängigen Aktivierung können die SR direkt auf die Gentranskription über die Bindung an ein HRE (klassisch, direkt) oder über sog. AP-1 und Sp-1 Bindungsstellen über Protein-Protein-Interaktionen (alternativ, tethered) wirken (Nilsson et al., 2001; Henry and Norman, 2003). Die schnelle Antwort auf eine Ligandenbindung wird über Komponenten der intrazellulären Signalwege, z. B. Second-Messenger Produktion, Ionenkanäle oder Proteinkaskaden vermittelt. Diese sehr raschen nur wenige Minuten oder Sekunden dauernden Aktivierungen sind unabhängig von der Gentranskription und werden deshalb als nicht-genomisch bezeichnet. Einer der ersten sog. nicht-genomischen Effekte wurde für E2 beschrieben. Pietras und Szego zeigten, dass E2 zu einer schnellen Stimulation der cAMP Produktion führt und es zu einem Ca^{2+} -Einstrom in das Endometrium von ovariectomierten Ratten kommt (Pietras und Szego, 1977). Auch die Anschaltung von extranukleären Signalkaskaden und der damit verbundenen Aktivierung des Src/ras/raf/MAP Kinase-Signalweg gehört zur Liganden-abhängigen nicht-genomischen Wirkweise. Bei der Liganden-unabhängigen Aktivierung spricht man meist vom sogenannten „Crosstalk“ bei der in Abwesenheit des Liganden alternative Signalwege die Aktivität des SR über Phosphorylierung modulieren können. Diese Liganden-unabhängige Aktivierung kann zum einen über Regulatoren der generellen Phosphorylierungskaskade (Proteinkinase A, Proteinkinase C) geschehen oder über extrazelluläre Signale vermittelt werden. Hierzu zählen Wachstumsfaktoren (EGF, IGF-1 und TGF β), Cytokine, Neurotransmitter (Dopamin) und Zellzyklusregulatoren (Nilsson et al., 2001; Henry und Norman, 2003; Heldring et al., 2007; Tanos et al., 2012). Abbildung 5 stellt beispielhaft die verschiedenen Wirkmechanismen dar.

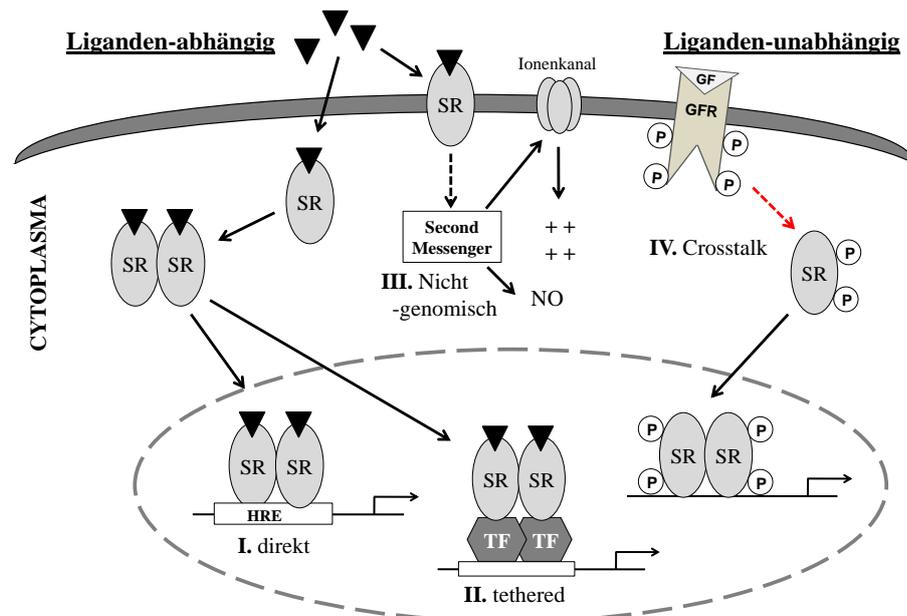


Abbildung 5: Wirkmechanismen von Steroidrezeptoren, modifiziert nach Heldring et al., 2007; Mun et al., 2013.

Steroidhormonrezeptor (SR), Hormon-responsives Element (HRE), Transkriptionsfaktor (TF), Phosphorylierung (P), Wachstumsfaktor (GF), Wachstumsfaktorrezeptor (GFR)

1.2.2 Estrogenrezeptoren

Die estrogenen Effekte werden hauptsächlich über die Estrogenrezeptoren (ER) vermittelt. Sie sind für die Signaltransduktion in der Zelle verantwortlich und vermitteln so ihre gewebespezifische Antwort. Sie zählen zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren NR3I (nuclear receptor subfamily 3, Gruppe I) und es existieren 2 Isoformen, der Estrogenrezeptor alpha ($ER\alpha$) und der Estrogenrezeptor beta ($ER\beta$), die auf verschiedenen Genen (Esr1 und Esr2) codiert sind. Beide Isoformen binden die gleiche DNA-Sequenz (das sog. Estrogen-responsive Element, ERE) und reagieren ähnlich auf E2, zeigen jedoch Unterschiede in ihrer DNA-Bindungs-Affinität und ihrer Spezifität zu pharmakologischen Liganden. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Transkriptionsaktivität und Gewebeverteilung üben beide Isoformen verschiedene zellspezifische Funktionen und Wirkungen im biologischen System aus (Nilsson et al., 2001) und stellen demnach interessante therapeutische Ziele dar (Nilsson and Gustafsson, 2011).

Die Expression der beiden Isoformen $ER\alpha$ und $ER\beta$ ist abhängig vom Geschlecht und folgt einer gewebespezifischen Verteilung. Der $ER\alpha$ wird hauptsächlich im Uterus, Prostata (Stromazellen), Ovar (Thekazellen), Hoden (Leydigzellen), Nebenhoden, Knochen, Brust, Leber, Niere, weißem Fettgewebe und verschiedenen Regionen im Gehirn exprimiert. Der $ER\beta$ wird vorwiegend im Darm, Prostata (Epithelzellen), Hoden, Ovar (Granulosazellen),

Knochenmark, Speicheldrüse, Gefäßendothel, Lunge, Blase und im Gehirn exprimiert (Gustafsson, 1999; Setchell and Cassidy, 1999; Nilsson and Gustafsson, 2011).

Die Wirkmechanismen von Estrogenen sind vielfältig und folgen den oben aufgeführten Aktivierungswegen (siehe Abb. 5). So können sie direkt über die DNA Bindung an das ERE wirken (klassisch direkter genomischer Weg). Beispiele für klassisch regulierte Gene mit mindestens einem ERE in der Promotorregion sind Complement C3, dessen Promotor zwei EREs enthält (Fan et al., 1996) oder das Gen für den Progesteronrezeptor (Savouret et al., 1991a; Kraus et al., 1994). Aber auch indirekte Wirkmechanismen sind beschrieben. So verhindert die Interaktion des ER α mit NF κ B die Bindung dessen an den IL-6 Promotor, was zu einer Inhibierung der IL-6 Expression durch E2 führt (Galien and Garcia, 1997). Ein Beispiel für einen sog. „Crosstalk“ stellt die E2-unabhängige Phosphorylierung des ER durch das extrazelluläre Signal Heregulin dar. In Brustkrebszellen führt Heregulin zur Aktivierung des Heregulinrezeptors HER-2 (eine Tyrosinkinase), was zu einer direkten und schnellen Phosphorylierung des ER an Tyrosinresten und in Folge zur Transkription des Progesteronrezeptorgens führt. Heregulin verstärkt damit das hormonunabhängige Wachstum von humanen Brustkrebszellen. Die daraus resultierende Überexpression von HER-2 führt zur Entwicklung eines E2-unabhängigen Wachstums, das für E2 und das für die Therapie von Brustkrebs eingesetzte SERM (selektiver Estrogenrezeptor-Modulator) Tamoxifen unempänglich ist (Pietras et al., 1995).

1.2.3 Progesteronrezeptoren

Die biologische Wirkung von Progesteron wird über seinen spezifischen Rezeptor dem Progesteronrezeptor (PR) entfaltet. Auch hier gibt es zwei Isoformen, der PR-A (83kDa) und der PR-B (114kDa). Diese sind von einem Gen codiert und entstehen durch wechselnde Aktivität zweier Promotoren (Horwitz and Alexander, 1983; Kastner et al., 1990).

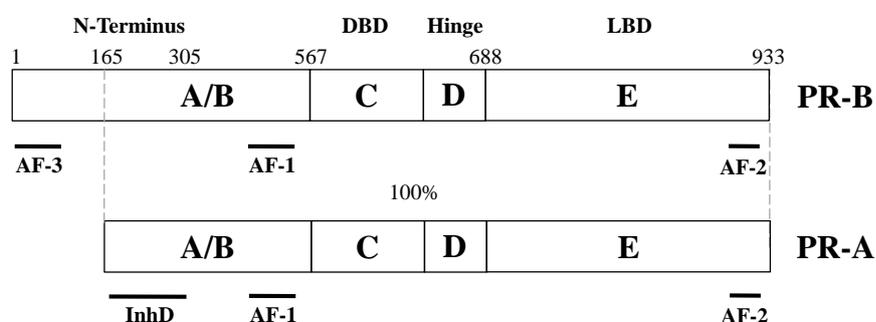


Abbildung 6: Schematischer Aufbau der Progesteronrezeptor-Isoformen A (PR-A) und B (PR-B), modifiziert nach Henry and Norman, 2003. Aktivierungsfunktion (AF), DNA-Binde-Domäne (DBD), Liganden-Binde-Domäne (LBD), Inhibitorische Domäne (InhD).

Beide Rezeptoren besitzen die gleiche LBD und DBD, weisen jedoch eine unterschiedliche transkriptionelle Aktivität durch einen unterschiedlichen N-Terminus auf (Abb 6). Durch die zusätzliche AF-3 innerhalb der N-terminalen Domäne ist der PR-B ein stärkerer Aktivator als PR-A und erlaubt die Bindung von verschiedenen Co-Faktoren, die nicht an PR-A binden können (Giangrande and McDonnell, 1999). Die unterschiedliche transkriptionelle Aktivität der PR ist demnach in ihrer unterschiedlichen Interaktion mit Co-Regulatoren begründet (Giangrande et al., 2000). Studien mit selektiven Knockout (KO)-Tieren zeigten, dass der PR-A hauptsächlich an der reproduktiven Antwort beteiligt ist, hingegen der PR-B für die normale proliferative Antwort der Brustdrüse auf Progesteron eine Rolle spielt (Mulac-Jericevic et al., 2000; Conneely et al., 2001; Mulac-Jericevic et al., 2003). Die zwei Promotoren des PR-Gens sind estrogenresponsiv. Der PR wird über die Bindung des ER α an das ERE in der Promotorregion des PR aktiviert (Savouret et al., 1991b). Die Expression des PRs steht somit unter der Kontrolle von E2 und wurde aufgrund dessen als Estrogenitätsmarker in der vorliegenden Arbeit genutzt (Kraus and Katzenellenbogen, 1993; Parczyk et al., 1997; Graham and Clarke, 1997).

1.3 Isoflavone

1.3.1 Vorkommen und Struktur

Isoflavone sind polyphenolische Substanzen mit estrogener Aktivität. Sie kommen als sekundäre Metabolite in der Pflanze vor und sind den Phytoestrogenen zugeordnet (Kulling and Watzl, 2003). Isoflavone finden sich hauptsächlich in Pflanzen der Familie *Fabaceae* und *Leguminosae*. Wichtige Vertreter sind die Sojabohne (*Glycine max*) und der Rotklee (*Trifolium pratense*) dar. Die wichtigsten Isoflavone in der Sojabohne sind Daidzein (Dai), Genistein (Gen) und Glycitein (Gly) und kommen im Verhältnis 10:8:1 vor (Bhagwat et al., 2008; Kulling and Watzl, 2003). In der Pflanze sind sie meist als Zuckerkonjugat in der Zellvakuole gespeichert und dienen als Vorstufen von Phytoalexinen, zur Abwehr von Bakterien und Pilzen (Phillips and Kapulnik, 1995). Chemisch gehören sie zur Gruppe der Flavanoide, die wiederum zu den Polyphenolen zählen. In Abbildung 7 sind die Strukturformeln der Isoflavone Daidzein, Genistein und Glycitein dargestellt.

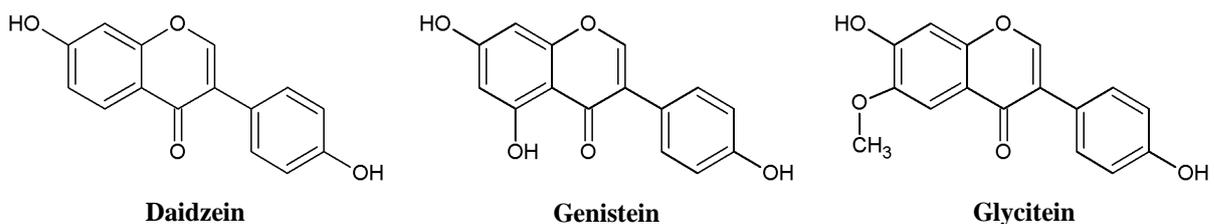


Abbildung 7: Strukturformeln der Isoflavone Daidzein, Genistein und Glycitein in Anlehnung an Soukup, 2013.

Soja und Sojaprodukte stellen die Hauptquelle für Isoflavone in der Ernährung des Menschen dar. Vor allem in Asien spielt Soja als Lebensmittel eine wichtige Rolle und ist zentraler Bestandteil der traditionellen Ernährungsweise. Hierzu zählt die Sojabohne selbst und eine Vielzahl von Sojaprodukten wie Sojamehl, Sojamilch, Tofu, Tempeh und Miso (Mortensen et al., 2009). In rohen unbehandelten Sojabohnen und Sojaprodukten (z.Bsp. Sojamehl) liegen die Isoflavone hauptsächlich als 6''-O-Malonyl-7-O-Glucosid vor, aber auch 6''-O-Acetyl-7-O-Glucoside, 7-O-Glucoside und Aglykone sind zu finden (Griffith and Collison, 2001). Fermentierte Sojaprodukte wie Sojamilch, Tofu, Tempeh oder Miso weisen einen hohen Aglykongehalt auf, da die für die Fermentation eingesetzten β -Glucosidasen den Zucker abspalten (Otieno et al., 2007).

Der Isoflavongehalt in der Sojabohne ist sehr variabel und hängt u.a. von der verwendeten Sojabohnensorte, dem Reifegrad der Ursprungspflanze, der Wachstumsregion, der Feuchtigkeit und Temperatur des Ackerbodens und dem Erntejahr (Wetterkonditionen) ab

und kann zwischen 18 bis 562 mg/100 g variieren (Kim et al., 2005; Lee et al., 2003; Mortensen et al., 2009). Auch die verschiedenen Verfahren zur Herstellung von Sojaprodukten beeinflussen den Isoflavongehalt (Liggins et al., 2000; Mortensen et al., 2009). Setchell & Cole untersuchten die Isoflavongehalte von 40 verschiedenen Sojamilchmarken über einen Zeitraum von 3 Jahren und zeigten, dass die Lagerung ebenfalls den IF-Gehalt beeinflusst. Sie fanden Unterschiede bis zu einem Faktor fünf (Setchell and Cole, 2003). Auch die Konjugationsmuster von Isoflavonen ändern sich durch die Produktherstellung und -lagerung. So wird bspw. das Malonylglucosid durch eine trockene und warme Behandlung zum Acetylglucosid decarboxyliert. Das Vorkommen von Acetylglucosiden stellt demnach einen Indikator für eine Hitzebehandlung dar (Mathias et al., 2006). Einen Überblick über die Isoflavongehalte zahlreicher Produkte und Lebensmittel gibt die von dem US Landwirtschaftsministerium (USDA) frei zugängliche Datenbank (Bhagwat et al., 2008) und auch die Europäische Lebensmittelinformationsplattform EuroFIR (Gry et al., 2007) an. Beide Datenbanken führen neben den Hauptisoflavonen Dai und Gen auch Gly und die in Rotklee enthaltenen 4'-Methylether von Dai (Formononetin) und Gen (Biochanin A) auf.

1.3.2 Aufnahme, Metabolismus und Bioverfügbarkeit

In der täglichen Aufnahmemenge von Isoflavonen gibt es im weltweiten Vergleich deutliche Unterschiede, die von der Ernährung entscheidend geprägt sind. Während Asiaten durch die traditionelle Ernährung 20-60 mg Isoflavone täglich aufnehmen (Seow et al., 1998; Nagata et al., 1998; Wakai et al., 1999; Arai et al., 2000), nehmen Europäer nur maximal 1-3 mg/d auf (Setchell and Cassidy, 1999; Horn-Ross et al., 2001, 2006; Keinan-Boker et al., 2002; Chun et al., 2007). Eine Sonderform stellt die vegetarische Ernährungsweise dar, bei der die Isoflavonaufnahmemenge mit 3-12 mg/d höher als in der westlichen Gesamtbevölkerung aber noch deutlich unter der traditionellen asiatischen Ernährungsweise liegt (Clarke et al., 2003; van Erp-Baart et al., 2003; Mortensen et al., 2009).

Die mit der Nahrung aufgenommenen Isoflavone können bereits im Dünndarm resorbiert werden. Die als Glucosid vorliegenden Isoflavone werden mittels der dünndarmeigenen zytosolischen Glucosidase (Lactase-phlorizin-hydrolase) und der Mikrobiotika in die freie Aglykonform überführt (Setchell and Cassidy, 1999; Day et al., 2000; Kulling and Watzl, 2003). Die Glucoside können auch über den natriumabhängigen Glucosetransporter SGLT1 aufgenommen werden, welcher jedoch nur eine untergeordnete Rolle spielt (Mortensen et al., 2009). Die Aufnahme der freien Aglykonform kann aufgrund der lipophilen Eigenschaft des Moleküls über passive Diffusion durch das Darmepithel erfolgen (Kulling and Watzl, 2003). Nicht resorbierte Isoflavone gelangen in den Dickdarm und unterliegen einem intensiven

mikrobiellen Metabolismus durch die Darmmikrobiotika. Hierbei kann Dai zu Dihydrodaidzein (DH-Dai), O-Desmethylangolensin (ODMA) und Equol umgesetzt werden (Bowey et al., 2003). Die Equolbildung unterscheidet sich interindividuell sehr stark und ist abhängig von der Ernährung und der damit vorhandenen Darmflora (Bolca et al., 2007). So sind nur etwa ein Drittel der westlichen Bevölkerung in der Lage Equol zu bilden im Vergleich zu ca. 55% der asiatischen und der sich vegetarisch-ernährenden Bevölkerung (Lampe et al., 1998; Mortensen et al., 2009). Ko et al. zeigten, dass eine regelmäßige Einnahme von Sojamilch über sechzehn Wochen zu einer Induktion der Equolbildung in 8 von 20 Nicht-Equolbildnern führte (Ko et al., 2010). Wie wichtig die Darmbakterien im mikrobiellen Metabolismus sind, zeigte eine Studie mit keimfreien Ratten, die keinen der bekannten Metabolite produzieren konnten. Kolonisierte man sie jedoch mit Mikroorganismen fand die Bildung wieder statt (Bowey et al., 2003). Auch physiologische und pathophysiologische Faktoren beeinflussen die Darmmikroflora. So führt eine Behandlung mit Antibiotika zu einer reduzierten bakteriellen Metabolitbildung (Atkinson et al., 2004). In Abbildung 8 ist der mikrobielle und oxidative Metabolismus von Daidzein in der Übersicht dargestellt.

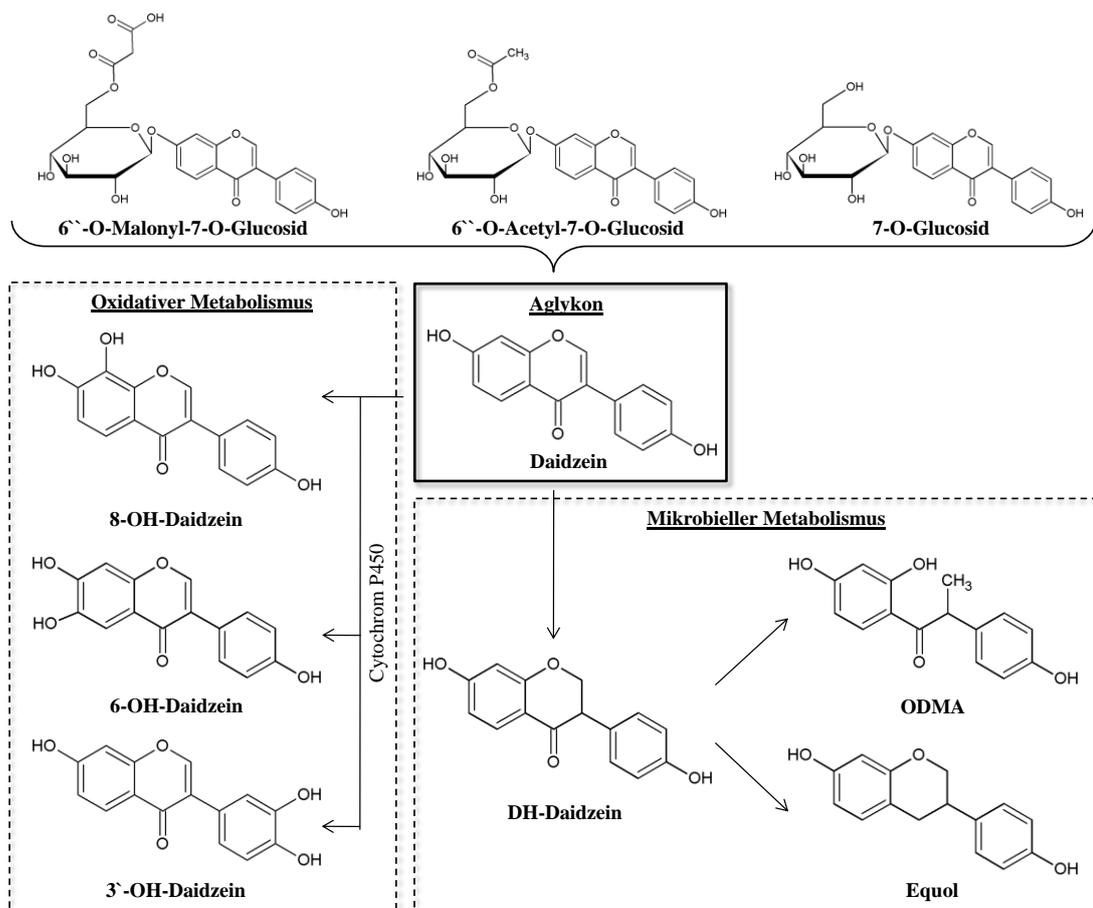


Abbildung 8: Übersicht über den mikrobiellen Metabolismus (Hauptweg) und den oxidativen Metabolismus über das Enzym Cytochrom P450 am Beispiel von Daidzein, modifiziert nach Mortensen et al., 2009.

Die mikrobiellen Metabolite von Genistein sind Dihydrogenistein (DH-Gen), 6'-Hydroxy-ODMA (6'-OH-ODMA), 2-(4-Hydroxyphenyl)-Propansäure (HPPS) und 4-Ethylphenol (Coldham et al., 2002). Glycitein wird zu 6-Hydroxy-Dai (6-OH-Dai) demethyliert und weiter zu 6-Hydroxy-DH-Dai, 6-Hydroxy-Equol und 5'-Hydroxy-ODMA abgebaut (Rüfer et al., 2007). Der mikrobielle Metabolismus von Genistein und Glycitein ist in Abbildung 9 dargestellt.

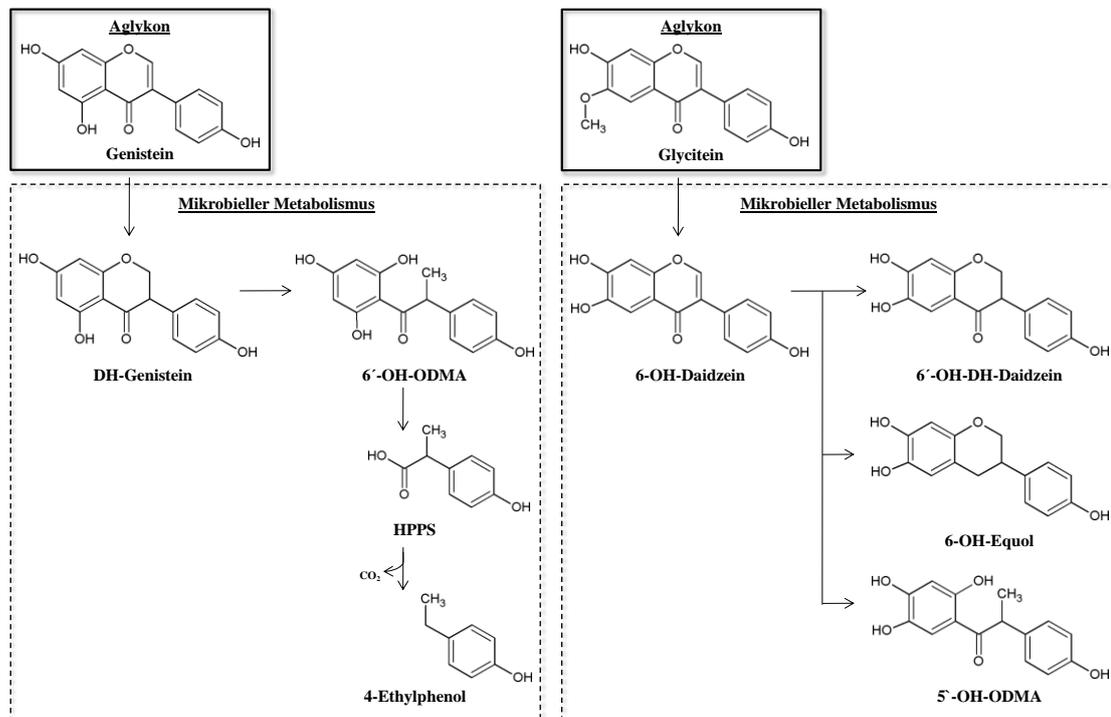


Abbildung 9: Mikrobieller Metabolismus von Genistein und Glycitein. Dihydro (DH), Hydroxy (OH), O-Desmethylangolensin (ODMA), 2-(4-Hydroxyphenyl)-Propansäure (HPPS), modifiziert nach Mortensen et al., 2009.

Die aus dem Darm resorbierten Isoflavone, sowie deren reduktiven Metabolite gelangen über die Pfortader in die Leber. Hier können die Isoflavone durch das endogene Cytochrom -P450 hydroxyliert werden und unterliegen somit einer Phase-I-Biotransformation. Dieser oxidative Metabolismus spielt jedoch nur eine untergeordnete Rolle (Kulling et al., 2000, 2001; Rüfer et al., 2006). Eine viel zentralere Rolle spielt der Phase-II-Metabolismus, bei dem die Isoflavone von UDP-Glucuronosyltransferasen (UGT) und Sulfotransferasen (SULT) zu Glucuroniden, Diglucuroniden, Sulfaten, Disulfaten oder Sulfolglucuroniden umgesetzt werden (Adlercreutz et al., 1995; Doerge et al., 2000; Nakano et al., 2004; Hosoda et al., 2010). Die Konjugation der stark wasserlöslichen Substituenten an die Metabolite führt zu einer weiter verbesserten Entgiftung und Ausscheidung dieser und findet ebenfalls in der Leber statt. Die Ausscheidung erfolgt hauptsächlich über die Nieren. Hierbei ist in der Literatur beschrieben, dass 5-35% der Metabolite renal ausgeschieden werden (Mortensen et al., 2009) und dabei die Glucuronide den Hauptausscheidungsmetabolit darstellen (Adlercreutz et al., 1995; Clarke et al., 2002).

Auch können die Isoflavone über die Galle ausgeschieden werden (Sfakianos et al., 1997; Mortensen et al., 2009). Mit der Galle gelangen die Isoflavone über den enterohepatischen Kreislauf in den Darm, wo die Konjugate durch die Enzyme der Darmflora gespalten und die Aglykone erneut resorbiert werden (Kulling and Watzl, 2003).

In hauptsächlich konjugierter Form sind die Isoflavon-Metabolite sowohl im Plasma/Serum, als auch im Gewebe messbar. Die Plasma-Isoflavonspiegel sind abhängig von der Isoflavonaufnahme. Aufgrund der traditionell isoflavonreichen Ernährung weisen Asiaten demnach einen höheren Plasma-Isoflavonspiegel von ca. 870 nM auf als Europäer mit durchschnittlich nur ca. 50 nM (Adlercreutz et al., 1993; Kulling and Watzl, 2003). Das Auftreten der Metabolite im Plasma ist zeitabhängig von ihrer Produktion im Darm. Die Plasmakurven weisen einen biphasischen Verlauf auf, der den enterohepatischen Kreislauf und die damit verbundene zyklische Aufnahme in den Dünndarm widerspiegelt (Setchell, 1998). Dabei wird die maximale Plasmakonzentration nach ca. 5-9 h nach Aufnahme erreicht (Mortensen et al., 2009). Bei einer Langzeitgabe von Isoflavonen verändert sich der Plasmakurvenverlauf nicht, jedoch fällt die Plasmakonzentration 24 h nach Aufnahme nicht mehr auf das Ursprungsniveau ab (Védrine et al., 2006).

Heutzutage ist nicht bekannt, ob die gemessenen Isoflavonkonzentration im Plasma repräsentativ für die jeweiligen Zielgewebe sind. Angaben zur Analyse der Spiegel in wichtigen Zielgeweben wie Brust, Prostata oder Fett sind nur sehr limitiert vorhanden. In einer Humanstudie mit postmenopausalen Frauen wurden nach einer zweiwöchigen Isoflavonaufnahme von 45 mg/d Plasmaspiegel von $\sim 1 \mu\text{M}$ gefunden, wo hingegen die Brustgewebespiegel mit $3 \mu\text{M}$ deutlich höher lagen (Kulling and Watzl, 2003). In der Studie von Maubach et al. wurden die Isoflavonspiegel in Urin, Serum und Brustgewebe verglichen. Hierbei stellte Equol den überwiegenden Metaboliten in der Brust dar ($< 1 \mu\text{mol/l}$) und lag deutlich über der Konzentration im Serum. Demnach scheint das Brustgewebe deutlich höheren Isoflavonkonzentrationen ausgesetzt zu sein. Im Urin lagen die Konzentrationen insgesamt um das 100-fache höher als im Serum und Brustgewebe (Maubach et al., 2003). Auch gibt es einen Unterschied in der Pharmakokinetik und Bioverfügbarkeit zwischen der freien Aglykonform und der glucosidischen Form. Setchell et al. zeigten unterschiedliche Plasmapeak-Konzentrationen zwischen Aglykonen und β -Glucosiden. So erreichten die Aglykone von Dai und Gen mit 6,6 h bzw. 5,2 h deutlich früher ihr t_{max} , als die β -Glucoside von Dai (9,0 h) und Gen (9,3 h) (Setchell et al., 2001). Daran wird deutlich, dass die längere Aufenthaltszeit der Glucoside notwendig für die hydrolytische Spaltung des Glucosidanteiles und der damit verbundenen Bioverfügbarkeit ist. Der komplexe Metabolismus der Isoflavone

macht ebenfalls deutlich, dass die biologische Wirksamkeit von einer Vielzahl von Faktoren abhängt und bei der Beurteilung berücksichtigt werden muss.

1.3.3 Biologische Wirkung

Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zum endogenen Estrogen E2 können sie als Estrogenagonisten oder -antagonisten über die Bindung an den ER physiologische Wirkungen nachahmen oder blockieren (Kulling and Watzl, 2003). Aufgrund dessen, lassen sie sich den selektiven Estrogenrezeptor-Modulatoren (SERM) zuordnen und werden auch als „Phyto-SERMs“ bezeichnet (Diel et al., 2001; Wuttke et al., 2003). *In vitro*-Studien zeigten, dass Isoflavone hauptsächlich den ER β binden, wobei Genistein die höchste Bindungsaffinität zum ER β aufweist (Kuiper et al., 1997, 1998; Wuttke et al., 2007). Verglichen zu E2 ist ihre Bindungsaffinität zu den ERs und die damit verbundene estrogene Aktivität deutlich geringer (Breinholt and Larsen, 1998; Gruber et al., 2002; Kuiper et al., 1998). Sie können jedoch in 100 bis 1000-fach höheren Konzentrationen im Körper vorliegen, da sie eine geringere Affinität zu den Serumproteinen Albumin oder SHBG besitzen und dadurch ein höherer Anteil ungebunden vorliegt (Adlercreutz et al., 1993; Setchell and Cassidy, 1999; Rowland et al., 2003).

Sojaisoflavone stehen in einem Zusammenhang mit einer Reihe positiver Effekte auf die Gesundheit des Menschen. So steht eine traditionell asiatischen Ernährungsweise in Zusammenhang mit einem verringerten Risiko an verschiedenen Erkrankungen wie Osteoporose (Messina et al., 2004), Herz-Kreislaufkrankungen und Adipositas zu erkranken (Barnes et al., 2000; Yamori, 2004; Orgaard and Jensen, 2008). So wurde in dem Tiermodell der weiblichen Wistar Ratte für den Knochen gezeigt, dass Genistein über den ER α die Apoptose inhibiert, die Zellproliferation und Differenzierung induziert und somit knochenprotektive Eigenschaften aufweist, was möglicherweise bei der Prävention von Osteoporose nützlich ist (Hertrampf et al., 2007, 2008). Hingegen Genistein im Darm des gleichen Tiermodells eine ER β vermittelte inhibitorische Wirkung auf die Epithelzellproliferation und eine Stimulation der Apoptose zeigte, was in Zusammenhang mit einem protektiven Effekt auf die Entstehung des Colonkarzinoms steht (Schleipen et al., 2011). Auch im Muskel weiblicher Wistar Ratten konnten ER β vermittelte Effekte für Genistein gezeigt werden, die möglicherweise dem Muskelschwund durch den niedrigen E2-Spiegel in der Menopause entgegenwirken können (Velders et al., 2010).

Isoflavone üben auch ER-unabhängige Wirkungen auf das Hormonsystem aus. Hierzu zählt die Induktion der SHBG-Synthese in der Leber, die zu einem verringerten endogenen Plasmaspiegel an freiem Estrogen führt (Mousavi and Adlercreutz, 1993). Auch hemmen

Isoflavone die Enzyme der Steroidbiosynthese (Aromatase, 17 β - und 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (HSD)), was zur Modulation des Estrogenmetabolismus führt (Rice and Whitehead, 2008; Patisaul and Jefferson, 2010). Desweiteren können Isoflavone, insbesondere Genistein, hormonunabhängige Wirkungen ausüben, die eine wichtige Rolle bei den potenziell protektiven Effekten und der antikanzerogenen Wirkung zu spielen scheinen. Dazu gehören die Hemmung der Zellproliferation verschiedener Tumorzellen, die Induktion der Apoptose, die Hemmung der DNA Topoisomerase II und die Hemmung verschiedener Protein-Tyrosinkinasen (Kulling und Watzl, 2003). Auch besitzen Isoflavone antioxidatives Potential. So können sie über die Aktivierung antioxidativer Enzyme wie der Katalase und der Superoxiddismutase die Zelle vor oxidativen DNA-Schäden schützen und damit vor der Entstehung möglicher Zellentartung durch unkontrollierte Mutationen (Wei et al., 1995; Rüfer and Kulling, 2006).

1.3.4 Effekte von Isoflavonen auf den weiblichen Organismus

Die Wirkung von Isoflavonen hängt von einer Vielzahl von Faktoren ab. So sind die verabreichte Dosis, die Zusammensetzung, die Art und Dauer der Anwendung und auch das Zielgewebe entscheidend. Isoflavone stehen zum Beispiel im Verdacht die Entwicklung von Krebserkrankungen im Genitaltrakt zu fördern und die Entwicklung des Genitales und die Reproduktionsfähigkeit in der Maus und im Mensch negativ zu beeinflussen (Jefferson et al., 2007; Patisaul and Jefferson, 2010). So wurde für eine perinatale Exposition mit 50 mg/kg/d Genistein in der CD-1 Maus ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Uterusadenokarzinoms gezeigt (Newbold et al., 2001). Weiterhin wurde bei einer frühkindlichen Exposition mit Sojamilch bei Mädchen eine frühere Menarche beobachtet (Adgent et al., 2012). In tierexperimentellen Studien mit Ratten konnte ein verfrühter Eintritt in die Pubertät und unregelmäßige Zyklen mit verlängerten Estrusphasen durch die neonatale Gabe von Genistein gezeigt werden (Nagao et al., 2001; Lewis et al., 2003; Kouki et al., 2003; Bateman and Patisaul, 2008). Dies ist auf die disruptive Wirkung der Isoflavone auf die Hypothalamus-Hypophysen-Gnaden-Achse aufgrund ihres estrogenen Wirkpotentials zurückzuführen (Bateman and Patisaul, 2008). In einer Arbeit aus der eigenen Arbeitsgruppe konnte dies ebenfalls gezeigt werden. So führte eine lebenslange diätetische Isoflavonaufnahme zu einem früheren Pubertätseintritt in der weiblichen Wistar-Ratte (Molzberger et al., 2013).

Auf die Brustdrüse üben Isoflavone unterschiedliche Wirkungen aus. *In vitro* wurde in der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 eine dosisabhängige Wirkung für Genistein gezeigt (Wang et al., 1996; Hsieh et al., 1998). Genistein stimulierte das Wachstum der Zellen bei

geringen physiologischen Konzentration von $< 1 \mu\text{M}$, die bei einer täglichen Aufnahme von 50-100 mg Isoflavonen erreicht werden können (Wang and Kurzer, 1997; Zava and Duwe, 1997; Hsieh et al., 1998; Setchell et al., 2001; Wuttke et al., 2007). Konzentrationen $> 1 \mu\text{M}$ inhibierten jedoch die Proliferation der ER α positiven MCF-7 Zellen und auch der ER negativen Brustkrebszelllinie MDA-MB231, das auf die ER-unabhängige Inhibierung der Tyrosinkinase zurückgeführt wird (Wang et al., 1996; Hsieh et al., 1998; Wuttke et al., 2007). Durch diesen biphasischen Effekt stehen Isoflavone in Verdacht tumorfördernde Eigenschaften auszuüben. *In vivo* wurde dies sowohl in Nacktmäusen mit MCF-7 Zelltransplantaten (Ju et al., 2006) als auch in chemisch induzierten Tumormodellen gezeigt. Die Gabe von 750 ppm Gen führte zu einer Stimulation des MCF-7 Zelltumorwachstums und des MNU-induzierten Tumorwachstums in Sprague Dawley Ratten (Hsieh et al., 1998; Allred et al., 2004b, 2004a). Ein weiterer kritischer Aspekt stellt die antagonisierende Wirkung von Genistein auf Tamoxifen dar (Jones et al., 2002; Limer et al., 2006). Ju et al zeigte, dass die antiproliferative Wirkung des Antiestrogens Tamoxifen durch Genistein in MCF-7 Zellen aufgehoben werden kann (Ju et al., 2002), was bei der Behandlung von Brustkrebs mit dem Tamoxifen zu berücksichtigen ist (Liu et al., 2005).

Eine ganze Reihe anderer Studien zeigen jedoch auch chemopräventive Wirkungen der Isoflavone im Tiermodell von Brustkrebs (Sarkar and Li, 2002). Aufgrund ihrer bevorzugten Bindung an den ER β und der darüber vermittelten antiproliferativen Effekte können sie die Krebsentstehung inhibieren (Platet et al., 2004; Shaaban et al., 2003). Hierbei werden eine Vielzahl an Mechanismen diskutiert: antiproliferative Aktivität (Choi et al., 1998; Shao et al., 1998), anti-angiogenetische Aktivität (Fotsis et al., 1993, 1995; Sasamura et al., 2004) und Apoptoseinduktion (Li et al., 1999), welche zur Wachstumshemmung des Tumors führt.

Man geht davon aus, dass die präventiven Effekte nur zustande kommen, wenn die Exposition von Isoflavonen bereits vor der Differenzierung der Brustdrüse (präpubertär) beginnt (Barnes, 1997; Gallo et al., 2001; Lamartiniere, 2002; Pei et al., 2003). Die präpubertäre Exposition mit Isoflavonen bei der Chemoprävention führt zu einer veränderten Brustdrüsenentwicklung, die mit einer verbesserten Epithelzelldifferenzierung der Brustdrüse einhergeht. Dies zeigt sich in einer geringeren Anzahl an TEB (*terminal end bud*) und einer verstärkten Ausbildung von lobuloalveolären Strukturen (Murrill et al., 1996; Lamartiniere et al., 1998a; Hilakivi-Clarke et al., 1999a; Lamartiniere, 2000; Warri et al., 2008). Dies wird durch eine initial kurzzeitige Hochregulation des EGF Signalweges als sog. „imprinting“-Mechanismus erklärt. Im adulten Tier führt dies zu einer reduzierten EGFR Expression in den TEB (Lamartiniere, 2000, 2002; Lamartiniere et al., 2002). Einen anderen möglichen Mechanismus stellt die

Hochregulation des Tumorsuppressorgens BRCA1 dar. Dieser steht in Zusammenhang mit einer verringerten Tumorinzidenz (Cabanés et al., 2004; de Assis et al., 2011). Somit kann eine lebenslange, *in utero* begonnene Isoflavonexposition vor Brustkrebs schützen (Peeters et al., 2003; Limer and Speirs, 2004; Whitsett and Lamartiniere, 2006; Lee et al., 2009). Studien aus der eigenen Arbeitsgruppe, konnten eine verringerte Estrogensensitivität der Brustdrüse nach lebenslanger Exposition mit Isoflavonen in der ovariectomierten Wistar-Ratte bereits zeigen (Molzberger et al., 2012). Dieser protektive Effekt hängt entscheidend von dem Expositionszeitraum ab. In einer nachfolgenden Studie konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei dem kritischen Zeitfenster der Applikation um die postnatale Phase vor der Pubertät handelt (Molzberger et al., 2013). Interessanterweise scheint die protektive Wirkung einer lebenslangen Isoflavonexposition zusätzlich gewebespezifisch zu sein. Studien einer kooperierenden Forschungsgruppe von Diel et al. zeigten eine verstärkte Estrogensensitivität im Uterus unter gleichen Bedingungen (Möller et al., 2010). Die gewebelektive Wirkung von Isoflavonen stellt damit einen kritischen Punkt bei der Verwendung von Isoflavonen im Rahmen einer alternativen HRT dar. Abbildung 10 stellt die möglichen Wirkmechanismen von Phytoestrogenen im Überblick auf die Brust dar.

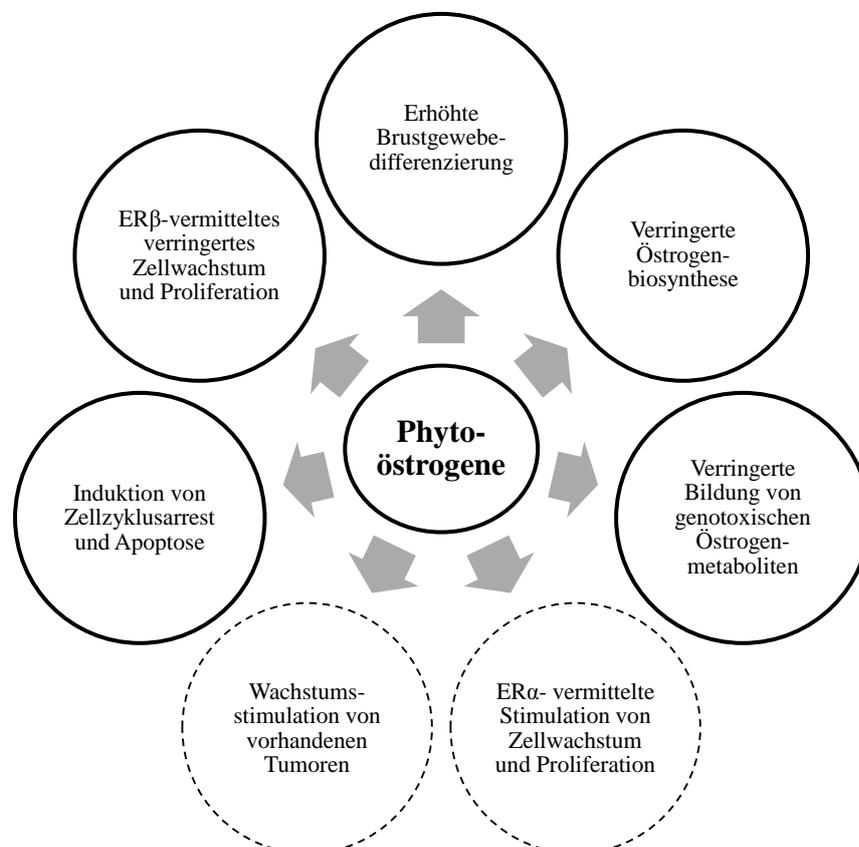


Abbildung 10: Überblick der von Phytoestrogenen ausgehenden Wirkung in Zusammenhang mit der Brustkrebsprävention (gestrichelte Linien: tumorfördernde Eigenschaften), modifiziert nach Mense et al., 2008.

1.4 Nahrungsergänzungsmittel

Aufgrund des estrogenen Wirkpotentials und der Gewebeselektivität der Isoflavone stehen sie zunehmend im Fokus der Gesellschaft. Durch die postulierten positiven Effekte auf die Gesundheit des Menschen drängen immer mehr Isoflavonpräparate auf den Markt, welche als Nahrungsergänzungsmittel (NEM) vertrieben werden.

Als NEM sind in der EU-Richtlinie 2002/46/EG und der darauf in §1 basierenden Nahrungsergänzungsmittel Verordnung (NemV) Produkte, die aus Nährstoffen oder sonstigen Stoffen mit ernährungsspezifischer und physiologischer Wirkung in konzentrierter Form bestehen, definiert. Das können Vitamine, Mineralstoffe und Spurenelemente, Aminosäuren, aber auch Ballaststoffe, Pflanzen oder Kräuterextrakte sein. Sie müssen mit einer Angabe über die empfohlene tägliche Verzehrmenge versehen sein, um Überdosierungen der Konzentrate zu vermeiden und mit dem Warnhinweis „Die angegebene empfohlene tägliche Verzehrmenge darf nicht überschritten werden.“ gekennzeichnet werden (NemV, §4 Kennzeichnung). Verbindliche Höchstmengen für Isoflavone in NEM existieren derzeit jedoch weder auf nationaler noch auf europäischer Ebene. Die vom Hersteller empfohlenen Dosen weisen starke Unterschiede auf und liegen meist zwischen 40-50 mg/d Isoflavon, können jedoch auch bis zu 100 mg oder 200 mg erreichen. Damit erreichen Verbraucher weit höhere Aufnahmemengen, als durch die klassisch asiatische Ernährungsweise (Setchell et al., 2001; Nurmi et al., 2002; Chua et al., 2004; Delmonte and Rader, 2006). Zu beachten ist hier, dass die analysierten Isoflavongehalte oft nicht mit den Herstellerangaben übereinstimmen (Mortensen et al., 2009). So zeigte die Studie von Nurmi et al., dass die tatsächlich gemessenen Gehalte unter denen der Produktangaben lagen (Nurmi et al., 2002). Auch konnte gezeigt werden, dass die IF-Zusammensetzung sich mit der Zeit in den Produkten verändert (Chua et al., 2004). Sie unterscheiden sich sowohl in der Quantität (IF-Menge) als auch Qualität (IF-Spektrum), auch fehlt es oft an Angaben bezüglich der Form des enthaltenen Isoflavonderivats (Aglykon oder Glucosid) (Eisenbrand, 2006; Mortensen et al., 2009).

Der Konsument kann demnach nicht sicher gehen, dass der angegebene Isoflavongehalt stimmt und hat demnach keine Kontrolle über die aufgenommene Dosis. Daran wird die Problematik bei der Verwendung von sojahaltigen NEM deutlich und erfordert eine genauere Kontrolle und Untersuchung solcher Produkte. Gerade die zum Teil sehr hohen Dosen, die vom Endverbraucher aufgenommen werden und die oft unsachgemäße Selbstmedikamentation stellen ein nichtkalkulierbares gesundheitliches Risiko, insbesondere in der Hauptrisikogruppe der postmenopausalen Frauen dar.

1.4.1 Verwendung von Nahrungsergänzungsmitteln

Laut BfR sind NEMs für gesunde Personen, die sich normal ernähren, in der Regel überflüssig. Ausnahme ist hier beispielsweise die gezielte Substitution mit Folsäure in der frühen Schwangerschaft. Aber auch im Leistungssport findet sich eine breite Anwendung von NEM. Rund die Hälfte der Nachwuchssportler auf Landesebene nehmen solche Präparate ein, mit dem Ziel die Leistungsfähigkeit zu steigern. Jedoch ist hier die Notwendigkeit fragwürdig. Eine vom Internationalen Olympischen Komitee (IOC) geförderte Studie am Institut für Biochemie der Deutschen Sporthochschule Köln fand in etwa 15% der 634 erworbenen NEM aus 13 verschiedenen Ländern Spuren von Anabolika, die nicht in der Packung angegeben waren. Bei den Präparaten aus Deutschland enthielten 11% verbotene Anabolika, welche wahrscheinlich durch Verunreinigungen bei der Herstellung in das Präparat gelangt sind (Geyer et al., 2004). Diese Studie zeigt, dass die Risikoeinschätzung von NEM aufgrund fehlender oder mangelhafter Kennzeichnung nahezu unmöglich für den Endverbraucher ist. Dopingexperten sehen NEM sogar als Vorstufe zum Doping an. Auch der Deutsche Olympische Sportbund (DOSB) äußerte in einer Stellungnahme, dass eine regelmäßige Einnahme von NEM zu einer Zunahme der Dopingbereitschaft beiträgt. Für die Risikominimierung in die Dopingfälle zu tapen und für eine bessere Aufklärung und Transparenz wurde in Folge dieser Studie die „Kölner Liste[®]“ initiiert. Diese führt die Testergebnisse von NEM auf Dopingsubstanzen auf (www.koelnerliste.com).

Einen weiteren wichtigen und weit verbreiteten Anwendungsbereich stellen die NEM „für die Frau in den Wechseljahren“ oder „in der Menopause“ dar. Die frei verkäuflichen Präparate enthalten pflanzliche Estrogene (Phytoestrogene) in Form von isolierten Isoflavonen aus Soja oder Rotklee. Sie sind kommerziell in Drogerien, Reformhäusern, Apotheken und im Internet erhältlich und werden als Alternative zur ärztlich verordneten Hormontherapie gegen klimakterische Beschwerden in postmenopausalen Frauen angeboten. Beworben werden sie als wirkungsvolle und nebenwirkungsfreie Naturprodukte und werden so zunehmend von peri- und postmenopausalen Frauen konsumiert. Es gibt jedoch derzeit keinen genehmigten „Health Claim“ für Phytoestrogene (Mortensen et al., 2009; Kulling and Lehmann, 2014). Als Lebensmittel sind NEMs dazu bestimmt, die normale Ernährung zu ergänzen, sie dürfen keine Nebenwirkungen haben und sind nicht dazu bestimmt Krankheiten zu heilen oder zu verhüten. Obwohl die NEM in der Darreichungsform von Kapseln, Tabletten, Dragees und Pulvern angeboten werden, sind sie keine Arzneimittel und fallen demnach nicht unter das Arzneimittelgesetz. Hierbei wird die Abgrenzungsproblematik von NEM zu Arzneimitteln

deutlich (Steffen, 2011) und weist einen offenkundigen Konflikt auf, der ein erhöhtes Maß an Sensibilität im Umgang mit Soja-NEMs fordert.

Die Verwendung von Sojapräparaten oder isolierten Isoflavonen von postmenopausalen Frauen als Alternative zur Hormonersatztherapie (HRT) ist angesichts ihrer gegensätzlichen Wirkungen kritisch zu betrachten (Eisenbrand, 2006; Bundesinstitut für Risikobewertung, 2007). Asiatische Frauen leiden zwar weniger an klimakterischen Beschwerden als europäische Frauen (Knight and Eden, 1996), jedoch ist die Datenlage bzgl. der Wirkung von Isoflavonen bei der Behandlung von klimakterischen Beschwerden sehr heterogen (Wuttke et al., 2007; Eden, 2012). Es finden sich sowohl Studien, die einen klaren positiven Effekt von Isoflavonen auf Hitzewallungen zeigen konnten (D'Anna et al., 2007; Ferrari, 2009; Crawford et al., 2013), als auch Studien die keinen Effekt zeigen (Knight et al., 2001; Lagari and Levis, 2014). Die europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) kommt zu dem Schluss, dass die Datenbasis aktuell nicht ausreicht, einen kausalen Zusammenhang zwischen der Isoflavonaufnahme und der Senkung von menopausalen vasomotorischen Symptomen zu bestätigen (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), 2012). In einer aktuellen Metaanalyse der Cochrane Collaboration kommt man ebenfalls zu dem Schluss, dass es keine schlüssigen Beweise für die Wirksamkeit von Phytoestrogen-NEMs bei der Linderung von postmenopausalen Symptomen gibt (Lethaby et al., 2013).

Auch ist nach wie vor ungeklärt, ob Isoflavone aufgrund ihres estrogenen Wirkpotentials unter bestimmten Bedingungen tumorfördernd wirken können und somit zum Brustkrebsrisiko beitragen (Eisenbrand, 2006, 2007). Es gibt nur wenige Studien die den Sojaverzehr auf die Zellproliferation des Brustdrüsengewebes bei der Frau untersuchten und überdies sehr oft heterogene Ergebnisse lieferten. So untersuchte Hargreaves et al. die Wirkung einer 14-tägigen Gabe von 60 g Soja (48 mg Gesamtisoflavone) /d auf das Brustdrüsengewebe von prämenopausalen Frauen und konnte nur einen schwachen estrogenen Effekt zeigen (Hargreaves et al., 1999). Hingegen zeigte eine andere randomisierte klinische Studie mit Frauen die benigne und maligne Brusterkrankungen aufwiesen, eine signifikant erhöhte Proliferationsrate und PR-Expression nach 14 Tagen täglicher Supplementation eines isoflavonhaltigen NEM mit 45 mg Isoflavon (McMichael-Phillips et al., 1998). In beiden Fällen wurde nur eine akute kurzzeitige Gabe untersucht. Für den Ausschluss gesundheitlich nachteiliger Wirkungen sind langfristige Studien notwendig (Messina, 2002). Delmanto et al. konnten in einer randomisierten doppel-blind, placebo-kontrollierten klinischen Studie mit 80 postmenopausalen Frauen erst kürzlich zeigen, dass die Aufnahme von 250 mg Sojaextrakt pro Tag (100 mg Isoflavone/d) über 10 Monate zu

keiner Veränderung in der mammografischen Dichte der Brust führt und es damit keinen Hinweis auf mögliche Veränderungen in der Brust durch einen langfristige Gabe von Isoflavonen gibt (Delmanto et al., 2013). In einer Studie in 395 postmenopausalen Frauen, die einen speziellen standardisierten Sojaisoflavonextrakt („Phytosoya[®]“) mit 70 mg/d Isoflavonen aufnahmen, konnten ebenfalls keine mammographischen Veränderungen in der Brust festgestellt werden (Palacios et al., 2010). Aufgrund der umstrittenen Wirkung von Isoflavonen wird jedoch von der Arzneimittelkommission der Deutschen Ärzteschaft vom Einsatz isoflavonhaltiger NEM im Rahmen der HRT abgeraten, da mögliche Stimulationseffekte durch phytoestrogene Sojabestandteile auf die Proliferation im normalen Brustgewebe, in Mammatumoren und auf den Uterus nicht ausgeschlossen werden können (AVP, 2003). So wurde in einer randomisierten, doppel-blind Placebo-kontrollierten klinischen Humanstudie in menopausalen Frauen der Einfluss einer Langzeit-Isoflavongabe (tgl. 3 Tabletten mit je 50 mg Sojaisoflavonen für 5 Jahre) auf das Endometrium untersucht. Die Studie gab Hinweise auf unerwünschte estrogenartige Effekte am Endometrium nach Langzeiteinnahme isolierter Sojaisoflavone (Unfer et al., 2004), wenn auch andere Studien keine adversen Effekte auf den Uterus nachweisen konnten (Palacios et al., 2010; Quaas et al., 2013; Alekel et al., 2014).

Die Aktualität des Themas wird anhand der öffentlichen Beiträge in Zeitungen und Fernsehen deutlich. So veröffentlichte Öko-Test in ihrem Jahrbuch für 2013 einen Artikel über das Testergebnis „Mittel gegen Wechseljahrsbeschwerden - Perspektivenwechsel“ (Öko-Test, 2012). Auch in einem in der ARD ausgestrahlten Fernsehbeitrag von „reportMünchen“ am 05.11.2013 wurde das Thema NEM mit dem Titel „Umstrittene Nahrungsergänzungsmittel - Gegen Beschwerden in den Wechseljahren“ kritisch diskutiert (report München, ARD, 2013). Daher ist es umso wichtiger neue Erkenntnisse zur biologischen Wirkungsweise zu gewinnen und einen Beitrag zum besseren Umgang mit Sojaisoflavon-NEM zu leisten.

2 Zielstellung der Arbeit

Ziel meiner Arbeit war es einen Beitrag zum Verständnis der biologischen Wirkmechanismen von Isoflavonen in den Zielgeweben Brustdrüse, Uterus, Vagina und Fettgewebe zu leisten. Durch die immer stärker im Fokus stehenden Isoflavone und der kritischen Diskussion bezüglich ihres ernährungsphysiologischen Nutzens, wurden im tierexperimentellen Ansatz Sojaisoflavone über die Nahrung in verschiedenen Dosen und Expositionszeiträumen verabreicht und hinsichtlich ihrer biologischen Wirkung analysiert. Die Aufklärung der biologischen Effekte und Wirkmechanismen soll einen Beitrag zur Bewertung des Nutzens und Risikopotentials dieser Substanzen bei der Behandlung von Wechseljahrsbeschwerden leisten. Konkret sollten dabei im Rahmen von drei unabhängigen Tierversuchen folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

I. Besteht eine dosisabhängige Wirkung von Isoflavonen

a) auf hormonabhängige Organe im intakten Tier

und

b) auf die Estrogensensitivität der Brustdrüse?

In diesem ersten Tierversuch wurden lebenslang drei unterschiedliche IF-Konzentrationen verwendet, um verschiedene Expositionsszenarien zu simulieren und eine mögliche Dosisabhängigkeit biologischer Effekte nachzuweisen. Die niedrigste Dosis spiegelt die europäische Ernährungssituation mit einer sehr geringen IF-Aufnahme wieder (< 10 ppm, IDD). Mit der zweiten Dosierung sollte ein klassisch asiatisches Expositionsszenario mit ~ 50 ppm (IRD50) erreicht werden. Die dritte verwendete Dosis (IRD400) stellt eine sehr hohe IF-Dosis mit ~ 400 ppm dar, die nur schwer über die Nahrung erreicht werden kann, jedoch noch ein asiatisches Expositionsszenario unter Aufnahme von sehr hohen Sojaisoflavonmengen reflektiert.

II. Ist der Expositionszeitraum entscheidend für die biologische Wirksamkeit von Isoflavonen, insbesondere für die Estrogensensitivität der Brustdrüse?

Hier stand in einem zweiten Tierversuch der Expositionszeitraum im Fokus. Es sollte der Einfluss einer kurzzeitigen Gabe einer sehr hohen Isoflavondosis (IRD400) nach der Ovariectomie im adulten Tier untersucht werden. Dies spiegelt eine mögliche Exposition der

europäischen postmenopausalen Frau unter Verwendung von Soja-NEM bei klimakterischen Beschwerden wider.

III. Welche Rolle spielt diätetisch aufgenommenes Fett bei der Wirksamkeit einer lebenslangen Isoflavonexposition?

Aufgrund der noch ungeklärten Rolle des Nahrungsfettes bei der Entstehung von Brustkrebs und anderer Erkrankungen wie Adipositas stand in dem dritten Tierversuch die Wirkung einer fettreicheren westlich orientierten Ernährung (HF, high fat) in Kombination mit einer lebenslangen Isoflavongabe (IRD400) im Fokus. Es wurde der Einfluss einer zusätzlichen Substitution von diätetischem Fett auf die lebenslange Isoflavonwirkung untersucht.

Zur Beantwortung dieser 3 zentralen Fragestellungen wurden physiologisch relevante Parameter (Körpergewichtsverlauf, Körpergewicht, Feuchtgewichte ausgewählter Gewebe und Organe, Eintritt in die Pubertät und die Charakterisierung des estrischen Zyklus) und estrogensensitive Parameter erhoben. Hierzu zählen das Uterusfeuchtgewicht und die Epithelhöhen von Uterus und Vagina. Weiterhin wurde die Estrogensensitivität der Brustdrüse über den Proliferationsmarker PCNA und den estrogenabhängigen PR immunhistochemisch untersucht. Die Untersuchung der Brustdrüse stand in dieser Arbeit im Fokus, um ein klareres Bild bezüglich des Brustkrebsrisikos in Zusammenhang mit der Aufnahme von Isoflavonen zu schaffen.

3 Material

3.1 Verwendete Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

Laborgerät	Bezeichnung	Hersteller
Ausgießstation	MPS/C, MPS/P, MPS/W	SLEE Mainz GmbH, Dtl.
Dewargefäß	Dewar Transportgefäß	KGW Isotherm, Dtl.
Eismaschine	AF80 Scotsman®	Frimont, Italien
Feinwaage	Sartorius M-power, AZ153	Sartorius Weighing Technology GmbH, Dtl.
Gefrierschrank	Hera freeze, -80°C	Heraeus Instruments, Dtl.
Homogenisator	Polytron® PT1200E	Kinematica AG, Schweiz
Kühl- & Gefrierkombination	+4°C und -20°C	Liebherr, Dtl.
Kühlzentrifuge	Centrifuge 5417R	Eppendorf AG, Dtl.
Lichtmikroskop	Dialux 20 EB, Typ 020-452.008	Ernst Leitz GmbH, Dtl.
Lichtquelle	Schott, KL 1500 LCD	Lighting and Imaging SCHOTT AG, Dtl.
Magnetrührer/Heizrührer	IKAMAG® RET	IKA-Labortechnik, Dtl.
Mörser & Pistill	-	Haldenwanger, Dtl.
pH-mV- Meter	Seven Easy pH	Mettler - Toledo AG, Schweiz
Pipetten	10 µl, 100 µl und 1000 µl	Eppendorf AG, Dtl.
Plattenphotometer	Vmax, Microplate Reader	Molecular Devices, USA
Rotationsmikrotom	Autocut, Mod 1140	Reichert-Jung, Österreich
Schüttelwasserbad	Typ 1083	GFL, Dtl.
Tischzentrifuge	Galaxy Mini	VWR, Belgien
Vakuumpumpe	Ideal	Schego, Dtl.
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, USA
Waage	Typ PM2000	Mettler - Toledo AG, Schweiz
Waage	FA-1500-2	Faust, Österreich
Waage	SBA52	Scaltec Instruments, Dtl.
Wärmeschrank	T5052 E	Heraeus, Dtl.
Paraffinstreckbad	Lab.15, Typ WP	Gerhardt, Dtl.
Zentrifuge	Megafuge 3.0 R	Heraeus Instruments, Dtl.

Verbrauchsmaterial	Bezeichnung	Hersteller
96 Well Mikrotiterplatte	Microtest™ 96	Becton Dickinson, USA
Deckgläser	Deckgläser 24x50mm, 100Stck	VWR, Belgien
EDTA Plasma Röhrchen	Röhre 5ml 57x16,5mm, K3E; 1,6mg EDTA/ml Blut Ref.49.355.001	Sarstedt, Dtl.
Einbettkassette	Histosette	VWR, Belgien
Einbettmedium	Tissue-Tek® O.C.T. Compound	Sakura Finetek, Niederlande
Falcon Gefäße	15 und 50 ml	VWR, Belgien

Fettstift	Dako Pen	Dako, Dänemark
Filterpapier	597 1/2 Faltenfilter	Whatman, Dtl.
Handschuhe	Unigloves®, Comfort Einmal-Latexhandschuhe	VWR, Belgien
Kanülen	HS einmal Injektionskanülen 23Gx1 1/4", 27Gx3/4"	Henry Schein Inc. Melville, USA
Kryoröhrchen	Mikro-Schraubröhre 2ml, PP	Sarstedt, Dtl.
Mikrotomklinge	Microtome blade A-35 , stainless steel	pfm medical, Japan
Objektträger	Polysine™ Objektträger, 25x75x1mm	VWR, Belgien
Objektträger	Objektträger, geschnitten mit Mattrand, 26x76x1mm	VWR, Belgien
Reaktionsgefäße	0,2; 0,5; 1,5 und 2,0 ml	VWR, Belgien
Skalpell	chirurgische Einmalskalpelle, Cutfix Stainless, Braun	Aesculap AG, Dtl.
Spritze	1ml Einmalspritzen	Henry Schein Inc., USA
Wattestäbchen	selbst angefertigt	-

3.2 Verwendete Chemikalien

Substanz/Chemikalie	Bezeichnung	Hersteller
17β-Estradiol	1,3,5[10]-Estratriene-3, 17 β-diol 98% (E8875), C ₁₈ H ₂₄ O ₂	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Dtl.
Ammoniumchlorid	NH ₄ Cl	Merck KGaA, Dtl.
Bromphenolblau	3,3',5,5'-Tetrabrom- phenolsulfonphthalein, C ₁₉ H ₁₀ Br ₄ O ₅ S	Merck KGaA, Dtl.
BSA	Bovine Serum Albumin Fraction V	PAA Laboratories GmbH, Österreich
Coomassie	Coomassie-Brillant-Blau R-250, C ₄₅ H ₄₄ N ₃ NaO ₇ S ₂ (Na-Salz)	Merck KGaA, Dtl.
DAB	3,3'-Diaminobenzidine- Tetrahydrochloride	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Dtl.
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole, C ₁₆ H ₁₅ N ₅	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Dtl.
Dinatrium- Hydrogenphosphat- Dihydrat	Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O	Merck KGaA, Dtl.
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat, C ₁₀ H ₁₆ N ₂ Na ₂ O ₈ * 2H ₂ O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Dtl.
Eindeckmittel	Entellan	Merck KGaA, Dtl.
Eosin	Orange G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Dtl.
Erdnussöl	-	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Dtl.
Essigsäure	C ₂ H ₄ O ₂	Merck KGaA, Dtl.

Ethanol 100% für Analysen	C ₂ H ₆ O	Merck KGaA, Dtl.
Ethanol 100%, vergällt	C ₂ H ₆ O	Hofmann, Dtl.
Farbstoff (blau)	-	Ssniff, Dtl.
Farbstoff (grün)	-	Ssniff, Dtl.
flüssig Stickstoff	N ₂	Air liquide, Dtl.
Formaldehyd 37%	CH ₂ O	Merck KGaA, Dtl.
Glucose	D(+)-Glucose wasserfrei, C ₆ H ₁₂ O ₆	Merck KGaA, Dtl.
Glucoseoxidase	Glucoseoxidase Typ VII von <i>Aspergillus niger</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Dtl.
Hämalaun	Mayers Hämalaunlösung	Merck KGaA, Dtl.
HRP	Streptavidin-biotinylated horseradish peroxidase complex	GE Healthcare UK Limited, UK
Immersionsöl	-	Merck KGaA, Dtl.
Isopentan	2-Methylbutan, C ₅ H ₁₂	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Dtl.
Isopropanol	2-Propanol, C ₃ H ₈ O	Merck KGaA, Dtl.
Kalilauge	KOH	Merck KGaA, Dtl.
Ketamin	Ketanest [®] S, 25mg/ml, Esketaminhydrochlorid	Pfizer, USA
Magermilchpulver	Frema	Granovita GmbH, Dtl.
Methanol	CH ₄ O	Merck KGaA, Dtl.
Natriumchlorid	NaCl	Merck KGaA, Dtl.
Natrium-Dihydrogenphosphat-Monohydrat	NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	Merck KGaA, Dtl.
Natronlauge	NaOH	Merck KGaA, Dtl.
Nickelsulfat	NiSO ₄	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Dtl.
Paraffin	Sasol wax Pellets 0587	Sasol wax, Dtl.
PMSF	C ₇ H ₇ FO ₂ S	Carl Roth GmbH + Co, Dtl.
PonceauS	-	Amresco, USA
Proteinbestimmung (nach Lowry), Kit	DC protein assay Reagent A und B	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Proteinstandard	Precision Plus Protein [™] Standard Dual Color (#161-0374)	Bio-Rad Laboratories, USA
Salzsäure 1M	TitriPUR [®] , HCl	Merck KGaA, Dtl.
Sojaextrakt	Novasoy650 [®]	Archer Daniels Midland Co., USA
Tramadol	Tramal [®] 100mg, Tramadolhydrochlorid	Grünenthal, Dtl.
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomet-han, H ₂ NC(CH ₂ OH) ₃	Merck KGaA, Dtl.
Triton X	Triton-X-100	Serva Electrophoresis, Dtl.
Tween 20	Polysorbat 20, C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Dtl.
Wasserstoffperoxid 30%	H ₂ O ₂	Merck KGaA, Dtl.

Xylazin	Rompun [®] 2%, Xylazin als Xylazinhydrochlorid	Bayer, Dtl.
Xylol	Xylol Isomerengemisch	Quadflieg, Dtl.

3.3 Verwendete Lösungen und Puffer

BSA 5 %		
BSA		0,5 g
PBS 0,1 M		10 ml

BSA 0,8 %		
BSA 5%		1 ml
PBS 0,1 M		5,25 ml

DAB Lösung			
DAB Lösung	5 g / 100 ml A. dest	150	µl
10 % Glucose	10 g β-D-Glucose / 100 ml A. dest	300	µl
Glucoseoxidase	1,2 mg / 1 ml A. dest	50	µl
Ammoniumchlorid	4 g NH ₄ Cl / 100 ml A. dest	150	µl
Nickelsulfat	130 mg NiSO ₄ / 10 ml A. dest	300	µl
PB 0,1 M		15	ml

Eosin 1 %			
Orange G		1	g
A.dest		1	l

E2-Stammlösung [1 mg / ml]			
17β-Estradiol		0,013	g
100% Ethanol		12,74	ml

E2-Behandlungslösung [1 ml / kg KGW]			
E2-Stammlösung [1 mg / ml]		20	µl
100% Ethanol		980	µl
Erdnussöl		4000	µl

Formol 4 %, pH 7,0			
Natrium-Dihydrogenphosphat-Monohydrat		4	g
Dinatriumhydrogenphosphat		6,5	g
Formaldehyd		200	ml
A. dest		ad 2	l

Hämalaun (1:10)			
Mayers Hämalaunlösung		20	ml
A.dest		180	ml

Lösung zur Hemmung der endogenen Peroxidase		
Methanol	10	ml
Wasserstoffperoxid 30%	0,25	ml
A. dest.	2,25	ml

Lösung zur Perforation der Zellwand		
Ammoniumchlorid 0,5 M	0,3	g
PBS 0,1 M	10	ml
Triton-X	25	µl

NaCl 0,9 % (isotonisch)		
Natriumchlorid	9	g
A. dest	ad 1	l

PB 0,1 M, pH 7,4		
Dinatrium-Hydrogenphosphat-Dihydrat	14,4	g
Natrium-Dihydrogenphosphat-Monohydrat	2,6	g
A. dest	ad 1	l

PBS 0,1 M, pH 7,4		
Dinatrium-Hydrogenphosphat-Dihydrat	14,4	g
Natrium-Dihydrogenphosphat-Monohydrat	2,6	g
Natriumchlorid	8,766	g
A. dest	ad 1	l

3.4 Organisation und Durchführung der tierexperimentellen Studien

Die Durchführung sämtlicher tierexperimenteller Untersuchungen, sowie die Haltung der Tiere erfolgte nach den Vorgaben des Tierschutzgesetzes und war von der zuständigen Regionalbehörde LANUV NRW gemäß § 8 Abs. 1 genehmigt.

Unabhängig von Art und Aufbau des Tierexperimentes wurden Wistar-Ratten des Stammes Rj:Han WI von den Janvier Laboratorien (Le Genest Saint Isles, Frankreich) verwendet. Die Tiere wurden bei einer Temperatur von ca. 22 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 50 – 70% und einem 12 h Tag-Nacht-Rhythmus unter Bereitstellung von Futter und Wasser *ad libitum* in der Versuchstierhaltung der Deutschen Sporthochschule Köln gehalten. Es erfolgte zweimal wöchentlich die Reinigung der Käfige gekoppelt an die Bestimmung des Körpergewichtes und der Futteraufnahmemenge, um den Gesundheitszustand und die körperliche Entwicklung der Tiere zu kontrollieren.

Es wurden insgesamt drei Tierversuche (TV I - III) durchgeführt. In den Tierversuchen I und III wurden Zuchtversuche durchgeführt. In Tierversuch II wurden die Tiere bereits im adulten Alter von 10 Wochen direkt vom Hersteller (Janvier) bezogen. Die verwendeten Fütterungsdiäten und deren Zusammensetzung variierten je nach Versuchsdesign des jeweiligen Tierexperiments und können dem folgenden Kapitel 3.4.2. entnommen werden. Das jeweilige Versuchsdesign der Tierversuche ist in Kapitel 3.4.3 beschrieben.

3.4.1 Verwendeter Sojaextrakt Novasoy® 650

Für die Untersuchung des Einflusses von Sojaisoflavonen in der weiblichen Wistar Ratte, wurden speziell angefertigte Futter verwendet. Die Futtersondermischungen wurden durch Zusetzen des Extraktes „Novasoy® 650“ der Firma ADM (Archer Daniels Midland Co., USA) generiert. Hierbei handelt es sich um einen Sojaextrakt mit einem Gesamtisoflavongehalt von mind. 65%. Er wird aus der Sojapflanze gewonnen, weist ein natürliches Profil an den Isoflavonen Genistein, Daidzein und Glycitein im Verhältnis von 1,3:1:0,3 auf und hat eine Nährstoffzusammensetzung, die der in der Sojabohne nachempfunden ist (Angaben aus der Produktbeschreibung von ADM). Für die Kalkulation der Mischungsverhältnisse für die Futtersondermischungen wurde der Sojaextrakt hinsichtlich des Isoflavongehaltes vom Max-Rubner-Institut in Karlsruhe analysiert. Auf Grundlage dieser Analytik wurde anschließend die Menge an Extrakt berechnet, die man dem Kontrollfutter zufügen muss, um die festgelegten Konzentrationen von 50 ppm und 400 ppm IF Aglykon-Äquivalente im Futter zu erreichen.

3.4.2 Verwendete Diäten

In allen durchgeführten Studien wurden Futter der Firma Ssniff, Soest Deutschland verwendet. Als speziell ausgewiesene phytoestrogenfreie Diät wurde die R/M-H Diät V1554 verwendet, die in allen Versuchen als Kontrolldiät diente und folgend als IDD bezeichnet wird. Für die isoflavonangereicherten Diäten (IRD) wurde der Kontrolldiät IDD der Extrakt Novasoy® 650 zugefügt. Für die Isoflavonkonzentration von 50 mg IF Aglykon-Äquivalent/kg Futter (50 ppm) wurden 0,131 g Extrakt/kg Futter beigemischt. Dieses Futter wird folgend als IRD50 bezeichnet. Für die hohe Isoflavonkonzentration von 400 mg/kg Futter (400ppm) wurden 1,05 g Extrakt/kg Futter verwendet. Diese Diät wird folgend als IRD400 bezeichnet. Für die bessere visuelle Unterscheidung der beiden IRDs, wurden die IRD50 grün und die IRD400 blau eingefärbt. In Tabelle 1 sind alle verwendeten Diäten, deren Bezeichnung und Zusammensetzung im Überblick dargestellt.

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Diäten und deren Bezeichnung in allen Tierversuchen (I-III)

Futter	Abkürzung	Bezeichnung	Bestellnummer	Versuch
Isoflavonarme Diät	IDD/ IDD LF	R/M-H, 10mm, phytoestrogenarm	V1554-000	I, II, III
Isoflavonreiche Diät, 50 ppm	IRD50	PS R/M, 10mm, +0,131 g/kg Novasoy® 650, phytoestrogenarm, Farbe: GRÜN	S0597-P041	I
Isoflavonreiche Diät, 400 ppm	IRD400/ IRD LF	PS R/M, 10mm, +1,05 g/kg Novasoy® 650, phytoestrogenarm, Farbe: BLAU	S0597-P042	I, II, III
Isoflavonarme Diät, high fat	IDD HF	R/M-H, 10mm, phytoestrogenarm, LP 16% CL, isoenergetisch mit 61% R/M phytoestrogenarm	S8733-S022	III
Isoflavonreiche Diät, high fat	IRD HF	PS R/M, 10mm, S8733-S022 +1,05 g/kg Novasoy® 650, 16% Fett, isoenergetisch mit 61% R/M phytoestrogenarm, Farbe: BLAU	S8733-P012	III
Standard-Aufzuchtdiät	CRD	R-Z – Auzuchtfutter für Ratten, proteinreduziert (18 % Protein)	S8189-S105	II

In **Tierversuch I** wurden für die Untersuchung einer lebenslangen und dosisabhängigen Wirkung von Isoflavonen die IDD, IRD50 und IRD400 verwendet.

In **Tierversuch II** fand die Aufzuchtdiät CRD, die Kontrolldiät IDD und die IRD400 Anwendung.

Für die Untersuchung des Einflusses von diätetischem Nahrungsfett in Kombination mit Isoflavonen, wurde im **Tierversuch III** die IDD verwendet, welche als fettarme (low fat, LF)

Kontrolldiät diene und hier als IDD LF bezeichnet wird. Auf Grundlage dieser Diät wurde durch Supplementation einer zusätzlichen Fettquelle in Form von 13,9% Sonnenblumenöl eine isokalorische fettreiche (high fat, HF) Diät generiert. In Tabelle 2 sind die beiden Diäten hinsichtlich ihrer Zusammensetzung, Energiegehalt und Fettsäuremuster dargestellt.

Tabelle 2: Überblick über die im Tierversuch III verwendeten Kontrolldiäten (IDD LF und HF) hinsichtlich ihrer Zusammensetzung, Energiegehalt und Fettsäuremuster

		IDD LF	IDD HF
R/M-H, phytoestrogenarm	%	100	61,0
Casein	%	-	8,7
Lignocellulose Pulver	%	-	11,5
Cellulose Pulver	%	-	1,9
Natriumcarboxymethylcellulose (Na-CMC)	%	-	1,0
L-Cystin	%	-	0,1
Vitamine & Spurenelemente	%	-	0,4
Kalziumkarbonat	%	-	0,4
Calciumphosphat, monobasisch	%	-	1,0
Cholinchlorid (50%)	%	-	0,1
Sonnenblumenöl	%	-	13,9
Rohnährstoffe			
Rohprotein	%	19,3	19,3
Rohfett	%	3,3	16,0
Rohfaser	%	4,4	16,0
Rohasche	%	6,0	5,2
Stärke	%	36,1	21,2
Zucker	%	3,1	2,1
N freier Extrakt (Kohlenhydrate)	%	55,1	34,4
Energiegehalt			
Metabolisierbare Energie (ME)	MJ/kg	12,8	12,8
Protein	kJ%	34	22
Fett	kJ%	9	40
Kohlenhydrate	kJ%	57	38
Fettsäureverteilung			
C 14:0	%	0,01	0,01
C 16:0	%	0,39	1,11
C 16:1	%	0,01	0,08
C 18:0	%	0,06	0,67
C 18:1	%	0,51	3,11
C 18:2	%	1,49	9,92
C 18:3	%	0,19	0,17
C 20:0	%	0,01	0,06

Für die Intervention mit Isoflavonen, wurde als isoflavonreiche fettarme Diät die IRD400 aus Tierversuch I herangezogen, welche in diesem Zusammenhang als IRD LF bezeichnet wird. Das isokalorische fettreiche Pendant (IRD HF) wurde durch Zumischung von 1,05 g Novasoy650[®] Extrakt/kg der fettreichen isokalorischen Kontrolldiät IDD HF erzielt (Tab. 1).

3.4.3 Experimentelle Designs

3.4.3.1 Tierversuch I: Lebenslange Exposition gegenüber diätetischen Isoflavonen

Bei diesem Versuch handelte es sich um einen Zuchtversuch, bei dem die lebenslange Exposition mit diätetischen Sojaisoiflavonen untersucht werden sollte. Dieses Szenario reflektiert die Ernährungsweise der asiatischen Bevölkerung, welche sich traditionell mit Sojaprodukten ernährt. Durch die Verwendung zweier unterschiedlicher Isoflavonkonzentrationen sollte weiterhin eine mögliche Dosisabhängigkeit untersucht werden. Im Folgenden wurde die erste Nachkommenschaft (F1-Generation) untersucht. Das Studiendesign ist in Abbildung 11 dargestellt.

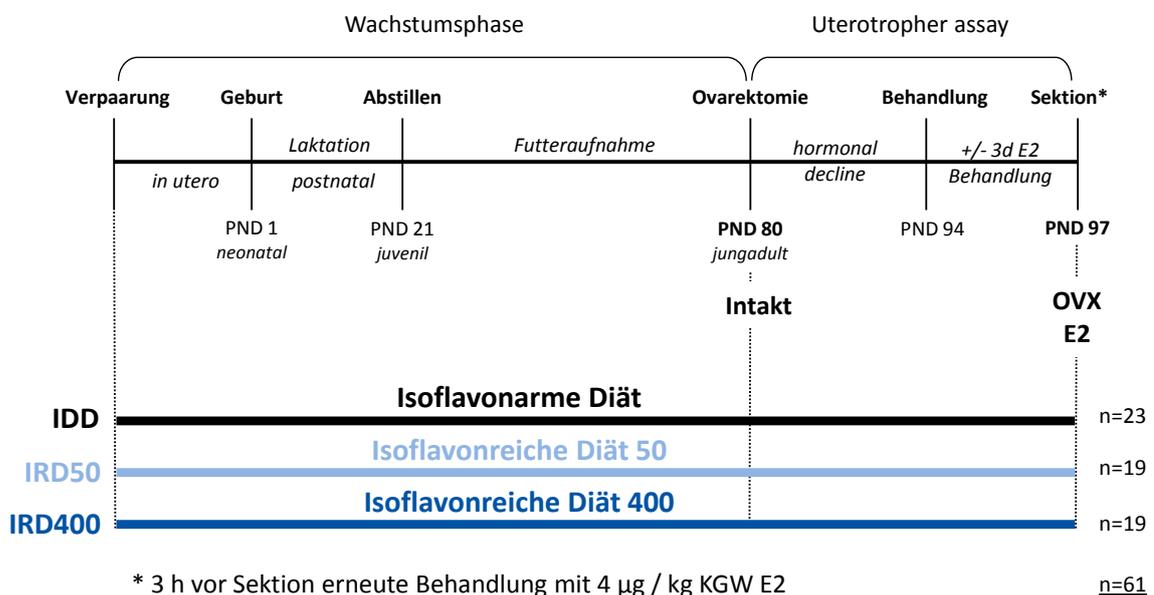


Abbildung 11: Experimentelles Design für den Tierversuch I - Lebenslange Exposition gegenüber diätetischen Isoflavonen

Für diesen generationsübergreifenden Ansatz wurden drei Futtergruppen gewählt. Die erste Gruppe erhielt die phytoestrogenfreie Diät (IDD), die als Kontrollgruppe diente. Die zweite Gruppe erhielt die isoflavonhaltige Diät IRD50 und die dritte Gruppe erhielt die isoflavonreiche Diät IRD400 (siehe Tab. 1). Für die Zucht wurden männliche und weibliche Wistar-Ratten für eine Woche auf den jeweiligen versuchsspezifischen Diäten (siehe Abb. 11) paarweise oder im sogenannten Triomating (Georg J Krinke et al., 2000) verpaart. Es folgte eine lebenslange diätetische Exposition der Tiere über alle Entwicklungsstadien: während der Trächtigkeit der Muttertiere (*in utero*), während der Laktationsphase, während der gesamten Wachstumsphase, bis hin zum Versuchende. Der Tag der Geburt wurde als postnataler Tag (PND) 1 festgelegt. Nach einer dreiwöchigen Laktationsphase (PND1-21) wurden die Tiere aller Futtergruppen abgestillt und nach Geschlechtern getrennt. Es wurde ab dem PND 25 der Eintritt in die Pubertät und ab dem PND 60 der estrische Zyklus der weiblichen F1-

Generation bestimmt. Anschließend erfolgte eine randomisierte Zuordnung der Tiere in je 3 Behandlungsgruppen pro Futtergruppe; Intakt (n=6), OVX (n=6-8) und E2 (n=7-9).

Zur Nachahmung der in der Postmenopause vorherrschenden Östrogenmangel wurde ein Uterotropher Assay am PND 80 durchgeführt (Kupfer, 1987; Odum et al., 1997). Hierfür wurde den Tieren im Rahmen einer Ovariectomie unter einer Ketamin/Xylazin Narkose (Ketanest[®] 40 mg/kg, Rompun[®] 4 mg/kg, *i.p.*) die Ovarien entfernt. Es folgte eine Schmerzbehandlung mit Tramadol (Tramal[®] 20 mg/kg, *s.c.*) für 3 Tage. Nach einer zweiwöchigen Heilungsphase, bei der die endogene Hormonproduktion der Estrogene und Gestagene stark absinkt (hormonal decline, PND 80-94), wurde den Tieren der E2 Gruppe für 3 Tage 4 µg 17β-Estradiol (E2) pro kg Körpergewicht (KGW) *s.c.* appliziert. Die Lösung wurde vor jeder Behandlung frisch hergestellt. Hierfür wurde der E2 Feststoff in 100% Ethanol gelöst und anschließend in einem Mischungsverhältnis von 1:4 (v/v) mit der Trägersubstanz Erdnussöl vermischt. Zum Ausschluss von Effekten des Lösungsmittels und der Trägersubstanz wurde den Tieren der OVX Gruppe nur die Ethanol/Erdnussöl-Emulsion (20:80, v/v) ohne E2 verabreicht und diente damit der Kontrolle. Am PND 97 erfolgte die Tötung der Tiere. Drei Stunden vor der Sektion wurde ein erneuter Stimulus mit 4 µg/kg KGW E2 gesetzt. Die Tiere der Gruppe „Intakt“ unterlagen keiner Ovariectomie und wurden unbehandelt am PND 80 getötet. Diese Gruppe diente der Ermittlung des biologischen Status der Tiere zum Zeitpunkt der Ovariectomie.

3.4.3.2 Tierversuch II: Akute Supplementation einer isoflavonreichen Diät in der ovariectomierten Ratte

Für die Untersuchung einer kurzzeitigen Gabe von diätetischen Isoflavonen im ovariectomierten Tier wurden im Rahmen des TV II Tiere im Alter von 10 Wochen direkt vom Hersteller (Janvier Laboratories, Le Genest Saint Isles, Frankreich) bezogen. Hierbei wurden die Tiere auf einem Standardfutter, einer sog. „conventional rat diet“ (CRD) der Firma Ssniff (R-Z, S8189-S105) aufgezogen. Das Futter wurde nach Anforderung einer Futterprobe ebenfalls am Max-Rubner-Institut analysiert.

Nach einer dreitägigen Eingewöhnungsphase auf der IDD erfolgte die Ovariectomie am PND 80 wie in TV I beschrieben. Unmittelbar danach wurden die Tiere in zwei Futtergruppen randomisiert eingeteilt, eine isoflavonfreie Kontrollgruppe (IDD, n=12) und eine isoflavonreiche Futtergruppe (IRD400, n=24). Nach dem zweiwöchigen hormonal decline wurden die Tiere randomisiert zu gleichen Tierzahlen in die Behandlungsgruppen OVX und E2 eingeteilt. Ablauf und Prozedere des durchgeführten Uterotrophen Assays erfolgte in

gleicher Weise wie in TV I beschrieben und ist zusammenfassend in Abbildung 12 dargestellt. In diesem Experiment gab es keine Gruppe von intakten Tieren.

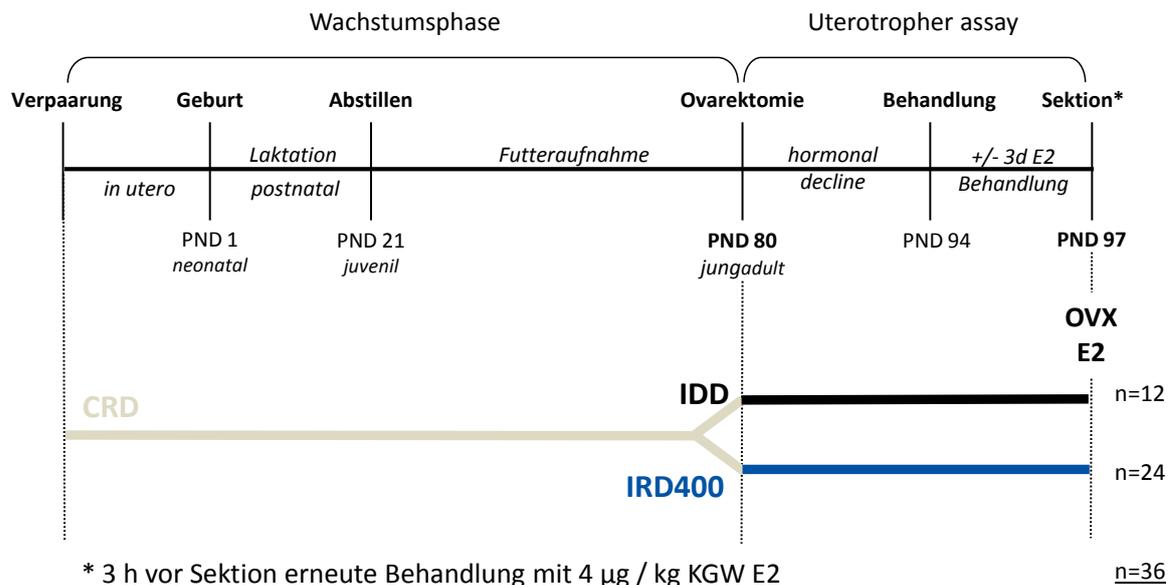


Abbildung 12: Experimentelles Design für den Tierversuch II - Akute Supplementation einer isoflavonreichen Diät in der ovarektomierten Ratte

3.4.3.3 Tierversuch III: Lebenslange Exposition gegenüber Isoflavonen in Kombination mit diätetischem Fett

Für die Untersuchung in wie weit diätetisch aufgenommenes Nahrungsfett auf die Wirkung von Isoflavonen Einfluss nimmt, wurde das dritte Tierexperiment durchgeführt. Hierbei handelte es sich erneut um einen generationsübergreifenden Ansatz, bei dem die F1-Generation aus eigener Aufzucht stammt. In Abbildung 13 ist das Studiendesign des Versuches dargestellt. In diesem Versuch wurde in gleicher Weise verfahren wie in TV I. Abweichend dazu, erfolgte am Tag der Geburt (PND 1) ein sogenanntes cross-fostering, bei dem alle Nachkommen unmittelbar nach ihrer Geburt auf alle Mütter der gleichen Diät gleich verteilt wurden (Georg J Krinke et al., 2000). Dies diente der Angleichung der Wurfgrößen und führte damit zu einer besseren Homogenität innerhalb der beiden Diätgruppen IDD (n=42) und IRD (n=42). Zum Zeitpunkt des Abstillens am PND 21 erfolgte für je eine Hälfte der Tiere ein Futterwechsel auf das entsprechende isokalorische Fettfutter (siehe Tab. 2). Somit ergaben sich 4 Diätgruppen zu je 21 Tieren; IDD LF, IDD HF, IRD LF und IRD HF. Jede Diätgruppe setzt sich aus drei Untergruppen zusammen; Intakt (n=6), OVX (n=7) und E2 (n=8).

Von der F1-Generation wurden der Eintritt in die Pubertät und die Zykluslänge bestimmt. Es folgte an PND 80 der Uterotrophe Assay in gleicher Weise wie in TV I beschrieben. Eine Stunde vor Tötung der Tiere wurde ein erneuter Stimulus mit 4 µg/kg KGW E2 gesetzt. Die

Tiere der Gruppe „Intakt“ unterlagen keiner Ovariectomie und wurden unbehandelt und in der gleichen Zyklusphase (Proestrus) am PND 80 getötet.

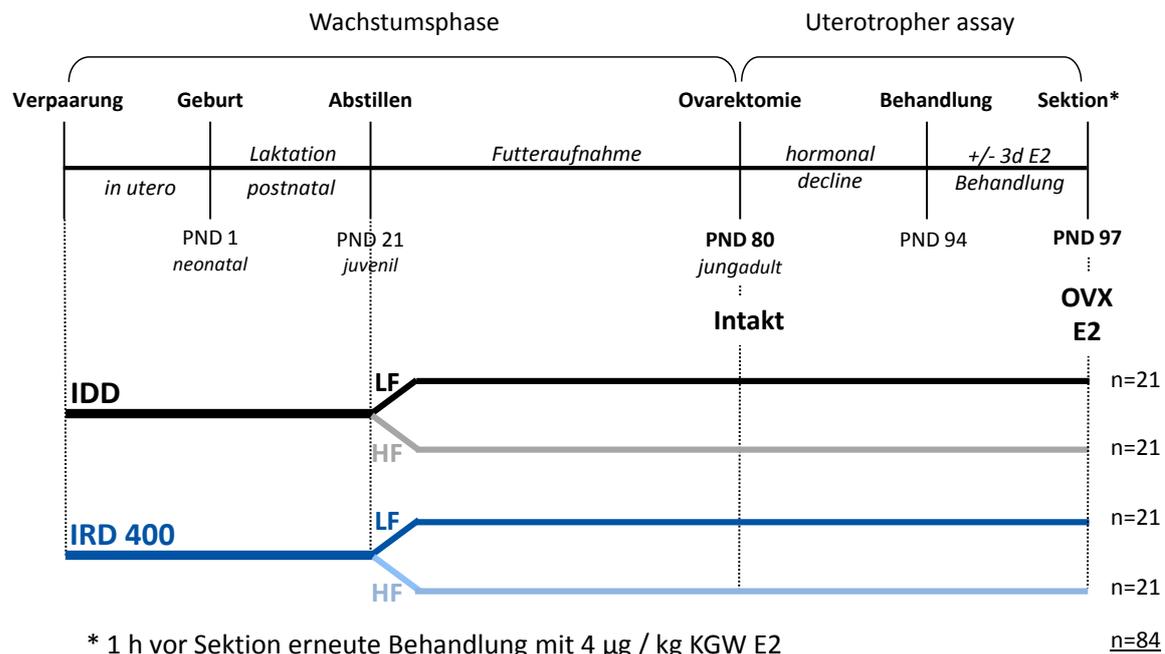


Abbildung 13: Experimentelles Design für den Tierversuch III - Lebenslange Exposition gegenüber Isoflavonen in Kombination mit diätetischem Fett

3.4.4 Organ- und Blutentnahme

Die Sektion erfolgte bei den intakten Tieren an PND 80 und bei den Tieren des Uterotropher Assays (OVX und E2) an PND 97. Nach der Bestimmung des Körpergewichtes folgte nach Einhalten des Zeitfensters der letztmaligen E2-Stimulation (3 h bzw. 1 h vorher) die Tötung der Tiere durch Dekapitation. Es schloss sich die sofortige Entnahme von Blut zur Gewinnung von Blutplasma und -serum und das Freipräparieren der gewünschten Organe an. Eine Aufstellung aller asservierten Organe kann Tabelle 3 entnommen werden. Im Falle der Gewebe Ovarien, Uterus, Niere, Leber, Duodenum, Colon und Pankreas wurde alles assoziierte Fett entfernt und vereinigt dem viszeralen Fett zugeordnet. Nach der Präparation der Muskeln *M. gastrocnemius* und *M. soleus* wurde die rechte Tibia für eine Knochendichtemessung im pQ-CT in NaCl befeuchtete Gaze eingeschlagen, mit Alufolie umwickelt und bei - 20 °C gelagert. Die Muskeln *M. gastrocnemius* und *M. soleus* wurden für die Anfertigung von Kryostatschnitten in die wasserlösliche Glykolmatrix TissueTek® eingebettet, mittels Isopentan für 1 min auf - 70 °C heruntergekühlt und anschließend in flüssigen Stickstoff eingefroren.

Es wurden von allen Geweben mit Ausnahme der Brustdrüse (Mamma) und der Darmmukosa die Feuchtgewichte mittels einer Feinwaage bestimmt. Ein Teil der Gewebe wurde für die molekularbiologischen Analysen in flüssigem Stickstoff (N₂) schockgefroren und

anschließend bei -80 °C gelagert. Der andere Teil wurde für die histologischen Untersuchungen in 4% -igem Formol bei Dunkelheit für 4-8 h fixiert bzw. in TissueTek[®] eingebettet.

Tabelle 3: Aufstellung aller in den tierexperimentellen Studien asservierten Organe

Molekularbiologie (N ₂)	Histologie (4% Formol/TissueTek [®])	Tierversuch		
		I	II	III
Mamma	Mamma	I	II	III
Uterus	Uterus	I	II	III
-	Vagina	I	II	III
Ovarien (nur Intakt)	Ovarien (nur Intakt)	I	-	III
viszerales Fett	viszerales Fett	I	II	III
Tibia	Tibia	I	-	III
Niere	Niere	I	II	III
Leber	Leber	I	II	III
Duodenum	Duodenum	I	II	III
Colon	Colon	I	II	III
Pankreas	Pankreas	I	-	III
Mukosa	-	I	II	III
<i>M. gastrocnemius</i>	<i>M. gastrocnemius</i> (TissueTek [®])	I	-	III
<i>M. soleus</i>	<i>M. soleus</i> (TissueTek [®])	I	-	III

Die Brustdrüsen der Versuchstiere bildeten die Hauptuntersuchungsorgane in dieser Arbeit. Das Uterusfeuchtgewicht (UWW), sowie die histologischen Parameter wie Vaginal- und Uterusepithelhöhen stellen ein valides Kriterium für die Bestimmung der estrogenen Wirksamkeit der E2-Behandlung dar und dienen der Kontrolle des durchgeführten Uterotrophen Assays und der Beurteilung der Estrogensensitivität.

Für die Bestimmung des Isoflavongehaltes im Blut wurde den Tieren bei der Sektion Blutplasma entnommen. Hierfür wurden 5 ml EDTA Plasmaröhrchen verwendet, die mind. bis zu 4 ml befüllt und bis Sektionsende im Kühlschrank bei + 4 °C gelagert wurden. Es folgte eine Zentrifugation bei + 4 °C für 10 min bei 2000 rcf. Der Überstand wurde in Aliquoten zu je 500 µl abpipettiert und anschließend bei - 20 °C gelagert. Für die Gewinnung des Serums wurde ein 2 ml Eppendorfgefäß mit Vollblut befüllt und anschließend bei + 4 °C für 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und ebenfalls bei -20 °C gelagert.

4 Methoden

4.1 Geschlechtsbestimmung, Pubertätseintritt und Zyklusbestimmung

Zum Zeitpunkt des Abstillens am PND 21, bei der die F1-Generation von ihren Müttern getrennt wird, erfolgte die Geschlechtsbestimmung über die Beurteilung des Anogenitalabstandes (Harkness et al., 2010). Der Abstand zwischen Anal- und Genitalöffnung ist bei Weibchen nur etwa halb so groß wie bei Männchen und ist in Abbildung 14 gezeigt.

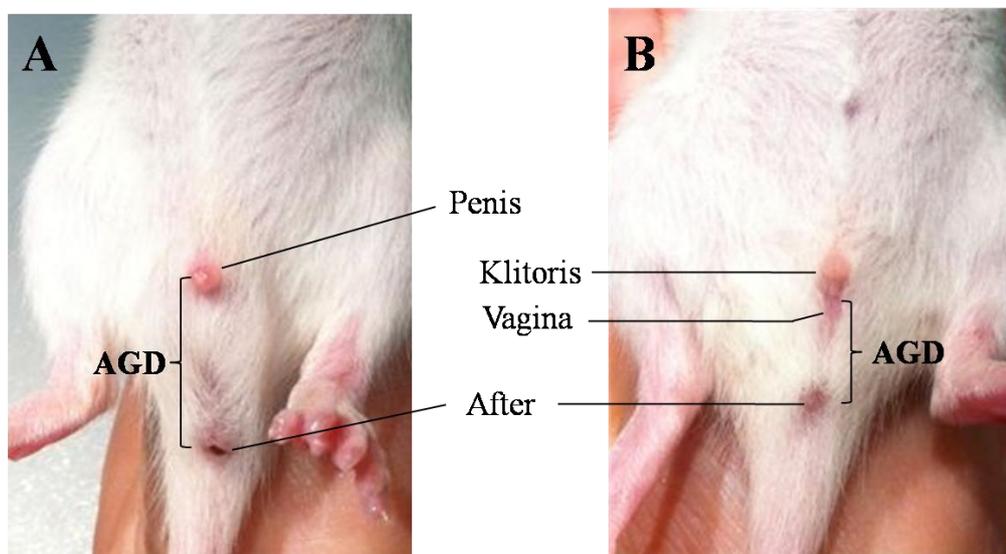
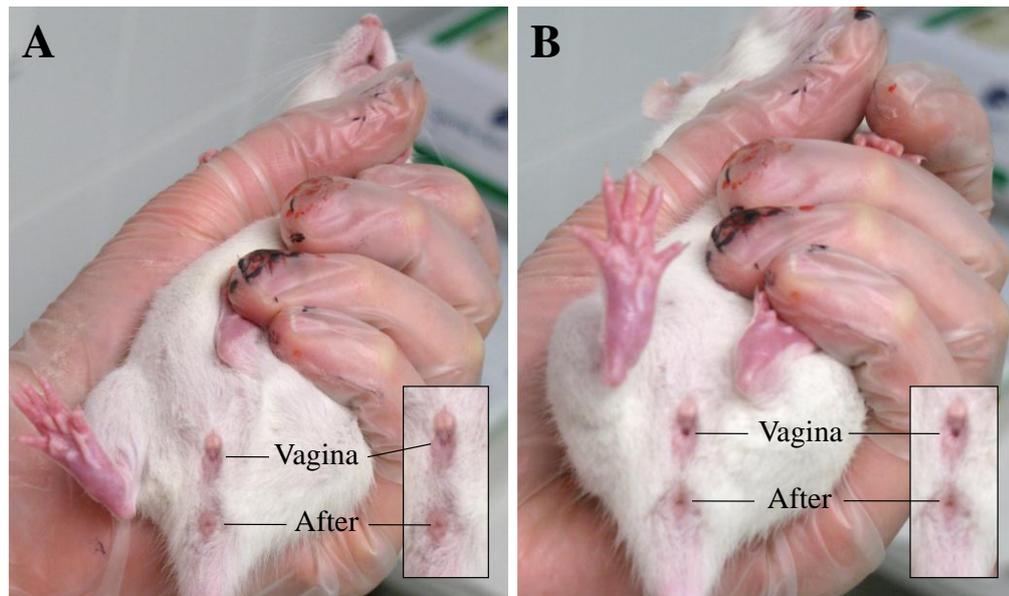


Abbildung 14: Geschlechtsbestimmung zum PND 21 über den Anogenitalabstand (AGD) männlicher (A) und weiblicher (B) Ratten

Für die Bestimmung des Eintritts in die Pubertät wurde ab dem PND 25 der Status der Vaginalöffnung (vaginal opening, VO) täglich überprüft. Man spricht beim VO von einer Öffnung, da aufgrund des Anstiegs des endogenen E₂-Spiegels zum Eintritt der Pubertät die Vagina anschwillt und dies zu einer Öffnung führt die sichtbar ist (Ojeda et al., 1976; Pescovitz and Walvoord, 2007). Dies ist exemplarisch in Abbildung 15 dargestellt. Dieser Parameter zeigt somit den Beginn der Geschlechtsreife und damit auch den ersten Eisprung an.



**Abbildung 15: Eintritt in die Pubertät anhand der Bestimmung der Vaginalöffnung (VO).
Tier mit geschlossener Vagina (A) und offener Vagina (B), modifiziert nach Brockmann, 2011.**

Nach Erreichen der Geschlechtsreife und einer Stabilisierung des Geschlechtszyklus erfolgte die Zyklusbestimmung ab dem PND 60 für ca. 3 Wochen bis zur Ovariectomie bzw. zum Tötungszeitpunkt der intakten Tiere am PND 80. Hierfür wurde täglich zur gleichen Zeit ein Vaginalabstrich entnommen. Dazu wurde ein in 0,9%-iger angewärmter NaCl-Lösung getränktes Wattestäbchen vorsichtig in die Vagina eingeführt und durch leichtes Drehen die Schleimhautzellen entnommen. Anschließend wurden die Zellen auf einem Objektträger in einem Tropfen 0,9%-iger NaCl-Lösung ausgestrichen, mit einem Deckglas bedeckt und lichtmikroskopisch begutachtet. Anhand der charakteristischen Verteilung spezifischer Zelltypen ließ sich das Zyklusstadium bestimmen. Für die Anfertigung repräsentativer Bilder der vier Zyklusphasen wurden von ausgewählten Tieren Vaginalabstriche mit 0,1 M PBS-Lösung abgenommen, die bei RT trocknen gelassen und anschließend einer Giemsa-Färbung unterzogen wurden. Nach dem Eindecken wurden die Bilder in 100x Vergrößerung aufgenommen. In Abbildung 16 sind die vier Zyklusphasen der Ratte mit ihren charakteristisch vorkommenden Zelltypen dargestellt. Für die Bestimmung der Estruslänge wurden die erhobenen Daten aus der Zyklusbestimmung herangezogen und die Tage, die die Tiere in der Estrusphase lagen, ausgezählt.

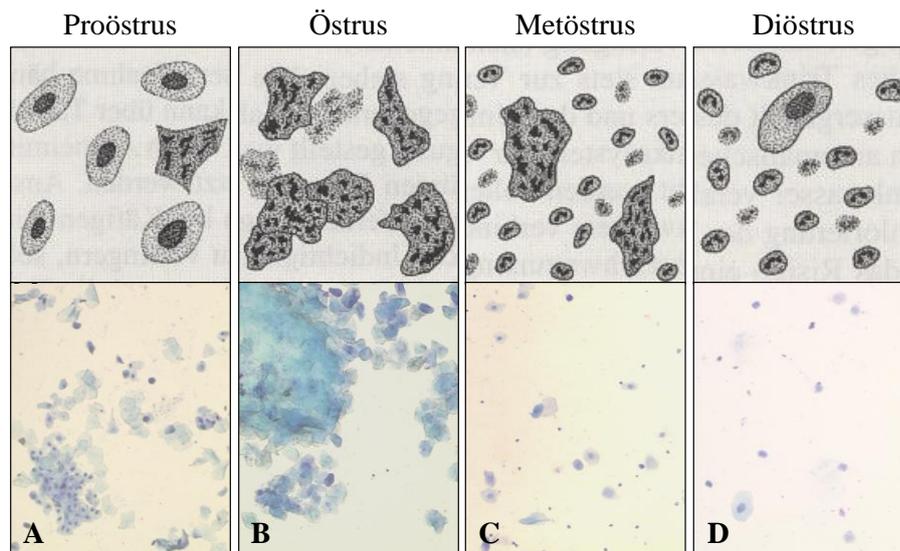


Abbildung 16: Die vier Zyklusphasen der Wistar Ratte.

(A) Proestrus mit überwiegend kernhaltigen Epithelzellen, (B) Estrus mit keratinisierten Epithelzellen, welche charakteristische makroskopische Plaques bilden, (C) Metestrus mit wenigen keratinisierten Epithelzellen und vielen Leukozyten und (D) Diestrus mit vielen Leukozyten und wenig kernhaltigen Epithelzellen. Oberhalb sind die Phasen schematisch nach Zutphen et al., 1995 dargestellt, unterhalb sind repräsentative Bilder aus den angefertigten Vaginalabstrichen aus TV I gezeigt.

4.2 Isoflavonanalytik

Die Bestimmung des Isoflavongehaltes des Sojaextraktes, der verwendeten Futter sowie des Blutplasmas wurde am Max-Rubner-Institut in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Sabine Kulling von Herrn Dr. Sebastian Soukup in Karlsruhe durchgeführt.

4.2.1 Extrakt und Futter

Für die Bestimmung des Isoflavongehaltes des Novasoy[®] 650 Extraktes und der verwendeten Futter wurde die HPLC-DAD-Methode, wie bereits in Molzberger et al. beschrieben, angewandt (Molzberger et al., 2013). Die Analyse der Fettfutter (HF) aus TV III wurden zusätzlich einer Fettextraktion mit Heptan unterzogen.

4.2.2 Plasma/Serum

Die Quantifizierung der Isoflavone und der gebildeten Metabolite erfolgte nach einer Festphasenextraktion (SPE) mittels UHPLC MS/MS, wie sie in der Doktorarbeit von Herrn Dr. Sebastian Soukup publiziert ist (Soukup, 2013; Soukup et al., 2014).

4.3 Laborchemische Parameter

Für die Messung der Serumlipide Triglyzerid, Cholesterol, LDL-Cholesterol und HDL-Cholesterol wurden verschiedene Kits verwendet (Tab. 4). Bei der Messung der Triglyzeride handelte es sich um ein kolorimetrisches Verfahren. Colesterol, LDL und HDL wurden photometrisch bestimmt. Die Messung erfolgte nach Angaben des Herstellers und wurde von

Frau Astrid Hofrichter vom Institut für Kreislaufforschung und Sportmedizin, Präventive und rehabilitative Sport- und Leistungsmedizin, durchgeführt.

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Kits für die Analyse der Serumlipide.

Parameter	Kitbezeichnung	Hersteller
Triglyzerid	ABX pentra, Triglycerides CP (A11A01640)	HORIBA ABX, Montpellier, Frankreich
Cholesterol	Cholesterol CHOD-PAP Methode (D95116)	DIALAB, Wiener Neudorf, Österreich
LDL-Cholesterol	Cholesterol LDL, direkt, enzymatisch selektive Protektion (F05367)	
HDL-Cholesterol	Cholesterol HDL, direkt, Immuninhibition (F03115)	

4.4 Histologie

4.4.1 Fixierung, Dehydrierung und Einbettung der Gewebe

Nach einer 4-8 stündigen Fixierung der Gewebe in 4% -igem Formol erfolgte ein zweimaliges Waschen mit 0,1 M PBS, um die Proteinvernetzung durch das Fixans zu beenden. Es folgte eine manuelle Dehydrierung der Gewebe mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (siehe Tbaelle 5) bei RT. Die entwässerten Organe wurden anschließend in das organische Lösungsmittel Xylol überführt, welches in der Lage ist, sich mit dem Einbettmedium Paraffin zu vermischen. Nachdem das Lösungsmittel durchdrungen ist, wurden die Gewebe in einen Wärmeschrank bei + 60 °C in geschmolzenes Paraffin eingebracht. In diesem Schritt verdampft das Xylol und wird durch flüssiges Paraffin ersetzt. Durch mehrmaligen manuellen Wechsel von flüssigem Paraffin erreicht man einen vollständiges Entfernen des Lösungsmittels und einen kompletten Austausch gegen Paraffin. In Tabelle 5 ist der zeitliche Ablauf der manuellen Dehydrierung und Einbettung dargestellt.

Tabelle 5: Aufsteigende Alkoholreihe zur manuellen Dehydrierung der Gewebe.

aufsteigende Alkoholreihe		
	50% EtOH	ü.N.
	60% EtOH	3h
	70% EtOH	3h
	80% EtOH	3h
	90% EtOH	ü.N.
	96% EtOH	8h
	100% EtOH	ü.N.
	100% EtOH	8h
	100% EtOH	ü.N.
	100% EtOH/Xylol	8h
	Xylol	ü.N.
	Xylol	8h
	Xylol	ü.N.

Paraffineinbettung		
	1. Paraffin	24h
	2. Paraffin	24h
	3. Paraffin	24h

4.4.2 Ausgießen und Ausrichten der Gewebe

Das Ausblocken der Organe erfolgte an einer Paraffinausgießstation. Die Organe wurden in speziellen Metallformen positioniert und die Hohlorane (Uterus, Vagina, Colon, Duodenum) zum Querschnitt ausgerichtet. Anschließend wurden die vorgeheizten Förmchen mit + 60 °C flüssigem Paraffin befüllt und zum riss- und blasenfreien Erkalten auf die Kühlplatte (- 20 °C) gestellt. Nach dem vollständigen Aushärten, wurde der Paraffinblock aus der Metallform gelöst und der ausgehärtete Paraffin-Gewebe-Block konnte bei RT unbegrenzt gelagert werden.

4.4.3 Herstellung von Paraffindünnschnitten

Zur Vorbereitung des Schneidens wurden die Paraffin-Gewebe-Blöcke auf der Kühlplatte der Ausgießstation vorgekühlt, um eine optimale Schnittfestigkeit zu erreichen. Am Rotationsmikrotom wurden Paraffindünnschnitte von 5 µm für die immunhistochemische Analyse und von 7 µm für die HE-Färbungen hergestellt. Diese wurden in einem Wasserbad bei ca. + 40 °C gestreckt und anschließend zu je 3 Schnitten auf einen polylysinbeschichteten Objektträger aufgenommen. Diese wurden auf der Wärmeplatte für ca. 30 min bei + 37 °C getrocknet.

4.4.4 Entparaffinieren und Rehydrierung von Gewebeschnitten

Für die anschließenden Färbemethoden, mussten die Paraffindünnschnitte entparaffiniert und rehydriert werden. Hierfür wurden die Schnitte zuvor bei + 60 °C im Wärmeschrank für 1 h gebacken. Dies diente dem Schmelzen des Paraffins und der stärkeren Bindung des Gewebes an den Objektträger, um ein Ablösen des Schnittes während der Färbeprozedur zu verhindern. Es folgte die Entparaffinierung mittels Xylol und eine anschließende Rehydrierung der Gewebe mit absteigender Alkoholreihe (siehe Tab. 6).

Tabelle 6: Absteigende Alkoholreihe zur Rehydrierung der Gewebe

absteigende Alkoholreihe		
Wiederholung	Lösung	Dauer
3 x	Xylol	10 min
2 x	100% EtOH	5 min
2 x	96% EtOH	5 min
2 x	70% EtOH	5 min
	A. dest	kurz eintauchen

4.4.5 HE-Färbung

Für die Bestimmung der Epithelhöhen von Uterus und Vagina sowie der Fettzellgrößenbestimmung wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Übersichtfärbung durchgeführt, welche eine klassisch histologische Färbetechnik darstellt. Hämatoxylin in Form von Hämalaun färbt saure (basophile) Strukturen, wie Zellkerne mit der darin enthaltenen DNA und das mit Ribosomen angereicherte raue endoplasmatische Retikulum blau ein. Eosin als ein synthetisch saurer Farbstoff färbt hingegen alle basischen (acidophilen) Strukturen, hauptsächlich die Zellplasmaproteine rot. Nachdem die Schnitte rehydriert wurden, erfolgte die HE-Färbung nach folgendem Zyklus: 3 min Hämalaun, kurzes Schwenken in 0,1% -iger HCl-Lösung, 3 min Bläuen unter fließendem Leitungswasser, 3 min 1% -iges Eosin und kurzes Schwenken in A. dest. Zur Konservierung der Färbung wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe (je 2 min 96% EtOH, 100% EtOH und Xylol) dehydriert und anschließend mit einem Deckgläschen in Entellan eingedeckt. Nach Trocknung und Aushärtung der Schnitte ü. N. erfolgte die lichtmikroskopische Begutachtung der Schnitte.

4.4.6 Immunhistochemische Färbung

Unter Immunhistochemie (IHC) versteht man das Anfärben von Proteinen mit Hilfe von Antikörpern in einem histologischen Schnitt. Dies dient der Identifizierung und auch der morphologischen Lokalisation bestimmter Zielstrukturen. Für die immunhistochemische Färbung von PCNA und PR der Brustdrüse wurden die 5 µm Schnitte, wie in 3.4.4. beschrieben, gebacken, entparaffiniert und rehydriert. Auf jedem Objektträger wurde eine Negativkontrolle mitgeführt. Hierfür erfolgte eine Umrandung der Gewebeschnitte mit einem Fettstift und es schloss sich eine kurzzeitige Inkubation mit 0,1 M PBS an. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei RT und in einer Feuchtkammer, um einer Austrocknung der Gewebe vorzubeugen.

Bei der angewandten IHC handelte es sich um eine enzymgekoppelte Reaktion mittels ABC-Methode (Avidin-Biotin-Complex). Sie ist schematisch in Abbildung 17 dargestellt. Im ersten Schritt wurde die endogene Peroxidase mittels 20-minütiger Inkubation mit einer H₂O₂-Methanol-Lösung gehemmt. Anschließend erfolgte ein Waschschriff von 4 x 5 min mit 0,1 M PBS. Es folgte die Perforation der Zellwand für 10 min mittels 0,5 M Ammoniumchlorid-Triton X-Lösung und einem erneuten Waschzyklus mit 0,1 M PBS von 4 x 5 min. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Schnitte für 1 h mit 5% -igem BSA bedeckt. Direkt nach dem Absaugen der Lösung erfolgte die Inkubation mit den in 0,8% -igen BSA verdünnten Primärantikörpern gegen PCNA (1:200) oder PR (1:10) ü. N. bei + 4 °C.

Nach erneuten 4 Waschschritten schloss sich die Inkubation für 1 h bei RT mit dem biotinylierten Sekundärantikörper an. Für das Färbarmachen des Sekundärantikörpers, erfolgte eine Inkubation mit einem Streptavidin-biotinylierten Meerrettichperoxidase (HRP)-Komplex für 1 h bei RT. Alle Verdünnungen, sowie die genauen Bezeichnungen der Antikörper sind Tabelle 7 zu entnehmen.

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Antikörper und das verwendete Chromogen für die Immunhistochemie (IHC)

Bezeichnung		Verdünnung	Firma
<i>Antikörper</i>			
PCNA	Monoclonal Mouse Anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen, Clone PC10	1:200 in 0,8% BSA	Dako, Dänemark
PR	Monoclonal Antibody IOPath® Anti-Progesterone Receptor, Clone PR10A9	1:10 in 0,8% BSA	Beckman & Coulter, UK
Sekundär	Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/Biotinylated	1:400 in 0,1 M PBS	Dako, Dänemark
<i>Konjugation</i>			
HRP	Streptavidin-biotinylated horseradish peroxidase complex	1:150 in 0,1 M PBS	GE Healthcare, UK

Abschließend wurde das Chromogen DAB für 7 min der Reaktion zugegeben. DAB bildet mit Hilfe von Wasserstoffperoxid und der HRP, welche zuvor an den Sekundärantikörper mit Hilfe eines Streptavidin-Biotin-Tags konjugiert wurde, unter Bildung von Wasser ein braunes Endprodukt (Abb. 17). Die Reaktion wurde nach mikroskopischer Beurteilung der Färbintensität anschließend mit 0,1 M PBS abgestoppt und es erfolgte ein erneuter Waschzyklus. Zur besseren Abgrenzung der nicht proliferierenden Zellkerne wurde eine Gegenfärbung (counterstain) mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI durchgeführt. Hierfür erfolgte eine letztmalige Inkubation mit einer 1:600 Verdünnung von DAPI in 0,1 M PBS für 10 min im Dunkeln. Ein letzter Waschschrift erfolgte, bevor die Proben erneut dehydriert und final mit Entellan eingebettet wurden (siehe Kapitel 4.4.5.). Die Trocknung, Aushärtung und Lagerung erfolgte im Dunkeln.

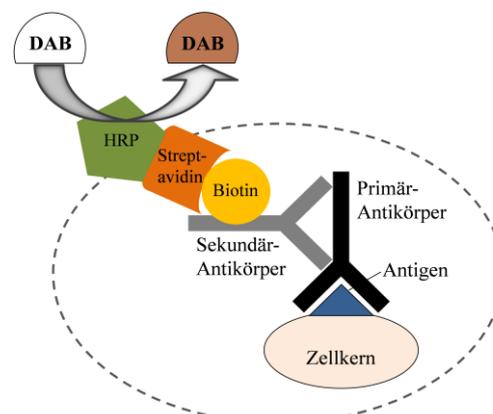


Abbildung 17: Schematische Darstellung der Immundetektion der enzymgekoppelten IHC nach der ABC-Methode

4.4.7 Bildliche Dokumentation der gefärbten Schnittpräparate

Die bildliche Dokumentation erfolgte in Abhängigkeit der Auswertung mit Hilfe von zwei verschiedenen Mikroskopen der Firma Carl Zeiss AG, Jena. In Tabelle 8 sind die beiden verwendeten Mikroskope und deren technische Ausstattung dargestellt.

Tabelle 8: Übersicht der technischen Daten der verwendeten Mikroskope zur histologischen Auswertung

	Inverses Lichtmikroskop	Aufrechtes Lichtmikroskop
Stativ	Axiovert 200M	Axiophot
Objektive	A-Plan 10x/0,25 Ph1	Plan NEOFLUAR 10x/0,30
	A-Plan 20x/0,4 Korr Ph2	Plan NEOFLUAR 20x/0,50
	-	Plan NEOFLUAR 63x/1,4 oil
Lichtquelle	XBO 75	HBO 50
	HAL 100	-
Software	Axio Vision Rel 3.6.3	KS300 3.0
Kamera	AxioCamMRm	CCD camera MC-3255
Firma	Carl Zeiss AG, Jena, Dtl.	Sony, Tokio, Japan
Anwendung	Epithelhöhenmessung	Immunhistochemische Auswertung Repräsentative Bilder Fettzellgrößenbestimmung

4.4.8 Epithelhöhenmessung

Für die Auswertung der Epithelhöhen von Vagina und Uterus wurden die HE-gefärbten Schnitte am Inversmikroskop Axiovert 200M mit einer 100x (für Vagina) bzw. 200x (für Uterus) Vergrößerung aufgenommen und mit Hilfe der Software AxioVision Rel. 4.8 und dem Messwerkzeug „Länge“ vermessen. Pro Tier wurden ca. 100 Messpunkte ausgewertet und zu einem Mittelwert zusammengefasst. Für die repräsentativen Aufnahmen wurden ausgewählte Präparate am Lichtmikroskop Axiophot mittels der KS300 3.0 erneut fotografiert.

4.4.9 Fettzellgrößenbestimmung

Die Messung der Fettzellgröße erfolgte mittels der Software ImageJ 1.46d (NIH, USA). Hierfür wurden die HE-gefärbten Schnitte am Lichtmikroskop Axiophot mit der Software KS300 3.0 bei 100x Vergrößerung abfotografiert. Anschließend wurde mittels ImageJ eine Flächenmessung mit dem „ROI-Manager“-Tool (1,2 Pixel / μm) von mind. 100 Zellen pro Tier durchgeführt und die Messwerte zu einem Mittelwert zusammengefasst.

4.4.10 Quantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung

Die immunhistochemisch gefärbten Schnitte der Brustdrüse wurden direkt am Lichtmikroskop Axiophot in 630x Vergrößerung mit Immersionsöl ausgezählt. Es wurden zuerst alle DAB-positiven Zellkerne im Durchlicht ausgezählt und im Anschluss alle restlichen Zellkerne, die durch die DAPI-Gegenfärbung im Fluoreszenzlicht blau erschienen. Pro Tier wurden mind. 10 Drüsengänge, welches einer Zellzahl von ca. 500-1000 Zellen entsprach, ausgezählt. Die Expression des Zielproteins wurde als Verhältnis in [% positive Zellkerne] ausgedrückt. Hierfür wurde ein Quotient aus DAB-positiven Zellkernen und Gesamtzellkernzahl, welche sich aus der Summe der DAB-positiven Zellen und den DAPI-positiven Zellen ergibt, gebildet. Die Aufnahme der repräsentativen Bilder erfolgte am gleichen Gerät mittels der CCD Kamera MC-3255 von Sony bei 630x Vergrößerung unter Verwendung von Immersionsöl.

4.5 Graphische und statistische Auswertung

Für die tabellarische Auswertung aller Messwerte wurde das Programm Excel der Firma Microsoft[®] verwendet. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit der Software GraphPad Prism[®], Prism6 für Windows, Version 6.02. In der Arbeit wurden in Abhängigkeit der Ergebnisdarstellung verschiedene Graphiktypen verwendet;

- ein „Scatterplot“, bei dem jeder Wert eines Tieres als Punkt dargestellt ist und der arithmetische Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) abgebildet ist,
- ein Liniendiagramm für die Körpergewichtsverläufe oder
- ein Balkendiagramm bei dem MW \pm SD dargestellt ist.

Als statistisches Testverfahren dieser Arbeit fand der Kruskal-Wallis H-Test gefolgt von einem Mann-Whitney U-Test Anwendung. Die statistische Auswertung wurde ebenfalls mit der Software GraphPad Prism6 durchgeführt. Der Kruskal-Wallis H-Test wurde herangezogen, um die Mittelwerte unabhängiger Stichproben mittels Rangsummen zu vergleichen. Mit diesem Rangtest lassen sich vorab signifikante Unterschiede über alle Stichproben bestimmen. Bei Ablehnung der Null-Hypothese ($p \leq 0,05$) wurde im Anschluss der Mann-Whitney U-Test durchgeführt, welcher die Überprüfung von signifikanten Unterschieden zwischen zwei unabhängigen Stichproben ermöglicht. Das Signifikanzniveau wurde mit $\alpha = 95\%$ und $p \leq 0,05$ festgelegt.

5 Ergebnisse

5.1 Lebenslange Exposition gegenüber diätetischen Isoflavonen – TV I: Besteht eine dosisabhängige Wirkung von Isoflavonen auf das weibliche endokrine System?

In dem ersten Tierversuch wurde der Einfluss einer lebenslangen Isoflavonaufnahme über die Nahrung auf das weibliche endokrine System der Wistar-Ratte untersucht. Im Fokus stand hierbei die Simulation des europäischen und asiatischen Expositionsszenarios unter Verwendung verschiedener Isoflavonkonzentrationen (IDD, IRD50 und IRD400). Darüber hinaus sollte geklärt werden, ob eine dosisabhängige Wirkung auf die Entwicklung der Ratte besteht (Kap. 5.1.3 und 5.1.4) und inwieweit die Estrogensensitivität durch Isoflavone moduliert wird (Kap. 5.1.5).

5.1.1 Analyse des Sojaextraktes und der verwendeten Diäten

Die Bestimmung des Isoflavongehaltes des Extraktes und der Diäten erfolgte am Max-Rubner-Institut in Karlsruhe in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Sabine Kulling.

Tabelle 9: Bestimmung der Isoflavongehalte des verwendeten Sojaisoflavon-Extrakt Novasoy®650 und der verwendeten Diäten IDD, IRD50 und IRD400 mittels HPLC-DAD-Methode (TV I).
Dargestellt sind die Aglykon-Äquivalente (Summe der entsprechenden Aglykone und der glykosidischen Form), n.d. unter der Nachweisgrenze.

IF-Gehalt (kalkuliert als Aglykon-Äquivalente)	Novasoy®650	IDD	IRD50	IRD400
	[mg/g]	[mg/kg]		
Daidzein (Dai)	169,8	n.d.	27,7	202,6
Genistein (Gen)	216,1	3,5	36,5	257,2
Glycitein (Gly)	38,9	n.d.	4,7	46,0
Summe	424,8	3,5	69,0	505,8

Der Hauptanteil der im Extrakt enthaltenen Isoflavone stellte die glykosidische Form dar (Daten vom MRI Karlsruhe, Dr. Sebastian Soukup). Die Zusammensetzung des Extraktes ist in Tabelle 9 dargestellt. Es zeigte sich, dass Genistein (kalkuliert als Aglykon-Äquivalente) mit 216,1 mg/g Extrakt den größten Anteil aufweist, gefolgt von Daidzein mit 169,8 mg/g und nur in sehr geringen Mengen das Glycitein mit 38,9 mg/g vorhanden ist. Daraus ergab sich eine Gesamtisoflavonkonzentration des Extraktes von 424,8 mg/g. Auf Grundlage dessen wurde die Menge an Extrakt berechnet die der Kontrolldiät IDD (Grundlage für Sondermischungen) zugemischt wurde, um 50 ppm (IRD50: 0,131 g/kg) bzw. 400 ppm (IRD400: 1,05 g/kg) an Isoflavon im Futter zu erreichen (siehe Kapitel 3.4.2). Die Analyse der Futter IRD50 und IRD400 ergab, dass die gewählten Konzentrationen um

27,5% bzw. 21% höher lagen, als vorab berechnet (siehe Tab. 9). Der Isoflavongehalt der IRD50 lag bei 69 mg Isoflavon/kg Futter und reflektiert eine klassisch traditionelle asiatische Ernährungsweise. Der Isoflavongehalt der IRD400 lag mit 506 mg Isoflavon/kg Futter um das Siebenfache höher und kann nur über eine sehr hohe diätetische Isoflavonaufnahme erreicht werden. Die speziell ausgewiesene phytoestrogenarme Diät enthielt einen erwartungsgemäß niedrigen Isoflavongehalt von 3,5 mg/kg Futter und reflektiert das europäische Expositionszenario.

5.1.2 Ermittlung der täglichen Nahrungsaufnahme und der Isoflavonexposition

Über die gesamte Wachstumsphase und Entwicklung der F1-Generation wurden das Körpergewicht und die Futtermenge bestimmt. Juvenile Tiere (PND 30) mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 77 g nahmen täglich ca. 10 g Futter auf und adulte Tiere (PND 80) mit einem Durchschnittsgewicht von 239 g ca. 19 g. Zwischen den verschiedenen Futtergruppen gab es keine relevanten Unterschiede. Abgeleitet aus dem Isoflavongehalt des Futters, der aufgenommenen Futtermenge und dem Körpergewicht errechnete sich die theoretische IF-Aufnahmemenge nach folgender Formel:

$$IF - Aufnahme = \frac{(\text{Isoflavongehalt des Futters } \left[\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right] * \text{Futtermenge pro Tag } \left[\frac{\text{kg}}{\text{d}} \right])}{\text{Körpergewicht [kg]}}$$

In Tabelle 10 zeigt sich eine unterschiedliche Exposition mit Isoflavonen in Abhängigkeit der Isoflavonkonzentration im Futter und dem Alter der Tiere. Die Tiere der isoflavonfreien Kontrolldiät (IDD) nahmen vernachlässigbar geringe Mengen an Isoflavonen (< 1 mg/kg KGW/d) auf. Dem gegenüber nahmen adulte Tiere der IRD50 das 18-fache mit 5,5 mg IF/kg KGW/d und Tiere der IRD400 das 134-fache mit 40,2 mg IF/kg KGW/d auf. Hierbei lag die Isoflavonaufnahmemenge der IRD400 um das ~7-fache höher verglichen zur IRD50. Weiterhin zeigte sich, dass juvenile Tiere eine ~1,6-fache höhere Isoflavonaufnahme aufwiesen, da die Futtermenge pro kg KGW deutlich höher in Jungtieren (130 g/kg) ist, als bei adulten Tieren (80 g/kg).

Tabelle 10: Theoretische orale Isoflavonaufnahme pro Diät in juvenilen (PND 30) und adulten (PND80) Tieren mit einem durchschnittlichem Körpergewicht von 77 g bzw. 239 g und einer Futtermenge von 10 g bzw. 19 g pro Tag (TV I).

IF-Aufnahme [mg/kg KGW/Tag]	IDD		IRD50		IRD400	
	PND 30	PND 80	PND 30	PND 80	PND 30	PND 80
Daidzein (Dai)	-	-	3,6	2,2	26,3	16,1
Genistein (Gen)	0,5	0,3	4,7	2,9	33,4	20,4
Glycitein (Gly)	-	-	0,6	0,4	6,0	3,7
Summe	0,5	0,3	9,0	5,5	65,7	40,2

5.1.3 Der Einfluss einer lebenslangen Isoflavonexposition auf die Pubertät und den Zyklus der weiblichen Ratte

Während der Aufzucht der F1-Generation wurden der Eintritt in die Pubertät und der Zyklus der Ratte untersucht, da diese Parameter hormonellen Einflüssen unterliegen. Hierbei stellte sich die Frage, in wieweit Isoflavone in der Lage sind, Einfluss auf diese Parameter zu nehmen und ob eine Dosisabhängigkeit besteht. Für die Bestimmung des Pubertätseintrittes wurde der Tag der Vaginalöffnung (VO) bestimmt. In Abbildung 18 ist das Ergebnis dargestellt. Sowohl die Tiere der IRD50 als auch die Tiere der IRD400 zeigen einen um ca. 1,5 Tage verfrühten Eintritt in die Pubertät gegenüber den Tieren der Kontrolldiät (IDD).

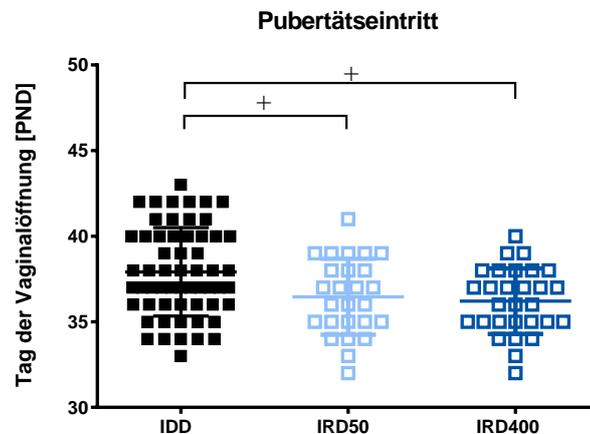


Abbildung 18: Der Einfluss einer lebenslangen diätetischen Isoflavonexposition auf den Pubertätseintritt über die Bestimmung des Zeitpunktes der Vaginalöffnung (TV I).

+ kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den Diäten mit $p \leq 0,05$ (indiziert als Linie), Mann-Whitney U-Test.

Die Bestimmung des Zyklus zeigte eine signifikante Verkürzung der Zyklusdauer bei der IRD400 (Abb. 19A). Die IRD50 zeigte im Vergleich zur Kontrolle IDD keinen signifikanten Effekt auf den Zyklus. Desweiteren konnte während der Bestimmung eine subjektiv stärkere und damit längere Estrusphase unter einer isoflavonreichen Diät beobachtet werden. Für die Bestätigung dessen wurde die Estruslänge quantitativ ausgewertet (Abb. 19B). Es zeigte sich eine verlängerte Estrusphase für beide Isoflavondiäten bezogen zur Kontrolldiät (IDD).

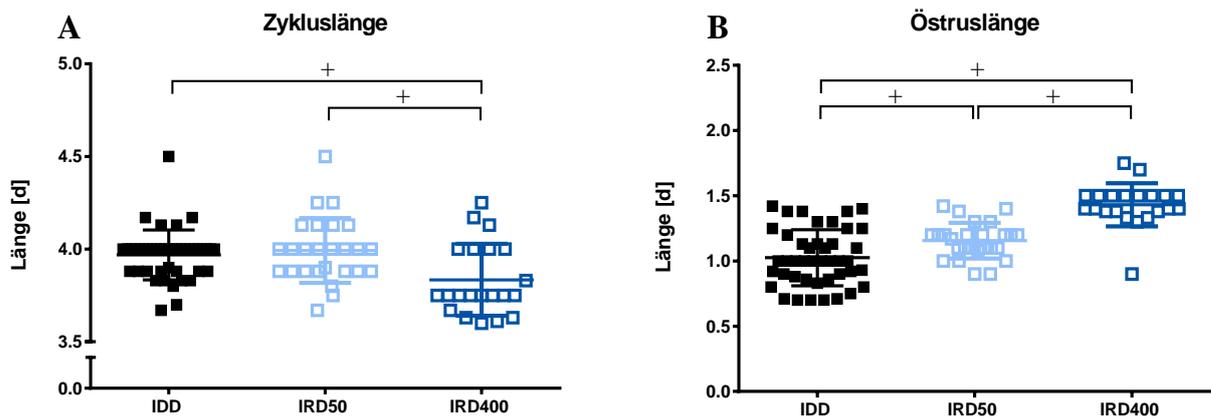


Abbildung 19: Der Einfluss einer lebenslangen diätetischen Isoflavonexposition auf den Zyklus (TV I). Es wurde die Zykluslänge (A) und die Estruslänge (B) bestimmt. + kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den Diäten mit $p < 0,05$ (indiziert als Linie), Mann-Whitney U-Test.

Zusammenfassend kann eine biologische Aktivität des verwendeten Novasoy[®] 650 Extraktes und ein damit verbundener dosisabhängiger Einfluss der Isoflavone auf den Pubertätseintritt und den Zyklus festgestellt werden.

5.1.4 Dosisabhängige Effekte einer lebenslangen Isoflavonexposition auf die Entwicklung im intakten Tier

Für die Untersuchung dosisabhängiger Effekte einer lebenslangen Isoflavonexposition wurden im ersten Versuchsteil Tiere der intakten Gruppe am PND 80 getötet und physiologische sowie estrogensensitive Parameter untersucht.

5.1.4.1 Physiologische Parameter: Körpergewicht und viszerale Fettmasse

In Abbildung 20A sind die Körpergewichte zum Zeitpunkt der Sektion dargestellt. Hierbei zeigten sich bei den Tieren der IRD50 die niedrigsten Körpergewichte, sowohl zur Kontrolldiät, als auch zur IRD400. Für alle Tiere wurde über den Zeitraum ihrer Entwicklung der Körpergewichtsverlauf pro Diätgruppe dargestellt (Abb. 20B). Hierbei kann man deutlich sehen, dass die Tiere sich bis zum PND 70 gleich entwickelten und der Unterschied im Körpergewicht sich erst zum PND 82 ausprägte. Die signifikante Reduktion im Körpergewicht der IRD50 spiegelte sich tendenziell in der viszeralen Fettmasse (Abb. 20C) und der Fettzellgröße wieder (Abb. 20D). Tiere der IRD400 zeigten die geringsten Fettzellgrößen, was sich jedoch nicht in einer verringerten viszeralen Fettmasse widerspiegelte. Das Körpergewicht der Tiere der IRD400 war verglichen zur Kontrolle (IDD) tendenziell geringer.

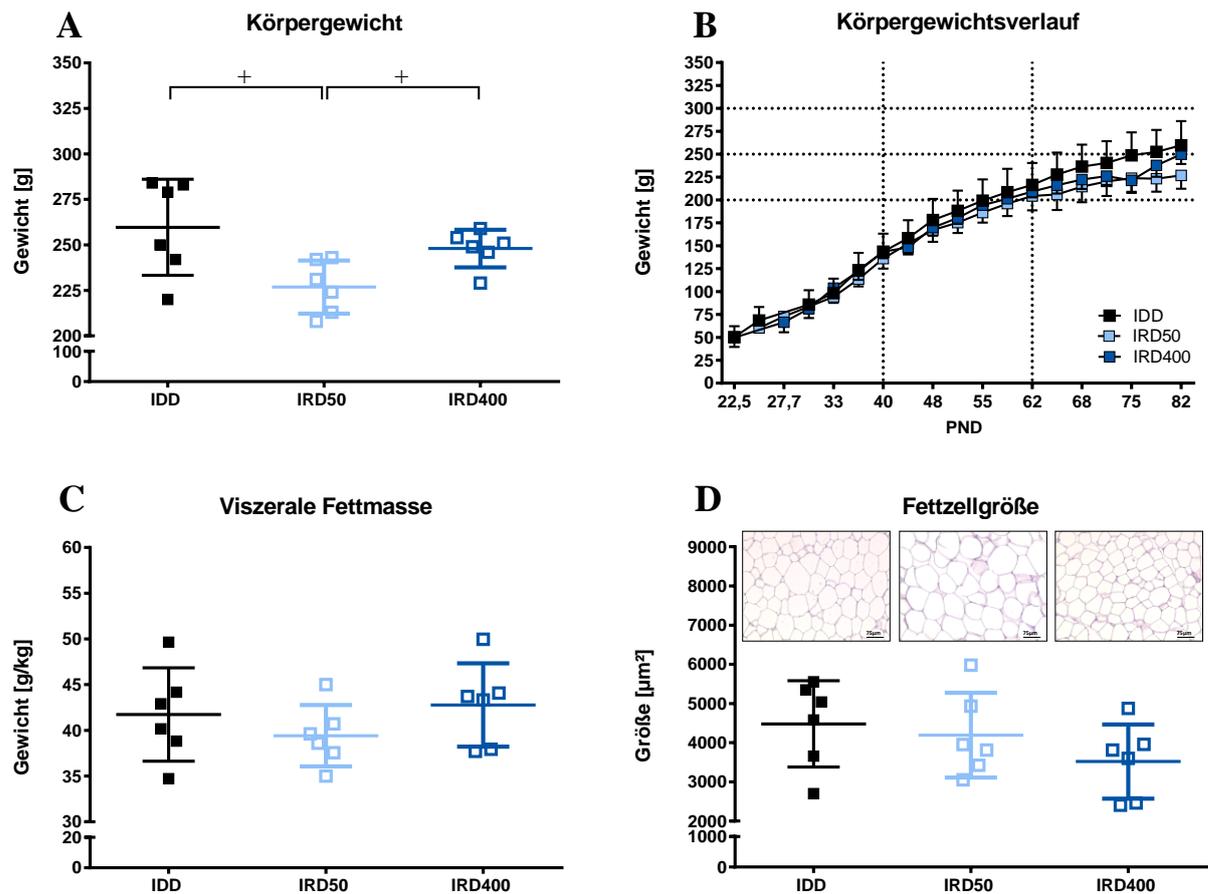


Abbildung 20: Dosisabhängige Effekte einer lebenslangen diätetischen Isoflavonexposition auf die Physiologie im intakten Tier (TV I).

Dargestellt sind das Körpergewicht (A), die Körpergewichtsentwicklung (B), die viszerale Fettmasse (C) und die Fettzellgröße mit repräsentativen Bildern von 7 µm HE gefärbten Paraffinschnitten, aufgenommen in 100x Vergrößerung (D). Linien in (B) markieren Ende des Pubertätseintritts zu ~PND40 Beginn der Zyklusbestimmung zu PND60. + kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den Diäten mit $p \leq 0,05$ (indiziert als Linie), Mann-Whitney U-Test.

5.1.4.2 Die estrogensensitiven Organe: Uterus, Vagina und Ovar

Für die Bestimmung des Einflusses einer lebenslangen, *in utero* begonnen Exposition ggü. Isoflavonen auf die estrogensensitiven Gewebe im intakten Tier wurden das relative Uterusfeuchtgewicht (Abb. 21A) und das relative Ovargewicht (Abb. 21B) bestimmt. Hierbei zeigte sich im UWW kein Unterschied zwischen den Diätgruppen. Hingegen reagierte das Ovar deutlich sensibler. Hier war ein signifikant höheres Ovargewicht in den Tieren der IRD50 zu beobachten verglichen zur Kontrolldiät IDD und zur IRD400. Die Epithelhöhen des Uterus (Abb. 21C) und der Vagina (Abb. 21D), als weitere estrogensensitive Marker, wurden ebenfalls untersucht. Hier zeigte sich bei beiden kein signifikanter Einfluss durch die Intervention mit Isoflavonen. Zusammenfassend kann lediglich im Ovargewicht ein dosisabhängiger Effekt gezeigt werden.

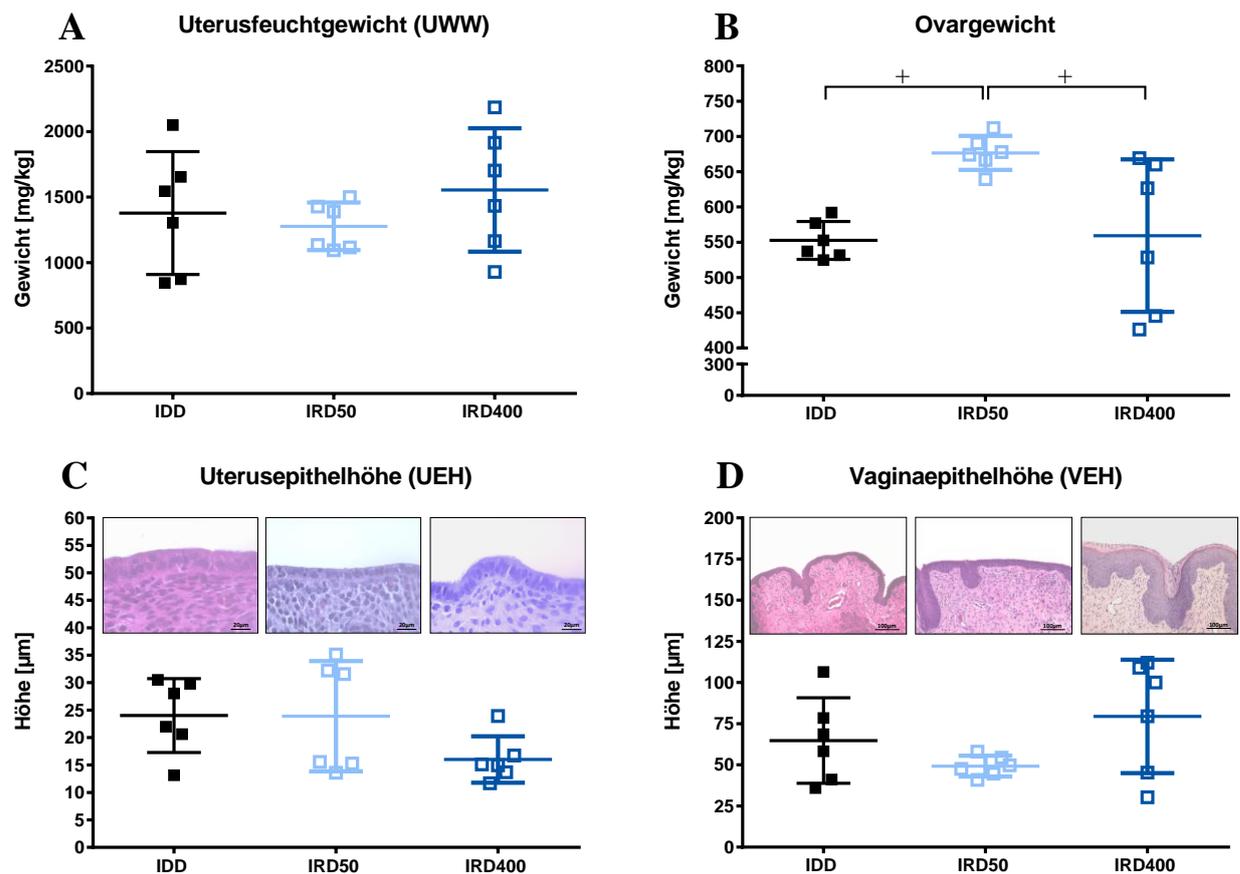


Abbildung 21: Dosisabhängige Effekte einer lebenslangen diätetischen Isoflavonexposition auf die estrogen sensitiven Gewebe Uterus, Vagina und Ovarien im intakten Tier (TV I). Dargestellt sind das Uterusfeuchtgewicht (A), das Ovargewicht (B), die Uterusepithelhöhe (C) und die Vaginaepithelhöhe. UEH und VEH mit repräsentativen Bildern von 7µm HE gefärbten Paraffinschnitten, aufgenommen in 400x bzw. 100x Vergrößerung (D). + kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den Diäten mit $p \leq 0,05$ (indiziert als Linie), Mann-Whitney U-Test.

5.1.4.3 Die Brustdrüse

Im Fokus dieser Arbeit stand der Einfluss einer lebenslangen Isoflavonexposition auf die Brustdrüse im intakten Tier. In der immunhistochemischen Analyse des estrogenregulierten Proliferationsmarkers PCNA (Abb. 22A) zeigte sich eine signifikant verringerte Proteinexpression in den Tieren der IRD400 Gruppe verglichen zu den Tieren der IRD50. Im Vergleich zur Kontrolldiät IDD zeigte sich kein signifikanter Effekt. Hier zeigten die Tiere der IRD50 Gruppe eine leichte Tendenz zur erhöhten Proliferation.

Die Analyse des estrogen sensitiven Progesteronrezeptors ergab keine differentielle Proteinexpression zwischen den Diäten (Abb. 22B). Zusammenfassend zeigte die lebenslange Intervention mit Isoflavonen im intakten Tier keinen Einfluss auf die Progesteronrezeptorexpression, jedoch auf den Proliferationsmarker PCNA bei der höchsten Isoflavondosis (IRD400).

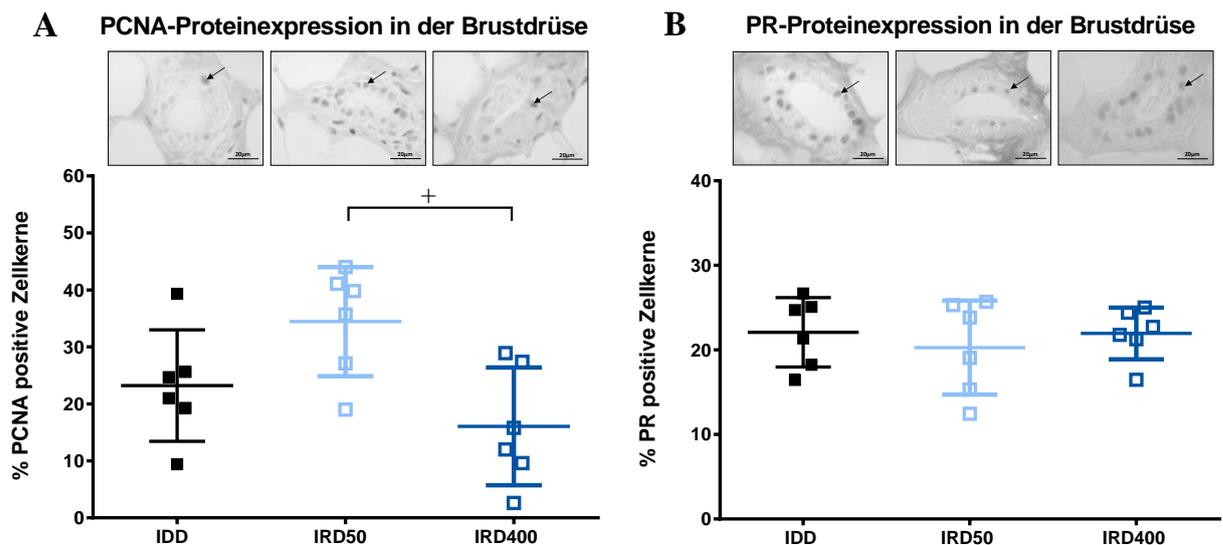


Abbildung 22: Die Proteinexpression der estrogenregulierten Marker Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen (PCNA) und Progesteronrezeptor (PR) in der Brustdrüse nach lebenslanger Isoflavonexposition im intakten Tier (TV I).

Dargestellt sind die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von PCNA (A) und PR (B). Die Graphen stellen die quantitative Auswertung in % positiver Zellkerne dar. Oberhalb der Graphiken sind repräsentative Bilder der DAB-gefärbten 5µm Mammoparaffindünnschnitte in 630x Vergrößerung dargestellt. Positive Zellkerne sind mit schwarzen Pfeilen beispielhaft markiert. + kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den Diäten mit $p \leq 0,05$ (indiziert als Linie), Mann-Whitney U-Test.

5.1.5 Dosisabhängige Effekte einer lebenslangen Isoflavonexposition auf die Estrogensensitivität im ovariectomierten Tier

Der Uterotrophe Assay im Nagetier dient zum einen als *in-vivo* Test für die Wirksamkeit von estrogenen Substanzen und zum anderen kann er auch als Modell für die Menopause herangezogen werden. Durch das Entfernen der Ovarien (Ovariectomie) kann die Menopause im Nager simuliert werden, da die endogene Estrogenproduktion dadurch stark herabgesenkt wird, wie es in der Menopause der Fall ist. In diesem zweiten Telexperiment des TV I wurde untersucht, ob eine lebenslange Exposition mit Isoflavonen zu einer veränderten Estrogensensitivität vor allem in der Brustdrüse führt und ob es zu einer veränderten Ansprechbarkeit der Zielgewebe aufgrund des im Rahmen des Uterotrophen Assay gesetzten estrogenen Stimulus (3 Tage 4 µg/kg KGW E2) kommt.

5.1.5.1 Physiologische Parameter: Körpergewicht und viszerale Fettmasse

Die Untersuchung der physiologischen Parameter des Körpergewichtes (Abb. 23A) ergab, dass die ovariectomierten Tiere auf der IRD400 in Kombination mit einem estrogenen Stimulus (E2) ein signifikant verringertes Körpergewicht sowohl zur Kontrolldiät IDD als auch zur IRD50 aufwiesen. Das gleiche Bild zeigte sich in der viszeralen Fettmasse (Abb. 23C). Zur Bestätigung dessen wurden die Fettzellgrößen bestimmt. Bei den Fettzellgrößen konnte ebenfalls eine tendenzielle Abnahme der Fettzellgrößen durch die Isoflavonexposition

verzeichnet werden (Abb. 23D). Dies wird auch in den HE-gefärbten Fettzellen deutlich. Die kleinsten Fettzellen waren in der IRD400 E2 Gruppe zu erkennen (Abb. 24). In den ovariectomierten Tieren (OVX) konnte kein signifikanter Einfluss der Diäten auf die Parameter Körpergewicht und Fettzellgröße festgestellt werden (Abb. 23A und 23D). Jedoch zeigte sich in den IRD400 Tieren ein tendenziell erniedrigtes Körpergewicht verglichen zur Kontrolle IDD. In der viszeralen Fettmasse wiesen die Tiere der IRD400 eine signifikant erniedrigte Fettmasse verglichen zur IRD50 Gruppe auf. Im Körpergewichtsverlauf (Abb. 23B) zeigte sich, dass sich alle Tiere über alle Gruppen bis zum PND50 gleich entwickelten. Nach dem Einsetzen der Pubertät lagen die Tiere der IRD400 unter denen der anderen Gruppen. Diese Entwicklung verstärkte sich nach der Ovariectomie (PND80-83). Zum Zeitpunkt der Sektion am PND 97 lag das Körpergewicht der IRD400 E2 Gruppe signifikant niedriger verglichen zur IDD und IRD50 Gruppe.

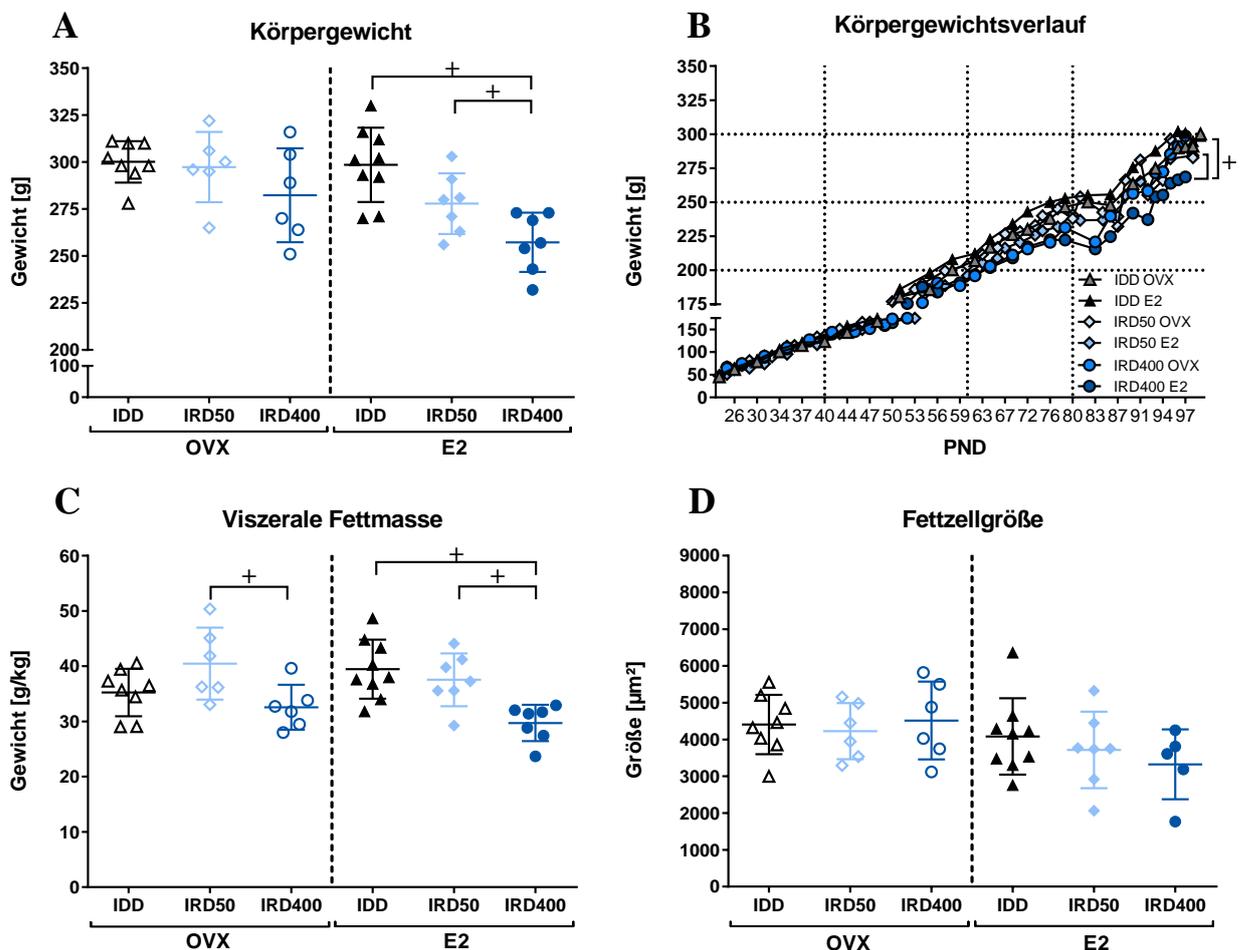


Abbildung 23: Der Einfluss einer lebenslangen diätetischen Isoflavonexposition auf die Physiologie in ovariectomierten Tieren im Rahmen des Uterotrophen Assay (TV I).

Dargestellt sind das Körpergewicht (A), die Körpergewichtsentwicklung (B), die viszerale Fettmasse (C) und die Fettzellgröße (D). Linien in (B) markieren Ende des Pubertätseintritts zu ~PND40, Beginn der Zyklusbestimmung zu PND60 und Zeitpunkt zur Ovariectomie (OVX) an PND80. *kennzeichnet signifikante Unterschiede zur OVX-Kontrolle innerhalb der gleichen Diät, + kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den Diäten mit $p \leq 0,05$ (indiziert als Linie), Kruskal-Wallis H-Test gefolgt von Mann-Whitney U-Test.

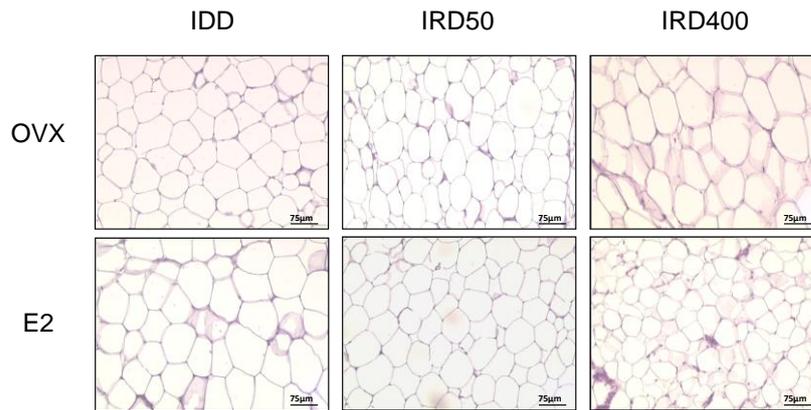


Abbildung 24: Zusammenfassung repräsentativer Darstellungen der Fettzellgrößen der ovariectomierten Tiere im Rahmen des Uterotrophen Assays. Dargestellt sind 7µm HE gefärbte Paraffinschnitte vom viszeralen Fett, aufgenommen in 100x Vergrößerung.

5.1.5.2 Die estrogensensitiven Organe: Uterus und Vagina

Der Uterus stellt ein primäres Zielorgan bei der Untersuchung von estrogenen Effekten von endogen und exogen zugeführten Substanzen dar. Damit ist das Uterusfeuchtgewicht ein valider Parameter für die Bestimmung der estrogenen Wirksamkeit der E2-Behandlung und der Isoflavonintervention. Abbildung 25 zeigt die Einflüsse einer lebenslangen, *in utero* begonnenen Exposition mit Isoflavonen auf das UWW in adulten ovariectomierten Ratten zum PND 97. Die Behandlung mit E2 führte unabhängig von der Diät zu einem signifikanten Anstieg des UWW. Innerhalb der E2 Gruppe zeigte sich ein tendenziell dosisabhängiger Anstieg des UWW mit steigendem Isoflavongehalt. In der OVX Gruppe konnte kein Unterschied zwischen den verwendeten Diäten gezeigt werden.

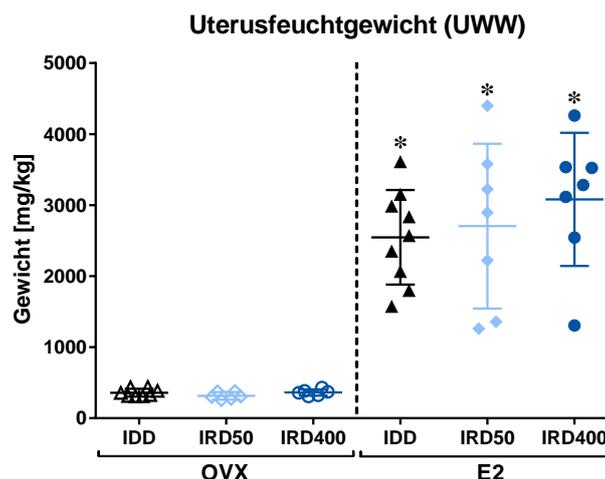


Abbildung 25: Der estrogenen Einfluss einer lebenslangen diätetischen Isoflavonexposition auf das relative Uterusfeuchtgewicht in ovariectomierten Tieren im Rahmen des Uterotrophen Assays (TV I). *kennzeichnet signifikante Unterschiede zur OVX-Kontrolle innerhalb der gleichen Diät, + kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den Diäten mit $p \leq 0,05$ (indiziert als Linie), Kruskal-Wallis H-Test gefolgt von Mann-Whitney U-Test.

Die Epithelhöhen von Uterus und Vagina stellen einen weiteren estrogensensitiven Parameter dar und wurden erneut untersucht. Die Uterusepithelhöhe (Abb. 26A) zeigte, wie schon im UWW gesehen, einen von der Diät unabhängigen signifikanten Anstieg durch die E2-Behandlung. Zusätzlich zeigte sich innerhalb der E2 Gruppe eine signifikant verringerte UEH in den Tieren der IRD400 bezogen zur Kontrolldiät IDD. Innerhalb der OVX Gruppe konnte kein Unterschied zwischen den verwendeten Diäten gezeigt werden. Betrachtet man das Epithel der Vagina (Abb. 26B), dann führte die E2-Behandlung erneut zu einem signifikanten Anstieg der VEH in allen Diätgruppen. Innerhalb der E2-Behandlungsgruppe zeichnete sich ein tendenziell dosisabhängiger Anstieg mit steigendem Isoflavongehalt ab. In der OVX Gruppe zeigte sich bei den Tieren der IRD400 eine verringerte VEH bezogen zur Kontrolldiät IDD. Zusammenfassend wirkt sich eine lebenslange Isoflavonexposition nicht auf die Estrogensensitivität des Uterus und der Vagina aus.

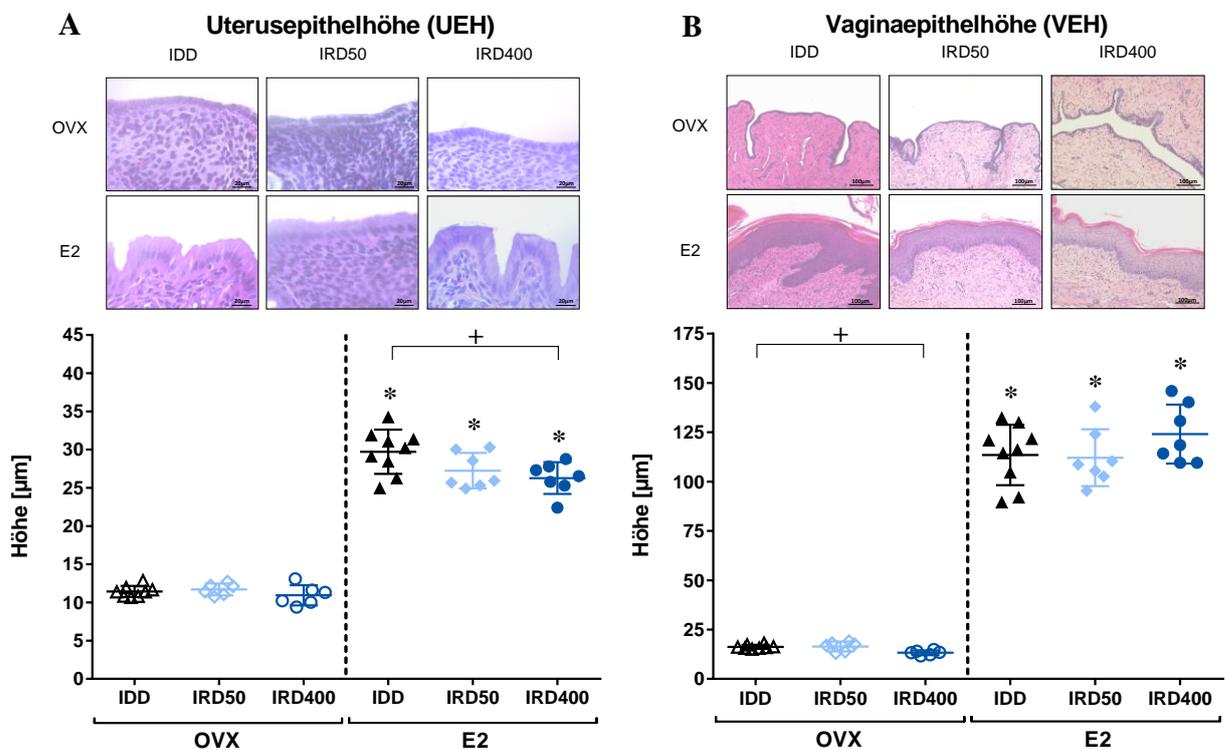


Abbildung 26: Der Einfluss einer lebenslangen diätetischen Isoflavonexposition auf die Estrogensensitivität des Uterus und der Vagina in ovariectomierten Tieren im Rahmen des Uterotrophen Assays (TV I).

Dargestellt sind die UEH (A) und VEH (B) mit repräsentativen Bildern von 7µm HE gefärbten Paraffinschnitten, aufgenommen in 400x bzw. 100x Vergrößerung *kennzeichnet signifikante Unterschiede zur OVX-Kontrolle innerhalb der gleichen Diät, + kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den Diäten mit $p \leq 0,05$ (indiziert als Linie), Kruskal-Wallis H-Test gefolgt von Mann-Whitney U-Test.

5.1.5.3 Die Estrogensensitivität der Brustdrüse

Der Fokus dieses Tierversuches bestand darin, die Frage zu beantworten, inwieweit sich eine lebenslange Isoflavonexposition auf die Estrogensensitivität der Brustdrüse auswirkt. Für die Untersuchung der Proliferation wurde die Expression des Markergens PCNA genutzt. In der immunhistochemischen Analyse der Epithelzellen der Brustdrüse (Abb. 27A) zeigte sich ein deutlicher Einfluss der Diäten auf die PCNA- und die PR-Proteinexpression. Die E2-Behandlung führte erwartungsgemäß in allen drei Diätgruppen zu einer Induktion der Proliferation. Jedoch ist die Estrogensensitivität der Brustdrüse maßgeblich vom Isoflavongehalt der Diäten beeinflusst. Innerhalb der E2 Gruppe zeigte sich bei den Tieren der IRD400 Gruppe eine um 63% reduzierte proliferative Antwort verglichen zur Kontrolldiät IDD. Auch bezogen auf die IRD50 war die PCNA-Proteinexpression der IRD400 Tiere um 68% reduziert. Die IRD50 wies im Vergleich zur IDD innerhalb der E2 Gruppe eine tendenziell erhöhte Proliferation auf. In den Tieren der OVX Gruppe ließ sich ein gleiches Muster erkennen. Die IRD50 wies ohne einen zusätzlichen estrogenen Stimulus im adulten ovariectomierten Tier (OVX) eine signifikant erhöhte Proliferation verglichen zur Kontrolldiät IDD und zur IRD400 auf. Tiere der IRD400 Futtergruppe zeigten eine signifikant reduzierte Proliferation verglichen zur Kontrolldiät IDD auf. Bezüglich der Proliferation spricht die Brustdrüse differentiell auf einen estrogenen Stimulus in Abhängigkeit der gegebenen Isoflavonkonzentration an. Die Estrogensensitivität in diesem Gewebe ist somit durch Isoflavone dosisabhängig beeinflusst.

Dies bestätigte sich in der Analyse des estrogenregulierten Progesteronrezeptors (Abb. 27B). Hier zeigte sich in den E2 behandelten Tieren eine um 55% reduzierte Proteinexpression des PR bei der Diätgruppe IRD400 verglichen zur IDD und um 66% verglichen zur IRD50. Die Expression des PRs in den Tieren der IRD50 E2 Gruppe war signifikant um 25% erhöht verglichen zur IDD. In den ovariectomierten Tieren (OVX) konnte keine Expression des PRs nachgewiesen werden (n.d.), was in den repräsentativen Bildern oberhalb des Graphen erkennbar ist. Die Stimulation mit E2 im Rahmen des Uterotrophen Assays führte zu einer Induktion in der PR-Proteinexpression in allen drei Diätgruppen.

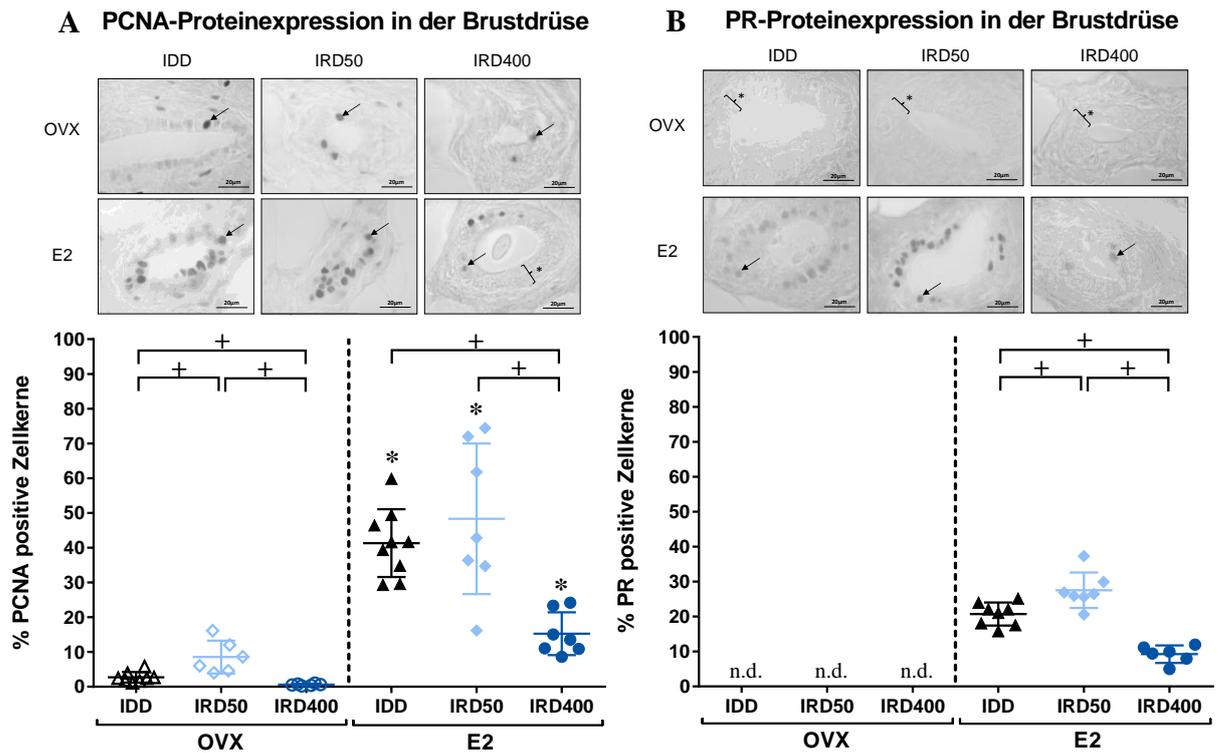


Abbildung 27: Die Proteinexpression der estrogenregulierten Marker Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen (PCNA) und Progesteronrezeptor (PR) in der Brustdrüse nach lebenslanger Isoflavonexposition von ovariectomierten Tieren im Rahmen des Uterotrophen Assays (TV I). Dargestellt sind die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von PCNA (A) und PR (B). Die Graphen stellen die quantitative Auswertung in % positiver Zellkerne dar. Oberhalb der Graphiken sind repräsentative Bilder der DAB-gefärbten 5µm Mammaparaffindünnschnitte in 630x Vergrößerung dargestellt. Positive Zellkerne sind mit schwarzen Pfeilen beispielhaft markiert, Klammern mit Sternchen zeigen das Drüsengangsepithel an. *kennzeichnet signifikante Unterschiede zur OVX-Kontrolle innerhalb der gleichen Diät, + kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den Diäten mit $p \leq 0,05$ (indiziert als Linie), Kruskal-Wallis H-Test gefolgt von Mann-Whitney U-Test.

5.2 Akute Supplementation einer isoflavonreichen Diät in der ovariectomierten Ratte – TV II: Ist der Expositionszeitraum mit Isoflavonen entscheidend für die biologische Wirksamkeit, im Speziellen auf die Brustdrüse, der Ratte?

In diesem Tierversuch wurde der Einfluss einer akuten oralen Isoflavongabe im ovariectomierten Tier untersucht. Hierbei wurden die Tiere auf einer Standarddiät (CRD) herangezogen und anschließend, nach der Ovariectomie mit dem hochdosierten Extrakt (IRD400) für 14 Tage zusätzlich stimuliert bzw. erhielten eine isoflavonfreie Diät (IDD, siehe Kapitel 3.4). Hier stand die Frage im Fokus, ob sich die Estrogensensitivität der Zielgewebe hinsichtlich der Expositionsdauer und des -zeitraumes beeinflussen lässt.

5.2.1 Analyse der verwendeten Diät

Der Gehalt an Isoflavonen des Standardaufzuchtfutters (CRD) wurde zur Vollständigkeit ebenfalls am Max-Rubner-Institut in Karlsruhe in der Arbeitsgruppe von Prof. Frau Sabine Kulling bestimmt. Die Analyse ergab einen relevanten Isoflavongehalt von 232,4 mg/kg. Der Gehalt entspricht ungefähr der Hälfte des Isoflavongehaltes der IRD400 und dem 66-fachen der Kontrolldiät IDD. Bezugnehmend auf TV I liegt die Dosis der CRD um das 3,4-fache höher als die IRD50. Bei der IDD und IRD400 handelt es sich um die gleichen Diäten, die in TV I verwendet wurden. Tabelle 11 stellt erneut in der Übersicht die Diäten hinsichtlich ihrer Isoflavonkonzentration dar.

Tabelle 11: Bestimmung der Isoflavongehalte des verwendeten Sojaisoflavon-Extrakt Novasoy® 650 und der Diäten IDD, CRD und IRD400 mittels HPLC-DAD-Methode (TV II).

Dargestellt sind die Aglykon-Äquivalente (Summe der entsprechenden Aglykone und der glykosidischen Form), n.d. unter der Nachweisgrenze.

IF-Gehalt (kalkuliert als Aglykon-Äquivalent)	Novasoy® 650	IDD	CRD	IRD400
	[mg/g]	[mg/kg]		
Daidzein (Dai)	169,8	n.d.	95,3	202,6
Genistein (Gen)	216,1	3,5	130,2	257,2
Glycitein (Gly)	38,9	n.d.	6,9	46,0
Summe	424,8	3,5	232,4	505,8

5.2.2 Physiologische Parameter: Körpergewicht und viszerale Fettmasse

Abbildung 28 stellt die physiologischen Parameter des Körpergewichtes (Abb. 28A) und der viszeralen Fettmasse (Abb. 28B) in den ovariectomierten Tieren nach einer akuten Isoflavongabe dar. Hierbei zeigte sich in keinem der beiden Parameter ein signifikanter Effekt hinsichtlich der E2-Behandlung oder der akuten Stimulation mit der isoflavonreichen Diät

IRD400. Im Körpergewicht zeichnet sich in der IRD400 Gruppe durch die E2-Behandlung eine Tendenz für ein verringertes Körpergewicht ab, welches auch bei der viszeralen Fettmasse (Abb. 28B) zu sehen ist. Die akute Gabe von Isoflavonen im adulten ovariectomierten Tier hat keinen Einfluss auf das Körpergewicht und die viszerale Fettmasse.

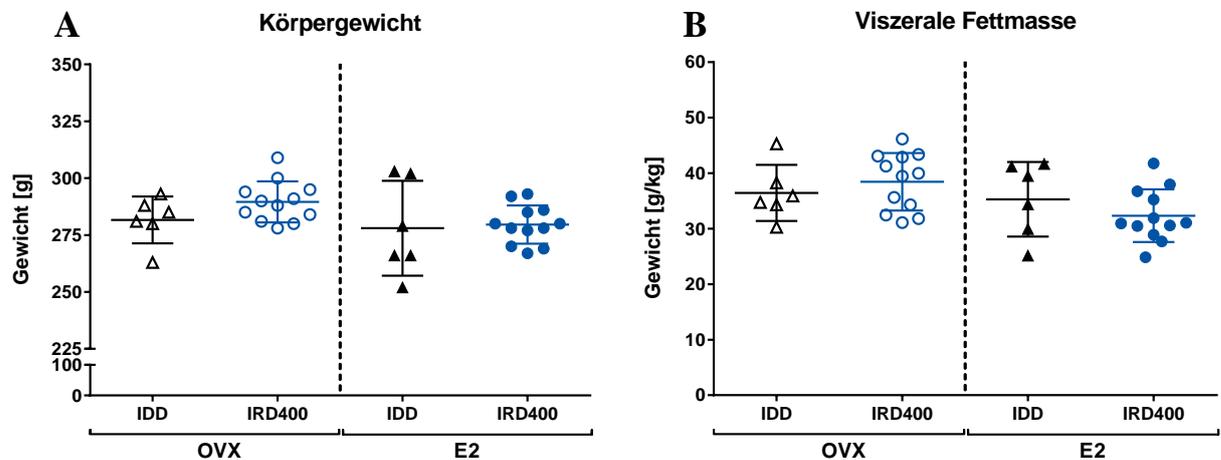


Abbildung 28: Der Einfluss einer akuten Isoflavongabe auf die Physiologie im ovariectomierten Tier (TV II).

Dargestellt sind das Körpergewicht (A) und die viszerale Fettmasse (B). Keine signifikanten Unterschiede, Kruskal-Wallis H-Test gefolgt von Mann-Whitney U-Test.

5.2.3 Die estrogensensitiven Organe: Uterus und Vagina

Das Uterusfeuchtgewicht als ein Marker für die estrogene Wirkung einer Substanz zeigte eine deutliche Zunahme des UWW durch den im Rahmen des Uterotrophen Assays gesetzten Stimulus mit E2 (Abb. 29) in den Tieren. Die zusätzliche Stimulation mit Isoflavonen (IRD400) hatte keinen Einfluss auf das UWW, da es zu keiner veränderten Responsivität des Gewebes in Tieren der IRD400 durch die E2-Behandlung kam.

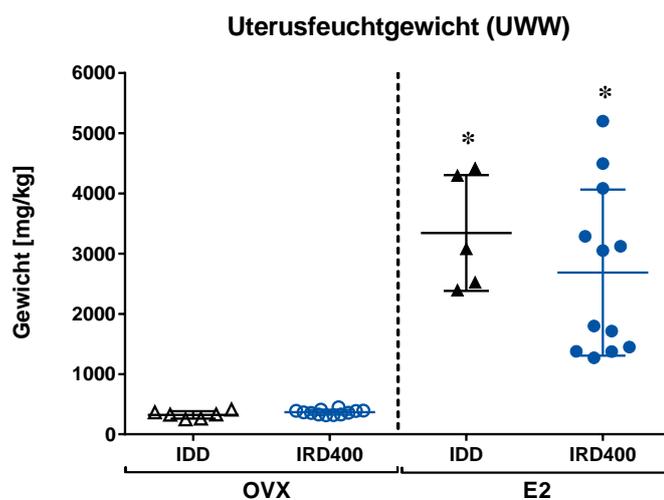


Abbildung 29: Der estrogene Einfluss einer akuten Isoflavongabe auf das relative Uterusfeuchtgewicht im ovariectomierten Tier (TV II).

*kennzeichnet signifikante Unterschiede zur OVX-Kontrolle innerhalb der gleichen Diät, + kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den Diäten mit $p \leq 0,05$ (indiziert als Linie), Kruskal-Wallis H-Test gefolgt von Mann-Whitney U-Test.

Gleiches Bild zeigte sich in den Epithelhöhen des Uterus (Abb. 30A) und der Vagina (Abb. 30B). Beide Parameter zeigten eine deutliche und gewünschte Reaktion auf den gesetzten E2-Stimulus in Form einer Erhöhung des Epithels. Jedoch führte auch hier die zusätzliche Stimulation mit dem hochdosierten Isoflavonextrakt (IRD400) zu keinem Effekt auf die UEH und die VEH.

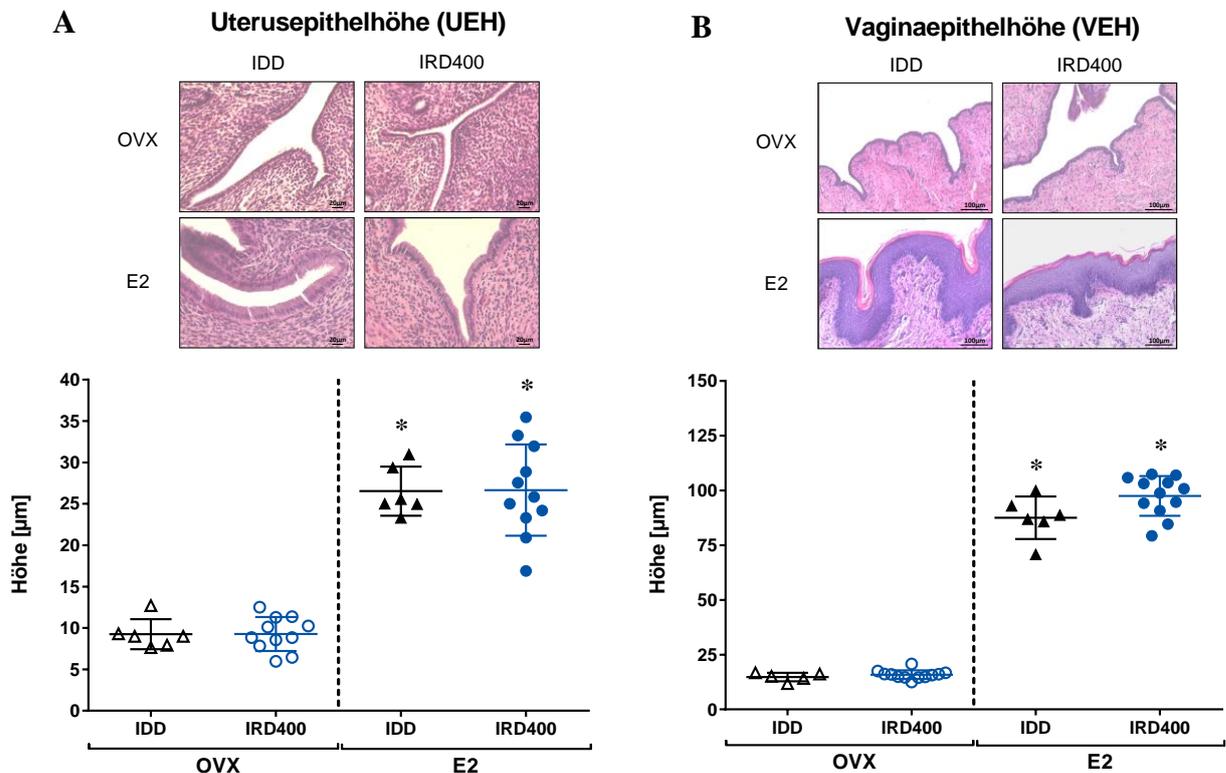


Abbildung 30: Der Einfluss einer akuten Isoflavongabe auf die estrogensensitiven Gewebe des Uterus und der Vagina im ovarektomierten Tier (TV II).

Dargestellt sind die UEH (A) und VEH (B) mit repräsentativen Bildern von 7µm HE gefärbten Paraffinschnitten, aufgenommen in 200x bzw. 100x Vergrößerung *kennzeichnet signifikante Unterschiede zur OVX-Kontrolle innerhalb der gleichen Diät, + kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den Diäten mit $p \leq 0,05$ (indiziert als Linie), Kruskal-Wallis H-Test gefolgt von Mann-Whitney U-Test.

5.2.4 Die Estrogensensitivität der Brustdrüse

Die Brustdrüse als das Hauptzielgewebe dieser Arbeit wurde erneut hinsichtlich ihrer Proliferation und Progesteronrezeptor-Expression untersucht. Die Behandlung mit E2 im Rahmen des durchgeführten Uterotrophen Assays führte erwartungsgemäß zu einer Induktion der Proliferation verglichen zu OVX, was sich in einer erhöhten PCNA-Expression zeigte (Abb. 31A). Tiere, welche unmittelbar nach der Ovarektomie mit Isoflavonen stimuliert wurden (IRD400), zeigten in der unbehandelten (OVX) Gruppe bereits eine 2,8-fach erhöhte Proliferation verglichen zur Kontrolle IDD. Folgte nun ein zusätzlicher E2- Stimulus, so sprachen die Tiere auf der IRD400 mit einer tendenziell stärkeren Proliferation von 28% an

als Tiere der IDD. Somit führte eine akute Gabe von Isoflavonen im adulten ovariectomierten Tier zu einer erhöhten Estrogenantwort der Brustdrüse.

Die Analyse des Progesteronrezeptors wies einen ähnlichen Befund auf (Abb. 31B). Hier sprachen die Tiere mit Isoflavonstimulus (IRD400) ebenfalls tendenziell stärker auf den zusätzlichen gesetzten E2-Stimulus mit 29% mehr an, verglichen zur Kontrolle IDD. Unbehandelte ovariectomierte Tiere (OVX) wiesen unabhängig von der Diät keine Expression des PRs auf. Die Behandlung mit E2 führte zu einer Induktion der PR-Proteinexpression.

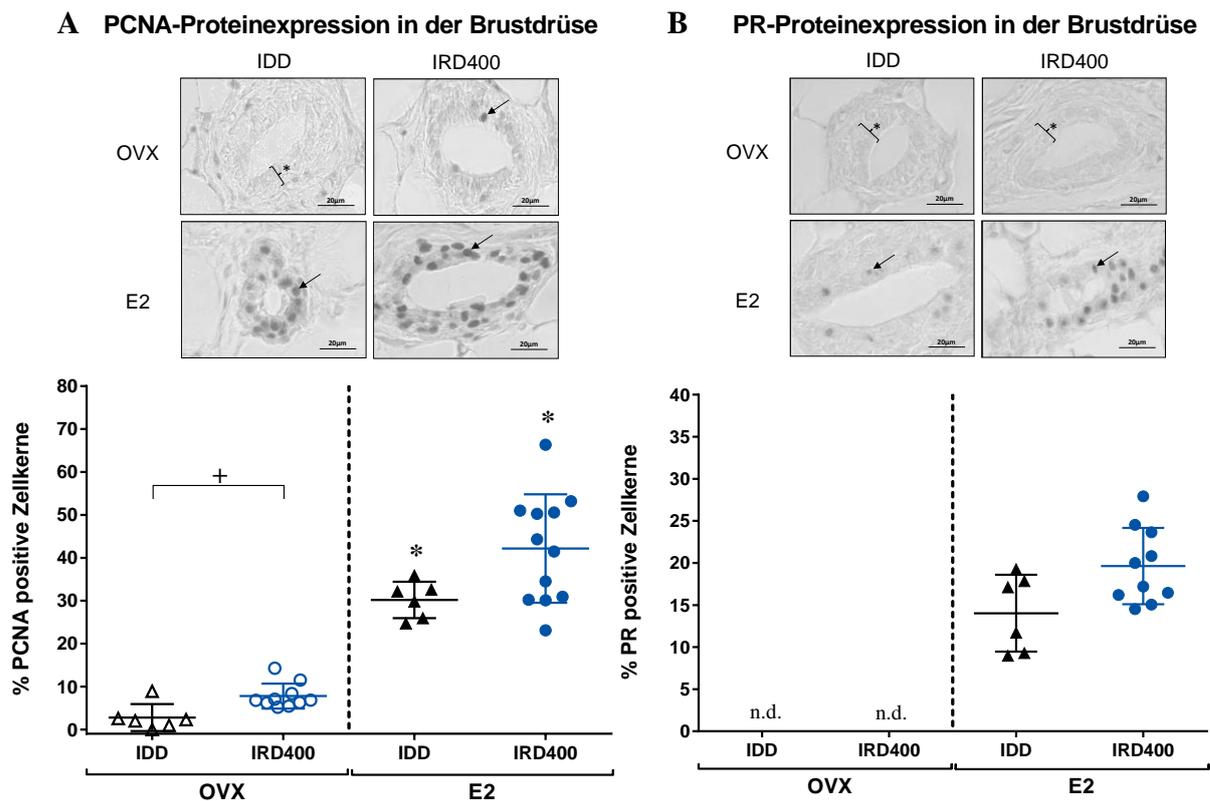


Abbildung 31: Die Proteinexpression der estrogenregulierten Marker Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen (PCNA) und Progesteronrezeptor (PR) in der Brustdrüse nach akuter Isoflavongabe von ovariectomierten Tieren (TV II).

Dargestellt sind die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von PCNA (A) und PR (B). Die Graphen stellen die quantitative Auswertung in % positiver Zellkerne dar. Oberhalb der Graphiken sind repräsentative Bilder der DAB-gefärbten 5µm Mammoparaffindünnschnitte in 630x Vergrößerung dargestellt. Positive Zellkerne sind mit schwarzen Pfeilen beispielhaft markiert, Klammern mit Sternchen zeigen das Drüsengangsepithel an, n.d. nicht detektierbar. *kennzeichnet signifikante Unterschiede zur OVX-Kontrolle innerhalb der gleichen Diät, + kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den Diäten mit $p \leq 0,05$ (indiziert als Linie), Kruskal-Wallis H-Test gefolgt von Mann-Whitney U-Test.

5.3 Lebenslange Exposition gegenüber Isoflavonen in Kombination mit diätetischem Fett – TV III: Welche Rolle spielt diätetisch aufgenommenes Fett bei der Wirksamkeit von Isoflavonen?

Aufgrund der noch ungeklärten Rolle des Nahrungsfettes bei der Entstehung und Entwicklung vieler Erkrankungen wie Adipositas oder auch Brustkrebs sollte in TV III untersucht werden, ob und inwieweit diätetisch aufgenommenes Nahrungsfett die Wirkung der Isoflavone, insbesondere die Estrogensensitivität der Brustdrüse beeinflusst. Hierfür wurden die Tiere erneut lebenslang mit (IRD400) oder ohne (IDD) Isoflavonen exponiert, wobei für jeweils einen Teil der Tiere ab dem 21. Tag ein Futterwechsel auf eine um 31% fettreichere isokalorische Diät (HF) erfolgte (siehe Kapitel 3.4.2).

5.3.1 Analyse der verwendeten Diäten

Die Futter wurden erneut hinsichtlich ihres Isoflavongehaltes am Max-Rubner-Institut in Karlsruhe in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Sabine Kulling analysiert. Die Analyse ergab einen Isoflavongehalt in der isoflavonreichen Diät (IRD) von 467 mg /kg Futter unabhängig von dem Fettgehalt der Diät (Tab. 12). Die IDD Futter lagen bei der Messung unterhalb der Nachweisgrenze (n.d.) und enthielten demnach keine biologisch relevanten Mengen an Isoflavonen.

Tabelle 12: Bestimmung der Isoflavongehalte der verwendeten Diäten mittels HPLC-DAD Methode mit vorheriger Fettextraktion mit Heptan (TV III). Dargestellt sind die Aglykon-Äquivalente (Summe der entsprechenden Aglykone und der glykosidischen Form), n.d. unter der Nachweisgrenze.

IF-Gehalt (kalkuliert als Aglykon-Äquivalent)	IDD LF	IDD HF	IRD LF	IRD HF
	[mg/kg]			
Daidzein (Dai)	n.d.	n.d.	191,0	195,1
Genistein (Gen)	n.d.	n.d.	228,7	230,6
Glycitein (Gly)	n.d.	n.d.	46,9	41,7
Summe	n.d.	n.d.	466,6	467,3

5.3.2 Der Einfluss von diätetischem Fett in Kombination mit Isoflavonen auf die Pubertät und den Zyklus

Erneut wurde in diesem Tierversuch der Zeitpunkt der Vaginalöffnung als ein Parameter für den Pubertätseintritt bestimmt (Abb. 32A). Hierbei konnte für die isoflavonfreie Kontrolldiät IDD gezeigt werden, dass eine fettreichere Ernährung (HF) ab dem PND 21 tendenziell zu einem um ca. 1,3 Tage früheren Pubertätseintritt führt. In den Tieren die lebenslang Isoflavone erhielten (IRD) führte die HF-Diät zu einem signifikanten Unterschied von 2,1

Tagen. Betrachtet man den Zyklus der Tiere (Abb. 32B), dann zeigt die Intervention mit Fett keinen Einfluss auf die Zyklusdauer. Jedoch führte eine lebenslange Gabe von Isoflavonen zu einer signifikanten Verkürzung des Zyklus, unabhängig vom Fettgehalt der Diät, welches bereits in TV I gezeigt werden konnte.

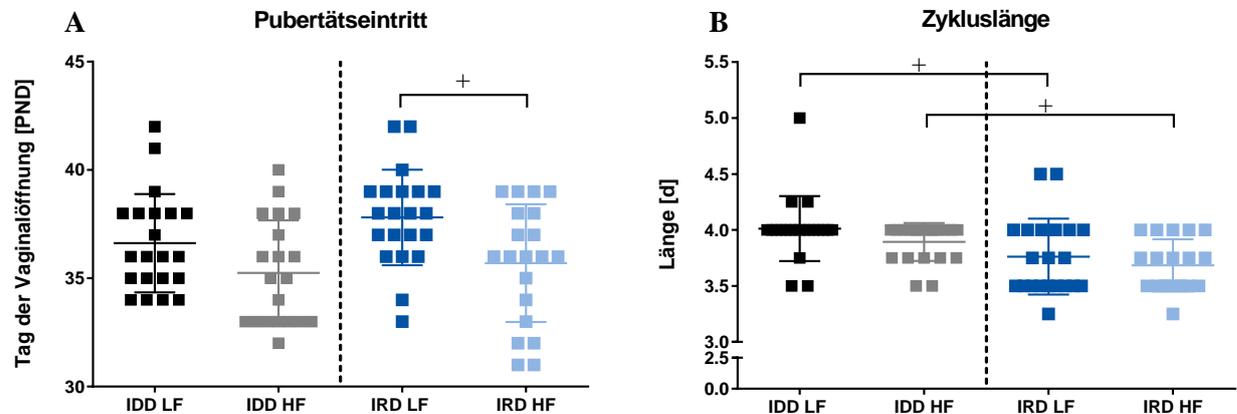


Abbildung 32: Der Einfluss von diätetischem Fett in Kombination einer lebenslangen Isoflavonaufnahme auf den Pubertätseintritt (VO) und den Zyklus (TV III).

Aufgrund der in der Literatur beschriebenen vorherrschenden Korrelation zwischen dem Körpergewicht und dem Eintritt in die Pubertät, wurde in diesem Tierversuch zusätzlich das Körpergewicht der Tiere zum Zeitpunkt der Vaginalöffnung dokumentiert und nach den beiden Diäten IDD und IRD getrennt aufgetragen. Das Ergebnis ist in Abbildung 33 zu sehen. In der isoflavonfreien Kontrollgruppe (IDD) zeigte sich, dass erst ab einem gewissen Schwellenwert von ~ 100 g Körpergewicht (als rot gestrichelte Linie dargestellt) die Vaginalöffnung eintritt (Abb. 33A). Die Tiere der IDD HF Gruppe zeigten einen früheren Pubertätseintritt verglichen zur LF Gruppe. Zum PND 33 zeigten bereits 8 Tiere der HF Gruppe die Vaginalöffnung an, aber keines der LF Gruppe (Abb. 33C). Späteste Vaginalöffnung der Gruppe HF war der PND 40 und bei der LF Gruppe der PND 42. In der Isoflavongruppe (IRD), zeichnete sich Ähnliches ab (Abb. 33B). Die Tiere der IRD HF Gruppe zeigten ebenfalls einen früheren Pubertätseintritt verglichen zur LF Gruppe. Zum PND 32 zeigten 4 Tiere der HF Gruppe die Vaginalöffnung an, aber keines der LF Gruppe (Abb. 33D). Späteste Vaginalöffnung der Gruppe HF war der PND 39, hingegen bei der IRD LF Gruppe erst 3 Tage später zum PND 42 die letzten Tiere in die Pubertät eintraten. Daraus ergibt sich der signifikante Unterschied zwischen LF und HF in der IRD (siehe Abb. 32A).

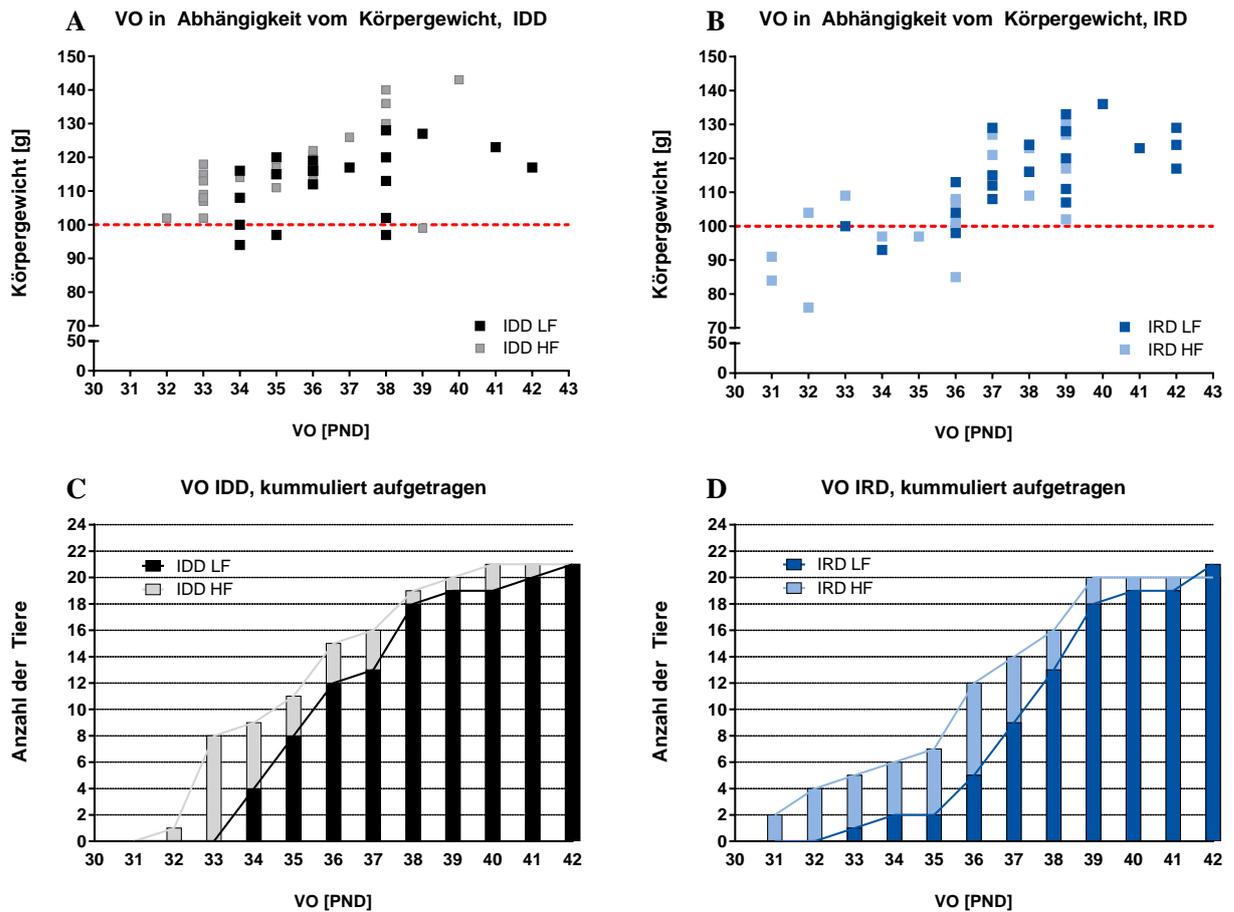


Abbildung 33: Der Zusammenhang zwischen dem Pubertätseintritt und Körpergewicht in Tieren mit einer fettreichen (HF) Ernährung ohne (A) und mit (B) Isoflavonen und der Einfluss der HF Intervention auf das VO (C und D).

Dargestellt sind getrennt nach IDD (A) und IRD400 (B) alle Einzeltiere der beiden Futtergruppen LF (lowfat) und HF (highfat) das Körpergewicht zum Zeitpunkt des VO (Pubertätseintritt) und die kumulative Darstellung der Anzahl der Tiere zum PND des VO für die IDD (C) und IRD (D).

5.3.3 Der Einfluss von diätetischem Fett in Kombination mit einer lebenslangen Isoflavonexposition im intakten Tier

Im ersten Teil des TV III wurden die intakten Tiere untersucht. Damit ist es möglich, den biologischen Status der Tiere zum Zeitpunkt der Ovariectomie zu ermitteln und mögliche Wechselwirkungen zwischen dem endogen vorliegendem E2 und dem substituierten Fett in Kombination mit Isoflavonen festzustellen und zu untersuchen. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Tiere in der gleichen Zyklusphase (Proestrus) getötet wurden, um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten und um potenzielle Effekte auf die Intervention und nicht auf die Zyklusphase zurückzuführen.

5.3.3.1 Physiologische Parameter: Körpergewicht und viszerale Fettmasse

In Abbildung 34A sind die Körpergewichte zum Zeitpunkt der Sektion (PND80) dargestellt. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Körpergewicht bezogen auf die Intervention mit Fett. Es ließ sich jedoch ein Trend zu einem leicht erhöhten Körpergewicht

von 4% (IDD) bzw. 6% (IRD400) in den jeweiligen HF Gruppen erkennen. Die Intervention mit Isoflavon (IRD) zeigte ebenfalls keinen Effekt verglichen zur Kontrolle IDD. Dies ist gut im Körpergewichtsverlauf in Abbildung 34B zu sehen. Alle Tiere, unabhängig von den Gruppen, entwickelten sich gleichmäßig. Aufgrund der Korrelation zwischen dem Körpergewicht und der viszeralen Fettmasse wurde dieser Parameter ebenfalls untersucht (Abb. 34C). Die viszerale Fettmasse der IDD HF war durch die Intervention mit Fett nicht erhöht verglichen zur Kontrolle IDD LF. Gleiches gilt für die IRD. Hier ließ sich nur eine geringe Tendenz zu einer erhöhten viszeralen Fettmasse in der HF Gruppe verglichen zur LF erkennen. Interessanterweise zeigte sich für die IRD HF eine signifikant höhere viszerale Fettmasse verglichen zur IDD HF. Für die Validierung möglicher Effekte der Interventionen wurde die Fettzellgröße bestimmt (Abb. 34D). Hier zeigte sich das gleiche Bild wie bei den Körpergewichten. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen vorzuweisen, jedoch einen Trend zur leicht erhöhten Fettzellgröße der HF Gruppen verglichen zur jeweiligen LF Gruppe. Die IDD und IRD unterschieden sich unabhängig vom Fettanteil nicht.

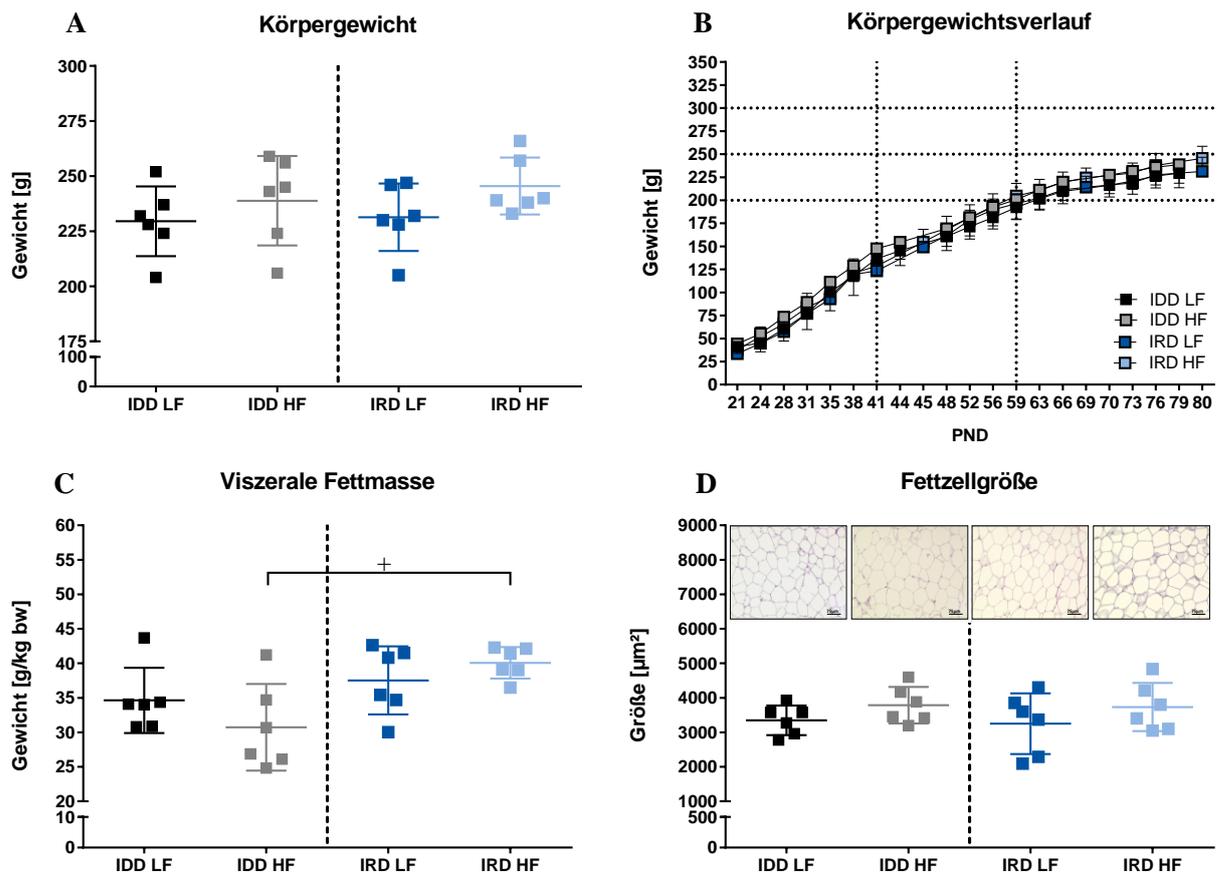


Abbildung 34: Der Einfluss von diätetischem Fett in Kombination einer lebenslangen Isoflavonaufnahme auf die Physiologie im intakten Tier (TV III).

Dargestellt sind das Körpergewicht (A), die Körpergewichtsentwicklung (B), die viszerale Fettmasse (C) und die Fettzellgröße mit repräsentativen Bildern von 7µm HE gefärbten Paraffinschnitten, aufgenommen in 100x Vergrößerung (D). Linien in (B) markieren Ende des Pubertätseintritts zu ~PND40 Beginn der Zyklusbestimmung zu PND59. + kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den Diäten mit $p \leq 0,05$ (indiziert als Linie), Kruskal-Wallis H-Test gefolgt von Mann-Whitney U-Test.

Für die Beurteilung des Fettstoffwechsels, wurden die Serumlipide gemessen. Hier zeigte sich im Cholesterol-, LDL- und Triglyzerid (TG)- Gehalt kein signifikanter Unterschied (Tab. 13) zwischen den Gruppen.

Tabelle 13: Der Einfluss von diätetischem Fett in Kombination einer lebenslangen Isoflavonaufnahme auf die Serumlipide in intakten Tieren (TV III).

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD der gemessenen Serumlipide Cholesterol, HDL, LDL und TG in tabellarischer Form. + kennzeichnet signifikante Unterschiede zu IDD LF mit $p \leq 0,05$, Kruskal-Wallis H-Test gefolgt von Mann-Whitney U-Test.

Diät	Serumlipide[mg/dl]			
	Cholesterol	HDL	LDL	TG
IDD LF	79,2 $\pm 8,0$	43,2 $\pm 3,4$	26,4 $\pm 4,2$	145,2 $\pm 20,8$
IDD HF	85,6 $\pm 9,2$	52,8+ $\pm 4,8$	25,2 $\pm 3,9$	128,2 $\pm 9,8$
IRD LF	79,3 $\pm 10,6$	49,2+ $\pm 5,8$	26,8 $\pm 3,5$	160,3 $\pm 36,1$
IRD HF	77,5 $\pm 13,5$	53,5 $\pm 6,4$	28,3 $\pm 8,8$	137,5 $\pm 26,5$

Einzig das HDL-Cholesterol zeigte einen signifikant erhöhten Serumspiegel in der IDD HF bezogen zur IDD LF (Abb. 35). In der IRD LF war der HDL-Spiegel bereits basal signifikant erhöht verglichen zur Kontrolldiät IDD LF. Die Intervention mit Fett (IRD HF) führte lediglich zu einer schwach ausgeprägten Erhöhung des HDLs in der IRD.

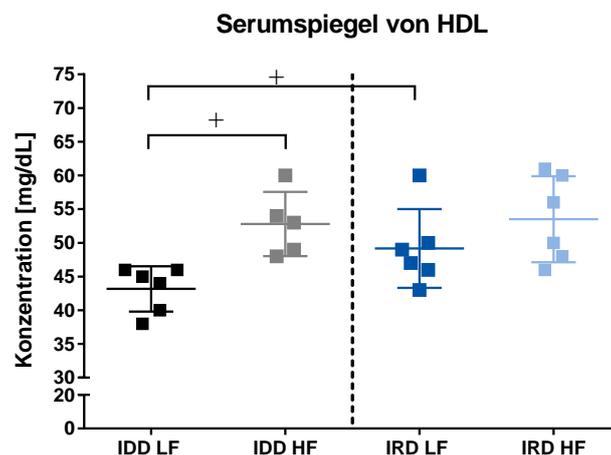


Abbildung 35: Der Einfluss von diätetischem Fett in Kombination einer lebenslangen Isoflavonaufnahme auf das Serumlipid HDL in intakten Tieren (TV III).

+ kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den Diäten mit $p \leq 0,05$ (indiziert als Linie), Kruskal-Wallis H-Test gefolgt von Mann-Whitney U-Test.

5.3.3.2 Die estrogensensitiven Organe: Uterus, Vagina und Ovar

Für die Beantwortung der Frage, ob diätetisches Fett einen Einfluss auf die klassisch estrogensensitiven Gewebe hat, wurden das relative UWW (Abb. 36A) und das relative Ovargewicht (Abb. 36B) in den intakten Tieren untersucht. Das UWW zeigte hinsichtlich der

Intervention mit Fett keinen Einfluss. Es zeigte sich eine schwache Reduktion des UWW in der HF Gruppe verglichen zur LF der jeweiligen Diät. Im Vergleich der IDD mit der IRD zeigte sich ein signifikant erniedrigtes UWW innerhalb der LF Gruppen und eine gleiche Tendenz bei den HF Gruppen. Betrachtet man das Ovargewicht, dann zeigte sich in der isoflavonfreien IDD ein tendenziell erhöhtes Ovargewicht der HF Gruppe verglichen zur LF. Interessanterweise konnte dies nicht in der IRD beobachtet werden. Hier zeichnete sich ein signifikant geringeres Ovargewicht in der IRD HF verglichen zur Kontrolle IDD HF ab. Innerhalb der IRD gab es keinen Unterschied im Ovargewicht und auch zwischen der IDD LF und der IRD LF nicht. Die Epithelhöhen des Uterus (Abb. 36C) und Vagina (Abb. 36D) zeigten keinerlei Einfluss durch die Intervention mit Fett (LF vs. HF) und auch nicht durch die Behandlung mit Isoflavonen (IRD) oder der Kombination. Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass einzig das Ovargewicht einen Effekt aufwies.

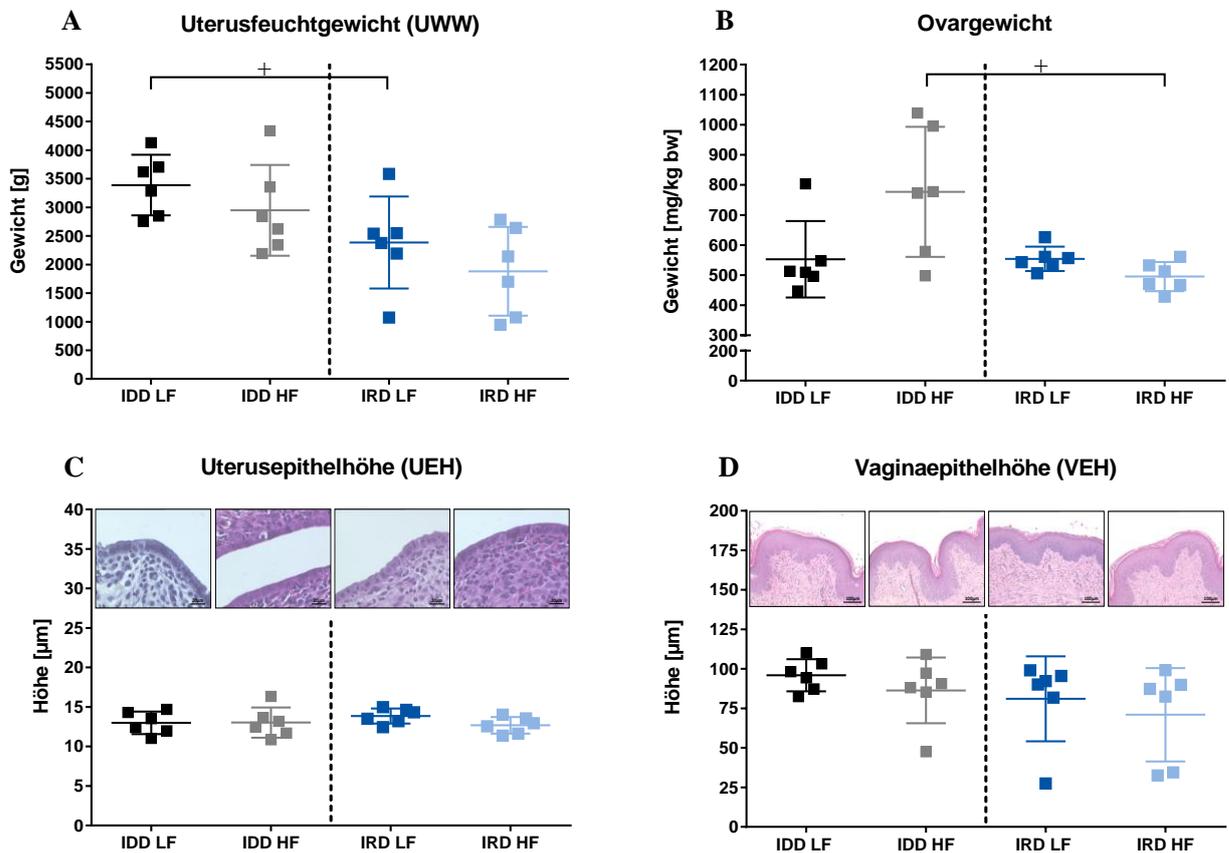


Abbildung 36: Der Einfluss von diätetischem Fett in Kombination einer lebenslangen Isoflavonaufnahme auf die Physiologie im intakten Tier (TV III).

Dargestellt sind das Uterusfeuchtgewicht (A), das Ovargewicht (B), die Uterusepithelhöhe (C) und die Vaginaepithelhöhe. UEH und VEH mit repräsentativen Bildern von 7 μ m HE gefärbten Paraffinschnitten, aufgenommen in 400x bzw. 100x Vergrößerung (D). + kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den Diäten mit $p \leq 0,05$ (indiziert als Linie), Kruskal-Wallis H-Test gefolgt von Mann-Whitney U-Test.

5.3.3.3 Die Brustdrüse

Für die Beurteilung des Einflusses von diätetisch aufgenommenem Fett auf die Brustdrüse, wurde der Proliferationsmarker PCNA untersucht. Die Analyse ergab, dass weder die Intervention mit Fett (LF vs. HF) noch die Intervention mit Isoflavonen (IDD vs. IRD) einen Einfluss auf diesen Marker zeigte (Abb. 37). In allen Gruppen lag die mittlere PCNA-Proteinexpression bei $\sim 14\% \pm 2\%$ PCNA positiver Zellkerne.

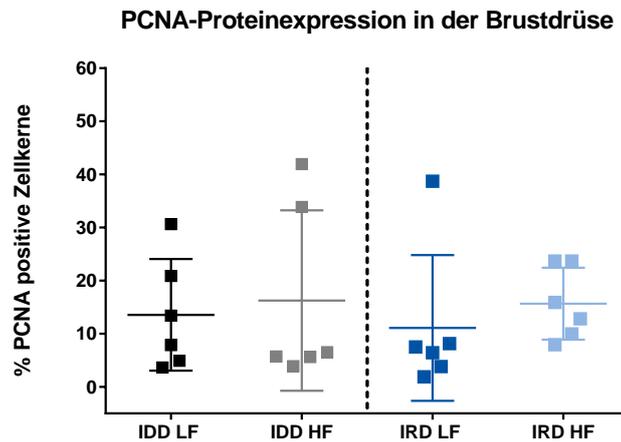


Abbildung 37: Die Proteinexpression des estrogenregulierten Markers Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen (PCNA) in der Brustdrüse von intakten Tieren nach einer lebenslangen Isoflavonexposition in Kombination mit diätetischem Fett (TV III).

Dargestellt ist die quantitative Auswertung in % positiver Zellkerne der immunhistochemischen Färbung von PCNA. Keine signifikanten Unterschiede, Kruskal-Wallis H-Test gefolgt von Mann-Whitney U-Test.

5.3.4 Der Einfluss von diätetischem Fett in Kombination mit einer lebenslangen Isoflavonexposition auf die Estrogensensitivität im ovariectomierten Tier

Inwieweit mit der Nahrung aufgenommenes Fett die Estrogensensitivität von estrogenen Zielgeweben beeinflusst wird, wurde in dem zweiten Teil des Tierversuches III erneut ein Uterotropher Assay durchgeführt.

5.3.4.1 Die estrogensensitiven Organe: Uterus und Vagina

In Abbildung 38 ist das UWW der Tiere aus dem Uterotrophen Assay dargestellt. Die Behandlung mit E2 führte in allen Tieren unabhängig von der Diät und der Intervention zu einem signifikanten Anstieg des UWW. In den unbehandelten Tieren der OVX Gruppe gab es keinen Unterschied zwischen IDD und IRD und auch nicht zwischen LF und HF. Innerhalb der E2 behandelten Tiere scheint das UWW in der IDD HF tendenziell erhöht zu sein verglichen zu seiner Kontrolle IDD LF. Bei der IRD stellt sich dies umgekehrt dar, hier zeigen die Tiere der IRD HF Gruppe das geringste UWW. Zusammenfassend kann jedoch festgestellt werden, dass die Intervention mit Nahrungsfett unabhängig vom Isoflavongehalt der Diät keinen signifikanten Einfluss auf das UWW hatte.

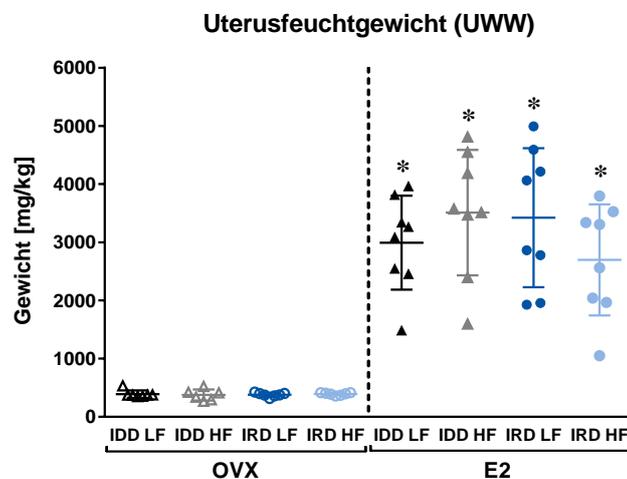


Abbildung 38: Der estrogene Einfluss von diätetischem Fett in Kombination einer lebenslangen Isoflavonaufnahme auf das relative Uterusfeuchtgewicht in ovariectomierten Tieren im Rahmen des Uterotrophen Assays (TV III).

*kennzeichnet signifikante Unterschiede zur OVX-Kontrolle innerhalb der gleichen Diät, + kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den Diäten mit $p \leq 0,05$ (indiziert als Linie), Kruskal-Wallis H-Test gefolgt von Mann-Whitney U-Test.

Die Epithelhöhen von Uterus und Vagina als zusätzliche estrogene Parameter wurden ebenfalls untersucht. Die Uterusepithelhöhe (Abb. 39A) zeigte, wie in dem UWW bereits gesehen, einen von der Diät unabhängigen signifikanten Anstieg durch die E2-Behandlung. Innerhalb der OVX Gruppen zeigte sich, dass die UEH bei der IRD LF im Vergleich zur IDD LF signifikant erhöht war. In den E2-behandelten Tieren war die UEH in der IRD HF

verglichen zur IDD HF signifikant erhöht. Die Vaginaepithelhöhe (Abb. 39B) zeigte innerhalb der OVX und E2 Gruppen keinerlei Unterschiede. Die Behandlung mit E2 führte zu einer signifikanten Erhöhung des Vaginaepithels.

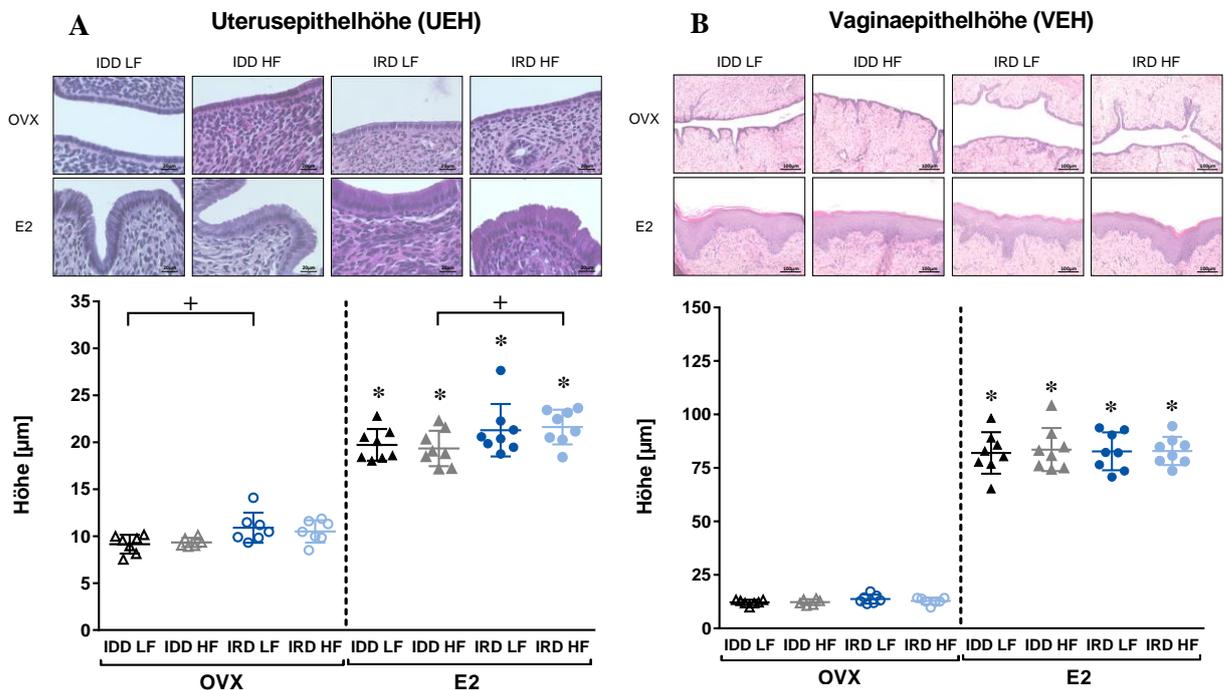


Abbildung 39: Der Einfluss von diätetischem Fett in Kombination einer lebenslangen Isoflavonaufnahme auf die Estrogensensitivität von Uterus und Vagina in ovariectomierten Tieren im Rahmen des Uterotrophen Assays (TV III).

Dargestellt sind die UEH (A) und VEH (B) mit repräsentativen Bildern von 7µm HE gefärbten Paraffinschnitten, aufgenommen in 400x bzw. 100x Vergrößerung *kennzeichnet signifikante Unterschiede zur OVX-Kontrolle innerhalb der gleichen Diät, + kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den Diäten mit $p \leq 0,05$ (indiziert als Linie), Kruskal-Wallis H-Test gefolgt von Mann-Whitney U-Test.

5.3.4.2 Die Estrogensensitivität der Brustdrüse (PCNA)

Für die Beantwortung der Frage, inwieweit mit der Nahrung aufgenommenes Fett die Estrogensensitivität der Brustdrüse beeinflusst, wurde die Expression von PCNA analysiert. In Abbildung 40 ist die Expression relativ zur OVX Gruppe dargestellt. Betrachtet man die Ansprechbarkeit der Epithelzellen der Brust auf den gesetzten estrogenen Stimulus (E2-Behandlung) im Rahmen des durchgeführten Uterotrophen Assays, dann führte dieser zu einer signifikanten Induktion der Proliferation im Brustgewebe in allen Gruppen unabhängig von der Diät und der Intervention. Im Diätvergleich wurde deutlich, dass Tiere die lebenslang Isoflavone (IRD) erhielten, eine verringerte estrogenere Responsivität aufwiesen unabhängig von der Fettintervention. Dies zeigte sich in einer 68% verringerten Expression von PCNA für die IRD LF verglichen mit IDD LF und einer 51% verringerten PCNA-Expression der IRD HF bezogen auf IDD HF. Die Intervention mit Nahrungsfett zeigte demnach keinen Effekt auf die Expression von PCNA. Zusammenfassend kann man feststellen, dass diätetisches

Nahrungsfett keinen Einfluss auf die Estrogensensitivität der Brustdrüse hat, jedoch die lebenslange Isoflavonaufnahme.

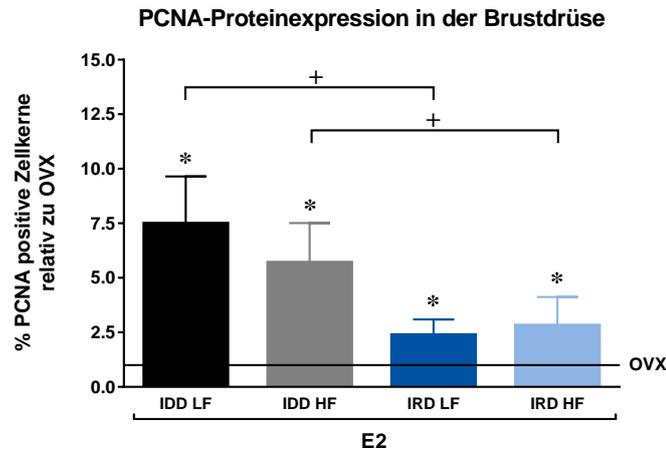


Abbildung 40: Die Proteinexpression des estrogenregulierten Marker Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen (PCNA) in der Brustdrüse nach einer lebenslangen Isoflavonexposition in Kombination mit diätetischem Fett von ovariectomierten Tieren im Rahmen des Uterotrophen Assays (TV III). Dargestellt ist die quantitative Auswertung in % positiver Zellkerne relativ zur OVX-Kontrolle (schwarze Linie) der immunhistochemischen Färbung von PCNA. *kennzeichnet signifikante Unterschiede zur OVX-Kontrolle innerhalb der gleichen Diät, + kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den Diäten mit $p \leq 0,05$ (indiziert als Linie), Kruskal-Wallis H-Test gefolgt von Mann-Whitney U-Test.

6 Diskussion

6.1 Dosisabhängige Effekte einer lebenslangen IF-Exposition auf die Entwicklung in der weiblichen Wistar Ratte

Epidemiologische Studien in Asiatinnen zeigten, dass ein erhöhter Sojakonsum mit einem verringerten Brustkrebsrisiko verbunden ist (Wu et al., 2008; Nagata et al., 2014). Jedoch werden auch adverse Effekte auf die Gesundheit beim Mensch und Nager diskutiert (Patisaul and Jefferson, 2010). Es bleibt demnach die Frage offen, inwiefern eine kontinuierliche sojareiche Ernährung einen gesundheitlichen Nutzen aufweist. Aufgrund der beschriebenen chemopräventiven Effekte einer lebenslangen Isoflavonexposition über die Nahrung auf bspw. die Brustdrüse wurden im Rahmen dieser Arbeit physiologische und histologische Parameter erhoben. Im Folgenden soll der gesundheitliche Nutzen von Sojaisoflavonen diskutiert werden.

6.1.1 Dosiswahl und Exposition

Studien belegen, dass die chemopräventive Wirkung von Isoflavonen nur dann zu Stande kommt, wenn die Exposition bereits vor der Pubertät stattfindet. Hierbei findet ein sogenanntes „imprinting“ statt, welches mit einer Vielzahl an positiven Wirkungen auf bspw. die Brustdrüse beschrieben wurde (Lamartiniere, 2002; Lamartiniere et al., 2002; Brown et al., 2010). Daher wurde in dem ersten Tierversuch (TV I) ein generationsübergreifender Langzeitfütterversuch unter Verwendung von drei verschiedenen Isoflavonkonzentrationen durchgeführt. Die Exposition mit den drei Diäten erfolgte bereits während der Verpaarung über den gesamten Zeitraum der Schwangerschaft und des Stillens der Muttertiere. Studien belegen, dass die embryonale bzw. fötale Exposition mit Isoflavonen entscheidende Einflüsse auf die Entwicklung und Differenzierung des Organismus nimmt (Patisaul and Jefferson, 2010; Kim and Park, 2012). Weiterhin wurde gezeigt, dass Isoflavone die Plazentaschranke überwinden können und so Feten bereits *in utero* über die Ernährung der Mutter mit Isoflavonen exponiert werden (Kim and Park, 2012). Auch können Isoflavone über die Muttermilch von den Nachkommen aufgenommen werden, was zu Veränderungen in der Entwicklung der Tiere führen kann (Franke and Custer, 1996; Doerge et al., 2006). So zeigte Wang et al. in einer Studie von 2011, dass Veränderungen im Proteom der Brustdrüse von 21 und 50 Tage alten Ratten stattfinden, wenn diese von Müttern gestillt werden, die eine 250 ppm Genistein angereicherte Diät erhielten (Wang et al., 2011).

Die drei unterschiedlichen Isoflavonkonzentrationen erlauben die Einteilung in verschiedene Expositionsszenarien. Die Kontrolldiät (IDD) enthielt nur vernachlässigbar geringe Mengen an Isoflavonen (3,5 mg/kg Futter) und erreichte eine Gesamt-IF-Exposition von 0,3 mg/kg KGW/d in der Ratte. Sie stellt damit eine klassisch westliche Ernährungsweise dar, bei der die tägliche IF-Aufnahme bei < 1 mg bis wenige mg/d liegt (Setchell and Cassidy, 1999) und nur sehr geringe Plasmakonzentrationen von bis zu 33 nM erreicht werden (Morton et al., 2002). Für die Simulation einer asiatischen Ernährungsweise wurde der isoflavonarmen Kontrolldiät (IDD) der Sojaextrakt Novasoy650[®] in zwei unterschiedlichen Konzentrationen beigemischt (siehe Kapitel 3.4.2). Die Konzentrationen wurden auf Grundlage der unterschiedlich hohen Isoflavonaufnahmen in der asiatischen Population ausgewählt. Messina et al. dokumentierte eine durchschnittliche Isoflavonmenge von 25-50 mg/d in Japan, zeigte aber auch dass ein Teil der Population auch mehr als 100 mg/d aufnehmen kann (Messina et al., 2006b). Die Isoflavonaufnahme innerhalb der asiatischen Population unterliegt individuellen Schwankungen und erklärt möglicherweise die heterogene Datenlage. Durch allometrische Umwandlung von der Ratte auf den Menschen (Schneider et al., 2004) ergibt sich aus einer IF-Aufnahme von angenommenen 100 mg/d für ein 7-8 jähriges Mädchen mit 25 kg eine IF-Aufnahme von 4 mg/kg KGW/d und für eine erwachsene Frau (60 kg) 1,67 mg/kg KGW/d. Die IRD50 spiegelte mit einer IF-Aufnahmemenge von 5,5 mg/kg/d in der Ratte (siehe Tab. 10) und der sich daraus ergebenden humanen Aufnahmemenge von 0,89 mg/kg/d (tägliche Gesamt-IF-Aufnahme von 53,4 mg/d), die traditionell asiatische Ernährung mit einer mittleren Aufnahme von Sojaprodukten wieder. Die IRD400 mit einer Isoflavonaufnahme von 40,2 mg/kg/d in der Ratte (siehe Tab. 10) liegt mit einer IF-Aufnahmemenge von 6,5 mg/kg/d in der erwachsenen Frau deutlich höher. Die Wahl der zwei unterschiedlichen Isoflavondosen in dieser Studie erlaubt uns die Untersuchung von dosisabhängigen Effekten innerhalb einer asiatischen Ernährungssituation.

Für die Validierung der diätetischen Isoflavonaufnahme wurden am Ende der Studie die Plasma-Isoflavonspiegel gemessen. Die lebenslange Gabe von Isoflavonen führte zu erhöhten Plasmakonzentrationen, die die Isoflavongehalte im Futter und damit verbunden die dosisabhängige IF-Aufnahme der Tiere widerspiegeln. Am Beispiel der 80 Tage alten intakten Tiere lag bei der IRD400 die Konzentration bei 3159 ± 1238 nM (IF-Aglykon-Äquivalent) und damit um das 10-fache höher als bei Tieren der IRD50 mit 307 ± 125 nM (siehe Anhang, Tab. A1). Die Plasmaspiegel sind vergleichbar zu vorangegangenen Studien. Hier führte eine Isoflavondiät mit 520 ppm zu mittleren Serumspiegeln von 3,32 μ M in der

Ratte (Molzberger et al., 2012). Eine Humanstudie von Yamamoto zeigte, dass die mittlere Aufnahme von Genistein und Daidzein in Japan bei 49,7 mg/d liegt und Plasmakonzentrationen von ~ 600 nM erreicht werden können (Yamamoto et al., 2001). In einer aktuellen Interventionsstudie mit postmenopausalen Frauen konnten nach Aufnahme von Sojaprodukten mit einem Isoflavongehalt von 48 mg/d für 4 Wochen Plasmakonzentrationen von 1300±800 nM in nicht-Equolbildnern und 2160±1480 nM in Equolbildner gemessen werden. Eine 8-wöchige Aufnahme eines Isoflavon-NEM mit ~ 100 mg/d (Daidzein und Genistein) führte zu Plasmakonzentrationen von 2650±1480 nM in nicht-Equolbildnern (van der Velpen et al., 2014). Die Plasmakonzentrationen der Tiere aus dem Uterotrophen Assay der vorliegenden Studie, lagen mit 396±212 nM und 239±56 nM (OVX bzw. E2) für die IRD50 und mit 2086±871 nM und 2151±1206 nM (OVX bzw. E2) für die IRD400 in vergleichbaren Bereichen (siehe Anhang, Tab. A2). Die aufgeführten Studien zeigen deutlich, dass über eine diätetische Aufnahme von Isoflavonen in der Ratte vergleichbare Plasmakonzentrationen erreicht werden können.

Die Übertragbarkeit der tierexperimentell erhobenen Daten, der Dosis und der Expositionsszenarien auf den Menschen sind jedoch von einer Vielzahl von Faktoren abhängig. Hierbei spielen anatomische als auch physiologische Speziesunterschiede eine Rolle. Hierzu zählen die unterschiedliche Fähigkeit zur Equolproduktion und die Beschaffenheit des Verdauungstraktes bei Mensch und Ratte. So ist die relative Absorptionsfläche des Dickdarms um das ca. 4-fache größer bei der Ratte als bei Menschen (DeSesso and Jacobson, 2001). Auch die Bakterienanzahl und -art unterscheiden sich zwischen den Spezies, was eine erhebliche Rolle bei der Metabolisierung von diätetischen Isoflavonen spielt (Granger et al., 1985). Ratten sind im Gegensatz zum Menschen vollständige Equolbilder. In der vorliegenden Studie, konnte Equol in Form des 7-Glucuronides in dosisabhängigerweise in allen Tieren der IRD Gruppen nachgewiesen werden (siehe Anhang, Tab. A1 und A2). Dies muss bei der Bewertung von biologischen Effekten in Betracht gezogen werden, da Equol eine stärkere estrogene Aktivität als Daidzein und bindet mit größerer Affinität als Daidzein an die humanen ER α und ER β (Sathyamoorthy and Wang, 1997; Breinholt and Larsen, 1998; Morito et al., 2001; Muthyala et al., 2004) und damit biologisch aktiver ist (Atkinson et al., 2005; Lampe, 2009). Hinzu kommt die höhere Transitzeit der Nahrung von 48-96 h beim Menschen (Granger et al., 1985) versus 15 h bei der Ratte (Enck et al., 1989), was zu einer schnelleren Aufnahme von bioaktiven Substanzen in der Ratte führt. Auch weisen Ratten einen höheren Metabolismus und eine höhere *turnover* Rate auf, die zu höheren Isoflavonplasmaspiegeln führen als beim Menschen.

Einen weiteren wichtigen Aspekt stellt die Vergleichbarkeit der Aufnahmemengen in Humanstudien dar. Oft sind die am Menschen erhobenen Daten nicht auf das Körpergewicht der Probanden normiert, woraus sich eine deutlich niedrigere Exposition für den Menschen aufgrund der stark unterschiedlichen Körpergewichte ergibt. Diese Faktoren sind bei der Bewertung von wissenschaftlichen Ergebnissen zu berücksichtigen.

6.1.2 Pubertät und Zyklus

Aufgrund der in der Literatur beschriebenen Eigenschaft der Isoflavone als endokrine Disruptoren wirken sie zu können (Newbold et al., 2001; Vollmer et al., 2002; Jefferson et al., 2007), stehen sie im Zusammenhang, nachteilige Effekte auf das Reproduktionssystem auszuüben (Wuttke et al., 2007; Kim and Park, 2012; Jefferson et al., 2012). Für die Bestimmung der biologischen Wirksamkeit des verwendeten Sojaisoflavonextraktes Novasoy650[®] und der Überprüfung einer möglichen veränderten Entwicklung der Tiere wurden die Entwicklungsparameter vaginal opening (VO) und die Zykluslänge bestimmt. Das VO gilt als valider Parameter für den Pubertätsbeginn im Nager (Ojeda et al., 1976). Durch den Anstieg der endogenen Estrogenkonzentration kommt es zu apoptotischen Prozessen in den Mukosazellen der Vagina, was in der Folge zur Öffnung dieser führt (Rodriguez et al., 1997). *In vivo* Studien an Ratten und Mäusen zeigten, dass eine frühe Exposition mit Isoflavonen zu einem verfrühten Eintritt in die Pubertät führt (Casanova et al., 1999; Takashima-Sasaki et al., 2006; Guerrero-Bosagna et al., 2008; Delclos et al., 2009). Eine frühe Menarche, die durch das VO indiziert ist, gehört zu den Risikofaktoren bei der Brustkrebsentstehung (Golub et al., 2008). Der in der vorliegenden Studie verfrühte Pubertätseintritt um ~ 1,5 d durch beide IRDs (Abb.18) spricht für die estrogenische Wirkung des verwendeten Extraktes und der darin enthaltenen Isoflavone und stellt einen unerwünschten Nebeneffekt als Folge der lebenslangen Isoflavonexposition dar. Ergebnisse aus der ALSPC Studie zeigten in Mädchen ein um 0,4 Jahre früheres Menarchealter durch eine frühe Sojaexposition (Adgent et al., 2012). Ein möglicher Mechanismus für die Modulation des Pubertätseintrittes könnte die verfrühte Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Ovar-Achse sein. Faber und Hughes zeigten, dass eine Gabe von Genistein zu einer erhöhten Sensitivität der Hypophyse auf GnRH führt (Faber and Hughes, 1993; Lewis et al., 2003). Die mögliche disruptive Wirkung von Isoflavonen auf die Hypothalamus-Hypophysen-Ovar-Achse kann sich neben der Geschlechtsreife auch auf den Zyklusverlauf auswirken. Eine Reihe von Studien zeigten, dass die neonatale Exposition mit Genistein zu unregelmäßigen Zyklen im Nager führt (Jefferson et al., 2005; Kouki et al., 2003) und die Ovulation beeinflusst (Lewis et al., 2003). Dass Isoflavone in dosisabhängigerweise Einfluss auf die

Entwicklung im weiblichen Tier nehmen, konnte bereits in einer vorangegangenen Studie gezeigt werden. Durch die Aufnahme von einem isoflavonreichen Futter mit 297 ppm Gesamtisoflavon, eine Dosis die zwischen der IRD50 und der IRD400 liegt, konnte sowohl ein verfrühter Pubertätseintritt, als auch ein um 0,6 Tage verkürzter Zyklus beobachtet werden (Molzberger et al., 2013). Aus den Ergebnissen der vorliegenden Studie zeigte sich in der Ratte nur bei der hohen Isoflavondosis von 506 ppm (IRD400) ein signifikant verkürzter Zyklus um ca. 1,5 Tage (Abb. 19A). Bei der niedrigeren Dosis von 69 ppm (IRD50) konnte dies nicht beobachtet werden, was auf einen dosisabhängigen Effekt seitens der Isoflavone schließen lässt.

In der Humansituation, wird ein verlängerter Menstruationszyklus, wie er auch bei asiatischen Frauen beobachtet werden kann (Wu et al., 1996b), aufgrund der sich daraus ergebenden verkürzten Lebenszeitexposition mit Estradiol mit einem verringerten Brustkrebsrisiko in Verbindung gebracht (Henderson et al., 1985). In einer Humanstudie von Cassidy et al. konnte in 6 premenopausalen Frauen gezeigt werden, dass die tägliche Aufnahme von 60 mg Sojaprotein (45 mg Isoflavone) für einen Monat zu einer Verlängerung der Follikelphase und einer Unterdrückung des ovulatorischen LH Anstieges führte (Cassidy et al., 1994). Eine Metaanalyse von 47 Studien fand ebenfalls eine Verlängerung des Menstruationszyklus von 1,05 Tagen durch die Aufnahme von Sojaprotein und Isoflavonen (Hooper et al., 2009). Eine längere Verweildauer in der Follikelphase, die in etwa der Estrusphase in der Ratte entspricht, steht ebenfalls in Zusammenhang mit einem verringerten Brustkrebsrisiko (Cassidy et al., 1994). Interessanterweise konnte in beiden Diäten (IRD50 und IRD400) eine längere Estrusphase beobachtet werden (Abb. 19B) und kann möglicherweise auf die in der Literatur beschriebene Wirkung von Genistein zurückgeführt werden. Dies steht im Gegensatz zu den oben erwähnten Ergebnissen der Zykluslänge und zeigt die Komplexität der Wirkung von Isoflavonen auf. Auch scheint die Übertragbarkeit tierexperimentell erhobener Daten der Ratte auf den Menschen schwierig, da die Hormonspiegel in der Ratte von dem Menstruationszyklus in der Frau abweichen. Zur genaueren Untersuchung würde sich die Aufnahme des Hormonprofiles der Gonadotropine LH und FSH, von GnRH und auch von E2 und P4 empfehlen, um ein genaues Verständnis der Prozesse zu erhalten. Weiterhin sollte die Zyklusbestimmung in einem engeren Beobachtungsfenster von 6-8h, statt alle 24h erfolgen, um eine bessere Auflösung der Zyklusphasen zu erreichen.

6.1.3 Dosisabhängige Effekte auf nicht-klassisch estrogensensitive Gewebe

Isoflavone stehen aufgrund ihrer estrogenen Wirkung in Zusammenhang mit positiven Effekten auf den Fettstoffwechsel (Medjakovic et al., 2010; Patel and Barnes, 2010; Xiao et al., 2014). Daher wurden die viszerale Fettmasse, die Adipozytengröße und das Körpergewicht bestimmt. Ein erhöhtes Körpergewicht verbunden mit einem erhöhten BMI steht in Zusammenhang mit einem gesteigerten Risiko für das metabolischen Syndrom und kardiovaskulären Erkrankungen (Yusuf et al., 2005). Asiatische Frauen haben ein geringeres Risiko an dem metabolischen Syndrom zu erkranken. So konnte eine Studie von 2012 einen klaren Unterschied im Körpergewicht von asiatischen Frauen im Vergleich zu britischen Frauen zeigen (Wells et al., 2012). In der vorliegenden Studie konnte durch die Aufnahme einer asiatisch angelehnten Isoflavonexposition (IRD50) ein verringertes Körpergewicht in 80 Tage alten intakten Tieren beobachtet werden (Abb. 20A) und deckt sich mit den Daten aus der Studie von Wells et al. 2012. In Mäusen konnte durch die Gabe von 25 µg/kg/d Genistein über das Trinkwasser ebenfalls ein vermindertes Körpergewicht beobachtet werden (Kyselova et al., 2004). Die viszerale Fettmasse (Abb. 20C) unterstützt die Daten aus dem Körpergewicht der intakten Tiere und zeigt deutlich eine Korrelation zwischen dem Körpergewicht und der viszeralen Fettmasse. Bestärkt wird dies durch die Analyse der Adipozytengröße, hier führte eine erhöhte Aufnahme an Isoflavonen zu einer tendenziell verringerten Fettzellgröße (Abb. 20D) mit steigendem Isoflavongehalt und spricht für einen anti-lipogenen Effekt. So zeigte eine Studie von Naaz et al., dass Genistein *in vivo* inhibitorisch auf das Fettgewebe wirkt und eine dosisabhängige Reduktion der Adipozytengröße in C75/BL6 Mäusen bewirkt (Naaz et al., 2003). Kim et al. konnten erstmals *in vivo* zeigen, dass der Genistein-induzierte Körpergewichtsverlust, bei einer Dosis von 1500 mg/kg Genistein, durch Apoptoseprozesse im Fettgewebe und einer verstärkten Lipolyse einhergeht (Kim et al., 2006) und stellten damit den Zusammenhang zwischen dem Körpergewicht und der viszeralen Fettmasse dar. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine lebenslange Isoflavonexposition in intakten Tieren einen nur geringen Einfluss auf die physiologischen Parameter zeigte, es jedoch Hinweise auf mögliche präventive Effekte bezüglich des Fettstoffwechsels gibt.

In der Menopause kommt es in Folge der abfallenden endogenen Estrogenproduktion zu einer veränderten Körperzusammensetzung, bei der der Körperfettanteil steigt und in Folge dessen das Körpergewicht (Ley et al., 1992; Toth et al., 2000; Davis et al., 2012). Studien aus der eigenen Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass eine Ovarektomie zu einem erhöhten viszeralen

Fettmasse führt und eine Langzeit-Estrogensubstitution dem entgegenwirken kann (Zoth et al., 2010; Weigt et al., 2012). In TV I zeigte sich in dem durchgeführten Uterotrophen Assay kein Unterschied zwischen den OVX und E2 Gruppen im Körpergewicht und im Fettgewebe (Abb. 23), was auf den kurzen Behandlungszeitraum von 3 Tagen zurückzuführen ist. Eine Adaptation des Fettgewebes benötigt demnach einen längeren und kontinuierlicheren Stimulus. In den E2 behandelten Tieren konnte, wie in den intakten Tieren, eine Abnahme des Körpergewichtes und der viszeralen Fettmasse durch einen steigenden Isoflavongehalt der Diät gezeigt werden (Abb. 23A und 23C). Gleiches ließ sich für die Adipozytengröße (Abb. 23D) beobachten und ist auf den möglichen anti-lipogenen Effekt von Genistein zurückzuführen. Die reduzierte Fettmasse und Adipozytengröße lassen auf eine veränderte Körperzusammensetzung schließen. Studien aus der eigenen Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass eine genisteinangereicherte Diät mit 700 ppm zu einer verringerten Lipogenese in der Leber und im Muskel führt (Weigt et al., 2013) und die *s.c.* Gabe von 10 mg/kg/d Genistein zu einer erhöhten Proteinsynthese im Skelettmuskel führt (Velders et al., 2012). Vermutlich führt die hohe Exposition mit Isoflavonen (IRD400) zu einer verminderten Fettzunahme nach der Ovariectomie während des *hormonal decline*, was sich in dem Körpergewichtsverlauf-Diagramm erkennen lässt (Abb. 23B). Hier lagen die Körpergewichte der Tiere der IRD400 ab dem PND80 deutlich unter den der anderen Tiere und konnten den durch die Ovariectomie erlittenen Körpergewichtsabfall nicht mehr aufholen. Dies lässt den Schluss zu, dass eine isoflavonreiche Diät präventiv der postmenopausalen Adipositas entgegenwirken kann und damit eine mögliche therapeutische Maßnahme in Zukunft darstellen könnte.

6.1.4 Dosisabhängige Effekte auf klassisch estrogensensitive Gewebe

Das Uterusfeuchtgewicht (UWW) und die Epithelhöhen des Uterus (UEH) und der Vagina (VEH) stellen klassische Parameter für die Analyse der Estrogenität von Untersuchungssubstanzen dar (Diel et al., 2004a, 2006). Im intakten Tier, was in etwa der premenopausalen Frau entspricht, zeigten sich keine nachteiligen Effekte auf die untersuchten Parameter im Reproduktionstrakt. Die Parameter UWW, UEH und VEH dienten hierbei als estrogensensitive Marker und zeigten keine Unterschiede hinsichtlich der Isoflavonexposition (Abb. 21), was für ein schwaches estrogenes Potential der IRD spricht. Dies deckt sich mit vorherigen Studien aus der eigenen Arbeitsgruppe. Molzberger et al. konnten keinen Einfluss einer IRD mit 520 ppm und 297 ppm Isoflavon auf das UWW in intakten 80 Tage alten Tieren feststellen (Molzberger et al., 2012, 2013) und auch Hertrampf et al. konnten keinen Unterschied im UWW und in den Epithelhöhen des Uterus und Vagina durch eine Isoflavondiät mit 472 ppm (232µg/g Dai und 240µg/g Gen) feststellen (Hertrampf et al.,

2009). Es ist anzumerken, dass das Ausmaß der Streuung der Einzelwerte innerhalb der Gruppen sehr unterschiedlich ist und dies in Zusammenhang mit den unterschiedlichen Zyklusphasen zum Zeitpunkt der Sektion stehen könnte. So unterliegt der Uterus starken Umbauprozessen innerhalb des Zyklus und das Uterusgewicht und die Epithelhöhen von Uterus und Vagina unterliegen demnach diesen zyklischen Schwankungen (Silbernagel and Despopoulos, 2012). Es kann daher keine definitive Aussage bezüglich der Wirkung von Isoflavonen im intakten Tier auf diese Parameter getroffen werden. Zu berücksichtigen ist hier, dass die Wirkung der Isoflavone sowohl von der eigenen Konzentration als auch von der vorliegenden Estrogenkonzentration abhängig ist (Hwang et al., 2006; Kim and Park, 2012). Möglicherweise konkurrieren die Isoflavone mit dem endogenen Estrogen um die Bindungsstellen des ER. Estrogene haben eine höhere Affinität zu ihrem Rezeptor als die Isoflavone (Kuiper et al., 1998), so dass estrogene Effekte seitens der Isoflavone eventuell nicht zu Stande kommen können, wenn die Rezeptorbindungsstellen bereits durch das endogen vorliegende Estrogen blockiert werden. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass dies neben der Rezeptoranzahl des jeweiligen Gewebes auch von den Konzentrationsverhältnissen der Substanzen abhängig ist. Interessanterweise konnte im Ovargewicht ein Einfluss durch die Isoflavondiät beobachtet werden. In der IRD50 Gruppe zeigte sich ein signifikant erhöhtes Ovargewicht verglichen zur isoflavonfreien Kontrolldiät IDD und zu der hohen Isoflavondiät IRD400. Dorward et al. konnten bei einer verabreichten Dosis von 250 µg/g Isoflavonen in weiblichen Mäusen (je 125 µg/g Dai und Gen) ebenfalls eine generelle Stimulation des ovariellen Wachstums durch Isoflavone zeigen (Dorward et al., 2007). Liu et al. zeigten, dass Isoflavone das ovarielle Wachstum und die Follikulogenese in der Ratte induzieren, was in einem erhöhten Ovargewicht, einer erhöhten preantralen Follikelgröße und einer erhöhten PCNA-Expression zu sehen war (Liu et al., 2008). Mögliche Mechanismen sind jedoch derzeit noch unzureichend untersucht.

Im Fokus dieser Arbeit stand die Untersuchung einer lebenslangen dosisabhängigen Isoflavonexposition auf die Estrogensensitivität im ovariectomierten Tier. Hierfür wurde ein Uterotropher Assay im ovariectomierten Tier durchgeführt (Odum et al., 1997). Anhand dessen, kann der estrogene Einfluss von den Isoflavonen auf die estrogenen Zielgewebe des Uterus und der Vagina untersucht werden (Diel et al., 2002, 2004b). Hierbei kommt es in Folge des gesetzten estrogenen Stimulus durch die dreitägige E2-Behandlung mit 4µg/kg E2 zu einer Induktion des Uterusfeuchtgewichtes unabhängig von der Diät (Abb. 25). Nach 2-6 h folgt aufgrund der erhöhten Permeabilität der Zellen eine erhöhte Wassereinlagerung in das

uterine Gewebe und zeitlich versetzt die Induktion der Zellproliferation, die zusammen zu einem erhöhten UWW führen (Hewitt et al., 2003). Auch zeigten sich die UEH und VEH erhöht, was durch den estrogenen Stimulus bewirkt wird. Das Tiermodell der ovariectomierten Ratte dient der Nachahmung der in der Menopause vorherrschenden Estrogenmangel. Damit stellt es ein wichtiges Modell für die Beurteilung der biologischen Wirksamkeit der Isoflavone in der postmenopausalen Frau dar, da die Hauptzielgruppe der isoflavonhaltigen NEM Frauen in den Wechseljahren sind. In den Tieren ohne eigene Estrogenproduktion (OVX) zeigte sich kein Effekt auf das UWW durch die Isoflavondiät (Abb. 25). Durch die Verabreichung des exogenen Stimulus zeigte sich in den E2-behandelten Tieren (E2) ein tendenzieller Anstieg mit steigendem Isoflavongehalt. Beides konnte in der Studie mit 297 ppm von Molzberger et al. beobachtet werden (Molzberger et al., 2013). Die Ergebnisse des Uterotrophes Assay geben Hinweis darauf, dass die Estrogenresponsivität des Uterus durch eine lebenslange Substitution mit Isoflavonen in hohen Dosen beeinflusst ist. In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass eine lebenslange Isoflavongabe über die Nahrung zu einer erhöhten Estrogensensitivität im Uterus von adulten Ratten führt, was sich in einem erhöhten UWW zeigte und auf eine ER α -vermittelte Wirkung zurückzuführen werden konnte (Möller et al., 2010). Es ist bekannt, dass der ER α eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der proliferativen Effekte im Uterus spielt und die uterine Proliferation unter der Kontrolle von Estrogenen steht (Kuiper et al., 1997; Diel et al., 2006; Gruber et al., 2002). Jedoch spielen auch nicht-proliferative Prozesse, wie eine erhöhte luminale Wassereinspeicherung eine entscheidende Rolle bei der Induktion des UWW und der UEH (Diel et al., 2006). So spielen die spezifischen estrogenregulierten Membranproteine der Familie der Aquaporine eine Rolle bei der erhöhten Wasseraufnahme in das Gewebe, das wiederum zu einer erhöhten UWW führt (Cullinan-Bove and Koos, 1993; Jablonski et al., 2003; Möller et al., 2010). In der UEH zeigte sich die erhöhte Responsivität jedoch nicht. Es folgte zwar eine Induktion der Epithelhöhe durch die E2-Behandlung, jedoch zeigte sich eine leichte Abnahme der UEH in Folge der Exposition mit der IRD400 (Abb. 26A). Interessanterweise konnten Möller et al. ebenfalls zeigen, dass Tiere unter einer isoflavonreichen Diät eine geringere Estrogenresponsivität des Uterusepithels aufwiesen (Möller et al., 2010). Möglicherweise ist die plastische Adaptation der UEH begrenzt und die diätvermittelten Effekte werden durch die starke E2-Stimulation überlagert. Zusätzlich wurde die VEH gemessen, da sie als sensitiverer Parameter bei der Beurteilung der Estrogenität gilt (Diel et al., 2004a). Die Analyse der VEH in dem durchgeführten Uterotrophes Assay ergab eine leichte Zunahme dieser in den E2-behandelten Tieren der IRD400- Futtergruppe (Abb. 26B).

Dies unterstützt die Daten des Uterus und die These, dass die Estrogensensitivität im Uterus und der Vagina durch eine lebenslange Isoflavongabe moduliert ist.

Abschließend kann festgestellt werden, dass bei einer lebenslangen Isoflavonaufnahme von 506 ppm (IRD400) die Estrogensensitivität in Uterus und Vagina tendenziell steigt, dies jedoch nicht für die geringere Isoflavondosis (IRD50) mit einer Aufnahmemenge von 69 ppm zutrifft. Dies ist kritisch zu beobachten, da es die Vermutung zulässt, dass eine sehr hohe Isoflavonaufnahme, zu einer zusätzlichen Estrogenstimulation führen kann, die wiederum mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung von endokrinen Tumoren wie bspw. dem Endometriuskarzinom in Zusammenhang steht. Wie jedoch Messina et al. zeigen konnten, erreichen nur 10% der asiatischen Bevölkerung Isoflavondosen von über 100 mg/d (Messina et al., 2006b). Die niedrige Isoflavondosis (IRD50) zeigte keine nachteiligen Effekte auf den Reproduktionstrakt, so dass nach vorliegenden Ergebnissen ein moderater Sojaverzehr keinen Risikofaktor darstellt und nur für ein schwach estrogenes Potential der Isoflavone spricht.

6.1.5 Dosisabhängige Effekte auf die Brustdrüse

Das rund dreifach geringere Risiko von Asiatinnen an Brustkrebs zu erkranken wird epidemiologisch auf die traditionell asiatische Ernährungsweise mit einem erhöhten Sojaisoflavonkonsum zurückgeführt (Wu et al., 1998, 2008; Yamamoto et al., 2003; Nagata et al., 2014). In der vorliegenden Studie wurde aufgrund dieser Tatsache die lebenslange Exposition mit Isoflavonen auf die Brustdrüse untersucht. Sowohl im Nager (Shyamala, 1999; Shyamala et al., 1999) als auch im Menschen (Russo and Russo, 2004) konnte gezeigt werden, dass E2 und P4 bei der normalen Brustentwicklung von entscheidender Bedeutung sind. P4 wird hauptsächlich für die lobuloalveoläre Entwicklung und der Verzweigung benötigt, hingegen E2 die duktale Elongation reguliert. Russo et al. zeigten in humanen Brustproben, dass der ER α und PR-Gehalt in den lobulären Strukturen der Brust direkt proportional zur Proliferationsrate steht (Russo et al., 1999). Der PR stellt zudem ein klassisch estrogenreguliertes Gen dar, dessen Aktivität über die Bindung des ER α an das ERE der PR-Promotorregion reguliert wird (Savouret et al., 1991a).

In intakten 80 Tage alten Weibchen, zeigte sich in der Progesteronrezeptor (PR)- Expression der Brustdrüse kein Unterschied zwischen den Diätgruppen. Dies lässt den Schluss zu, dass Isoflavone im intakten Tier keine zusätzliche estrogene Wirkung auf diesen estrogenabhängigen Parameter ausüben (Abb. 22B) und damit die vorangegangenen Ergebnisse der estrogensensitiven Gewebe der UWW, UEH und der VEH im intakten Tier stützen. So scheinen die Isoflavone eine nur sehr schwache estrogene Wirkung im intakten Tier zu entwickeln, was möglicherweise auf die bereits beschriebene Konkurrenz des endogenen

vorliegenden E2 mit den Isoflavonen zurückzuführen ist. PCNA ist ein nukleäres Protein, dass in proliferierenden Zellen während der S-Phase im Zellzyklus exprimiert wird (Kurki et al., 1986) und unterliegt u.a. dem Einfluss von Estrogenen (Lobenhofer et al., 2002). Die Analyse der Proliferation der Brustdrüse zeigte bei der IRD400-Diät eine niedrigere PCNA-Expression verglichen zur IRD50 (Abb. 22A). Es kann demnach eine eindeutige dosisabhängige Wirkung für die proliferative Ansprechbarkeit der Brustdrüse in der intakten Wistar Ratte belegt werden. Eine hohe Isoflavondosis (IRD400) führt zu einer verringerten Proliferation, was sich bei der niedrigen Dosis nicht beobachten ließ (IRD50). Aus *in vitro* Experimenten ist bekannt, dass sehr hohe Konzentrationen von $> 1 \mu\text{M}$ Genistein zu einer Inhibierung der Proliferation in MCF-7 Zellen, als auch in den ER negativen MDA-MB231 Zellen führen (Wang and Kurzer, 1997; Zava and Duwe, 1997). Zurückgeführt wird dies auf den inhibitorischen Effekt von Genistein auf die Tyrosinkinase (zusammengefasst in Wuttke et al., 2007). Möglicherweise ist die estrogenunabhängige Hemmung der Tyrosinkinase für die reduzierte Proliferation in der Brustdrüse durch die IRD400 verantwortlich.

Für die Untersuchung, ob die Sensitivität der Brustdrüse durch eine lebenslange *in utero* und postnatale Isoflavonexposition beeinflusst ist, wurde ein Uterotropher Assay in ovariectomierten Tieren durchgeführt. Hierbei dienten OVX-Tiere als Modell der Estrogendefizienz, wie sie bei der postmenopausalen Frau zu finden ist, bei der die dreitägige Behandlung mit E2 eine Hormonersatztherapie (HRT) simulierte. Die klassische HRT steht zunehmend in der Diskussion, das Brustkrebsrisiko von postmenopausalen Frauen zu erhöhen (Rossouw et al., 2002; Beral, 2003) und führte in den letzten 20 Jahren zur verstärkten Untersuchung der Isoflavone als mögliche Alternative zur klassischen HRT. Bezogen auf die Proliferation konnte in den OVX-Tieren ohne zusätzliche Stimulation durch E2 eine erhöhte PCNA-Expression durch die IRD50 verglichen zur Kontrolle (IDD) beobachtet werden (Abb. 27A). Die hohe IRD400 Dosis zeigte hingegen einen gegenteiligen Effekt einer verringerten PCNA-Expression. Dieser Effekt konnte bereits in den intakten Tieren beobachtet werden und ist, wie oberhalb diskutiert, aus *in vitro* Studien bekannt.

Für die Stimulation der Zellproliferation in der Brustdrüse wurden die Tiere 3 Tage mit $4\mu\text{g/kg KGW}$ E2 s.c. behandelt. Dies führte wie in vorangegangenen Experimenten (Hertrampf et al., 2006; Molzberger et al., 2012) zu einer Induktion der Proteinexpression von PCNA in allen Diätgruppen. Erneut zeigte sich ein dosisabhängiger Effekt durch die IRD. Interessanterweise führte die IRD400 erneut zu einer signifikant geringeren PCNA-Expression als die IRD50 und die IDD, was für eine verringerte proliferative Antwort der

Brustdrüse auf die Estrogenbehandlung spricht. Diese Daten bestätigen die Ergebnisse aus vorangegangenen Studien, bei denen durch eine diätetische Aufnahme von 520 ppm der gleiche Effekt auf die Brustdrüse beobachtet werden konnte (Molzberger et al., 2012).

Eine mögliche Erklärung für die veränderte Ansprechbarkeit könnte die veränderte Brustdrüsenentwicklung durch Isoflavone in der prepubertären Phase sein. Eine frühe Exposition mit Isoflavonen kann zu einer veränderten Brustdrüsenentwicklung führen (Limer and Speirs, 2004; Warri et al., 2008; Messina and Hilakivi-Clarke, 2009; Jenkins et al., 2012). Es konnte gezeigt werden, dass eine lebenslange prepubertäre Gabe von Genistein zu einer verstärkten Epithelzellendifferenzierung der Brustdrüse führt, eine verringerte Anzahl an TEBs und eine erhöhte Differenzierung von lobuloalveolären Strukturen auslöst (Hilakivi-Clarke et al., 1999b; Lamartiniere et al., 2002; Thomsen, 2006). Diese Veränderungen stehen in Zusammenhang mit einer veränderten proliferativen Aktivität im adulten Tier (Cabanes et al., 2004; Lamartiniere, 2002; Warri et al., 2008). Damit könnte über eine veränderte Zellularität der Brustdrüse die verringerte proliferative Antwort durch die IRD400 erklärt werden.

Auch die Estrogensensitivität (PR-Expression) der Brustdrüse ist maßgeblich von den Isoflavonen beeinflusst. Der PR (Abb. 27B) stellt einen validen estrogensensitiven Marker dar (Mangal et al., 1997; Tibbetts et al., 1998; Diel et al., 2004b) und ist in gleicher Weise wie PCNA in den E2-behandelten Tieren moduliert. Hierbei führt die IRD400 zu einer stark reduzierten PR-Expression verglichen zur IDD und IRD50. Im Gegensatz dazu, zeigt die IRD50 eine Induktion der PR-Expression, was für eine erhöhte Estrogensensitivität spricht und die Ergebnisse der PCNA-Analyse bestätigt. Weiterhin zeigte sich durch die Ergebnisse aus der Brustdrüse, dass Isoflavone gewebespezifische Antworten auslösen. So zeigten Tiere der IRD50 keinen zusätzlichen estrogenen Effekt durch die Isoflavonexposition auf den Uterus und der Vagina, in der Brust hingegen einen deutlichen estrogenen Effekt.

In den OVX Tieren konnte keinerlei PR-Proteinexpression verzeichnet werden. Durch die Ovariectomie kommt es zum nahezu vollständigen Entzug von E2 und P4, was in Folge zu einem sehr starken Abfall der PR Expression führt (Rimoldi et al., 2007). Zusammenfassend kann für die hohe Isoflavondiät (IRD400) ein protektiver Effekt auf die Brustdrüse abgeleitet werden, der sich in einer verringerten proliferativen Ansprechbarkeit auf einen exogen zugeführten Stimulus auf das Gewebe zeigt (PCNA) und zusätzlich auch eine verringerte Estrogensensitivität (PR). Dies ist in Übereinstimmung mit vorangegangenen Studien, die ebenfalls eine reduzierte Estrogensensitivität in der Brustdrüse durch eine lebenslange isoflavonreiche Diät zeigen konnten (Molzberger et al., 2012, 2013) und untermauert die These, dass eine lebenslange Isoflavondiät protektiv wirken kann und sich damit günstig auf

die Entstehung von Brustkrebs auswirkt. Iwasaki et al. konnten in einer Studie in japanischen Frauen zeigen, dass der Zusammenhang zwischen der Isoflavonaufnahme und dem Brustkrebsrisiko von den Isoflavonkonzentration im Plasma und der Isoflavonform abhängig ist. Für Genistein fand sich eine inverse Korrelation zwischen sehr hohen Plasmakonzentrationen und einem verringerten Brustkrebsrisiko, jedoch nicht für Daidzein (Iwasaki et al., 2008; Iwasaki and Tsugane, 2011). Frauen mit einer Plasmakonzentration im höchsten Quartil (4.) von 1311nM Genistein zeigten ein signifikant niedrigeres Brustkrebsrisiko mit einem Quotenverhältnis (Odds ratio, OR) von 0,49 (korrigierte OR 0,34). Niedrigere Genisteinkonzentrationen von 119 nM (1.Quartil), 400 nM (2.Quartil) oder 707 nM (3.Quartil) konnten dies nicht zeigen (Iwasaki et al., 2008). Die in unseren Tieren gemessenen Plasmagenisteinspiegel der IRD50, die keinen protektiven Effekt auf die Brustdrüse aufzeigte, lag im Mittel über alle drei Gruppen (Intakt, OVX und E2) bei 167 ± 79 nM zwischen dem 1. und 2. Quartil. Hingegen die Plasmaspiegel der IRD400 im Mittel bei $1303,3 \pm 710$ nM (Genistein-Aglykon-Äquivalent) genau in dem Bereich liegen, wie er von asiatischen Frauen erreicht werden kann (4. Quartil von Iwasaki et al.) und in Zusammenhang mit einem verringerten Brustkrebsrisiko steht. Damit bestärkt sich die Theorie, dass die Wirkung von Isoflavonen u.a. entscheidend von der vorliegenden Isoflavonkonzentration im Plasma abhängt. Desweiteren sollte in Betracht gezogen werden, dass eine Ableitung von den vorliegenden Plasmaspiegeln auf die entsprechenden Gewebespiegel nicht herangezogen werden kann, obwohl bekannt ist, dass die vorliegenden Gewebespiegel von bspw. E2 eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von Brustkrebs spielen. Die Messung der Isoflavonspiegel im Brustgewebe und den Brustdrüsen stellt demnach einen wichtigen Ansatzpunkt zukünftiger Untersuchungen dar. Jedoch muss auch hier die Übertragbarkeit von Tierdaten auf den Menschen sorgsam in Betracht gezogen werden.

Mögliche molekulare Mechanismen, die die reduzierte Estrogensensitivität und proliferative Antwort durch die IRD400 erklären könnten sind bis dato nicht vollständig bekannt. Molzberger et al. zeigten in der Genexpressionsanalyse der Brustdrüse, dass die ER α mRNA-Expression in Tieren des Uterotrophen Assay (OVX+E2) die eine IRD mit 520 ppm oder eine mit 700 ppm Genistein angereicherten Diät erhielten erniedrigt ist (Molzberger et al., 2012). Der ER α ist in der Lage den PR zu induzieren (Saji et al., 2000). Umgekehrt müsste die verminderte ER α -Expression, wie bei Molzberger et al. gezeigt, in Folge einer hohen Isoflavonexposition ebenfalls zu einer reduzierten PR-Expression führen, da dieser unter der regulatorischen Kontrolle des ER α steht (Savouret et al., 1991a). Möglicherweise kommt es durch die ebenfalls von Molzberger et al. gezeigte Hochregulation des ER β durch eine

lebenslange IRD (Molzberger et al., 2012) zu einer verringerten ER α Expression, das in Folge zu einer verringerten PR-Expression führt und biologisch zu einer verringerten Estrogensensitivität (PR) und konsequenterweise zu einer verringerten proliferativen Antwort (PCNA) in der Brustdrüse führt. Es ist bekannt, dass der ER β als transdominanter Repressor die Transkriptionsaktivität des ER α inhibieren kann und damit die zelluläre Sensitivität von E2 reduziert, wenn beide Isoformen in der Zelle coexprimiert werden (Cowley und Parker, 1999; Hall und McDonnell, 1999). *In vitro*-Studien konnten zeigen, dass die estrogenstimulierte Proliferation nach der Induktion eines ER β -Expressionsvektors in MCF-7 Zellen (ER α -positiv) reduziert war (Omoto et al., 2003). Bestärkt wird die These, dass Isoflavone eine höhere Bindungsaffinität an den ER β vorweisen (Kuiper et al., 1997, 1998). Der ER β wird durch die Isoflavone stärker aktiviert und supprimiert damit den ER α . Auch zeigten Molzberger et al. in ihrer Studie eine erhöhte Expression des estrogensensitiven Gens pS2 (Molzberger et al., 2012). Es ist beschrieben, dass die Transkription von pS2 von Estrogenen induziert wird (Brown et al., 1984) und von Antiestrogenen in MCF-7 Zellen inhibiert wird (Rajah et al., 1996). Weiterhin konnte in einer Studie in Nacktmäusen mit einem MCF-7-Xenograft für den von uns verwendeten Novasoy Extrakt eine erhöhte pS2 Expression gezeigt werden (Allred et al., 2004a). Die Regulation des pS2 Gens ist auch von epigenetischen Faktoren wie bspw. der Methylierung der Promotorregion abhängig (Martin et al., 1995, 1997). Einige Studien konnten zeigen, dass Isoflavone in der Lage sind epigenetische Veränderungen hervorzurufen (Pudenz et al., 2014) und diese in Zusammenhang mit positiven Effekten auf den Brustkrebs stehen (Guerrero-Bosagna et al., 2008; Li et al., 2009; Molinié and Georgel, 2009). Erst kürzlich veröffentlichte Ergebnisse des Projektverbundes IsoCross konnten zeigen, dass die Exposition mit Isoflavonen zu Methylierungsänderungen in estrogensensitiven Genen in der Brustdrüse führt (Blei et al., 2014). Neben der DNA-Methylierung ist Genistein außerdem in der Lage andere epigenetische Mechanismen wie Histonmodifikationen oder nichtkodierende RNAs zu modulieren (Huang et al., 2011; Gerhauser, 2014; Pudenz et al., 2014). Die Vielzahl an möglichen Mechanismen erfordert weitere Analysen in Zukunft.

Zusammenfassend wirkte sich eine an die asiatische Ernährungsweise angelehnte Exposition mit einer hohen Isoflavonaufnahme (IRD400) in einer verringerten Proliferation in der Brustdrüse im intakten Tier und in den Tieren des Uterotrophen Assay aus. Die Estrogensensitivität (PR-Expression) war in diesen Tieren ebenfalls reduziert, was in der Summe zu möglicherweise protektiven Effekten bzgl. des Brustkrebsrisikos führt. Die

niedrigere Dosis der IRD50 konnte dies nicht vorweisen. Im Gegenteil, hier fand sich eine induzierte Estrogensensitivität in Kombination mit einer erhöhten proliferativen Aktivität in der Brustdrüse. Damit ist ein dosisabhängiger Effekt der Isoflavone in der Brustdrüse der Ratte vorzuweisen. Zukünftig könnten, neben der Vielzahl anderer Risikofaktoren (frühe Menarche, späte Menopause, hohe endogene E2-Spiegel, Nulliparität, erhöhte mammographische Dichte der Brust, Übergewicht etc.) möglicherweise die Isoflavondosis und die Isoflavonplasmaspiegel für die Einschätzung des Brustkrebsrisikos herangezogen werden.

6.2 Der Einfluss des Expositionszeitraumes auf die biologische Wirkung von Isoflavonen im ovariectomierten Tier

Isoflavone werden immer häufiger als „nebenwirkungsfreie“ Alternative zur klassischen HRT beworben und frei über das Internet vertrieben. Immer mehr postmenopausale Frauen greifen auf solche Produkte zurück in der Hoffnung, ihre klimakterischen Beschwerden damit zu lindern. Jedoch stehen die zum Teil stark hochdosierten Isoflavone mit bis zu 150 mg Isoflavon / Kapsel aufgrund ihres estrogenen Wirkpotentials in der Kritik nachteilige Effekte auf die Gesundheit im Menschen auszuüben und darüberhinaus in Verbindung mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko. In diesem Tierversuch stand die Beurteilung der biologischen Wirkung einer kurzzeitigen (akuten) Isoflavongabe im postmenopausalen Tiermodell der ovariectomierten Ratte im Vordergrund. Die Konzentrationen wurden auf Grundlage der angenommenen durchschnittlichen täglichen IF-Aufnahme durch allometrische Umwandlung von der Ratte auf die Exposition auf den Mensch ausgewählt (Schneider et al., 2004). Hierbei spiegelte die verwendete IRD400 eine IF-Aufnahme von 6,5 mg/kg KGW/d wieder, die von postmenopausalen Frauen (60 kg) durch die überdosierte Einnahme von Soja-NEMs erreicht werden kann. Sie stellt demnach ein hochdosiertes Expositionsszenario bei der Verwendung von NEM in der Hauptrisikogruppe der postmenopausalen Frau dar, das aber im Extremfall erreicht werden kann.

Auf das Fettgewebe und das damit korrelierende Körpergewicht (Abb. 28) zeigte sich durch die 17-tägige Intervention mit 506 mg/kg Isoflavonen (IRD400) und einer täglichen Aufnahmemenge von 40 mg/kg KGW kein Einfluss. Auch in den estrogen-sensitiven Parametern des UWW (Abb. 29), der UEH und VEH (Abb. 30) konnte kein Einfluss durch den zusätzlichen Isoflavonstimulus beobachtet werden. Die E2 Behandlung am PND 94-97 führte zu einer erwartungsgemäßen Induktion der Parameter, jedoch zu keiner veränderten Responsivität des Gewebes bei Tieren in der IRD400 Futtergruppe. Möglicherweise ist hier der Expositionszeitraum von 17 Tagen (PND80-PND97) zu kurz um eine Adaptation des Gewebes hervorzurufen. In einer Studie von Rimoldi et al. zeigte sich bei einer Genisteindosis von 54 mg/kg KGW und einer 3-monatigen Exposition nach Ovariectomie eine deutliche Stimulation des UWW, der VEH und ein verringertes Körpergewicht in den Tieren. Diese Effekte blieben bei der von Rimoldi verwendeten niedrigeren Dosis von 5,4 mg/kg KGW aus (Rimoldi et al., 2007). Dies gibt erneut Hinweis auf einen möglichen dosisabhängigen Effekt. Die Aufnahmemenge von Genistein in der hier vorliegenden Studie (TV II) mit ~ 20 mg/kg

KGW/d in der Ratte (siehe Tab. 10) liegt damit nur um das 4-fache höher als die niedrige Dosis und um das 2,5 fache niedriger als die hohe Dosis von Rimoldi. Möglicherweise lag, neben der kürzeren Expositionszeit, die von uns verwendete Dosis mit einem Genisteinanteil von 20 mg /kg KGW/d zu niedrig um estrogene Effekte im Reproduktionssystem zu erzielen. Unfer et al. konnten in einer randomisierten doppel-blind, Placebo-kontrollierten Studie mit 367 postmenopausalen Frauen zeigen, dass eine tägliche Aufnahme von 150 mg Isoflavonen für 5 Jahre zu einer um 3,37 % erhöhten endometrialen Hyperplasie führt (Unfer et al., 2004). Dies ist kritisch zu beobachten, da es die Vermutung zulässt, dass eine sehr hohe Isoflavonaufnahme wie sie durch Substitution mit NEMs erreicht werden kann, zu einer zusätzlichen Estrogenstimulation führen kann. Dies steht wiederum mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung von endokrinen Tumoren wie bspw. dem Endometriumskarzinom in Zusammenhang. Zudem scheint der sehr lange Zeitraum von 5 Jahren einen zusätzlichen Risikofaktor darzustellen. Andererseits zeigen Ergebnisse aktueller randomisierter Studien, dass die endometriale Dicke durch eine tägliche Sojaisoflavongabe über einen Zeitraum von drei Jahren in postmenopausalen Frauen nicht beeinflusst wurde (Quaas et al., 2013; Alekel et al., 2014).

Hinzu kommt, dass die Applikation der Substanzen, in den in der Literatur beschriebenen tierexperimentellen Studien, stark variieren. So kann die Gabe sowohl oral über die Gavage als auch direkt *s.c.* erfolgen. Beides führt zu einer schnelleren Bioverfügbarkeit im Vergleich zu Isoflavonen die mit der Nahrung über das Futter aufgenommen und verstoffwechselt werden. Desweiteren werden Soja-/Isoflavon-NEM oft in Form von Kapseln oder Tabletten konsumiert, bei der andere pharmakologische Kinetiken zu erwarten sind, verglichen zu einer diätetischen Aufnahme über ein Lebensmittel. Einen weiteren Aspekt stellt die vorliegende Isoflavonform dar, die appliziert wird. Viele Studien applizieren die Reinsubstanzen (Aglykonform) (Diel et al., 2004b, 2006; Hertrampf et al., 2006; Rimoldi et al., 2007). In dieser Arbeit wurde jedoch ein Sojaisoflavonextrakt verwendet, der hauptsächlich aus Glukosiden besteht und eine komplexere Matrix aufweist, als die Reinsubstanzen. Es ist bekannt, dass die aufgeführten Faktoren sowohl den Metabolismus als auch den biologischen „Outcome“ in erheblichem Maße beeinflussen können. So zeigten Studien, dass Isoflavone von fermentierten Sojaprodukten, wie Miso und Natto, eine höhere Bioverfügbarkeit aufweisen, als nicht-fermentierte Produkte wie Tofu und Sojamilch. Die Glucoside in nicht-fermentierten Produkten müssen demnach erst von den Darmbakterien in die Aglykonform hydrolysiert werden, bevor sie aufgenommen werden können (Zubik and Meydani, 2003; Kano et al., 2006). Weiterhin stellt der verwendete Sojaextrakt ein komplexes

Sojaisoflavongemisch bestehend aus Genistein, Daidzein und Glycitein dar, woraufhin sich biologische Effekte nicht auf eine Einzelsubstanz zurückführen lassen, wie es bei der isolierten Gabe von Isoflavonen möglich ist. Es ist zudem noch unzureichend untersucht, wie die Wirkung der einzelnen Isoflavone sich gegenseitig beeinflusst, da oftmals die Einzelsubstanzen und deren isolierte Wirkung charakterisiert werden.

Es ist bekannt, dass Isoflavone gewebe selektive Wirkungen entfalten, woraufhin sie in der Vergangenheit oft als Phyto-SERM Bezeichnung fanden (Diel et al., 2001; Wuttke et al., 2003). Dies zeigt sich in dieser Studie anhand der Daten aus der Brustdrüse. Die Brustdrüse scheint in diesem Experiment deutlich sensitiver auf die akute Isoflavongabe zu reagieren, als der Uterus und die Vagina und deckt sich mit den Beobachtungen aus TV I. Hier war eine deutliche Induktion der Proliferation in den OVX-Tieren durch die IRD400 zu verzeichnen (Abb. 31A), was für eine Stimulation des Brustgewebes durch die 17-tägige Substitution mit hochdosierten Isoflavonen (IRD400) spricht. In den E2 behandelten Tieren zeigte sich eine tendenziell erhöhte PCNA-Expression in den Tieren die zusätzlich die IRD400 erhielten, was für einen pro-proliferativen Effekt und einer erhöhten estrogenen Antwort des Gewebes spricht. Gleiches ließ sich bei der PR-Expression (Abb. 31B) beobachten, was die These eines additiven estrogenen Effektes durch Isoflavone stützt. Hertrampf et al. zeigte zwar eine Induktion der PR-Expression durch eine 3-tägige Gabe von 100 und 200 mg/kg KGW/d Genistein über die Gavage, jedoch lag diese deutlich unter der Stimulation mit 0,1mg/kg KGW/d Ethinylestradiol (Hertrampf et al., 2006). Die Applikation unterschied sich durch die Gabe von isolierten Genistein über die Gavage erst nach dem 14-tägigen *hormonal decline* deutlich und lässt sich demnach nicht direkt mit dem vorliegenden Daten vergleichen.

Dieses Ergebnis steht in Gegensatz zu der lebenslangen Isoflavonexposition aus TV I, bei der die IRD400 eine verringerte Estrogensensitivität in der Brustdrüse und damit einen möglichen protektiven Effekte aufzeigte. Damit scheint sich die These zu erhärten, dass der Expositionszeitraum eine entscheidende Rolle bei der Wirksamkeit von Isoflavonen spielt. Lamartiniere und Hilakivi-Clarke postulieren seit vielen Jahren, dass chemopräventive Effekte nur dann zustande kommen, wenn die Exposition mit Isoflavonen vor der Differenzierung der Brustdrüse stattfindet (Lamartiniere et al., 1998b; Hilakivi-Clarke et al., 1999a; Lamartiniere, 2000, 2002). Hierbei wird sowohl eine möglicher „imprinting“-Mechanismus durch eine kurzzeitige Hochregulation des EGF-Signalweges diskutiert, der im adulten Tier zu einer verringerten EGFR Expression im TEB führt (Lamartiniere, 2002; Lamartiniere et al., 2002), als auch die durch Genistein induzierte Hochregulation des Tumorsuppressorgens BRCA1 (de Assis et al., 2011; Cabanes et al., 2004). Eine Studie aus

dem eigenen Arbeitsumfeld konnte eindeutig belegen, dass das kritische Zeitfenster für die Isoflavonexposition die postnatale Phase vor der Pubertät (prepubertär) darstellt (Molzberger et al., 2013) und findet im Rahmen dieses TV möglicherweise Bestätigung.

Einen kritischen Aspekt bei der Beurteilung der vorliegenden Effekte stellt die Tatsache dar, dass die verwendeten Tiere im Alter von 10 Wochen direkt vom Hersteller bezogen wurden und nicht aus der eigenen isoflavonfreien Aufzucht stammten. Die Tiere wurden beim Hersteller auf einer sog. Standarddiät des Herstellers (CRD) aufgezogen. Die Analyse der Diät am MRI in Karlsruhe ergab eine Isoflavonkonzentration der CRD von 232,4 mg/kg und lag damit um das rund dreifache höher als die in TV I eingesetzte IRD50 (69 mg/kg) und um die Hälfte niedriger wie die hier verwendete IRD400 (506 mg/kg). Betrachtet man nun die Ergebnisse unter der Prämisse des chemopräventiven Effektes von Isoflavonen bei prepubertärer Gabe dieser, so könnte man postulieren, dass es sich hier ebenfalls um einen dosisabhängigen Effekt handelt. In TV I konnte deutlich gezeigt werden, dass die lebenslange Gabe der IRD50 keinen protektiven Effekt in Form einer reduzierten Estrogensensitivität und proliferativen Antwort in der Brustdrüse aufweist. Im Gegenteil zeigte sich eine Induktion der PCNA- und PR-Expression durch die IRD50. Die Tiere aus diesem TV II, waren quasi ebenfalls lebenslang mit Isoflavonen mit einer Dosis von 232 ppm exponiert, bevor sie 3 Tage lang (bis zur OVX) auf der IDD einer kurzen Auswaschphase folgten, bevor sie zu den experimentellen Gruppen zusammengesetzt wurden (siehe Abb. 12). Möglicherweise reichte die Dosis der CRD nicht aus, um einen protektiven Effekt auf die Brustdrüse durch den zusätzlichen estrogenen Stimulus in Form der substituierten IRD400 auszuüben. Hinzu kommt, dass der Serum-Isoflavonspiegel in den Tieren aus diesem Versuch mit 1338-1519 nM (OVX, IRD400) deutlich niedriger lag (siehe Anhang, Tab. A3), verglichen mit den Tieren aus TV I bei dem die Spiegel bei 2086-2151 nM lagen (siehe Anhang, Tab. A2). Zieht man erneut die Studie von Iwasaki et al. heran, so lagen die Genistein Plasmakonzentrationen der Tiere aus diesem Versuch bei 769 ± 236 nM und 701 ± 302 nM (siehe Anhang, Tab. A3) und liegen somit im 3. Quartil der Iwasaki Studie, bei der ebenfalls keine inverse Korrelation bzgl. des Brustkrebsrisikos (OR=1,04) aufgezeigt werden konnte (Iwasaki et al., 2008).

Anhand dieses Versuches wird die Komplexität der Beurteilung der biologischen Effekte und Wirkungen von Isoflavonen deutlich. Es ist hinlänglich bekannt, dass kommerzielle erhältliche Diäten für tierexperimentelle Studien Sojaproteine oder Sojamehl in den Futtermitteln enthalten und demnach auch Isoflavone nachweisbar sind. So konnten Degen et al. bei der Analyse von 15 verschiedenen Standarddiäten verschiedener Hersteller

Isoflavonkonzentrationen von bis zu 500 µg/g auffinden (Degen et al., 2002), die uterotrophe und estrogene Wirkung ausübten, wie in der vorliegenden Arbeit aufgezeigt. Es zeigt, wie genau man tierexperimentelle Studien planen und durchführen sollte und auch von wie vielen Faktoren die Wirksamkeit von Isoflavonen abhängt. Welchen Einfluss die CRD bei der Aufzucht der Tiere auf die vorliegenden Ergebnisse hat, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht beurteilt werden. Angesichts der Tatsache, dass die Tiere auf dieser nicht-isoflavonfreien Diät (CRD) aufgezogen wurden ist die gesamte Interpretation der Daten mit außerordentlicher Zurückhaltung zu betrachten. Um eine klare Aussage bzgl. der Effekte treffen zu können, sind ergänzende Tierversuche notwendig.

Zusammenfassend deutet das vorliegende Ergebnis auf eine Stimulation der Brustdrüse durch die kurzzeitige akute Aufnahme von hochdosierten Isoflavonen hin, wie sie bei einer unsachgemäßen überdosierten Einnahme von Soja-NEMs in der postmenopausalen Frau erreicht werden kann. Die vorliegenden Ergebnisse machen jedoch deutlich, dass die Risikoabschätzung von Sojaisoflavonen von einer Vielzahl an Faktoren abhängt (Dosis, Expositionszeitraum, Dauer der Verwendung und erreichte Plasmakonzentration) und ein kritischer Umgang mit Soja-NEMs bei postmenopausalen Frauen zu fordern ist.

6.3 Der lebenslange Einfluss von diätetischem Fett in Kombination mit Isoflavonen auf die Entwicklung

Neben der estrogenen Wirkung von Isoflavonen auf eine Vielzahl an Geweben und ihren in der Literatur beschriebenen Effekt auf die Hypothalamus-Hypophysen-Ovar-Achse, wirkt sich auch eine fettreiche Ernährung auf den Organismus aus. So steht eine fettreiche Ernährung in Zusammenhang mit der Entwicklung von Adipositas oder dem metabolischen Syndrom. Beide stehen sowohl in engen Zusammenhang zueinander, als auch in Zusammenhang das Brustkrebsrisiko zu erhöhen (Anderson and Neuhouser, 2012).

6.3.1 Dosiswahl und Exposition

Für die Untersuchung möglicher nachteiliger Effekte einer erhöhten Fettaufnahme über die Nahrung und dem Einfluss von Nahrungsfett auf die Isoflavonwirkung, wurde in dem dritten Tierversuch eine Diät gewählt, die einen höheren Rohfettanteil von 16% (HF) verglichen zur fettarmen Kontrolldiät (LF) mit 3,3% aufwies (siehe Tab. 2). Die metabolisierbare Energie aus Fett betrug für die HF-Diät 40 kJ% und für die LF-Diät 9 kJ%. Der erhöhte Fettanteil wurde durch Supplementation einer zusätzlichen Fettquelle in Form von Sonnenblumenöl erreicht. Bei Sonnenblumenöl handelt es sich um ein kaltgepresstes Pflanzenöl, welches aus 48,3 - 74,0% aus der mehrfach-ungesättigten Fettsäure Linolsäure besteht (Fiebig, 2011). Im Fettsäuremuster spiegelt sich der erhöhte Anteil an ungesättigten Fettsäuren wieder (siehe Tab. 2). Hier lag der prozentuale Anteil von C18:1 (Ölsäure) und C18:2 (Linolsäure) um das rund 6-fache höher als bei der Kontrolldiät. Für die bessere Vergleichbarkeit der Diätgruppen zueinander wurden die Diäten isokalorisch ausgewählt, um eine gleiche Kalorienaufnahme pro aufgenommene Futtermenge zu gewährleisten. Durch Zusatz des Isoflavonextraktes Novasoy[®]650 zur IDD, in gleicher Dosierung wie in den beiden vorangegangenen TV (506 ppm, IRD400), wurde die isoflavonangereicherte Diät (IRD LF und IRD HF) erzeugt und ermöglichten die Untersuchung des Einflusses von Nahrungsfett auf die Isoflavonwirkung. Hierbei stellte die IDD HF Gruppe ein westlich orientiertes Expositionsszenario mit einer erhöhten Fettaufnahme dar. So empfiehlt die Deutsche Gesellschaft für Ernährung eine moderate Fettzufuhr mit 30-35% Energie aus Fett und einem Verhältnis von ungesättigten zu gesättigten Fettsäuren von 2:1. Bei einer höheren Aufnahme steigt das Risiko für Adipositas und deren Folgeerkrankungen an (DGE, 2011). Jedoch liegt der Zuckeranteil in dem westlich geprägten Ernährungsstil ebenfalls erhöht, was zu einem erhöhten Kaloriengehalt und damit verbunden zu einer erhöhten Kalorienaufnahme führt. Die asiatische Ernährungsweise ist neben dem erhöhten Isoflavongehalt auch durch einen

geringeren Fett und Zuckergehalt in der Nahrung gekennzeichnet und wird von der IRD LF widergespiegelt. Die Aufnahme von einheimischen Getreide- und Gemüsesorten und einem geringen Anteil industriell gefertigter Nahrungsmittel unterscheiden im Wesentlichen den traditionellen asiatischen Ernährungsstil mit dem Europäischen und führen zu der unterschiedlichen Auftretungswahrscheinlichkeit von ernährungsbedingten chronischen Erkrankungen. Jedoch wurde in den letzten Jahren ein Wandel in der asiatischen Ernährungsweise hin zur vermehrten Fett- und Zuckeraufnahme durch einen erhöhten Fleisch- und Fastfood-Konsum beobachtet, dass in der Konsequenz zu einer erhöhten Inzidenz von chronischen Erkrankungen und Brustkrebs in Asien führt (Popkin et al., 2001; Iwasaki and Tsugane, 2011). Umso wichtiger scheint demnach die Untersuchung zu sein, in wieweit sich ein erhöhter Fettanteil in der Nahrung in Kombination mit Isoflavonen (IRD HF) auf den Organismus auswirkt und war Gegenstand der vorliegenden Untersuchung. Wie sich ein erhöhter Zucker- und/oder Kaloriengehalt auf den Organismus auswirkt, kann in dieser Studie jedoch nicht beantwortet werden, da die hier vorliegenden HF Diäten isokalorisch ausgewählt wurden. Dies diente dem Zweck, allein den Einfluss eines erhöhten Fettanteiles in der Nahrung und dessen Wirkung zu untersuchen.

6.3.2 Pubertät und Zyklus

Für die Untersuchung der Auswirkung von Nahrungsfett auf das Reproduktionssystem wurden wie in TV I der Eintritt in die Pubertät und der Zyklus der Tiere untersucht. Während der Pubertät kommt es zu starken Änderungen in der Energiehomöostase und der reproduktiven Funktion. Es kommt zu einer erhöhten Sekretion von GnRH und weiblicher Steroidhormone und damit verbunden zu einer bevorzugten Fettaufnahme und Körperfetteinlagerungen (Kennedy and Mitra, 1963; Leibowitz et al., 2009). In der vorliegenden Studie führte eine prepupertäre Intervention mit Fett nach Abstillen der Tiere (ab PND21) zu einem früheren Eintritt in die Pubertät unabhängig vom Isoflavongehalt (Abb. 32A). Bereits 1975 und 1979 konnte in Studien mit Ratten unter Verwendung einer HF-Diät eine früheres VO in Ratten beobachtet werden (Frisch et al., 1975; Kirtley and Maher, 1979). Auch aktuelle Studien konnten einen direkten Zusammenhang zwischen der Aufnahme von Nahrungsfett und einem früheren Pubertätseintritt in der Wistar-Ratte beobachten (Fungfuang et al., 2013; Sánchez-Garrido et al., 2013). Welche Mechanismen im Detail dabei eine Rolle spielen ist noch unzureichend geklärt. Boukouvalas et al. zeigten, dass ein fettinduziertes Ungleichgewicht zu neuroendokrinen Dysfunktionen führt, das sich in einem verfrühten Pubertätseintritt zeigt. In den weiblichen Tiere fand man erhöhte Gewichte der Nebennieren und eine veränderte Hypophysen-Hypothalamus-Nebennieren Sensitivität durch eine HF-

Intervention (Boukouvalas et al., 2008). Es ist bekannt, dass das Körpergewicht und die damit verbundene Fettmasse einen entscheidenden Einfluss auf die sexuelle Reifung ausüben. Eine amerikanische Studie konnte demnach zeigen, dass übergewichtige Mädchen früher in die Pubertät kommen, als nicht übergewichtige Mädchen (Lee et al., 2007). Eine mögliche Erklärung könnten erhöhte Steroidspiegel im weiblichen Organismus durch die Aufnahme einer HF-Diät sein, die die reproduktive Reifung beeinflussen und darüber die Pubertät frühzeitig auslösen. So zeigte Leibowitz et al., dass eine HF-Diät in der Ratte zu erhöhten E2- und P4-Spiegeln führt und es zu Veränderungen in den Peptiden Galanin und Enkephalin im paraventriculären und medialen preoptischen Nucleus, welche sensitiv auf Steroidhormone reagieren und eine Rolle bei der Steuerung und Regulation der Energiebilanz und der reproduktiven Funktion spielen, kommt (Leibowitz et al., 2009). Auch scheint das Proteohormon Leptin eine Rolle bei der Vermittlung der Geschlechtsreife zu spielen. In einer Tierstudie mit Ratten, die nur einen eingeschränkten Nahrungszugriff erhielten, führte die Nahrungsrestriktion zu einem verspäteten Pubertätseintritt in Kombination mit einem verringerten Plasmaleptin-Spiegel und Körpergewicht (Zeinoaldini et al., 2006). Eine postnatale Überernährung in Ratten führte hingegen zu erhöhten LH, FSH und Leptin-Spiegeln (Sánchez-Garrido et al., 2013). Es ist bekannt, dass Leptin die Hypothalamus-Hypophysen-Ovar-Achse über die Stimulation von Kisspeptin aktivieren kann und damit einen direkten Einfluss auf die Reproduktion nimmt (Jasik and Lustig, 2008; Leidenberger, 2009). Die Messung der Leptinspiegel stellt demnach einen wichtigen Aspekt bei zukünftigen Analysen dar.

Aus der Literatur und der gynäkologischen Praxis ist bekannt, dass es einen Zusammenhang zwischen dem Körpergewicht und dem Eintritt in die Pubertät gibt (Leidenberger, 2009). Für die Untersuchung, ob es ein „kritisches“ Körpergewicht gibt, ab dem die Pubertät erreicht wird, wurde das Körpergewicht zum Zeitpunkt des VO dokumentiert (Abb. 32 A und B). Bei Tieren, der IDD Gruppen, bildete sich ein „kritisches“ Körpergewicht von ~ 100 g ab (Abb. 33A). Jedoch konnte kein großer Unterschied im Körpergewicht zum Zeitpunkt des VO zwischen der LF und HF Gruppe in der IDD gezeigt werden (Abb. 33A). Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus der Studie von Boukouvalas et al., der ebenfalls keinen Unterschied im Körpergewicht zum Zeitpunkt des VO durch eine HF-Intervention finden konnte (Boukouvalas et al., 2008). In den IRD-Tieren lagen deutlich mehr Tiere unter der gesetzten 100 g Grenze (Abb. 33B), jedoch scheint das Körpergewicht nicht der valideste Parameter zu sein. Möglicherweise spielt die Fettmasse einen entscheidenden Einfluss auf die endokrine Funktion im Reproduktionstrakt. Eine erhöhte Fettmasse steht in Zusammenhang mit einer

verstärkten Aromataseaktivität im Fettgewebe, das in der Folge zu erhöhten E2-Spiegel führt (zusammengefasst in Simpson and Brown, 2013) und damit die Pubertät früher ausgelöst werden kann. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Tiere der HF Gruppen ein früheres VO aufwiesen, als die Tiere der LF-Kontrollgruppen (Abb. 33 C und D) und stützt diese Theorie. Interessanterweise zeigte die Intervention mit Fett keinen Einfluss auf die Zykluslänge (Abb. 32B). Hier zeigte sich wie bereits in TV I beobachtet, ein kürzerer Zyklus durch die Isoflavondiät IRD, jedoch nicht durch die HF Intervention. Zwischen der LF und HF Gruppe innerhalb der IRD konnte ebenfalls kein Unterschied gezeigt werden, was dafür spricht, dass die HF-Diät keinen Einfluss auf die Isoflavonwirkung hat.

6.3.3 Der Lebenslange Einfluss von diätetischem Fett in Kombination mit Isoflavonen auf nicht-klassisch estrogensensitive Gewebe

In TV I konnte bereits im Ansatz gezeigt werden, dass sich Isoflavone möglicherweise positiv auf den Fettstoffwechsel auswirken können. In diesem TV sollte nun untersucht werden, wie sich die HF-Diät in Kombination mit Isoflavonen in 80 Tage alten intakten Tieren auswirkt. Die HF-Diät führte nur zu einem leicht erhöhten Körpergewicht von 4% (IDD) und 6% (IRD) (Abb. 34A). Dieser geringe Unterschied zwischen den Diätgruppen kann darauf zurückgeführt werden, dass die Diäten isokalorisch ausgewählt wurden. Der Futterverbrauch innerhalb der Gruppen war ähnlich, so dass alle Tiere die gleiche Kalorienmenge aufgenommen haben. Das Körpergewicht scheint durch eine veränderte Nahrungszusammensetzung (erhöhter Fettanteil bei gleicher Kalorienanzahl) demnach nicht sehr stark beeinflussbar zu sein, was sich auch im Körpergewichtsverlauf (Abb. 34B) der Gruppen widerspiegelt. Die viszerale Fettmasse (Abb. 34C) zeigte sich in der IRD HF verglichen zur isoflavonfreien Kontrolle IDD HF erhöht und auch die Adipozytengröße war leicht durch die Intervention mit Fett induziert (Abb. 34D). Eine mögliche Erklärung könnte eine erhöhte Lipogenese aufgrund einer geringeren endogenen E2-Konzentration sein. So stehen Isoflavone in Zusammenhang mit verringerten Plasmaestrogenspiegeln (Sowers et al., 2006). Studien mit Aromatase Knockout (ArKO) Tieren zeigten, dass in den Tieren die kein endogenes E2 aufgrund eines CYP19-Defektes synthetisieren können, das intraabdominale Fett und die Adipozytengröße erhöht sind, was auf eine erhöhte Lipogeneseaktivität zurückgeführt wird. Weiterhin konnte in diesen Studien gezeigt werden, dass eine 3-wöchige Substitution mit E2 zu einer Abnahme dieser Parameter führt und dies durch eine reduzierte Lipoproteinlipase (LPL), Leptin und PPAR γ mRNA Expression hervorgerufen wird (Jones et al., 2000; Misso et al., 2003). So kann E2 die Expression von LPL über ER-vermittelte Mechanismen supprimieren (Homma et al., 2000), wodurch der protektive Effekt seitens der

Estrogene auf den Fettstoffwechsel zustande kommt. Weiterhin führt E2 zu verringerten Cholesterolspiegeln über eine induzierte LDL-Rezeptor Expression in der Leber (Kovanen, 1987). Interessanterweise zeigte sich in der Serumlipidanalyse in den intakten Tieren eine erhöhte HDL Expression in der IDD HF Gruppe und auch in der IRD LF verglichen zur IDD LF. Man kann hier von einem möglichen Kompensationsmechanismus ausgehen. So transportiert HDL überschüssiges Cholesterol aus der Peripherie zur Leber zurück, wo es anschließend in Gallensäure umgewandelt und über die Galle ausgeschieden werden kann. Studien konnten zeigen, dass sowohl E2 als auch P4 zu einer erhöhten Aktivität des Enzyms CYP7a (Cholesterol 7 α -hydroxylase) führen, welches ein Schlüsselenzym in der Gallensäurebildung darstellt (Chico et al., 1996). Möglicherweise induzieren Isoflavone aufgrund ihres estrogenes Potentials die Aktivität von CYP7a und schützen damit den Organismus vor einer Akkumulation von Cholesterol und Fett. ArKO Mäuse zeigen demnach das pathologische Bild einer Fettleber und einer Hypercholesterinämie, das auf die reduzierte Gallensäuresynthese aufgrund des E2-Defizites zurückgeführt werden kann (Peet et al., 1998; Jones et al., 2000). Der Cholesterolspiegel war in den IDD HF Tieren leicht erhöht und könnte zur Kompensation dessen zu erhöhten HDL-Spiegel führen (Tab. 13). Dass durch die Isoflavone (IRD LF) auch ohne Fett der HDL Spiegel erhöht ist, könnte auf einen präventiven protektiven Effekt seitens der Isoflavone zurückzuführen sein. Kirk und Kollegen konnten zeigen, dass eine diätetische Isoflavonaufnahme zu erhöhten HDL-Spiegeln in C57BL/6 Mäusen führt und damit protektiv gegen die Bildung einer Artherosklerose wirkt (Kirk et al., 1998). Der Kompensationsmechanismus über HDL könnte neben dem gleichen Kaloriengehalt, auch erklären, warum das Körpergewicht und auch die viszerale Fettmasse kaum Veränderungen durch die HF-Intervention erfahren. So handelt es sich bei den intakten Tieren, um gesunde Tiere, die keine pathophysiologische Störungen im Hormon- und Fettstoffwechsel aufweisen. Der Organismus ist demnach in der Lage den erhöhten Fettanteil in der Nahrung zu kompensieren und keinerlei Pathologien wie bspw. eine hepatische Steatose, eine Adipozytenhyperplasie und/oder -atrophie, Hypertriglyzeridämie oder ähnliches auszubilden. Auch gibt es Hinweise darauf, dass der Organismus seine Körperzusammensetzung ändert. So ist das Muskelgewicht vom *M. soelus* (siehe Anhang, Tab. A4) durch die Intervention mit HF erhöht, was einen Hinweis auf eine veränderte Nährstoffverteilung gibt. Möglicherweise kommt es zu Fetteinlagerungen in den Muskel, was in Zukunft durch eine spezifische Lipidfärbung mit Oil-Red-O untersucht werden könnte. Im Gegensatz dazu steht eine aktuelle Studie in postmenopausalen Frauen aus diesem Jahr, die zeigen konnte, dass die Aufnahme von 90 mg Isoflavon über einen Zeitraum von 16 Wochen

zu keinen Veränderungen im Lipidprofil (Cholesterol-, LDL-, HDL- und TG- Plasmaspiegel) führte und damit kein positiver Effekt auf die kardiovaskuläre Gesundheit gezeigt werden konnte (Carmignani et al., 2014). Dies zeigt erneut die Problematik der Übertragbarkeit von Ergebnissen aus tierexperimentellen Studien auf die Humansituation auf und gilt zu berücksichtigen.

6.3.4 Der lebenslange Einfluss von diätetischem Fett in Kombination mit Isoflavonen auf klassisch estrogensensitive Gewebe

Die Untersuchung der klassisch estrogensensitiven Gewebe des Uterus und der Vagina diente der Überprüfung, ob ein erhöhter Anteil an Nahrungsfett zu einem zusätzlichen estrogenen Stimulus führen kann und inwiefern die Intervention mit Fett die Isoflavonwirkung beeinflusst.

In intakten 80 Tage alten Tieren zeigte sich auf die Epithelhöhen des Uterus und der Vagina (Abb. 36C und D) kein Einfluss durch die Intervention mit Fett (HF) und auch nicht durch die Isoflavonexposition (IRD), was sich mit den Daten aus TV I und vorangegangenen Studien deckt und für einen geringen estrogenen Effekt durch die Isoflavone spricht (Hertrampf et al., 2009). Im UWW zeigte sich eine Abnahme durch die IRD. Dieser Effekt war in TV I nicht zu beobachten, was möglicherweise auf die ungleichen Zyklusphasen innerhalb der intakten Gruppen aus TV I zurückgeführt werden könnte. Die Abnahme des UWW durch die IRD könnte auf einen verringerten endogenen E2-Spiegel zurückzuführen sein. In der Literatur ist beschrieben, dass eine lebenslange Isoflavonexposition mit verringerten endogenen E2-Spiegeln durch Inhibierung der Aromataseaktivität einhergeht (Mousavi and Adlercreutz, 1993; Patisaul and Jefferson, 2010). So zeigen asiatische Frauen deutlich geringere E2-Spiegel verglichen mit kaukasischen Frauen (Sowers et al., 2006). Möglicherweise führt die sehr hohe Isoflavondosis von 506 ppm auch zu anti-proliferativen Effekten, wie sie in einer Vielzahl an Studien beschrieben wurden sind (zusammengefasst in Mortensen et al., 2009). Die molekularen Mechanismen im Uterus wurden in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht untersucht. Jedoch würden beide Erklärungen zu einer verringerten Uterusproliferation führen und möglicherweise diesen Effekt erklären. In der vorliegenden Studie wurde darauf geachtet, dass alle Tiere in der gleichen Zyklusphase getötet wurden. Damit kann ausgeschlossen werden, dass unterschiedlich vorliegende E2-Konzentrationen zu einer Verzerrung von Effekten führen. Interessanterweise zeigte sich durch die Intervention mit Fett (HF) ein tendenziell verringertes UWW in der Kontrolldiät IDD und auch in der IRD. Eine Studie von Parker et al. zeigte, dass durch eine HF-induzierte Adipositas die Konzentration an Natürlichen Killer Zellen (NK-Zellen) im Uterusgewebe reduziert ist, was zu einer

verminderten Interferon gamma (IFN- γ) Expression führt (Parker et al., 2014). IFN γ wirkt neben der Rekrutierung weiterer NK-Zellen stimulierend auf die Vaskularisierung des Endometriums (Kitaya et al., 2007). Eine durch HF ausgelöste reduzierte IFN γ -Expression und der damit verringerten Angiogenese könnte die verringerte UWW durch die HF Intervention erklären. Jedoch kann dies nur durch eine gezielte Analyse des Uterus bestätigt werden.

Im Ovargewicht zeigte sich erstmals einen kombinatorischer Effekt von Isoflavonen und Fett. Hierbei war das Ovargewicht in der IDD HF Gruppe erhöht (Abb. 36B), was innerhalb der IRD Gruppen nicht beobachtet werden konnte. Hier lag das Gewicht signifikant niedriger verglichen zur IDD HF. Möglicherweise schützen Isoflavone vor der Einlagerung von gonadalem Fett bzw. vor der krankhaften Fetteinlagerung in das periovarielle Fettgewebe, welches sich zukünftig mit der histologischen Analyse des Ovars feststellen lassen könnte. Eine Humanstudie konnte zeigen, dass der Konsum von Genistein zu einer reduzierten Gesamtkörperfettmasse führt (Goodman-Gruen and Kritz-Silverstein, 2003). Eine Studie mit C57BL/6 Mäusen zeigte bei sehr hohen pharmakologische Konzentrationen von bis zu 200.000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Genistein eine Inhibierung der Fettgewebsablagerung (Penza et al., 2006). Möglicherweise führt die IRD in der Ratte zu apoptotischen Effekten in den Adipozyten, was in einem verringerten Ovargewicht zusehen ist. Interessanterweise zeigte sich in einer aktuellen Studie, dass eine tägliche orale Genisteinaufnahme von 50mg/kg zwischen dem PND 1 und 22 u.a. zu einer erhöhten PPAR γ Expression führt. Diese wird in Verbindung mit einer begünstigten Entwicklung einer Adipositas in weiblichen Ratten gebracht wird (Strakovsky et al., 2014). Die Aufklärung der molekularen Mechanismen im Fettstoffwechsel nimmt damit eine zentrale Rolle ein und sollte in zukünftigen Untersuchungen berücksichtigt werden.

Für die Untersuchung der Estrogensensitivität wurde der Uterotrophe Assay herangezogen. Die Estrogendefizienz in der Menopause wird durch die OVX im Nager nachgeahmt. Damit unterliegen die estrogensensitiven Gewebe einer progressiven Atrophie, die durch den reduzierten E2-Spiegel induziert wird. In dem vorliegenden Ergebnis zeigt sich dies durch eine starke Abnahme des UWW (Abb. 38), der UEH und der VEH (Abb.39) in allen Diätgruppen (OVX). Hierbei konnte keinerlei Einfluss durch die Intervention mit Fett oder der Isoflavongabe festgestellt werden. In Folge der Stimulation mit E2 für 3 Tage im Rahmen des Uterotrophen Assay, kommt es zur Induktion des UWW, der UEH und der VEH aufgrund der Estrogensensitivität dieser Gewebe. Die Intervention mit Fett allein (IDD LF vs. HF) und in Kombination mit Isoflavonen (IRD LF vs. HF) führte zu keiner veränderten

Ansprechbarkeit der Gewebe auf den E2-Stimulus. Dies lässt den Schluss zu, dass eine erhöhte Aufnahme an Fett mit der Nahrung zu keiner veränderten zellulären Modulation im Uterus und Vagina führt und die Estrogensensitivität dieser Gewebe nicht durch HF beeinflusst ist. Inwiefern molekulare Mechanismen betroffen sind kann in der vorliegenden Arbeit nicht beantwortet werden, stellt aber ein spannenden Aspekt in Zukunft dar.

6.3.5 Der lebenslange Einfluss von diätetischem Fett in Kombination mit Isoflavonen auf die Brustdrüse

Neben den Risikofaktoren wie Nulliparität, frühe Menarche und spätes Eintreten in die Menopause spielen auch das Körpergewicht und der Fettgehalt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Brustkrebs. So stehen Übergewicht (Iwasaki and Tsugane, 2011; Anderson and Neuhouser, 2012) und eine verringerte körperliche Betätigung (Monninkhof et al., 2007; Suzuki et al., 2011) in Zusammenhang mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko. Interessanterweise scheint die Assoziation zwischen dem Körperfettgehalt und dem Brustkrebsrisiko abhängig vom menopausalen Status zu sein. Dem Bericht von 2007 des World Cancer Research Fund (WCRF) und American Institute for Cancer Research (AICR) ist zu entnehmen, dass in premenopausalen Frauen eine inverse Korrelation vorliegt, hingegen postmenopausale Frauen eine positive Korrelation bzgl. des Körperfettgehaltes und dem Brustkrebsrisikos aufweisen (World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research, 2007). Dieser Gegensatz wird auf die unterschiedlichen endogenen Estrogenspiegel zurückgeführt. Übergewichtige premenopausalen Frauen neigen verstärkt zu menstruellen Unregelmäßigkeiten und anovulatorischen Zyklen, was zu einer verringerten Anzahl an Ovulationen in ihrer gesamten Lebensphase und in der Konsequenz zu verringerten endogenen E2 Konzentration führt. Hingegen in postmenopausalen Frauen die endogenen E2 Spiegel aufgrund der erhöhten Estrogenproduktion durch die Aromatase im Fettgewebe in Kombination mit verringerten SHBG-Spiegeln deutlich erhöht sind (Potischman et al., 1996). So konnte eine Studie von Subbaramaiah et al. zeigen, dass die Aromatase-Expression und -Aktivität in der Brustdrüse von übergewichtigen Mäusen erhöht ist und die estrogenabhängige Expression von PR und pS2 in den Adipozyten der Brustdrüse induziert ist (Subbaramaiah et al., 2011). In einer darauffolgenden Humanstudie konnte eine erhöhte Aromataseaktivität im Brustgewebe übergewichtiger postmenopausaler Frauen gefunden werden (Morris et al., 2011). Es ist bekannt, dass sowohl endogene als auch exogene Estrogene die Proliferation in der Brust induzieren, was die Wahrscheinlichkeit für Mutationen und damit Entartungen während der Zellteilung erhöht (Henderson and Feigelson, 2000). Das Fettgewebe als ein endokrin aktives Organ, stellt nach der Menopause den Hauptort für den Aromatase (CYP19)-

vermittelten Estrogenmetabolismus dar. Der Fettanteil und die Fettmasse spielen dadurch eine wichtige Rolle in dem Zusammenhang von Übergewicht und Brustkrebsentwicklung (Anderson and Neuhouser, 2012). In der Analyse von 9 prospektiven Studien konnte ein direkter Zusammenhang zwischen erhöhten E2-Spiegeln und einen damit verbundenen erhöhten Brustkrebsrisiko in postmenopausalen Frauen gefunden werden (Key et al., 2002). Aufgrund der aufgezeigten Problematik der erhöhten E2-Spiegel durch eine erhöhte Fettmasse und dem Brustkrebsrisiko, wurde die Brustdrüse in intakten Tieren (premenopausale Frau) und in den Tieren des Uterotrophen Assays (postmenopausales Modell) hinsichtlich ihrer Expression des Proliferationsmarkers PCNA untersucht. In intakten Tieren konnte kein Einfluss des zusätzlich aufgenommenen Nahrungsfettes auf die PCNA-Proteinexpression gefunden werden (Abb. 37). Auch die lebenslange Gabe von Isoflavonen mit und ohne Fett zeigte keinen Unterschied in der PCNA-Expression in der Brustdrüse intakter Tiere. Man kann davon ausgehen, dass ein erhöhter Fettanteil in der Nahrung zu keiner veränderten Proliferation in der Brustdrüse führt. Eine mögliche Erklärung könnten die zuvor diskutierten Punkte des unveränderten Körpergewichtes und der unveränderten viszeralen Fettmasse aufgrund des isokalorischen Energiegehaltes sein (Abb. 36). Durch Fehlen zusätzlichen Fettgewebes, kann man davon ausgehen, dass es zu keiner fettinduzierten erhöhten Estrogenbildung kommt. Die Messung der endogenen E2-Spiegel, die Bestimmung der CYP19-Aktivität und die Expressionsanalyse von bspw. CYP19 und PR und pS2 im Fettgewebe der Brust könnten zukünftig herangezogen werden, um die biologischen Mechanismen besser zu verstehen und den Einfluss von Nahrungsfett auf die Brustdrüse näher zu charakterisieren.

Die Untersuchung der Estrogensensitivität in den ovariectomierten Tieren (Abb. 39) zeigte ebenfalls keinerlei Veränderung durch die HF Intervention in der PCNA-Proteinexpression. Wie bereits in TV I beobachtet, führte die dreitägige E2-Behandlung zu einer Induktion der Proliferation in allen Diätgruppen. Auch die reduzierte proliferative Responsivität der Brustdrüse auf Estrogene durch eine lebenslange Isoflavongabe (IRD) war erneut zu beobachten und bestätigt die zuvor gezeigten Daten und die Daten von Molzberger et al. (Molzberger et al., 2012). Die Intervention mit Fett bzw. die Kombination aus Isoflavonen und Fett führte zu keinerlei Veränderung. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu einer Studie von Medvedovic et al.. Dieser konnte eine erhöhte Proliferation in der Brustdrüse weiblicher Ratten während der Pubertät nach Fütterung einer mit verschiedenen Fettsäuren angereicherten Diät beobachten und stellten dies in Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko im Alter an Brustkrebs zu erkranken (Medvedovic et al., 2009). Bereits Hilakivi-

Clarke zeigte, dass eine hohe mütterliche Fettaufnahme während der Schwangerschaft das Brustkrebsrisiko der F1-Generation erhöhen kann. Die frühe Exposition mit diätetischem Fett, insbesondere der mehrfach-ungesättigten Omega-6-Fettsäure Linolsäure führt zu erhöhten E2-Spiegeln während der Schwangerschaft, was in der Folge zu einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines karzinogen-induzierten Brusttumors führen kann. Als ein möglicher Mechanismus wurde die reduzierte Differenzierung des Brustepithels und eine erhöhte Anzahl an den TEB (terminal end bud) in Folge einer frühzeitigen Exposition mit diätetischem Fett diskutiert (Hilakivi-Clarke et al., 1999b). Bei diesen Brustepithelzellstrukturen handelt es sich um die Ansatzstellen von neoplastischen Transformationen (Russo et al., 1982). In weiteren Studien von Hilakivi-Clarke et al. führte eine *in utero* und postnatale Exposition mit E2 zu einer erhöhten Anzahl von TEB und zu einer verminderten Differenzierung in lobuloalveoläre Strukturen (Hilakivi-Clarke et al., 1997a, 1997b). Die Tiere aus der vorliegenden Studie erhielten die HF-Diät erst zum Zeitpunkt des Abstillens am PND21, was möglicherweise erklären könnte, dass die Intervention von Fett keinen Einfluss auf die Proliferation in der Brustdrüse zeigte. Zu welchem Zeitpunkt die zellulären Änderungen in der Brustdrüse durch eine erhöhte Fettaufnahme stattfinden ist nicht bekannt. Aus vorangegangenen Studien ist bekannt, dass die Exposition von Isoflavonen vor der Pubertät stattfinden muss, um Mechanismen anzuschalten die zu einer veränderten Brustdrüsenmorphologie führen. Inwieweit das gleiche auf die Fettgabe zutrifft ist unbekannt und stellt einen interessanten Forschungsansatz dar. Denkbar ist auch, dass der Fettgehalt im Futter nicht ausreichend war, um bspw. die endogenen E2-Konzentrationen zu modulieren. So waren das Körpergewicht und die viszerale Fettmasse kaum durch die HF-Intervention verändert, was sich in dem gleichen Energiegehalt der LF und HF Diät von 12,8MJ/kg begründen lässt. Für eine bessere Darstellung der europäischen Ernährungssituation im Vergleich zur Asiatischen, wäre eine Adaptation des Energiegehaltes notwendig. So unterscheidet sich die westliche orientierte Diät nicht nur im Fett- sondern auch im Zuckergehalt, der wiederum zu einem erhöhten Kaloriengehalt führt. Jedoch war es durch die isokalorisch ausgewählten Futter in der vorliegenden Studie möglich, eine Aussage hinsichtlich der Wirkung eines erhöhten Fettanteiles allein auf den Organismus zu treffen.

Zusammenfassend zeigte sich in diesem Tierversuch erneut eine reduzierte Estrogensensitivität der Brustdrüse durch ein lebenslange IRD, die durch einen erhöhten Fettanteil in der Nahrung nicht beeinflusst wurde und in Zusammenhang mit einem möglichen protektiven Effekt steht. Die Intervention mit HF zeigte keine nachteiligen Effekte auf die untersuchten Organe, insbesondere auf die Proliferation in der Brustdrüse.

7 Schlussfolgerung & Ausblick

Als wesentliche, neue Erkenntnisse zeigen die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit, dass sowohl die Dosis als auch der Expositionszeitraum für die biologische Wirkung von Isoflavonen von entscheidender Bedeutung sind.

In den Untersuchungen des TV I wurde deutlich, dass Isoflavone in dosisabhängiger Weise auf die Brustdrüse wirken. In geringen Konzentrationen (IRD50) zeigte sich ein eher nachteiliger Effekt auf die Brustdrüse, was in einer erhöhten proliferativen (PCNA) und estrogenen (PR) Antwort zu sehen war. In hohen Konzentrationen (IRD400) konnten hingegen mögliche protektive Einflüsse hinsichtlich des Brustgewebes gezeigt werden. Hier führte die lebenslange Exposition von Isoflavonen, wie sie in der traditionellen asiatischen Ernährungsweise vorhanden sein kann, zu einer verminderten proliferativen Ansprechbarkeit und einer reduzierten Estrogensensitivität des Brustdrüsenepithels. Die geringere Brustkrebsinzidenz in asiatischen Ländern kann somit möglicherweise auf die lebenslange Isoflavonexposition zurückgeführt werden.

Weiterhin wird deutlich, dass Isoflavone ihre Wirkung gewebe selektiv entfalten. Auf das Körpergewicht und das Fettgewebe scheinen sich Isoflavone positiv auszuwirken, was sich in einer verringerten Adipozytengröße und Fettzellmasse mit steigendem Isoflavongehalt widerspiegelte. Hingegen scheinen Isoflavone auf das reproduktive System wirken zu können und dieses zu modulieren. Ein verfrühter Pubertätseintritt und einer kurzer Menstruationszyklus bei der Frau stellen beides Risikofaktoren bei der Brustkrebsentwicklung dar und konnten in der Ratte unter einer lebenslangen Isoflavonexposition beobachtet werden. Diese unerwünschten Nebeneffekte müssen bei der Beurteilung des gesundheitlichen Nutzens von Isoflavonen berücksichtigt werden, auch wenn sie im Gegensatz zu dem positiven Befund der Brust stehen. Auf die estrogensensitiven Gewebe des Uterus und der Vagina zeigten sich nur leichte Modulationen durch Isoflavone, die weiteren Untersuchungen bzgl. der molekularen Mechanismen bedürfen.

Durch die in TV II erhobenen Daten wird deutlich, dass der Expositionszeitraum für die Wirkung von Isoflavonen auf die Brustdrüse ebenfalls von großer Bedeutung ist. Bei einer akuten hochdosierten Isoflavonaufnahme, wie sie durchaus bei der Verwendung von Soja-NEM zur Behandlung klimakterischer Beschwerden in der Frau herangezogen wird, kann es zu einer verstärkten estrogenen Antwort in der Brustdrüse durch eine hohe Isoflavonaufnahme

kommen. So scheint sich eine hochdosierte Isoflavonsubstitution negativ auf die Brustdrüse bei einer vorliegenden Estrogendefizienz auszuwirken und gibt einen Hinweis auf ein mögliches gesundheitliches Risiko. Allerdings muss diese Aussage unter Vorbehalt betrachtet werden, da die Tiere aus versuchstechnischen Gründen nicht isoflavonfrei aufwuchsen und die erhobenen Daten lediglich ein Indiz für einen möglichen nachteiligen Effekt durch eine erhöhte estrogene Aktivität in der Brustdrüse darstellen. Zur endgültigen Klärung der Frage, ob es zu einem möglicherweise erhöhten Brustkrebsrisiko durch eine Proliferationsstimulation über die Aufnahme von hochdosierten Isoflavonen kommen kann, müssen weitere tierexperimentellen Studien durchgeführt werden. Es kann somit keine endgültige Aussage bezüglich der Risikoabschätzung der im Internet freiverkäuflich und als „nebenwirkungsfreie Alternativen“ zur klassischen HRT beworbenen Soja-/Isoflavonprodukte getroffen werden und bedarf zukünftiger Untersuchungen.

Interessanterweise wirkte sich ein erhöhter Fettgehalt in der Nahrung, wie er u.a. in der westlichen Ernährungsweise vorzufinden ist, nicht nachteilig auf die Proliferation der Brustdrüse aus. Demnach scheint es möglich, dass andere nicht-estrogene Faktoren bei der positiven Korrelation zwischen Übergewicht und einem erhöhten Brustkrebsrisiko eine Rolle spielen. Diätetisches Fett beeinflusst jedoch die sexuelle Reifung, was sich in einem früheren Pubertätseintritt durch eine HF-Intervention zeigte und damit Faktoren wie Leptin und die Gonadotropine als mögliche Mechanismen identifizierte. Auf das Fettgewebe und den damit verbundenen Fettstoffwechsel konnte die zuvor in TV I gezeigten positiven Effekte einer verringerten Adipozytengröße und viszeralen Fettmasse durch eine hohe Isoflavonaufnahme bestätigt werden. So können die Isoflavone über die Induktion von HDL einen protektiven Effekt auf den Fettstoffwechsel ausüben und kompensieren möglicherweise durch diesen Weg den erhöhten Fettgehalt aus der Nahrung. Demnach könnten Isoflavone einen möglichen therapeutischen Ansatz bei der Prävention von Adipositas darstellen, die jedoch einer weiteren intensiven Erforschung und der Aufdeckung der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen bedürfen.

Zukünftige Analysen sollten neben der Aufklärung der molekularen Mechanismen in dem Brustdrüsenepithel und dem Uterus auch die Bedeutung des Brustfettgewebes thematisieren. Die Analysen des Fettstoffwechsels im viszeralen Fett und auch im Fett des Brustgewebes sollten hierbei im Fokus stehen. So ist es möglich, dass die vom Fett ausgeschütteten Stoffe sowohl endokrin als auch parakrin auf das umliegende Gewebe wirken können und somit

einen Einfluss auf den gesamten Organismus und somit auch die Brustzellendifferenzierung ausüben.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass eine sojareiche asiatische Ernährungsweise möglicherweise protektive Effekte auf die Brustdrüse und das Fettgewebe ausüben kann. Isoflavone weisen eine sehr hohe Komplexität in ihrer Wirkung auf und spielen demnach eine wichtige Rolle bei der Ätiologie diverser Krankheiten wie Brustkrebs und Adipositas, die jedoch einer sehr differenzierten Betrachtungsweise und Bewertung bedarf.

8 Literaturverzeichnis

- Adgent, M., Daniels, J., Rogan, W., Adair, L., Edwards, L., Westreich, D., Maisonet, M., and Marcus, M. (2012). Early life soy exposure and age at menarche. *Paediatr. Perinat. Epidemiol.* 26, 163–175.
- Adlercreutz, H. (2002). Phytoestrogens and breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 83, 113–118.
- Adlercreutz, H., Markkanen, H., and Watanabe, S. (1993). Plasma concentrations of phytoestrogens in Japanese men. *The Lancet* 342, 1209–1210.
- Adlercreutz, H., van der Wildt, J., Kinzel, J., Attalla, H., Wähälä, K., Mäkelä, T., Hase, T., and Fotsis, T. (1995). Lignan and isoflavonoid conjugates in human urine. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 52, 97–103.
- Alekel, D.L., Genschel, U., Koehler, K.J., Hofmann, H., Van Loan, M.D., Beer, B.S., Hanson, L.N., Peterson, C.T., and Kurzer, M.S. (2014). Soy Isoflavones for Reducing Bone Loss Study: effects of a 3-year trial on hormones, adverse events, and endometrial thickness in postmenopausal women. *Menopause N. Y. N.*
- Allred, C.D., Allred, K.F., Ju, Y.H., Goepfing, T.S., Doerge, D.R., and Helferich, W.G. (2004a). Soy processing influences growth of estrogen-dependent breast cancer tumors. *Carcinogenesis* 25, 1649–1657.
- Allred, C.D., Allred, K.F., Ju, Y.H., Clausen, L.M., Doerge, D.R., Schantz, S.L., Korol, D.L., Wallig, M.A., and Helferich, W.G. (2004b). Dietary genistein results in larger MNU-induced, estrogen-dependent mammary tumors following ovariectomy of Sprague–Dawley rats. *Carcinogenesis* 25, 211–218.
- Anderson, D.C. (1974). Sex-hormone-binding globulin. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 3, 69–96.
- Anderson, G.L., and Neuhouser, M.L. (2012). Obesity and the Risk for Premenopausal and Postmenopausal Breast Cancer. *Cancer Prev. Res. (Phila. Pa.)* 5, 515–521.
- Anthony, M.S., Clarkson, T.B., and Williams, J.K. (1998). Effects of soy isoflavones on atherosclerosis: potential mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.* 68, 1390S – 1393S.
- Arai, Y., Uehara, M., Sato, Y., Kimura, M., Eboshida, A., Adlercreutz, H., and 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.
- De Assis, S., Warri, A., Benitez, C., Helferich, W., and Hilakivi-Clarke, L. (2011). Protective effects of prepubertal genistein exposure on mammary tumorigenesis are dependent on BRCA1 expression. *Cancer Prev. Res. Phila. Pa* 4, 1436–1448.
- Atkinson, C., Berman, S., Humbert, O., and Lampe, J.W. (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.
- Atkinson, C., Frankenfeld, C.L., and Lampe, J.W. (2005). Gut bacterial metabolism of the soy isoflavone daidzein: exploring the relevance to human health. *Exp. Biol. Med.* 230, 155–170.

- AVP, A. in der P. (2003). Therapieempfehlungen der Arzneimittelkommission der Deutschen Ärzteschaft: Hormon-Therapie im Klimakterium.
- Baker, L., Meldrum, K.K., Wang, M., Sankula, R., Vanam, R., Raiesdana, A., Tsai, B., Hile, K., Brown, J.W., and Meldrum, D.R. (2003). The role of estrogen in cardiovascular disease. *J. Surg. Res.* *115*, 325–344.
- Barkhem, T., Carlsson, B., Nilsson, Y., Enmark, E., Gustafsson, J.-Å., and Nilsson, S. (1998). Differential Response of Estrogen Receptor α and Estrogen Receptor β to Partial Estrogen Agonists/Antagonists. *Mol. Pharmacol.* *54*, 105–112.
- Barnes, S. (1997). The chemopreventive properties of soy isoflavonoids in animal models of breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* *46*, 169–179.
- Barnes, S., Boersma, B., Patel, R., Kirk, M., Darley-Usmar, V.M., Kim, H., and Xu, J. (2000). Isoflavonoids and chronic disease: mechanisms of action. *Biofactors* *12*, 209–215.
- Barrett, J.R. (2006). The Science of Soy: What Do We Really Know? *Environ. Health Perspect.* *114*, A352–A358.
- Bateman, H.L., and Patisaul, H.B. (2008). Disrupted female reproductive physiology following neonatal exposure to phytoestrogens or estrogen specific ligands is associated with decreased GnRH activation and kisspeptin fiber density in the hypothalamus. *NeuroToxicology* *29*, 988–997.
- Beral, V. (2003). Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* *362*, 419–427.
- Beral, V., Banks, E., and Reeves, G. (2002). Evidence from randomised trials on the long-term effects of hormone replacement therapy. *Lancet* *360*, 942–944.
- Bhagwat, S., Haytowitz, D.B., and Holden, J.M. (2008). USDA Database for the Isoflavone Content of Selected Foods Release 2.0. Md. US Dep. Agric. 15.
- Blei, T., Soukup, S.T., Schmalbach, K., Pudenz, M., Möller, F.J., Egert, B., Wörtz, A., Kurrat, A., Müller, D., Vollmer, G., et al. (2014). Dose-dependent effects of isoflavone exposure during early lifetime on the rat mammary gland: Studies on estrogen sensitivity, isoflavone metabolism and DNA methylation. *Mol. Nutr. Food Res.*(submitted)
- Bolca, S., Possemiers, S., Herregat, A., Huybrechts, I., Heyerick, A., Vriese, S.D., Verbruggen, M., Depypere, H., Keukeleire, D.D., Bracke, M., et al. (2007). Microbial and Dietary Factors Are Associated with the Equol Producer Phenotype in Healthy Postmenopausal Women. *J. Nutr.* *137*, 2242–2246.
- Boukouvalas, G., Antoniou, K., Papalex, E., and Kitraki, E. (2008). Post weaning high fat feeding affects rats' behavior and hypothalamic pituitary adrenal axis at the onset of puberty in a sexually dimorphic manner. *Neuroscience* *153*, 373–382.
- Bowey, E., Adlercreutz, H., and 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.

- Boyle, P., and Levin, B., International Agency for Research on Cancer (2008). World cancer report (Lyon: IARC Press).
- Branca, F. (2003). Dietary phyto-oestrogens and bone health. *Proc. Nutr. Soc.* 62, 877–887.
- Branca, F., and Lorenzetti, S. (2005). Health effects of phytoestrogens. *Forum Nutr.* 100–111.
- Breinholt, V., and Larsen, J.C. (1998). Detection of Weak Estrogenic Flavonoids Using a Recombinant Yeast Strain and a Modified MCF7 Cell Proliferation Assay. *Chem. Res. Toxicol.* 11, 622–629.
- Brink, E., Coxam, V., Robins, S., Wahala, K., Cassidy, A., Branca, F., and PHYTOS Investigators (2008). Long-term consumption of isoflavone-enriched foods does not affect bone mineral density, bone metabolism, or hormonal status in early postmenopausal women: a randomized, double-blind, placebo controlled study. *Am. J. Clin. Nutr.* 87, 761–770.
- Brockmann, T. (2011). Einfluss von Isoflavonen aus Soja als Nahrungsbestandteile auf ausgewählte Parameter der Hormon- und Organphysiologie der Ratte. Diplomarbeit. Technische Universität Dresden.
- Brown, K.A., and Simpson, E.R. (2010). Obesity and Breast Cancer: Progress to Understanding the Relationship. *Cancer Res.* 70, 4–7.
- Brown, A.M., Jeltsch, J.M., Roberts, M., and Chambon, P. (1984). Activation of pS2 gene transcription is a primary response to estrogen in the human breast cancer cell line MCF-7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 6344–6348.
- Brown, N.M., Belles, C.A., Lindley, S.L., Zimmer-Nechemias, L., Witte, D.P., Kim, M.-O., and Setchell, K.D.R. (2010). Mammary gland differentiation by early life exposure to enantiomers of the soy isoflavone metabolite equol. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 48, 3042–3050.
- Bundesinstitut für Risikobewertung (2007). Gesundheitliche Bewertung von Nahrungsergänzungsmitteln - BfR.
- Cabanes, A., Wang, M., Olivo, S., DeAssis, S., Gustafsson, J.-Å., Khan, G., and Hilakivi-Clarke, L. (2004). Prepubertal estradiol and genistein exposures up-regulate BRCA1 mRNA and reduce mammary tumorigenesis. *Carcinogenesis* 25, 741–748.
- Campbell, N.A., and Reece, J.B. (2006). *Biologie* (Pearson Studium).
- Carmignani, L.O., Pedro, A.O., Costa-Paiva, L.H.S. da, and Pinto-Neto, A.M. (2014). The effect of soy dietary supplement and low dose of hormone therapy on main cardiovascular health biomarkers: a randomized controlled trial. *Rev. Bras. Ginecol. E Obstetrícia Rev. Fed. Bras. Soc. Ginecol. E Obstetrícia* 36, 251–258.
- Casanova, M., You, L., Gaido, K.W., Archibeque-Engle, S., Janszen, D.B., and Heck, H.A. (1999). Developmental effects of dietary phytoestrogens in Sprague-Dawley rats and interactions of genistein and daidzein with rat estrogen receptors alpha and beta in vitro. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 51, 236–244.
- Cassidy, A. (2005). Dietary phyto-oestrogens: molecular mechanisms, bioavailability and importance to menopausal health. *Nutr. Res. Rev.* 18, 183.

- Cassidy, A., and Hooper, L. (2006). Phytoestrogens and cardiovascular disease. *J. Br. Menopause Soc.* *12*, 49–56.
- Cassidy, A., Bingham, S., and Setchell, K.D. (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.
- Cecchini, R.S., Costantino, J.P., Cauley, J.A., Cronin, W.M., Wickerham, D.L., Land, S.R., Weissfeld, J.L., and Wolmark, N. (2012). Body Mass Index and the Risk for Developing Invasive Breast Cancer among High-Risk Women in NSABP P-1 and STAR Breast Cancer Prevention Trials. *Cancer Prev. Res. (Phila. Pa.)* *5*, 583–592.
- Chico, Y., Fresnedo, O., Botham, K., Lacort, M., and Ochoa, B. (1996). Regulation of bile acid synthesis by estradiol and progesterone in primary cultures of rat hepatocytes. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes Off. J. Ger. Soc. Endocrinol. Ger. Diabetes Assoc.* *104*, 137–144.
- Choi, Y.H., Zhang, L., Lee, W.H., and Park, K.Y. (1998). Genistein-induced G2/M arrest is associated with the inhibition of cyclin B1 and the induction of p21 in human breast carcinoma cells. *Int. J. Oncol.*
- Chow, J., Tobias, J.H., Colston, K.W., and Chambers, T.J. (1992). Estrogen maintains trabecular bone volume in rats not only by suppression of bone resorption but also by stimulation of bone formation. *J. Clin. Invest.* *89*, 74–78.
- Chua, R., Anderson, K., Chen, J., and Hu, M. (2004). Quality, labeling accuracy, and cost comparison of purified soy isoflavonoid products. *J. Altern. Complement. Med.* *10*, 1053–1060.
- Chun, O.K., Chung, S.J., and Song, W.O. (2007). Estimated Dietary Flavonoid Intake and Major Food Sources of U.S. Adults. *J. Nutr.* *137*, 1244–1252.
- Clarke, D.B., Lloyd, A.S., Botting, N.P., Oldfield, M.F., Needs, P.W., and Wiseman, H. (2002). Measurement of intact sulfate and glucuronide phytoestrogen conjugates in human urine using isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry with [¹³C₃]isoflavone internal standards. *Anal. Biochem.* *309*, 158–172.
- Clarke, D.B., Barnes, K.A., Castle, L., Rose, M., Wilson, L.A., Baxter, M.J., Price, K.R., and DuPont, M.S. (2003). Levels of phytoestrogens, inorganic trace-elements, natural toxicants and nitrate in vegetarian duplicate diets. *Food Chem.* *81*, 287–300.
- Coldham, N.G., Darby, C., Hows, M., King, L.J., Zhang, A.-Q., and Sauer, M.J. (2002). Comparative metabolism of genistin by human and rat gut microflora: detection and identification of the end-products of metabolism. *Xenobiotica* *32*, 45–62.
- Conneely, O.M., Mulac-Jericevic, B., Lydon, J.P., and De Mayo, F.J. (2001). Reproductive functions of the progesterone receptor isoforms: lessons from knock-out mice. *Mol. Cell. Endocrinol.* *179*, 97–103.
- Cowley, S.M., and Parker, M.G. (1999). A comparison of transcriptional activation by ER alpha and ER beta. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *69*, 165–175.

- Crawford, S.L., Jackson, E.A., Churchill, L., Lampe, J.W., Leung, K., and Ockene, J.K. (2013). Impact of dose, frequency of administration, and equol production on efficacy of isoflavones for menopausal hot flashes: a pilot randomized trial. *Menopause N. Y. N* 20, 936–945.
- Cullinan-Bove, K., and Koos, R.D. (1993). Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in the rat uterus: rapid stimulation by estrogen correlates with estrogen-induced increases in uterine capillary permeability and growth. *Endocrinology* 133, 829–837.
- D'Anna, R., Cannata, M.L., Atteritano, M., Cancellieri, F., Corrado, F., Baviera, G., Triolo, O., Antico, F., Gaudio, A., Frisina, N., et al. (2007). Effects of the phytoestrogen genistein on hot flashes, endometrium, and vaginal epithelium in postmenopausal women: a 1-year randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Menopause* 14, 648–655.
- Davis, S.R., Castelo-Branco, C., Chedraui, P., Lumsden, M.A., Nappi, R.E., Shah, D., Villaseca, P., and Writing Group of the International Menopause Society for World Menopause Day 2012 (2012). Understanding weight gain at menopause. *Climacteric J. Int. Menopause Soc.* 15, 419–429.
- Day, A.J., Cañada, F.J., Díaz, J.C., Kroon, P.A., Mclauchlan, R., Faulds, C.B., Plumb, G.W., Morgan, M.R.A., and Williamson, G. (2000). Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett.* 468, 166–170.
- Degen, G.H., Janning, P., Diel, P., and Bolt, H.M. (2002). Estrogenic isoflavones in rodent diets. *Toxicol. Lett.* 128, 145–157.
- Delclos, K.B., Weis, C.C., Bucci, T.J., Olson, G., Mellick, P., Sadovova, N., Latendresse, J.R., Thorn, B., and Newbold, R.R. (2009). Overlapping but distinct effects of genistein and ethinyl estradiol (EE2) in female Sprague–Dawley rats in multigenerational reproductive and chronic toxicity studies. *Reprod. Toxicol.* 27, 117–132.
- Delmanto, A., Nahas-Neto, J., Traiman, P., Uemura, G., Pessoa, E.C., and Nahas, E.A.P. (2013). Effects of soy isoflavones on mammographic density and breast parenchyma in postmenopausal women: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Menopause N. Y. N* 20, 1049–1054.
- Delmonte, P., and Rader, J.I. (2006). Analysis of isoflavones in foods and dietary supplements. *J. AOAC Int.* 89, 1138–1146.
- DeSesso, J.M., and Jacobson, C.F. (2001). Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. *Food Chem. Toxicol.* 39, 209–228.
- DGE (2011). DGE-Position: Richtwerte für die Energiezufuhr aus Kohlenhydraten und Fett (Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V., Bonn).
- Diel, P., Olf, S., Schmidt, S., and Michna, H. (2001). Molecular Identification of Potential Selective Estrogen Receptor Modulator (SERM) Like Properties of Phytoestrogens in the Human Breast Cancer Cell Line MCF-7. *Planta Med.* 67, 510–514.
- Diel, P., Schmidt, S., and Vollmer, G. (2002). In vivo test systems for the quantitative and qualitative analysis of the biological activity of phytoestrogens. *J. Chromatogr. B* 777, 191–202.

- Diel, P., Schmidt, S., Vollmer, G., Janning, P., Upmeier, A., Michna, H., Bolt, H.M., and Degen, G.H. (2004a). Comparative responses of three rat strains (DA/Han, Sprague-Dawley and Wistar) to treatment with environmental estrogens. *Arch. Toxicol.* 78, 183–193.
- Diel, P., Geis, R.-B., Caldarelli, A., Schmidt, S., Leschowsky, U.L., Voss, A., and Vollmer, G. (2004b). The differential ability of the phytoestrogen genistein and of estradiol to induce uterine weight and proliferation in the rat is associated with a substance specific modulation of uterine gene expression. *Mol. Cell. Endocrinol.* 221, 21–32.
- Diel, P., Hertrampf, T., Seibel, J., Laudenschlager, U., Kolba, S., and Vollmer, G. (2006). Combinatorial effects of the phytoestrogen genistein and of estradiol in uterus and liver of female Wistar rats. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 102, 60–70.
- Dixon, R.A. (2004). Phytoestrogens. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 225–261.
- Doerge, D.R., Chang, H.C., Churchwell, M.I., and Holder, C.L. (2000). Analysis of Soy Isoflavone Conjugation In Vitro and in Human Blood Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Drug Metab. Dispos.* 28, 298–307.
- Doerge, D.R., Twaddle, N.C., Churchwell, M.I., Newbold, R.R., and Delclos, K.B. (2006). Lactational transfer of the soy isoflavone, genistein, in Sprague-Dawley rats consuming dietary genistein. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* 21, 307–312.
- Dong, J.-Y., and Qin, L.-Q. (2011). Soy isoflavones consumption and risk of breast cancer incidence or recurrence: a meta-analysis of prospective studies. *Breast Cancer Res. Treat.* 125, 315–323.
- Dorward, A.M., Shultz, K.L., and Beamer, W.G. (2007). LH analog and dietary isoflavones support ovarian granulosa cell tumor development in a spontaneous mouse model. *Endocr. Relat. Cancer* 14, 369–379.
- Eden, J.A. (2012). Phytoestrogens for menopausal symptoms: A review. *Maturitas* 72, 157–159.
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) (2012). EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA); Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to soy isoflavones and maintenance of bone mineral density (ID 1655) and reduction of vasomotor symptoms associated with menopause (ID 1654, 1704, 2140, 3093, 3154, 3590)(further assessment) pursuant to Article 13 (1) of Regulation (EC) No 1924/2006 (European Food Safety Authority).
- Eisenbrand, G. (2006). DFG-Senatskommission zur Beurteilung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von Lebensmitteln.
- Eisenbrand, G. (2007). Isoflavones as phytoestrogens in food supplements and dietary foods for special medical purposes (Senate Commission on Food Safety (SKLM) of the German Research Foundation (DFG)).
- Enck, P., Merlin, V., Erckenbrecht, J.F., and Wienbeck, M. (1989). Stress effects on gastrointestinal transit in the rat. *Gut* 30, 455–459.

- Van Erp-Baart, M.-A.J., Brants, H.A.M., Kiely, M., Mulligan, A., Turrini, A., Sermoneta, C., Kilkkinen, A., and Valsta, L.M. (2003). Isoflavone intake in four different European countries: the VENUS approach. *Br. J. Nutr.* 89 *Suppl 1*, S25–S30.
- Evans, R.M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889–895.
- Faber, K.A., and Hughes, C.L., Jr (1993). Dose-response characteristics of neonatal exposure to genistein on pituitary responsiveness to gonadotropin releasing hormone and volume of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area (SDN-POA) in postpubertal castrated female rats. *Reprod. Toxicol. Elmsford N 7*, 35–39.
- Fan, J.D., Wagner, B.L., and McDonnell, D.P. (1996). Identification of the sequences within the human complement 3 promoter required for estrogen responsiveness provides insight into the mechanism of tamoxifen mixed agonist activity. *Mol. Endocrinol.* 10, 1605–1616.
- Ferguson, D.J., and Anderson, T.J. (1981). Morphological evaluation of cell turnover in relation to the menstrual cycle in the “resting” human breast. *Br. J. Cancer* 44, 177–181.
- Ferrari, A. (2009). Soy extract phytoestrogens with high dose of isoflavones for menopausal symptoms. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 35, 1083–1090.
- Fiebig, H.-J. (2011). Fettsäurezusammensetzung wichtiger pflanzlicher und tierischer Speisefette und -öle.
- Forouzanfar, M.H., Foreman, K.J., Delossantos, A.M., Lozano, R., Lopez, A.D., Murray, C.J., and Naghavi, M. (2011). Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *The Lancet* 378, 1461–1484.
- Fotsis, T., Pepper, M., Adlercreutz, H., Fleischmann, G., Hase, T., Montesano, R., and Schweigerer, L. (1993). Genistein, a dietary-derived inhibitor of in vitro angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 2690–2694.
- Fotsis, T., Pepper, M., Adlercreutz, H., Hase, T., Montesano, R., and Schweigerer, L. (1995). Genistein, a Dietary Ingested Isoflavonoid, Inhibits Cell Proliferation and In Vitro Angiogenesis. *J. Nutr.* 125, 790S – 797S.
- Franke, A.A., and Custer, L.J. (1996). Daidzein and genistein concentrations in human milk after soy consumption. *Clin. Chem.* 42, 955–964.
- Fredriks, A.M., van Buuren, S., Burgmeijer, R.J., Meulmeester, J.F., Beuker, R.J., Brugman, E., Roede, M.J., Verloove-Vanhorick, S.P., and Wit, J.M. (2000). Continuing positive secular growth change in The Netherlands 1955-1997. *Pediatr. Res.* 47, 316–323.
- Frisch, R.E., Hegsted, D.M., and Yoshinaga, K. (1975). Body weight and food intake at early estrus of rats on a high-fat diet. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72, 4172–4176.
- Fungfuang, W., Nakao, N., Nakada, T., Yokosuka, M., and Saito, T.R. (2013). Early onset of reproductive function in female rats treated with a high-fat diet. *J. Vet. Med. Sci. Jpn. Soc. Vet. Sci.* 75, 523–526.
- Galien, R., and Garcia, T. (1997). Estrogen receptor impairs interleukin-6 expression by preventing protein binding on the NF- κ B site. *Nucleic Acids Res.* 25, 2424–2429.

Gallo, D., Giacomelli, S., Cantelmo, F., Zannoni, G.F., Ferrandina, G., Fruscella, E., Riva, A., Morazzoni, P., Bombardelli, E., Mancuso, S., et al. (2001). Chemoprevention of DMBA-induced mammary cancer in rats by dietary soy. *Breast Cancer Res. Treat.* *69*, 153–164.

Garnero, P., Sornay-Rendu, E., Chapuy, M.-C., and Delmas, P.D. (1996). Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis. *J. Bone Miner. Res.* *11*, 337–349.

Gencel, V.B., Benjamin, M.M., Bahou, S.N., and Khalil, R.A. (2012). Vascular effects of phytoestrogens and alternative menopausal hormone therapy in cardiovascular disease. *Mini Rev. Med. Chem.* *12*, 149–174.

Georg J Krinke, Gillian Bullock, and Tracie Bunton (2000). *The Handbook of Experimental Animals Series, The Laboratory Rat* (Academic Press).

Gerhauser, C. (2014). Epigenetics, (poly) phenolics and cancer prevention. In *Recent Advances in Polyphenol Research*, (UK: Wiley-Blackwell),.

Geyer, H., Parr, M.K., Mareck, U., Reinhart, U., Schrader, Y., and Schanzer, W. (2004). Analysis of non-hormonal nutritional supplements for anabolic-androgenic steroids-results of an international study. *Int. J. Sports Med.* *25*, 124–129.

Giangrande, P.H., and McDonnell, D.P. (1999). The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene. *Recent Prog. Horm. Res.* *54*, 291–313; discussion 313–314.

Giangrande, P.H., Kimbrel, E.A., Edwards, D.P., and McDonnell, D.P. (2000). The Opposing Transcriptional Activities of the Two Isoforms of the Human Progesterone Receptor Are Due to Differential Cofactor Binding. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 3102–3115.

Golub, M.S., Collman, G.W., Foster, P.M.D., Kimmel, C.A., Rajpert-De Meyts, E., Reiter, E.O., Sharpe, R.M., Skakkebaek, N.E., and Toppari, J. (2008). Public health implications of altered puberty timing. *Pediatrics* *121 Suppl 3*, S218–S230.

Goodman-Gruen, D., and Kritz-Silverstein, D. (2003). Usual dietary isoflavone intake and body composition in postmenopausal women: *Menopause* *10*, 427–432.

Graham, J.D., and Clarke, C.L. (1997). Physiological Action of Progesterone in Target Tissues 1. *Endocr. Rev.* *18*, 502–519.

Granger, D.N., Barrowman, J.A., and Kviety, P.R. (1985). *Clinical gastrointestinal physiology* (Saunders).

Griffith, A.P., and Collison, M.W. (2001). Improved methods for the extraction and analysis of isoflavones from soy-containing foods and nutritional supplements by reversed-phase high-performance liquid chromatography and liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* *913*, 397–413.

Gruber, C.J., Tschugguel, W., Schneeberger, C., and Huber, J.C. (2002). Production and Actions of Estrogens. *N. Engl. J. Med.* *346*, 340–352.

- Gry, J., Black, L., Eriksen, F.D., Pilegaard, K., Plumb, J., Rhodes, M., Sheehan, D., Kiely, M., and Kroon, P.A. (2007). EuroFIR-BASIS – a combined composition and biological activity database for bioactive compounds in plant-based foods. *Trends Food Sci. Technol.* *18*, 434–444.
- Guerrero-Bosagna, C.M., Sabat, P., Valdovinos, F.S., Valladares, L.E., and Clark, S.J. (2008). Epigenetic and phenotypic changes result from a continuous pre and post natal dietary exposure to phytoestrogens in an experimental population of mice. *BMC Physiol.* *8*, 17.
- Gustafsson, J.A. (1999). Estrogen receptor beta--a new dimension in estrogen mechanism of action. *J. Endocrinol.* *163*, 379–383.
- Hall, J.M., and McDonnell, D.P. (1999). The Estrogen Receptor β -Isoform (ER β) of the Human Estrogen Receptor Modulates ER α Transcriptional Activity and Is a Key Regulator of the Cellular Response to Estrogens and Antiestrogens. *Endocrinology* *140*, 5566–5578.
- Hargreaves, D.F., Potten, C.S., Harding, C., Shaw, L.E., Morton, M.S., Roberts, S.A., Howell, A., and Bundred, N.J. (1999). Two-week dietary soy supplementation has an estrogenic effect on normal premenopausal breast. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *84*, 4017–4024.
- Harkness, J.E., Turner, P.V., VandeWoude, S., and Wheler, C.L. (2010). Harkness and Wagner's Biology and Medicine of Rabbits and Rodents (Wiley-Blackwell).
- Heldring, N., Pike, A., Andersson, S., Matthews, J., Cheng, G., Hartman, J., Tujague, M., Ström, A., Treuter, E., Warner, M., et al. (2007). Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets. *Physiol. Rev.* *87*, 905–931.
- Henderson, B.E., and Feigelson, H.S. (2000). Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis* *21*, 427–433.
- Henderson, B.E., Ross, R.K., Judd, H.L., Krailo, M.D., and Pike, M.C. (1985). Do regular ovulatory cycles increase breast cancer risk? *Cancer* *56*, 1206–1208.
- Henry, H.L., and Norman, A.W. (2003). *Encyclopedia of hormones* (Academic Press).
- Hertrampf, T., Schmidt, S., Seibel, J., Laudénbach-Leschowsky, U., Degen, G.H., and Diel, P. (2006). Effects of Genistein on the Mammary Gland Proliferation of Adult Ovariectomised Wistar Rats. *Planta Med.* *72*, 304–310.
- Hertrampf, T., Gruca, M.J., Seibel, J., Laudénbach, U., Fritzemeier, K.H., and Diel, P. (2007). The bone-protective effect of the phytoestrogen genistein is mediated via ER α -dependent mechanisms and strongly enhanced by physical activity. *Bone* *40*, 1529–1535.
- Hertrampf, T., Schleipen, B., Velders, M., Laudénbach, U., Fritzemeier, K.H., and Diel, P. (2008). Estrogen receptor subtype-specific effects on markers of bone homeostasis. *Mol. Cell. Endocrinol.* *291*, 104–108.
- Hertrampf, T., Ledwig, C., Kulling, S., Molzberger, A., Möller, F.J., Zierau, O., Vollmer, G., Moors, S., Degen, G.H., and Diel, P. (2009). Responses of estrogen sensitive tissues in female Wistar rats to pre- and postnatal isoflavone exposure. *Toxicol. Lett.* *191*, 181–188.

Hewitt, S.C., Deroo, B.J., Hansen, K., Collins, J., Grissom, S., Afshari, C.A., and Korach, K.S. (2003). Estrogen receptor-dependent genomic responses in the uterus mirror the biphasic physiological response to estrogen. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *17*, 2070–2083.

Hilakivi-Clarke, L., Clarke, R., Onojafe, I., Raygada, M., Cho, E., and Lippman, M. (1997a). A maternal diet high in n – 6 polyunsaturated fats alters mammary gland development, puberty onset, and breast cancer risk among female rat offspring. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *94*, 9372–9377.

Hilakivi-Clarke, L., Cho, E., Raygada, M., and Kenney, N. (1997b). Alterations in mammary gland development following neonatal exposure to estradiol, transforming growth factor alpha, and estrogen receptor antagonist ICI 182,780. *J. Cell. Physiol.* *170*, 279–289.

Hilakivi-Clarke, L., Onojafe, I., Raygada, M., Cho, E., Skaar, T., Russo, I., and Clarke, R. (1999a). Prepubertal exposure to zearalenone or genistein reduces mammary tumorigenesis. *Br. J. Cancer* *80*, 1682–1688.

Hilakivi-Clarke, L., Cho, E., Onojafe, I., Raygada, M., and Clarke, R. (1999b). Maternal exposure to genistein during pregnancy increases carcinogen-induced mammary tumorigenesis in female rat offspring. *Oncol. Rep.* *6*, 1089–1095.

Homma, H., Kurachi, H., Nishio, Y., Takeda, T., Yamamoto, T., Adachi, K., Morishige, K., Ohmichi, M., Matsuzawa, Y., and Murata, Y. (2000). Estrogen suppresses transcription of lipoprotein lipase gene. Existence of a unique estrogen response element on the lipoprotein lipase promoter. *J. Biol. Chem.* *275*, 11404–11411.

Hooper, L., Ryder, J.J., Kurzer, M.S., Lampe, J.W., Messina, M.J., Phipps, W.R., and Cassidy, A. (2009). Effects of soy protein and isoflavones on circulating hormone concentrations in pre- and post-menopausal women: a systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod. Update* *15*, 423–440.

Hooper, L., Madhavan, G., Tice, J.A., Leinster, S.J., and Cassidy, A. (2010). Effects of isoflavones on breast density in pre- and post-menopausal women: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Hum. Reprod. Update* *16*, 745–760.

Horn-Ross, P.L., John, E.M., Lee, M., Stewart, S.L., Koo, J., Sakoda, L.C., Shiau, A.C., Goldstein, J., Davis, P., and Perez-Stable, E.J. (2001). Phytoestrogen Consumption and Breast Cancer Risk in a Multiethnic Population The Bay Area Breast Cancer Study. *Am. J. Epidemiol.* *154*, 434–441.

Horn-Ross, P.L., Barnes, S., Lee, V.S., Collins, C.N., Reynolds, P., Lee, M.M., Stewart, S.L., Canchola, A.J., Wilson, L., and Jones, K. (2006). Reliability and Validity of an Assessment of Usual Phytoestrogen Consumption (United States). *Cancer Causes Control* *17*, 85–93.

Horwitz, K.B., and Alexander, P.S. (1983). In Situ Photolinked Nuclear Progesterone Receptors of Human Breast Cancer Cells: Subunit Molecular Weights after Transformation and Translocation*. *Endocrinology* *113*, 2195–2201.

Hosoda, K., Furuta, T., Yokokawa, A., and Ishii, K. (2010). Identification and quantification of daidzein-7-glucuronide-4'-sulfate, genistein-7-glucuronide-4'-sulfate and genistein-4',7-diglucuronide as major metabolites in human plasma after administration of kinako. *Anal. Bioanal. Chem.* *397*, 1563–1572.

- Hsieh, C.-Y., Santell, R.C., Haslam, S.Z., and Helferich, W.G. (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.
- Huang, J., Plass, C., and Gerhauser, C. (2011). Cancer chemoprevention by targeting the epigenome. *Curr. Drug Targets* *12*, 1925–1956.
- Hulka, B.S., and Moorman, P.G. (2001). Breast cancer: hormones and other risk factors. *Maturitas* *38*, 103–113.
- Hwang, C.S., Kwak, H.S., Lim, H.J., Lee, S.H., Kang, Y.S., Choe, T.B., Hur, H.G., and Han, K.O. (2006). Isoflavone metabolites and their in vitro dual functions: They can act as an estrogenic agonist or antagonist depending on the estrogen concentration. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *101*, 246–253.
- Iwasaki, M., and Tsugane, S. (2011). Risk factors for breast cancer: epidemiological evidence from Japanese studies. *Cancer Sci.* *102*, 1607–1614.
- Iwasaki, M., Inoue, M., Otani, T., Sasazuki, S., Kurahashi, N., Miura, T., Yamamoto, S., and Tsugane, S. (2008). Plasma Isoflavone Level and Subsequent Risk of Breast Cancer Among Japanese Women: A Nested Case-Control Study From the Japan Public Health Center-Based Prospective Study Group. *J. Clin. Oncol.* *26*, 1677–1683.
- Jablonski, E.M., McConnell, N.A., Hughes, F.M., Jr, and Huet-Hudson, Y.M. (2003). Estrogen regulation of aquaporins in the mouse uterus: potential roles in uterine water movement. *Biol. Reprod.* *69*, 1481–1487.
- Jasik, C.B., and Lustig, R.H. (2008). Adolescent obesity and puberty: the “perfect storm.” *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1135*, 265–279.
- Jefferson, W.N., Padilla-Banks, E., and Newbold, R.R. (2005). Adverse effects on female development and reproduction in CD-1 mice following neonatal exposure to the phytoestrogen genistein at environmentally relevant doses. *Biol. Reprod.* *73*, 798–806.
- Jefferson, W.N., Padilla-Banks, E., and Newbold, R.R. (2007). Disruption of the developing female reproductive system by phytoestrogens: Genistein as an example. *Mol. Nutr. Food Res.* *51*, 832–844.
- Jefferson, W.N., Patisaul, H.B., and Williams, C.J. (2012). Reproductive consequences of developmental phytoestrogen exposure. *Reproduction* *143*, 247–260.
- Jenkins, S., Betancourt, A.M., Wang, J., and Lamartiniere, C.A. (2012). Endocrine-active chemicals in mammary cancer causation and prevention. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *129*, 191–200.
- Jones, J.L., Daley, B.J., Enderson, B.L., Zhou, J.-R., and Karlstad, M.D. (2002). Genistein inhibits tamoxifen effects on cell proliferation and cell cycle arrest in T47D breast cancer cells. *Am. Surg.* *68*, 575–577; discussion 577–578.
- Jones, M.E., Thorburn, A.W., Britt, K.L., Hewitt, K.N., Wreford, N.G., Proietto, J., Oz, O.K., Leury, B.J., Robertson, K.M., Yao, S., et al. (2000). Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 12735–12740.

- Ju, Y.H., Doerge, D.R., Allred, K.F., Allred, C.D., and Helferich, W.G. (2002). Dietary Genistein Negates the Inhibitory Effect of Tamoxifen on Growth of Estrogen-dependent Human Breast Cancer (MCF-7) Cells Implanted in Athymic Mice. *Cancer Res.* 62, 2474–2477.
- Ju, Y.H., Allred, K.F., Allred, C.D., and Helferich, W.G. (2006). Genistein stimulates growth of human breast cancer cells in a novel, postmenopausal animal model, with low plasma estradiol concentrations. *Carcinogenesis* 27, 1292–1299.
- Juul, A., Teilmann, G., Scheike, T., Hertel, N.T., Holm, K., Laursen, E.M., Main, K.M., and Skakkebaek, N.E. (2006). Pubertal development in Danish children: comparison of recent European and US data. *Int. J. Androl.* 29, 247–255.
- Kano, M., Takayanagi, T., Harada, K., Sawada, S., and Ishikawa, F. (2006). Bioavailability of Isoflavones after Ingestion of Soy Beverages in Healthy Adults. *J. Nutr.* 136, 2291–2296.
- Kastner, P., Krust, A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H., and Chambon, P. (1990). Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J.* 9, 1603.
- Keinan-Boker, L., Peeters, P., Mulligan, A., Navarro, C., Slimani, N., Mattisson, I., Lundin, E., McTaggart, A., Allen, N., Overvad, K., et al. (2002). Soy product consumption in 10 European countries: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Public Health Nutr.* 5, 1217–1226.
- Kennedy, G.C., and Mitra, J. (1963). Body weight and food intake as initiating factors for puberty in the rat. *J. Physiol.* 166, 408–418.
- Key, T., Appleby, P., Barnes, I., Reeves, G., and Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group (2002). Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. *J. Natl. Cancer Inst.* 94, 606–616.
- Khosla, S., Melton, L.J., 3rd, Atkinson, E.J., O’Fallon, W.M., Klee, G.G., and Riggs, B.L. (1998). Relationship of serum sex steroid levels and bone turnover markers with bone mineral density in men and women: a key role for bioavailable estrogen. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 2266–2274.
- Kim, S.H., and Park, M.J. (2012). Effects of phytoestrogen on sexual development. *Korean J. Pediatr.* 55, 265–271.
- Kim, H.-K., Nelson-Dooley, C., Della-Fera, M.A., Yang, J.-Y., Zhang, W., Duan, J., Hartzell, D.L., Hamrick, M.W., and Baile, C.A. (2006). Genistein decreases food intake, body weight, and fat pad weight and causes adipose tissue apoptosis in ovariectomized female mice. *J. Nutr.* 136, 409–414.
- Kim, S.H., Jung, W.S., Ahn, J.K., and Chung, I.M. (2005). Analysis of isoflavone concentration and composition in soybean [*Glycine max* (L.)] seeds between the cropping year and storage for 3 years. *Eur. Food Res. Technol.* 220, 207–214.
- Kirk, E.A., Sutherland, P., Wang, S.A., Chait, A., and LeBoeuf, R.C. (1998). Dietary Isoflavones Reduce Plasma Cholesterol and Atherosclerosis in C57BL/6 Mice but not LDL Receptor-Deficient Mice. *J. Nutr.* 128, 954–959.

- Kirtley, D., and Maher, R. (1979). Effect of an isocaloric high fat diet on initiation of puberty in Osborne-Mendel rats. *Biol. Reprod.* *21*, 331–338.
- Kitaya, K., Yasuo, T., Yamaguchi, T., Fushiki, S., and Honjo, H. (2007). Genes regulated by interferon-gamma in human uterine microvascular endothelial cells. *Int. J. Mol. Med.* *20*, 689–697.
- Knight, D.C., and Eden, J.A. (1996). A review of the clinical effects of phytoestrogens. *Obstet. Gynecol.* *87*, 897–904.
- Knight, D.C., Howes, J.B., Eden, J.A., and Howes, L.G. (2001). Effects on menopausal symptoms and acceptability of isoflavone-containing soy powder dietary supplementation. *Climacteric J. Int. Menopause Soc.* *4*, 13–18.
- Ko, T.-F., Tsai, H.-S., Lin, S.-M., Liu, C.-D., Learn, S.-P., and Chiou, R.Y.Y. (2010). GC-MS Determined Distribution of Urinary Equol Producers as Affected by Age, Gender, and Repeated Ingestions of Soymilk. *J. Food Sci.* *75*, H306–H310.
- Kouki, T., Kishitake, M., Okamoto, M., Oosuka, I., Takebe, M., and Yamanouchi, K. (2003). Effects of neonatal treatment with phytoestrogens, genistein and daidzein, on sex difference in female rat brain function: estrous cycle and lordosis. *Horm. Behav.* *44*, 140–145.
- Kovanen, P.T. (1987). Regulation of plasma cholesterol by hepatic low-density lipoprotein receptors. *Am. Heart J.* *113*, 464–469.
- Kraus, W.L., and Katzenellenbogen, B.S. (1993). Regulation of progesterone receptor gene expression and growth in the rat uterus: modulation of estrogen actions by progesterone and sex steroid hormone antagonists. *Endocrinology* *132*, 2371–2379.
- Kraus, W.L., Montano, M.M., and Katzenellenbogen, B.S. (1994). Identification of multiple, widely spaced estrogen-responsive regions in the rat progesterone receptor gene. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *8*, 952–969.
- Kuiper, G.G., Carlsson, B.O., Grandien, K.A.J., Enmark, E., Häggblad, J., Nilsson, S., and Gustafsson, J.-A. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology* *138*, 863–870.
- Kuiper, G.G.J.M., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., van der Saag, P.T., van der Burg, B., and Gustafsson, J.-Å. (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor β . *Endocrinology* *139*, 4252–4263.
- Kulling, S.E., and Watzl, B. (2003). Phytoöstrogene. *Heft 6*.
- Kulling, S., and Lehmann, L. (2014). Isoflavone und ihre Wirkung: Datenlage und aktuelle Forschungsprojekte. *Lebensmittelchemie* *68*, 62–66.
- Kulling, S.E., Honig, D.M., Simat, T.J., and Metzler, M. (2000). Oxidative in Vitro Metabolism of the Soy Phytoestrogens Daidzein and Genistein. *J. Agric. Food Chem.* *48*, 4963–4972.
- Kulling, S.E., Honig, D.M., and 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.

- Kupfer, D. (1987). Critical evaluation of methods for detection and assessment of estrogenic compounds in mammals: strengths and limitations for application to risk assessment. *Reprod. Toxicol. Elmsford N I*, 147–153.
- Kurki, P., Vanderlaan, M., Dolbeare, F., Gray, J., and Tan, E.M. (1986). Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin during the cell cycle. *Exp. Cell Res. 166*, 209–219.
- Kyselova, V., Peknicova, J., Boubelik, M., and Buckiova, D. (2004). Body and organ weight, sperm acrosomal status and reproduction after genistein and diethylstilbestrol treatment of CD1 mice in a multigenerational study. *Theriogenology 61*, 1307–1325.
- Lagari, V.S., and Levis, S. (2014). Phytoestrogens for menopausal bone loss and climacteric symptoms. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 139*, 294–301.
- Lamartiniere, C.A. (2000). Protection against breast cancer with genistein: a component of soy. *Am. J. Clin. Nutr. 71*, 1705s – 1707s.
- Lamartiniere, C.A. (2002). Timing of exposure and mammary cancer risk. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 7*, 67–76.
- Lamartiniere, C.A., Zhang, J.X., and Cotroneo, M.S. (1998a). Genistein studies in rats: potential for breast cancer prevention and reproductive and developmental toxicity. *Am. J. Clin. Nutr. 68*, 1400S – 1405S.
- Lamartiniere, C.A., Murrill, W.B., Manzillo, P.A., Zhang, J.X., Barnes, S., Zhang, X., Wei, H., and Brown, N.M. (1998b). Genistein alters the ontogeny of mammary gland development and protects against chemically-induced mammary cancer in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N 217*, 358–364.
- Lamartiniere, C.A., Cotroneo, M.S., Fritz, W.A., Wang, J., Mentor-Marcel, R., and Elgavish, A. (2002). Genistein Chemoprevention: Timing and Mechanisms of Action in Murine Mammary and Prostate. *J. Nutr. 132*, 552S – 558S.
- Lampe, J.W. (2009). Is equol the key to the efficacy of soy foods? *Am. J. Clin. Nutr. 89*, 1664S – 1667S.
- Lampe, J.W., Karr, S.C., Hutchins, A.M., and Slavin, J.L. (1998). Urinary equol excretion with a soy challenge: influence of habitual diet. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N 217*, 335–339.
- Larionov, A.A., Vasyliiev, D.A., Mason, J.I., Howie, A.F., Berstein, L.M., and Miller, W.R. (2003). Aromatase in skeletal muscle. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 84*, 485–492.
- Lee, H.P., Lee, J., Gourley, L., Duffy, S.W., Day, N.E., and Estève, J. (1991). Dietary effects on breast-cancer risk in Singapore. *The Lancet 337*, 1197–1200.
- Lee, J.M., Appugliese, D., Kaciroti, N., Corwyn, R.F., Bradley, R.H., and Lumeng, J.C. (2007). Weight status in young girls and the onset of puberty. *Pediatrics 119*, e624–e630.
- Lee, S.-A., Shu, X.-O., Li, H., Yang, G., Cai, H., Wen, W., Ji, B.-T., Gao, J., Gao, Y.-T., and Zheng, W. (2009). Adolescent and adult soy food intake and breast cancer risk: results from the Shanghai Women’s Health Study. *Am. J. Clin. Nutr. 89*, 1920–1926.

- Lee, S.J., Ahn, J.K., Kim, S.H., Kim, J.T., Han, S.J., Jung, M.Y., and Chung, I.M. (2003). Variation in Isoflavone of Soybean Cultivars with Location and Storage Duration. *J. Agric. Food Chem.* *51*, 3382–3389.
- Lee, W.S., Harder, J.A., Yoshizumi, M., Lee, M.E., and Haber, E. (1997). Progesterone inhibits arterial smooth muscle cell proliferation. *Nat. Med.* *3*, 1005–1008.
- Leibowitz, S.F., Akabayashi, A., Alexander, J., Karatayev, O., and Chang, G.-Q. (2009). Puberty onset in female rats: relationship with fat intake, ovarian steroids and the peptides, galanin and enkephalin, in the paraventricular and medial preoptic nuclei. *J. Neuroendocrinol.* *21*, 538–549.
- Leidenberger, F. (2009). *Klinische Endokrinologie für Frauenärzte* (Heidelberg: Springer Medizin Verlag).
- Lethaby, A., Marjoribanks, J., Kronenberg, F., Roberts, H., Eden, J., and Brown, J. (2013). Phytoestrogens for menopausal vasomotor symptoms. *Cochrane Database Syst. Rev.* *12*, CD001395.
- Levi, F., Lucchini, F., and La Vecchia, C. (1994). Worldwide patterns of cancer mortality, 1985-89. *Eur. J. Cancer Prev. Off. J. Eur. Cancer Prev. Organ. ECP* *3*, 109–143.
- Lewis, R.W., Brooks, N., Milburn, G.M., Soames, A., Stone, S., Hall, M., and Ashby, J. (2003). The Effects of the Phytoestrogen Genistein on the Postnatal Development of the Rat. *Toxicol. Sci.* *71*, 74–83.
- Ley, C.J., Lees, B., and Stevenson, J.C. (1992). Sex- and menopause-associated changes in body-fat distribution. *Am. J. Clin. Nutr.* *55*, 950–954.
- Li, Y., Upadhyay, S., Bhuiyan, M., and Sarkar, F.H. (1999). Induction of apoptosis in breast cancer cells MDA-MB-231 by genistein. *Oncogene* *18*.
- Li, Y., Liu, L., Andrews, L.G., and Tollefsbol, T.O. (2009). Genistein depletes telomerase activity through cross-talk between genetic and epigenetic mechanisms. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *125*, 286–296.
- Liggins, J., Bluck, L.J.C., Runswick, S., Atkinson, C., Coward, W.A., and Bingham, S.A. (2000). Daidzein and genistein contents of vegetables. *Br. J. Nutr.* *84*, 717–725.
- Limer, J.L., and Speirs, V. (2004). Phyto-oestrogens and breast cancer chemoprevention. *Breast Cancer Res.* *6*, 119–132.
- Limer, J.L., Parkes, A.T., and Speirs, V. (2006). Differential response to phytoestrogens in endocrine sensitive and resistant breast cancer cells in vitro. *Int. J. Cancer* *119*, 515–521.
- Liu, B., Edgerton, S., Yang, X., Kim, A., Ordonez-Ercan, D., Mason, T., Alvarez, K., McKimmey, C., Liu, N., and Thor, A. (2005). Low-Dose Dietary Phytoestrogen Abrogates Tamoxifen-Associated Mammary Tumor Prevention. *Cancer Res.* *65*, 879–886.
- Liu, Z., Zhang, X., Li, L., Zhang, W., Cui, W., Song, Y., Wang, W., Jia, X., Li, N., and Yan, W. (2008). Effects of Lactational Exposure to Soy Isoflavones on Reproductive System in Neonatal Female Rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* *102*, 317–324.

- Lobenhofer, E.K., Bennett, L., Cable, P.L., Li, L., Bushel, P.R., and Afshari, C.A. (2002). Regulation of DNA replication fork genes by 17beta-estradiol. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 16, 1215–1229.
- Löffler, G., Petrides, P.E., and Heinrich, P.C. (2007). *Biochemie und Pathobiochemie* (Heidelberg: Springer Medizin Verlag).
- Longcope, C., Franz, C., Morello, C., Baker, R., and Johnston Jr, C.C. (1986). Steroid and gonadotropin levels in women during the peri-menopausal years. *Maturitas* 8, 189–196.
- Lydon, J.P., DeMayo, F.J., Funk, C.R., Mani, S.K., Hughes, A.R., Montgomery, C.A., Shyamala, G., Conneely, O.M., and O'Malley, B.W. (1995). Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev.* 9, 2266–2278.
- Mangal, R.K., Wiehle, R.D., Poindexter, A.N., and Weigel, N.L. (1997). Differential expression of uterine progesterone receptor forms A and B during the menstrual cycle. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 63, 195–202.
- Manolagas, S.C. (2000). Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis. *Endocr. Rev.* 21, 115–137.
- Martin, V., Ribieras, S., Song-Wang, X., Rio, M.C., and Dante, R. (1995). Genomic sequencing indicates a correlation between DNA hypomethylation in the 5' region of the pS2 gene and its expression in human breast cancer cell lines. *Gene* 157, 261–264.
- Martin, V., Ribieras, S., Song-Wang, X.G., Lasne, Y., Frappart, L., Rio, M.C., and Dante, R. (1997). Involvement of DNA methylation in the control of the expression of an estrogen-induced breast-cancer-associated protein (pS2) in human breast cancers. *J. Cell. Biochem.* 65, 95–106.
- Mathias, K., Ismail, B., Corvalan, C.M., and Hayes, K.D. (2006). Heat and pH Effects on the Conjugated Forms of Genistin and Daidzin Isoflavones. *J. Agric. Food Chem.* 54, 7495–7502.
- Maubach, J., Bracke, M.E., Heyerick, A., Depypere, H.T., Serreyn, R.F., Mareel, M.M., and De Keukeleire, D. (2003). Quantitation of soy-derived phytoestrogens in human breast tissue and biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 784, 137–144.
- Maxwell, S.R. (1998). Women and heart disease. *Basic Res. Cardiol.* 93 Suppl 2, 79–84.
- McMichael-Phillips, D.F., Harding, C., Morton, M., Roberts, S.A., Howell, A., Potten, C.S., and Bundred, N.J. (1998). Effects of soy-protein supplementation on epithelial proliferation in the histologically normal human breast. *Am. J. Clin. Nutr.* 68, 1431S – 1435S.
- Medjakovic, S., Mueller, M., and Jungbauer, A. (2010). Potential Health-modulating Effects of Isoflavones and Metabolites via Activation of PPAR and AhR. *Nutrients* 2, 241–279.
- Medvedovic, M., Gear, R., Freudenberg, J.M., Schneider, J., Bornschein, R., Yan, M., Mistry, M.J., Hendrix, H., Karyala, S., Halbleib, D., et al. (2009). Influence of fatty acid diets on gene expression in rat mammary epithelial cells. *Physiol. Genomics* 38, 80–88.
- Mense, S.M., Hei, T.K., Ganju, R.K., and Bhat, H.K. (2008). Phytoestrogens and Breast Cancer Prevention: Possible Mechanisms of Action. *Environ. Health Perspect.* 116, 426–433.

- Messina, M.J. (2002). Soy foods and soybean isoflavones and menopausal health. *Nutr. Clin. Care Off. Publ. Tufts Univ.* 5, 272–282.
- Messina, M., and Hilakivi-Clarke, L. (2009). Early intake appears to be the key to the proposed protective effects of soy intake against breast cancer. *Nutr. Cancer* 61, 792–798.
- Messina, M., Ho, S., and Alekel, D.L. (2004). Skeletal benefits of soy isoflavones: a review of the clinical trial and epidemiologic data. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 7, 649–658.
- Messina, M., McCaskill-Stevens, W., and Lampe, J.W. (2006a). Addressing the Soy and Breast Cancer Relationship: Review, Commentary, and Workshop Proceedings. *J. Natl. Cancer Inst.* 98, 1275–1284.
- Messina, M., Nagata, C., and Wu, A.H. (2006b). Estimated Asian adult soy protein and isoflavone intakes. *Nutr. Cancer* 55, 1–12.
- Migliaccio, S., Newbold, R.R., Bullock, B.C., Jefferson, W.J., Sutton, F.G., Jr, McLachlan, J.A., and Korach, K.S. (1996). Alterations of maternal estrogen levels during gestation affect the skeleton of female offspring. *Endocrinology* 137, 2118–2125.
- Misso, M.L., Murata, Y., Boon, W.C., Jones, M.E.E., Britt, K.L., and Simpson, E.R. (2003). Cellular and molecular characterization of the adipose phenotype of the aromatase-deficient mouse. *Endocrinology* 144, 1474–1480.
- Molinié, B., and Georgel, P. (2009). Genetic and epigenetic regulations of prostate cancer by genistein. *Drug News Perspect.* 22, 247–254.
- Möller, F.J., Diel, P., Zierau, O., Hertrampf, T., Maaß, J., and Vollmer, G. (2010). Long-term dietary isoflavone exposure enhances estrogen sensitivity of rat uterine responsiveness mediated through estrogen receptor alpha. *Toxicol. Lett.* 196, 142–153.
- Molzberger, A.F., Vollmer, G., Hertrampf, T., Möller, F.J., Kulling, S., and Diel, P. (2012). In utero and postnatal exposure to isoflavones results in a reduced responsiveness of the mammary gland towards estradiol. *Mol. Nutr. Food Res.*
- Molzberger, A.F., Soukup, S.T., Kulling, S.E., and Diel, P. (2013). Proliferative and estrogenic sensitivity of the mammary gland are modulated by isoflavones during distinct periods of adolescence. *Arch. Toxicol.* 87, 1129–1140.
- Monninkhof, E.M., Elias, S.G., Vlems, F.A., van der Tweel, I., Schuit, A.J., Voskuil, D.W., van Leeuwen, F.E., and TFPAC (2007). Physical activity and breast cancer: a systematic review. *Epidemiol. Camb. Mass* 18, 137–157.
- Morito, K., Hirose, T., Kinjo, J., Hirakawa, T., Okawa, M., Nohara, T., Ogawa, S., Inoue, S., Muramatsu, M., and Masamune, Y. (2001). Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta. *Biol. Pharm. Bull.* 24, 351–356.
- Morris, P.G., Hudis, C.A., Giri, D., Morrow, M., Falcone, D.J., Zhou, X.K., Du, B., Brogi, E., Crawford, C.B., Kopelovich, L., et al. (2011). Inflammation and increased aromatase expression occur in the breast tissue of obese women with breast cancer. *Cancer Prev. Res. Phila. Pa* 4, 1021–1029.

- Mortensen, A., Kulling, S.E., Schwartz, H., Rowland, I., Ruefer, C.E., Rimbach, G., Cassidy, A., Magee, P., Millar, J., Hall, W.L., et al. (2009). Analytical and compositional aspects of isoflavones in food and their biological effects. *Mol. Nutr. Food Res.* *53*, S266–S309.
- Morton, M.S., Arisaka, O., Miyake, N., Morgan, L.D., and Evans, B.A.J. (2002). Phytoestrogen Concentrations in Serum from Japanese Men and Women over Forty Years of Age. *J. Nutr.* *132*, 3168–3171.
- Mousavi, Y., and 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.
- Mulac-Jericevic, B., Mullinax, R.A., DeMayo, F.J., Lydon, J.P., and Conneely, O.M. (2000). Subgroup of Reproductive Functions of Progesterone Mediated by Progesterone Receptor-B Isoform. *Science* *289*, 1751–1754.
- Mulac-Jericevic, B., Lydon, J.P., DeMayo, F.J., and Conneely, O.M. (2003). Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 9744–9749.
- Mun, M.J., Kim, J.-H., Kim, T.-H., Hwang, J.-Y., and Jang, W.-C. (2013). Associations between Estrogen Receptor Gene Polymorphisms and Endometriosis. *J. Korean Soc. Menopause* *19*, 64.
- Murrill, W.B., Brown, N.M., Zhang, J.-X., Manzillo, P.A., Barnes, S., and Lamartiniere, C.A. (1996). Prepubertal genistein exposure suppresses mammary cancer and enhances gland differentiation in rats. *Carcinogenesis* *17*, 1451–1457.
- Muthyala, R.S., Ju, Y.H., Sheng, S., Williams, L.D., Doerge, D.R., Katzenellenbogen, B.S., Helferich, W.G., and Katzenellenbogen, J.A. (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.
- Naaz, A., Yellayi, S., Zakroczymski, M.A., Bunick, D., Doerge, D.R., Lubahn, D.B., Helferich, W.G., and Cooke, P.S. (2003). The soy isoflavone genistein decreases adipose deposition in mice. *Endocrinology* *144*, 3315–3320.
- Nagao, T., Yoshimura, S., Saito, Y., Nakagomi, M., Usumi, K., and Ono, H. (2001). Reproductive effects in male and female rats of neonatal exposure to genistein. *Reprod. Toxicol.* *15*, 399–411.
- Nagata, C., Takatsuka, N., Kurisu, Y., and Shimizu, H. (1998). Decreased Serum Total Cholesterol Concentration Is Associated with High Intake of Soy Products in Japanese Men and Women. *J. Nutr.* *128*, 209–213.
- Nagata, C., Mizoue, T., Tanaka, K., Tsuji, I., Tamakoshi, A., Matsuo, K., Wakai, K., Inoue, M., Tsugane, S., Sasazuki, S., et al. (2014). Soy intake and breast cancer risk: an evaluation based on a systematic review of epidemiologic evidence among the Japanese population. *Jpn. J. Clin. Oncol.* *44*, 282–295.

- Nakano, H., Ogura, K., Takahashi, E., Harada, T., Nishiyama, T., Muro, K., Hiratsuka, A., Kadota, S., and Watabe, T. (2004). Regioselective Monosulfation and Disulfation of the Phytoestrogens Daidzein and Genistein by Human Liver Sulfotransferases. *Drug Metab. Pharmacokinet.* *19*, 216–226.
- Newbold, R.R., Banks, E.P., Bullock, B., and Jefferson, W.N. (2001). Uterine Adenocarcinoma in Mice Treated Neonatally with Genistein. *Cancer Res.* *61*, 4325–4328.
- Nilsson, S., and Gustafsson, J.-Å. (2011). Estrogen Receptors: Therapies Targeted to Receptor Subtypes. *Clin. Pharmacol. Ther.* *89*, 44–55.
- Nilsson, S., Mäkelä, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., Enmark, E., Pettersson, K., Warner, M., and Gustafsson, J.-Å. (2001). Mechanisms of Estrogen Action. *Physiol. Rev.* *81*, 1535–1565.
- Nurmi, T., Mazur, W., Heinonen, S., Kokkonen, J., and Adlercreutz, H. (2002). Isoflavone content of the soy based supplements. *J. Pharm. Biomed. Anal.* *28*, 1–11.
- Odum, J., Lefevre, P.A., Tittensor, S., Paton, D., Routledge, E.J., Beresford, N.A., Sumpter, J.P., and Ashby, J. (1997). The Rodent Uterotrophic Assay: Critical Protocol Features, Studies with Nonyl Phenols, and Comparison with a Yeast Estrogenicity Assay. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* *25*, 176–188.
- Ojeda, S.R., Wheaton, J.E., Jameson, H.E., and McCANN, S.M. (1976). The Onset of Puberty in the Female Rat: Changes in Plasma Prolactin, Gonadotropins, Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LHRH), and Hypothalamic LHRH Content. *Endocrinology* *98*, 630–638.
- Öko-Test (2012). Mittel gegen Wechseljahrsbeschwerden. *Öko-Test Jahrb. Für 2013* 95–99.
- Olsson, H., Landin-Olsson, M., and Gullberg, B. (1983). Retrospective assessment of menstrual cycle length in patients with breast cancer, in patients with benign breast disease, and in women without breast disease. *J. Natl. Cancer Inst.* *70*, 17–20.
- Omoto, Y., Eguchi, H., Yamamoto-Yamaguchi, Y., and Hayashi, S. (2003). Estrogen receptor (ER) beta1 and ERbeta2 inhibit ERalpha function differently in breast cancer cell line MCF7. *Oncogene* *22*, 5011–5020.
- Orgaard, A., and Jensen, L. (2008). The effects of soy isoflavones on obesity. *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ *233*, 1066–1080.
- Otieno, D.O., Ashton, J.F., and Shah, N.P. (2007). Isoflavone phytoestrogen degradation in fermented soymilk with selected β -glucosidase producing *L. acidophilus* strains during storage at different temperatures. *Int. J. Food Microbiol.* *115*, 79–88.
- Ouyang, P., Michos, E.D., and Karas, R.H. (2006). Hormone Replacement Therapy and the Cardiovascular System: Lessons Learned and Unanswered Questions. *J. Am. Coll. Cardiol.* *47*, 1741–1753.
- Palacios, S., Pornel, B., Vázquez, F., Aubert, L., Chantre, P., and Marès, P. (2010). Long-term endometrial and breast safety of a specific, standardized soy extract. *Climacteric J. Int. Menopause Soc.* *13*, 368–375.

- Parczyk, K., Madjno, R., Michna, H., Nishino, Y., and Schneider, M.R. (1997). Progesterone receptor repression by estrogens in rat uterine epithelial cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *63*, 309–316.
- Parker, V.J., Solano, M.E., Arck, P.C., and Douglas, A.J. (2014). Diet-induced obesity may affect the uterine immune environment in early-mid pregnancy, reducing NK-cell activity and potentially compromising uterine vascularization. *Int. J. Obes.* *2005* *38*, 766–774.
- Parkin, D.M. (2001). Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol.* *2*, 533–543.
- Parkin, D.M., Bray, F.I., and Devesa, S.S. (2001). Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur. J. Cancer* *37*, 4–66.
- Patel, R.P., and Barnes, S. (2010). Isoflavones and PPAR Signaling: A Critical Target in Cardiovascular, Metastatic, and Metabolic Disease. *PPAR Res.* *2010*.
- Patisaul, H.B., and Jefferson, W. (2010). The pros and cons of phytoestrogens. *Front. Neuroendocrinol.* *31*, 400–419.
- Peet, D.J., Turley, S.D., Ma, W., Janowski, B.A., Lobaccaro, J.M., Hammer, R.E., and Mangelsdorf, D.J. (1998). Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* *93*, 693–704.
- Peeters, P.H.M., Keinan-Boker, L., van der Schouw, Y.T., and Grobbee, D.E. (2003). Phytoestrogens and breast cancer risk. Review of the epidemiological evidence. *Breast Cancer Res. Treat.* *77*, 171–183.
- Pei, R.-J., Sato, M., Yuri, T., Danbara, N., Nikaido, Y., and Tsubura, A. (2003). Effect of prenatal and prepubertal genistein exposure on N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary tumorigenesis in female Sprague-Dawley rats. *Vivo Athens Greece* *17*, 349–357.
- Penza, M., Montani, C., Romani, A., Vignolini, P., Pampaloni, B., Tanini, A., Brandi, M.L., Alonso-Magdalena, P., Nadal, A., Ottobrini, L., et al. (2006). Genistein affects adipose tissue deposition in a dose-dependent and gender-specific manner. *Endocrinology* *147*, 5740–5751.
- Pescovitz, O.H., and Walvoord, E.C. (2007). *When Puberty is Precocious: Scientific and Clinical Aspects* (Springer Verlag).
- Petrakis, N.L., Barnes, S., King, E.B., Lowenstein, J., Wiencke, J., Lee, M.M., Miike, R., Kirk, M., and Coward, L. (1996). Stimulatory influence of soy protein isolate on breast secretion in pre- and postmenopausal women. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* *5*, 785–794.
- Phillips, D.A., and Kapulnik, Y. (1995). Plant isoflavonoids, pathogens and symbionts. *Trends Microbiol.* *3*, 58–64.
- Pietras, R.J., and Szego, C.M. (1977). Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature* *265*, 69–72.
- Pietras, R.J., Arboleda, J., Reese, D.M., Wongvipat, N., Pegram, M.D., Ramos, L., Gorman, C.M., Parker, M.G., Sliwkowski, M.X., and Slamon, D.J. (1995). HER-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-independent growth in human breast cancer cells. *Oncogene* *10*, 2435–2446.

- Pike, M.C., Pearce, C.L., and Wu, A.H. (2004). Prevention of cancers of the breast, endometrium and ovary. *Oncogene* 23, 6379–6391.
- Platet, N., Cathiard, A.M., Gleizes, M., and Garcia, M. (2004). Estrogens and their receptors in breast cancer progression: a dual role in cancer proliferation and invasion. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 51, 55–67.
- Popkin, B.M., Horton, S., and Kim, S. (2001). The nutritional transition and diet-related chronic diseases in Asia: implications for prevention. Wash. DC Int. Food Policy Res. Inst. FCND Discuss. Pap. 105.
- Potischman, N., Swanson, C.A., Siiteri, P., and Hoover, R.N. (1996). Reversal of relation between body mass and endogenous estrogen concentrations with menopausal status. *J. Natl. Cancer Inst.* 88, 756–758.
- Pudenz, M., Roth, K., and Gerhauser, C. (2014). Impact of Soy Isoflavones on the Epigenome in Cancer Prevention. *Nutrients* 6.(in press)
- Quaas, A.M., Kono, N., Mack, W.J., Hodis, H.N., Felix, J.C., Paulson, R.J., and Shoupe, D. (2013). Effect of isoflavone soy protein supplementation on endometrial thickness, hyperplasia, and endometrial cancer risk in postmenopausal women: a randomized controlled trial. *Menopause N. Y. N* 20, 840–844.
- Rajah, T.T., Dunn, S.T., and Pento, J.T. (1996). The influence of antiestrogens on pS2 and cathepsin D mRNA induction in MCF-7 breast cancer cells. *Anticancer Res.* 16, 837–842.
- Rannevik, G., Jeppsson, S., Johnell, O., Bjerre, B., Laurell-Borulf, Y., and Svanberg, L. (1995). A longitudinal study of the perimenopausal transition: altered profiles of steroid and pituitary hormones, SHBG and bone mineral density. *Maturitas* 21, 103–113.
- report München, ARD (2013). Umstrittene Nahrungsergänzungsmittel - Gegen Beschwerden in den Wechseljahren?
- Rice, S., and Whitehead, S.A. (2008). Phytoestrogens oestrogen synthesis and breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 108, 186–195.
- Riggs, B.L., Khosla, S., and Melton, L.J. (2002). Sex Steroids and the Construction and Conservation of the Adult Skeleton. *Endocr. Rev.* 23, 279–302.
- Rimoldi, G., Christoffel, J., Seidlova-Wuttke, D., Jarry, H., and Wuttke, W. (2007). Effects of Chronic Genistein Treatment in Mammary Gland, Uterus, and Vagina. *Environ. Health Perspect.* 115, 62–68.
- Rodriguez, I., Araki, K., Khatib, K., Martinou, J.-C., and Vassalli, P. (1997). Mouse Vaginal Opening Is an Apoptosis-Dependent Process Which Can Be Prevented by the Overexpression of Bcl2. *Dev. Biol.* 184, 115–121.
- Rossouw, J.E., Anderson, G.L., Prentice, R.L., LaCroix, A.Z., Kooperberg, C., Stefanick, M.L., Jackson, R.D., Beresford, S.A.A., Howard, B.V., Johnson, K.C., et al. (2002). Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 288, 321–333.

- Rowland, I., Faughnan, M., Hoey, L., Wähälä, K., Williamson, G., and Cassidy, A. (2003). Bioavailability of phyto-oestrogens. *Br. J. Nutr.* *89 Suppl 1*, S45–S58.
- Rüfer, C.E., and Kulling, S.E. (2006). Antioxidant Activity of Isoflavones and Their Major Metabolites Using Different in Vitro Assays. *J. Agric. Food Chem.* *54*, 2926–2931.
- Rüfer, C.E., Glatt, H., and Kulling, S.E. (2006). Structural Elucidation of Hydroxylated Metabolites of the Isoflavan Equol by Gas Chromatography-Mass Spectrometry and High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Drug Metab. Dispos.* *34*, 51–60.
- Russo, J., and Russo, I.H. (2004). Development of the human breast. *Maturitas* *49*, 2–15.
- Russo, J., Tay, L.K., and Russo, I.H. (1982). Differentiation of the mammary gland and susceptibility to carcinogenesis. *Breast Cancer Res. Treat.* *2*, 5–73.
- Russo, J., Ao, X., Grill, C., and Russo, I.H. (1999). Pattern of distribution of cells positive for estrogen receptor α and progesterone receptor in relation to proliferating cells in the mammary gland. *Breast Cancer Res. Treat.* *53*, 217–227.
- Saji, S., Jensen, E.V., Nilsson, S., Rylander, T., Warner, M., and Gustafsson, J.-Å. (2000). Estrogen receptors α and β in the rodent mammary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *97*, 337–342.
- Sánchez-Garrido, M.A., Castellano, J.M., Ruiz-Pino, F., Garcia-Galiano, D., Manfredi-Lozano, M., Leon, S., Romero-Ruiz, A., Diéguez, C., Pinilla, L., and Tena-Sempere, M. (2013). Metabolic programming of puberty: sexually dimorphic responses to early nutritional challenges. *Endocrinology* *154*, 3387–3400.
- Sarkar, F.H., and Li, Y. (2002). Mechanisms of cancer chemoprevention by soy isoflavone genistein. *Cancer Metastasis Rev.* *21*, 265–280.
- Sasamura, H., Takahashi, A., Yuan, J., Kitamura, H., Masumori, N., Miyao, N., Itoh, N., and Tsukamoto, T. (2004). Antiproliferative and antiangiogenic activities of genistein in human renal cell carcinoma. *Urology* *64*, 389–393.
- Sathyamoorthy, N., and Wang, T.T.Y. (1997). Differential effects of dietary phyto-oestrogens daidzein and equol on human breast cancer MCF-7 cells. *Eur. J. Cancer* *33*, 2384–2389.
- Savouret, J.F., Bailly, A., Misrahi, M., Rauch, C., Redeuilh, G., Chauchereau, A., and Milgrom, E. (1991a). Characterization of the hormone responsive element involved in the regulation of the progesterone receptor gene. *EMBO J.* *10*, 1875–1883.
- Savouret, J.F., Fridlanski, F., Atger, M., Misrahi, M., Berger, R., and Milgrom, E. (1991b). Origin of the high constitutive level of progesterone receptor in T47-D breast cancer cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* *75*, 157–162.
- Schleipen, B., Hertrampf, T., Fritzeimer, K.H., Kluxen, F.M., Lorenz, A., Molzberger, A., Velders, M., and Diel, P. (2011). ER β -specific agonists and genistein inhibit proliferation and induce apoptosis in the large and small intestine. *Carcinogenesis* *32*, 1675–1683.
- Schneider, K., Oltmanns, J., and Hassauer, M. (2004). Allometric principles for interspecies extrapolation in toxicological risk assessment—empirical investigations. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* *39*, 334–347.

- Seow, A., Shi, C.Y., Franke, A.A., Hankin, J.H., Lee, H.P., and Yu, M.C. (1998). Isoflavonoid levels in spot urine are associated with frequency of dietary soy intake in a population-based sample of middle-aged and older Chinese in Singapore. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 7, 135–140.
- Setchell, K.D. (1998). Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *Am. J. Clin. Nutr.* 68, 1333S – 1346S.
- Setchell, K.D.R., and Cassidy, A. (1999). Dietary Isoflavones: Biological Effects and Relevance to Human Health. *J. Nutr.* 129, 758–758.
- Setchell, K.D.R., and Cole, S.J. (2003). Variations in Isoflavone Levels in Soy Foods and Soy Protein Isolates and Issues Related to Isoflavone Databases and Food Labeling. *J. Agric. Food Chem.* 51, 4146–4155.
- Setchell, K.D.R., Brown, N.M., Desai, P., Zimmer-Nechemias, L., Wolfe, B.E., Brashear, W.T., Kirschner, A.S., Cassidy, A., and Heubi, J.E. (2001). Bioavailability of Pure Isoflavones in Healthy Humans and Analysis of Commercial Soy Isoflavone Supplements. *J. Nutr.* 131, 1362S – 1375S.
- Sfakianos, J., Coward, L., Kirk, M., and Barnes, S. (1997). Intestinal Uptake and Biliary Excretion of the Isoflavone Genistein in Rats. *J. Nutr.* 127, 1260–1268.
- Shaaban, A.M., O'Neill, P.A., Davies, M.P., Sibson, R., West, C.R., Smith, P.H., and Foster, C.S. (2003). Declining estrogen receptor-[beta] expression defines malignant progression of human breast neoplasia. *Am. J. Surg. Pathol.* 27, 1502–1512.
- Shao, Z.-M., Alpaugh, M.L., Fontana, J.A., and Barsky, S.H. (1998). Genistein inhibits proliferation similarly in estrogen receptor-positive and negative human breast carcinoma cell lines characterized by P21WAF1/CIP1 induction, G2/M arrest, and apoptosis. *J. Cell. Biochem.* 69, 44–54.
- Shyamala, G. (1999). Progesterone signaling and mammary gland morphogenesis. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 4, 89–104.
- Shyamala, G., Louie, S.G., Camarillo, I.G., and Talamantes, F. (1999). The Progesterone Receptor and Its Isoforms in Mammary Development. *Mol. Genet. Metab.* 68, 182–190.
- Silbernagel, S., and Despopoulos, A. (2012). *Taschenatlas Physiologie* (Georg Thieme Verlag KG).
- Simpson, E.R., and Brown, K.A. (2013). Minireview: Obesity and Breast Cancer: A Tale of Inflammation and Dysregulated Metabolism. *Mol. Endocrinol.* 27, 715–725.
- Sirtori, C.R. (2001). Risks and benefits of soy phytoestrogens in cardiovascular diseases, cancer, climacteric symptoms and osteoporosis. *Drug Saf. Int. J. Med. Toxicol. Drug Exp.* 24, 665–682.
- Smolders, R.G.V., van der Mooren, M.J., Sipkema, P., and Kenemans, P. (2003). Estrogens, homocysteine, vasodilatation and menopause: basic mechanisms, interactions and clinical implications. *Gynecol. Endocrinol. Off. J. Int. Soc. Gynecol. Endocrinol.* 17, 339–354.

- Soukup, S.T. (2013). Soja-Isoflavone: Entwicklung und Validierung einer analytischen Hochdurchsatz-Methode zur Untersuchung der Bioverfügbarkeit und des Metabolitenprofils in Mensch und Ratte (Der Andere Verlag).
- Soukup, S.T., Al-Maharik, N., Botting, N., and Kulling, S.E. (2014). Quantification of soy isoflavones and their conjugative metabolites in plasma and urine: an automated and validated UHPLC-MS/MS method for use in large-scale studies. *Anal. Bioanal. Chem.*
- Sowers, M.R., Jannausch, M.L., McConnell, D.S., Kardia, S.R., and Randolph Jr., J.F. (2006). Endogenous Estradiol and Its Association with Estrogen Receptor Gene Polymorphisms. *Am. J. Med.* *119*, S16–S22.
- Steffen, C. (2011). Klinische Studien mit Nahrungsergänzungsmitteln: Abgrenzungsproblematik. *Pharm. Unserer Zeit* *40*, 332–337.
- Strakovsky, R.S., Lezmi, S., Flaws, J.A., Schantz, S.L., Pan, Y.-X., and Helferich, W.G. (2014). Genistein exposure during the early postnatal period favors the development of obesity in female, but not male rats. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* *138*, 161–174.
- Stute, P. (2011). Veränderungen in der Menopause. *Gynäkol. Endokrinol.* *9*, 144–150.
- Subbaramaiah, K., Howe, L.R., Bhardwaj, P., Du, B., Gravaghi, C., Yantiss, R.K., Zhou, X.K., Blaho, V.A., Hla, T., Yang, P., et al. (2011). Obesity is associated with inflammation and elevated aromatase expression in the mouse mammary gland. *Cancer Prev. Res. Phila. Pa* *4*, 329–346.
- Subbiah, M.T. (1998). Mechanisms of cardioprotection by estrogens. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N* *217*, 23–29.
- Suzuki, R., Iwasaki, M., Yamamoto, S., Inoue, M., Sasazuki, S., Sawada, N., Yamaji, T., Shimazu, T., Tsugane, S., and Japan Public Health Center-based Prospective Study Group (2011). Leisure-time physical activity and breast cancer risk defined by estrogen and progesterone receptor status--the Japan Public Health Center-based Prospective Study. *Prev. Med.* *52*, 227–233.
- Takashima-Sasaki, K., Komiyama, M., Adachi, T., Sakurai, K., Kato, H., Iguchi, T., and Mori, C. (2006). Effect of exposure to high isoflavone-containing diets on prenatal and postnatal offspring mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *70*, 2874–2882.
- Taku, K., Melby, M.K., Nishi, N., Omori, T., and Kurzer, M.S. (2011). Soy isoflavones for osteoporosis: an evidence-based approach. *Maturitas* *70*, 333–338.
- Tanos, T., Rojo, L.J., Echeverria, P., and Brisken, C. (2012). ER and PR signaling nodes during mammary gland development. *Breast Cancer Res. BCR* *14*, 210.
- Thomsen, A.R. (2006). Estrogenic Effect of Soy Isoflavones on Mammary Gland Morphogenesis and Gene Expression Profile. *Toxicol. Sci.* *93*, 357–368.
- Tibbetts, T.A., Mendoza-Meneses, M., O'Malley, B.W., and Conneely, O.M. (1998). Mutual and intercompartmental regulation of estrogen receptor and progesterone receptor expression in the mouse uterus. *Biol. Reprod.* *59*, 1143–1152.

- Toniolo, P.G., Levitz, M., Zeleniuch-Jacquotte, A., Banerjee, S., Koenig, K.L., Shore, R.E., Strax, P., and Pasternack, B.S. (1995). A Prospective Study of Endogenous Estrogens and Breast Cancer in Postmenopausal Women. *J. Natl. Cancer Inst.* *87*, 190–197.
- Tostes, R.C., Nigro, D., Fortes, Z.B., and Carvalho, M.H.C. (2003). Effects of estrogen on the vascular system. *Braz. J. Med. Biol. Res.* *36*, 1143–1158.
- Toth, M.J., Tchernof, A., Sites, C.K., and Poehlman, E.T. (2000). Effect of menopausal status on body composition and abdominal fat distribution. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* *24*, 226–231.
- Unfer, V., Casini, M.L., Costabile, L., Mignosa, M., Gerli, S., and Di Renzo, G.C. (2004). Endometrial effects of long-term treatment with phytoestrogens: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Fertil. Steril.* *82*, 145–148.
- Vázquez, F., Rodríguez-Manzaneque, J.C., Lydon, J.P., Edwards, D.P., O'Malley, B.W., and Iruela-Arispe, M.L. (1999). Progesterone regulates proliferation of endothelial cells. *J. Biol. Chem.* *274*, 2185–2192.
- Védrine, N., Mathey, J., Morand, C., Brandolini, M., Davicco, M.-J., Guy, L., Rémésy, C., Coxam, V., and Manach, C. (2006). One-month exposure to soy isoflavones did not induce the ability to produce equol in postmenopausal women. *Eur. J. Clin. Nutr.* *60*, 1039–1045.
- Velders, M., Solzbacher, M., Schleipen, B., Laudénbach, U., Fritze-meier, K.H., and Diel, P. (2010). Estradiol and genistein antagonize the ovariectomy effects on skeletal muscle myosin heavy chain expression via ER- β mediated pathways. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *120*, 53–59.
- Velders, M., Schleipen, B., Fritze-meier, K.H., Zierau, O., and Diel, P. (2012). Selective estrogen receptor- β activation stimulates skeletal muscle growth and regeneration. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *26*, 1909–1920.
- Van der Velpen, V., Hollman, P.C., van Nielen, M., Schouten, E.G., Mensink, M., Van't Veer, P., and Geelen, A. (2014). Large inter-individual variation in isoflavone plasma concentration limits use of isoflavone intake data for risk assessment. *Eur. J. Clin. Nutr.*
- Vollmer, G., Starcke, S., Wober, J., and Zierau, O. (2002). Endocrine modulation and the fragile balance of homeostasis--an overview. *Neuro Endocrinol. Lett.* *23 Suppl 2*, 37–42.
- Wakai, K., Egami, I., Kato, K., Kawamura, T., Tamakoshi, A., Lin, Y., Nakayama, T., Wada, M., and Ohno, Y. (1999). Dietary Intake and Sources of Isoflavones Among Japanese. *Nutr. Cancer* *33*, 139–145.
- Wang, C., and Kurzer, M.S. (1997). Phytoestrogen concentration determines effects on DNA synthesis in human breast cancer cells. *Nutr. Cancer* *28*, 236–247.
- Wang, J., Betancourt, A.M., Mobley, J.A., and Lamartiniere, C.A. (2011). Proteomic Discovery of Genistein Action in the Rat Mammary Gland. *J. Proteome Res.* *10*, 1621–1631.
- Wang, T.T., Sathyamoorthy, N., and Phang, J.M. (1996). Molecular effects of genistein on estrogen receptor mediated pathways. *Carcinogenesis* *17*, 271–275.

- Warri, A., Saarinen, N.M., Makela, S., and Hilakivi-Clarke, L. (2008). The role of early life genistein exposures in modifying breast cancer risk. *Br. J. Cancer* 98, 1485–1493.
- Wattigney, W.A., Srinivasan, S.R., Chen, W., Greenlund, K.J., and Berenson, G.S. (1999). Secular trend of earlier onset of menarche with increasing obesity in black and white girls: the Bogalusa Heart Study. *Ethn. Dis.* 9, 181–189.
- Wei, H., Bowen, R., Cai, Q., Barnes, S., and Wang, Y. (1995). Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N* 208, 124–130.
- Weigt, C., Hertrampf, T., Zoth, N., Fritzeimer, K.H., and Diel, P. (2012). Impact of estradiol, ER subtype specific agonists and genistein on energy homeostasis in a rat model of nutrition induced obesity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 351, 227–238.
- Weigt, C., Hertrampf, T., Kluxen, F.M., Flenker, U., Hülsemann, F., Fritzeimer, K.H., and Diel, P. (2013). Molecular effects of ER alpha- and beta-selective agonists on regulation of energy homeostasis in obese female Wistar rats. *Mol. Cell. Endocrinol.* 377, 147–158.
- Wells, J.C.K., Treleaven, P., and Charoensiriwath, S. (2012). Body shape by 3-D photonic scanning in Thai and UK adults: comparison of national sizing surveys. *Int. J. Obes.* 36, 148–154.
- Whitsett, T.G., Jr, and Lamartiniere, C.A. (2006). Genistein and resveratrol: mammary cancer chemoprevention and mechanisms of action in the rat. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 6, 1699–1706.
- World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research (2007). *Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective* (Washington, DC: AICR).
- World Health Organization, International Agency for Research on Cancer (2014). *GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012: Breast Cancer Prevention Institute Fact Sheets*.
- Wu, A.H., and Pike, M.C. (1995). Dietary soy protein and hormonal status in females. *Am. J. Clin. Nutr.* 62, 151–153.
- Wu, A.H., Ziegler, R.G., Horn-Ross, P.L., Nomura, A.M., West, D.W., Kolonel, L.N., Rosenthal, J.F., Hoover, R.N., and Pike, M.C. (1996a). Tofu and risk of breast cancer in Asian-Americans. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 5, 901–906.
- Wu, A.H., Ziegler, R.G., Pike, M.C., Nomura, A.M., West, D.W., Kolonel, L.N., Horn-Ross, P.L., Rosenthal, J.F., and Hoover, R.N. (1996b). Menstrual and reproductive factors and risk of breast cancer in Asian-Americans. *Br. J. Cancer* 73, 680.
- Wu, A.H., Ziegler, R.G., Nomura, A.M., West, D.W., Kolonel, L.N., Horn-Ross, P.L., Hoover, R.N., and Pike, M.C. (1998). Soy intake and risk of breast cancer in Asians and Asian Americans. *Am. J. Clin. Nutr.* 68, 1437S – 1443S.
- Wu, A.H., Yu, M.C., Tseng, C.-C., and Pike, M.C. (2008). Epidemiology of soy exposures and breast cancer risk. *Br. J. Cancer* 98, 9–14.

- Wu, A.H., Lee, E., and Vigen, C. (2013). Soy isoflavones and breast cancer. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book ASCO Am. Soc. Clin. Oncol. Meet.* 102–106.
- Wuttke, W., Jarry, H., Becker, T., Schultens, A., Christoffel, V., Gorkow, C., and Seidlová-Wuttke, D. (2003). Phytoestrogens: endocrine disrupters or replacement for hormone replacement therapy? *Maturitas 44, Supplement*, S9–S20.
- Wuttke, W., Jarry, H., and Seidlová-Wuttke, D. (2007). Isoflavones—Safe food additives or dangerous drugs? *Ageing Res. Rev.* 6, 150–188.
- Xiao, C.W., Wood, C.M., Weber, D., Aziz, S.A., Mehta, R., Griffin, P., and Cockell, K.A. (2014). Dietary supplementation with soy isoflavones or replacement with soy proteins prevents hepatic lipid droplet accumulation and alters expression of genes involved in lipid metabolism in rats. *Genes Nutr.* 9, 373.
- Yager, J.D. (2012). Catechol-O-methyltransferase: characteristics, polymorphisms and role in breast cancer. *Drug Discov. Today Dis. Mech.* 9, e41–e46.
- Yamamoto, S., Sobue, T., Sasaki, S., Kobayashi, M., Arai, Y., Uehara, M., Adlercreutz, H., Watanabe, S., Takahashi, T., Itoi, Y., et al. (2001). Validity and reproducibility of a self-administered food-frequency questionnaire to assess isoflavone intake in a Japanese population in comparison with dietary records and blood and urine isoflavones. *J. Nutr.* 131, 2741–2747.
- Yamamoto, S., Sobue, T., Kobayashi, M., Sasaki, S., and Tsugane, S. (2003). Soy, Isoflavones, and Breast Cancer Risk in Japan. *J. Natl. Cancer Inst.* 95, 906–913.
- Yamori, Y. (2004). Worldwide epidemic of obesity: hope for Japanese diets. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 31 *Suppl 2*, S2–S4.
- Yusuf, S., Hawken, S., Ounpuu, S., Bautista, L., Franzosi, M.G., Commerford, P., Lang, C.C., Rumboldt, Z., Onen, C.L., Lisheng, L., et al. (2005). Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study. *Lancet* 366, 1640–1649.
- Zava, D.T., and Duwe, G. (1997). Estrogenic and antiproliferative properties of genistein and other flavonoids in human breast cancer cells *in vitro*. *Nutr. Cancer* 27, 31–40.
- Zeinoaldini, S., Swarts, J.J.M., and Van de Heijning, B.J.M. (2006). A signaling role for leptin in puberty onset in female rats? *J. Pediatr. Endocrinol. Metab. JPEM* 19, 1239–1247.
- Ziegler, R.G., Hoover, R.N., Pike, M.C., Hildesheim, A., Nomura, A.M., West, D.W., Wu-Williams, A.H., Kolonel, L.N., Horn-Ross, P.L., and Rosenthal, J.F. (1993). Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. *J. Natl. Cancer Inst.* 85, 1819–1827.
- Zoth, N., Weigt, C., Laudenschlager, U., and Diel, P. (2010). Physical activity and estrogen treatment reduce visceral body fat and serum levels of leptin in an additive manner in a diet induced animal model of obesity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 122, 100–105.
- Zubik, L., and Meydani, M. (2003). Bioavailability of soybean isoflavones from aglycone and glucoside forms in American women. *Am. J. Clin. Nutr.* 77, 1459–1465.

Zutphen, L.F.M. van, V. Baumans, and A.C. Beynen (1995). Grundlagen der Versuchstierkunde (Stuttgart, Jena, New York: Gustav Fischer).

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Brustkrebsinzidenz weltweit, altersstandardisierte Rate pro 100.000 (alle Altersgruppen), aus Parkin et al., 2001.	1
Abbildung 2: Strukturformeln der Steroidhormone der Frau.....	4
Abbildung 3: Ovarielle Steroidbiosynthese modifiziert nach Löffler et al., 2007.	5
Abbildung 4: Allgemeiner Aufbau der Steroidhormonrezeptoren (Nilsson et al., 2001). Aktivierungsfunktion (AF), DNA-Binde-Domäne (DBD), Liganden-Binde-Domäne (LBD) 12	
Abbildung 5: Wirkmechanismen von Steroidrezeptoren, modifiziert nach Heldring et al., 2007; Mun et al., 2013.....	14
Abbildung 6: Schematischer Aufbau der Progesteronrezeptor-Isoformen A (PR-A) und B (PR-B), modifiziert nach Henry and Norman, 2003. Aktivierungsfunktion (AF), DNA-Binde-Domäne (DBD), Liganden-Binde-Domäne (LBD), Inhibitorische Domäne (InhD).	15
Abbildung 7: Strukturformeln der Isoflavone Daidzein, Genistein und Glycitein in Anlehnung an Soukup, 2013.	17
Abbildung 8: Übersicht über den mikrobiellen Metabolismus (Hauptweg) und den oxidativen Metabolismus über das Enzym Cytochrom P450 am Beispiel von Daidzein, modifiziert nach Mortensen et al., 2009.	19
Abbildung 9: Mikrobieller Metabolismus von Genistein und Glycitein.	20
Abbildung 10: Überblick der von Phytoestrogenen ausgehenden Wirkung in Zusammenhang mit der Brustkrebsprävention (gestrichelte Linien: tumorfördernde Eigenschaften), modifiziert nach Mense et al., 2008.	25
Abbildung 11: Experimentelles Design für den Tierversuch I - Lebenslange Exposition gegenüber diätetischen Isoflavonen.....	40
Abbildung 12: Experimentelles Design für den Tierversuch II - Akute Supplementation einer isoflavonreichen Diät in der ovariectomierten Ratte.....	42
Abbildung 13: Experimentelles Design für den Tierversuch III - Lebenslange Exposition gegenüber Isoflavonen in Kombination mit diätetischem Fett.....	43
Abbildung 14: Geschlechtsbestimmung zum PND 21 über den Anogenitalabstand (AGD) männlicher (A) und weiblicher (B) Ratten	45
Abbildung 15: Eintritt in die Pubertät anhand der Bestimmung der Vaginalöffnung (VO). ...	46
Abbildung 16: Die vier Zyklusphasen der Wistar Ratte.	47
Abbildung 17: Schematische Darstellung der Immundetektion der enzymgekoppelten IHC nach der ABC- Methode.....	51

Abbildung 18: Der Einfluss einer lebenslangen diätetischen Isoflavonexposition auf den Pubertätseintritt über die Bestimmung des Zeitpunktes der Vaginalöffnung (TV I).	56
Abbildung 19: Der Einfluss einer lebenslangen diätetischen Isoflavonexposition auf den Zyklus (TV I).....	57
Abbildung 20: Dosisabhängige Effekte einer lebenslangen diätetischen Isoflavonexposition auf die Physiologie im intakten Tier (TV I).	58
Abbildung 21: Dosisabhängige Effekte einer lebenslangen diätetischen Isoflavonexposition auf die estrogensensitiven Gewebe Uterus, Vagina und Ovarien im intakten Tier (TV I).	59
Abbildung 22: Die Proteinexpression der estrogenregulierten Marker Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen (PCNA) und Progesteronrezeptor (PR) in der Brustdrüse nach lebenslanger Isoflavonexposition im intakten Tier (TV I).	60
Abbildung 23: Der Einfluss einer lebenslangen diätetischen Isoflavonexposition auf die Physiologie in ovariectomierten Tieren im Rahmen des Uterotrophen Assay (TV I).	61
Abbildung 24: Zusammenfassung repräsentativer Darstellungen der Fettzellgrößen der ovariectomierten Tiere im Rahmen des Uterotrophen Assays.	62
Abbildung 25: Der estrogene Einfluss einer lebenslangen diätetischen Isoflavonexposition auf das relative Uterusfeuchtgewicht in ovariectomierten Tieren im Rahmen des Uterotrophen Assays (TV I).	62
Abbildung 26: Der Einfluss einer lebenslangen diätetischen Isoflavonexposition auf die Estrogensensitivität des Uterus und der Vagina in ovariectomierten Tieren im Rahmen des Uterotrophen Assays (TV I).	63
Abbildung 27: Die Proteinexpression der estrogenregulierten Marker Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen (PCNA) und Progesteronrezeptor (PR) in der Brustdrüse nach lebenslanger Isoflavonexposition von ovariectomierten Tieren im Rahmen des Uterotrophen Assays (TV I).	65
Abbildung 28: Der Einfluss einer akuten Isoflavongabe auf die Physiologie im ovariectomierten Tier (TV II).....	67
Abbildung 29: Der estrogene Einfluss einer akuten Isoflavongabe auf das relative Uterusfeuchtgewicht im ovariectomierten Tier (TV II).	67
Abbildung 30: Der Einfluss einer akuten Isoflavongabe auf die estrogensensitiven Gewebe des Uterus und der Vagina im ovariectomierten Tier (TV II).....	68
Abbildung 31: Die Proteinexpression der estrogenregulierten Marker Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen (PCNA) und Progesteronrezeptor (PR) in der Brustdrüse nach akuter Isoflavongabe von ovariectomierten Tieren (TV II).	69

Abbildung 32: Der Einfluss von diätetischem Fett in Kombination einer lebenslangen Isoflavonaufnahme auf den Pubertätseintritt (VO) und den Zyklus (TV III).....	71
Abbildung 33: Der Zusammenhang zwischen dem Pubertätseintritt und Körpergewicht in Tieren mit einer fettreichen (HF) Ernährung ohne (A) und mit (B) Isoflavonen und der Einfluss der HF Intervention auf das VO (C und D).....	72
Abbildung 34: Der Einfluss von diätetischem Fett in Kombination einer lebenslangen Isoflavonaufnahme auf die Physiologie im intakten Tier (TV III).....	73
Abbildung 35: Der Einfluss von diätetischem Fett in Kombination einer lebenslangen Isoflavonaufnahme auf das Serumlipid HDL in intakten Tieren (TV III).	74
Abbildung 36: Der Einfluss von diätetischem Fett in Kombination einer lebenslangen Isoflavonaufnahme auf die Physiologie im intakten Tier (TV III).....	75
Abbildung 37: Die Proteinexpression des estrogenregulierten Markers Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen (PCNA) in der Brustdrüse von intakten Tieren nach einer lebenslangen Isoflavonexposition in Kombination mit diätetischem Fett (TV III).	76
Abbildung 38: Der estrogene Einfluss von diätetischem Fett in Kombination einer lebenslangen Isoflavonaufnahme auf das relative Uterusfeuchtgewicht in ovariectomierten Tieren im Rahmen des Uterotrophen Assays (TV III).	77
Abbildung 39: Der Einfluss von diätetischem Fett in Kombination einer lebenslangen Isoflavonaufnahme auf die Estrogensensitivität von Uterus und Vagina in ovariectomierten Tieren im Rahmen des Uterotrophen Assays (TV III).	78
Abbildung 40: Die Proteinexpression des estrogenregulierten Marker Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen (PCNA) in der Brustdrüse nach einer lebenslangen Isoflavonexposition in Kombination mit diätetischem Fett von ovariectomierten Tieren im Rahmen des Uterotrophen Assays (TV III).....	79

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Diäten und deren Bezeichnung in allen Tierversuchen (I-III)	38
Tabelle 2: Überblick über die im Tierversuch III verwendeten Kontrolldiäten (IDD LF und HF) hinsichtlich ihrer Zusammensetzung, Energiegehalt und Fettsäuremuster	39
Tabelle 3: Aufstellung aller in den tierexperimentellen Studien asservierten Organe	44
Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Kits für die Analyse der Serumlipide.	48
Tabelle 5: Aufsteigende Alkoholreihe zur manuellen Dehydrierung der Gewebe.	48
Tabelle 6: Absteigende Alkoholreihe zur Rehydrierung der Gewebe.....	49
Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Antikörper und das verwendete Chromogen für die Immunhistochemie (IHC).....	51
Tabelle 8: Übersicht der technischen Daten der verwendeten Mikroskope zur histologischen Auswertung.....	52
Tabelle 9: Bestimmung der Isoflavongehalte des verwendeten Sojaisoflavon-Extrakt Novasoy® 650 und der verwendeten Diäten IDD, IRD50 und IRD400 mittels HPLC-DAD-Methode (TV I).....	54
Tabelle 10: Theoretische orale Isoflavonaufnahme pro Diät in juvenilen (PND 30) und adulten (PND80) Tieren mit einem durchschnittlichem Körpergewicht von 77 g bzw. 239 g und einer Futteraufnahme von 10 g bzw. 19 g pro Tag (TV I).	55
Tabelle 11: Bestimmung der Isoflavongehalte des verwendeten Sojaisoflavon-Extrakt Novasoy® 650 und der Diäten IDD, CRD und IRD400 mittels HPLC-DAD-Methode (TV II).	66
Tabelle 12: Bestimmung der Isoflavongehalte der verwendeten Diäten mittels HPLC-DAD Methode mit vorheriger Fettextraktion mit Heptan (TV III).....	70
Tabelle 13: Der Einfluss von diätetischem Fett in Kombination einer lebenslangen Isoflavonaufnahme auf die Serumlipide in intakten Tieren (TV III).	74

Tabelle A1: Datentabelle der erhobenen Gewichts- und Analysendaten der intakten Tiere aus TV I	XI
Tabelle A2: Datentabelle der erhobenen Gewichts- und Analysendaten der Tiere des Uterotrophen Assays aus TV I	XII
Tabelle A3: Datentabelle der erhobenen Gewichts- und Analysendaten der Tiere des Uterotrophen Assays aus TV II	XIV
Tabelle A4: Datentabelle der erhobenen Gewichts- und Analysendaten der intakten Tiere aus TV III.....	XVI
Tabelle A5: Datentabelle der erhobenen Gewichts- und Analysendaten der Tiere des Uterotrophen Assays aus TV III.....	XVII

Anhang

1. Tierversuch I: Lebenslange Exposition gegenüber diätetischen Isoflavonen

1.1. Dosisabhängige Effekte einer lebenslangen Isoflavonexposition auf die Entwicklung im intakten Tier (TV I)

Tabelle A1: Datentabelle der erhobenen Gewichts- und Analysendaten der intakten Tiere aus TV I

Gruppe	Intakt					
	IDD		IRD50		IRD400	
Diät	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Parameter	MW	SD	MW	SD	MW	SD
A) absolute Gewichte						
KGW [g]	259,67	26,42	226,83	14,58	248,00	10,32
Uterus [mg]	353,17	108,02	290,00	48,56	385,00	117,17
Ovarien [mg]	143,67	17,64	153,67	13,85	139,33	30,81
Leber [g]	9,54	0,88	7,94	0,42	9,44	0,60
Gastro [g]	1,60	0,20	1,47	0,12	1,53	0,11
Soleus [mg]	128,00	17,40	115,67	14,18	117,50	12,14
Tibia [mg]	482,17	34,83	488,17	50,90	485,33	15,53
viszerales Fett [g]	10,87	1,97	8,93	0,81	10,61	1,25
Niere [g]	0,84	0,09	0,80	0,08	0,89	0,07
B) relative Gewichte						
Uterus [mg/kg KGW]	1378,09	469,33	1276,74	181,66	1554,68	470,82
Ovarien [mg/kg KGW]	552,60	26,82	676,66	24,17	559,37	108,09
Leber [g/kg KGW]	36,79	1,85	35,13	2,89	38,11	2,80
Gastro [g/kg KGW]	6,16	0,57	6,49	0,36	6,17	0,22
Soleus [mg/kg KGW]	494,12	53,99	509,33	44,06	473,35	40,14
Tibia [mg/kg KGW]	1863,58	108,44	2147,78	95,00	1959,18	85,97
viszerales Fett [g/kg KGW]	41,74	5,10	39,41	3,36	42,79	4,56
Niere [g/kg KGW]	3,27	0,37	3,52	0,14	3,58	0,21
C) Analysen						
UEH [µm]	24,01	6,72	23,89	10,05	16,00	4,22
VEH [µm]	64,78	25,98	49,23	6,30	79,39	34,46
Uterus PCNA [% positive Zellen]	37,64	19,02	71,77	15,79	77,06	10,72
Mamma PCNA [% positive Zellen]	23,22	9,77	34,45	9,57	16,05	10,32
Mamma PR [% positive Zellen]	22,09	4,10	20,28	5,55	21,95	3,06
Fettzellgröße [µm ²]	4479,90	1102,45	4192,17	1080,02	3519,04	947,49
Soleusfasergröße [µm ²]	3502,50	391,87	3222,19	295,42	3305,22	150,15
Serum-Leptin [pg/ml]	557,95	230,31	341,72	189,86	477,93	69,63
D) IF-Plasmaspiegel [nM]						
Gen	n.d.	n.d.	3	1	46	30
Gen-7-GlcA	n.d.	n.d.	154	66	1417	606
Gen-Aglykon-Äquivalent	-	-	161	70	1628	707
Dai	n.d.	n.d.	7	2	93	49
Dai-7-GlcA	9	1	125	46	1148	407
Dai-Aglykon-Äquivalent	5	5	145	55	1531	561
Dai+Gen-Aglykon-Äquivalent	5	5	307	125	3159	1238
Equol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Equol-7-GlcA	n.d.	n.d.	43	21	434	136

MW Mittelwert, SD Standardabweichung, n.d. unter der Nachweisgrenze

1.2. Dosisabhängige Effekte einer lebenslangen Isoflavonexposition auf die Östrogensensitivität im ovariectomierten Tier (TV I)

Tabelle A2: Datentabelle der erhobenen Gewichts- und Analysendaten der Tiere des Uterotrophen Assays aus TV I

Gruppe	OVX						E2					
Diät	IDD		IRD50		IRD400		IDD		IRD50		IRD400	
Parameter	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
A) absolute Gewichte												
KGW [g]	300,13	11,04	297,33	18,67	282,33	24,97	298,56	19,81	277,86	16,15	257,29	15,73
Uterus [mg]	107,25	13,42	93,33	16,67	101,83	11,18	764,22	212,88	748,57	321,69	794,43	250,03
Ovarien [mg]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leber [g]	11,52	1,31	11,75	0,65	10,59	0,99	10,38	0,90	9,87	0,80	9,63	0,91
Gastro [g]	1,72	0,09	1,59	0,14	1,57	0,21	1,75	0,28	1,64	0,14	1,58	0,20
Soleus [mg]	145,50	16,92	134,17	11,63	124,00	18,29	145,33	20,45	135,29	16,12	131,14	12,63
Tibia [mg]	495,25	20,40	479,33	19,16	463,17	45,74	523,11	55,35	480,14	39,75	460,71	34,10
viszerales Fett [g]	10,56	1,21	12,07	2,29	9,20	1,44	11,76	1,57	10,48	1,82	7,63	0,79
Niere [g]	0,87	0,08	0,97	0,13	0,89	0,08	0,96	0,19	0,93	0,09	0,96	0,14
B) relative Gewichte												
Uterus [mg/kg KGW]	358,78	55,19	314,17	53,57	362,26	44,48	2546,48	665,68	2704,88	1159,87	3081,29	937,31
Ovarien [mg/kg KGW]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leber [g/kg KGW]	38,33	3,49	39,61	2,90	37,52	1,28	34,80	2,69	35,53	1,98	37,60	4,96
Gastro [g/kg KGW]	5,75	0,32	5,35	0,21	5,58	0,79	5,83	0,59	5,89	0,26	6,13	0,46
Soleus [mg/kg KGW]	484,56	50,58	452,54	45,97	437,90	39,17	485,45	44,27	487,33	54,74	509,73	36,79
Tibia [mg/kg KGW]	1650,76	56,90	1615,68	85,58	1639,56	46,03	1749,91	104,85	1726,59	65,12	1790,07	52,70
viszerales Fett [g/kg KGW]	35,24	4,29	40,46	6,52	32,57	4,06	39,46	5,35	37,54	4,79	29,72	3,29
Niere [g/kg KGW]	2,89	0,18	3,25	0,36	3,17	0,12	3,20	0,49	3,34	0,29	3,73	0,46
C) Analysen												
UEH [μm]	11,44	0,73	11,71	0,78	10,94	1,33	29,72	2,89	27,25	2,32	26,27	2,08
VEH [μm]	16,25	1,00	16,44	2,51	13,27	1,18	113,50	15,29	112,10	14,40	124,10	14,91
Uterus PCNA [% positive Zellen]	6,78	5,20	8,79	8,78	14,07	17,09	49,73	12,18	47,29	25,72	59,51	23,74
Mamma PCNA [% positive Zellen]	2,73	1,50	8,55	4,73	0,61	0,28	41,32	9,76	48,33	21,65	15,24	6,17
Mamma PR [% positive Zellen]	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	20,72	3,28	27,53	5,10	9,24	2,49
Fettzellgröße [μm^2]	4408,47	808,50	4228,70	761,97	4515,89	1057,07	4083,88	1036,97	3716,37	1041,26	3324,99	951,35
Serum-Leptin [pg/ml]	526,84	161,54	672,07	279,30	482,72	93,42	469,41	189,65	530,24	25,67	407,07	68,27

Fortsetzung von Tabelle A2

Gruppe	OVX						E2						
	Diät	IDD		IRD50		IRD400		IDD		IRD50		IRD400	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Parameter													
D) IF-Plasmaspiegel [nM]													
Gen	n.d.	n.d.	5	2	35	28	n.d.	n.d.	3	0	39	37	
Gen-7-GlcA	n.d.	n.d.	197	112	973	399	n.d.	n.d.	118	34	1068	661	
Gen-Aglykon-Äquivalent	-	-	217	130	1078	502	-	-	123	36	1204	782	
Dai	n.d.	n.d.	10	3	61	32	n.d.	n.d.	7	2	54	41	
Dai-7-GlcA	7	n.d.	152	67	825	268	10	4	106	18	750	303	
Dai-Aglykon-Äquivalent	1	3	179	82	1009	371	6	6	116	22	947	427	
Dai+Gen-Aglykon-Äquivalent	1	3	396	212	2086	871	7	6	239	56	2151	1206	
Equol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
Equol-7-GlcA	n.d.	n.d.	54	35	274	131	n.d.	n.d.	33	n.d.	271	104	

MW Mittelwert, SD Standardabweichung, n.d. unter der Nachweisgrenze

zu Tabelle A1 und A2 D): Daten erhoben am Max-Rubner Institut Karlsruhe von Prof. Sabine Kulling und Dr. Sebastian Soukup. Dargestellt sind Ausschnitte aus der Analyse des Plasma-Isoflavon-Metabolitenprofils mittels Festphasenextraktion (SPE) und UHPLC MS/MS. Dargestellt sind die mittleren Plasmaspiegel in nM der freien Form (Aglykon) von Genistein (Gen) und Daidzein (Dai), deren Glucuronide (7-GlcA), die Aglykon-Äquivalente (Summe der entsprechenden Aglykone und der glykosidischen Form) und der mikrobielle Metabolit von Daidzein Equol

zu Tabelle A3 D): Daten erhoben am Max-Rubner Institut Karlsruhe von Prof. Sabine Kulling und Dr. Sebastian Soukup. Dargestellt ist ein Ausschnitt aus der Analyse des Serum-Isoflavon-Metabolitenprofils mittels Festphasenextraktion (SPE) und UHPLC MS/MS. Dargestellt sind die mittleren Serumspiegel in nM der freien Form (Aglykon) von Genistein (Gen) und Daidzein (Dai), deren Glucuronide (7-GlcA), die Aglykon-Äquivalente (Summe der entsprechenden Aglykone und der glykosidischen Form) und der mikrobielle Metabolit von Daidzein Equol

2. Tierversuch II: Akute Supplementation einer isoflavonreichen Diät in der ovariectomierten Ratte

Tabelle A3: Datentabelle der erhobenen Gewichts- und Analysendaten der Tiere des Uterotrophen Assays aus TV II

Gruppe	OVX				E2			
Diät	IDD		IRD400		IDD		IRD400	
Parameter	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
A) absolute Gewichte								
KGW [g]	281,67	10,31	289,58	9,00	278,00	20,81	279,58	8,41
Uterus [mg]	90,67	15,10	106,08	11,43	916,60	286,71	749,08	381,18
Leber [g]	9,79	1,23	10,26	1,23	9,08	1,22	9,28	0,34
viszerales Fett [g]	10,28	1,64	11,13	1,48	9,75	1,66	9,05	1,47
Niere [g]	0,84	0,04	0,94	0,07	0,89	0,11	0,97	0,09
B) relative Gewichte								
Uterus [mg/kg KGW]	323,15	61,64	366,57	40,72	3342,69	962,18	2686,01	1379,99
Leber [g/kg KGW]	34,66	3,30	35,42	3,98	32,57	2,19	33,24	1,62
viszerales Fett [g/kg KGW]	36,45	5,05	38,46	5,18	35,30	6,71	32,33	4,75
Niere [g/kg KGW]	2,99	0,13	3,25	0,19	3,19	0,27	3,47	0,29
C) Analysen								
UEH [μ m]	9,26	1,81	9,27	2,06	26,53	2,96	26,66	5,51
VEH [μ m]	14,77	1,95	15,86	1,99	87,52	9,70	97,51	9,05
Mamma PCNA [% positive Zellen]	2,78	3,14	7,80	2,90	30,19	4,23	42,16	12,65
Mamma PR [% positive Zellen]	n.d.	-	n.d.	-	14,03	4,57	19,64	4,54
D) IF-Serumspiegel [nM]								
Gen	n.d.	n.d.	50	28	4	-	24	16
Gen-7-GlcA	n.d.	n.d.	674	205	9	0	642	267
Gen-Aglykon-Äquivalent	n.d.	n.d.	769	236	16	10	701	302
Dai	n.d.	n.d.	83	33	3	-	51	29
Dai-7-GlcA	n.d.	n.d.	514	148	4	0	466	191
Dai-Aglykon-Äquivalent	n.d.	n.d.	749	211	14	14	637	265
Dai+Gen-Aglykon-Äquivalent	n.d.	n.d.	1519	440	29	23	1338	553
Equol	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
Equol-7-GlcA	n.d.	n.d.	230	70	n.d.	n.d.	249	106

MW Mittelwert, SD Standardabweichung, n.d. unter der Nachweisgrenze, k.A. keine Angabe

3. Tierversuch III: Lebenslange Exposition gegenüber Isoflavonen in Kombination mit diätetischem Fett

3.1. Der Einfluss von diätetischem Fett in Kombination mit einer lebenslangen Isoflavonexposition im intakten Tier (TV III)

Tabelle A4: Datentabelle der erhobenen Gewichts- und Analysendaten der intakten Tiere aus TV III

Gruppe	Intakt									
	Diät		IDD LF		IDD HF		IRD LF		IRD HF	
Parameter	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
A) absolute Gewichte										
KGW [g]	229,50	15,82	238,83	20,27	231,33	15,28	245,50	12,94		
Uterus [mg]	780,00	142,42	695,00	151,65	548,67	184,50	467,67	211,61		
Ovarien [mg]	126,50	27,86	184,17	49,62	128,17	12,09	121,17	7,91		
Leber [g]	8,89	0,94	8,67	0,66	9,18	0,74	9,60	0,73		
Gastro [g]	1,38	0,11	1,51	0,14	1,39	0,11	1,55	0,10		
Soleus [mg]	103,83	11,60	117,50	10,35	98,17	8,11	119,00	8,60		
Tibia [mg]	528,00	22,06	567,17	49,76	562,50	25,00	571,00	23,06		
viszerales Fett [g]	7,91	0,78	7,37	1,77	8,66	1,13	9,84	0,81		
Niere [g]	0,84	0,07	0,86	0,10	0,85	0,08	0,88	0,10		
B) relative Gewichte										
Uterus [mg/kg KGW]	3389,63	530,02	2947,48	795,04	2385,27	805,40	1880,59	776,13		
Ovarien [mg/kg KGW]	552,87	127,04	776,90	216,01	554,16	40,41	495,24	48,58		
Leber [g/kg KGW]	38,68	1,50	36,38	2,31	39,65	1,02	39,12	2,86		
Gastro [g/kg KGW]	6,01	0,36	6,31	0,16	6,00	0,13	6,30	0,31		
Soleus [mg/kg KGW]	452,07	33,98	493,14	36,38	425,27	36,70	486,18	47,81		
Tibia [mg/kg KGW]	2305,94	113,36	2374,41	45,59	2436,85	128,69	2327,91	74,05		
viszerales Fett [g/kg KGW]	34,63	4,73	30,73	6,27	37,52	4,93	40,07	2,28		
Niere [g/kg KGW]	3,70	0,52	3,63	0,42	3,68	0,20	3,58	0,32		
C) Analysen										
UEH [μm]	12,99	1,43	13,03	1,91	13,85	0,96	12,68	1,05		
VEH [μm]	95,92	10,16	86,37	20,82	81,03	26,88	70,98	29,53		
Mamma PCNA [% positive Zellen]	13,57	10,50	16,26	16,99	11,09	13,73	15,66	6,77		
Mamma PR [% positive Zellen]	18,87	4,26	11,65	4,13	13,35	2,66	10,15	5,63		
Fettzellgröße [μm^2]	3347,52	429,24	3786,11	529,87	3249,94	879,48	3733,65	696,57		
Cholesterol [mg/dl]	79,17	7,99	85,60	9,18	79,33	10,58	77,50	13,50		
HDL [mg/dl]	43,17	3,37	52,80	4,76	49,17	5,85	53,50	6,38		
LDL [mg/dl]	26,40	4,23	25,16	3,85	26,77	3,49	28,25	8,77		
TG [mg/dl]	145,17	20,82	128,20	9,83	160,33	36,05	137,50	26,46		

MW Mittelwert, SD Standardabweichung

3.2. Der Einfluss von diätetischem Fett in Kombination mit einer lebenslangen Isoflavonexposition auf die Östrogensensitivität im ovariectomierten Tier

Tabelle A5: Datentabelle der erhobenen Gewichts- und Analysendaten der Tiere des Uterotrophen Assays aus TV III

Gruppe	OVX								E2							
	Diät		IDD HF		IRD LF		IRD HF		IDD LF		IDD HF		IRD LF		IRD HF	
Parameter	MW	STABW	MW	STABW	MW	STABW	MW	STABW	MW	STABW	MW	STABW	MW	STABW	MW	STABW
A) absolute Gewichte																
KGW [g]	284,00	16,57	301,00	19,80	283,00	18,05	279,14	17,34	290,25	13,83	283,38	9,56	259,88	12,30	269,63	11,06
Uterus [mg]	111,14	22,50	111,83	23,10	107,43	11,67	110,00	10,30	873,63	246,85	995,63	309,94	895,25	332,64	727,38	256,00
Ovarien [mg]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leber [g]	10,42	1,06	11,00	1,47	10,63	0,90	10,23	0,86	10,68	0,75	10,01	0,62	9,21	0,71	9,42	0,50
Gastro [g]	1,70	0,10	1,88	0,12	1,71	0,12	1,69	0,09	1,78	0,12	1,69	0,06	1,60	0,11	1,67	0,08
Soleus [mg]	132,29	13,35	162,50	23,33	132,71	17,14	142,71	4,75	131,75	12,38	137,50	12,20	122,88	10,62	129,75	9,00
Tibia [mg]	591,29	29,62	617,67	74,17	586,43	36,53	553,14	29,61	614,25	35,82	595,13	59,62	582,00	17,51	579,38	27,53
viszerales Fett [g]	9,44	1,50	10,64	1,58	9,99	1,75	10,27	2,38	10,12	2,53	10,37	1,99	8,25	1,21	9,41	1,14
Niere [g]	0,90	0,12	0,98	0,12	0,86	0,08	0,92	0,09	0,91	0,09	0,92	0,09	0,88	0,06	0,91	0,05
B) relative Gewichte																
Uterus [mg/kg KGW]	389,98	63,25	375,74	95,39	379,74	34,83	393,72	22,11	2993,51	808,85	3508,98	1077,51	3422,81	1194,55	2697,83	954,35
Ovarien [mg/kg KGW]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leber [g/kg KGW]	37,02	1,89	36,47	3,13	37,53	1,54	36,89	1,79	37,12	1,25	35,33	1,96	35,41	1,55	34,96	1,65
Gastro [g/kg KGW]	5,98	0,22	6,24	0,20	6,06	0,37	6,05	0,35	6,12	0,19	5,97	0,12	6,18	0,38	6,19	0,29
Soleus [mg/kg KGW]	465,90	38,54	537,82	43,51	467,98	42,80	513,65	46,10	453,55	30,95	484,70	32,44	472,49	28,88	481,13	24,69
Tibia [mg/kg KGW]	2086,92	140,69	2046,33	110,00	2073,62	77,95	1987,36	146,25	2117,64	106,52	2099,58	189,67	2241,46	56,59	2151,54	124,65
viszerales Fett [g/kg KGW]	33,18	4,58	35,43	5,29	35,33	5,80	36,69	7,37	34,86	8,69	36,66	7,55	31,79	4,71	34,81	4,17
Niere [g/kg KGW]	3,15	0,32	3,26	0,31	3,04	0,15	3,29	0,33	3,14	0,28	3,26	0,24	3,39	0,21	3,39	0,17
C) Analysen																
UEH [µm]	9,15	1,00	9,34	0,49	10,90	1,60	10,51	1,19	19,73	1,69	19,34	1,89	21,28	2,79	21,63	1,85
VEH [µm]	12,15	1,22	12,27	1,36	13,72	2,08	12,79	1,57	81,99	9,71	83,54	10,07	82,76	8,85	82,91	6,61
Mamma PCNA [% positive Zellen]	6,53	5,47	8,22	5,13	19,55	3,62	12,85	6,17	48,79	14,37	46,81	14,95	46,43	14,42	36,11	17,08
Mamma PR [% positive Zellen]	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	15,97	2,91	18,83	4,75	17,92	6,71	18,14	6,26

Fortsetzung von Tabelle A5

Gruppe	OVX								E2							
	Diät	IDD LF		IDD HF		IRD LF		IRD HF		IDD LF		IDD HF		IRD LF		IRD HF
Parameter	MW	STABW	MW	STABW	MW	STABW	MW	STABW	MW	STABW	MW	STABW	MW	STABW	MW	STABW
Fettzellgröße [μm^2]	4513,93	917,60	4447,46	958,27	4559,42	629,25	4814,36	1193,28	4106,08	998,88	4284,04	709,39	4022,45	487,01	4068,97	454,34
Cholesterol [mg/dl]	100,00	9,59	108,50	18,48	98,57	13,82	105,29	9,79	109,63	12,21	110,38	14,53	101,00	14,88	100,25	13,80
HDL [mg/dl]	54,43	4,86	67,67	13,69	53,71	6,37	64,29	4,35	61,13	6,85	68,38	9,59	56,38	6,82	59,88	6,56
LDL [mg/dl]	33,79	5,36	35,97	4,60	29,73	6,99	33,06	6,21	36,28	6,64	34,83	4,24	27,54	5,82	29,45	7,80
TG [mg/dl]	103,57	16,36	86,00	15,23	103,00	21,52	96,50	13,59	101,25	20,76	107,38	40,89	109,88	30,70	60,00	18,89

MW Mittelwert, SD Standardabweichung, n.d. unter der Nachweisgrenze

Curriculum Vitae

Name Blei, Tina
Geburtsdatum/-ort 20. Juni 1986 in Freital
Familienstand ledig
Anschrift Hochstadenstrasse 1-3, 50674 Köln
Telefon +49 176 / 22231108
Email blei.tina@googlemail.com



WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEIT

- 04/2011 – 03/2014 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Deutschen Sporthochschule Köln
Institut für Kreislaufforschung und Sportmedizin
Abteilung Molekulare und Zelluläre Sportmedizin
Prof. Dr. Patrick Diel
- 09/2010 – 12/2010 Wissenschaftliche Hilfskraft an der Universität Rostock
Medizinische Fakultät
Institut für Experimentelle Chirurgie und zentrale Versuchstierhaltung
Prof. Dr. Brigitte Vollmar
- 11/2009 Großpraktikum an der Universität Rostock
Medizinische Fakultät
Institut für Experimentelle Chirurgie und zentrale Versuchstierhaltung
Prof. Dr. Brigitte Vollmar
- 11/2007 Großpraktikum an der Technischen Universität Dresden
Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften, Fachrichtung Biologie
Institut für Zoologie, Molekulare Zellphysiologie und Endokrinologie
Prof. Dr. Günter Vollmer
- 07/2007 – 09/2007 Betriebspraktikum im Max-Delbrück-Center für Molekulare Medizin,
Berlin-Buch
Herz-Kreislauf- und Stoffwechselerkrankungen
Molekularbiologie von Hormonen im Herz-Kreislaufsystem
Prof. Dr. Michael Bader
- 10/2006 – 07/2007 Studentische Hilfskraft an der TU Dresden
Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften, Fachrichtung Biologie
Institut Botanik, Drittmittelprojekt Biomechanik von Kakteen
Prof. Dr. Christoph Neinhuis

HOCHSCHULLEHRE

- 02/2012 – 03/2014 Betreuung von Master- und Bachelorarbeiten, Studenten, Praktikanten
und Schulpraktikanten in der Deutschen Sporthochschule Köln

- 10/2012 – 03/2014 Seminarbetreuung im Rahmen der Veranstaltung BAS1 - Vertiefendes Seminar/Übung; Biowissenschaftliche Grundlagen
Deutsche Sporthochschule Köln
- 04/2012 – 09/2012 Vorlesung im Rahmen der Veranstaltung Profilergänzung PE1.15b; Gesundheit & Ernährung: „Krebs“ und „Osteoporose“
Deutsche Sporthochschule Köln

WISSENSCHAFTLICHE AUSBILDUNG

- 04/2011 – 12/2014 Promotion (Dr. rer. nat), Deutsche Sporthochschule Köln
„Der Einfluss von Sojaisoflavonen auf hormonabhängige Organe - tierexperimentelle Studien im Modell der weiblichen Wistar Ratte“
DFG-gefördertes Projekt: “Lifelong exposure to dietary isoflavones - Identification of molecular mechanisms involved in tissue specific modulation of estrogen sensitivity”
- 10/2008 – 11/2010 Medizinische Biotechnologie (Ma.Sc.), Universität Rostock
„Altersbedingte hepatische Steatose - Welche Rolle spielen nukleäre Rezeptoren im Fettmetabolismus?“
erlangter akademischer Grad: Master of Science
- 10/2005 – 09/2008 Molekulare Biotechnologie (Ba.Sc.), Technische Universität Dresden
„Etablierung von Genexpressionsprofilen in Prostatae und Samenblasen von kastrierten männlichen Ratten nach Prüfung von drei Naringeninartigen Phytoöstrogenen auf (Anti-) Androgenität (Hershberger-Assay)“
erlangter akademischer Grad: Bachelor of Science
- 10/2004 – 09/2005 Betriebswirtschaftslehre (Dipl.), Technische Universität Dresden

WEITERE QUALIFIKATIONEN

- 07/2012 – 12/2013 Mentoring-Programm TEAMWORK^{science}
für Nachwuchswissenschaftlerinnen, Deutsche Sporthochschule Köln
Weiterbildungen: „Karriereentwicklung durch Forschungsförderung“, „Selbstpräsentation und Kommunikationsstrategien“, „Krisen- und Konfliktmanagement“
- 10/2012 – 01/2013 Weiterbildung „Spoken English - Masterclass for academic staff“
- 04/2012 – 07/2012 Weiterbildung „Writing Academic English“
- 08/2011 Qualifikation zur Durchführung tierexperimenteller Studien, Kurs: Using Experimental Animals in Research (UEAR), FELASA Cat. B
Zertifikat

METHODENSPEKTRUM

Histologische Techniken: Paraffineinbettung, Mikrotom- & Kryostatschnitte, Übersichtsfärbungen, Epithelhöhenmessung, Fettzellgrößenbestimmung, Immunhistochemie & Immunfluoreszenz

Molekularbiologische Methoden: RNA- und Proteinisolation, real-time PCR, Western Blot, Gelelektrophorese (SDS- und Agarosegel), Proteinanalytik (ELISA, Proteinbestimmung nach BRADFORD und LOWRY), Zellkulturtechniken

Tierexperimentelles Arbeiten: Planung tierexperimenteller Studien, Pflege und Behandlung von Ratten und Mäusen, Gewebepräparation (Hirn, Prostata, Samenblase, Uterus, viszerales Fett, Tibia, Brustdrüse, Niere, Leber, Muskeln) und deren Analyse

Bedienung von Laborgeräten und deren Software: Mikroskope (Axiophot Zeiss mit KS300, Axiovert 200M Zeiss mit AxioVision 4.8), Stratagene Mx3005Pro Agilent Technologies mit MxPro 4.10, LightCycler1.5 Roche Diagnostic

SPRACH- UND EDV- KENNTNISSE

Deutsch	Muttersprache
Englisch	fließend
Französisch	Grundkenntnisse
Russisch	Grundkenntnisse
EDV	MS-Office, Microsoft Project, Internetanwendungen, SQL-Abfragen, Datenbankenrecherche, Literaturrecherche, Literaturverwaltungsprogramme (Endnote10, Zotero), ImageJ, SigmaStat, SigmaPlot 12.0, SPSS, GraphPad Prism6, Primer3web 4.0, UCSC Genome Bioinformatics, NCBI- Anwendungen (Pubmed, BLAST, GEO2R)

MITGLIEDSCHAFTEN

seit 2011	Young Active Research in Endocrinology-YARE
seit 2011	TPSK Schwimmverein Masters, Köln
seit 2010	ehrenamtliches Mitglied beim Deutschem Rotes Kreuz (DRK) - Wasserwacht Rostock
10/2008 – 10/2010	gewähltes Mitglied Fachschaft für Humanmedizin und Medizinische Biotechnologie der Universität Rostock
seit 1992	aktives Mitglied im Deutschen Schwimm-Verband (dsv)

INTERESSEN

Schwimmsport, Rettungsschwimmen, Lesen, Brett- und Kartenspiele

PUBLIKATIONEN

Blei T*, Soukup S*, Schmalbach K*, Pudenz M*, Möller F, Egert B, Wörtz N, Kurrat A, Müller D, Vollmer G, Gerhäuser C, Lehmann L, Kulling S, Diel P
Dose-dependent effects of isoflavone exposure during early lifetime on the rat mammary gland: Studies on estrogen sensitivity, isoflavone metabolism and DNA methylation
Mol Nutr Food Res. 2014 (submitted). *equal contribution

Kuhla A*, Blei T*, Jaster R, Vollmar B.
Aging is associated with a shift of fatty metabolism toward lipogenesis”, J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2011 Nov; 66 (11):1192-200. *equal contribution

ABSTRACT FÜR VORTRÄGE

Blei T
OP7-42: Isoflavone exposure during adolescence modulates estrogen sensitivity of the mammary gland as a function of dose and time window of exposure. 56. Symposium Deutsche Gesellschaft für Endokrinologie 13.-16.03.2013, Düsseldorf

Blei T
Modulation of estrogen sensitivity of the mammary gland by isoflavones – effects of lifelong dose dependent exposure. 14th Young Active Research in Endocrinology (YARE), 12.-14.10.2012, Dresden

ABSTRACT FÜR POSTER

Kurrat A, Blei T, Kulling S, Müller D, Piechotta M, Soukup S, Weigt C, Diel P
MON-0918: Effects of lifelong dietary phytoestrogen exposure on the susceptibility to develop obesity – A study in ovariectomized and intact female Wistar rats. The Endocrine Society’s 96th Annual Meeting & Expo 21.-24.06.2014, Chicago, USA

Pudenz M, Weichenhan D, Lipka D, Blei T, Diel P, Plass C, Gerhäuser C
Isoflavones reduce estrogen-induced genome-wide DNA methylation changes in rat mammary tissue. Cell Symposia, Cancer Epigenomics, 06.-08.10.2013, Sitges, Spanien

Jäger S, Blei T, Soukup S, Diel P, Kulling S, Lehmann L
Untersuchungen zum Einfluss eines isoflavonreichen Extraktes auf den Estrogenmetabolismus im Lebergewebe von weiblichen Wistar-Ratten. 42. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 16.-18.09.2013, Braunschweig

Blei T, Kurrat A, Müller D, Soukup S, Kulling S, Diel P
Combinatory effects of isoflavone intake and dietary fat in estrogen sensitive tissues of female Wistar rat. ESE Summer School on Endocrinology 28.07.-01.08.2013, Bregenz, Österreich

Blei T, Kurrat A, Müller D, Soukup S, Gerhäuser C, Kulling S, Lehmann L, Niehoff A, Vollmer G, Diel P
SUN-367: Lifelong isoflavone exposure dose dependently modulates the estrogen and androgen sensitivity of a variety of tissues in male and female Wistar rats. The Endocrine Society’s 95th Annual Meeting & Expo 15.-18.06.2013, San Francisco, USA

Müller D, Blei T, Gerhäuser C, Kulling S, Lehmann L, Vollmer G, Diel P
P41: Effects of Isoflavone exposure on the androgen sensitivity of male Wistar rats.
56. Symposium Deutsche Gesellschaft für Endokrinologie 13.-16.03.2013, Düsseldorf

Kurrat A, Blei T, Gerhäuser C, Kulling S, Lehmann L, Vollmer G, Diel PP89: Exposure towards isoflavones during adolescence modulates estrogen sensitivity of uterus and vagina and reduces visceral body fat dose-dependently. 56. Symposium Deutsche Gesellschaft für Endokrinologie 13.-16.03.2013, Düsseldorf

Schmalbach K, Blei T, Soukup S, Diel P, Kulling S E, Lehmann L
Einfluss eines isoflavonreichen Extrakts auf den Estrogenmetabolismus und die zelluläre Stressantwort im Brustgewebe weiblicher Wistar-Ratten. 41. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 10.-12.09.2012, Münster.

Blei T, Kurrat A, Müller D, Kulling S, Diel P
Modulation of estrogen sensitivity of the mammary gland by isoflavones – effects of lifelong dose-dependent exposure. ESE Summer School on Endocrinology 05.08.-09.08.2012, Bregenz, Österreich

Molzberger A, Blei T, Gerhäuser C, Kulling S, Lehmann L, Müller D, Vollmer G, Diel P
Isoflavone exposure during different periods of life differentially modulates estrogenic response of the mammary gland and the fat tissue. The Endocrine Society's 94th Annual Meeting, 23.-26.06.2012, Houston, USA

Blei T, Molzberger T, Laudénbach-Leschowsky U, Diel P
Isoflavones: Cross-species' comparison on metabolism, estrogen sensitivity, epigenetics and carcinogenesis. ESE Summer School on Endocrinology 24.07.-28.07.2011, Bregenz, Österreich