

Aus der Abteilung für Ernährungsmedizin

Leiter: Prof. Dr. med. Olaf Adam

Medizinische Klinik und Poliklinik IV

Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Wirkung der Kombination von Genistein mit
anderen sekundären Pflanzenstoffen auf die Konzentration des
Genistein im Vollblut, sowie die totale antioxidative Kapazität
und die Lipidperoxidation im Plasma gesunder junger
Erwachsener.**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Gökçen Alço

aus Landau an der Isar

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Olaf Manfred Adam

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. rer. Nat. Sven Lammich
Prof. Dr. med. Berthold Koletzko

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 10.06.2020

Das schönste Glück des denkenden Menschen ist,

das Erforschliche erforscht zu haben

und das Unerforschte ruhig zu verehren.

Johann Wolfgang von Goethe

*Meinem Opa (Büyükba) und meinen Eltern in Liebe und
Dankbarkeit gewidmet.*

Inhaltsverzeichnis

Dissertation	1
1 Einleitung.....	8
2 Stand der Wissenschaft.....	14
2.1 Klassifizierung der Polyphenole, insbesondere Flavonoide (Genistein, Quercetin und Naringenin).....	14
2.2 Biosynthese, Vorkommen und Funktion in der Pflanze.....	15
2.2.1 Biosynthese der Flavonoide	15
2.2.2 Vorkommen der Flavonoide in Lebensmitteln und tägliche Aufnahme	15
2.2.3 Funktion der Flavonoide in der Pflanze.....	19
2.3 Biokinetik.....	19
2.3.1 Biokinetik und Bioverfügbarkeit.....	19
2.3.2 Aufnahme der Flavonoide.....	19
2.3.3 Metabolismus.....	21
2.4 Interindividuelle Unterschiede des Genisteinstoffwechsels.....	29
2.4.1 Alter und Geschlecht.....	29
2.4.2 Ernährung.....	30
2.5 Physiologische Eigenschaften von Genistein	30
2.5.1 Entzündungshemmung durch antioxidative Eigenschaften des Genisteins	31
2.6 Substratreduktionstherapie mit Genistein bei Sanfilippo-Syndrom	34
2.6.1 Sanfilippo-Syndrom (Mukopolysaccharidose Typ III, MPS III).....	34
2.6.2 Substratreduktionstherapie (SRT) bei MPS III.....	36
3 Ziel der vorliegenden Arbeit.....	41
4 Material und Methoden.....	42
4.1 Probandenkollektiv	42

4.1.1 Rekrutierung der Probanden.....	42
4.1.2 Telefonscreening und Auswahl der Probanden	42
4.1.3 Einschluss-, Ausschluss- und Abbruchkriterien.....	43
4.2 Untersuchungsmethoden	43
4.2.1 Untersuchung vor der Aufnahme.....	43
4.2.2 Diätetische Intervention.....	45
4.3 Studiendesign	45
4.4 Versuchsprotokoll	45
4.5 Versuchspräparate und Dosierungen	46
4.6 Studienablauf	47
4.6.2 Bestimmung der totalen antioxidativen Kapazität (TAC).....	52
4.6.3 Bestimmung von Malondialdehyd (MDA).....	54
4.6.4 Bestimmung der Mikrobiota	56
4.7 Statistische Auswertung und Beratung.....	56
4.7.1 Dateneingabe und Zielgrößen.....	57
4.7.2 Statistische Tests	57
5 Ergebnisse	59
5.1 Deskriptive Statistik.....	59
5.1.1 Soziodemographische Daten.....	59
5.1.2 Telefonscreening und Voruntersuchung.....	60
5.1.3 Ergebnisse der Befragung mittels Verzehrhäufigkeitsfragebogen (Food-Frequency-Questionnaire, FFQ) vor der Studienteilnahme	61
5.2. Laboranalysen	63
5.2.1 TAC _Δ	63
5.2.2 MDA _Δ	67
5.2.3 Genisteinbestimmung mittels HPLC.....	71
4.4 Versuchsprotokoll	74
5.2.4 Änderungen des Mikrobioms durch die Intervention.....	79

6	Diskussion.....	81
6.1	Totale antioxidative Kapazität (TAC)	81
6.2	Geschlechtsunterschiede und TAC.....	83
6.3	Ernährung und TAC	84
6.4	Körperliche Aktivität (Halb- und Marathon) und TAC.....	85
6.5	Wirkung verschiedener Flavonoide auf Malondialdehyd (MDA).....	86
6.6	Das Mikrobiom	89
6.7	Bestimmung von Genistein und Genistin im Vollblut	90
6.7.1	Genistin	90
6.7.2	Genistein (Aglykon)	91
6.8	<i>Bestätigung unserer These in der Literatur</i>	98
6.9	Limitationen der Studie.....	99
7	Zusammenfassung.....	100
7.1	Ausblick	100
8	Literaturverzeichnis.....	102
9	Abkürzungsverzeichnis.....	126
10	Abbildungsverzeichnis.....	133
11	Tabellenverzeichnis	136
12	Anhang	139
12.1	Telefonscreening	139
12.2	Körperliche Untersuchung	142
12.3	Patientenaufklärung und Einwilligungserklärung	143
12.4	Teilnehmervertrag.....	145
12.5	Anleitung zur Stuhlentnahme	147
12.6	Verzehrshäufigkeitsfragebogen (Food-Frequency-Questionnaire)	149
12.7	Lebensmittelempfehlung während der Studienzeit	150
12.8	Laboruntersuchung	151

13	Danksagung	152
14	Eidesstattliche Erklärung.....	154

1 Einleitung

Speicherkrankheiten, die mit Ablagerungen von nicht abbaubaren Substanzen im Gehirn einhergehen, sind einer Behandlung nur schwer zugänglich. Hierzu gehört das Sanfilippo-Syndrom (Mukopolysaccharidose Typ III, MPS-III) mit seinen Untergruppen (A - D). Untersuchungen der letzten Jahre haben deutlich gezeigt, dass die Schädigung der Nervenzellen weniger durch die Ablagerungen des bei dieser Erkrankung nicht abbaubaren Heparansulfat (HS) bedingt ist, als vielmehr durch eine begleitende Entzündung des umgebenden Gewebes (Martins et al., 2015; Garbuzova-Davis et al., 2013; Arfi et al., 2011). Bei den cerebralen Speicherkrankheiten spielt die Neuroinflammation, ausgelöst durch den oxidativen Stress, eine große Rolle und trägt zum Fortschreiten der Krankheitssymptome wesentlich bei (Trudel et al., 2015). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass bei den cerebralen Speicherkrankheiten weniger die Ablagerungen als vielmehr die Neuroinflammation, für die resultierende Schädigung neuronaler Strukturen bestimmt ist (Wang et al., 2016). Die Folgen dieser Neuroinflammation sind eine Schwellung des Gewebes mit (a) Schädigung der kleinsten Blutgefäße (Kapillaren), (b) Zerstörung der Zellmembranen, (c) Einlagerung von krankheitstypischen Stoffwechselprodukten, (d) einer erheblichen Schwellung des Extrazellulärraumes, sowie (e) einer IgG-vermittelten mikrovaskulären Durchlässigkeit und (f) ausgedehnter lysosomaler Schwellung im kapillaren Endothelium (Garbuzova-Davis et al., 2013).

Seit den 80er Jahren des vergangenen Jahrhunderts ist zunehmend deutlich geworden, dass die Ernährung einen erheblichen Einfluss auf die Entzündungsbereitschaft im Körper hat. Dies wurde zunächst bei Grönland-Eskimos festgestellt, die sehr selten an entzündlich-rheumatischen Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen oder Asthma litten. Auch Herz-Kreislauf-Erkrankungen, die auf einer Arteriosklerose beruhen, waren viel seltener als in der Allgemeinbevölkerung der Industrienationen (Backer et al., 2016; Schaebel et al., 2013; Bjerregaard et al., 1997; Newman et al., 1993). Der Grund für diese geringe Entzündungsbereitschaft war das Vorhandensein von entzündungshemmenden Fettsäuren, die sich in der fischreichen Nahrung befinden. Dies wurde durch Untersuchungen an Volksgruppen mit ähnlichem Verzehrmuster bestätigt, wie an norwegischen Küstenbewohnern oder japanischen Fischern. (Maehre et al., 2015; Sekikawa et al., 2015; Gabriel & Michaud, 2009). Im Gegensatz dazu ist die Kost von Angehörigen westlicher Industrienationen, wie Deutschland, entzündungsfördernd (Agus et al., 2016; Manzel et al., 2014; Thorburn et al., 2014). Eine wichtige entzündungsfördernde Komponente ist die nur in Produkten tierischer Herkunft vorhandene Arachidonsäure (AS) (Calder, 2013). Das ist eine mehrfach ungesättigte Fettsäure

der Omega-6 Reihe mit sehr speziellen Funktionen. Ihr metabolischer Konkurrent ist die entzündungshemmende Fettsäure in Fischen, die Eicosapentaensäure (EPA), die zur Reihe der Omega-3-Fettsäuren gehört (Adam, 2017; Calder, 2013; Adam et al., 2003; Kremer et al., 1995). Sie gleicht der AS völlig, bis auf eine zusätzliche Doppelbindung im Molekül. Beide Fettsäuren haben 20 (griechisch 20 = eicosa) Kohlenstoffatome. Die eine zusätzliche Doppelbindung der EPA bedingt den großen Wirkunterschied (Adam, 2017; Calder, 2013; Adam et al., 2003). Aus beiden mehrfach ungesättigten Fettsäuren, EPA und AS, werden sogenannte Eicosanoide gebildet, deren Molekülkette ebenfalls aus 20 Kohlenstoffatomen besteht. Durch Oxidation der AS entstehen mehr als 80 unterschiedliche Wirkstoffe, die fast alle entzündungsfördernde Effekte haben (Adam, 2017; Calder, 2013, 2010; Adam et al., 2003; Kremer et al., 1995). EPA dagegen wird in geringem Umfang zu entzündungshemmenden Wirkstoffen oxidiert, ihre Hauptwirkung entfaltet sie aber durch Verdrängung der AS aus den Zellmembranen und durch Hemmung von deren Umwandlung zu entzündungsfördernden Eicosanoiden (Adam, 2017, 2010). Zwischen den Omega-6- und Omega-3-Fettsäuren besteht eine Kompetition für die Aufnahme, den Transport und die Umwandlung zu Entzündungsmediatoren (Adam, 2017; Calder, 2013). Zu der entzündungshemmenden Wirkung der Fischölfettsäure gibt es mehrere Untersuchungen, die in kritischen Reviews und auch in mehreren Metaanalysen zusammengefasst worden sind, (Ellulu et al., 2015; Miles & Calder, 2015; James et al., 2010; Calder, 2006). Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass für die entzündungshemmenden Wirkungen der EPA der Evidenzgrad 1A besteht (Adam, 2017; Calder, 2006). Dies bedeutet, dass die entzündungshemmende Wirkung der EPA zweifelsfrei bewiesen ist.

Die Bildung der Entzündungsstoffe aus AS ist ein oxidativer Vorgang, Sauerstoffradikale werden in das Molekül der Fettsäure eingebaut und wandeln die Fettsäure so in hochwirksame Folgeprodukte um. Diese Folgeprodukte lösen in der Zellumgebung die Zeichen der Entzündung aus, im Gehirn zeigt sich dies durch eine Ödembildung und Schwellung, wie sie bei dem Sanfilippo-Syndrom nachzuweisen ist (Martins et al., 2015; Garbuzova-Davis et al., 2013; Arfi et al., 2011). Der Wirkmechanismus der Entzündungshemmung entspricht dem, wie er auch mit Medikamenten, die als Hemmer der Cyclooxygenase im Handel sind (Cox-1-, Cox-2-Hemmer), erfolgt. Allerdings ist die medikamentöse Hemmung der Cyclooxygenase ein irreversibler Prozess, der nur durch Neubildung des Enzyms rückgängig gemacht werden kann, während die Hemmung durch EPA eine kompetitive Hemmung ist, die durch Zufuhr von AS wieder rückgängig gemacht werden kann (Das, 2005; Obata et al., 1999). Der Vorteil der ernährungstherapeutischen Hemmung der Entzündungsenzyme ist das Fehlen von

Nebenwirkungen, wie sie von den Cyclooxygenasehemmern bekannt sind. Zudem hemmen diese nicht-steroidalen Antirheumatika nur die Aktivität der Cyclooxygenase, während EPA sowohl die Cyclo- wie auch die Lipoxygenase hemmt. Eine weitere Möglichkeit der Entzündungshemmung durch die Ernährung ist die Verminderung der Arachidonsäurezufuhr. Derzeit werden 200 bis 400 mg AS täglich aufgenommen, der Bedarf liegt unter 100 mg. Die Überversorgung erfolgt vor allem durch fleischreiche Ernährung und dem reichlichen Verzehr tierischer Produkte (Adam, 2017). In einer doppelblinden placebokontrollierten Studie konnte gezeigt werden, dass sich die Hemmung der Cyclo- und Lipoxygenase durch EPA verstärkt, wenn man den Verzehr arachidonsäurehaltiger Lebensmittel einschränkt (Adam et al., 2003). Die Bildung der entzündungsfördernden Eicosanoide aus AS ist ein oxidativer Vorgang, deshalb haben Antioxidantien einen Einfluss auf die Entzündung, wie dies in mehreren Studien (Kapoor et al., 2005; Gadek et al., 1999; Ferrandiz & Alcaraz, 1991) beschrieben ist.

Die antioxidative Wirkung der Ernährung kann durch Verwendung von frischen Früchten, Gemüse und Kräutern verstärkt werden. Die entzündungshemmende Wirkung der EPA kann durch Verwendung von Ölen mit einem hohen Anteil an Omega-3 Fettsäuren unterstützt werden, z. B. mit Rapsöl oder Leinöl. Weitere Komponenten der antiinflammatorischen Ernährung sind Spurenelemente, wie Selen und Zink, die als Cofaktoren antioxidativ wirksamer Enzyme, wie der Glutathionperoxidase, fungieren. Alle diese Maßnahmen werden unter dem Begriff A.D.A-Maßnahmen (**All Dietary Antiinflammatory Means, Alle Diätetischen Antientzündlichen Maßnahmen**), zusammengefasst. Bisher haben sich diese Maßnahmen bei entzündlich-rheumatischen Erkrankungen bewährt (Adam, 2010). Deutliche Hinweise auf die Wirksamkeit dieser Maßnahmen gibt es auch für die Multiple Sklerose, einer Autoimmunerkrankung des Gehirns, deren neurologische Ausfälle ebenfalls durch eine Zerstörung von Nervenfasern und eine deutliche Neuroinflammation, entsprechend den Befunden bei Mukopolysaccharidose (MPS), bedingt sind. Weitere Hinweise auf die entzündungshemmende Wirkung der A.D.A-Maßnahmen gibt es für chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED), wie die Colitis ulcerosa oder den Morbus Crohn (Adam, 2010). Für MPS-Kranke gibt es bisher nur sporadische Beobachtungen, so dass hier eine Studie dringend erforderlich erscheint. Allerdings ist durch diese A.D.A-Maßnahmen keine Heilung, sondern nur eine Verzögerung im Krankheitsverlauf zu bewirken.

In der Literatur wurde gezeigt, dass Antioxidantien die Neuroinflammation bei lysosomalen Speicherkrankheiten vermindern können und dadurch die klinischen Folgen weniger gravierend sind (Kim et al., 2013; de Ruijter et al., 2012; Wegrzyn, 2012; Delgadillo et al., 2011; Malinowska et al., 2010; Malinowska et al., 2009; Piotrowska et al., 2008). In vitro Versuche an MPS-III-

Fibroblasten (Piotrowska et al., 2006) und Tierversuche (Malinowska et al., 2010; Malinowska et al., 2009) haben gezeigt, dass sich mit dem aus Soja hergestelltem Isoflavon Genistein (4,5,7-trihydroxyisoflavone) eine Verminderung der neurologischen Symptome und sogar ein geringerer Anfall des, bei MPS-III nicht degradierbaren, Heparansulfat erzielen lässt. Genistein ist deshalb bei MPS-III von besonderem Interesse, da seine antioxidative Wirkung die Neuroinflammation abschwächt und es im Sinne einer Substratreduktionstherapie (SRT, engl. substrate reduction therapy), den Anfall des nicht degradierbaren Heparansulfats vermindert (Kim et al., 2013; de Ruijter et al., 2012; Delgadillo et al., 2011; Piotrowska et al., 2008; Jakobkiewicz-Banecka et al., 2007). Beide Wirkungen sind geeignet, das Auftreten neuronaler Ausfälle zu verzögern und zu vermindern. Es konnte ein Zusammenhang zwischen der totalen antioxidativen Kapazität (TAC, engl. total antioxidant capacity) im Blutplasma und der Verfügbarkeit von Antioxidantien, wie z. B. Flavonoide, gezeigt werden (Harasym & Oledzki, 2014). Bei diesen Untersuchungen wurde deutlich, dass der Anstieg der TAC durch ein einzelnes Antioxidans limitiert ist, aber durch die Kombination verschiedener Antioxidantien gesteigert werden kann (Kloska et al., 2011; Arfi, Richard, Gandolphe, et al., 2010). Für die Ineffizienz eines einzelnen Antioxidans reaktive Sauerstoffspezies (ROS; engl. *reactive oxygen species*) zu inaktivieren werden unzureichende Plasmakonzentrationen, wie auch elektrostatische Faktoren als Gründe genannt. Zum einen ist die Resorption von Genistein nicht effizient, da es von der Darmmikrobiota degradiert wird. Zum anderen ist die elektrostatische Ladung eines ROS so groß, dass kein einzelnes Antioxidans zur Neutralisierung in der Lage ist (Ozdal et al., 2016; Crozier et al., 2010; Crozier et al., 2009; Hu 2007; Setchell et al., 2001). Zur Reduktion von ROS sind deshalb mehrere Antioxidantien erforderlich, die im Rahmen einer Redoxkette effizient zusammenwirken können (Kloska et al., 2011). Untersuchungen an Zellkulturen (Piotrowska et al., 2008; Piotrowska et al., 2006) und Tierversuche (Malinowska et al., 2010; Malinowska et al., 2009) sprechen für eine therapeutische Wirkung von Genistein. Eine humane Studie an MPS-III-Erkrankten (Piotrowska et al., 2008) lieferte gute Ergebnisse in Bezug auf die Hemmung der Glykosaminoglykane-Synthese (GAG), Verbesserung der Haarmorphologie und der kognitiven Funktion durch die Einnahme eines genisteinreichen Sojaextraktes, allerdings wurde hier die TAC während der Studie nicht untersucht. In weiteren Studien an MPS-III-Patienten konnte die Abnahme von Heparansulfat im Plasma durch die Einnahme von Genistein bestätigt werden, allerdings nur mit geringer bis keiner klinischen Wirksamkeit. Es wurde vermutet, dass die erreichten Plasmakonzentrationen des Genisteins zu niedrig waren (de Ruijter et al., 2012; Delgadillo et al., 2011).

Da höhere Dosierungen des Genistein nur unzureichend resorbiert und vermehrt durch die Darmmikrobiota abgebaut werden, sowie als Phytoöstrogene zu unerwünschten Wirkungen führen können (Kim et al., 2013; Ososki & Kennelly, 2003; Setchell & Cassidy, 1999), haben wir den Ansatz verfolgt, durch metabolisch konkurrierende oder additiv wirkende sekundäre Pflanzenstoffe eine Verminderung der renalen Clearance, bzw. eine Steigerung der TAC im Plasma zu bewirken und damit den Plasmaspiegel von Genistein zu erhöhen. Wir haben untersucht, ob durch die Kombination mit anderen antioxidativ wirksamen Flavonoiden eine Steigerung der TAC messbar wird. Zudem habe wir mit der hier beschriebenen Studie geprüft, ob sich die Spiegel des Genistein beim Menschen durch die Co-Medikation mit Polyphenolen, insbesondere Flavonoiden, anheben lassen. Durch andere sekundäre Pflanzenstoffe, wie Naringenin oder Quercetin könnte eine Kompetition um die zur Elimination zuständigen Enzyme die Verzögerung der Ausscheidung von Genistein bewirken. Dies hätte einen Anstieg des Genistein im Plasma zur Folge. Hierdurch könnte zum einen die Bildung des Speicherprodukts HS vermindert zum anderen eine Zunahme der antioxidativen Kapazität im Plasma erwartet werden (Jakobkiewicz-Banecka et al., 2016; Kloska et al., 2011; GENiSIS2013).

Abhängig von der Einschränkung der Aktivität des verursachenden Enzyms Heparansulfatase und überlagert von Ernährungsfaktoren, gibt es sehr unterschiedliche Verläufe des MPS-IIIA Syndroms. In der Literatur finden sich Verlaufberichte, die Kinder mit 3 bis 4 Jahren bereits als debil und pflegebedürftig beschreiben, während andere ein Lebensalter von 2 oder 3 Jahrzehnten erreichen (Valstar et al., 2010; Valstar et al., 2008). Neuere Genanalysen lassen sogar vermuten, dass es Mutationen des Gens 17q25.3 gibt, die für die Biosynthese der Heparansulfatase zuständig ist, die eine fast normale Lebenserwartung und geistige Entwicklung zulassen (Van Hove et al., 2003). Bei den erwähnten entzündlichen Erkrankungen (z. B. Arteriosklerose durch homozygote familiäre Hypercholesterinämie, rheumatische Erkrankungen) ist eine Ernährungstherapie bei starker genetischer Disposition so gut wie wirkungslos, während milder Verlaufsformen der Ernährungstherapie gut zugänglich sind (Khanna et al., 2017; Torres et al., 2015; Root et al., 2012). Deshalb könnte auch der Effekt der Ernährungstherapie bei neurodegenerativen Erkrankungen individuell unterschiedlich sein. Bei sehr schweren Verläufen könnte die Ernährungstherapie, deren Effekte nur die Neuroinflammation eindämmen und erst nach etwa 2 Monaten Therapie beginnen, wirkungslos bleiben. Dagegen könnten Betroffene mit prothriertem Krankheitsverlauf von der Ernährungstherapie profitieren (Khanna et al., 2017; Torres et al., 2015). Diese therapeutischen Gründe, aber mehr noch die Ungewissheit der Eltern, auf welche Probleme sie sich einzustellen haben, machen es dringend erforderlich, dass bessere prognostische Kriterien erarbeitet

werden, um den Schweregrad und den Verlauf der Erkrankung präziser abschätzen zu können und dadurch die Erkrankten zu identifizieren, die von einer Ernährungstherapie, die das übergeordnete Ziel dieser Untersuchung ist, profitieren.

2 Stand der Wissenschaft

2.1 Klassifizierung der Polyphenole, insbesondere Flavonoide (Genistein, Quercetin und Naringenin)

Im Pflanzenreich sind phenolische Verbindungen weit verbreitete bioaktive Substanzen, die Farbstoffe, Abwehrstoffe, Geschmacksstoffe und Gerbstoffe, aber auch Gerüstsubstanzen, wie Lignine, bilden. Polyphenole (PP) sind durch die Anwesenheit von mehreren Phenolgruppen (d.h. aromatischen Ringen mit Hydroxylgruppen) charakterisiert (Vogt, 2010; Boudet, 2007; Knaggsa, 2003). Die Polyphenole werden entsprechend der Struktur ihres Kohlenstoffskeletts in Flavonoide, Phenolsäuren und die weniger häufigen Stilbene, Lignane und Cumarine unterteilt.

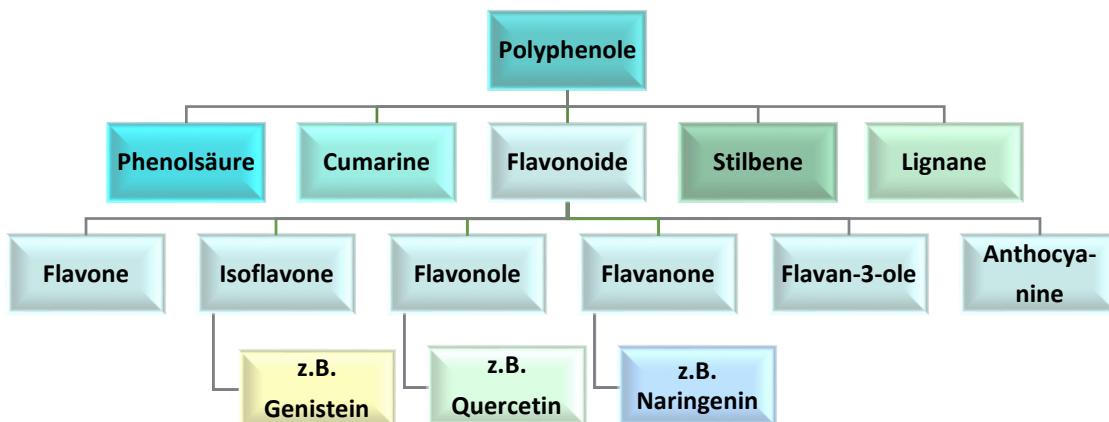


Abbildung 1: Stoffklassen der Polyphenole. Die Polyphenole werden in Phenolsäure, Cumarine, Flavonoide, Stilbene und Ligane aufgeteilt. Die Flavonoide teilen sich wiederum in sechs Untergruppen auf: Flavone, Isoflavone, Flavonole, Flavanone, Flavanol-3-ole und Anthrocyanide.

Flavonoide umfassen Flavone, Isoflavone (z.B. Genistein), Flavonole (z.B. Quercetin), Flavanone (z.B. Naringenin), Flavanol-3-ole und Anthocyanidine, also Pigmente, die für die Farbe der meisten Früchte verantwortlich sind (Manach et al., 2004; Scalbert & Williamson, 2000) (siehe Abbildung 1). Sie leiten sich strukturell vom Flavan (2-Phenyl-benzo-dihydropyran) ab und bestehen aus einem 15-C-Kohlenstoffgrundgerüst (C6-C3-C6-Ringsystem) mit einem O-Heterozyklus (Ring C) und zwei aromatischen Ringen A und B, die über eine C- Brücke miteinander verknüpft sind (Abbildung 2) (Belitz, 2008; Herrmann, 1992). Die große Vielfalt der Flavonoide entsteht durch die unterschiedlichen Oxidationsstufen im sauerstoffhaltigen Ring, die Substitutionsmuster an den aromatischen Ringen und das Anhängen von Zucker (Glykosid), die das analytische und

biochemische Verhalten beeinflussen (Scalbert et al., 2002). Flavonoide wie Genistein (Isoflavon), Quercetin (Flavonol) und Naringenin (Flavanon), die in der vorliegenden Arbeit eine Rolle spielen, sind in Abbildung 2 dargestellt. Bei den Isoflavonen, z.B. Genistein, ist der B-Ring in 3. Position am C-Ring verknüpft und bei den Flavonolen (z.B. Quercetin) und Flavanonen (z.B. Naringenin) an der 2. Position. Der C-Ring besteht aus einem Pyranring, der in 4. Position eine Ketokonfiguration aufweist (s. Abbildung 2).

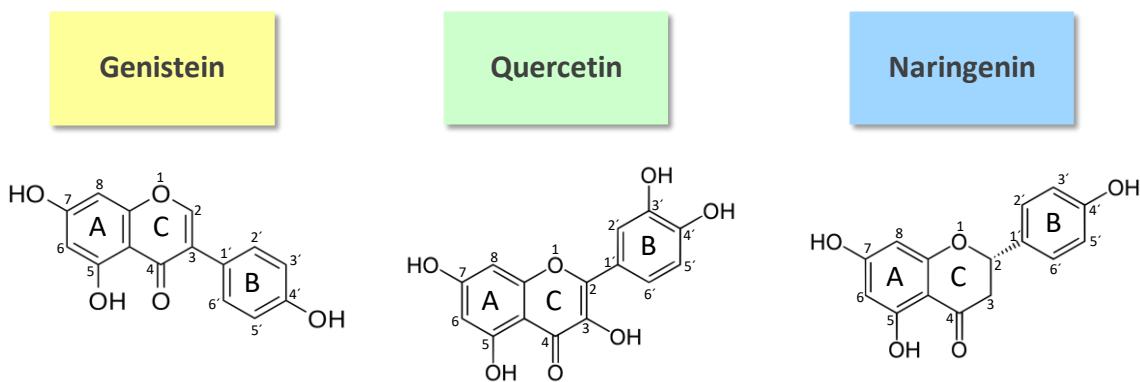


Abbildung 2: Chemische Struktur von Genistein, Quercetin und Naringenin.

2.2 Biosynthese, Vorkommen und Funktion in der Pflanze

2.2.1 Biosynthese der Flavonoide

Die Biosynthese der Flavonoide in der Pflanze beginnt mit der aromatischen Aminosäure Phenylalanin im Shikimisäureweg. Der Ausgangsstoff für die Flavonoide ist das p-Cumaroyl-Coenzym, das in mehreren Schritten aus Phenylalanin gebildet wird (Hänsel, 2007). Mit der Wirkung der Chalconflavanonisomerase (CHI) erfolgt der Ringschluss des dritten Ringes zu Flavanonen (z.B. Naringenin). Durch das Enzym Isoflavonsynthase wird aus Naringenin das Genistein (4', 5, 7-trihydroxyisoflavone) gebildet. Für die Synthese von Quercetin wird das Naringenin an C-3 Position durch Flavanon-3-Hydroxylase hydroxyliert und im Anschluß über Flavonolsynthase zu Flavonol synthetisiert.

2.2.2 Vorkommen der Flavonoide in Lebensmitteln und tägliche Aufnahme

2.2.2.1 Vorkommen von Genistein (Isoflavon)

Mehr als 8000 Flavonoide wurden in Pflanzen bereits identifiziert und die Liste wächst ständig weiter (Hänsel, 2007). Flavonoide kommen größtenteils als Glykoside, also Zuckerkonjugate, im Pflanzenreich vor, während der Anteil der Aglykone (ohne Zuckerrest) relativ niedrig ist. Die zugehörige Zuckereinheit ist sehr häufig Glukose oder Rhamnose, es können auch andere

Zuckerarten wie Galactose, Arabinose, Xylose, Glucuronsäure beteiligt sein (B. G. Kim et al., 2015). Isoflavone, insbesondere Genistein, findet sich vor allem in Leguminosae (Schmetterlingsblütler). Hierbei sind die Sojabohne und -produkte die wichtigsten Quellen in der Nahrung für Genistein (Genovese et al., 2007; H. Wang & Murphy, 1994b; Coward et al., 1993). In Abhängigkeit von der Art der Verarbeitung der Sojabohne liegt Genistein als Glykosid = Genistin (native Sojaproducte z.B. Tofu oder Sojamilch) oder als Aglykon (z.B. Miso oder Sojasauce) vor. D.h. der Zuckerrest wird durch die für die Fermentation eingesetzten Mikroorganismen enzymatisch abgespalten (Liggins et al., 2000; Coward et al., 1993) Je nach Sorte, der geographische Lage, der Erntezeit und anderen Umwelteinflüssen, kann die Konzentration des Genisteins in dem Produkt schwanken (Erdman et al., 2004; H. Wang & Murphy, 1994a). Für ausgewählte Nahrungsmittel können detaillierte Angaben über die USDA-Database des US Departments of Agriculture in Maryland, USA (D. B. H. a. J. M. H. Seema Bhagwat, 2008) und die Online- Datenbank „Phenol-Explorer“ (Rothwell JA, 2013) erhalten werden (s. Tabelle 1).

Tabelle 1: Genistein in Lebensmitteln. Die detaillierten Angaben wurden mit der *USDA Database for the Isoflavone Content of Selected Foods Release 2.1* und die Online-Datenbank *Phenol-Explorer* erstellt und zeigt die Genisteinkonzentration bei ausgewählten Lebensmitteln an. Die meist erheblichen Konzentrationsunterschiede bei einem Lebensmittel werden vom Zeitpunkt der Ernte, dem Reifegrad, dem Boden und anderen Faktoren verursacht.

Genistein in Lebensmittel	Mean [mg/100g]	Min [mg/100g]	Max [mg/100g]	Referenz
Sojamehl	89,42	33,5	150	USDA 2.1 (2015)
Tempeh	37-36,15	1	112	USDA 2.1 (2015)
Natto	37-37,66	22	59	USDA 2.1 (2015)
Miso	23,24	1,45	52,40	USDA 2.1 (2015)
Sojabohne	22,57 (roh) 7,06 (gekocht)	0,04	62,7	USDA 2.1 (2015)
Tofu, roh	12,99	2,89	18,66	USDA 2.1 (2015)
Rotklee	10	-	-	USDA 2.1 (2015)
Sojamilch [mg/L]	4,94	2,38	71	Rothwell et al., Phenol-Explorer 3.0 (2013)
Säuglingsnahrung	1-15	1	15	USDA 2.1 (2015)

In der westlichen Ernährung liegt die tägliche Aufnahme von Isoflavonen unter 2 mg pro Tag. In asiatischen Ländern dagegen werden aufgrund der traditionell sojareichen Ernährungsweise, wie Miso (Sojabohnenpaste), Tempeh (Fermentationprodukt aus Sojabohnen und Schimmelpilz) und Natto (Fermentationsprodukt aus Sojabohnen und *Bacillus subtilis* ssp.) bis zu 60 – 80 mg

Isoflavone pro Tag aufgenommen (Kumar et al., 2007). Diese Unterschiede zwischen östlicher und westlicher Ernährung werden in der Literatur kontrovers diskutiert. Unter anderem wird angenommen, dass der regelmäßige und damit hohe Verzehr von Isoflavonen einen wesentlichen Faktor für die niedrige Inzidenz von z.B. Prostatacarzinomen darstellt (Perabo et al., 2009). Die Isoflavonaufnahme kann bei vegetarischer oder veganer Ernährung bis zu 75 mg betragen (Bakker, 2004). In der Postmenopause der Frau eingesetzte Nahrungsergänzungsmittel auf Soja-Basis können die Isoflavonaufnahme bis auf 100 mg erhöhen (Reiter et al., 2009; Nurmi et al., 2002).

Die Verwendung von Soja für die Säuglingsnahrung hat sich im letzten Jahrzehnt verdoppelt. Hierzu führt die häufiger werdende Milchallergie in der Muttermilch bei Säuglingen oder eine Allergie gegen Kuhmilch (Bhatia & Greer, 2008; Osborn & Sinn, 2004). Säuglingsnahrung auf Sojabasis enthält jedoch signifikante Mengen an dem Phytoöstrogen Genistein. Trotz vieler Sicherheitstudien (Lasekan et al., 1999; Graham et al., 1970) wird die große Menge an Phytoöstrogen für Säuglinge als bedenklich angesehen (Westmark, 2016; Health, 2009; Badger et al., 2002; Nagao et al., 2001). Säuglinge nehmen mit der Ernährung auf Sojabasis täglich 22 – 45 mg/Tag oder 4,2 - 9,4 mg/kg/Körpergewicht auf (Dinsdale & Ward, 2010; Koletzko et al., 2006; Strom et al., 2001; Setchell et al., 1998). Diese Dosis ist um ein Vielfaches höher als die Menge der Aufnahme dieser Phytoöstrogene mit der Muttermilch (0,01 mg/Tag). Wie sich diese erhöhte Zufuhr auf die Entwicklung der Fortpflanzungsorgane, das Immunsystem und die Schilddrüse bei Säuglingen auswirkt, ist nicht abschließend geklärt (BfR, 2007). Bei erwachsenen Frauen kann es durch Phytoöstrogene zu Veränderungen im Menstruationszyklus kommen (Cassidy et al., 1994).

2.2.2.2 Vorkommen von Quercetin (Flavonol)

Flavonole sind ubiquitäre Flavonoide in Lebensmitteln, einer der Hauptvertreter ist das Quercetin (Manach et al., 2005). Flavonole liegen in glykosylierter Form, häufig mit Glucose, Galaktose oder dem Disaccharid Rutinose (Rhamnosyl-(1-6)-glucosid) verknüpft in den Lebensmitteln vor, während Verbindungen mit Rhamnose, Arabinose, Xylose und der Glucuronsäure weniger häufig vorkommen (Wong, 2017; Hermann 1976). Quercetin wird als das am häufigsten vorkommende und wichtigste Aglykon der Flavonole angesehen und liegt in der Natur nur in seiner glykosylierten Form vor. Für Quercetin sind bisher 170 Glykoside bekannt (Rechkemmer, 2001). Die reichsten Quercetin-Quellen sind Kapern, Liebstöckel, Dill, Oregano, Zwiebeln und Heidelbeere (s. Tabelle 2). Die tägliche Zufuhr von Flavanolen wird für Männer und Frauen im Alter von 14 – 80 Jahren in Deutschland mit 386 mg/Tag angegeben (Vogiatzoglou

et al., 2014). Hierbei sind die Hauptquellen für die Aufnahme von Flavanolen Obst und Obstprodukte sowie Getränke wie Tee und Fruchtsäfte. Je nach Ernährungsgewohnheit, wie z.B. vegetarisch oder vegan, kann die Aufnahme bis auf 841 mg/Tag steigen (Vogiatzoglou et al., 2014; Chun et al., 2007).

Tabelle 2: Quercetin in Lebensmitteln. Die Quercetinmittelwerte und Schwankungsbreite in Lebensmitteln wurden mit der *USDA Database for the Isoflavone Content of Selected Foods Release 3.0* (D. B. H. Seema Bhagwat, Joanne M. Holden, 2015) und die Online-Datenbank *Phenol-Explorer* erstellt.

Quercetin in Lebensmittel	Mean [mg/100g]	Min [mg/100g]	Max [mg/100g]	Referenz
Kapern, roh	233	149	323	USDA 3.0 (2011)
Liebstöckel	170	-	-	USDA 3.0 (2011)
Dill	55	7	110	USDA 3.0 (2011)
Oregano, mexikanisch	42	34	47	USDA 3.0 (2011)
Zwiebel, roh	21	0	119	USDA 3.0 (2011)
Heidelbeere	8	0	19	USDA 3.0 (2011)

2.2.2.3 Vorkommen von Naringenin (Flavanon)

In Lebensmitteln finden sich Flavanone in Artischocken und bestimmten Kräutern, wie mexikanischer Oregano oder Rosmarin. Sie tragen, im Vergleich zu Zitrusfrüchten, nur einen geringeren Anteil zur durchschnittlichen Flavonoid-Aufnahme bei. Eines der Haupt-Aglykone ist das Naringenin (s. Tabelle 3). Die Glykolisierung der Flavanone erfolgt meist durch ein Disaccharid an Position sieben: entweder durch eine Neohesperidose, die einen bitteren Geschmack verleiht (wie Naringin in Grapefruit). In der Zitrusfrucht können besonders die Albedo (der weiße Teil) und die Segmentmembranen einen hohen Flavanongehalt haben und deshalb kann die ganze Frucht bis zu fünfmal so viel Flavone wie ein Glas des Saftes enthalten (Hertog et al., 1993). Die tägliche Aufnahme von Naringenin liegt bei ca. 58 mg und wird ebenfalls durch eine vegetarische bzw. vegane Ernährung erhöht (Ranka et al., 2008).

Tabelle 3: Naringenin in Lebensmitteln. Die Mittelwerte und Schwankungsbreite für die Naringeninkonzentration in ausgewählten Lebensmitteln wurden mit der *USDA Database for the Isoflavone Content of Selected Foods Release 3.0* und die Online-Datenbank *Phenol-Explorer* erstellt.

Naringenin in Lebensmittel	Mean	Min	Max	Referenz
	[mg/100g]	[mg/100g]	[mg/100g]	
Oregano, mexikanisch	372	335	1418	USDA 3.0 (2011)
Kumquats	57	-	-	USDA 3.0 (2011)
Grapefruit	53	-	-	USDA 3.0 (2011)
Rosmarin	25	-	-	USDA 3.0 (2011)
Pomelo	25	-	-	USDA 3.0 (2011)
Orange	15	4	45	USDA 3.0 (2011)
Artischocke	13	0	23	USDA 3.0 (2011)

2.2.3 Funktion der Flavonoide in der Pflanze

Flavonoide haben in der Pflanze eine Vielzahl von biologischen Funktionen und unterstützen u.a. in der strukturellen Integrität, der UV-Photoprotektion, der Reproduktion, der Zell-Zell-Kommunikation und der Signaltransduktion. Des Weiteren fungieren sie als induzierbare Abwehrtoxine gegen Mikroorganismen (Viren, Bakterien, Pilzen) oder als Lockstoffe für Insekten für die Bestäubung (Duthie et al., 2000) (Mandal et al., 2010; Duthie et al., 2000; Hertog et al., 1993).

2.3 Biokinetik

2.3.1 Biokinetik und Bioverfügbarkeit

Die Bioverfügbarkeit einer Substanz wird durch das ADME-Profil bestimmt. Der dafür zuständige Stoffwechselweg Absorption, Distribution (Verteilung), Metabolismus, und Elimination der Flavonoide ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Im Folgenden ist ein Überblick der bisher erlangten Erkenntnisse für Genistein und Genistin dargestellt.

2.3.2 Aufnahme der Flavonoide

Die Absorption von Genistein, Quercetin und Naringenin wird von vielen Faktoren beeinflusst. Hierzu gehören die Art der Glykoside, Zusammensetzung der Kost, Lebensmittelmatrix, Wechselwirkung mit anderen Nahrungsbestandteilen im Dünndarm einschließlich der Konjugation, dem bakteriellen Stoffwechsel durch das Mikrobiom des Dickdarms, die anschließende Absorption der Metabolite und die Ausscheidung über die Galle nach hepatischer Biotransformation. Im Dünndarm spielen physiochemische Faktoren wie das Molekulargewicht,

die Lipophilie, die Löslichkeit sowie die Magen- und Darmtransitzeit, der pH-Wert im Darmlumen und die Membranpermeabilität ebenfalls eine Rolle (Sugano & Terada, 2015; Jiang & Hu 2012; Z. Yang et al., 2012; Ho, 1983; Higuchi W.I., 1981).

In der Natur liegen Genistein, Quercetin und Naringenin überwiegend als β -Glykoside vor und sind hydrophil. Für die Diffusion in die Schleimhautzellen des Dünndarms müssen diese Flavonoide zuerst in ihre lipophilen Aglykone umgewandelt werden. Für die Spaltung der Glykoside im Dünndarm ist das Enzym Lactase-Phlorizin-Hydrolase (LPH), eine β -Glykosidase, verantwortlich (Nemeth et al., 2003; Setchell et al., 2002; Setchell et al., 2001; Day et al., 2000) (siehe

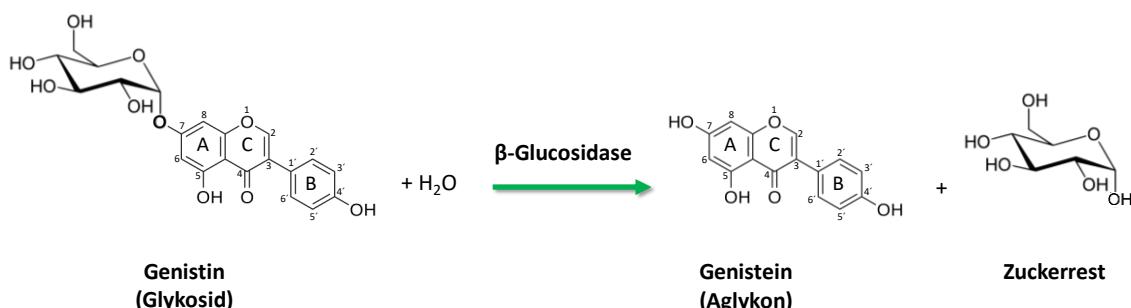


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Abspaltung des Zuckerrestes am Beispiel vom Genistin durch β -Glukosidase zu Genistein.

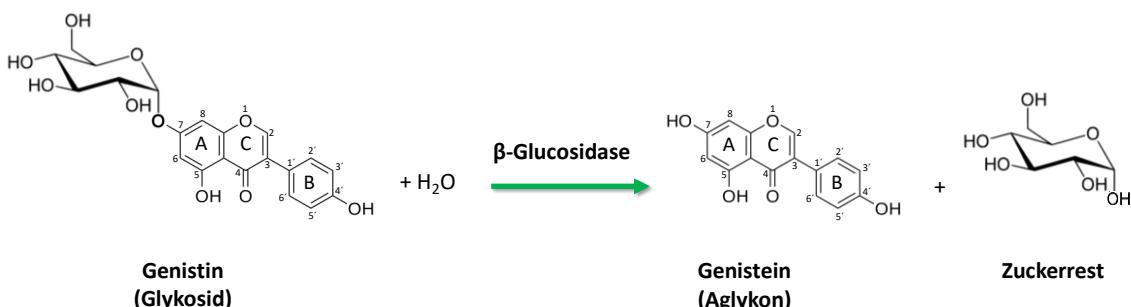


Abbildung 3).

Als Aglykon werden Genistein, Quercetin und Naringenin aufgrund des geringen Molekulargewichts (Genistein: 270,24 g/mol; Quercetin: 302,24 g/mol; Naringenin: 272,5 g/mol) der günstigen lipophilen Eigenschaft und der hohen Perfusionsfähigkeit in vivo schnell und nahezu vollständig absorbiert (Dai et al., 2015; Chen et al., 2003; Liu & Hu, 2002; Day et al., 2000). Das Genistein zeigt eine regionsspezifische Absorption im Duodenum (44%), Colon (35%) Ileum (18%) und Jejunum (16%) (J. Chen et al., 2003).

2.3.3 Metabolismus

Nach der Resorption in die Enterozyten werden die Aglykone durch die Darm- und Leberenzyme metabolisiert (Gradolatto et al., 2004; Chen et al., 2003). Hierbei spielt der Phase-II-Metabolismus durch Uridine-5'-Diphosphat-Glucuronosyltransferasen (UGTs) und Sulfotransferasen (SULTs) im Vergleich zum Phase-I-Metabolismus durch Cytochrom P450 (CYP) eine größere Rolle. Im Metabolierungsprozess werden die Substanzen durch UGTs zu Glucuroniden und/oder durch SULTs zu Sulfaten umgewandelt (Meng et al., 2012; Wu et al., 2011; Tang et al., 2010). Anschließend erfolgt der Transport der Konjugate durch die Efflux-Transporter wie z.B. P-Glycoprotein (P-gp), Multi-Drug Resistance Protein (MRP), Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) und Organic Anion Transporting Polypeptide (OATP), die alle zu den ABC-Transportproteinen (ATP-Binding Cassette) gehören, in das Darmlumen bzw. in die Galle (Jiang & Hu 2012; Zhu et al., 2010). Eine interessante Tatsache ist, dass die ausgeschiedenen Konjugate durch die intestinalen Bakterienenzyme (β -Glucuronidasen und Sulfatasen) zurück zu Aglykonen hydrolysiert werden können, die wiederum der Absorption und dem beschriebenen Metabolismus unterliegen (siehe Abbildung 4). Somit können die Aglykone bei der enterischen Resorption und im enterohepatischen Kreislauf mehrfach recycled werden, was zu einer

variablen und schwer abschätzbarer Halbwertszeit führt (Crozier et al., 2010; Crozier et al., 2009; Ming Hu, 2007; Setchell et al., 2001).

Eine weitere wichtige Eigenschaft der drei Flavonoide (Genistein, Quercetin und Naringenin) ist die Fähigkeit, den Enzymen nicht nur als Substrat, sondern auch als Regulator/Modulator zu dienen. Hierbei können sie die Aktivitäten von Phase-II-Enzymen (z. B. UGTs, SULTs und Glutathion-S-Transferasen (GSTs)) und aktiven Transportern wie P-gp, BCRP, MRP2 oder OATP durch verschiedene Mechanismen, wie z. B. kompetitive Hemmung, Substrat- oder Produktinhibition/-induktion, aktivieren oder inhibieren (Miron et al., 2017; Alvarez et al., 2010; Cermak, 2008; Y. J. Moon et al., 2006; Morris & Zhang, 2006) (siehe Kapitel 2.3.3.3). Sie

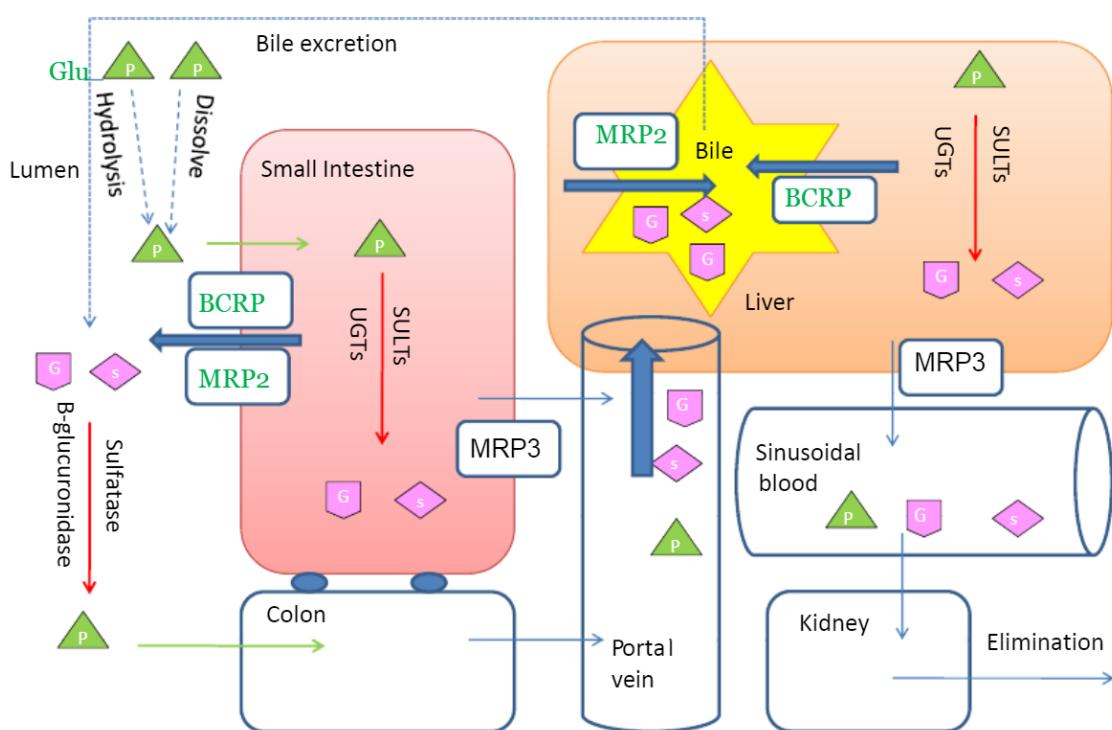


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Verteilung von Genistein im systemischen Kreislauf nach oraler Gabe von Genistin oder Genistein (vertikale Ansicht).

beeinflussen darüber hinaus auch die Expression von Phase-II-Enzymen und Transportern sowohl auf der mRNA- als auch auf der Proteinebene.

2.3.3.1 Metabolismus durch die Darmbakterien

Das Mikrobiom des Colons enthält ca. 10^{13} - 10^{14} Mikroorganismen und hat damit ein hohes katalytisches und hydrolytisches Potential (Cani & Delzenne, 2009). Flavonoid-Glykoside können durch β -Glucosidasen im Darm in ihre Aglykone umgewandelt werden was zu einer Steigerung ihrer Resorption führt (siehe 2.3.2). Die Aglykone können dann sowohl vollständig absorbiert oder durch Darmmikrobiota metabolisiert werden, wie z. B. Hydrolyse, Ringspaltung und Dehydroxylierung (Zubik & Meydani, 2003). Diese Modifikationen an den Aglykonen können deren biologische Aktivität verändern und einen Einfluss auf die antioxidative Wirksamkeit haben (Murota & Terao, 2003; Day et al., 2000).

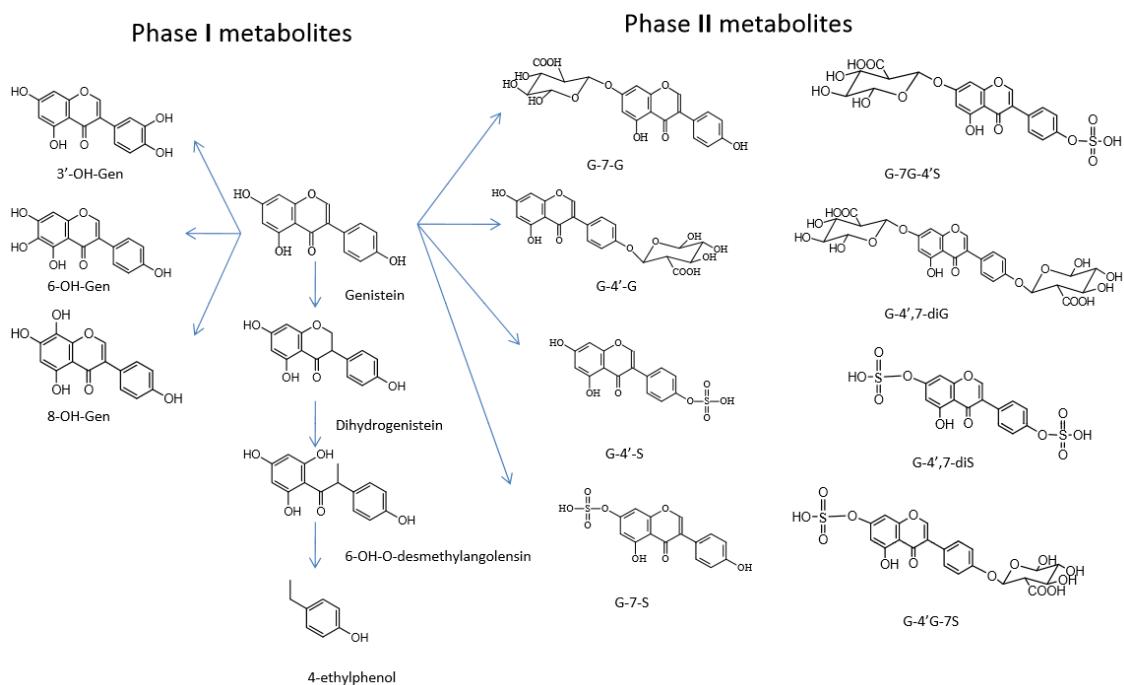


Abbildung 5: Der Metabolismusweg und Hauptmetabolite der Phase-I und Phase-II von Genistein in vivo. (Aus Yang et al., 2012)

Genistein durchläuft in vivo einen umfangreichen Stoffwechsel und wird hauptsächlich zu Dihydrogenstein (DHG) reduziert, um dann weiter zu 6'-Hydroxy-O-demethylangolensin (6'-OH-ODMA) verstoffwechselt zu werden (siehe Abbildung 5). Es folgt ein weiterer Abbau über 4-Hydroxyphenyl-2-propionsäure zum biologischen Endprodukt p-Ethylphenol.

Die Strukturen der Genistein-Hauptmetabolite in vivo sind in der Abbildung 5 schematisch dargestellt. Zum Metabolismus des Genisteins gehören die Glucuronidierung durch UGTs, Sulfatierung durch SULTs LTs (Yang et al., 2010; Hosoda et al., 2008; Shelnutt et al., 2002) und begrenzte CYP-Reaktionen. Die Genistein-Peakkonzentration im Plasma wird innerhalb von 30

Minuten nach Substanzgabe erreicht und deutet auf eine hohe Stoffwechselrate im Darm und in der Leber hin (Yang et al., 2010). Aufgrund der hohen Aktivität der Enzyme UGTs und SULTs im Darm, wird Genistein überwiegend in den Enterozyten metabolisiert (enterischer Stoffwechsel). Über die Pfortader gelangen die verbleibenden Genistein-Agylkone in die Leber (enterohepatischer Kreislauf), wodurch sie erneut metabolisiert werden (Izukawa et al., 2009; L. Zhang et al., 2007).

Quercetin wird primär zu Glucuroniden und Sulfoglucuroniden und in geringem Maße zu Sulfaten metabolisiert (Justino et al., 2004). Hollman et al. (Hollman et al., 1995) zeigten, dass Quercetin-Glukoside effizienter absorbiert werden als Quercetin–Aglykon (Graefe et al., 2001; Erlund et al., 2000). Quercetin kommt als Aglycon in der Natur nicht vor, sondern tritt nur in konjuguierten Formen auf. Im Allgemeinen wird Quercetin zu 20 – 40 % in der 3'-Position methyliert, was Isorhamnetin ergibt (Traka & Mithen, 2011; Day et al., 2001; Graefe et al., 2001). Über die Metabolite von Naringenin wurde bisher wenig berichtet, allerdings weiß man, dass Naringenin zu Naringenin-7-Glucosid bzw. Naringenin-7-Rhamnoglycosid metabolisiert wird (Day et al., 1998).

Das Mikrobiom spielt bei der Biotransformation von Genistein, Quercetin und Naringenin eine entscheidende Rolle. Umgekehrt können diese drei Substanzen ebenso einen Einfluss auf die Zusammensetzung des Mikrobioms ausüben (Kawabata et al., 2013; Duda-Chodak, 2012; Parkar et al., 2008; Clavel et al., 2005). So wurde in der Studie von Clavel et al. gezeigt, dass Genistein die vorherrschende Bakterienpopulation zu Gunsten von anderen Bakteriengruppen wie z.B. *Faecalibacterium prasnutzii* und *Lactobacillus-Enterococcus* durch Hemmung der Bakterienstämme wie *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* und *Lactobacillus rhamnosus* verändern kann (Clavel et al., 2005). Eine dosisabhängige Hemmung des Wachstums zeigte Quercetin auf die Stämme *Bacteroides galacturonicus*, *Lactobacillus sp.*, *Enterococcus caccae*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Ruminococcus gauvreauii* und *Escherichia coli*. Durch Naringenin wurde das Wachstum von *Bacteroides galacturonicus*, *Lactobacillus sp.*, *Enterococcus caccae*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Ruminococcus gauvreauii* und *Escherichia coli* gehemmt (Kawabata et al., 2013; Duda-Chodak, 2012).

2.3.3.2 Phase-I-Metabolismus

Flavonoide werden nach ihrer Absorption auch durch Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen verstoffwechselt, wobei der Phase-I-Metabolismus im Vergleich zum Phase-II

Metabolismus eher von geringer Bedeutung ist. Hierbei werden sie zu verschiedenen mono-, di- und trihydroxylierten Metaboliten umgesetzt. Bisher wurden *in vivo* und *in vitro* mehrere Phase-I-Metabolite des Genisteins identifiziert die mehrheitlich hydroxiert waren (Bursztyna et al., 2008; X. L. Wang et al., 2005; Breinholt et al., 2003; Kulling et al., 2001; Kulling et al., 2000). Zu den wichtigsten Oxidationsmetaboliten zählen 3'-OH-, 6-OH- und, 8-OH-Genistein (Kulling et al., 2001). Genistein wird vorwiegend durch die CYP-Isoform CYP1A2 und in geringem Maße durch CYP 2E1, CYP2D6 und CYP3A4 oxidiert (Breinholt et al., 2003; M. Hu et al., 2003). Darüber hinaus muss berücksichtigt werden, dass CYPs durch Flavonoide gehemmt werden können. Vor allem CYP1A1, CYP1B1 CYP1A2, CYP2E1 und CYP3A4 werden durch Genistein konzentrationsabhängig inhibiert (Chan & Leung, 2003; Foster et al., 2003; Helsby et al., 1998). Die Enzyme werden von Quercetin und Naringenin ebenfalls inhibiert, wobei Naringenin mehr das CYP3A4 inhibiert und weniger das CYP1A2 (Y. Chen et al., 2009; S. Zhou et al., 2004; Fuhr et al., 1993).

2.3.3.3 Phase-II-Metabolismus

Genistein und seine Metabolite werden während des Phase-II-Metabolismus effizient durch UGTs und SULTs konjugiert. (Gu et al., 2006) haben die Konjugationsprodukte von Genistein im menschlichen Plasma zu 78,4% als Glucuronide (Monoglucuronide > Diglucuronide > Sulfoglucuronide), zu 20,4% als Sulfate (Disulfate > Monosulfate) und 1,2% Aglykone bestimmt, in der Urinprobe lagen 86,7% als Glucuronide, 13,3% Sulfate und 0,1% Aglykone vor (Gu et al., 2006; Adlercreutz et al., 1995). Einige humane Studien zeigen, dass Genistein-Glucuronide hauptsächlich als G-7G-4'S und G-4',7-diG im Plasma vorkommen und durch UGTs (UGT1A8 > UGT1A9 > UGT1A10 > UGT1A1 > UGT1A6 > UGT1A7) katalysiert werden (Hosoda, Furuta, Yokokawa, et al., 2010; Tang et al., 2009; Shelnutt et al., 2002; Doerge et al., 2000). Die Niere und das Colon haben ein höheres Expressionsniveau für UGT1A9 und UGT1A10 als die Leber. Demzufolge findet die höchste Genistein-Glucuronidierung in der Niere statt, gefolgt von Colon und Leber (Riches et al., 2009; Doerge et al., 2000; Strassburg et al., 1998). Tang et al. stellten fest, dass Genistein UGT-Isoform-spezifische metabolische Muster aufweist, die konzentrationsabhängig sind (Tang et al., 2009). Quercetin und Naringenin werden ebenfalls von vielen UGTs metabolisiert (Tabelle 4). Als Substrat dienen hierbei UGT1A1, UA1A9, UGT2B7 und

UGT2B15 auch dem Quercetin und UGT1A1, UGT1A8, UGT1A10 dem Naringenin (Zhou et al., 2013; Jiang & Hu 2012; Cheng et al., 1999).

Tabelle 4: Interaktionen zwischen UGTs und Flavonoide. (Aus Jiang et al., 2012 ohne Lit.)

Isoform	Expression	Flavonoids as substrates	Flavonoids as modulators	
			Inducer or activator	Inhibitor
UGT1A1	Liver, intestine, colon, stomach	small Quercetin, fisetin, naringenin, luteolin, genistien, daidzein, eupatilin, glycinein, formononetin, biochanin A, prunetin	Chrysin, apigenin, quercetin	Chrysin
UGT1A3	Liver, intestine, colon	small Isorhamnetin, silybin, kaempferol, daidzein, morin, avicularin, eupatilin quercetin xylopyranoside, quercetin-3', 4'-OCHO-	—	—
UGT1A6	Liver, intestine, colon, stomach	small Luteolin and chrysin	Quercetin	Silymarin
UGT1A7	Colon Stomach Esophagus	Eupatilin	—	—
UGT1A8	Small intestine Colon Esophagus	Naringenin, genistein, daidzein, eupatilin, glycinein, formononetin, biochanin A, prunetin, apigenin, chrysin, 7-hydroxyflavone	—	—
UGT1A9	Liver, colon, esophagus, (kidney)	Luteolin, genistein, glycinein, formononetin, biochanin A, prunetin, daidzein, morin, avicularin, quercetin, eupatilin, quercetin xylopyranoside, quercetin-3', 4'-OCHO-	—	Silymarin
UGT1A10	Small intestine, colon, stomach, esophagus	colon, Naringenin, genistein, apigenin, chrysin, 7-hydroxyflavone, eupatilin	—	—
UGT2B7	Liver, intestine, colon, esophagus	small Luteolin and quercetin	—	—
UGT2B15	Liver, intestine, stomach, esophagus	colon, Luteolin and quercetin	—	—
UGT2B17	Liver, intestine, colon, stomach	small Galangin, chrysin, naringin, 7-hydroxyflavone	—	—
Unspecified isoforms	—	—	Biochanin A, daidzein, formononetin, genistein, prunetin, apigenin, galangin, kaempferol, naringenin, quercetin, chrysin, nobiletin, silymarin, tangeritin	Chrysin, nobiletin, silymarin, baicalein, wogonin

Der zweitwichtigste Stoffwechselweg für Genistein während der Phase-II ist beim Menschen die Sulfonierung durch die Sulfotransferase (Hosoda, Furuta, & Ishii, 2010; Gu et al., 2006; Adlercreutz et al., 1995). Die Konzentrationen der Genistein-Monosulfate (G-7-S, G-4'-S), Disulfate (G-4'S-7S), Sulfoglucuronide (G-7G-4'S und G-7S-4'G) sind im Plasma höher als im Urin (Hosoda et al., 2011; Hosoda, Furuta, & Ishii, 2010; Rimbach et al., 2004). Die Sulfonierung von Genistein in Menschen erfolgt je nach Aktivität der Enzyme durch SULT1A1 > SULT2A1 > SULT1E >

SULT1A2 = SULT1A3 (Doerge et al., 2000). Andererseits reguliert Genistein konzentrationsabhängig die Aktivität von SULT1A1 (siehe Tabelle 5), da es in höheren Konzentrationen diese inhibiert (Jiang & Hu 2012; Nishimuta et al., 2007; Ohkimoto et al., 2004; Otake et al., 2000). Die Tabelle 5 zeigt auch, dass Quercetin ebenfalls ein Inhibitor für SULT1A1 und SULT1E1 ist. Hieraus lässt sich ableiten, dass die Wechselwirkungen zwischen Flavonoiden und den metabolisierenden Enzymen sehr komplex und vielseitig sind. Flavonoide können selbst Substrate von metabolisierenden Enzymen sein und gleichzeitig diese Enzyme aktivieren oder inhibieren. Der umfangreiche Stoffwechsel durch Phase I und II beeinflusst dadurch die Konzentration der Aglycone in der systemischen Zirkulation. Daher sind die Interaktionen zwischen Flavonoiden und Enzymen kritische Faktoren, die bei gleichzeitiger Einnahme mit Medikamenten berücksichtigt werden müssen, die auch Einfluss auf die Plasmakonzentration der Flavonoide haben.

Tabelle 5: Interaktionen zwischen SULTs und Flavonoide. (Aus Jiang et al., 2012 ohne Lit.)

Isoform	Expressiona	Flavonoids as substrates	Flavonoids as modulators	
			Inducer or activator	Inhibitor
SULT1A1	Liver, small intestine, colon, stomach	EC, galangin, hesperetin, eriodictyol, (+)-catechin	Genistein, biochanin A	Apigenin, chrysins, quercetin, myricetin kaempferol, genistein, daidzein, hesperetin, eriodictyol, catechin EC, luteolin3', 4'-dihydroxyflavone, 3',4',7-trihydroxyisoflavone
SULT1A3	Liver, small intestine, colon	Galangin, hesperetin, eriodictyol, (+)-catechin, EC Similar to SULT1A1	—	Baicalein, hesperetin, eriodictyol
SULT1E1	Liver, small intestine, colon, stomach	EC, galangin Similar to SULT1A1	Biochanin A	Tricin, galangin, genistein, equol, daidzein, quercetin
Unspecified isoform	—	Genistein, apigenin, baicalein	—	—
SULT2A1	Liver, small intestine, colon	—	Genistein, biochanin A	Apigenin, myricetin, baicalein, galangin, 7-hydroxyflavone

2.3.4 Verteilung

Ein weiterer Faktor mit Einfluss auf die Bioverfügbarkeit von Genistein ist, neben dem extensiven Metabolismus, der Transport. Beispielsweise wurden bei Ratten die höchsten Konzentrationen für Genistein im Darm, der Leber und im Plasma festgestellt, während in den Fortpflanzungsorganen die Konzentrationen niedriger waren (Coldham & Sauer, 2000). Je nach Gewebe und Wechselwirkung mit Östrogenrezeptoren sind unterschiedliche Efflux-Transporter für die Aufnahme und Verteilung des Genistein verantwortlich (Coldham & Sauer, 2000) (Coldham, 2000). Diese Transporter gehören zur ABC-Superfamilie und werden in der apikalen Membran von Enterozyten und Hepatozyten stark exprimiert (Mao, 2008). Zu ihrer

physiologischen Funktion gehört der aktive Transport endogener Stoffwechselprodukte (z. B. Bilirubin und seine polare Konjugate) und Xenobiotika (z. B. Arzneimittel) aus den Zellen (van Herwaarden & Schinkel, 2006; Leslie et al., 2005; Ozvegy et al., 2001). Es wurden bereits eine Vielzahl von Modellen verwendet, um die Fähigkeit von Flavonoiden als Substrate und Inhibitoren von ABC-Transporter zu untersuchen (Bircsak & Aleksunes, 2015). Flavonoide wie Genistein, Quercetin, Naringenin und deren Metabolite, interagieren mit diesen Transportern als Substrate, Inhibitoren und/oder Modulatoren der Genexpression (siehe Tabelle 6). Sofern diese Flavonoide inhibitorisch auf ABC-Transporter wirken, hemmen sie auch die Ausscheidung von Medikamenten. Hierdurch können sie die Resistenzentwicklung gegen z. B. einem Chemotherapeutikum unterdrücken und so die Empfindlichkeit von Krebszellen gegenüber dem Arzneimittel erhalten. Dies ist eine vielversprechende Methode der Entstehung multiresistenter Keime entgegenzuwirken (Schexnayder & Stratford, 2016; Bircsak & Aleksunes, 2015; Castro & Altenberg, 1997).

Tabelle 6: Interaktion zwischen Transportern und Flavonoide. (Modifiziert aus Jiang et al., 2012)

Transporters	Flavonoids substrates	as	Flavonoids as modulators			
			Inducer activator	or	Inhibitor	No effect
P-gp	Flavonoid aglycone		Catechin, epicatechin, grapefruit juice, quercetin and kaempferol (low concentration)	EGCG, kaempferol (high concentration), chrysins, flavones, hesperetin, naringenin, genistein	quercetin	Grapefruit juice, naringin, hesperidin, rutin
MRP2	Flavonoid glucuronides and sulfates		Chrysins	Genistein, kaempferol, flavopiridol, chrysins, quercetin, biochanin A, catechin, EGCG, quercetin-7-O-glucuronide		Genistin
BCRP	Flavonoid glucuronides and sulfates		Quercetin, chrysins and flavone	Chrysins, biochanin A, apigenin, genistein, fisetin, kaempferol, hesperetin, naringenin, quercetin, luteolin-4-glucoside, daidzein-7-glucuronide, daidzein-4-sulfate, daidzin, ononin, genistin, sissotrin, glycitin, coumestrin		Naringin and phloridzin
OATP	—	Rutin	—	Naringin, naringenin, quercetin, hesperidin, biochanin A, genistein, EGCG		Genistin and quercetin
OAT	Ellagic acid quercetin-3-O-glucuronide, quercetin-3'-O-lucuronide, quercetin-3'-O-sulfate	—	—	Ellagic acid, naringenin, morin, silybin, quercetin, quercetin-3-O-glucuronide, quercetin-3'-O-glucuronide, quercetin-3'-O-sulfate	—	—

Die Tabelle 6 zeigt die wichtigsten Efflux-Transporter für Genistein und seine Glucuronid- und Sulfatkonjugate (van de Wetering et al., 2012; Alvarez et al., 2011; Enokizono et al., 2007). Zahlreiche Studien belegen, dass das BCRP bei der Genistein-Ausscheidung, insbesondere der konjugierten Formen, eine dominante Rolle spielt, denn es interagiert mit Phase II Enzymen und verändert so auch die Bioverfügbarkeit der Flavonoide (Bircsak & Aleksunes, 2015; Zhu et al., 2010; Enokizono et al., 2007). Allerdings wird dieser Transporter selbst konzentrationsabhängig von Genistein, Quercetin und Naringenin in hohen Konzentrationen inhibiert (siehe Tabelle 6). Ebenso dienen Flavonoid-Metabolite als Substrate für MRP2, das aber von Genistein und Quercetin inhibiert werden kann. So müssen bei der Beurteilung der Bioverfügbarkeit neben einem extensiven Metabolismus durch Phase I und II Enzyme die Beteiligung aktiver Efflux-Transporter und Transportprozesse für die Abschätzung der Flavonoidkonzentrationen im Plasma berücksichtigt werden.

2.3.5 Ausscheidung

Obwohl Genistein *in vivo* einen umfangreichen Metabolismus durchläuft, wird es als Xenobioticum hauptsächlich in konjugierte Form über Darm, Galle und Niere ausgeschieden (Zhou et al., 2008; Shelnutt et al., 2000). Neben der Aufnahme und Metabolisierung des Genistein, verstoffwechselt der Darm auch dessen Konjugate und beeinflusst deren Ausscheidung. Die Kopplung von intestinalen metabolisierenden Enzymen und Effluxtransportern beeinflusst die intestinale Disposition von Genistein (Wang et al., 2006; J. Chen et al., 2003). Der Darm hat somit einen großen Einfluss auf den Intermediärstoffwechsel und die Plasmakonzentration des Genisteins. Die Ausscheidung erfolgt hauptsächlich als Glucuronid (hydrophil) und weniger als Aglykon mit dem Urin (Zhou et al., 2008; Gu et al., 2006).

2.4 Interindividuelle Unterschiede des Genisteinstoffwechsels

2.4.1 Alter und Geschlecht

Der Einfluss von Alter und Geschlecht auf die Bioverfügbarkeit des Genisteins ist bisher wenig untersucht worden. In der von Hoey et al. durchgeführten Studie wurden für Säuglinge im Vergleich zu Kindern (ab 4 Monate bis 7 Jahre) nach Sojakenntnahme niedrigere Isoflavonkonzentrationen beobachtet, was auf die nicht dem Lebensmittelverzehr ausgesetzte Darmflora der Säuglinge zurückgeführt wurde (Hoey et al., 2004). In Bezug auf das Geschlecht wurden keine Unterschiede in der Pharmakokinetik von Genistein oder dessen Phase-II-Metaboliten im Urin nachgewiesen (Faughnan et al., 2004; Shelnutt et al., 2002; Zhang et al., 1999). Cassidy et al. beobachteten einen signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschied in

der Bioverfügbarkeit von Daidzein, jedoch nicht von Genistein (Cassidy et al., 2006). Zhang et al. und Sepehr et al. berichteten über ähnliche Ergebnisse, dass Genistein keinen signifikanten Unterschied der Bioverfügbarkeit zwischen Männern und Frauen zeigte (Sepehr et al., 2007; Zhang et al., 1999).

2.4.2 Ernährung

Die Nahrungsmatrix (z.B. Monosubstanz, Extrakt oder Lebensmittel) und Aufnahmeform des Genisteins z.B. als Aglykon oder Glykosid, Nahrungsquelle, Menge (traditionell hoher Konsum von Sojaprodukten in asiatischen Ländern) spielen eine entscheidende Rolle für die Bioverfügbarkeit und den Metabolismus. Eine flüssige Matrix, wie z.B. Sojamilch, ergibt eine schnellere Absorption und höhere Plasmakonzentrationen als eine feste Matrix. Aglykone in einem fermentierten Nahrungsmittel, wie z. B. Tempeh, werden schneller absorbiert als Glukosidkonjugate (Cassidy et al., 2006). Die Absorption von Genistein kann beispielsweise durch Ballaststoffe beeinträchtigt werden. Hierdurch kann die Aktivität der Enzyme und ihre Fähigkeit zur Metabolisierung von Genistein (z.B. β -Glucosidase) behindert sein. Um die Wirkung von Ballaststoffen auf die Bioverfügbarkeit von Genistein zu untersuchen, wurden sieben gesunden Frauen in einem Crossover-Design 15 g Ballaststoffe gleichzeitig mit der Wirksubstanz verabreicht. Die Zugabe von Ballaststoffen führte zu einer Abnahme der Genisteinkonzentration im Plasma und Urin. Die genaue Ursache wurde nicht untersucht, es ist jedoch bekannt, dass wasserunlösliche Ballaststoffe einen adsorptiven Effekt (bulking effect) haben und zusätzlich durch die Unlöslichkeit in Wasser die Distribution als auch die Exkretion behindern können (Tew et al., 1996).

2.5 Physiologische Eigenschaften von Genistein

Die intrazelluläre Wirkungsweise von Genistein ist komplex und multidirektional. Beispielsweise kann Genistein auf molekularer Ebene die Topoisomerase II hemmen, die an der DNA-Expression, Replikation, Transkription und Reparatur beteiligt ist (Okura et al., 1988). Auf zellulärer Ebene inhibiert Genistein die Aktivität von tyrosinspezifischen Proteinkinasen, die an der Phosphorylierung von Rezeptoren beteiligt sind und zur Signaltransduktion dienen (Akiyama et al., 1987). Durch den antioxidativen Effekt hemmt Genistein die Signalweiterleitung und Zellproliferation. Genistein kann somit die humorale und zelluläre Immunität auf mehreren Ebenen modulieren und bei einer Entzündungsreaktion die Migration der Entzündungszellen inhibieren (MacGregor et al., 2005; Yellayi et al., 2003). Aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit mit dem Steroidhormon 17 β -Östradiol kann Genistein mit dem Östrogenrezeptor

(ER, Bindungsaffinität zum ER-β 87% und ER-α 4%) interagieren und östrogenartige Wirkungen ausüben (Mikkola & Clarkson, 2002; Kuiper et al., 1998). Diese Eigenschaft des Genisteins findet bereits z.B. in der Prävention von hormonsensitiven Krebsarten Anwendung. Auch die cholesterin-senkende Wirkung von Genistein wird auf seine östrogene Struktur zurückgeführt (Lichtenstein, 1998). So konnte gezeigt werden, dass der Verzehr von Genistein die Plasmaspiegel von Gesamtcholesterin und LDL-Cholesterin verringert und HDL-Cholesterin (High Density Lipoprotein) erhöht (Squadrito et al., 2013; Branca & Lorenzetti, 2005; Sanders et al., 2002). Die Einnahme von Genistein zur Prävention oder Therapie der Osteoporose wurde bei postmenopausalen osteoporotischen Frauen nur als in geringem Maße vorteilhaft erkannt und wird nicht mehr empfohlen (Alekel et al., 2015; Shedd-Wise et al., 2011; Marini et al., 2007). Neben der Hemmung der Biosynthese von Heparansulfat sind es die antioxidativen Eigenschaften von Genistein, die es zu einer vielversprechenden Substanz bei der Behandlung von entzündlichen Krankheiten, z.B. der Neuroinflammation, besonders bei Sanfilippo III oder anderen cerebralen Speicherkrankheiten, machen.

2.5.1 Entzündungshemmung durch antioxidative Eigenschaften des Genisteins

Bei vielen biochemischen Prozessen werden im Organismus aus Sauerstoff Radikale gebildet (Reactive Oxygen Species, ROS), z.B. Hydroxyl- und Peroxylradikale, Superoxidradikal anionen und Wasserstoffperoxid gebildet. Primär dienen diese Substanzen, deren physiologische Bildung etwa 20 Gramm (g) pro Tag beträgt, wichtigen Zellfunktionen, wie der Keimabwehr durch die Bildung von unterchloriger Säure oder der Aktivierung von Enzymen der Arachidonsäurekaskade, die bei zahlreichen immunologischen und entzündlichen Prozessen beteiligt sind (Korbecki et al., 2013; Brieger et al., 2012; Spickett et al., 2000). Im Übermaß gebildet, wie dies bei der Neuroinflammation der Fall ist, wirken sie zellschädigend. Eine ausreichende Bildung der ROS ist somit erforderlich, jedoch muss ein Übermaß vermieden werden (Ivanova et al., 2016; Kaur et al., 2015). Zur Aufrechterhaltung dieses sensiblen Gleichgewichts dienen antioxidative Enzyme wie Katalase, Superoxiddismutase und Glutathion-S-Transferase, Substanzen wie Vitamin E und Vitamin C, sowie sekundäre Pflanzenstoffe, wie Genistein (D'Autreaux & Toledano, 2007). Die entzündungshemmende Wirkung von Genistein wird durch seine Eigenschaft als Akzeptor von elektrischer Ladung erklärt. Als Akzeptor elektrischer Ladung unterstützt Genistein die oben genannten Substanzen bei der Neutralisierung von ROS. Die elektrische Ladung kann durch den Transfer von Elektronen bzw. Wasserstoffatomen erfolgen (Kalaiselvan et al., 2010; Zielonka et al., 2003; Guo et al., 2002; Mitchell et al., 1998; Ruiz-Larrea et al., 1997; Cai & Wei, 1996). Hierbei sind die Anzahl und

Position der Hydroxylgruppen bestimmende Faktoren für die antioxidative Aktivität der Isoflavonoide (Arora et al., 1998). ROS sind auch Aktivatoren von Enzymen, die für die Entzündungsreaktion relevant sind und so die Biosynthese der Eicosanoide steigern, die mit Cytokinen und Chemokinen interagieren. Hämäläinen et al. (2007) konnten zeigen, dass Genistein entzündungshemmend wirkt, indem es die Aktivierung des entzündungsfördernden Transkriptionsfaktors NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer) dosisabhängig inhibiert (siehe Abbildung 6) und somit die Expression und Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie TNF- α (Tumornekrosefaktor- α) und Interleukine (IL-1 und IL-6) hemmt (Li et al., 2013; Hämäläinen et al., 2007). In einer Studie an einem genetisch veränderten Mäusestamm mit entzündlicher Enzephalomyelitis nahm die Expression von IL-17, IL-6 und IFN- γ (Interferon- γ) nach Gabe von 7-Otetradecanoyl-Genistein, einem lipohilen Analogon von Genistein, ab (Castro et al., 2012). Die entzündungshemmende Wirkung von Genistein konnte auch an fibroblastenähnlichen Synoviozyten von Patienten mit rheumatoider Arthritis beobachtet werden. Hierbei wurde die IL-1 β (Interleukin 1 beta) und TNF- α vermittelte Proliferation der Zellen nach Behandlung mit Genistein gehemmt (Zhang et al., 2012). Das Enzym Cyclooxygenase-2 (COX-2), zuständig unter anderem für die Biosynthese des proinflammatorischen Prostaglandin E₂ (PGE₂), kann von Genistein ebenfalls gehemmt werden (Jeong et al., 2014; Hamalainen et al., 2011; Takano-Ishikawa et al., 2006). Isoprostan bzw. Isoprostaglandine (Eicosanoide), eine große Gruppe isomerer nicht-enzymatischer Oxidationsprodukte des Linolsäure- und Arachidonsäurestoffwechsels dienen als Biomarker für den oxidativen Stress. Rao et al. (1997) zeigten in einem Tierversuch, dass die Bildung von 8-Isoprostan durch Genistein vermindert werden kann. Darüber hinaus hat Genistein neben der Entzündungshemmung auch eine anti-adipogene Funktion, indem es die Glucocorticoid-induzierte Leptinproduktion und TGF- β herunter reguliert. Erhöhte Leptinwerte im Körper führen zu einer Zunahme von Insulinresistenz und Entzündungsreaktionen (Mukund et al., 2017). Basierend auf diese Daten ist Genistein in der Lage proinflammatorische Kaskaden zu schwächen und kann so entzündliche Reaktionen beeinflussen.

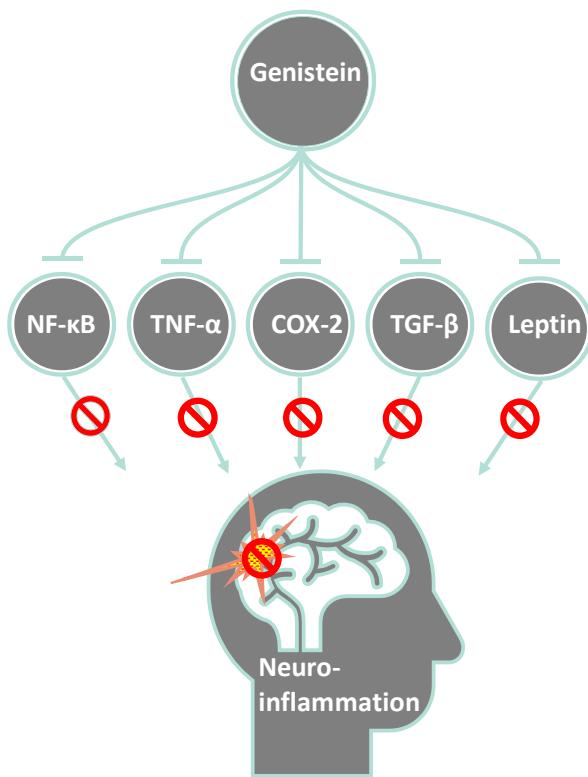


Abbildung 6: Die Effekte von Genistein auf die Signalwege der Neuroinflammation. Abkürzungen: NF- κ B = nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer'; TNF- α , tumor necrosis factor-alpha, COX-2 = Cyclooxygenase 2; TGF- β , transforming growth factor-beta.

2.6 Substratreduktionstherapie mit Genistein bei Sanfilippo-Syndrom

2.6.1 Sanfilippo-Syndrom (Mukopolysaccharidose Typ III, MPS III)

Das Sanfilippo-Syndrom (Mukopolysaccharidose Typ III [MPS III]) ist eine lysosomale Speicherkrankheit, bei der sich aufgrund mangelhafter Enzymaktivität das Heparansulfat (HS), ein Glykosaminoglykan, sowohl in Lysosomen als auch außerhalb von Zellen ansammelt (Neufeld, 2001; 1991). MPS-III gehört zu den seltenen Erkrankungen (*rare diseases*) und die Inzidenz in Deutschland wird auf 1,57 pro 100 000 Geburten geschätzt. Je nach Enzymdefekt wird die Erkrankung in vier verschiedene Subtypen (Typ A-D) unterteilt (siehe Tabelle 7). Der Subtyp A kommt am häufigsten vor, gefolgt von den Subtypen B, C und D (Baehner et al., 2005). In internationalen epidemiologischen Studien sind ähnliche Häufigkeiten dokumentiert, wobei der Subtyp B in Südosteuropa häufiger ist (Wolfenden et al., 2017; Valstar et al., 2008). Diese Subtypen werden autosomal-rezessiv vererbt, wobei jeweils multiple Mutationen in den Heparansulfat abbauenden Enzymen *SGSH* (kodiert für Heparan-N-Sulfatase), *NAGLU* (kodiert für α -N-Acetylglucosaminidase), *HGSNAT* (kodiert für Acetyl-CoA: α -Glucosaminid-Acetyltransferase) und *GNS* (codiert für N-Acetylglucosamin-6-sulfatase) bekannt sind (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Klassifikation der Mucopolysaccharidose Typ III.

MPS III Subtyp	Gen/ Chromosom	Defizientes Enzym	Bekannte Mutationen*
A	<i>SGSH</i> / 17q25.3	Heparan N-Sulfatase (Sulfamidase)	Total: 137 Missense/ nonsense: 104 Deletion: 20 Insertion: 11 Spleicing: 2
B	<i>NAGLU</i> / 17q21	α -N-Acetyl- glucosaminidase	Total: 153 Missense/ nonsense: 104 Deletion: 27 Insertion: 17 Spleicing: 5
C	<i>HGSNAT</i> / 8p11.1	Acetyl-CoA: α -Glucosaminid-Acetyltransferase	Total: 64 Missense/ nonsense: 36 Deletion: 7 Insertion: 7 Spleicing: 13
D	<i>GNS</i> / 12q14	<i>Glucosamine (N-acetyl)-6-sulphatase</i>	Total: 23 Missense/ nonsense: 7 Deletion: 6 Insertion: 5 Spleicing: 3

(*<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php> am 05.01.2018)

MPS III wird bei den betroffenen Kindern meist im Alter zwischen 3 und 15 Jahren diagnostiziert. Klinisch gibt es nur sehr wenige Unterschiede zwischen den Subtypen. Subtyp A ist in der Regel mit einem schweren Verlauf der Erkrankung verbunden (van de Kamp et al., 1981), während der Subtyp C meist einen protrahierteren Verlauf hat (Ruijter et al., 2008). Nach einer Periode klinisch unauffälliger Entwicklung zeigen die Kinder eine Reihe von Symptomen, einschließlich eines raschen Verlustes sozialer Fähigkeiten mit Hyperaktivität und aggressivem Verhalten, Lernfähigkeitsverlust, Schlafstörungen, Hirsutismus, grobe Gesichtszüge und Durchfall (Cleary & Wraith, 1993). Es kommt beim Sanfilippo-Syndrom zum zunehmenden Verlust motorischer und intellektueller Fähigkeiten (Valstar et al., 2010). Für diese zunehmenden Defizite werden weniger die Ablagerung des nicht abbaubaren Heparansulfats verantwortlich gemacht, vielmehr werden sie zum überwiegenden Teil durch die begleitende Entzündung (Neuroinflammation) ausgelöst (Jakobkiewicz-Banecka et al., 2016; Martins et al., 2015; Trudel et al., 2015). Eine kausale und wirksame Therapie für MPS III ist nicht bekannt. In klinischer Erprobung sind derzeit die Substraterduktionstherapie mit Genistein, die Gentherapie mit transfizierten Adenoviren und die Enzymersatztherapie (Gaffke et al., 2018; Ghosh et al., 2017; Tardieu et al., 2017; Jones et al., 2016; GENiSIS2013). Die periphere Applikation des Enzyms ist für die Behandlung von MPS III aufgrund der unzureichenden Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke nicht geeignet (Beck, 2018; Wraith, 2009). Derzeit wird die intrathekale Applikation (Einspritzung in die Ventrikel des Gehirns), einer durch rekombinante DNA-Technologie hergestellten naturidentischen Heparan-N-sulphatase, erprobt. Die Erfolge waren jedoch nur marginal, zusätzlich belastet mit hohen therapeutischen Risiken, wie Meningitis und anderen Infektionen (Aoyagi-Scharber et al., 2017; King et al., 2016; Beard et al., 2015). In einer weiteren Studie wird ein viraler Vektor (scAAV9.U1a) überprüft, der intravenös nur einmal verabreicht wird und die Fähigkeit hat, die Bluthirnschranke zu überwinden (NCH, 2016). Der Vektor wird an das defekte Sulfamidase-Gen des Empfängers eingebaut und soll dann die normale Sulfamidase produzieren. Diese Vorgehensweise hat natürlich den großen Vorteil, dass das Gen nicht über die Schädeldecke direkt in das Gehirn injiziert werden muss.

Die Speicherung von Heparansulfat im Gehirn ist für einige der Krankheitssymptome verantwortlich und andere entstehen als Folge der sekundären Ablagerung von Glycosphingolipiden sowie durch nachfolgende Prozesse wie oxidativer Stress und Neuroinflammation (Jakobkiewicz-Banecka et al., 2016; Trudel et al., 2015). Mehrere Studien weisen darauf hin, dass der oxidative Stress, ausgelöst durch das Ungleichgewicht von Oxidantien / Antioxidantien eine wichtige Rolle für den Verlauf von neuronalen MPS-III-Erkrankungen spielt (Arfi et al., 2011; Vitner et al., 2010; Villani et al., 2009; Pereira et al., 2008).

Es wurde gezeigt, dass der oxidative Stress in einem sehr frühen Stadium der Krankheit bereits nachweisbar ist und nicht als die Folge der Neuroinflammation angesehen werden kann (Trudel et al., 2015). Im letzten Jahrzehnt konnte bewiesen werden, dass Heparansulfat die Neuroinflammation durch den Toll-like Receptor 4 (*toll-like receptor 4*, TLR4) auslöst und eine Immunantwort initiiert, die die Zeichen einer Autoimmunreaktion zeigt und durch die Freisetzung von pro-entzündlichen Mediatoren zur Progression und Schwere der klinischen Symptome beiträgt (Jakobkiewicz-Banecka et al., 2016; DiRosario et al., 2009; Ausseil et al., 2008). Zwar führte die Hemmung des TLR4-Signalweges in einem MPS-IIIB-Modell der Maus zu einer Verzögerung des Auftretens der Neuroinflammation, konnte aber das Fortschreiten des neurodegenerativen Prozesses nicht aufhalten (Ausseil et al., 2008). Figueiredo-Pereira et al. (2016) zeigten, dass die Neutralisation spezifischer neurotoxischer Prostaglandine (PG), insbesondere durch PGJ² stromabwärts des Cyclooxygenase-Enzyms, einen signifikanten Einfluss auf die Neuroinflammation hat und als eine mögliche therapeutische Strategie bei der Behandlung chronischer neurodegenerativer Störungen eingesetzt werden könnte. Mit einer antioxidantienreichen Ernährung kann der Anfall von ROS vermindert und dadurch der Schaden am Gewebe vermindert werden. Ziel der entzündungshemmenden Maßnahmen ist die Verminderung der durch die Gewebsschädigung bedingten neurologischen Defizite. Die diätetische Modulation des pro-inflammatorischen Essens, die auf oben beschriebene Immunmechanismen abzielt, könnte zu therapeutischen oder präventiven Strategien führen (Heneka et al., 2015; Riccio & Rossano, 2015). Das Prinzip der Ernährungstherapie bei cerebralen Speicherkrankheiten besteht in einer Verminderung entzündungsfördernder und einer Steigerung entzündungshemmender Nährstoffe sowie in einer adäquaten Versorgung mit Antioxidantien. Das entzündungshemmende Essmuster wurde seit der Entdeckung von entzündungshemmenden Omega-3-Fettsäuren im Fischöl in den 80er des letzten Jahrhunderts etabliert (Adam, 2010). Seitdem wurde die Wirkung von reaktiven Sauerstoffspezies, Antioxidantien und Spurenelementen intensiv untersucht und die Merkmale einer entzündungshemmenden Ernährung für entzündliche rheumatische Erkrankungen wurden gut etabliert (Nagy et al., 2019; Adam, 2010; Adam et al., 2003).

2.6.2 Substratreduktionstherapie (SRT) bei MPS III

Die Substratreduktionstherapie (*Substrate Reduction Therapy*, SRT) ist eine weitere Möglichkeit für die Behandlung von MPS. Die SRT zielt drauf ab, die Quantität von Verbindungen, die in Zellen des betroffenen Organismus nicht effizient abgebaut werden können, zu reduzieren. Unter diesem Aspekt basiert die SRT bei MPS auf der Reduktion der Synthese von

Glykosaminoglykanen (GAG). Die GAG-Synthese, einschließlich des Heparansulfats, hängt von der epidermalen Wachstumsfaktor-vermittelten Aktivierung ihres Rezeptors EGFR (engl. *epidermal growth factor receptor*) ab und erfordert für die vollständige Expression von Genen, die für an der GAG-Produktion beteiligten Enzyme kodieren, die Phosphorylierung des EGFRs (siehe Abbildung 7) (Jakobkiewicz-Banecka et al. 2009). Die Phosphorylierung des EGFRs erfolgt durch das Enzym EGFR-Tyrosinkinase (EGFR-TK) und führt über die intrazelluläre Signaltransduktion zur Aktivierung der Transkription spezifischer Gene im Zellkern (H. Kim et al., 1998; Tirone et al., 1997; Akiyama et al., 1987). Die Hemmung der EGFR-TK durch Genistein beeinträchtigt die Signaltransduktion, was zu einer Verminderung der Expression von Genen, die für die GAG-Synthese notwendigen Enzyme kodieren führt und folglich die Ablagerung von Heparansulfat vermindert. Somit ist die sekundäre Wirkung dieser negativen Regulierung die Hemmung der Ablagerung von Heparansulfat (siehe Abbildung 7) (Wegrzyn et al., 2010; Jakobkiewicz-Banecka et al., 2009; Piotrowska et al., 2006).

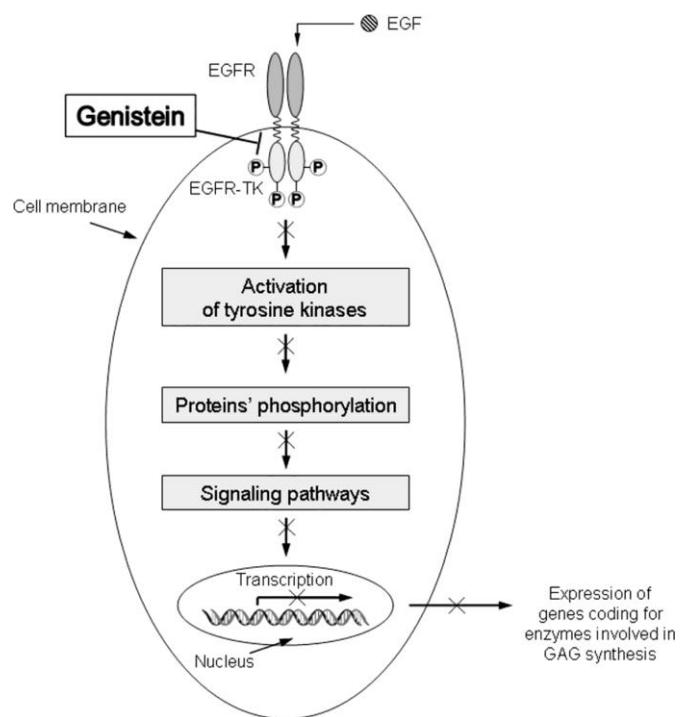


Abbildung 7: Hemmung der EGFR-TK durch Genistein und der Effekt auf die Expression der Gene, die an der GAG-Synthese involviert sind (Wegrzyn et al., 2010). Die Expression von Genen, die für zur GAG-Produktion erforderliche Enzyme kodieren, hängt von der EGF-vermittelten Aktivierung seines Rezeptors EGFR ab. Die Phosphorylierung bestimmter Proteine durch EGFR-Tyrosinkinase (EGFR-TK) führt zur intrazellulären Signaltransduktion und Aktivierung der Transkription spezifischer Gene im Zellkern. Die Hemmung der EGFR-TK-Aktivität durch Genistein führt zu einer Beeinträchtigung der Signaltransduktion und damit zu einer verminderten Expression von Genen, die für an der GAG-Synthese beteiligte Enzyme kodieren.

Gemäß diesem Konzept wird der Wirkungsmechanismus dieses Isoflavons auf die GAG-Synthese bei MPS als *gene expression-targeted isoflavone therapy* (GETIT) bezeichnet. Studien mit einer Konzentration von 10 - 30 μM Genistein in MPS-III-Fibroblastenkulturen von Patienten, waren sehr vielversprechend, da gezeigt werden konnte, dass Genistein die Synthese von GAGs signifikant inhibiert und zu einer deutlichen Reduktion der Heparansulfat-Ablagerung in den Fibroblasten führt (Piotrowska et al., 2006). Malinowska et al. zeigten 2009 in einem Mausmodell für MPS-IIIB, die verminderte lysosomale Speicherung in peripheren Geweben nach Behandlung mit Genistein (Malinowska et al., 2009). Nach dieser ersten Studie lieferte das gleiche Team den Nachweis, dass Genistein in der Lage ist, die Bluthirnschranke zu überwinden und als SRT im Gehirn des MPS-IIIB Mausmodells wirkt, in dem es die Ablagerung des HS in den Lysosomen und die Neuroinflammation in der Großhirnrinde und dem Hippocampus signifikant reduziert (Malinowska et al., 2010). Eine weitere Studie an genmanipulierten Mäusen mit MPS II zeigte nach 10-wöchiger Behandlung mit Genistein (5 – 25 mg/kg täglich) die Reduktion der GAG-Ausscheidung im Urin und bei einigen Tieren sogar weniger GAG-Ablagerungen im Gehirn (Friso et al., 2010). Basierend auf Studien mit menschlichen MPS-III Fibroblasten (Jakobkiewicz-Banecka et al., 2009; Piotrowska et al., 2006) und Tierexperimenten (Malinowska et al., 2010; Malinowska et al., 2009) wurde angenommen, dass Genistein sowohl durch seine primäre Wirkung als indirekter GAG-Synthaseinhibitor als auch durch seine sekundären, MPS-unspezifischen Wirkungen bei der Therapie dieser Erkrankung von Nutzen sein könnte (Wegrzyn, 2012; Jakobkiewicz-Banecka et al., 2007). Dazu gehören die Verringerung der Gangliosidspeicherung (Malinowska et al., 2010) die Neuroprotektion gegen P-Tau-induzierte Neurotoxizität (Bang et al., 2004) die Abschwächung von oxidativem Stress im Gehirn (Liang et al., 2008) die Verhinderung von Neuroinflammation (Valles et al., 2010) und die Hemmung der Apoptose in neuronalen Zellen (Wegrzyn, 2012; Kajta et al., 2007).

Deshalb wurde Genistein als ein mögliches Therapeutikum für die SRT-GETIT Behandlung bei MPS verwendet und im nächsten Schritt in klinischen Pilotstudien bei MPS-III-Patienten eingesetzt (Kim et al., 2013; de Ruijter et al., 2012; Delgadillo et al., 2011; Piotrowska et al., 2008; Jakobkiewicz-Banecka et al., 2007). In einer an MPS-III A- und B-Kindern durchgeföhrten Pilotstudie wurden nach 12-monatiger oraler Behandlung mit genisteinreichem Isoflavon-Extrakt eine klinische Verbesserung nachgewiesen. Die behandelten Patienten zeigten eine Abnahme der GAG-Ausscheidung im Urin und eine Verbesserung der Haarmorphologie sowie der kognitiven Funktionen und des Verhaltens (Jakobkiewicz-Banecka et al., 2007). Wurde Genistein in der niedrigen Dosierung von 5 mg/kg/KG (Körpergewicht) täglich eingenommen, so verringerte sich zwar die HS-Plasmakonzentration, aber die klinischen Symptome wurden nicht

verbessert (Delgadillo et al., 2011). Eine 19-monatige Beobachtungsstudie, bei der den Teilnehmern täglich Genistein in einer Dosierung von 10 mg/kg/KG gegeben wurde, zeigte keine relevante Besserung. Die Autoren vermuteten, dass möglicherweise keine ausreichende Genisteinkonzentration erreicht wurde (de Ruijter et al., 2012). Die orale Langzeittherapie über 12 Monate mit Genistein bis zu einer Dosierung von 150 mg/kg/KG täglich hatte keine Nebenwirkungen, die einen Abbruch erforderlich gemacht hätten (Kim et al., 2013). Auffällig war in der Studie von Kim et al. (2013) bei zwei männlichen Patienten die Entwicklung der Brüste nach Tanner Grad II und die GAG-Ausscheidung im Urin war unregelmäßig. Danach wurde eine doppelblinde, randomisierte, placebokontrollierte klinische Studie der Phase III mit hochdosiertem oralen Genistein-Aglykon bei Patienten mit Sanfilippo-Syndrom durchgeführt, deren Ergebnisse derzeit noch ausstehen (GENiSIS2013). Biochemische Kenntnisse der Pathogenese der Neuroinflammation führten andere Forscher zur Untersuchung von Kombination verschiedener Flavonoide, da sich hierdurch synergistische Effekte bei der Hemmung der GAG-Synthese vermuten ließe (Kloska et al., 2011; Arfi, Richard, & Gandolphe, 2010). Kloska et al. (2011) konnten an Fibroblasten von MPS-IIIA-Patienten eine dosisabhängige Verminderung der GAG-Synthese durch die Kombination von Flavonoiden (Apigenin, Daidzein, Kaempferol und Naringenin) zeigen. Die Wirkung jeder Kombination erwies sich wirksamer als die Einzelsubstanzen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Kombination von mehreren Flavonoiden in der Dosierung von jeweils 10 µg der Wirkung von 100 µg einer Einzelsubstanz überlegen ist und die lysosomale Speicherung effizienter reduziert. Während Genistein die Tyrosinkinase des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) inhibiert, vermindert die Kombination von Flavonoiden die Akkumulation von Heparansulfat in Fibroblasten auf eine andere Weise, da keines der getesteten Flavonoide, außer Genistein, eine statistisch signifikante Hemmung der EGFR-Phosphorylierung zeigte (Kloska et al., 2011). Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass durch die Kombination von Genistein mit anderen Flavonoiden die Plasmakonzentration von Genistein erhöht wird. Da Flavonoide häufig identische Stoffwechselwege haben und es dadurch zu einer Kompetition um den Abbau kommen kann, könnte dies die Plasmakonzentration von Genistein erhöhen (Ozdal et al., 2016; Kamboh et al., 2013; Matthies et al., 2012). Hierdurch wäre auch eine gesteigerte antioxidative Gesamtkapazität vorstellbar (Harasym & Oledzki, 2014) (s. Kapitel 2.3.3 Metabolismus). Allerdings bedarf diese Theorie noch in weiten Bereichen der experimentellen Überprüfung.

Die bisher in der Literatur mitgeteilten Ergebnisse bescheinigen der oralen Genisteingabe bei MPS therapeutische Sicherheit bis zu 12 Monaten. Da es aber eine lebenslange Therapie wäre, besteht weiterhin Bedarf an größeren randomisierten, placebo-kontrollierten klinischen

Studien, um unerwünschte Wirkungen sicher auszuschließen und die klinische Wirkung nachweisen zu können. Zudem fehlen kontrollierte Studien zu dem Effekt von antioxidativ wirksamen Substanzen auf die Neuroinflammation, deren Folgen für den Krankheitsverlauf möglicherweise gravierender sind als die Ablagerung von Heparansulfat.

3 Ziel der vorliegenden Arbeit

Diese Arbeit soll überprüfen, ob eine Kombination von Genistein mit anderen Flavonoiden (Quercetin und Naringenin) einen Einfluss auf die Totale Antioxidative Kapazität (TAC) im Plasma und den Anfall von reaktiven Sauerstoffspezies im Vergleich zu der Monotherapie mit Genistein hat. Der klinische Hintergrund für diese Untersuchung war eine Tierstudie, die Genistein als Substrat-Reduktionstherapie (SRT) bei einem Mausmodell der MPS III, erfolgreich geprüft hatte. Damit hätte Genistein zwei Vorteile für MPS III Patienten: Neben der Verminderung des Anfalls von Heparansulfat hat Genistein als Antioxidans ein entzündungshemmendes Potential.

Aus einer vorausgehenden Humanstudie war anzunehmen, dass die erreichten Konzentrationen von Genistein keinen entscheidenden Effekt auf die Krankheitsprogression bei Patienten mit MPS III haben. Die Autoren vermuteten, dass ein höherer Blutspiegel die im Tierversuch gefundene Verzögerung im Krankheitsverlauf bewirken kann. Wir haben deshalb untersucht, ob die Co-Medikation mit einem Flavonoid, das im Stoffwechsel mit Genistein konkurriert, zu einem Anstieg der Genisteinkonzentration im Blut führt und die antioxidative Kapazität erhöht. Die verwendeten Substanzen wurden in einer Menge eingesetzt, die auch mit herkömmlicher Kost gut erreichbar ist, da wir als Fernziel eine Ernährungsempfehlung für Patienten mit Speicherkrankheiten konzipieren wollen.

4 Material und Methoden

4.1 Probandenkollektiv

4.1.1 Rekrutierung der Probanden

Die Untersuchung hatte der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität unter der Studien-Nr. 160-14 vorgelegen und die Kommission konnte der Studie ethisch-rechtliche Unbedenklichkeit zuerkennen.

Die Probandenrekrutierung erfolgte im Mai 2015 durch verschiedene Maßnahmen. Die meisten Probanden konnten über Aushänge in der Universität gewonnen werden, einige auch über Anzeigen in sozialen Netzwerken im Internet. Die Interessenten meldeten sich per E-Mail oder telefonisch. Im Anschluss daran wurde in einem mehrstufigen Verfahren die Eignung der Probanden für die geplante Untersuchung überprüft.

Für die vollständige Teilnahme an der Studie erhielt jeder Proband eine Aufwandsentschädigung von 400 €.

4.1.2 Telefonscreening und Auswahl der Probanden

22 Personen wurden im Rahmen eines Telefonscreenings kontaktiert, um den genauen Ablauf der Studie mit ihnen durchzugehen und einen ersten Überblick über die Versuchspräparate zu bekommen. Dabei wurde mit Hilfe eines hierfür entwickelten Fragebogens (Anlage 12.1 Telefonscreening) das allgemeine Essverhalten, Konsum von Nahrungsergänzungsmitteln, körperliche bzw. psychische (Vor-) Erkrankungen und Medikamenteneinnahme abgefragt. Besonderes Gewicht wurde auf den Ausschluss von Stoffwechselstörung, Nahrungsmittelallergie oder -unverträglichkeit gelegt. Die Antwortmöglichkeiten lauteten: „nein oder ja“ bzw. bei „Leiden Sie unter Verstopfung bzw. Durchfall?“: „nie, selten, öfters und (fast) immer“. Insgesamt wurden 12 Personen zu einer Voruntersuchung eingeladen und unter Beachtung der unter Kapitel 4.1.3 Einschluss-, Ausschluss- und Abbruchkriterien aufgeführten Kriterien konnten sie in die Studie eingeschlossen werden. Durch eine internistisch-klinische Untersuchung (Anlage 0) wurde sichergestellt, dass keine relevante Erkrankung vorliegt und keine Ausschlusskriterien bestanden. Ausschlusskriterien waren Stoffwechsel-, Leber-, Nieren- sowie Magen- und Darmerkrankungen (Anlage 0). Nach ausführlicher Information über die Art der Studie, deren Ziele und die mögliche mit der Teilnahme verbundene Risiken hatte der Studieninteressent ausgiebig Gelegenheit persönliche Fragen zu stellen. Danach erfolgte die

Unterzeichnung der Informationsschrift, Einwilligungserklärung (Anlage 12.3) und Teilnehmervertrag (Anlage 12.4)

4.1.3 Einschluss-, Ausschluss- und Abbruchkriterien

4.1.3.1 Einschlusskriterien

Als Einschlusskriterien wurden festgelegt

- Alter 20 - 40 Jahre
- BMI 20 - 25 kg/m²
- Kein Konsum von Alkohol, Medikamenten, Drogen oder Supplementen
- Keine Sojaprodukte, keine Lebensmittel mit Sojagehalt (Schokolade usw.) zwei Wochen vor und während der Studie
- Keine Stoffwechselstörung
- Keine Leber- oder Nierenerkrankung
- Keine gastro-intestinalen Erkrankungen
- Keine spezifischen Kostformen oder Diäten (wie Low fat, Low Carb, keine einseitige Kostform, wie vegetarisch, vegan)

4.1.3.2 Abbruchkriterien

- Entzug der Einwilligung zur Teilnahme an der Studie
- Verstoß gegen eines der Einschlusskriterien
- Auftreten einer akuten gastro-intestinalen Erkrankung
- Unregelmäßige Einnahme der Versuchssubstanzen
- Verstoß gegen das Versuchsprotokoll

4.1.3.3 Ausschlusskriterien

- Fehlende schriftliche Zustimmung zum Studienprotokoll
- Eines der Einschlusskriterien wird nicht erfüllt

4.2 Untersuchungsmethoden

4.2.1 Untersuchung vor der Aufnahme

Die Voruntersuchung (VU) fand sieben Tage vor Versuchsbeginn statt. Dabei wurden die Studieninteressenten nochmals ausführlich über Studienziel und -ablauf, eventuelle Risiken, Datenschutz und Probandenvertrag aufgeklärt. Zusätzlich wurde ihnen die schriftliche

Patienteninformation mit der Einwilligungserklärung ausgehändigt. Nach Beantwortung aller Fragen durch den Prüfarzt und ausreichender Bedenkzeit unterschrieben die Probanden die Einwilligungserklärung.

4.2.1.1 Eingangsuntersuchung

Die klinisch-medizinische Untersuchung umfasste die Erhebung der eigenen und der relevanten Familienanamnese, eine körperliche Untersuchung, Messung des Blutdrucks, der Herzfrequenz, des Body Mass Index (BMI), sowie Abnahme der Routine-Laborwerte und der Ausgangswerte für die Versuchsparameter. Die Berechnung des BMI erfolgte nach der Formel Körpergewicht [kg]/Körpergröße[m]². Allen Studieninteressenten wurde nach einer 12-stündigen Nahrungskarenz mit einer Butterfly®-Kanüle (Sarstedt, Nümbrecht) aus einer Cubitalvene Blut in jeweils zwei 2,7 ml EDTA- und 2,4 ml Lithium-Heparin-Monovetten® abgenommen. Aus dem EDTA-Blut wurden die Kontrollparameter kleines Blutbild; Blutzucker, Eiweiß, Leberwerte (ASAT/GOT, ALAT/GPT und γ-GT), Bilirubin (Bili. Ges.), Blutfette (Cholesterin und Triglyceride), C-reaktives Protein (CRP), alkalische Phosphatase (aP), Natrium und Kalium, das Thyreoidea-stimulierendes Hormon (TSH) sowie das Kreatinin (Anlage 12.8 Laboruntersuchung) angefordert. Diese Laborparameter wurden noch am gleichen Tag in dem Routinelabor der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV (Ziemsenstr. 1; 80336 München) analysiert. Für die Bestimmung des Genisteins wurde ein 2,7 ml Vollblut-EDTA-Monovette® bis zur Analyse bei -80°C aufbewahrt. Die Urinuntersuchung aus dem Morgenurin erfolgte mittels Urinteststreifen (s. Anlage 12.8) und der Rest wurde bis zur eventuellen Analyse der Genisteinmetabolite bei -20°C aufbewahrt. Für die Bestimmung des Mikrobioms zum Zeitpunkt der ersten Visite (U1A, Anlage 12.8) wurde dem Probanden ein Stuhlsammelgefäß mit DNA-Stabilisator der Firma STRATEC Biomedical AG, einen Stuhlauffangbehälter, ein paar Handschuhe, eine Anleitung zur Stuhlentnahme sowie ein Fragebogen „Anleitung zur Stuhlentnahme“ (s. Anlage 12.5) ausgehändigt.

4.2.1.2 Feststellung der Ernährungsweise mittels Ernährungserhebung (Food-Frequency-Questionnaire).

Zum Ausschluss einseitiger oder ungesunder Ernährungsweisen wurde dem Studieninteressenten ein Verzehrshäufigkeitsfragebogen (Food-Frequency-Questionnaire, FFQ) ausgehändigt und die Beantwortung der darin enthaltenen Fragen genau erklärt (s. Anlage 12.6). Die Teilnehmer haben den FFQ-Erhebungsbogen selbstständig vor Ort ausgefüllt. Für die Angabe der Häufigkeiten von Verzehr der jeweiligen Lebensmittelgruppen (kohlenhydrat- und

fetthaltige Lebensmitteln, sowie alkoholischen Getränken) standen 6 Antwortmöglichkeiten zur Verfügung: „nie oder weniger als 1 Mal pro Monat“, „1 bis 3 Mal pro Monat“, „1 bis 2 Mal pro Woche“, „3 bis 6 Mal pro Woche“, „täglich“ oder „mehrmals täglich“. Die Antworten der Verzehrshäufigkeiten wurden für die letzten drei Monate gemacht. Mit den Ergebnissen aus dem evaluierten FFQ wurden Personen mit ungewöhnlichen oder ungesunden Ernährungsweisen ausgeschlossen, sowie der Verzehr von Genistein, Quercetin, und Naringenin mit der Kost abgeschätzt. Die Ergebnisse wurden mit dem Studieninteressenten besprochen.

4.2.2 Diätetische Intervention

Das Einhalten der erforderlichen Ernährungsrichtlinien (gleichmäßiger Verzehr von flavonoidhaltigen Lebensmitteln) wurde besprochen und eine Tabelle (s. Anlage 12.7) mit ungeeigneten Lebensmitteln zur Orientierung an den Studieninteressenten ausgehändigt. Jeder Teilnehmer erhielt ausführliche und detaillierte Informationen über die Art und Menge von interferierenden Lebensmitteln, die mit dem Studienprotokoll noch vereinbar ist.

4.3 Studiendesign

Wir führten eine doppelblinde, stratifizierte, randomisierte Studie im doppel-cross-over Design durch, so dass jeder Teilnehmer seine eigene Kontrolle war. Lagen keine Ausschlusskriterien vor und waren die Einschlusskriterien erfüllt, so wurde der Teilnehmer stratifiziert einer 4-er Gruppe, (Gruppe I mit Teilnehmer 1 – 4, Gruppe II mit Teilnehmer 5 - 8 und Gruppe III mit Teilnehmer 9 - 12) zugeteilt und die Gruppen wurden randomisiert der Abfolge der drei Versuchspräparate (ABC) zugewiesen (s. Tabelle 8). Die Abfolge der Zuteilung zu den Versuchspräparaten war C-A-B, A-B-C oder B-C-A. Durch diese zeitlich versetzte Zuteilung zu den drei Versuchspräparaten wurden zeitliche Faktoren auf den Versuchsablauf ausgeschlossen. Die Stratifizierungskriterien waren Alter, BMI und Geschlecht. Die Randomisierung erfolgte nach dem Zufallsprinzip durch Ziehen eines Loses. Die Teilnehmerdaten wurden unmittelbar nach Aufnahme des Teilnehmers pseudonymisiert (Zuordnung einer Nummer, die in keinem Zusammenhang zu den Teilnehmerdaten steht) und konnten nur durch den Studienleiter den Untersuchungsergebnissen zugeordnet (entschlüsselt) werden. Als Gründe für die Entschlüsselung wurden neu aufgetretene, ungeklärte Beschwerden des Teilnehmers oder auffällige Laborparameter festgelegt.

4.4 Versuchsprotokoll

Jeder Versuchsteilnehmer durchlief vollständig das in Tabelle 8 beschriebene Versuchsprotokoll.

Über sieben Tage erhielten die drei Gruppen von jeweils vier Teilnehmern eines der drei Versuchspräparate (A, B, C), gefolgt von einer wash-out Periode von sieben Tagen. Dann wechselten die Gruppen in unterschiedlicher Reihenfolge zu den anderen beiden Versuchspräparaten (s. Tabelle 8). Somit war jeder Teilnehmer seine eigene Kontrolle. Da die Reihenfolge der Zuteilung für jeweils vier Teilnehmer unterschiedlich war, können zeitliche Effekte (z. B. Außentemperatur) der Zuteilung ausgeschlossen werden.

Tabelle 8: Versuchsprotokoll. Jeweils vier Probanden in einer Gruppe (Gruppe I mit Teilnehmer #1 - #4, Gruppe II mit Teilnehmer #5 - #8 und Gruppe III mit Teilnehmer #9 - #12) erhielten zu Beginn jeder siebentägigen Einnahmeperiode (U1A = Beginn der ersten Einnahmeperiode, U2A = Beginn der zweiten Einnahmeperiode und U3A = Beginn der dritten Einnahmeperiode) eine der Versuchsdosierungen (A = 100 mg Genistein + 100 mg Naringenin, B = 100 mg Genistein + 100 mg Quercetin oder C = 100 mg Genistein) in unterschiedlicher Reihenfolge. Zwischen den Einnahmeperioden lag eine wash-out-Periode von sieben Tagen (U1B = Ende der ersten Einnahmeperiode, U2B = Ende der zweiten Einnahmeperiode und U3B = Ende der dritten Einnahmeperiode), in der die Probanden keine Versuchspräparate einnahmen.

Gruppe	Teil-nehmer	U1A	U1B	U2A	U2B	U3A	U3B
		Einnahme-periode (7 d)	wash-out (7 d)	Einnahme-periode (7 d)	wash-out (7 d)	Einnahme-periode (7 d)	wash-out (7 d)
I	# 1	C		A		B	
	# 2	C		A		B	
	# 3	C		A		B	
	# 4	C		A		B	
II	# 5	A		B		C	
	# 6	A		B		C	
	# 7	A		B		C	
	# 8	A		B		C	
III	# 9	B		C		A	
	# 10	B		C		A	
	# 11	B		C		A	
	# 12	B		C		A	

4.5 Versuchspräparate und Dosierungen

Die orale Einnahme der Versuchspräparate A, B und C (s. Tabelle 9) erfolgte sieben Tage lang dreimal täglich über den Tag verteilt (entsprechend Lit. (Kulling et al., 2001) zu den Mahlzeiten. Der Abstand zwischen der letzten Dosierung und der Blutentnahme musste mehr als 5 Stunden sein.

Tabelle 9: Verwendete Flavonoide und Dosierungen. Die Versuchspräparate A (100 mg Genistein + 100 mg Naringenin), B (100 mg Genistein + 100 mg Quercetin) oder C (100 mg Genistein) wurden in unterschiedlicher Reihenfolge in den jeweiligen Einnahmeperioden eingenommen.

Versuchspräparat	Zusammensetzung
A	100 mg Genistein + 100 mg Naringenin
B	100 mg Genistein + 100 mg Quercetin
C	100 mg Genistein

4.6 Studienablauf

Zu Beginn (VU und U1A) und am Ende (U3B und NU) der Studie wurden bei den Teilnehmern nach einer mehr als 8-stündigen Nahrungskarenz, aber ausreichender Wasserzufuhr Untersuchungsmaterialien abgenommen. Zu den Zwischenvisiten (U1B, U2A-B und U3A) waren Teilnehmer nicht nüchtern. Die Tabelle 10 zeigt den Ablauf und die Parameter der einzelnen Untersuchungen.

Visite VU (Voruntersuchung): In der Voruntersuchung (siehe 4.2.1.1 Eingangsuntersuchung) wurden die Ein- und Ausschlusskriterien überprüft, Untersuchungsmaterialien asserviert, sowie nach Vorschrift aufbewahrt und die Probanden auf die weiteren Visiten vorbereitet.

Visite U1A (Beginn der ersten Einnahmeperiode): Es wurden Blut- und Urinproben zur Bestimmung der Versuchs- und Kontrollparameter asserviert und nach Vorschrift aufbewahrt. Die Versuchspersonen erhielten die verblindeten U1A-Versuchspräparate mit der Einnahmeverordnung für sieben Tage und einen Termin für die nächste Visite.

Visite U1B (Ende der ersten Einnahmeperiode): Die Abbruchkriterien wurden überprüft, ebenso die Einnahme der Versuchspräparate durch Rückgabe der leeren Verpackungen. Blut- und Urinproben zur Bestimmung der Versuchs- und Kontrollparameter wurden asserviert und nach Vorschrift aufbewahrt. Ein Termin für die nächste Visite in sieben Tagen wurde vereinbart.

Visite U2A (Beginn der zweiten Einnahmeperiode): Es wurden Blut- und Urinproben zur Bestimmung der Versuchs- und Kontrollparameter asserviert und nach Vorschrift aufbewahrt. Die Versuchspersonen erhielten die verblindeten U2A-Versuchspräparate mit der Einnahmeverordnung für sieben Tage und einen Termin für die nächste Visite.

Visite U2B (Ende der zweiten Einnahmeperiode): Die Abbruchkriterien wurden überprüft, ebenso die Einnahme der Versuchspräparate durch Rückgabe der leeren Verpackungen, Blut- und Urinproben zur Bestimmung der Versuchs- und Kontrollparameter wurden asserviert und nach Vorschrift aufbewahrt. Ein Termin für die nächste Visite in sieben Tagen wurde vereinbart.

Visite U3A (Beginn der dritten Einnahmeperiode): Es wurden Blut- und Urinproben zur Bestimmung der Versuchs- und Kontrollparameter asserviert und nach Vorschrift aufbewahrt. Die Versuchspersonen erhielten die verblindeten U3A-Versuchspräparate mit der Einnahmeverordnung für sieben Tage und einen Termin für die nächste Visite.

Visite U3B (Ende der dritten Einnahmeperiode): Die Abbruchkriterien wurden überprüft, ebenso die Einnahme der Versuchspräparate durch Rückgabe der leeren Verpackungen, Blut-

und Urinproben zur Bestimmung der Versuchs- und Kontrollparameter wurden asserviert und nach Vorschrift aufbewahrt. Ein Termin für die Nachuntersuchung wurde vereinbart.

Nachuntersuchung und Abschlusstermin (NU): Eine Woche nach Versuchsende kamen die Teilnehmer zu einem abschließenden Gespräch, bei dem Ihnen die Ergebnisse der Routine- und Kontrolluntersuchungen mitgeteilt wurden und sie nochmals Gelegenheit hatten, Fragen zu stellen. Es wurde Ihnen angeboten, die Veröffentlichung der Ergebnisse der Studie zu erhalten.

Tabelle 10: Studienablaufplan. Zu jeder Visite wurden bei allen Teilnehmern die Abbruchkriterien überprüft, Blut asserviert, die jeweilige Versuchskombination mitgegeben und ein Termin für die nächste Visite gemacht. Nur bestimmte Kontrollparameter (Genistein, Kreatinin, γ-GT, CRP, Triglyceride und Urin) wurden zu jeder Visite analysiert.

Visite	VU	U1A	U1B	U2A	U2B	U3A	U3B	NU
✓ Überprüfung der Abbruchkriterien								
→ Entzug der Zustimmung zu den Versuchsbedingungen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
→ Verstoß gegen eines der Einschlusskriterien	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
→ Auftreten einer akuten gastro-intestinalen Erkrankung	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
→ Unregelmäßige Einnahme der Versuchssubstanzen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
→ Verstoß gegen das Versuchsprotokoll	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
✓ Mitgabe von Versuchspräparaten: A, B oder C		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		
✓ Terminvereinbarung in 7 Tagen		<input type="checkbox"/>						
✓ Asservierung von Untersuchungsmaterialien								
Blut:	2 X 2,7 ml EDTA (Vollblut)	Genistein	<input type="checkbox"/>					
		Blutbild	<input type="checkbox"/>					<input type="checkbox"/>
	2 X 2,7 ml Li-Heparin (Plasma)	Natrium	<input type="checkbox"/>					<input type="checkbox"/>
		Kalium	<input type="checkbox"/>					<input type="checkbox"/>
		Kreatinin	<input type="checkbox"/>					
		Glucose	<input type="checkbox"/>					<input type="checkbox"/>
		Eiweiß	<input type="checkbox"/>					<input type="checkbox"/>
		Bili. Ges.	<input type="checkbox"/>					<input type="checkbox"/>
		ASAT (GOT)	<input type="checkbox"/>					<input type="checkbox"/>
		ALAT (GPT)	<input type="checkbox"/>					<input type="checkbox"/>
		γ-GT	<input type="checkbox"/>					
		CRP	<input type="checkbox"/>					
Urin:	aP	<input type="checkbox"/>						<input type="checkbox"/>
	Triglyceride	<input type="checkbox"/>						
	Cholesterin	<input type="checkbox"/>						<input type="checkbox"/>
	TSH	<input type="checkbox"/>						<input type="checkbox"/>
Stuhl:	1 X Stratectube	<input type="checkbox"/>						<input type="checkbox"/>

4.6.1 Bestimmung des Genisteins

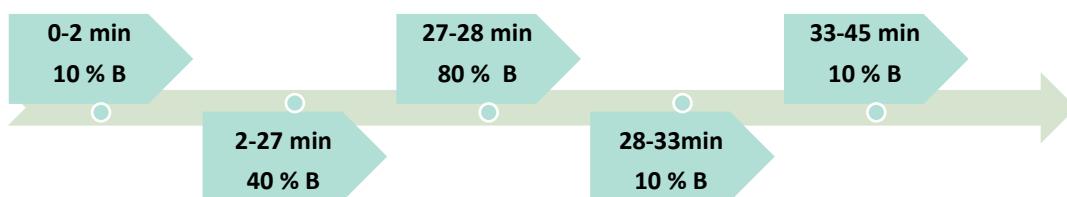
4.6.1.1 High-Performance-Liquid-Chromatographie (HPLC)

Die Bestimmung des Polyphenols Genistein im Blut erfolgte mit der High-Performance-Liquid-Chromatographie (HPLC). Das Prinzip der HPLC beruht auf einem physikalisch-chemischen Trennverfahren, bei dem die zu untersuchende Substanz, zusammen mit einem Laufmittel durch eine Trennsäule zwischen zwei Phasen aufgetrennt und anschließend quantifiziert wird. Das Füllmaterial wird als stationäre Phase (=Säule) bezeichnet und das Laufmittel als mobile Phase (=Eluent) (Axel M. Gressner, 2007). Durch den hohen Druck im System und das unterschiedliche Adsorptionsverhalten der zu detektierenden Stoffe (3 bis 10 µm) an der stationären Phase, werden die gesuchten Substanzen aufgetrennt und durch den Vergleich der Retentionszeiten mit Hilfe eines Standards identifiziert und zusätzlich das Substanzspektrum analysiert. Die Analyten wurden nach der Auftrennung mit einem geeigneten Detektor quantifiziert (Axel M. Gressner, 2007). Die quantitative Bestimmung der Analyten erfolgte durch den Vergleich mit einem kalibrierten internen Standard.

4.6.1.2 Methode

Die vollständige und reproduzierbare Auftrennung des zu bestimmenden Stoffes ist die Voraussetzung für aussagekräftige Ergebnisse. Im Rahmen einer Pilotstudie „QUERGEN-Studie“ nach dem Protokoll von Biasutto et al. (2010) wurde die passende Methode für die Probenaufbereitung und die Analysekonditionen der HPLC für die vorliegende Arbeit entwickelt (Galasso, 2012). Das Protokoll der Probenaufbereitung und die Analyseparameter für die HPLC werden im Folgenden kurz erläutert. Das Laufmittel setzte sich aus Eluent A mit 0,5 % Phosphorsäure und Eluent B mit Acetonitril p.a. zusammen (Tabelle 11.). Der Lauf erfolgt bei 30°C mit einem Flow von 1 ml pro Minute mit folgendem Multi-Step-Gradienten:

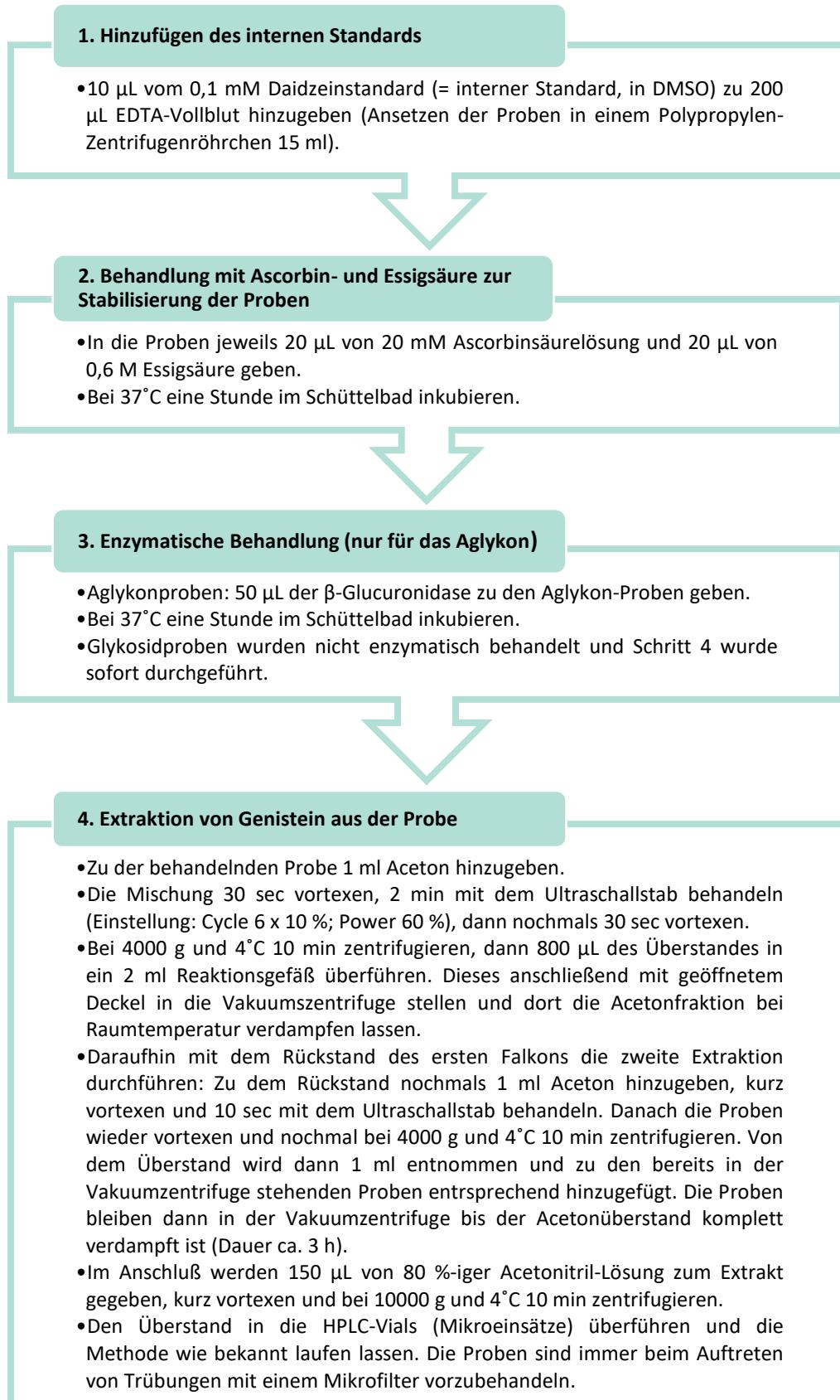
Tabelle 11: Verwendeter Lauf für die Bestimmung der Proben. Multi-Step-Gradient des Laufs



Die Detektion von Genistein und des internen Standards Daidzein erfolgte mit einem UV-Detektor bei 260 nm. Die Identifizierung der Peaks erfolgte durch einen Vergleich der UV-Spektren und Retentionszeiten mit den Referenzchromatogrammen. Für die

Flächenberechnung der Peaks wurde die Software Chromeleon angewendet. Die korrekte Integration der Kontrollen wurde visuell überprüft und nicht richtig erkannte Peaks von Hand nachberechnet.

Die Genistein-Extraktion (siehe Tabelle 12) wurde mit dem in der QUERGEN-Pilotstudie entwickelten Protokoll durchgeführt (Galasso, 2012). In einem ersten Schritt direkt nach dem Hinzufügen des internen Standards Daidzein, wurden die Proben zur Verbesserung der Haltbarkeit mit Ascorbinsäure und Essigsäure versetzt. Nach einer Einwirkzeit von einer Stunde wurde den Proben das Enzym β -Glucuronidase zur Bestimmung der Aglykone zugegeben und eine Stunde lang im 37°C Schüttelbad inkubiert, um die Abspaltung der Zuckerstrukturen von den Glykosiden zu gewährleisten. Die Proben zur Bestimmung der Glykoside wurden nicht enzymatisch behandelt, die Extraktion der Glykoside erfolgte unmittelbar nach Zerstörung der zellulären Strukturen durch eine Ultraschallbehandlung. Im Anschluß wurden die Flavonoide mit Aceton aus der Matrix extrahiert. Abschließend erfolgte, nach Abdampfung des Acetons, die Rücklösung der Probe in Acetonitril. Im Folgenden wird das ausführliche Protokoll zur Probenaufbereitung dargestellt:

Tabelle 12: Ausführliches Protokoll zur Probenaufbreitung (Galasso, 2012).

Zur Erstellung der Standardkurve wurden Proben mit 5, 10, 15 und 20 μM Genistein hergestellt. Um die Interassay-Variation zu messen, wurden in getrennten Ansätzen 6 dieser Standardkurven gemessen und der Variationskoeffizient bestimmt.

4.6.2 Bestimmung der totalen antioxidativen Kapazität (TAC)

4.6.2.1 Total Antioxidant Capacity (TAC) Assay

Die TAC beschreibt die Gesamtheit aller antioxidativ wirksamen Plasmabestandteile und wurde mit dem OxiSelect™ Total Antioxidant Capacity (TAC) Assay Kit der Firma CELL BIOLABS (Biolabs, 2010-2012), basierend auf dem single-electron-transfer (SET), gemessen. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Quantifizierung von übertragenen Elektronen auf ein Antioxidationsmittel, bei der eine beliebiges Oxidans reduziert wird. Im ersten Schritt des TAC-Assays erfolgt die Reduktion von Kupfer(II)-Ionen zu Kupfer(I)-Ionen, durch in der Probe vorliegende Antioxidantien, über einen bestimmten Zeitraum. Nach der Reduktion reagieren die Kupfer(I)-Ionen mit einem Chromogen, das seine maximale Absorption bei 490 nm hat. Nach Zugabe der Stopplösung wird die optische Dichte (OD; transmittiertes Licht) der chromogenen Flüssigkeit bei einer Wellenlänge von 490 nm spektrophotometrisch gemessen (Abbildung 8).

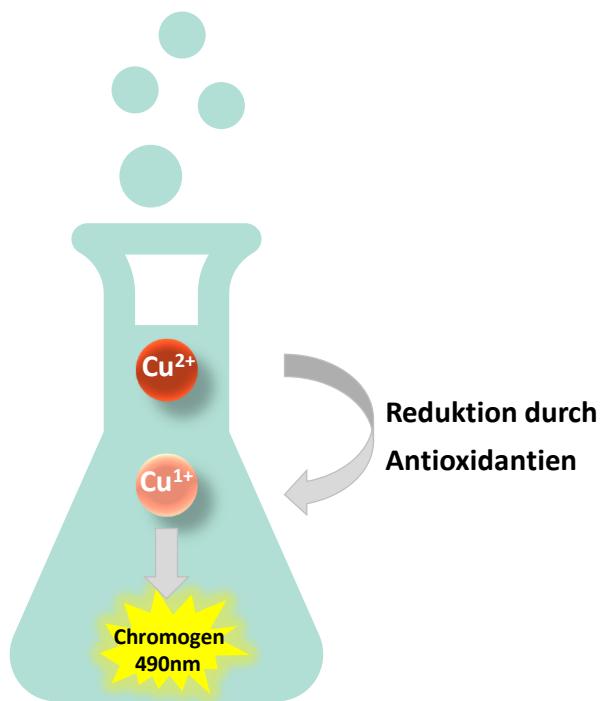


Abbildung 8: Das Messprinzip des TAC Aktivitätassays

Bei der Ermittlung der Nettoabsorptionswerte werden die OD-Werte der Messung „ohne Kupferlösung“ von den OD-Werten der Messung „mit Kupferlösung“ subtrahiert.

Antioxidative Kapazität (μM)

= OD Probe mit Kupferionenreagenz – OD Probe ohne Kupferionenreagenz

Als Bezugsgröße wird eine mit Harnsäure erstellte Standardkurve verwendet. Die Nettoabsorptionswerte der jeweiligen Proben werden mit der bekannten Harnsäurekonzentration in der Standardkurve verglichen. Die so bestimmten Absorptionswerte sind proportional zur reduktiven Kapazität in der Probe. Das antioxidative Potential wird in " μM Kupferreduktions-Äquivalente" oder "mM Harnsäure Äquivalente" angegeben.

4.6.2.2 Durchführung

Alle mitgelieferten Reagenzien des OxiSelect™ Total Antioxidant Capacity (TAC) Assay Kit's wurden nach den Herstellerangaben (Biolabs, 2010-2012) vorbereitet (s. Tabelle 13) und bis zur Verwendung im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

Tabelle 13: Vorbereitung der Reagenzien im 'OxiSelect™ Total Antioxidant Capacity (TAC) Assay Kit

Reagenz	Verdünnung	Verdünnungslösung
100X Reaktionspuffer	1:100	1X Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS = phosphate buffered saline)
100X Kupferionenreagenz	1:100	Deionisiertes Wasser
10X Stopplösung	1:10	Deionisiertes Wasser

Für den Harnsäure-Standard wurden 10 mg Harnsäure Pulver abgewogen und in 1N Natriumhydroxid (NaOH) gelöst. Diese 10 mg/ml Harnsäurelösung entsprach einer Ausgangskonzentration von 60 mM. Für die Erstellung der Standardkurve wurden daraus in einer Verdünnungsreihe Konzentrationen von 0,0039 mM, 0,0156 mM, 0,0625 mM, 0,25 mM und 1 mM mit deionisiertem Wasser hergestellt und davon jeweils als Doppelbestimmung 20 μL in einer 96-Flachbodenmikrotiterplatte (Fa. Nunc, Wiesbaden, Deutschland) aufgebracht. Die Blutplasmaproben der Teilnehmer wurden unverdünnt eingesetzt und als Doppelbestimmung zu je 20 μL zu jeder Probe pipettiert. Dann wurden 180 μL eines 1X Reaktionspuffers pro Vertiefung zugegeben und sorgfältig gemischt. Um die Absorptionswerte der Probe vor Zugabe von Kupferionenreagenz (OD Probe vor Kupferionenreagenzzusatz) zu erhalten, wurden die einzelnen Kavitäten der 96er Mikrotiterplatte mit dem Mithras LB Multimode Microplate Reader der Firma Berthold Technologies gemessen. Es wurde ein Filter mit 490 nm verwendet. Durch Zugabe von 50 μL 1X Kupferionenreagenz pro Cavität wurde die Farbreaktion initiiert und 5 min. lang bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler inkubiert. Durch Zugabe von 50 μL

Stopplösung wurde die Reaktion beendet. Es folgte die erneute Messung der Absorption (OD Probe mit Kupferionenreagenz).

Die Auswertung der Platten konnte mit dem SPSS Programm (Version 23) erstellt werden. Hierbei wurden die erhaltenen OD-Werte der Messung „ohne Kupferlösung“ von den OD-Werten der Messung „mit Kupferlösung“ subtrahiert. Abschließend erfolgte durch Vergleich mit der Harnsäure-Standardkurve die Quantifizierung der TAC-Konzentration in der Probe. Die graphische Darstellung und statistische Auswertung der Messwerte erfolgte ebenfalls mit dem SPSS Programm (Version 23).

4.6.3 Bestimmung von Malondialdehyd (MDA)

Lipidperoxidationsprodukte entstehen durch Interaktion freier Radikale mit (mehrfach) ungesättigten Fettsäuren. Diese instabilen Verbindungen zerfallen nach kurzer Zeit in ihre Folgeprodukte, darunter Malondialdehyd (MDA). MDA dient zur Quervernetzung von Lipiden und Proteinen in der Biodoppelmembran und wird physiologisch in der Arachidonsäure-Kaskade gebildet (Frijhoff et al., 2015; Ayala et al., 2014; Nam, 2011). Das Molekül besitzt eine hohe Affinität zu primären Aminogruppen von Phospholipiden und Proteinen. Bei Reaktion mit der DNA kann es zu fehlerhaften Transkriptionen führen und die Funktion intrazellulären Proteins zerstören. Die Konzentration von MDA ist ein Maß für Lipidperoxidation und Zellschädigung.

4.6.3.1 MDA Adduct Competitive ELISA

Der Nachweis der MDA-Proteinaddukte erfolgte in der vorliegenden Arbeit mit dem OxiSelect™ MDA Adduct Competitive ELISA (enzyme-linkedimmunosorbent assay) Kit von CELL BIOLABS INC. (Biolabs, 2013). Das Prinzip des OxiSelect™ MDA Adduct Competitive ELISA Kits beruht auf

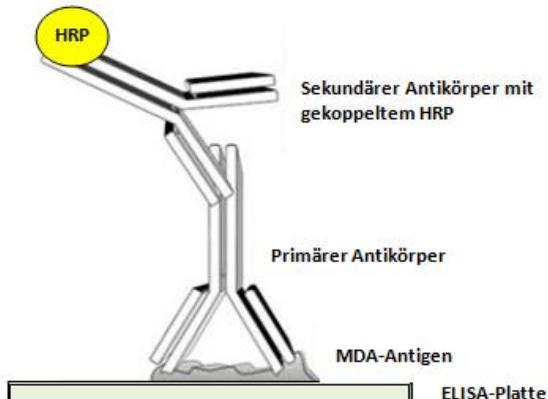


Abbildung 9: Spezifischer Nachweis von MDA-Proteinen. Der primäre Antikörper bindet an das MDA-Antigen. An dem sekundären Antikörper ist Meerrettich-Peroxidase (HRP) kovalent gekoppelt. HRP katalysiert die Oxidation von Luminol und es erfolgt die Emission von Licht, welches detektiert werden kann.

einer enzymatischen Farbreaktion zur Quantifizierung entstandener Antigen-Antikörper-Komplexe. Eine ELISA-Platte wird mit einem MDA-Konjugat beschichtet und mit der zu analysierenden Probe bzw. dem MDA-BSA-Standard beschickt. Nach einer kurzen Inkubation wird zuerst ein polyklonaler Anti-MDA Antikörper, gefolgt von einem HRP (horseradish peroxidase)-konjugierten sekundären Antikörper hinzugegeben (s. Abbildung 9).

Die Quantifizierung der MDA-Proteinaddukte in der Probe, wird durch einen Vergleich der Extinktionen mit einer vorgegebenen MDA-BSA-Standardkurve ermöglicht.

4.6.3.2 Durchführung

Das OxiSelect™ MDA AdductCompetitive ELISA Kit wurde bis zur Verwendung im Kühlschrank bei 4°C gelagert und die Verdünnung der jeweiligen Reagenzien (s. Tabelle 14) erfolgte nach der Produktbeschreibung des Herstellers.

Tabelle 14: Verdünnung der jeweiligen Reagenzien im OxiSelect™ MDA AdductCompetitive ELISA Kit

Reagenz	Verdünnung	Verdünnungslösung
1000X Anti-MDA Antikörper	1:1000	Assay Diluent
1000X Sekundär-Antikörper, HPR Konjugat	1:1000	Assay Diluent
10X Waschpuffer	1:10	Deionisiertes Wasser
100X Konjugat-Diluent	1:100	1X Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS = phosphate buffered saline)
1.0 mg/ml MDA-Konjugat	1:2000 Zielkonzentration: 500 ng/ml	1X Konjugat-Diluent

Im ersten Schritt wurde jede Vertiefung der mitgelieferten 96-well ELISA-Mikrotiterplatte mit 100 µL des 500 ng/ml MDA-Konjugats beschichtet und über die Nacht im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das überschüssige MDA-Konjugat entfernt, zweimal mit dem 1X PBS (400µL/Vertiefung) gewaschen und die Platte auf Zellstoff ausgeklopft. Noch freiliegende Bindungsstellen der ELISA-Platte wurden anschließend mit 200 µL Assay Diluent durch

Tabelle 15: Verdünnung der Standardkurve

MDA-BSA Standard (µg/mL)	MDA Addukt (pmol/mL)
6,25	1500
1,56	375
0,39	94
0,10	24
0,025	6
0	0

einstündige Inkubation bei Raumtemperatur geblockt. In der Zwischenzeit wurde der Standard durch eine Verdünnungsreihe von seiner Ausgangskonzentration von 1 mg/ml zu den Zielkonzentrationen (s. Tabelle 15) verdünnt.

Der Assay Diluent wurde durch Ausklopfen der Platte entfernt und 50 µL der zu analysierenden Blutplasmaproben der Studienteilnehmer bzw. die Standardlösungen in Doppelbestimmungen aufgetragen und für 10 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Orbitalshüttler IKA® MTS 4 gemischt. Im nächsten Schritt wurden 50 µL des Primärantikörpers in jede Vertiefung pipettiert, so dass die nachzuweisenden MDA-Proteine in der Probe während der einstündigen Inkubation auf dem Orbitalshüttler bei Raumtemperatur an den Anti-MDA Antikörper binden konnten. Ein erneuter Waschzyklus (3X 250 µL 1X Waschpuffer) mit anschließendem Ausklopfen der ELISA-Platte folgte. Die gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexe wurden nachfolgend, mit einem HRP-markierten Antikörper beschichtet, eine Stunde auf dem Orbitalshüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden anschließend in drei Waschungen mit Waschpuffer-Lösung abgewaschen und durch Ausklopfen der Platte auf Zellstoff entfernt. Nach Zugabe von 100 µL Substrat-Lösung in jede Vertiefung der ELISA-Platte wurde die Platte 15 Minuten auf dem Orbitalshüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Die gelbe Farbreaktion wurde durch Zugabe von 50 µL Stopplösung je Vertiefung gestoppt. Die Messung der Proben erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 450nm. Die Extinktion verhält sich proportional zur Antigenkonzentration in der gemessenen Probe. Durch Vergleich mit der bekannten Standardkalibrationskurve wurden die MDA-Konzentrationen der jeweiligen Proben quantitativ bestimmt.

4.6.4 Bestimmung der Mikrobiota

Die Untersuchung und Auswertung der gesammelten Stuhlproben vor (U1A) und nach (U3B) der Studie für die Bestimmung der Mikrobiota erfolgten nach beschriebener Methode (Lagkouvardos et al., 2017; Mitra et al., 2013) bei Dr. Ilias Lagkouvardos und Dr. Thomas Clavel am ZIEL - Institute for Food & Health, Core Facility Microbiome/NGS, Weihenstephaner Berg 3 in 85354 Freising.

4.7 Statistische Auswertung und Beratung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe eines gemischten Modells mit der Hauptzielgröße „Plasmaspiegel des Genistein“ mit einem zufälligen Personen-Effekt und den Versuchspräparaten (A, B und C) als kategoriale Einflussgröße. Der Effekt der Versuchsbedingung wird auf dem 5% - Niveau getestet. Als Sensitivitätsanalyse wird der nichtparametrische Friedman Test

durchgeführt. Die anderen Parameter werden explorativ analysiert. Der Stichprobenumfang ist ausreichend, um Effekte der Größenordnung von einer Standardabweichung nachzuweisen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm *IBM SPSS Statistics 23.0 for Windows* (Statistical Package for the Social Sciences). Für deskriptive Darstellungen wurden Häufigkeitsangaben (Mittelwert und Standardabweichung) errechnet.

Die statistische Beratung bei der Auswertung der Studie erfolgt durch Prof. Dr. Helmut Küchenhoff, StaBLab (Statistisches Beratungslabor), Raum: 402, Akademiestraße 1, 80799 München, Ludwig-Maximilians-Universität München.

4.7.1 Dateneingabe und Zielgrößen

Die Berechnung der Differenzen für TAC, MDA, wurde Genistein-Aglykon und Genistein-Glykosid erfolgte aus den gemessenen Werten zu Beginn und am Ende jeder Einnahmeperiode, indem der Anfangswert vom Endwert abgezogen, also Ende der Einnahmeperiode (B) minus Beginn der Einnahmeperiode (A) und dann die zeitlich versetzten Einnahmeperioden (U1A, U2A und U3A) für jedes der drei Versuchspräparate (A, B oder C) zusammengefasst wurde. Für die graphische Darstellung wurden Boxplots gewählt aus denen Mediane, Minimal- und Maximalwerte sowie die 25% und 75%- Quantile ersichtlich sind. Die Mediane der jeweiligen Gruppendifferenzen wurden miteinander verglichen, um eventuelle Ausreißer eines Probandenkollektivs, die den Mittelwert stark beeinflussen würden, besser zu relativieren.

4.7.2 Statistische Tests

Zur validen statistischen Auswertung und für die Berechnung der geschätzten Differenzen der TAC, MDA und Genistein im HPLC wurde das linear gemischte Modell (LMM, engl. *Linear Mixed Model*) verwendet. Das LMM entspricht einem linearen Modell mit zufälligen Personeneffekten, mithilfe deren die wiederholte Messung an den gleichen Probanden berücksichtigt werden kann. Zusätzlich werden feste Effekte für die verschiedenen Gruppen aufgenommen, die die eigentliche Fragestellung nach den Auswirkungen der Intervention in den Gruppen beantworten. Das Modell schätzt die Differenz der Werte (z.B. TAC) zu Beginn und zu Ende der Messung (TAC_{Δ}) für jede Gruppe. In der Referenzkategorie „Genistein“ (G) wird ein Effekt für die Differenz geschätzt, für die anderen Gruppen die Abweichung von dieser Differenz.

Die Parametrisierung entspricht folgendem statistischen Modell:

Zur validen statistischen Auswertung und für die Berechnung der geschätzten Differenzen der TAC, MDA und Genistein im HPLC wurde das linear gemischte Modell (LMM, engl. *Linear Mixed Model*) verwendet. Das LMM entspricht einem linearen Modell mit zufälligen Personeneffekten,

mithilfe deren die wiederholte Messung an den gleichen Probanden berücksichtigt werden kann. Zusätzlich werden feste Effekte für die verschiedenen Gruppen aufgenommen, die die eigentliche Fragestellung nach den Auswirkungen der Intervention in den Gruppen beantworten. Das Modell schätzt die Differenz der Werte (z.B. TAC) zu Beginn und zu Ende der Messung (TAC_{Δ}) für jede Gruppe. In der Referenzkategorie „Genistein“ (G) wird ein Effekt für die Differenz geschätzt, für die anderen Gruppen die Abweichung von dieser Differenz.

Die Parametrisierung entspricht folgendem statistischen Modell:

$TAC_{\Delta} = \beta_0 (\text{Kontrollgruppe „G“}) + \beta_1 I(\text{Gruppe}_{\{i,j\}} = G + N) + \beta_2 I(\text{Gruppe}_{\{i,j\}} = G + Q) + b_i + \epsilon_{\{i,j\}}$, für die Beobachtung j von Person i. Mit $I()$ wird die Indikatorfunktion bezeichnet, die 1 ist, wenn die Gruppe von Person i zum Beobachtungszeitpunkt j der angegebenen Gruppe entspricht und bei allen anderen Konstellationen auf 0 gesetzt wird.

β_0 ist der Intercept, also der geschätzte Effekt in der Referenzkategorie (Genistein-Gruppe), β_1 bzw. β_2 die Abweichung von diesem für die Gruppen G + N bzw. G + Q.

Die b_i , $i = 1, \dots, N$, sind normalverteilte personenspezifische Effekte mit Erwartungswert 0, die $\epsilon_{\{i,j\}}$ sind zufällige Fehlerterme die ebenfalls den Erwartungswert 0 haben.

Die geschätzten Effekte des Modells sind unter in der Tabelle 20 (s. Kapitel 5.2.1.3 LGM bei TAC_{Δ} im Ergebnisteil) enthalten. Für eine einfachere Interpretation wurde in der letzten Spalte direkt der Intercept mit dem Erwartungswert 0 zum geschätzten Effekt addiert, woraus sich die geschätzte Differenz (resultierender Effekt) des TAC Wertes für diese Kategorie ergibt. Die Konfidenzintervalle geben den Bereich an von dem angenommen werden kann, dass der wahre Parameter mit 95 %-iger Wahrscheinlichkeit (1-alpha) in diesem Bereich liegen.

Die geschätzten Effekte des Modells sind in der Tabelle 20 (s. Kapitel 5.2.1.3 LGM bei TAC_{Δ} im Ergebnisteil) enthalten. Für eine einfachere Interpretation wurde in der letzten Spalte direkt der Intercept mit dem Erwartungswert 0 zum geschätzten Effekt addiert, woraus sich die geschätzte Differenz (resultierender Effekt) des TAC Wertes für diese Kategorie ergibt. Die Konfidenzintervalle geben den Bereich an von dem ausgegangen werden kann, dass der wahre Parameter mit 95 %-iger Wahrscheinlichkeit (1-alpha) in diesem Bereich liegen.

5 Ergebnisse

5.1 Deskriptive Statistik

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm *IBM SPSS Statistics 23.0 for Windows* (Statistical Package for the Social Sciences). Für deskriptive Darstellungen wurden Häufigkeitsangaben (Mittelwert und Standardabweichung) errechnet.

5.1.1 Soziodemographische Daten

In die Versuchsreihe wurden insgesamt 12 Teilnehmer eingeschlossen, von denen sieben weiblich (58,3 %) und fünf männlich (41,7 %) waren (s. Tabelle 16). Zum Versuchsbeginn lag das durchschnittliche Alter bei $26,4 \pm 3,8$ Jahre (Range: 22 – 33 Jahre). Die Größe der Teilnehmer lag bei $177,1 \pm 8,5$ cm (Range: 165 – 190 cm) und das Körpergewicht bei $71,3 \pm 8,7$ kg (Range: 57,2 – 82 kg). Der berechnete BMI betrug $22,6 \pm 0,9$ kg/m² (Range: 21,0 – 24,0 kg/m²). Die Blutdruckwerte waren systolisch bei $118 \pm 9,8$ mmHg (Range 105 – 130 mmHg) und diastolisch bei $72,5 \pm 8,7$ mmHg (Range 60 – 80mmHg), ebenso wie die Herzfrequenz mit $67,8 \pm 5,2$ pro Minute (Range 62 – 78/min) im Normbereich.

Die Stratifizierung gelang für Alter und BMI. In der Gruppe III wurden drei Frauen und ein Mann aufgenommen, da sich für die Studie mehr Frauen als Männer interessierten und die Deadline für die Rekrutierungszeit erreicht wurde.

Tabelle 16: Anthropometrische Daten der Probanden und deren Zugehörigkeit zur Versuchsgruppe.

Teilnehmer	Geschlecht (w; m)	Alter (Jahre)	Größe (cm)	Gewicht (kg)	BMI (kg/m ²)	Gruppe
Total N= 12	w (58,3%) m (41,7%)	$26,4 \pm 3,8$	$177,1 \pm 8,5$	$71,3 \pm 8,7$	$22,6 \pm 0,9$	1/2/3
1	w	22	174	72,0	23,1	1
2	m	24	190	82,0	22,7	1
3	w	33	165	57,2	21,0	1
4	m	27	185	82,1	24,0	1
5	w	25	175	67,9	22,2	2
6	w	28	174	72,0	23,4	2
7	m	30	184	77,0	22,8	2
8	m	22	188	80,0	22,6	2
9	w	31	165	58,7	21,7	3
10	w	29	173	69,6	23,3	3
11	w	23	170	61,6	21,3	3
12	m	23	182	76,0	22,9	3

5.1.2 Telefonscreening und Voruntersuchung

Das standardisierte Telefoninterview wurde mit Hilfe eines hierfür entwickelten Fragebogens (s. Anhang 12.1 Telefonscreening) durchgeführt und enthielt Fragen zu körperlichen oder psychischen (Vor-) Erkrankungen und zur Medikamenteneinnahme, zum Konsum von Nahrungsergänzungsmitteln sowie zu relevanten Lebensstilfaktoren (z. B. Rauchen, Alkohol) der Teilnehmer. Nur ein Teilnehmer gab als Vorerkrankung eine erfolgreich therapierte Infektion mit dem Helicobacter pylori an (s. Tabelle 17). Ein Drittel der Teilnehmer gaben Allergien an, die aber derzeit symptomlos waren (33,3 %; n=4). Die Einnahme von Nahrungsergänzungsmitteln in der Anamnese wurde nur von einem Teilnehmer (8,3 %; n=1) angegeben, der vor zwei Wochen ein handelsübliches Präparat (Aminosäuren) zum Muskelaufbau kurzfristig eingenommen hatte. Ein Viertel der Teilnehmer konsumierte in der Vorgesichte Soja bzw. Sojaprodukte (25 %; n=3). Mehr als die Hälfte der Teilnehmer gaben an, wöchentlich ein Glas (66,7 %; n=8) bzw. zwei bis drei Gläser (33,3 %; n=4) alkoholische Getränke zu konsumieren. Allerdings galt der Konsum von mehr als zwei Gläsern alkoholischer Getränke in der Woche als Ausschlusskriterium.

Tabelle 17: Anamnestische Angaben der Probanden zu Erkrankungen, Einnahme von Medikamenten oder Nahrungsergänzungsmitteln und zu Lebensstilfaktoren der Studienteilnehmer in der Vorgesichte.

Erkrankungen/Lebensstilfaktoren	nein n (%)	ja n (%)	Kommentar
Stoffwechselstörung	12 (100)	0	
Lebererkrankung	12 (100)	0	
Nierenerkrankung	12 (100)	0	
Magen-Darmerkrankung	12 (100)	0	
Allergie	8 (66,7)	4 (33,3)	
Andere Erkrankungen/ Medikamente	10 (83,3)	2 (16,7)	Helicobacter pylori; Antihistaminikum
Psychopharmaka	12 (100)	0	
NEM	11 (91,7)	1 (8,3)	
Sojakonsum	9 (75)	3 (25)	
Alkoholkonsum	0	12 (100)	
Alkoholverzicht während der Genisteinstudie	0	12 (100)	
Rauchen	12 (100)	0	
Einhaltung der Ernährungsvorgaben	0	12 (100)	

Die Tabelle 18 zeigt, dass gastrointestinale Beschwerden bei unseren Probanden selten waren, gelegentliche Obstipation trat bei 2 Teilnehmern (16,7 %) und gelegentlicher Durchfall bei 5 Teilnehmern (41,7 %) anamnestisch auf. Die Befragungen während der

Studiendauer ergaben, dass alle Teilnehmer während der Studie auf Alkohol und Soja bzw. Sojaprodukte komplett verzichteten. Alle Studienteilnehmer waren Nichtraucher.

Tabelle 18: Ergebnisse zu Obstipation und Durchfall der Studienteilnehmer in der Vorgeschichte.

Obstipation/ Durchfall	nie	selten	öfters	(fast) immer
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Obstipation	10 (83,3)	2 (16,7)	0	0
Durchfall	7 (58,3)	5 (41,7)	0	0

5.1.3 Ergebnisse der Befragung mittels Verzehrshäufigkeitsfragebogen (Food-Frequency-Questionnaire, FFQ) vor der Studienteilnahme

Mit dem Food-Frequency-Questionnaire (FFQ) wurden 29 verschiedene Lebensmittelgruppen erfasst und deren Verzehrshäufigkeit während der vergangenen 3 Monate erfragt (Anlage 12.6). Für die Beurteilung des gesundheitlichen Wertes der Kost, wurden die Vorgaben der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE e. V.) zugrunde gelegt. Da ein Vegetarier diesen Kriterien entsprach wurde er ebenfalls in die Studie aufgenommen. Zur Validierung der Aussage wurden die relevanten Lebensmittel getrennt ausgewertet (s. Tabelle 19).

Obst: Zwei Teilnehmer (16,7 %) verzehrten häufiger als einmal täglich Obst und vier (33,3 %) gaben an, einmal täglich Obst zu essen. Der von DGE empfohlene Orientierungswert von mindestens 250 g pro Tag wurde damit von sechs Teilnehmern (50 %) seltener erreicht.

Gemüse: Beim Gemüse sieht es ähnlich aus, denn fünf Teilnehmer (41,7 %) aßen weniger als 400 g Gemüse am Tag (DGE-Empfehlung), wobei 8,3 % der Teilnehmer häufiger als einmal täglich und 50 % einmal täglich Gemüse zu sich nahmen.

Milch: Es erreichten ein Viertel der untersuchten Teilnehmer (25 %) immer bzw. ein Teilnehmer (8,3 %) fast immer den Orientierungswert der DGE zum Verzehr von Milch und Milcherzeugnisse von 200 g bis 250 g pro Tag. Bei 8 Teilnehmern (66,7 %) lag der Verzehr von Milch und Milchprodukten unter den Empfehlungen.

Fisch: Der empfohlene Verzehr von Fischen, zwei Mahlzeiten pro Woche (davon eine mit fettem Fisch) wurde von 2 Personen erreicht. 9 Personen lagen unter dieser Verzehrmenge, 1 Person lag darüber. Letztere verzehrte drei bis sechs Mal pro Woche Fisch.

Eier: Zwei unserer Versuchsteilnehmer konsumierten täglich und sechs Teilnehmer drei bis sechs Mal pro Woche Eier. Damit lagen sie über den Empfehlungen der DGE von <3 Eiern pro Woche.

Brot: Vollkorn- und Mischbrote wurden täglich bzw. mehrmals täglich von 4 Teilnehmern, Vollkorn Getreideprodukte verzehrten 8 Teilnehmer regelmäßig.

Alkohol: Der langfristig tolerable Alkoholkonsum pro Tag wird für Männer auf 20 g und für Frauen auf 10 g geschätzt. Die Befragung hinsichtlich des Alkoholkonsums ist in Tabelle 19 dargestellt. Der Alkohol wurde in Form von Bier oder Wein, Sekt bzw. Spirituosen konsumiert. Damit war der Vorversuchsbeginn abgefragte Alkoholkonsum innerhalb des tolerablen Bereichs. Während der Studie durfte kein Alkohol getrunken werden.

Tabelle 19: Ergebnisse der Häufigkeitsbefragung mittels Food-Frequency-Questionnaire.

Lebensmittel	nie oder < als 1 Mal/Monat	1 bis 3 Mal/Monat	1 bis 2 Mal/Woche	3 bis 6 Mal/Woche	täglich	mehrmals täglich
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Fleisch	1 (8,3)	1 (8,3)	5 (41,7)	5 (41,7)	0	0
Fisch	5 (41,7)	4 (33,3)	2 (16,7)	1 (8,3)	0	0
Eier	0	1 (8,3)	3 (25)	6 (50)	2 (16,7)	0
Wurst	2 (16,7)	3 (25)	5 (41,7)	2 (16,7)	0	0
Käse	0	0	4 (33,3)	5 (41,7)	3 (25)	0
Milch/ Joghurt	1 (8,3)	1 (8,3)	2 (16,7)	4 (33,3)	3 (25)	1 (8,3)
Sahne	2 (16,7)	4 (33,3)	6 (50)	0	0	0
Schokolade		2 (16,7)	5 (41,7)	2 (16,7)	3 (25)	0
Kuchen	0	9 (75)	3 (25)	0	0	0
Blätterteig/ Pastete	2 (16,7)	10 (83,3)	0	0	0	0
Kekse	3 (27,3)	8 (72,7)	0	0	0	0
Nüsse/ Chips	3 (25)	4 (33,3)	3 (25)	2 (16,7)	0	0
Butter	1 (8,3)	1 (8,3)	2 (16,7)	7 (58,3)	1 (8,3)	0
Margarine	7 (58,3)	4 (33,3)	1 (8,3)	0	0	0
Öl	1 (8,3)	2 (16,7)	2 (16,7)	4 (33,3)	3 (25)	0
Plattenfette/ Speck	6 (50)	4 (33,3)	1 (8,3)	1 (8,3)	0	0
Fastfood	2 (16,7)	9 (75)	1 (8,3)	0	0	0
Obst	0	0	4 (33,3)	2 (16,7)	4 (33,3)	2 (16,7)
Gemüse	0	0	1 (8,3)	4 (33,3)	6 (50)	1 (8,3)
Salat	0	1 (8,3)	4 (33,3)	4 (33,3)	3 (25)	0
Hülsenfrüchte	3 (25)	5 (41,7)	3 (25)	1 (8,3)	0	0
Kartoffeln	0	4 (33,3)	6 (50)	2 (16,7)	0	0
Reis	0	4 (33,3)	7 (58,3)	1 (8,3)	0	0
Nudeln	0	2 (16,7)	5 (41,7)	5 (41,7)	0	0
Vollkorn-/Mischbrot	0	2 (16,7)	3 (25)	3 (25)	3 (25)	1 (8,3)
Flocken	2 (16,7)	0	3 (25)	2 (16,7)	5 (41,7)	0
Bier	0	5 (41,7)	7 (58,3)	0	0	0
Wein/ Sekt	4 (33,3)	7 (58,3)	1 (8,3)	0	0	0
Spirituosen	5 (41,7)	7 (58,3)	0	0	0	0

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass kein Teilnehmer eine spezielle Kostform einhielt und das Verzehrsverhalten der Teilnehmer innerhalb des in Deutschland üblichen Rahmens lag.

5.2. Laboranalysen

5.2.1 TAC_A

5.2.1.1 Erstellung der Standardkurve für TAC

Für die Erstellung der Standardkurve für den TAC-Assay wurde eine TAC Standardreihe (0,0039–1 mM) hergestellt und in Doppelbestimmung mit dem TAC-Assay gemessen (siehe Methode 3.6.2.2). Die Werte sind in Abbildung 10 aufgetragen.

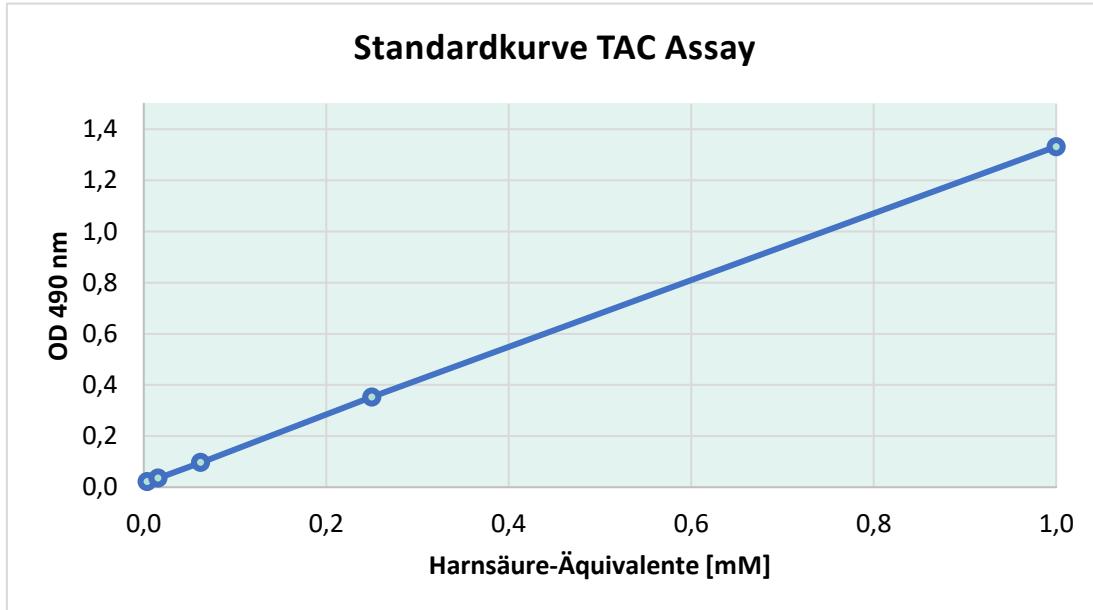


Abbildung 10: Standardkurve für den TAC Assay. Für die Bestimmung der Standardkurve und zur Ermittlung der TAC-Konzentration in den Untersuchungsproben, wurde als Standard Harnsäure in Konzentrationen von 0,0039 – 1mM auf einer Platte aufgetragen. Mittels der Fünf-Punkte-Messung konnte eine Trendlinie bestimmt und die unbekannten TAC-Konzentrationen jeder Teilnehmerprobe als Harnsäureäquivalente in mM ermittelt werden.

Die Konzentration des Analyten wird auf der Standardkurve ermittelt. Diese erhält man, wenn man eine Trendlinie durch die Mittelwerte der im Assay erstellten Standardgeraden zieht. Da die Analytkonzentrationen nach Angaben des TAC-Assayherstellers zwischen 0,0039 und 1,00 mM erwartet wurden, wurde die Standardlösung bis zu diesem unteren Bereich verdünnt. In unserer Studie an gesunden Personen waren Werte zwischen 0,253 mM bis 0,622 mM zu

erwarten und deshalb wurde der optimale Messbereich für die Analyt-Konzentrationen (zwischen 0,0039 und 1,00 mM) in diesen Bereich gelegt.

5.2.1.2 Berechnung der Änderungen von TAC_{Δ} durch die Intervention

Die totale antioxidative Kapazität (TAC engl. *Total Antioxidant Capacity*) wurde jeweils zu Beginn (U1A, U2A und U3A) und am Ende (U1B, U2B und U3B) jeder Einnahmeperiode bei jedem Teilnehmer gemessen. Die TAC-Konzentration wurde über die Standardkurve ermittelt und lag für Genistein (G) zwischen 0,265 – 0,622 mM, Genistein + Naringenin (G + N) zwischen 0,253 – 0,553 mM und Genistein + Quercetin (G + Q) zwischen 0,266 – 0,579 mM. Aus dem Endwert minus den Anfangswert (U1B - U1A; U2B - U2A bzw. U3B – U3A) wurde die Differenz (TAC_{Δ}) berechnet. Die so erhaltenen Differenzen wurden für G, G + N und G + Q in den einzelnen Versuchsperioden zusammengefasst. Da die Zuteilung zu den drei Versuchspräparaten für jede der drei Gruppen unterschiedlich war, konnten wir damit eventuelle zeitliche Störfaktoren sicher ausschließen (siehe Kapitel 4.4 Versuchsprotokoll). Insgesamt wurden 72 Proben (U1A - U3B mit je 12 Teilnehmern) jeweils durch Doppelbestimmung gemessen. Bei 18 Proben war die Abweichung in den Doppelbestimmungen so groß, dass der nicht plausible Wert unberücksichtigt blieb.

Die Ergebnisse der Berechnung von TAC_{Δ} aus dem Endwert minus den Anfangswert der drei Supplementierungsphasen sind graphisch als Boxplot dargestellt (Abbildung 11). Trotz identischer Dosierung und kontrollierter Ernährung zeigen die individuellen TAC_{Δ} in jeder Versuchsperiode eine erhebliche Streuung. Im Vergleich zum Ausgangswert fällt in der Genisteingruppe (Kontrolle) der Median der TAC während der Supplementierung um -0,0051 mM ab, die TAC vermindert sich also während der Supplementierung um diesen Betrag. Etwas größer ist die Abnahme der TAC mit -0,0082 mM unter der Supplementierung mit G + N. In der G + Q-Gruppe ist ein Anstieg der TAC um 0,0111 mM im Median über den Ausgangswert festzustellen. Damit nimmt die TAC im Plasma während der Supplementierung mit Genistein und Quercetin zu. Der obere Whisker in der G-Gruppe mit 0,086 mM und G + Q-Gruppe mit 0,098 mM weisen höhere Werte als in der G + N-Gruppe mit 0,045 mM auf, allerdings sind in der G + N-Gruppe zwei Ausreißer außerhalb der Spannweite zu erkennen (Abbildung 11). Als Ausreißer werden Werte bezeichnet, deren Abstand vom 25 %-Perzentil nach unten bzw. vom 75 %-Perzentil nach oben zwischen dem 1,5-fachen und dem 3-fachen der Boxhöhe liegen. Diese zwei Ausreißer sind den Studienteilnehmern #10 mit 0,097 mM und #7 mit 0,102 mM zugeordnet. Bei der Überprüfung der beiden Ausreißer wurde bei Studienteilnehmer #7 festgestellt, dass er während der in Frage stehenden Supplementierungsperiode U1A einmal die

Einnahme von G + N vergessen hat. Eine Auswirkung auf die Plasmaspiegel des Genistein ist davon nicht zu erwarten. Die unteren Whisker unterscheiden sich in der Länge beim Vergleich der drei Gruppen unwesentlich, sie liegen im Bereich von -0,079 mM (G + Q-Gruppe) bis -0,048 mM (G + N-Gruppe). In der G-Gruppe liegt der untere Whisker bei -0,055 mM und ist kürzer als der obere Whisker, als Hinweis auf die größere Streuung der oberen Werte.

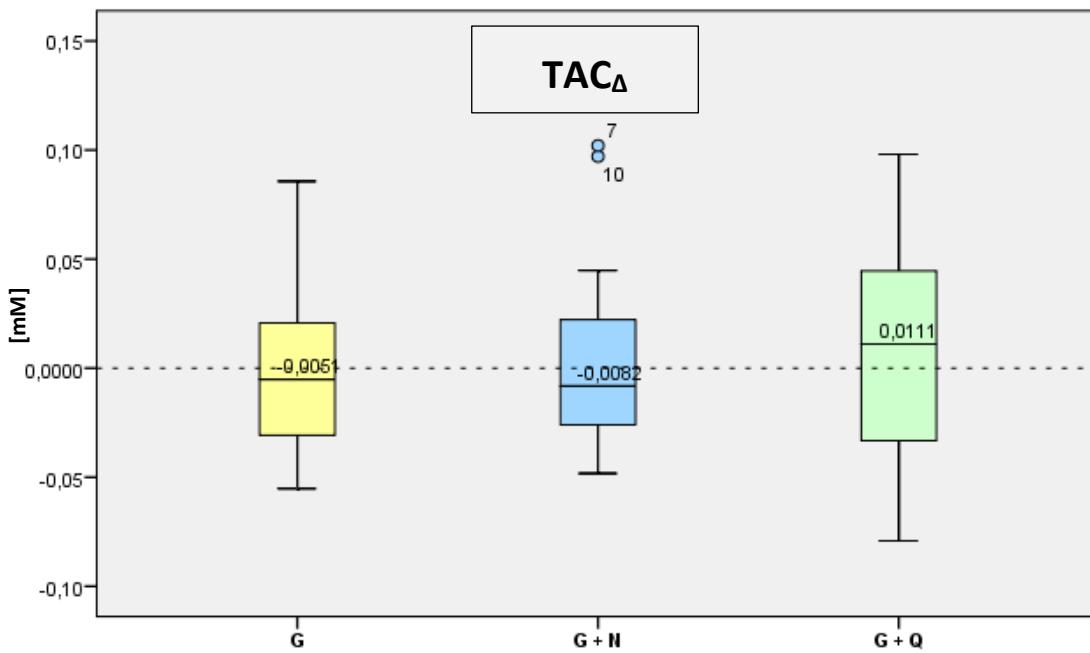


Abbildung 11: Boxplots der Gruppen-Differenzen von TAC (TAC_{Δ}). Die Berechnung des Medians der Differenzen zwischen Endwert minus Anfangswert erfolgte für alle drei Gruppen. Die Boxplots zeigen eine geringe Abnahme der TAC während der Supplementierung mit Genistein (G) im Median um -0,0051, die Verminderung war während der Supplementierung mit Genistein + Naringenin (G + N) etwas geringer (-0,0082 mM allerdings sind auch zwei Ausreißer (#7 mit 0,102 mM und #10 mit 0,097 mM (die beiden blauen Punkte) außerhalb der Spannweite zu erkennen. Die Supplementierung mit Genistein + Quercetin (G + Q) dagegen ließ den Median der Differenzen um 0,0111 ansteigen.

Für die Studienparameter war keine Normalverteilung anzunehmen und damit ist eine Berechnung der Mittelwerte statistisch nicht aussagekräftig. Unter Berücksichtigung des relativ kleinen Teilnehmerkollektivs von 12 Personen und den großen interindividuellen Schwankungen zwischen den ermittelten Ergebnissen, dienen die hier gezeigten Mittelwerte (MW) nur zur deskriptiven Interpretation und sollen die Verbindung zum vorgestellten linear gemischt Modell (LGM) erleichtern. Die Abbildung 12 weist für alle Gruppen positive TAC_{Δ} - Mittelwerte aus und bestätigt somit die vermehrte TAC durch die Supplementierung während der Studie. Hierbei ist die höchste Zunahme in der G + Q-Gruppe (0,008 mM), gefolgt von G + N (0,006 mM) und G (0,001 mM). Die Zunahme in der G und G + N-Gruppe steht mit dem Median im Boxplot im Widerspruch, da diese dort abnehmen.

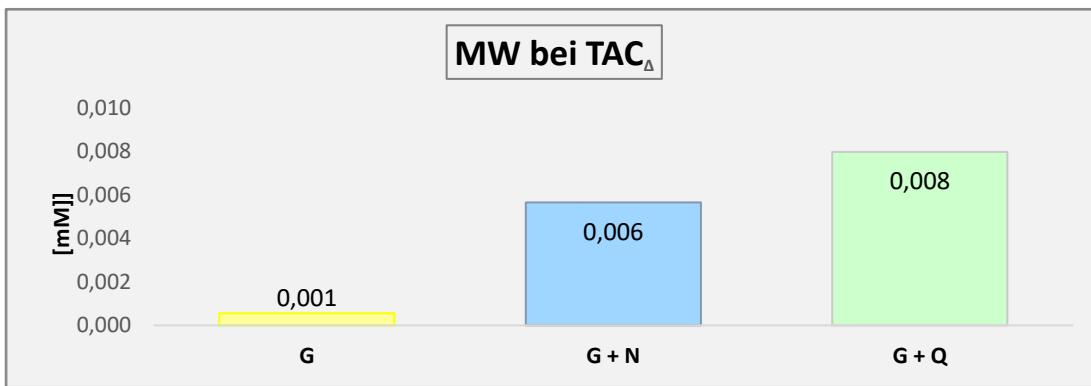


Abbildung 12: MW der Gruppen-Differenzen von TAC (TAC_{Δ}). Die Mittelwerte der TAC_{Δ} sind in allen drei Gruppen positiv. Es kommt somit rechnerisch am Ende der Versuchsperiode im Vergleich zum Beginn in allen Gruppen zu einem Anstieg der TAC. In der G + Q-Gruppe ist die Zunahmen mit 0,008 mM am höchsten, gefolgt von G + N mit 0,006 mM und G mit 0,001 mM. Diese Mittelwerte dienen der deskriptiven Beschreibung und sollen zur Veranschaulichung des linear gemischten Modells (LMM) dienen.

5.2.1.3 LGM bei TAC_{Δ}

Hier soll das Vorgehen beim linear gemischten Modell (LGM) und die Interpretation der Modellkoeffizienten beispielhaft an TAC dargestellt werden, die Berechnungen erfolgen bei allen anderen Versuchsparametern analog. Die Signifikanzen sollten nicht interpretiert werden, da das Hauptziel "Genistein" ist und ausschließlich zur explorativen Auswertung dient. Für die Schätzung fester Parameter wurden die Werte aus dem LGM mit 6 bis 9 Stellen nach dem Komma übernommen, im Text wurden die Werte bei TAC auf 4 bzw. MDA, Genistein und Genistin auf 2 Stellen nach dem Komma begrenzt.

Der geschätzte Effekt betrug in der Referenzkategorie „Genistein“ (G) 0,0006 mM (95 % Konfidenzintervall (KI) [-0,2783 mM; 0,029 mM]) (s. Tabelle 20). Dieser Wert (konstanter Term, Intercept) ist positiv, also größer 0 und bedeutet für die G-Gruppe eine Zunahme der TAC-Konzentration während der Versuchsperiode. In der G + N-Gruppe ist der geschätzte Effekt 0,0053 mM (95 % KI [-0,035 mM; 0,0454 mM]), der resultierende Effekt also (geschätzter Effekt G + N plus geschätzter Effekt Intercept für G) 0,0053 mM + 0,0006 mM = 0,0059 mM und somit größer als in der G-Gruppe. Diese Aussagen stehen scheinbar im Widerspruch zu den im Boxplot dargestellten Ergebnissen, da dort der Median negativ ist. Es gibt durch die erhebliche Streuung der Differenzen von Endwert minus Anfangswert offenbar mehr negative Differenzen, die den Median negativ werden lassen. Die Korrektur durch das Intercept (Addition des geschätzten Effektes für G mit dem geschätzten Effekt für G + N bzw. G + Q) gleicht dies aus, so dass sowohl im LGM wie auch im MW die Differenzen positiv sind (s. Tabelle 20). Die größte Zunahme der TAC-Konzentration stellt man in der G + Q-Gruppe mit dem geschätzten Effekt von 0,0075 mM

(95 % KI [-0,0326 mM; 0,0478 mM]) und einem daraus resultierenden Effekt von 0,0082 mM fest. Der Median wie auch der MW bestätigen die Zunahmen für das LGM-Ergebnis in der G + Q-Gruppe. Diese TAC Δ -Ergebnisse erreichten jedoch nicht das statistische Signifikanzniveau (0,70 – 0,97).

Tabelle 20: LGM bei TAC Δ . Die geschätzten Effekte des LGM's für Genistein sind in der Spalte „Geschätzter Effekt“ abzulesen. Für diesen wird ein 95 % Konfidenzintervall angegeben. Der daraus resultierende Effekt für die jeweilige Gruppe, der aus der Summe des geschätzten Effekts der jeweiligen Gruppe und dem konstanten Term (Intercept) besteht ist, in der Spalte resultierender Effekt berechnet. Die größte Zunahme während der Supplementierung wird in der G + Q-Gruppe erreicht, gefolgt von der G + N-Gruppe während die Zunahme in der G-Gruppe am geringsten ist.

Parameter	Geschätzter Effekt	Konfidenzintervall 95%		Resultierender Effekt ^c (TAC Δ)
		Untergrenze	Obergrenze	
Konstanter Term (Intercept) [mM]	0,000583	-0,027825	0,028991	
[G + N] [mM]	0,00525	-0,034925	0,045425	0,005833
[G + Q] [mM]	0,007583	-0,032592	0,047758	0,008166
[Referenzkategorie = G] ^b [mM]	0			0,000583

a. Abhängige Variable: TAC Δ

b. Dieser redundante Parameter wird auf null gesetzt.

c. Die TAC Δ wurde berechnet durch die Summe von konstantem Term (Intercept) und geschätztem Effekt

5.2.2 MDA Δ

5.2.2.1 Erstellung der Standardkurve für die Bestimmung von MDA

Um die MDA-Konzentration in den Proben zu bestimmen wurden Verdünnungsreihen für MDA-Konzentrationen zwischen 6 und 1500 pmol/ml für die Standardkurve hergestellt (siehe Kapitel 3.6.3.1). Diese Konzentrationen sind in die Abbildung 13 eingezeichnet. Für die Messung gilt, die niedrigste Konzentration von MDA in der Standardreihe hat die höchste optische Dichte (OD). Die OD fällt mit der Höhe der eingesetzten Konzentration des MDA in der Standardkurve ab, wie in der Abbildung 13 dargestellt. Die Genauigkeit der Ablesung des Messwertes ist im flachen Teil der Standardkurve am besten. Deshalb strebt man an, die Standardkurve so zu erstellen, dass die Messwerte der zu untersuchenden Proben in dem flachen Bereich der Standardkurve liegen.

Die MDA-Konzentrationen in den Plasmaproben der Versuchsteilnehmer lagen zwischen 306 und 1472 pmol/ml und damit waren alle Proben im optimalen Messbereich.

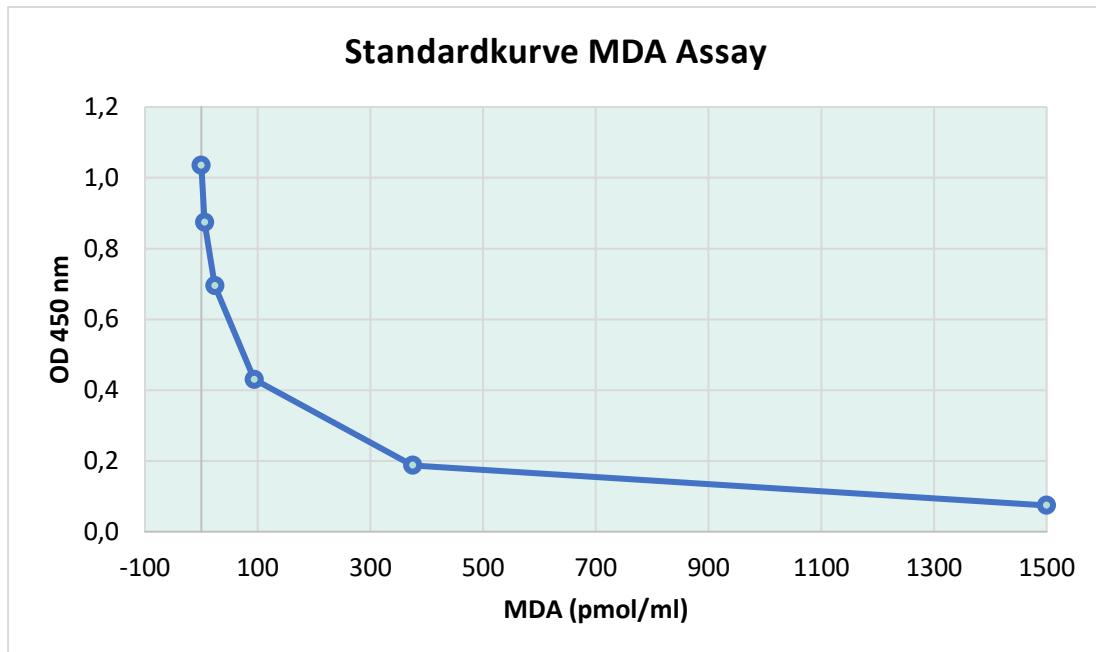


Abbildung 13: Standardkurve für den MDA Assay. Beispiel für eine Standardkurve zur Messung von MDA. Die mit einem Photometer gemessene optische Dichte (OD) nimmt mit zunehmender Konzentration der MDA Addukte ab und ist für einen Messbereich zwischen 6 – 1500 pmol/ml ausgelegt. Die Werte der Teilnehmerproben wurden anhand der Standardkurve quantifiziert.

5.2.2.2 Berechnung der Änderungen von MDA_{Δ} durch die Intervention

Die MDA-Konzentration innerhalb der Gruppen wurden über die Standardkurve ermittelt und lag in der G-Gruppe zwischen 543 - 1465 pmol/ml, G + N-Gruppe zwischen 306 – 1473 pmol/ml und G + Q-Gruppe zwischen 443 – 1594 pmol/ml. In der Abbildung 14 ist die Boxplotdarstellung für die Differenzen (Ende der Einnahmeperiode minus Beginn der Einnahmeperiode) der jeweiligen Gruppen für MDA aufgezeichnet. Die MDA-Konzentration nimmt in der Kontrollgruppe G um -36,86 pmol/ml gegenüber dem Ausgangswert ab. Am Ende der Versuchsperiode der G + N-Gruppe ist der Median der MDA-Konzentration um 3,33 pmol/ml und in der G + Q-Gruppe um 63,56 pmol/ml größer als zu Beginn, was auf einen höheren Anfall von Sauerstoffradikalen und Zunahme der Lipidperoxidation hindeutet.

Alle drei Boxplots weisen eine unterschiedliche Streuung der Werte auf. Der untere Whisker ist in der G-Gruppe mit -518,9 pmol/ml und in der G + N-Gruppe mit -364,44 pmol/ml niedriger als in der G + Q-Gruppe mit -133,98 pmol/ml. Der Boxplot der G + Q-Gruppe ist kompakter als die anderen beiden Gruppen, wobei der Wert des Studienteilnehmers (#6) mit 487,62 pmol/ml weit außerhalb des 1,5-fachen Interquartilenabstands liegt (s. Abbildung 14). Der Studienteilnehmer

#6 gab an, dass er in der U2A-Phase einmal die doppelte Menge an G+Q eingenommen hat. Da sich die Werte bei einer Kontrollmessung bestätigten und auch die Doppelbestimmung keinen Hinweis auf einen methodischen Fehler erkennen ließ, wurde der Ausreißer in die Berechnung des Medians einbezogen. Die einzige erkennbare Besonderheit war ein Halbmarathon, an dem der Studienteilnehmer #5 zwei Tage sowie Studienteilnehmer #1, #2 und #12 drei Tage vor der Messung teilgenommen hatten. Der obere Whisker der Gruppe G ist mit 169 pmol/ml höher als der in der Gruppe G + N mit 142 pmol/ml, die Werte haben eine geringe Streuung.

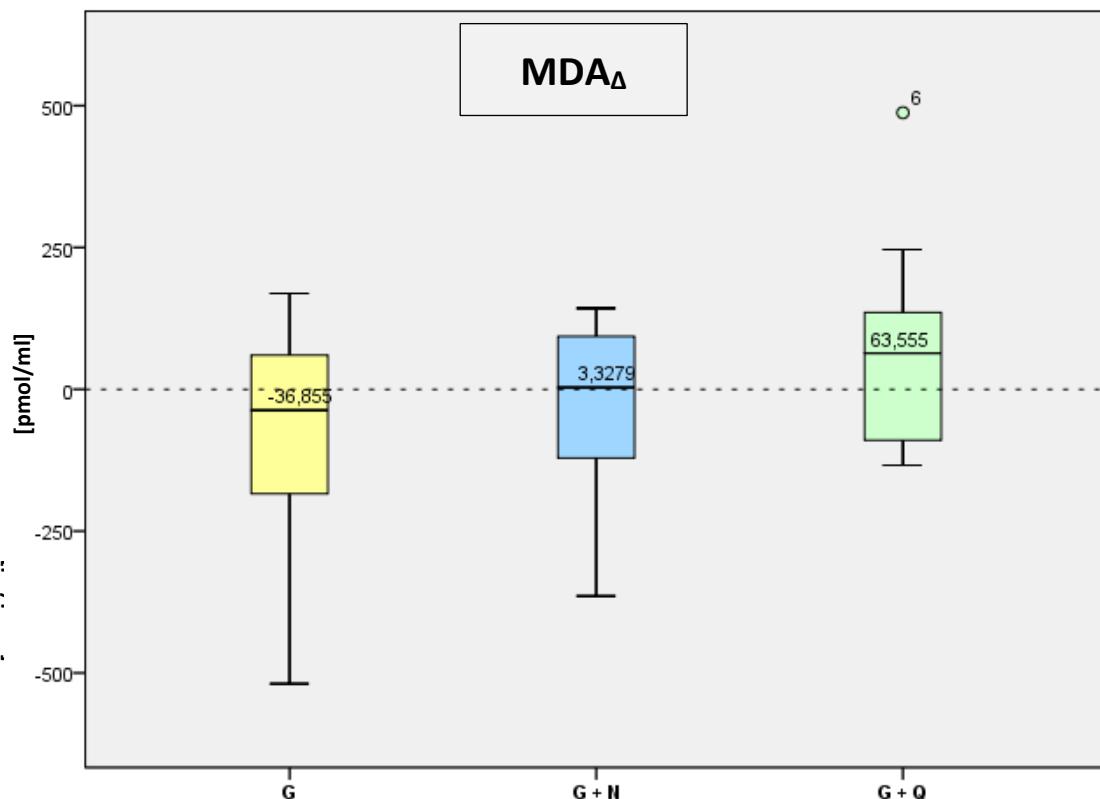


Abbildung 14: Boxplots für die Gruppen-Differenzen des MDA (MDA_{Δ}). Die MDA_{Δ} wurde aus dem MDA-Endwert minus MDA-Anfangswert zu jeder Versuchsperiode errechnet und in der jeweiligen Gruppe G, G + N bzw. G + Q zusammengefasst. Der Median nimmt in der G-Gruppe um -36,86 pmol/ml ab. In den Gruppen G + N beobachtet man eine Zunahme um 3,33 pmol/ml und in der G + Q Gruppe um 63,56 pmol/ml. Zusätzlich ist in der G + Q-Gruppe ist ein Aureißen bei Studienteilnehmer #6 mit 487,62 pmol/ml außerhalb der Spannweite zu erkennen.

Die MW der MDA_{Δ} unterstützen in der G und G + Q-Gruppe aber nicht in der G + N-Gruppe die im Boxplot erkennbaren Ergebnisse (Abbildung 15). Der Mittelwert für G + N nimmt in dieser Darstellung im Vergleich zum Boxplot ab. Diese MW dienen nur zur Veranschaulichung des LGM, sie bestätigen die im LGM dargestellten Tendenzen.

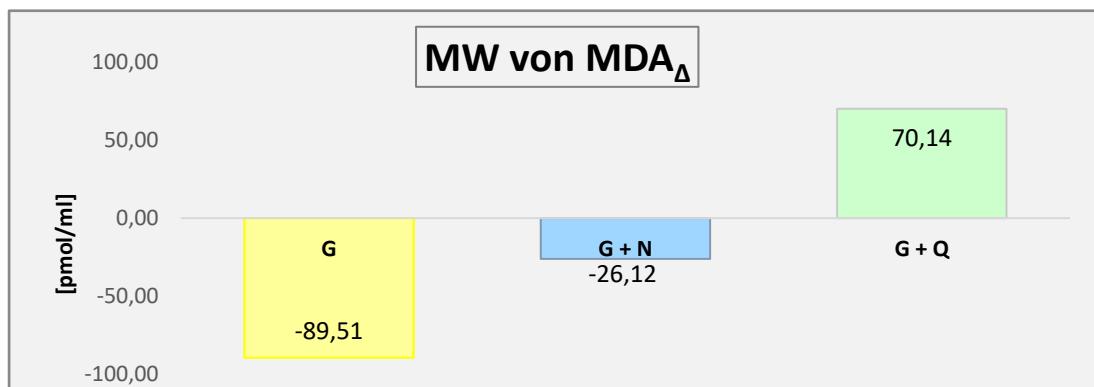


Abbildung 15: MW der Gruppen-Differenzen von MDA (MDA Δ). Die Abnahme der MDA-MW im Plasma am Ende der Versuchsperiode im Vergleich zum Beginn (MDA Δ) ist in der G und G + N-Gruppe festzustellen. In der G + Q-Gruppe nimmt der MW von MDA Δ zu und damit auch die Lipidperoxidation.

5.2.2.3 LGM bei MDA Δ

Auch für die statistische Auswertung der gemessenen Unterschiede zwischen Beginn und Ende jeder Versuchsperiode wurde für MDA Δ das LGM gewählt. Der geschätzte Effekt beträgt im LGM für MDA Δ in der Kontrollgruppe mit G (konstanter Term, Intercept) -89,51 pmol/ml (95 % KI [-194,57 pmol/ml; 15,55 pmol/ml]) (s. Tabelle 21).

Tabelle 21: LGM bei MDA Δ . Wie für die TAC ist auch für MDA die höchste Zunahme ist in der G + Q-Kombination zu sehen, gefolgt von den werten unter der G + N-Kombination und die geringste Änderung war in der G-Gruppe festzustellen.

Schätzungen fester Parameter ^a				
Parameter	Geschätzter Effekt	Konfidenzintervall 95%		Resultierender Effekt ^c (TAC Δ)
		Untergrenze	Obergrenze	
Konstanter Term (Intercept) [mM]	-89,507292	-194,565036	15,550452	
[G + N] [mM]	63,385998	-85,188088	211,960085	-26,1212936
[G + Q] [mM]	159,64438	11,070300	308,218473	70,137094
[Referenz = G] ^b [pmol/ml]	0			-89,50729203

a. Abhängige Variable: MDA Δ

b. Dieser redundante Parameter wird auf null gesetzt.

c. Die TAC Δ wurde berechnet durch die Summe von konstantem Term (Intercept) und geschätztem Effekt

Die Konzentration des MDA nimmt somit am Ende der Supplementierung mit Genistein im Vergleich zum Beginn der Versuchsperiode ab. Der Unterschied zur G-Gruppe (geschätzter Effekt) beträgt für MDA Δ in der G + N-Gruppe 63,39 pmol/ml (95 % KI [-85,19 pmol/ml; 211,96 pmol/ml]) pmol/ml, woraus sich als geschätzter resultierender Effekt ein um -26,12 pmol/ml geringerer Anfall von MDA, also eine Abnahme der ROS ergibt. Dieses Ergebnis ist im

Widerspruch zu dem im Boxplot dargestellten Median, da dieser bei der Berechnung zunimmt. Eine Zunahme der MDA-Konzentration wurde in der G + Q-Gruppe um 159,64 pmol/ml (95 % KI [11,07 pmol/ml; 308,22 pmol/ml]) gemessen, damit war der geschätzte resultierende Effekt 70,14 pmol/ml. Dies bedeutet einen höheren Anfall von Sauerstoffradikalen und eine Zunahme des oxidativen Stresses im Vergleich zur Kontrollgruppe G. Das statistische Signifikanzniveau wurde hierbei nicht erreicht (0,03 – 0,4).

5.2.3 Genisteinbestimmung mittels HPLC

5.2.3.1 Standardkurve und Interassay-Variation für die Genisteinbestimmung

Die Bestimmung der Genisteinkonzentration in den Proben erfolgte vor und nach der Supplementierung mit den Studienpräparaten. Hierzu wurde eine Standardkurve für Genistein für Konzentrationen zwischen 5 – 20 µM erstellt. Für die Genauigkeit des linearen Verlaufs wurde das Bestimmtheitsmaß R^2 mit 0,9998 angegeben (s. Abbildung 16).

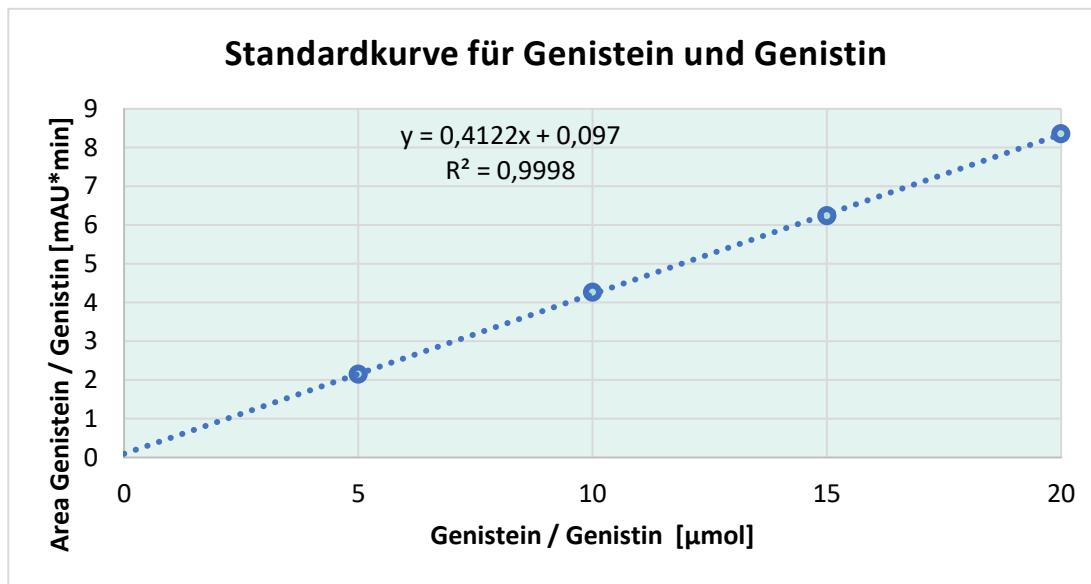


Abbildung 16: Standardkurve für die Messung des Genistein (Aglykon) und Genistins (Glykosid) mittels HPLC. Für die Erstellung der Standardkurve wurden Konzentrationen im Bereich von 5 – 20 µM verwendet. Mit dieser Standardkurve wurden dann die Genistein- / Genistinkonzentrationen in den Teilnehmerproben ermittelt.

Der Interassay - Variationskoeffizient wurde bei der Präzisionsprüfung mit 1,24 % festgestellt (s. Tabelle 22).

Tabelle 22: Kalibrationskontrolle (10 µM Genistein-Standard)

Datum	Area IS (interner Standard)	Area Genistein
05.02.2016	1,438	4,263
05.02.2016	1,453	4,291
06.02.2016	1,451	4,301
06.02.2016	1,435	4,260
09.02.2016	1,435	4,159
09.02.2016	1,445	4,293
Mean (n=6)		4,261
SD		0,053
%CV		1,24

5.2.3.2 Berechnung der Konzentrationsänderungen von Genistein (Aglykon) durch die Intervention

Die Ermittlung der Genistein-Konzentration (Aglykon, nicht-glykosiert) erfolgte über die erstellte Standardkurve und lag unter Supplementierung mit G zwischen 1,18 – 1,66 µmol/l, G + N zwischen 1,05 – 1,6 µmol/l und G + Q zwischen 1,12 – 1,9 µmol/l. Auch für das Genistein wurden die Differenzen der End- und Anfangswerte (Ende der Einnahmeperiode minus Beginn der Einnahmeperiode) in jeder Gruppe berechnet (Δ Genistein) und dann die zeitlich versetzten Einnahmeperioden für jedes der drei Versuchspräparate zusammengefasst. Diese sind in der Abbildung 17 dargestellt.

Die höchste mediane Zunahme des Genistein um 0,06 µmol/l war unter der Supplementierung mit G zu beobachten. Verglichen mit dieser Kontrollgruppe war die Differenz von End- und Anfangswert des Genistein in der G + N-Gruppe mit -0,07 µmol/l niedriger. Dies bedeutet, dass Naringenin das Genistein im Vollblut nicht erhöht. Dagegen kommt es während der Supplementierung mit G + Q zu einer Steigerung des Genistein im Vollblut um 0,04 µmol/l. Dies zeigt, dass die Wirkung der Co-Medikation mit Quercetin sich von der Wirkung des Naringenin unterscheidet und damit ist gezeigt, dass die Flavonoide sich in der metabolischen Interaktion unterschiedlich verhalten. Die durch die Whisker angezeigte Schwankungsbreite der Werte des Genistein stellt sich in allen drei Behandlungsgruppen ähnlich dar.

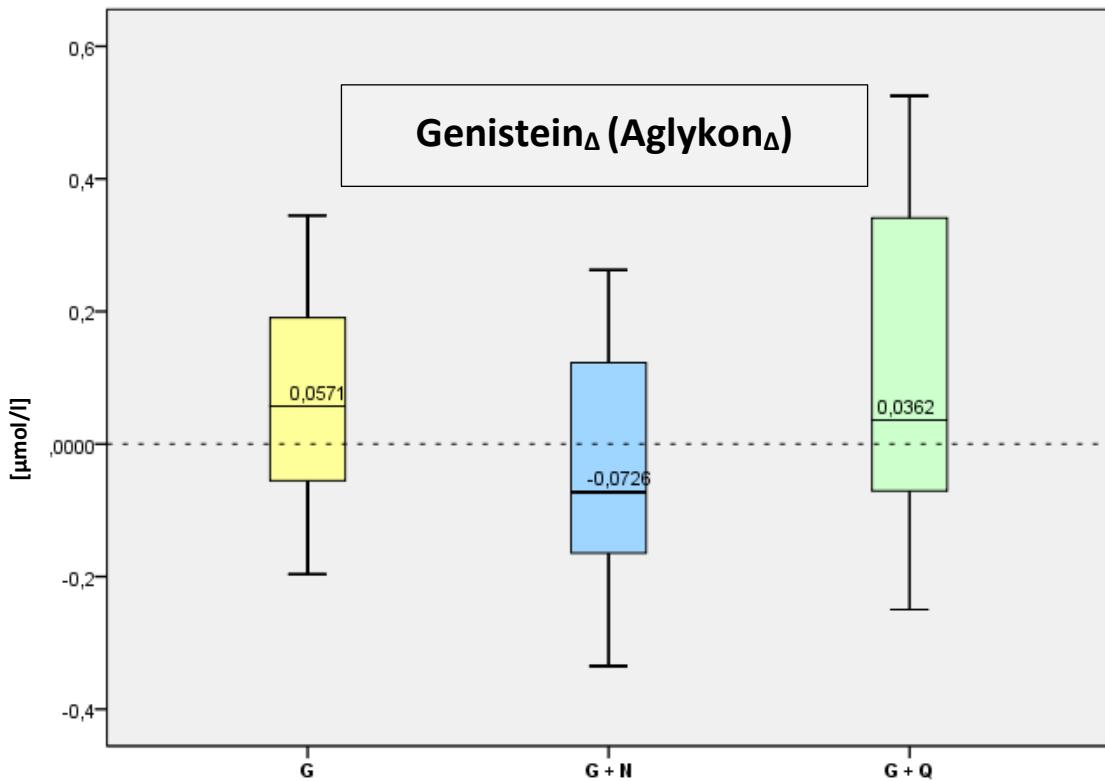


Abbildung 17: Boxplots für die Gruppen-Differenzen (Genistein_Δ). Die Differenz von End- minus Anfangswert wurde berechnet und als Genistein_Δ bezeichnet. Die während der drei Versuchsperioden ermittelten Werte für Genistein_Δ wurden dann für die jeweiligen Gruppe zusammengefasst. Genistein_Δ war in der G-Gruppe mit 0,0571 μmol/l positiv und wies einen Anstieg des Genistein durch die Supplementierung aus, der auch in der G + Q-Gruppe mit 0,0362 μmol/l zu beobachten war. Der Median in der G + N-Gruppe ist um -0,0726 μmol/l niedriger als zu Beginn dieser Versuchperiode, es kommt also zu einer Abnahme des Genistein-Aglykons im Plasma am Ende dieser Versuchperiode.

Die Mittelwerte des Genistein der zwölf Teilnehmer liegen vor der Supplementierung mit G bei 1,3 μmol/l, vor G + N bei 1,35 μmol/l und vor G + Q bei 1,38 μmol/l im Vergleichbaren Bereich. Nach der Supplementierung mit G auf steigt der MW des Genistein auf 1,37 μmol/l und nach G + Q auf 1,49 μmol/l. Die Einnahme von G + N zeigt eine Abnahme des MW auf 1,31 μmol/l. Die jeweiligen Mittelwerte der Differenzen zeigen die gleichen Tendenzen. Die Abbildung 18 zeigt den größten Konzentrationsanstieg des Genistein zwischen Anfangs- und Endwert nach der Supplementierung mit G + Q um 0,11 μmol/l und G um 0,07 μmol/l. Die Einnahme von G + N führt zu einer Abnahme der Genisteinkonzentration um -0,04 μmol/l (s. Abbildung 18).

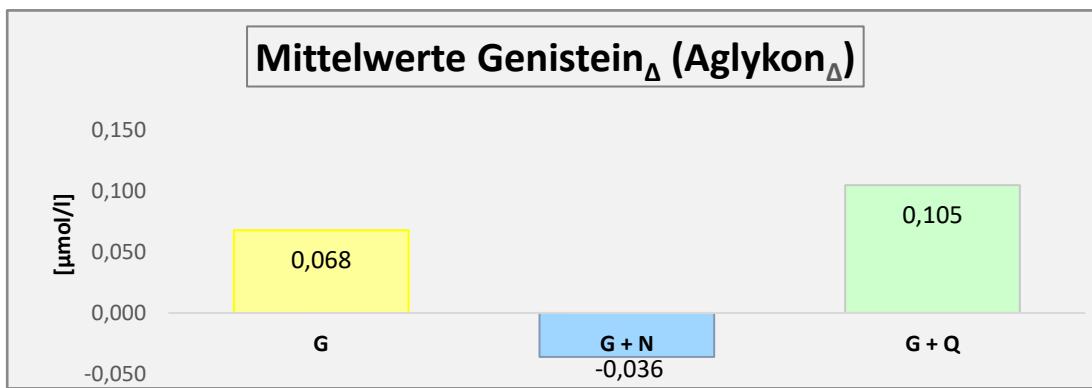


Abbildung 18: Mittelwerte der Gruppen-Differenzen von Genistein (Genistein Δ). Eine Zunahme der Genistein Δ -Mittelwerte im EDTA-Vollblut am Ende der Versuchsperiode im Vergleich zu Beginn ist in der G- (0,07 $\mu\text{mol/l}$) und G + Q-Gruppe (0,11 $\mu\text{mol/l}$) festzustellen. In der G + N-Gruppe (-0,04 $\mu\text{mol/l}$) nimmt der Mittelwert ab. Somit werden die besten Resultate durch die Kombination von Genistein mit Quercetin erzielt. Diese Mittelwerte unterstützen die jeweiligen Mediane und veranschaulichen die Tendenzen im LGM.

5.2.3.3 LGM bei Genistein Δ

Der geschätzte Effekt für den konstanten Term (Intercept) in der G-Kontrollgruppe beträgt für das Genistein Δ im LGM 0,069 $\mu\text{mol/l}$ (95 % KI [-0,06 $\mu\text{mol/l}$; 0,2 $\mu\text{mol/l}$]) (Tabelle 23).

Dieser Wert ist positiv und zeigt somit eine Zunahme des Genistein am Ende der Supplementierung mit G im Vergleich zu Beginn. Für die Berechnung des geschätzten resultierenden Effektes, wurden der geschätzte Effekt und das zugehörige Intercept (konstanter Term der G-Kontrollgruppe) addiert. In der G + N-Gruppe beträgt der geschätzte Effekt -0,1 $\mu\text{mol/l}$ (95 % KI [-0,27 $\mu\text{mol/l}$; 0,07 $\mu\text{mol/l}$]) und signalisiert durch den negativen Wert eine Abnahme des Genistein gegenüber dem beobachteten Effekt in der G-Kontrollgruppe. Hieraus errechnet sich für den geschätzten resultierenden Effekt in der G + N-Gruppe eine Abnahme der Konzentration um -0,04 $\mu\text{mol/l}$ im Vergleich zum Beginn dieser Versuchsperiode (Kapitel 4.4 Versuchsprotokoll)

4.4 Versuchsprotokoll

Jeder Versuchsteilnehmer durchlief vollständig das in Tabelle 8 beschriebene Versuchsprotokoll. Über sieben Tage erhielten die drei Gruppen von jeweils vier Teilnehmern eines der drei Versuchspräparate (A, B, C), gefolgt von einer wash-out Periode von sieben Tagen. Dann wechselten die Gruppen in unterschiedlicher Reihenfolge zu den anderen beiden Versuchspräparaten (s. Tabelle 8). Somit war jeder Teilnehmer seine eigene Kontrolle. Da die Reihenfolge der Zuteilung für jeweils vier Teilnehmer unterschiedlich war, können zeitliche

Tabelle 23: LGM bei Genistein Δ . Die G + Q-Kombination bewirkt die größte Zunahme, gefolgt von G-Gruppe. Unter der G + N-Kombination verminderte sich die Konzentration des Genistein im Vollblut.

Parameter	Geschätzter Effekt	Schätzungen fester Parameter ^a			Resultierender Effekt ^c (TAC Δ)	
		Konfidenzintervall 95%		Untergrenze		
		Obergrenze				
Konstanter Term (Intercept) [mM]	0,068018493	-0,055404	0,191441			
[G + N] [mM]	-0,104154194	-0,274285	0,065977	-0,036135701		
[G + Q] [mM]	0,037066644	-0,133064	0,207198	0,105085		
[Referenz = G] ^b [pmol/ml]	0				0,068018493	

a. Abhängige Variable: Genistein Δ

b. Dieser redundante Parameter wird auf null gesetzt.

c. Die Genistein Δ wurde berechnet durch die Summe von konstantem Term (Intercept) und geschätztem Effekt

Effekte (z. B. Außentemperatur) der Zuteilung ausgeschlossen werden.

, Tabelle 8). Der geschätzte Effekt ist in der G + Q- Gruppe bei 0,04 µmol/l (95 % KI [-0,13 µmol/l; 0,21 µmol/l]) und zeigt eine Zunahme des Genistein unter der zusätzlichen Supplementierung mit Quercetin beim Vergleich mit der G-Kontrollgruppe. Der geschätzte resultierende Effekt in der G + Q-Gruppe erreicht für das Genistein Δ mit 0,11 µmol/l die größte Zunahme. Alle drei Gruppen bestätigen die Tendenzen der Mediane im Boxplot. Keines der Ergebnisse erreichte das statistische Signifikanzniveau (0,22 – 0,66).

5.2.3.4 Berechnung der Konzentrationsänderungen von Genistin (Genistin-Glykosid) durch die Intervention

Die jeweiligen Konzentrationen für Genistin (Genistin-Glykosid) in den Teilnehmerproben wurden ebenfalls über die Standardkurve ermittelt und lagen in der Gruppe G zwischen 1,33 – 8,52 µmol/l, in der Gruppe G + N zwischen 1,63 – 5,73 µmol/l und in der Gruppe G + Q zwischen 1,52 – 8,53 µmol/l. Für die Ermittlung der Genistin-Differenzen (Genistin Δ) in den jeweiligen Gruppen wurden die Anfangswerte von den Endwerten abgezogen. Alle drei Gruppendifferenzen zeigen einen Konzentrationsanstieg des Genistin am Ende der jeweiligen Versuchsperiode im Vergleich zu Beginn (Abbildung 19). Der mediane höchste Wert des Genistin Δ wird während der Supplementierung in der G + Q-Gruppe mit 2,56 µmol/l erreicht. Dieser Wert ist deutlich höher als der in der G-Gruppe mit 1,9 µmol/l und in der G + N-Gruppe mit 1,89 µmol/l. Diese Tendenzen der Differenzen werden durch die Schätzung im LGM (s. Tabelle 24Tabelle) bestätigt. Zu berücksichtigen ist die Größe der Schwankungsbreite in der G-

Gruppe. Die gezeigte Streuung des oberen Whiskers in der G + N-Gruppe mit 3,9 µmol/l und in der G + Q-Gruppe mit 4,07 µmol/l unterscheidet sich unwesentlich. Allerdings verlängert sich

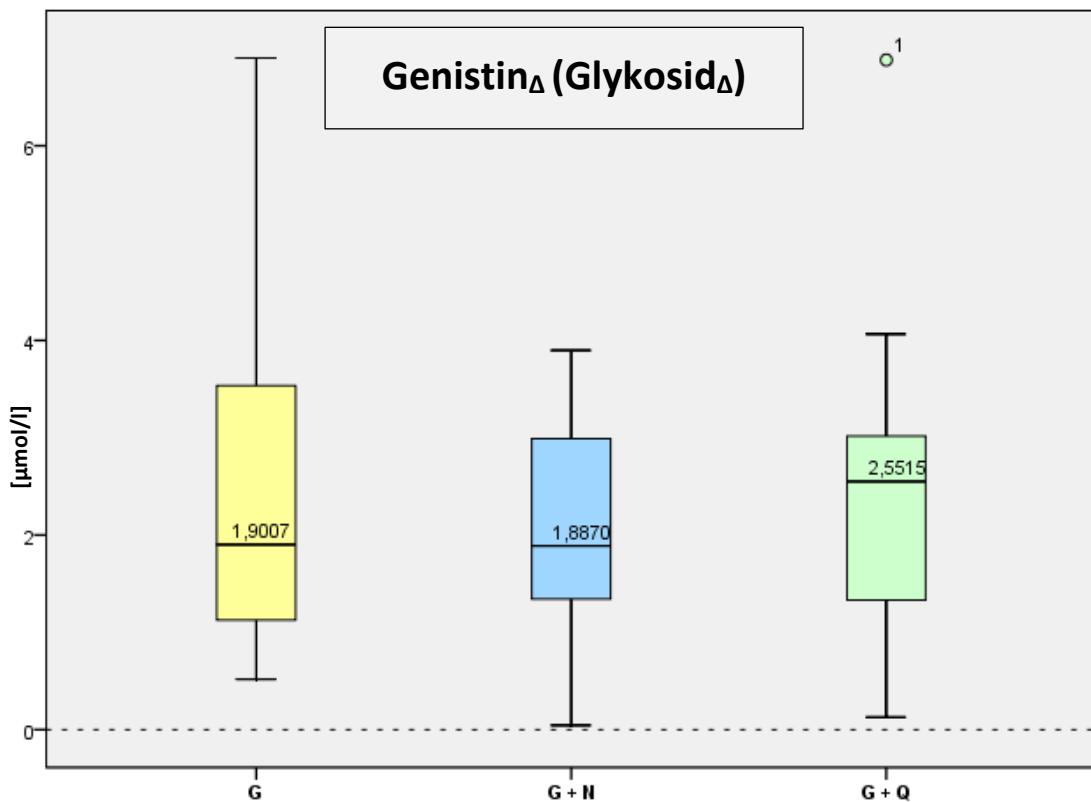


Abbildung 19: Boxplots für die Gruppen-Differenzen von Genistin (Genistin Δ). Für die Berechnung des Genistin Δ wurde der Anfangswert vom Endwert abgezogen. Die jeweiligen Differenzen sind zusammengefasst in den Gruppen zu sehen. Die Auswertung des Genistin Δ zeigt in allen drei Gruppen einen Anstieg der Konzentrationen am Ende der Versuchsreihe im Vergleich zu Beginn an. Die G + Q-Gruppe zeigt den höchsten medianen Unterschied (2,56 µmol/l) zwischen dem Anfangs- und Endwert, gefolgt von der G-Gruppe mit 1,9 µmol/l und der G + N-Gruppe mit 1,89 µmol/l.

der Whisker in der G-Gruppe mit dem Wert 6,9 µmol/l und in der G + Q-Gruppe durch den Ausreißer von 6,89 µmol/l bei jeweils einer Versuchsperson nach oben. Diese beiden Werte gehören der Studienteilnehmerin #1, die einen Halbmarathon gelaufen ist. Die unteren Whisker variieren weniger als die oberen Whisker und liegen im Bereich von 0,04 µmol/l bei G + N-Gruppe, gefolgt von G + Q-Gruppe mit 0,13 µmol/l und G-Gruppe 0,52 µmol/l.

Die Genistin-Mittelwerte aus den Rohdaten aller Teilnehmer liegen vor bzw. nach der Einnahme von G bei 1,65 und 4,1 µmol/l, von G + N bei 1,82 und 3,9 µmol/l und von G + Q bei 1,83 und 4,31 µmol/l und steigen somit in allen drei Gruppen durch die Supplementierung an. Ebenso zeigt sich eine Zunahme des MW für Genistin Δ durch die Einnahme von G + Q um 2,48 µmol/l, gefolgt von G um 2,41 µmol/l, und G + N um 2,08 µmol/l am Ende der Studie im Vergleich zu

Beginn (Abbildung 20). Diese Ergebnisse unterstützen die jeweiligen Mediane im Boxplot sowie die Tendenzen des geschätzten und resultierenden Effektes im LMM.

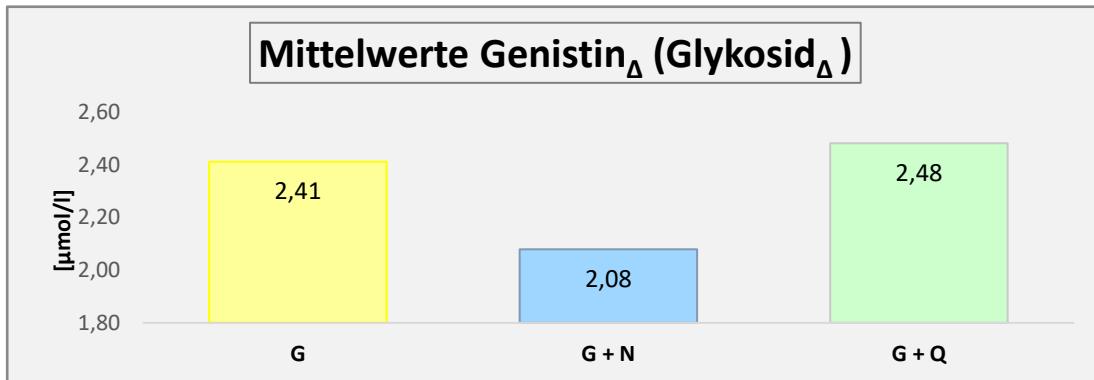


Abbildung 20: Mittelwerte der Gruppen-Differenzen von Genistin (Genistin_Δ). Eine Zunahme der Genistein $_\Delta$ -Mittelwerte im EDTA-Vollblut am Ende der Versuchsperiode im Vergleich zu Beginn ist in der allen drei Gruppen festzustellen. Auch hier resultiert der größte Anstieg durch die Supplementierung von Genistein + Quercetin (2,48 $\mu\text{mol/l}$), gefolgt von G (2,41 $\mu\text{mol/l}$) und G + N (2,08 $\mu\text{mol/l}$). Diese Mittelwerte unterstützen die jeweiligen Mediane und veranschaulichen die Tendenzen im linear gemischten Modell.

5.2.3.5 LGM bei Genistin_Δ

Der geschätzte Effekt für das Genistin_Δ im LGM beträgt in der Referenzkategorie „G“ (Intercept) 2,41 $\mu\text{mol/l}$ (95 % KI [1,43 $\mu\text{mol/l}$; 3,4 $\mu\text{mol/l}$]). Da diese Differenz zwischen den Anfangs- und Endwert positiv ist, beweist diese einen Anstieg des Genistin durch die Supplementierung mit 3 x 100 mg Genistein pro Tag. Der resultierende Effekt ist am Ende der Supplementierung mit G + Q mit 2,48 $\mu\text{mol/l}$ am größten (s. Tabelle). Er übertrifft den Intercept um 0,07 $\mu\text{mol/l}$ (95 % KI [-0,68; 0,83]) und beweist eine Erhöhung des Genistin durch die Kombination G + Q. Dagegen ist der geschätzte Effekt durch die Supplementierung mit G + N um -0,33 $\mu\text{mol/l}$ (95 % KI [-1,09 $\mu\text{mol/l}$; 0,42 $\mu\text{mol/l}$]) kleiner als der Intercept. Damit beträgt die Differenz zwischen Anfangs- und Endwert des Genistin unter der Supplementierung mit der Kombination G + N nur 2,08 $\mu\text{mol/l}$ (resultierender Effekt). Somit ist die Kombination G + N weniger erfolgreich, die Spiegel des Genistin anzuheben, als die Supplementierung mit Genistein allein. Die jeweiligen Tendenzen bestätigen die in den Boxplots dargestellten Mediane und werden von den ermittelten MW-en unterstützt. Diese Werte konnten das statistische Signifikanzniveau nicht erreichen (0 – 0,85).

Tabelle 24: LGM bei Genistin Δ . Die G + Q-Kombination hat auch hier die höchste Zunahme, gefolgt von G-Gruppe und die geringste Zunahme findet sich während der der G + N-Kombination.

Schätzungen fester Parameter ^a				
Parameter	Geschätzter Effekt	Konfidenzintervall 95%		Resultierender Effekt ^c (TAC Δ)
		Untergrenze	Obergrenze	
Konstanter Term (Intercept) [mM]	2,411865999	1,427349	3,396383	
[G + N] [mM]	-0,332607076	-1,087574	0,422359	2,079258923
[G + Q] [mM]	0,070104488	-0,684862	0,825071	2,481970
[Referenz = G] ^b [pmol/ml]	0			2,411865999

a. Abhängige Variable: Genistin Δ

b. Dieser redundante Parameter wird auf null gesetzt.

c. Die Genistin Δ wurde berechnet durch die Summe von konstantem Term (Intercept) und geschätztem Effekt

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Kombination Genistein und Quercetin (G + Q) in der Lage ist, die Konzentration des Genistein im Blut anzuheben, während dies für die Supplementierung mit Genistein und Naringenin (G + N) nicht im gleichen Maß zutrifft. Die Erhöhung der Blutkonzentration von Genistein ist vor allem auf eine Zunahme des Genistins (Genistein-Glykosid) zurückzuführen, während das Genistein (Aglykon) nur im linear gemischten Modell erhöht erscheint. Mit der Zunahme der Genisteinkonzentration unter der Supplementierung mit Genistein und Quercetin kommt es ebenfalls zu einer Erhöhung der TAC im Plasma, allerdings führt diese Kombination auch zu einer Erhöhung von MDA, was einen höheren Anfall von Sauerstoffradikalen bedeutet.

5.2.4 Änderungen des Mikrobioms durch die Intervention

Die Zusammensetzung des Mikrobioms wurde vor und nach der Studie untersucht. Durch die Auswertung der 16S rRNA gene sequencing kann festgestellt werden, dass in unserem Versuch durch die Intervention mit Supplementen die darmständigen Bakterien unverändert bleiben und es zu keinem signifikanten Unterschied (p-Value: 0,998) zwischen vor und nach der Studie kommt (s. Abbildung 21).

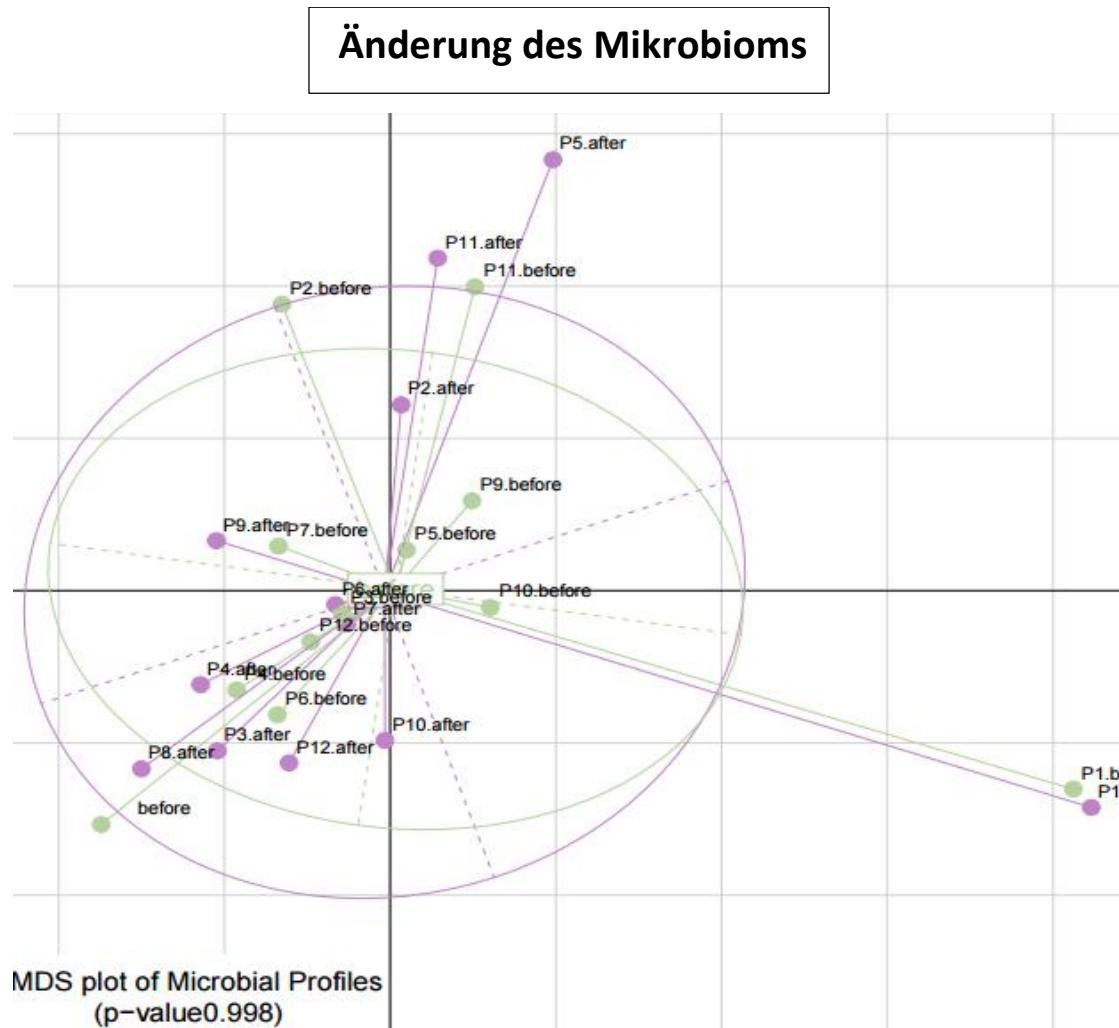


Abbildung 21: Darstellung des Mikrobioms durch die Intervention. Die Darstellung der Mikrobiomprofile (before = vor der Studie zum Zeitpunkt U1A; after = nach der Studie zum Zeitpunkt U3B) zeigt, dass die Intervention mit G, G + N bzw. G + Q keinen messbaren Einfluss auf die darmständigen Bakterien (p-Value: 0,998) hat und damit keine Änderung des Mikrobioms verursacht.

Die mikrobielle Vielfalt / Diversität wird unter dem Begriff „Richness“ zusammengefasst. Richness zählt die Anzahl der verschiedenen Kombinationen von taxonomischen Spezies, den sog. OTU's (operational taxonomic unit) zusammen. Je mehr verschiedene Keime und damit ausgeprägte Diversität, desto günstiger wird die Zusammensetzung des Mikrobioms beurteilt.

Im Vergleich der Richness innerhalb des Teilnehmerkollektivs fällt die Teilnehmerin #1 als einzige mit 162 (vor der Studie) und 168 (nach der Studie) OTU's auf (s. Abbildung 22). Die Konzentrationen ihrer OTU's waren relativ gering, d.h. dass sie im Darm eine sehr diverse mikrobielle Zusammensetzung hat, aber alle Spezies nur in geringer Anzahl vorhanden sind. Die Daten können wegen der komplexen und aufwendigen Darstellung im Ergebnisteil nicht gezeigt werden. Die niedrigste Diversität ist bei Teilnehmer #8 mit 80 (vor der Studie) und 89 (nach der Studie) OTU's festzustellen. Alle anderen Teilnehmer waren in einem mittleren OTU-Bereich. Die Anstiege bzw. Abnahmen der OTU's aller Teilnehmer während des Versuchs ist nicht signifikant.

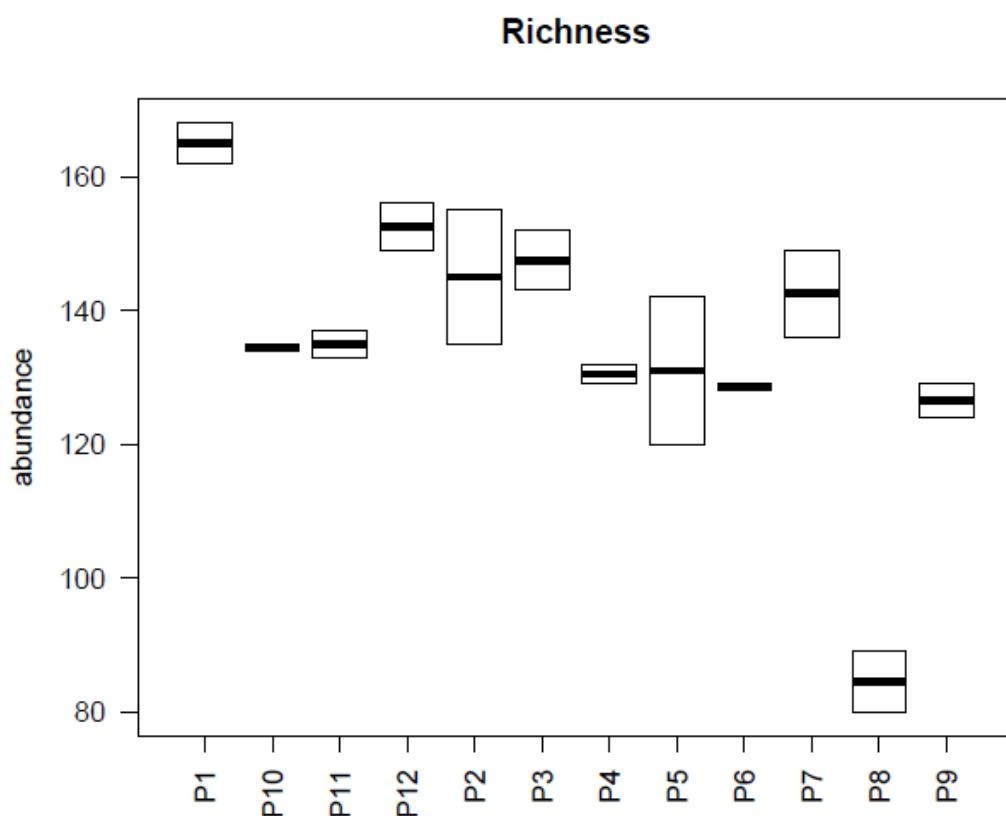


Abbildung 22: Darstellung der Richness des Mikrobioms durch die Intervention. Richness zeigt die Summe aller taxonomisch ähnlichen Gruppen, also der OTU's an. Der Teilnehmer #8 hat die wenigsten und die Teilnehmerin #1 die meisten OTU's. Die restlichen Teilnehmer sind im mittleren OTU-Bereich. Die Änderungen der Zu- bzw. Abnahmen der OTU's ist nicht statistisch signifikant.

6 Diskussion

Epidemiologische Studien legen nahe, dass Flavonoide eine entzündungshemmende Wirkung haben und gegen entzündliche Erkrankungen schützen können (Pérez-Cano & Castell, 2016; Gonzalez et al., 2011; Serafini et al., 2010; Duthie, 1999). Die Wirkung der Flavonoide wird auf ihre antioxidativen Eigenschaften zurückgeführt, einschließlich ihrer Fähigkeit Superoxidanionen und Hydroxylradikale zu entfernen und die Lipidperoxidation zu inhibieren (Boadi et al., 2005, 2003). Meine Versuche beziehen sich auf die Änderung der totalen antioxidativen Kapazität im Plasma durch Kombination von antioxidativ wirksamen Flavonoiden. Im Vergleich zu den neueren Berichten in der Literatur fokussiert sich die Diskussion zunächst auf die totale antioxidative Kapazität (TAC) unter den Versuchsbedingungen und den Einfluss von Geschlecht, Ernährung und körperlicher Aktivität auf die TAC. Darauf folgt die Wirkung verschiedener Flavonoide auf die Lipidperoxidation, die Bedeutung der Mikrobiota für den Stoffwechsel des Genistein und die Erhöhung der Genisteinkonzentration im EDTA-Vollblut.

6.1 Totale antioxidative Kapazität (TAC)

Flavonoide wie Genistein, Quercetin und Naringenin wurden in den letzten Jahren als wichtige Antioxidanten erkannt und sind immer noch ein Gegenstand der aktuellen Forschung. Flavonoide zeigen *in vitro* zahlreiche Wirkungen, die *in vivo* allerdings durch die niedrige Bioverfügbarkeit begrenzt sind (Miron et al., 2017; Pérez-Cano & Castell, 2016; Z. Chen et al., 2014; Rodriguez-Mateos et al., 2014; Jiang & Hu 2012; Zhen Yang et al., 2012; Gonzalez et al., 2011; Serafini et al., 2010; Ross & Kasum, 2002; Duthie, 1999). Mit dieser Arbeit wird untersucht, ob die Konzentration von Genistein (Isoflavon) im Vollblut durch Co-Medikation mit anderen Flavonoiden (Quercetin = Flavonol und Naringenin = Flavonon) erhöht werden kann und sich dadurch die TAC steigern lässt.

Die Erhöhung der Plasmaspiegel des Genistein ist durch Konkurrenz in der Phase II der Biotransformation durch Hemmung der Metabolisierung oder Ausscheidung sowie durch eine vermehrte antioxidative Kapazität im Sinne eines „Spareffekts“ denkbar. Der so bewirkte Anstieg des Genistein im Blut durch das zusätzlich gegebene Flavonoid und auch dessen eigene antioxidative Wirkung könnten die TAC steigern (Kloska et al., 2011; Arfi, Richard, Gandolphe, et al., 2010). Eine Folge der vermehrten TAC könnte dann eine Verminderung der oxidativen Parameter, z.B. des Malondialdehyd (MDA), sein. In unserer Studie erfolgte eine Messung der antioxidativen Kapazität jeweils am folgenden Morgen nach dem Ende der 7-tägigen Supplementierungsperiode mit den Versuchspräparaten (Genistein, Quercetin und Naringenin).

Die Veränderung der TAC durch die Versuchspräparate wurde mit dem validierten OxiSelect™ Total Antioxidant Capacity (TAC) Assay gemessen (Apak et al., 2004; Pietta, 2000).

Zur Bestimmung der TAC im Blutplasma können verschiedene Messmethoden verwendet werden. Das Prinzip ist bei den meisten Assays die kontrollierte Generierung von Sauerstoffradikalen durch stark oxidierende Substanzen. Gemessen wird dann die Kapazität des Plasmas die entstehenden Sauerstoffradikale zu reduzieren. Für die Charakterisierung der TAC werden verschiedene Messmethoden unter SET (**S**ingle **E**lectron **T**ransfer) zusammengefasst. Eine gängige SET-Messmethode ist die so genannte CUPRAC-Methode (**C**UPric **R**educing **A**ntioxidant **C**apacity). Die CUPRAC-Methode basiert auf dem Prinzip die Kupferkomplexe zu reduzieren (Ialongo, 2017; Apak et al., 2004) und erfasst im Vergleich zur FRAP-Methode (**F**erric **R**educing **A**bility of **P**lasma, ebenfalls eine SET), auch die Antioxidantien mit einer Thiol-Gruppe (Rubio et al., 2016). Eine weitere SET-Methode ist die Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC), die die Fähigkeit des Plasmas misst, dreiwertiges Eisen in zweiwertiges zu reduzieren (Miller et al., 1993). Bei dieser Methode wird eine im Stoffwechsel nicht vorkommende Substanz (ABTS, 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) verwendet, die keine „physiologische“ Substanz zur Erzeugung von Radikalen ist, während Kupfer und Eisen Bestandteile der oxidativ wirksamen Enzyme sind. In einer Humanstudie mit gesunden Probanden korrelierte die TAC, gemessen mit der CUPRAC-Methode, signifikant mit dem FRAP und TEAC (Campos et al., 2009). Aus diesen Gründen haben wir uns für die CUPRAC-Methode mit dem OxiSelect™ Total Antioxidant Capacity (TAC) Assay Kit der Firma Cell Biolabs, Inc. entschieden. Dieser Test erfasst unter anderem Ascorbinsäure, Rinderalbumin (BSA, von engl. *Bovine Serum Albumin*), Glutathion (GSH), Trolox, Harnsäure, Vitamin E und Butylhydroxytoluol (BHT) (Biolabs, 2010-2012).

In der Literatur wird berichtet, dass eine selektive Kombination von Polyphenolen, wie z.B. Genistein, Quercetin und Resveratrol die Wirksamkeit der Einzelsubstanzen signifikant erhöhen kann (Park et al., 2008). Dabei können niedrig dosierte Flavonoid-Kombinationen (Genistein, Quercetin und Biochanin A) *in vitro* eine antioxidative Wirkung haben, die ausgeprägter ist als wesentlich höher dosierte Einzelsubstanzen (Kumar et al., 2011). Wir konnten in der vorliegenden Studie beobachten, dass die TAC-Konzentration am Ende der Versuchsperiode in der G + Q-Gruppe (Kombination von Genistein + Quercetin) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Genistein als Einzelsubstanz) und auch zur G + N-Gruppe (Kombination von Genistein + Naringenin) am höchsten war. Die graphischen Darstellungen unterstützen dieses Ergebnis und zeigen, dass es in der G + Q-Gruppe zu einer Zunahme des Medians der TAC_{Δ} um 0,0111 mM kommt. Ebenso wird dieses Ergebnis durch den geschätzten und resultierenden Effekt im linear

gemischten Modell (LGM) (0,008 mM) bestätigt. Die Daten deuten darauf hin, dass von den verabreichten Flavonoiden die G + Q-Kombination am meisten die TAC erhöht und die Wirkung von Genistein, als Einzelsubstanz gegeben, übertrifft. Die G- und G + N-Gruppen lieferten in der graphischen Darstellung ein negatives Ergebnis, da der Median um -0,051 mM bzw. -0,0082 mM unter den Ausgangswert sank und somit keine Zunahme der TAC durch die Einnahme von G bzw. Co-Medikation mit Naringenin festzustellen war. Im Vergleich dazu lieferte das LGM in beiden Gruppen (G + N = 0,06 bzw. G-Gruppe = 0,001) eine Zunahme der Differenzen, die aber geringer war als in der Kombination G + Q (0,008 mM). Diese Aussagen im LGM sind mathematisch valider, da das statische Modell die zufälligen Personen-Effekte und der Versuchsbedingung (G, G + Q oder G + N) als kategoriale Einflussgrößen auswertet. Allerdings erreichen die Änderungen von TAC_{Δ} statistisch nicht das Signifikanzniveau. Wir zeigen in dieser Pilotstudie, dass die Kombination der Flavonoide G + Q einen additiven Effekt auf die TAC ausübt. Erwähnenswert ist, dass die Dosierung der bei diesem Pilotversuch verwendeten Flavonoide so gewählt wurde, dass sie auch mit normaler Ernährung gut erreicht werden kann.

6.2 Geschlechtsunterschiede und TAC

Mit 58,3% übertraf der Anteil Frauen im Versuchskollektiv geringfügig den der Männer (41,7 %). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen keine signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschiede in Bezug auf die TAC. Geschlechtsunterschiede in der antioxidativen Kapazität werden in der Literatur für spezielle Konditionen gefunden, die aber für gesunde junge Personen ohne Relevanz sind (Tenkorang et al., 2018; Ide et al., 2002). Unter physiologischen Bedingungen scheinen die Frauen weniger anfällig für oxidativen Stress zu sein. Dies kann an den antioxidativen Eigenschaften von Östrogen liegen (Kander et al., 2017). Obwohl Männer im Allgemeinen einen höheren oxidativen Stress aufweisen als Frauen und auch häufiger an Krankheiten leiden, bei denen oxidativer Stress eine Rolle spielt, z. B. Arteriosklerose, ist oxidativer Stress nicht immer schädlich. Physiologische Testosteronspiegel können oxidativen Stress erhöhen und neuroprotektiv sein, indem die Zelle vor einer Schädigung durch nachfolgende Exposition gegenüber oxidativem Stress konditioniert wird (Tenkorang et al., 2018). Somit findet man in der Literatur zwar Hinweise, dass sich unter besonderen Konditionen Unterschiede in dem Anfall an Sauerstoffradikalen zwischen den Geschlechtern finden, dass jedoch für Personen in der Altersgruppe unseres Kollektivs keine Unterschiede bestehen.

6.3 Ernährung und TAC

Für unsere Studie hat die Ernährung in mehrfacher Hinsicht eine große Bedeutung. Es soll die Bedeutung der antioxidativ wirkenden Flavonoide, sowie deren metabolische Interaktionen untersucht werden. Darüber hinaus hat die Ernährung Auswirkungen auf das Mikrobiom und dieses wiederum interagiert mit dem Stoffwechsel der Flavonoide. Es ist folglich wichtig, definierte Ernährungsbedingungen zu schaffen und sicherzustellen, dass sich das Mikrobiom während der Versuchsphase nicht ändert.

Zunächst galt es, einseitige Kostformen zu erkennen und auszuschließen, da diese die Zusammensetzung des Mikrobioms verändern, wie z. B. eine sehr fettreiche Kost (Murphy et al., 2015). Die Evaluierung der Ernährung vor Versuchsbeginn erfolgte mit dem **Food-Frequency-Questionnaire (FFQ)**. Mit ihm wurden 29 verschiedene Lebensmittelgruppen abgefragt, die im Rahmen einer gesunden Ernährung, wie sie von der **Deutschen Gesellschaft für Ernährung e. V. (DGE)** empfohlen wird, Relevanz haben. Dabei ist zu beachten, dass die Empfehlungen für die Nährstoffzufuhr Limitationen aufweisen, wie dies von der DGE thematisiert wird (DGE Referenzwerte: <https://www.dge.de/wissenschaft/referenzwerte/> am 04.07.2018). Je nach wissenschaftlicher Datenlage und physiologischer Rolle werden die Empfehlungen (Referenzwerte) als empfohlene Zufuhr, als Schätzwert oder als Richtwert ausgesprochen. Demzufolge haben empfohlene Zufuhr, Schätzwert und Richtwert eine unterschiedliche Aussagekraft. Die Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr benennen Mengen für die tägliche Zufuhr von Energie und Nährstoffen, sowie Wasser, Ballaststoffe und Alkohol.

Die Umsetzung der Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr soll einen Beitrag zur Erhaltung und Förderung der Gesundheit und der Lebensqualität leisten. Da aber der individuelle Bedarf von zahlreichen Faktoren, wie Erbanlagen, Lebensstilfaktoren, körperlicher Aktivität, um nur einige zu nennen, abhängt, gibt es für die meisten Nährstoffe keine allgemeine gültige Zufuhrempfehlung. Die Empfehlungen für die tägliche Nährstoffzufuhr basieren auf dem durchschnittlichen Bedarf, von dem angenommen wird, dass er für 50 % einer definierten Bevölkerungsgruppe ausreichend ist. Für die Berechnung der empfohlenen Zufuhr, das sind die Referenzwerte, wird zu diesem Bedarf ein Zuschlag von 20 – 30 % (entspricht 2 Standardabweichungen bzw. einer Streuung von 10 – 15 %) addiert (DGE Empfohlene Zufuhr: <https://www.dge.de/index.php?id=358> 09.07.2018). Damit decken die als Referenzwerte angegebenen Quantitäten der Nährstoffe (empfohlene Zufuhr) den Bedarf nahezu aller gesunden Individuen einer definierten Personengruppe, stellt die lebenswichtigen metabolischen, physischen und psychischen Funktionen sicher und schützt vor

ernährungsbedingten Gesundheitsschäden und Mangelzuständen. Mit dem Anspruch der absoluten Richtigkeit ist die Beurteilung bzw. Planung einer bedarfsdeckenden Ernährung von Einzelpersonen mit den Referenzwerten nicht möglich, da der individuelle Bedarf damit nicht berücksichtigt wird.

Wir haben in unserem Setting den FFQ verwendet, der keine quantitativen Aussagen über die Zufuhrmenge erlaubt, es aber ermöglicht, qualitativ die Ernährung zu beurteilen. Wir konnten damit feststellen, dass unsere Versuchsteilnehmer in dem Verzehrsverhalten eher dem Durchschnitt der Deutschen (Nationale Verzehrstudie II) als dem von ernährungsbewussten Personen entsprach. Insgesamt konnten wir somit feststellen, dass sich unsere Versuchspersonen „durchschnittlich“ ernährten. Verglichen mit den aktuellen Ernährungsempfehlungen der DGE und im Vergleich zu den Daten der Nationalen Verzehrsstudie II (NVS II) konsumierten unsere Studienteilnehmer weniger häufig als empfohlen Obst, Gemüse, Fisch, Milch und Brot. Da diese Lebensmittel zur Versorgung mit Antioxidantien beitragen, kann daraus geschlossen werden, dass die Teilnehmer nicht mit Antioxidantien überversorgt waren und somit die Studien-Präparate in der Lage waren, die TAC im Plasma zu erhöhen. Wir wollten auch keine sehr gesundheitsbewussten Teilnehmer in die Studie aufnehmen, da deren Versorgung mit sekundären Pflanzenstoffen sehr gut ist und möglicherweise die Interventionseffekte verschleiert hätte.

Während der Studie war der Verzehr von Obst und Gemüse in üblichen Mengen, mit Ausnahme von Soja und Sojaprodukten, erlaubt. Es durften aber keine entscheidenden Änderungen, wie „Obsttage“ oder eine Umstellung auf z. B. vegetarische / vegane Kost erfolgen. Alle Konzentrate, wie Fruchtsäfte, Marmeladen, Smoothies usw. wurden während der Versuchszeit ebenfalls vom Verzehr ausgeschlossen. Diese Vorgaben wurden von allen Teilnehmern eingehalten, wie bei den Kontrolluntersuchungen festgestellt werden konnte.

6.4 Körperliche Aktivität (Halb- und Marathon) und TAC

Während der Studie haben vier Teilnehmer gleichzeitig an einem Laufwettbewerb teilgenommen, davon absolvierten drei einen Halbmarathon und einer die volle Marathondistanz. Diese Aktivität war drei Tage vor dem nächsten Kontrollzeitpunkt (U3B) mit Blutentnahme. Die Leistungsfähigkeit der Läufer wurde nicht erfasst, sie spielt aber für die oxidative Belastung eine Rolle (Mrakic-Sposta et al., 2015; Carlsohn et al., 2008; Briviba et al., 2005; Leeuwenburgh & Heinecke, 2001) und kann die individuelle Auswirkung des Laufs auf den oxidativen Stoffwechsel beeinflussen. In der Literatur ist dokumentiert, dass die Dauer der oxidativen Folgen eines Laufes nicht über Stunden hinausgeht (Niess & Simon, 2007; Niess,

2002). Briviba et al. untersuchte die Auswirkung verschiedener Laufdistanzen auf die Konzentration der Antioxidantien im Plasma (Briviba et al., 2005). Bei Hobbyläufern fand er einen statistisch signifikanten Anstieg verschiedener Parameter, die mit oxidativem Stress im Zusammenhang stehen, wie oxidative DNS-Schädigung, reduzierte antioxidative Kapazität, die gegen DNS-Schädigungen schützt und die Immunfunktionen verändert. Dieser Effekt ist vom Trainingszustand des Läufers abhängig. Ein regelmäßiges Training kann vor belastungsinduziertem oxidativem Stress schützen und zu einer trainingsbedingt gesteigerten Belastungstoleranz beitragen sowie die antioxidative Kapazität erhöhen (Carlsohn et al., 2008; Niess, 2002). Nach einem Training oder Wettkampf steigen bestimmte Blutparameter des oxidativen Stresses wie konjugierte Diene (CD, engl. *conjugated dienes*), Malondialdehyde (MDA), Superoxid-Dismutase (SOD), Glutathionperoxidases (GSHPx) und Katalase (CAT, engl. *catalase*) an, bleiben für 24 bis 48 Stunden erhöht und erreichen danach das Ausgangsniveau (Niess & Simon, 2007; Niess, 2002; Marzatico et al., 1997). Einen ähnlichen zeitlichen Verlauf haben belastungsbedingte Beschwerden wie Muskelschmerzen, -kater oder Müdigkeit. Välimäki et al. (2016) zeigten, dass z.B. die oxidativen Veränderungen an HDL bereits 90 Minuten nach einem Marathonlauf nicht mehr nachweisbar sind (Välimäki et al., 2016). Da das Ende des Marathonlaufs aber mindestens 72 Stunden vor der Kontrolluntersuchung war, können wir einen Einfluss des Langstreckenlaufs auf die gemessenen Parameter als unwahrscheinlich ansehen, wollen ihn aber auch nicht völlig ausschließen.

6.5 Wirkung verschiedener Flavonoide auf Malondialdehyd (MDA)

Malondialdehyd (MDA) entsteht während der Lipidperoxidation als Abbauprodukt mehrfach ungesättigter Fettsäuren und dient als wichtiger Biomarker für den oxidativen Stress (Frijhoff et al., 2015; Halliwell & Whiteman, 2004; Marnett, 1999; Esterbauer et al., 1991; Janero, 1990). Oxidativer Stress induziert die Ausschüttung von entzündungsfördernden Zytokinen und spezifischer Transkriptionsfaktor wie NF-κB (Dozor, 2010; Lykkesfeldt, 2007). Flavonoide wie z.B. das Genistein, das in Sojaprodukten reichlich vorkommt, können mit freien Radikalen reagieren und deren negative Ladung übernehmen (McGraw et al., 2016; Tovar et al., 2002). Als Einzelsubstanzen verringern Genistein (Javanbakht et al., 2014), Quercetin (Dong et al., 2014) und auch Naringenin (Sirovina et al., 2016) die Oxidation von Serumlipiden. Dabei entstehen hoch reaktive Produkte, wie Hydroxide, Hydroperoxide und Peroxide, die ihrerseits wieder einen Reaktionspartner zur Übernahme der negativen Ladung brauchen, um keinen Zellschaden zu verursachen. Dies könnte durch die kombinierte Gabe verschiedener antioxidativ wirksamer Stoffe erfolgen, wie dies z. B. in der Redoxkette beschrieben wurde (Bouayed & Bohn, 2010).

Wir konnten allerdings keine Berichte in der Literatur finden, die die Wirkung verschiedener Flavonoide in dieser Hinsicht im menschlichen Blutplasma oder Vollblut untersucht haben. Die Studie kann somit nach unserem Wissensstand erstmals zeigen, dass sich die antioxidative Wirkung von Genistein als Einzelsubstanz durch die Co-Medikation mit Quercetin steigern lässt. Bemerkenswert ist, dass das Flavanon Naringenin bei der Kombination mit Genistein die TAC am Ende der Versuchsperiode nicht ansteigen lässt, vielmehr nimmt die mit MDA bestimmbare Menge an ROS zu. Allerdings lassen sich beim Vergleich mit Quercetin unter Naringenin niedrigere Werte, für die durch MDA gemessenen ROS nachweisen.

Die Bestimmung von Malondialdehyd mittels Thiobarbitursäure (TBA), die einfach spektrometrisch gemessen werden kann, ist neben der fluorimetrischen Bestimmung, die am häufigsten angewendete Methode zur Bestimmung von Lipidperoxiden und ist in zahlreichen Publikationen zur Abschätzung des oxidativen Stresses verwendet worden (Tsikas, 2017; Devasagayam et al., 2003). Ein bekannter Nachteil dieses Tests ist, dass TBA nicht ausschließlich mit MDA reagiert, sondern auch mit anderen Komponenten der biologischen Matrix. Um die Spezifität der Bindung zu erhöhen, werden in der von uns verwendeten Modifikation, die unter dem Namen OxiSelect™ MDA Adduct Competitive ELISA Kit der Firma CELL BIOLABS im Handel ist, spezifische Antikörper gegen MDA eingesetzt, die MDA spezifisch binden.

In unserer Studie nahm der Median des MDA, gebildet aus der Differenz von Endwert minus Anfangswert der jeweiligen Versuchsperiode, während der Gabe von Genistein um -36,86 pmol/l ab, ebenso das Intercept im LGM. Dies bedeutet, dass am Ende der Versuchsperiode mit Genistein als Einzelsubstanz weniger MDA zugesetzt werden musste, also weniger Lipidoxide entstanden waren. Dieser Befund könnte auch durch eine Änderung der Ernährung, die durch unsere Versuchsbedingungen ungewollt induziert wurde, bedingt sein.

Die Erfassung der Ernährungsweise unserer Versuchsteilnehmer mittels des FFQ's hat gezeigt, dass sie sich „durchschnittlich“, entsprechend einer „Western Diet“ ernährten und somit nicht die empfohlene Menge an sekundären Pflanzenstoffen aufgenommen hatten und auch während des Versuchs nicht aufnahmen. Während des Versuchs konnten die Teilnehmer Obst und Gemüse in dem für sie üblichen Umfang verzehren. Sie bekamen zwar eine Liste ausgehändigt und erklärt, in der alle Lebensmittel mit einem hohen Anteil an Flavonoiden vermerkt waren und die sie während des Versuchs meiden sollten. Trotzdem könnte es sein, dass die Versorgung mit Antioxidantien, zu denen auch die Flavonoide gehören, während des Versuchs höher als in der Vorversuchsperiode war. Allerdings wird ein neuer steady state der von uns verwendeten Flavonoide binnen einer Woche erreicht (Bitto et al., 2013; Burnett et al., 2011). Zudem war die

Zuteilung der Versuchspersonen zu Genistein wie zu den anderen Versuchspräparaten zeitlich versetzt (Tabelle 8 Versuchsprotokoll), so dass 4 Versuchspersonen Genistein bzw. die anderen Kombinationen in der zweiten bzw. dritten Versuchsperiode erhielten. Die Supplementierung in der G-Gruppe zeigt graphisch (-36,86 pmol/ml) wie rechnerisch im LGM (-89,51 pmol/ml) eine Abnahme von MDA und somit den erwarteten geringeren Anfall von ROS. Die Bestimmung von MDA unter G + N ergibt graphisch eine geringe mediane Zunahme (3,33 pmol/ml) im Vergleich zum Anfangswert, allerdings nimmt MDA im LGM (-26,12 pmol/ml) ab und es ist somit keine Zunahme der Lipidoxidation festzustellen. Dagegen ist der Median der Differenzen von End- und Anfangswert unter G + Q positiv, somit ist unter dieser Supplementierung eine Zunahme (63,56 pmol/ml) der durch MDA gemessenen Lipidoxidation erfolgt (siehe Abschnitt 5.2.2.2). Dieser Effekt wird auch durch die Schätzung der festen Parameter im LGM (70,14 pmol/ml) bestätigt (Tabelle 21). Anzumerken ist, dass die Änderungen des MDA_{Δ} unter keiner der gegebenen Flavonoidkombinationen das Signifikanzniveau erreichen, sie können also zufällig sein. Trotzdem ist dieser Befund überraschend, da in der Literatur eine Abnahme der Lipidperoxidation, nachgewiesen durch einen geringeren Anfall von TBARS und damit geringere Werte des MDA nach Injektion mit Quercetin (täglich 15 mg/kg intraperitoneal (i.p.)), im Tierversuch, gezeigt wird (Coskun et al., 2005). Als möglicher Confounder wird die beschriebene Teilnahme an dem Marathonlauf von vier Versuchspersonen in dieser Versuchsperiode in Betracht gezogen. Wie vorher angegeben, steigert ein Marathonlauf den Anfall an Sauerstoffradikalen, aber der zeitliche Abstand zwischen dem Marathonlauf und der Blutentnahme macht einen Einfluss unwahrscheinlich. Die ROS werden binnen Stunden wieder eliminiert, allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass es dabei zu einem Verbrauch von Antioxidantien kommt, der einen länger dauernden Effekt auslöst. Leider gibt es hierzu keine relevanten Untersuchungen. Unsicher bei dieser Betrachtung ist auch der Einfluss des Trainingszustandes. Obige Aussage gilt möglicherweise nur für trainierte Sportler. Unsere Versuchspersonen waren durchweg Hobbysportler und möglicherweise kommt es dadurch zu einem höheren Anfall von Sauerstoffradikalen. Dies ist möglich, wenn bei der körperlichen Belastung die aerobe Schwelle überschritten wird und es im anaeroben Zeitraum zu einem Muskelschaden, wie z. B. Muskelkater, kommt. Diese Annahme wird durch eine Arbeit von Child et al. (1998) unterstützt. Er beschreibt einen vermehrten Anfall von Sauerstoffradikalen durch einen Halbmarathon- bzw. Marathonlauf, nachgewiesen durch eine Zunahme der TAC-Werte bei gleichzeitigem Anstieg sowohl von MDA als auch von dem Muskelenzym Creatinkinase (CK). Ein Anstieg der CK beweist einen Untergang von Muskelgewebe, das durch eine Entzündungsreaktion mit vermehrtem Anfall von ROS beseitigt werden muss. In der

Untersuchung von Child et al. (1998) und durch andere Literaturstellen gezeigt (Jowko et al., 2015; Clarkson, 1995), führt der Anstieg des MDA auch zu einer Aktivierung des antioxidativen Systems. Es könnte ein Teil des beobachteten TAC-Anstiegs unter der Supplementierung mit G + Q durch einen gesteigerten Anfall von ROS bedingt sein. In unserer Studie zeigt Genistein, als Einzelsubstanz und gleichzeitig als Kontrolle, anders als bei G + Q- und G + N-Kombination, eine Abnahme der Lipidoxidation, da sich die MDA-Konzentration um -36,86 pmol/ml am Ende dieser Versuchsperiode im Vergleich zum Beginn verringert. Es lässt sich eine Beziehung zu den TAC-Werten zeigen, die unter der Supplementierung mit G abnehmen. Zusammenfassend zeigen die TAC und MDA Befunde, dass offensichtlich eine Beziehung zwischen dem oxidativen und antioxidativen System besteht, wobei die Wirkung der Intervention auf das offensichtlich multifaktoriell gesteuerte System bisher noch zu wenig verstanden ist.

6.6 Das Mikrobiom

Genistein (Isoflavon), Quercetin (Flavonol) und Naringenin (Flavonon) kommen in Lebensmitteln vor allem als Glykoside (bioinaktiv) vor (Ozdal et al., 2016; Thilakarathna & Rupasinghe, 2013; Walle, 2004; Gee et al., 1998; Setchell, 1998). Für die Umwandlung in die entsprechenden bioaktiven Aglykone, werden Glykoside nach oraler Aufnahme im unteren Dünndarm durch β -Glukosidasen in der Darmwand hydrolysiert und vom Zuckerrest abgespalten (s. Kapitel 2.3.2). Die Bioverfügbarkeit der Aglykone ist im Vergleich zu Glykosiden etwas niedriger (Thilakarathna & Rupasinghe, 2013; Setchell et al., 2001). Die Polyphenolstruktur der Flavonoide bestimmt das Ausmaß und die Absorptionsrate im Darm sowie die Konzentration in Urin und Blut (Zheng et al., 2003; Xu et al., 1995).

Phenolische Verbindungen sind als antimikrobielle Mittel mit bakteriostatischer oder bakterizider Wirkung bekannt (Barbieri et al., 2017). Genistein, dass eine 5-Hydroxylgruppe besitzt, wird im Vergleich zu Daidzein, das keine 5-Hydroxylgruppe aufweist, schneller abgebaut. In vitro Studien zeigen, dass Genistein, Quercetin und Naringenin das Wachstum von Bakterien der Mikrobiota dosisabhängig hemmen können (Kawabata et al., 2013; Duda-Chodak, 2012; Parkar et al., 2008). Durch ihre antiproliferativen und antiinflammatorischen Aktivitäten haben sie einen Einfluss auf die Darmbakterien und spielen eine Rolle für die allgemeine Darmgesundheit (Espin et al., 2017; Selma et al., 2009). Die Darmfunktion und damit auch der intestinale Stoffwechsel des Genistein hängen unter anderem von der Zusammensetzung der Mikrobiota ab. Es muss deshalb sichergestellt sein, dass sich die Darmmikrobiota während des Versuchs nicht ändert. Die Darmmikrobiota wurde zu Beginn und am Ende bei unseren Studienteilnehmern untersucht. Die Zusammensetzung des Mikrobioms wurde durch die

Sequenzierung der 16S-ribosomale RNA mit der Methodik von (Lagkouvardos et al., 2017) ermittelt. Dieses sogenannte microbial profiling zeigt mit einem p-Wert von 0,998 keinen signifikanten Unterschied durch die Einnahme der verschiedenen Polyphenole, insbesondere der Flavonoide, während der Studie. Damit kann ein Einfluss der Darmmikrobiota auf die Konzentration des Genistein im Vollblut ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass eine Supplementierung mit Genistein, auch in Kombination mit Quercetin oder Naringenin in einer Dosis von jeweils 100 mg die Zusammensetzung des Mikrobioms nicht messbar verändert.

6.7 Bestimmung von Genistein und Genistin im Vollblut

Die Messungen von Genistin (Glykosid) und Genistein (Aglykon) erfolgen in der vorliegenden Arbeit im EDTA-Vollblut, basierend auf der von Biasutto et al. (2010) beschriebenen Methode und den im Rahmen der Methodenentwicklung durchgeföhrten Vorversuchen mit HPLC von Galasso (2012) an der Universität Hohenheim (Galasso, 2012; Biasutto et al., 2010).

Die Studienteilnehmer erhielten Genistein (G) als Einzelsubstanz oder in Kombination mit Quercetin (G + Q) bzw. Naringenin (G + N) jeweils über 7 Tage, zwischen jeder Einnahmeperiode war eine wash-out-Phase von 7 Tagen, so dass die gesamte Studiendauer 6 Wochen betrug

6.7.1 Genistin

Der mediane Unterschied in der Gruppendifferenz zwischen dem Anfangs- und Endwert für das Genistin (Glykosid) stieg unter allen drei Supplementen in der Reihenfolge G + Q (2,55 µmol/l) > G (1,90 µmol/l) > G + N (1,88 µmol/l) an. Die jeweiligen graphischen Tendenzen der Zunahmen werden durch die Berechnung des resultierenden Effektes für jede der drei verwendeten Dosierungen (G + Q = 2,48 µmol/l; G = 2,41 µmol/l; G + N = 2,08 µmol/l) im LGM bestätigt, allerdings sind sie statistisch nicht signifikant. Die größte Zunahme des Genistin im Vollblut wird durch die Co-Medikation von G + Q erreicht. Beim Vergleich der jeweiligen Whiskerlängen der Gruppendifferenzen für das Genistin in den Boxplots fällt auf, dass sie in den drei Versuchsabschnitten sehr unterschiedlich sind. Insbesondere ist dies in der G + Q-Gruppe durch den extrem hohen Wert von 6,88 µmol/l (zum Zeitpunkt U3B) und in der G-Gruppe durch den Wert von 6,90 µmol/l (zum Zeitpunkt U3A) zu sehen. Dieser Wert verlängert in der G- und G + Q-Gruppe den oberen Whisker erheblich. Beide Werte sind der Studienteilnehmerin #1 zuzuordnen. Diese Versuchsperson hatte bei allen Messzeitpunkten höhere Genistin-Werte als die übrigen Versuchsteilnehmer. Eine Fehlbestimmung kann ausgeschlossen werden, da die Kontrollmessung mehrfach durchgeföhrte wurde. Wir haben geprüft, ob sich diese Teilnehmerin

auch in den TAC Werten von den anderen Teilnehmern unterscheidet und konnten TAC-Werte im unteren Bereich im Vergleich zu den restlichen Teilnehmern feststellen. Besonders auffällig niedrig ist die TAC-Konzentration nach der letzten Supplementierungsperiode (U3B) - in der die Versuchsperson am Halbmarathonlauf teilgenommen hatte. Mit $0,291 \mu\text{mol/l}$ war die TAC-Konzentration erheblich niedriger als der Mittelwert der TAC-Konzentrationen aller Teilnehmer zum Zeitpunkt U3B mit $0,39 \pm 0,09 \mu\text{mol/l}$ (MW \pm SD). Die MDA-Werte waren bei der Teilnehmerin im mittleren Bereich. Da das Genistin $_{\Delta}$ mit $6,88 (\text{G} + \text{Q})$ bzw. $6,90 (\text{G}) \mu\text{mol/l}$ weitaus höher als bei den anderen Versuchsteilnehmern war, könnte man vermuten, dass auch die Konzentrationen des Genistein im oberen Bereich liegen. Jedoch waren die Genistein $_{\Delta}$ -Werte bei dieser Teilnehmerin mit $0,06 (\text{G} + \text{Q})$ bzw. $0,34 (\text{G}) \mu\text{mol/l}$ im mittleren Bereich, was für einen verminderten Metabolismus des Genistin spricht. Da Genistin zur Resorption in das Aglykon Genistein von der Darmmikrobiota umgewandelt werden muss, haben wir das Profil der Darmkeime bei dieser Teilnehmerin näher überprüft. Es zeigt eine hohe Diversität der Keime, was als Zeichen einer „gesunden“ Darmflora interpretiert wird. Jedoch ist die Keimzahl sowohl der einzelnen Spezies wie auch des gesamten Mikrobioms im Vergleich zu den anderen Versuchsteilnehmern niedrig. Die Daten können wegen der komplexen und aufwendigen Darstellung im Ergebnisteil nicht gezeigt werden. Es kann somit sein, dass die Umwandlung von Genistin in Genistein bei dieser Teilnehmerin eingeschränkt war. Die mikrobielle Zusammensetzung des Darminhalts wird von mehreren Faktoren bestimmt, wie der genetischen Ausstattung, sowie den Lebens- und Ernährungsgewohnheiten. Der FFQ lieferte bei dieser Teilnehmerin keine Hinweise auf besondere Verzehrsgewohnheiten und wir konnten auch keine speziellen Lebensgewohnheiten, wie Verwendung von bakterizid wirkenden Stoffen oder Kräutern erfragen. Somit kommen zwar genetische Ursachen in Betracht, können aber durch unsere Untersuchungen nicht bewiesen werden.

6.7.2 Genistein (Aglykon)

Ein Anstieg der Genistein-Konzentration fand sich in dieser Studie nach der Gabe von G und G + Q, während unter G + N kein Anstieg des Genistein im EDTA-Vollblut messbar war. Die Zunahme des Medians der Genisteinkonzentration war am Ende der Versuchsperiode mit G (Median: $0,057 \mu\text{mol/l}$; LGM: $0,07 \mu\text{mol/l}$) am größten (s. Boxplot Abbildung 17). Statistisch bedeutungsvoller ist das LGM, welches am Ende der Versuchsperiode mit G + Q (Median: $0,036 \mu\text{mol/l}$; LGM: $0,11 \mu\text{mol/l}$) den größten Anstieg der Genisteinkonzentration im Plasma aufweist (s. Tabelle 23). Dagegen nimmt der Median der Genisteinkonzentration am Ende der Supplementierung mit G + N um $0,073 \mu\text{mol/l}$ ab, im LGM ist die Abnahme mit $-0,04 \mu\text{mol/l}$

geringer. Diese Unterschiede von Median und LGM sind durch die Einberechnung des Interceptes zu den jeweiligen geschätzten Effekten der Supplementierung zurückzuführen. Die Ergebnisse im LGM sind mathematisch modelliert und somit valider im Vergleich zu den in Boxplots dargestellten Medianen. Das LGM liefert den Nachweis, dass die Co-Medikation mit G + Q die Genisteinkonzentration im Vollblut am meisten erhöht. Die Unterschiede der Differenzen sind auch hier statistisch nicht signifikant, was möglicherweise der geringen Fallzahl geschuldet ist.

Um die von uns ermittelten Konzentrationen von Genistein mit den Berichten aus der Literatur vergleichen zu können, werden im Folgenden die MW \pm SD angegeben. In dieser Studie lag die durchschnittliche Genistein-Konzentration im EDTA-Vollblut der 12 Teilnehmer vor der Supplementierung mit G bei $1,3 \pm 0,07 \mu\text{mol/l}$, mit G + N bei $1,35 \pm 0,13 \mu\text{mol/l}$ und mit G + Q bei $1,38 \pm 0,16 \mu\text{mol/l}$ und somit in einem vergleichbaren Bereich. Dies ist ein Hinweis, dass die wash-out Periode ausreichend lang war und kein carry-over Effekt die Ergebnisse verfälscht. Verglichen mit den in der Literatur für die Konzentration des Genistein im Plasma und Serum berichteten Werten (zwischen 0,06 und 0,11 $\mu\text{mol/l}$), werden in dieser Pilotstudie deutlich höhere Werte des Genistein im EDTA-Blut vor Behandlungsbeginn gemessen ((deVere White et al., 2010; Kumar et al., 2007; Hussain et al., 2003) s. Tabelle 25).

Die Anstiege der Genisteinkonzentration sind durch die Supplementierung beim vorliegenden Versuch mit den in der Literatur berichteten Ergebnissen vergleichbar. Setchell et al. (2001) können nach Gabe einer Einzeldosis von 50 mg Genistein die Konzentration von Genistein mit $1,26 \pm 0,27 \mu\text{mol/l}$ im Plasma feststellen (Setchell et al., 2001). Verglichen mit unseren Ergebnissen nach der Supplementierung mit G ($1,37 \pm 0,15 \mu\text{mol/l}$), G + N ($1,31 \pm 0,16 \mu\text{mol/l}$) und G + Q ($1,49 \pm 0,26 \mu\text{mol/l}$) sind die meisten in der Literatur berichteten Werte niedriger (s. Abbildung 18). Unsere Werte sind näher an den Ergebnissen von Galasso ($1,294 \pm 0,063 \mu\text{mol/l}$), die im EDTA-Vollblut ermittelt wurden, während die anderen Untersucher im Plasma oder Serum gemessen haben. Nach der Gabe von Genistein als Reinsubstanz in einer Dosierung von täglich 100 mg über einen Zeitraum von 3 Monaten fand Galasso eine Zunahme der Genisteinkonzentration auf $1,294 \pm 0,063 \mu\text{mol/l}$ im EDTA-Vollblut (Galasso, 2012).

Tabelle 25: Vergleich der Genisteinkonzentration aus unserer Studie mit der Literatur. Gelistet nach Konzentration nach der Supplementation.

Studie	Material	Basiswert c ($\mu\text{mol/l}$)	Tägliche Supplementation (Konzentration, Substanz und Dauer)	Nach der Supplementation c ($\mu\text{mol/l}$)
Busby et al. (2002)	Plasma	n. a.	<i>Einzeldosis</i> ; Formulation A: 16 mg/kg KG Genistein + 1,8mg/kg KG Daidzein Formulation B: 16mg/kg KG Genistein + 7,8mg/kg KG Daidzein	A: $0,066 \pm 0,031$ B: $0,363 \pm 0,213$
Hussain et al. (2003)	Serum	$0,11 \pm 0,29$	100 mg Isoflavone „Novasoy®“ davon 50 mg Genistein, (Verhältnis 1:1:1:0.2 Genistein:Daidzein:Glycetin), 3-6 Monate	$0,65 \pm 0,63$
Setchell et al. (2001)	Plasma	n. a.	<i>Einzeldosis</i> 50 mg Genistein (Reinsubstanz)	$1,26 \pm 0,271$
Galasso (2012)	EDTA-Vollblut	$1,14 \pm 0,054$	100mg Genistein (Reinsubstanz), 3 Monate	$1,294 \pm 0,063$
Diese Studie mit G + N	EDTA-Vollblut	$1,35 \pm 0,13$	100mg Genistein + 100mg Naringenin, 3 Wochen	$1,31 \pm 0,16$
Diese Studie mit G	EDTA-Vollblut	$1,3 \pm 0,07$	100mg Genistein (Reinsubstanz), 3 Wochen	$1,37 \pm 0,15$
Kumar et al. (2007)	Plasma	0,06	80 mg Isoflavone „Prevastein HC®“, Genistein, Daidzein und Glycitein, 3 Monate	1,46
Diese Studie mit G + Q	EDTA-Vollblut	$1,38 \pm 0,16$	100mg Genistein + 100mg Quercetin, 3 Wochen	$1,49 \pm 0,26$
Zhang et al. (1999)	Plasma	n. a.	<i>Einzeldosis</i> ; 4,5 $\mu\text{mol/kg}$ KG Isoflavone in der Sojamilch mit 4,4 $\mu\text{mol/g}$ Genistein + 3,9 $\mu\text{mol/g}$ Daidzein + 0,7 $\mu\text{mol/g}$ Glycitein bzw. Sojabohnenkeim mit 9 $\mu\text{mol/g}$ Genistein + 34,6 $\mu\text{mol/g}$ Daidzein + 27,8 $\mu\text{mol/g}$ Glycitein	Sojamilch bei Männern: $1,78 \pm 0,83$ Frauen: $1,70 \pm 1,01$ Sojabohnenkeim bei Männern: $1,7 \pm 1,01$ Frauen: $0,51 \pm 0,19$

n.a. = nicht angegeben

Dies könnte darin liegen, dass Galasso und diese Studie die Konzentration des Genistein im EDTA-Vollblut gemessen haben, während in der Literatur die verwendete Matrix das Plasma bzw. Serum ist (Galasso, 2012; Biasutto et al., 2010; deVere White et al., 2010; Hosoda, Furuta, & Ishii, 2010; Mantovani et al., 2009; Grace et al., 2003; Moon et al., 2000). Somit können wir unsere Ergebnisse hinsichtlich der Konzentration des Genistein nur mit der Arbeit von Galasso (2012) vergleichen. Galasso hat die Messung im EDTA-Vollblut etabliert und validiert (Galasso, 2012). Als Grund für die Verwendung von EDTA-Vollblut wurde von Galasso angegeben, dass sich Flavonoide an polare Substanzen, wie z. B. den Membranen von Blutzellen binden und nach

Abtrennung der korpuskularen Blutbestandteile der Bestimmung entgehen (Biasutto et al., 2010). Biasutto et al. (2010) vergleichen die Ergebnisse der Bestimmung von Flavonoiden wie z.B. Quercetin und Resveratrol im Vollblut und im Plasma und finden ebenfalls im Vollblut höhere Werte. Quercetin und Resveratrol sind wegen der fünf im Molekül enthaltenen Hydroxylgruppen polare Substanzen, wie auch andere Flavonoide und binden mehr an korpuskularen Blutbestandteilen wie z.B. Zellmembran als weniger polare Flavonoide. In dieser Studie wird für die Bestimmung des Genistein in der Probenaufbereitung eine Hydrolyse durch die Zugabe des Enzyms β -Glucuronidase durchgeführt, um den Zuckerrest abzutrennen. Im nächsten Schritt werden die EDTA-Vollblutproben vor der Zentrifugation mit Ultraschall behandelt. Die hierdurch bewirkte Fragmentierung der Zellmembran gewährleistet den Aufschluss der Zellen. Es können auch die membranständigen Anteile der Analyten erfasst werden und mit in die Analyse eingehen (Galasso, 2012).

Eine weitere Ursache für die oben geschilderten Unterschiede der Konzentration des Genistein zwischen unseren und den in der Literatur berichteten Werten kann der Verzehr von Produkten sein, die Soja enthalten. Soja wird in der Lebensmittelindustrie breit verwendet. Schokolade, Snacks, Fertiggerichte oder Müsli können Soja enthalten. Zwar haben wir sojareiche Produkte mit den Teilnehmern besprochen und sie auch auf die Verwendung von Soja in der Lebensmittelindustrie hingewiesen, da der Zusatz von Soja jedoch oft nur an der Zutatenliste erkannt werden kann, kann die ungewollte Aufnahme nicht ganz ausgeschlossen werden. Jedoch ist diese Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse sehr unwahrscheinlich, da sowohl die Werte vor Versuchsbeginn, wie auch die unter der von uns kontrollierten Ernährung während des Versuchs höher waren, als in der Literatur für Plasmawerte beschrieben (s. Tabelle 25). Gestützt wird diese Annahme durch die Berichte in der Literatur, die ebenfalls im Vergleich zu den im Plasma gemessenen Werten höhere Konzentration des Genistein im EDTA-Vollblut nach Fragmentierung der korpuskulären Blutbestandteile (Galasso, 2012; Biasutto et al., 2010) finden.

Erstaunlich ist der Anstieg der Genisteinkonzentration im Plasma, wenn Genistein mit polyphenolreichen Produkten aufgenommen wird, in denen das Genistein in der natürlichen Matrix vorliegt, wie dies in der Sojamilch oder Sojabohnen der Fall ist. Wie in unserem Versuch nachgestellt, findet sich in diesen Produkten eine Anzahl von Polyphenolen, wie Genistein, Daidzein, Quercetin, Rutin, Hesperidin und vielen anderen. In der Literatur wird der Anstieg des Genistein im Plasma durch Verzehr von Sojamilch als Einmaldosis mit 4,5 $\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{KG}$ eines Isoflavongemisches beschrieben. Der Anstieg des Genistein auf $1,78 \pm 0,83 \mu\text{mol/l}$ (Zhang et al., 1999) durch das Isoflavongemisch ist weitaus höher als der durch die oben geschilderte

Supplementierung mit isoliertem Genistein (Tabelle 25). Dies unterstützt unsere Hypothese, dass die Kombination von Polyphenolen die Konzentration des Genistein im Plasma steigert. Es wäre sehr interessant zu wissen, ob die in einem Lebensmittel vorhandenen sekundären Pflanzenstoffe sich in ihrer Wirkung immer unterstützen, dies sozusagen ein Selektionsvorteil ist, da er die Pflanze vor dem UV-Licht, Bakterienbefall und anderem schützt, oder ob eine Kombination von verschiedenen Pflanzen für den Menschen in dieser Hinsicht besonders bedeutungsvoll ist. In der Literatur gibt es Hinweise, dass auch die Form des Genistein im Nahrungsmittel Einfluss auf die Resorption und die Bioverfügbarkeit hat. In den Pflanzen liegt Genistein meist in beiden Formen, dem Aglykon und Glykosid, vor.

Die Metabolisierung des Genistin und Genistein erfolgt weniger in der Leber, sondern vor allem im Colon. Das hat wesentliche Auswirkung auf die Wirkdauer und die Bioverfügbarkeit des Genistein (Chen et al., 2005; Manach et al., 2005; Busby et al., 2002; Setchell et al., 2001). In Berichten über Plasmakonzentrationen des Genistein wird mehrfach ein Doppelpeak beschrieben, wobei der zweite Peak größer als der vorangehende ist. Dies ist typisch für einen enterohepatischen Kreislauf. Es erklärt teilweise, dass Genistein trotz einer geringen Resorption nach oraler Gabe und einer raschen renalen Elimination eines Anteils binnen 3,2 Stunden (Busby et al., 2002) messbare Plasmaspiegel erreicht und eine Halbwertszeit von 6-8 Stunden beim Menschen hat (Yang et al., 2012; Yang et al., 2010; Zhou et al., 2008; Coldham et al., 2002). Wie beschrieben hat der Stoffwechsel des Genistein sozusagen ein Duo-Recycling mit einem enterischen Stoffwechsel und enterohepatischen Kreislauf. Dies hat zum einen eine umfangreiche Metabolisierung mit Bildung zahlreicher, zum Teil stoffwechselaktiver Metabolite zur Folge und trägt auch zu der erwähnten protrahierten Halbwertszeit im Plasma bei. In der Mehrzahl der Resorptionsstudien wird eine bessere Resorption des Aglykons im Vergleich zum Glykosid nachgewiesen (Busby et al., 2002). Allerdings waren die Versuchsbedingungen nicht einheitlich und schwer vergleichbar, da unterschiedliche Konzentrationen und unterschiedliche Mischungen von Aglykon und Glykosid verwendet werden (Zheng et al., 2004; Zubik & Meydani, 2003; Richelle et al., 2002; Izumi et al., 2000; Tew et al., 1996). In einigen Dosisfindungsexperimenten kam es nicht zu einem linearen Anstieg des Genistein im Plasma. Ab einer Dosis des Genistein über 0,8 mg/kg wurde eine Abflachung des Anstiegs von Genistein im Plasma beobachtet, und auch die Area Under the Curve (AUC) wurde kleiner, was auf eine limitierte Resorption, eine gesteigerte Elimination oder einen Sättigungsmechanismus bei der Resorption und / oder dem Metabolismus hinweist (Setchell et al., 2003). Andere Studien zeigen eine lineare Zunahme des Genistein bei Supplementierung mit steigenden Dosen bis zu 16 mg/kg KG (Franke et al., 2014; Bloedon et al., 2002; Busby et al., 2002; Slavin et al., 1998) was

auf individuelle Unterschiede in der Resorption oder im Metabolismus hinweisen kann. Bei allen Studien fällt eine große interindividuelle Streuung der Werte auf, möglicherweise durch den komplexen Metabolismus des Genistein bedingt.

Zu den Stoffwechselwegen für die Elimination von Genistein, Quercetin und Naringenin gehören die Oxidation in der Phase I über die CYP-P450-Enzyme und die Glucuronidierung durch UDP-Glucuronyltransferasen bzw. Sulfatierung durch SULT-Sulfotransferasen in der Phase II (Miron et al., 2017; Yang et al., 2010). Während der Phase I ist das vorherrschende Cytochrom-P450 bei Genistein CYP1A2 gefolgt von CYP2E1, CYP2D6 und CYP3A4 (Basheer & Kerem, 2015; Breinholt et al., 2003; M. Hu et al., 2003; Roberts-Kirchhoff et al., 1999). Quercetin und Naringenin werden ebenfalls über diese Enzyme metabolisiert, wobei Naringenin vor allem über CYP3A4 verstoffwechselt wird und weniger über CYP1A2 (Basheer & Kerem, 2015; Y. Chen et al., 2009; S. Zhou et al., 2004; Fuhr et al., 1993). Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass es bei der Co-Medikation von Genistein mit Quercetin zu einer Kompetition um die Verstoffwechselung über CYP1A2 kommt und dadurch die Blutkonzentration von Genistein erhöht wird, wie wir es in unserem Versuch beobachten konnten. Der Metabolismus über die CYP-P450-Enzyme ist im Allgemeinen für Flavonoide von untergeordneter Bedeutung (Miron et al., 2017; Jiang & Hu, 2012). Der Phase-II-Metabolismus ist der dominierende Stoffwechselweg für die Flavonoide. Im Vergleich dazu hat der Phase-I Metabolismus nur begrenzten Einfluss. Die Präferenz der Art der Metabolisierung durch Glucuronidierung (UGT's)> Sulfatierung (SULT's)> Oxidation (CYP's) trifft für die meisten in der Literatur beschriebenen Flavonoide zu. Flavonoide werden größtenteils durch verschiedene UGT-Isoformen metabolisiert. Die in der Literatur vorliegenden Daten zeigen, dass sich die verschiedenen UGT- und SULT-Isoformen Flavonoide in unterschiedlichen Mengen und an verschiedenen Positionen in Glucuronide bzw. Sulfate umwandeln können (Meng et al., 2012; Wu et al., 2011; Tang et al., 2010). Die Ergebnisse von (Doerge et al., 2000) bestätigen, dass die Menge der Glucuronidationsprodukte beim Menschen größer als die von einem Flavonoid entstehenden Sulfate oder Aglykone ist. Die Affinität des Genistein zu den glucuronierenden Enzymen nimmt in der Reihenfolge UGT1A8> 1A9> 1A10> 1A1 ab (Tang et al., 2009). Hierbei spielt unter anderem die Konzentration des Genistein eine Rolle. Die Glucuronidation von Genistein ist für UGT1A9 bei einer Konzentration von 2,5 mM am höchsten, während dies für UGT1A8 bei einer Konzentration von 10 und 35 mM zutrifft. Quercetin und Naringenin werden ebenfalls durch UGTA8, UGTA9 und UGTA10 metabolisiert (Zhou et al., 2013; Chen et al., 2008; Cheng et al., 1999). In unserem Versuch fanden wir höhere Konzentrationen von Genistein und Genistin im EDTA-Vollblut unter der Kombination von Genistein mit Quercetin im Vergleich mit den Ergebnissen unter Naringenin. Ob dies auf den oben erwähnten

Stoffwechsel oder auf eine Kompetition um die Verstoffwechselung durch die UGT's zurückzuführen ist, kann mit unserem Versuchsansatz aus den Ergebnissen nicht entschieden werden.

Die Sulfotransferasen (SULTs: 1A1, 1A2, 1E und 2A1), sind beim Menschen die zweitwichtigste Überfamilie von Phase-II-Enzymen für den Genisteinmetabolismus und katalysieren die Bildung des Genisteinsulfats (Hosoda, Furuta, & Ishii, 2010; Gu et al., 2006; Adlercreutz et al., 1995). Die Affinität zu und der Umsatz von Genistein verringert sich von SULT 1A1> 2A1> 1E> 1A2 = 1A3 (Zhen Yang et al., 2012; Doerge et al., 2000). Genistein dient zwar einerseits als Substrat für SULT1A1, hemmt aber gleichzeitig dosisabhängig die Aktivität des Enzyms (Jiang & Hu 2012). Vergleichende Untersuchungen zeigen, dass Quercetin ein stärkerer Inhibitor des Enzyms als Genistein ist (Mesia-Vela & Kauffman, 2003). Darüber hinaus inhibiert Quercetin die Enzyme SULT1A3 und SULT1E (Nishimuta et al., 2007; Ohkimoto et al., 2004; Otake et al., 2000). Es kommt bei einer Co-Medikation mit Quercetin zur Verminderung der Sulfatierung von oral verabreichtem Genistein in der Darmschleimhaut und damit zur Verzögerung des Abbaus. Dies konnte ebenfalls zum Anstieg der Genisteinkonzentration unter der Co-Medikation mit Quercetin im Plasma beitragen.

Die Kopplung von metabolisierenden Enzymen und Efflux-Transportern im Darm ermöglicht das enterohepatische Recycling und stellt einen der Hauptwege für die Genistein-Verteilung und Eliminierung dar (Miron et al., 2017; Jiang & Hu 2012; Hu 2007; Jeong et al., 2005). Neben dem umfangreichen Stoffwechsel ist der Transport von Flavonoiden und deren Metaboliten ein weiterer Faktor, der zu geringen und individuell variablen Plasmaspiegeln beiträgt. Ein Großteil des Genistein kann durch Efflux-Transporter, die an der apikalen Seite von Enterozyten exprimiert werden, wie z.B. BCRP (Breast Cancer Resistant Protein) und MRP2 (Multi-drug Resistance Protein 2) zur Exkretion in das Darmlumen gebracht werden (Schexnayder & Stratford, 2016; Chen et al., 2003; Liu & Hu, 2002). Polymorphismen des BCRP-Transporters, die zu einer Inhibition oder Ausschaltung der Enzymaktivität führen, erhöhen die Plasmaspiegel von Genistein signifikant (Bircsak & Aleksunes, 2015; Alvarez et al., 2011; Zhu et al., 2010; Enokizono et al., 2007). Es ist anzunehmen, dass hierdurch nicht nur die Plasmaspiegel ansteigen, sondern auch die Bioverfügbarkeit zunimmt. In der Literatur gibt es Hinweise, dass die gleichzeitige Verabreichung von mehreren Flavonoiden (Apigenin, Biochanin A, Chrysin, Genistein, Kaempferol, Hesperetin, Naringenin, and Silymarin) die Pharmakokinetik dieser Substanzen verändert, in dem der BCRP-Transporter durch resultierende Interaktionen inhibiert wird (Zhang et al., 2004). Alvarez et al. (2011) untersuchen die Wirkung der Co-Medikation von Genistein und Daidzein an *Bcrp*-Knockoutmäusen und können zeigen, dass sich die AUC des Genistein

dosisabhängig signifikant steigern lässt (Alvarez et al., 2011). Die Autoren nehmen an, dass die oben diskutierten Effekte, also die Kompetition und die Inhibition der ausscheidenden Enzyme dafür ursächlich sind. In der Arbeit von Oitate et al. kann gezeigt werden, dass der transzelluläre Transport von Genistein in Caco-2-Zellen durch Quercetin gehemmt wird (Oitate et al., 2001). Dieser Befund wird mit der Hemmung eines aktiven Transporters für Genistein erklärt, der auf der apikalen Seite der Caco-2-Zellen lokalisiert sein muss. In unserem Versuch waren die medianen Differenzen des Genistein und Genistin im Vollblut unter der Verabreichung von Genistein und Quercetin im Vergleich mit den Ergebnissen unter Naringenin erhöht. Ob dieser Effekt durch eine Hemmung des Transporters, der Kompetition zwischen den Substanzen oder dem Transporter zustande gekommen ist, kann nicht entschieden werden.

6.8 Bestätigung unserer These in der Literatur

Die These unserer Arbeit lautet: Die Supplementierung mit mehreren Flavonoiden übertrifft die Wirkung einer Einzelsubstanz.

Artikel aus der Literatur zeigen die zahlreichen Wirkungen der Flavonoide, denen antimikrobielle, entzündungshemmende, antiproliferative und metabolische Wirkungen zugeschrieben werden. Einige Versuche, besonders die mit konventionellen Nahrungsmitteln, lassen vermuten, dass durch die Kombination verschiedener Flavonoide eine Wirkungssteigerung erzielt werden kann. Dies gilt sowohl für die Verminderung der Kinaseaktivität des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors, bei dem die Hemmung der GAG-Synthese signifikant durch die Kombination von Flavonoiden im Vergleich zu einer Monosubstanz gesteigert wird, wie auch für die in unserer Pilotstudie im Focus stehende antientzündliche Wirkung (Kloska et al., 2011; Arfi, Richard, & Gandolphe, 2010). Harasym and Oledzki (2014) stellen einen Zusammenhang zwischen der TAC im Blutplasma und der Verfügbarkeit von Antioxidantien, wie z. B. Flavonoiden fest (Harasym & Oledzki, 2014). Die Ergebnisse unserer Studie stimmen damit überein, da die Kombination von Genistein mit Quercetin oder Naringenin (hier nur im LGM) die TAC gegenüber der Supplementierung mit Genistein allein übertraf. Die Kombination mit Quercetin hat einen deutlich größeren Effekt als die Kombination mit Naringenin. Unsere Studie konnte zeigen, dass sich die antioxidative Wirkung von Genistein als Einzelsubstanz durch die Co-Medikation mit Quercetin steigern lässt. Darüber hinaus konnten wir mit der Pilotstudie erstmals zeigen, dass die Kombination von Flavonoiden, die durch Bestimmung des MDA gemessene Lipidperoxidation vermindert. Die von uns verwendete Methode der MDA-Bestimmung zeichnet sich durch eine hervorragende Spezifität aus und kann so als ein Marker für den oxidativen Stress angesehen werden.

Oxidativer Stress ist für viele der sogenannten Zivilisationskrankheiten ein pathogenetischer Marker. Diese Erkrankungen sind durch steigende Prävalenz in den Industrienationen, unter anderem in Deutschland, gekennzeichnet und betreffen Krebserkrankungen, Autoimmunerkrankungen der Gelenke, des Darms, der Schilddrüse, des Gehirns und des Bindegewebes, aber auch Speicherkrankheiten, wie die Mukopolysaccharidosen, den Morbus Alzheimer oder den Morbus Parkinson. Hervorzuheben ist dabei die Neuroinflammation, die besonders bei der Multiplen Sklerose und den cerebralen Speicherkrankheiten von großer klinischer Relevanz für die Progression im Krankheitsverlauf ist. Damit können unsere Ergebnisse von klinischer Relevanz sein, da sie eine Grundlage für das Design einer anti-inflammatorischen Ernährung sind, durch die möglicherweise noch bessere Ergebnisse erzielt werden können als durch die Gabe von (hochkonzentrierten) Einzelsubstanzen, die mit unerwünschten Wirkungen verbunden sein können.

6.9 Limitationen der Studie

Aufgrund des kleinen Teilnehmerkollektivs von 12 Personen sind die ermittelten Ergebnisse nur begrenzt aussagekräftig. Für die Bestätigung der gesteigerten EDTA-Vollblutkonzentration des Genistein durch Co-Medikation mit Quercetin, sollten weitere Untersuchungen mit größeren Kollektiven durchgeführt werden. Durch eine längere Interventionsdauer könnte geprüft werden, wann sich durch die Supplementierung ein neuer steady-state in der Genisteinkonzentration und in der TAC im EDTA-Blut einstellt. Infolge der kurzen Supplementierungsperiode von einer Woche und dem prolongierten Stoffwechsel von Genistein ist es möglich, dass bei den Versuchspersonen noch kein steady state erreicht wurde. Hierzu ist in der Pilotstudie keine Aussage möglich, da finanzielle Begrenzungen nur jeweils eine Messung am Supplementierungsbeginn und -ende erlaubten. Aus diesem Grund kann auch nichts über eine Linearität oder ein level off des Anstiegs der Blutspiegel des Genistein ausgesagt werden. Gleiches gilt für die TAC und die Lipidperoxidation, den oxidativen Stress. Hierzu wären mehrere Messungen über einen längeren Zeitraum erforderlich. Diese Untersuchung würde zeigen, ob sich über die Zeit die Parameter verändern. Berichte in der Literatur weisen darauf hin, dass die verschiedenen, in der Pflanze vorhandenen Flavonoide sich in ihrer Wirkung verstärken. Es ist also nicht nachgewiesen, ob die von uns gewählten Flavonoide tatsächlich die optimale Kombination sind. Interessant wäre die Untersuchung, ob Kombinationen von sekundären Pflanzenstoffen, wie sie z. B. in Soja vorliegen, eine evolutionsbedingte Optimierung der antiinflammatorischen Wirkung darstellen.

7 Zusammenfassung

Der wichtigste Befund dieser Arbeit ist der Anstieg des Genistein im EDTA-Blut und gleichzeitig der TAC durch die Co-Medikation mit Quercetin. Dies ließ sich sowohl im Boxplot wie auch in der LGM-Berechnung darstellen und korrespondierte mit einer Zunahme der TAC und einer Abnahme der Lipidperoxidation im MDA-Assay. Interessanterweise sind diese Ergebnisse für die Kombination von Genistein und Naringenin als Supplement deutlich weniger ausgeprägt. Für Naringenin fand sich ein solcher Effekt nur im LGM. Somit scheint eine Synergie für diese Effekte zwischen dem Flavonol Quercetin und dem Isoflavon Genistein zu bestehen, die möglicherweise durch Interaktionen bei der Resorption, dem Stoffwechsel oder der Elimination bedingt sind.

Mit dieser Studie wird nach unserer Kenntnis erstmals die Überlegenheit von Kombinationen der Flavonoide gegenüber der Gabe von Einzelsubstanzen gezeigt. Zusammenfassend kann man sagen, dass es große interindividuelle Unterschiede im Stoffwechsel der Flavonoide gibt, die durch individuelle Faktoren, wie die Ernährung, beeinflusst werden und durch genetisch determinierte Aktivitäten von Enzymen und Transportern sowie der Leber- und Darmfunktion orchestriert werden. Individuell und nahrungsabhängig wird der Flavonoidstoffwechsel zusätzlich durch die Zusammensetzung der Darmmikrobiota und die Darmpassagezeit sowie die Zufuhr der Makro- und Mikronährstoffe moduliert. Wesentliche Faktoren sind die Wirkung der Mikrobiota auf die Resorption und auf die Enzyme, die den enterohepatischen und enterischen Stoffwechsel regulieren und den Transport und die Ausscheidung der Flavonoide bestimmen. Da die Enzymaktivitäten dynamisch ausgelegt sind, ergeben sich sowohl circadiane wie ernährungsabhängige Schwankungen der Aktivität, was sowohl die unterschiedlichen Ergebnisse in der Literatur wie auch die große Schwankungsbreite der Vollblutkonzentrationen von Genistein in unserem Versuch erklären kann.

7.1 Ausblick

Zusammenfassend ist anzunehmen, dass eine sinnvolle Kombination mehrerer Antioxidantien und sekundären Pflanzenstoffen, wie sie in natürlichen Lebensmitteln vorliegen, wirksamer ist als die Supplementierung mit einer Einzelsubstanz. Darüber hinaus werden die unerwünschten Wirkungen von unphysiologisch hohen Dosen eines Antioxidans vermieden. Im Hinblick auf die nachgewiesene Steigerung der Gesamt mortalität durch hohe Dosen von Vitamin E oder Vitamin C scheint dieses Ergebnis von besonderer Bedeutung. Die Ergebnisse unserer Pilotstudie sollten durch größere Studien validiert werden, bei denen andere Kombinationen von sekundären Pflanzenstoffen zusätzlich getestet werden können. Als Leitlinie könnten sekundäre

Pflanzenstoffe gewählt werden, wie sie sich in der Kombination in geeigneten Pflanzen finden. Alternativ könnte auch an eine Feldstudie gedacht werden, bei der eine nach den bisherigen Erkenntnissen designte Ernährung bei Erkrankungen mit entzündlicher Komponente (z. B. Arteriosklerose, Autoimmunerkrankungen, Neoplasien, Neuroinflammation oder Allergien) zum Einsatz kommt.

8 Literaturverzeichnis

- Adam, O. (2010). *Diät und Rat bei Rheuma und Osteoporose*. (Vol. 3., aktualis. Neuausg.). Weil der Stadt: Hädecke Verlag.
- Adam, O. (2017). Essen gegen Schmerz und Entzündung
Ernährungstherapie bei Rheumatischen Erkrankungen. *CO.med*.
- Adam, O., Beringer, C., Kless, T., Lemmen, C., Adam, A., Wiseman, M., . . . Forth, W. (2003). Anti-inflammatory effects of a low arachidonic acid diet and fish oil in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*, 23(1), 27-36. doi:10.1007/s00296-002-0234-7
- Adlercreutz, H., van der Wildt, J., Kinzel, J., Attalla, H., Wahala, K., Makela, T., . . . Fotsis, T. (1995). Lignan and isoflavonoid conjugates in human urine. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 52(1), 97-103.
- Agus, A., Denizot, J., Thevenot, J., Martinez-Medina, M., Massier, S., Sauvanet, P., . . . Barnich, N. (2016). Western diet induces a shift in microbiota composition enhancing susceptibility to Adherent-Invasive *E. coli* infection and intestinal inflammation. *Sci Rep*, 6, 19032. doi:10.1038/srep19032
- Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., . . . Fukami, Y. (1987). Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem*, 262(12), 5592-5595.
- Alekel, D. L., Genschel, U., Koehler, K. J., Hofmann, H., Van Loan, M. D., Beer, B. S., . . . Kurzer, M. S. (2015). Soy Isoflavones for Reducing Bone Loss Study: effects of a 3-year trial on hormones, adverse events, and endometrial thickness in postmenopausal women. *Menopause*, 22(2), 185-197. doi:10.1097/gme.0000000000000280
- Alvarez, A. I., Real, R., Perez, M., Mendoza, G., Prieto, J. G., & Merino, G. (2010). Modulation of the activity of ABC transporters (P-glycoprotein, MRP2, BCRP) by flavonoids and drug response. *J Pharm Sci*, 99(2), 598-617. doi:10.1002/jps.21851
- Alvarez, A. I., Vallejo, F., Barrera, B., Merino, G., Prieto, J. G., Tomas-Barberan, F., & Espin, J. C. (2011). Bioavailability of the glucuronide and sulfate conjugates of genistein and daidzein in breast cancer resistance protein 1 knockout mice. *Drug Metab Dispos*, 39(11), 2008-2012. doi:10.1124/dmd.111.040881
- Aoyagi-Scharber, M., Crippen-Harmon, D., Lawrence, R., Vinclette, J., Yogalingam, G., Prill, H., . . . Bunting, S. (2017). Clearance of Heparan Sulfate and Attenuation of CNS Pathology by Intracerebroventricular BMN 250 in Sanfilippo Type B Mice. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 6, 43-53. doi:10.1016/j.omtm.2017.05.009
- Apak, R., Güçlü, K., & Özürek, M. (2004). Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method.
- Arfi, A., Richard, M., & Gandolphe, C. (2010). *Storage correction in cells of patients suffering from mucopolysaccharidoses types IIIA and VII after treatment with genistein and other isoflavones*. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Arfi, A., Richard, M., Gandolphe, C., Bonnefont-Rousselot, D., Therond, P., & Scherman, D. (2011). Neuroinflammatory and oxidative stress phenomena in MPS IIIA mouse model: the positive effect of long-term aspirin treatment. *Mol Genet Metab*, 103(1), 18-25. doi:10.1016/j.ymgme.2011.01.015

- Arfi, A., Richard, M., Gandolphe, C., & Scherman, D. (2010). Storage correction in cells of patients suffering from mucopolysaccharidoses types IIIA and VII after treatment with genistein and other isoflavones. *J Inherit Metab Dis*, 33(1), 61-67. doi:10.1007/s10545-009-9029-2
- 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. doi:10.1006/abbi.1998.0783
- Ausseil, J., Desmaris, N., Bigou, S., Attali, R., Corbineau, S., Vitry, S., . . . Heard, J. M. (2008). Early neurodegeneration progresses independently of microglial activation by heparan sulfate in the brain of mucopolysaccharidosis IIIB mice. *PLoS One*, 3(5), e2296. doi:10.1371/journal.pone.0002296
- Axel M. Gressner, T. A. (2007). *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Ayala, A., Munoz, M. F., & Arguelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 360438. doi:10.1155/2014/360438
- Backer, V., Baines, K. J., Powell, H., Porsbjerg, C., & Gibson, P. G. (2016). Increased asthma and adipose tissue inflammatory gene expression with obesity and Inuit migration to a western country. *Respir Med*, 111, 8-15. doi:10.1016/j.rmed.2015.12.003
- Badger, T. M., Ronis, M. J., Hakkak, R., Rowlands, J. C., & Korourian, S. (2002). The health consequences of early soy consumption. *J Nutr*, 132(3), 559s-565s. doi:10.1093/jn/132.3.559S
- Baehner, F., Schmiedeskamp, C., Krummenauer, F., Miebach, E., Bajbouj, M., Whybra, C., . . . Beck, M. (2005). Cumulative incidence rates of the mucopolysaccharidoses in Germany. *J Inherit Metab Dis*, 28(6), 1011-1017. doi:10.1007/s10545-005-0112-z
- Bakker, M. I. (2004). *Dietary intake of phytoestrogens*. Retrieved from
- Bang, O. Y., Hong, H. S., Kim, D. H., Kim, H., Boo, J. H., Huh, K., & Mook-Jung, I. (2004). Neuroprotective effect of genistein against beta amyloid-induced neurotoxicity. *Neurobiol Dis*, 16(1), 21-28. doi:10.1016/j.nbd.2003.12.017
- Barbieri, R., Coppo, E., Marchese, A., Daglia, M., Sobarzo-Sanchez, E., Nabavi, S. F., & Nabavi, S. M. (2017). Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. *Microbiol Res*, 196, 44-68. doi:10.1016/j.micres.2016.12.003
- Basheer, L., & Kerem, Z. (2015). Interactions between CYP3A4 and Dietary Polyphenols. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 854015. doi:10.1155/2015/854015
- Beard, H., Luck, A. J., Hassiotis, S., King, B., Trim, P. J., Snel, M. F., . . . Hemsley, K. M. (2015). Determination of the role of injection site on the efficacy of intra-CSF enzyme replacement therapy in MPS IIIA mice. *Mol Genet Metab*, 115(1), 33-40. doi:10.1016/j.ymgme.2015.03.002
- Beck, M. (2018). Treatment strategies for lysosomal storage disorders. *Dev Med Child Neurol*, 60(1), 13-18. doi:10.1111/dmcn.13600
- Belitz, H.-D., Grosch, Werner, Schieberle, Peter. (2008). *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*.
- BfR, B. f. R. (2007). *Isolierte Isoflavone sind nicht ohne Risiko* Retrieved from
- Bhatia, J., & Greer, F. (2008). Use of soy protein-based formulas in infant feeding. *Pediatrics*, 121(5), 1062-1068. doi:10.1542/peds.2008-0564

- Biasutto, L., Marotta, E., Garbisa, S., Zoratti, M., & Paradisi, C. (2010). Determination of quercetin and resveratrol in whole blood--implications for bioavailability studies. *Molecules*, 15(9), 6570-6579. doi:10.3390/molecules15096570
- Biolabs, C. (2010-2012). OxiSelect™ Total Antioxidant Capacity (TAC) Assay Kit. Product Manual. ©2010-2012. Catalog Number STA-360
Retrieved from
- Biolabs, C. (2013). OxiSelect™ MDA Adduct Competitive ELISA Kits . CELL BIOLABS, INC. [Online]
Retrieved from
- Bircsak, K. M., & Aleksunes, L. M. (2015). Interaction of Isoflavones with the BCRP/ABCG2 Drug Transporter. *Curr Drug Metab*, 16(2), 124-140.
- Bitto, A., Burnett, B. P., Polito, F., Russo, S., D'Anna, R., Pillai, L., . . . Levy, R. M. (2013). The steady-state serum concentration of genistein aglycone is affected by formulation: a bioequivalence study of bone products. *Biomed Res Int*, 2013, 273498. doi:10.1155/2013/273498
- Bjerregaard, P., Mulvad, G., & Pedersen, H. S. (1997). Cardiovascular risk factors in Inuit of Greenland. *Int J Epidemiol*, 26(6), 1182-1190.
- Bloedon, L. T., Jeffcoat, A. R., Lopaczynski, W., Schell, M. J., Black, T. M., Dix, K. J., . . . Zeisel, S. H. (2002). Safety and pharmacokinetics of purified soy isoflavones: single-dose administration to postmenopausal women. *Am J Clin Nutr*, 76(5), 1126-1137. doi:10.1093/ajcn/76.5.1126
- Boadi, W. Y., Iyere, P. A., & Adunyah, S. E. (2003). Effect of quercetin and genistein on copper- and iron-induced lipid peroxidation in methyl linolenate. *J Appl Toxicol*, 23(5), 363-369. doi:10.1002/jat.933
- Boadi, W. Y., Iyere, P. A., & Adunyah, S. E. (2005). In vitro exposure to quercetin and genistein alters lipid peroxides and prevents the loss of glutathione in human progenitor mononuclear (U937) cells. *J Appl Toxicol*, 25(1), 82-88. doi:10.1002/jat.1049
- Bouayed, J., & Bohn, T. (2010). Exogenous antioxidants--Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxid Med Cell Longev*, 3(4), 228-237. doi:10.4161/oxim.3.4.12858
- Boudet, A. M. (2007). Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry*, 68(22-24), 2722-2735. doi:10.1016/j.phytochem.2007.06.012
- Branca, F., & Lorenzetti, S. (2005). Health effects of phytoestrogens. *Forum Nutr*(57), 100-111.
- Breinholt, V. M., Rasmussen, S. E., Brosen, K., & Friedberg, T. H. (2003). In vitro metabolism of genistein and tangeretin by human and murine cytochrome P450s. *Pharmacol Toxicol*, 93(1), 14-22.
- Brieger, K., Schiavone, S., Miller, F. J., Jr., & Krause, K. H. (2012). Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly*, 142, w13659. doi:10.4414/smw.2012.13659
- Briviba, K., Watzl, B., Nickel, K., Kulling, S., Bos, K., Haertel, S., . . . Bub, A. (2005). A half-marathon and a marathon run induce oxidative DNA damage, reduce antioxidant capacity to protect DNA against damage and modify immune function in hobby runners. *Redox Rep*, 10(6), 325-331. doi:10.1179/135100005X83716
- Burnett, B. P., Pillai, L., Bitto, A., Squadrito, F., & Levy, R. M. (2011). Evaluation of CYP450 inhibitory effects and steady-state pharmacokinetics of genistein in combination with cholecalciferol and citrated zinc bisglycinate in postmenopausal women. *Int J Womens Health*, 3, 139-150. doi:10.2147/IJWH.S19309

- Bursztyka, J., Perdu, E., Tulliez, J., Debrauwer, L., Delous, G., Canlet, C., . . . Cravedi, J. P. (2008). Comparison of genistein metabolism in rats and humans using liver microsomes and hepatocytes. *Food Chem Toxicol*, 46(3), 939-948. doi:10.1016/j.fct.2007.10.023
- Busby, M. G., Jeffcoat, A. R., Bloedon, L. T., Koch, M. A., Black, T., Dix, K. J., . . . Zeisel, S. H. (2002). Clinical characteristics and pharmacokinetics of purified soy isoflavones: single-dose administration to healthy men. *Am J Clin Nutr*, 75(1), 126-136. doi:10.1093/ajcn/75.1.126
- Cai, Q., & Wei, H. (1996). Effect of dietary genistein on antioxidant enzyme activities in SENCAR mice. *Nutr Cancer*, 25(1), 1-7. doi:10.1080/01635589609514423
- Calder, P. C. (2006). n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr*, 83(6 Suppl), 1505s-1519s. doi:10.1093/ajcn/83.6.1505S
- Calder, P. C. (2010). Omega-3 Fatty Acids and Inflammatory Processes. *Nutrients*, 2(3), 355-374. doi:10.3390/nu2030355
- Calder, P. C. (2013). n-3 fatty acids, inflammation and immunity: new mechanisms to explain old actions. *Proc Nutr Soc*, 72(3), 326-336. doi:10.1017/s0029665113001031
- Campos, C., Guzmán, R., & López-Fernández, E. (2009). Evaluation of the copper(II) reduction assay using bathocuproinedisulfonic acid disodium salt for the total antioxidant capacity assessment: The CUPRAC-BCS assay: Elsevier Inc.
- Cani, P. D., & Delzenne, N. M. (2009). The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Curr Pharm Des*, 15(13), 1546-1558.
- Carlsohn, A., Rohn, S., Bittmann, F., Raila, J., Mayer, F., & Schweigert, F. J. (2008). Exercise increases the plasma antioxidant capacity of adolescent athletes. *Ann Nutr Metab*, 53(2), 96-103. doi:10.1159/000165357
- Cassidy, A., Bingham, S., & Setchell, K. D. (1994). Biological effects of a diet of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal women. *Am J Clin Nutr*, 60(3), 333-340. doi:10.1093/ajcn/60.3.333
- Cassidy, A., Brown, J. E., Hawdon, A., Faughnan, M. S., King, L. J., Millward, J., . . . Setchell, K. D. (2006). Factors affecting the bioavailability of soy isoflavones in humans after ingestion of physiologically relevant levels from different soy foods. *J Nutr*, 136(1), 45-51. doi:10.1093/jn/136.1.45
- Castro , Junior, C. O., Alves, C. C., Dias, A. T., Alves, L. L., Mazzoccoli, L., . . . Ferreira, A. P. (2012). Immunomodulatory effects and improved prognosis of experimental autoimmune encephalomyelitis after O-tetradecanoyl-genistein treatment. *Int Immunopharmacol*, 12(2), 465-470. doi:10.1016/j.intimp.2011.12.025
- Castro, A. F., & Altenberg, G. A. (1997). Inhibition of drug transport by genistein in multidrug-resistant cells expressing P-glycoprotein. *Biochem Pharmacol*, 53(1), 89-93.
- Cermak, R. (2008). Effect of dietary flavonoids on pathways involved in drug metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 4(1), 17-35. doi:10.1517/17425255.4.1.17
- Chan, H. Y., & Leung, L. K. (2003). A potential protective mechanism of soya isoflavones against 7,12-dimethylbenz[a]anthracene tumour initiation. *Br J Nutr*, 90(2), 457-465.
- Chen, Lin, H., & Hu, M. (2003). Metabolism of flavonoids via enteric recycling: role of intestinal disposition. *J Pharmacol Exp Ther*, 304(3), 1228-1235. doi:10.1124/jpet.102.046409
- Chen , Wang, S., Jia, X., Bajimaya, S., Lin, H., Tam, V. H., & Hu, M. (2005). Disposition of flavonoids via recycling: comparison of intestinal versus hepatic disposition. *Drug Metab Dispos*, 33(12), 1777-1784. doi:10.1124/dmd.105.003673

- Chen , Xie, S., Chen, S., & Zeng, S. (2008). Glucuronidation of flavonoids by recombinant UGT1A3 and UGT1A9. *Biochem Pharmacol*, 76(3), 416-425. doi:10.1016/j.bcp.2008.05.007
- Chen , J., Lin, H., & Hu, M. (2003). Metabolism of flavonoids via enteric recycling: role of intestinal disposition. *J Pharmacol Exp Ther*, 304(3), 1228-1235. doi:10.1124/jpet.102.046409
- Chen, Y., Jia, X., Tan, X., Fan, C., & Hu, M. (2009). [Absorption and metabolism of flavonoids in Herba Epimedii via rat intestinal perfusion model]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 34(22), 2928-2931.
- Chen, Z., Zheng, S., & Li, L. (2014). *Metabolism of Flavonoids in Human: A Comprehensive Review*: Bentham Science Publishers Ltd.
- Cheng, Z., Radominska-Pandya, A., & Tephly, T. R. (1999). Studies on the substrate specificity of human intestinal UDP- glucuronosyltransferases 1A8 and 1A10. *Drug Metab Dispos*, 27(10), 1165-1170.
- Child, R. B., Wilkinson, D. M., Fallowfield, J. L., & Donnelly, A. E. (1998). Elevated serum antioxidant capacity and plasma malondialdehyde concentration in response to a simulated half-marathon run. *Med Sci Sports Exerc*, 30(11), 1603-1607.
- Chun, O. K., Chung, S. J., & Song, W. O. (2007). Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of U.S. adults. *J Nutr*, 137(5), 1244-1252. doi:10.1093/jn/137.5.1244
- Clarkson, P. M. (1995). Antioxidants and physical performance. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 35(1-2), 131-141. doi:10.1080/10408399509527692
- Clavel, T., Fallani, M., Lepage, P., Levenez, F., Mathey, J., Rochet, V., . . . Coxam, V. (2005). Isoflavones and functional foods alter the dominant intestinal microbiota in postmenopausal women. *J Nutr*, 135(12), 2786-2792. doi:10.1093/jn/135.12.2786
- Cleary, M. A., & Wraith, J. E. (1993). Management of mucopolysaccharidosis type III. *Archives of Disease in Childhood*, 69(3), 403-406.
- Coldham, N. G., & Sauer, M. J. (2000). Pharmacokinetics of [(14)C]Genistein in the rat: gender-related differences, potential mechanisms of biological action, and implications for human health. *Toxicol Appl Pharmacol*, 164(2), 206-215. doi:10.1006/taap.2000.8902
- Coldham, N. G., Zhang, A. Q., Key, P., & Sauer, M. J. (2002). Absolute bioavailability of [14C] genistein in the rat; plasma pharmacokinetics of parent compound, genistein glucuronide and total radioactivity. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 27(4), 249-258.
- Coskun, O., Kanter, M., Korkmaz, A., & Oter, S. (2005). Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. *Pharmacol Res*, 51(2), 117-123. doi:10.1016/j.phrs.2004.06.002
- 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(11), 1961-1967. doi:10.1021/jf00035a027
- Crozier, A., Del Rio, D., & Clifford, M. N. (2010). Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Mol Aspects Med*, 31(6), 446-467. doi:10.1016/j.mam.2010.09.007
- Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep*, 26(8), 1001-1043. doi:10.1039/b802662a
- D'Autreux, B., & Toledano, M. B. (2007). ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(10), 813-824. doi:10.1038/nrm2256

- Dai, P., Zhu, L., Luo, F., Lu, L., Li, Q., Wang, L., . . . Liu, Z. (2015). Triple Recycling Processes Impact Systemic and Local Bioavailability of Orally Administered Flavonoids. *AAPS J*, 17(3), 723-736. doi:10.1208/s12248-015-9732-x
- Das, U. N. (2005). COX-2 inhibitors and metabolism of essential fatty acids. *Med Sci Monit*, 11(7), Ra233-237.
- Day, A. J., Canada, F. J., Diaz, J. C., Kroon, P. A., McLauchlan, R., Faulds, C. B., . . . Williamson, G. (2000). Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett*, 468(2-3), 166-170.
- Day, A. J., DuPont, M. S., Ridley, S., Rhodes, M., Rhodes, M. J., Morgan, M. R., & Williamson, G. (1998). Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FEBS Lett*, 436(1), 71-75.
- Day, A. J., Mellon, F., Barron, D., Sarrazin, G., Morgan, M. R., & Williamson, G. (2001). Human metabolism of dietary flavonoids: identification of plasma metabolites of quercetin. *Free Radic Res*, 35(6), 941-952.
- de Ruijter, J., Valstar, M. J., Narajczyk, M., Wegrzyn, G., Kulik, W., Ijlst, L., . . . Wijburg, F. A. (2012). Genistein in Sanfilippo disease: a randomized controlled crossover trial. *Ann Neurol*, 71(1), 110-120. doi:10.1002/ana.22643
- Delgadillo, O'Callaghan Mdel, M., Artuch, R., Montero, R., & Pineda, M. (2011). Genistein supplementation in patients affected by Sanfilippo disease. *J Inherit Metab Dis*, 34(5), 1039-1044. doi:10.1007/s10545-011-9342-4
- Devasagayam, T. P., Boloor, K. K., & Ramasarma, T. (2003). Methods for estimating lipid peroxidation: an analysis of merits and demerits. *Indian J Biochem Biophys*, 40(5), 300-308.
- deVere White, R. W., Tsodikov, A., Stapp, E. C., Soares, S. E., Fujii, H., & Hackman, R. M. (2010). Effects of a high dose, aglycone-rich soy extract on prostate-specific antigen and serum isoflavone concentrations in men with localized prostate cancer. *Nutr Cancer*, 62(8), 1036-1043. doi:10.1080/01635581.2010.492085
- Dinsdale, E. C., & Ward, W. E. (2010). Early Exposure to Soy Isoflavones and Effects on Reproductive Health: A Review of Human and Animal Studies. *Nutrients*, 2(11), 1156-1187. doi:10.3390/nu2111156
- DiRosario, J., Divers, E., Wang, C., Etter, J., Charrier, A., Jukkola, P., . . . Fu, H. (2009). Innate and adaptive immune activation in the brain of MPS IIIB mouse model. *J Neurosci Res*, 87(4), 978-990. doi:10.1002/jnr.21912
- Doerge, D. R., Chang, H. C., Churchwell, M. I., & Holder, C. L. (2000). Analysis of soy isoflavone conjugation in vitro and in human blood using liquid chromatography-mass spectrometry. *Drug Metab Dispos*, 28(3), 298-307.
- Dong, Y. S., Wang, J. L., Feng, D. Y., Qin, H. Z., Wen, H., Yin, Z. M., . . . Li, C. (2014). Protective effect of quercetin against oxidative stress and brain edema in an experimental rat model of subarachnoid hemorrhage. *Int J Med Sci*, 11(3), 282-290. doi:10.7150/ijms.7634
- Dozor, A. J. (2010). The role of oxidative stress in the pathogenesis and treatment of asthma. *Ann N Y Acad Sci*, 1203, 133-137. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05562.x
- Duda-Chodak, A. (2012). The inhibitory effect of polyphenols on human gut microbiota. *J Physiol Pharmacol*, 63(5), 497-503.
- Duthie, G. G. (1999). Parsley, polyphenols and nutritional antioxidants. *Br J Nutr*, 81(6), 425-426.

- Duthie, G. G., Duthie, S. J., & Kyle, J. A. (2000). Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutr Res Rev*, 13(1), 79-106. doi:10.1079/095442200108729016
- Ellulu, M. S., Khaza'ai, H., Abed, Y., Rahmat, A., Ismail, P., & Ranneh, Y. (2015). Role of fish oil in human health and possible mechanism to reduce the inflammation. *Inflammopharmacology*, 23(2-3), 79-89. doi:10.1007/s10787-015-0228-1
- Enokizono, J., Kusuhara, H., & Sugiyama, Y. (2007). Effect of breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) on the disposition of phytoestrogens. *Mol Pharmacol*, 72(4), 967-975. doi:10.1124/mol.107.034751
- Erdman, J. W., Jr., Badger, T. M., Lampe, J. W., Setchell, K. D., & Messina, M. (2004). Not all soy products are created equal: caution needed in interpretation of research results. *J Nutr*, 134(5), 1229s-1233s. doi:10.1093/jn/134.5.1229s
- Erlund, I., Kosonen, T., Alftan, G., Maenpaa, J., Perttunen, K., Kenraali, J., . . . Aro, A. (2000). Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol*, 56(8), 545-553.
- Espin, J. C., Gonzalez-Sarrias, A., & Tomas-Barberan, F. A. (2017). The gut microbiota: A key factor in the therapeutic effects of (poly)phenols. *Biochem Pharmacol*, 139, 82-93. doi:10.1016/j.bcp.2017.04.033
- Esterbauer, H., Schaur, R. J., & Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*, 11(1), 81-128.
- Faughnan, M. S., Hawdon, A., Ah-Singh, E., Brown, J., Millward, D. J., & Cassidy, A. (2004). Urinary isoflavone kinetics: the effect of age, gender, food matrix and chemical composition. *Br J Nutr*, 91(4), 567-574. doi:10.1079/bjn20041087
- Ferrandiz, M. L., & Alcaraz, M. J. (1991). Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agents Actions*, 32(3-4), 283-288.
- Figueiredo-Pereira, M. E., Corwin, C., & Babich, J. (2016). Prostaglandin J2: a potential target for halting inflammation-induced neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci*, 1363, 125-137. doi:10.1111/nyas.12987
- Foster, B. C., Vandenhoek, S., Hana, J., Krantis, A., Akhtar, M. H., Bryan, M., . . . Arnason, J. T. (2003). In vitro inhibition of human cytochrome P450-mediated metabolism of marker substrates by natural products. *Phytomedicine*, 10(4), 334-342. doi:10.1078/094471103322004839
- Franke, A. A., Lai, J. F., & Halm, B. M. (2014). Absorption, distribution, metabolism, and excretion of isoflavonoids after soy intake. *Arch Biochem Biophys*, 559, 24-28. doi:10.1016/j.abb.2014.06.007
- Frijhoff, J., Winyard, P. G., Zarkovic, N., Davies, S. S., Stocker, R., Cheng, D., . . . Ghezzi, P. (2015). Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal*, 23(14), 1144-1170. doi:10.1089/ars.2015.6317
- Friso, A., Tomanin, R., Salvalaio, M., & Scarpa, M. (2010). Genistein reduces glycosaminoglycan levels in a mouse model of mucopolysaccharidosis type II. *Br J Pharmacol*, 159(5), 1082-1091. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00565.x
- Fuhr, U., Klittich, K., & Staib, A. H. (1993). Inhibitory effect of grapefruit juice and its bitter principal, naringenin, on CYP1A2 dependent metabolism of caffeine in man. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 35(4), 431-436.

- Gabriel, S. E., & Michaud, K. (2009). Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther*, 11(3), 229. doi:10.1186/ar2669
- Gadek, J. E., DeMichele, S. J., Karlstad, M. D., Pacht, E. R., Donahoe, M., Albertson, T. E., . . . Noursalehi, M. (1999). Effect of enteral feeding with eicosapentaenoic acid, gamma-linolenic acid, and antioxidants in patients with acute respiratory distress syndrome. Enteral Nutrition in ARDS Study Group. *Crit Care Med*, 27(8), 1409-1420.
- Gaffke, L., Pierzynowska, K., Piotrowska, E., & Wegrzyn, G. (2018). How close are we to therapies for Sanfilippo disease? *Metab Brain Dis*, 33(1), 1-10. doi:10.1007/s11011-017-0111-4
- Galasso, A. (2012). *Randomisierte, placebo-kontrollierte Pilotstudie zur Erhebung der chemopräventiven Wirkung von diätetisch verabreichtem Genistein und Quercetin bei Männern mit erhöhten PSA-Werten.* (Masterthesis), Universität Hohenheim Stuttgart-Hohenheim.
- Garbuzova-Davis, S., Mirtyl, S., Sallot, S. A., Hernandez-Ontiveros, D. G., Haller, E., & Sanberg, P. R. (2013). Blood-brain barrier impairment in MPS III patients. *BMC Neurology*, 13, 174-174. doi:10.1186/1471-2377-13-174
- 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.
- GENiSIS2013. *EU Clinical Trials Register*, 2013-001479-18.
- Genovese, M. I., Barbosa, A. C., Pinto Mda, S., & Lajolo, F. M. (2007). Commercial soy protein ingredients as isoflavone sources for functional foods. *Plant Foods Hum Nutr*, 62(2), 53-58. doi:10.1007/s11130-007-0041-0
- Ghosh, A., Shapiro, E., Rust, S., Delaney, K., Parker, S., Shaywitz, A. J., . . . Jones, S. A. (2017). Recommendations on clinical trial design for treatment of Mucopolysaccharidosis Type III. *Orphanet J Rare Dis*, 12(1), 117. doi:10.1186/s13023-017-0675-4
- Gonzalez, R., Ballester, I., Lopez-Posadas, R., Suarez, M. D., Zarzuelo, A., Martinez-Augustin, O., & Sanchez de Medina, F. (2011). Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 51(4), 331-362. doi:10.1080/10408390903584094
- Grace, P. B., Taylor, J. I., Botting, N. P., Fryatt, T., Oldfield, M. F., Al-Maharik, N., & Bingham, S. A. (2003). Quantification of isoflavones and lignans in serum using isotope dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 17(12), 1350-1357. doi:10.1002/rcm.1059
- Gradolatto, A., Canivenc-Lavier, M. C., Basly, J. P., Siess, M. H., & Teyssier, C. (2004). Metabolism of apigenin by rat liver phase I and phase II enzymes and by isolated perfused rat liver. *Drug Metab Dispos*, 32(1), 58-65. doi:10.1124/dmd.32.1.58
- Graefe, E. U., Wittig, J., Mueller, S., Riethling, A. K., Uehleke, B., Drewelow, B., . . . Veit, M. (2001). Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *J Clin Pharmacol*, 41(5), 492-499.
- Graham, G. G., Morales, E., Acevedo, G., & Cordano, A. (1970). Dietary protein quality in infants and children: VI. isolated soy protein milk. *American Journal of Diseases of Children*, 120(5), 419-423. doi:10.1001/archpedi.1970.02100100083007
- Gu, L., House, S. E., Prior, R. L., Fang, N., Ronis, M. J., Clarkson, T. B., . . . Badger, T. M. (2006). Metabolic phenotype of isoflavones differ among female rats, pigs, monkeys, and women. *J Nutr*, 136(5), 1215-1221. doi:10.1093/jn/136.5.1215

- Guo, Q., Rimbach, G., Moini, H., Weber, S., & Packer, L. (2002). ESR and cell culture studies on free radical-scavenging and antioxidant activities of isoflavonoids. *Toxicology*, 179(1-2), 171-180.
- Halliwell, B., & Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*, 142(2), 231-255. doi:10.1038/sj.bjp.0705776
- Hamalainen, M., Nieminen, R., Asmawi, M. Z., Vuorela, P., Vapaatalo, H., & Moilanen, E. (2011). Effects of flavonoids on prostaglandin E2 production and on COX-2 and mPGES-1 expressions in activated macrophages. *Planta Med*, 77(13), 1504-1511. doi:10.1055/s-0030-1270762
- Hämäläinen, M., Nieminen, R., Vuorela, P., Heinonen, M., & Moilanen, E. (2007). Anti-Inflammatory Effects of Flavonoids: Genistein, Kaempferol, Quercetin, and Daidzein Inhibit STAT-1 and NF-κB Activations, Whereas Flavone, Isorhamnetin, Naringenin, and Pelargonidin Inhibit only NF-κB Activation along with Their Inhibitory Effect on iNOS Expression and NO Production in Activated Macrophages. *Mediators of Inflammation*, 2007, 45673. doi:10.1155/2007/45673
- Hänsel, R., Sticher, Otto. (2007). *Pharmakognosie - Phytopharmazie* (8 ed.): Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Harasym, J., & Oledzki, R. (2014). Effect of fruit and vegetable antioxidants on total antioxidant capacity of blood plasma. *Nutrition*, 30(5), 511-517. doi:10.1016/j.nut.2013.08.019
- Health, P. a. C. (2009). Concerns for the use of soy-based formulas in infant nutrition. *Paediatrics & Child Health*, 14(2), 109-113.
- Helsby, N. A., Chipman, J. K., Gescher, A., & Kerr, D. (1998). Inhibition of mouse and human CYP 1A- and 2E1-dependent substrate metabolism by the isoflavonoids genistein and equol. *Food Chem Toxicol*, 36(5), 375-382.
- Heneka, M. T., Carson, M. J., El Khoury, J., Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., . . . Kummer, M. P. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*, 14(4), 388-405. doi:10.1016/s1474-4422(15)70016-5
- Hermann , K. (1976). Flavonols and flavones in food plants: a review†. *International Journal of Food Science & Technology*, 11(5), 433-448. doi:doi:10.1111/j.1365-2621.1976.tb00743.x
- Herrmann, K. (1992). Über die Gehalte der hauptsächlichen Pflanzenphenole im Obst. Flüssiges Obst. . 66 – 70.
- Hertog, M. G., Hollman, P. C., Katan, M. B., & Kromhout, D. (1993). Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr Cancer*, 20(1), 21-29. doi:10.1080/01635589309514267
- Higuchi W.I., H., N.F., Park, J.Y. , Komiya, I. . (1981). *Rate-limiting steps and factors in drug absorption*. New York Drug Absorption, ADIS Press.
- Ho, N. F. H. P., J.Y. Ni, P.F. Higuchi, W.I. (1983). Advancing quantitative and mechanistic approaches in interfacing gastrointestinal drug absorption studies in animals and humans in Animal models for oral drug delivery in man: In situ and in vivo approaches. Edited by William Crouthamel and Allen C. Sarapu. American Pharmaceutical Association, Academy of Pharmaceutical Sciences,. *Journal of Pharmaceutical Sciences*.
- Hoey, L., Rowland, I. R., Lloyd, A. S., Clarke, D. B., & Wiseman, H. (2004). Influence of soya-based infant formula consumption on isoflavone and gut microflora metabolite concentrations in urine and on faecal microflora composition and metabolic activity in infants and children. *Br J Nutr*, 91(4), 607-616. doi:10.1079/bjn20031083

- Hollman, P. C., de Vries, J. H., van Leeuwen, S. D., Mengelers, M. J., & Katan, M. B. (1995). Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr*, 62(6), 1276-1282. doi:10.1093/ajcn/62.6.1276
- Hosoda, K., Furuta, T., & Ishii, K. (2010). Simultaneous determination of glucuronic acid and sulfuric acid conjugated metabolites of daidzein and genistein in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 878(7-8), 628-636. doi:10.1016/j.jchromb.2010.01.028
- Hosoda, K., Furuta, T., & Ishii, K. (2011). Metabolism and disposition of isoflavone conjugated metabolites in humans after ingestion of kinako. *Drug Metab Dispos*, 39(9), 1762-1767. doi:10.1124/dmd.111.038281
- Hosoda, K., Furuta, T., Yokokawa, A., & Ishii, K. (2010). Identification and quantification of daidzein-7-glucuronide-4'-sulfate, genistein-7-glucuronide-4'-sulfate and genistein-4',7-diglucuronide as major metabolites in human plasma after administration of kinako. *Anal Bioanal Chem*, 397(4), 1563-1572. doi:10.1007/s00216-010-3714-8
- Hosoda, K., Furuta, T., Yokokawa, A., Ogura, K., Hiratsuka, A., & Ishii, K. (2008). Plasma profiling of intact isoflavone metabolites by high-performance liquid chromatography and mass spectrometric identification of flavone glycosides daidzin and genistin in human plasma after administration of kinako. *Drug Metab Dispos*, 36(8), 1485-1495. doi:10.1124/dmd.108.021006
- Hu , M. (2007). Commentary: Bioavailability of Flavonoids and Polyphenols: Call to Arms. *Molecular pharmaceutics*, 4(6), 803-806. doi:10.1021/mp7001363
- Hu, M. (2007). Commentary: Bioavailability of Flavonoids and Polyphenols: Call to Arms. *Molecular pharmaceutics*, 4(6), 803-806. doi:10.1021/mp7001363
- Hu, M., Krausz, K., Chen, J., Ge, X., Li, J., Gelboin, H. L., & Gonzalez, F. J. (2003). Identification of CYP1A2 as the main isoform for the phase I hydroxylated metabolism of genistein and a prodrug converting enzyme of methylated isoflavones. *Drug Metab Dispos*, 31(7), 924-931. doi:10.1124/dmd.31.7.924
- Hussain, M., Banerjee, M., Sarkar, F. H., Djuric, Z., Pollak, M. N., Doerge, D., . . . Kucuk, O. (2003). Soy isoflavones in the treatment of prostate cancer. *Nutr Cancer*, 47(2), 111-117. doi:10.1207/s15327914nc4702_1
- Ialongo, C. (2017). *Preanalytic of total antioxidant capacity assays performed in serum, plasma, urine and saliva*: Elsevier Inc.
- Ide, T., Tsutsui, H., Ohashi, N., Hayashidani, S., Suematsu, N., Tsuchihashi, M., . . . Takeshita, A. (2002). Greater oxidative stress in healthy young men compared with premenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22(3), 438-442.
- II, N. V. (2008). Nationale Verzehrsstudie II. Ergebnisbericht, Teil 1: Die bundesweite Befragung zur Ernährung von Jugendlichen und Erwachsenen.
- Ivanova, D., Zhelev, Z., Aoki, I., Bakalova, R., & Higashi, T. (2016). Overproduction of reactive oxygen species - obligatory or not for induction of apoptosis by anticancer drugs. *Chinese Journal of Cancer Research*, 28(4), 383-396. doi:10.21147/j.issn.1000-9604.2016.04.01
- Izukawa, T., Nakajima, M., Fujiwara, R., Yamanaka, H., Fukami, T., Takamiya, M., . . . Yokoi, T. (2009). Quantitative analysis of UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A and UGT2B expression levels in human livers. *Drug Metab Dispos*, 37(8), 1759-1768. doi:10.1124/dmd.109.027227

- Izumi, T., Piskula, M. K., Osawa, S., Obata, A., Tobe, K., Saito, M., . . . Kikuchi, M. (2000). Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *J Nutr*, 130(7), 1695-1699. doi:10.1093/jn/130.7.1695
- Jakobkiewicz-Banecka , Gabig-Ciminska, M., Kloska, A., Malinowska, M., Piotrowska, E., Banecka-Majkutewicz, Z., . . . Wegrzyn, G. (2016). Glycosaminoglycans and mucopolysaccharidoses type III. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 21, 1393-1409.
- Jakobkiewicz-Banecka , Piotrowska, E., Narajczyk, M., Baranska, S., & Wegrzyn, G. (2009). Genistein-mediated inhibition of glycosaminoglycan synthesis, which corrects storage in cells of patients suffering from mucopolysaccharidoses, acts by influencing an epidermal growth factor-dependent pathway. *J Biomed Sci*, 16, 26. doi:10.1186/1423-0127-16-26
- Jakobkiewicz-Banecka, Wegrzyn, A., & Wegrzyn, G. (2007). Substrate deprivation therapy: a new hope for patients suffering from neuronopathic forms of inherited lysosomal storage diseases. *J Appl Genet*, 48(4), 383-388. doi:10.1007/bf03195237
- James, M., Proudman, S., & Cleland, L. (2010). Fish oil and rheumatoid arthritis: past, present and future. *Proc Nutr Soc*, 69(3), 316-323. doi:10.1017/s0029665110001564
- Janero, D. R. (1990). Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med*, 9(6), 515-540.
- Javanbakht, M. H., Sadria, R., Djalali, M., Derakhshanian, H., Hosseinzadeh, P., Zarei, M., . . . Mirshafiey, A. (2014). Soy protein and genistein improves renal antioxidant status in experimental nephrotic syndrome. *Nefrologia*, 34(4), 483-490. doi:10.3265/Nefrologia.pre2014.Jun.12051
- Jeong , Lee, H. H., Han, M. H., Kim, G. Y., Kim, W. J., & Choi, Y. H. (2014). Anti-inflammatory effects of genistein via suppression of the toll-like receptor 4-mediated signaling pathway in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. *Chem Biol Interact*, 212, 30-39. doi:10.1016/j.cbi.2014.01.012
- Jeong, Liu, X., Jia, X., Chen, J., & Hu, M. (2005). Coupling of conjugating enzymes and efflux transporters: impact on bioavailability and drug interactions. *Curr Drug Metab*, 6(5), 455-468.
- Jiang, W., & Hu, M. (2012). Mutual interactions between flavonoids and enzymatic and transporter elements responsible for flavonoid disposition via phase II metabolic pathways. *RSC Adv*, 2(21), 7948-7963. doi:10.1039/c2ra01369j
- Jiang , W., & Hu , M. (2012). *Mutual interactions between flavonoids and enzymatic and transporter elements responsible for flavonoid disposition via phase II metabolic pathways*.
- Jones, S. A., Breen, C., Heap, F., Rust, S., de Ruijter, J., Tump, E., . . . Wijburg, F. A. (2016). A phase 1/2 study of intrathecal heparan-N-sulfatase in patients with mucopolysaccharidosis IIIA. *Mol Genet Metab*, 118(3), 198-205. doi:10.1016/j.ymgme.2016.05.006
- Jowko, E., Dlugolecka, B., Makaruk, B., & Cieslinski, I. (2015). The effect of green tea extract supplementation on exercise-induced oxidative stress parameters in male sprinters. *Eur J Nutr*, 54(5), 783-791. doi:10.1007/s00394-014-0757-1
- Justino, G. C., Santos, M. R., Canario, S., Borges, C., Florencio, M. H., & Mira, L. (2004). Plasma quercetin metabolites: structure-antioxidant activity relationships. *Arch Biochem Biophys*, 432(1), 109-121. doi:10.1016/j.abb.2004.09.007
- Kajita, M., Domin, H., Gryniewicz, G., & Lason, W. (2007). Genistein inhibits glutamate-induced apoptotic processes in primary neuronal cell cultures: an involvement of aryl hydrocarbon receptor and estrogen receptor/glycogen synthase kinase-3beta

- intracellular signaling pathway. *Neuroscience*, 145(2), 592-604. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.11.059
- Kalaiselvan, V., Kalaivani, M., Vijayakumar, A., Sureshkumar, K., & Venkateskumar, K. (2010). Current knowledge and future direction of research on soy isoflavones as a therapeutic agents. *Pharmacogn Rev*, 4(8), 111-117. doi:10.4103/0973-7847.70900
- Kamboh, A. A., Hang, S. Q., Bakhetgul, M., & Zhu, W. Y. (2013). Effects of genistein and hesperidin on biomarkers of heat stress in broilers under persistent summer stress. *Poult Sci*, 92(9), 2411-2418. doi:10.3382/ps.2012-02960
- Kander, M. C., Cui, Y., & Liu, Z. (2017). Gender difference in oxidative stress: a new look at the mechanisms for cardiovascular diseases. *J Cell Mol Med*, 21(5), 1024-1032. doi:10.1111/jcmm.13038
- Kapoor, M., Clarkson, A. N., Sutherland, B. A., & Appleton, I. (2005). The role of antioxidants in models of inflammation: emphasis on L-arginine and arachidonic acid metabolism. *Inflammopharmacology*, 12(5-6), 505-519. doi:10.1163/156856005774382797
- Kaur, U., Banerjee, P., Bir, A., Sinha, M., Biswas, A., & Chakrabarti, S. (2015). Reactive oxygen species, redox signaling and neuroinflammation in Alzheimer's disease: the NF-kappaB connection. *Curr Top Med Chem*, 15(5), 446-457.
- Kawabata, K., Sugiyama, Y., Sakano, T., & Ohigashi, H. (2013). Flavonols enhanced production of anti-inflammatory substance(s) by *Bifidobacterium adolescentis*: prebiotic actions of galangin, quercetin, and fisetin. *Biofactors*, 39(4), 422-429. doi:10.1002/biof.1081
- Khanna, S., Jaiswal, K. S., & Gupta, B. (2017). Managing Rheumatoid Arthritis with Dietary Interventions. *Frontiers in Nutrition*, 4, 52. doi:10.3389/fnut.2017.00052
- Kim, Dodsworth, C., Paras, A., & Burton, B. K. (2013). High dose genistein aglycone therapy is safe in patients with mucopolysaccharidoses involving the central nervous system. *Mol Genet Metab*, 109(4), 382-385. doi:10.1016/j.ymgme.2013.06.012
- Kim, B. G., Yang, S. M., Kim, S. Y., Cha, M. N., & Ahn, J. H. (2015). Biosynthesis and production of glycosylated flavonoids in *Escherichia coli*: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*, 99(7), 2979-2988. doi:10.1007/s00253-015-6504-6
- Kim, H., Peterson, T. G., & Barnes, S. (1998). Mechanisms of action of the soy isoflavone genistein: emerging role for its effects via transforming growth factor beta signaling pathways. *Am J Clin Nutr*, 68(6 Suppl), 1418s-1425s. doi:10.1093/ajcn/68.6.1418S
- King, B., Hassiotis, S., Rozakis, T., Beard, H., Trim, P. J., Snel, M. F., . . . Hemsley, K. M. (2016). Low-dose, continuous enzyme replacement therapy ameliorates brain pathology in the neurodegenerative lysosomal disorder mucopolysaccharidosis type IIIA. *J Neurochem*, 137(3), 409-422. doi:10.1111/jnc.13533
- Kloska, A., Jakóbiewicz-Banecka, J., & Narajczyk, M. (2011). *Effects of flavonoids on glycosaminoglycan synthesis: implications for substrate reduction therapy in Sanfilippo disease and other mucopolysaccharidoses*. Boston: Springer US.
- Knaggs, A. R. (2003). The biosynthesis of shikimate metabolites. *Nat Prod Rep*, 20, 119-136.
- Koletzko, B., Ernährungskommission der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und, J., & Ernährungskommission der Schweizerischen Gesellschaft für, P. (2006). Stellungnahme zur Verwendung von Säuglingsnahrungen auf Sojaeiweißbasis. *Monatsschrift Kinderheilkunde*, 154(9), 913-916. doi:10.1007/s00112-006-1409-1
- Korbecki, J., Baranowska-Bosiacka, I., Gutowska, I., & Chlubek, D. (2013). The effect of reactive oxygen species on the synthesis of prostanoids from arachidonic acid. *J Physiol Pharmacol*, 64(4), 409-421.

- Kremer, J. M., Lawrence, D. A., Petrillo, G. F., Litts, L. L., Mullaly, P. M., Rynes, R. I., . . . et al. (1995). Effects of high-dose fish oil on rheumatoid arthritis after stopping nonsteroidal antiinflammatory drugs. Clinical and immune correlates. *Arthritis Rheum*, 38(8), 1107-1114.
- Kuiper, G. G., Lemmen, J. G., Carlsson, B., Corton, J. C., Safe, S. H., van der Saag, P. T., . . . Gustafsson, J. A. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*, 139(10), 4252-4263. doi:10.1210/endo.139.10.6216
- 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.
- Kumar, Krischer, J. P., Allen, K., Riccardi, D., Besterman-Dahan, K., Salup, R., . . . Pow-Sang, J. (2007). Safety of purified isoflavones in men with clinically localized prostate cancer. *Nutr Cancer*, 59(2), 169-175. doi:10.1080/01635580701432660
- Kumar , R., Verma, V., & Jain, A. (2011). *Synergistic chemoprotective mechanisms of dietary phytoestrogens in a select combination against prostate cancer*: Elsevier Inc.
- Lagkouvardos, I., Fischer, S., Kumar, N., & Clavel, T. (2017). Rhea: a transparent and modular R pipeline for microbial profiling based on 16S rRNA gene amplicons. *PeerJ*, 5, e2836. doi:10.7717/peerj.2836
- Lasekan, J. B., Ostrom, K. M., Jacobs, J. R., Blatter, M. M., Ndife, L. I., Gooch, W. M., 3rd, & Cho, S. (1999). Growth of newborn, term infants fed soy formulas for 1 year. *Clin Pediatr (Phila)*, 38(10), 563-571. doi:10.1177/000992289903801001
- Leeuwenburgh, C., & Heinecke, J. W. (2001). Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Curr Med Chem*, 8(7), 829-838.
- Leslie, E. M., Deeley, R. G., & Cole, S. P. (2005). Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol*, 204(3), 216-237. doi:10.1016/j.taap.2004.10.012
- Li, J., Gang, D., Yu, X., Hu, Y., Yue, Y., Cheng, W., . . . Zhang, P. (2013). Genistein: the potential for efficacy in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*, 32(5), 535-540. doi:10.1007/s10067-012-2148-4
- Liang, H. W., Qiu, S. F., Shen, J., Sun, L. N., Wang, J. Y., Bruce, I. C., & Xia, Q. (2008). Genistein attenuates oxidative stress and neuronal damage following transient global cerebral ischemia in rat hippocampus. *Neurosci Lett*, 438(1), 116-120. doi:10.1016/j.neulet.2008.04.058
- Lichtenstein, A. H. (1998). Soy protein, isoflavones and cardiovascular disease risk. *J Nutr*, 128(10), 1589-1592. doi:10.1093/jn/128.10.1589
- Liggins, J., Bluck, L. J., Runswick, S., Atkinson, C., Coward, W. A., & Bingham, S. A. (2000). Daidzein and genistein content of fruits and nuts. *J Nutr Biochem*, 11(6), 326-331.
- Liu, Y., & Hu, M. (2002). Absorption and metabolism of flavonoids in the caco-2 cell culture model and a perused rat intestinal model. *Drug Metab Dispos*, 30(4), 370-377.
- Lykkesfeldt, J. (2007). Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clin Chim Acta*, 380(1-2), 50-58. doi:10.1016/j.cca.2007.01.028
- MacGregor, C. A., Canney, P. A., Patterson, G., McDonald, R., & Paul, J. (2005). A randomised double-blind controlled trial of oral soy supplements versus placebo for treatment of

- menopausal symptoms in patients with early breast cancer. *Eur J Cancer*, 41(5), 708-714. doi:10.1016/j.ejca.2005.01.005
- Maehre, H. K., Jensen, I.-J., Elvevoll, E. O., & Eilertsen, K.-E. (2015). ω-3 Fatty Acids and Cardiovascular Diseases: Effects, Mechanisms and Dietary Relevance. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9), 22636-22661. doi:10.3390/ijms160922636
- Malinowska, M., Wilkinson, F. L., Bennett, W., Langford-Smith, K. J., O'Leary, H. A., Jakobkiewicz-Banecka, J., . . . Bigger, B. W. (2009). Genistein reduces lysosomal storage in peripheral tissues of mucopolysaccharide IIIB mice. *Mol Genet Metab*, 98(3), 235-242. doi:10.1016/j.ymgme.2009.06.013
- Malinowska, M., Wilkinson, F. L., Langford-Smith, K. J., Langford-Smith, A., Brown, J. R., Crawford, B. E., . . . Bigger, B. W. (2010). Genistein improves neuropathology and corrects behaviour in a mouse model of neurodegenerative metabolic disease. *PLoS One*, 5(12), e14192. doi:10.1371/journal.pone.0014192
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., & Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 79(5), 727-747. doi:10.1093/ajcn/79.5.727
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Remesy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr*, 81(1 Suppl), 230s-242s. doi:10.1093/ajcn/81.1.230S
- Mandal, S. M., Chakraborty, D., & Dey, S. (2010). Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant Signal Behav*, 5(4), 359-368.
- Mantovani, D., Cardozo Filho, L., Santos, L. C., de Souza, V. L., & Watanabe, C. S. (2009). Chromatographic quantification of isoflavone content from soy derivates using HPLC technique. *J Chromatogr Sci*, 47(9), 766-769.
- Manzel, A., Muller, D. N., Hafler, D. A., Erdman, S. E., Linker, R. A., & Kleinewietfeld, M. (2014). Role of "Western diet" in inflammatory autoimmune diseases. *Curr Allergy Asthma Rep*, 14(1), 404. doi:10.1007/s11882-013-0404-6
- Mao, Q. (2008). BCRP/ABCG2 in the placenta: expression, function and regulation. *Pharm Res*, 25(6), 1244-1255. doi:10.1007/s11095-008-9537-z
- Marini, H., Minutoli, L., Polito, F., Bitto, A., Altavilla, D., Atteritano, M., . . . Squadrato, F. (2007). Effects of the phytoestrogen genistein on bone metabolism in osteopenic postmenopausal women: a randomized trial. *Ann Intern Med*, 146(12), 839-847.
- Marnett, L. J. (1999). Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res*, 424(1-2), 83-95.
- Martins, C., Hulkova, H., Dridi, L., Dormoy-Raclet, V., Grigoryeva, L., Choi, Y., . . . Pshezhetsky, A. V. (2015). Neuroinflammation, mitochondrial defects and neurodegeneration in mucopolysaccharidosis III type C mouse model. *Brain*, 138(Pt 2), 336-355. doi:10.1093/brain/awu355
- Marzatico, F., Pansarasa, O., Bertorelli, L., Somenzini, L., & Della Valle, G. (1997). Blood free radical antioxidant enzymes and lipid peroxides following long-distance and lactacidemic performances in highly trained aerobic and sprint athletes. *J Sports Med Phys Fitness*, 37(4), 235-239.
- Matthies, A., Loh, G., Blaut, M., & Braune, A. (2012). Daidzein and genistein are converted to equol and 5-hydroxy-equol by human intestinal *Slackia isoflavoniconvertens* in gnotobiotic rats. *J Nutr*, 142(1), 40-46. doi:10.3945/jn.111.148247
- McGraw, N. J., Krul, E. S., Grunz-Borgmann, E., & Parrish, A. R. (2016). Soy-based renoprotection. *World J Nephrol*, 5(3), 233-257. doi:10.5527/wjn.v5.i3.233

- Meng, S., Wu, B., Singh, R., Yin, T., Morrow, J. K., Zhang, S., & Hu, M. (2012). SULT1A3-mediated regiospecific 7-O-sulfation of flavonoids in Caco-2 cells can be explained by the relevant molecular docking studies. *Mol Pharm*, 9(4), 862-873. doi:10.1021/mp200400s
- Mesia-Vela, S., & Kauffman, F. C. (2003). Inhibition of rat liver sulfotransferases SULT1A1 and SULT2A1 and glucuronosyltransferase by dietary flavonoids. *Xenobiotica*, 33(12), 1211-1220. doi:10.1080/00498250310001615762
- Mikkola, T. S., & Clarkson, T. B. (2002). Estrogen replacement therapy, atherosclerosis, and vascular function. *Cardiovasc Res*, 53(3), 605-619.
- Miles, E. A., & Calder, P. C. (2015). Fatty acids, lipid emulsions and the immune and inflammatory systems. *World Rev Nutr Diet*, 112, 17-30. doi:10.1159/000365426
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (Lond)*, 84(4), 407-412.
- Miron, A., Aprotozoiae, A. C., Trifan, A., & Xiao, J. (2017). Flavonoids as modulators of metabolic enzymes and drug transporters. *Ann N Y Acad Sci*, 1398(1), 152-167. doi:10.1111/nyas.13384
- Mitchell, J. H., Gardner, P. T., McPhail, D. B., Morrice, P. C., Collins, A. R., & Duthie, G. G. (1998). Antioxidant efficacy of phytoestrogens in chemical and biological model systems. *Arch Biochem Biophys*, 360(1), 142-148. doi:10.1006/abbi.1998.0951
- Mitra, S., Forster-Fromme, K., Damms-Machado, A., Scheurenbrand, T., Biskup, S., Huson, D. H., & Bischoff, S. C. (2013). Analysis of the intestinal microbiota using SOLiD 16S rRNA gene sequencing and SOLiD shotgun sequencing. *BMC Genomics*, 14 Suppl 5, S16. doi:10.1186/1471-2164-14-s5-s16
- Moon, Nakata, R., Oshima, S., Inakuma, T., & Terao, J. (2000). Accumulation of quercetin conjugates in blood plasma after the short-term ingestion of onion by women. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 279(2), R461-467. doi:10.1152/ajpregu.2000.279.2.R461
- Moon, Y. J., Wang, X., & Morris, M. E. (2006). Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicol In Vitro*, 20(2), 187-210. doi:10.1016/j.tiv.2005.06.048
- Morris, M. E., & Zhang, S. (2006). Flavonoid-drug interactions: effects of flavonoids on ABC transporters. *Life Sci*, 78(18), 2116-2130. doi:10.1016/j.lfs.2005.12.003
- Mrakic-Sposta, S., Gussoni, M., Moretti, S., Pratali, L., Giardini, G., Tacchini, P., . . . Vezzoli, A. (2015). Effects of Mountain Ultra-Marathon Running on ROS Production and Oxidative Damage by Micro-Invasive Analytic Techniques. *PLoS One*, 10(11), e0141780. doi:10.1371/journal.pone.0141780
- Mukund, V., Mukund, D., Sharma, V., Mannarapu, M., & Alam, A. (2017). Genistein: Its role in metabolic diseases and cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 119, 13-22. doi:<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.09.004>
- Murota, K., & Terao, J. (2003). Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Arch Biochem Biophys*, 417(1), 12-17.
- Murphy, E. A., Velazquez, K. T., & Herbert, K. M. (2015). Influence of high-fat diet on gut microbiota: a driving force for chronic disease risk. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 18(5), 515-520. doi:10.1097/MCO.0000000000000209
- Nagao, T., Yoshimura, S., Saito, Y., Nakagomi, M., Usumi, K., & Ono, H. (2001). Reproductive effects in male and female rats of neonatal exposure to genistein. *Reprod Toxicol*, 15(4), 399-411.

- Nagy, K., Zheng, C., Bolognesi, C., & Adam, B. (2019). Interlaboratory evaluation of the genotoxic properties of pencycuron, a commonly used phenylurea fungicide. *Sci Total Environ*, 647, 1052-1057. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.08.067
- Nam, T. G. (2011). Lipid peroxidation and its toxicological implications. *Toxicol Res*, 27(1), 1-6. doi:10.5487/tr.2011.27.1.001
- NCH, N. C. s. H. (2016). *Phase I/II Gene Transfer Clinical Trial of scAAV9.U1a.hSGSH for Mucopolysaccharidosis (MPS) IIIA.* Retrieved from <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02716246?cond=Sanfilippo+A>
- Nemeth, K., Plumb, G. W., Berrin, J. G., Juge, N., Jacob, R., Naim, H. Y., . . . Kroon, P. A. (2003). Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur J Nutr*, 42(1), 29-42. doi:10.1007/s00394-003-0397-3
- Neufeld. (2001). The mucopolysaccharidosis. . In B. A. Scriver CR, Sly WS and Valle D (Ed.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (pp. 3421-3452.). New York: McGraw-Hill Co.,
- Neufeld, E. F. (1991). Lysosomal storage diseases. *Annu Rev Biochem*, 60, 257-280. doi:10.1146/annurev.bi.60.070191.001353
- Newman, W. P., Middaugh, J. P., Propst, M. T., & Rogers, D. R. (1993). Atherosclerosis in Alaska Natives and non-natives. *Lancet*, 341(8852), 1056-1057.
- Niess. (2002). *Freie Radikale und oxidativer Stress bei körperlicher Belastung und Trainingsanpassung - Eine aktuelle Übersicht* (Vol. 53). Köln.
- Niess, & Simon, P. (2007). Response and adaptation of skeletal muscle to exercise--the role of reactive oxygen species. *Front Biosci*, 12, 4826-4838.
- Nishimuta, H., Ohtani, H., Tsujimoto, M., Ogura, K., Hiratsuka, A., & Sawada, Y. (2007). Inhibitory effects of various beverages on human recombinant sulfotransferase isoforms SULT1A1 and SULT1A3. *Biopharm Drug Dispos*, 28(9), 491-500. doi:10.1002/bdd.579
- Nurmi, T., Mazur, W., Heinonen, S., Kokkonen, J., & Adlercreutz, H. (2002). Isoflavone content of the soy based supplements. *J Pharm Biomed Anal*, 28(1), 1-11.
- Obata, T., Nagakura, T., Masaki, T., Maekawa, K., & Yamashita, K. (1999). Eicosapentaenoic acid inhibits prostaglandin D2 generation by inhibiting cyclo-oxygenase-2 in cultured human mast cells. *Clin Exp Allergy*, 29(8), 1129-1135.
- Ohkimoto, K., Liu, M. Y., Suiko, M., Sakakibara, Y., & Liu, M. C. (2004). Characterization of a zebrafish estrogen-sulfating cytosolic sulfotransferase: inhibitory effects and mechanism of action of phytoestrogens. *Chem Biol Interact*, 147(1), 1-7.
- 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.
- Okura, A., Arakawa, H., Oka, H., Yoshinari, T., & Monden, Y. (1988). Effect of genistein on topoisomerase activity and on the growth of [Val 12]Ha-ras-transformed NIH 3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 157(1), 183-189.
- Osborn, D. A., & Sinn, J. (2004). Soy formula for prevention of allergy and food intolerance in infants. *Cochrane Database Syst Rev*(3), Cd003741. doi:10.1002/14651858.CD003741.pub2
- Ososki, A. L., & Kennelly, E. J. (2003). Phytoestrogens: a review of the present state of research. *Phytother Res*, 17(8), 845-869. doi:10.1002/ptr.1364

- Otake, Y., Nolan, A. L., Walle, U. K., & Walle, T. (2000). Quercetin and resveratrol potently reduce estrogen sulfotransferase activity in normal human mammary epithelial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 73(5), 265-270.
- Ozdal, T., Sela, D. A., Xiao, J., Boyacioglu, D., Chen, F., & Capanoglu, E. (2016). The Reciprocal Interactions between Polyphenols and Gut Microbiota and Effects on Bioaccessibility. *Nutrients*, 8(2), 78. doi:10.3390/nu8020078
- Ozvegy, C., Litman, T., Szakacs, G., Nagy, Z., Bates, S., Varadi, A., & Sarkadi, B. (2001). Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 285(1), 111-117. doi:10.1006/bbrc.2001.5130
- Park, H. J., Yang, J. Y., Ambati, S., Della-Fera, M. A., Hausman, D. B., Rayalam, S., & Baile, C. A. (2008). Combined effects of genistein, quercetin, and resveratrol in human and 3T3-L1 adipocytes. *J Med Food*, 11(4), 773-783. doi:10.1089/jmf.2008.0077
- Parkar, S. G., Stevenson, D. E., & Skinner, M. A. (2008). The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health. *Int J Food Microbiol*, 124(3), 295-298. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.017
- Perabo, F. G. E., von Löw, E. C., Siener, R., Ellinger, J., Müller, S. C., & Bastian, P. J. (2009). Eine kritische Bewertung der Phytotherapie des Prostatakarzinoms. *Der Urologe*, 48(3), 270-283. doi:10.1007/s00120-008-1929-5
- Pereira, V. G., Martins, A. M., Micheletti, C., & D'Almeida, V. (2008). Mutational and oxidative stress analysis in patients with mucopolysaccharidosis type I undergoing enzyme replacement therapy. *Clin Chim Acta*, 387(1-2), 75-79. doi:10.1016/j.cca.2007.09.008
- Pérez-Cano, F. J., & Castell, M. (2016). Flavonoids, Inflammation and Immune System. *Nutrients*, 8(10), 659. doi:10.3390/nu8100659
- Pietta, P.-G. (2000). *Flavonoids as Antioxidants*.
- Piotrowska , Jakobkiewicz-Banecka, J., Baranska, S., Tylki-Szymanska, A., Czartoryska, B., Wegrzyn, A., & Wegrzyn, G. (2006). Genistein-mediated inhibition of glycosaminoglycan synthesis as a basis for gene expression-targeted isoflavone therapy for mucopolysaccharidoses. *Eur J Hum Genet*, 14(7), 846-852. doi:10.1038/sj.ejhg.5201623
- Piotrowska , Jakobkiewicz-Banecka, J., Tylki-Szymanska, A., Liberek, A., Maryniak, A., Malinowska, M., . . . Wegrzyn, G. (2008). Genistin-rich soy isoflavone extract in substrate reduction therapy for Sanfilippo syndrome: An open-label, pilot study in 10 pediatric patients. *Curr Ther Res Clin Exp*, 69(2), 166-179. doi:10.1016/j.curtheres.2008.04.002
- Piotrowska, Jakóbkiewicz-Banecka, J., Tylki-Szymanska, A., Liberek, A., Maryniak, A., Malinowska, M., . . . Wegrzyn, G. (2008). Genistin-rich soy isoflavone extract in substrate reduction therapy for Sanfilippo syndrome: An open-label, pilot study in 10 pediatric patients. *Curr Ther Res Clin Exp*, 69(2), 166-179. doi:10.1016/j.curtheres.2008.04.002
- Ranka, S., Gee, J. M., Biro, L., Brett, G., Saha, S., Kroon, P., . . . Johnson, I. T. (2008). Development of a food frequency questionnaire for the assessment of quercetin and naringenin intake. *Eur J Clin Nutr*, 62(9), 1131-1138. doi:10.1038/sj.ejcn.1602827
- Rao, C. V., Wang, C. X., Simi, B., Lubet, R., Kelloff, G., Steele, V., & Reddy, B. S. (1997). Enhancement of experimental colon cancer by genistein. *Cancer Res*, 57(17), 3717-3722.
- Rechkemmer, B. W. G. (2001). Flavonoide. *Ernährungs-Umschau* 48, 498-502.
- Reiter, E., Beck, V., Medjakovic, S., Mueller, M., & Jungbauer, A. (2009). Comparison of hormonal activity of isoflavone-containing supplements used to treat menopausal complaints. *Menopause*, 16(5), 1049-1060. doi:10.1097/gme.0b013e31819c146c

- Riccio, P., & Rossano, R. (2015). Nutrition facts in multiple sclerosis. *ASN Neuro*, 7(1). doi:10.1177/1759091414568185
- Richelle, M., Pridmore-Merten, S., Bodenstab, S., Enslen, M., & Offord, E. A. (2002). Hydrolysis of isoflavone glycosides to aglycones by beta-glycosidase does not alter plasma and urine isoflavone pharmacokinetics in postmenopausal women. *J Nutr*, 132(9), 2587-2592. doi:10.1093/jn/132.9.2587
- Riches, Z., Stanley, E. L., Bloomer, J. C., & Coughtrie, M. W. (2009). Quantitative evaluation of the expression and activity of five major sulfotransferases (SULTs) in human tissues: the SULT "pie". *Drug Metab Dispos*, 37(11), 2255-2261. doi:10.1124/dmd.109.028399
- Rimbach, G., Weinberg, P. D., de Pascual-Teresa, S., Alonso, M. G., Ewins, B. A., Turner, R., . . . Cassidy, A. (2004). Sulfation of genistein alters its antioxidant properties and its effect on platelet aggregation and monocyte and endothelial function. *Biochim Biophys Acta*, 1670(3), 229-237. doi:10.1016/j.bbagen.2003.12.008
- Roberts-Kirchhoff, E. S., Crowley, J. R., Hollenberg, P. F., & Kim, H. (1999). Metabolism of genistein by rat and human cytochrome P450s. *Chem Res Toxicol*, 12(7), 610-616. doi:10.1021/tx9802320
- Rodriguez-Mateos, A., Vauzour, D., & Krueger, C. (2014). *Bioavailability, bioactivity and impact on health of dietary flavonoids and related compounds: an update*. Berlin/Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Root, M. M., McGinn, M. C., Nieman, D. C., Henson, D. A., Heinz, S. A., Shanely, R. A., . . . Jin, F. (2012). Combined fruit and vegetable intake is correlated with improved inflammatory and oxidant status from a cross-sectional study in a community setting. *Nutrients*, 4(1), 29-41. doi:10.3390/nu4010029
- Ross, J. A., & Kasum, C. M. (2002). *DIETARY FLAVONOIDS: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety*.
- Rothwell JA, P.-J. J., Neveu V, Medina-Ramon A, M'Hiri N, Garcia Lobato P, Manach C, Knox K, Eisner R, Wishart D, Scalbert A. (2013). *Phenol-Explorer 3.0: a major update of the Phenol-Explorer database to incorporate data on the effects of food processing on polyphenol content*.
- Rubio, C. P., Hernández-Ruiz, J., & Martínez-Subiela, S. (2016). *Spectrophotometric assays for total antioxidant capacity (TAC) in dog serum: an update*: BioMed Central.
- Ruijter, G. J., Valstar, M. J., van de Kamp, J. M., van der Helm, R. M., Durand, S., van Diggelen, O. P., . . . Wijburg, F. A. (2008). Clinical and genetic spectrum of Sanfilippo type C (MPS IIIC) disease in The Netherlands. *Mol Genet Metab*, 93(2), 104-111. doi:10.1016/j.ymgme.2007.09.011
- Ruiz-Larrea, M. B., Mohan, A. R., Paganga, G., Miller, N. J., Bolwell, G. P., & Rice-Evans, C. A. (1997). Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones. *Free Radic Res*, 26(1), 63-70.
- Sanders, T. A., Dean, T. S., Grainger, D., Miller, G. J., & Wiseman, H. (2002). Moderate intakes of intact soy protein rich in isoflavones compared with ethanol-extracted soy protein increase HDL but do not influence transforming growth factor beta(1) concentrations and hemostatic risk factors for coronary heart disease in healthy subjects. *Am J Clin Nutr*, 76(2), 373-377. doi:10.1093/ajcn/76.2.373
- Scalbert, A., Morand, C., Manach, C., & Remesy, C. (2002). Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed Pharmacother*, 56(6), 276-282.
- Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr*, 130(8S Suppl), 2073s-2085s. doi:10.1093/jn/130.8.2073S

- Schaebel, L. H., Vestergaard, H., Laurberg, P., Rathcke, C. N., & Andersen, S. (2013). Intake of traditional Inuit diet vary in parallel with inflammation as estimated from YKL-40 and hsCRP in Inuit and non-Inuit in Greenland. *Atherosclerosis*, 228(2), 496-501. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2013.03.022
- Schexnayder, C., & Stratford, R. E. (2016). Genistein and Glyceollin Effects on ABCC2 (MRP2) and ABCG2 (BCRP) in Caco-2 Cells. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(1), 17. doi:10.3390/ijerph13010017
- Seema Bhagwat, D. B. H., Joanne M. Holden. (2015). *USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods Release 3* Retrieved from: https://www.ars.usda.gov/ARSUserFiles/80400525/Data/Flav/Flav_R03.pdf
- Seema Bhagwat, D. B. H. a. J. M. H. (2008). *USDA Database for the Isoflavone Content of Selected Foods, Release 2.0*.
- Sekikawa, A., Doyle, M. F., & Kuller, L. H. (2015). Recent findings of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids (LCn-3 PUFAs) on atherosclerosis and coronary heart disease (CHD) contrasting studies in Western countries to Japan. *Trends Cardiovasc Med*, 25(8), 717-723. doi:10.1016/j.tcm.2015.03.001
- Selma, M. V., Espin, J. C., & Tomas-Barberan, F. A. (2009). Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *J Agric Food Chem*, 57(15), 6485-6501. doi:10.1021/jf902107d
- Sepehr, E., Cooke, G., Robertson, P., & Gilani, G. S. (2007). Bioavailability of soy isoflavones in rats Part I: application of accurate methodology for studying the effects of gender and source of isoflavones. *Mol Nutr Food Res*, 51(7), 799-812. doi:10.1002/mnfr.200700083
- Serafini, M., Peluso, I., & Raguzzini, A. (2010). Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proc Nutr Soc*, 69(3), 273-278. doi:10.1017/s002966511000162x
- 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. doi:10.1093/ajcn/68.6.1333S
- Setchell, K. D., Brown, N. M., Desai, P., Zimmer-Nechemias, L., Wolfe, B. E., Brashears, W. T., . . . Heubi, J. E. (2001). Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *J Nutr*, 131(4 Suppl), 1362S-1375S. doi:10.1093/jn/131.4.1362S
- Setchell, K. D., Brown, N. M., Desai, P. B., Zimmer-Nechimias, L., Wolfe, B., Jakate, A. S., . . . Heubi, J. E. (2003). Bioavailability, disposition, and dose-response effects of soy isoflavones when consumed by healthy women at physiologically typical dietary intakes. *J Nutr*, 133(4), 1027-1035. doi:10.1093/jn/133.4.1027
- Setchell, K. D., Brown, N. M., Zimmer-Nechemias, L., Brashears, W. T., Wolfe, B. E., Kirschner, A. S., & Heubi, J. E. (2002). Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 76(2), 447-453. doi:10.1093/ajcn/76.2.447
- Setchell, K. D., & Cassidy, A. (1999). Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *J Nutr*, 129(3), 758s-767s. doi:10.1093/jn/129.3.758S
- Setchell, K. D., Zimmer-Nechemias, L., Cai, J., & Heubi, J. E. (1998). Isoflavone content of infant formulas and the metabolic fate of these phytoestrogens in early life. *Am J Clin Nutr*, 68(6 Suppl), 1453s-1461s. doi:10.1093/ajcn/68.6.1453S
- Shedd-Wise, K. M., Alekel, D. L., Hofmann, H., Hanson, K. B., Schiferl, D. J., Hanson, L. N., & Van Loan, M. D. (2011). The soy isoflavones for reducing bone loss study: 3-yr effects on

- pQCT bone mineral density and strength measures in postmenopausal women. *J Clin Densitom*, 14(1), 47-57. doi:10.1016/j.jocd.2010.11.003
- Shelnutt, S. R., Cimino, C. O., Wiggins, P. A., & Badger, T. M. (2000). Urinary pharmacokinetics of the glucuronide and sulfate conjugates of genistein and daidzein. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 9(4), 413-419.
- Shelnutt, S. R., Cimino, C. O., Wiggins, P. A., Ronis, M. J., & Badger, T. M. (2002). Pharmacokinetics of the glucuronide and sulfate conjugates of genistein and daidzein in men and women after consumption of a soy beverage. *Am J Clin Nutr*, 76(3), 588-594. doi:10.1093/ajcn/76.3.588
- Sirovina, D., Orsolic, N., Gregorovic, G., & Koncic, M. Z. (2016). Naringenin ameliorates pathological changes in liver and kidney of diabetic mice: a preliminary study. *Arh Hig Rada Toksikol*, 67(1), 19-24. doi:10.1515/aiht-2016-67-2708
- Slavin, J. L., Karr, S. C., Hutchins, A. M., & Lampe, J. W. (1998). Influence of soybean processing, habitual diet, and soy dose on urinary isoflavanoid excretion. *Am J Clin Nutr*, 68(6 Suppl), 1492S-1495S. doi:10.1093/ajcn/68.6.1492S
- Spickett, C. M., Jerlich, A., Panasenko, O. M., Arnhold, J., Pitt, A. R., Stelmaszynska, T., & Schaur, R. J. (2000). The reactions of hypochlorous acid, the reactive oxygen species produced by myeloperoxidase, with lipids. *Acta Biochim Pol*, 47(4), 889-899.
- Squadrito, F., Marini, H., Bitto, A., Altavilla, D., Polito, F., Adamo, E. B., . . . Licata, G. (2013). Genistein in the metabolic syndrome: results of a randomized clinical trial. *J Clin Endocrinol Metab*, 98(8), 3366-3374. doi:10.1210/jc.2013-1180
- Strassburg, C. P., Manns, M. P., & Tukey, R. H. (1998). Expression of the UDP-glucuronosyltransferase 1A locus in human colon. Identification and characterization of the novel extrahepatic UGT1A8. *J Biol Chem*, 273(15), 8719-8726.
- Strom, B. L., Schinnar, R., Ziegler, E. E., Barnhart, K. T., Sammel, M. D., Macones, G. A., . . . Hanson, S. A. (2001). Exposure to soy-based formula in infancy and endocrinological and reproductive outcomes in young adulthood. *Jama*, 286(7), 807-814.
- Sugano, K., & Terada, K. (2015). Rate- and Extent-Limiting Factors of Oral Drug Absorption: Theory and Applications. *J Pharm Sci*, 104(9), 2777-2788. doi:10.1002/jps.24391
- Takano-Ishikawa, Y., Goto, M., & Yamaki, K. (2006). Structure-activity relations of inhibitory effects of various flavonoids on lipopolysaccharide-induced prostaglandin E2 production in rat peritoneal macrophages: comparison between subclasses of flavonoids. *Phytomedicine*, 13(5), 310-317. doi:10.1016/j.phymed.2005.01.016
- Tang, L., Singh, R., Liu, Z., & Hu, M. (2009). Structure and concentration changes affect characterization of UGT isoform-specific metabolism of isoflavones. *Mol Pharm*, 6(5), 1466-1482. doi:10.1021/mp8002557
- Tang, L., Ye, L., Singh, R., Wu, B., Lv, C., Zhao, J., . . . Hu, M. (2010). Use of glucuronidation fingerprinting to describe and predict mono- and dihydroxyflavone metabolism by recombinant UGT isoforms and human intestinal and liver microsomes. *Mol Pharm*, 7(3), 664-679. doi:10.1021/mp900223c
- Tardieu, M., Zerah, M., Gougeon, M. L., Ausseil, J., de Bourdonville, S., Husson, B., . . . Heard, J. M. (2017). Intracerebral gene therapy in children with mucopolysaccharidosis type IIIB syndrome: an uncontrolled phase 1/2 clinical trial. *Lancet Neurol*, 16(9), 712-720. doi:10.1016/s1474-4422(17)30169-2
- Tenkorang, M. A., Snyder, B., & Cunningham, R. L. (2018). Sex-related differences in oxidative stress and neurodegeneration. *Steroids*, 133, 21-27. doi:10.1016/j.steroids.2017.12.010

- Tew, B. Y., Xu, X., Wang, H. J., Murphy, P. A., & Hendrich, S. (1996). A diet high in wheat fiber decreases the bioavailability of soybean isoflavones in a single meal fed to women. *J Nutr*, 126(4), 871-877. doi:10.1093/jn/126.4.871
- Thilakarathna, S. H., & Rupasinghe, H. P. V. (2013). Flavonoid Bioavailability and Attempts for Bioavailability Enhancement. *Nutrients*, 5(9), 3367-3387. doi:10.3390/nu5093367
- Thorburn, A. N., Macia, L., & Mackay, C. R. (2014). Diet, metabolites, and "western-lifestyle" inflammatory diseases. *Immunity*, 40(6), 833-842. doi:10.1016/j.jimmuni.2014.05.014
- Tirone, E., D'Alessandris, C., Hascall, V. C., Siracusa, G., & Salustri, A. (1997). Hyaluronan synthesis by mouse cumulus cells is regulated by interactions between follicle-stimulating hormone (or epidermal growth factor) and a soluble oocyte factor (or transforming growth factor beta1). *J Biol Chem*, 272(8), 4787-4794.
- Torres, N., Guevara-Cruz, M., Velazquez-Villegas, L. A., & Tovar, A. R. (2015). Nutrition and Atherosclerosis. *Arch Med Res*, 46(5), 408-426. doi:10.1016/j.arcmed.2015.05.010
- Tovar, A. R., Murguia, F., Cruz, C., Hernandez-Pando, R., Aguilar-Salinas, C. A., Pedraza-Chaverri, J., . . . Torres, N. (2002). A soy protein diet alters hepatic lipid metabolism gene expression and reduces serum lipids and renal fibrogenic cytokines in rats with chronic nephrotic syndrome. *J Nutr*, 132(9), 2562-2569. doi:10.1093/jn/132.9.2562
- Traka, M. H., & Mithen, R. F. (2011). Plant science and human nutrition: challenges in assessing health-promoting properties of phytochemicals. *Plant Cell*, 23(7), 2483-2497. doi:10.1105/tpc.111.087916
- Trudel, S., Trecherel, E., Gomila, C., Peltier, M., Aubignat, M., Gubler, B., . . . Ausseil, J. (2015). Oxidative stress is independent of inflammation in the neurodegenerative Sanfilippo syndrome type B. *J Neurosci Res*, 93(3), 424-432. doi:10.1002/jnr.23497
- Tsikas, D. (2017). Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Anal Biochem*, 524, 13-30. doi:10.1016/j.ab.2016.10.021
- Valles, S. L., Dolz-Gaiton, P., Gambini, J., Borras, C., Lloret, A., Pallardo, F. V., & Vina, J. (2010). Estradiol or genistein prevent Alzheimer's disease-associated inflammation correlating with an increase PPAR gamma expression in cultured astrocytes. *Brain Res*, 1312, 138-144. doi:10.1016/j.brainres.2009.11.044
- Valstar, M. J., Neijs, S., Bruggenwirth, H. T., Olmer, R., Ruijter, G. J., Wevers, R. A., . . . Wijburg, F. A. (2010). Mucopolysaccharidosis type IIIA: clinical spectrum and genotype-phenotype correlations. *Ann Neurol*, 68(6), 876-887. doi:10.1002/ana.22092
- Valstar, M. J., Ruijter, G. J., van Diggelen, O. P., Poorthuis, B. J., & Wijburg, F. A. (2008). Sanfilippo syndrome: a mini-review. *J Inherit Metab Dis*, 31(2), 240-252. doi:10.1007/s10545-008-0838-5
- van de Kamp, J. J., Niermeijer, M. F., von Figura, K., & Giesberts, M. A. (1981). Genetic heterogeneity and clinical variability in the Sanfilippo syndrome (types A, B, and C). *Clin Genet*, 20(2), 152-160.
- van de Wetering, M. D., D'Angio, G., & Caron, H. (2012). Obituary of a very special doctor, Dr Jan de Kraker (October 18, 1944 to January 19, 2012). *J Pediatr Hematol Oncol*, 34(4), 245-246.
- van Herwaarden, A. E., & Schinkel, A. H. (2006). The function of breast cancer resistance protein in epithelial barriers, stem cells and milk secretion of drugs and xenotoxins. *Trends Pharmacol Sci*, 27(1), 10-16. doi:10.1016/j.tips.2005.11.007

- Van Hove, J. L., Wevers, R. A., Van Cleemput, J., Moerman, P., Sciot, R., Matthijs, G., . . . Hopwood, J. J. (2003). Late-Onset visceral presentation with cardiomyopathy and without neurological symptoms of adult Sanfilippo A syndrome. *Am J Med Genet A*, *118a*(4), 382-387. doi:10.1002/ajmg.a.20068
- Villani, G. R., Di Domenico, C., Musella, A., Cecere, F., Di Napoli, D., & Di Natale, P. (2009). Mucopolysaccharidosis IIIB: oxidative damage and cytotoxic cell involvement in the neuronal pathogenesis. *Brain Res*, *1279*, 99-108. doi:10.1016/j.brainres.2009.03.071
- Vitner, E. B., Platt, F. M., & Futerman, A. H. (2010). Common and uncommon pathogenic cascades in lysosomal storage diseases. *J Biol Chem*, *285*(27), 20423-20427. doi:10.1074/jbc.R110.134452
- Vogiatzoglou, A., Heuer, T., Mulligan, A. A., Lentjes, M. A. H., Luben, R. N., & Kuhnle, G. G. C. (2014). Estimated dietary intakes and sources of flavanols in the German population (German National Nutrition Survey II). *European Journal of Nutrition*, *53*(2), 635-643. doi:10.1007/s00394-013-0572-0
- Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid Biosynthesis. *Molecular Plant*, *3*(1), 2-20. doi:<https://doi.org/10.1093/mp/ssp106>
- Walle, T. (2004). Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radic Biol Med*, *36*(7), 829-837. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.01.002
- Wang, Cai, B., Shao, J., Wang, T. T., Cai, R. Z., Ma, C. J., . . . Du, J. (2016). Genistein suppresses the mitochondrial apoptotic pathway in hippocampal neurons in rats with Alzheimer's disease. *Neural Regen Res*, *11*(7), 1153-1158. doi:10.4103/1673-5374.187056
- Wang, H., & Murphy, P. A. (1994a). Isoflavone Composition of American and Japanese Soybeans in Iowa: Effects of Variety, Crop Year, and Location. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *42*(8), 1674-1677. doi:10.1021/jf00044a017
- Wang, H., & Murphy, P. A. (1994b). Isoflavone Content in Commercial Soybean Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *42*(8), 1666-1673. doi:10.1021/jf00044a016
- Wang , S. W., Chen, J., Jia, X., Tam, V. H., & Hu, M. (2006). Disposition of flavonoids via enteric recycling: structural effects and lack of correlations between in vitro and in situ metabolic properties. *Drug Metab Dispos*, *34*(11), 1837-1848. doi:10.1124/dmd.106.009910
- Wang, X. L., Shin, K. H., Hur, H. G., & Kim, S. I. (2005). Enhanced biosynthesis of dihydrodaidzein and dihydrogenistein by a newly isolated bovine rumen anaerobic bacterium. *J Biotechnol*, *115*(3), 261-269. doi:10.1016/j.jbiotec.2004.08.014
- Wegrzyn. (2012). Gene expression-targeted isoflavone therapy. *IUBMB Life*, *64*(4), 307-315. doi:10.1002/iub.1007
- Wegrzyn , G., Jakobkiewicz-Banecka, J., Gabig-Ciminska, M., Piotrowska, E., Narajczyk, M., Kloska, A., . . . Wegrzyn, A. (2010). Genistein: a natural isoflavone with a potential for treatment of genetic diseases. *Biochem Soc Trans*, *38*(2), 695-701. doi:10.1042/bst0380695
- Westmark, C. J. (2016). Soy-Based Therapeutic Baby Formulas: Testable Hypotheses Regarding the Pros and Cons. *Front Nutr*, *3*, 59. doi:10.3389/fnut.2016.00059
- Wolfenden, C., Wittkowski, A., & Hare, D. J. (2017). Symptoms of Autism Spectrum Disorder (ASD) in Individuals with Mucopolysaccharide Disease Type III (Sanfilippo Syndrome): A Systematic Review. *J Autism Dev Disord*, *47*(11), 3620-3633. doi:10.1007/s10803-017-3262-6

- Wong, D. W. S. (2017). *Mechanism and Theory in Food Chemistry, Second Edition* (Vol. 2): Springer International Publishing AG.
- Wraith, J. E. (2009). Enzyme replacement therapy for the management of the mucopolysaccharidoses. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 47 Suppl 1, S63-65.
- Wu, B., Basu, S., Meng, S., Wang, X., & Hu, M. (2011). Regioselective sulfation and glucuronidation of phenolics: insights into the structural basis. *Curr Drug Metab*, 12(9), 900-916.
- Xu, X., Harris, K. S., Wang, H. J., Murphy, P. A., & Hendrich, S. (1995). Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in women. *J Nutr*, 125(9), 2307-2315. doi:10.1093/jn/125.9.2307
- Yang, Z., Kulkarni, K., & Zhu, W. (2012). *Bioavailability and Pharmacokinetics of Genistein: Mechanistic Studies on its ADME*: Bentham Science Publishers Ltd.
- Yang, Z., Kulkarni, K., Zhu, W., & Hu, M. (2012). Bioavailability and pharmacokinetics of genistein: mechanistic studies on its ADME. *Anticancer Agents Med Chem*, 12(10), 1264-1280.
- Yang , Z., Kulkarni, K., Zhu, W., & Hu, M. (2012). Bioavailability and pharmacokinetics of genistein: mechanistic studies on its ADME. *Anticancer Agents Med Chem*, 12(10), 1264-1280.
- Yang, Z., Zhu, W., Gao, S., Xu, H., Wu, B., Kulkarni, K., . . . Hu, M. (2010). Simultaneous determination of genistein and its four phase II metabolites in blood by a sensitive and robust UPLC-MS/MS method: Application to an oral bioavailability study of genistein in mice. *J Pharm Biomed Anal*, 53(1), 81-89. doi:10.1016/j.jpba.2010.03.011
- Yellayi, S., Zakroczymski, M. A., Selvaraj, V., Valli, V. E., Ghanta, V., Helferich, W. G., & Cooke, P. S. (2003). The phytoestrogen genistein suppresses cell-mediated immunity in mice. *J Endocrinol*, 176(2), 267-274.
- Zhang, Dong, J., He, P., Li, W., Zhang, Q., Li, N., & Sun, T. (2012). Genistein inhibit cytokines or growth factor-induced proliferation and transformation phenotype in fibroblast-like synoviocytes of rheumatoid arthritis. *Inflammation*, 35(1), 377-387. doi:10.1007/s10753-011-9365-x
- Zhang, Wang, G. J., Song, T. T., Murphy, P. A., & Hendrich, S. (1999). Urinary disposition of the soybean isoflavones daidzein, genistein and glycitein differs among humans with moderate fecal isoflavone degradation activity. *J Nutr*, 129(5), 957-962. doi:10.1093/jn/129.5.957
- Zhang, L., Zuo, Z., & Lin, G. (2007). Intestinal and hepatic glucuronidation of flavonoids. *Mol Pharm*, 4(6), 833-845. doi:10.1021/mp700077z
- Zhang , S., Yang, X., & Morris, M. E. (2004). Combined effects of multiple flavonoids on breast cancer resistance protein (ABCG2)-mediated transport. *Pharm Res*, 21(7), 1263-1273.
- Zheng, Y., Hu, J., Murphy, P. A., Alekel, D. L., Franke, W. D., & Hendrich, S. (2003). Rapid gut transit time and slow fecal isoflavone disappearance phenotype are associated with greater genistein bioavailability in women. *J Nutr*, 133(10), 3110-3116. doi:10.1093/jn/133.10.3110
- Zheng, Y., Lee, S. O., Verbruggen, M. A., Murphy, P. A., & Hendrich, S. (2004). The apparent absorptions of isoflavone glucosides and aglucons are similar in women and are increased by rapid gut transit time and low fecal isoflavone degradation. *J Nutr*, 134(10), 2534-2539. doi:10.1093/jn/134.10.2534

- Zhou, Shi, R., Ma, B., Ma, Y., Wang, C., Wu, D., . . . Cheng, N. (2013). CYP450 1A2 and multiple UGT1A isoforms are responsible for jatrorrhizine metabolism in human liver microsomes. *Biopharm Drug Dispos*, 34(3), 176-185. doi:10.1002/bdd.1835
- Zhou , S., Hu, Y., Zhang, B., Teng, Z., Gan, H., Yang, Z., . . . Mei, Q. (2008). Dose-dependent absorption, metabolism, and excretion of genistein in rats. *J Agric Food Chem*, 56(18), 8354-8359. doi:10.1021/jf801051d
- Zhou, S., Lim, L. Y., & Chowbay, B. (2004). Herbal modulation of P-glycoprotein. *Drug Metab Rev*, 36(1), 57-104. doi:10.1081/dmr-120028427
- Zhu, W., Xu, H., Wang, S. W., & Hu, M. (2010). Breast cancer resistance protein (BCRP) and sulfotransferases contribute significantly to the disposition of genistein in mouse intestine. *AAPS J*, 12(4), 525-536. doi:10.1208/s12248-010-9209-x
- Zielonka, J., Gebicki, J., & Gryniewicz, G. (2003). Radical scavenging properties of genistein. *Free Radic Biol Med*, 35(8), 958-965.
- Zubik, L., & Meydani, M. (2003). Bioavailability of soybean isoflavones from aglycone and glucoside forms in American women. *Am J Clin Nutr*, 77(6), 1459-1465. doi:10.1093/ajcn/77.6.1459

9 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
€	Euro
®	Registrierte Marke
°C	Grad Celsius
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
6'-OH-ODMA	6'-Hydroxy-O-demethylangolensin
A.D.A-Maßnahmen	Alle Diätetischen Antientzündlichen Maßnahmen; engl. All Dietary Antiinflammatory Means,
ABC	ATP-Binding Cassette
ADME	<u>Absorption</u> , <u>Distribution</u> , <u>Metabolismus</u> , <u>Elimination</u>
Aglykon	Substanz ohne einem Zuckerrest z.B. Genistein
ALAT/GPT	Alanin-Aminotransferase/ Glutamat-Pyruvat-Transaminase
aP	Alkalische Phosphatase
AS	Arachidonsäure
ASAT/GOT	Aspartat-Aminotransferase/ Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
Bili. Ges.	Bilirubin gesamt
BHT	Butylhydroxytoluol
BMI	Body Mass Index

BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderalbumin)
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CHI	Chalconflavanonisomerase
CK	Creatinkinase
Cox	Cyclooxygenase
CRP	C-reaktives Protein
Cu	Kupfer (engl.)
CUPRAC	CUPric Reducing Antioxidant Capacity
CYP	Cytochrom P450
d	Tag
d.h.	das heißt
DHG	Dihydrogenstein
DNS	Desoxyribonukleinsäure, engl. deoxyribonucleic acid
Dr.	Doktor
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EGFR	epidermal growth factor receptor
EGFR-TK	EGFR-Tyrosinkinase
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
engl.	Englisch (engl. <i>Reactive Oxygen Species, ROS</i>)
EPA	Eicosapentaensäure

et al.,	et alii (Maskulinum), et aliae (Femininum) oder et alia (Neutrum)
FFQ	Food-Frequency-Questionnaire
FRAP	Ferric Reducing Ability of Plasma
g	Gramm
G-4'S-7S	Disulfate
G-7G-4'S und G-7S-4'G	Sulfoglucuronide
G-7-S, G-4'-S	Genistein-Monosulfate
GAG	Glykosaminoglykane
GETIT	<i>gene expression-targeted isoflavone therapy</i>
Glykosid	Substanz mit einem Zuckerkonjugat z.B. Genistin
GSH	Glutathion
GNS	GNS (codiert für N-Acetylglucosamin-6)-sulfatase
GST	Glutathion-S-Transferasen
HDL	high-density lipoprotein
HGSNAT	Acetyl-CoA: α -Glucosaminid-Acetyltransferase
HPLC	High-Performance-Liquid-Chromatographie
HRP	Horseradish peroxidase
HS	Heparansulfat
IFN- γ	Interferon- γ
Interleukin	IL

i.p.	intraperitoneal
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
Li-Heparin	Lithium-Heparin
LPH	Lactase-Phlorizin-Hydrolase
M	Mol
m(²)	Meterquadrat
MDA	Malondialdehyd
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimol
MPS	Mucopolysaccaridosen MPS III-A
MRP	Multi-Drug Resistance Protein
MW	Mittelwert
N	Teilchenzahl
NAGLU	<i>NAGLU</i> α-N-Acetylglucosaminidase
NaOH	Natriumhydroxid
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer'
ng	Nanogramm

nm	Nanometer
NU	Nachuntersuchung (Genisteinstudie)
OAT	organic anion transporters
OATP	Organic Anion Transporting Polypeptide
OD	Optische Dichte
p.a.	pro analysi (= für analytische Zwecke)
PBS	Phosphate buffered saline
PG	Prostaglandine
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGJ ²	Prostaglandin J ²
P-gp	P-Glycoprotein
PP	Polyphenole
Prof.	Professor
RNS	Ribonukleinsäure, engl. ribonucleic acid
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies; engl. reactive oxygen species
s.	siehe
S.	Seite
sec	Sekunde
SET	Single Electron Transfer
SGLT1	sodium dependent glucose cotransporter 1

SGSH	Heparan-N-Sulfatase
SPSS	Superior Performing Software System
SRT	Substratreduktionstherapie; engl. <u>substrate reduction therapy</u>
StaBLab	STAtistischesBeratungsLABor
SULT	Sulfotransferase
TAC	totale antioxidative Kapazität; engl. <u>total antioxidant capacity</u>
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
tgl.	Täglich
TLR	Toll-like Receptor
TNF	tumor necrosis factor-alpha
TSH	Thyreoida-stimulierendes Hormon
u.a.	unter anderem
U1A	Beginn der ersten Einnahmephase (Genisteinstudie)
U1B	Ende der ersten Einnahmephase (Genisteinstudie)
U2A	Beginn der zweiten Einnahmephase (Genisteinstudie)
U2B	Ende der zweiten Einnahmephase (Genisteinstudie)
U3A	Beginn der dritten Einnahmephase (Genisteinstudie)
U3B	Ende der dritten Einnahmephase (Genisteinstudie)
µg	Mikrogramm
UGT	Uridine-5'-Diphosphat-Glucuronosyltransferase

UV	Ultraviolett
VU	Voruntersuchung (Genisteinstudie)
X	Mal
z.B.	zum Beispiel
β	Beta
γ -GT	γ -Glutamyltransferase
μ M	Mikromol

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stoffklassen der Polyphenole. Die Polyphenole werden in Phenolsäure, Cumarine, Flavonoide, Stilbene und Ligane aufgeteilt. Die Flavonoide teilen sich wiederum in sechs Untergruppen auf: Flavone, Isoflavone, Flavonole, Flavanone, Flavanol-3-ole und Anthrocyanide.....	14
Abbildung 2: Chemische Struktur von Genistein, Quercetin und Naringenin.	15
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Abspaltung des Zuckerrestes am Beispiel vom Genistin durch β -Glukosidase zu Genistein.	20
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Verteilung von Genistein im systemischen Kreislauf nach oraler Gabe von Genistin oder Genistein (vertikale Ansicht). : Genistin; : Genistein; : Genisteinglucuronide; : Genisteinsulfate (Aus Yang et al., 2012)	22
Abbildung 5: Der Metabolismusweg und Hauptmetabolite der Phase-I und Phase-II von Genistein in vivo. (Aus Yang et al., 2012)	23
Abbildung 6: Die Effekte von Genistein auf die Signalwege der Neuroinflammation. Abkürzungen: NF- κ B = nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer'; TNF-a, tumor necrosis factor-alpha, COX-2 = Cyclooxygenase 2; TGF- β , transforming growth factor-beta.	33
Abbildung 7: Hemmung der EGFR-TK durch Genistein und der Effekt auf die Expression der Gene, die an der GAG-Syntehese involviert sind (Węgrzyn et al., 2010). Die Expression von Genen, die für zur GAG-Produktion erforderliche Enzyme kodieren, hängt von der EGF-vermittelten Aktivierung seines Rezeptors EGFR ab. Die Phosphorylierung bestimmter Proteine durch EGFR-Tyrosinkinase (EGFR-TK) führt zur intrazellulären Signaltransduktion und Aktivierung der Transkription spezifischer Gene im Zellkern. Die Hemmung der EGFR-TK-Aktivität durch Genistein führt zu einer Beeinträchtigung der Signaltransduktion und damit zu einer verminderten Expression von Genen, die für an der GAG-Synthese beteiligte Enzyme kodieren.	37
Abbildung 8: Das Messprinzip des TAC Aktivitätassays	52
Abbildung 9: Spezifischer Nachweis von MDA-Proteinen. Der primäre Antikörper bindet an das MDA-Antigen. An dem sekundären Antikörper ist Meerrettich-Peroxidase (HRP) kovalent gekoppelt. HRP katalysiert die Oxidation von Luminol und es erfolgt die Emission von Licht, welches detektiert werden kann.	54

Abbildung 10: Standardkurve für den TAC Assay. Für die Bestimmung der Standardkurve und zur Ermittlung der TAC-Konzentration in den Untersuchungsproben, wurde als Standard Harnsäure in Konzentrationen von 0,0039 – 1mM auf einer Platte aufgetragen. Mittels der Fünf-Punkte-Messung konnte eine Trendlinie bestimmt und die unbekannten TAC-Konzentrationen jeder Teilnehmerprobe als Harnsäureäquivalente in mM ermittelt werden..... 63

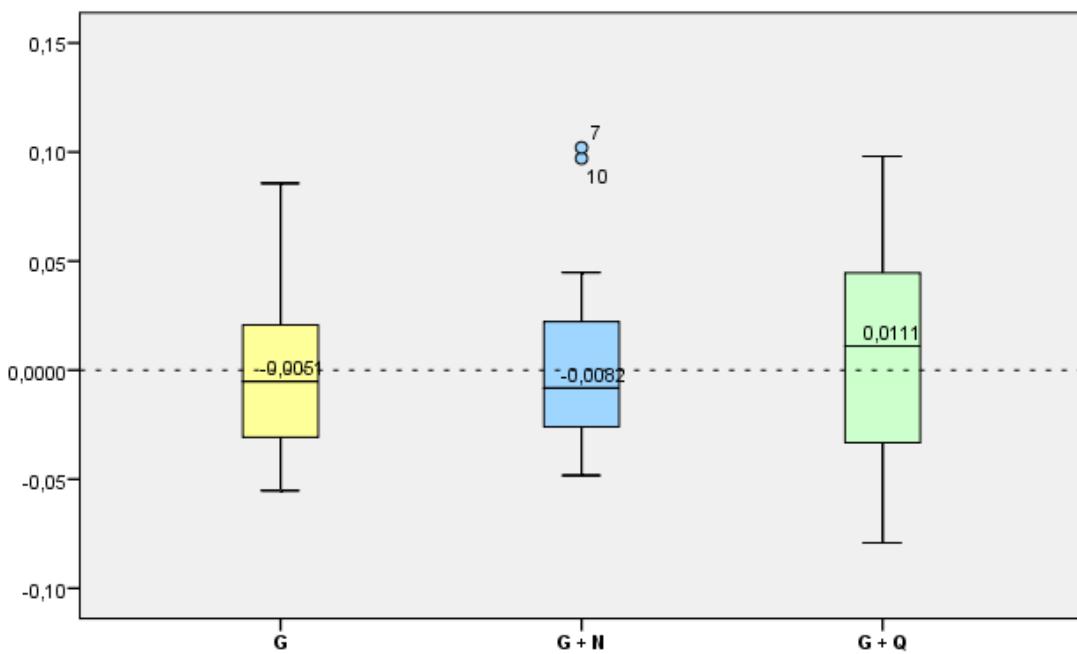


Abbildung 11: Boxplots der Gruppen-Differenzen von TAC (TAC_{Δ}). Die Berechnung des Medians der Differenzen zwischen Endwert minus Anfangswert erfolgte für alle drei Gruppen. Die Boxplots zeigen eine geringe Abnahme der TAC während der Supplementierung mit Genistein (G) im Median um -0,0051, die Verminderung war während der Supplementierung mit Genistein + Naringenin (G + N) etwas geringer (-0,0082 mM allerdings sind auch zwei Ausreißer (#7 mit 0,102 mM und #10 mit 0,097 mM (die beiden blauen Punkte) außerhalb der Spannweite zu erkennen. Die Supplementierung mit Genistein + Quercetin (G + Q) dagegen ließ den Median der Differenzen um 0,0111 ansteigen..... 65

Abbildung 12: MW der Gruppen-Differenzen von TAC (TAC_{Δ}). Die Mittelwerte der TAC_{Δ} sind in allen drei Gruppen positiv. Es kommt somit rechnerisch am Ende der Versuchsperiode im Vergleich zum Beginn in allen Gruppen zu einem Anstieg der TAC. In der G + Q-Gruppe ist die Zunahmen mit 0,008 mM am höchsten, gefolgt von G + N mit 0,006 mM und G mit 0,001 mM. Diese Mittelwerte dienen der deskriptiven Beschreibung und sollen zur Veranschaulichung des linear gemischten Modells (LMM) dienen..... 66

Abbildung 13: Standardkurve für den MDA Assay. Beispiel für eine Standardkurve zur Messung von MDA. Die mit einem Photometer gemessene optische Dichte (OD) nimmt mit zunehmender

Konzentration der MDA Addukte ab und ist für einen Messbereich zwischen 6 – 1500 pmol/ml ausgelegt. Die Werte der Teilnehmerproben wurden anhand der Standardkurve quantifiziert.

..... 68

Abbildung 14: Boxplots für die Gruppen-Differenzen des MDA (MDA_{Δ}). Die MDA_{Δ} wurde aus dem MDA-Endwert minus MDA-Anfangswert zu jeder Versuchsperiode errechnet und in der jeweiligen Gruppe G, G + N bzw. G + Q zusammengefasst. Der Median nimmt in der G-Gruppe um -36,86 pmol/ml ab. In den Gruppen G + N beobachtet man eine Zunahme um 3,33 pmol/ml und in der G + Q Gruppe um 63,56 pmol/ml. Zusätzlich ist in der G + Q-Gruppe ein Aureißer bei Studienteilnehmer #6 mit 487,62 pmol/ml außerhalb der Spannweite zu erkennen..... 69

Abbildung 15: MW der Gruppen-Differenzen von MDA (MDA_{Δ}). Die Abnahme der MDA-MW im Plasma am Ende der Versuchsperiode im Vergleich zum Beginn (MDA_{Δ}) ist in der G und G + N-Gruppe festzustellen. In der G + Q-Gruppe nimmt der MW von MDA_{Δ} zu und damit auch die Lipidperoxidation. 70

Abbildung 16: Standardkurve für die Messung des Genistein (Aglykon) und Genistins (Glykosid) mittels HPLC. Für die Erstellung der Standardkurve wurden Konzentrationen im Bereich von 5 – 20 μ M verwendet. Mit dieser Standardkurve wurden dann die Genistein- / Genistinkonzentrationen in den Teilnehmerproben ermittelt. 71

Abbildung 17: Boxplots für die Gruppen-Differenzen ($Genistein_{\Delta}$). Die Differenz von End- minus Anfangswert wurde berechnet und als $Genistein_{\Delta}$ bezeichnet. Die während der drei Versuchsperioden ermittelten Werte für $Genistein_{\Delta}$ wurden dann für die jeweiligen Gruppe zusammengefasst. $Genistein_{\Delta}$ war in der G-Gruppe mit 0,0571 μ mol/l positiv und wies einen Anstieg des Genistein durch die Supplementierung auf. Es ist auch in der G + Q-Gruppe mit 0,0362 μ mol/l zu beobachten. Der Median in der G + N-Gruppe ist um -0,0726 μ mol/l niedriger als zu Beginn dieser Versuchsperiode, es kommt also zu einer Abnahme des Genistein-Aglykons im Plasma am Ende dieser Versuchsperiode. 73

Abbildung 18: Mittelwerte der Gruppen-Differenzen von Genistein ($Genistein_{\Delta}$). Eine Zunahme der $Genistein_{\Delta}$ -Mittelwerte im EDTA-Vollblut am Ende der Versuchsperiode im Vergleich zu Beginn ist in der G- (0,07 μ mol/l) und G + Q-Gruppe (0,11 μ mol/l) festzustellen. In der G + N-Gruppe (-0,04 μ mol/l) nimmt der Mittelwert ab. Somit werden die besten Resultate durch die Kombination von Genistein mit Quercetin erzielt. Diese Mittelwerte unterstützen die jeweiligen Mediane und veranschaulichen die Tendenzen im LGM. 74

Abbildung 19: Boxplots für die Gruppen-Differenzen von Genistin ($Genistin_{\Delta}$). Für die Berechnung des $Genistin_{\Delta}$ wurde der Anfangswert vom Endwert abgezogen. Die jeweiligen

Differenzen sind zusammengefasst in den Gruppen zu sehen. Die Auswertung des Genistin Δ zeigt in allen drei Gruppen einen Anstieg der Konzentrationen am Ende der Versuchsreihe im Vergleich zu Beginn an. Die G + Q-Gruppe zeigt den höchsten medianen Unterschied (2,56 $\mu\text{mol/l}$) zwischen dem Anfangs- und Endwert, gefolgt von der G-Gruppe mit 1,9 $\mu\text{mol/l}$ und der G + N-Gruppe mit 1,89 $\mu\text{mol/l}$	76
Abbildung 20: Mittelwerte der Gruppen-Differenzen von Genistin (Genistin Δ). Eine Zunahme der Genistein Δ -Mittelwerte im EDTA-Vollblut am Ende der Versuchsperiode im Vergleich zu Beginn ist in den allen drei Gruppen festzustellen. Auch hier resultiert der größte Anstieg durch die Supplementierung von Genistein + Quercetin (2,48 $\mu\text{mol/l}$), gefolgt von G (2,41 $\mu\text{mol/l}$) und G + N (2,08 $\mu\text{mol/l}$). Diese Mittelwerte unterstützen die jeweiligen Mediane und veranschaulichen die Tendenzen im linear gemischten Modell.	77
Abbildung 21: Darstellung des Mikrobioms durch die Intervention. Die Darstellung der Mikrobiomprofile (before = vor der Studie zum Zeitpunkt U1A; after = nach der Studie zum Zeitpunkt U3B) zeigt, dass die Intervention mit G, G + N bzw. G + Q keinen messbaren Einfluss auf die darmständigen Bakterien (p-Value: 0,998) hat und damit keine Änderung des Mikrobioms verursacht.	79
Abbildung 22: Darstellung der Richness des Mikrobioms durch die Intervention. Richness zeigt die Summe aller taxonomisch ähnlichen Gruppen, also der OTU's an. Der Teilnehmer #8 hat die wenigsten und die Teilnehmerin #1 die meisten OTU's. Die restlichen Teilnehmer sind im mittleren OTU-Bereich. Die Änderungen der Zu- bzw. Abnahmen der OTU's ist nicht statistisch signifikant.	80

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Genistein in Lebensmitteln. Die detaillierten Angaben wurden mit der <i>USDA Database for the Isoflavone Content of Selected Foods Release 2.1</i> und die Online-Datenbank <i>Phenol-Explorer</i> erstellt und zeigt die Genisteinkonzentration bei ausgewählten Lebensmitteln an. Die meist erheblichen Konzentrationsunterschiede bei einem Lebensmittel werden vom Zeitpunkt der Ernte, dem Reifegrad, dem Boden und anderen Faktoren verursacht.	16
Tabelle 2: Quercetin in Lebensmitteln. Die Quercetinmittelwerte und Schwankungsbreite in Lebensmitteln wurden mit der <i>USDA Database for the Isoflavone Content of Selected Foods Release 3.0 (D. B. H. Seema Bhagwat, Joanne M. Holden, 2015)</i> und die Online-Datenbank <i>Phenol-Explorer</i> erstellt.	18

Tabelle 3: Naringenin in Lebensmitteln. Die Mittelwerte und Schwankungsbreite für die Naringeninkonzentration in ausgewählten Lebensmitteln wurden mit der <i>USDA Database for the Isoflavone Content of Selected Foods Release 3.0</i> und die Online-Datenbank <i>Phenol-Explorer</i> erstellt.....	19
Tabelle 4: Interaktionen zwischen UGTs und Flavonoide. (Aus Jiang et al., 2012 ohne Lit.).....	26
Tabelle 5: Interaktionen zwischen SULTs und Flavonoide. (Aus Jiang et al., 2012 ohne Lit.).....	27
Tabelle 6: Interaktion zwischen Transportern und Flavonoide. (Modifiziert aus Jiang et al., 2012)	
.....	28
Tabelle 7: Klassifikation der Mucopolysaccharidose Typ III.....	34
Tabelle 8: Versuchsprotokoll. Jeweils vier Probanden in einer Gruppe (Gruppe I mit Teilnehmer #1 - #4, Gruppe II mit Teilnehmer #5 - #8 und Gruppe III mit Teilnehmer #9 - #12) erhielten zu Beginn jeder siebentägigen Einnahmeperiode (U1A = Beginn der ersten Einnahmeperiode, U2A = Beginn der zweiten Einnahmeperiode und U3A = Beginn der dritten Einnahmeperiode) eine der Versuchsdosierungen (A = 100 mg Genistein + 100 mg Naringenin, B = 100 mg Genistein + 100 mg Quercetin oder C = 100 mg Genistein) in unterschiedlicher Reihenfolge. Zwischen den Einnahmeperioden lag eine wash-out-Periode von sieben Tagen (U1B = Ende der ersten Einnahmeperiode, U2B = Ende der zweiten Einnahmeperiode und U3B = Ende der dritten Einnahmeperiode), in der die Probanden keine Versuchspräparate einnahmen.	46
Tabelle 9: Verwendete Flavonoide und Dosierungen. Die Versuchspräparate A (100 mg Genistein + 100 mg Naringenin), B (100 mg Genistein + 100 mg Quercetin) oder C (100 mg Genistein) wurden in unterschiedlicher Reihenfolge in den jeweiligen Einnahmeperioden eingenommen.	
.....	46
Tabelle 10: Studienablaufplan. Zu jeder Visite wurden bei allen Teilnehmern die Abbruchkriterien überprüft, Blut asserviert, die jeweilige Versuchskombination mitgegeben und ein Termin für die nächste Visite gemacht. Nur bestimmte Kotrollparameter (Genistein, Kreatinin, γ-GT, CRP, Triglyceride und Urin) wurden zu jeder Visite analysiert.	48
Tabelle 11: Verwendeter Lauf für die Bestimmung der Proben. Multi-Step-Gradient des Laufs	49
Tabelle 12: Ausführliches Protokoll zur Probenaufbreitung (Galasso, 2012).	51
Tabelle 13: Vorbereitung der Reagenzien im 'OxiSelect™ Total Antioxidant Capacity (TAC) Assay Kit	53
Tabelle 14: Verdünnung der jeweiligen Reagenzien im OxiSelect™ MDA AdductCompetitive ELISA Kit.....	55

Tabelle 15: Verdünnung der Standardkurve	55
Tabelle 16: Anthropometrische Daten der Probanden und deren Zugehörigkeit zur Versuchsgruppe.....	59
Tabelle 17: Anamnestische Angaben der Probanden zu Erkrankungen, Einnahme von Medikamenten oder Nahrungsergänzungsmitteln und zu Lebensstilfaktoren der Studienteilnehmer in der Vorgeschichte.	60
Tabelle 18: Ergebnisse zu Obstipation und Durchfall der Studienteilnehmer in der Vorgeschichte.	61
Tabelle 19: Ergebnisse der Häufigkeitsbefragung mittels Food-Frequency-Questionnaire.	62
Tabelle 20: LGM bei TAC _Δ . Die geschätzten Effekte des LGM's für Genistein sind in der Spalte „Geschätzter Effekt“ abzulesen. Für diesen wird ein 95 % Konfidenzintervall angegeben. Der daraus resultierende Effekt für die jeweilige Gruppe, der aus der Summe des geschätzten Effekts der jeweiligen Gruppe und dem konstanten Term (Intercept) besteht ist, in der Spalte resultierender Effekt berechnet. Die größte Zunahme während der Supplementierung wird in der G + Q-Gruppe erreicht, gefolgt von der G + N-Gruppe während die Zunahme in der G-Gruppe am geringsten ist.....	67
Tabelle 21: LGM bei MDA _Δ . Wie für die TAC ist auch für MDA die höchste Zunahme ist in der G + Q-Kombination zu sehen, gefolgt von den werten unter der G + N-Kombination und die geringste Änderung war in der G-Gruppe festzustellen.	70
Tabelle 22: Kalibrationskontrolle (10 µM Genistein-Standard)	72
Tabelle 23: LGM bei Genistein _Δ . Die G + Q-Kombination bewirkt die größte Zunahme, gefolgt von G-Gruppe. Unter der G + N-Kombination verminderte sich die Konzentration des Genistein im Vollblut.	75
Tabelle 24: LGM bei Genistin _Δ . Die G + Q-Kombination hat auch hier die höchste Zunahme, gefolgt von G-Gruppe und die geringste Zunahme findet sich während der der G + N-Kombination.....	78
Tabelle 25: Vergleich der Genisteinkonzentration aus unserer Studie mit der Literatur. Gelistet nach Konzentration nach der Supplementation.	93

12 Anhang

12.1 Telefonscreening

SOZIODEMOGRAPHISCHE DATEN

- Name, _____
Vorna _____
- me:
- Geschl weiblich männlich
echt:
- Alter: |_____|_____| Jahre

- **Körpergrö** | ____ | ____ | ____ | cm
ße:
- **Gewic** | ____ | ____ | ____ | kg
ht:
- **BMI:** | ____ | ____ | ____ |

AUSWAHLKRITERIEN A (ERKRANKUNGEN UND MEDIAMENTE)

- | | | | |
|--|-----------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|
| 1. Wurde bei Ihnen eine Stoffwechselstörung festgestellt? | <input type="checkbox"/> ja | <input type="checkbox"/> nein | |
| 2. Wurde bei Ihnen eine Lebererkrankung festgestellt? | <input type="checkbox"/> ja | <input type="checkbox"/> nein | |
| 3. Wurde bei Ihnen eine Nierenerkrankung festgestellt? | <input type="checkbox"/> ja | <input type="checkbox"/> nein | |
| 4. Wurde bei Ihnen eine Magen-Darm-Erkrankung festgestellt? | <input type="checkbox"/> ja | <input type="checkbox"/> nein | |
| 5. Wurde bei Ihnen eine Allergie oder Unverträglichkeit festgestellt? | <input type="checkbox"/> ja | <input type="checkbox"/> nein | |
| 6. Leiden Sie unter Verstopfung? | | | |
| <input type="checkbox"/> nie | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> öfters | <input type="checkbox"/> (fast) immer |
| selte | | | |
| n | | | |
| 7. Leiden Sie unter Durchfall? | | | |
| <input type="checkbox"/> nie | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> öfters | <input type="checkbox"/> (fast) immer |
| selte | | | |
| n | | | |
| 8. Bestehen oder haben früher andere körperliche oder psychische Erkrankung(en) bestanden? | <input type="checkbox"/> ja | <input type="checkbox"/> nein | |

Wenn ja, bitte spezifizieren Erkrankung(en), Medikament(e) und Tagesdosis):

9. Nehmen / nahmen Sie Schlaf- oder Beruhigungsmittel, Psychopharmaka (z.B. Amphetamine)?

AUSWAHLKRITERIEN B (ERNÄHRUNG)

- | | | |
|---|-----------------------------|-------------------------------|
| 10. Nehmen Sie regelmäßig Supplamente und/oder Nahrungsergänzungsmitteln? | <input type="checkbox"/> ja | <input type="checkbox"/> nein |
| 11. Wie oft konsumieren Sie Soja und Sojaprodukte (z.B. Sojabohnen, Sojakeimlinge, Tofu, Sojadrinks, Sojapudding, | <input type="checkbox"/> ja | <input type="checkbox"/> nein |

Sojajoghurt, Sojaeis, Sojamehl, Sojaflocken,
Sojasoße, Sojaöl)?

Wenn ja, bitte täglich
spezifizieren:

- mehrmals in der Woche
- mehrmals im Monat
- mehrmals im Jahr

12. Konsumieren Sie Alkohol?

ja nein

Wenn ja, bitte 1 Glas wöchentlich
spezifizieren:

- 2-3 Gläser wöchentlich
- 1 Glas täglich
- 2-3 Gläser täglich
- 3-4 Gläser täglich

13. Rauchen Sie?

ja nein

14. Sind Sie bereit, während der
Einnahmezeit der Antioxidantien auf den
Alkoholkonsum komplett zu verzichten?
Wenn nein, bitte geben Sie den Grund an:

15. Sind Sie bereit, während der
Einnahmezeit der Antioxidantien keine
Medikamente (außer Kontrazeptiva),
Drogen, Supplamente,
Nahrungsergänzungsmittel, Sojaprodukte,
Lebensmittel mit Sojagehalt einzunehmen
bzw. zu konsumieren?
Wenn nein, bitte geben Sie den Grund an:

ja nein

12.2 Körperliche Untersuchung

Antioxidantien – Studie

Prof. Dr. med habil. Olaf Adam
Physiologikum der LMU
Goethestraße 31
80336 München

Körperliche Untersuchung

Name

Anamnese

Familie

Stoffwechselleiden in der Familie

Eigene Anamnese

Stoffwechselerkrankungen:

SD-Erkrankungen:

G-I-Erkrankungen:

Niere:

Sonstige Erkrankungen:

Untersuchungsbefund und Beurteilung

Größe:

Gewicht:

BMI:

RR:

Puls:

Kopf:

Hals:

Thorax:

Abdomen:

Extremitäten:

Neurologisch:

Beurteilung:

Unterschrift

12.3 Patientenaufklärung und Einwilligungserklärung

Klinikum der Universität
München
Medizinische Klinik – Innenstadt
Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

Klinikum der Universität München • Medizinische Klinik – Innenstadt
Ziemssenstraße 1 • D-80336 München

Ludwig
Maximilians
Universität
München



Prof. Dr. Olaf Adam
Ernährungsmedizin
Physiologikum der LMU
Goethestraße 31
80336 München
Tel 089-2180-75764
FAX 089-218075765

München, den 04.08.2020

muenchen.de

„Versuche zur Konzentrationserhöhung von Genistein im Plasma durch metabolisch konkurrierende Polyphenole“

- Informationsschrift und Einwilligungserklärung -

Liebe Interessentin, lieber Interessent,

Isoflavone kommen als Antioxidantien in Pflanzen vor und es werden ihnen vorbeugende Eigenschaften gegen Gefäßverkalkung, Krebs und entzündliche Erkrankungen zugeschrieben. Auch für so genannte Speichererkrankungen, wie das Sanfilippo Syndrom spielt die Entzündung eine Rolle. Da es sonst keine Behandlungsmöglichkeit gibt, hat man versucht, die regelmäßige Verschlechterung der Erkrankung durch das Isoflavon Genistein zu verlangsamen. Das ist zum Teil geglückt, allerdings wurden die erzielten Genisteinspiegel im Blut und damit die antioxidative Wirkung als zu gering angesehen. Mit unserer Untersuchung soll festgestellt werden, ob andere Isoflavone die antioxidative Kapazität und die Genisteinspiegel im Blut verbessern.

Dazu sind eine ärztliche Befragung (Anamnese), Urin-, Stuhl- und Blutuntersuchungen, sowie die Einnahme von Briefchen mit Isoflavonen (Genistein, Naringenin, Quercetin) erforderlich. Genistein, Naringenin und Quercetin sind Antioxidantien, die in der verwendeten Konzentration in Soja und den daraus hergestellten Produkten, ebenso in zahlreichen Gemüsen, Obst und Nüssen (z. B. Tomaten, Küchenzwiebeln, Kohlgemüse, Äpfeln, Tee, Beeren) vor. Deren Gehalt hängt aber von zahlreichen Faktoren (Reifungsgrad, Zubereitung usw.) ab, so dass wir die Untersuchungen nicht mit natürlichen Lebensmitteln machen können. Wir verwenden deshalb standardisierte Extrakte aus diesen Lebensmitteln, die auch als Nahrungsergänzungsmittel zugelassen und im Handel sind. Wie daraus klar hervorgeht, handelt sich also nicht um Heilmittel oder Arzneimittel, dazu sind diese zur Vorbeugung der oben erwähnten Krankheiten (Primärprävention) eingesetzten Extrakte viel zu wenig wirksam.

Wenn Sie an dem Versuch teilnehmen, so werden Sie für 7 Tagen der Einnahme von Genistein 160mg/Tag oder Genistein 160mg/Tag + Quercetin 100mg oder Genistein 160mg/Tag + Naringenin zugeteilt. Jeweils vier Teilnehmer beginnen mit einer der drei Alternativen. Nach einer Pause von 7 Tagen erhalten Sie die nächsten Briefchen mit den Antioxidantien. In welcher Reihenfolge Sie die Antioxidantien erhalten, ist für jeweils 4 Teilnehmer unterschiedlich, um Zeiteffekte zu vermeiden. Jede Einnahmeperiode dauert 7 Tage, insgesamt nehmen Sie also 21 Tage Antioxidantien ein. Vor Versuchsbeginn und am Ende werden Stuhlproben untersucht. Urin- und Blutproben werden beim Vorversuch und am Anfang und Ende jeder der drei Versuchsperioden untersucht. Die Ergebnisse der Untersuchungen werden Ihnen schriftlich nach Abschluss der Untersuchungen mitgeteilt. Als Aufwandsentschädigung für Sie können wir Ihnen nach Abschluss aller Untersuchungen € 400,00 anbieten. Sie können zudem aus Ihren Ergebnissen erkennen, ob bei Ihnen eine ausreichende Versorgung mit den sekundären Pflanzenstoffen gewährleistet ist.

Ein unmittelbarer Nutzen durch die Teilnahme an der Studie ist zur Zeit nicht vorhersehbar. Er könnte theoretisch in einem wissenschaftlichen Erkenntnisgewinn bestehen, in Zukunft die Versorgung mit Antioxidantien und die Möglichkeiten einer Verzögerung des Verlaufs von Speicherkrankheiten (z. B. Sanfilippo Syndrom) erreichen zu können.

Für *Genistein* sind in der vorgesehenen Dosierung und bei Verwendung während des Versuchszeitraums keine unerwünschten Wirkungen zu erwarten.

Für *Naringenin* sind in der vorgesehenen Dosierung und bei Verwendung während des Versuchszeitraums keine unerwünschten Wirkungen zu erwarten.

Für *Quercetin* sind in der vorgesehenen Dosierung und bei Verwendung während des Versuchszeitraums keine unerwünschten Wirkungen zu erwarten.

Nur der Prüfungsleiter hat im Rahmen der entsprechenden gesetzlichen Vorschriften Zugang zu den vertraulichen Daten, in denen Sie namentlich genannt werden. Diese Person unterliegt der ärztlichen Schweigepflicht und ist zur Beachtung des Datenschutzes verpflichtet. Die Weitergabe der pseudonymisierten Daten im In- und Ausland erfolgt ausschließlich zu statistischen und wissenschaftlichen Zwecken, und Sie werden ausnahmslos darin nicht namentlich genannt. Auch in etwaigen Veröffentlichungen der Daten dieser klinischen Prüfung werden Sie nicht namentlich genannt.

Die Daten zur Person des Patienten und die im Rahmen der Studie zu erhebenden Befunden werden gespeichert, aber der Personenbezug durch Verschlüsselung (sog. Pseudonymisierung) unkenntlich gemacht. Dies geschieht durch Zuordnung einer Nummer, die in keinem Zusammenhang zu Ihren persönlichen Daten steht nur der Studienleiter hat ggf. codierten Zugang, der eine Rückverfolgung der Daten erlaubt. Gründe für die Entschlüsselung sind z. B. neu aufgetretene, ungeklärte Beschwerden des Teilnehmers oder auffällige Laborparameter.

Die Teilnahme an der Studie ist völlig freiwillig und kann jederzeit ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteile für die weitere Betreuung widerrufen werden. Wenn Sie sich zum Widerruf der Einwilligung entschließen, werden die bisher gesammelten Proben fachgerecht entsorgt und die bisher erhobenen Daten entsprechend den Richtlinien vernichtet.

Ich bin ausführlich über die Studie aufgeklärt worden, bin mit der Erhebung und Verwendung persönlicher Daten nach Maßgabe der Patienteninformation einverstanden. Ich konnte meine Fragen klären und erkläre mich mit der Teilnahme an der Studie einverstanden.

München, den

Unterschrift Proband(in)

Unterschrift aufklärender Arzt

12.4 Teilnehmervertrag

**Vertrag über die Durchführung der Versuche zur Konzentrationserhöhung von Genistein im Plasma
durch metabolisch konkurrierende Polyphenole**

zwischen

Proband:

Name, Vorname _____

Strasse, Hausnummer _____

PLZ, Ort _____

Telefonnummer: _____

E-Mail: _____

und

Klinikum der Universität München, Medizinische Klinik – Innenstadt, Ernährungsmedizin

Mediziner Leiter: Professor Olaf Adam

Goethestraße 31, 80336 München

Tel: 089-2180-75764

Fax: 089-2180-74765

§1 Vertragsdauer und Kündigung

- (1) Der Vertrag wird mit der Unterzeichnung durch beide Vertragsparteien wirksam.
- (2) Der Vertrag kann bei Vorliegen eines wichtigen Grundes jederzeit und mit sofortiger Wirkung außerordentlich gekündigt werden. Als wichtiger Grund gelten insbesondere: Ungenügende Qualität der Dokumentation und wesentliche Abweichungen vom Prüfungsplan.
Geplanter Beginn: 26./27.05.2015
Geplantes Ende der Studie: 02./03.07.2015
- (3) Die Kündigung bedarf der Schriftform.

§2 Vergütung

- (1) Die vereinbarte Aufwandsentschädigung von 400 Euro entfällt, falls die Abbruchkriterien (s. §2 Punkt 2) des Prüfungprotokolls ganz oder teilweise nicht eingehalten wurden oder falls die Daten aufgrund fehlender oder unplausibler Angaben ganz oder teilweise nicht auswertbar sind.
- (2) Zu den Abbruchkriterien gehören:
 - Entzug der Zustimmung zu den Versuchsbedingungen
 - Verstoß gegen eines der Einschlußkriterien
 - Auftreten einer akuten gastro-intestinalen Erkrankung
 - Unregelmäßige Einnahme der Versuchssubstanzen
 - Verstoß gegen das Versuchsprotokoll
- (3) Eine Teilzahlung der Honorierung ist nicht erlaubt. Die Überweisung des Aufwandsentschädigungs wird erst nach Ablauf der Studie und bei Einhaltung **aller** im Studienplan vorgesehenen Visiten sowie Compliance der Abbruchkriterien erfolgen.

Die Aufwandsentschädigung wird überwiesen an:

Empfänger: _____

Kontonummer / IBAN: _____

BLZ / BIC: _____

Bank: _____

Verwendungszweck: _____

Unterschriften

[MEDIZINISCHER LEITER]

Professor Olaf Adam

Goethestraße 31, 80336 München

Datum/ Ort

[TEILNEHMER] Name, Vorname	Datum/ Ort

12.5 Anleitung zur Stuhlentnahme

KONTAKTDATEN BEI FRAGEN

Klinikum der Universität München	<u>Medizinischer Leiter der Studie:</u> Professor Olaf Adam	<u>Projektleitung:</u> Frau Gökcen Alco
Medizinische Klinik – Innenstadt Ernährungsmedizin	Goethestraße 31, 80336 München Tel: 089-2180-75764	Tel: 089-2180-75764
Physiologikum der LMU	Fax: 089-2180-74765	

STUHLGEWINNUNG

Anleitung zur Gewinnung einer Stuhl-Probe

Bitte entnehmen Sie die Stuhlprobe, wenn möglich am Tag des Studienzentrumsbesuchs – möglichst vom ersten Stuhlgang!

Vorbereitung:

1. Bitte befestigen Sie den beigelegten „**Stuhlfänger**“, wie auf dem Stuhlfänger beschrieben, mit Hilfe der Klebeflächen an der Toiletttenbrille und hängen ihn in die Toilettenschüssel.
2. Stellen Sie das erhaltene **Stuhlsammelgefäß** parat. Am Verschluss des Gefäßes ist ein Plastiklöffel angebracht, der für die Entnahme der Stuhlprobe verwendet werden soll.

Im Stuhlsammelgefäß befindet sich eine Lösung zur Stabilisierung der Stuhlprobe. Diese Lösung sollten Sie unbedingt in dem Röhrchen belassen. Die Lösung ist „reizend“ (aber nicht giftig) und sollte daher ausschließlich wie vorgesehen für die Stuhlentnahme eingesetzt werden.

3. Ziehen Sie die Einmalhandschuhe an.

Durchführung der Stuhlentnahme:

4. Geben Sie eine **Stuhlprobe** auf den Stuhlfänger ab (**Der Stuhlfänger ist nur für eine begrenzte Traglast ausgelegt**). Achten Sie darauf, dass die Stuhlprobe nicht durch Urin verunreinigt wird.
5. Pressen Sie sicherheitshalber beim Aufstehen von der Toiletenbrille die Enden des Stuhlfängers leicht auf den Sitz. Sollte sich die Stuhlprobe nicht auf dem Stuhlfänger befinden, sammeln Sie bitte keinen Stuhl aus der Toilettenschüssel!
6. Mit dem Löffel am Verschluss des Stuhlsammelgefäßes entnehmen Sie **an zwei verschiedenen Stellen** des Stuhls jeweils einen Löffel Stuhl und geben ihn in das Stuhlsammelgefäß.
Das Stuhlsammelgefäß bitte nicht komplett befüllen! 2 Löffel sind ausreichend!
7. Verschließen Sie das Stuhlsammelgefäß gut und **schütteln die Probe 10x**.
8. Falls nötig, säubern Sie bitte das Äußere des Stuhlsammelgefäßes.
9. Entfernen Sie den **Stuhlfänger** und werfen ihn in die Toilette. Nach einer kurzen Einweichzeit des Stuhlfängers kann dieser einfach in der Toilette hinuntergespült werden.

Weitere Schritte:

10. **Verpacken** Sie das Stuhlsammelgefäß (und die Urinprobe) in den Transportbeutel.
11. **Lagern** Sie die Stuhlprobe in dem Transportbeutel bitte bis zum Transport ins Studienzentrum im **Kühlschrank. Bitte nicht einfrieren!**

Fragebogen „Angaben zur Stuhlentnahme“:

12. Bitte füllen Sie **direkt** nach der Stuhlentnahme den mitgelieferten „**Fragebogen „Angaben zur Stuhlentnahme“** aus.
13. Bitte legen Sie den gefalteten **Fragebogen in den Transportbeutel**.

12.6 Verzehrhäufigkeitsfragebogen (Food-Frequency-Questionnaire)

Erhebungsbogen – Ernährung mit dem Food-Frequency-Questionnaire

Initialien des Befragten:

Wie häufig haben Sie die folgenden Lebensmittel in den letzten 3 Monaten verzehrt? (Bitte ankreuzen)

Lebensmittel	nie oder < als 1 Mal/ Monat	1 bis 3 Mal/ Monat	1 bis 2 Mal/ Woche	3 bis 6 Mal/ Woche	täglich	mehrmals täglich
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Fleisch						
Fisch						
Eier						
Wurst						
Käse						
Milch/ Joghurt						
Sahne						
Schokolade						
Kuchen						
Blätterteig/ Pastete						
Kekse						
Nüsse/ Chips						
Butter						
Margarine						
Öl						
Plattenfette/ Speck						
Fastfood						
Obst						
Gemüse						
Salat						
Hülsenfrüchte						
Kartoffeln						
Reis						
Nudeln						
Vollkorn-/Mischbrot						
Flocken						
Bier						
Wein/ Sekt						

12.7 Lebensmittelempfehlung während der Studienzeit

KONTAKTDATEN BEI FRAGEN

Klinikum der Universität München Medizinische Klinik – Innenstadt Ernährungsmedizin Physiologikum der LMU	<u>Medizinischer Leiter der Studie:</u> Professor Olaf Adam Goethestraße 31, 80336 München Tel: 089-2180-75764 Fax: 089-2180-74765	<u>Projektleitung:</u> Frau Gökcen Alco Tel: 089-2180-75764
--	--	---

Sie erhalten in unterschiedlicher Reihenfolge die sekundären Pflanzenstoffe Genistein, Quercetin und

NAHRUNGSMITTEL, AUF DIE SIE BESONDERS ACHTEN MÜSSEN:

Naringenin. Diese Antioxidantien sind Bestandteile von zahlreichen Lebensmitteln, wie Soja, Nüssen, Obst, Früchten und Gemüse. Unsere Untersuchungen werden mit Extrakten aus diesen Lebensmitteln durchgeführt, die im Handel freiverkäuflich als Nahrungsergänzungsmittel angeboten werden.

Der Verzehr von üblichen Mengen dieser Lebensmittel ist problemlos. Sie sollten nur keine „Obsttage“ einlegen oder Vegetarier werden. Alle Konzentrate, wie Fruchtsäfte, Marmeladen, Smoothies usw. bitte während der Versuchszeit meiden.

Besonders hohe Konzentrationen von **Genistein** sind in Schmetterlingsblüttern, wie Soja und allen Hülsenfrüchten (Leguminosen, Erdnüsse, Erbsen, Bohnen, Linsen, Lupinen) und daraus hergestellten Produkten enthalten. Viele Produkte werden mit Soja angereichert, wie z. B. Schokolade, Energydrinks, Mayo oder fettreduzierte Produkte. Achten Sie während der Versuchszeit besonders auf die Inhaltsstoffe, die auf der Produktpackung angegeben sind. Von den angegebenen Lebensmitteln in der Versuchszeit bitte Abstand nehmen.

Große Mengen an **Quercetin** sind in Zwiebeln, Äpfeln, Brokkoli oder grünen Bohnen enthalten. Durch Kochen wird Quercetin weitgehend zerstört. Auch durch das Schälen von Obst und Gemüse sinkt der Flavonoid-Anteil (Quercetin) drastisch, denn speziell in den farbigen Schalen (Flavonoide sind Pflanzenfarbstoffe) ist der Flavonidgehalt hoch. Also besonders beim Verzehr roher Produkte vorsichtig sein.

Einen hohen Quercetingehalt findet man in:

Tee (CamelliaSinensis) Zwiebeln – besonders in den äußersten Ringen (284–486 mg·kg ⁻¹) Heidelbeeren (kultiviert 74 mg·kg ⁻¹ , wild 146–158 mg·kg ⁻¹) Grünkohl (60–110 mg·kg ⁻¹) roten Trauben Äpfeln (21–440 mg·kg ⁻¹) Schnittlauch (245 mg·kg ⁻¹) Zitrusfrüchten Brokkoli (30 mg·kg ⁻¹) und anderem grünen Blattgemüse	grünen Bohnen (39 mg·kg ⁻¹) Kirschen (32 mg·kg ⁻¹) Himbeeren schwarzen Johannisbeeren (69 mg·kg ⁻¹) Brombeeren (45 mg·kg ⁻¹) Preiselbeeren (kultiviert 83–156 mg·kg ⁻¹ , wild 121 mg·kg ⁻¹) der Süßen Eberesche (85 mg·kg ⁻¹) Sanddorn (62 mg/kg) und Krähenbeeren (kultiviert 53 mg/kg, wild 56 mg·kg ⁻¹). Tomaten Kapern (1800 mg·kg ⁻¹)
--	--

Naringenin ist ein Flavonoid, welches vor allem in Zitruspflanzen, besonders in Grapefruit, zu finden ist. Es ist für den bitteren Geschmack von Grapefruit verantwortlich ist.

12.8 Laboruntersuchung

Klinische Chemie			
Natrium	mmol/l	PS	135 – 145
Kalium	mmol/l	PS	3.5 – 5.0
Blutzucker	mg/dl	PS	60 – 99
Kreatinin	mg/dl	PS	0.5 – 1.0
C-reakt. Protein	mg/dl	PS	≤ 0.50
Eiweiß, gesamt	g/dl	PS	6.0 – 8.5
Bilirubin gesamt	mg/dl	PS	≤ 1.2
GOT [AST] (37°)	U/l	PS	≤ 35
GPT [ALT] (37°)	U/l	PS	≤ 35
Gamma-GT (37°)	U/l	PS	≤ 40
Alk. Phosphatase (37°)	U/l	PS	35 – 105
Cholesterin	mg/dl	PS	120 – 240
Triglyzeride	mg/dl	PS	50 – 200
Urin, SM, Stuhl			
Urinstatus (Stix)		U	
U-Stix Leukozyten	Leuko/µl	U	10
U-Stix Nitrit		U	neg.
U-Stix pH		U	5.0 – 6.0
U-Stix Eiweiss	mg/dl	U	neg.
U-Stix Glucose	mg/dl	U	neg.
U-Stix Keton	mg/dl	U	neg.
U-Stix Urobilinogen	mg/dl	U	≤ 1.0
U-Stix Bilirubin		U	neg.
U-Stix Blut	Ery/µl	U	5
U-Stix spez. Gewicht	g/l	U	1005 – 1030
Hämatologie			
Blutbild		B	
Leukozyten	G/l	B	4.0 – 10.4
Erythrozyten	T/l	B	3.96 – 5.16
Hämoglobin	g/dl	B	11.5 – 15.4
Hämatokrit		B	0.346 – 0.453
MCV	fL	B	80.0 – 95.5
MCH	pg	B	26.1 – 32.6
MCHC	g/dl	B	31.9 – 35.5
Thrombozyten	G/l	B	176 – 391
Endokrinologie, Spezialanalytik			
TSH	µU/ml	S	0.30 – 4.00
Werte außerhalb der Richtwerte sind grau hinterlegt.			
Material: S Serum, B Vollblut, P Plasma, U Urin, L Liquor, KM Knochenmark, ST Stuhl, SM Sondermaterial			

13 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. habil. O. Adam für die Bereitstellung des interessanten Themas, die engagierte und warmherzige Betreuung sowie das mir entgegengebrachte Vertrauen. Mit vielen hilfreichen Anregungen und konstruktiven Vorschlägen leitete er mich stets motivierend und zielstrebig zum wissenschaftlichen Arbeiten an und stand mir jederzeit mit unermüdlichem Engagement unterstützend zur Seite. Es war eine große Bereicherung!

Großer Dank der Hühlein-Kurscheid-Stiftung und Karl-Thiemig-Stiftung zur Förderung von Wissenschaft, durch deren Anschubfinanzierung die vorbereitenden Untersuchungen für diese Arbeit ermöglicht wurden.

Für die kompetente Unterstützung bei der Formulierung von Versuchs- und Bezugspräparaten möchten wir uns bei Herrn Apotheker Ingo Beer und Frau Angela Gröber, Marien-Apotheke, Sendlinger-Tor-Platz 7, 80336 München bedanken.

Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. Stephan C. Bischoff und Herrn Andreas Ring vom Institut für Ernährungsmedizin der Universität Hohenheim für die Einarbeitung und Auswertung der Genisteindaten.

Besonderer Dank gilt auch Frau Nicole Lichter und dem Gastro-Laborteam der LMU München für die Durchführung und Auswertung der meisten Laboruntersuchungen. Frau Lichter war mit ihrer herzlichen und hilfsbereiten Art eine sehr große Stütze.

Herzlich danken möchte ich dem betriebsärztlichen Dienst und Gesundheitsmanagement, insbesondere Herrn Dr. med. Winfried Kapfhammer und sein Team für die Bereitstellung der Untersuchungsräume für die Probandenrekrutierung und Durchführung der Studie.

Danken möchte ich ebenso Herrn Prof. Dr. Küchenhoff und seinen Mitarbeitern des Instituts für Statistik der LMU München für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Und Dank gilt selbstverständlich auch den Probanden, die mit großem Interesse an der Studie teilgenommen haben.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern Fatma und Hüseyin Alco und Schwestern Imren, Gülsen und Buket, die mich während den Jahren meiner Promotion in vielerlei Hinsicht unterstützten und individuell ihren Teil zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Für Eure uneingeschränkte Liebe und Geduld danke ich Minchen & Manni.

Von tiefstem Herzen danke ich meinem Verlobten Christoph für seine fürsorgliche Pflege während meines Schreibwahns, Unterstützung und Rückhalt in allem, was ich mir vornehme.

14 Eidesstattliche Erklärung

Alco, Gökcen

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Wirkung der Kombination von Genistein mit anderen sekundären Pflanzenstoffen auf die Konzentration des Genistein im Vollblut, sowie die totale antioxidative Kapazität und die Lipidperoxidation im Plasma gesunder junger Erwachsener.

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

München, 10.06.2020

Unterschrift

Gökçen Alço