

Max Rubner-Institut
Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel
Institut für Physiologie und Biochemie der Ernährung

**Interventionsstudie zur Rolle von Isoflavonen im
Fettstoffwechsel gesunder postmenopausaler Frauen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften (Dr. troph.)

der Landwirtschaftlichen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

von

Ann Katrin Engelbert

aus

Gummersbach

Bonn 2018

Referent: Professor Dr. Achim Bub

Korreferent: Professor Dr. Peter Stehle

Tag der mündlichen Prüfung: 18.01.2018

Angefertigt mit Genehmigung der Landwirtschaftlichen Fakultät der Universität Bonn

Teile dieser Arbeit wurden vorab veröffentlicht in:

A.K. Engelbert, S.T. Soukup, A. Roth, N. Hoffmann, D. Graf, B. Watzl, S.E. Kulling, A. Bub, Isoflavone supplementation in postmenopausal women does not affect leukocyte LDL receptor and scavenger receptor CD36 expression: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial, Mol Nutr Food Res. 2016; 60(9):2008-19.

Danksagung

Ich danke Professor Dr. Achim Bub ganz herzlich für die Bereitstellung des Themas, seine kompetente fachliche Betreuung, Diskussionsbereitschaft und Unterstützung in den letzten Jahren.

Professor Dr. Stehle möchte ich für die freundliche und unkomplizierte Übernahme der Korreferententätigkeit herzlich danken.

Martina Broßart, Claudia Dörr, Tanja Gadau, Susanne Gräber, Eva Hoch, Anita Kriebel, Ute Stadler-Prayle und Ulrike Rossi, meinen Kolleginnen des Studienzentrums, gilt mein besonderer Dank für ihre Hilfe und Unterstützung vor, während und nach der Studie. Dr. med. Claudia Dörr gilt mein besonderes Dankeschön für die Durchführung der Fettbiopsien. Zudem geht mein Dank an Lars Uhlmann für seine hilfreichen Tipps hinsichtlich der Durchflusszytometrie.

Besonderer Dank gebührt ebenfalls Dr. Alex Roth und Dr. Paola Ferrario für ihre statistische Fachkenntnis und insbesondere Paola für die konstruktiven Diskussionen und das gewissenhafte Korrekturlesen.

Dr. Sebastian Soukup möchte ich herzlich für die Isoflavonanalytik im Extrakt, Plasma und Fettgewebe danken. Bjørk Ditlev Larsen, der die Whole Genome Sequenzierung der Biopsieproben an der University of Southern Denmark durchgeführt hat, möchte ich ebenfalls meinen Dank aussprechen. Und auch Dr. Andreas Dötsch danke ich sehr für seine hilfreichen Tipps hinsichtlich der Auswertung der Genexpressionsdaten.

Dr. Daniela Graf danke ich dafür, dass sie mich in die Welt der Durchflusszytometrie eingeführt hat und für jeden Tipp, jede Anmerkung, Diskussion und Aufmunterung in den letzten Jahren. Dani, vielen Dank für alles!

Bei meinen Masterandinnen Nadine Hoffmann, Kira Dölp und Rebecca Veit möchte ich mich sehr für ihre Mitarbeit während der Studie bedanken.

Bei Daniela Graf, Christiane Mulsow, Andrea Gille, Benedikt Merz und ganz besonders Nathalie Siegel, möchte ich mich einerseits für die zahlreichen fachlichen Diskussionen und andererseits auch für die mal weniger fachlichen Gespräche bedanken. Es macht Spaß mit Menschen wie euch zusammenarbeiten zu dürfen.

Fürs Korrekturlesen möchte ich Dr. Stefanie Herberth und Sarah Schmidt meinen besonderen Dank aussprechen.

Meiner Familie möchte ich von Herzen für ihre immerwährende Unterstützung danken.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Menopause.....	2
1.2	Lipidstoffwechsel	4
1.2.1	Lipoproteine	4
1.2.1.1	Lipoproteinmetabolismus	5
1.2.1.2	Exogener Lipoproteinmetabolismus	5
1.2.1.3	Endogener Lipoproteinmetabolismus	6
1.2.1.4	Reverser Cholesteroltransport	6
1.2.2	LDL-Rezeptor	7
1.2.2.1	Feedbackregulation der Cholesterollhomöostase	8
1.2.2.2	LDLR-Expression auf mononukleären Zellen des peripheren Blutes	9
1.2.2.3	LDLR-Expression auf Adipozyten	9
1.2.3	Scavenger Rezeptor CD36	9
1.2.3.1	CD36-Expression auf Monozyten und Makrophagen	10
1.2.3.2	CD36-Expression auf Adipozyten.....	11
1.2.4	Fettgewebe.....	11
1.2.5	Einfluss des Fettgewebes und der Körperfettverteilung auf den Lipid- und Lipoproteinmetabolismus	12
1.2.6	Fettstoffwechsel in der Menopause.....	14
1.2.6.1	Lipid- und Lipoproteinstoffwechsel in der Menopause.....	14
1.2.6.2	Körperfettverteilung in der Menopause.....	15
1.3	Isoflavone	17
1.3.1	Struktur, Vorkommen und Aufnahme der Isoflavone.....	17
1.3.2	Bioverfügbarkeit und Metabolisierung der Isoflavone.....	18
1.3.2.1	Absorption	18
1.3.2.2	Metabolisierung	19
1.3.3	Isoflavonwirkungen.....	20
1.3.3.1	Estrogenrezeptor-vermittelte Wirkungen	20

1.3.3.2	Nicht ER-abhängige Wirkungen.....	21
1.3.3.3	Potentielle Wirkungen von Isoflavonen bei Postmenopausalen Frauen.....	21
1.3.3.4	Antioxidative Kapazität der Isoflavone	22
1.3.3.5	Isoflavoneffekte auf den Lipid- und Lipoproteinmetabolismus sowie die Körperzusammensetzung.....	23
2	Problemstellung und Ziele der Arbeit	25
3	Material und Methoden	27
3.1	Studiendesign	27
3.1.1	Probandinnen.....	28
3.1.1.1	Fallzahlbestimmung.....	29
3.1.2	Interventionsprodukt	29
3.2	Geräte, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	30
3.3	Methoden.....	34
3.3.1	Anthropometrische Daten.....	34
3.3.2	Körperzusammensetzung	34
3.3.3	Blutproben und Analysen.....	35
3.3.3.1	Serum- und Plasmagewinnung	36
3.3.3.2	Quantifizierung der Isoflavone im Plasma	36
3.3.4	Durchflusszytometrische Quantifizierung der LDLR- und CD36-Expression auf Leukozyten	36
3.3.4.1	Lymphozytäre LDLR-Expression	37
3.3.4.2	Leukozytäre CD36-Expression.....	38
3.3.5	Biopsie des abdominellen subkutanen Fettgewebes.....	39
3.3.5.1	RNA Isolierung aus Fettgewebe.....	40
3.3.5.2	RNA-Sequenzierung und differentielle Genexpressionsanalyse	41
3.3.5.3	Genexpressionsanalyse ausgewählter Gene mittels quantitativer Echtzeit-Polymerasekettenreaktion	42
3.3.5.4	Isoflavonanalytik im Fettgewebe.....	45
3.3.6	Statistische Auswertung	46
3.3.6.1	Interventionseffekte	46

3.3.6.2	Modulierender Einfluss des Körperfettanteils bzw. der viszeralen Fettmenge auf die Intervention.....	47
3.3.6.3	Determinanten der LDLR- und CD36-Expression auf Lymphozyten.....	49
3.3.6.4	Genexpressionsanalysen.....	50
4	Ergebnisse	51
4.1	Probandinnenkollektiv.....	51
4.1.1	Einteilung der Probandinnen anhand ihres anfänglichen Körperfettgehaltes.....	53
4.1.2	Einteilung der Probandinnen anhand ihrer anfänglichen Menge an viszeralem Fettgewebe.....	55
4.2	Einfluss der Intervention auf Sexualhormone, Schilddrüsenhormone, Insulin und Leptin	58
4.2.1	Einfluss der Studiendurchführung in zwei Perioden auf die Hormonkonzentrationen .	58
4.3	Serumlipide	59
4.3.1	Einfluss der Intervention auf die Serumlipide.....	59
4.3.2	Einfluss der Ausgangskonzentration an LDL-Cholesterol auf die Behandlung.....	59
4.3.3	Einfluss des prozentualen Körperfettgehaltes auf die Behandlung	60
4.3.3.1	Cholesterol.....	60
4.3.3.2	LDL-Cholesterol.....	60
4.3.3.3	HDL-Cholesterol	61
4.3.3.4	Triglyzeride	61
4.3.4	Einfluss der Menge an viszeralem Fettgewebe auf die Behandlung	61
4.3.4.1	Gesamtcholesterol.....	61
4.3.4.2	LDL-Cholesterol.....	61
4.3.4.3	HDL Cholesterol.....	62
4.3.4.4	Triglyzeride	62
4.3.5	Einfluss des Equolbildner Phänotyps auf die Behandlung	62
4.3.6	Einfluss der Studiendurchführung in zwei Perioden auf die Serumlipide.....	63
4.4	LDLR-Expression auf Lymphozyten	64
4.4.1	Determinanten der LDLR-Expression auf den Lymphozyten.....	64
4.4.1.1	Determinanten der prozentualen LDLR-Expression auf den Gesamtlmphozyten.....	64

4.4.1.2	Determinanten der prozentualen LDLR-Expression auf den T-Lymphozyten.....	64
4.4.1.3	Determinanten der prozentualen LDLR-Expression auf B- und NK-Zellen	65
4.4.1.4	Determinanten der Variabilität der MFI der LDLR ⁺ Lymphozyten.....	65
4.4.2	Einfluss der Intervention auf die LDLR-Expression der Lymphozyten und Lymphozytensubpopulationen	65
4.4.3	Einfluss des anfänglichen Körperfettgehaltes auf die Behandlung hinsichtlich der LDLR-Expression der Lymphozyten	66
4.4.3.1	LDLR-Expression der NK-Zellen	66
4.4.3.2	LDLR-Expression der T-Zellen und B-Zellen.....	67
4.4.4	Einfluss der Menge an viszeralem Fettgewebe auf die Behandlung	67
4.4.4.1	LDLR-Expression der B-Zellen	67
4.4.4.2	LDLR-Expression der NK-Zellen	67
4.4.4.3	LDLR-Expression der T-Zellen.....	67
4.4.5	Einfluss des Equolbildnerstatus auf die Behandlung	67
4.4.6	Saisonale Effekte auf die LDLR-Expression.....	68
4.5	CD36-Expression auf Monozyten und Lymphozyten.....	69
4.5.1	Determinanten der CD36-Expression auf den Monozyten und Lymphozyten	69
4.5.1.1	Determinanten der Variabilität der CD36-Expression auf Monozyten	69
4.5.1.2	Determinanten der Variabilität der prozentualen CD36-Expression auf Lymphozyten..	69
4.5.2	Einfluss der Intervention auf die CD36-Expression der Monozyten und Lymphozyten	70
4.5.3	Einfluss des anfänglichen Körperfettgehaltes auf die Behandlung	70
4.5.4	Einfluss der anfänglichen Menge an viszeralem Fettgewebe auf die Behandlung.....	70
4.5.5	Equolbildner Phänotyp	71
4.5.6	Saisonale Effekte auf die CD36-Expression	71
4.6	Körperfettgehalt und Körperzusammensetzung	72
4.6.1	Einfluss der Intervention auf den Körperfettgehalt und die Körperzusammensetzung.	72
4.6.2	Einfluss des Equolbildner Phänotyps auf den Körperfettgehalt und die Körper- zusammensetzung.....	72

4.6.3	Einfluss der Studiendurchführung in zwei Perioden auf den Körperfettgehalt und die Körperzusammensetzung	72
4.7	Genexpression im subkutanen abdominellen Fettgewebe	73
4.7.1	Genomweite Genexpression	73
4.7.1.1	Sensitivitätsanalyse	73
4.7.1.2	Differentiell exprimierte Gene zwischen den Gruppen (ohne FDR-Korrektur)	73
4.7.1.3	Funktionelle Kategorisierung und Anreicherungsanalyse	74
4.7.2	Genexpression ausgewählter Gene des Fettstoffwechsels und des Estrogenmetabolismus	78
4.8	Isoflavone im Fettgewebe	80
5	Diskussion	81
5.1	Studiendesign	81
5.2	Einfluss der Isoflavonintervention auf Fettstoffwechselfparameter	83
5.2.1	Serumlipide	83
5.2.2	Rezeptorexpression von CD36 und LDLR auf Leukozyten postmenopausaler Frauen 86	
5.2.2.1	LDLR-Expression	87
5.2.2.2	CD36 Rezeptorexpression	88
5.2.3	Zusammenhang zwischen der leukozytären Expression von LDLR bzw. CD36 und den Serumlipidkonzentrationen	89
5.2.4	Einfluss des Körperfettgehaltes auf die Isoflavonintervention	90
5.2.5	Einfluss des Equolbildnerstatus auf die Isoflavonintervention	91
5.3	Einfluss von Isoflavonen auf das Fettgewebe	93
5.3.1	Einfluss der Isoflavonintervention auf die Körperzusammensetzung	93
5.3.2	Einfluss von Isoflavonen auf Gene des Fettstoffwechsels und der Körperzusammensetzung	95
5.3.3	Isoflavone im subkutanen Bauchfettgewebe	100
5.4	Stärken und Limitationen der Studie	101
5.4.1	Stärken	101
5.4.1.1	Studiendesign	101
5.4.1.2	Bestimmung der Körperzusammensetzung mittels DEXA	101

5.4.1.3	Statistische Berücksichtigung der Studiendurchführung in zwei Perioden	101
5.4.1.4	Umfassende Untersuchung des Einflusses der Intervention auf den Fettstoffwechsel....	103
5.4.2	Limitationen	103
5.4.2.1	Baselineunterschiede durch Gruppeneinteilung nach Körperfett- bzw. Viszeral- fettgehalt und Intervention.....	103
5.4.2.2	Expression des LDLR auf Leukozyten.....	104
5.4.2.3	Anzahl der Biopsien des subkutanen Fettgewebes	104
5.4.2.4	Isoflavonkonzentrationen im Plasma und Equolbildnerstatus.....	104
5.4.2.5	Durchführung der Studie in zwei Perioden.....	105
5.5	Schlussfolgerungen	105
	Zusammenfassung.....	109
	Summary	111
	Anhang.....	113

Abkürzungsverzeichnis

μSv	Mikrosievert
3T3L1	Präadipozytenzelllinie
5-OH-HxMF	5-hydroxy-3,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone
AACS	Acetoacetyl-CoA Synthetase
ACAT	Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase
ACB1	Acyl-CoA-binding protein
ACC	Acetyl-CoA carboxylase
ALB1	Albumin 1
aP2	Adipocyte Protein 2
APC	Allophycocyanin
ART3	ADP-ribosyltransferase 3
ATGL	Adipose triglyceride lipase
BMI	Body Mass Index
B-Zellen	B-Lymphozyten
C/EBP	CCAAT/Enhancer-Binding-Proteine
C57B/6J	C57BL/6 Unterstamm (The Jackson Laboratory)
CD19	Cluster of differentiation 19
CD3	Cluster of differentiation 3
CD36	Cluster of differentiation 36
cDNA	Complementary DNA (komplementäre DNA)
CETP	Cholesterolester-Transferprotein
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomographie
DEXA	Dual-energy X-ray absorptiometry
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAH7	Dynein Axonemal Heavy Chain 7
DNAH8	Dynein Axonemal Heavy Chain 8
DUOX2	Dual oxidase 2
E2	Estradiol
EB/NEB	Equolbildner/Nicht-Equolbildner
EFSA	European Food Safety Authority/Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit
ERGDB	Estrogen responsive genes database
ERα/ ESR1	Estrogenrezeptor alpha
Erβ/ ESR2	Estrogenrezeptor beta
FACL2/ACSL1	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FADS1	Fatty acid desaturase 1
FADS2	Fatty acid desaturase 2
FAS	Fettsäuresynthase
FAT	Fatty Acid Translocase
FC	Fold change
FDR	False discovery rate
FFA	Freie Fettsäuren/Free Fatty Acids
FGF13	Fibroblast Growth Factor 13
FITC	Fluorescein isothiocyanate

FL	Fluoreszenz
FS	Fettsäure
FSC	Forward Scatter
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GGT	γ -Glutamyltransferase
GLM	Gemischt lineares Modell
GO	Gene Ontology
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (Aspartat-Aminotransferase)
GPDH	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase
GSH	Glutathion
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ O _{bidest}	Bidestilliertes Wasser
HDL	High density lipoprotein
HepG2	Human hepatocellular carcinoma
hg19	Human genome 19
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
HP	Haptoglobin
HPMC	Hydroxypropylmethylcellulose
HpMF	3,5,6,7,8,30,40-heptamethoxyflavone
HPR	Haptoglobin-related protein
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
HRT	Hormone replacement therapy
HSL	Hormonsensitive Lipase
IDL	Intermediate-density lipoprotein
KCTD8	Potassium Channel Tetramerization Domain Containing 8
KMO	Kynurenin-3-Monooxygenase
LANCL3	LanC-like protein 3
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
LDL	Low density lipoprotein
LDLR	Low density lipoprotein Rezeptor
LH	Luteinisierendes Hormon
LN ₂	Flüssiger Stickstoff
LNCaP-Zellen	Humane Prostatakrebszellen
LPL	Lipoproteinlipase
LSS	Lanosterol synthase
MCP1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MRI	Max Rubner-Institut
mRNA	Messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
NDB	Nutrient data bank
NF κ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
NR3I	Nuclear receptor subfamily 3, group I
OD	Optische Dichte
oxLDL	Oxidiertes low density lipoprotein
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PE	Phycoerythrin

PerCP	Peridinin chlorophyll
PGF13	Placental growth factor
PLA2G7	Phospholipase A2 Group VII
PMF	Postmenopausale Frauen
POU4F1	POU Class 4 Homeobox 1
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
PTCHD3	Patched Domain-Containing Protein 3
RIN	RNA integrity number
RNA	Ribonukleinsäure
qRT-PCR	Echtzeit-Polymerasekettenreaktion/real-time quantitative polymerase chain reaction
SAT	Subcutaneous adipose tissue
SCD1	Stearoyl-CoA desaturase
SERM	Selektive Estrogenrezeptormodulatoren
SGLT1	Natrium/Glucose-Cotransporter 1
SPE	Solid phase extraction/Festphasenextraktion
SR-A	Klasse A Scavenger Rezeptor
SRBI	Scavenger-Rezeptor B1
SRE	Sterol response element
SREBP	Sterol regulatory element-binding protein
SSC	Sideward Scatter
SWAN-Studie	The Study of Women's Health Across the Nation
T3	Triiodthyronin
T4	Tetraiodthyronin, Thyroxin
TDGF1	Teratocarcinoma-derived growth factor 1
TG	Triglyzeride
THP1 Zellen	Monozytenzelllinie
TMM	Trimmed Mean of M-Component
TNF α	Tumornekrosefaktor- α
TRIMM55	Tripartite motif-containing protein 55
TSHB	Thyreoidea stimulierendes Hormon basal
T-Zellen	T-Lymphozyten
VAT	Visceral adipose tissue
VIF	Varianzinflationsfaktor
VLDL	Very low density lipoprotein
VLDLR	Very-low-density-lipoprotein Rezeptor
WGS	Whole genome sequencing
WHO	World Health Organisation

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Zeitliche Abschnitte des Klimakteriums.....	2
Abbildung 2	Aufbau eines Lipoproteinpartikels.....	4
Abbildung 3	Lipoproteinmetabolismus.....	7
Abbildung 4	Strukturen der Isoflavonaglykone.....	17
Abbildung 5	Bakterielle Metabolite der Isoflavone Daidzein und Genistein.....	19
Abbildung 6	Potentielle Mechanismen von Isoflavonen mit Auswirkungen auf das kardiovaskuläre Risiko.....	22
Abbildung 7	Übersicht über das Studiendesign und die Erhebungsmethoden.....	34
Abbildung 8	Quantifizierung des viszeralen und subkutanen Fettgewebes mittels DEXA anhand der CoreScan Applikation.....	35
Abbildung 9	Auswertungsbeispiel zur Quantifizierung LDLR ⁺ T-, B- und NK-Lymphozyten.....	38
Abbildung 10	Auswertbeispiel zur Quantifizierung CD36 ⁺ Monozyten.....	39
Abbildung 11	CONSORT Flowchart der Probandinnenrekrutierung.....	51
Abbildung 12	Vergleich der T3-Konzentrationen [pg/mL] vor und nach der 12-wöchigen Intervention.....	58
Abbildung 13	Serumlipidkonzentrationen [mg/dL] vor und nach 12-wöchiger Intervention.....	59
Abbildung 14	Vergleich der LDL-Cholesterolkonzentrationen vor und nach der Intervention in Frauen mit Ausgangskonzentrationen ≥ 160 mg/dL bzw. < 160 mg/dL.....	60
Abbildung 15	Expression des LDLR in Lymphozytensubpopulationen (% MFI).....	66
Abbildung 16	Expression des CD36 Rezeptors auf Monozyten (% MFI) in Equolbildnern und Nicht-Equolbildnern.....	71
Abbildung 17	Ergebnisse der differentiellen Genexpressionsanalyse dargestellt als Volcano Plot.	74
Abbildung 18	Funktionelle Kategorisierung der reprimierten Gene entsprechend der GO-Annotation.....	75
Abbildung 19	Funktionelle Kategorisierung der induzierten Gene entsprechend der GO-Annotation.	76
Abbildung 20	Quantitative RT-PCR ausgewählter Gene des Fettstoffwechsels und des Estrogenmetabolismus.....	79
Abbildung 21	Expression des ESR1 ($2^{-\Delta CT}$) (normalisiert auf das Housekeepinggen HPRT) in der Verum- und Placebogruppe.....	79

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Charakterisierung der Plasmalipoproteine	5
Tabelle 2	Primersequenzen für die quantitative Real time-PCR.....	44
Tabelle 3	PCR-Zyklen.....	44
Tabelle 4	Baselinecharakteristika der gesamten Probandinnen	52
Tabelle 5	Anzahl der Probandinnen in den jeweiligen Interventionsgruppen eingeteilt nach Kategorien für den Körperfettgehalt zu Beginn der Studie.....	53
Tabelle 6	Ausgangskonzentrationen der Serumlipide sowie der LDLR- und CD36-Expression auf Leukozyten in postmenopausalen Frauen mit niedrigem und hohem Körperfettgehalt in der Placebo und Verumgruppe	54
Tabelle 7	Anzahl der Probandinnen in den jeweiligen Interventionsgruppen eingeteilt nach Kategorien für den Körperfettgehalt zu Beginn der Studie getrennt für Periode 1 und 2 ...	55
Tabelle 8	Anzahl der Probandinnen in den jeweiligen Interventionsgruppen eingeteilt nach Kategorien für den Viszeralfettgehalt	55
Tabelle 9	Baselinekonzentrationen der Serumlipide sowie der LDLR- und CD36-Expression auf Leukozyten in postmenopausalen Frauen gruppiert nach niedrigem und hohem viszeralen Fettgehalt in der Verum oder Placebogruppe.....	56
Tabelle 10	Anzahl der Probandinnen in den jeweiligen Interventionsgruppen eingeteilt nach Kategorien für den Viszeralfettgehalt getrennt für Periode 1 und 2.....	57
Tabelle 11	Serumlipide vor und nach 12-wöchiger Intervention mit Isoflavonen in Equolbildnern und Nicht-Equolbildnern.....	62
Tabelle 12	Multipl. lineares Regressionsmodell für die Baselinevariabilität der prozentualen LDLR- Expression auf den Gesamtlymphozyten	64
Tabelle 13	Multipl. lineares Regressionsmodell für die Baselinevariabilität der prozentualen LDLR- Expression auf den T-Lymphozyten	65
Tabelle 14	LDLR-Expression auf Lymphozyten zu Beginn und nach 12-wöchiger Isoflavonintervention in Equolbildnern und Nicht-Equolbindnern.....	68
Tabelle 15	Multipl. lineares Regressionsmodell für die Baseline Variabilität der CD36 Rezeptorexpression auf Monozyten	69
Tabelle 16	Multipl. lineares Regressionsmodell für die Baseline Variabilität der CD36 Rezeptorexpression auf Lymphozyten	70
Tabelle 17	Parameter der Körperzusammensetzung in Equol- und Nicht-Equolbildnerinnen der Verumgruppe vor und nach der Isoflavonintervention	72

1 Einleitung

Die hormonellen Veränderungen während der Menopause führen zu charakteristischen Wechseljahrsbeschwerden und darüber hinaus zu Veränderungen in der Körperfettverteilung und den Lipoprotein- sowie Serumlipidkonzentrationen postmenopausaler Frauen (Cignarella et al., 2010; Toth et al., 2000). Diese Veränderungen sind mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen assoziiert. Der Einsatz einer Hormonersatztherapie kann einerseits diesen Veränderungen und Risiken entgegenwirken, könnte andererseits aber auch mit einem erhöhten Risiko für u. a. Brustkrebs-erkrankungen verbunden sein (Col et al., 1997; Lobo, 2017). Die Inzidenz für kardiovaskuläre Erkrankungen, Osteoporose, menopausale Beschwerden und auch Brustkrebs bei postmenopausalen Frauen aus asiatischen Ländern ist geringer als in westlichen Ländern (Adlercreutz et al., 1986; Nagata et al., 1999; Nagata et al., 2001). Die Aufnahme von Soja über die Nahrung ist bei diesen Frauen dagegen deutlich höher. In epidemiologischen Studien und Querschnittsstudien wurde ein Zusammenhang zwischen Sojaaufnahme und reduziertem Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen bestätigt (Zhang et al., 2003). Als Wirksubstanzen stehen hier, aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu Estrogenen, v. a. die Soja-Isoflavone im Fokus. Frei verfügbare Nahrungsergänzungsmittel mit Isoflavonen werden mit positiven Effekten auf Wechseljahrsbeschwerden beworben und bieten dadurch vielen Frauen eine scheinbar nebenwirkungsärmere Alternative zur Hormonersatztherapie. Untersuchungen zu den Wirkungen von Isoflavonen auf die Lipoprotein-konzentrationen oder typische Symptome in den Wechseljahren, bspw. Hitzewallungen, sind zahlreich, ihre Ergebnisse allerdings inkonsistent. Mögliche modulierende Faktoren auf die Isoflavoneffekte werden diskutiert, so zum Beispiel der Equolbildnerstatus. Da der Transport der Isoflavone im Blut zu ca. 50 % an Lipoproteine assoziiert erfolgt, könnten Unterschiede im Lipoproteinprofil postmenopausaler Frauen, als Konsequenz unterschiedlicher Körperfett- und Viszeralfettgehalte, Auswirkungen auf den Metabolismus der Isoflavone und damit einhergehend deren Wirkungen haben. Daher sollte die vorliegende Studie untersuchen, ob die Intervention einen Einfluss auf Serumlipide sowie die Expression des Low Density Lipoprotein Rezeptors (LDLR) und des Scavenger Rezeptors CD36 (CD36) hat. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob der Körperfettgehalt bzw. Viszeralfettgehalt einen modulierenden Faktor für Isoflavoneffekte in postmenopausalen Frauen darstellt.

1.1 Menopause

Unter dem Begriff Menopause wird nach Definition der WHO Scientific Group die letzte Menstruation vor dem dauerhaften Ausbleiben derselben bezeichnet (WHO, 1996). Dieser Zeitpunkt kann nur retrospektiv terminiert werden. Als natürliche Menopause wird eine dauerhafte, mindestens seit 12 Monaten bestehende Amenorrhö bezeichnet. Daneben beschreibt die Perimenopause den Zeitraum seit Beginn der sich verändernden endokrinologischen, biologischen und klinischen Merkmale bis ein Jahr nach der Menopause. Die Perimenopause umfasst damit auch den Zeitraum des menopausalen Übergangs, der durch noch auftretende Menstruationszyklen aber stark veränderte Zykluslängen gekennzeichnet sein kann. Die WHO Scientific Group empfiehlt die Bezeichnung des gesamten reproduktiven Zeitraums vor der Menopause als Prämenopause. Die Postmenopause ist demnach definiert als die Phase nach der Menopause, unabhängig davon, ob diese spontan auftritt oder induziert wird (Abbildung 1).

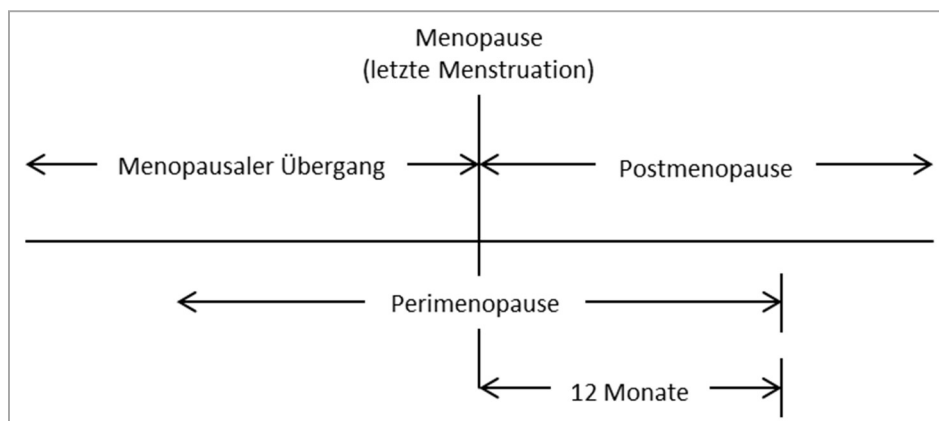


Abbildung 1 Zeitliche Abschnitte des Klimakteriums. Modifiziert nach WHO Scientific group (WHO, 1996).

Als Nebenerscheinung des Alterns tritt die Menopause bei Frauen weltweit ungefähr zwischen dem 45. und 55. Lebensjahr auf und stellt das Ende der Reproduktionsfähigkeit dar. Ursächlich ist das Erliegen der Ovarfunktion, welches das Ausbleiben der monatlichen Menstruation zur Folge hat. Das Absinken der primordialen Follikelzahl auf weniger als 1000 resultiert in veränderten Konzentrationen der hypothalamischen, hypophysären und ovariellen Hormone und damit einhergehenden Veränderungen der zyklischen ovariellen Hormonsekretion sowie veränderten Ovulationszyklen (Hale et al., 2014). Die reduzierte Ovarfunktion führt zu verminderten Konzentrationen der Steroidhormone Estradiol und Progesteron und den Peptidhormonen Inhibin und Aktivin. Letztere sind an der Regulation der Produktion des Follikelstimulierendes Hormons (FSH) beteiligt. Bis auf Progesteron, welches ein Produkt des Corpus Luteum darstellt, entstammen diese Hormone gänzlich ovariellen Granulosazellen. Neben den verminderten Konzentrationen dieser Hormone kommt es zu einem Konzentrationsanstieg der beiden hypophysären Gonadotropine Luteinisierendes Hormon (LH) und FSH. FSH wird vor allem von Steroid- und Peptidhormonen kontrolliert, LH v. a. durch

Steroidhormone. Estron, welches von zahlreichen Geweben (Leber, Muskel, Gehirn, Mammae) und hauptsächlich dem Fettgewebe produziert wird, ist das in der Postmenopause dominierende Estrogen. Estron entsteht durch das Enzym Aromatase durch Aromatisierung von Androstendion und Dehydroepiandrosteron, die in der Nebenniere und den Ovarien produziert werden, und weist 1/3 der biologischen Wirksamkeit von Estradiol auf. In den peripheren Geweben kann Estron in Estradiol konvertiert werden. Diese Rolle als Vorstufe für Estradiol stellt die hauptsächliche Funktion des Estrons dar (Baltzer et Graf, 2004; de Padua et al., 2012; Gruber et al., 2002; Taubert et Licht, 2007). Physiologische Veränderungen nach der Menopause können sowohl durch die eingeschränkte Ovarfunktion als auch durch generelle Alterungsprozesse hervorgerufen werden (WHO, 1996). Typische Beschwerden, die durch die Menopause verursacht werden können, sind u. a. vasomotorische Beschwerden wie Hitzewallungen und Schweißausbrüche und damit einhergehende Schlafstörungen. Diese wiederum können weitere Symptome mit sich ziehen, beispielsweise Müdigkeit, Reizbarkeit oder auch Stimmungsschwankungen (Kronenberg, 1990; Lagari et Levis, 2014). Weiterhin können die hormonellen Veränderungen zu kardiovaskulären Effekten oder auch zu Effekten auf das Skelettsystem führen (Gordon et al., 1978; Kannel, 1987; Stevenson et al., 1994; WHO, 1996).

Die Prävalenz für die koronare Herzkrankheit steigt altersabhängig an. In Frauen vor dem 45. Lebensjahr liegt sie in Deutschland unter 1% und erhöht sich in Frauen zwischen 45-64 Jahren auf 4 %. In Frauen über 65 Jahren liegt die Prävalenz sogar bei 18 % (RKI, 2014). Durch die Menopause hervorgerufene Verschiebungen im Lipoproteinprofil und den Konzentrationen der Serumlipide scheinen eine bedeutende Rolle im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen zu spielen.

1.2 Lipidstoffwechsel

Der Fettstoffwechsel umfasst einerseits die Aufnahme und den Abbau von Fetten im Körper als auch deren Verdauung und Transport. Als Energielieferanten und als größte Energiereserve des Körpers in Form von Fettgewebe kommt den Lipiden eine bedeutende Rolle zu. Neben diesen Funktionen dienen sie auch als Vorstufen für Gallensäuren, Steroidhormone oder Eicosanoide. Der Transport der Lipide im Blut erfolgt überwiegend in Form von Lipoproteinen.

1.2.1 Lipoproteine

Lipide müssen aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften für den Transport im Blut an spezifische Transportmoleküle gebunden werden. Ein solches Transportmolekül stellt beispielsweise das sexualhormonbindende Globulin (SHBG) dar, welches Steroidhormone bindet. Eine weitere Transportmöglichkeit bieten die mizellaren Lipoproteine, welche sich aus Lipiden und Proteinen zusammensetzen. Lipoproteine enthalten in unterschiedlichen Anteilen amphiphile Lipide (Fettsäuren, Phospholipide und freies Cholesterol), welche die Hülle des Partikels bilden sowie hydrophobe Lipide (Cholesterolester und Triglyzeride (TG)), die sich im Kern des Partikels befinden (Abbildung 2). Phospholipide wie Lecithin und Sphingomyelin dienen als oberflächenaktive Substanzen der Lösungsvermittlung für Cholesterolester und TG. Die Proteinanteile der Lipoproteine, die Apolipoproteine, befinden sich auf der Oberfläche und stabilisieren den Lipoproteinpartikel (Kostner et al., 2006). Daneben tragen sie entscheidend zur Funktion und zum Stoffwechsel der Lipoproteine bei, da über die Apolipoproteine die Interaktion der Lipoproteine beispielsweise mit Oberflächenrezeptoren der Zellen erfolgt (Richter et Von Eckardstein, 2006).

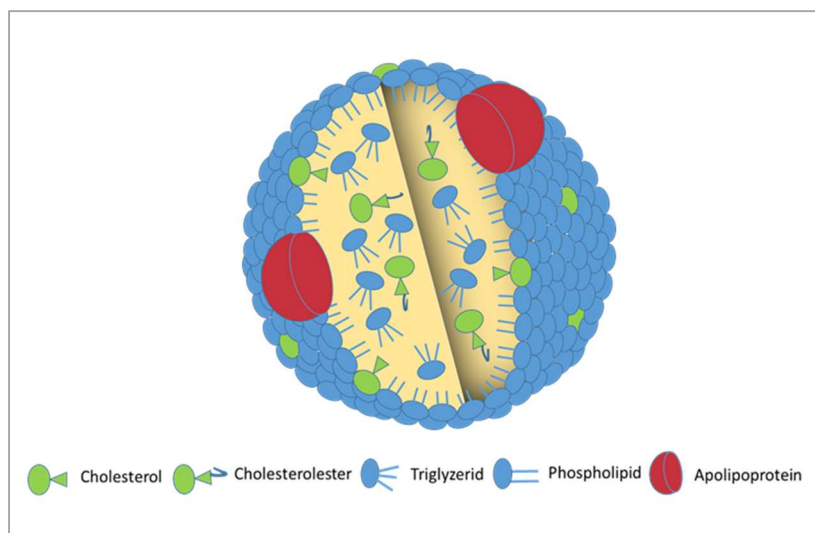


Abbildung 2 Aufbau eines Lipoproteinpartikels (eigene Darstellung).

Lipoproteine werden anhand ihrer Dichte in mindestens fünf Hauptfraktionen unterteilt. Die jeweils unterschiedliche Dichte ergibt sich aus der Zusammensetzung der einzelnen Lipoproteine, also ihren jeweiligen Anteilen an Lipiden und Proteinen (Tabelle 1). Die Dichte der jeweiligen Hauptfraktion liegt dann zwischen der Dichte der Lipide ($< 0,9$ g/mL) und der der Proteine ($> 1,28$ g/mL) (Wächtershäuser et Stein, 2007). Die Dichte ist umso geringer, desto größer der Lipidanteil am Lipoprotein ist. Die fünf Hauptfraktionen sind die Chylomikronen, die Very low density lipoproteins (VLDL), die Intermediate density lipoproteins (IDL), die Low density lipoproteins (LDL) und die High density lipoproteins (HDL).

Tabelle 1 Charakterisierung der Plasmalipoproteine modifiziert nach (Kostner et al., 2006; Richter et Von Eckardstein, 2006; Von Eckardstein et Assmann, 2007; Wächtershäuser et Stein, 2007).

Fraktion	Hauptapolipoproteine	Ursprung	Protein-gehalt (%)	Lipid-gehalt (%)	Tri-glyceride (%)	Freies Cholesterol (%)	Cholesterolester (%)	Phospho-lipide (%)
Chylomikronen	B48, AI, CII, E	Darm	2	98	90	1,5	1,5	5
VLDL	B100, CII, E	Leber	10	90	54	7	13	16
IDL	B100, E	VLDL	17	83	20	9	34	20
LDL	B100	IDL	23	77	4	11	41	21
HDL	AI, AII	Leber, VLDL, Chylomikronen						
HDL ₂	AI, AII, E	HDL ₃	42	58	5	5	13	35
HDL ₃	AI, AII, AIV, E	Nascente HDL (intestinal, hepatisch)	56	44	3	3	15	23

1.2.1.1 Lipoproteinmetabolismus

Der Lipoproteinmetabolismus umfasst drei Stoffwechselwege: den exogenen und den endogenen Lipoproteinstoffwechselweg sowie den reversen Cholesteroltransport. Der exogene Weg dient dem Transport der über die Nahrung aufgenommenen Lipide. Im endogenen Weg werden die in der Leber synthetisierten Lipoproteine wieder abgebaut und die Zellen über LDL mit Cholesterol versorgt. Der reverse Cholesteroltransport dient dagegen dem Rücktransport des Cholesterols aus peripheren Geweben zur Leber (Abbildung 3).

1.2.1.2 Exogener Lipoproteinmetabolismus

Den Hauptanteil der Nahrungslipide machen die Triglyzeride aus. Weitere Nahrungslipide sind Phospholipide, Sphingolipide und Cholesterol, sowie Cholesterolester. Die Triglyzeride werden im Dünndarm durch die Pankreaslipase zu Fettsäuren, Monoacylglycerinen und Glycerin gespalten. Diese bilden zusammen mit Gallensäuren und Phospholipiden der Galle Micellen, die durch die Enterocyten resorbiert werden. Die über die Micellen in die Enterozyten transportierten Produkte der

Pankreaslipase werden im Enterozyten wieder zu Triglyzeriden reverestert. Anschließend bilden diese zusammen mit Apolipoproteinen die Chylomikronen. Diese enthalten ebenfalls sowohl das resorbierte als auch das neu synthetisierte und durch die Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase (ACAT) veresterte Cholesterol. Die Chylomikronen gelangen über intestinale Lymphgefäße in den Ductus thoracicus und über diesen ins Blut. Der Triglyzeridgehalt nimmt infolge von Wechselwirkungen mit der endothelständigen Lipoproteinlipase (LPL) ab, die freien Fettsäuren (FFA) und Monoglyzeride werden in die Muskulatur und das Fettgewebe aufgenommen. Apo C und Apo E treten von HDL auf die Chylomikronen über. Im Gegenzug werden Apo A-I und Apo C an die HDL abgegeben. Die Cholesterolester-reichen Chylomikronen-Remnants werden dann rezeptorvermittelt über Apo E in die Leber aufgenommen (Kostner et al., 2006; Wächtershäuser et Stein, 2007).

1.2.1.3 Endogener Lipoproteinmetabolismus

Der endogene Lipoproteinmetabolismus beginnt mit der hepatischen Produktion der VLDL. Diese enthalten Apo B100, Apo E und Apo C und nehmen nach ihrem Übertritt ins Blut noch weiter Apo E und Apo C aus den HDL auf. Phospholipide werden im Austausch gegen freies Cholesterol auf HDL übertragen. Diese Übertragung wird durch das Phospholipid-Transferprotein PLTP vermittelt. Apo C-II der VLDL aktiviert die LPL, welche den Hauptanteil der Triglyzeride in den VLDL hydrolysiert, wodurch Cholesterolester- und Apo E-reiche IDL entstehen. Daneben wird freies Cholesterol sowie der Großteil der Apo C wieder auf HDL übertragen. Die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT), welche mit HDL assoziiert ist, verestert das freie Cholesterol. Dieses kann dann wieder auf Lipoproteine, die Apo B enthalten, übertragen werden. Dieser Vorgang wird durch das Cholesterolester-Transferprotein (CETP) vermittelt. Die IDL werden nachfolgend entweder zu LDL abgebaut oder über den LDLR in die Leber aufgenommen. Die Apo C-I freien IDL haben eine höhere Affinität zum LDLR als LDL selbst, da sie eine hohe Apo E-Konzentration aufweisen. Der Abbau der LDL erfolgt entweder LDLR-abhängig oder über den Scavenger-Pathway. LDLR-abhängig werden 60-70% des LDL abgebaut (Kostner et al., 2006; Wächtershäuser et Stein, 2007).

1.2.1.4 Reverser Cholesteroltransport

Der reverse Cholesteroltransport dient dem Rücktransport von Cholesterol aus der Peripherie in die Leber, da nur diese dazu in der Lage ist, Cholesterol in größerem Umfang über den Umbau in Gallensäuren auszuscheiden. In der Peripherie kommt es zur Übertragung von freiem Cholesterol aus den Membranen auf HDL, primär auf diskoidal naszente HDL (prä- β -HDL) sowie auf kleine, aus dem Abbau der Chylomikronen stammende, HDL-Partikel der HDL₃-Fraktion. Sie enthalten LCAT, Apo A-I und Apo E. Durch die LCAT wird das aufgenommene freie Cholesterol verestert, wodurch Cholesterolester entstehen, welche sich aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften im Inneren des HDL-Partikels anreichern, was zur Bildung von größeren, sphärischen HDL-Partikeln führt. Durch die Einlagerung der Cholesterolester im Inneren des Partikels entsteht auf deren Oberfläche Platz, um weiteres Cholesterol einzulagern. Nach Einlagerung von Apo E und Phospholipiden (aus dem VLDL-

Abbau) unter Beteiligung der LCAT entstehen HDL1 und HDL2. Diese werden dann in die Leber aufgenommen. Teilweise wird das veresterte Cholesterol auch CETP-vermittelt im Austausch gegen Triglyceride von HDL auf LDL und VLDL überführt. Über deren Apo B erfolgt anschließend die Aufnahme in die Leber oder wiederum der Transport zu peripheren Geweben (Kostner et al., 2006; Wächtershäuser et Stein, 2007).

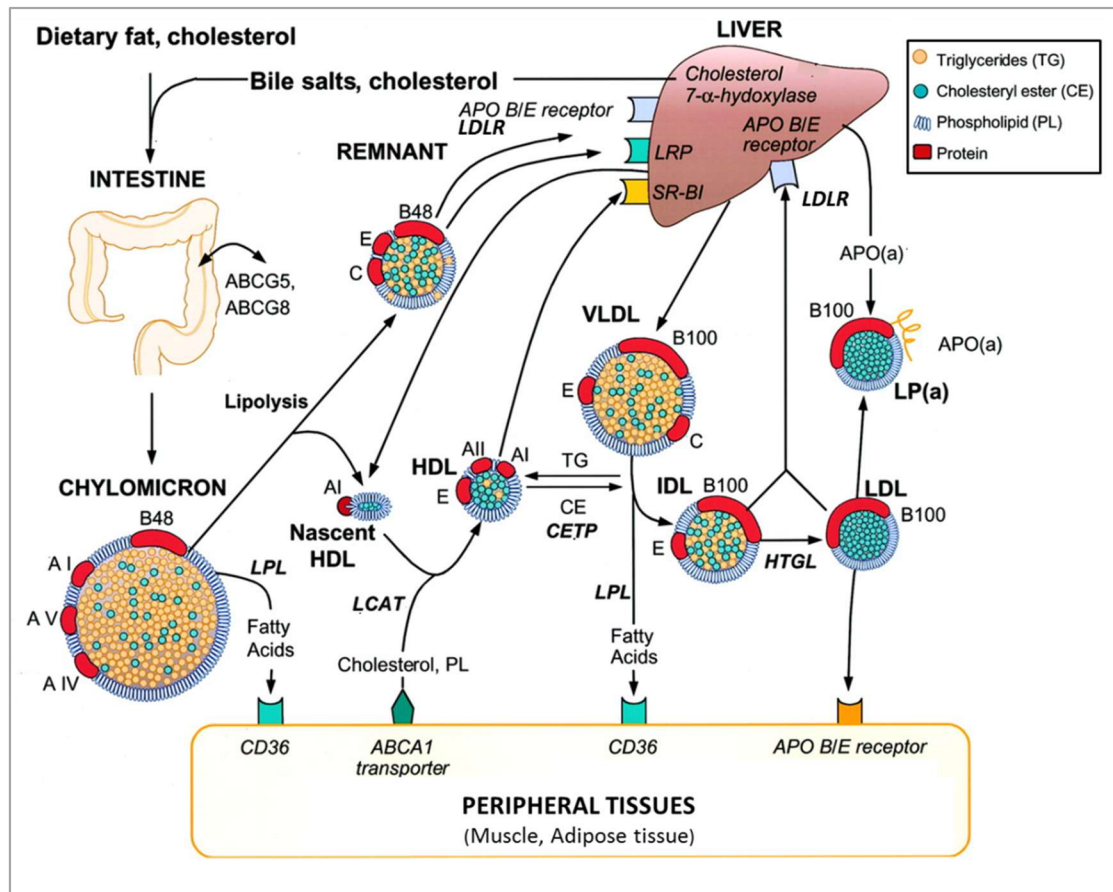


Abbildung 3 Lipoproteinmetabolismus. Darstellung modifiziert nach Lusic et al. (Lusic et al., 2004).

1.2.2 LDL-Rezeptor

Der LDL-Rezeptor ist wesentlich für die Aufnahme von mit Cholesterol beladenen Lipoproteinen verantwortlich, um die Zellen mit nativem, unmodifiziertem LDL-Cholesterol zu versorgen. Über diesen Rezeptor werden zwei Drittel der LDL abgebaut (Brown et al., 1981; Kostner et al., 2006). An der LDL-Clearance ist hauptsächlich die Leber beteiligt, wobei auch nicht-hepatische Gewebe ihren Anteil beitragen.

Der LDL-Rezeptor ist ein Glykoprotein, das sich auf der Zelloberfläche zahlreicher Gewebe befindet, u. a. auf den Hepatozyten, Lymphozyten und adrenalen Zellen (Ho et al., 1976; Kovanen et al., 1979). Es handelt sich um ein Typ-1-Transmembranprotein bestehend aus 839 Aminosäuren. Dieser Oberflächenrezeptor dient der Aufnahme des in LDL-Partikeln transportierten Cholesterols und trägt

über einen Feedback-Mechanismus bedeutend zur Homöostase der Cholesterolkonzentrationen in der Zirkulation bei (Brown et Goldstein, 1986).

Die beiden Liganden des LDLR sind das LDL mit Apo B-100 sowie Lipoproteine mit zahlreichen Apo E auf ihrer Oberfläche (VLDL, IDL, HDL) (Jeon et Blacklow, 2005). Die Aufnahme der Lipoproteine in die Zellen erfolgt rezeptorgebunden. Die im Endoplasmatischen Retikulum gebildeten LDLR-Vorläufer werden im Golgi-Apparat glykosyliert und resultieren in Rezeptoren mit einem Molekulargewicht von 160 kDA. Die LDLR sammeln sich auf der Zelloberfläche in Clathrin-coated pits, welche sich einstülpen und endozytotische Vesikel bilden. Nach Dissoziation der Clathrinhülle fusionieren mehrere endozytotische Vesikel zu Endosomen. Infolge einer pH-Erniedrigung in den Endosomen auf unter 6,5 wird das rezeptorgebundene LDL vom Rezeptor getrennt, welcher zusammen mit weiteren Rezeptoren in Recyclingvesikeln wieder an die Zelloberfläche gelangt und weitere Lipoproteine binden kann. Die vom Rezeptor getrennten LDL werden in Lysosomen überführt, in denen der Proteinanteil zu Aminosäuren hydrolysiert wird, während eine Lipase die Cholesterolester hydrolysiert und somit Cholesterol freisetzt. Das freigesetzte Cholesterol dient der Zelle zur Synthese von Plasmamembranen, der Bildung von Gallensäuren oder Steroidhormonen oder wird in der Zelle in Lipidtropfen in Form von cytoplasmatischen Cholesterolestern gespeichert (Brown et Goldstein, 1986).

1.2.2.1 Feedbackregulation der Cholesterolhomöostase

Die Cholesterolhomöostase unterliegt einem eng regulierten Feedbackmechanismus. Das aus den LDL stammende Cholesterol trägt über unterschiedliche Mechanismen zur Regulation der intrazellulären Cholesterolkonzentrationen bei. Unverestertes zelluläres Cholesterol reguliert auf Transkriptionsebene über *Sterol regulatory element-binding proteins* (SREBP) die Expression der Enzyme der Cholesterolbiosynthese, hauptsächlich durch Supprimierung des Schrittmacherenzym 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase) und des LDLR. Dadurch wird die Synthese von Cholesterol sowie die Aufnahme weiteren LDL-Cholesterols aus der Zirkulation vermindert. Sowohl das HMG-CoA-Reduktase-Gen als auch das LDLR-Gen weisen in ihrer Promotorregion ein *Sterol Regulatory Element* (SRE) auf, welches bei niedrigen intrazellulären Cholesterolkonzentrationen durch Bindung des Transkriptionsfaktors SREBP aktiviert wird und in Folge zu einer Steigerung der Transkription des LDLR als auch der HMG-CoA-Reduktase führt. Dagegen wird das im Endoplasmatischen Retikulum lokalisierte SREBP bei hohen Cholesterolkonzentrationen nicht zum Golgiapparat transportiert und kann dort somit nicht proteolytisch zur Freisetzung seiner Transaktivierungsdomäne gespalten und anschließend in den Nukleus transportiert werden. Folglich bleibt die Aktivierung der Transkription von LDLR und der HMG-CoA-Reduktase unterdrückt (Ikonen, 2008). Daneben resultiert die Aktivierung der ACAT in einer verstärkten Veresterung des freien Cholesterols und folglich in der Speicherung von Cholesterolestern in intrazellulären Vesikeln (Goldstein et Brown, 2009; Kostner et al., 2006). Über

das Zusammenwirken dieser Mechanismen werden die Cholesterolkonzentrationen in der Zelle eng kontrolliert.

Die LDLR Aktivität wird durch zahlreiche Faktoren beeinflusst. Die Expression des Rezeptors wird beispielsweise durch Schilddrüsenhormone, hochdosierte Estrogene, ungesättigte Fettsäuren, Wachstumsfaktoren, Zytokine, Insulin oder auch insulinähnliche Wachstumsfaktoren stimuliert. Letztere könnten über eine SREBP1-Aktivierung zur Stimulation des LDLR beitragen (Kostner et al., 2006). Katecholamine dagegen verringern die LDLR-Expression bspw. auf mononukleären Leukozyten (Krone et al., 1988).

1.2.2.2 LDLR-Expression auf mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Der LDLR wird auf den mononukleären Zellen des peripheren Blutes exprimiert, so u. a. auch auf den Lymphozytensubpopulationen T-, B- und NK-Zellen, welche zudem Unterschiede in der LDL-Aufnahme aufweisen (Maczek et al., 1996). Die höchste LDL-Aufnahme weisen NK-Zellen auf, gefolgt von B- und T-Zellen. Weiterhin zeigen sich Expressionsunterschiede des Rezeptors zwischen polymorphnukleären Neutrophilen, Monozyten und Lymphozyten, mit der höchsten Expression auf Neutrophilen und der geringsten Expression auf Lymphozyten (Lara et al., 1997). In zirkulierenden Lymphozyten ist der LDLR negativ mit den Serumcholesterolkonzentrationen assoziiert und daher nur gering exprimiert (Hambitzer et al., 1987). Jedoch weisen frisch isolierte Blutlymphozyten eine hohe LDL-Bindungsfähigkeit auf (Reichl et al., 1976).

1.2.2.3 LDLR-Expression auf Adipozyten

Auf Adipozyten wird der LDL-Rezeptor ebenfalls exprimiert und vermittelt dort die spezifische Bindung von Apo E- und Apo B- haltigen Lipoproteinen und die Aufnahme von Cholesterol aus diesen Partikeln. Dies wurde für murine Präadipozyten des epididymalen Fettgewebes nachgewiesen, welche einen zum humanen fibroblastären LDL-Rezeptor analogen LDLR exprimieren (Barbaras et al., 1985). In humanen Adipozyten wird der Rezeptor ebenfalls exprimiert, was durch eine hochaffine und leistungsfähige spezifische Bindung von LDL an die Plasmamembran der Adipozyten gekennzeichnet ist (Fong et al., 1984; Angel et al., 1979).

1.2.3 Scavenger Rezeptor CD36

Neben der hauptsächlich über den LDL-Rezeptor vermittelten Aufnahme von LDL-Cholesterol trägt auch der Scavenger Rezeptor CD36 zur Aufnahme von Cholesterol aus dem Plasma bei. Dieser Rezeptor gehört zusammen mit dem Scavenger Rezeptor-BI (SR-BI) zur Klasse B der Scavengerrezeptoren. CD36 ist ein glykosyliertes Transmembranprotein (88 kDA) mit zwei Transmembrandomänen, einer langen und stark glykosylierten extrazellulären Domäne und zwei sehr kurzen intrazytoplasmatischen Domänen (Silverstein et al., 2010). Der Rezeptor wird von zahlreichen Zelltypen exprimiert, darunter Zellen des Retikulohistiozytären Systems wie Monozyten und

Makrophagen (Barnwell et al., 1985; Talle et al., 1983), dendritischen Zellen, Hepatozyten, Adipozyten und Herz- und Skelettmuskelzellen (Febbraio et al., 2001; Knowles et al., 1984). Auf Phagozyten dient er als Scavenger Rezeptor und ist in dieser Funktion neben der Aufnahme apoptotischer Zellen und mikrobieller Pathogene auch für die Degradation von modifiziertem Plasma LDL-Cholesterol verantwortlich (Endemann et al., 1993). Daneben fungiert CD36 u. a. in Adipozyten, Muskelzellen, Enterozyten und Hepatozyten als Transportprotein für langkettige Fettsäuren und wird auch als *Fatty acid translocase* (FAT) bezeichnet (Abumrad et al., 1993; Silverstein et al., 2009).

Im Gegensatz zum LDL-Rezeptor, welcher einem negativen Feedbackmechanismus unterliegt und dessen Expression bei hohen intrazellulären Cholesterolkonzentrationen herunterreguliert wird, besitzen CD36 kein SRE in der 5'-Region des Gens und werden auch bei hohen intrazellulären Cholesterolkonzentrationen exprimiert (Han et al., 1999). Dies liegt dem Mechanismus einer nicht-regulierten Aufnahme von oxidierten LDL in die Makrophagen zugrunde. In geschädigten oder dysfunktionalen Regionen des Endothels treten Monozyten aus dem Blutstrom in die Intima über und differenzieren anschließend zu Makrophagen. Auch LDL aus dem Blut passieren das Endothel und verbleiben im Bindegewebe der Intima, wo deren ungesättigte Phospholipide durch reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies der Makrophagen oxidiert werden. Die Produktion dieser reaktiven Spezies wird durch pro-inflammatorische Cytokine vermittelt. In Endothelzellen werden durch oxidierte LDL Adhäsionsmoleküle ausgebildet, an die sich Monozyten vermehrt anlagern. Daneben werden Chemokine gebildet, welche die Differenzierung dieser Monozyten in Makrophagen bewirken (Kostner et al., 2006). Weiterhin kommt es durch die Oxidation zu einer Affinitätsänderung der LDL mit einem Affinitätsverlust für LDLR, dem eine erhöhte Affinität für CD36 gegenübersteht (Silverstein et al., 2010). Die Aufnahme von oxLDL in die Makrophagen erfolgt fortlaufend und ungehindert, sodass es zu einer Überladung der Makrophagen mit Cholesterol und nachfolgend zur Ausbildung von Schaumzellen kommt. Schaumzellen stellen die erste sichtbare Form atherosklerotischer Veränderungen dar und zeugen vom pro-atherogenen Potential der oxLDL (Brown et al., 1981; Silverstein et al., 2010).

Die Expression des CD36 wird durch oxLDL reguliert, da diese oxidierte Lipide enthalten, die als Vorstufen für Liganden oder direkt als Liganden den Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor PPAR γ aktivieren können. Der nukleäre Hormonrezeptor PPAR γ dient u. a. als Transkriptionsfaktor für CD36 sowie andere mit dem Lipidmetabolismus assoziierte Gene, wie bspw. LPL und *Adipocyte Protein 2* (aP2) (Schoonjans et al., 1996; Silverstein et al., 2010; Tontonoz et al., 1998).

1.2.3.1 CD36-Expression auf Monozyten und Makrophagen

CD36 wird im Blut auf Monozyten, Makrophagen und Thrombozyten exprimiert, wohingegen der Rezeptor auf Lymphozyten, Thymozyten und lymphoblastoiden Zellen nicht exprimiert wird (Talle et al., 1983). Während der Differenzierung von frisch isolierten humanen Monozyten zu Makrophagen

kommt es in Kultur nach 3-4 Tagen, und damit im frühen Makrophagenstadium, zu einem 8-fachen Anstieg der CD36 mRNA und nach 3-5 Tagen zu einem Anstieg des Rezeptors auf der Zelloberfläche. Auch intrazellulär lässt sich während der Ausdifferenzierung nach 2-6 Tagen CD36 nachweisen. Anschließend geht die CD36-Expression wieder auf ihre Basalwerte zurück (Huh et al., 1996). Die Aktivität des Rezeptors ist ebenfalls in frisch isolierten Monozyten gering, steigt aber während der Ausdifferenzierung zu Makrophagen um das ca. 10-fache an (Fogelman et al., 1981). Die CD36-Expression auf Monozyten und Thrombozyten gesunder Individuen variiert zudem stark von 211 bis 5150 (1628 ± 986) Molekülen pro Monozyt und 1259-11002 (4487 ± 2017) Molekülen pro Thrombozyt (Masuda et al., 2015).

1.2.3.2 CD36-Expression auf Adipozyten

CD36 ist als Membranprotein auf Adipozyten exprimiert und als solches in den Transport langkettiger Fettsäuren in die Adipozyten involviert (Abumrad et al., 1993). Die CD36-Expression im subkutanen Fettgewebe variiert körperrgewichtabhängig im Fettgewebe von Personen nach Gewichtsreduktion verglichen mit übergewichtigen Personen (Fisher et al., 2002). In humanen Adipozyten des Brustgewebes postmenopausaler Frauen zeigt sich eine geringere Konzentration an CD36, verglichen mit premenopausalen Frauen. Die verminderte CD36-Expression ging mit erhöhten Arachidonsäurekonzentrationen einher (Abbadia et al., 1997). Die CD36-Expression unterscheidet sich nicht zwischen abdominalem und femoralem Fettgewebe und auch nicht in Abhängigkeit der Adipozytengröße. Auch zwischen männlichen Probanden und prämenopausalen Frauen gibt es keine Unterschiede der CD36-Expression im Fettgewebe (Hames et al., 2015). Bei normalgewichtigen Frauen und Männern scheint die CD36-Expression im viszeralen Fettgewebe im Vergleich zum subkutanen Fettgewebe höher zu sein (Bonon et al., 2006).

1.2.4 Fettgewebe

Die Gesamtheit der verschiedenen Fettdepots im Körper bildet ein großes Organ mit eigenständiger Anatomie und entsprechender spezifischer Versorgung durch Blut- und Nervenzellen (Cinti, 2012). Die zelluläre Zusammensetzung des Fettgewebes umfasst neben den Adipozyten auch die stromavaskuläre Fraktion, welche aus Blutzellen, Endothelzellen, Perizyten, Fibroblasten, Immunzellen als auch Vorläuferzellen der Adipozyten besteht (Coelho et al., 2013; Ibrahim, 2010). Die Hauptzellen des Fettgewebes sind die Adipozyten, welche Energie in Form von mit Lipiden gefüllten Vakuolen speichern. Der Adipozytendifferenzierung liegt eine sequenzielle Aktivierung einer Kaskade von Transkriptionsfaktoren zugrunde, welche durch eine vorübergehende Expression von CCAAT/Enhancer-Binding-Proteinen (C/EBPs) ausgelöst wird und nachfolgend PPAR γ aktiviert. Die Aktivierung von C/EBP α und PPAR γ 2 ist verantwortlich für die Aktivierung der Adipogenese. Eine Aktivierung des PPAR γ kann auch durch SREBP1c erfolgen (Sethi et Vidal-Puig, 2007). Zum Ende der Differenzierung hin, steigen die mRNA Konzentrationen für Enzyme des Triglyzeridmetabolismus an (Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase, FAS, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase) (Rayalam et al., 2008). Neuere, kleinere Adipozyten nehmen im postprandialen Zustand viele FFA und TG auf,

wohingegen größere Adipozyten aufgrund ihrer hyperlipolytischen Aktivität und ihrer Insulinresistenz Dysfunktionalität aufweisen (Ibrahim, 2010).

Prozesse der Adipogenese werden auch durch Estradiol (E2) reguliert, welches damit einen wichtigen Faktor in der Festlegung der Adipozytenanzahl darstellt. Zudem kann E2 über eine Inhibierung der Lipoproteinlipase (LPL) die Lipogenese in Adipozyten reduzieren als auch indirekt Einfluss auf die Lipolyse ausüben, indem es die Hormonsensitive Lipase (HSL) induziert oder die Fettsäureoxidation erhöht. Die Estrogenrezeptoren α und β (ER α und ER β) werden in humanen Präadipozyten und Adipozyten, aber auch in anderen Zellen des Fettgewebes, beispielsweise vaskulären Endothelzellen oder Makrophagen exprimiert (Cooke et Naaz, 2004; Crandall et al., 1998; Pedersen et al., 2001).

Die Funktionen des Fettgewebes sind vielfältig, so dient es u. a. der mechanischen Protektion von Organen oder Muskelgruppen, als thermische Isolierung zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur, der Immunantwort oder der Bereitstellung von Energie für metabolische Prozesse (Cinti, 2012; Coelho et al., 2013). Anatomisch und funktionell lässt sich das Körperfett in das Fettgewebe des Unterkörpers und das Fettgewebe des Oberkörpers einteilen. Es kann entweder subkutan oder intra-abdominal lokalisiert sein. Das intraabdominelle Fett wird auch als Viszeralfett (VAT) bezeichnet (Ebbert et Jensen, 2013). Über 80 % des Gesamtkörperfettes sind subkutan lokalisiert und hierbei hauptsächlich in der femoro-glutealen Region, sowie der hinteren und vorderen Bauchdecke angesiedelt. Je nach Lokalisation unterscheidet sich das Fettgewebe aus zellulärer, molekularer oder physiologischer Sicht. So stellt das subkutane Fettgewebe ein Puffersystem für übermäßige Energiezufuhr dar, in dem die Energie in Form von TG gespeichert vorliegt. Ist die Speicherkapazität des subkutanen Fettgewebes erschöpft oder dessen Fähigkeit neue Adipozyten zu generieren eingeschränkt, so kommt es zu einer vermehrten Einlagerung von viszeralem Fett. Die Adipozyten des viszeralen Fettgewebes sind metabolisch aktiver als die des subkutanen Fettgewebes. Das venöse Blut des viszeralen Fettgewebes gelangt über die Pfortader auf direktem Weg in die Leber, wodurch diese direkt mit FFA versorgt oder durch Adipokine des Fettgewebes aktiviert werden kann. Im viszeralen Fettgewebe finden sich im Gegensatz zum subkutanen Fettgewebe (SAT) mehr große Adipozyten, wodurch das VAT weniger insulinresistent ist und auch weniger FFA und TG aufnimmt als das SAT (Ibrahim, 2010). In Adipozyten finden sich einerseits Enzyme der Lipogenese und andererseits auch lipolytische Enzyme, wie Lipasen, welche für den Abbau der dort gespeicherten Triglyzeride in FFA und Glycerol verantwortlich sind. Diese werden dann über das Blut zu Leber und Muskeln transportiert in denen sie als Substrate der Fettsäureoxidation genutzt werden können (Sethi et Vidal-Puig, 2007).

1.2.5 Einfluss des Fettgewebes und der Körperfettverteilung auf den Lipid- und Lipoproteinmetabolismus

Dyslipoproteinämische Zustände sind mit der Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen assoziiert. Der Einfluss des Fettgewebes, insbesondere der Fettgewebsverteilung, auf die Lipoprotein-

konzentrationen ist hier bedeutend (Despres et al., 1990). Zudem ist die Körperfettverteilung ein vom Gesamtkörperfett unabhängiger wichtiger und anerkannter Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen (Ebbert et Jensen, 2013). Darüber hinaus ist Übergewicht mit erhöhten Lipoproteinkonzentrationen, v. a. der LDL und VLDL assoziiert (Wasan et al., 2008). So war beispielsweise in der Framingham Offspring-Studie der BMI altersunabhängig positiv mit Plasma Triglyzeriden, Gesamtcholesterol, VLDL-Cholesterol und LDL-Cholesterolkonzentrationen in Frauen assoziiert (Lamon-Fava et al., 1996).

Fettgewebe

Die Adipozyten des weißen Fettgewebes bauen permanent TG auf und ab. Der Umsatz beläuft sich auf ca. 50-60 g TG pro Tag. Die Adipozyten übernehmen wichtige Funktionen in der Regulation der Lipide und des Glucosestoffwechsels. Die Einlagerung (Lipogenese durch Lipoproteinlipase) als auch die Hydrolyse (Lipolyse durch hormonsensitive Lipase) der TG in den Adipozyten wird multifaktoriell eng kontrolliert. Hierbei tragen hormonelle Faktoren, wie Catecholamine oder Insulin, aber auch die Energieaufnahme oder metabolische Faktoren wie Glucose oder Cytokine bei. Lipogenese und Lipolyse sind bedeutend für die Kontrolle der Plasma Lipidkonzentrationen, v. a. der Triglyzeridkonzentrationen (Beylot, 2014). Veränderungen des Fettgewebes, beispielsweise durch Adipozytenhypertrophie oder auch die Akkumulation von Fettgewebe können somit in abnormalen Plasma Lipidkonzentrationen resultieren und das Risiko für u. a. kardiovaskuläre Erkrankungen erhöhen (Bays et al., 2013). Die vom Fettgewebe sezernierten Adipokine (bspw. Leptin oder Adiponektin) und Cytokine sowie die Regulation der TG-Konzentrationen dienen teilweise der Kontrolle der gespeicherten Lipide in anderen Geweben. Daneben haben diese Mediatoren auch Auswirkungen auf die Insulinsensitivität von beispielsweise Muskel- und Leberzellen (Beylot, 2014).

Körperfettverteilung

Fettgewebe verschiedener Körperregionen weisen unterschiedliche metabolische Eigenschaften auf. So ist die lipolytische Aktivität und damit Freisetzung von freien Fettsäuren (FFA) im intra-abdominellen Fettgewebe erhöht. Die FFA hemmen nachfolgend die Bindung von Insulin an die Hepatozyten, wodurch die Insulin-bedingte Gluconeogenese-hemmende Wirkung aufgehoben wird. Die Leber produziert vermehrt Glucose und die Plasmakonzentrationen an Glucose und Insulin steigen an. Außerdem führt die hohe Konzentration an freien Fettsäuren zu einer Steigerung der hepatischen VLDL-Synthese in deren Folge die Plasma VLDL-Konzentrationen ebenfalls ansteigen. Durch das Überangebot an freien Fettsäuren werden zwischen den Lipoproteinen vermehrt Triglyzeride gegen Cholesterolester ausgetauscht, sodass triglyzeridreiche LDL, HDL und auch kleine dichte LDL-Partikel entstehen. Kleine dichte LDL sind anfälliger für Oxidationen und tragen zu einem gesteigerten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen bei (Björntorp, 1990; Regnstrom et al., 1992; Wirth, 2013). Als potentielle Mechanismen werden hier u. a. eine geringere Affinität für den LDLR

und eine höhere Anfälligkeit für Oxidationsprozesse diskutiert (Berneis et Krauss, 2002; Chancharme et al., 1999; de Graaf et al., 1991).

Weiterhin ist eine hohe abdominelle Fettmenge mit geringen HDL-Cholesterolkonzentrationen und reduzierten Lipoprotein-Verhältnissen (HDL/LDL; HDL apo A-I/LDL apo B, HDL₂-Chol/HDL₃-Chol) im Serum assoziiert (Despres et al., 1985; Despres et al., 1989) und führt zu erhöhten Plasma Triglyzeridkonzentrationen (Krotkiewski et al., 1983).

1.2.6 Fettstoffwechsel in der Menopause

Infolge der veränderten Hormonkonzentrationen während der Menopause kommt es in postmenopausalen Frauen zu Veränderungen im Lipoproteinstoffwechsel und der Körperfettverteilung.

1.2.6.1 Lipid- und Lipoproteinstoffwechsel in der Menopause

Im Vergleich zum Lipidprofil prämenopausaler Frauen zeichnet sich das Lipidprofil postmenopausaler Frauen durch charakteristische ungünstige Veränderungen aus. Die Menopause sowie das Alter sind für diese Veränderungen hauptverantwortlich. Gekennzeichnet ist das Lipidprofil postmenopausaler Frauen unter anderem durch erhöhte LDL-Cholesterolkonzentrationen im Vergleich zu dem prämenopausaler Frauen (Campos et al., 1988; Cho et al., 2011; Derby et al., 2009; Fukami et al., 1995; Stevenson et al., 1993). Daneben weisen nicht-übergewichtige postmenopausale Frauen auch höhere Gesamtcholesterol- und Triglyzeridkonzentrationen verglichen mit prämenopausalen Frauen auf. Die HDL- und HDL₂-Konzentrationen sind dagegen im Vergleich mit prämenopausalen Frauen niedriger, wohingegen die HDL₃-Konzentrationen erhöht sind. Diese Unterschiede sind weder vom Alter noch vom BMI abhängig (Stevenson et al., 1993). In der SWAN-Studie (Study of Women's Health Across the Nation) traten Veränderungen in den Lipoproteinen hauptsächlich während späteren Phasen der Menopause auf, gekennzeichnet durch erhöhte Gesamt- und LDL-Cholesterolkonzentrationen sowie erhöhte Triglyzerid- und Lipoprotein(a)-Konzentrationen mit Höchstwerten während der späten Peri- und frühen Postmenopause. Gleiche Verläufe zeigten sich hier auch für die HDL-Cholesterolkonzentrationen, die während der späten Peri- und frühen Postmenopause am höchsten waren (Derby et al., 2009). Hinsichtlich der HDL-Cholesterolkonzentrationen ist die Studienlage jedoch uneinheitlich. So konnten in einem Zeitraum von vier Jahren vor bis zu einem Jahr nach der Menopause keine Veränderungen sowohl der HDL-Cholesterolkonzentrationen noch der TG-Konzentrationen festgestellt werden (Fukami et al., 1995). Dementsprechend konnten während des Übergangs von der Prä- zur Postmenopause ebenfalls keine Unterschiede zwischen den HDL-Cholesterol- und Triglyzeridkonzentrationen von prämenopausalen, perimenopausalen und postmenopausalen Frauen gezeigt werden (Cho et al., 2011).

Die im Verlauf der Peri- und Postmenopause auftretenden Veränderungen im Lipid- und Lipoproteinstoffwechsel sind auf veränderte Hormonkonzentrationen zurückzuführen, die während

des menopausalen Übergangs auftreten. In der Perimenopause sinken die Estrogenkonzentrationen auf unter 20 pg/mL ab, dagegen ist das FSH mit Werten über 20 mIE/mL erhöht. Auch das LH ist leicht erhöht (20-75 mIE/mL). Progesteron ist nicht mehr nachweisbar und die Androgenkonzentration herabgesetzt. Die Testosteronkonzentrationen sind wie auch in der nachfolgenden Postmenopause konstant. Ein permanent niedriges Estrogenniveau und ein konstant erhöhtes FSH mit mehr als 60 mIE/mL kennzeichnen die Menopause. Auch das LH weist in dieser Phase gleichbleibend erhöhte Werte auf. Die Androgene sind, wie auch in der Perimenopause, reduziert (Heinrigs, 2009). Derby et al. (2009) berichten von den niedrigsten Gesamt- und LDL-Cholesterol- und Triglyzerid-Konzentrationen in Frauen, die die höchsten Estrogenspiegel aufwiesen (Derby et al., 2009). Entsprechend konnten positive Korrelationen zwischen FSH und Gesamtcholesterolkonzentration sowie negative Korrelationen zwischen Estradiol und Gesamtcholesterolkonzentration gezeigt werden (Cho et al., 2011). Nach Behandlung mit Estrogen bzw. Kombinationen aus Estrogen und Progesteron wiesen auch noch die Frauen, die der am wenigsten effektiven Behandlung ausgesetzt waren, um durchschnittlich 0,6 mmol/L (2,4 mg/dL) höhere HDL-Cholesterolkonzentrationen und um 0,26 mmol/L (10,1 mg/dL) niedrigere LDL-Cholesterolkonzentrationen verglichen mit den Konzentrationen nach Placebozufuhr auf (Miller et al., 1995).

Für Veränderungen in den LDL-Cholesterolkonzentrationen nach Estrogensubstitution kann die LDLR-Aktivität in Hepatozyten und extrahepatischen Geweben verantwortlich sein. Der LDLR auf der Oberfläche von Hepatozyten und u. a. humanen Lymphozyten besitzt die Fähigkeit, die Aufnahme und den Abbau von LDL-Cholesterol aus dem Plasma zu vermitteln (Brown et al., 1981; Ho et al., 1976). Durch die verminderten Estrogenkonzentrationen nach der Menopause sinkt die Zahl der LDL-Rezeptoren in der Leber und damit steigen die LDL-Cholesterolkonzentrationen im Blut an (Arca et al., 1994). Nach oraler Estrogengabe (2mg/d) konnte in postmenopausalen Frauen mit initial niedrigen LDLR-Aktivitäten eine Erhöhung der LDLR-Aktivität in Lymphozyten festgestellt werden. Damit einhergehend sanken proportional die Gesamt- und LDL-Cholesterolkonzentrationen (Inukai et al., 2000). In postmenopausalen Frauen ohne Hormonersatztherapie (HRT) konnten höhere Gesamt- und LDL-Cholesterolkonzentrationen sowie Lipoprotein(a)-Konzentrationen ermittelt werden, als bei solchen, die eine HRT durchführten oder prämenopausal waren. Die LDLR-Aktivität lag bei diesen postmenopausalen Frauen ohne HRT unter der Aktivität der postmenopausalen Frauen mit HRT. Es bestand eine negative Korrelation zwischen der LDLR-Aktivität und den Gesamt- sowie LDL-Cholesterolkonzentrationen (Abbey et al., 1999).

1.2.6.2 Körperfettverteilung in der Menopause

Veränderungen in der Körperzusammensetzung und hier insbesondere der Körperfettverteilung, sind neben Veränderungen in den Lipoproteinkonzentrationen weitere Faktoren, welche sich einerseits negativ auf den Fettstoffwechsel auswirken können und andererseits selbst zu einem erhöhten kardiovaskulären Risiko beitragen (siehe Kapitel 1.2.5). Viszerales und subkutanes Fettgewebe

sezernieren Adipozytokine, u. a. Leptin und Adiponektin, welche wichtige Mediatoren des Glucose- und Lipidstoffwechsels darstellen und weisen unterschiedliche lipolytische sowie lipogene Aktivität auf.

Die Menopause stellt einen Risikofaktor für eine Gewichtszunahme dar und geht mit einem verstärkten Verlust der fettfreien Masse einher (Kaser, 2008). Während der menopausalen Transitionsphase erhöht sich das Körpergewicht und damit einhergehend der BMI (Gambacciani et al., 1999; Ley et al., 1992). Daneben führen reduzierte Estrogen- und Progesteronkonzentrationen zu einer Verschiebung des prämenopausalen Fettverteilungsmusters – also der gynoiden Fettverteilung – hin zu einer erhöhten Einlagerung von Fett im Bauchraum und damit einer zentralen Adipositas – und somit einer androiden Fettverteilung (Gambacciani et al., 1999; Rosano et al., 2007). Altersabhängig kommt es in prämenopausalen Frauen zu einer Erhöhung des Körperfettgehaltes in der gynoiden Region, die durch eine verstärkte Einlagerung von Fett im Beinbereich gekennzeichnet ist. Demgegenüber stehen Fetteinlagerungen in der androiden Region bei perimenopausalen Frauen, welche primär auf die menopausalen Veränderungen als auf das Alter zurückzuführen sind (Gambacciani et al., 1999). Dieser androiden Fettverteilung kann teilweise mit einer HRT entgegengewirkt werden (Gambacciani et al., 2001).

Veränderungen der Lipoproteinkonzentrationen während des menopausalen Übergangs sind in peri- und postmenopausalen Frauen mit initial höherem Körpergewicht weniger stark ausgeprägt als in Frauen mit niedrigerem Körpergewicht. Dies könnte von erhöhten Östradiolkonzentrationen in diesen Frauen abhängig sein, da ein erhöhter BMI in peri- und postmenopausalen Frauen mit erhöhten Estradiolkonzentrationen assoziiert ist (Derby et al., 2009; Randolph et al., 2004). Estrogene tragen bedeutend zur Regulation der Entwicklung und Verteilung von Fettgewebe bei, u. a. sind sie an der Festlegung der Adipozytenzahl beteiligt und beeinflussen die Lipolyse über indirekte Induzierung der HSL und Erhöhung der Fettsäureoxidation. Zudem übt E2 metabolische Effekte auf Gewebe aus, die den Appetit, Energieumsatz oder Stoffwechsel (bspw. Hypothalamus oder Leber) und damit einhergehend auch das Fettgewebe regulieren (Cooke et Naaz, 2004).

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zwischen Estrogenen und Isoflavonen können solche Effekte auf Fettgewebe und Fettmetabolismus, wie sie beispielsweise für E2 bekannt sind, auch als potentielle Wirkmechanismen der Isoflavone angenommen werden.

1.3 Isoflavone

Die Isoflavone zählen neben den Lignan- und Coumestanen zur Klasse der Phytoestrogene und sind somit den sekundären Pflanzenstoffen zuzuordnen. Aufgrund ihrer chemischen Struktur gehören Isoflavone zu den Flavonoiden, welche wiederum eine Untergruppe der Polyphenole darstellen (Watzl et al., 2005). Der Pflanze dienen sie zur Abwehr von Pathogenen und sind an der Signaltransduktion sowie der Zell-Zell-Kommunikation beteiligt (Rolfe, 1988).

1.3.1 Struktur, Vorkommen und Aufnahme der Isoflavone

Die Struktur der Isoflavone zeichnet sich durch zwei über einen heterozyklischen Pyranring miteinander verbundene Benzolringe aus (Abbildung 4) (Rimbach et al., 2008). Obwohl sie nicht-steroidal aufgebaut sind, weisen Isoflavone strukturelle Ähnlichkeit mit endogen synthetisierten Estrogenen auf und können an Estrogenrezeptoren binden, wobei sie eine stärkere Bindungsaffinität zu Estrogenrezeptor β (ER β) als zu Estrogenrezeptor α (ER α) aufweisen (Kuiper et al., 1998). Durch die Bindung an Estrogenrezeptoren können Isoflavone estrogene oder auch anti-estrogene Wirkungen im Körper hervorrufen.

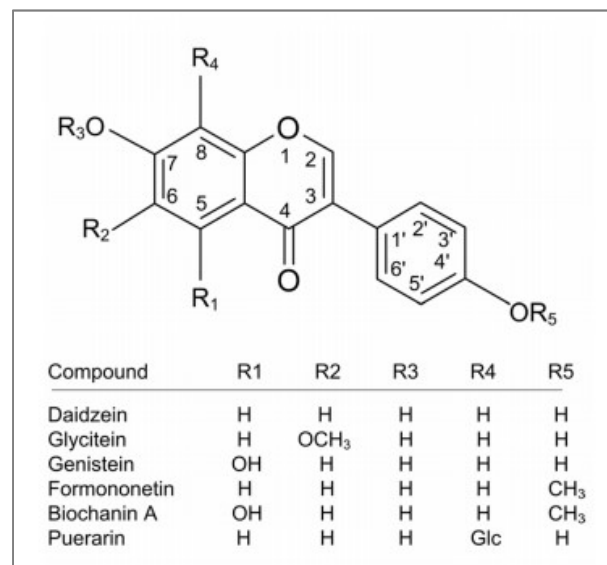


Abbildung 4 Strukturen der Isoflavonaglykone (Mortensen et al., 2009).

Isoflavone kommen vorwiegend in Pflanzen der Familie der Leguminosen (Leguminosae) vor. Unter diesen ist die Sojabohne (*Glycine max*) die Hauptquelle für Isoflavone. Daneben sind bedeutende Konzentrationen auch in Rotklee (Isoflavone Formononetin und Biochanin A) und den Wurzelknollen der Kuduzpflanze (Isoflavon Puerarin) zu finden (Mortensen et al., 2009). Die Hauptisoflavone in der Sojabohne sind Genistein, Daidzein und Glycitein, die in der Pflanze vorwiegend β -glykosidisch

gebunden (Genistin, Daidzin und Glycitin) vorliegen. In nicht-verarbeiteten Sojabohnen finden sich hauptsächlich 7-*O*- β -Glykoside und 6''-*O*-malonyl-7-*O*- β -Glykoside der Isoflavone (Mortensen et al., 2009). Die Isoflavongehalte der Sojabohnen unterliegen einer großen Variabilität und können u. a. in Abhängigkeit von den Anbaubedingungen oder dem Erntejahr stark variieren (Wang et Murphy, 1994).

Die Aufnahme von Isoflavonen bei westeuropäischer Ernährungsweise ist gering, da Soja oder Sojaprodukte in dieser einen eher geringen Anteil ausmachen. Verglichen mit der Aufnahme in asiatischen Ländern, in denen täglich über traditionelle Lebensmittel Isoflavonmengen zwischen 11 und 40 mg/d Gesamtglykone (entsprechend 18-63 mg/d Glykosiden) über die normale Ernährung zugeführt werden, ist die Aufnahme in westlichen Ländern mit unter 2 mg/d deutlich niedriger (Munro et al., 2003).

Der Konsum neuartiger Sojaprodukte, wie beispielsweise Sojamilch-Getränke, Sojakäse oder auch Sojajoghurt, steigt in den westlichen Ländern an und trägt damit ebenfalls zur Isoflavonaufnahme bei (Mortensen et al., 2009). Der Verarbeitungsgrad der Produkte hat einen Einfluss auf die chemische Form der zugeführten Isoflavone. Während nicht-fermentierte Sojaprodukte hauptsächlich β -glykosidische Konjugate enthalten, liegen die Isoflavone in fermentierten Produkten (z. B. Miso, Tempeh oder Sojabohnenpaste) überwiegend als Isoflavonaglykone vor (Coward et al., 1993). Sojasauce, Sojalecithin und Sojaöl weisen dagegen keine bedeutenden Mengen an Isoflavonen auf (Coward et al., 1993; Setchell et Cassidy, 1999; Wang et al., 1990). Einen signifikanten Einfluss auf die Isoflavonaufnahme hat die Einnahme von Isoflavon supplementen auf der Basis von Soja oder Rotklee. Diese Extrakte sind häufig nicht ausreichend charakterisiert und Konsumenten können über die Einnahme solcher Supplemente und angereicherter Produkte hohen Isoflavonmengen ausgesetzt sein (Cassidy, 2005).

1.3.2 Bioverfügbarkeit und Metabolisierung der Isoflavone

1.3.2.1 Absorption

Isoflavone werden über nicht-fermentierte Sojalebensmittel hauptsächlich als Glykoside aufgenommen, während sie über fermentierte Produkte vorwiegend als Aglykone aufgenommen werden. Die für die Absorption der Isoflavone verantwortlichen Vorgänge sind noch nicht ausreichend geklärt (Kulling et Watzl, 2003; Mortensen et al., 2009). Die Beteiligung von bakteriellen intestinalen Glucosidasen als auch dünndarmeigenen zytosolischen Glucosidasen, welche die Isoflavone vor deren Absorption hydrolysieren und deren Aglykone freisetzen ist wahrscheinlich (Day et al., 2000; Setchell, 1998). Die Aglykone werden nachfolgend absorbiert oder unterliegen einer weiteren Metabolisierung im Darm (Cassidy, 2005). Durch die Lipophilie der Aglykone kann eine Resorption durch passive Diffusion angenommen werden (Kulling et Watzl, 2003). In humanen intestinalen Caco-2-Zellen konnten Isoflavonaglykone die Zellwand passieren, während dies für die Glykoside

nicht der Fall war (Murota et al., 2002; Oitate et al., 2001). Daneben werden auch aktive Transportwege über beispielsweise den Natrium/Glucose-Cotransporter 1 (SGLT1) diskutiert, wie er für das Flavanol Quercetin nachgewiesen wurde (Gee et al., 1998; Kottra et Daniel, 2007; Walgren et al., 2000).

1.3.2.2 Metabolisierung

Die nicht absorbierten oder von β -Glucosidasen nur schlecht hydrolysierten Isoflavone gelangen in den Dickdarm, wo sie einer bakteriellen Metabolisierung unterliegen (Barnes, 2010; Kulling et Watzl, 2003). Im Dickdarm kommt es neben Hydrolysierungen auch zu reduktiven Modifizierungen am heterozyklischen Ring der Isoflavone. Genistein wird hierbei zunächst zu Dihydrogenistein reduziert und kann nachfolgend zu 6'-Hydroxy-O-Demethylangolensin (6'-Hydroxy-O-DMA) oder *p*-Ethylphenol metabolisiert werden. Modifizierungen des Daidzeins führen zu Dihydrodaidzein, O-demethylangolensin (O-DMA) und Equol (Abbildung 5) (Cassidy, 2005; Kulling et Watzl, 2003). Der Daidzeinmetabolit Equol wird, abhängig von der individuellen Darmmikrobiota, nur in ca. 30-40 % der Bevölkerung gebildet (Setchell et al., 2003). Demnach kann in Equolbildner (EB) und Nicht-Equolbildner (NEB) unterschieden werden (Cassidy, 2005). Equol zeichnet sich im Vergleich zu anderen Isoflavonen und Isoflavonmetaboliten durch eine geringere Affinität für Serumproteine aus, wohingegen seine Affinität zu Estrogenrezeptoren (ER) im Vergleich zu seinen Vorstufen Daidzein und Dihydrodaidzein erhöht ist (Hodgson et al., 1996). Weiterhin weist Equol eine höhere antioxidative Kapazität auf, was auf die fehlende 2,3-Doppelbindung und die 4-oxo-Gruppe am C-Ring zurückführbar zu sein scheint (Arora et al., 1998).

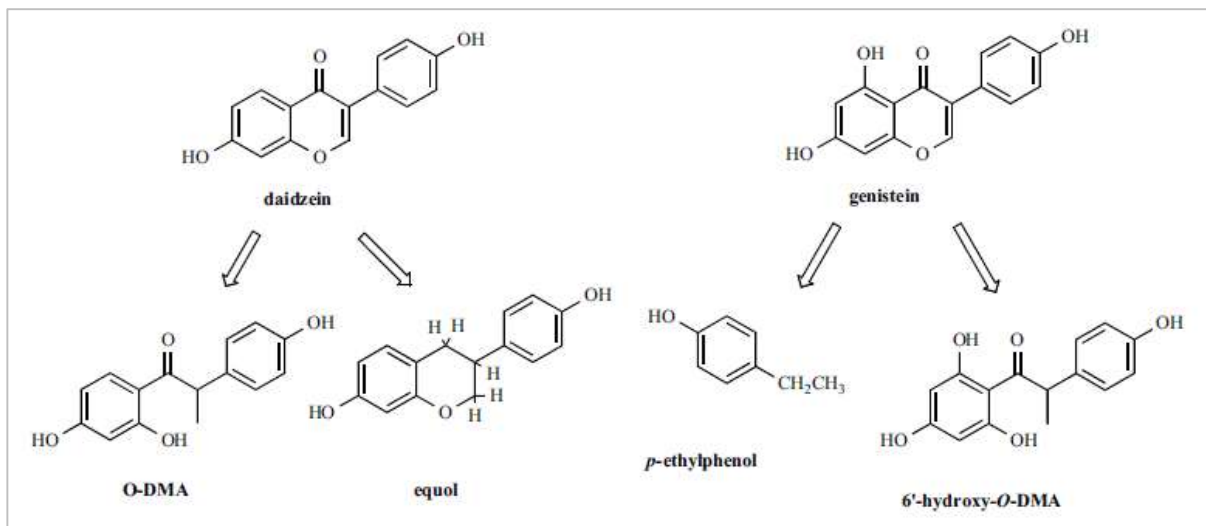


Abbildung 5 Bakterielle Metabolite der Isoflavone Daidzein und Genistein (Poluzzi et al., 2014).

Nach der Absorption der Isoflavone und deren Metaboliten aus dem Darm gelangen diese über die Pfortader zur Leber. Hier unterliegen sie Hydroxylierungsreaktionen durch Cytochrom P450

Isoenzyme sowie Phase-II-Konjugationsreaktionen mit Glucuronsäure oder Sulfat (Kulling et al., 2000; Kulling et al., 2001). Diese Konjugationsreaktionen können in Leber und Darm auftreten. Die Isoflavone gelangen als Phase-II-Konjugate in die systemische Zirkulation und sind in zahlreichen Körperflüssigkeiten nachweisbar (Lampe, 2003; Mortensen et al., 2009). Nachweise von Isoflavonen in humanem Gewebe fehlen jedoch größtenteils (Mortensen et al., 2009), mit Ausnahme von Daten im weiblichen Brustgewebe und in der Prostataflüssigkeit (Hedlund et al., 2005; Maubach et al., 2003). Die Ausscheidung erfolgt neben der hauptsächlich renalen Ausscheidung auch biliär (Mortensen et al., 2009). Im Zuge dieser gelangen die Isoflavone mit der Galle in den Darm, wo sie weiter mikrobiell metabolisiert werden und die entstandenen Aglykone reabsorbiert werden können. Folglich unterliegen die Isoflavone einem enterohepatischen Kreislauf (Sfakianos et al., 1997). Nach Isoflavonzufuhr können im Plasma und Urin Glucuronide und in geringeren Konzentrationen auch Sulfatkonjugate der Isoflavone nachgewiesen werden (Cassidy, 2005; Mortensen et al., 2009). Im Plasma finden sich vorwiegend Isoflavonkonjugate und zu ca. 1-2 % Aglykone (Kulling et Watzl, 2003). Glucoside sind im Plasma nicht vorzufinden. Plasma Gesamtisoflavonkonzentrationen können bei Asiaten mit traditioneller Ernährung im Mittel bei 870 nM liegen. Demgegenüber stehen Isoflavonplasmakonzentrationen von Europäern mit ca. 10 nM (Adlercreutz et al., 1993).

Isoflavone werden im Plasma größtenteils an Plasmaproteine gebunden transportiert (Csanady et al., 2002). Nach Daidzeinaufnahme konnte gezeigt werden, dass dessen Transport zu ca. 47 % an Lipoproteine assoziiert erfolgt. Der mit 20 % höchste Anteil wurde an LDL assoziiert detektiert. Der Anteil in HDL lag bei 14 %, in VLDL bei 9,5 % und in Chylomikronen bei 2,5 % (Rüfer et al., 2009). Nach der moderaten Aufnahme sojahaltiger Lebensmittel können Serumkonzentrationen im niedrigen mikromolaren Bereich erreicht werden. Diese Konzentrationen liegen zwischen 100 bis 1000-fach höher als die Konzentrationen an Estrogen (Cassidy, 2005). Isoflavone weisen im Vergleich zu Estrogenen eine geringere Bindung an Serumproteine auf, wodurch sie Geweben eher zur Verfügung stehen können (Nagel et al., 1998).

1.3.3 Isoflavonwirkungen

Isoflavonwirkungen können entweder über Estrogenrezeptoren vermittelt oder Estrogenrezeptor-unabhängig hervorgerufen werden.

1.3.3.1 Estrogenrezeptor-vermittelte Wirkungen

Estrogenrezeptoren sind Steroidrezeptoren und gehören zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren NR3I. Ihre Aktivierung erfolgt durch das Steroidhormon Estrogen (Dahlman-Wright et al., 2006). Die Estrogenrezeptoren sind gewebespezifisch exprimiert. So findet man den ER α vorwiegend in Brust, Uterus und Leber. ER β dagegen befindet sich in den Ovarien, Hoden, Prostata und dem Gastrointestinaltrakt (Couse et Korach, 1999; Lau et al., 1999; Matthews et Gustafsson, 2003). Diese unterschiedliche Expressierung der Rezeptoren ermöglicht folglich gewebespezifische Wirkungen.

Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit Estrogen können Isoflavone ebenfalls an Estrogenrezeptoren binden und Estrogenrezeptor-vermittelte Wirkungen hervorrufen (Martin et al., 1978), auch wenn die Affinität zum Rezeptor 1000 bis 10000-fach geringer eingeschätzt wird als die von Estradiol (Schmitt et al., 2001). Jedoch können nach moderater Aufnahme sojahlaltiger Lebensmittel Isoflavonkonzentrationen im niedrigen mikromolaren Bereich erreicht werden, die 100 bis 10000-fach höher sind, als die der endogenen Estrogene (Cassidy, 2005). Neben der gewebespezifischen Rezeptorexpression trägt auch die höhere Affinität der Isoflavone zu ER β zu den gewebespezifischen Isoflavonwirkungen bei. Daher werden sie auch als selektive Estrogenrezeptormodulatoren (SERM) angesehen, die je nach Gewebe estrogene, antiestrogene oder keine Wirkungen hervorrufen können (Mortensen et al., 2009). In Abhängigkeit der endogenen Estrogenkonzentration zeigen sich unterschiedliche Isoflavoneffekte. Postmenopausale Estrogenkonzentrationen führen zu agonistischen, additiven Effekten der Isoflavone. Antagonistische Effekte der Isoflavone treten dagegen bei premenopausalen Estrogenkonzentrationen durch kompetitive Bindung der Isoflavone an den Rezeptor auf (Hwang et al., 2006).

1.3.3.2 Nicht ER-abhängige Wirkungen

Neben den beschriebenen direkten, ER-abhängigen genomischen Effekten können Isoflavone auch über nicht ER-abhängige Mechanismen wirken oder als Vorstufen für Substanzen mit endokrinen Wirkungen dienen (Mortensen et al., 2009; Nilsson et al., 2011; Smith et O'Malley, 2004). Insbesondere für Genistein sind zahlreiche hormonunabhängige Wirkmechanismen beschrieben, neben beispielsweise Effekten auf die Aromatase und Tyrosinkinase auch dessen antioxidative Aktivität (Akiyama et al., 1987; Kao et al., 1998; Kulling et Watzl, 2003).

1.3.3.3 Potentielle Wirkungen von Isoflavonen bei Postmenopausalen Frauen

Weltweit variiert die Inzidenz von kardiovaskulären Erkrankungen, Osteoporose, Brustkrebs aber auch menopausalen Beschwerden stark. Teilweise ist in asiatischen Ländern das Auftreten dieser Erkrankungen bzw. Symptome niedriger als in westlichen Ländern, u. a. ist in Japan die Inzidenz für kardiovaskuläre Erkrankungen geringer (Ohira et Iso, 2013; Wu et al., 2008). Dies wird in epidemiologischen Studien u. a. mit einer höheren Aufnahme von Sojaisoiflavonen über die Ernährung in Zusammenhang gebracht, welche mit erhöhten Urin- und Plasma-Isoflavonkonzentrationen in asiatischen Ländern einhergeht (Adlercreutz et al., 1991). Folglich sind die Isoflavone und deren potentielle Effekte im Zusammenhang mit den erwähnten Erkrankungen und Beschwerden in den Fokus des Forschungsinteresses gerückt (Adlercreutz et al., 1986; Cassidy, 2005). Die kardioprotektiven Effekte werden auf die strukturelle Ähnlichkeit zwischen Sojaisoiflavonen und Estrogenen zurückgeführt. Das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen postmenopausaler Frauen kann durch eine Estrogensersatztherapie vermindert werden. Diese positiven Effekte werden über Veränderungen im Lipoproteinmetabolismus vermittelt und hier v. a. durch Verminderungen der LDL- sowie Erhöhungen der HDL-Cholesterolkonzentrationen. Weiterhin entfalten Estrogene direkte

Effekte auf die Blutgefäßwände, die sich positiv auf das Erkrankungsrisiko für kardiovaskuläre Erkrankungen auswirken können wie z. B. die Regulation des Gefäßtonus über die Aktivierung der endothelialen Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase mit nachfolgender NO-Freisetzung (Hisamoto et Bender, 2005; Setchell et Cassidy, 1999). Auch für die Isoflavone werden solche atheroprotektiven Mechanismen angenommen. So werden neben dem Einfluss auf Serumlipide und antioxidative Wirkungen auch Einflüsse auf die Arterienfunktion, Zelladhäsion und Thrombozytenaggregation, als auch anti-inflammatorische Effekte diskutiert (Abbildung 6) (Cassidy, 2005; Mortensen et al., 2009).

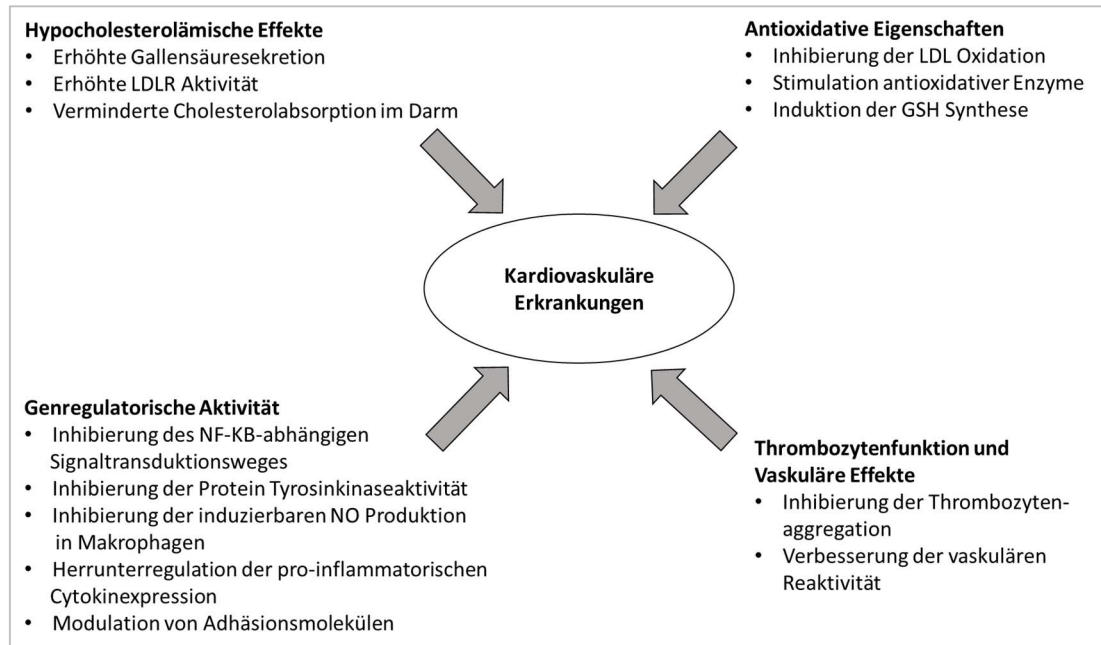


Abbildung 6 Potentielle Mechanismen von Isoflavonen mit Auswirkungen auf das kardiovaskuläre Risiko. Darstellung modifiziert nach Cassidy 2005 (Cassidy, 2005).

1.3.3.4 Antioxidative Kapazität der Isoflavone

Der antioxidativen Kapazität der Isoflavone könnten verschiedene molekulare Mechanismen zugrunde liegen, beispielsweise die Inhibierung der H₂O₂-Produktion, die Stimulation antioxidativer Enzyme (Katalase, Superoxid-Dismutase) oder die Fähigkeit Chelatkomplexe mit Metallen einzugehen (Mortensen et al., 2009). Weiterhin können Genistein und Daidzein dazu beitragen, verminderte zelluläre Glutathionkonzentrationen wieder zu erhöhen (Cassidy, 2005). Im Gegensatz zu Daidzein scheint Genistein ein effektiveres Antioxidans darzustellen, was wahrscheinlich auf dessen dritte Hydroxylgruppe am C-5 zurückzuführen ist (Mortensen et al., 2009). Die antioxidative Kapazität von Equol liegt wohl noch über der von Genistein und Daidzein und lässt sich möglicherweise durch dessen vorangegangene extensive Metabolisierung und die dadurch fehlende 2,3-Doppelbindung sowie die fehlende 4-Oxo-Gruppe erklären (Arora et al., 1998; Rüfer et al., 2006). Darüber hinaus kann Genistein mit Lipidradikalen reagieren und somit die Lipidperoxidation reduzieren (Patel et al., 2001). Nach dem Konsum isoflavonhaltiger Sojaprodukte konnte eine erhöhte Oxidationsresistenz der LDL auch in isolierten LDL festgestellt werden (Tikkanen et al., 1998; Wiseman et al., 2000). Die

Reduktion der Lipidperoxidation ist bedeutend für die Verminderung oxidativer Prozesse an den LDL und der Ausbildung von Schaumzellen.

1.3.3.5 Isoflavoneffekte auf den Lipid- und Lipoproteinmetabolismus sowie die Körperzusammensetzung

Die Wirkungen von isolierten Isoflavonen auf die Serumlipide wurden in zahlreichen Interventionsstudien untersucht (Aubertin-Leheudre et al., 2008; Kim et al., 2013; Nikander et al., 2004; Steinberg et al., 2011; Uesugi et al., 2002; Ye et al., 2012b). Hierbei zeigten sich oftmals keine Unterschiede zwischen den Interventionsgruppen und den Kontrollgruppen in Hinblick auf Gesamt-, LDL- und HDL-Cholesterolkonzentrationen sowie TG-Konzentrationen (Aubertin-Leheudre et al., 2008; Nikander et al., 2004; Steinberg et al., 2011; Ye et al., 2012b). Demgegenüber stehen jedoch Studienergebnisse, in denen Interventionen zu senkenden Effekten auf die Triglyzeridkonzentrationen oder zu Erhöhungen der LDL-Cholesterolkonzentrationen führten (Kim et al., 2013; Nikander et al., 2004). Weiterhin wurden zahlreiche Interventionsstudien durchgeführt, bei denen kombinierte Präparate aus Sojaprotein und isolierten Isoflavonen eingesetzt wurden und welche ebenfalls inhomogene Ergebnisse hinsichtlich ihrer Effekte auf Parameter des Lipidstoffwechsels zeigten (Campbell et al., 2010; Mangano et al., 2013; Taku et al., 2007; Teede et al., 2001; Wangen et al., 2001; Zhan et Ho, 2005). In zwei Metaanalysen wurden Gesamt- und LDL-Cholesterolsenkende Effekte durch die kombinierte Gabe von Sojaprotein und Isoflavonen festgestellt (Taku et al., 2007; Zhan et Ho, 2005). Ergebnisse aktuellerer Interventionsstudien konnten solche Effekte dagegen nicht bestätigen (Campbell et al., 2010; Mangano et al., 2013).

Einflüsse einer Isoflavonintervention auf die Lipoproteinkonzentrationen könnten über eine gesteigerte Expression oder Aktivität des LDL-Rezeptors oder auch des CD36-Rezeptors vermittelt werden. Solche Isoflavonwirkungen sind bisher für LDLR in wenigen Humanstudien gezeigt worden (Baum et al., 1998; Lovati et al., 1987). Für CD36 wurden vor diesem Hintergrund bisher noch keine Humanstudien durchgeführt. Sowohl für LDLR als auch für CD36 sind solche Einflüsse vorwiegend in Zellkulturexperimenten oder im Tiermodell beschrieben (Caruso et al., 2008; Kirk et al., 1998; Owen et al., 2004). Bisher wurden weder *in vitro*, *ex vivo* noch *in vivo* Studien zum Einfluss von Isoflavonen auf die CD36-Expression bzw. Aktivität in Monozyten bzw. Makrophagen durchgeführt. Jedoch regulierten sowohl Genistein als auch Daidzein in humanen HepG2-Zellen die transkriptionelle Aktivität des CD36 Rezeptors hoch, wobei diese Regulation durch Genistein stärker ausgeprägt war als durch Daidzein (Yang et al., 2009).

Weiterhin werden anti-adipogene Wirkungen von Soja und Isoflavonen diskutiert. Solche Effekte sind bisher vorwiegend in Tierstudien beschrieben (Cao et al., 2013; Kurrat et al., 2015; Zanella et al., 2015), aber auch in einer Humanstudie führte die kombinierte Gabe von Soja und Isoflavonen zu verminderten Mengen an abdominellem und subkutanem abdominellem Fett (Sites et al., 2007). Als mögliche Mechanismen dieser anti-adipogenen Effekte werden beispielsweise eine durch Isoflavone

hervorgerufene Erhöhung der Lipolyse, Verminderungen der LPL-Aktivität und der Adipozytendifferenzierung angenommen (Harmon et Harp, 2001; Kim et al., 2006; Naaz et al., 2003; Rayalam et al., 2008). Solche Wirkungen der Isoflavone auf Parameter der Körperzusammensetzung könnten sich nachfolgend auch in Veränderungen des Lipidtransports, der Lipoproteinzusammensetzung und den Lipoproteinkonzentrationen widerspiegeln (vgl. Kapitel 1.2.5).

Zusammenfassend deutet die bisherige Datenlage darauf hin, dass Isoflavone die Serumlipidkonzentrationen und Lipoproteinzusammensetzung beeinflussen können, die Studienergebnisse sind allerdings inhomogen. Hinsichtlich der Wirkung von Isoflavonen auf die LDLR- und CD36-Expression sowie auf Parameter der Körperzusammensetzung und damit verbundenen Auswirkungen auf die Serumlipide gibt es nur wenige bzw. noch keine Humanstudien. Aus den bisherigen Zellkultur- und Tierstudien lässt sich jedoch schlussfolgern, dass es sich hierbei um potentielle Wirkmechanismen der Isoflavone handelt. Diese inhomogene bzw. unzureichende Datenlage und die Frage nach potentiellen Einflussfaktoren auf Isoflavonwirkungen, welche zur Inhomogenität der bisher veröffentlichten Studienergebnisse beitragen könnten, führten zu den nachfolgend in Kapitel 2 beschriebenen Fragestellungen für die vorliegende Arbeit.

2 Problemstellung und Ziele der Arbeit

Primär durch verminderte Estrogenkonzentrationen hervorgerufen weisen postmenopausale Frauen neben der Amenorrhoe und den möglicherweise auftretenden typischen Wechseljahrsbeschwerden, wie Hitzewallungen oder Schweißausbrüchen, auch Veränderungen in der Körperzusammensetzung sowie ungünstige Veränderungen in den Konzentrationen der Lipoproteine und Serumlipide auf. Zudem erhöht sich das Risiko für Osteoporose und kardiovaskuläre Erkrankungen. Um die niedrigen Estrogenspiegel auszugleichen und den beschriebenen Risiken entgegenzuwirken, wird häufig eine Hormonersatztherapie durchgeführt. Diese wiederum ist mit unerwünschten Nebenwirkungen, z. B. einem erhöhten Brustkrebsrisiko assoziiert. Die Einnahme von pflanzlichen Isoflavonen bietet hier vielen Frauen eine scheinbar nebenwirkungsärmere Alternative. Isoflavone können aufgrund ihrer estrogenähnlichen Struktur ebenfalls estrogene Aktivität vermitteln. Daneben sind sie frei verkäuflich und demnach leicht zugänglich.

Studienergebnisse zur Wirkung isolierter Isoflavone bei postmenopausalen Frauen sind allerdings inkonsistent. Bei einem Teil der Frauen scheint sich die Einnahme positiv auf vorhandene Beschwerden in den Wechseljahren auszuwirken, während solche Effekte bei anderen Frauen nicht beobachtet werden. Ein Einfluss der Isoflavone auf die Serumlipide wird ebenfalls postuliert, allerdings sind auch hier die Studienergebnisse sehr uneinheitlich. Daraus resultiert die Frage, welche Faktoren zu diesen konträren Wirkungen beitragen. Ein Einfluss einer Isoflavonintervention auf die fettstoffwechselrelevanten Rezeptoren LDLR und Scavenger Rezeptor CD36 ist denkbar. Somit könnten Veränderungen in der Expression dieser Rezeptoren einen Mechanismus für mögliche Wirkungen von Isoflavonen auf die Serumlipide darstellen. Ursächlich könnten hierfür aber auch der Körperfettgehalt, das viszerale Bauchfett sowie der Equolbildnerstatus sein. Der Einfluss des Körperfettgehaltes auf den Lipoprotein- und Lipidstoffwechsel ist beschrieben. Der Transport der Isoflavone im Blut erfolgt zu ca. 50% an Lipoproteine assoziiert. Unterschiede im Lipoproteinprofil, als Konsequenz unterschiedlicher Körperfett- oder Viszeralfettgehalte, könnten somit Auswirkungen auf Transport und Aufnahme und darüber hinaus die Wirkungen der Isoflavone haben. Der Equolbildnerstatus als potentieller Einflussfaktor auf Isoflavonwirkungen wird ebenfalls diskutiert. Die biologische Aktivität von Isoflavonen in Equolbildnern könnte stärker ausgeprägt sein als in Nicht-Equolbildnern.

Tier- und Humanstudien deuten zudem auf Effekte von Soja und Sojaisoflavonen auf die Körperzusammensetzung hin. Die in der Menopause beschriebene vermehrte Einlagerung von viszeralem Bauchfett ist mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen assoziiert. Daher werden Fettstoffwechselfparameter und Parameter der Körperzusammensetzung herangezogen um Auswirkungen der Intervention auf diese Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen beurteilen zu können.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Wirkungen von isolierten Sojaisoflavonen auf den Fettstoffwechsel postmenopausaler Frauen zu untersuchen. Hierzu wurden in einer 12-wöchigen randomisierten, doppelblinden und Placebo-kontrollierten Interventionsstudie im Paralleldesign folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Führt die Intervention mit Sojaisoflavonextrakt in postmenopausalen Frauen zu Veränderungen in den Serumlipidkonzentrationen?
 - Werden solche Isoflavoneffekte auf die Serumlipidkonzentrationen durch Veränderungen in der Expression der Rezeptoren LDLR bzw. Scavenger Rezeptor CD36 vermittelt?
 - Beeinflusst der Körperfettgehalt- bzw. die Menge an Viszeralfett oder der Equolbildnerstatus Isoflavoneffekte auf die Serumlipidkonzentrationen?

2. Hat die Intervention mit Sojaisoflavonextrakt in postmenopausalen Frauen einen Einfluss auf das Fettgewebe?
 - Werden Gene des subkutanen Bauchfettgewebes, und hier insbesondere Gene des Fettstoffwechsels, des Estrogenmetabolismus oder der Energiehomöostase, durch die Isoflavonintervention differentiell verändert exprimiert?
 - Wirkt sich die Isoflavonintervention auf den Körperfettgehalt und die Körperzusammensetzung aus?
 - Können Isoflavone und deren Metabolite im Fettgewebe lokalisiert werden? Welche Metabolite sind hier zu finden und in welcher Quantität?

3 Material und Methoden

3.1 Studiendesign

Um die Forschungsfragen zu beantworten wurde eine prospektive, doppelblinde, randomisierte und Placebo-kontrollierte Interventionsstudie im Paralleldesign durchgeführt. Diese Studie war ein am Max Rubner-Institut (MRI), Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel in Karlsruhe, durchgeführtes Teilprojekt des durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) geförderten Projektes „Isoflavones: A cross-species comparison on metabolism, estrogen sensitivity, epigenetics, and carcinogenesis“ mit der Fördernummer KU1079/9-1. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Landesärztekammer Baden-Württemberg am 08.02.2011 genehmigt und ist beim DRKS unter der DRKS-ID DRKS00000708 gelistet. Die Studiendurchführung erfolgte monozentrisch am Studienzentrum des MRI. Der Interventionszeitraum betrug 12 Wochen. Studienleiter war Herr Prof. Dr. med. Achim Bub und Studienärztin Frau Dr. med. Claudia Dörr. Die Studie wurde aus Kapazitätsgründen in zwei Perioden zwischen Oktober 2013 und Januar 2014 (Periode 1) sowie Februar 2014 und Mai 2014 (Periode 2) durchgeführt.

Während des 12-wöchigen Interventionszeitraumes mit entweder Isoflavonen (Verum) oder Placebo, kamen die Probandinnen zu drei Terminen in das Studienzentrum: am ersten Tag der Studie (Baseline), nach sechs Wochen und nach der 12-wöchigen Intervention. Für die vorliegende Arbeit wurden nur die Baselinedaten und die Daten nach 12-wöchiger Intervention in die Auswertung einbezogen. Der Termin nach sechs Wochen der Intervention wurde durchgeführt, um Proben für Projektpartner zu generieren und hat keine Relevanz für die vorliegende Arbeit. Sowohl Baseline als auch nach 12 Wochen wurde die Körperzusammensetzung der Probandinnen bestimmt, der Blutdruck gemessen sowie Blut- und Urinproben durch die Probandinnen abgegeben. Nach 12-wöchiger Intervention wurde zudem in einer Subgruppe eine Biopsie des subkutanen Fettgewebes durchgeführt. Alle während der Studie durchgeführten und für diese Arbeit relevanten Untersuchungen sind in Kapitel 3.3 im Detail beschrieben. Eine Übersicht der während des Studienablaufs durchgeführten Untersuchungen ist in Abbildung 7 dargestellt.

Die Blockrandomisierung erfolgte durch einen Statistiker mit SAS 9.4 (SAS Institute Inc. Cary, USA) mit einer Blockgröße von sechs und einer Verteilung von 1:1 (Placebo:Verum). Die Verteilung der Frauen innerhalb eines Blocks erfolgte zufällig. Frauen die Placebo oder Verum bekamen wurden gleichmäßig auf beide Perioden der Studie verteilt. Eine nicht an der Studie beteiligte Person nummerierte die identisch aussehenden Boxen, welche die Isoflavon- oder Placebokapseln enthielten, entsprechend der durch die Randomisierung festgelegten Verteilungssequenz. Die Studiennummern

wurden den Frauen zufällig zugeteilt und am ersten Tag der Studie wurde den Probandinnen ihr Präparat durch die dafür zuständige Person persönlich ausgehändigt.

3.1.1 Probandinnen

Die Rekrutierung der Probandinnen erfolgte zum einen durch Auswahl geeigneter Probandinnen aus der Probandendatenbank des Studienzentrums, indem diejenigen Probandinnen ausgewählt wurden, die dem Anforderungsprofil entsprachen. Diese wurden postalisch kontaktiert und über die Studie informiert. Zum anderen erfolgten Aufrufe über den E-Mail-Verteiler des MRI, Anzeigen und Berichte in den lokalen Tageszeitungen sowie über ein Radiointerview. Zusätzlich wurden bei niedergelassenen Gynäkologen in Karlsruhe und Umgebung Flyer mit Informationen über die geplante Studie ausgelegt.

Das Probandinnenkollektiv setzte sich vollständig aus gesunden postmenopausalen Frauen zusammen, welche die folgenden Einschlusskriterien erfüllten:

Einschlusskriterien

- Postmenopausale Frauen unter 75 Jahren (FSH > 40 IU/L)
- BMI > 20 kg/m²
- Nichtraucherinnen
- Probandinnen, die in schriftlicher Form ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Studie gegeben haben

Frauen, die mindestens eines der folgenden Ausschlusskriterien aufwiesen konnten nicht an der Studie teilnehmen.

Ausschlusskriterien:

- Frauen unter Hormonersatztherapie
- Frauen, die an Brustkrebs erkrankt sind oder waren
- Probandinnen mit schwerwiegenden Erkrankungen, welche die Nährstoffresorption, Verdauungsfunktion, Verstoffwechslung oder Ausscheidung betreffen
- Probandinnen, die in den zurückliegenden 3 Monaten Supplemente oder Medikamente einnahmen, die Zielparameter (Haupt- und Nebenzielparameter) beeinflussen können
- BMI < 20 kg/m²
- Probandinnen, von denen zu erwarten ist, dass sie sich nicht compliant verhalten

Bei Frauen, die ihr Interesse an der Studienteilnahme bekundeten, wurden telefonisch anhand eines standardisierten Fragebogens die Ein- und Ausschlusskriterien abgefragt und darüber hinaus mögliche weitere Erkrankungen ausgeschlossen. Bei Erfüllung der Kriterien und bei weiter bestehendem

Interesse an einer Studienteilnahme durch die Probandinnen, wurde eine Voruntersuchung im Studienzentrum des MRI vereinbart. Dieser Termin umfasste neben einer Anamnese durch die Studienärztin auch eine Blutabnahme (kleines Blutbild) sowie Spontanurinabgabe (Urinteststreifen), um akute Erkrankungen der Probandinnen auszuschließen. Zudem wurden Gewicht und Größe der Probandinnen erfasst um nur Frauen mit BMI > 20 kg/m², entsprechend der Einschlusskriterien, in die Studie aufzunehmen. Darüber hinaus fand an diesem Termin die umfassende mündliche und schriftliche Information der potentiellen Studienteilnehmerinnen über Hintergrund und Ablauf der geplanten Studie statt. Das Einverständnis zur Teilnahme an der Studie wurde schriftlich eingeholt.

3.1.1.1 Fallzahlbestimmung

Da bis zum Zeitpunkt der Studienplanung keine Studien zur Untersuchung der Expression des LDLR und des CD36 Rezeptors auf Leukozyten postmenopausaler Frauen publiziert wurden, wurde die Fallzahl über die potentiell zu erwartende Veränderung der LDL-Cholesterolkonzentrationen bestimmt. Dieser Ansatz wurde gewählt, da ein Zusammenhang zwischen der LDLR- und CD36-Expression und der LDL-Cholesterolkonzentration anzunehmen ist. Bei einer angenommenen Standardabweichung von 25 % der mittleren LDL-Cholesterolkonzentration und einer zu erwartenden Veränderung der LDL-Cholesterolkonzentrationen um ca. 5 % ergibt sich bei einem Signifikanzniveau von 0,05 und einer Power von 0,8 eine Fallzahl von 183 Probandinnen.

3.1.2 Interventionsprodukt

Die Intervention wurde mit einem freiverkäuflichen Sojaisoflavonextrakt der Firma ADM mit einem Isoflavongehalt von 67,7 % (NovaSoy650[®], ADM, Decatur, IL, USA) durchgeführt. Dieser Sojaisoflavonextrakt wurde als Bulkware in einer Abnahmemenge von 20 kg für das gesamte Projekt gekauft, um alle geplanten Human- und Tierstudien mit demselben Extrakt durchführen zu können. Die Darreichung in der hier beschriebenen Humanstudie erfolgte in opaken Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) Kapseln der Größe 0. Als Trennmittel wurde Magnesiumstearat eingesetzt und als Füllstoff diente Maltodextrin. Die äußerlich identischen Placebokapseln beinhalteten ebenfalls Maltodextrin und Magnesiumstearat. Die Kapselabfüllung erfolgte durch die Firma Metabolic Nutrition Sporternährungs GmbH (Messel, Deutschland).

Der Isoflavongehalt pro Kapsel lag bei 58,7 mg (Genistein 49,7%, Daidzein 41,4 %, Glycitein 9,0 %) und wurde durch Dr. Sebastian Soukup vom Institut für Sicherheit und Qualität für Obst und Gemüse des MRI nach der in Molzberger et al. beschriebenen Methode mittels HPLC-DAD quantifiziert (Molzberger et al., 2013). Die Einnahme der Kapseln durch die Studienteilnehmerinnen erfolgte zweimal täglich, sowohl morgens als auch abends während oder nach den Mahlzeiten, woraus sich eine aufgenommene Gesamtmenge an Isoflavonen von 117,4 mg (Aglykonäquivalente) pro Tag ergibt.

3.2 Geräte, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

a) Anthropometrie

Stadiometer seca 910 und seca 220	seca
DEXA Lunar iDXA mit CoreScan/Encore Software	GE Healthcare

b) Blutparameter und Urinproben

Venofix® Safety Sicherheits-Venenpunktionsbesteck	B.Braun
Monovetten S-Monovette® Serum-Gel, 9 mL	Sarstedt
Monovetten S-Monovette® EDTA-Gel, 9 mL	Sarstedt
Heparinröhrchen S-Monovette® Li-Heparin 2,6 mL	Sarstedt
Zentrifuge Heraeus Multifuge X3R Centrifuge	Thermo Scientific
Urinbecher 100 mL mit Schraubverschluss	Sarstedt
CombiScan® 100	Analyticon
Teststreifen für Urilyzer CombiScreen 11SYS PLUS	Analyticon
Kontroll-Lösung für Urilyzer CombiScreen Control PN	Analyticon

c) Durchflusszytometrie

FACS Verse mit Software FACSuite	BD Biosciences
FACS Lysing Solution (1:10 verdünnt mit H ₂ O _{bidest})	BD Biosciences
Fließmittel (FACS Clean, FACS Flow)	BD Biosciences
FACSuite™ CS&T Research Beads	BD Biosciences
Rundbodenröhrchen, Falcon®	Corning
Rollenmischer RM5V-30	CAT
Pipettenspitzen epT.I.P.S Dualfilter (diverse Größen)	Eppendorf
Pipetten Eppendorf Research 0,5-10 µL; 10-100 µL; 100-1000 µL; 500-5000 µL	Eppendorf
Natriumazid	Merck
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich

Lösungen:

PBS-Na-Azid-Lösung (0,1%)

1000 mL PBS ohne Ca²⁺, Mg²⁺
1g Na-Azid
Bei 4°C lagern

Paraformaldehydlösung (1%)

5g Paraformaldehyd in 500 mL 0,15M NaCl (4,383g NaCl in 500 mL Aqua bidest) lösen
 1 mL 1M NaOH zugeben und erhitzen auf 60°C (~1h) (Magnetrührer)
 pH einstellen auf 7,4 (mit 0,1M NaOH bzw. HCl), bei 4°C lagern

Antikörper:

Anti-human-CD3-FITC-AK (Clone UCHT1)	BD Biosciences
Anti-human-CD19-PerCP-AK (Clone A3-B1)	Abcam
Anti-human LDLR-PE-AK (Clone 472413)	R&D Systems
Anti-human CD36-APC-AK (Clone TR9)	Abcam

Isotypkontrollen:

Mouse IgG1-PE-AK (Clone 11711)	R&D Systems
Mouse IgG1 isotype control (clone 1F8)	Abcam

d) Biopsie des subkutanen Fettgewebes**Lokalanästhesie:**

Cutasept® F für Hautdesinfektion	BODE
Zellstofftupfer Askina® Brauncel®	B.Braun
Edding Permanentmarker	Edding
10 ml Spritze mit Sterican® Injektionskanüle Gr. 17	B.Braun
Anästhetikum Xylonest® 1%	AstraZeneca
Unsterile Handschuhe z. B. Powder-free latex gloves	Kimtech

Fettaspiration:

Cutasept® F für Hautdesinfektion	BODE
Injekt® Einmalspritze 10 mL	B.Braun
Discofix® C Dreiwegehahn	B.Braun
Dispomed® Strausskanüle (orange (1,8x43) oder grün (2x43))	Dispomed®
Sterile Handschuhe Sempermed® Supreme	Semperit Technische Produkte GmbH
Raucodrape® PRO OP-Lochtücher, steril, 2-lagig	L&R
Steriles Lochtuch, 2-lagig	L&R
DracoFix sterile Mullkompressen	Dr. Ausbüttel & Co. GmbH
Steri-Strips™	3M
Cutiplast Plus Steril Pflaster	Smith & Nephew
Kalt/Warm Mehrfach Komresse Hot/Cold Pack	Gello® GmbH Geltechnik

Probenweiterverarbeitung:

0,9 % NaCl-Lsg	B.Braun
Corning® 15 mL Zentrifugenröhrchen	Corning®
Cryoröhrchen mit Innengewinde 1,2 mL	Brand
Dewar Transportgefäß	KGW Isotherm
Mörser und Pistill	Eigenanfertigung MRI
Reaktionsgefäße Safe-Lock tubes, 2 mL	Eppendorf
Pinzetten, Spatel	
LN ₂ (flüssiger Stickstoff)	

e) Isolierung von RNA und DNA aus subkutanem Fettgewebe

Reaktionsgefäße Safe-Lock tubes, 2 mL	Eppendorf
AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit	Qiagen
Plattenschüttler IKA® MTS 2/4	IKA
Sterican® Injektionskanüle Gr. 1	B.Braun
Injekt® Einmalspritze 5 mL	B.Braun
Chloroform	Carl Roth GmbH + Co. KG
EBA 21 Kleincentrifuge	Hettich Zentrifugen
Spektralphotometer Nanodrop mit Software ND1000	NanoDrop Technologies, Inc.

f) PCR

Omniscript RT Kit	Qiagen
Reaktionsgefäße Safe-Lock tubes, 1,5 mL	Eppendorf
Primer (Custom DNA Oligos)	Eurofins genomics
IQ™ SYBR®Green Supermix	Bio-Rad
96-well 0,2 ml thin wall PCR plates	Bio-Rad
RNase Inhibitor, Human Placenta	New England BioLabs® Inc.
BioRad IQ™5 Real Time Detektionssystem	Bio-Rad

g) Statistische Auswertung und Ergebnisdarstellung

Software:

SAS 9.4	SAS Institute Inc.
SAS JMP 11.0.0, SAS JMP 12.0.1	SAS Institute Inc.

SAS JMP Genomics 8.0

R Version 3.3.2

Sigmaplot 12.3

FunRich

SAS Institute Inc.

The R Foundation

Systat Software Inc.

Open Access Software Tool

<http://www.funrich.org/>

Web-basierte Anwendungen:

WebGestalt

Open Access Software Tool

http://www.webgestalt.org/webgestalt_2013/

NCBI/PrimerBlast

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

3.3 Methoden

Ein Überblick über die in der Studie durchgeführten und nachfolgend im Detail beschriebenen Untersuchungen und Erhebungsmethoden ist in Abbildung 7 dargestellt.

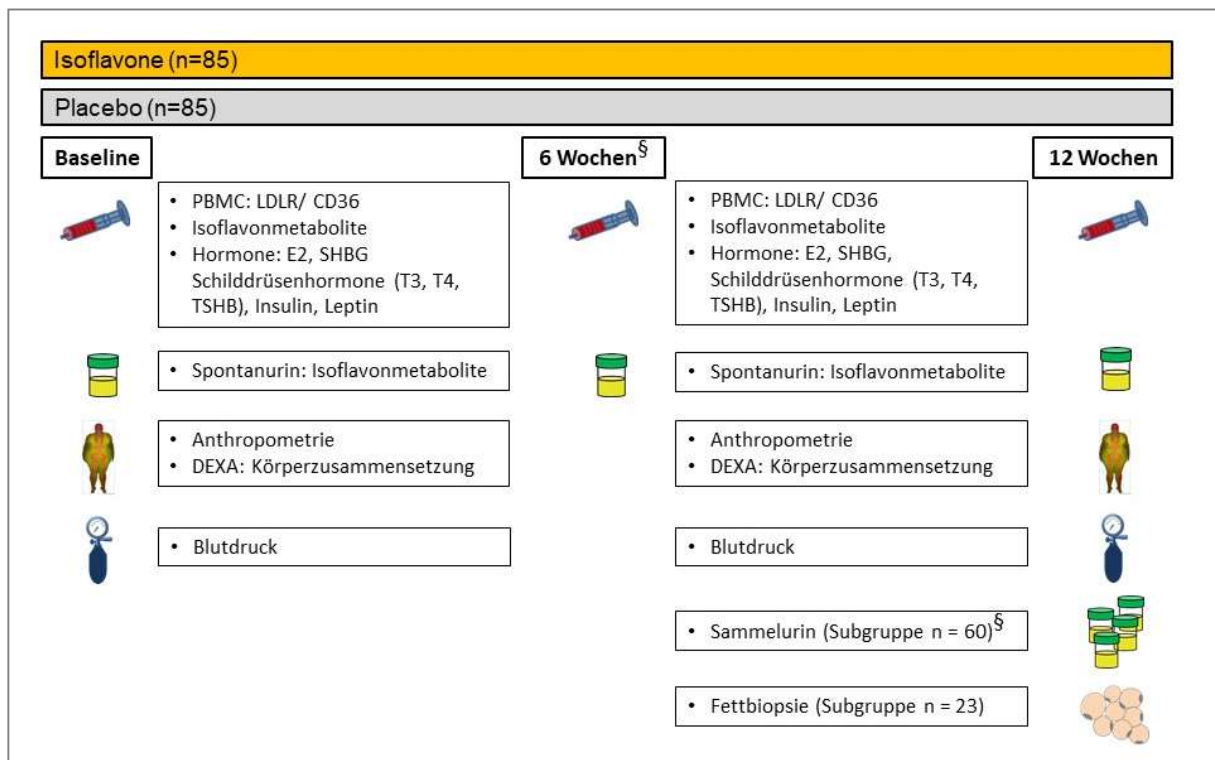


Abbildung 7 Übersicht über das Studiendesign und die Erhebungsmethoden zu den Zeitpunkten 0 (Baseline), sechs Wochen nach Beginn der Intervention und nach 12-wöchiger Intervention mit Isoflavonen oder Placebo. §: für diese Arbeit nicht relevante Untersuchungen.

3.3.1 Anthropometrische Daten

Die Erfassung des Körpergewichts erfolgte mittels eines geeichten Stadiometers (seca 910 und seca 220, seca, Hamburg) in leichter Kleidung (z. B. in Unterwäsche) und ohne Schuhe auf 0,1 kg genau und die Erfassung der Körpergröße auf 0,5 cm genau. Der entsprechende BMI errechnete sich anhand der Formel $BMI = \text{Körpergewicht (kg)} / \text{Quadrat der Körpergröße (m}^2\text{)}$.

3.3.2 Körperzusammensetzung

Die Bestimmung der Körperzusammensetzung wurde mittels eines röntgendiagnostischen Verfahrens, der Dual Röntgen Absorptiometrie, englisch *Dual-energy X-ray absorptiometry* (DEXA), durchgeführt. Bei diesem Verfahren wird die Patientin einer sehr geringen Dosis Röntgenstrahlung ausgesetzt (0,96 μSv), da das Gewebe mittels Photonen unterschiedlicher Energieniveaus bestrahlt wird. Weichteilgewebe und Knochen absorbieren die Röntgenstrahlung differentiell, es kommt zu einem Energieverlust, welcher dann durch das Gerät registriert wird. Anhand dieses Energieverlustes erfolgt die Differenzierung und Quantifizierung der Gewebe. Die Messung erfolgte mit einem

Lunar iDXA (GE Healthcare, Madison, Wisconsin USA), wofür die Studienteilnehmerinnen, nur in Unterwäsche bekleidet, liegend entsprechend Standardprotokollen positioniert wurden. Die Quantifizierung des viszeralen Fettgewebes erfolgte mittels CoreScan Applikation (GE Healthcare, Madison, Wisconsin USA), bei der automatisch die androide Region als Region oberhalb des Beckenkamms plus 20 % der Distanz bis zum Schädelbeginn definiert und die Menge an abdominellem Fett gemessen wird. Innerhalb dieser androiden Region wird dann anhand eines Algorithmus die Menge des viszeralen und subkutanen Fettgewebes geschätzt (siehe Abbildung 8) (Kaul et al., 2012). Mittels GE Encore Software Version 14.10.022 wurden die Scans ausgewertet.

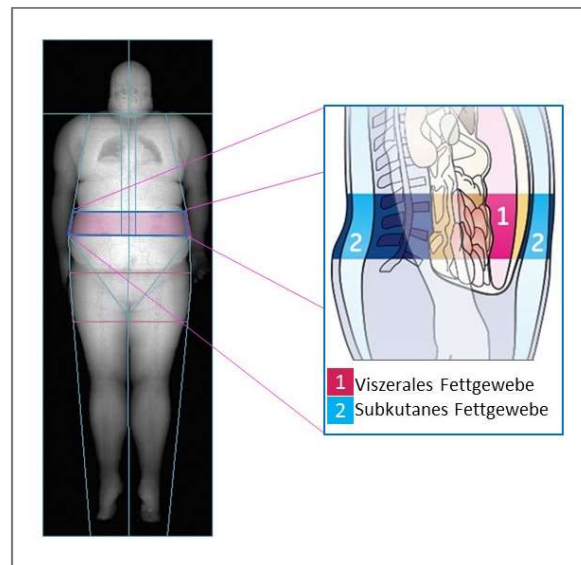


Abbildung 8 Quantifizierung des viszeralen und subkutanen Fettgewebes mittels DEXA anhand der CoreScan Applikation (GE Healthcare, Madison, Wisconsin USA). Das blaue Trapez stellt hierbei die androide Region dar, in der mittels Algorithmus in viszerale (1) und subkutane (2) Fettgewebe unterschieden wird. Abbildung modifiziert nach http://www3.gehealthcare.com/en/products/categories/bone_health/corescan (GE Healthcare, 2017).

Bei den in dieser Studie mittels DEXA ermittelten Parametern der Körperzusammensetzung handelte es sich um den Körperfettanteil, die viszerale Fettgewebsmasse, die subkutane Fettgewebsmasse, die Fettmasse, die Fettmasse in der androiden Region und der gynoiden Region, die Magermasse und Knochenmasse, sowie die Knochendichte, Gewebemasse, fettfreie Masse, den Fettanteil der Gewebe, sowie den Fettmasse- und Magermasseindex.

3.3.3 Blutproben und Analysen

Während der Studienphase erfolgten drei Blutabnahmen. Dazu wurden die entsprechenden Mengen Blut am ersten Tag der Studie, nach sechs Wochen und abschließend nach 12 Wochen morgens, nach mindestens 10-stündiger Nahrungskarenz, in nüchternem Zustand in sitzender Position aus einer zugänglichen Vene der Ellenbeuge mittels Punktion entnommen.

3.3.3.1 Serum- und Plasmagewinnung

Für die Serumgewinnung wurde das Blut in eine S-Monovette® 7.5 mL Z-Gel abgenommen, während für die Plasmagewinnung die Abnahme in eine S-Monovette® 2,7 mL, K3 EDTA erfolgte. Für die Serumgewinnung wurde die S-Monovette® vor der abschließenden Zentrifugation für 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Beide Monovetten wurden bei 2500 x g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert.

3.3.3.2 Quantifizierung der Isoflavone im Plasma

Die Isoflavone und deren Metabolite im Plasma wurden mittels UHPLC-MS/MS quantifiziert. Die Durchführung dieser Messungen erfolgte durch Dr. Sebastian Soukup im Institut für Sicherheit und Qualität für Obst und Gemüse des MRI nach der in Soukup et al. beschriebenen Methode mit einer minimalen Abänderung (Soukup et al., 2014). Statt 500 µL Plasma wurden nur 300 µL eingesetzt, mit 5 µL interner Standardlösung versetzt und anschließend mit 200 µL Wasser verdünnt. Mittels der Plasma-Isoflavonkonzentrationen erfolgte die Einteilung der Probandinnen aus der Verumgruppe in Equolbildnerinnen und Nicht-Equolbildnerinnen. Hierfür wurde ein Grenzwert von 50 nmol/L herangezogen. Dieser Wert orientierte sich an einer aus der Literatur entnommenen Konzentration zur Unterscheidung zwischen Equolbildnern und Nicht-Equolbildnern von 10 ng/mL (~41,3 nmol/L) (Lydeking-Olsen et al., 2004).

3.3.4 Durchflusszytometrische Quantifizierung der LDLR- und CD36-Expression auf Leukozyten

Die LDLR- und CD36-Expression auf Leukozyten wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Hierbei handelt es sich um eine Multiparameteranalyse von Zellen, die vereinzelt in einem laminaren Flüssigkeitsstrom einen Laserstrahl passieren. Die Charakterisierung der Zellen erfolgt einerseits über die unterschiedliche Streuung des Laserlichts aufgrund unterschiedlicher Größe und Granularität der Zellen. Andererseits können simultan zur Detektion der Größe und Granularität weitere Eigenschaften der Zelle über die Anfärbung spezifischer Antigene auf der Zelloberfläche mittels Fluoreszenzmarkierten Antikörpern oder DNA-Farbstoffen untersucht werden. Ein Durchflusszytometer setzt sich aus einem Flüssigkeits-, einem optischen- und einem elektronischen System zusammen. Das Flüssigkeitssystem dient der Aufnahme der Zellsuspension und hydrodynamischen Fokussierung der Zellen, damit diese vereinzelt in einem laminaren Flüssigkeitsstrom das Laserlicht passieren. Neben dem Laser als Anregungssystem stellen Filter, Spiegel und Detektoren für das Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht sowie das emittierte Fluoreszenzlicht das optische System dar. Das elektronische System wandelt die optischen in elektronische Signale um und dient ebenfalls der Digitalisierung dieser.

Die durchflusszytometrischen Messungen, die dieser Arbeit zugrunde liegen wurden mit einem FACS Verse Durchflusszytometer (BD) durchgeführt. Dessen Anregeoptik besteht aus einem blauen und

einem roten Laser, von denen der blaue eine Anregungswellenlänge von 488 nm besitzt während die Anregungswellenlänge des roten Lasers 635 nm beträgt. Das vorwärts gestreute Licht (Forward Scatter, FSC) wird über eine Silizium-Photodiode gemessen und stellt das Maß für die Zellgröße dar. Das seitwärts gestreute Licht (Sideward Scatter, SSC) und das emittierte Fluoreszenzlicht werden mittels entsprechender Spiegel und Filter auf den SSC-Kanal bzw. die Fluoreszenzkanäle (FL1, FL2, FL3, FL4) geleitet, die aus Photomultiplier Tubes bestehen, welche das einfallende Licht in ein elektronisches Signal umwandeln. Die Auswertung der Proben erfolgte mittels der FACSuite Software (BD FACSuite V1. 0.5.3841).

3.3.4.1 Lymphozytäre LDLR-Expression

Die Bestimmung der LDLR-Expression auf den Subpopulationen der Lymphozyten wurde mit entsprechenden Fluoreszenz-markierten monoklonalen Antikörpern gegen populationsspezifische Oberflächenantigene durchgeführt. CD3 ist ein klassischer T-Zellmarker, wohingegen CD19 einen klassischen Marker für B-Zellen darstellt. NK-Zellen zeichnen sich durch das Fehlen von sowohl CD3 als auch CD19 aus und wurden somit aus den Gesamtlmphozyten abzüglich der T- sowie B-Zellen ermittelt (Caligiuri, 2008). Für die Identifizierung unspezifischer Bindungen wurden Isotypkontrollen eingesetzt. Für jede Probe wurde ein FACS-Röhrchen für die Probe und ein weiteres für die Isotypkontrolle vorbereitet. In diesen wurden jeweils 100 μ L Heparin-Vollblut mit 5 μ L FITC-konjugiertem Anti-human-CD3-Antikörper (mAb, clone UCHT1, Becton Dickinson (BD), Heidelberg, Deutschland) zur Identifizierung der T-Zellen, 5 μ L PerCP- konjugiertem Anti-human-CD19 Antikörper (clone A3-B1, Abcam, Cambridge, UK) zur Identifizierung der B-Zellen und 10 μ L PE-konjugiertem anti-human LDLR mAb (clone 472413, R&D) zur Identifizierung der LDLR⁺-Zellen oder PE-konjugierter IgG1 Isotypkontrolle (clone 11711, R&D Systems (R&D), Minneapolis, USA) für 20 Minuten im Dunklen bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Erythrozytenlyse mit FACS Lysing Solution (BD) für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen und eine nachfolgende Zentrifugation bei 250 x g für 5 Minuten. Der Überstand über dem Zellpellet aus Lymphozyten wurde abgekippt und die Proben vor der Messung einmal mit PBS-Na-Azid gewaschen (Zentrifugation bei 250 x g, 5 Minuten) und mit 1 % (v:v) Paraformaldehyd fixiert und bis zur Messung dunkel und auf Eis gelagert. Für die Messung wurde die Lymphozytenpopulation im FSC/SSC- Punktdiagramm eingegrenzt und 10000 Lymphozyten analysiert (Abbildung 9).

Der erste Auswerteschritt umfasste die Markierung der Lymphozytenpopulation im FSC/SSC-Punktdiagramm. Anhand der Histogrammdarstellung, bei der die Fluoreszenzintensitäten im FL1 gegen die Zellzahlen aufgetragen sind, wurden die CD3⁺ Lymphozyten eingegrenzt. Genauso wurde auch für die CD19⁺ Lymphozyten verfahren, allerdings wurden hier die Fluoreszenzintensitäten im FL3 gegen die Zellzahlen aufgetragen. Für die so ermittelten T-Zellen wurden dann über eine weitere Histogrammdarstellung, bei der die Fluoreszenzintensitäten des FL2 gegen die Zellzahlen aufgetragen waren, die LDLR⁺ T-Zellen quantifiziert. Auch für die eingegrenzten B-Zellen wurden die

LDLR⁺ B-Zellen anhand einer Histogrammdarstellung quantifiziert, bei der die Fluoreszenzintensitäten des FL2 gegen die Zellzahlen aufgetragen waren. Die CD3⁺CD19⁻ Zellen (NK-Zellen) wurden durch Abzug der T- und B-Zellen von den Gesamtlymphozyten ermittelt und über diese Eingrenzung ebenfalls ein Histogramm erstellt. Auch hier waren die Fluoreszenzintensitäten des FL2 gegen die Zellzahlen aufgetragen worüber die LDLR⁺ NK-Zellen quantifiziert werden konnten. Die prozentuale Anzahl an LDLR⁺ T-Zellen, LDLR⁺ B-Zellen und LDLR⁺ NK-Zellen wurde jeweils durch Abzug der Isotypkontrolle ermittelt.

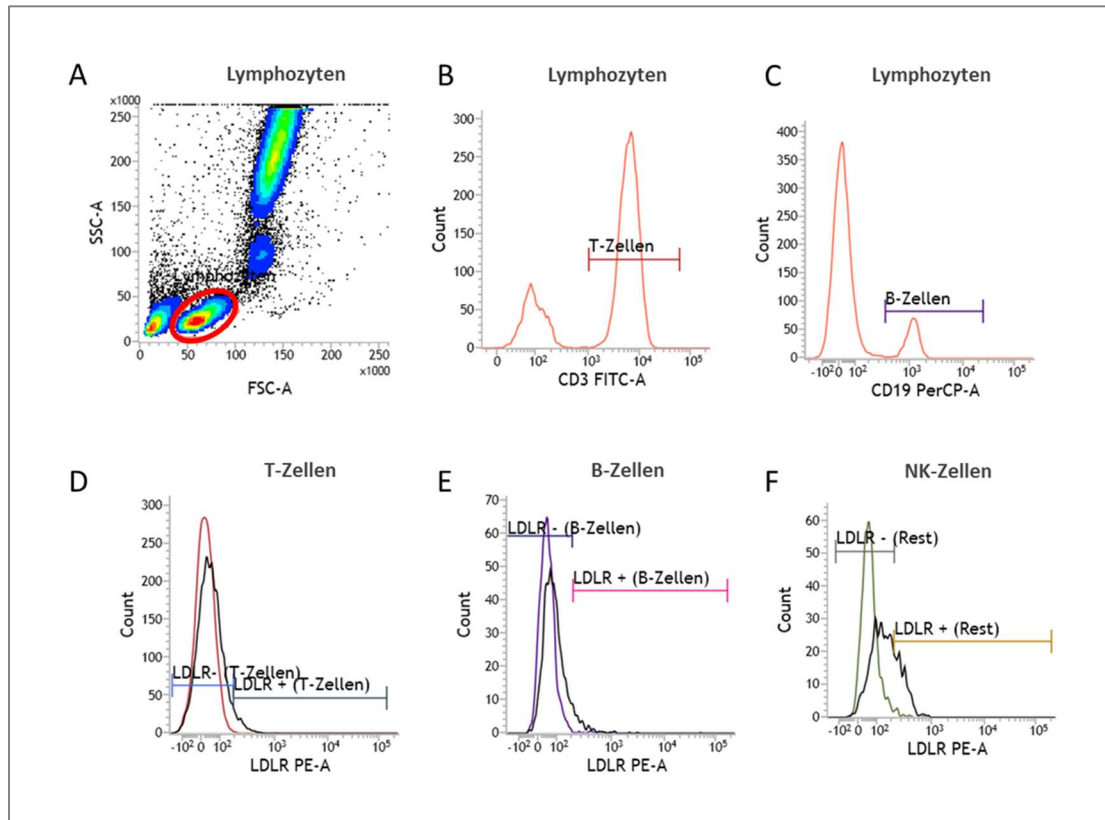


Abbildung 9 Auswertungsbeispiel zur Quantifizierung LDLR⁺ T-, B- und NK-Lymphozyten: A) FSC/SSC-Punktdiagramm mit markierten Lymphozyten (roter Kreis); B) Histogramm des Fluoreszenzkanals FL1 zur Identifizierung der CD3⁺ T-Zellen; C) Histogramm des Fluoreszenzkanals FL3 zur Identifizierung der CD19⁺ B-Zellen; D) Histogramm des FL2 der CD3⁺ T-Zellen zur Quantifizierung LDLR⁺ T-Zellen; E) Histogramm des FL2 der CD19⁺ B-Zellen zur Quantifizierung LDLR⁺ B-Zellen; F) Histogramm des FL2 der CD3⁺CD19⁻ NK-Zellen zur Quantifizierung LDLR⁺ NK-Zellen; in D), E), F) sind die Isotypkontrollen mit farbigen und die Proben mit schwarzen Peaks dargestellt.

3.3.4.2 Leukozytäre CD36-Expression

Für die Quantifizierung der CD36⁺ Monozyten wurde die Monozytenpopulation anhand des FSC/SSC-Punktdiagramms eingegrenzt und die CD36⁺ Zellen mittels fluoreszenzmarkiertem-Antikörper gegen CD36 detektiert. Für die Analyse wurde ein FACS-Röhrchen für die Probe und eines für die Isotypkontrolle vorbereitet. In jedem der Röhrchen wurden 100 µL Heparin-Vollblut mit FACS Lysing solution (BD) für 10 Minuten im Dunklen bei Raumtemperatur lysiert und bei 250 x g für

5 Minuten zentrifugiert. Nach dem Abkippen des Überstandes wurden die Zellen im Pellet mit PBS-Na-Azid gewaschen (Zentrifugation bei 250 x g für 5 Minuten). Der Überstand wurde abgekippt und die Zellen mit APC-konjugiertem CD36 Antikörper (clone TR9, Abcam) oder IgG1 Isotypkontrolle (clone 1F8, Abcam) für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS-Na-Azid (Zentrifugation bei 250 x g für 5 Minuten), Abkippen des Überstandes und der Fixierung der Zellen mittels 1 % (v:v) Paraformaldehyd wurden die Zellen bis zur Messung dunkel und auf Eis gelagert. Im FSC/SSC-Punktendiagramm wurde die Monozytenpopulation eingegrenzt und 5000 Monozyten analysiert. Anhand der Histogrammdarstellung, bei der die Fluoreszenzintensitäten im FL4 gegen die Zellzahlen aufgetragen sind, wurden die CD36⁺ Monozyten erfasst (Abbildung 10). Durch das simultane Eingrenzen der Lymphozytenpopulation wurde ebenfalls die CD36-Expression auf den Lymphozyten bestimmt.

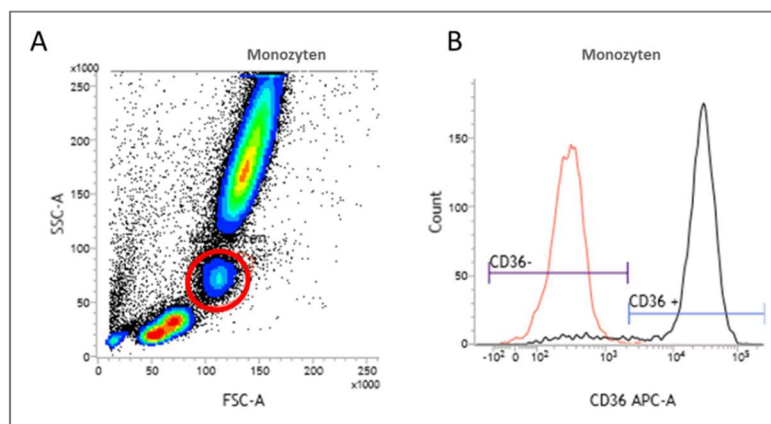


Abbildung 10 Auswertebispiel zur Quantifizierung CD36⁺ Monozyten: A) FSC/SSC-Punktendiagramm mit markierten Monozyten (roter Kreis); B) Histogramm des Fluoreszenzkanals FL4 zur Quantifizierung CD36⁺ Monozyten; dargestellt sind als orange-farbiger Peak die Isotypkontrolle und als schwarzer Peak die Probe.

3.3.5 Biopsie des abdominellen subkutanen Fettgewebes

Die Biopsie des abdominellen subkutanen Fettgewebes wurde nach flacher Lagerung der Probandinnen auf einer Untersuchungsliege durch die Studienärztin durchgeführt. Hierzu wurde unter Lokalanästhesie (Xylonest® 1 %, AstraZeneca GmbH, Wedel, Deutschland) aus der periumbilikalen Region Fettgewebe in ein System aus Strausskanüle, Dreiwegehahn und 10 mL Spritze aspiriert, in dem durch Verschluss des Dreiwegehahns und Fixierung des Kolbens mittels einer Nadelhülle Unterdruck erzeugt wurde. Die Strausskanüle wurde an der vorab markierten Entnahmestelle parallel zur Hautoberfläche eingeführt und der Dreiwegehahn geöffnet. Die Fettaspiration erfolgte fächerförmig durch Vor- und Zurückziehen der Kanüle unter Rotationsbewegungen, woraufhin sich das Fettgewebe im Spritzenkolben sammelte (Hazenberg, 2011). Sowohl Spritzeninhalt als auch Kanüleninhalt wurden mit 0,9 % NaCl-Lösung gespült und in ein steriles 15 mL Falconröhrchen überführt. Um Blutzellen- und Gerinnsel von der Probe abzutrennen, wurde das Falconröhrchen mit

0,9 % NaCl-Lösung bis auf 13 mL aufgefüllt und bei 400 x g bei Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert. Mittels Pinzette oder Spatel wurde das Fettgewebe in ein weiteres 15 mL Falconröhrchen überführt, mit NaCl-Lösung gewaschen und ein weiteres Mal unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Anschließend wurde das Fettgewebe in ein vorgewogenes Cryogefäß überführt, in flüssigem Stickstoff (LN₂) schockgefroren und gewogen. Die Lagerung erfolgte bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C.

3.3.5.1 RNA Isolierung aus Fettgewebe

Vor der Isolierung der RNA wurden die tiefgekühlten Biopsieproben unter LN₂-Kühlung mittels Mörser pulverisiert und Aliquots à 75 mg pulverisiertem Gewebe hergestellt.

Für die Isolierung der RNA aus Fettgewebe wurde das Qiagen AllPrep DNA/RNA/miRNA Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) benutzt, dessen Protokoll, wie nachfolgend beschrieben, entsprechend den vorliegenden Bedingungen optimiert wurde. Statt 30 mg wurden 2 x 75 mg Fettgewebe als Ausgangsmaterial eingesetzt und mit je 900 µL statt 600 µL Puffer RLT Plus versetzt und das Fettgewebe anschließend für 40 Minuten auf einem Plattenschüttler lysiert. Das Gemisch aus lysiertem Fettgewebe und Puffer wurde daraufhin mit Kanüle (Ø 0.9 mm) und 5 mL-Spritze fünfmal geschert. Die beiden Lysate wurden in einem Reaktionsgefäß kombiniert, mit 150 µL Chloroform versetzt und 3 Minuten bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die obere wässrige Phase auf eine AllPrep DNA Mini Spin column, aufgesteckt auf ein 2 mL Collection Tube, überführt und 30 Sekunden bei 13000 rpm zentrifugiert bis sich keine Flüssigkeit mehr auf der Säule befand. Der Durchfluss wurde für die weitere Isolierung der RNA herangezogen und die AllPrep DNA Mini Spin column bis zur Isolierung der DNA bei 4°C in einem neuen Collection Tube aufbewahrt. Alle weiteren Schritte zur RNA Isolierung entsprachen dem Protokoll des All Prep DNA/RNA/miRNA Kits von Qiagen. Im Anschluss an die Isolierung wurde am Spektralphotometer (NanoDropND-1000, NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) die Konzentration der RNA (ng/µL) über die Messung der Extinktion (OD) der Probe bei 260 nm gemessen und die Konzentration mittels ND-1000 V 3.3.0 Software ermittelt.

Der OD-Quotient der Messwerte bei 260 und 280 nm diente als Maß für die Reinheit der RNA. Bei Quotienten unter 1,8 kann dies auf eine Verunreinigung mit beispielsweise Proteinen oder Phenol hinweisen. Für die weiteren Analysen wurden ausschließlich RNA-Proben verwendet, die einen 260/280-Quotienten zwischen 1,8 und 2 aufwiesen. Die eluierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die RNA-Proben, welche für die RNA-Sequenzierung verwendet wurden, unterlagen mit der Ermittlung der RNA-Integritätszahl (RIN), einem Maß für die Degradierung der Gesamt-RNA, noch einer weiteren Qualitätskontrolle vor der Sequenzierung. Die Messung erfolgte an einem Agilent 2100 Bioanalyzer und die Auswertung über die Agilent 2100 Expert Software (Santa Clara, CA, USA). Nur Proben mit RIN Scores über 6 wurden für die Sequenzierung herangezogen.

3.3.5.2 RNA-Sequenzierung und differentielle Genexpressionsanalyse

Die RNA wurde für eine genomweite RNA-Sequenzierung (*Whole genome sequencing* (WGS)) eingesetzt, die in der Arbeitsgruppe von Prof. S. Mandrup, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Southern Denmark, Odense, durchgeführt wurde. Dafür wurde zuerst die mRNA mittels poly-T-beschichteten Beads angereichert und eine cDNA-Bibliothek hergestellt. Anhand des Illumina TruSeq mRNA Protokolls wurde die cDNA-Bibliothek erstellt. Die Sequenzierung erfolgte auf einem Illumina HiSeq1500, mit einer Sequenzierungstiefe von ca. 15 Millionen kurzen DNA-Abschnitten (reads, 50 bp) pro Probe. Diese reads wurden anhand des Programms Star aligner (Dobin et al., 2013) dem Referenzgenom (hg19) zugeordnet. Die Normalisierung, Qualitätskontrolle, Auswertung und die differentielle Genexpressionsanalyse wurden mit JMP Genomics 8.0 durchgeführt. Vor der differentiellen Genexpressionsanalyse wurden die Sequenzierungsdaten TMM (Trimmed Mean of M-Component) normalisiert, mit dem Ziel systematische technische Effekte in den Daten zu beseitigen, um einen Einfluss durch technische Verzerrungen auf die Daten möglichst gering zu halten (Robinson et Oshlack, 2010). Innerhalb der Genexpressionsanalyse wurde anhand einer ANOVA untersucht, welche Gene durch die Intervention im Vergleich zu Genen aus Proben der Placebogruppe signifikant induziert bzw. reprimiert exprimiert wurden. Durch multiples Testen können Gene statistisch als differentiell exprimiert gelten, die dies in Wahrheit jedoch gar nicht sind. Daher muss eine Kontrolle für multiples Testen erfolgen. Hierbei handelte es sich um die False discovery rate (FDR) Adjustierung nach Benjamini und Hochberg mit einem Signifikanzniveau von $p = 0,05$ (Benjamini et Hochberg, 1995). Unter Berücksichtigung der Adjustierung für multiples Testen waren keine Gene zwischen den Proben der Frauen aus der Verum im Vergleich zur Placebogruppe differentiell exprimiert. Um potentiell interessante Kandidatengene zu identifizieren, wurde dennoch mit den nicht-adjustierten Daten eine weitere Auswertung der Genexpressionsdaten durchgeführt. Dafür wurden alle Gene mit einem $-\log_{10}(\text{Worth}) \geq 1,3$ (entspricht einem Signifikanzniveau von $p = 0,05$) und einer Differenz zwischen der Placebogruppe und Verumgruppe (Placebo-Verum) von $\leq -0,5$ oder $\geq 0,5$ berücksichtigt. Die Differenz entspricht dem Fold Change (FC) und bedeutet, dass das Gen in der Verumgruppe im Vergleich zur Placebogruppe bei einer Differenz von $\geq 0,5$ mindestens 1,4-fach herunterreguliert war und bei einer Differenz von $\leq -0,5$ mindestens 1,4-fach hochreguliert war. Ein FC von -1 bzw. 1 entspricht somit einer zweifachen Hoch- bzw. Herunterregulation. Über die nachfolgende Anreicherungsanalyse für die Gene Ontology Kategorien mit dem Programm WebGestalt wurden die differentiell verändert exprimierten Gensets auf signifikante Anreicherungen in den Bereichen „zelluläre Komponente“, „Biologischer Prozess“ und „Molekulare Funktion“ untersucht, um Informationen darüber zu erlangen, welche Prozesse und Funktionen durch die Intervention möglicherweise verändert waren (Wang et al., 2013; Zhang et al., 2005). Hierfür wurden die Sets aus den im Vergleich zu Placebo induziert bzw. reprimiert exprimierten Genen analysiert, um über- oder unterrepräsentierte Gene Ontology (GO) termini in diesen Sets nachzuweisen. Als Referenzgenset für die Analyse diente das gesamte humane Genom.

WebGestalt gleicht die Anzahl der annotierten Gene aus den Gensets „reprimiert“ bzw. „induziert“ mit der Gesamtzahl dieser Gene innerhalb des entsprechenden GO-Terminus ab. Über einen hypergeometrischen Test wird nachfolgend berechnet, ob die Anhäufung dieser Gene in diesem GO-Terminus signifikant ist oder ob es sich um eine zufällige Anhäufung handelt. Die Adjustierung für multiples Testen erfolgte auch hier mit der Methode nach Benjamini & Hochberg (Benjamini et Hochberg, 1995). Die Auswertung beschränkte sich auf die GO-Termini mit $p \leq 0,05$. Der Abgleich der differentiell exprimierten Gene mit 1067 Estrogen-responsiven Genen aus der Dragon Estrogen Responsive Genes Database (ERGDB)-Datenbank (Tang et al., 2004) wurde mittels Venn Diagrammen mit dem Programm FunRich durchgeführt (Pathan et al., 2015).

Sensitivitätsanalyse für die RNA-Sequenzierung

Um zu ermitteln, welcher fold-change zwischen den Proben aus den isoflavonsupplementierten Frauen und den Proben aus den placebosupplementierten Frauen, unter den vorliegenden Bedingungen anhand der WGS hätte aufgedeckt werden können, wurde eine nachträgliche Sensitivitätsanalyse durchgeführt. Die Streuung der Genexpression ergibt sich aus der biologischen und der technischen Variation. Für Genexpressionsdaten liegt der Variationskoeffizient laut Literatur zwischen 0,32 und 0,74 mit einem Median von 0,43 (Hart et al., 2013). Der Berechnung wurde die Annahme zugrunde gelegt, dass Homoskedastizität vorliegt, also die Varianz der Genexpression sich in den 2 Gruppen nicht unterscheidet. Für die Berechnung wurde ein Variationskoeffizient von 0,5 vorausgesetzt. Die Sequenzierung erfolgte auf einem Illumina HiSeq1500, mit einer Sequenzierungstiefe von ca. 15 Millionen kurzen DNA-Abschnitten, sodass die Tiefe 15 entsprach (Hart et al., 2013). Es wurden Proben von 12 Frauen mit Isoflavonintervention und von 11 Frauen mit Placebointervention sequenziert. Die Power wurde mit 0,8 angesetzt und das Signifikanzniveau entsprach 0,05. Die Berechnung der Fallzahl erfolgte mit R Version 3.3.2 und dem Paket *RNASeqPower*.

3.3.5.3 Genexpressionsanalyse ausgewählter Gene mittels quantitativer Echtzeit-Polymerasekettenreaktion

Für die Genexpressionsanalyse mittels quantitativer Echtzeit-Polymerasekettenreaktion, englisch *real-time quantitative polymerase chain reaction* (qRT-PCR), wurde aus 9 Proben der Placebogruppe und 11 Proben der Isoflavongruppe RNA isoliert. Die Fettgewebemengen der drei weiteren Biopsieproben waren für die RNA-Isolierung nicht mehr ausreichend. Die RNA Isolierung aus den Proben des subkutanen Bauchfettgewebes erfolgte wie in Kapitel 3.3.5.1 beschrieben.

Real Time quantitative PCR

Das Prinzip der qRT-PCR besteht aus zwei unabhängigen Reaktionen. In der ersten Reaktion, der reversen Transkription, wird mRNA in cDNA umgeschrieben. Daran schließt sich die PCR-Reaktion an, bei der ein ausgewählter cDNA-Abschnitt vervielfältigt wird und die synthetisierte DNA quantifiziert wird.

Reverse Transkription

Dieser erste Schritt der Real Time-PCR bewirkt die Umschreibung der mRNA-Sequenzen durch das Enzym Reverse Transkriptase in cDNA, welche dann als Matrize für die sich anschließende PCR dient. Die Umschreibung erfolgt mittels Oligo (dT) Primern, deren Thymidinnucleotide mit dem PolyA-Schwanz der mRNA hybridisieren. Das 3'-Ende der Primer wird durch die Reverse Transkriptase erkannt und diese synthetisiert dann einen zur mRNA komplementären DNA-Strang.

Für die Reverse Transkription wurde das Omniscript Reverse Transcriptase Kit von Qiagen verwendet. Die RNA wurde auf Eis aufgetaut. Für einen 20 µL Ansatz wurden 50 ng Gesamt-RNA eingesetzt. Der Mastermix wurde aus 2 µL Reaktionspuffer (10-fach konzentriert), 2 µL dNTP mix, 2 µL Oligo (dT) Primern (Konzentration 10 pmol/µl; 10 µM), 1 µL RNase Inhibitor (10 u/µL) (0,5 µL RNase Inhibitor + 0,5 µL 1-fach konzentrierter Reaktionspuffer) und 1 µL Omniscript Reverse Transkriptase hergestellt, gut durchmischt und für ca. 15 Sekunden zentrifugiert um den gesamten Ansatz am Boden des Reaktionsgefäßes zu sammeln. Die entsprechende Menge Gesamt-RNA wurde hinzugegeben und anschließend mit RNase-freiem Wasser auf ein Endvolumen von 20 µL aufgefüllt, wiederum gut durchmischt und ein weiteres Mal für ca. 15 Sekunden zentrifugiert und anschließend bei 37°C für 1h inkubiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die cDNA-Proben bei -20°C gelagert.

qPCR-Reaktion

Die um Fluoreszenzmessungen erweiterte und auf dem Prinzip der PCR basierende quantitative Echtzeit-PCR ermöglicht die Quantifizierung der synthetisierten DNA. Die Amplifikate nehmen bei der PCR exponentiell zu. Durch Zugabe fluoreszierender DNA-Farbstoffe zum PCR-Ansatz kann diese Zunahme während des PCR-Zyklus in Echtzeit fluorimetrisch über einen Lightcycler erfasst werden. Ein solcher Fluoreszenzfarbstoff ist SYBR Green, welcher nicht-sequenzspezifisch mit der DNA interkaliert und nur im Komplex mit dieser fluoresziert. Das Fluoreszenzsignal steigt mit der Menge an doppelsträngiger DNA, also zunehmender Menge an gebildetem Produkt, an.

Für die Durchführung der qRT-PCR wurden die spezifischen Primersequenzen der interessierenden Gene über NCBI/Primer-BLAST ausgewählt und sind Tabelle 2 zu entnehmen (Ye et al., 2012a). Die Zielgene LDLR und CD36 wurden ausgewählt, da sie im Fettgewebe an der Aufnahme von Cholesterol bzw. langkettigen Fettsäuren und damit dem Lipid- und Lipoproteinmetabolismus beteiligt sind. Da Einflüsse von Isoflavonen auf die Expression dieser Rezeptoren beschrieben sind (siehe Kapitel 1.3.3.5), sollte untersucht werden, ob Isoflavone auch Effekte auf die Rezeptorexpressionen im Fettgewebe ausüben. Über die Zielgene ESR1 (Estrogenrezeptor 1 Gen) und ESR2 (Estrogenrezeptor 2 Gen) werden Estrogenwirkungen vermittelt. Isoflavone können an die Estrogenrezeptoren binden, sodass angenommen wurde, dass die Isoflavonintervention sich auf die Expression der beiden Rezeptoren auswirken kann (vgl. Kapitel 1.3.3.1). Das Aromatasegen CYP19A1 wurde gewählt, da die Aromatase im Fettgewebe menopausaler Frauen den Hauptort der

Estrogensynthese darstellt. Es ist beschrieben, dass die Expression der Aromatase durch Phytoestrogene inhibiert werden kann (Lephart, 2015; Wang et al., 2008).

Tabelle 2 Primersequenzen für die quantitative Real time-PCR

<i>Gen</i>	<i>Sequenz Forward Primer (5' → 3')</i>	<i>Sequenz Reverse Primer (5' → 3')</i>
<i>Housekeepinggenen</i>		
<i>HPRT</i>	AACCTCTCGGCTTTCCCG	ATCATCACTAATCACGACGCCA
<i>Zielgene</i>		
<i>LDLR</i>	TACCCCTCGATGGTCAGTCT	GAATAAAACAAGGCCGGCGA
<i>CD36</i>	TCAATGGCTTTCAGATGTCAGG	GATTTCCACGGCATAGCAGC
<i>ESR1</i>	TAACAGCCTCCTGTCTACCGA	AGGAGCATGGACCTTTCGAG
<i>ESR2</i>	AATGCCGATGCCTATCCTCT	CTCTCCATGGCAAATGAACAGG
<i>CYP19A1</i>	GTGTCAGAAACCCTGTGGTG	AGGGGGCAATTTAGAGTCCAC

Für einen PCR-Reaktionsansatz mit einem Reaktionsvolumen von 25 µL wurden 12,5 µL IQ™ SYBR® Green supermix (2-fach konzentriert) mit je 1 µL Forward- bzw. Reverse Primer (je 1:5 verdünnt) und 8,5 µl H₂O_{bidest} gut gemischt und in die entsprechenden Wells einer 96-Well-Platte vorgelegt. Diesem Ansatz wurden je 2 µL cDNA hinzugefügt. Für die mitamplifizierten No Template Controls wurde statt cDNA 2 µL H₂O_{bidest} verwendet. Anschließend wurde die Platte für wenige Sekunden zentrifugiert. Die Messung der PCR erfolgte in einem Bio Rad IQ™5 Real Time PCR Detektionssystem unter den in Tabelle 3 aufgeführten PCR-Bedingungen in Dreifachbestimmung.

Tabelle 3 PCR-Zyklen

	Zyklus 1		Zyklus 2 (40x)			Zyklus 3 (67x)	Zyklus 4
	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 1 <i>Denaturierung</i>	Schritt 2 <i>Annealing</i>	Schritt 3 <i>Elongation</i>	Schritt 1 <i>Schmelzkurve</i>	Schritt 1
Temperatur (°C)	50,0	95,0	95,0	60,0	72,0	62,0	8,0
Dauer (Min.)	2:00	10:00	0:20	0:40	1:00	0:30	∞

Relative Quantifizierung

Bei der relativen Quantifizierung wird die Expressionsmenge der Zielgen-RNA auf die Expressionsmenge der RNA eines nicht-regulierten Referenzgens (Haushaltsgen) normalisiert. Als Haushaltsgen des Fettgewebes wurde HPRT herangezogen (Hammarstedt et al., 2003; Linscheid et al., 2005).

Die Auswertung der RT-PCR Ergebnisse erfolgte nach der vergleichenden C_T Methode ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) von Schmittgen und Livak (Schmittgen et Livak, 2008). Hierfür wird der Threshold-Cycle C_T -Wert herangezogen. Dieser Wert stellt den PCR-Zyklus dar, bei dem die Fluoreszenz signifikant über das Hintergrundsignal ansteigt. In diesem Zyklus wird also während der frühen exponentiellen Phase eine detektierbare Menge an Amplikon gebildet. Je mehr DNA anfänglich in der Reaktion enthalten war, umso früher wird dieser Zyklus erreicht. Zwischen dem C_T -Wert und der Menge an Amplikon besteht eine inverse Beziehung.

Der vergleichenden C_T Methode liegen die Annahmen zugrunde, dass sich die Effizienz nahe 1 befindet und dass sich die Effizienzen der Targetgene und internen Kontrollen (Housekeepinggene) ähneln. Diese Methode bietet den Vorteil, dass die Daten als Fold-change angegeben werden können.

Mit den Daten aus der Dreifachbestimmung wurde zuerst der mittlere C_T -Wert für das jeweilige Target berechnet. Dies geschah sowohl für die Zielgene, als auch für das Housekeepinggen. Anschließend wurde der jeweilige $2^{-\Delta C_T}$ -Wert über die Formel $2^{-\Delta C_T} = 2^{-[C_T \text{ Referenzgen} - C_T \text{ Housekeepinggen}]}$ gebildet. Diese Berechnung erfolgte sowohl für die einzelnen Werte der Probandinnen in der Isoflavongruppe als auch in der Placebogruppe. Aus den elf $2^{-\Delta C_T}$ -Werten der Isoflavongruppe bzw. den neun $2^{-\Delta C_T}$ -Werten der Placebogruppe wurden die entsprechenden Mittelwerte errechnet. Diese wurden dann für die Berechnung des Fold change der Expression zwischen der Isoflavon- und Placebogruppe durch Bildung des Quotienten $MW_{[IF\text{-Gruppe}]} / MW_{[Placebogruppe]}$ herangezogen. Ein Quotient im Bereich zwischen 0-1 stellt die Herunterregulation, ein Quotient über 1 die Hochregulierung eines Gens dar. Bei einem Wert von $z < 1$ lag somit eine Reduktion in der Expression durch die Isoflavonsupplementation vor. In diesem Fall entsprach der Fold change, also die Veränderung durch die Intervention, dem negativen Kehrwert ($-1/z$). Bei Normalverteilung der Daten wurde ein Student's T-Test als Mittelwertsvergleich durchgeführt, um zu überprüfen, ob signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Placebo und Isoflavongruppe vorliegen. Bei nicht-normalverteilten Daten erfolgte die Berechnung mittels Mann-Whitney U-Test. Die Durchführung der Mittelwertsvergleiche, sowie die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte in SigmaPlot 12.3. Das Signifikanzniveau lag bei $p \leq 0,05$.

3.3.5.4 Isoflavonanalytik im Fettgewebe

Die Isoflavonanalytik im Fettgewebe wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. Sebastian Soukup im Institut für Sicherheit und Qualität für Obst und Gemüse des MRI, Haid-und-Neu-Straße 9, 76131 Karlsruhe,

Deutschland, durchgeführt. Nach einer in mehreren Schritten ablaufenden Flüssig-Fest-Extraktion mit unterschiedlichen Lösungsmitteln und anschließender Aufreinigung der Extrakte mittels Festphasenextraktion (SPE) entsprach die LC-MS/MS-Methode der in Soukup et al. beschriebenen Methode (Soukup et al., 2014).

3.3.6 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde für die 12-wöchige Intervention mit Isoflavonen oder Placebo der Begriff „Behandlung“ verwendet. Unter dem Begriff „Saison“ werden die beiden unterschiedlichen Perioden, in denen die Studie durchgeführt wurde verstanden. Die Berücksichtigung der Saison in den statistischen Modellen sollte dazu dienen, mögliche weitere und von der Intervention unabhängige Effekte auf die Zielparameter, feststellen zu können. Der Begriff „Zeit“ steht für die beiden Zeitpunkte vor und nach der 12-wöchigen Intervention. Unter dem Begriff „Equol“ ist der Equolbildner-Status zusammengefasst (Equolbildner vs. Nicht-Equolbildner).

3.3.6.1 Interventionseffekte

Um Effekte der Faktoren Behandlung, Zeit und Saison auf den jeweiligen Zielparameter zu untersuchen wurde ein linear gemischtes Modell eingesetzt. In dieses Modell wurden weiterhin die Zweifachinteraktionen *Behandlung x Zeit*, *Behandlung x Saison* und *Saison x Zeit* mit einbezogen. Der Effekt *Behandlung x Zeit* beschreibt den Effekt der Intervention, da erwartet werden kann, dass durch die Verumbehandlung Unterschiede zwischen Zeitpunkt 1 und Zeitpunkt 2 auftreten, während dies für die Placebobehandlung nicht erwartet werden kann. Die Interaktion aus Zeit und Saison zeigt Effekte an, die über den Studienzeitraum auftreten und zwischen den Perioden unterschiedlich sind. Die Auswertung der Studienergebnisse erfolgt unter der Annahme, dass diese saisonalen Effekte unabhängig von der Intervention auftreten und Interventionseffekte nicht beeinflussen. Die Probandinnen IDs wurden als zufällige Effekte in das Modell aufgenommen.

Um zu berücksichtigen, dass prozentuale Werte sich nur zwischen 0 und 100 erstrecken können, wurde bei prozentualen abhängigen Variablen eine Mixed Beta Regression durchgeführt. Da die Werte streng über 0 liegen müssen, wurde mit 0,147 % ein kleiner Wert größer 0 eingesetzt, der anhand der Formel $0,5/N$ berechnet wurde (Smithson et Verkuilen, 2006).

Mit diesem Modell wurde auch untersucht, ob die Höhe der anfänglichen LDL-Cholesterolkonzentration einen Einfluss auf die Isoflavonintervention hat. Dafür wurden die Probandinnen in zwei Subgruppen aufgeteilt, die entweder anfängliche LDL-Cholesterolkonzentrationen < 160 mg/dL oder ≥ 160 mg/dL aufwiesen.

Zudem wurde dieses Modell angewandt, um den Einfluss des Equolbildner-Status auf die Intervention zu untersuchen. Dafür wurde anstelle des Faktors Behandlung der Faktor Equol (Equolbildner vs. Nicht-Equolbildner) in das Modell integriert.

Das Signifikanzniveau entsprach $p \leq 0,05$. Effekte mit einem Signifikanzniveau $\leq 0,10$ wurden als tendenzielle Effekte angesehen.

Voraussetzungen für die Anwendung des gemischt linearen Modells

Um das Modell anwenden zu können, müssen die studentisierten Residuen normalverteilt sein. Die Überprüfung dieser Voraussetzung erfolgte visuell anhand der Quantile-Quantile-Plots. Bei Nichtvorliegen einer Normalverteilung erfolgte eine logarithmische Transformation der jeweiligen abhängigen Variablen. Weiterhin wurde die Homogenität der Residuen durch visuelle Inspektion der gegeneinander aufgetragenen abhängigen studentisierten Residuen und der vorausgesagten Werte kontrolliert. Studentisierte Residuen mit Werten weit außerhalb des Intervalls -3 bis 3 wurden als Ausreißer betrachtet und aus dem entsprechenden Modell entfernt. Für das Beta Regressionsmodell für prozentuale, abhängige Variablen wurden keine Ausreißer aus dem Modell entfernt. Die Berechnungen erfolgten mit SAS 9.4 und der Prozedur PROC GLIMMIX für die Beta Regression und der Prozedur PROC MIXED für alle weiteren Berechnungen.

3.3.6.2 Modulierender Einfluss des Körperfettanteils bzw. der viszeralen Fettmenge auf die Intervention

Für die Berechnung eines modulierenden Einflusses des Körperfettanteils bzw. der viszeralen Fettmenge auf die Intervention wurden die Daten von 169 Frauen herangezogen, da von einer Frau keine DEXA-Daten erhoben werden konnten. Zielparameter waren die Konzentrationen der Serumlipide sowie die Rezeptorexpressionen des LDLR und des CD36 Rezeptors auf Lymphozyten und Monozyten nach 12-wöchiger Intervention (Post-Treatment-Auswertung). Das Signifikanzniveau entsprach $p \leq 0,05$.

Um einen potentiell modulierenden Einfluss des anfänglichen Körperfettanteils bzw. der Menge an viszeralem Fettgewebe auf die Isoflavonintervention zu untersuchen wurden zwei statistische Ansätze verfolgt. Bei beiden Ansätzen handelte es sich um gemischte lineare Modelle (GLM), in denen der Effekt des Körperfettanteils bzw. der viszeralen Fettmenge, der Effekt der Intervention (Isoflavone oder Placebo) sowie der Interaktionseffekt aus Körperfettgehalt und Intervention bzw. viszeraler Fettmenge und Intervention auf die zuvor genannten Zielparameter untersucht wurden.

Beim ersten Ansatz wurde der anfängliche Körperfettanteil der Frauen kategorisiert in hoch ($\geq 35\%$) und niedrig ($< 35\%$) (Gallagher et al., 2000). Für den viszeralen Fettgehalt wurde der Grenzwert bei 800 g angesetzt und ein anfänglicher viszeraler Fettgehalt < 800 g als niedrig und ≥ 800 g als hoch kategorisiert. Die Entscheidung für den Grenzwert 800 g kam durch die im Rahmen einer Masterarbeit durchgeführte Auswertung von MRI-internen Daten zum Taillenumfang und mittels DEXA ermittelten Viszeralfettgehalten postmenopausaler Frauen zustande ($n_{\text{gesamt}} = 141$; $n = 76$ aus der vorliegenden Studie; $n = 65$ aus einer weiteren Studie des MRI). Hierbei zeigte sich ein moderater Zusammenhang zwischen dem Taillenumfang und der Menge an viszeralem Fettgewebe ($r = 0,59$).

Bei einem Taillenumfang von 88 cm, wie er von der *American Heart Association* und dem *National Heart, Lung, and Blood Institute* als Grenzwert für die Deklaration als Risikofaktor des metabolischen Syndroms bei Frauen festgelegt ist, ergab sich ein Viszeralfettgehalt von 802 g (Grundy et al., 2005).

Die beiden untersuchten Einflussvariablen Behandlung und Körperfettanteil wurden somit als kategoriale Variablen in das Modell integriert (kategoriales Modell). Bei signifikanten Interaktionseffekten wurde ein Post-Hoc-Test durchgeführt, um signifikante Unterschiede zwischen den Gruppenmittelwerten aufzudecken. Eingesetzt wurde ein *Tukey HSD* (Honestly Significant Difference) Test. Dieser Ansatz wurde einerseits für alle 169 Frauen insgesamt durchgeführt, als auch getrennt nach Periode 1 und Periode 2, um mögliche saisonale Unterschiede ausschließen zu können. Die Berechnung erfolgte mit SAS JMP 12.0.1.

Beim zweiten Ansatz wurde der Körperfettgehalt bzw. die Menge an viszeralem Fettgewebe als kontinuierliche Variable integriert (kontinuierliches Modell). Mögliche saisonale Einflüsse wurden durch Einbeziehung der Periode als zufälliger Effekt berücksichtigt. Die Berechnung erfolgte in R Version 3.3.2 mit der Funktion *lmer* aus dem Paket *lme4*. Somit entsprach die Modellierung:

$$1) \text{ Zielvariable} = \alpha_0 + \alpha \text{Behandlung} + \beta(1|\text{Periode}) + \gamma \text{Körperfettgehalt} + \eta \text{Behandlung} * \text{Körperfettgehalt} + \varepsilon$$

$$2) \text{ Zielvariable} = \alpha_0 + \alpha \text{Behandlung} + \beta(1|\text{Periode}) + \gamma \text{viszerale Fettmenge} + \eta \text{Behandlung} * \text{viszerale Fettmenge} + \varepsilon$$

wobei $(1|\text{Periode})$ für die Periode als zufälliger Effekt steht.

Die Anpassungen der Geraden erfolgten über die Maximum-Likelihood-Methode. Getestete signifikante Interaktionseffekte wurden abgebildet, wobei der Interventionseffekt dort als sich kreuzende (und nicht parallele) Regressionsgeraden der Placebo- und Verumgruppe zu erkennen war. Der Vorteil dieses kontinuierlichen Modells gegenüber des kategorialen Modells ist, dass es durch die Einführung der kontinuierlichen Variable nicht zu einem Informationsverlust kommen kann, wie er durch zu scharfe Grenzen bei der Kategorisierung möglich wäre.

Die Ergebnisse dieser Post-Treatment-Auswertung ließen auf Interaktionseffekte zwischen anfänglichem Körperfettgehalt und Behandlung für die Zielparameter Gesamtcholesterol- sowie LDL-Cholesterolkonzentrationen als auch auf Interaktionseffekte zwischen anfänglicher viszeraler Fettmenge und der Behandlung hinsichtlich dieser beiden Zielparameter schließen (Ergebnisübersicht im Anhang in Tabelle A1 und Tabelle A2). Allerdings lagen schon vor dem Beginn der Intervention Interaktionseffekte zwischen Behandlung und Körperfettgehalt bzw. Menge an viszeralem Fettgewebe

vor. Dieser Effekt des Körperfettgehaltes bzw. der viszeralen Fettmenge auf die Intervention konnte zu diesem Zeitpunkt noch gar nicht bestehen, da noch gar keine Intervention mit Isoflavonen oder Placebo stattgefunden hat. Daher handelt es sich hierbei um fiktive Interaktionen, die allein durch die Gruppeneinteilung nach Körperfettgehalt bzw. viszeraler Fettmenge und Behandlung hervorgerufen wurden. Diese fiktiven Interaktionseffekte traten ebenfalls bei den Zielparametern HDL-Cholesterol- und TG-Konzentrationen auf. Daher wurde für die Zielparameter Gesamt- sowie LDL- und HDL-Cholesterolkonzentration und TG-Konzentrationen eine andere statistische Herangehensweise gewählt und die absoluten Differenzen dieser Zielparameter, also die Veränderung zwischen Baseline- und Endwerten, in das GLM integriert. Für alle weiteren untersuchten Zielparameter unterschieden sich die Gruppen zu Beginn der Intervention nicht und es traten ebenfalls keine fiktiven Interaktionen auf, sodass hier nur die Post-Treatmentkonzentrationen mit in die Analyse aufgenommen wurden (Vickers, 2001).

3.3.6.3 Determinanten der LDLR- und CD36-Expression auf Lymphozyten

Um solche Parameter zu identifizieren, die die Baselinevariabilität der leukozytären Rezeptorexpressionen des LDLR und CD36 beeinflussen, wurde eine multiple lineare Regressionsanalyse mit SAS JMP 11.0.0 durchgeführt. In das Modell für die LDLR-Expression auf den Lymphozytensubpopulationen wurden Fettstoffwechselfparameter (Gesamtcholesterol-, LDL-Cholesterol-, HDL-Cholesterol- und TG-Konzentrationen), Parameter der Körperzusammensetzung (Körpergewicht, BMI, prozentualer Körperfettanteil und viszerales Fettgewebe (g)), klinische Routineparameter (Lymphozyten (absolut und prozentual), GGT, GOT, Harnsäure, Insulin, Glucose, T3, systolischer und diastolischer Blutdruck) und das Alter aufgenommen. Die gleichen Parameter fanden auch im Modell für die monozytäre CD36-Expression Anwendung, mit Ausnahme von T3 und den Lymphozyten, für die Monozyten (absolut und prozentual) mit einfließen.

Um eine vorliegende Kollinearität zwischen erklärenden Variablen auszuschließen, wurde diese anhand des Varianzinflationsfaktors diagnostiziert und stark korrelierende Variablen ($VIF \geq 3$) aus dem Modell ausgeschlossen. Die studentisierten Residuen des Modells mussten Normalverteilung aufweisen. Die Überprüfung dieser Voraussetzung erfolgte mithilfe des Shapiro-Wilk-W-Tests. Lag keine Normalverteilung der Residuen vor, wurde eine Box-Cox-Transformation durchgeführt. Studentisierte Residuen mit Werten außerhalb des Intervalls -3 bis 3 wurden als Ausreißer betrachtet und aus dem entsprechenden Modell entfernt.

Alle Daten in dieser Arbeit werden als Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (SD) angegeben. Unterschiede zwischen den Gruppen werden als statistisch signifikant angegeben, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5 % liegt ($p \leq 0,05$).

3.3.6.4 Genexpressionsanalysen

Die Beschreibung der statistischen Auswertung für die genomweite Genexpressionsanalyse und die Genexpressionsanalyse der qRT-PCR-Ergebnisse erfolgte in den Kapiteln 3.3.5.2 und 3.3.5.3 im direkten Anschluss an die jeweilige Methodenbeschreibung.

4 Ergebnisse

4.1 Probandinnenkollektiv

179 postmenopausale Frauen erfüllten die Kriterien und wurden als Probandinnen in die Studie eingeschlossen und gleichmäßig auf die Verum (n = 89) und die Placebogruppe (n = 90) randomisiert. Neun Frauen beendeten die Intervention vorzeitig (4 aus der Verumgruppe und 5 aus der Placebogruppe). Gründe dafür waren gesundheitliche Probleme (n = 5), Medikamenteneinnahme, die sich nicht mit den Einschlusskriterien vereinbaren lies (n = 1), wiederkehrende Menstruationsblutung (n = 1) und ein Gewichtsverlust der in einem BMI < 20 kg/m² resultierte (n = 2). Somit konnten die Daten von 170 postmenopausalen Frauen (n = 85 in der Verumgruppe und n = 85 in der Placebogruppe) analysiert werden (siehe Abbildung 11).

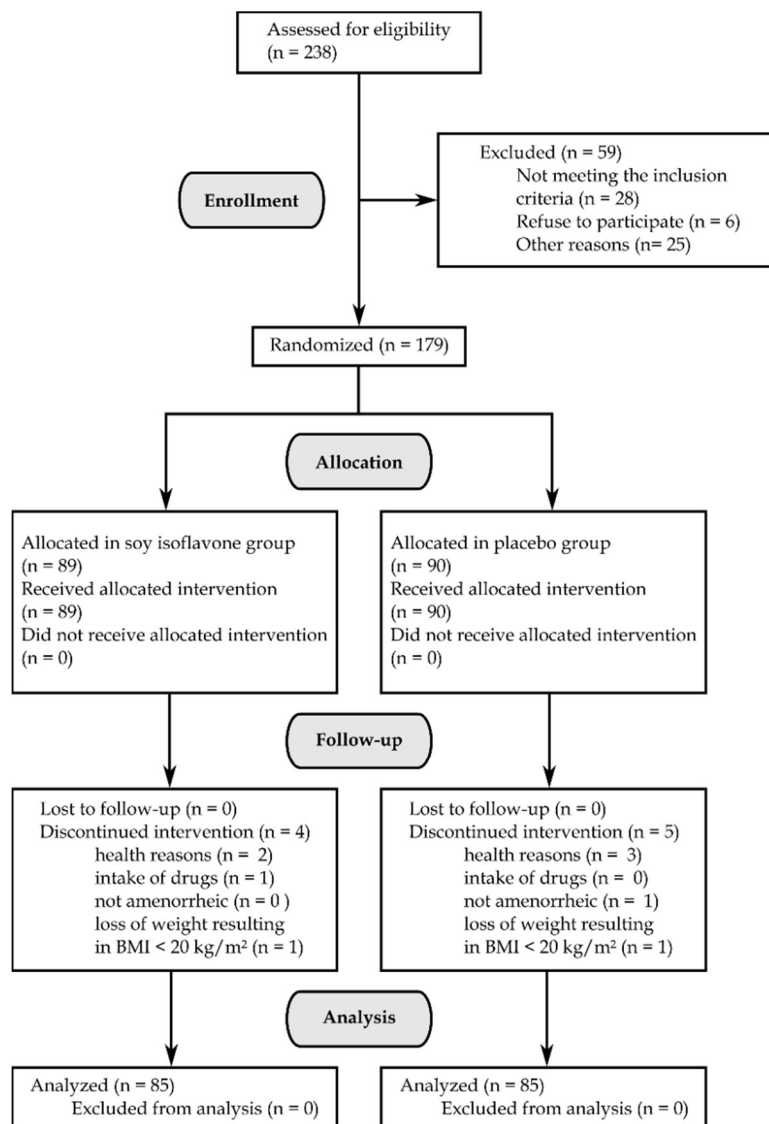


Abbildung 11 CONSORT Flowchart der Probandinnenrekrutierung (Engelbert et al., 2016)

Die Compliance wurde in den Frauen aus Periode 2 (Februar-Mai 2014) durch Zählen der nach der Studie zurückgegebenen Kapseln ermittelt. Diese Information lag von 71 Frauen vor und es wurde eine Compliance von 98 % festgestellt. Die durchschnittliche Plasmaisoflavonkonzentration, welche sich aus der Summe von Daidzein, Genistein und deren entsprechenden Aglykonäquivalenten zusammensetzt, lag bei $2,6 \pm 2,1 \mu\text{M}$ in der Isoflavongruppe. Anhand der Plasmaisoflavonkonzentrationen erfolgte die Einteilung in Equol- und Nicht-Equolbildnerinnen. In der Isoflavongruppe waren 26 von 85 Frauen Equolbildnerinnen (30,6 %).

Die anthropometrischen Baselinedaten, als auch die Blutlipid- und Blutzellkonzentrationen zu Studienbeginn sind der Tabelle 4 zu entnehmen. Es zeigten sich, außer für die Leukozytenkonzentrationen ($p = 0,04$), keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Die Leukozytenkonzentrationen lagen in beiden Gruppen im physiologischen Bereich.

Tabelle 4 Baselinecharakteristika der gesamten Probandinnen ($n = 170$) als auch getrennt in Verum bzw. Placebogruppe (je $n = 85$)

<i>n</i>	<u>Gesamt</u> 170	<u>Placebo</u> 85	<u>Verum</u> 85
Anthropometrie			
Alter (Jahre)	59,5 ^a ± 6,03	59,5 ± 6,22	59,6 ± 5,88
Größe (cm)	164 ± 6,09	164 ± 6,49	164 ± 5,69
Gewicht (kg)	68,2 ± 11,4	69,2 ± 12,1	67,3 ± 10,6
BMI (kg/m ²)	25,2 ± 3,86	25,6 ± 4,23	24,9 ± 3,44
Blutlipide			
Gesamtcholesterol (mg/dL)	226 ± 34,8	224 ± 35,0	227 ± 34,7
LDL-Cholesterol (mg/dL)	144 ± 33,6	142 ± 32,7	146 ± 34,6
HDL-Cholesterol (mg/dL)	76,0 ± 17,2	76,8 ± 17,2	75,0 ± 17,1
Triglyceride (mg/dL)	94,5 ± 43,2	92,4 ± 33,2	96,6 ± 51,6
Blutzellen			
Erythrozyten (/pL)	4,55 ± 0,30	4,56 ± 0,30	4,54 ± 0,29
Leukozyten (/nL)*	5,14 ± 1,33	4,96 ± 1,18	5,33 ± 1,44
Lymphozyten (%)	34,8 ± 7,08	35,1 ± 6,97	34,5 ± 7,23
Lymphozyten abs. (/nL)	1,76 ± 0,46	1,72 ± 0,45	1,79 ± 0,47
Monozyten (%)	8,22 ± 1,99	8,29 ± 1,83	8,16 ± 2,14
Monozyten abs. (/nL)	0,42 ± 0,13	0,41 ± 0,13	0,43 ± 0,13
Eosinophile (%)	2,91 ± 1,60	3,01 ± 1,61	2,81 ± 1,60
Basophile (%)	0,65 ± 0,43	0,65 ± 0,34	0,65 ± 0,50
Neutrophile(%)	53,4 ± 8,00	53,0 ± 7,85	53,8 ± 8,17
Thrombozyten (/nL)	251 ± 52,0	246 ± 49,0	257 ± 54,6

* $p \leq 0,05$ = signifikanter Unterschied zwischen Placebo- und Verumgruppe, ermittelt mit dem Student's T-Test

^a MW ± SD (gilt für alle Werte)

4.1.1 Einteilung der Probandinnen anhand ihres anfänglichen Körperfettgehaltes

Um zu untersuchen, ob der prozentuale Körperfettgehalt einen Einfluss auf die Intervention ausübt, wurden die Probandinnen anhand ihres Körperfettgehaltes zu Beginn der Studie kategorisiert. Ein prozentualer Körperfettgehalt von $< 35\%$ wurde als niedriger Körperfettgehalt, Werte darüber als hoher Körperfettgehalt eingeteilt (Tabelle 5) (vgl. Kapitel 3.3.6.2).

Tabelle 5 Anzahl der Probandinnen in den jeweiligen Interventionsgruppen eingeteilt nach Kategorien für den Körperfettgehalt zu Beginn der Studie (n=169)

Placebo		Verum	
Niedriger Körperfettgehalt ($< 35\%$)	Hoher Körperfettgehalt ($\geq 35\%$)	Niedriger Körperfettgehalt ($< 35\%$)	Hoher Körperfettgehalt ($\geq 35\%$)
n = 29	n = 55	n = 33	n = 52

Die Gesamtcholesterol-, LDL-Cholesterol- und TG-Ausgangskonzentrationen in der Isoflavongruppe in Frauen mit einem hohen Körperfettgehalt waren höher als in den Frauen mit einem niedrigen Körperfettgehalt. Unterschiede zur Placebogruppe bestanden nicht. In der Placebogruppe waren die HDL-Cholesterolkonzentrationen in der Gruppe mit einem niedrigen Körperfettgehalt höher als in der Gruppe mit hohem Körperfettgehalt. Für alle weiteren untersuchten Parameter traten zu Beginn der Intervention keine Unterschiede auf. Die Ausgangskonzentrationen der Serumlipide sowie der LDLR- und CD36-Expression in diesen Gruppen sind Tabelle 6 zu entnehmen. Die Plasmaisoflavonkonzentrationen der Frauen in der Verumgruppe mit niedrigem bzw. hohem Körperfettgehalt unterschieden sich nach 12-wöchiger Intervention nicht ($2,7 \pm 2,2 \mu\text{M}$ vs. $2,5 \pm 1,9 \mu\text{M}$) ($p = 0,6632$).

Tabelle 6 Ausgangskonzentrationen der Serumlipide sowie der LDLR- und CD36-Expression auf Leukozyten in postmenopausalen Frauen mit niedrigem (< 35 %) und hohem (≥ 35 %) Körperfettgehalt in der Placebo und Verumgruppe

	Placebo		Verum	
	Niedriger	Hoher	Niedriger	Hoher
	Körperfettgehalt (< 35 %)	Körperfettgehalt (≥ 35 %)	Körperfettgehalt (< 35 %)	Körperfettgehalt (≥ 35 %)
n	29	55	33	52
Cholesterol (mg/dL)	232 ± 43,2 ^{a)}	220 ± 29,6	211 ± 26,2 ^B	237 ± 35,9 ^A
LDL-Cholesterol (mg/dL)	143 ± 39,5	142 ± 29,2	129 ± 26,8 ^B	156,4 ± 35,0 ^A
HDL-Cholesterol (mg/dL)	86,5 ± 14,1 ^A	71,3 ± 16,3 ^B	79,8 ± 19,3	72,1 ± 15,1
Triglyzeride (mg/dL)	79,2 ± 22,0	99,6 ± 36,2	79,5 ± 29,1 ^B	107 ± 59,4 ^A
LDLR ⁺	9,39 ± 3,41	9,92 ± 3,11	10,3 ± 4,02	9,14 ± 3,17
Gesamtlymphozyten (%)				
LDLR ⁺ T-Zellen (%)	5,49 ± 2,16	6,48 ± 2,86	6,27 ± 3,33	5,53 ± 3,00
LDLR ⁺ B-Zellen (%)	9,21 ± 4,75	9,01 ± 3,58	10,78 ± 5,73	8,69 ± 3,33
LDLR ⁺ NK-Zellen (%)	22,6 ± 7,91	25,9 ± 7,12	26,2 ± 7,77	23,9 ± 6,99
LDLR ⁺ T-Zellen (MFI)	237 ± 30,5	228 ± 26,9	229 ± 26,8	231 ± 35,3
LDLR ⁺ B-Zellen (MFI)	416 ± 141	422 ± 161	409 ± 194	443 ± 194
LDLR ⁺ NK-Zellen (MFI)	247 ± 28,1	262 ± 40	249 ± 29,0	247 ± 38,5
CD36 ⁺ Monozyten (%)	91,7 ± 2,55	91,8 ± 2,72	92,5 ± 2,42	91,6 ± 2,79
CD36 ⁺ Monozyten (MFI)	12049 ± 3730	13587 ± 5282	12922 ± 4996	13587 ± 4439

^{a)}MW ± SD (gilt für alle Werte in der Tabelle)

A, B: Gruppen mit unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet (Tukey HSD Test); es sind nur die für die Auswertung relevanten Unterschiede gekennzeichnet

Nach Perioden getrennte Einteilung der Probandinnen anhand des Körperfettgehaltes

Um ausschließen zu können, dass die Durchführung der Studie in 2 Perioden sich auf potentielle Einflüsse des Körperfettgehaltes auf die Intervention auswirkt, wurde die Analyse mittels des kategorialen Modells zudem für die erste und zweite Periode getrennt durchgeführt. Die Einteilung des Körperfettgehaltes erfolgte analog der Einteilung für den gesamten Studienzeitraum (Tabelle 5), die entsprechende Einteilung nach Perioden ist Tabelle 7 zu entnehmen. Die Ausgangskonzentrationen der Serumlipide sowie der LDLR- & CD36-Expression in Periode 1 und die entsprechenden Werte in Periode 2 können in Tabelle A3 und der Tabelle A4 im Anhang eingesehen werden. Die Berücksichtigung der beiden Perioden erfolgte im kontinuierlichen Modell als zufälliger Effekt (vgl. Kapitel 3.3.6.2).

Tabelle 7 Anzahl der Probandinnen in den jeweiligen Interventionsgruppen eingeteilt nach Kategorien für den Körperfettgehalt zu Beginn der Studie getrennt für Periode 1 (n = 94) und 2 (n = 75)

	Placebo		Verum	
	Niedriger Körperfettgehalt ($< 35\%$)	Hoher Körperfettgehalt ($\geq 35\%$)	Niedriger Körperfettgehalt ($< 35\%$)	Hoher Körperfettgehalt ($\geq 35\%$)
Periode 1	n = 17	n = 30	n = 19	n = 28
Periode 2	n = 15	n = 22	n = 14	n = 24

4.1.2 Einteilung der Probandinnen anhand ihrer anfänglichen Menge an viszeralem Fettgewebe

Damit untersucht werden konnte, ob die Menge an viszeralem Fettgewebe einen Einfluss auf die Intervention mit Isoflavonen hatte, wurde für das kategoriale Modell der Viszeralfettgehalt der Probandinnen zu Beginn der Studie in die Kategorien hoch und niedrig aufgegliedert. Eine viszerale Fettmenge von < 800 g wurde als niedriger Viszeralfettgehalt, Werte darüber als hoher Viszeralfettgehalt kategorisiert (Tabelle 8) (vgl. Kapitel 3.3.6.2).

In der Verumgruppe waren die Gesamtcholesterol-, LDL-Cholesterol- und Triglyzerid-Konzentrationen zu Beginn der Studie jeweils in den Frauen mit hohem viszeralem Fettgehalt im Vergleich zu denen mit niedrigem Körperfettgehalt erhöht. Die HDL-Cholesterolkonzentrationen waren in der Placebogruppe in Frauen mit hohem viszeralem Fettgehalt niedriger als in Frauen mit niedrigem viszeralem Fettgehalt. Die Gesamtcholesterolkonzentrationen waren zudem in Frauen mit hohem viszeralem Fettgehalt in der Verumgruppe höher als in Frauen der Placebogruppe. Wie auch für den Körperfettgehalt unterschieden sich alle weiteren untersuchten Parameter zu Beginn der Studie aufgrund der Einteilung nach viszeraler Fettmenge und Behandlung nicht. Die Ausgangskonzentrationen der Serumlipide sowie der LDLR- und CD36-Expression sind Tabelle 9 zu entnehmen. Die Isoflavonkonzentrationen im Plasma der isoflavonsupplementierten Frauen unterschieden sich zwischen Frauen mit einem viszeralen Fettgehalt unter 800 g und Frauen mit einem viszeralen Fettgehalt über 800 g nicht ($2,6 \pm 1,9 \mu\text{M}$ vs. $2,5 \pm 1,9 \mu\text{M}$; $p = 0,8437$).

Tabelle 8 Anzahl der Probandinnen in den jeweiligen Interventionsgruppen eingeteilt nach Kategorien für den Viszeralfettgehalt (n=169)

Placebo		Verum	
Niedriger Viszeralfettgehalt ($< 800\text{g}$)	Hoher Viszeralfettgehalt ($\geq 800\text{g}$)	Niedriger Viszeralfettgehalt ($< 800\text{g}$)	Hoher Viszeralfettgehalt ($\geq 800\text{g}$)
n = 52	n = 32	n = 51	n = 34

Tabelle 9 Baselinekonzentrationen der Serumlipide sowie der LDLR- und CD36-Expression auf Leukozyten in postmenopausalen Frauen gruppiert nach niedrigem (< 800 g) und hohem (≥ 800 g) viszeralen Fettgehalt in der Verum oder Placebogruppe

	Placebo		Verum	
	Niedriger Viszeralfettgehalt (< 800 g)	Hoher Viszeralfettgehalt (≥ 800 g)	Niedriger Viszeralfettgehalt (< 800 g)	Hoher Viszeralfettgehalt (≥ 800 g)
n	52	32	51	34
Cholesterol (mg/dL)	230 ± 36,5 ^{a)}	214 ± 30,9 ^B	219 ± 30,7 ^B	240 ± 37,0 ^A
LDL-Cholesterol (mg/dL)	144 ± 33,8	140 ± 31,8	137 ± 30,4 ^B	160 ± 36,0 ^A
HDL-Cholesterol (mg/dL)	82,2 ± 16,1 ^A	67,4 ± 14,8 ^B	78,1 ± 17,8	70,6 ± 15,3
Triglyzeride (mg/dL)	83,5 ± 26,3	107 ± 38,4	82,7 ± 27,0 ^B	117 ± 70,1 ^A
LDLR ⁺	9,23 ± 3,13	10,5 ± 3,20	9,64 ± 3,89	9,53 ± 3,03
Gesamtlymphozyten (%)				
LDLR ⁺ T-Zellen (%)	5,67 ± 2,50	6,90 ± 2,80	5,84 ± 3,17	5,77 ± 3,12
LDLR ⁺ B-Zellen (%)	8,61 ± 4,14	9,80 ± 3,70	9,67 ± 5,21	9,21 ± 3,17
LDLR ⁺ NK-Zellen (%)	23,6 ± 7,42	26,7 ± 7,37	24,8 ± 8,11	24,7 ± 6,15
LDLR ⁺ T-Zellen (MFI)	236 ± 28,8	222 ± 25,5	230 ± 24,2	231 ± 41,6
LDLR ⁺ B-Zellen (MFI)	418 ± 161	423 ± 142	412 ± 197	457 ± 188
LDLR ⁺ NK-Zellen (MFI)	252 ± 30,1	265 ± 45,6	251 ± 31,2	243 ± 39,8
CD36 ⁺ Monozyten (%)	91,8 ± 2,50	91,6 ± 2,91	91,9 ± 2,62	91,9 ± 2,79
CD36 ⁺ Monozyten (MFI)	12369 ± 5265	14236 ± 3740	12896 ± 4258	13968 ± 5125

^{a)} MW ± SD (gilt für alle Werte in der Tabelle)

A, B: Gruppen mit unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet (Tukey HSD Test); es sind nur die für die Auswertung relevanten Unterschiede gekennzeichnet

Nach Perioden getrennte Einteilung der Probandinnen anhand ihrer Viszeralfettmenge

Um auch hier ausschließen zu können, dass die Durchführung der Studie in 2 Perioden einen Einfluss auf die möglicherweise modulierenden Effekte der viszeralen Fettmenge zu Beginn der Studie auf die Intervention hatte, wurde die Analyse zudem für die Perioden 1 und 2 getrennt durchgeführt. Die Einteilung des viszeralen Fettgehaltes erfolgte analog der Einteilung für den gesamten Studienzeitraum (Tabelle 8), die Einteilung nach Perioden ist in Tabelle 10 dargestellt. Im kontinuierlichen Modell war die Einteilung in Perioden als zufälliger Effekt mitberücksichtigt (vgl. Kapitel 3.3.6.2). Die Ausgangskonzentrationen der jeweiligen Zielparameter in den entsprechenden Gruppen für Periode 1 und 2 sind Tabelle A5 und Tabelle A 6 im Anhang zu entnehmen.

Tabelle 10 Anzahl der Probandinnen in den jeweiligen Interventionsgruppen eingeteilt nach Kategorien für den Viszeralfettgehalt getrennt für Periode 1 (n = 94) und 2 (n = 75)

	Placebo		Verum	
	Niedriger Viszeralfettgehalt (< 800 g)	Hoher Viszeralfettgehalt (≥ 800 g)	Niedriger Viszeralfettgehalt (< 800 g)	Hoher Viszeralfettgehalt (≥ 800 g)
Periode 1	n = 29	n = 18	n = 28	n = 19
Periode 2	n = 23	n = 14	n = 23	n = 15

4.2 Einfluss der Intervention auf Sexualhormone, Schilddrüsenhormone, Insulin und Leptin

Die Intervention hatte keinen Einfluss auf die Estradiolkonzentrationen ($p = 0,1327$). Veränderungen der SHBG-Konzentrationen ($p = 0,5629$) sowie der Konzentrationen an Insulin und Leptin ($p = 0,3733$; $p = 0,3032$) traten durch die Intervention nicht auf.

Da potentielle goitrogene Effekte der Isoflavone diskutiert werden, wurden zudem die Schilddrüsenhormone T3, T4 und TSHB untersucht. Die Isoflavonintervention führte zu niedrigeren T3-Konzentrationen nach der 12-wöchigen Studiendauer ($p = 0,0185$). Diese niedrigeren T3-Konzentrationen traten aber ebenso in der Placebogruppe auf, sodass kein Unterschied zwischen Placebo und Isoflavonintervention vorlag (Abbildung 12). T4 ($p = 0,5599$) sowie TSHB ($p = 0,3165$) blieben durch die Intervention unverändert. Die Intervention mit Isoflavonen hat demnach keinen Einfluss auf die untersuchten Schilddrüsenhormone.

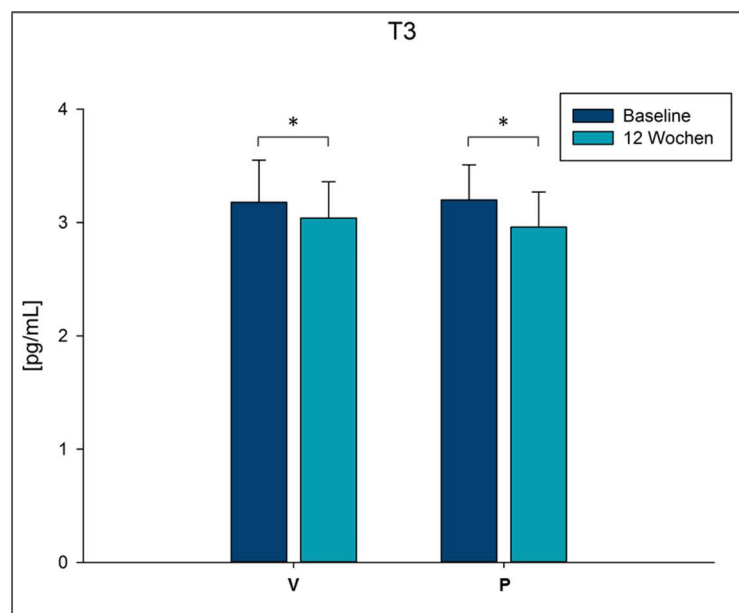


Abbildung 12 Vergleich der T3-Konzentrationen [pg/mL] vor und nach der 12-wöchigen Intervention mit Verum (V) oder Placebo (P) in postmenopausalen Frauen ($p \leq 0,05$). Alle Angaben in MW \pm SD.

4.2.1 Einfluss der Studiendurchführung in zwei Perioden auf die Hormonkonzentrationen

In der ersten Periode stiegen die Leptinkonzentrationen von $13,9 \pm 9,08$ ng/mL auf $14,8 \pm 9,26$ ng/mL an ($p = 0,0076$). In der zweiten Periode veränderten sich die Leptinkonzentrationen nicht ($14,1 \pm 8,02$ ng/mL vs. $13,7 \pm 8,59$ ng/mL). Für die weiteren untersuchten Hormone konnten keine Effekte durch die Einteilung der Studie in zwei Perioden festgestellt werden (siehe Tabelle A7 im Anhang).

4.3 Serumlipide

4.3.1 Einfluss der Intervention auf die Serumlipide

Die Einnahme von Isoflavonen erhöhte die LDL-Cholesterolkonzentration um 5 mg/dL von $146 \pm 34,6$ mg/dL auf $151 \pm 34,0$ mg/dL ($p = 0,03$). Dieser Effekt ist zwar signifikant, die Erhöhung ist mit ca. 3,4 % allerdings moderat. Außerdem stiegen die Triglyzeridkonzentrationen von $92,4 \pm 34,4$ mg/dL auf $97,9 \pm 38,5$ mg/dL an. Dieser Anstieg war jedoch nicht signifikant ($p = 0,09$). Die Isoflavonintervention beeinflusste die Gesamtcholesterolkonzentrationen und HDL-Cholesterolkonzentrationen nicht (Abbildung 13).

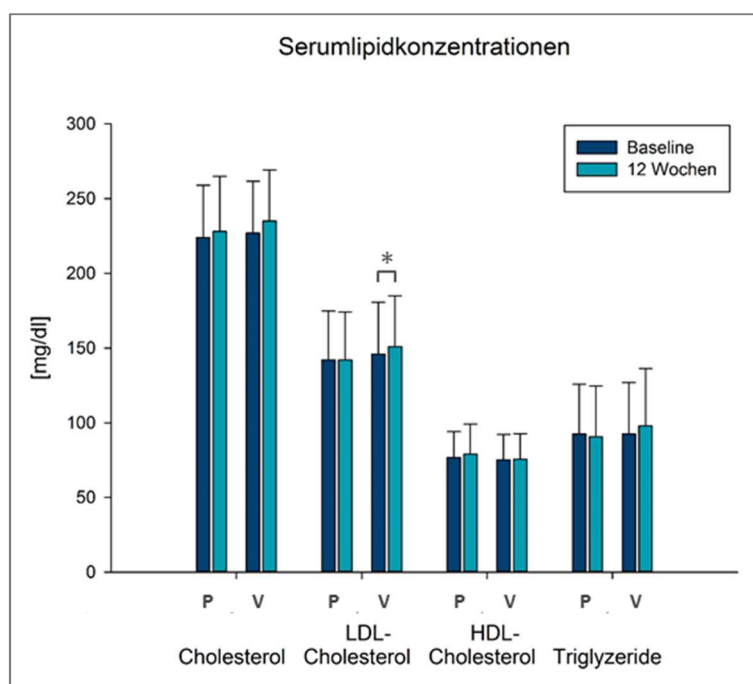


Abbildung 13 Serumlipidkonzentrationen [mg/dL] vor und nach 12-wöchiger Intervention mit Soja Isoflavonextrakt (V) oder Placebo (P) ($p \leq 0,05$). Alle Angaben in MW \pm SD.

4.3.2 Einfluss der Ausgangskonzentration an LDL-Cholesterol auf die Behandlung

In der Literatur ist beschrieben, dass Isoflavoneffekte auf die Serumlipide in hypercholesterolämischen Frauen stärker ausgeprägt sein können, als in Frauen mit normalen Cholesterolkonzentrationen (Nikander et al., 2004; Qin et al., 2013; Taku et al., 2007; Zhan et Ho, 2005). Aus diesem Grund wurden die Frauen entsprechend ihrer LDL-Cholesterolkonzentrationen zu Beginn der Studie in Frauen mit Konzentrationen über oder unter 160 mg/dL eingeteilt. Es wurde untersucht, ob sich die Isoflavonintervention in diesen Gruppen unterschiedlich auswirkt. Diese Isoflavonintervention hatte keinen signifikanten Effekt auf die LDL-Cholesterolkonzentrationen in den Frauen mit anfänglichen Konzentrationen > 160 mg/dL ($p = 0,11$) noch in denen mit Konzentrationen < 160 mg/dL ($p = 0,12$)

(Abbildung 14). Somit zeigte sich kein Effekt der Intervention in Abhängigkeit der Ausgangskonzentrationen des LDL-Cholesterols.

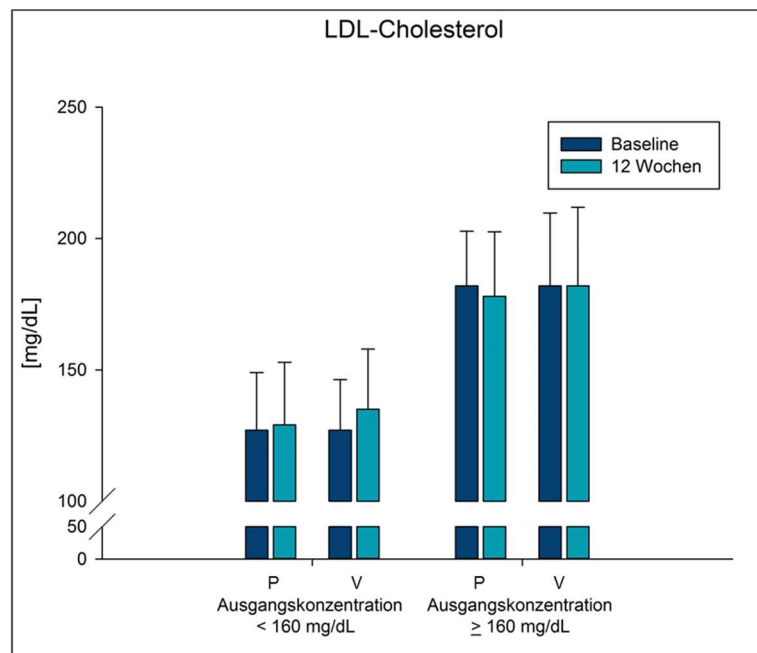


Abbildung 14 Vergleich der LDL-Cholesterolkonzentrationen vor (Baseline) und nach (12 Wochen) der Intervention mit Placebo (P) oder Verum (V) in Frauen mit Ausgangskonzentrationen an LDL-Cholesterol ≥ 160 mg/dL zu Beginn der Intervention im Vergleich zu Frauen mit anfänglichen LDL-Cholesterolkonzentrationen < 160 mg/dL. Alle Angaben in MW \pm SD.

4.3.3 Einfluss des prozentualen Körperfettgehaltes auf die Behandlung

4.3.3.1 Cholesterol

Schon zu Beginn der Intervention unterschieden sich die Cholesterolkonzentrationen der Frauen mit niedrigem und hohem Körperfettgehalt in der Verumgruppe ($211 \pm 26,2$ mg/dL vs. $237 \pm 35,9$ mg/dL). Aus diesem Grund wurde für die Auswertung die absolute Differenz der Cholesterolkonzentrationen, also die Veränderung zwischen Ausgangs- und Endkonzentration, als Zielvariable herangezogen. Der anfängliche Körperfettgehalt hatte hinsichtlich der Cholesterolkonzentration keinen Einfluss auf die Intervention (kategoriales Modell $p = 0,7696$; kontinuierliches Modell $p = 0,9435$).

4.3.3.2 LDL-Cholesterol

Wie auch beim Gesamtcholesterol unterschied sich die LDL-Cholesterolkonzentration in den Frauen, die in die Verumgruppe eingeteilt waren schon zu Beginn zwischen denen mit niedrigem bzw. hohem Körperfettgehalt ($129 \pm 26,8$ mg/dL vs. $156,4 \pm 35,0$ mg/dL; $p = 0,0131$). Somit war die Zielvariable auch hier die Differenz der End- und Ausgangskonzentration des LDL-Cholesterols. Hinsichtlich der LDL-Cholesterolkonzentrationen beeinflusste der anfängliche Körperfettgehalt die Intervention nicht (kategoriales Modell $p = 0,6538$; kontinuierliches Modell $p = 0,972$).

4.3.3.3 HDL-Cholesterol

In den Frauen in der Placebogruppe waren die HDL-Cholesterolkonzentrationen schon zu Beginn der Studie zwischen Frauen mit niedrigem Körperfettanteil und hohem Körperfettanteil unterschiedlich ($86,5 \pm 14,1$ mg/dL vs. $71,3 \pm 16,3$ mg/dL). Der Körperfettgehalt beeinflusste die Intervention hinsichtlich der HDL-Cholesterolkonzentrationen nicht (kontinuierliches Modell $p = 0,6122$; kategoriales Modell $p = 0,9601$).

4.3.3.4 Triglyzeride

Die Triglyzeridkonzentrationen waren in Frauen der Isoflavongruppe vor der Intervention in den Frauen mit einem hohen Körperfettgehalt höher als in Frauen mit niedrigem Körperfettgehalt ($107 \pm 59,4$ mg/dL vs. $79,5 \pm 29,1$ mg/dL). Ebenso wie hinsichtlich der Gesamtcholesterol, LDL- und HDL-Cholesterolkonzentrationen beeinflusste der Körperfettgehalt zu Beginn der Intervention auch die Triglyzeridkonzentrationen nicht (kontinuierliches Modell $p = 0,724$ und kategoriales Modell $p = 0,6471$).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass der Körperfettgehalt zu Beginn der Studie die Intervention hinsichtlich der Serumlipidkonzentrationen nicht beeinflusst.

4.3.4 Einfluss der Menge an viszeralem Fettgewebe auf die Behandlung

4.3.4.1 Gesamtcholesterol

Die Gesamtcholesterolkonzentrationen unterschieden sich schon zu Beginn der Studie zwischen den Frauen mit einem viszeralen Fettgehalt unter 800 g und über 800 g in der Verumgruppe ($219 \pm 30,7$ mg/dL vs. $240 \pm 37,0$ mg/dL). Auch in den Frauen mit einem hohen Gehalt an viszeralem Fett unterschieden sich zum Beginn die Gesamtcholesterolkonzentrationen zwischen der Verum und der Placebogruppe ($240 \pm 37,0$ mg/dL vs. $214 \pm 30,9$ mg/dL). Dies führte dazu, dass die Ausgangswerte mit in die Analyse einbezogen wurden und die Zielvariable demnach der absoluten Differenz zwischen den Cholesterolkonzentrationen nach der Studie und denen zu Beginn der Studie entsprach. Der anfängliche viszerale Fettgehalt beeinflusste die Behandlung hinsichtlich der Gesamtcholesterolkonzentrationen nicht ($p = 0,8944$ im kategorialen Modell; $p = 0,90758$ im kontinuierlichen Modell).

4.3.4.2 LDL-Cholesterol

In der Verumgruppe trat schon zu Beginn der Intervention ein Unterschied zwischen den Frauen mit niedriger und hoher viszeraler Fettmenge bezüglich ihrer LDL-Cholesterolkonzentrationen auf ($137 \pm 30,4$ mg/dL vs. $160 \pm 36,0$ mg/dL). Demnach war es notwendig, die Ausgangswerte mit in die Auswertung einzubeziehen. Daraus ergab sich als Zielvariable, wie auch schon beim Gesamtcholesterol, die absolute Differenz zwischen End- und Ausgangskonzentrationen des LDL-Cholesterols. Modulierende Effekte der viszeralen Fettmenge auf die Intervention konnten

hinsichtlich der absoluten Differenz der LDL-Cholesterolkonzentrationen durch keines der beiden Modelle festgestellt werden (kontinuierliches Modell: $p = 0,941$; kategoriales Modell: $p = 0,6956$).

4.3.4.3 HDL Cholesterol

Die HDL-Cholesterolkonzentrationen unterschieden sich schon zu Beginn der Studie in den Frauen der Placebogruppe zwischen denen mit hohem und niedrigem viszeralen Fettgehalt ($67,4 \pm 14,8$ mg/dL vs. $82,2 \pm 16,1$ mg/dL). Aus diesem Grund wurde auch für die HDL-Cholesterolkonzentrationen mit den absoluten Differenzen zwischen den End- und Ausgangskonzentrationen als Zielvariable gerechnet. Der viszerale Fettgehalt hatte hinsichtlich der HDL-Cholesterolkonzentrationen ebenfalls keinen Einfluss auf die Intervention. Dies bestätigte auch das kontinuierliche Modell (kontinuierliches Modell: $p = 0,87593$; kategoriales Modell: $p = 0,8440$).

4.3.4.4 Triglyzeride

Wie auch schon beim LDL-Cholesterol bestand hinsichtlich der Triglyzeridkonzentrationen schon zu Beginn der Intervention ein Unterschied zwischen den Frauen mit niedriger und hoher viszeraler Fettmenge ($82,7 \pm 27,0$ mg/dL vs. $117 \pm 70,1$ mg/dL). Somit wurde die Auswertung hinsichtlich der Triglyzeride ebenfalls mit der absoluten Differenz als Zielvariable durchgeführt. Auch hier hatte die anfängliche viszerale Fettmenge keinen Effekt auf die Interaktion. Dies wurde durch beide Modelle bestätigt (kategoriales Modell ($p = 0,7849$), kontinuierliche Modell ($p = 0,208$)).

Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass die anfängliche Menge an viszeralem Fettgewebe keinen Einfluss auf die Intervention hinsichtlich der Serumlipide hatte.

4.3.5 Einfluss des Equolbildner Phänotyps auf die Behandlung

Der Equolbildner Phänotyp hatte weder auf die Gesamt-, LDL- und HDL-Cholesterolkonzentration noch auf die Triglyzeridkonzentrationen einen Einfluss (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11 Serumlipide vor und nach 12-wöchiger Intervention mit Isoflavonen in Equolbildnern und Nicht-Equolbildnern

	Equolbildner				Nicht-Equolbildner			
		Baseline	12 Wochen		Baseline	12 Wochen		
Blutlipide	n		n		n		n	
Gesamtcholesterol (mg/dL)	26	231 ^{a)} ± 43,9	26	238 ± 42,2	59	225 ± 30,1	59	234 ± 30,3
LDL-Cholesterol (mg/dL)	26	150 ± 42,5	26	154 ± 39,1	59	144 ± 30,6	59	150 ± 31,7
HDL-Cholesterol (mg/dL)	26	74,0 ± 14,7	26	74,7 ± 15,7 1	59	75,6 ± 18,2	59	76,0 ± 17,8
Triglyzeride (mg/dL)	26	91,9 ± 39,7	26	97,4 ± 41,0	59	98,7 ± 56,1	59	98,2 ± 37,7

^{a)} MW ± SD (gilt für alle Daten in dieser Tabelle)

4.3.6 Einfluss der Studiendurchführung in zwei Perioden auf die Serumlipide

In der ersten Periode stieg die LDL-Cholesterolkonzentration interventionsunabhängig an ($p = 0,0107$). In der zweiten Periode sanken die LDL-Cholesterolkonzentrationen in den Frauen mit anfänglichen LDL-Cholesterolkonzentrationen über 160 mg/dL ($p = 0,0014$). Die Studiendurchführung in zwei Phasen beeinflusste die anderen Serumlipide nicht (Tabelle A7 im Anhang).

4.4 LDLR-Expression auf Lymphozyten

4.4.1 Determinanten der LDLR-Expression auf den Lymphozyten

Um solche Parameter zu identifizieren, die die Baselinevariabilität der LDLR-Expression auf den Lymphozyten behandlungsunabhängig beeinflussen, wurde eine multiple lineare Regressionsanalyse durchgeführt.

4.4.1.1 Determinanten der prozentualen LDLR-Expression auf den Gesamtlymphozyten

Mit den herangezogenen Parametern konnten 7,7 % der Variabilität der prozentualen LDLR-Expression auf den Gesamtlymphozyten erklärt werden ($p = 0,0269$). LDL-Cholesterol ($p = 0,0007$), TG ($p = 0,0082$) und T3 ($p = 0,0476$) trugen signifikant zur Variabilität der LDLR-Expression auf den Gesamtlymphozyten zu Beginn der Studie bei. Einen tendenziellen Beitrag zur Signifikanz des Modells trug GOT ($p = 0,0770$) bei (Tabelle 12).

Tabelle 12 Multiples lineares Regressionsmodell für die Baselinevariabilität der prozentualen LDLR-Expression auf den Gesamtlymphozyten: nach p-Wert sortierte Parameterschätzer ($R^2_{adj} = 0,077259$; $p = 0,0269$)

Variable	Schätzer	Standardfehler	t-Wert	p-Wert	Std Beta
LDL-Cholesterol	-0,031592	0,009088	-3,48	0,0007 ^{a)}	-0,32536
Triglyzeride	0,0308851	0,011529	2,68	0,0082 ^{a)}	0,318987
T3	-1,506336	0,754032	-2,00	0,0476 ^{a)}	-0,15766
GOT	0,0923198	0,051833	1,78	0,0770 ^{b)}	0,164952
Alter	-0,06549	0,047775	-1,37	0,1725	-0,12131
Glucose	-0,045744	0,034937	-1,31	0,1925	-0,11697
Diastolischer Blutdruck	0,0496065	0,041329	1,20	0,2320	0,14134
HDL-Cholesterol	0,0147531	0,01975	0,75	0,4563	0,077189
Lymphozyten (%)	-0,030804	0,042949	-0,72	0,4744	-0,06559
Gewicht	0,0160183	0,025862	0,62	0,5366	0,056469
GGT	-0,009891	0,017956	-0,55	0,5826	-0,05113
Insulin	0,0363613	0,080987	0,45	0,6541	0,045393
Lymphozyten (absolut)	-0,278186	0,658739	-0,42	0,6734	-0,03884
Systolischer Blutdruck	0,0123428	0,029935	0,41	0,6807	0,052685
Harnsäure	0,023811	0,301876	0,08	0,9372	0,007018

^{a)} $p \leq 0,05$; ^{b)} $0,05 < p \leq 0,10$

4.4.1.2 Determinanten der prozentualen LDLR-Expression auf den T-Lymphozyten

Das gesamte Variablenset erklärte die Variabilität der prozentualen LDLR-Expression auf den T-Zellen zu 9,8 % ($p = 0,0081$). Die Hauptdeterminanten des Modells waren LDL-Cholesterol ($p = 0,0002$), TG ($p = 0,0047$) und der diastolische Blutdruck ($p = 0,0455$). Nicht signifikant trug GOT zur Variabilität der LDLR-Expression auf den T-Lymphozyten bei ($p = 0,0509$) (Tabelle 13).

Tabelle 13 Multiples lineares Regressionsmodell für die Baselinevariabilität der prozentualen LDLR-Expression auf den T-Lymphozyten: nach p-Wert sortierte Parameterschätzer ($R^2_{adj} = 0,097667$; $p = 0,0081$)

Variable	Schätzer	Standardfehler	t-Wert	p-Wert	Std Beta
LDL-Cholesterol	-0,026837	0,007041	-3,81	0,0002 ^{a)}	-0,34607
Triglyzeride	0,0262263	0,009148	2,87	0,0047 ^{a)}	0,339092
Diastolischer Blutdruck	0,0447047	0,022164	2,02	0,0455 ^{a)}	0,160987
GOT	0,0802605	0,040782	1,97	0,0509 ^{b)}	0,180649
Glucose	-0,034704	0,027251	-1,27	0,2048	-0,11161
GGT	-0,013787	0,014057	-0,98	0,3283	-0,08896
Alter	-0,02865	0,034333	-0,83	0,4053	-0,06577
Lymphozyten (%)	0,020904	0,033887	0,62	0,5383	0,05587
Gewicht	0,0112316	0,020335	0,55	0,5816	0,049371
T3	-0,324465	0,598095	-0,54	0,5883	-0,0421
Insulin	0,0341569	0,063477	0,54	0,5913	0,053099
Lymphozyten (absolut)	-0,187981	0,51655	-0,36	0,7164	-0,03337
Harnsäure	0,0669379	0,238788	0,28	0,7796	0,024657
HDL-Cholesterol	0,0036194	0,015684	0,23	0,8178	0,023628

^{a)} $p \leq 0,05$; ^{b)} $0,05 < p \leq 0,10$

4.4.1.3 Determinanten der prozentualen LDLR-Expression auf B- und NK-Zellen

Das gesamte Variablenset lieferte ein tendenziell signifikantes Modell für die Variabilität der prozentualen LDLR-Expression auf den B-Lymphozyten ($r^2_{adj} = 0,052896$; $p = 0,0771$). Die herangezogenen Variablen erklärten die Variabilität der prozentualen LDLR-Expression auf den NK-Zellen nicht ($p = 0,1788$).

4.4.1.4 Determinanten der Variabilität der MFI der LDLR⁺ Lymphozyten

Die Modelle für die Variabilität der MFI der LDLR⁺ T-Zellen, LDLR⁺ B-Zellen und LDLR⁺ NK-Zellen waren nicht signifikant. Somit konnte die Variabilität der MFI für diese Parameter nicht durch die ausgewählten Variablensets erklärt werden.

Die gewählten Modelle sind demnach für die Gesamtlymphozyten und T-Lymphozyten nur marginal (7,7 % bzw. 9,8 %) oder nicht (alle weiteren Parameter) dazu geeignet, die Variabilität der LDLR-Expression zu Beginn der Studie ausreichend zu erklären. Für die Gesamtlymphozyten und T-Lymphozyten erklären die herangezogenen Variablen jedoch auch nur einen sehr geringen Anteil der Variabilität der Expression dieser Parameter zu Beginn der Studie.

4.4.2 Einfluss der Intervention auf die LDLR-Expression der Lymphozyten und Lymphozytensubpopulationen

Die LDLR-Expression wurde auf den Gesamtlymphozyten und den Lymphozytensubpopulationen, den CD3⁺-Lymphozyten (T-Zellen), CD19⁺-Lymphozyten (B-Zellen) und den CD3⁺CD19⁻-Lymphozyten (NK-Zellen), bestimmt.

Der Anteil an LDLR exprimierenden Gesamtlymphozyten blieb nach der Intervention im Vergleich zu den Baselinewerten unverändert ($p = 0,22$). Die Intervention beeinflusste die Expression des LDLR in den unterschiedlichen Lymphozytensubpopulationen ebenfalls nicht (T-Zellen, $p = 0,51$; B-Zellen, $p = 0,73$; NK-Zellen, $p = 0,33$). Die Mittlere Fluoreszenzintensität, als Maß für die Rezeptorexpression auf der Einzelzellebene, blieb ebenfalls unverändert (T-Zellen, $p = 0,11$; B-Zellen, $p = 0,36$; NK-Zellen, $p = 0,23$) (Abbildung 15).

Somit hatte die Isoflavonintervention keinen Einfluss auf die LDLR-Expression auf den Gesamtlymphozyten und Lymphozytensubpopulationen.

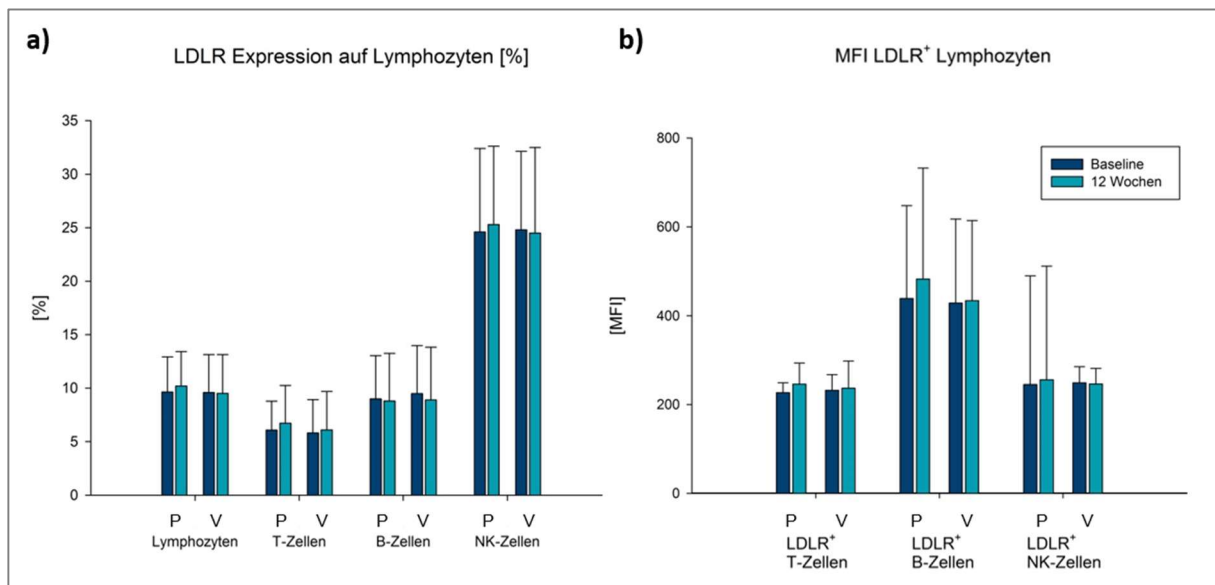


Abbildung 15 Prozentuale Expression des LDLR in Lymphozytensubpopulationen (a) sowie Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der LDLR⁺ Lymphozytensubpopulationen (b) vor und nach 12-wöchiger Intervention mit Isoflavonen (V) oder Placebo (P). Alle Angaben in MW \pm SD.

4.4.3 Einfluss des anfänglichen Körperfettgehaltes auf die Behandlung hinsichtlich der LDLR-Expression der Lymphozyten

4.4.3.1 LDLR-Expression der NK-Zellen

Die prozentuale LDLR-Expression auf den NK-Zellen wurde durch einen Einfluss des anfänglichen Körperfettgehaltes auf die Intervention moduliert (kategoriales Modell $p = 0,03$). Wie sich dieser Effekt auf die Gruppen auswirkte konnte allerdings mittels des entsprechend ausgeführten Post-Hoc-Test nicht gezeigt werden, da hier keine Gruppenunterschiede ausgewiesen wurden. Zudem konnte ein Einfluss des Körperfettgehaltes auf die Intervention durch das kontinuierliche Modell nicht bestätigt werden ($p = 0,253$). Auch die MFI der LDLR⁺ NK-Zellen wurde nicht durch den Körperfettgehalt zu Beginn der Studie beeinflusst.

Die Durchführung der Studie in 2 Perioden hat sich auf die prozentuale LDLR-Expression auf den NK-Zellen ausgewirkt, da nur in der ersten Periode, nicht jedoch in der zweiten Periode, ein Einfluss des Fettgehaltes auf die Expression auftrat (kategoriales Modell $p = 0,0182$).

4.4.3.2 LDLR-Expression der T-Zellen und B-Zellen

Die Intervention wurde bezüglich aller weiteren untersuchten Parameter, also den LDLR⁺ Gesamtlmphozyten (%), LDLR⁺ T-Zellen (% MFI) und LDLR⁺ B-Zellen (% MFI) ebenfalls nicht durch den Körperfettgehalt zum Beginn der Studie beeinflusst. Demnach moduliert der Körperfettgehalt zu Beginn der Studie die Intervention hinsichtlich der LDLR-Expressionen auf den Lymphozyten und Lymphozytensubpopulationen nicht.

4.4.4 Einfluss der Menge an viszeralem Fettgewebe auf die Behandlung

4.4.4.1 LDLR-Expression der B-Zellen

In der ersten Periode kam es hinsichtlich der prozentualen LDLR-Expression auf den B-Zellen zu einem Effekt des viszeralen Fettgehaltes auf die Intervention (kategoriales Modell $p = 0,0275$). Zudem wurde ein tendenzieller Effekt für die MFI der LDLR-Expression auf den B-Zellen festgestellt (kategoriales Modell $p = 0,0911$). In der zweiten Periode beeinflusste der viszerale Fettgehalt zu Beginn der Intervention tendenziell die Intervention hinsichtlich der prozentualen LDLR-Expression auf den B-Zellen ($p = 0,0722$), nicht jedoch hinsichtlich der MFI dieser. Ein tendenzieller Effekt der Ausgangsmenge an viszeralem Fett auf die Intervention bezüglich der prozentualen LDLR-Expression auf den B-Zellen wurde durch das kontinuierliche Modell bestätigt ($p = 0,0644$).

4.4.4.2 LDLR-Expression der NK-Zellen

Ein tendenzieller Einfluss der Menge an viszeralem Fettgewebe auf die Intervention bezüglich der MFI der LDLR⁺ NK-Zellen zeigte sich mittels kategorialer Modellierung ($p = 0,0693$), nicht jedoch mittels kontinuierlicher. Hinsichtlich der prozentualen Rezeptorexpression auf den NK-Zellen hatte die anfängliche Menge an viszeralem Fettgewebe keinen modulierenden Effekt auf die Intervention.

4.4.4.3 LDLR-Expression der T-Zellen

Die LDLR-Expression auf den T-Zellen (% MFI) wurde nicht durch einen Effekt der viszeralen Fettmenge zu Beginn der Studie auf die Intervention moduliert.

4.4.5 Einfluss des Equolbildnerstatus auf die Behandlung

Die Interventionseffekte auf die prozentuale LDLR-Expression auf den Lymphozyten und deren Subpopulationen als auch die MFI der LDLR⁺ Subpopulationen wurde, mit Ausnahme der MFI der LDLR⁺ T-Zellen ($p = 0,01$), nicht durch den Equolbildner Phänotyp beeinflusst. Die MFI der LDLR⁺ T-Zellen stieg in den Equolbildnern während der Intervention an ($p = 0,01$) (Tabelle 14).

Tabelle 14 LDLR-Expression auf Lymphozyten zu Beginn und nach 12-wöchiger Isoflavonintervention in Equolbildnern und Nicht-Equolbildnern

	<u>Equolbildner</u>				<u>Nicht-Equolbildner</u>			
		Baseline	12 Wochen		Baseline	12 Wochen		
LDL-Rezeptor	n		n		n		n	
Lymphozyten (%)	25	9,37 ^{a)} ± 3,28	25	9,71 ± 3,41	59	9,69 ± 3,68	59	9,43 ± 3,73
CD3 ⁺ (T-Zellen) (%)	25	5,46 ± 2,58	25	6,23 ± 3,61	59	5,96 ± 3,34	59	6,09 ± 3,61
CD19 ⁺ (B-Zellen) (%)	25	8,93 ± 3,47	25	9,20 ± 5,57	59	9,72 ± 4,86	59	8,79 ± 4,66
CD3 ⁺ CD19 ⁻ (NK-Zellen) (%)	25	24,6 ± 8,10	25	25,1 ± 7,71	59	24,8 ± 7,07	59	24,2 ± 8,16
MFI CD3 ⁺ (T-Zellen)	25	227 ± 22,4	25	246 ± 47,5 ^{b)}	59	232 ± 35,4	59	237 ± 61,2
MFI CD19 ⁺ (B-Zellen)	25	439 ± 209	25	483 ± 250	59	429 ± 189	59	434 ± 180
MFI CD3 ⁺ CD19 ⁻ (NK-Zellen)	25	245 ± 33,5	25	256 ± 59	59	249 ± 35,9	59	246 ± 35,2

^{a)} MW ± SD (gilt für alle Daten in dieser Tabelle)

^{b)} $p \leq 0,05$

4.4.6 Saisonale Effekte auf die LDLR-Expression

Unabhängig von der Intervention war bei den Gesamtlymphozyten und T-Zellen die Rezeptorexpression in der ersten Periode verstärkt und die Rezeptorexpression in der zweiten Periode vermindert ($p < 0,0001$ für beide Parameter). Auch die MFI der LDLR positiven T-, B- und NK-Zellen stieg interventionsunabhängig jeweils in der ersten Periode über die Studiendauer an und fiel in der zweiten Periode ab (jeweils $p < 0,0001$) (siehe Tabelle A7 im Anhang).

4.5 CD36-Expression auf Monozyten und Lymphozyten

4.5.1 Determinanten der CD36-Expression auf den Monozyten und Lymphozyten

Um Parameter zu identifizieren, die behandlungsunabhängig die Baselinevariabilität der CD36-Expression auf den Monozyten und Lymphozyten beeinflussen, wurde eine multiple lineare Regressionsanalyse durchgeführt.

4.5.1.1 Determinanten der Variabilität der CD36-Expression auf Monozyten

Das ausgewählte Variablenset konnte 11 % der Variabilität der prozentualen CD36-Expression auf den Monozyten erklären ($p \leq 0,01$) (Tabelle 15). Innerhalb dieses Modells trugen die Variablen Monozyten ($p < 0,01$), Harnsäure ($p = 0,05$) und prozentualer Körperfettgehalt ($p = 0,05$) signifikant zur Variabilität der CD36-Expression vor der Intervention bei. Insulin trug nicht signifikant zur Variabilität des Modells bei ($p = 0,06$). Das entsprechende Modell für die Variabilität der MFI der CD36⁺ Monozyten zeigte keine Signifikanz ($p = 0,15$).

Tabelle 15 Multiples lineares Regressionsmodell für die Baseline Variabilität der CD36 Rezeptorexpression auf Monozyten: nach p-Wert sortierte Parameterschätzer ($R^2_{\text{adj}} = 0,109828$; $p = 0,0062$)

Variable	Schätzer	Standardfehler	t-Wert	p-Wert	Std Beta
Monozyten (%)	0,3986714	0,126934	3,14	0,0020 ^{a)}	0,306575
Harnsäure	-0,498571	0,246625	-2,02	0,0451 ^{a)}	-0,18539
Körperfettgehalt (%)	-0,1089	0,054955	-1,98	0,0494 ^{a)}	-0,27351
Insulin	0,1207843	0,064344	1,88	0,0625	0,188954
Glucose	-0,043701	0,026543	-1,65	0,1018	-0,14236
LDL-Cholesterol	-0,007114	0,006694	-1,06	0,2896	-0,09319
Körpergewicht	0,0311058	0,029999	1,04	0,3015	0,137711
Systolischer Blutdruck	0,0242516	0,023557	1,03	0,3050	0,135633
Diastolischer Blutdruck	-0,026443	0,032164	-0,82	0,4124	-0,10049
Alter	-0,021005	0,03825	-0,55	0,5837	-0,04908
GOT	0,0215694	0,041719	0,52	0,6059	0,049364
Monozyten (abs.)	-0,866258	1,830965	-0,47	0,6368	-0,04453
Triglyzeride	0,0028235	0,006252	0,45	0,6522	0,047873
VAT	0,0002396	0,000673	0,36	0,7222	0,053248
HDL-Cholesterol	-0,004523	0,014973	-0,30	0,7630	-0,02995
GGT	0,0022458	0,013996	0,16	0,8727	0,014754

^{a)} $p \leq 0,05$

4.5.1.2 Determinanten der Variabilität der prozentualen CD36-Expression auf Lymphozyten

Das gesamte Variablenset erklärte die Variabilität der CD36-Expression auf Lymphozyten zu 8,6 % ($p = 0,02$) (Tabelle 16). Zu den Hauptdeterminanten zählten LDL-Cholesterol ($p = 0,01$) und Alter ($p = 0,04$). Weitere Determinanten waren Körpergewicht ($p = 0,06$), Insulin ($p = 0,08$) und systolischer Blutdruck ($p = 0,09$), deren Beitrag zum Modell aber nicht signifikant war.

Tabelle 16 Multiples lineares Regressionsmodell für die Baseline Variabilität der CD36 Rezeptorexpression auf Lymphozyten: nach p-Wert sortierte Parameterschätzer ($R^2_{\text{adj}} = 0,0857$; $p = 0,0237$)

Variable	Schätzer	Standardfehler	t-Wert	p-Wert	Std Beta
LDL-Cholesterol	0,0179503	0,006973	2,57	0,0111 ^{a)}	0,234175
Alter	-0,081818	0,038709	-2,11	0,0363 ^{a)}	-0,19394
Gewicht	-0,057483	0,030651	-1,88	0,0628	-0,25505
Insulin	0,119162	0,06647	1,79	0,0752	0,188737
Systolischer Blutdruck	0,0406712	0,024028	1,69	0,0927	0,226042
Monozyten (abs.)	2,446854	1,880982	1,30	0,1955	0,124469
Glucose	-0,035476	0,02729	-1,30	0,1957	-0,11493
VAT	0,0008647	0,000678	1,28	0,2040	0,192648
HDL-Cholesterol	0,0138085	0,015517	0,89	0,3750	0,0905
Harnsäure	-0,212753	0,249114	-0,85	0,3945	0,08067
GOT	-0,033903	0,04235	-0,80	0,4248	-0,07885
Triglyzeride	-0,004557	0,006349	-0,72	0,4741	-0,07745
Körperfettgehalt (%)	-0,030731	0,05504	-0,56	0,5775	-0,07838
Diastolischer Blutdruck	-0,015181	0,032767	-0,46	0,6439	-0,05706
Monozyten (%)	0,0550923	0,129238	0,43	0,6706	0,042478
GGT	0,0034964	0,014434	0,24	0,8090	0,023171

^{a)} $p \leq 0,05$

Da die ausgewählten Parameter nur 11 % der Variabilität der Expression auf den Monozyten und nur 8,6 % auf den Lymphozyten erklären, scheinen die gewählten Parametersets nicht dazu geeignet zu sein, die Variabilität der CD36-Expression zu Beginn der Studie ausreichend zu erklären.

4.5.2 Einfluss der Intervention auf die CD36-Expression der Monozyten und Lymphozyten

Sowohl die relative Expression des CD36 Rezeptors auf den Monozyten als auch die MFI der CD36⁺ Monozyten wurde durch die Intervention nicht beeinflusst. Für alle untersuchten Parameter zeigten sich keine Unterschiede zwischen der Placebo- und Verumgruppe und auch nicht innerhalb der jeweiligen Gruppe über den Interventionszeitraum (jeweils $p = 0,95$). Die CD36-Expression der Lymphozyten stieg in der Placebogruppe nicht signifikant von $6,90 \pm 2,91$ % auf $8,2 \pm 3,3$ % an ($p = 0,07$).

4.5.3 Einfluss des anfänglichen Körperfettgehaltes auf die Behandlung

Der anfängliche Körperfettgehalt hatte keinen Einfluss auf die Intervention in Hinblick auf die CD36-Expression der Monozyten und Lymphozyten (% MFI).

4.5.4 Einfluss der anfänglichen Menge an viszeralem Fettgewebe auf die Behandlung

Ein modulierender Effekt des viszeralen Fettgehaltes auf die Intervention trat hinsichtlich der CD36-Expression auf den Monozyten (% MFI) ebenfalls nicht auf.

4.5.5 Equolbildner Phänotyp

Der Equolbildner Phänotyp hatte für alle untersuchten Parameter hinsichtlich der CD36-Expression keinen Einfluss auf die Isoflavoneffekte. Zwischen den beiden Gruppen zeigten sich ebenso keine Unterschiede wie innerhalb der jeweiligen Gruppe über den Interventionszeitraum (Abbildung 16).

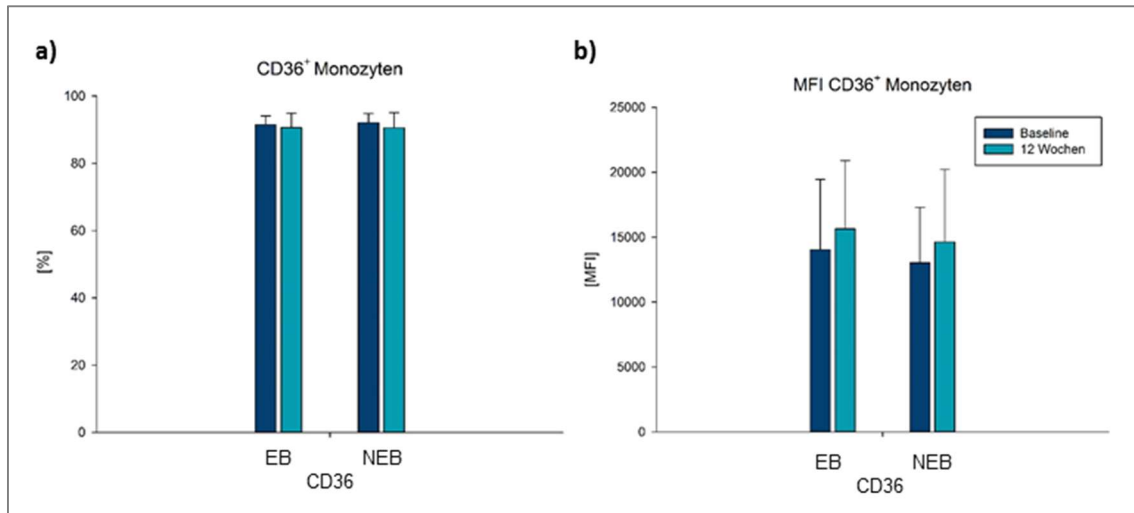


Abbildung 16 Prozentuale Expression des CD36 Rezeptors auf Monozyten (a) sowie Mittlere Fluoreszenzintensität der CD36⁺ Monozyten (b) vor und nach 12-wöchiger Intervention mit Isoflavonen in Equolbildnern (EB) und Nicht-Equolbildnern (NEB). Alle Angaben in MW ± SD.

4.5.6 Saisonale Effekte auf die CD36-Expression

Interventionsunabhängige saisonale Effekte traten für die relative CD36-Expression auf Monozyten auf. Hierbei kam es zu einer gesteigerten Expression in der ersten Periode und einer verminderten Expression in der zweiten Periode ($p < 0,01$) (Tabelle A7 im Anhang).

4.6 Körperfettgehalt und Körperzusammensetzung

Da für Soja und Isoflavone anti-adipogene Wirkungen, beispielsweise Effekte auf Gesamtkörperfett, viszerales Bauchfett oder auch das Körpergewicht, die Körperzusammensetzung und Körperfettdepots diskutiert werden, wurde der Einfluss der Intervention auf diese Parameter auch in der vorliegenden Humanstudie untersucht.

4.6.1 Einfluss der Intervention auf den Körperfettgehalt und die Körperzusammensetzung

Die Intervention hatte keinen Einfluss auf das Körpergewicht ($p = 0,3637$), den BMI ($p = 0,3847$), den prozentualen Körperfettanteil ($p = 0,9537$), das viszerale Fettgewebe, das subkutane Bauchfettgewebe ($p = 0,1238$) als auch die androide ($p = 0,1110$) und gynoide ($p = 0,7311$) Region. Auch alle weiteren erhobenen Parameter der Körperzusammensetzung wurden durch die Intervention ebenfalls nicht beeinflusst.

4.6.2 Einfluss des Equolbildner Phänotyps auf den Körperfettgehalt und die Körperzusammensetzung

Zwischen Equolbildenden und Nicht-Equolbildenden Frauen zeigten sich hinsichtlich der Isoflavonintervention keine Unterschiede auf die Parameter der Körperzusammensetzung. Weder in der Gruppe der Equolbildnerinnen, noch in der Gruppe der Nicht-Equolbildnerinnen kam es zu Interventionseffekten (Tabelle 17).

Tabelle 17 Parameter der Körperzusammensetzung in Equol- und Nicht-Equolbildnerinnen der Verumgruppe vor und nach der Isoflavonintervention

	<u>Equolbildner</u>				<u>Nicht-Equolbildner</u>			
		Baseline		12 Wochen		Baseline		12 Wochen
Körperzusammensetzung	n		n		n		n	
Körpergewicht (kg)	26	69,3 ± 9,3 ^{a)}	26	69,1 ± 9,14	59	66,4 ± 11,1	59	66,5 ± 11,4
Viszerales Fettgewebe (g)	26	735 ± 466	26	708 ± 434	59	697 ± 564	59	687 ± 546
Körperfett (%)	26	38,3 ± 5,91	26	38,3 ± 5,78	59	36,3 ± 6,82	59	36,1 ± 6,85

^{a)}MW ± SD (für alle Werte in dieser Tabelle)

4.6.3 Einfluss der Studiendurchführung in zwei Perioden auf den Körperfettgehalt und die Körperzusammensetzung

Die Parameter Gewicht, BMI, Körperfettanteil, Fettmasse, Fettanteil Gewebe, Gewebemasse, gynoide Region und Fettmasseindex wurden interventionsunabhängig durch die Durchführung der Studie in zwei Perioden beeinflusst (siehe Tabelle A8 im Anhang).

4.7 Genexpression im subkutanen abdominellen Fettgewebe

4.7.1 Genomweite Genexpression

Zur ungerichteten Untersuchung des Einflusses der Isoflavonintervention auf die genomweite Genexpression im subkutanen abdominellen Fettgewebe wurde eine differentielle Expressionsanalyse durchgeführt. Unter Berücksichtigung der Adjustierung für multiples Testen, mit einer FDR von 0,05, finden sich keine differentiell exprimierte Gene zwischen den Proben der Frauen aus der Verum im Vergleich zur Placebogruppe.

4.7.1.1 Sensitivitätsanalyse

Bei der Annahme eines Variationskoeffizienten von 0,5 und einer Power von 0,8 wäre ein fold-change von 1,93 zwischen den Gruppen detektierbar gewesen. Unter der Annahme eines pessimistischeren Variationskoeffizienten von 0,74 wäre ein fold-change von 2,5 zwischen den Gruppen detektierbar gewesen. Um einen fold-change von 1 zwischen den Gruppen aufdecken zu können, hätte die Stichprobe aus jeweils 99,8 Probandinnen und damit 100 Probandinnen in der Isoflavongruppe und 100 Probandinnen in der Placebogruppe bestehen müssen.

4.7.1.2 Differentiell exprimierte Gene zwischen den Gruppen (ohne FDR-Korrektur)

Um potentiell interessante Kandidatengene zu identifizieren, wurde dennoch eine weitere Auswertung der Genexpressionsdaten durchgeführt. Somit sind bei Nichtberücksichtigung der FDR 140 Gene nach der Isoflavonintervention im Vergleich zur Placebointervention signifikant unterschiedlich exprimiert. Von diesen sind 88 Gene in der Isoflavongruppe induziert und 52 Gene reprimiert exprimiert. Sechs Gene wiesen eine mindestens 2-fache Veränderung auf: LANCL3, TRIM55, PTCHD3, HPR, TDGF1 und KCTD8. Das am stärksten herunterregulierte Gen war HPR, welches 2,4-fach herunterreguliert war (Diff of Condition = 1,24). Mit einer 2,2-fachen Hochregulation war TDGF1 das am stärksten hochregulierte Gen (Diff of Condition = -1,12) (Abbildung 17).

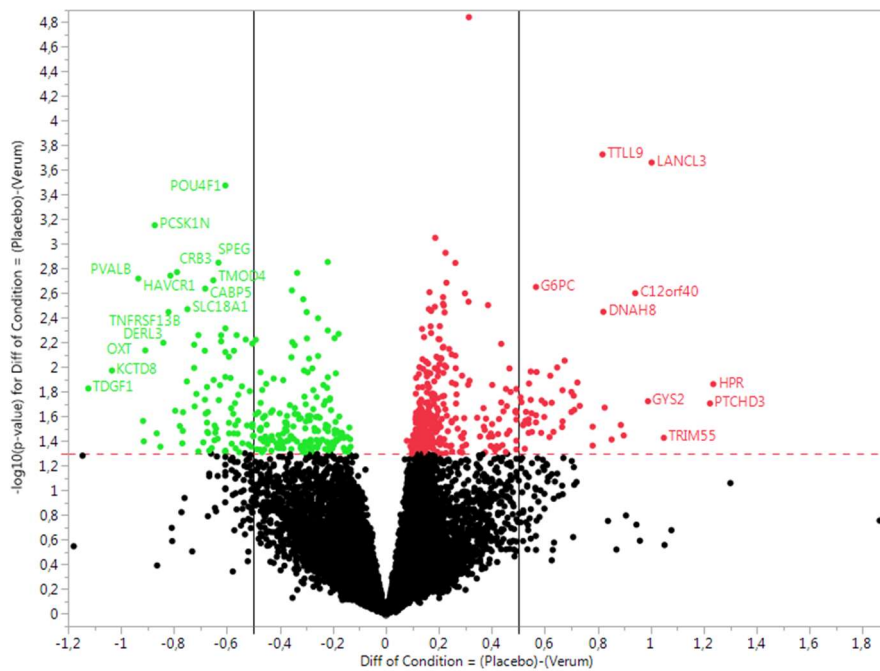


Abbildung 17 Ergebnisse der differentiellen Genexpressionsanalyse dargestellt als Volcano Plot, bei dem der \log_2 fold-change (x-Achse) der untersuchten Gene gegen die Signifikanz (y-Achse) aufgetragen ist. Die grün (induziert) und rot (reprimiert) eingefärbten Gene liegen über dem Signifikanzniveau von $p = 0,05$ (gestrichelte horizontale Linie). Gene, die in der Verumgruppe im Vergleich zur Placebogruppe mindestens 1,4-fach hoch- bzw. runterreguliert waren, liegen links bzw. rechts der senkrechten schwarzen Linien (Differenz zwischen der Verum und Placebogruppe von mindestens 0,5 bzw. -0,5). Zu berücksichtigen ist, dass bei der dieser Abbildung zugrunde liegenden Auswertung nicht für multiples Testen adjustiert wurde.

4.7.1.3 Funktionelle Kategorisierung und Anreicherungsanalyse

Um die differentiell exprimierten Gene funktionell zu kategorisieren, wurde sowohl für das Set der reprimierten als auch für das Set der induzierten Gene eine GO-Anreicherungsanalyse durchgeführt.

Reprimierte Gene

Entsprechend der GO-Annotation konnten 51 der 52 reprimiert exprimierten Gene kategorisiert werden. Aus Abbildung 18 wird der prozentuale Anteil an Genen in den entsprechenden Prozessen für die jeweilige GO-Kategorie ersichtlich. Die meisten Gene in der Kategorie „Biologischer Prozess“ waren an metabolischen Prozessen (38,5 %), multizellulären organismischen Prozessen (36,5 %) oder der biologischen Regulation beteiligt (36,5 %). In der Kategorie „Molekulare Funktion“ waren 48,1 % der Gene an Prozessen der Ionen-Bindung involviert und in der Kategorie „Zelluläre Komponente“ waren 42,3 % der Gene dem Kompartiment Membran zugeordnet.

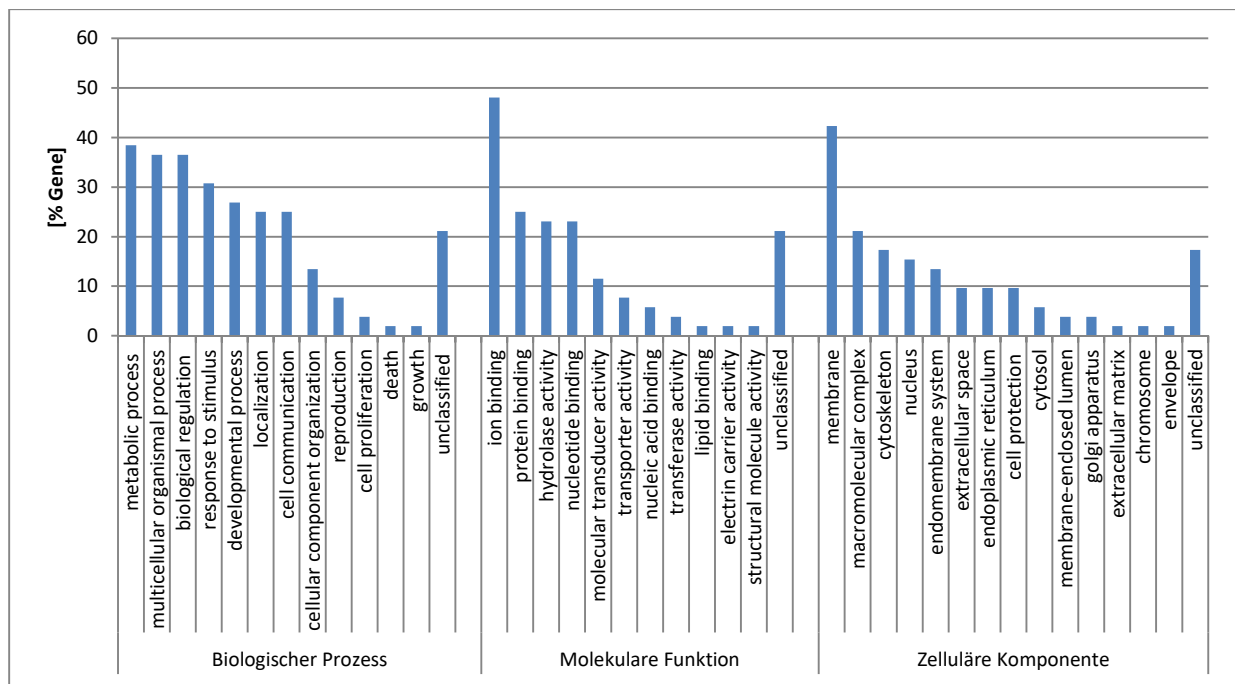


Abbildung 18 Funktionelle Kategorisierung der reprimierten Gene entsprechend der GO-Annotation. Gene können in mehreren Kategorien gleichzeitig vertreten sein. 51 von 52 Genen konnten einer Kategorie zugeordnet werden.

Induzierte Gene

Von den 88 induzierten Genen konnten 85 entsprechend ihrer GO-Annotation einer Kategorie zugeordnet werden. Die meisten Gene (40,9 %) waren innerhalb der Kategorie „Biologischer Prozess“ an der biologischen Regulation beteiligt, 39,7 % an metabolischen Prozessen. Ionenbindung (28,4 %) und Proteinbindung (27,3 %) waren in der Kategorie „Molekulare Funktion“ die Funktionen, denen die meisten Gene zugeordnet werden konnten. Wie auch bei den reprimierten Genen wurden die meisten Gene in der Kategorie „Zelluläre Komponente“ dem Kompartiment Membran zugeordnet (38,6 %) (Abbildung 19).

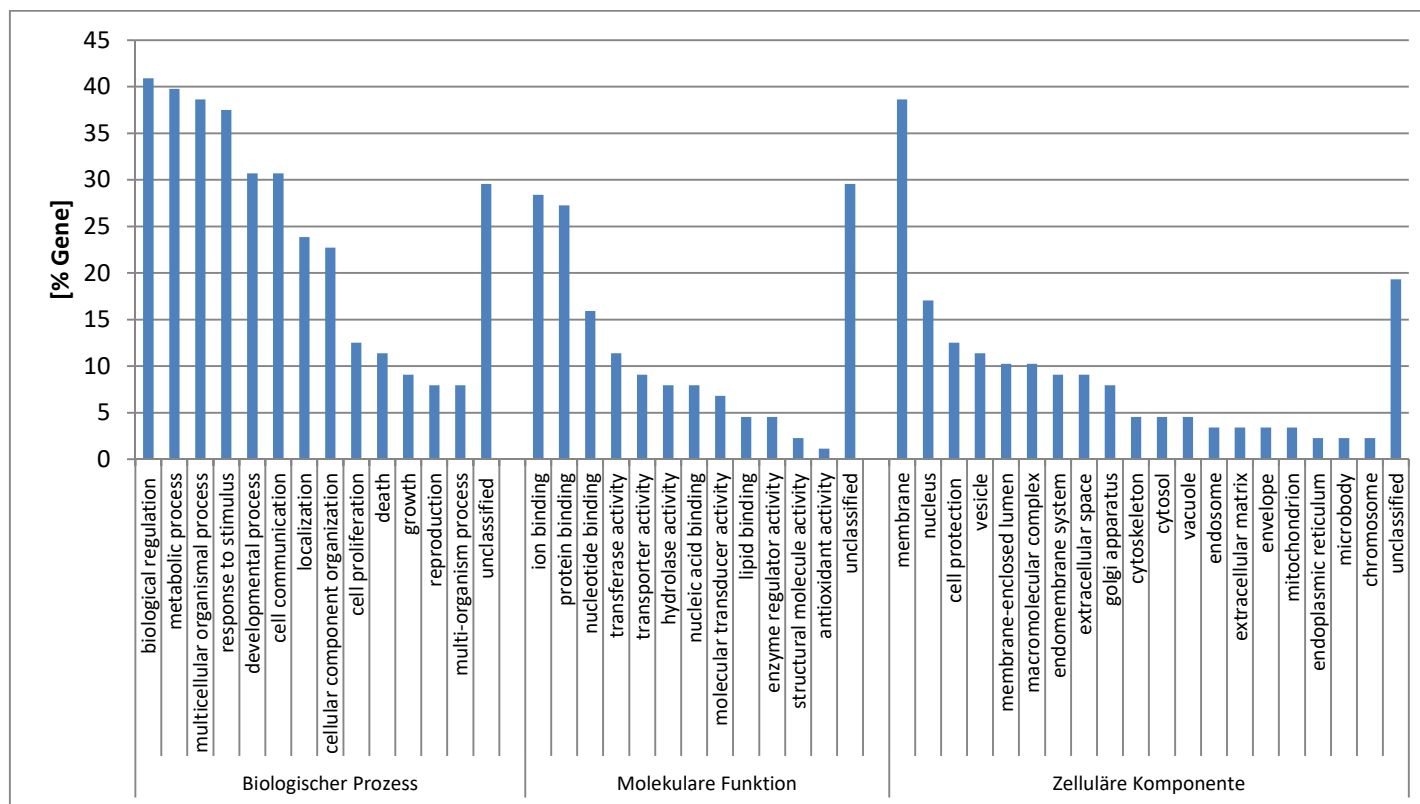


Abbildung 19 Funktionelle Kategorisierung der induzierten Gene entsprechend der GO-Annotation. Gene können in mehreren Kategorien gleichzeitig vertreten sein. 85 von 88 Genen konnten einer Kategorie zugeordnet werden.

Reprimierte Gene

Innerhalb der 52 reprimiert exprimierten Gene waren in der GO-Kategorie „Biologischer Prozess“ die drei Prozesse „unsaturated fatty acid biosynthetic process“ (GO:0006636), „alpha-linolenic acid metabolic process“ (GO:0036109) und „linoleic acid metabolic process“ (GO:0036109) signifikant überrepräsentiert (jeweils $p = 0,0452$). Die Gene FADS1 und FADS2 lagen dieser Überrepräsentation zugrunde. In der GO-Kategorie „Molekulare Funktion“ waren 19 Prozesse signifikant überrepräsentiert. Diese sind der Tabelle A9 im Anhang zu entnehmen. Die beiden am stärksten überrepräsentierten Prozesse waren GO:0016717 (Oxidoreduktase Aktivität), mit den Genen FADS1 und FADS2 sowie der Prozess GO:0030492 (Hämoglobin Bindung) mit den Genen Haptoglobin (HP) und Haptoglobin-related protein (HPR) (jeweils $p = 0,0085$). In der GO-Kategorie „Zelluläre Komponente“ war der Prozess „axonemal dynein complex“ (GO:0005858) signifikant durch folgende reprimierte Gene überrepräsentiert: DNAH7 und DNAH8.

Die Gene FADS1 und FADS2 codieren für Enzyme, die langkettige Fettsäuren desaturieren und damit an der Synthese von ungesättigten, langkettigen Fettsäuren beteiligt sind (Zhang et al., 2016). Für E2 und Isoflavone sind in der Literatur schon Effekte sowohl auf FADS1 als auch auf FADS2 beschrieben (Lundholm et al., 2008, Rice et al., 2007). Ein Zusammenhang zwischen Isoflavonen und der Genexpression der Gene HP und HPR sowie DNAH7 und DNAH8 findet sich bisher in der Literatur nicht.

Induzierte Gene

Die Anreicherungsanalyse ergab für die 88 induzierten Gene ausschließlich eine signifikante Anreicherung in der Kategorie „Molekulare Funktion“. Diese Anreicherung belief sich auf den Prozess „NAD(P)H oxidase activity“ (GO:0016174) durch die Gene DUOX2 und KMO ($p = 0,0220$). Weder auf DUOX2 noch auf KMO sind bisher Effekte, weder durch E2 noch Isoflavone beschrieben.

Estrogen-responsive Gene

Da Isoflavone aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit estrogene Aktivität aufweisen, wurde untersucht, ob Estrogen-responsive Gene durch die Isoflavonintervention verändert exprimiert werden. Der Abgleich der differentiell exprimierten Gene mit 1067 Estrogen-responsiven Genen aus der Dragon Estrogen Responsive Genes Database (ERGDB)-Datenbank (Tang et al., 2004) zeigte drei differentiell exprimierte Estrogen-responsive Gene. Die beiden induzierten Gene ART3 und POU4F1 sowie das reprimierte Gen CRP sind demnach Estrogen-responsiv. Für zirkulierendes CRP im Blut ist bereits beschrieben, dass Isoflavone dessen Konzentration verringern kann (Dong et al., 2011; Filiberto et al., 2013). Der Transkriptionsfaktor POU4F1 kann mit dem Estrogenrezeptor interagieren und nachfolgend dessen Bindung an das Estrogen regulatorische Element in der regulatorischen Region entsprechender Gene regulieren (Budhram-Mahadeo et al., 1998).

PPAR γ -regulierte Gene

Der nukleäre Hormonrezeptor PPAR γ dient u. a. als Transkriptionsfaktor für CD36 sowie andere mit dem Lipidmetabolismus assoziierte Gene (Schoonjans et al., 1996; Silverstein et al., 2010; Tontonoz et al., 1998). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob PPAR γ -regulierte Gene durch die Isoflavonintervention verändert exprimiert wurden. Unter den im Fettgewebe differentiell exprimierten Genen fand sich mit FADS2 nur ein PPAR γ -reguliertes Gen, welches durch die Intervention herunterreguliert war. Die durch FADS2 kodierte Desaturase FADS2 ist, wie bereits beschrieben, an der Lipogenese beteiligt (der PPAR γ -Signalweg in Adipozyten ist Abbildung A1 im Anhang zu entnehmen).

4.7.2 Genexpression ausgewählter Gene des Fettstoffwechsels und des Estrogenmetabolismus

Mittels RT-PCR wurde die Expression von zwei Genen des Fettstoffwechsels sowie drei Genen des Estrogenmetabolismus untersucht. Isoflavonwirkungen auf den LDLR und CD36 Rezeptor sind in der Literatur beschrieben. Daher sollte auch untersucht werden, ob die Isoflavonintervention die Expression dieser Rezeptoren des Fettstoffwechsels im Fettgewebe beeinflusst. ESR1 und ESR2 wurden als Zielgene ausgewählt, da über sie Estrogenwirkungen vermittelt werden und aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Isoflavone mit Östrogenen Auswirkungen der Isoflavone auf die Rezeptorexpression denkbar sind. Die Auswahl des Aromatasegens CYP19A1 erfolgte, da die Aromatase im Fettgewebe in postmenopausalen Frauen den Hauptort der Estrogensynthese darstellt und darüber hinaus beschrieben ist, dass Phytoestrogene die Expression des Gens beeinflussen können.

Die relativen Expressionen der Gene des Fettstoffwechsels (LDLR, CD36), normalisiert auf das Housekeepinggen HPRT, waren zwischen der Verum- und der Placebogruppe nicht unterschiedlich (Abbildung 20). Hinsichtlich der Gene des Estrogenmetabolismus gab es einen signifikanten Unterschied zwischen der Expression des ESR1 in der Verumgruppe und der Placebogruppe ($p = 0,048$). ESR1 war in der Verumgruppe 1,7-fach geringer exprimiert als in der Placebogruppe (Abbildung 21). ESR2 und CYP19A1 waren zwischen den Gruppen nicht unterschiedlich exprimiert (Abbildung 20).

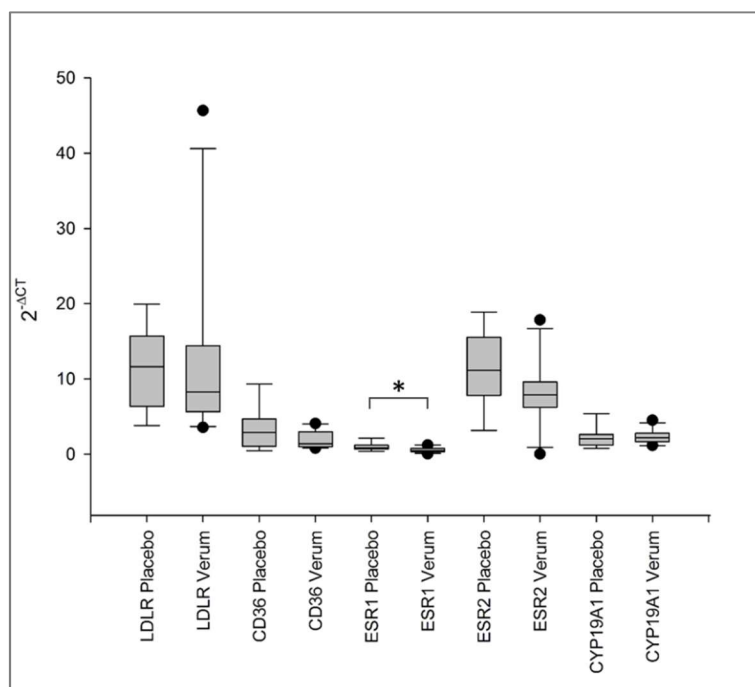


Abbildung 20 Quantitative RT-PCR ausgewählter Gene des Fettstoffwechsels und des Estrogenmetabolismus. Die Expression des jeweiligen Zielgenes wurde mit der des Housekeepinggens HPRT normalisiert ($2^{-\Delta CT}$). Die Mittelwertsvergleiche erfolgten bei Normalverteilung mittels Student's T-Test und bei nicht-normalverteilten Daten anhand des Mann-Whitney U-Test. * = $p \leq 0,05$; Placebo: n = 9; Verum n = 11).

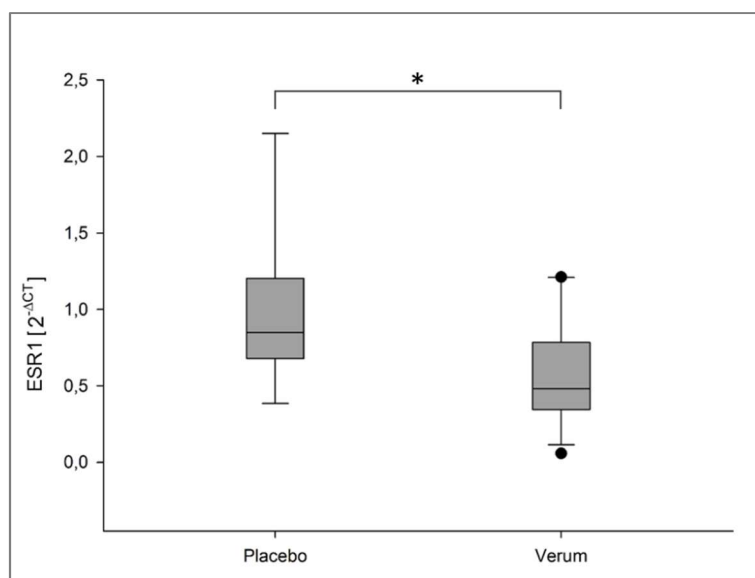


Abbildung 21 Expression des ESR1 ($2^{-\Delta CT}$) (normalisiert auf das Housekeepinggen HPRT) in der Verum- und Placebogruppe. Der Mittelwertsvergleich erfolgte mittels Student's T-Test. (* = $p \leq 0,05$; Placebo: n = 9; Verum n = 11).

4.8 Isoflavone im Fettgewebe

Aufgrund eines defekten UHPLC-MS/MS konnten nicht alle 23 Biopsieproben auf ihren Isoflavongehalt hin analysiert werden. Für vier vorab in einem Probelauf analysierte Proben (2 Verum/2 Placebo) wurde jedoch eine solche Analytik durchgeführt. In den beiden Proben der isoflavonsupplementierten Frauen fanden sich $60,3 \pm 12,0$ pmol Isoflavone (Summe von Daidzein, Genistein und deren entsprechenden Aglykonäquivalenten) pro Gramm Fettgewebe. In den Proben der Frauen, die Placebo zu sich nahmen fanden sich $1,00 \pm 0,0$ pmol/g Fettgewebe.

5 Diskussion

5.1 Studiendesign

Die Studie wurde randomisiert, placebo-kontrolliert und doppelblind durchgeführt. Dieses Studiendesign gewährleistet eine zufällige Verteilung der Probandinnen auf die beiden Interventionsgruppen, Placebo- oder Isoflavonintervention. Randomisierte, kontrollierte Studien stellen u. a. den Goldstandard in der klinischen Forschung hinsichtlich neuer Therapien dar (Kabisch et al., 2011). Die Probandinnen waren durchweg postmenopausal, die jeweils letzte Menstruationsblutung fand mindestens ein Jahr vor Studienbeginn statt. Zudem erfolgte die Überprüfung des Menopausestatus anhand der Konzentration des FSH (Su et Freeman, 2009).

Als Interventionsprodukt kam der Sojaisoflavonextrakt NovaSoy650[®] der Firma ADM zur Anwendung. Hierbei handelt es sich um einen Extrakt, der auch in zahlreichen freiverkäuflichen Isoflavonpräparaten enthalten ist. Demnach stellt dieser ein gutes Abbild eines Nahrungsergänzungsmittels auf Sojaisoflavonbasis dar, wie es von Frauen in den Wechseljahren durchaus als Alternative zur Hormonersatztherapie konsumiert und in diesem Zusammenhang auch von zahlreichen Herstellern beworben wird. Somit gewährleistet der Einsatz dieses Extraktes eine hohe Praxisrelevanz hinsichtlich der Untersuchung der Rolle der Isoflavone im Fettstoffwechsel postmenopausaler Frauen. Neben dieser hohen Praxisrelevanz bietet die Zufuhr eines Isoflavonextraktes in Kapselform zudem Vorteile als Interventionsprodukt im Vergleich zum Einsatz von Sojalebensmitteln. Diese Vorteile liegen u. a. in der einfachen Aufnahme der Isoflavone für die Probandinnen. Zudem ist die Gabe eines Placebopräparates in identischer Form so leicht zu handhaben. Die Aufnahme von zwei Kapseln pro Tag ist relativ unproblematisch und stellt verhältnismäßig gesehen keinen zu großen Aufwand für die Probandinnen dar, wie es möglicherweise bei einer 12-wöchigen Ernährung mit Sojaprodukten der Fall gewesen wäre. Zudem wird empfohlen, zur Erzielung optimaler klinischer Effekte, Sojaprodukte oder Supplemente auf mehrere Mahlzeiten bzw. Verabreichungen pro Tag aufzuteilen, um eine gleichbleibend hohe Serumkonzentrationen zu gewährleisten (Cassidy, 2005). Um eine mit den in der zugrundeliegenden Studie eingesetzten 117,4 mg IF/d vergleichbare Menge an Isoflavonen über Sojalebensmittel aufzunehmen, hätten beispielsweise pro Tag ca. 1,1 L Sojamilch (Nutrient data bank (NDB) Nummer 99572) oder 370 g gekochter Tofu (NDB Nummer 99529) (Bhagwat et al., 2008) konsumiert werden müssen. Dies hätte einen deutlich höheren Aufwand, sowohl für die Probandinnen, als auch für die Studiendurchführenden, bedeutet, da die Bereitstellung der Produkte, als auch eine vergleichbare Zubereitung dieser, gewährleistet hätte werden müssen.

Ein weiterer Grund für die Gabe eines Sojaisoflavonextraktes war, dass es sich bei der Studie um ein am MRI durchgeführtes Teilprojekt des Projektes „Isoflavones: A cross-species comparison on metabolism, estrogen sensitivity, epigenetics, and carcinogenesis“ (DFG-Fördernummer KU1079/9-

1) handelte. Alle innerhalb dieses Projektes durchgeführten Tier- und Humanstudien wurden mit demselben Sojaisoflavonextrakt durchgeführt, der vorab für das gesamte Projekt gekauft wurde.

Anhand der Ergebnisse einer Literaturrecherche wurde die eingesetzte Dosis an Isoflavonen pro Tag auf 100 mg festgelegt (Badeau et al., 2007; Nikander et al., 2004; Steinberg et al., 2011; Ye et al., 2012b). Hierbei war das Ziel, möglichst eine maximal hohe, zu Effekten führende Dosierung einzusetzen, bei keinem bzw. minimalem Risiko für nachteilige Effekte. Nach der Herstellung der Kapseln durch einen kommerziellen Anbieter wurde der Isoflavongehalt in den Kapseln MRI-intern quantifiziert. Herstellungsbedingt nahmen die Frauen letztendlich 117,4 mg Sojaisoflavone pro Tag auf. Eine Isoflavonmenge von 117,4 mg/d über Lebensmittel zu erreichen, wie zuvor exemplarisch anhand von Sojamilch oder gekochtem Tofu gezeigt, ist durchaus durch eine geeignete Auswahl sojahaltiger Lebensmittel möglich. Asiatische Frauen nehmen, wie eingangs dieser Arbeit erwähnt, durchschnittlich bis zu 40 mg/d Isoflavone (als Aglykone) über ihre traditionelle Ernährung zu sich, wohingegen Frauen in westlichen Ländern über ihre Ernährung weniger als 2 mg/d IF aufnehmen (siehe Kapitel 1.3.1). Demnach sind 117,4 mg/d als relativ hohe Zufuhr anzusehen. In anderen Studien, die Effekte von isolierten Isoflavonen auf Parameter des Fettstoffwechsels postmenopausaler Frauen untersuchten, wurden Dosierungen zwischen 61-126 mg IF/d eingesetzt (Kim et al., 2013; Nikander et al., 2004; Steinberg et al., 2011; Uesugi et al., 2002; Ye et al., 2012b). Neben der Dosis kann auch die Dauer der Intervention einen Einfluss auf potentielle, auch negative, Effekte durch Isoflavonsupplemente haben. In der vorliegenden Studie wurde ein Zeitraum von 3 Monaten gewählt, welcher sich gut mit Interventionszeiträumen deckt, die ähnliche Zielparameter untersuchten und Interventionszeiträume zwischen einem Monat bis zu 2 Jahren hatten (Kim et al., 2013; Nikander et al., 2004; Steinberg et al., 2011; Uesugi et al., 2002; Ye et al., 2012b). Die Ergebnisse zahlreicher Studien mit isoflavonhaltigen Lebensmitteln oder Supplementen mit Isoflavonexpositionen zwischen 3 und 131 mg Isoflavonaglykonäquivalente/d und Darreichungszeiträumen zwischen einem und 6 Monaten wiesen nicht auf negative Effekte durch die Intervention hin (Cassidy, 2005). Aktuell hat sich auch das zuständige Gremium der EFSA mit der Bewertung einer als sicher anzusehenden Zufuhr von isoliert in Nahrungsergänzungsmitteln verabreichten Isoflavonen auseinandergesetzt und schlussfolgert, dass der Orientierungswert für eine als hinreichend sicher anzunehmende Verwendung für Frauen nach der Menopause einer Dosierung von 100 mg/d Sojaisoflavonen bei einer Zufuhr von bis zu 10 Monaten entspricht. Allerdings ist hierbei zu berücksichtigen, dass dieser Orientierungswert für gesunde peri- und postmenopausale Frauen anzusehen ist und dass aufgrund einer unsicheren Datenlage von einer Zufuhr durch Frauen mit zurückliegender oder akut bestehender estrogenabhängiger Erkrankung, bspw. Brustkrebs, abzuraten ist (EFSA ANS Panel, 2015). Dieser Einschätzung schließt sich auch das BfR in seiner Mitteilung aus dem Jahr 2015 an (BfR, 2015). Demnach scheint die Kombination aus gewählter Dosierung und Dauer in der zugrundeliegenden Studie aus Aspekten der Sicherheit sinnvoll gewählt. Zudem wurden vor dem Hintergrund potentieller negativer goitrogener Auswirkungen der Isoflavone auch die Schilddrüsenparameter T3, T4 und

TSHB untersucht, auf welche die Intervention keinen Einfluss hatte (siehe Kapitel 4.2). Folglich bestehen keine Sicherheitsbedenken bezüglich der Zufuhr von 117,4 mg/d Sojaisoflavonen über einen Zeitraum von 3 Monaten.

Die Compliance der Probandinnen war mit 98 % sehr hoch, was darauf schließen lässt, dass diese ein hohes Maß an Motivation mit in die Studie einbrachten und die Aufnahme der Präparate als gesichert angesehen werden kann. Das zahlreiche Nicht-Auftreten von Effekten ist somit nicht auf eine unzureichende Compliance der Teilnehmerinnen zurückzuführen.

Die Ernährung der Frauen wurde während der Studie weder kontrolliert noch mittels Ernährungsfragebögen erfasst, die Frauen waren aber dazu angewiesen während des Studienzeitraums keine soja- und isoflavonhaltigen Produkte zu konsumieren. Dazu wurde ihnen zu Studienbeginn eine Liste mit Sojaprodukten und anderen potentiell isoflavonhaltigen Produkten ausgehändigt. Dies diente dazu, die tägliche Dosierung der Isoflavone mit 117,4 mg/d nicht zu überschreiten und potentielle synergistische Effekte zwischen den als Intervention eingesetzten Isoflavonen und Sojaprotein aus konsumierten Sojaprodukten zu vermeiden.

Die Durchführung der Studie erfolgte aus Kapazitätsgründen in zwei unterschiedlichen Perioden von Oktober bis Januar bzw. von Februar bis Mai. Dadurch erschien es möglich, dass nur durch die Einteilung einer Probandin in eine bestimmte Periode schon Effekte auf Zielparameter auftreten könnten, beispielsweise in Abhängigkeit von der Jahreszeit. Solche, als saisonale Effekte bezeichneten Veränderungen treten unabhängig von der eigentlichen Intervention auf. Dies wurde bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse mitberücksichtigt, indem auf interventionsunabhängige Effekte durch die Einteilung in zwei Perioden hin untersucht wurde.

5.2 Einfluss der Isoflavonintervention auf Fettstoffwechselfparameter

5.2.1 Serumlipide

Nach der 12-wöchigen Supplementation mit Sojaisoflavonextrakt kam es in den Frauen der Verumgruppe verglichen mit denen in der Placebogruppe zu einer Erhöhung der Serum LDL-Cholesterolkonzentrationen um 5 mg/dL (ca. 3,4 %). Dieser Anstieg ist zwar moderat, kann allerdings von pathophysiologischer Relevanz sein, da eine Reduktion der Serum Cholesterolkonzentrationen um 10 % zu einer 30-40 %-igen Risikoreduktion für kardiovaskuläre Krankheiten in Frauen und Männern zwischen 50 und 60 Jahren führt (Law et al., 1994). Da beschrieben ist, dass Isoflavoneffekte in hypercholesterolämischen Frauen stärker ausgeprägt sein können (Nikander et al., 2004; Qin et al., 2013; Taku et al., 2007; Zhan et Ho, 2005), wurde dies in Frauen mit erhöhten LDL-Cholesterolkonzentrationen (>160 mg/dL) und Frauen mit Ausgangskonzentrationen unter 160 mg/dL (<160 mg/dL) untersucht. Hierbei konnte kein Unterschied zwischen Frauen mit erhöhten Ausgangskonzentrationen an LDL-Cholesterol und Frauen mit Ausgangskonzentrationen unter

160 mg/dL festgestellt werden. Die LDL-Cholesterolkonzentrationen in der Gruppe mit Ausgangswerten unter 160 mg/dL stiegen im Gegensatz zu denen in einer Studie von Nikander et al. nicht an, obwohl die Zusammensetzung des Sojaisoflavonextraktes, die Interventionsdauer als auch die Dosis des zugeführten Extraktes zwischen beiden Studien vergleichbar waren (Nikander et al., 2004). Veränderungen der LDL-Cholesterolkonzentrationen nach isolierter Isoflavongabe wurden auch in einer 4-wöchigen Studie mit postmenopausalen japanischen Frauen festgestellt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie führte die Intervention mit 61,8 mg/d Sojaisoflavonextrakt (Daidzein 53%, Genistein 11%, Glycitein 36%) zu einer Reduktion der LDL-Cholesterolkonzentrationen. Allerdings trat der Effekt nur innerhalb der isoflavonsupplementierten Gruppe über den Zeitraum der Intervention auf, ein Unterschied zur Placebogruppe bestand nicht. Ein solcher Effekt ist auch für die Gesamtcholesterolkonzentrationen beschrieben. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Probandinnen über den Interventionszeitraum von einem Monat weiterhin sojahaltige und damit sojaproteinreiche Lebensmittel verzehren durften, wodurch ein Effekt der Isoflavone erst auftreten bzw. verstärkt werden könnte. Der darüber hinaus zusätzliche Isoflavoneintrag über die aufgenommenen Lebensmittel lag bei ca. 30 mg/d (Uesugi et al., 2002). Mögliche synergistische Effekte zwischen individuellen Flavonoiden hinsichtlich gesundheitlicher Wirkungen können auftreten, wenn ein komplexes Lebensmittel konsumiert wird, welche nicht in Erscheinung treten, wenn die Inhaltsstoffe in isolierter Form aufgenommen werden (Ross et Kasum, 2002). Solche synergistischen Effekte können auch durch die kombinierte Gabe von Sojaprotein und Isoflavonen angenommen werden, da allein für Sojaprotein schon zahlreiche hypocholesterolemische Effekte, bspw. eine erhöhte Gallensäurensynthese oder erhöhte Aktivitäten der Apo B- und E-Rezeptoren gezeigt wurden (Potter, 1995). Demnach könnte die zusätzliche Gabe von Isoflavonen mit ihren entsprechenden Wirkmechanismen hier noch verstärkend auf die Zufuhr von Sojaprotein wirken. Damit können die Ergebnisse von Uesugi et al. nicht als reine Effekte von Isoflavonen auf die Serumlipide angesehen werden, wodurch ein direkter Vergleich mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie nicht möglich ist, da hier Sojaisoflavonextrakt isoliert verabreicht wurde und die Probandinnen keine sojaproteinreichen Lebensmittel verzehren durften (Uesugi et al., 2002).

In weiteren Studien, bei denen die Intervention ebenfalls mit isolierten Isoflavonen erfolgte, konnten keine Isoflavoneffekte auf die LDL-Cholesterolkonzentrationen aufgezeigt werden. Bei diesen lag die Interventionsdauer bei 6 oder 24 Monaten und die Isoflavonextrakte unterschieden sich in Aufnahmemenge (70, 80 oder 120 mg/d) und Zusammensetzung (Aubertin-Leheudre et al., 2008; Steinberg et al., 2011; Ye et al., 2012b). In der vorliegenden Studie blieben die Gesamt- und HDL-Cholesterolkonzentrationen im Gegensatz zu den LDL-Cholesterolkonzentrationen durch die Intervention unverändert. Allerdings stiegen die Triglyzeridkonzentrationen in Frauen, die Isoflavone supplementierten, tendenziell an. Demgegenüber steht eine Reduktion der Triglyzeride nach einer 3-monatigen Zufuhr von isolierten Isoflavonen in einer Studie von Kim et al. mit postmenopausalen koreanischen Frauen (Kim et al., 2013). In dieser führte die Intervention allerdings nicht zu

Veränderungen der LDL-Cholesterolkonzentrationen. Gemeinsam haben beide Studien, dass durch die Intervention keine Effekte auf die Gesamt- und HDL-Cholesterolkonzentrationen bestanden. Die Studien unterschieden sich jedoch hinsichtlich der zugeführten Menge an Gesamtisoflavonen (70 mg/d i.V. zu 117,4 mg/d) und der Zusammensetzung des Isoflavonextraktes, welcher bei Kim et al. besonders durch einen hohen Anteil an Glycitin gekennzeichnet war (Glycitin 54%, Daidzin 18% und Genistin 18%). Glycitein ist in dem Extrakt, der in der vorliegenden Studie verwendet wurde, im Vergleich zu Genistein und Daidzein mit nur 9 % eher unterrepräsentiert. Auch in der rohen Sojabohne liegt der Genisteinanteil mit ca. 15 % in einem ähnlichen Bereich (NDB Nummer 11450) (Bhagwat et al., 2008). Ob der stark höhere Anteil an Glycitin in der Studie von Kim et al. zu der Reduktion der Triglyzeridkonzentrationen führte, kann nicht weiter bestätigt werden, da Studien zur Wirkung von isoliertem Glycitin auf Triglyceride gänzlich fehlen. Weiterhin handelte es sich bei dem Studienkollektiv um koreanische Frauen, die allerdings ihre Isoflavonaufnahme über die Ernährung während der Studie auf weniger als 10 mg/d einschränken mussten (Kim et al., 2013).

Neben den oben näher beschriebenen Studien gibt es zahlreiche weitere Studien, die Effekte isolierter Isoflavone auf die Serumlipide untersuchten. Allerdings wurden in diesen oftmals senkende Effekte auf die Gesamtcholesterol- oder LDL-Cholesterolkonzentrationen und auch Erhöhungen der HDL-Cholesterolkonzentrationen durch Isoflavone postuliert, obwohl es sich bei den Supplementen nicht ausschließlich um Sojaisoflavonextrakt, sondern um mit Isoflavonen angereichertes Sojaprotein handelte (Jenkins et al., 2002; Teede et al., 2001; Wangen et al., 2001). Dass hier mögliche synergistische Effekte zwischen Isoflavonen und Sojaprotein auftreten können, wurde eingangs dieses Kapitels bereits beschrieben. Zwei Metaanalysen führten ebenfalls zu der Annahme, dass ein Kombinationseffekt von Sojaprotein und darin enthaltenen oder gleichzeitig zugeführten Isoflavonen angenommen werden kann (Taku et al., 2007; Zhan et Ho, 2005). Unter Berücksichtigung von elf Studien konnten Taku et al. in der Gruppe, die mit Isoflavonen angereichertes Sojaprotein aufnahm, eine Reduktion der Gesamtcholesterolkonzentrationen um 0,10 mmol/L (3,9 mg/dL) und der LDL-Cholesterolkonzentrationen um 0,13 mmol/L (5,0 mg/dL) im Vergleich zu der Gruppe, die nicht-angereichertes Sojaprotein zu sich nahm, aufzeigen. In die Analyse flossen sowohl Studien mit normocholesterolämischen, leicht hypercholesterolämischen als auch hypercholesterolämischen Probanden mit ein. Wurde getrennt nach Studien mit normocholesterolämischen und hypercholesterolämischen Probanden ausgewertet, zeigten sich keine Verbesserungen der Gesamtcholesterolkonzentrationen. In beiden Subgruppen traten Reduktionen der LDL-Cholesterolkonzentrationen auf. Diese lagen für normocholesterolämische Probanden durchschnittlich bei 0,17 mmol/L (6,6 mg/dL) und für hypercholesterolämische Probanden durchschnittlich bei 0,13 mmol/L (5,0 mg/dL). Resultierend aus diesen Ergebnissen kann angenommen werden, dass die 1-3 monatige Aufnahme von 102 mg Sojaisoflavonextrakt die Gesamt- und LDL-Cholesterolkonzentrationen senken kann, unabhängig von der gleichzeitig zugeführten Menge an Sojaprotein (Taku et al., 2007). In einer zweiten Metaanalyse hatte die Aufnahme isoflavonhaltigen Sojaproteins

eine Reduktion der Gesamtcholesterolkonzentrationen um 0,22 mmol/L (3,77 %), der LDL-Cholesterolkonzentrationen um 0,21 mmol/L (5,25 %) und der Triglyzeridkonzentrationen um 0,10 mmol/L (7,27 %) sowie eine Erhöhung der HDL-Cholesterolkonzentrationen um 0,04 mmol/L (3,03 %) zur Folge. Drei Studien wurden für diese Analyse herangezogen, in denen Sojaisoflavone in Tablettenform verabreicht wurden. Eine alleinige Auswertung dieser 3 Studien zeigte keine Effekte auf die Serumlipidkonzentrationen (Zhan et Ho, 2005). Somit wird auch anhand dieser Metaanalyse deutlich, dass ein Unterschied zwischen der isolierten Isoflavonzufuhr und der Zufuhr in Kombination mit Sojaprotein vorliegen könnte.

Die Aufnahmemenge an isoliertem Sojaisoflavonextrakt in der hier vorliegenden Studie lag mit 117 mg/d in einem ähnlich Bereich wie die in der Metaanalyse von Taku postulierte 102 mg/d. Auch die Länge der Intervention war mit drei Monaten vergleichbar und auch die Höhe der Veränderung hinsichtlich der LDL-Cholesterolkonzentration liegt in einem vergleichbaren Bereich (Taku et al., 2007). Daher kann nicht abschließend geklärt werden, warum es in der vorliegenden Studie nicht zu Effekten auf die Gesamtcholesterolkonzentrationen und darüber hinaus sogar zu einer Erhöhung der LDL-Cholesterolkonzentrationen kam, trotz vergleichbarer Studiendauer und Isoflavonaufnahme.

Zu berücksichtigen ist die Tatsache, dass für die Metaanalysen nicht nur Studien mit postmenopausalen Frauen, sondern auch prämenopausalen Frauen sowie Männern herangezogen wurden (Taku et al., 2007; Zhan et Ho, 2005). Nicht nur der Einfluss der Kombination von Sojaprotein und Isoflavonen, sondern auch hormonelle Unterschiede oder unterschiedliche Ausgangskonzentrationen der Cholesterolkonzentrationen könnten hier einen Einfluss auf die unterschiedlichen und sogar gegenläufigen Ergebnisse haben. Ergebnisse weiterer Studien mit kombinierter Isoflavon- und Sojaproteingabe konnten keine Effekte auf Gesamt- oder LDL-Cholesterolkonzentrationen feststellen (Campbell et al., 2010; Mangano et al., 2013). Nicht unerwähnt bleiben sollte, dass im Jahr 1999 in den USA von der FDA (Food and Drug Administration) ein Health Claim allein für Sojaprotein anerkannt wurde, welcher angibt, dass 25 g pro Tag Sojaprotein, als Teil einer an gesättigten Fetten und Cholesterol armen Diät, das Risiko für Herzerkrankungen reduzieren kann. Dieser Health Claim wurde vor dem Hintergrund anerkannt, dass unter der beschriebenen Ernährung die Zufuhr von Sojaprotein die Gesamtcholesterol und LDL-Cholesterolkonzentrationen reduzieren kann ohne sich negativ auf HDL Cholesterolkonzentrationen auszuwirken. Dieser Health Claim darf auch aktuell noch verwendet werden (FDA, 2016).

5.2.2 Rezeptorexpression von CD36 und LDLR auf Leukozyten postmenopausaler Frauen

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Beantwortung der Frage, ob eine 12-wöchige Isoflavonintervention die Expression der fettstoffwechselrelevanten Rezeptoren LDLR und Scavengerrezeptor CD36 auf Leukozyten postmenopausaler Frauen beeinflusst. Ein Zusammenhang zwischen Veränderungen in den Rezeptorexpressionen und Veränderungen in den Serumlipid-

konzentrationen wurde als hypothetischer Mechanismus für Isoflavonwirkungen auf die Serumlipidkonzentrationen angenommen. Diese Studie ist die erste, in der der Einfluss eines Sojaisoflavonextraktes auf die LDLR- und CD36-Expression in postmenopausalen Frauen untersucht wurde.

5.2.2.1 LDLR-Expression

Die LDLR-Expression wurde auf mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) untersucht, da bekannt ist, dass der Rezeptor auf diesen exprimiert wird und PBMC überdies als Modell für den peripheren Lipoproteinmetabolismus *in vivo* anerkannt und zudem aus Blutproben einfach und schnell verfügbar sind (Lara et al., 1997; Maczek et al., 1996; Stulnig et al., 1995). Zwar wird der Großteil des zirkulierenden LDL-Cholesterols in die Leber aufgenommen (Brown et Goldstein, 1983), dort verstoffwechselt und somit aus der Zirkulation entfernt, dennoch tragen Immunzellen mit bis zu 15 % zur Entfernung des LDL-Cholesterols aus dieser bei.

In der hier vorgestellten Studie konnte kein Einfluss der 12-wöchigen Isoflavonintervention auf die LDLR-Expression auf Gesamtlymphozyten festgestellt werden. Dies galt sowohl für die prozentuale Rezeptorexpression auf den Gesamtlymphozyten als auch für die Mittlere Fluoreszenzintensität dieser, welche als Maß für die Rezeptorexpression auf der Einzelzellebene herangezogen wurde. Da die Lymphozytensubpopulationen unterschiedliche physiologische Funktionen ausüben und weiterhin die LDL-Aufnahme zwischen den Populationen unterschiedlich stark ausgeprägt ist (NK-Zellen > B-Zellen > T-Zellen) (Maczek et al., 1996), wurde ebenfalls untersucht, ob sich die Isoflavonintervention auf gleiche oder unterschiedliche Weise und Ausprägung auf die T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen auswirkt. Allerdings veränderte die Intervention auch die LDLR-Expression auf den jeweiligen Subpopulationen nicht. Diesen Ergebnissen auf der Proteinebene stehen die Ergebnisse von Baum et al. auf molekularer Ebene gegenüber, bei denen eine 6-monatige Intervention mit 40 g isoliertem Sojaprotein pro Tag, das entweder 56 oder 90 mg Gesamtoflavone (als Aglykone) enthielt, bei postmenopausalen Frauen zu einer gesteigerten LDLR mRNA Expression auf mononukleären Zellen führte. Jedoch konnten auch hier nach 12 Wochen keine Effekte auf die LDLR mRNA Expression nachgewiesen werden. Die Probandinnen in dieser Studie von Baum et al. führten allerdings eine Niedrig-Fett, Niedrig-Cholesterol Diät durch, während die Probandinnen der vorliegenden Studie ihre normalen Ernährungsgewohnheiten beibehalten durften und nur auf Soja und daraus hergestellte Produkte verzichten mussten. Dies und die Tatsache, dass die Studienteilnehmerinnen von Baum et al. isoflavonhaltiges Sojaprotein im Gegensatz zu einem Isoflavonextrakt in der vorliegenden Studie konsumierten, erschweren den Vergleich der beiden Studien (Baum et al., 1998). Zudem korrelieren Veränderungen in der LDLR mRNA Expression nicht notwendigerweise mit Veränderungen in der LDLR Protein Expression (Cassidy et al., 2003; Nägele et al., 1997). Dass Isoflavoneffekte auf die Rezeptorexpression möglich sind, konnte neben diesen Ergebnissen aus Humanstudien auch *in vitro* sowohl für Genistein als auch für Daidzein auf die LDLR-Expression in unterschiedlichen Zelltypen nachgewiesen werden. So stimulierte Genistein in DLD-1

Kolonkrebszellen die LDLR-Expression, während Daidzein eine erhöhte LDLR Aktivität in HepG2 Zellen hervorrief (Caruso et al., 2008; Owen et al., 2004). Solche Erhöhungen in der LDLR-Expression bzw. Aktivität des LDLR, insbesondere in der Leberzelllinie, unterstützen die zugrundeliegende Annahme, dass Isoflavone über diese Mechanismen zur Senkung der Serum LDL-Cholesterolkonzentrationen beitragen könnten. Neben der vorliegenden Studie gibt es allerdings noch keine weiteren Studien zu potentiellen Effekten der Isoflavone auf die Rezeptorexpression des LDLR in postmenopausalen Frauen. Ein solcher Zusammenhang in Lymphozyten postmenopausaler Frauen kann durch die Ergebnisse der vorliegenden Studie allerdings nicht angenommen werden.

5.2.2.2 CD36 Rezeptorexpression

Genauso wie die LDLR-Expression wurde die Expression des CD36 Scavenger Rezeptors auf Leukozyten durch die Intervention nicht beeinflusst. Bisher gibt es keine weiteren Studien, in denen die Effekte von Soja oder Isoflavonen auf die Expression von CD36 auf Leukozyten in Postmenopausalen Frauen untersucht wurden. Ebenfalls wurden weder in vitro, ex vivo noch in vivo Studien zum Einfluss von Isoflavonen auf die CD36-Expression bzw. Aktivität in Monozyten bzw. Makrophagen durchgeführt. Dennoch war der Einfluss von Flavonoiden und Isoflavonoiden in diesem Zusammenhang Gegenstand verschiedener Studien. So veränderte sich die CD36 mRNA Expression nach Behandlung von humanen monozytären THP-1 Zellen mit den Zitrusflavonoiden 5-OH-HxMF und HpMF nicht. Interessanterweise führte eines dieser Flavonoide, HpMF, zu einer reduzierten Aufnahme von oxLDL in die Zellen, was infolge einer verminderten Expression des Klasse A Scavenger Rezeptors SR-A, nicht jedoch des Klasse B Rezeptors CD36, auftrat (Kou et al., 2013). In aus Apolipoprotein E-defizienten Mäusen (E⁰) isolierten Makrophagen der peritonealen Flüssigkeit kam es nach nutritiver Zufuhr des Isoflavans Glabridin zu erhöhten intrazellulären Konzentrationen des Glabridins verbunden mit einer 53%igen Reduktion von zellulären Lipidperoxiden. Zudem führte die Intervention zu einer um 25% verminderten Aufnahme von oxLDL in die Zellen. Diese Inhibierung der Bildung von Lipidperoxiden und eine daraus resultierende Verminderung des Lipidperoxidproduktes oxLDL kann mit einer reduzierten CD36 mRNA-Expression verbunden sein, wie in derselben Studie für das Antioxidans Vitamin E nachgewiesen wurde (Fuhrman et al., 2002). Neben diesen Untersuchungen in monozytären Zellen und Makrophagen wurden Einflüsse durch Isoflavone oder Estrogene auf die Scavenger Rezeptor Expression auch in anderen Zelltypen bzw. Geweben gezeigt. Sowohl Genistein als auch Daidzein regulierten in humanen HepG2-Zellen die transkriptionelle Aktivität des CD36 Rezeptors hoch, wobei diese Regulation durch Genistein stärker ausgeprägt war als durch Daidzein (Yang et al., 2009). In Rattenlebern konnte eine reduzierte Expression von Klasse B Scavenger Rezeptoren nachgewiesen werden, welche indirekt aus einer Estrogen-abhängigen Erhöhung der LDLR-Aktivität resultierte. Dies könnte einen Mechanismus für potentielle estrogene IF-Effekte auf CD36 darstellen (Stangl et al., 2002). Diese Hypothese konnte jedoch in der vorliegenden Arbeit dahingehend nicht überprüft werden, da weder CD36 mRNA oder LDLR mRNA noch deren Aktivität in den Leukozyten bestimmt wurden. Auch Einflüsse durch andere

Sojainhaltsstoffe auf die CD36-Expression sind denkbar. So reduzierte beispielsweise Pinitol, ein zyklisches Polyol aus Soja, in THP-1 Makrophagen die Expression der Scavenger Rezeptoren CD36 und CD68 (Choi et al., 2007).

Wie auch für den LDLR konnte auch für den CD36 Rezeptor kein Hinweis auf eine durch Isoflavonsupplementation veränderte Expression auf Leukozyten gefunden werden. Für zukünftige Studien sollte eine mRNA und/oder Aktivitätsbestimmung der Rezeptoren in isolierten Leukozyten durchgeführt werden, da vielleicht nicht deren Expression, dafür aber deren Aktivität durch Isoflavone verändert sein könnte. Des Weiteren wäre auch eine Bestimmung der oxLDL-Konzentrationen denkbar um mögliche Veränderungen in den oxLDL Konzentrationen und deren potentielle Auswirkungen auf die CD36-Expression feststellen zu können.

5.2.3 Zusammenhang zwischen der leukozytären Expression von LDLR bzw. CD36 und den Serumlipidkonzentrationen

Die Annahme, dass Isoflavone die leukozytäre LDLR-Expression steigern und darüber die LDL-Cholesterolkonzentrationen im Serum vermindern, konnte durch die vorliegenden Ergebnisse nicht bestätigt werden. Im Gegenteil kam es zu einem Anstieg des LDL-Cholesterols durch die Isoflavonintervention und nicht zu Effekten auf die Rezeptorexpression. Die LDL-Cholesterolhomöostase in Zellen ist über einen Feedbackmechanismus invers reguliert, wodurch erhöhte LDL-Cholesterolkonzentrationen in einer verminderten LDLR-Expression resultieren sollten (Goldstein et Brown, 2009). Da kein Effekt auf die LDLR-Expression, weder durch die IF-Intervention noch durch erhöhte LDL-Cholesterolkonzentrationen, auftrat, kann angenommen werden, dass der Anstieg des LDL-Cholesterols im Plasma um 3-4 % nicht zu intrazellulär erhöhten LDL-Cholesterolkonzentrationen in den Leukozyten beitrug. Eine verminderte LDLR-Expression der Leukozyten infolge erhöhter intrazellulärer Cholesterolkonzentrationen hätte erwartet werden können.

Die Untersuchungen der LDLR-Expression wurden nur auf den Lymphozyten durchgeführt, obwohl der Großteil der LDL-Clearance in der Leber stattfindet. Dies soll verdeutlichen, dass Effekte der Isoflavone auf die LDLR-Expression der Hepatozyten anders hätten ausfallen können, als dies in den Lymphozyten der Fall gewesen ist. Da Nägele et al. jedoch einen hoch aktiven LDLR Pathway in Immunzellen und hier hauptsächlich in Lymphozyten, beschrieben haben, der für ca. 15 % der LDL-Clearance des Körpers verantwortlich ist (Nägele et al., 1997), kann dennoch davon ausgegangen werden, dass Veränderungen in der LDLR-Expression auf Immunzellen ebenfalls zu Veränderungen in Serum LDL-Cholesterolkonzentrationen hätten beitragen können.

Da die Expression sowohl von LDLR als auch von CD36 sich durch die Intervention nicht veränderte, scheint es unwahrscheinlich, dass Isoflavoneffekte auf den Cholesterolmetabolismus über veränderte Expressionen dieser beiden Rezeptoren auf den Leukozyten vermittelt werden. Um festzustellen, ob mögliche Einflussfaktoren unabhängig von der Isoflavonintervention die Rezeptorexpression vor

Studienbeginn beeinflussten, wurde eine Multiple lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Obwohl eine Modulierung der LDLR-Expression durch verschiedene Faktoren wie HDL-Cholesterol, Alter, Insulin oder T3 bekannt ist (Bakker et al., 1998; Streicher et al., 1998; Stulnig et al., 1995) hatte in der vorliegenden Studie, mit Ausnahme von T3 auf die Expression des LDLR auf den Gesamtymphozyten, keiner dieser Faktoren einen Einfluss auf die anfängliche LDLR-Expression auf den Leukozyten. Die CD36-Expression kann durch Glucose und Insulin stimuliert werden (Griffin et al., 2001; Tepavcevic et al., 2011). Ein signifikanter Beitrag dieser beiden Faktoren zur Variabilität der Expression zu Studienbeginn konnte nicht bestätigt werden, Insulin trug jedoch tendenziell zu dieser bei. Da allerdings nur 11 % der Variabilität der CD36-Expression auf den Monozyten und 8,6 % der Variabilität auf den Lymphozyten mit dem entsprechenden Modell erklärt werden konnten und die Modelle für die prozentuale LDLR-Expression nur für die Gesamtymphozyten (7,7 %) und die LDLR⁺ T-Lymphozyten (9,8 %), nicht jedoch für die weiteren Subpopulationen signifikant waren, scheint es unwahrscheinlich, dass einer der untersuchten und für die Modelle herangezogenen Faktoren stärkeren Einfluss auf die IF-Effekte hatte und mögliche IF-Effekte auf die Rezeptorexpression auf den Leukozyten überdeckte. Vielmehr kann davon ausgegangen werden, dass die Intervention keinen Einfluss auf die Rezeptorexpression, weder des LDLR noch des CD36 Rezeptors auf Leukozyten, hatte.

5.2.4 Einfluss des Körperfettgehaltes auf die Isoflavonintervention

Der Transport der Isoflavone im Blut erfolgt zu ca. 50 % an Lipoproteine assoziiert (Rüfer et al., 2009). Lipoproteinprofile können in Abhängigkeit des Körperfettgehaltes bzw. der Körperfettverteilung stark variieren (Despres et al., 1990; Ebbert et Jensen, 2013; Wasan et al., 2008). Aus diesem Grund wurde angenommen, dass sich Unterschiede im Körperfettgehalt auf Transport, Bioverfügbarkeit und Wirkungen der Isoflavone auswirken können. Solche veränderten pharmakokinetischen Prozesse sind vor dem Hintergrund Lipoprotein-vermittelter Transportmechanismen insbesondere für hydrophobe Medikamente schon beschrieben (Wasan et al., 2008). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob ein modulierender Effekt des Körperfettgehaltes bzw. der Menge an viszeralem Fettgewebe auf die Intervention mit Isoflavonen hinsichtlich deren potentieller Wirkungen auf Serumlipidkonzentrationen, sowie die Expression des LDLR als auch CD36 Rezeptors besteht. Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Studie wurden solche modulierenden Effekte des Körperfettgehaltes bzw. der Menge an viszeralem Fettgewebe auf die Intervention für diese Parameter nicht festgestellt.

Der Körperfettgehalt bzw. die Menge an viszeralem Fett haben zudem keinen Einfluss auf die Plasma-Isoflavonkonzentrationen in den Frauen der Verumgruppe. Nach der 12-wöchigen Intervention mit Isoflavonen unterschieden sich die Plasma-Isoflavonkonzentrationen zwischen Frauen mit niedrigem Körperfettgehalt und hohem Körperfettgehalt nicht ($2,7 \pm 2,2 \mu\text{M}$ vs. $2,5 \pm 1,9 \mu\text{M}$). Die Plasma-Isoflavonkonzentrationen der Frauen mit niedrigem und hohem Viszeralfettgehalt nach der

Intervention entsprachen sich ebenfalls ($2,6 \pm 1,9 \mu\text{M}$ vs. $2,5 \pm 1,9 \mu\text{M}$). Die Annahme, dass sich unterschiedliche Körperfett- bzw. Viszeralfettgehalte auf die Plasma-Isoflavonkonzentrationen und nachfolgend die Bioverfügbarkeit der Isoflavone auswirken, kann somit nicht bestätigt werden. Dass es keine modulierenden Effekte der Körperfettverteilung bzw. des viszeralen Fettgehaltes auf die Intervention hinsichtlich der Serumlipide und der Rezeptorexpressionen des LDLR und CD36 gab, könnte darin begründet sein, dass sich die Plasma-Isoflavonkonzentrationen nicht zwischen den nach Körperfett- bzw. viszeralem Fettgehalt eingeteilten Gruppen unterschieden.

Berücksichtigt werden sollte zudem, dass die IF-Aufnahmemenge nicht auf das Körpergewicht bezogen wurde (mg IF/kg KG), sondern alle Frauen unabhängig von ihrem individuellen Körpergewicht die gleiche Menge IF pro Tag zu sich genommen haben (117 mg/d). Daher hätten Wirkungen schon allein durch die unterschiedliche Dosierung in den Frauen zustande kommen können. So hätte angenommen werden können, dass IF eher in den Frauen mit niedrigerem Körperfettgehalt Wirkungen hervorrufen können, da in diesen die Dosierung im direkten Vergleich zu Frauen mit höherem Körperfettgehalt entsprechend höher wäre.

Die Lipoproteinsubklassen wurden in der zugrundeliegenden Studie genau so wenig untersucht, wie die Isoflavonkonzentrationen in den Lipoproteinen selbst. Diese Analysen wären jedoch dahingehend noch informativ gewesen, dass eine Überprüfung der Annahme, dass unterschiedliche Körperfett- bzw. Viszeralfettgehalte mit veränderten Lipoproteinprofilen assoziiert sind, hätte stattfinden können. So ist beschrieben, dass eine hohe abdominelle Fettmenge mit geringen HDL-Cholesterolkonzentrationen und reduzierten Lipoprotein-Verhältnissen, beispielsweise HDL/LDL; HDL2/HDL3 im Serum assoziiert ist (Despres et al., 1985; Despres et al., 1989). Weiterhin ist die Freisetzung von FFA im intraabdominellen Fettgewebe erhöht, was nachfolgend zu triglyzeridreichen LDL, HDL und auch kleinen dichten LDL Partikeln führen kann (Björntorp, 1990; Wirth, 2013). Solche Unterschiede hätten sich in veränderten pharmakokinetischen Eigenschaften der Isoflavone, bspw. einer gesteigerten Bioverfügbarkeit in Geweben mit hoher spezifischer Lipoproteinrezeptorexpression niederschlagen können (Wasan et al., 2008). Auch wenn in der vorliegenden Studie keine modulierenden Effekte bezüglich des Körperfettgehaltes auf die Isoflavonintervention hinsichtlich der unterschiedlichen Zielparameter festgestellt werden konnten, und somit davon ausgegangen werden kann, dass keine Veränderung in der Bioverfügbarkeit der Isoflavone und damit deren Wirkmechanismen bestand, fällt es mit Hinblick auf diese fehlenden Informationen schwer eine abschließende Beurteilung zum Zusammenhang von Körperfettgehalt und Isoflavonintervention zu treffen.

5.2.5 Einfluss des Equolbildnerstatus auf die Isoflavonintervention

Effekte von Isoflavonen auf kardiovaskuläre Risikofaktoren werden häufig mit Bezugnahme auf die Fähigkeit einiger Personen aus Daidzein Equol bilden zu können diskutiert. Der durch Darmbakterien gebildete Daidzeinmetabolit Equol wird als Wirkstoff hinsichtlich der Verbesserung kardiovaskulärer

Risikofaktoren als potenter angesehen als sein Vorläufermolekül Daidzein bzw. andere über die Nahrung zugeführte Isoflavone. Gründe hierfür sind unter anderem seine, im Vergleich zu Daidzein, höhere Affinität für Estrogenrezeptoren und seine höhere Antioxidative Kapazität (Arora et al., 1998; Hodgson et al., 1996). Daher könnten Isoflavonwirkungen in Equolbildnern stärker ausgeprägt sein als in Nicht-Equolbildnern. Aus diesem Grund wurde auch in der vorliegenden Arbeit retrospektiv eine Auswertung für die Zielparameter LDLR bzw. CD36-Expression auf Leukozyten, sowie Serumlipide und Körperzusammensetzung, anhand des Equolbildnerstatus, durchgeführt. Insgesamt waren 26 der 85 Frauen Equolbildner, dies entspricht einem prozentualen Anteil von 30,6 %. Da der Anteil an Equolbildnern in der westlichen Bevölkerung bei ca. 30-50 % liegt (Atkinson et al., 2005), ist dieser in der zugrundeliegenden Studie gut abgebildet. Allerdings führte die Fähigkeit Equol bilden zu können nicht zu Isoflavoneffekten auf die Serumlipide und die Körperzusammensetzung. Die Ergebnisse hinsichtlich der Serumlipidkonzentrationen decken sich mit denen von Hall et al., in deren Studie mit gesunden PMF, die über 8 Wochen mit IF angereicherte Müsliriegel verzehrten, auch keine Effekte des Equolbildnerstatus auf die Serumlipide auftraten (Hall et al., 2006). Hinsichtlich der Körperzusammensetzung zeigten sich ebenfalls keine Effekte durch den Equolbildnerstatus in hypercholesterolemischen PMF und Männern, die einen Monat lang Sojalebensmittel zu sich nahmen (Wong et al., 2012).

Mit Ausnahme der MFI der LDLR⁺ T-Zellen wurde auch die Expression der Rezeptoren LDLR und CD36 auf Leukozyten nicht durch den Equolbildnerstatus beeinflusst. Hier zeigten sich somit keine Unterschiede in Isoflavon-supplementierenden PMF zwischen Equolbildnerinnen und Nicht-Equolbildnerinnen. Einzig die Mittlere Fluoreszenzintensität der LDLR⁺ T-Zellen stieg in Equolbildnerinnen im Vergleich zu Nicht-Bildnerinnen an. Allerdings kam es nicht zu Effekten auf den prozentualen Anteil an LDLR⁺ T-Zellen an den gesamten T-Zellen. Der Grund für den Anstieg der MFI, also eine erhöhte Anzahl an Rezeptoren pro LDLR⁺-T-Zelle, ist nicht bekannt. Da auch keine Effekte auf die MFI der anderen Lymphozytensubtypen auftraten, kann dieser Effekt als vernachlässigbar angesehen werden. Nichtsdestotrotz sollte darauf verwiesen werden, dass Gene in Lymphozyten postmenopausaler Frauen, je nach Equolbildnerstatus durch Isoflavone unterschiedlich induziert werden können, was demnach auch für das LDLR-Gen denkbar wäre. Allerdings war dieses in einer Studie von Niculescu et al. nicht unter den durch Equol differentiell induzierten Genen vertreten (Niculescu et al., 2007).

Setchell und Cole empfehlen zur standardisierten Equolbildnerstatusbestimmung eine 3-tägige Sojamilchzufuhr von 2 x 250 mL Sojamilch pro Tag (Setchell et Cole, 2006). Aus Gründen der Machbarkeit für die Probandinnen wurde in der vorliegenden Studie die Entscheidung getroffen, den Equolbildnerstatus retrospektiv nach der 12-wöchigen Isoflavonaufnahme im Plasma zu bestimmen um die Frauen nicht noch einer weiteren Belastung im Vorlauf der eigentlichen Studie auszusetzen.

Daher wurde der Grenzwert bei einer Equolkonzentration von 50 nmol/L angesetzt und Frauen mit höheren Konzentrationen als Equolbildnerinnen klassifiziert (Lydeking-Olsen et al., 2004).

Möglicherweise kam es in der vorliegenden Studie nicht zu Equoleffekten, da sich das Probandinnenkollektiv gänzlich aus gesunden postmenopausalen Frauen zusammensetzte. So wird für Equol diskutiert, ob beispielsweise in hypercholesterolämischen oder hyperlipidämischen Patienten eher Effekte auf die Serumlipide auftreten könnten, die Ergebnisse hierzu sind jedoch inhomogen (Meyer et al., 2004; Thorp et al., 2008; Zhan et Ho, 2005). In einer aktuellen Zusammenfassung von 42 randomisiert kontrollierten Studien wurde ein modifizierender Effekt des Equolstatus auf Sojaisoflavoninterventionen in Bezug auf Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen untersucht. Alle Studien, bei denen sich positive Auswirkungen des Equolbildnerstatus auf kardiovaskuläre Risikofaktoren zeigten, waren mit PMF durchgeführt worden (Birru et al., 2016). Daher wären Effekte durch die Isoflavonintervention in equolbildenden Frauen auch in der vorliegenden Studie durchaus denkbar gewesen. In der Übersichtsarbeit von Birru et al. konnte in 14 Studien ein positiver Effekt durch den Equolbildnerstatus auf Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen gezeigt werden, wovon 9 Studien mit Probanden durchgeführt wurden, die schon mit gesundheitlichen Problemen hinsichtlich kardiovaskulärer Erkrankungen vorbelastet waren, jedoch fanden sich auch in 5 Studien mit gesunden Probanden positive Effekte durch den Equolbildnerstatus (Birru et al., 2016).

Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass in der vorgestellten Studie keine Einflüsse des Equolbildnerstatus auf die untersuchten Parameter zu erkennen waren.

5.3 Einfluss von Isoflavonen auf das Fettgewebe

5.3.1 Einfluss der Isoflavonintervention auf die Körperzusammensetzung

Für Soja und Isoflavone werden anti-adipogene Wirkungen diskutiert, darunter Effekte auf Körperfett, viszerales Bauchfett und Körpergewicht, sowie Einflüsse auf die Körperzusammensetzung und Körperfettdepots (Cao et al., 2013; Kurrat et al., 2015; Sites et al., 2007; Zanella et al., 2015). Solche Veränderungen könnten Auswirkungen auf den Lipidtransport, die Lipoproteinzusammensetzung und -konzentration (Ebbert et Jensen, 2013) im Plasma haben und darüber hinaus zu einem reduzierten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen in PMF führen. In der vorliegenden Studie konnten weder Effekte der IF Intervention auf Körpergewicht, Körperfettgehalt und viszerales Fettgewebe noch auf weitere Parameter der Körperzusammensetzung in PMF festgestellt werden. Weitere Humanstudien zu Effekten von isolierten Isoflavonen auf die zuvor genannten Parameter wurden bisher, mit Ausnahme einer Studie, bei der die Intervention mit einer Kombination aus 20 g Sojaprotein und 160 mg Isoflavonen (96 mg Aglykonäquivalente) in Form eines Shakes erfolgte, nicht durchgeführt. In dieser

Studie resultierte die 3-monatige Intervention in postmenopausalen Frauen ebenfalls nicht in Unterschieden zwischen der Placebogruppe und der Soja-Gruppe hinsichtlich der Menge an viszeralem Fettgewebe, BMI, Körpergewicht, prozentualem Körperfettgehalt und fettfreier Masse. Die Menge an abdominellem Fettgewebe und subkutanem abdominellen Fettgewebe unterschied sich jedoch zwischen den beiden Gruppen. Dabei kam es jeweils zu einem Anstieg des Fettes in der Placebogruppe, während in der Verumgruppe eine Verringerung der Fettmenge zu verzeichnen war (Sites et al., 2007). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie mit isoliert verabreichten Isoflavonen decken sich mit Ergebnissen aus einem Tierversuch mit ovariectomierten Ratten, als Tiermodell für den Menopausestatus, denen ebenfalls über 12 Wochen ein identischer Isoflavonextrakt verfüttert wurde (Kurrat et al., 2015). Demgegenüber wurde ebenfalls in ovariectomierten Ratten nach 12-wöchiger Intervention mit isoliertem Daidzein ein Gewichtsverlust sowie ein Verlust an viszeralem Fettgewebe festgestellt (Cao et al., 2013). Die Autoren zahlreicher Zellkultur- und Tierstudien nehmen an, dass die postulierten anti-adipogenen Effekte durch Isoflavone auf eine Erhöhung der Lipolyse, eine verstärkte Inhibierung der Adipozytendifferenzierung, eine verstärkte Apoptose oder auch eine verminderte LPL-Aktivität zurückzuführen sind (Harmon et al., 2001; Kim et al., 2006; Naaz et al., 2003; Rayalam et al., 2008). Solche potentiellen Effekte durch die Isoflavone auf Gene des Fettgewebes wurden in der vorliegenden Studie untersucht und werden im weiteren Verlauf dieser Diskussion ausführlich diskutiert.

Die saisonalen, interventionsunabhängigen Effekte auf das Gewicht, den BMI, die Gewebemasse und die gynoide Region waren durch eine Erhöhung des jeweiligen Parameters in der ersten Periode und durch keine Effekte bzw. Verminderungen in der zweiten Periode (gynoide Region) gekennzeichnet. Für den Körperfettanteil, die Fettmasse, den Fettanteil am Gewebe und den Fettmasseindex kam es zu Verminderungen in der zweiten Periode. Solche saisonalen Unterschiede bezüglich der Körperzusammensetzung waren auch in gesunden postmenopausalen Frauen zwischen den Perioden Juni/Juli bis Dezember und Dezember/Januar bis Juni/Juli feststellbar (Dawson-Hughes et al., 1992). Hierbei kam zu einer Erhöhung an fettfreiem Gewebe und des Knochengewebes in den Beinen und in der Körperstammregion und zu einer Reduktion des Körperfettgewebes in den Beinen. In der Periode zwischen Dezember/Januar und Juni/Juli kam es zu einer Erhöhung des Knochengewebes in der Körperstammregion und einer Verminderung dieser in den Beinen sowie im gesamten Körper. Die Menge an Fettgewebe war hier in den Beinen, der Körperstammregion und dem Gesamtkörper erhöht. Das Gewicht der Probandinnen aus der ersten Periode war in dieser Studie um $1,21 \pm 0,3$ % erhöht und während der zweiten Periode um $0,39 \pm 0,29$ % vermindert (Dawson-Hughes et al., 1992). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass saisonale Unterschiede in der Körperzusammensetzung auftreten können. Allerdings ist der Vergleich zwischen der vorliegenden Studie und der Studie von Dawson-Hughes erschwert, da die Perioden sich über unterschiedlich lange Zeiträume erstrecken (7 Monate im Vergleich zu 3 Monaten in der vorliegenden Studie) und auch eine klare Abgrenzung

zwischen Frühling/Sommer und Herbst/Winter in ihrer Studie nicht vorzunehmen ist. Unterschiede in der Körperzusammensetzung zwischen verschiedenen Jahreszeiten sind denkbar, da sich die tägliche Aktivität der Probandinnen im Herbst/Winter von der im Frühling/Sommer unterscheiden könnte, beispielsweise aufgrund der Außentemperaturen oder der unterschiedlichen Lichtverhältnisse. In einer Studie an Frauen zwischen 20 und 54 Jahren wurde mittels Akzelerometer deren Aktivität an sieben aufeinanderfolgenden Tagen bestimmt. Diese Messungen erfolgten in drei unterschiedlichen Jahreszeiten. Tatsächlich war die Aktivität im Winter geringer als im Sommer oder im Frühjahr bzw. Herbst und die Aktivitäten der Frauen erfolgten im Winter eher in sitzender Position als im Sommer. Der Anteil an leichten, moderaten und stärkeren Aktivitäten war ebenfalls niedriger (Buchowski et al., 2009). Daher scheint es naheliegend, dass die saisonalen Veränderungen und vor allem die Erhöhungen des Gewichts und des BMI in der ersten Periode und die Reduktion des prozentualen Körperfettgehaltes in der zweiten Periode auf Veränderungen in der Aktivität der Frauen während des Studienzeitraums zurückzuführen sind, auch wenn den Frauen zu Beginn der Studie nahegelegt wurde, ihre normalen Aktivitäten weiter aufrechtzuerhalten.

Da die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht auf Effekte der Isoflavonintervention auf Parameter der Körperzusammensetzung hinweisen, kann davon ausgegangen werden, dass der beobachtete Anstieg der LDL-Cholesterolkonzentrationen nicht auf Isoflavoneffekte auf diese Parameter zurückgeht. Wahrscheinlicher ist, dass dieser Anstieg durch andere, in der Studie nicht erfasste Parameter erklärbar ist.

5.3.2 Einfluss von Isoflavonen auf Gene des Fettstoffwechsels und der Körperzusammensetzung

Wie bereits erwähnt, werden neben anderen auch anti-adipogene Effekte durch Isoflavone diskutiert und deren potentielle Mechanismen bisher vor allem in Zellkultur- und Tierstudien beschrieben. So stehen hier Effekte im Fokus, welche sich auf die Lipogenese und Lipolyse, aber auch die Adipozytendifferenzierung und Apoptose auswirken und über diese Mechanismen potentiell eine Akkumulierung von Triglyzeriden in den Adipozyten vermindern oder die Regulation der Adipozytenanzahl beeinflussen könnten (Cooke et Naaz, 2004; Park et al., 2009; Rayalam et al., 2008). Um solche potentiellen Effekte auch im Fettgewebe postmenopausaler Frauen unter Isoflavonsupplementation aufzeigen zu können, wurde in der zugrundeliegenden Studie einerseits eine Whole Genome Sequenzierung (WGS) durchgeführt und zudem die Expression ausgewählter Zielgene des Lipidstoffwechsels, sowie des Estrogenmetabolismus mittels RT-PCR untersucht. Anhand der Ergebnisse der WGS konnten im subkutanen Bauchfett nach 12-wöchiger Intervention keine Unterschiede in der Expression von Genen des Fettstoffwechsels oder des Energiestoffwechsels festgestellt werden, obwohl Isoflavone im Fettgewebe nachgewiesen wurden und somit von direkten Wirkungen durch Isoflavone auf dieses ausgegangen werden konnte (siehe Kapitel 5.3.3). Mit Ausnahme des ESR1 Gens waren auch die mittels RT-PCR ermittelten Genexpressionen zwischen

Proben aus Isoflavon- und Placebosupplementierten Frauen nicht unterschiedlich. Die Annahme, dass entsprechende Gene durch die Isoflavonintervention differentiell exprimiert werden, konnte somit nicht bestätigt werden und damit auch kein Zusammenhang zwischen veränderten Genexpressionen im subkutanen Bauchfettgewebe und Veränderungen der Serum LDL-Cholesterolkonzentrationen angenommen werden. Überdies erfolgten, wie schon in Kapitel 5.3.1 beschrieben, auch keine Veränderungen der Körperzusammensetzung, des Körperfettgehalts oder des viszeralen Fettgehaltes, in denen sich veränderte Genexpressionen von Genen des Fettgewebes hätten widerspiegeln können.

Bei der Auswertung genomweiter Genexpressionsdaten muss eine Adjustierung für multiples Testen erfolgen, da es sonst zur α -Fehler-Kumulierung und damit zu falsch positiven Aussagen kommen kann. Unter Berücksichtigung der FDR sind somit keine Gene differentiell zwischen beiden Gruppen exprimiert. Um jedoch mögliche Kandidatengene zu identifizieren, die einem potentiellen Einfluss durch Isoflavone unterliegen, wurde in dieser Arbeit dennoch eine Auswertung durchgeführt. Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass unter den gefundenen Kandidatengenen Gene enthalten sein können, die in Wahrheit nicht differentiell exprimiert sind.

Bisher wurde nur in einer weiteren Humanstudie der Einfluss einer Isoflavonsupplementation auf die Genexpression im Fettgewebe postmenopausaler Frauen untersucht. Dabei wurde in Isoflavonsupplemente mit hohem Genistein ($n = 31$) bzw. geringem Genisteingehalt ($n = 24$) unterschieden. In Abhängigkeit des Genisteingehaltes waren die Auswirkungen auf die Genexpression des Fettgewebes unterschiedlich. So führte eine 8-wöchige Isoflavonintervention mit niedrigem Genisteingehalt zu herunterregulierten Gensets des Energiemetabolismus (Gene des Glucosemetabolismus, der oxidativen Phosphorylierung, des Tricarbonsäurezyklus und des Fettsäuremetabolismus), des Aminosäuremetabolismus und des Zellzyklus. In den Frauen mit einer Isoflavonintervention mit hohem Genisteingehalt waren demgegenüber neben diesen Gensets noch Gensets mit Beteiligung an inflammatorischen Prozessen und Estrogensignalwegen hochreguliert (van der Velpen et al., 2014). Demgegenüber stehen die Ergebnisse der Kandidatengenanalyse der vorliegenden Studie, welche darauf hinweisen, dass Gene des Fettsäuremetabolismus (repräsentiert durch FADS1 und FADS2) verglichen mit Placebo herunterreguliert wurden. Hinweise auf weitere differentiell exprimierte Gensets des Energiemetabolismus, des Aminosäuremetabolismus oder des Zellzyklus wurden nicht gefunden. Der Vergleich der eingesetzten Präparate zwischen beiden Studien zeigt deutliche Unterschiede in deren Zusammensetzung. Der in der vorliegenden Studie eingesetzte Sojaisoiflavonextrakt NovaSoy® könnte mit einem Anteil von 49,7 % Genistein (41,4 % Daidzein und 9,0 % Glycitein) im direkten Vergleich demnach eher als Produkt mit hohem Genisteingehalt angesehen werden (Van der Velpen et al.: HG 42,0 mg/d Genistin + 0,7 mg/d Genistein; 50,8 mg/d Daidzin + 0,5 mg/d Daidzein; 9,8 mg/d Glycitin + 0,4 mg/d Glycitein). Die Gesamtmenge an pro Tag zugeführten Isoflavonen war dabei in beiden Studien mit 117,4 mg/d in der dieser Arbeit zugrunde

liegenden Studie und der Studie von Van der Velpen et al. mit 104,2 mg/d (hoher Genisteingehalt) bzw. 100 mg/d (niedriger Genisteingehalt) annähernd gleich (van der Velpen et al., 2014).

Die regulierten Gensets waren in der Studie von Van der Velpen et al. in Equolbildnern- und Nicht-Equolbildnern konsistent. Durch Zufuhr eines Isoflavonextraktes mit hohem Genisteingehalt unterschieden sich die Effekte jedoch zwischen den beiden Equolbildnerphänotypen. So kam es in Nicht-Bildnern zu einer Hochregulation von Genen des Energiemetabolismus im Gegensatz zu einer Herunterregulation in Equolbildnern. Gene, die mit Inflammationen assoziiert sind, waren unabhängig von der Genisteinkonzentration in Equolbildnern hoch- und in Nicht-Equolbildnern herunterreguliert. (van der Velpen et al., 2014). In der vorliegenden Studie konnte keine Auswertung der Genexpressionsdaten stratifiziert nach Equolbildnerstatus erfolgen, da über diesen nur Daten von Frauen unter Isoflavonintervention zur Verfügung standen. Darüber hinaus wiesen von den 12 biospierten IF-supplementierenden Frauen nur drei Equolbildnerstatus auf, wodurch eine statistische Auswertung hier nicht aussagekräftig gewesen wäre.

Leider können die Ergebnisse aus der Studie von Van der Velpen nicht durch die Ergebnisse der vorliegenden Studie untermauert werden. Allerdings ist der Vergleich beider Studien auch durch die unterschiedliche Präparatezusammensetzung, die Unterscheidung in Präparate mit hoch- und niedrigem Genisteingehalt und die Stratifizierung in Equolbildner und Nicht-Equolbildner erschwert. Hinzu kommen Unterschiede in der statistischen Auswertung. So wurde in der vorliegenden Arbeit für die GSEA eine FDR von 0,05 herangezogen, wohingegen von Van der Velpen et al. eine FDR von 0,25 angewandt wurde (van der Velpen et al., 2014). Da jedoch schon die Adjustierung für multiples Testen für die differentielle Genexpressionsanalyse in der vorliegenden Studie nicht berücksichtigt wurde, ist es wahrscheinlich, dass unter den differentiell exprimierten Genen sogenannte falsch positive Gene enthalten sind, die in Wahrheit nicht differentiell zwischen den Gruppen exprimiert sind. Würde jetzt auch noch die GSEA mit einem Genset mit schon potentiell falsch positiven Genen und zusätzlich mit einer weniger strengen FDR durchgeführt, wäre die Wahrscheinlichkeit höher, falsch positive Gene als für eine Gene Ontology Kategorie angereichert auszuweisen. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit bei der GSEA eine strengere FDR von 0,05 angewandt.

Effekte der Isoflavone auf Gene des Fettmetabolismus sind bisher, außer in der zuvor diskutierten Humanstudie, nicht in Studien am Menschen berichtet worden. Für E2 ist jedoch beschrieben, dass es im Fettgewebe postmenopausaler Frauen die Expression von zahlreichen an der Lipogenese beteiligten Genen (AACS, SCD1, FAS, ACC1, FADS1, PPAR γ) herunterregulieren kann (Lundholm et al., 2008). Ein interessanter Aspekt hierbei ist, dass die Veränderungen in der mRNA Expression von AACS, SCD1, FAS, ACC1 und FADS1 positiv mit Veränderungen der Plasmatriglyzeridkonzentrationen der PMF assoziiert waren. In der zugrundeliegenden Studie zeigte sich das FADS1 Gen durch die Isoflavonintervention ebenfalls herunterreguliert, die anderen beschriebenen und durch E2 vermindert exprimierten Gene waren durch die Intervention mit IF nicht verändert. In einem

Zellkulturversuch mit humanen Prostatakrebszellen (LNCaP-Zellen), welche mit einer zellkulturkompatiblen Form des NovaSoy® Isoflavonextraktes behandelt wurden, kam es zu einer Hochregulierung von Genen des Lipidstoffwechsels, darunter FADS2. Die Autoren nehmen an, dass die Isoflavone die Expression des SREBP beeinflussen und darüber auf FADS2, FACL2/ACSL1 und LSS Einfluss nehmen können (Rice et al., 2007). Im Gegensatz zu den Ergebnissen in humanen Prostatakrebszellen fand sich in der hier vorgestellten Studie eine Herunterregulation des FADS2 Gens im subkutanen Fettgewebe und zudem kein Effekt auf SREBP. Damit bestätigt sich einerseits ein potentieller Effekt der Isoflavone auf FADS2, andererseits findet sich weder ein Einfluss des Regulators SREBP auf die FADS2 Expression, noch eine Übereinstimmung in der Effektrichtung, welche jedoch auch in Abhängigkeit des untersuchten Gewebes unterschiedlich sein könnte. Überdies wurden Isoflavoneffekte auf die Genexpression von Fettstoffwechsel-relevanten Genen des Fettgewebes oder der Leber bisher vorwiegend in Zellkultur- und Tierversuchen nachgewiesen. Hierbei wurden v. a. Auswirkungen auf den PPAR γ untersucht, einen Rezeptor, dem eine zentrale Rolle in der Adipogenese und anderen Prozessen des Lipidmetabolismus sowie des Energiemetabolismus zukommt (siehe PPAR γ -Signalwege in Adipozyten in Abbildung A1 im Anhang). Für PPAR γ ist beschrieben, dass dieser durch Phytoestrogene aktiviert werden kann (Jungbauer et Medjakovic, 2014). Die FADS2 Expression in Adipozyten wird ebenfalls über den PPAR γ reguliert. Obwohl sich in der vorgestellten Studie eine Herunterregulation der FADS2 Expression zeigte, konnte kein Einfluss auf die PPAR γ Expression festgestellt werden. Demgegenüber wurde in humanen Präadipozyten aus subkutanem Fettgewebe während der Ausdifferenzierung die Expression der adipozytenspezifischen Gene PPAR γ , aP2, C/EBP α , GPDH, FAS, SREBP1, Leptin, Perilipin, LPL und HSL nach Behandlung mit Genistein (3,125-50 μ M) dosisabhängig herunterreguliert. Die ER α -Rezeptorexpression war nach Behandlung mit 50 μ M (Tag 7 der Ausdifferenzierung) und 25 μ M Genistein (Tag 14 der Ausdifferenzierung) herunterreguliert. Zudem resultierten alle Konzentrationen in verminderten ER β -Rezeptorexpression am 7. Tag der Ausdifferenzierung und bei Konzentrationen von 6,25 μ M und 25 μ M am 14. Tag der Ausdifferenzierung (Park et al., 2009). Auch in der zugrundeliegenden Studie konnte eine Herunterregulierung des ER α (ESR1) durch die Isoflavonintervention gezeigt werden. Dieser Effekt trat allerdings nur für die mittels RT-PCR ausgewerteten Proben auf. In 3T3-L1-Zellen führte die Behandlung mit 12,5-50 μ M Daidzein oder Genistein zu erhöhten mRNA-Konzentrationen an PPAR γ . Solche Effekte waren auch im epididymalen Fettgewebe übergewichtiger, mit Daidzein gefütterter C57BL/6J-Mäuse nachzuweisen, in denen es zudem zu verminderten mRNA-Konzentrationen an MCP1 und TNF α sowie erhöhten Konzentrationen an Adiponektin kam (Sakamoto et al., 2014). Nach 15-tägiger Intervention mit Genistein waren im epididymalen Fettgewebe von C57BL/6J Mäusen auf einer Niedrigfettdiät 13 Signalwege im Vergleich zu Gewebe nach E2-Behandlung differentiell reguliert. PPAR γ -kontrollierte Gene waren hier durch Genistein hochreguliert, wohingegen sie durch E2 herunterreguliert waren. Im PPAR-Signalweg waren neben PPAR γ auch ATGL, HSL und LPL

differenziell exprimiert. Von den Genen, die durch E2 induziert waren, wurde nur ein einziges Gen, PLA2G7, auch durch Genistein induziert. In der Gruppe der durch E2 herunterregulierten Gene waren es VLDLR, ALB1 und FGF13, die ebenfalls durch Genistein herunterreguliert wurden. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass sich die Mäuse auf einer Niedrigfettdiät befanden (Zanella et al., 2015). Die Ergebnisse der Studie von Zanella et al. weisen darauf hin, dass sich Wirkungen von E2 und Isoflavonen im gleichen Gewebe auch konträr auf Genexpressionen auswirken können. In der vorgestellten Studie wurde die differentielle Genexpressionsanalyse zwischen Genen aus Gewebe von mit Isoflavonen- oder Placebosupplementierten Frauen und nicht im Vergleich zu einer E2 Intervention durchgeführt. Ein Abgleich der differentiel exprimierten Gene mit einer Datenbank estrogenresponsiver Gene zeigte lediglich drei estrogenresponsive Gene, die induzierten Gene ART3 und POU4F1, sowie das 1,5-fach reprimierte Gen CRP. CRP stellt einen systemischen Marker für Entzündungsreaktionen sowie einen Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen dar (Buckley et al., 2009). Seine Synthese erfolgt überwiegend in der Leber, es wird aber auch im Fettgewebe synthetisiert (Anty et al., 2006; Ouchi et al., 2003). Dem Hinweis der vorliegenden Studie, in der die CRP Expression im Fettgewebe isoflavonsupplementierter Frauen im Vergleich zu placebosupplementierten Frauen reprimiert war und den Ergebnissen von Van der Velpen zufolge, in denen Gensets mit Beteiligung an inflammatorischen Prozessen durch die Intervention mit Isoflavonen verändert exprimiert wurden, können generell Wirkungen von Isoflavonen auf Gene inflammatorischer Prozesse im Fettgewebe angenommen werden. Leider erfolgte in der vorgestellten Studie keine Bestimmung der CRP Konzentrationen im Serum, sodass Aussagen zum Einfluss von Isoflavonen auf zirkulierendes CRP und auch Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen CRP im Fettgewebe und zirkulierendem CRP hier nicht durchgeführt werden konnten. Der Hinweis auf mögliche Isoflavoneffekte auf CRP im Fettgewebe sollte allerdings in zukünftigen Studien dazu Anlass geben, auch CRP im Serum zu bestimmen. Des Weiteren ist es durchaus möglich, dass Isoflavoneffekte auf die Genexpression fettstoffwechselrelevanter Gene in anderen Geweben bestehen, die in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurden, wie bspw. der Leber. In diesem Kontext wurde der Einfluss eines, mit dem Isoflavonextrakt der vorliegenden Studie identischen, Sojaisoflavonextrakts auf Lipogenese, FS-Oxidation und Lipidspeicherung in weiblichen Wistar Ratten untersucht. Dabei waren die hepatischen mRNA-Konzentrationen von SREBP-1c, ACC und PPAR α von Ratten auf lebenslanger Isoflavondiät im Vergleich zur mRNA von isoflavonfrei gefütterten Ratten vermindert. Tendenziell zeigte sich dies auch für die mRNA-Konzentrationen von FAS. Jedoch wurde in dieser Studie die adipozytäre Genexpression der zuvor genannten Gene nicht untersucht (Kurrat et al., 2015).

Alle weiteren und bisher nicht diskutierten potentiell differentiel exprimierten Gene in der vorliegenden Arbeit konnten nicht in einen offensichtlichen Zusammenhang mit möglichen Isoflavoneffekten auf den Lipidmetabolismus oder den Energiemetabolismus gebracht werden. Zudem sollte zum Abschluss dieses Kapitels nochmals darauf hingewiesen werden, dass die hier

beschriebenen differentiell exprimierten Gene nur unter Nichtberücksichtigung einer Adjustierung für multiples Testen differentiell zwischen der Verum- und Placebogruppe exprimiert waren. Aus diesem Grund können die Ergebnisse nur Hinweise für mögliche Isoflavoneffekte liefern, welche in zukünftigen Studien überprüft und gegebenenfalls verifiziert werden könnten.

5.3.3 Isoflavone im subkutanen Bauchfettgewebe

In dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob nach 12-wöchiger Intervention Isoflavone im subkutanen Bauchfettgewebe postmenopausaler Frauen detektiert werden können. Da der Transport der Isoflavone größtenteils an Lipoproteine assoziiert erfolgt (Rüfer et al., 2009), ist es wahrscheinlich, dass die Isoflavone über diesen Weg auch ins Fettgewebe transportiert werden. Für die Isoflavonanalyse im Fettgewebe wurde nach der 12-wöchigen Intervention sowohl in Frauen der Verum- als auch in Frauen der Placebogruppe eine Biopsie des subkutanen Bauchfettgewebes durchgeführt. Die Isoflavonanalyse sollte für 23 Proben (12 Verum/11 Placebo) erfolgen. Allerdings können Aussagen darüber, ob Isoflavone ins Fettgewebe aufgenommen werden nur für vier (2 Verum/2 Placebo), in einem Probelauf analysierte Proben getroffen werden, da die weitere Analyse aufgrund eines defekten UHPLC-MS/MS nicht durchgeführt werden konnte. In den beiden Proben der Isoflavon-supplementierten Frauen fanden sich $60,3 \pm 12,0$ pmol/g Isoflavone (Summe von Daidzein, Genistein und deren entsprechenden Aglykonäquivalenten), dagegen in den beiden Proben der Frauen, die Placebo zu sich nahmen nur vernachlässigbare $1,00 \pm 0,0$ pmol/g Fettgewebe. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass die Isoflavone ins Fettgewebe aufgenommen werden, allerdings muss diese Annahme zukünftig noch durch die endgültige Analyse aller 23 Proben bestätigt werden. In welcher Form die Isoflavone demnach im Fettgewebe vorliegen, kann anhand von 2 untersuchten Verumproben ebenfalls noch nicht abschließend beurteilt werden. Für Estradiol ist beschrieben, dass sich der Großteil dieses in postmenopausalen Frauen in veresterter Form im Fettgewebe befindet (Vihma et Tikkanen, 2011), was für Isoflavone ebenfalls vorstellbar wäre. Da die Estrogenrezeptoren ER α , ER β und GPER im humanen Fettgewebe exprimiert werden, sind direkte rezeptorvermittelte Effekte der Isoflavone auf das Fettgewebe möglich, wie es auch für Estrogene der Fall ist (Gavin et al., 2013; Pedersen et al., 2001).

Die hier vorgestellte Studie ist die erste, in der Isoflavone und Isoflavonmetabolite im subkutanen Fettgewebe von PMF bestimmt wurden und die vorläufigen Ergebnisse legen nahe, dass sich nach einer 12-wöchigen Isoflavonintervention Isoflavone und deren Metabolite in diesem nachweisen lassen.

5.4 Stärken und Limitationen der Studie

5.4.1 Stärken

5.4.1.1 Studiendesign

Eine Stärke der Studie ist deren Studiendesign. So stellen randomisierte, placebo-kontrolliert und doppelblind durchgeführte Studien u. a. den Goldstandard in der klinischen Forschung hinsichtlich neuer Therapien dar (Kabisch et al., 2011). Weiterhin zeichnet sich die Studie durch ihre hohe Praxisrelevanz aus. Sojaisoflavonextrakte werden vorwiegend für Frauen in den Wechseljahren beworben und von diesen konsumiert, beispielsweise als Alternative zu einer HRT gegen Wechseljahrsbeschwerden. Die Probandinnen waren zudem hoch motiviert, was sich in einer Compliance von 98 % widerspiegelt. Die regelmäßige Aufnahme des Sojaisoflavonextraktes kann demnach als gesichert angesehen werden. Es kann somit ausgeschlossen werden, dass die zahlreichen Nicht-Effekte auf eine unzureichende Compliance der Teilnehmerinnen zurückzuführen sind.

5.4.1.2 Bestimmung der Körperzusammensetzung mittels DEXA

Die Parameter der Körperzusammensetzung wurden in dieser Studie mittels DEXA bestimmt. Vorteile der DEXA gegenüber anderen Verfahren wie Computertomographie (CT) oder MRI (Magnetic Resonance Imaging) sind die geringere Strahlendosis, die geringere Messzeit sowie geringere Kosten (Kaul et al., 2012; Neeland et al., 2016). Die in dieser Arbeit verwendete CoreScan Applikation zur Erfassung der viszeralen und subkutanen Fettmenge in der androiden Region ist gegen CT validiert worden und zeigt starke Übereinstimmung zwischen den ermittelten Werten beider Methoden für beide Geschlechter ($r^2 = 0,959$ für Frauen) und über einen breiten BMI-Bereich hinweg. (Kaul et al., 2012). Demnach liefert die DEXA Messung präzise Werte für die viszerale und subkutane Fettmenge, weswegen in der vorliegenden Studie auf die Messung des Bauchumfangs als Surrogatmarker für viszerales Fettgewebe verzichtet werden konnte. Ein weiterer Vorteil der Bestimmung der Körperzusammensetzung mittels DEXA ist die Generierung aller Parameter der Körperzusammensetzung aus einer einzigen Messung im Gegensatz zu verschiedenen Messungen wie BIA, CT und DEXA ohne CoreScan-Applikation. Auch in der zum Vergleich herangezogenen, in Kapitel 5.3.1 beschriebenen Studie von Sites 2007 wurden der Körperfettanteil, die fettfreie Masse als auch die Fettmasse durch DEXA-Messungen erfasst. Allerdings wurden hier das gesamte abdominale, sowie das viszerale und subkutane Fett mittels CT Scan im Bereich des 4ten und 5ten Lendenwirbels bestimmt, wohingegen dies in der vorliegenden Studie ebenfalls mittels DEXA über die spezifisch dafür entwickelte CoreScan-Software erfolgte (Kaul et al., 2012; Sites et al., 2007).

5.4.1.3 Statistische Berücksichtigung der Studiendurchführung in zwei Perioden

Eine weitere Stärke stellt die statistische Auswertung der Studie dar. Die Einbeziehung der beiden unterschiedlichen Perioden, in denen die Studie durchgeführt wurde, diente dazu, durch diese

Aufteilung auftretende potentielle Effekte auf die untersuchten Parameter mitberücksichtigen zu können. Die so festgestellten Effekte resultierten aus der Durchführung der Studie in zwei Studienphasen (Periode 1 und Periode 2), wobei Periode 1 den Zeitraum von Oktober bis Januar und Periode 2 den Zeitraum von Februar bis Mai umfasste. Die saisonalen Effekte traten unabhängig von den Interventionseffekten auf und wurden u. a. für LDL-Cholesterol, die prozentuale LDLR-Expressionen auf Gesamtymphozyten und T-Zellen (% und MFI), sowie auf B- und NK-Zellen (MFI), die CD36-Expression auf den Monozyten als auch für das Körpergewicht, den prozentualen Körperfettgehalt und den BMI festgestellt. Insbesondere für Cholesterolkonzentrationen zeigen Studien, dass diese jahreszeitabhängigen Schwankungen unterliegen (Moura et al., 2013; Ockene et al., 2004). Beispielsweise wurden höhere Cholesterolkonzentrationen im Winter festgestellt als im Sommer. In der gleichen Studie traten überdies höhere Cholesterolkonzentrationen eher in Frauen als in Männern auf (Ockene et al., 2004). Diese Ergebnisse stützen die in der hier vorgestellten Studie festgestellten, saisonalen Effekte auf u. a. die LDL-Cholesterolkonzentrationen in postmenopausalen Frauen, welche überwiegend durch Erhöhungen in der ersten Periode gekennzeichnet waren und somit auch eher im Herbst bzw. Winter auftraten. Die für die LDLR- und CD36-Expression auf Leukozyten ebenfalls auftretenden interventionsunabhängigen, saisonalen Effekte im Frühjahr (Periode 2) zeigten expressionsreduzierende und damit gänzlich gegenläufige Auswirkungen, verglichen mit den expressionssteigernden Effekten auf diese Parameter im Winter (Periode 1). Die in der ersten Periode auftretende Erhöhung der Rezeptorexpression steht der Annahme gegenüber, dass erhöhte LDL-Cholesterolkonzentrationen zu einer Reduktion der LDLR-Expression führen sollten, um einer vermehrten LDL-Cholesterolaufnahme in die Zellen entgegenzuwirken. Warum diese Erhöhung in den Rezeptorexpressionen in Periode 1 erfolgte ist nicht abschließend nachzuvollziehen, da Humanstudien als auch Zellkulturversuche mit humanen Zellen in diesem Zusammenhang bisher fehlen.

Die saisonal hervorgerufene Erhöhung der LDL-Cholesterolkonzentration lag bei 3,5 %. Diese Erhöhung deckt sich annähernd mit der Erhöhung der LDL-Cholesterolkonzentration durch die Isoflavonintervention, die bei ca. 3,4 % lag. Da beide Effekte unabhängig voneinander auftraten, ist anzunehmen, dass eine Isoflavonintervention mit 117,4 mg/d in Form eines Sojaextraktes über einen Zeitraum von 12 Wochen zu einer leichten Erhöhung der LDL-Cholesterolkonzentrationen in postmenopausalen Frauen führt. Allerdings kann eine Erhöhung der LDL-Cholesterolkonzentrationen in einem ähnlichen Ausmaß allein dadurch zustande kommen, dass eine Frau zu einer bestimmten Jahreszeit an der Studie teilgenommen hat. Daher relativiert der festgestellte saisonale Effekt auf die LDL-Cholesterolkonzentrationen den ebenfalls festgestellten Anstieg der Konzentrationen durch die Isoflavonintervention. Die Studienergebnisse legen nahe, dass für zukünftige Studien, bei denen Isoflavonwirkungen auf Serumlipide oder auch Parameter der Körperzusammensetzung untersucht werden, der Zeitraum der Studiendurchführung mit berücksichtigt werden sollte.

5.4.1.4 Umfassende Untersuchung des Einflusses der Intervention auf den Fettstoffwechsel

In dieser Studie wurde die Rolle der Isoflavone im Fettstoffwechsel postmenopausaler Frauen umfassend untersucht. Nicht nur der Einfluss der Intervention auf Serumlipide, sondern auch auf fettstoffwechselrelevante Rezeptoren im Blut und Fettgewebe, sowie die Gene des Fettgewebes wurden genauso untersucht, wie der Einfluss auf die Körperzusammensetzung der Probandinnen. Hierfür wurde ein breites Methodenspektrum eingesetzt (u. a. die Durchführung als randomisierte klinische Studie, Bestimmung der Körperzusammensetzung mittels DEXA, Bestimmung der Serumlipidkonzentrationen mittels klinischer Chemie, durchflusszytometrische Bestimmung fettstoffwechselrelevanter Rezeptoren auf den Leukozyten und Genexpressionsanalysen im Fettgewebe mittels RT-PCR und WGS). Diese Untersuchungen lieferten einen ausführlichen und methodisch fundierten Überblick über die Auswirkungen einer 12-wöchigen Isoflavonintervention in postmenopausalen Frauen.

5.4.2 Limitationen

5.4.2.1 Baselineunterschiede durch Gruppeneinteilung nach Körperfett- bzw. Viszeralfettgehalt und Intervention

Um den Einfluss des Körperfettgehaltes bzw. der Menge an viszeralem Fett auf die Intervention zu untersuchen, wurden die Probandinnen der Verum- bzw. Placebogruppe anhand der Höhe ihres Körperfett- bzw. Visceralfettgehaltes kategorisiert. Schon zu Beginn der Studie gab es allerdings interventionsunabhängige Unterschiede der Serumlipidkonzentrationen zwischen diesen Gruppen. Diese Unterschiede sind einzig durch die Gruppeneinteilung nach Körperfettgehalt bzw. Menge an viszeralem Fettgewebe und Intervention zustande gekommen. Sie sind interventionsunabhängig, da zu diesem Zeitpunkt noch gar keine Aufnahme der Isoflavon- oder Placebopräparate durch die Probandinnen erfolgt war. Diese Baselineunterschiede machten für die entsprechenden Parameter eine andere statistische Herangehensweise erforderlich, da sie die statistische Power der Post-Treatment-Analyse verschlechterten. Um dennoch statistisch aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, wurden die absoluten Differenzen, also die Differenz zwischen Endkonzentration nach 12-wöchiger Intervention und den Ausgangskonzentrationen, als Zielparameter herangezogen. Für die weiteren Parameter, bei denen die Ausgangskonzentrationen in den Gruppen homogen waren, konnte die alleinige Auswertung der Post-Treatment-Konzentrationen bestehen bleiben (Vickers, 2001). Der ursprünglichen Entscheidung für die Post-Treatment-Analyse lag die Überlegung zugrunde, dass die Ergebnisse möglichst gut zu interpretieren sein sollten, sodass beispielweise konkrete Aussagen hinsichtlich der Wirkung einer Isoflavonintervention bei Frauen mit hohem oder niedrigem Körperfettgehalt bzw. hoher oder niedriger Menge an viszeralem Fettgewebe getroffen hätten werden können. Solche einfachen Ergebnisse hätten sich nachfolgend auch in möglichen Handlungsempfehlungen für Frauen mit entsprechendem Phänotyp niederschlagen können.

5.4.2.2 Expression des LDLR auf Leukozyten

Da es sich bei der vorliegenden Studie um eine Humanstudie handelte, war es nicht möglich die Expression des LDLR in der Leber zu untersuchen. So könnte der Anstieg der LDL-Cholesterolkonzentrationen auch mit veränderten Rezeptorexpressionen in der Leber assoziiert sein, da der Hauptanteil der LDL-Clearance in der Leber stattfindet. Allerdings sind Lymphozyten als humanes Probenmaterial leicht zugänglich und zudem als Modellsystem für den extrahepatischen Cholesterollowerstand anerkannt (Stulnig et al., 1995; Nägele et al., 1997). Zudem trägt der LDLR Pathway in den Lymphozyten mit ca. 15 % zur LDL-Clearance des Körpers bei (Nägele et al., 1997).

5.4.2.3 Anzahl der Biopsien des subkutanen Fettgewebes

Dass mittels WGS keine differentiell exprimierten Gene im subkutanen Fettgewebe zwischen isoflavon- und placebosupplementierten Frauen aufgedeckt werden konnten, könnte in einer zu niedrigen Anzahl an durchgeführten Biopsien begründet sein. Unter Annahme eines Variationskoeffizienten von 0,74 hätte mit 12 Verum- und 11 Placeboproben erst eine 2,5-fache Veränderung zwischen den Gruppen mit einer Power von 0,8 und einem Signifikanzniveau von 0,05 aufgedeckt werden können (Hart et al., 2013). Selbst bei einer weniger pessimistischen Annahme mit einem Variationskoeffizienten von 0,5, wäre der kleinste zu detektierende Unterschied zwischen den Gruppen eine 1,9-fache Veränderung gewesen. Um mit einem Variationskoeffizienten von 0,5 eine 1-fache Veränderung zwischen den Gruppen aufdecken zu können wären pro Gruppe 100 Frauen notwendig gewesen. Demzufolge wäre eine höhere Anzahl an Biopsien wünschenswert gewesen, was aus personellen Gründen in der vorliegenden Studie jedoch nicht möglich war. Überdies wurden nur Biopsien nach 12-wöchiger Intervention durchgeführt, nicht jedoch zu Beginn der Studie. So war ausschließlich ein Vergleich zwischen der Placebo- und Verumgruppe möglich, eine Veränderung im Vergleich zu den Genexpressionen zu Beginn der Studie konnte nicht durchgeführt werden.

5.4.2.4 Isoflavonkonzentrationen im Plasma und Equolbildnerstatus

In der vorliegenden Studie wurden die Isoflavonkonzentrationen im Plasma bisher nur in Frauen quantifiziert, die Isoflavone konsumiert haben, nicht jedoch in Frauen aus der Placebogruppe. Die Konzentrationen lagen bei $2,6 \pm 2,1 \mu\text{M}$. Die gemessenen Konzentrationen können durch die Ergebnisse einer Bioverfügbarkeitsstudie mit gesunden Erwachsenen, die 144 mg/d bzw. 288 mg/d Aglykonäquivalente über den gleichen Extrakt (NovaSoy®) wie in der vorliegenden Studie zu sich nahmen bestätigt werden. Gardner et al. konnten Plasmakonzentrationen im Bereich zwischen 2 und 5 μM feststellen (Gardner et al., 2009). Dennoch wäre es sinnvoll, die Isoflavonkonzentrationen auch in Frauen der Placebogruppe zu quantifizieren, um vollständig ausschließen zu können, dass diese keine isoflavonhaltigen Produkte über den Interventionszeitraum konsumiert haben. Alle Probandinnen waren jedoch dazu aufgefordert, keine soja- oder isoflavonhaltigen Produkte während des Studienzeitraums zu konsumieren. Daher kann davon ausgegangen werden, dass in den Frauen der Placebogruppe keine oder nur Spuren von Isoflavonmetaboliten im Plasma zu finden sind.

Der Equolbildnerstatus wurde demnach nur in Frauen unter Isoflavonintervention bestimmt, da nur von diesen Informationen über die Plasmaisoflavinonzentrationen und Isoflavonmetabolite vorlagen. Somit konnten nur Effekte zwischen den Equolbildenden und Nicht-Equolbildenden Frauen in der Verumgruppe festgestellt werden, ein Vergleich mit Frauen aus der Placebogruppe war demnach nicht möglich.

5.4.2.5 Durchführung der Studie in zwei Perioden

Das Auftreten von interventionsunabhängigen Effekten aufgrund der Durchführung der Studie in zwei Perioden sollte bei zukünftigen Studienplanungen bedacht werden. Um solche Effekte zu vermeiden wäre eine Studiendurchführung in nur einer Studienphase oder gleichmäßig verteilt über ein ganzes Jahr sinnvoll. In der vorliegenden Studie konnten diese Effekte anhand einer geeigneten Auswahl der statistischen Methoden erkannt werden. So war es möglich, beispielsweise die Höhe des interventionsbedingten Anstiegs der LDL-Cholesterolkonzentrationen zu relativieren.

5.5 Schlussfolgerungen

Studien zur Wirkung von Isoflavonen in postmenopausalen Frauen sind zahlreich und ihre Fragestellungen umfassen einen großen potentiellen Wirkungsbereich der Isoflavone. Vor allem Fragestellungen hinsichtlich kardiovaskulärer Risikofaktoren sind hier zu nennen. Die Ergebnisse sind größtenteils inhomogen. Die zugrundeliegende Arbeit beschäftigte sich umfassend mit der Rolle der Isoflavone im Fettstoffwechsel postmenopausaler Frauen und insbesondere mit der Frage nach Faktoren, die Isoflavonwirkungen modulieren können.

Die 12-wöchige Isoflavonintervention wirkte sich in postmenopausalen Frauen hinsichtlich der Serumlipide nur auf die LDL-Cholesterolkonzentrationen aus, nicht jedoch auf die anderen Serumlipidkonzentrationen. Studienergebnisse anderer Autoren deuten entweder ebenfalls nicht auf Effekte durch isoliert verabreichte Isoflavone in diesem Kontext hin oder zeigen gegenläufige Ergebnisse. Der Anstieg der LDL-Cholesterolkonzentrationen war mit 3,4 % moderat. Zudem wurde in dieser Studie gezeigt, dass ein Anstieg der Konzentrationen in diesem Bereich auch alleine durch die Durchführung der Studie in einer bestimmten Jahreszeit zustande kommen kann. Demnach kann der, die LDL-Cholesterolkonzentrationen steigernde, Isoflavoneffekt relativiert werden.

Diese Studie ist die erste Humanstudie, in der die Auswirkungen eines Soja Isoflavonextraktes auf die Expression der fettstoffwechselrelevanten Rezeptoren LDLR und CD36 auf Leukozyten postmenopausaler Frauen untersucht wurden. Stimulierende als auch hemmende Effekte auf Expression und Aktivität dieser Rezeptoren wurden bisher einzig in vitro in unterschiedlichen Zelltypen für isoliert verabreichtes Genistein oder Daidzein nachgewiesen. In der vorliegenden Studie bestand solch ein Zusammenhang in Lymphozyten gesunder postmenopausaler Frauen nicht. Allerdings sollte in zukünftigen Studien neben der Expression auch die Aktivität der Rezeptoren mitberücksichtigt werden, um eine umfassendere Aussage tätigen zu können. Die Annahme, dass durch die Isoflavonintervention hervorgerufene Veränderungen in der LDLR- bzw. CD36-Expression

sich in Veränderungen der Serumlipidkonzentrationen widerspiegeln, kann aufgrund der Erhöhung der LDL-Cholesterolkonzentrationen und den sich nicht veränderten Rezeptorexpressionen nicht bestätigt werden.

Die Fragestellung, ob der Körperfettgehalt bzw. die Menge an viszeralem Fettgewebe modulierend auf die Isoflavonintervention wirkt, wurde in dieser Humanstudie zum ersten Mal untersucht. Es wurde angenommen, dass unterschiedliche Körperfett- bzw. Viszeralfettgehalte mit veränderten Lipoproteinprofilen einhergehen und durch den an Lipoproteine assoziierten Transport der Isoflavone möglicherweise die Bioverfügbarkeit dieser verbessert sein könnte. In dieser Studie konnten jedoch keine modulierenden Effekte festgestellt werden.

Einen weiteren potentiell modulierenden Faktor der Isoflavonwirkungen stellt der Equolbildnerstatus dar. Der Daidzeinmetabolit Equol wird hinsichtlich der Verbesserung kardiovaskulärer Risikofaktoren als potenter angesehen als Daidzein und andere über die Nahrung zugeführte Isoflavone. Effekte auf die Serumlipide, Rezeptorexpression (LDLR und CD36) sowie Parameter der Körperzusammensetzung konnten in der zugrundeliegenden Studie nicht festgestellt werden. Diese Ergebnisse decken sich mit Ergebnissen weiterer Humanstudien mit isoflavonangereicherten- oder Sojalebensmitteln. In der vorliegenden Studie wurde der Equolbildnerstatus nur in Frauen der isoflavonsupplementierten Gruppe, nicht jedoch in Frauen der Placebogruppe festgestellt. Um statistisch aussagekräftigere Resultate hinsichtlich der Auswirkungen des Equolbildnerstatus auf Isoflavoninterventionen zu erhalten, sollte dieser in weiterführenden Studien auch in der Placebogruppe miterfasst werden.

Auch wenn Ergebnisse aus Zellkultur- und Tierversuchen, sowie eine weitere Humanstudie, anti-adipogene Wirkungen der Isoflavone postulieren, konnte ein solcher Effekt der Isoflavonintervention auf Parameter der Körperzusammensetzung in der zugrundeliegenden Humanstudie nicht festgestellt werden. So ist ein Zusammenhang zwischen der Erhöhung der LDL-Cholesterolkonzentration und einer veränderten Körperzusammensetzung demnach unwahrscheinlich.

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse der Gene des Fettgewebes zeigen, dass es durch die 12-wöchige Intervention nicht zu Veränderungen in der Genexpression von Genen des Fett- oder des Energiestoffwechsels kam, obwohl stark davon ausgegangen werden kann, dass Isoflavone im Fettgewebe vorliegen und dort auch direkte Wirkungen hervorrufen könnten. In Zellkulturstudien, sowie einer weiteren Humanstudie, sind solche Wirkungen durch Isoflavonextrakte schon beschrieben. Da sich zwar keine Änderungen der Gene des Fettstoffwechsels zeigten, die LDL-Cholesterolkonzentrationen in den isoflavonsupplementierten Frauen jedoch leicht anstiegen, kann hier nicht von einem Zusammenhang zwischen Isoflavonwirkungen auf fettstoffwechselrelevante Gene und Serumlipidkonzentrationen im Fettgewebe ausgegangen werden. Allerdings trägt hauptsächlich die Leber zur LDL-Clearance bei, sodass mögliche Effekte auf Gene des Fettgewebes hier wahrscheinlich auch nur eine untergeordnete Rolle gespielt hätten. Isoflavoneffekte auf fettstoffwechselrelevante Gene der Leber wurden nicht untersucht. Die Anzahl an Fettbiopsien war jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit zu gering um aussagekräftige Unterschiede zwischen den beiden Gruppen aufdecken zu können. Dies ließe sich in zukünftigen Studien, wenn die zeitlichen und personellen

Kapazitäten dies zulassen, über eine Erhöhung der Anzahl an durchgeführten Fettbiopsien verbessern. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass potentielle Effekte durch die Isoflavone auf Gene des Fett- oder Energiestoffwechsels wahrscheinlich sind, die statistische Power in der vorliegenden Studie allerdings nicht ausreichend war, um diese zweifelsfrei aufzudecken.

Des Weiteren sollte mittels der hier vorgestellten Studie geklärt werden, ob sich Isoflavone nach einer 12-wöchigen Intervention im subkutanen Fettgewebe postmenopausaler Frauen nachweisen lassen, da direkte Effekte der Isoflavone über Estrogenrezeptoren im Fettgewebe denkbar sind. Die Analyse der Isoflavone im Fettgewebe konnte bisher nur in einem Probelauf für 4 Proben durchgeführt werden, welcher jedoch die Annahme zulässt, dass Isoflavone im Fettgewebe nachweisbar sind. Diese vorläufige Annahme muss zukünftig noch durch die Analyse der weiteren Fettgewebeproben bestätigt werden und lässt dann auch eine Beurteilung der im Fettgewebe vorliegenden Isoflavonmetabolite zu.

Die vorliegende Arbeit liefert einen thematisch sowie methodisch umfassenden Überblick zur Rolle der Isoflavone im Fettstoffwechsel postmenopausaler Frauen. Sowohl die Zielgruppe als auch der eingesetzte Soja Isoflavonextrakt führen zu einer hohen Praxisrelevanz dieser Studie. Diese wurde randomisiert, doppelblind und Placebo-kontrolliert durchgeführt, sodass die Ergebnisse als gesichert angesehen werden können. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Isoflavonwirkungen im Fettstoffwechsel postmenopausaler Frauen eher eine untergeordnete Rolle spielen.

Zusammenfassung

Die Menopause geht sowohl mit charakteristischen hormonellen Veränderungen als auch charakteristischen Wechseljahrsbeschwerden und Veränderungen der Körperfettverteilung sowie der Lipoprotein- und Serumlipidkonzentrationen einher. Diese Veränderungen stehen in Zusammenhang mit einem gesteigerten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen in postmenopausalen Frauen. Epidemiologische- und Querschnittsstudien deuten auf ein niedrigeres Risiko für u. a. kardiovaskuläre Erkrankungen, Osteoporose und menopausale Beschwerden in postmenopausalen Frauen aus asiatischen Ländern hin. Der dort im Vergleich zu westlichen Ländern höhere Konsum an Sojaprodukten wird mit diesen geringeren Inzidenzen in Zusammenhang gebracht. Als Wirksubstanz stehen hier vor allem die Sojaisoflavone, sekundäre Pflanzenstoffe, im Fokus der wissenschaftlichen Forschung. Diese werden in westlichen Ländern auch als Nahrungsergänzungsmittel vor allem für Frauen in den Wechseljahren als nebenwirkungsärmere Alternative zu einer Hormonersatztherapie postuliert und werden von vielen betroffenen Frauen konsumiert. Allerdings sind Studienergebnisse zu Wirkungen der Isoflavone beispielsweise auf die Lipoprotein- oder Serumlipidkonzentrationen oder weitere Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen zwar zahlreich, jedoch heterogen. Modulierende Faktoren auf die Isoflavonwirkungen sind denkbar, welche ursächlich für diese heterogenen Studienergebnisse sein könnten. So erfolgt der Transport der Isoflavone zu ca. 50 % an Lipoproteine assoziiert und Lipoproteinprofile können sich in Abhängigkeit des Körperfettgehaltes bzw. der Körperfettverteilung unterscheiden, sodass ein Zusammenhang zwischen Körperfettgehalt bzw. Verteilung und Isoflavonwirkungen angenommen wurde. Ziel dieser Arbeit war es, einen umfassenden Überblick über die Rolle der Isoflavone im Fettstoffwechsel postmenopausaler Frauen zu geben. Die randomisierte, doppelblinde und Placebo-kontrollierte Humanstudie im Paralleldesign wurde mit 179 gesunden, postmenopausalen Frauen über einen Zeitraum von 12 Wochen durchgeführt. Die Isoflavonsupplementierung erfolgte mit einem frei verkäuflichen Sojaisoflavonextrakt in einer Dosierung von 117,4 mg/d (Genistein 49,7 %, Daidzein 41,4 %, Glycitein 9,0 %). Untersucht wurde der Einfluss der Intervention auf Serumlipidkonzentrationen und die Rezeptorexpression der fettstoffwechselrelevanten Rezeptoren LDLR und Scavengerrezeptor CD36 auf den Leukozyten. Zudem wurde erforscht, ob modulierende Einflüsse durch den Körperfett- bzw. Viszeralfettgehalt oder den Equolbildnerstatus auf die Isoflavonintervention bestehen. Weiterhin wurde eine Genexpressionsanalyse in Biopsaten des subkutanen Bauchfettgewebes durchgeführt, um differentiell exprimierte Gene des Energie- und Fettstoffwechsels in diesem aufzuzeigen. Zudem wurde untersucht, ob die Isoflavonintervention sich auf die Körperfettverteilung und Körperzusammensetzung auswirkt und ob Isoflavone und deren Metabolite im subkutanen Bauchfett nachgewiesen werden können.

Ein Einfluss der Isoflavonintervention konnte einzig auf die LDL-Cholesterolkonzentrationen nachgewiesen werden, die nach der 12-wöchigen Intervention um ca. 3,4 % erhöht waren. Die

Intervention hatte keinen Einfluss auf Gesamtcholesterol- und HDL-Cholesterolkonzentrationen. Eine Tendenz für einen Effekt zeigte sich hinsichtlich der Triglyzeridkonzentrationen, welche durch die Isoflavonintervention leicht anstiegen. Die LDLR- und CD36 Rezeptorexpressionen, wie auch die untersuchten Parameter der Körperzusammensetzung, zeigten keine Veränderung durch die Intervention. Ein Effekt des Körperfettanteils- bzw. der Menge an viszeralem Fettgewebe auf die Konzentrationen der Serumlipide und die LDLR- und CD36 Rezeptor-Expression konnte ebenfalls nicht festgestellt werden. Auch die Fähigkeit einiger Probandinnen, den Daidzeinmetabolit Equol bilden zu können, trug nicht zu veränderten Isoflavonwirkungen in diesen Frauen, verglichen zu Nicht-Equolbildnern bei. Im subkutanen Fettgewebe konnten keine differentiell exprimierte Gene zwischen der Placebo- und Isoflavongruppe festgestellt werden, auch wenn hier nach der 12-wöchigen Intervention Isoflavone nachzuweisen waren. Interventionsunabhängig kam es durch die Durchführung der Studie in zwei unterschiedlichen Jahreszeiten u. a. zu Effekten auf die LDL-Cholesterolkonzentrationen. Dieser saisonale Effekt führte zu einem Anstieg des LDL-Cholesterols um 3,5 %.

Zusammenfassend lässt sich demnach festhalten, dass die 12-wöchige Intervention mit 117,4 mg/d Sojaisoflavonextrakt, mit Ausnahme des moderaten Anstiegs der LDL-Cholesterolkonzentrationen, keinen Einfluss auf Parameter des Fettstoffwechsels gesunder postmenopausaler Frauen hatte. Dieser leichte Anstieg kann jedoch dadurch relativiert werden, dass ein Anstieg der LDL-Cholesterolkonzentrationen in vergleichbarer Höhe interventionsunabhängig auch allein durch die Durchführung der Studie in einer bestimmten Jahreszeit hätte auftreten können. Auch modulierende Effekte des Körperfettgehaltes bzw. der Menge an viszeralem Fettgewebe oder durch den Equolbildnerstatus lagen nicht vor. Die Ergebnisse dieser randomisierten, doppelblinden und Placebo-kontrollierten Studie lassen den Schluss zu, dass Isoflavone im Fettstoffwechsel postmenopausaler Frauen eher eine untergeordnete Rolle spielen.

Summary

Menopause is accompanied by hormonal alterations as well as changes in lipid and lipoprotein metabolism and is furthermore associated with alterations in body fat distribution, comprising the accumulation of visceral adipose tissue. These alterations lead to an increased risk of cardiovascular diseases in postmenopausal women. Epidemiological and cross sectional studies indicate lower incidence of cardiovascular diseases, osteoporosis and menopausal symptoms in postmenopausal women in Asian countries. This is assumed to be associated with a higher amount of soy in Asian diets. Soy isoflavones are believed to be the responsible substances and are therefore in the interest of scientific research. In western countries soy isoflavones are over the counter supplements and represent a potential alternative to hormone replacement therapies for postmenopausal women that suffer from menopausal symptoms. However, studies regarding effects of isoflavones on e.g. lipoprotein or serum lipid concentrations or other risk factors concerning cardiovascular diseases show heterogeneous results. It is conceivable that modulating factors exist which are responsible for these disparate results. It is known that the transport of isoflavones is to around 50 % associated to lipoproteins. Lipoprotein profiles can vary due to different body fat contents or body fat compositions. Therefore a direct interaction between body fat content or the amount of visceral adipose tissue and effects of isoflavones can be assumed. The objective of the presented work was to give a comprehensive overview about the role of isoflavones in the lipid metabolism of postmenopausal women. A randomized, double-blind and placebo-controlled study with 179 healthy postmenopausal women was conducted over a period of 12 weeks. An over the counter soy isoflavone extract was used as the intervention product (genistein 49.7 %, daidzein 41.4 %, glycitein 9.0 %) with a daily dosage of 117.4 mg.

Effects of isoflavones on serum lipid concentrations and the expression of LDLR and CD36 receptors on leukocytes were examined. Moreover a modulating effect of body fat content or rather the amount of visceral adipose tissue on isoflavone-effects was investigated. A further possible modulating factor could be the ability to produce the daidzein metabolite equol. Biopsies of subcutaneous adipose tissue were used to perform a gene expression analysis to show differentially expressed genes of lipid and energy metabolism due to the isoflavone intervention. Furthermore isoflavones and isoflavone metabolites were determined in these samples. Effects of isoflavones on body fat content and body composition were also investigated.

An effect of isoflavones on serum lipid concentrations was only shown for LDL-cholesterol concentrations, which rose around 3.4 % after 12 weeks of soy isoflavone intervention. No effects were shown for total cholesterol and HDL-cholesterol concentrations. Although not statistically significant there was an increase of triglyceride concentrations in the isoflavone supplemented group. Expression of LDLR and CD36 receptors as well as body composition parameters, were not affected through the intervention. The postulated effect of body fat content or rather the amount of visceral

adipose tissue on isoflavone effects on serum lipid concentrations and receptor expressions could not be proved. The ability to produce equol did not contribute to potential isoflavone effects in these women compared to women not able to produce equol. In subcutaneous adipose tissue genes of lipid or energy metabolism were not differentially expressed between the placebo and isoflavone group. However, isoflavones could be found in this tissue after 12 weeks of isoflavone intervention. Due to the performance of the study in two different seasons, effects on e. g. LDL-Cholesterol concentrations occurred independently of the intervention with isoflavones. This seasonal effect increased LDL-Cholesterol concentrations by 3.5 %.

Summarizing the aforementioned results, the intervention with 117.4 mg per day of soy isoflavone extract for 12 weeks did not affect parameters of lipid metabolism in healthy postmenopausal women, except a moderate rise in LDL-cholesterol concentrations. An increase of LDL-Cholesterol concentrations in a similar amount can also occur independently of the isoflavone intervention only through the performance of a study in a distinct season. Therefore, the moderate effect of isoflavones on LDL-Cholesterol concentrations can be qualified. A modulating effect of body fat content or rather the amount of visceral adipose tissue regarding isoflavone effects was not observed. It can be concluded that isoflavones exhibit only a minor role concerning lipidmetabolism of healthy postmenopausal women.

Anhang

Ergebnisse der Post-Treatment-Auswertung für Cholesterol-, LDL-Cholesterol-, HDL-Cholesterolkonzentrationen und TG-Konzentrationen, sowie LDLR- und CD36-Expression auf Leukozyten: Einfluss des Körperfettgehalts auf die Behandlung

Tabelle A1 Signifikante und tendenzielle Ergebnisse der Post-Treatment-Auswertung zur Untersuchung eines modulierenden Effektes des prozentualen Körperfettgehaltes auf die Intervention mit Isoflavonen bzw. Placebo. Die Tabelle beinhaltet ausschließlich Zielparameter, für die signifikante Interaktionseffekte aus Körperfettgehalt und Behandlung festgestellt wurden.

	Kategoriales Modell		Kontinuierliches Modell	
	Gesamt (p-Wert)	Periode 1 (p-Wert)	Periode 2 (p-Wert)	Gesamt (p-Wert)
Cholesterol ^{c)}	0,0010	0,0014	n.s.	0,00210
LDL-Cholesterol ^{c)}	0,0040	0,0047	n.s.	0,0306
HDL-Cholesterol ^{c)}	n.s.	n.s.	n.s.	0,01540
			(0,0547) ^{a)}	
Triglyzeride ^{c)}	n.s.	0,0445	n.s.	n.s.
LDLR ⁺ NK-Zellen	0,0338 ^{b)}	0,0182	n.s.	n.s.

^{a)} $0,05 < p < 0,10$

^{b)} Mittels Tukey HSD konnten keine Gruppenunterschiede aufgezeigt werden, daher erfolgt keine grafische Ergebnisdarstellung

^{c)} Für diese Parameter lag keine Baselinehomogenität der Konzentrationen vor, weswegen die hier festgestellten Effekte des Körperfettgehaltes auf den jeweiligen Parameter in Wahrheit nicht existieren. Die statistische Auswertung wurde entsprechend dieses Umstandes angepasst und die absoluten Differenzen (Differenz aus Endkonzentration und Ausgangskonzentration) als Zielparameter in das Modell aufgenommen. Die Ergebnisse sind dem Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit zu entnehmen (Kapitel 4.3.3).

Ergebnisse der Post-Treatment-Auswertung für Cholesterol-, LDL-Cholesterol-, HDL-Cholesterolkonzentrationen und TG-Konzentrationen, sowie LDLR- und CD36-Expression auf Leukozyten: Einfluss der Menge an viszeralem Fettgewebe auf die Behandlung

Tabelle A2 Signifikante und tendenzielle Ergebnisse der Post-Treatment-Auswertung zur Untersuchung eines modulierenden Effektes der Menge an Viszeralfett auf die Intervention mit Isoflavonen bzw. Placebo. Die Tabelle beinhaltet ausschließlich Zielparameter, für die signifikante Interaktionseffekte aus Körperfettgehalt und Behandlung festgestellt wurden.

	Kategoriales Modell			Kontinuierliches Modell
	Gesamt (p-Wert)	Periode 1 (p-Wert)	Periode 2 (p-Wert)	Gesamt (p-Wert)
Cholesterol ^{c)}	0,0012	0,0027	n.s.	0,000955
LDL-Cholesterol ^{c)}	0,0045	0,0064	n.s.	0,00786
HDL-Cholesterol ^{c)}	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Triglyzeride ^{c)}	n.s.	n.s.	n.s.	0,038
LDLR ⁺ B-Zellen (%)	n.s.	0,0275 ^{b)}	n.s.	n.s.
LDLR ⁺ B-Zellen (MFI)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
LDLR ⁺ NK-Zellen (MFI)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

^a 0,05 < p < 0,10

^b Mittels Tukey HSD konnten keine Gruppenunterschiede aufgezeigt werden, daher erfolgt keine grafische Ergebnisdarstellung

^c Für diese Parameter lag keine Baselinehomogenität der Konzentrationen vor, weswegen die hier festgestellten Effekte der Viszeralfettmenge auf den jeweiligen Parameter in Wahrheit nicht existieren. Die statistische Auswertung wurde entsprechend dieses Umstandes angepasst und die absoluten Differenzen (Differenz aus Endkonzentration und Ausgangskonzentration) als Zielparameter in das Modell aufgenommen. Die Ergebnisse sind dem Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit zu entnehmen (Kapitel 4.3.4).

Einfluss des prozentualen Körperfettgehalts auf die Behandlung

In Tabelle A3 sind die Baselinekonzentrationen der Zielp Parameter für die Untersuchung des Einflusses des Körperfettgehaltes auf die Behandlung in der ersten Periode zusammengestellt und in Tabelle A4 die Baselinekonzentrationen in der zweiten Periode.

Tabelle A3 Baselinecharakteristika der Frauen in der Placebo- bzw. Verumgruppe eingeteilt nach niedrigem (< 35 %) und hohem (≥ 35 %) Körperfettanteil in Periode 1

	Placebo		Verum	
	niedriger Körperfettgehalt (< 35 %)	hoher Körperfettgehalt (≥ 35 %)	niedriger Körperfettgehalt (< 35 %)	hoher Körperfettgehalt (≥ 35 %)
n	17	30	19	28
Cholesterol (mg/dL)	227 ± 47,7 ^a	216 ± 29,4 ^B	205 ± 23,8	237 ± 42,6 ^A
LDL-Cholesterol (mg/dL)	140 ± 42,9	138,3 ± 29,1 ^B	122 ± 24,6	156 ± 40,4 ^A
HDL-Cholesterol (mg/dL)	79,9 ± 10,0	68,3 ± 14,5 ^B	81,8 ± 22,0 ^B	68,5 ± 15,9 ^A
Triglyzeride (mg/dL)	83,4 ± 21,7	101 ± 35,5 ^B	73,0 ± 25,8 ^B	122 ± 71,8 ^A
LDLR ⁺	9,03 ± 4,02	8,56 ± 2,49	9,24 ± 2,59	8,82 ± 2,71
Gesamtlymphozyten (%)				
LDLR ⁺ T-Zellen (%)	5,63 ± 2,56	5,78 ± 2,66	5,26 ± 2,02	5,17 ± 2,91
LDLR ⁺ B-Zellen (%)	9,51 ± 4,27	9,02 ± 3,14	10,1 ± 4,29	9,08 ± 2,49
LDLR ⁺ NK-Zellen (%)	19,23 ± 7,78	23,3 ± 5,61	24,4 ± 6,87	23,07 ± 5,35
LDLR ⁺ T-Zellen (MFI)	233,53 ± 24,85	222 ± 26,9	232 ± 29,7	234 ± 44,0
LDLR ⁺ B-Zellen (MFI)	375 ± 74,2	372 ± 108	357 ± 94,7	373 ± 87,1
LDLR ⁺ NK-Zellen (MFI)	250 ± 26,4 ^{AB}	273 ± 40,0 ^B	254 ± 33,7 ^{AB}	241 ± 35,3 ^A
CD36 ⁺ Monozyten (%)	91,9 ± 2,46	91,9 ± 3,05	92,5 ± 2,16	91,4 ± 2,7
CD36 ⁺ Monozyten (MFI)	12719 ± 3074	14830 ± 6184	11708 ± 4987	14332 ± 5557

^{a)} MW ± SD (gilt für alle Werte in dieser Tabelle)

A, B: Gruppen mit unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet (Tukey HSD Test); es sind nur die für die Auswertung relevanten Unterschiede gekennzeichnet

Tabelle A4 Baselinecharakteristika der Frauen in der Placebo- bzw. Verumgruppe eingeteilt nach niedrigem (< 35 %) und hohem (≥ 35 %) Körperfettanteil in Periode 2

n	Placebo		Verum	
	< 35 %	≥ 35 %	< 35 %	≥ 35 %
	15	22	14	24
Cholesterol (mg/dL)	234 ± 33,5 ^{a)}	227 ± 27,8	219 ± 26,4	237 ± 24,9
LDL-Cholesterol (mg/dL)	143 ± 30,0	149 ± 28,6	139 ± 25,1	157 ± 26,4
HDL-Cholesterol (mg/dL)	93,1 ± 16,2 ^B	73,7 ± 16,4 ^B	77,1 ± 13,6 ^B	76,3 ± 12,4 ^A
Triglyzeride (mg/dL)	73,4 ± 18,2	101 ± 37,8	88,4 ± 29,9	90,0 ± 30,5
LDLR ⁺	10,2 ± 2,57	11,5 ± 2,87	11,8 ± 4,87	9,50 ± 3,55
Gesamtlymphozyten (%)				
LDLR ⁺ T-Zellen (%)	5,79 ± 1,82	7,23 ± 2,87	7,56 ± 4,04	5,94 ± 2,98
LDLR ⁺ B-Zellen (%)	8,80 ± 4,69	9,0 ± 4,15	11,6 ± 6,90	8,23 ± 4,00
LDLR ⁺ NK-Zellen (%)	28,0 ± 6,56	28,6 ± 6,98	28,56 ± 7,95	24,8 ± 8,30
LDLR ⁺ T-Zellen (MFI)	246 ± 36,7	231 ± 19,6	225 ± 20,4	227 ± 19,1
LDLR ⁺ B-Zellen (MFI)	501 ± 212	464 ± 163	480 ± 255	526 ± 243
LDLR ⁺ NK-Zellen (MFI)	247 ± 27,2	246 ± 37,3	242 ± 17,5	253 ± 40,1
CD36 ⁺ Monozyten (%)	91,6 ± 2,43	91,5 ± 2,19	92,4 ± 2,66	91,8 ± 2,8
CD36 ⁺ Monozyten (MFI)	11120 ± 3803	1245 ± 2585	14136 ± 4508	12810 ± 2451

^{a)} MW ± SD (gilt für alle Werte in dieser Tabelle)

A, B: Gruppen mit unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet (Tukey HSD Test); es sind nur die für die Auswertung relevanten Unterschiede gekennzeichnet

Einfluss der Menge an viszeralem Fett auf die Behandlung

In Tabelle A5 sind die Baselinekonzentrationen der Zielp Parameter für die Untersuchung des Einflusses der Menge an viszeralem Fett auf die Behandlung in der ersten Periode zusammengestellt und in Tabelle A 6 die Baselinekonzentrationen in der zweiten Periode.

Tabelle A5 Baselinekonzentrationen der Serumlipide sowie der LDLR- und CD36-Expression auf Leukozyten in postmenopausalen Frauen gruppiert nach niedrigem (< 800 g) und hohem (\geq 800 g) viszeralem Fettgehalt in der Verum oder Placebogruppe in Periode 1

	Placebo		Verum	
	Niedriger Viszeralfettgehalt ($<$ 800 g)	Hoher Viszeralfettgehalt (\geq 800 g)	Niedriger Viszeralfettgehalt ($<$ 800 g)	Hoher Viszeralfettgehalt (\geq 800 g)
n	29	18	28	19
Cholesterol (mg/dL)	225 \pm 40,3 ^a	211 \pm 30,3	212 \pm 29,4 ^B	243 \pm 44,7 ^A
LDL-Cholesterol (mg/dL)	141 \pm 37,1	136 \pm 30,4	129 \pm 29,8	162 \pm 42,2
HDL-Cholesterol (mg/dL)	76,8 \pm 12,7	65,6 \pm 13,7	78,4 \pm 20,7	67,3 \pm 16,0
Triglyzeride (mg/dL)	87,0 \pm 26,3	107 \pm 37,1 ^B	80,3 \pm 26,8 ^B	135 \pm 83,0 ^A
LDLR ⁺	8,65 \pm 3,47	8,80 \pm 2,48	8,99 \pm 2,58	8,99 \pm 2,79
Gesamtlymphozyten (%)				
LDLR ⁺ T-Zellen (%)	5,52 \pm 2,77	6,04 \pm 2,35	5,25 \pm 2,33	5,13 \pm 2,93
LDLR ⁺ B-Zellen (%)	8,94 \pm 3,83	9,58 \pm 3,16	9,79 \pm 3,76	9,05 \pm 2,61
LDLR ⁺ NK-Zellen (%)	21,1 \pm 7,22	23,3 \pm 5,60	23,8 \pm 6,67	23,3 \pm 4,96
LDLR ⁺ T-Zellen (MFI)	232 \pm 24,2	216 \pm 27,8	231 \pm 27,5	237 \pm 50,9
LDLR ⁺ B-Zellen (MFI)	359 \pm 78,4	396 \pm 118	348 \pm 91,3	394 \pm 81,8
LDLR ⁺ NK-Zellen (MFI)	256 \pm 30,6 ^{AB}	279 \pm 42,6 ^B	253 \pm 35,2 ^{AB}	236 \pm 32,7 ^A
CD36 ⁺ Monozyten (%)	92,1 \pm 2,62	91,7 \pm 3,17	92,2 \pm 2,52	91,3 \pm 2,6
CD36 ⁺ Monozyten (MFI)	13684 \pm 6071	14704 \pm 3746	12431 \pm 4422	14650 \pm 6493

^{a)} MW \pm SD (gilt für alle Werte in der Tabelle)

A, B: Gruppen mit unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet (Tukey HSD Test); es sind nur die für die Auswertung relevanten Unterschiede gekennzeichnet

Tabelle A 6 Baselinekonzentrationen der Serumlipide sowie der LDLR- und CD36-Expression auf Leukozyten in postmenopausalen Frauen gruppiert nach niedrigem (< 800 g) und hohem (\geq 800 g) viszeralen Fettgehalt in der Verum oder Placebogruppe in Periode 2

n	Placebo		Verum	
	< 800 g	\geq 800 g	< 800 g	\geq 800 g
	23	14	23	15
Cholesterol (mg/dL)	236 \pm 29,0 ^a	219 \pm 29,8	227 \pm 29,3	236 \pm 21,6
LDL-Cholesterol (mg/dL)	148 \pm 27,8	144 \pm 31,6	146 \pm 27,9	157 \pm 24,4
HDL-Cholesterol (mg/dL)	88,9 \pm 17,1	69,6 \pm 15,3 ^B	77,7 \pm 12,9 ^B	74,8 \pm 12,5 ^A
Triglyzeride (mg/dL)	79,0 \pm 25,1	107 \pm 38,7 ^B	85,7 \pm 26,4	95,1 \pm 34,6 ^A
LDLR ⁺	9,89 \pm 2,47	12,7 \pm 2,48	10,4 \pm 4,83	10,2 \pm 3,07
Gesamtlymphozyten (%)				
LDLR ⁺ T-Zellen (%)	5,85 \pm 2,05	8,01 \pm 2,84	6,52 \pm 3,76	6,57 \pm 3,05
LDLR ⁺ B-Zellen (%)	8,23 \pm 4,35	10,1 \pm 4,17	9,53 \pm 6,43	9,41 \pm 3,67
LDLR ⁺ NK-Zellen (%)	26,6 \pm 6,30	31,2 \pm 6,70	25,9 \pm 9,25	26,5 \pm 6,80
LDLR ⁺ T-Zellen (MFI)	242 \pm 32,5	230 \pm 18,9	228 \pm 18,7	222 \pm 20,3
LDLR ⁺ B-Zellen (MFI)	492 \pm 200	457 \pm 156	490 \pm 251	537 \pm 241
LDLR ⁺ NK-Zellen (MFI)	246 \pm 27,7	248 \pm 41,4	248 \pm 24,5	251 \pm 44,9
CD36 ⁺ Monozyten (%)	91,6 \pm 2,24	91,6 \pm 2,38	91,6 \pm 2,63	92,7 \pm 2,76
CD36 ⁺ Monozyten (MFI)	10881 \pm 3467	13695 \pm 3509	13361 \pm 3931	13240 \pm 2557

^{a)} MW \pm SD (gilt für alle Werte in der Tabelle)

A, B, AB: Gruppen mit unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet (Tukey HSD Test); es sind nur die für die Auswertung relevanten Unterschiede gekennzeichnet.

Einflüsse auf die Behandlung hervorgerufen durch die Durchführung der Studie in zwei Perioden (Saisonale Effekte)

Aus Tabelle A7 sind die saisonalen Effekte auf LDLR- und CD36-Expression, Serumlipide, Körperzusammensetzung und die Hormone zu entnehmen. Saisonale Effekte sind Effekte, die über den Studienzeitraum hinweg auftreten und sich zwischen den Perioden unterscheiden. Es liegt die Annahme zugrunde, dass saisonale Effekte unabhängig von der Intervention auftreten und Interventionseffekte nicht beeinflussen. In Tabelle A8 sind die saisonalen Effekte und deren Effektrichtungen auf die Parameter der Körperzusammensetzung dargestellt.

Tabelle A7 Saisonale Effekte auf LDLR- und CD36-Expression, Serumlipide sowie Körperzusammensetzung und Hormonkonzentrationen

	Periode 1				Periode 2				P-Wert
	Baseline	12 Wochen	Baseline	12 Wochen	Baseline	12 Wochen	Baseline	12 Wochen	
	n ^{a)}		n		n		n		
LDL-Rezeptor									
Lymphozyten (%)	91	8,78 ^{b)} ± 2,97	91	10,2 ± 3,55	75	10,6 ± 3,64	75	9,44 ± 3,27	<0,0001
CD3 ⁺ (T-Zellen) (%)	93	5,42 ± 2,66	93	7,03 ± 3,94	75	6,6 ± 3,11	75	5,69 ± 2,89	<0,0001
CD19 ⁺ (B-Zellen) (%)	92	9,26 ± 3,56	93	8,16 ± 4,82	75	9,21 ± 5,02	75	9,73 ± 4,35	0,0791
CD3 ⁺ CD19 ⁻ (NK-Zellen) (%)	92	22,6 ± 6,72	93	24,4 ± 7,43	75	27,2 ± 7,77	75	25,6 ± 7,91	0,0165
MFI CD3 ⁺ (T-Zellen)	93	230 ± 33,7	93	256 ± 56,8	75	231 ± 25,3	75	212 ± 22,8	<0,0001
MFI CD19 ⁺ (B-Zellen)	92	371 ± 94,7	93	505 ± 210	75	494 ± 221	75	347 ± 106	<0,0001
MFI CD3 ⁺ CD19 ⁻ (NK-Zellen)	92	257 ± 38,4	93	271 ± 43,2	75	248 ± 34,1	75	224 ± 26,6	<0,0001
CD36 Rezeptor									
Monozyten (%)	93	91,9 ± 2,75	93	93,2 ± 2,58	72	91,8 ± 2,55	72	87,0 ± 4,38	<0,0001
Lymphozyten (%)	93	6,02 ± 2,35	93	8,86 ± 2,79	68	8,52 ± 2,66	67	6,27 ± 2,45	<0,0001
MFI Monozyten	80	13736 ± 5442	80	16556 ± 6581	73	12614 ± 3683	73	12651 ± 3700	0,0002
Blutlipide									
Gesamtcholesterol (mg/dL)	95	222 ± 38,6	95	228 ± 38,3	75	230 ± 28,9	75	236 ± 31,7	0,8131
LDL-Cholesterol (mg/dL)	95	141 ± 36,9	95	146 ± 37,0	75	148 ± 28,5	75	147 ± 28,2	0,0107
LDL-Cholesterol <160 mg/dL	71	125 ± 21,8	71	131 ± 24,9	47	131 ± 18,6	47	133 ± 21,4	0,2116
LDL-Cholesterol >160 mg/dL	24	187 ± 32,6	24	190 ± 31,2	28	178 ± 14,1	28	172 ± 20,8	0,0014
HDL-Cholesterol (mg/dL)	95	73,5 ± 17,	95	74,5 ± 17,8	75	79,0 ± 16,4	75	80,6 ± 19,3	0,9545
Triglyzeride (mg/dL)	95	98,3 ± 50,1	95	97,4 ± 39,1	75	89,6 ± 32,3	75	90,3 ± 32,4	0,8250
Körperzusammensetzung									
Gewicht (kg)	95	68,7 ± 11,1	95	69,1 ± 11,3	75	67,6 ± 11,8	75	67,5 ± 11,9	0,0080
Körperfettanteil (%)	94	37,5 ± 6,6	94	37,6 ± 6,6	75	37,2 ± 6,6	75	36,8 ± 6,6	0,0040
Viszerales Fettgewebe (g)	94	775 ± 601	94	766 ± 581	75	672 ± 537	75	667 ± 532	0,9500

	Periode 1				Periode 2				P-Wert
	Baseline		12 Wochen		Baseline		12 Wochen		
	n		n		n		n		
Hormone									
T3 (pg/mL)	95	3,22 ± 0,35	95	3,07 ± 0,31	75	3,15 ± 0,32	75	2,91 ± 0,29	0,0894
T4 (ng/mL)	95	0,82 ± 0,14	95	0,85 ± 0,14	75	0,85 ± 0,12	75	0,85 ± 0,12	0,0718
TSHB (µU/mL)	95	1,53 ± 1,06	95	1,67 ± 1,50	75	1,44 ± 0,84	75	1,36 ± 0,83	0,6185
Insulin (µIU/mL)	95	9,45 ± 4,05	95	9,69 ± 4,35	75	9,42 ± 4,02	75	10,4 ± 5,12	0,0545
Leptin (ng/mL)	95	13,9 ± 9,08	95	14,8 ± 9,26	75	14,1 ± 8,02	75	13,7 ± 8,59	0,0076
SHBG (nmol/L)	95	73,3 ± 29,6	95	72,7 ± 26,2	75	79,8 ± 30,6	75	78,1 ± 29,3	0,1341
Estradiol (pg/mL)	87	8,63 ± 12,4	87	8,74 ± 12,3	66	10,1 ± 20,6	66	10,2 ± 17,6	0,4183

a) Anzahl kann aufgrund von nicht-messbaren Proben variieren

b) MW ± SD (gilt für alle Werte in dieser Tabelle)

Tabelle A8 Saisonale Effekte und deren Effektrichtung auf Parameter der Körperzusammensetzung

Parameter	Saisonaler Effekt (Periode/ Richtung)	p-Wert
Gewicht	Periode 1 ↑	0,0080 ^a
BMI	Periode 1 ↑	0,0084 ^a
Körperfettanteil	Periode 2 ↓	0,0040 ^a
Fettmasse	Periode 2 ↓	0,0012 ^a
Viszerale Fettgewebsmasse	-	0,9474
Subkutanes Bauchfett	-	0,1222
Fettanteil Gewebe	Periode 2 ↓	0,0039 ^a
Magermasse	-	0,7359
Gewebemasse	Periode 1 ↑	0,0150 ^a
Fettfreie Masse	-	0,7279
Androide Region	-	0,5475
Gynoide Region	Periode 1 ↑ Periode 2 ↓	<0,0001 ^a
Knochenmasse	-	0,7648
Knochendichte	-	0,0506 ^b
Fettmasseindex	Periode 2 ↓	0,0015 ^a
Magermasseindex	-	0,6573

^a= signifikanter saisonaler Effekt ($p \leq 0,05$); ^b= tendenziell signifikanter saisonaler Effekt ($0,05 < p < 0,10$)

Gene Set Enrichment Analysis Ergebnisse der reprimierten Gene

Tabelle A9 Übersicht über die innerhalb der 52 reprimiert exprimierten Gene in der GO-Kategorie „Molekulare Funktion“ überrepräsentierten 19 Prozesse

GO ID	Name	adjP	
GO:0016717	oxidoreductase activity, acting on paired donors, with oxidation of a pair of donors resulting in the reduction of molecular oxygen to two molecules of water	0,0085	FADS1, FADS2
GO:0030492	hemoglobin binding	0,0085	HP, HPR
GO:0032550	purine ribonucleoside binding	0,0477	DIRAS3, DNAH8, ABCB5, ABCC11, ACOT12, AACS, MSH5, CACNA1B, TTLL9, MORC1, DNAH7
GO:0030554	adenyl nucleotide binding	0,0477	DNAH8, ABCB5, ABCC11, ACOT12, AACS, MSH5, CACNA1B, TTLL9, MORC1, DNAH7
GO:0032553	ribonucleotide binding	0,0477	DIRAS3, PDE6C, DNAH8, ABCB5, ABCC11, ACOT12, AACS, MSH5, CACNA1B, TTLL9, MORC1, DNAH7
GO:0016705	oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen	0,0477	FADS1, FADS2, CYP4F22
GO:0043168	anion binding	0,0477	DIRAS3, PDE6C, DNAH8, ABCB5, ABCC11, ACOT12, AACS, MSH5, G6PC, CACNA1B, TTLL9, MORC1, DNAH7
GO:0032559	adenyl ribonucleotide binding	0,0477	DNAH8, ABCB5, ABCC11, ACOT12, AACS, MSH5, CACNA1B, TTLL9, MORC1, DNAH7
GO:0001882	nucleoside binding	0,0477	DIRAS3, DNAH8, ABCB5, ABCC11, ACOT12, AACS, MSH5, CACNA1B, TTLL9, MORC1, DNAH7
GO:0032549	ribonucleoside binding	0,0477	DIRAS3, DNAH8, ABCB5, ABCC11, ACOT12, AACS, MSH5, CACNA1B, TTLL9, MORC1, DNAH7

GO ID	Name	adjP	
GO:0005524	ATP binding	0,0477	DNAH8, ABCB5, ABCC11, ACOT12, AACS, MSH5, CACNA1B, TTLL9, MORC1, DNAH7
GO:0046906	tetrapyrrole binding	0,0477	FADS1, FADS2, CYP4F22
GO:0043167	ion binding	0,0477	DSC3, FADS1, FADS2, DNAH8, ABCB5, ABCC11, AACS, MSH5, MORC1, DNAH7, OIT3, ZNF20, DIRAS3, PDE6C, TRIM55, ACOT12, MMP8, CYP4F22, FBXO40, G6PC, RFPL4B, CACNA1B, TTLL9, CRP, UNC13C
GO:0032555	purine ribonucleotide binding	0,0477	DIRAS3, PDE6C, DNAH8, ABCB5, ABCC11, ACOT12, AACS, MSH5, CACNA1B, TTLL9, MORC1, DNAH7
GO:0001883	purine nucleoside binding	0,0477	DIRAS3, DNAH8, ABCB5, ABCC11, ACOT12, AACS, MSH5, CACNA1B, TTLL9, MORC1, DNAH7
GO:0017076	purine nucleotide binding	0,0477	DIRAS3, PDE6C, DNAH8, ABCB5, ABCC11, ACOT12, AACS, MSH5, CACNA1B, TTLL9, MORC1, DNAH7
GO:0035639	purine ribonucleoside triphosphate binding	0,0477	DIRAS3, DNAH8, ABCB5, ABCC11, ACOT12, AACS, MSH5, CACNA1B, TTLL9, MORC1, DNAH7
GO:0020037	heme binding	0,0477	FADS1, FADS2, CYP4F22

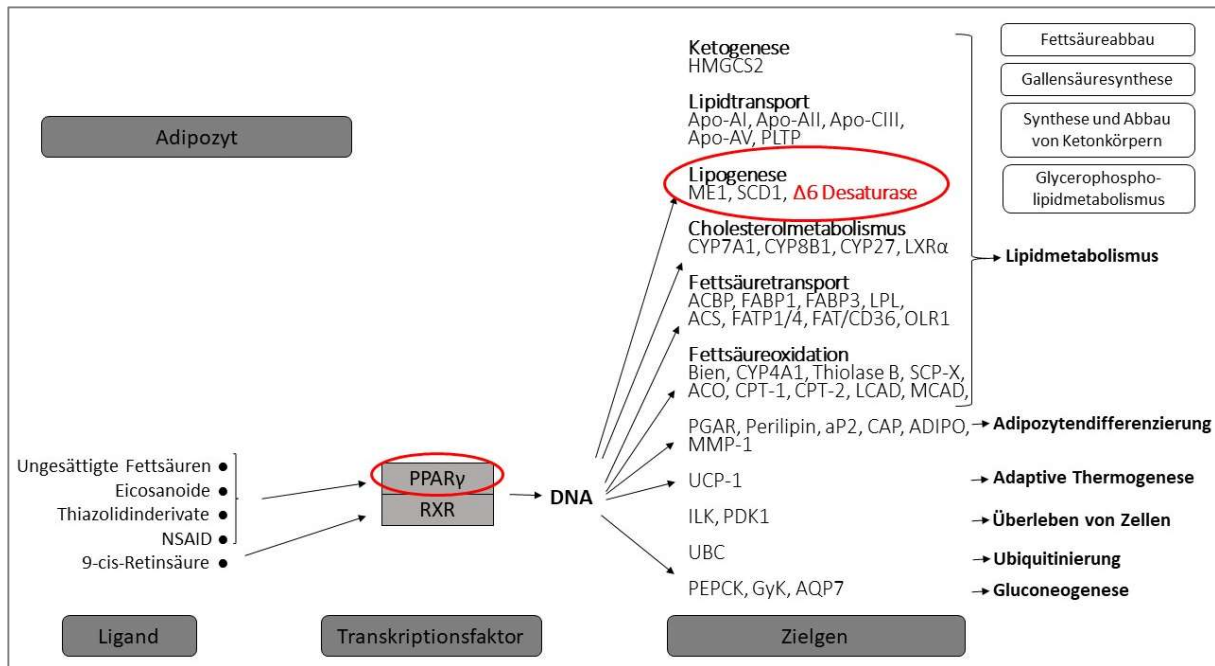


Abbildung A1 PPAR γ Signalweg in Adipozyten. In der vorliegenden Studie war das im Fettgewebe durch PPAR γ regulierte Gen FADS2, dessen Genprodukt an der Lipogenese beteiligt ist (Desaturase), im Fettgewebe isoflavonsupplementierter Frauen verglichen mit placebosupplementierten Frauen herunterreguliert (rote Kreise). Abbildung modifiziert nach KEGG Mapper Search Pathway http://www.genome.jp/kegg/tool/map_pathway1.html, © bei Kanehisa Laboratories, 03320 6/3/16, zuletzt besucht am 23.06.2017.



Literaturverzeichnis

- Abbadia, Z., Vericel, E., Mathevet, P., Bertin, N., Panaye, G., Frappart, L. 1997: Fatty Acid Composition and CD36 Expression in Breast Adipose Tissue of Premenopausal and Postmenopausal Women. *Anticancer Res* 17 (2A); 1217-1221.
- Abbey, M., Owen, A., Suzakawa, M., Roach, P., Nestel, P. J. 1999: Effects of Menopause and Hormone Replacement Therapy on Plasma Lipids, Lipoproteins and LDL-Receptor Activity. *Maturitas* 33 (3); 259-269.
- Abumrad, N. A., el-Maghrabi, M. R., Amri, E. Z., Lopez, E., Grimaldi, P. A. 1993: Cloning of a Rat Adipocyte Membrane Protein Implicated in Binding or Transport of Long-Chain Fatty Acids That Is Induced During Preadipocyte Differentiation. Homology With Human CD36. *J Biol Chem.* 268 (24); 17665-17668.
- Adlercreutz, H., Fotsis, T., Bannwart, C., Wahala, K., Makela, T., Brunow, G., Hase, T. 1986: Determination of Urinary Lignans and Phytoestrogen Metabolites, Potential Antiestrogens and Anticarcinogens, in Urine of Women on Various Habitual Diets. *J Steroid Biochem.* 25 (5B); 791-797.
- Adlercreutz, H., Fotsis, T., Lampe, J., Wahala, K., Makela, T., Brunow, G., Hase, T. 1993: Quantitative Determination of Lignans and Isoflavonoids in Plasma of Omnivorous and Vegetarian Women by Isotope Dilution Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Scand. J Clin Lab Invest Suppl* 215; 5-18.
- Adlercreutz, H., Honjo, H., Higashi, A., Fotsis, T., Hamalainen, E., Hasegawa, T., Okada, H. 1991: Urinary Excretion of Lignans and Isoflavonoid Phytoestrogens in Japanese Men and Women Consuming a Traditional Japanese Diet. *Am J Clin Nutr* 54 (6); 1093-1100.
- Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M., Fukami, Y. 1987: Genistein, a Specific Inhibitor of Tyrosine-Specific Protein Kinases. *J Biol Chem* 262 (12); 5592-5595.
- Angel, A., D'Costa, M.A., Yuen, R. 1979: Low density lipoprotein binding, internalization, and degradation in human adipose cells. *Can J Biochem.* 57 (6); 578-87.
- Anty, R., Bekri, S., Luciani, N., Saint-Paul, M. C., Dahman, M., Iannelli, A., Amor, I. B., Staccini-Myx, A., Huet, P. M., Gugenheim, J., Sadoul, J. L., Le Marchand-Brustel, Y., Tran, A., Gual, P. 2006: The Inflammatory C-Reactive Protein Is Increased in Both Liver and Adipose Tissue in Severely Obese Patients Independently From Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes, and NASH. *Am J Gastroenterol.* 101 (8); 1824-1833.
- Arca, M., Vega, G. L., Grundy, S. M. 1994: Hypercholesterolemia in Postmenopausal Women. Metabolic Defects and Response to Low-Dose Lovastatin. *JAMA* 271 (6); 453-459.
- Arora, A., Nair, M. G., Strasburg, G. M. 1998: Antioxidant Activities of Isoflavones and Their Biological Metabolites in a Liposomal System. *Arch. Biochem. Biophys.* 356 (2); 133-141.
- Atkinson, C., Frankenfeld C. L., Lampe, J. W. 2005: Gut Bacterial Metabolism of the Soy Isoflavone Daidzein: Exploring the Relevance to Human Health. *Exp Biol Med (Maywood)* 230 (3); 155-170.
- Aubertin-Leheudre, M., Lord, C., Khalil, A., Dionne, I. J. 2008: Isoflavones and Clinical Cardiovascular Risk Factors in Obese Postmenopausal Women: a Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Trial. *J Womens Health (Larchmt.)* 17 (8); 1363-1369.

- Badeau, R., Jauhiainen, M., Metso, J., Nikander, E., Tikkanen, M. J., Ylikorkala, O., Mikkola, T. S. 2007: Effect of Isolated Isoflavone Supplementation on ABCA1-Dependent Cholesterol Efflux Potential in Postmenopausal Women. *Menopause*. 14 (2); 293-299.
- Bakker, O., Hudig, F., Meijssen, S., Wiersinga, W. M. 1998: Effects of Triiodothyronine and Amiodarone on the Promoter of the Human LDL Receptor Gene. *Biochem. Biophys. Res Commun*. 249 (2); 517-521.
- Baltzer, J. et Graf, M. 2004: Gynäkologie. In Baltzer, J., Friese, K., Graf, M., Wolff, F., *Praxis der Gynäkologie und Geburtshilfe*, 338-583. Stuttgart: Thieme.
- Barbaras, R., Grimaldi, P., Negrel, R., Ailhaud, G. 1985: Binding of Lipoproteins and Regulation of Cholesterol Synthesis in Cultured Mouse Adipose Cells. *Biochim. Biophys. Acta* 845 (3); 492-501.
- Barnes, S. 2010: The Biochemistry, Chemistry and Physiology of the Isoflavones in Soybeans and Their Food Products. *Lymphat. Res. Biol.* 8 (1); 89-98.
- Barnwell, J. W., Ockenhouse, C. F., Knowles, D. M. 1985: Monoclonal Antibody OKM5 Inhibits the in Vitro Binding of Plasmodium Falciparum-Infected Erythrocytes to Monocytes, Endothelial, and C32 Melanoma Cells. *J Immunol.* 135 (5); 3494-3497.
- Baum, J. A., Teng, H., Erdman, J. W., Jr., Weigel, R. M., Klein, B. P., Persky, V. W., Freels, S., Surya, P., Bakhit, R. M., Ramos, E., Shay, N. F., Potter, S. M. 1998: Long-Term Intake of Soy Protein Improves Blood Lipid Profiles and Increases Mononuclear Cell Low-Density-Lipoprotein Receptor Messenger RNA in Hypercholesterolemic, Postmenopausal Women. *Am. J. Clin. Nutr.* 68 (3); 545-551.
- Bays, H. E., Toth, P. P., Kris-Etherton, P. M., Abate, N., Aronne, L. J., Brown, W. V., Gonzalez-Campoy, J. M., Jones, S. R., Kumar, R., La, F. R., Samuel, V. T. 2013: Obesity, Adiposity, and Dyslipidemia: a Consensus Statement From the National Lipid Association. *J Clin Lipidol.* 7 (4); 304-383.
- Benjamini, Y. et Hochberg, Y. 1995: Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. 57 (1); 289-300.
- Berneis, K. K. et Krauss, R. M. 2002: Metabolic Origins and Clinical Significance of LDL Heterogeneity. *J Lipid Res* 43 (9); 1363-1379.
- Beylot, M. 2014: Metabolism of White Adipose Tissue. In Fantuzzi, G., Braunschweig, C., *Adipose Tissue and Adipokines in Health and Disease, Nutrition and Health*, 33-52. New York: Springer.
- BfR 2015: Nahrungsergänzungsmittel mit isolierten Isoflavonen: Bei Einnahme in und nach den Wechseljahren Orientierungswerte für Dosierung und Anwendungsdauer einhalten Mitteilung Nr. 043/2015 des BfR vom 16. November 2015. <http://www.bfr.bund.de> Mitteilung Nr. 043/2015, letzmaliger Zugriff: 03.09.2017.
- Bhagwat, S., Haytowitz, D. B., Holden, J. M. 2008: USDA Database for the Isoflavone Content of Selected Foods, Release 2.0. U. S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Nutrient Data Laboratory Home Page. https://data.nal.usda.gov/dataset/usda-database-isoflavone-content-selected-foods-release-20_108, letzmaliger Zugriff: 05.09.2017.

- Birru, R. L., Ahuja, V., Vishnu, A., Evans, R. W., Miyamoto, Y., Miura, K., Usui, T., Sekikawa, A. 2016: The Impact of Equol-Producing Status in Modifying the Effect of Soya Isoflavones on Risk Factors for CHD: a Systematic Review of Randomised Controlled Trials. *J Nutr Sci.* 5e30
- Björntorp, P. 1990: "Portal" Adipose Tissue As a Generator of Risk Factors for Cardiovascular Disease and Diabetes. *Arteriosclerosis* 10 (4); 493-496.
- Bonen, A., Tandon N. N., Glatz J. F., Luiken J. J., Heigenhauser, G. J. 2006: The Fatty Acid Transporter FAT/CD36 Is Upregulated in Subcutaneous and Visceral Adipose Tissues in Human Obesity and Type 2 Diabetes. *International Journal of Obesity* 30 (6); 877-883.
- Brown, M. S. et Goldstein, J. L. 1983: Lipoprotein Receptors in the Liver. Control Signals for Plasma Cholesterol Traffic. *J Clin Invest* 72 (3); 743-747.
- Brown, M. S. et Goldstein, J. L. 1986: A Receptor-Mediated Pathway for Cholesterol Homeostasis. *Science* 232 (4746); 34-47.
- Brown, M. S., Kovanen, P. T., Goldstein, J. L. 1981: Regulation of Plasma Cholesterol by Lipoprotein Receptors. *Science* 212 (4495); 628-635.
- Buchowski, M. S., Choi, L., Majchrzak, K. M., Acra, S., Mathews, C. E., Chen, K. Y. 2009: Seasonal Changes in Amount and Patterns of Physical Activity in Women. *J Phys. Act. Health* 6 (2); 252-261.
- Buckley, D. I., Fu, R., Freeman, M., Rogers, K., Helfand, M. 2009: C-Reactive Protein As a Risk Factor for Coronary Heart Disease: a Systematic Review and Meta-Analyses for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 151 (7); 483-495.
- Budhram-Mahadeo, V., Parker, M., Latchman, D. S. 1998: POU Transcription Factors Brn-3a and Brn-3b Interact With the Estrogen Receptor and Differentially Regulate Transcriptional Activity Via an Estrogen Response Element. *Mol Cell Biol* 18 (2); 1029-1041.
- Caligiuri, M. A. 2008: Human Natural Killer Cells. *Blood* 112 (3); 461-469.
- Campbell, S. C., Khalil, D. A., Payton, M. E., Arjmandi, B. H. 2010: One-Year Soy Protein Supplementation Does Not Improve Lipid Profile in Postmenopausal Women. *Menopause.* 17 (3); 587-593.
- Campos, H., McNamara J. R., Wilson P. W., Ordovas J. M., Schaefer, E. J. 1988: Differences in Low Density Lipoprotein Subfractions and Apolipoproteins in Premenopausal and Postmenopausal Women. *J Clin Endocrinol Metab.* 67 (1); 30-35.
- Cao, Y. K., Zhang, S. F., Zou, S. E., Xia, X. 2013: Daidzein Improves Insulin Resistance in Ovariectomized Rats. *Climacteric.* 16 (1); 111-116.
- Caruso, M. G., Messa, C., Orlando, A., D'Attoma, B., Notarnicola, M. 2008: Early Induction of LDL Receptor Gene Expression by Genistein in DLD-1 Colon Cancer Cell Line. *Fitoterapia* 79 (7-8); 524-528.
- Cassidy, A. 2005: Dietary Phyto-Oestrogens: Molecular Mechanisms, Bioavailability and Importance to Menopausal Health. *Nutrition Research Reviews.* 18 (2); 183-201.
- Cassidy, A., de Pascual, T. S., Rimbach, G. 2003: Molecular Mechanisms by Which Dietary Isoflavones Potentially Prevent Atherosclerosis. *Expert. Rev. Mol Med* 5 (24); 1-15.

- Chancharme, L., Therond, P., Nigon, F., Lepage, S., Couturier, M., Chapman, M. J. 1999: Cholesteryl Ester Hydroperoxide Lability Is a Key Feature of the Oxidative Susceptibility of Small, Dense LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19 (3); 810-820.
- Cho, E. J., Min, Y. J., Oh, M. S., Kwon, J. E., Kim, J. E., Lee, W. S., Lee, K. J., Kim, S. W., Kim, T. H., Kim, M. A., Kim, C. J., Ryu, W. S. 2011: Effects of the Transition From Premenopause to Postmenopause on Lipids and Lipoproteins: Quantification and Related Parameters. *Korean J. Intern. Med.* 26 (1); 47-53.
- Choi, M. S., Lee, W. H., Kwon, E. Y., Kang, M. A., Lee, M. K., Park, Y. B., Jeon, S. M. 2007: Effects of Soy Pinitol on the Pro-Inflammatory Cytokines and Scavenger Receptors in Oxidized Low-Density Lipoprotein-Treated THP-1 Macrophages. *J Med Food* 10 (4); 594-601.
- Cignarella, A., Kratz, M., Bolego, C. 2010: Emerging Role of Estrogen in the Control of Cardiometabolic Disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 31 (4); 183-189.
- Cinti, S. 2012: The Adipose Organ at a Glance. *Dis Model Mech* 5 (5); 588-594.
- Coelho, M., Oliveira, T., Fernandes, R. 2013: Biochemistry of Adipose Tissue: an Endocrine Organ. *Arch. Med Sci.* 9 (2); 191-200.
- Col, N. F., Eckman, M. H., Karas, R. H., Pauker, S. G., Goldberg, R. J., Ross, E. M., Orr, R. K., Wong, J. B. 1997: Patient-Specific Decisions About Hormone Replacement Therapy in Postmenopausal Women. *JAMA* 277 (14); 1140-1147.
- Cooke, P. S. et Naaz, A. 2004: Role of Estrogens in Adipocyte Development and Function. *Exp Biol Med.* 229 (11); 1127-35.
- Couse, J. F. et Korach, K. S. 1999: Estrogen Receptor Null Mice: What Have We Learned and Where Will They Lead Us? *Endocr. Rev* 20 (3); 358-417.
- Coward, L., Barnes, N. C., Setchell, K. D. R., Barnes, S. 1993: Genistein, Daidzein, and Their .Beta.-Glycoside Conjugates: Antitumor Isoflavones in Soybean Foods From American and Asian Diets. *J. Agric. Food Chem.* 41 (11); 1961-1967.
- Crandall, D. L., Busler, D. E., Novak, T. J., Weber, R. V., Kral, J. G. 1998: Identification of Estrogen Receptor Beta RNA in Human Breast and Abdominal Subcutaneous Adipose Tissue. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 248 (3); 523-526.
- Csanady, G. A., Oberste-Frielinghaus, H. R., Semder, B., Baur, C., Schneider, K. T., Filser, J. G. 2002: Distribution and Unspecific Protein Binding of the Xenoestrogens Bisphenol A and Daidzein. *Arch. Toxicol.* 76 (5-6); 299-305.
- Dahlman-Wright, K., Cavailles, V., Fuqua, S. A., Jordan, V. C., Katzenellenbogen, J. A., Korach, K. S., Maggi, A., Muramatsu, M., Parker, M. G., Gustafsson, J. A. 2006: International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen Receptors. *Pharmacol. Rev.* 58 (4); 773-781.
- Dawson-Hughes, B. et Harris, S. 1992: Regional Changes in Body Composition by Time of Year in Healthy Postmenopausal Women. *Am J Clin Nutr* 56 (2); 307-313.
- Day, A. J., Cañada, F. J., Díaz J.C., Kroon, P. A., Mclauchlan, R., Faulds, C. B., Plumb, G. W., Morgan, M. R. A., Williamson, G. 2000: Dietary Flavonoid and Isoflavone Glycosides Are Hydrolysed by the Lactase Site of Lactase Phlorizin Hydrolase. *FEBS Letters* 468 (2-3); 166-170.

- de Graaf, J., Hak-Lemmers, H. L., Hectors, M. P., Demacker, P. N., Hendriks, J. C., Stalenhoef, A. F. 1991: Enhanced Susceptibility to in Vitro Oxidation of the Dense Low Density Lipoprotein Subfraction in Healthy Subjects. *Arterioscler Thromb* 11 (2); 298-306.
- de Padua, M. A., Silva, T. C., Takada, J. Y., Avakian, S. D., Strunz, C. M., Machado Cesar, L. A., Mendes, A. J., Ramires, J. A. 2012: Long-Term Prospective Study of the Influence of Estrone Levels on Events in Postmenopausal Women With or at High Risk for Coronary Artery Disease. *Scientific World Journal*. 363595
- Derby, C. A., Crawford, S. L., Pasternak, R. C., Sowers, M., Sternfeld, B., Matthews, K. A. 2009: Lipid Changes During the Menopause Transition in Relation to Age and Weight: the Study of Women's Health Across the Nation. *Am. J. Epidemiol.* 169 (11); 1352-1361.
- Despres, J. P., Allard, C., Tremblay, A., Talbot, J., Bouchard, C. 1985: Evidence for a Regional Component of Body Fatness in the Association With Serum Lipids in Men and Women. *Metabolism* 34 (10); 967-973.
- Despres, J. P., Moorjani, S., Ferland, M., Tremblay, A., Lupien, P. J., Nadeau, A., Pinault, S., Theriault, G., Bouchard, C. 1989: Adipose Tissue Distribution and Plasma Lipoprotein Levels in Obese Women. Importance of Intra-Abdominal Fat. *Arteriosclerosis* 9 (2); 203-210.
- Despres, J. P., Moorjani, S., Lupien, P. J., Tremblay, A., Nadeau, A., Bouchard, C. 1990: Regional Distribution of Body Fat, Plasma Lipoproteins, and Cardiovascular Disease. *Arteriosclerosis* 10 (4); 497-511.
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., Gingeras, T. R. 2013: STAR: Ultrafast Universal RNA-Seq Aligner. *Bioinformatics*. 29 (1); 15-21.
- Dong, J. Y., Wang, P., He, K., Qin, L. Q. 2011: Effect of Soy Isoflavones on Circulating C-Reactive Protein in Postmenopausal Women: Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Menopause* 18 (11); 1256-1262.
- Ebbert, J. O. et Jensen, M. D. 2013: Fat Depots, Free Fatty Acids, and Dyslipidemia. *Nutrients*. 5 (2); 498-508.
- EFSA ANS Panel (EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food) 2015: Scientific Opinion on the Risk Assessment for Peri- and Post-Menopausal Women Taking Food Supplements Containing Isolated Isoflavones. *EFSA Journal* 13 (10:4246); 342-pp.
- Endemann, G., Stanton, L. W., Madden, K. S., Bryant, C. M., White, R. T., Protter, A. A. 1993: CD36 Is a Receptor for Oxidized Low Density Lipoprotein. *J Biol Chem*. 268 (16); 11811-11816.
- Engelbert, A. K., Soukup, S. T., Roth, A., Hoffmann, N., Graf, D., Watzl, B., Kulling, S. E., Bub, A. 2016: Isoflavone Supplementation in Postmenopausal Women Does Not Affect Leukocyte LDL Receptor and Scavenger Receptor CD36 Expression: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Mol Nutr Food Res* 60 (9); 2008-2019.
- FDA 2016: FDA Statement Regarding Soy Protein and Coronary Heart Disease Health Claim Review. <https://www.fda.gov/food/ingredientspackaginglabeling/labelingnutrition/ucm509239.htm>; letztmaliger Zugriff: 03.09.2017.
- Febbraio, M., Hajjar, D. P., Silverstein, R. L. 2001: CD36: a Class B Scavenger Receptor Involved in Angiogenesis, Atherosclerosis, Inflammation, and Lipid Metabolism. *J Clin Invest* 108 (6); 785-791.

- Filiberto, A. C., Mumford, S. L., Pollack, A. Z., Zhang, C., Yeung, E. H., Perkins, N. J., Wactawski-Wende, J., Schisterman, E. F. 2013: Habitual Dietary Isoflavone Intake Is Associated With Decreased C-Reactive Protein Concentrations Among Healthy Premenopausal Women. *J Nutr* 143 (6); 900-906.
- Fisher, R. M., Hoffstedt, J., Hotamisligil, G. S., Thorne, A., Ryden, M. 2002: Effects of Obesity and Weight Loss on the Expression of Proteins Involved in Fatty Acid Metabolism in Human Adipose Tissue. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* 26 (10); 1379-1385.
- Fogelman, A. M., Haberland, M. E., Seager, J., Hokom, M., Edwards, P. A. 1981: Factors Regulating the Activities of the Low Density Lipoprotein Receptor and the Scavenger Receptor on Human Monocyte-Macrophages. *J Lipid Res* 22 (7); 1131-1141.
- Fong B. S., Rodrigues P. O., Angel, A. 1984: Characterization of Low Density Lipoprotein Binding to Human Adipocytes and Adipocyte Membranes. *J Biol Chem* 259 (16); 10168-10174.
- Fuhrman, B., Volkova, N., Aviram, M. 2002: Oxidative Stress Increases the Expression of the CD36 Scavenger Receptor and the Cellular Uptake of Oxidized Low-Density Lipoprotein in Macrophages From Atherosclerotic Mice: Protective Role of Antioxidants and of Paraoxonase. *Atherosclerosis* 161 (2); 307-316.
- Fukami, K., Koike, K., Hirota, K., Yoshikawa, H., Miyake, A. 1995: Perimenopausal Changes in Serum Lipids and Lipoproteins: a 7-Year Longitudinal Study. *Maturitas* 22 (3); 193-197.
- Gallagher, D., Heymsfield, S. B., Heo, M., Jebb, S. A., Murgatroyd, P. R., Sakamoto, Y. 2000: Healthy Percentage Body Fat Ranges: an Approach for Developing Guidelines Based on Body Mass Index. *Am J Clin Nutr* 72 (3); 694-701.
- Gambacciani, M., Ciaponi, M., Cappagli, B., Benussi, C., De, S. L., Genazzani, A. R. 1999: Climacteric Modifications in Body Weight and Fat Tissue Distribution. *Climacteric.* 2 (1); 37-44.
- Gambacciani, M., Ciaponi, M., Cappagli, B., De, S. L., Orlandi, R., Genazzani, A. R. 2001: Prospective Evaluation of Body Weight and Body Fat Distribution in Early Postmenopausal Women With and Without Hormonal Replacement Therapy. *Maturitas* 39 (2); 125-132.
- Gardner, C. D., Chatterjee, L. M., Franke, A. A. 2009: Effects of Isoflavone Supplements Vs. Soy Foods on Blood Concentrations of Genistein and Daidzein in Adults. *J. Nutr. Biochem.* 20 (3); 227-234.
- Gavin, K. M., Cooper, E. E., Hickner, R. C. 2013: Estrogen Receptor Protein Content Is Different in Abdominal Than Gluteal Subcutaneous Adipose Tissue of Overweight-to-Obese Premenopausal Women. *Metabolism* 62 (8); 1180-1188.
- GE Healthcare. 2017: http://www3.gehealthcare.com/en/products/categories/bone_health/corescan; letztmaliger Zugriff: 22.04.2017.
- Gee, J. M., DuPont, M. S., Rhodes, M. J., Johnson, I. T. 1998: Quercetin Glucosides Interact With the Intestinal Glucose Transport Pathway. *Free Radic. Biol Med* 25 (1); 19-25.
- Goldstein, J. L. et Brown, M. S. 2009: The LDL Receptor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29 (4); 431-438.
- Gordon, T. F., Kannel W. B., Hjortland M. C., McNamara, P. M. 1978: Menopause and Coronary Heart Disease. The Framingham Study. *Ann Intern Med.* 89 (2); 157-161.

- Griffin, E., Re, A. F., Hamel, N. F., Fu, C. F., Bush, H. F., McCaffrey, T. F., Asch, A. S. 2001: A Link Between Diabetes and Atherosclerosis: Glucose Regulates Expression of CD36 at the Level of Translation. *Nature Medicine* 7 (7); 840-846.
- Gruber, C. J., Tschugguel, W., Schneeberger, C., Huber, J. C. 2002: Production and Actions of Estrogens. *N. Engl. J Med* 346 (5); 340-352.
- Grundy, S. M., Cleeman, J. I., Daniels, S. R., Donato, K. A., Eckel, R. H., Franklin, B. A., Gordon, D. J., Krauss, R. M., Savage, P. J., Smith, S. C., Jr., Spertus, J. A., Costa, F. 2005: Diagnosis and Management of the Metabolic Syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 112 (17); 2735-2752.
- Hale, G. E., Robertson, D. M., Burger, H. G. 2014: The Perimenopausal Woman: Endocrinology and Management. *J Steroid Biochem Mol Biol* 142: 121-131.
- Hall, W. L., Vafeiadou, K., Hallund, J., Bugel, S., Reimann, M., Koebnick, C., Zunft, H. J., Ferrari, M., Branca, F., Dadd, T., Talbot, D., Powell, J., Minihane, A. M., Cassidy, A., Nilsson, M., Dahlman-Wright, K., Gustafsson, J. A., Williams, C. M. 2006: Soy-Isoflavone-Enriched Foods and Markers of Lipid and Glucose Metabolism in Postmenopausal Women: Interactions With Genotype and Equol Production. *Am J Clin Nutr* 83 (3); 592-600.
- Hambitzer, R., Melzner, I., Haferkamp, O. 1987: Relationships Between Lymphocyte Cholesterol Homeostasis and LDL-Cholesterol. *Clin Biochem.* 20 (2); 97-104.
- Hames, K. C., Koutsari, C., Santosa, S., Bush, N. C., Jensen, M. D. 2015: Adipose Tissue Fatty Acid Storage Factors: Effects of Depot, Sex and Fat Cell Size. *Int. J Obes. (Lond)* 39 (6); 884-887.
- Hammarstedt, A., Jansson, P. A., Wesslau, C., Yang, X., Smith, U. 2003: Reduced Expression of PGC-1 and Insulin-Signaling Molecules in Adipose Tissue Is Associated With Insulin Resistance. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 301 (2); 578-582.
- Han, J., Hajjar, D. P., Tauras, J. M., Nicholson, A. C. 1999: Cellular Cholesterol Regulates Expression of the Macrophage Type B Scavenger Receptor, CD36. *J Lipid Res* 40 (5); 830-838.
- Harmon, A. W. et Harp, J. B. 2001: Differential Effects of Flavonoids on 3T3-L1 Adipogenesis and Lipolysis. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 280 (4); C807-C813.
- Hart, S. N., Therneau T. M., Zhang, Y., Poland G. A., Kocher, J. P. 2013: Calculating Sample Size Estimates for RNA Sequencing Data. *J Comput Biol* 20 (12); 970-978.
- Hazenber, B. P. C. 2011: Fat Aspiration Procedure
<http://www.amyloid.nl/Files/Fat%20aspiration%20procedure02.pdf>; letztmaliger Zugriff: 05.09.2017.
- Hedlund, T. E., Maroni, P. D., Ferucci, P. G., Dayton, R., Barnes, S., Jones, K., Moore, R., Ogden, L. G., Wahala, K., Sackett, H. M., Gray, K. J. 2005: Long-Term Dietary Habits Affect Soy Isoflavone Metabolism and Accumulation in Prostatic Fluid in Caucasian Men. *J Nutr* 135 (6); 1400-1406.
- Heinrigs, M. 2009: Peri- und Postmenopause. In Strauss, A., Janni, W., *Klinikmanual Gynäkologie und Geburtshilfe*, 18-32. Heidelberg: Springer.
- Hisamoto, K. et Bender, J. R. 2005: Vascular Cell Signaling by Membrane Estrogen Receptors. *Steroids* 70 (5-7); 382-387.

- Ho, Y. K., Brown, S., Bilheimer, D. W., Goldstein, J. L. 1976: Regulation of Low Density Lipoprotein Receptor Activity in Freshly Isolated Human Lymphocytes. *J Clin Invest* 58 (6); 1465-1474.
- Hodgson, J., Croft, K., Puddey, I., Mori, T., Beilin, L. 1996: Soybean Isoflavonoids and Their Metabolic Products Inhibit in Vitro Lipoprotein Oxidation in Serum. *Nutritional Biochemistry* 7 (12); 664-669.
- Huh, H. Y., Pearce, S. F., Yesner, L. M., Schindler, J. L., Silverstein, R. L. 1996: Regulated Expression of CD36 During Monocyte-to-Macrophage Differentiation: Potential Role of CD36 in Foam Cell Formation. *Blood* 87 (5); 2020-2028.
- Hwang, C. S., Kwak, H. S., Lim, H. J., Lee, S. H., Kang, Y. S., Choe, T. B., Hur, H. G., 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 (4-5); 246-253.
- Ibrahim, M. M. 2010: Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue: Structural and Functional Differences. *Obes. Rev* 11 (1); 11-18.
- Ikonen, E. 2008: Cellular Cholesterol Trafficking and Compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 (2); 125-138.
- Inukai, T., Takanashi, K., Takebayashi, K., Tayama, K., Aso, Y., Takiguchi, Y., Takemura, Y. 2000: Estrogen Markedly Increases LDL-Receptor Activity in Hypercholesterolemic Patients. *J. Med.* 31 (5-6); 247-261.
- Jenkins, D. J., Kendall, C. W., Jackson, C. J., Connelly, P. W., Parker, T., Faulkner, D., Vidgen, E., Cunnane, S. C., Leiter, L. A., Josse, R. G. 2002: Effects of High- and Low-Isoflavone Soyfoods on Blood Lipids, Oxidized LDL, Homocysteine, and Blood Pressure in Hyperlipidemic Men and Women. *Am J Clin Nutr* 76 (2); 365-372.
- Jeon, H. et Blacklow, S. C. 2005: Structure and Physiologic Function of the Low-Density Lipoprotein Receptor. *Annu. Rev. Biochem.* 74; 535-562.
- Jungbauer, A. et Medjakovic, S. 2014: Phytoestrogens and the Metabolic Syndrome. *J Steroid Biochem. Mol Biol* 139; 277-289.
- Kabisch, M., Ruckes, C., Seibert-Grafe, M., Blettner, M. 2011: Randomized Controlled Trials: Part 17 of a Series on Evaluation of Scientific Publications. *Dtsch. Arztebl. Int.* 108 (39); 663-668.
- Kannel, W. B. 1987: Metabolic Risk Factors for Coronary Heart Disease in Women: Perspective From the Framingham Study. *Am Heart J* 114 (2); 413-419.
- Kao, Y. C., Zhou, C., Sherman, M., Laughton, C. A., Chen, S. 1998: Molecular Basis of the Inhibition of Human Aromatase (Estrogen Synthetase) by Flavone and Isoflavone Phytoestrogens: A Site-Directed Mutagenesis Study. *Environ. Health Perspect.* 106 (2); 85-92.
- Kaser, S. 2008: Epidemie Adipositas: Geschlechterspezifische Unterschiede. In Hochleitner M., *Gender Medicine. Ringvorlesung an der Medizinischen Universität Innsbruck*, 155-71. Wien: Facultas Verlags- und Buchhandels AG.
- Kaul, S., Rothney, M. P., Peters, D. M., Wacker, W. K., Davis, C. E., Shapiro, M. D., Ergun, D. L. 2012: Dual-Energy X-Ray Absorptiometry for Quantification of Visceral Fat. *Obesity. (Silver. Spring)* 20 (6); 1313-1318.

- Kim, H. K., Nelson-Dooley, C., Della-Fera, M. A., Yang, J. Y., Zhang, W., Duan, J., Hartzell, D. L., Hamrick, M. W., 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 (2); 409-414.
- Kim, J., Lee, H., Lee, O., Lee, K. H., Lee, Y. B., Young, K. D., Jeong, Y. H., Choue, R. 2013: Isoflavone Supplementation Influenced Levels of Triglyceride and Luteinizing Hormone in Korean Postmenopausal Women. *Arch. Pharm. Res* 36 (3); 306-313.
- Kirk, E. A., Sutherland, P., Wang, S. A., Chait, A., LeBoeuf, R. C. 1998: Dietary Isoflavones Reduce Plasma Cholesterol and Atherosclerosis in C57BL/6 Mice but Not LDL Receptor-Deficient Mice. *J Nutr* 128 (6); 954-959.
- Knowles, D. M., Tolidjian, B., Marboe, C., D'Agati, V., Grimes, M., Chess, L. 1984: Monoclonal Anti-Human Monocyte Antibodies OKM1 and OKM5 Possess Distinctive Tissue Distributions Including Differential Reactivity With Vascular Endothelium. *J Immunol.* 132 (5); 2170-2173.
- Kostner, G. M., Scharnagl, H., Kostner, K., März, W. 2006: Zusammensetzung und Stoffwechsel der Lipoproteine. In Schwandt, P., Parhofer, K. G., *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen*, 2-65. Stuttgart: Schattauer.
- Kotra, G. et Daniel, H. 2007: Flavonoid Glycosides Are Not Transported by the Human Na⁺/Glucose Transporter When Expressed in *Xenopus Laevis* Oocytes, but Effectively Inhibit Electrogenic Glucose Uptake. *J Pharmacol. Exp Ther.* 322 (2); 829-835.
- Kou, M. C., Fu, S.H., Yen, J.H., Weng, C.Y., Li, S., Ho, C.T., Wu, M.J. 2013: Effects of Citrus Flavonoids, 5-Hydroxy-3,6,7,8,3',4'-Hexamethoxyflavone and 3,5,6,7,8,3',4'-Heptamethoxyflavone, on the Activities of Macrophage Scavenger Receptors and the Hepatic LDL Receptor. *Food Funct.* 4 (4); 602-609.
- Kovanen, P. T., Basu, S. K., Goldstein, J. L., Brown, M. S. 1979: Low Density Lipoprotein Receptors in Bovine Adrenal Cortex. II. Low Density Lipoprotein Binding to Membranes Prepared From Fresh Tissue. *Endocrinology* 104 (3); 610-616.
- Krone, W., Naegele, H., Behnke, B., Greten, H. 1988: Opposite Effects of Insulin and Catecholamines on LDL-Receptor Activity in Human Mononuclear Leukocytes. *Diabetes* 37 (10); 1386-1391.
- Kronenberg, F. 1990: Hot Flashes: Epidemiology and Physiology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 592:52-86.
- Krotkiewski, M., Bjorntorp, P., Sjostrom, L., Smith, U. 1983: Impact of Obesity on Metabolism in Men and Women. Importance of Regional Adipose Tissue Distribution. *J Clin Invest* 72 (3); 1150-1162.
- Kuiper, G. G., Lemmen, J. G., Carlsson, B., Corton, J. C., Safe, S. H., van der Saag, P. T., van der Burg, B., Gustafsson, J. A. 1998: Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens With Estrogen Receptor Beta. *Endocrinology* 139 (10); 4252-4263.
- Kulling, S. E., Honig, D. M., Metzler, M. 2001: Oxidative Metabolism of the Soy Isoflavones Daidzein and Genistein in Humans in Vitro and in Vivo. *J Agric. Food Chem* 49 (6); 3024-3033.
- Kulling, S. E., Honig, D. M., Simat, T. J., Metzler, M. 2000: Oxidative in Vitro Metabolism of the Soy Phytoestrogens Daidzein and Genistein. *J Agric. Food Chem* 48 (10); 4963-4972.
- Kulling, S. E. et Watzl, B. 2003: Phytoestrogens. *Ernährungs Umschau* 50 (6); 234-239.

- Kurrat, A., Blei, T., Kluxen, F. M., Mueller, D. R., Piechotta, M., Soukup, S. T., Kulling, S. E., Diel, P. 2015: Lifelong Exposure to Dietary Isoflavones Reduces Risk of Obesity in Ovariectomized Wistar Rats. *Mol Nutr Food Res* 59 (12); 2407-18.
- Lagari, V. S. et Levis, S. 2014: Phytoestrogens for Menopausal Bone Loss and Climacteric Symptoms. *J Steroid Biochem. Mol Biol* 139; 294-301.
- Lamon-Fava, S., Wilson, P. W., Schaefer, E. J. 1996: Impact of Body Mass Index on Coronary Heart Disease Risk Factors in Men and Women. The Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16 (12); 1509-1515.
- Lampe, J. W. 2003: Isoflavonoid and Lignan Phytoestrogens As Dietary Biomarkers. *J. Nutr.* 133 Suppl 3956S-964S.
- Lara, L. L., Rivera, H., Perez, P., Blanca, I., Bianco, N. E., De Sanctis, J. B. 1997: Low Density Lipoprotein Receptor Expression and Function in Human Polymorphonuclear Leucocytes. *Clin Exp Immunol.* 107 (1); 205-212.
- Lau, K. M., Mok, S. C., Ho, S. M. 1999: Expression of Human Estrogen Receptor-Alpha and -Beta, Progesterone Receptor, and Androgen Receptor mRNA in Normal and Malignant Ovarian Epithelial Cells. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96 (10); 5722-5727.
- Law, M. R., Wald, N. J., Thompson, S. G. 1994: By How Much and How Quickly Does Reduction in Serum Cholesterol Concentration Lower Risk of Ischaemic Heart Disease? *BMJ* 308 (6925); 367-372.
- Lephart, E. D. 2015: Modulation of Aromatase by Phytoestrogens. *Enzyme Res Volume 2015*, Article ID 594656
- Ley, C. J., Lees, B., Stevenson, J. C. 1992: Sex- and Menopause-Associated Changes in Body-Fat Distribution. *Am J Clin Nutr* 55 (5); 950-954.
- Linscheid, P., Seboek, D., Zulewski, H., Keller, U., Muller, B. 2005: Autocrine/Paracrine Role of Inflammation-Mediated Calcitonin Gene-Related Peptide and Adrenomedullin Expression in Human Adipose Tissue. *Endocrinology* 146 (6); 2699-2708.
- Lobo, R. A. 2017: Hormone-Replacement Therapy: Current Thinking. *Nat. Rev Endocrinol* 13 (4); 220-231.
- Lovati, M. R., Manzoni, C., Canavesi, A., Sirtori, M., Vaccarino, V., Marchi, M., Gaddi, G., Sirtori, C. R. 1987: Soybean Protein Diet Increases Low Density Lipoprotein Receptor Activity in Mononuclear Cells From Hypercholesterolemic Patients. *J. Clin. Invest* 80 (5); 1498-1502.
- Lundholm, L., Zang, H., Hirschberg, A. L., Gustafsson, J. A., Arner, P., Dahlman-Wright, K. 2008: Key Lipogenic Gene Expression Can Be Decreased by Estrogen in Human Adipose Tissue. *Fertil. Steril.* 90 (1); 44-48.
- Lusis, A. J., Fogelman, A. M., Fonarow, G. C. 2004: Genetic Basis of Atherosclerosis: Part I: New Genes and Pathways. *Circulation* 110 (13); 1868-1873.
- Lydeking-Olsen, E., Beck-Jensen, J. E., Setchell, K. D., Holm-Jensen, T. 2004: Soymilk or Progesterone for Prevention of Bone Loss--a 2 Year Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Eur. J Nutr* 43 (4); 246-257.

- Maczek, C., Recheis, H., Bock, G., Stulnig, T., Jurgens, G., Wick, G. 1996: Comparison of Low Density Lipoprotein Uptake by Different Human Lymphocyte Subsets: a New Method Using Double-Fluorescence Staining. *J. Lipid Res.* 37 (6); 1363-1371.
- Mangano, K. M., Hutchins-Wiese, H. L., Kenny, A. M., Walsh, S. J., Abourizk, R. H., Bruno, R. S., Lipcius, R., Fall, P., Kleppinger, A., Kenyon-Pesce, L., Prestwood, K. M., Kerstetter, J. E. 2013: Soy Proteins and Isoflavones Reduce Interleukin-6 but Not Serum Lipids in Older Women: a Randomized Controlled Trial. *Nutr Res* 33 (12); 1026-1033.
- Martin, P. M., Horwitz, K. B., Ryan, D. S., McGuire, W. L. 1978: Phytoestrogen Interaction With Estrogen Receptors in Human Breast Cancer Cells. *Endocrinology* 103 (5); 1860-1867.
- Masuda, Y., Tamura, S., Matsuno, K., Nagasawa, A., Hayasaka, K., Shimizu, C., Moriyama, T. 2015: Diverse CD36 Expression Among Japanese Population: Defective CD36 Mutations Cause Platelet and Monocyte CD36 Reductions in Not Only Deficient but Also Normal Phenotype Subjects. *Thromb Res* 135 (5); 951-957.
- Mathews, J. et Gustafsson, J. A. 2003: Estrogen Signaling: a Subtle Balance Between ER Alpha and ER Beta. *Mol Interv.* 3 (5); 281-292.
- Maubach, J., Bracke, M. E., Heyerick, A., Depypere, H. T., Serreyn, R. F., Mareel, M. M., De, K. D. 2003: Quantitation of Soy-Derived Phytoestrogens in Human Breast Tissue and Biological Fluids by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 784 (1); 137-144.
- Meyer, B. J., Larkin, T. A., Owen, A. J., Astheimer, L. B., Tapsell, L. C., Howe, P. R. 2004: Limited Lipid-Lowering Effects of Regular Consumption of Whole Soybean Foods. *Ann Nutr Metab* 48 (2); 67-78.
- Miller, V. T., LaRosa, J., Barnabei, V. 1995: Effects of Estrogen or Estrogen/Progestin Regimens on Heart Disease Risk Factors in Postmenopausal Women. The Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Trial. *JAMA* 273 (3); 199-208.
- Molzberger, A. F., Soukup, S. T., Kulling, S. E., Diel, P. 2013: Proliferative and Estrogenic Sensitivity of the Mammary Gland Are Modulated by Isoflavones During Distinct Periods of Adolescence. *Arch. Toxicol.* 87 (6); 1129-1140.
- Mortensen, A., Kulling, S. E., Schwartz, H., Rowland, I., Ruefer, C. E., Rimbach, G., Cassidy, A., Magee, P., Millar, J., Hall, W. L., Kramer, B. F., Sorensen, I. K., Sontag, G. 2009: Analytical and Compositional Aspects of Isoflavones in Food and Their Biological Effects. *Mol. Nutr. Food Res.* 53 Suppl 2; S266-S309.
- Moura, F. A., Dutra-Rodrigues, M. S., Cassol, A. S., Parra, E. S., Zago, V. H., Panzoldo, N. B., Alexandre, F., Vieira, I. C., Vendrame, F., Virginio, V. W., Castanho, V. S., Danelon, M. R., Nunes, V. S., Leanca, C. C., Saraiva, F. K., Coelho, O. R., Nakandakare, E., Quintao, E. C., de Faria, E. C., Sposito, A. C. 2013: Impact of Seasonality on the Prevalence of Dyslipidemia: a Large Population Study. *Chronobiol. Int.* 30 (8); 1011-1015.
- Munro, I. C., Harwood, M., Hlywka, J. J., Stephen, A. M., Doull, J., Flamm, W. G., Adlercreutz, H. 2003: Soy Isoflavones: a Safety Review. *Nutr Rev* 61 (1); 1-33.
- Murota, K., Shimizu, S., Miyamoto, S., Izumi, T., Obata, A., Kikuchi, M., Terao, J. 2002: Unique Uptake and Transport of Isoflavone Aglycones by Human Intestinal Caco-2 Cells: Comparison of Isoflavonoids and Flavonoids. *J Nutr* 132 (7); 1956-1961.

- Naaz, A., Yellayi, S., Zakroczymski, M. A., Bunick, D., Doerge, D. R., Lubahn, D. B., Helferich, W. G., Cooke, P. S. 2003: The Soy Isoflavone Genistein Decreases Adipose Deposition in Mice. *Endocrinology* 144 (8); 3315-3320.
- Nagata, C., Shimizu, H., Takami, R., Hayashi, M., Takeda, N., Yasuda, K. 1999: Hot Flushes and Other Menopausal Symptoms in Relation to Soy Product Intake in Japanese Women. *Climacteric*. 2 (1); 6-12.
- Nagata, C., Takatsuka, N., Kawakami, N., Shimizu, H. 2001: Soy Product Intake and Hot Flashes in Japanese Women: Results From a Community-Based Prospective Study. *Am J Epidemiol*. 153 (8); 790-793.
- Nagel, S. C., vom Saal F. S.; Welshons, W. V. 1998: The Effective Free Fraction of Estradiol and Xenoestrogens in Human Serum Measured by Whole Cell Uptake Assays: Physiology of Delivery Modifies Estrogenic Activity. *Proc Soc Exp Biol Med* 217 (3); 300-309.
- Nägele, H., Gebhardt, A., Niendorf, A., Kroschinski, J., Zeller, W. 1997: LDL Receptor Activity in Human Leukocyte Subtypes: Regulation by Insulin. *Clin. Biochem*. 30 (7); 531-538.
- Neeland, I. J., Grundy, S. M., Li, X., Adams-Huet, B., Vega, G. L. 2016: Comparison of Visceral Fat Mass Measurement by Dual-X-Ray Absorptiometry and Magnetic Resonance Imaging in a Multiethnic Cohort: the Dallas Heart Study. *Nutr Diabetes* 6 (7); e221
- Niculescu, M. D., Pop, E. A., Fischer, L. M., Zeisel, S. H. 2007: Dietary Isoflavones Differentially Induce Gene Expression Changes in Lymphocytes From Postmenopausal Women Who Form Equol As Compared With Those Who Do Not. *J Nutr Biochem*. 18 (6); 380-390.
- Nikander, E., Tiitinen, A. F., Laitinen, K. F., Tikkanen, M. F., Ylikorkala, O. 2004: Effects of Isolated Isoflavonoids on Lipids, Lipoproteins, Insulin Sensitivity, and Ghrelin in Postmenopausal Women. *J Clin Endocrinol Metab* 89 (7); 3567-3572.
- Nilsson, B. O., Olde, B., Leeb-Lundberg, L. M. 2011: G Protein-Coupled Oestrogen Receptor 1 (GPER1)/GPR30: a New Player in Cardiovascular and Metabolic Oestrogenic Signalling. *Br. J Pharmacol*. 163 (6); 1131-1139.
- Ockene, I. S., Chiriboga, D. E., Stanek, E. J., III, Harmatz, M. G., Nicolosi, R., Saperia, G., Well, A. D., Freedson, P., Merriam, P. A., Reed, G., Ma, Y., Matthews, C. E., Hebert, J. R. 2004: Seasonal Variation in Serum Cholesterol Levels: Treatment Implications and Possible Mechanisms. *Arch. Intern. Med* 164 (8); 863-870.
- Ohira, T. et Iso, H. 2013: Cardiovascular Disease Epidemiology in Asia: an Overview. *Circ. J* 77 (7); 1646-1652.
- Oitate, M., Nakaki, R., Koyabu, N., Takanaga, H., Matsuo, H., Ohtani, H., Sawada, Y. 2001: Transcellular Transport of Genistein, a Soybean-Derived Isoflavone, Across Human Colon Carcinoma Cell Line (Caco-2). *Biopharm. Drug Dispos*. 22 (1); 23-29.
- Ouchi, N., Kihara, S., Funahashi, T., Nakamura, T., Nishida, M., Kumada, M., Okamoto, Y., Ohashi, K., Nagaretani, H., Kishida, K., Nishizawa, H., Maeda, N., Kobayashi, H., Hiraoka, H., Matsuzawa, Y. 2003: Reciprocal Association of C-Reactive Protein With Adiponectin in Blood Stream and Adipose Tissue. *Circulation* 107 (5); 671-674.
- Owen, A. J., Roach, P. D., Abbey, M. 2004: Regulation of Low-Density Lipoprotein Receptor Activity by Estrogens and Phytoestrogens in a HepG2 Cell Model. *Ann. Nutr Metab* 48 (4); 269-275.

- Park, H. J., Della-Fera, M. A., Hausman, D. B., Rayalam, S., Ambati, S., Baile, C. A. 2009: Genistein Inhibits Differentiation of Primary Human Adipocytes. *J Nutr Biochem.* 20 (2); 140-148.
- Patel, R. P., Boersma, B. J., Crawford, J. H., Hogg, N., Kirk, M., Kalyanaraman, B., Parks, D. A., Barnes, S., Darley-USmar, V. 2001: Antioxidant Mechanisms of Isoflavones in Lipid Systems: Paradoxical Effects of Peroxyl Radical Scavenging. *Free Radic. Biol Med* 31 (12); 1570-1581.
- Pathan, M., Keerthikumar, S., Ang, C. S., Gangoda, L., Quek, C. Y., Williamson, N. A., Mouradov, D., Sieber, O. M., Simpson, R. J., Salim, A., Bacic, A., Hill, A. F., Stroud, D. A., Ryan, M. T., Agbinya, J. I., Mariadason, J. M., Burgess, A. W., Mathivanan, S. 2015: FunRich: An Open Access Standalone Functional Enrichment and Interaction Network Analysis Tool. *Proteomics.* 15 (15); 2597-2601.
- Pedersen, S. B., Bruun, J. M., Hube, F., Kristensen, K., Hauner, H., Richelsen, B. 2001: Demonstration of Estrogen Receptor Subtypes Alpha and Beta in Human Adipose Tissue: Influences of Adipose Cell Differentiation and Fat Depot Localization. *Mol Cell Endocrinol* 182 (1); 27-37.
- Poluzzi, E., Piccinni, C., Raschi, E., Rampa, A., Recanatini, M., De, P. F. 2014: Phytoestrogens in Postmenopause: the State of the Art From a Chemical, Pharmacological and Regulatory Perspective. *Curr. Med. Chem.* 21 (4); 417-436.
- Potter, S. M. 1995: Overview of Proposed Mechanisms for the Hypocholesterolemic Effect of Soy. *J Nutr* 125 (3 Suppl); 606S-611S.
- Qin, Y., Niu, K., Zeng, Y., Liu, P., Yi, L., Zhang, T., Zhang, Q. Y., Zhu, J. D., Mi, M. T. 2013: Isoflavones for Hypercholesterolaemia in Adults. *Cochrane. Database. Syst. Rev* (6); CD009518
- Randolph, J. F., Jr., Sowers, M., Bondarenko, I. V., Harlow, S. D., Luborsky, J. L., Little, R. J. 2004: Change in Estradiol and Follicle-Stimulating Hormone Across the Early Menopausal Transition: Effects of Ethnicity and Age. *J Clin Endocrinol Metab* 89 (4); 1555-1561.
- Rayalam, S., Della-Fera, M. A., Baile, C. A. 2008: Phytochemicals and Regulation of the Adipocyte Life Cycle. *J. Nutr. Biochem.* 19 (11); 717-726.
- Regnstrom, J., Nilsson, J., Tornvall, P., Landou, C., Hamsten, A. 1992: Susceptibility to Low-Density Lipoprotein Oxidation and Coronary Atherosclerosis in Man. *Lancet* 339 (8803); 1183-1186.
- Reichl, D., Postiglione, A., Myant, N. B. 1976: Uptake and Catabolism of Low Density Lipoprotein by Human Lymphocytes. *Nature* 260 (5552); 634-635.
- Rice, L., Handayani, R., Cui, Y., Medrano, T., Samedi, V., Baker, H., Szabo, N. J., Rosser, C. J., Goodison, S., Shiverick, K. T. 2007: Soy Isoflavones Exert Differential Effects on Androgen Responsive Genes in LNCaP Human Prostate Cancer Cells. *J Nutr* 137 (4); 964-972.
- Richter, W. O. et Von Eckardstein, A. 2006: Fettstoffwechsel. In Siegenthaler, W., Blum, H. E., *Klinische Pathophysiologie*, 137-163. Stuttgart: Thieme.
- Rimbach, G., Boesch-Saadatmandi, C., Frank, J., Fuchs, D., Wenzel, U., Daniel, H., Hall, W. L., Weinberg, P. D. 2008: Dietary Isoflavones in the Prevention of Cardiovascular Disease-a Molecular Perspective. *Food Chem. Toxicol.* 46 (4); 1308-1319.
- RKI, B. 2014: Koronare Herzkrankheit. Faktenblatt zu GEDA 2012: Ergebnisse der Studie »Gesundheit in Deutschland Aktuell 2012«.

- http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsB/GEDA12.pdf?__blob=publicationFile; zuletzt aufgerufen am 29.08.2017.
- Robinson, M. D. et Oshlack, A. 2010: A Scaling Normalization Method for Differential Expression Analysis of RNA-Seq Data. *Genome Biol* 11 (3); R25
- Rolfe, B. G. 1988: Flavones and Isoflavones As Inducing Substances of Legume Nodulation. *Biofactors* 1 (1); 3-10.
- Rosano, G. M., Vitale, C., Marazzi, G., Volterrani, M. 2007: Menopause and Cardiovascular Disease: the Evidence. *Climacteric*. 10 Suppl 1; 119-24.
- Ross, J. A. et Kasum, C. M. 2002: Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr*. 22:19-34.
- Rüfer, C. E., Glatt, H., 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 (1); 51-60.
- Rüfer, C. E., Kulling, S. E., Moseneder, J., Winterhalter, P., Bub, A. 2009: Role of Plasma Lipoproteins in the Transport of the Soyabean Isoflavones Daidzein and Daidzein-7-O-Beta-D-Glucoside. *Br. J. Nutr*. 102 (6); 793-796.
- Sakamoto, Y., Naka, A., Ohara, N., Kondo, K., Iida, K. 2014: Daidzein Regulates Proinflammatory Adipokines Thereby Improving Obesity-Related Inflammation Through PPARgamma. *Mol Nutr Food Res* 58 (4); 718-726.
- Schmitt, E., Dekant, W., Stopper, H. 2001: Assaying the Estrogenicity of Phytoestrogens in Cells of Different Estrogen Sensitive Tissues. *Toxicol. In Vitro* 15 (4-5); 433-439.
- Schmittgen, T. D. et Livak, K. J. 2008: Analyzing Real-Time PCR Data by the Comparative C(T) Method. *Nat. Protoc*. 3 (6); 1101-1108.
- Schoonjans, K., Peinado-Onsurbe, J., Lefebvre, A. M., Heyman, R. A., Briggs, M., Deeb, S., Staels, B., Auwerx, J. 1996: PPARalpha and PPARgamma Activators Direct a Distinct Tissue-Specific Transcriptional Response Via a PPRE in the Lipoprotein Lipase Gene. *EMBO J* 15 (19); 5336-5348.
- Setchell, K. D. 1998: Phytoestrogens: the Biochemistry, Physiology, and Implications for Human Health of Soy Isoflavones. *Am J Clin Nutr* 68 (6 Suppl); 1333S-1346S.
- Setchell, K. D. et Cassidy, A. 1999: Dietary Isoflavones: Biological Effects and Relevance to Human Health. *J Nutr* 129 (3); 758S-767S.
- Setchell, K. D. et Cole, S. J. 2006: Method of Defining Equol-Producer Status and Its Frequency Among Vegetarians. *J Nutr* 136 (8); 2188-2193.
- Setchell, K. D., Faughnan, M. S., Avades, T., Zimmer-Nechemias, L., Brown, N. M., Wolfe, B. E., Brashear, W. T., Desai, P., Oldfield, M. F., Botting, N. P., Cassidy, A. 2003: Comparing the Pharmacokinetics of Daidzein and Genistein With the Use of ¹³C-Labeled Tracers in Premenopausal Women. *Am. J. Clin. Nutr*. 77 (2); 411-419.
- Sethi, J. K. et Vidal-Puig, A. J. 2007: Thematic Review Series: Adipocyte Biology. Adipose Tissue Function and Plasticity Orchestrate Nutritional Adaptation. *J Lipid Res* 48 (6); 1253-1262.

- Sfakianos, J., Coward, L., Kirk, M., Barnes, S. 1997: Intestinal Uptake and Biliary Excretion of the Isoflavone Genistein in Rats. *J Nutr* 127 (7); 1260-1268.
- Silverstein, R. L. et Febbraio, M. 2009: CD36, a Scavenger Receptor Involved in Immunity, Metabolism, Angiogenesis, and Behavior. *Sci. Signal.* 2 (72); re3
- Silverstein, R. L., Li, W., Park, Y. M., Rahaman, S. O. 2010: Mechanisms of Cell Signaling by the Scavenger Receptor CD36: Implications in Atherosclerosis and Thrombosis. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 121; 206-220.
- Sites, C. K., Cooper, B. C., Toth, M. J., Gastaldelli, A., Arabshahi, A., Barnes, S. 2007: Effect of a Daily Supplement of Soy Protein on Body Composition and Insulin Secretion in Postmenopausal Women. *Fertil. Steril.* 88 (6); 1609-1617.
- Smith, C. L. et O'Malley, B. W. 2004: Coregulator Function: a Key to Understanding Tissue Specificity of Selective Receptor Modulators. *Endocr. Rev* 25 (1); 45-71.
- Smithson, M. et Verkuilen, J. 2006: A Better Lemon Squeezer? Maximum-Likelihood Regression With Beta-Distributed Dependent Variables. *Psychological Methods* 11 (1); 54-71.
- Soukup, S. T., Al-Maharik, N., Botting, N., 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.* 406 (24); 6007-6020.
- Stangl, H., Graf, G. A., Yu, L., Cao, G., Wyne, K. 2002: Effect of Estrogen on Scavenger Receptor BI Expression in the Rat. *J Endocrinol* 175 (3); 663-672.
- Steinberg, F. M., Murray, M. J., Lewis, R. D., Cramer, M. A., Amato, P., Young, R. L., Barnes, S., Konzelmann, K. L., Fischer, J. G., Ellis, K. J., Shypailo, R. J., Fraley, J. K., Smith, E. O., Wong, W. W. 2011: Clinical Outcomes of a 2-y Soy Isoflavone Supplementation in Menopausal Women. *Am. J. Clin. Nutr.* 93 (2); 356-367.
- Stevenson, J. C., Crook, D., Godsland, I. F. 1993: Influence of Age and Menopause on Serum Lipids and Lipoproteins in Healthy Women. *Atherosclerosis* 98 (1); 83-90.
- Stevenson, J. C., Crook, D., Godsland, I. F., Collins, P., Whitehead, M. I. 1994: Hormone Replacement Therapy and the Cardiovascular System. Nonlipid Effects. *Drugs* 47 Suppl 235-41.
- Streicher, R., Kotzka, J. F., Muller-Wieland, D. F., Krone, W. 1998: Regulation of the LDL Receptor Gene Expression by Hormones. *Z Ernährungswiss* 37 (Suppl 1); 85-87.
- Stulnig, T. M., Klocker, H., Harwood, H. J., Jr., Jurgens, G., Schonitzer, D., Jarosch, E., Huber, L. A., Amberger, A., Wick, G. 1995: In Vivo LDL Receptor and HMG-CoA Reductase Regulation in Human Lymphocytes and Its Alterations During Aging. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15 (7); 872-878.
- Su, H. I. et Freeman, E. W. 2009: Hormone Changes Associated With the Menopausal Transition. *Minerva Ginecol.* 61 (6); 483-489.
- Taku, K., Umegaki, K., Sato, Y., Taki, Y., Endoh, K., Watanabe, S. 2007: Soy Isoflavones Lower Serum Total and LDL Cholesterol in Humans: a Meta-Analysis of 11 Randomized Controlled Trials. *Am J Clin Nutr* 85 (4); 1148-1156.

- Talle, M. A., Rao, P. E., Westberg, E., Allegar, N., Makowski, M., Mittler, R. S., Goldstein, G. 1983: Patterns of Antigenic Expression on Human Monocytes As Defined by Monoclonal Antibodies. *Cell Immunol.* 78 (1); 83-99.
- Tang, S., Han, H., Bajic, V. B. 2004: ERGDB: Estrogen Responsive Genes Database. *Nucleic Acid Res* 32 (Database issue):D533-D536.
- Taubert, H.-D. et Licht, P. 2007: Geschlechtsspezifische Entwicklung der Frau und ihre Störungen. In Schmidt-Matthiesen, H.; Wallwiener, D. *Gynäkologie und Geburtshilfe*, 3-88. Stuttgart: Schattauer.
- Teede, H. J., Dalais, F. S., Kotsopoulos, D., Liang, Y. L., Davis, S., McGrath, B. P. 2001: Dietary Soy Has Both Beneficial and Potentially Adverse Cardiovascular Effects: a Placebo-Controlled Study in Men and Postmenopausal Women. *J Clin Endocrinol Metab* 86 (7); 3053-3060.
- Tepavcevic, S., Koricanac, G., Zakula, Z., Milosavljevic, T., Stojiljkovic, M., Isenovic, E. R. 2011: Interaction Between Insulin and Estradiol in Regulation of Cardiac Glucose and Free Fatty Acid Transporters. *Horm. Metab Res* 43 (8); 524-530.
- Thorp, A. A., Howe, P. R., Mori, T. A., Coates, A. M., Buckley, J. D., Hodgson, J., Mansour, J., Meyer, B. J. 2008: Soy Food Consumption Does Not Lower LDL Cholesterol in Either Equol or Nonequol Producers. *Am. J. Clin. Nutr.* 88 (2); 298-304.
- Tikkanen, M. J., Wahala, K. F., Ojala S FAU – Vihma, Vihma, V. F., Adlercreutz, H. 1998: Effect of Soybean Phytoestrogen Intake on Low Density Lipoprotein Oxidation Resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (6); 3106-3110.
- Tontonoz, P., Nagy, L. F., Alvarez J. G., Thomazy V. A., Evans, R. M. 1998: PPARgamma Promotes Monocyte/Macrophage Differentiation and Uptake of Oxidized LDL. *Cell* 93 (2); 241-252.
- Toth, M. J., Tchernof, A., Sites, C. K., Poehlman, E. T. 2000: Menopause-Related Changes in Body Fat Distribution. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 904; 502-506.
- Uesugi, T., Fukui, Y., Yamori, Y. 2002: Beneficial Effects of Soybean Isoflavone Supplementation on Bone Metabolism and Serum Lipids in Postmenopausal Japanese Women: a Four-Week Study. *J Am Coll. Nutr* 21 (2); 97-102.
- van der Velpen, V., Geelen, A., Hollman, P. C., Schouten, E. G., van, '., V, Afman, L. A. 2014: Isoflavone Supplement Composition and Equol Producer Status Affect Gene Expression in Adipose Tissue: a Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Crossover Trial in Postmenopausal Women. *Am J Clin Nutr* 100 (5); 1269-1277.
- Vickers, A. J. 2001: The Use of Percentage Change From Baseline As an Outcome in a Controlled Trial Is Statistically Inefficient: a Simulation Study. *BMC. Med Res Methodol.* 1:6.
- Vihma, V. et Tikkanen, M. J. 2011: Fatty Acid Esters of Steroids: Synthesis and Metabolism in Lipoproteins and Adipose Tissue. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol* 124 (3-5); 65-76.
- Von Eckardstein, A. et Assmann, G. 2007: Störungen im Stoffwechsel der High-Density-Lipoproteine. In Schwandt, P., Parhofer, K. G. *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen*, 112-145. Stuttgart: Schattauer.
- Wächtershäuser, A. et Stein, J. 2007: Lipid and Lipoprotein Metabolism. *Pharm. Unserer Zeit* 36 (2); 98-107.

- Walgren, R. A., Lin, J. T., Kinne, R. K., Walle, T. 2000: Cellular Uptake of Dietary Flavonoid Quercetin 4'-Beta-Glucoside by Sodium-Dependent Glucose Transporter SGLT1. *J Pharmacol. Exp Ther.* 294 (3); 837-843.
- Wang, G., Kuan, S. S., Francis, O. J., Ware, G. M., Carman, A. S. 1990: A Simplified HPLC Method for the Determination of Phytoestrogens in Soybean and Its Processed Products. *J. Agric. Food Chem.* 38 (1); 185-190.
- Wang, H. et Murphy, P. A. 1994: Isoflavone Composition of American and Japanese Soybeans in Iowa: Effects of Variety, Crop Year, and Location. *J. Agric. Food Chem.* 42 (8); 1674-1677.
- Wang, J., Duncan, D., Shi, Z., Zhang, B. 2013: WEB-Based GENE SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt): Update 2013. *Nucleic Acids Res* 41 (Web Server issue); W77-W83.
- Wang, Y., Man, G. W., Chan, F. L., Chen, S., Leung, L. K. 2008: The Red Clover (*Trifolium Pratense*) Isoflavone Biochanin A Inhibits Aromatase Activity and Expression. *Br J Nutr* 99 (2); 303-310.
- Wangen, K. E., Duncan, A. M., Xu, X., Kurzer, M. S. 2001: Soy Isoflavones Improve Plasma Lipids in Normocholesterolemic and Mildly Hypercholesterolemic Postmenopausal Women. *Am J Clin Nutr* 73 (2); 225-231.
- Wasan, K. M., Brocks, D. R., Lee, S. D., Sachs-Barrable, K., Thornton, S. J. 2008: Impact of Lipoproteins on the Biological Activity and Disposition of Hydrophobic Drugs: Implications for Drug Discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7 (1); 84-99.
- Watzl, B. et Leitzmann, C. 2005: *Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln*. Stuttgart: Hippokrates.
- WHO 1996: Research on the Menopause in the 1990s. Report of a WHO Scientific Group. *World Health Organ Tech Rep Ser* 866; 1-107.
- Wirth, A. 2013: Fettstoffwechselstörungen. In Wirth, A. *Adipositas: Epidemiologie. Ätiologie. Folgekrankheiten. Therapie*, 159-168. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Wiseman, H., O'Reilly, J. D., Adlercreutz, H., Mallet, A. I., Bowey, E. A., Rowland, I. R., Sanders, T. A. 2000: Isoflavone Phytoestrogens Consumed in Soy Decrease F(2)-Isoprostane Concentrations and Increase Resistance of Low-Density Lipoprotein to Oxidation in Humans. *Am J Clin Nutr* 72 (2); 395-400.
- Wong, J. M., Kendall, C. W., Marchie, A., Liu, Z., Vidgen, E., Holmes, C., Jackson, C. J., Josse, R. G., Pencharz, P. B., Rao, A. V., Vuksan, V., Singer, W., Jenkins, D. J. 2012: Equol Status and Blood Lipid Profile in Hyperlipidemia After Consumption of Diets Containing Soy Foods. *Am. J. Clin. Nutr.* 95 (3); 564-571.
- Wu, A. H., Yu, M. C., Tseng, C. C., Pike, M. C. 2008: Epidemiology of Soy Exposures and Breast Cancer Risk. *Br. J. Cancer* 98 (1); 9-14.
- Yang, Y., Jiang, W. F., Wang, L. F., Zhang ZB., SI SY., Hong, B. 2009: Characterization of the Isoflavone Pratensein As a Novel Transcriptional Up-Regulator of Scavenger Receptor Class B Type I in HepG2 Cells. *Biol. Pharm. Bull.* 32 (7); 1289-1294.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, T. L. 2012a: Primer-BLAST: a Tool to Design Target-Specific Primers for Polymerase Chain Reaction. *BMC. Bioinformatics.* 13; 134.

- Ye, Y. B., Wang, Z. L., Zhuo, S. Y., Lu, W., Liao, H. F., Verbruggen, M., Fang, S., Mai, H. Y., Chen, Y. M., Su, Y. X. 2012b: Soy Germ Isoflavones Improve Menopausal Symptoms but Have No Effect on Blood Lipids in Early Postmenopausal Chinese Women: a Randomized Placebo-Controlled Trial. *Menopause* 19 (7); 791-798.
- Zanella, I., Marrazzo, E., Biasiotto, G., Penza, M., Romani, A., Vignolini, P., Caimi, L., Di, L. D. 2015: Soy and the Soy Isoflavone Genistein Promote Adipose Tissue Development in Male Mice on a Low-Fat Diet. *Eur. J Nutr* 54 (7); 1095-1107.
- Zhan, S. et Ho, S. C. 2005: Meta-Analysis of the Effects of Soy Protein Containing Isoflavones on the Lipid Profile. *Am J Clin Nutr* 81 (2); 397-408.
- Zhang, B., Kirov, S., Snoddy, J. 2005: WebGestalt: an Integrated System for Exploring Gene Sets in Various Biological Contexts. *Nucleic Acids Res* 33 (Web Server issue); W741-W748.
- Zhang, J. Y., Kothapalli, K. S., Brenna, J. T. 2016: Desaturase and Elongase-Limiting Endogenous Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid Biosynthesis. *Curr. Opin. Clin Nutr Metab Care* 19 (2); 103-110.
- Zhang, X., Shu, X. O., Gao, Y. T., Yang, G., Li, Q., Li, H., Jin, F., Zheng, W. 2003: Soy Food Consumption Is Associated With Lower Risk of Coronary Heart Disease in Chinese Women. *J Nutr* 133 (9); 2874-2878.

Publikationen

Fachzeitschriften:

- **Engelbert, A. K.**, Soukup, S. T., Roth, A., Hoffmann, N., Graf, D., Watzl, B., Kulling, S. E., Bub, A. Isoflavone supplementation in postmenopausal women does not affect leukocyte LDL receptor and scavenger receptor CD36 expression – a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Mol Nutr Food Res.* 2016; 60(9):2008-19.

Kongressbeiträge:

- **Engelbert, A. K.**, Soukup, S. T., Roth, A., Hoffmann, N., Graf, D., Watzl, B., Kulling, S. E., Bub, A. Effekte einer Isoflavonintervention auf die Leukozyten-LDLR- und -CD36-Expression in Equol- und nicht-Equol-produzierenden postmenopausalen Frauen. Abstractband zum 53. Wissenschaftlichen Kongress S. 66, 53. Wissenschaftlicher Kongress der DGE, 2 -4. März 2016, Fulda, Deutschland.
- Feuerstein, C., Larsen, B. D., Toth, R., **Engelbert, A. K.**, Bub, A., Mandrup, S., Gerhaeuser, C. Regulation of genes associated with Metabolic Syndrome by DNA methylation - A correlation analysis with clinical parameters. *Epigenetics, Obesity and Metabolism Conference 2015*, 11.-14. Oktober 2015, Cambridge, UK.
- **Engelbert, A. K.**, Graf, D., Roth, A., Kriebel, A., Watzl, B., Bub, A. Einfluss von Isoflavonen auf die Leukozyten-LDLR- und -CD36-Expression postmenopausaler Frauen. Abstractband zum 52. Wissenschaftlichen Kongress S. 69, 52. Wissenschaftlicher Kongress der DGE, 11.-13. März 2015, Halle-Wittenberg, Deutschland.
- **Engelbert, A. K.**, Ferrario, P. G., Watzl, B., Kulling, S. E., Bub, A. Body fat modulates effects of isoflavones on lipoproteins in postmenopausal women. Abstractband zum 11th World Congress on Polyphenols Applications S. 98, 11th World Congress on Polyphenols Applications, 20.-21. Juni 2017, Wien, Österreich.

Vorträge:

- **Engelbert, A. K.** Effects of Isoflavones on LDL-receptor and CD36 receptor expression in leukocyte subsets. *Pathway27 Annual Meeting*, 13. März 2017, Karlsruhe, Deutschland.