Aus dem Institut für Kreislaufforschung und Sportmedizin

Abteilung für molekulare und zelluläre Sportmedizin

der Deutschen Sporthochschule Köln

Geschäftsführender Leiter: Prof. Dr. Wilhelm Bloch

Vergleichende Studie zur Wirkung von Soja-Isoflavonen auf die viszerale Fettgewebsakkumulation in männlichen und weiblichen Wistar-Ratten

von der Deutschen Sporthochschule Köln

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der Naturwissenschaft (Dr. rer. nat.)

angenommene Dissertation

vorgelegt von

Anne Kurrat

aus Köln

Köln 2019

Erster Gutachter:	Prof. Dr. Patrick Diel
Zweite Gutachterin:	Prof. Dr. Sabine Kulling
Vorsitzender des Promotionsausschusses:	Univ.-Prof. Dr. Mario Thevis
Datum der Disputation:	18.07.2019

Eidesstattliche Versicherungen gem. § 7 Abs. 2 Nr. 4 und 5 der Promotionsordnung der Deutschen Sporthochschule Köln, 20.02.2013:

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

Hierdurch erkläre ich, dass ich die „Leitlinien guter wissenschaftlicher Praxis“ der Deutschen Sporthochschule Köln eingehalten habe.

Köln, den

Anne Kurrat

Die vorliegende Arbeit ist im Rahmen des DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft) geförderten Projekts „IsoCross - Cross-species comparison of metabolism, estrogen sensitivity, epigenetics and carcinogenesis“ entstanden.

Teile dieser Arbeit sind bereits in der Publikation „A. Kurrat, T. Blei, F.M. Kluxen, D.M. Mueller, M. Piechotta, S.T. Soukup, S.E. Kulling, P. Diel, Lifelong exposure to dietary isoflavones reduces risk of obesity in ovariectomized Wistar rats. Mol. Nutr. Food Res. 2015, 59(12):2407-18.“ veröffentlicht worden.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis ..... **IV**

Tabellenverzeichnis ..... **VI**

Abkürzungsverzeichnis ..... **VII**

Zusammenfassung ..... **X**

Abstract ..... **XIV**

1 Einleitung **1**

1.1 Übergewicht und die physiologischen Grundlagen **2**

1.1.1 Definition 2

1.1.2 Biologie der Adipozyten und Fettgewebsplastizität 2

1.1.3 Endokrine Funktion des Fettgewebes 4

1.1.4 Lipidstoffwechsel 5

1.1.5 Transkriptionelle Kontrolle 7

1.1.6 Einfluss der Sexualhormone auf das weiße Fettgewebe 8

1.1.7 Folgen von Übergewicht 12

1.2 Isoflavone **14**

1.2.1 Vorkommen und Charakterisierung 14

1.2.2 Aufnahmemengen im Menschen 15

1.2.3 Pharmakokinetik 15

1.2.4 Wirkmechanismen 19

1.2.5 Biologische Wirkung und Toxizität 20

1.2.5.1 Wirkung auf Wechseljahresbeschwerden und Osteoporose 21

1.2.5.2 Wirkung auf die Schilddrüse 22

1.2.5.3 Wirkung auf hormonabhängige Krebsarten 22

1.2.5.4 Wirkung auf Blutlipide und koronare Herzerkrankungen 23

1.2.5.5 Wirkung auf das Fettgewebe 24

1.3 Zielstellung **26**

2 Material & Methoden **28**

2.1 Versuchstiere **28**

2.2 Futtersorten und Isoflavonextrakt **28**

2.3 Versuchsdesign **31**

2.4 Sektion und Probengewinnung **32**

2.5 Bestimmung der Adipozytengrößen ... 32
2.6 Isoflavonanalytik ... 34
2.7 Blutanalysen ... 35
2.8 Genexpressionsanalysen ... 35
2.8.1 RNA-Extraktion, -Isolation und Konzentrationsbestimmung ... 35
2.8.2 cDNA Synthese ... 36
2.8.3 qRT-PCR ... 36
2.8.4 Auswertung der qRT-PCR ... 37
2.9 Statistische Auswertung ... 38
3 Ergebnisse ... 40
3.1 Effekte von Isoflavonen in weiblichen Wistar Ratten ... 40
3.1.1 Tägliche Futteraufnahmemenge und Energieaufnahme ... 40
3.1.2 Isoflavonaufnahme aus dem Futter ... 41
3.1.3 Isoflavonmetabolitenspektrum im Plasma ... 42
3.1.4 Körpergewichtsentwicklung ... 45
3.1.5 Terminales Körpergewicht, viszerale Fettgewebsmasse, Adipozytengrößen und Leptinspiegel ... 46
3.1.6 T4-Spiegel im Serum ... 47
3.1.7 Muskel- und Knochengewichte ... 48
3.1.8 Uterusgewicht ... 50
3.1.9 Serumlipide ... 50
3.1.10 Genexpressionsanalysen verschiedener Markergene des Fettstoffwechsels in Leber- und Fettgewebe ... 51
3.1.11 Genexpressionsanalysen inflammationsassoziierter Markergene im Fettgewebe ... 54
3.2 Effekte von Isoflavonen in männlichen Wistar Ratten ... 56
3.2.1 Tägliche Futteraufnahmemenge und Energieaufnahme ... 56
3.2.2 Isoflavonaufnahme aus dem Futter ... 57
3.2.3 ISO-Metabolitenspektrum im Plasma ... 58
3.2.4 Körpergewichtsentwicklung und terminales Körpergewicht ... 61
3.2.5 Körpergewichtszunahme, viszerale Fettgewebsmasse, Adipozytengrößen und Leptinspiegel ... 61
3.2.6 Muskel- und Knochengewichte ... 63
3.2.7 Gewichte männlicher Sexualorgane ... 64
3.2.8 Serumlipide ... 65
3.2.9 Genexpressionsanalysen verschiedener Markergene des Fettstoffwechsels im Fettgewebe ... 66

3.2.10 Genexpressionsanalysen inflammationsassoziierter Markergene des Fettgewebes 68

4 Diskussion ... 69

4.1 Isoflavonaufnahme und Plasmaspiegel ... 69

4.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede im Isoflavonmetabolitenspektrum ... 73

4.3 Die Wirkung der Isoflavone auf das Körpergewicht und die viszerale Fettakkumulation ... 75

4.4 Wirkung der Isoflavone auf die Skelettmuskulatur ... 81

4.5 Wirkung der Isoflavone auf die Blutlipide ... 84

4.6 Wirkung auf die mRNA Expression von Markergenen des Fettstoffwechsels in Leber- und Fettgewebe ... 86

4.7 Wirkung auf die mRNA Expression inflammationsassoziierter Markergene im Fettgewebe ... 92

4.8 Einfluss der Expositionszeit auf die antiadipogene Wirkung der Isoflavone ... 94

4.9 Übertragbarkeit auf den Menschen ... 96

4.10 Limitationen des Versuchs und Ausblick ... 98

5 Gesamtbetrachtung ... 99

Literaturverzeichnis ... 102

6 Anhang ... 134

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Chemische Struktur von 17-β-Estradiol (E2) im Vergleich zu den 3 wichtigsten Isoflavonen Genistein (GEN), Daidzein (DAI) und Glycitein 14
Abbildung 1.2 Metabolisierung von Daidzein durch Darmbakterien 16
Abbildung 2.1 Versuchsdesign und experimentelle Gruppen. 31
Abbildung 3.1 Futter- und Energieaufnahme der weiblichen Ratten. 40
Abbildung 3.2 Berechnete Isoflavonaufnahme der Weibchen an PND 83 und PND 170 sowie Isoflavonspiegel im Plasma 42
Abbildung 3.3 Phase-II-Metabolitenspektrum von Genistein und Daidzein im Plasma der Weibchen (ISO Gruppen) 44
Abbildung 3.4 Körpergewichtsverläufe der weiblichen Ratten. 45
Abbildung 3.5 Effekte einer isoflavonreichen Ernährung auf Körpergewicht, viszerale Fettmasse, Adipozytengröße, Leptinspiegel, Korrelation zwischen Leptin und viszeralem Fett sowie Leptin und Adipozytengröße sowie repräsentative Aufnahmen von Adipozyten der verschiedenen Behandlungsgruppen 47
Abbildung 3.6 T4 Serumspiegel weiblicher Ratten 48
Abbildung 3.7 Absolute Muskelgewichte von *M. soleus* und *M. gastrocnemius* und das Knochengewicht von *O. tibia* 49
Abbildung 3.8 Absolutes Uterusgewicht weiblicher Ratten.. 50
Abbildung 3.9 Serumlipide weiblicher Ratten 51
Abbildung 3.10 Relative mRNA Expression von SREBP 1c, FAS, ACC, PPARα bzw. γ in jeweils Leber und Fettgewebe weiblicher Ratten 53
Abbildung 3.11 Relative mRNA Expression der Entzündungsmarker in qualität IL6, IL10 und MCP1 im Fettgewebe weiblicher Ratten 55
Abbildung 3.12 Futter- und Energieaufnahme der männlichen Ratten 56
Abbildung 3.13 Berechnete Isoflavonaufnahme der Männchen an PND 87 und PND 170 sowie Isoflavonspiegel im Plasma 57
Abbildung 3.14 Phase-II-Metabolitenspektrum von Genistein und Daidzein im Plasma der Männchen 60
Abbildung 3.15 Körpergewichtsverläufe der männlichen Ratten 61
Abbildung 3.16 Körpergewichtszunahme zwischen PND 80 und PND 173 sowie viszerale Fettmasse, Adipozytengröße und Leptinspiegel in männlichen Ratten 62
Abbildung 3.17 Absolutes Muskelgewicht von *M. soleus* (A), *M. gastrocnemius* (B) und *M. levator ani* sowie das Knochengewicht des *O. tibia* 64

Abbildung 3.18 Absolutes Gewicht der Testes (nur intakte Tiere), der Prostata sowie der Samenblase der Männchen 65
Abbildung 3.19 Serumlipide männlicher Ratten. 66
Abbildung 3.20 Relative mRNA Expression von SREBP 1c, FAS, ACC und PPARγ im Fettgewebe männlicher Ratten 67
Abbildung 3.21 Relative mRNA Expression der Entzündungsmarker IL6 und MCP1 im Fettgewebe männlicher Ratten 68

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Zusammensetzung des Kontrollfutters und des WD Futters 29
Tabelle 2.2 Isoflavonprofile in isoflavonangereichertem Kontrollfutter und WD Futter 30
Tabelle 2.3 Protokoll zur Entwässerung der fixierten Gewebe und Paraffineinbettung 33
Tabelle 2.4 Aufstellung der verwendeten Primer (Ratte) der qPCR 37
Tabelle 3.1 Plasmakonzentrationen an Isoflavonmetaboliten in den weiblichen Ratten 43
Tabelle 3.2 Plasmakonzentrationen von Isoflavonmetaboliten in den männlichen Ratten 59

Abkürzungsverzeichnis

1A	Cytochrom C Oxidase Untereinheit 1A
ACC	Acetyl-Coenzym A-Carboxylase
ANOVA	Varianzanalyse, engl. *Analysis of Variance*
AR	Androgenrezeptor
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BMI	*Body Mass Index*
C/EBP	*CCAAT/enhancer-binding proteins*
CoA	Coenzym A
CON	Kontrollfuttergruppe
COX 1	Cytochrom C Oxidase Untereinheit 1A
Ct	*Cycle threshold*
DAD	Diodenarraydetektor
DAI	Daidzein
DEXA	Dual-Röntgen-Absorptiometrie
DH-	Dihydro-
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DS	Disulfat
E2	17-β Estradiol
EFSA	Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit, engl. *European Food Safety Authority*
ELISA	*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*
ER	Estrogenrezeptor
F1	Filialgeneration
FAS	Fettsäuresynthase, engl. *fatty acid synthase*
FDA	*Food and Drug Administration*
GEN	Genistein
GlcA	Glucuronid
GLUT4	Glucosetransporter 4
GLY	Glycitein
HDL	*High Density Lipoprotein*
HET	Hormonersatztherapie
HHG-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse
HHT-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Thyreoid-Achse

HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, engl. *high performance liquid chromatography*
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HSL	Hormonsensitive Lipase
HTGL	Hepatische Triglyzerid-Lipase
IARC	*International Agency for Research on Cancer*
IGF-1	*Insulin growth factor 1*
IL	Interleukin
ISO	Isoflavone
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KGW	Körpergewicht
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW
LDL	*Low Density Lipoprotein*
LOD	Detektionslimit, engl. *limit of detection*
LOQ	Quantifizierungslimit, engl. *limit of quantification*
LPL	Lipoproteinlipase
M.	*Musculus* (Lat.), Muskel
MCP1	*monocyte chemotactic protein 1*
ME	metabolisierbare Energie
MHC	*Myosin heavy chain*
MOSH	*Male Obesity Associated Secondary Hypogonadism*
MRM	*Multiple reaction monitoring*
mRNA	*Messenger*-RNA
n.s.	nicht signifikant
O-DMA	O-Desmethylangolensin
O.	*Os* (Lat.), Knochen
ORX	Orchiektomie
OVX	Ovariektomie
P	Elterngeneration
PADAM	partielles Androgendefizit des alternden Mannes
qRT-PCR	quantitative real-time („Echtzeit“) Polymerasekettenreaktion
PND	postnataler Tag
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
PR	Progesteronrezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotationen pro Minute

RXR	Retinoid X Rezeptor
S	Sulfat
SD	Standardabweichung
SERM	selektiver Estrogenrezeptormodulator
SHGB	Sexualhormon-bindendes Globulin
SRE	Sterol-regulierendes Element
SREBP 1c	Sterol regulierendes Element-Bindungsprotein 1c, engl. *sterol regulatory element-binding protein 1c*
T3	Triiodthyronin
T4	Thyroxin bzw. Tetraiodthyronin
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
tRNA	Transfer-RNA
TSH	Thyroidea-stimulierendes Hormon
UHPLC MS/MS	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometer, engl. *Ultra high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometer*
visz.	viszeral
VLDL	*Very Low Density Lipoprotein*
WD	westliche Diät
WHO	Weltgesundheitsorganisation, engl. *World Health Organisation*

Zusammenfassung

Einleitung: Übergewicht und Adipositas sind mit einem erhöhten Risiko für metabolische Erkrankungen sowie Krebs assoziiert und betreffen vor allem die Altersgruppe über 55 Jahren. Neben Bewegungsmangel und einer erhöhten Energiezufuhr stellt auch das Absinken der Sexualhormonproduktion eine Ursache in der Entstehung von Übergewicht im Alter dar.

Epidemiologische und experimentelle *in vivo* und *in vitro* Studien deuten auf eine positive Wirkung von Soja-Isoflavonen (ISO) auf das viszerale Fettgewebe und den Fettstoffwechsel. Zudem weisen Studien in Nagern auf eine geschlechtsspezifische Wirkung von ISO. Während in Weibchen eine reduzierte Fetteinlagerung beobachtet wurde, zeigten Männchen konzentrationsabhängig eine stärkere Ausprägung der Fetteinlagerung.

Über ihre strukturelle Ähnlichkeit zu den Estrogenen sind ISO in der Lage an Estrogenrezeptoren (ER) zu binden und so estrogene, aber auch antiestrogene Wirkung auf das Fettgewebe zu erzielen. Darüber hinaus wirken sie auch auf nicht-ER vermittelte Signalwege, die eine zentrale Rolle im Fettstoffwechsel spielen.

In der hier vorliegenden Arbeit wird die Wirkung einer lebenslangen ISO Exposition über die Nahrung auf die Entwicklung von Übergewicht und die Auswirkungen auf den Fettstoffwechsel am Modell der Wistar-Ratte untersucht. Dabei wurde das Übergewicht durch adipogene Faktoren wie eine westliche Ernährung (WD = westliche Diät) mit erhöhtem Zucker- und Fettgehalt und das Ausschalten der endogenen Sexualhormonproduktion über Gonadektomie (Ovariektomie = OVX; Orchiektomie = ORX) induziert. Der Fokus lag auf dem Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Tieren.

Methoden: Wistar Ratten wurden bereits *in utero* über die Muttertiere, anschließend über die Muttermilch und später über das Futter bis zum Versuchsende am postnatalen Tag (PND) 170/173 (w/m) mit ISO exponiert. In der ersten Versuchshälfte von Geburt bis zu PND 83/85 erhielten die Tiere ein Standardfutter (CON), das für die Hälfte der Tiere mit einem definierten ISO-Extrakt angereichert war (CON ISO; 467 mg/kg Futter)**.** Anschließend erfolgte die Aufteilung in 7 Gruppen; zwei intakte Kontrollgruppen, erhielten das CON Futter mit oder ohne ISO bis zum Versuchsende (CON intakt und CON ISO intakt). Vier Gruppen wechselten an PND 85/87 auf ein fett- und zuckerreiches WD Futter mit ISO (WD ISO; 431 mg/kg Futter) bzw. ohne ISO, wobei zwei der Gruppen zuvor gonadektomiert wurden (WD OVX/ORX and WD ISO OVX/ORX) und die zwei anderen intakt blieben (WD intakt and WD ISO intakt). Je eine weitere Gruppe an OVX/ORX Tieren, die ohne ISO aufgewachsen sind, erhielt mit Umstellung auf das WD Futter zusätzlich ISO (WD ISO switch OVX/ORX). Mit

diesen Gruppen sollte eine kurzzeitige ISO-Exposition in der Meno- bzw. Andropause nachgeahmt werden.

Der Versuch endete an PND 170/173 und es erfolgte die Sektion der Tiere, in der das Körpergewicht und die Gewichte des viszeralen Fettgewebes, einiger Sexualorgane und ausgewählter Muskeln ermittelt wurden. Es erfolgte die Bestimmung des ISO-Gehalts und des ISO-Metabolitenprofils im Plasma sowie von Leptin und den Blutlipiden im Serum. Zudem wurden die Adipozytengrößen in den perirenalen Fettdepots histologisch bestimmt und die mRNA-Expression einiger lipogener und inflammationsassoziierter Markergene mittels PCR in der Leber (nur Weibchen) und dem Fettgewebe analysiert.

Ergebnisse: Die ISO-Plasmaspiegel betrugen in Weibchen 330 – 1400 nM und in Männchen 814 – 3641 nM. Aufgrund eines geringeren Futterkonsums wurden dabei die niedrigsten Plasmaspiegel in WD Gruppen erreicht. In den Weibchen nahmen glucuronidierte ISO-Konjugate den höchsten Anteil am Phase-II-Metabolitenprofil im Plasma ein. In den Männchen dominierten dagegen sulfatierte ISO-Konjugate wie Disulfate und Sulfoglucuronide, deren Anteil sich durch die Orchiektomie jedoch verringerte. Zudem wiesen Weibchen höhere Plasmakonzentrationen an ISO-Aglykonen auf als Männchen.

In den Weibchen konnte die lebenslange Exposition mit ISO das Körpergewicht, die viszerale Fettmasse, die Adipozytengröße, sowie die Leptinspiegel im Serum statistisch signifikant verringern. Dieser Effekt war in normalgewichtigen CON Gruppen am deutlichsten und in übergewichtigen OVX Tieren schwächer ausgeprägt. ISO hatten keinen Einfluss auf die durch WD Futter bzw. OVX erhöhten Blutlipide.

In intakten Männchen der WD Gruppe konnte eine leicht verminderte Fettakkumulation bei gleichbleibender Adipozytengröße, sowie leicht verringerte Leptin- und Triglyzeridspiegel im Plasma durch ISO erzielt werden. In ORX Tieren, die nach der Orchiektomie zunächst Gewicht verloren, führten ISO zu einer schnelleren Gewichtszunahme, ohne die viszerale Fettgewebsmasse zu beeinflussen.

In den Muskeln der Weibchen konnte durch ISO ein OVX-induzierter Muskelmasseverlust im *M. soleus* antagonisiert werden, wohingegen Effekte auf die Muskelmasse in den Männchen ausblieben.

In der Leber der Weibchen konnte die Expression der lipogenen Marker SREBP 1c und ACC in intakten CON Tieren sowie SREBP 1c und FAS in WD OVX Tieren durch die lebenslange ISO Gabe verringert werden. Im Fettgewebe dagegen führten ISO zu einer verstärkten Expression an SREBP 1c, FAS, ACC und PPARγ in den CON intakt Tieren. Im Fettgewebe der Männchen war die Expression an SREBP 1c und ACC intakter CON Männchen durch ISO verringert. Einer in WD Gruppen verringerten Expression von SREBP 1c, FAS und ACC konnte mit ISO entgegengewirkt werden.

In intakten und OVX Gruppen der Weibchen konnten ISO einem Anstieg der mRNA Expression inflammatorischer Zytokine IL6 und MCP1 durch WD Futter bzw. OVX entgegenwirken und die Expression von antiinflammatorischem IL10 in OVX Tieren erhöhen. In den Männchen dagegen blieb eine Änderung der Expression inflammatorischer Markergene durch WD Futter bzw. ORX aus und es konnten keine statistisch signifikanten Effekte von ISO auf die Expression von IL6 und MCP1 beobachtet werden.

Zudem wurden keine biologisch relevanten Veränderungen auf das Gewicht von Uterus, Testes, Samenblase und Prostata nach ISO-Exposition festgestellt.

Diskussion: Die wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit deuten an, dass die antiadipogene Wirkung von ISO geschlechtsabhängig ist, wobei eine lebenslange ISO-Aufnahme die Fettgewebsakkumulation in weiblichen Ratten, jedoch nur zu geringerem Umfang in männlichen Ratten reduzieren konnte. Eine verstärkte Gewichtszunahme und Fetteinlagerung durch ISO in männlichen Tieren, wie es teilweise für männliche Mäuse in der Literatur beschrieben wird, wurde in dieser Studie nicht beobachtet.

Zudem gab es Hinweise, dass ISO zu einer veränderten Körperzusammensetzung beider Geschlechter führten und zum Erhalt der Muskelmasse in gonadektomierten Weibchen, nicht aber in Männchen, beitrugen.

Ursächlich für die schwächeren Effekte in Männchen könnte die geschlechtsspezifische Phase-II-Metabolisierung mit der unterschiedlichen Verteilung an konjugierten ISO-Metaboliten und geringeren Plasmakonzentrationen an biologisch aktiven Aglykonen, sowie eine verminderte Bioverfügbarkeit von ISO im Zielgewebe in Frage kommen.

Des Weiteren ist möglich, dass die ISO Wirkung von den erreichten ISO-Plasmaspiegeln abhängt. Die deutlichsten Effekte auf das Fettgewebe zeigten sich bei ISO-Plasmaspiegeln von ca. 1000 - 2400 nM, welche auch bei sojareicher Ernährung in ost-asiatischen Bevölkerungsgruppen auftreten. Mit sehr niedrigeren Plasmaspiegeln von < 1000 nM in den Weibchen und sehr hohen Plasmaspiegeln von 3641 nM in den Männchen konnten dagegen schwächere bis keine Effekte im Fettgewebe erzielt werden.

Die Daten zu den Gewichten der Sexualorgane liefern keine Hinweise, dass die erreichten ISO-Plasmaspiegel akut endokrin-disruptive Wirkung auf die Sexualorgane hatten.

ISO konnten auf die mRNA-Genexpression einiger Markergene in der Leber und im Fettgewebe wirken, die an Signalwegen des Lipidstoffwechsels und an Inflammationsprozessen beteiligt sind. Eine Hypothese zur Wirkung der ISO ist, dass die antiadipogene Wirkung im viszeralen Fettgewebe normalgewichtiger Weibchen durch eine verbesserte Fettzellerneuerung mit einhergehender Apoptose zustande gekommen sein könnte. In WD Männchen scheint die Regulation der Lipogenese dagegen eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Fazit: Die Ergebnisse zeigen, dass eine lebenslange ISO-Exposition mit Plasmaspiegeln, die auch im Menschen bei sojareicher Ernährung erreicht werden können, die Fettgewebsakkumulation und adipozytäre Hypertrophie in weiblichen, jedoch nicht in männlichen Tieren, vermindern kann. Eine ausbalancierte Fettgewebshomöostase kann der Entwicklung von viszeralem Übergewicht und assoziierten metabolischen Erkrankungen sowie Krebs vorbeugen. Die Relevanz für den Menschen gilt es in nachfolgenden Untersuchungen näher zu betrachten.

Abstract

Introduction: Overweight and obesity are major risk factors for the development of metabolic diseases as well as cancer and mainly affect the elderly population over 55 years of age. Besides a decrease in physical activity and an increased intake of energy-dense foods, an age-related decline in sexual hormones can contribute to the development of obesity late in life.

Epidemiologic as well as *in vitro* and *in vivo* experimental evidence suggests that the intake of soy isoflavones (ISO) can have beneficial effects on adipose tissue and fat metabolism. Moreover, animal studies in rodents indicate that ISO act gender specific, showing anti-adipogenic effects in females but adipogenic effects in males. Due to their spatial configuration, ISO binds to the estrogen receptor (ER) and can exert estrogenic but also anti-estrogenic effects on several target tissues. Furthermore, ISO are proved to exert non-ER-mediated effects through numerous other signaling pathways involved in adipose deposition and lipid metabolism.

This study investigates the effects of lifelong dietary ISO intake on fat metabolism and development of obesity in male and female Wistar rats. Therefore, obesity was induced by adipogenic factors such as western diet (WD) and inhibition of sexual hormone production by gonadectomy (ovarectomy = OVX; orchiectomy = ORX). In particular, the study focuses on the comparison of effects in male and female animals.

Methods: Animals were exposed to ISO starting *in utero* via exposure of the dams, continued during lactation period by mother's milk and maintained to adolescence by dietary intake up to postnatal day (PND) 170/173 (f/m). During the first experimental period, animals grew up on ISO free control diet (CON) or ISO enriched control diet (CON ISO; 467 mg/kg diet). On PND 83/85, animals were divided into seven groups. Two intact control groups received CON diet with or without ISO up to study termination (CON intact and CON ISO intact). Four groups switched to a western diet rich in sugar and fat with ISO (WD ISO; 431 mg/kg diet) or without ISO on PND 85/87 after two of these groups were gonadectomized (WD OVX/ORX and WD ISO OVX/ORX) and two were left intact (WD intact and WD ISO intact). One further group of OVX/ORX animals, which was nursed ISO free, switched to ISO enriched WD on PND 85/87. This group was intended to mimic short-term exposure in andro- /menopause. The study was terminated on PND 170/173 and animals were subjected to necropsy where body weight, weight of visceral adipose tissue, sexual organs, selected skeletal muscles and adipocyte sizes in perirenal adipose tissue were determined. In blood samples, ISO concentration and respective ISO metabolites as well as leptin and lipid levels

were analyzed. Levels of mRNA gene expression of several markers associated to lipogenic and inflammation processes were determined in liver (females only) and adipose tissue.

Results: ISO plasma concentrations of 330 – 1400 nM and 814 – 3641 nM were achieved in females and males, respectively. Due to a lower food intake, lowest plasma levels were obtained in WD fed animals and highest levels in intact CON animals. In females, glucuronides were the main phase II ISO metabolites in plasma, whereas in males, disulfates and sulfoglucuronides were the main metabolites and the portion of sulfate conjugates was diminished by ORX. Furthermore, females showed higher amounts of ISO aglycones in plasma than males.

In females, lifelong but not short-term ISO exposure resulted in reduced body weight, reduced visceral adipose tissue, adipocyte sizes and serum leptin levels. This effect was more pronounced in lean CON intact than in obese WD OVX females. ISO did not affect increased lipid levels induced by WD.

In males, ISO slightly diminished adipose deposition, leptin and triglyceride levels only in intact WD animals without affecting adipocyte sizes. In addition, ISO increased weight gain after ORX induced weight loss without affecting visceral fat mass.

OVX induced muscle weight loss of *M. soleus* was antagonized by short-term and lifelong ISO exposure in females, but no effect was observed in muscle mass of ORX males.

Hepatic gene expression of lipogenic markers SREBP 1c, FAS and ACC was down-regulated by lifelong ISO exposure in CON intact and WD OVX females. On the contrary, SREBP 1c, FAS, ACC and PPARγ gene expression was up-regulated in adipose tissue of intact CON females. In adipose tissue of CON intact males, expression of SREBP 1c and ACC was down-regulated by ISO. Furthermore, a WD induced decrease of SREBP 1c, FAS and ACC expression was antagonized by ISO in males.

ISO decreased the expression of inflammatory marker genes IL6 and MCP1 in adipose tissue of obese intact and OVX females fed WD and increased the expression of anti-inflammatory marker IL10 in WD OVX females. The effect of WD on expression of inflammatory marker genes was less pronounced in males than in females and no statistically significant differences in expression levels could be obtained by ISO exposure.

Furthermore, no biologically relevant weight changes in uterus, testes, seminal vesicles or prostate were observed after ISO exposure.

Discussion: Main results obtained within this study suggest that a lifelong ISO exposure affects adipose tissue in a gender specific way, while reducing adipose deposition in females but only to a less extend in males. Increased weight gain and adipose deposition as described for male mice in the literature were not observed. Further, results indicate that body composition was affected in both sexes, while a gonadectomy induced loss of muscle mass was shown to be antagonized by ISO in females only.

The less pronounced effects on adipose tissue in males are assumed to mainly result from a gender specific phase II metabolism of ISO, lower plasma amounts of biologically active aglycones or a reduced bioavailability of ISO in target tissues. Moreover, effects of ISO appear to depend on plasma concentrations achieved by dietary intake. Substantial effects were attained at ISO plasma levels of 1000 – 2400 nM, which can similarly be achieved by soy-rich diets in East Asian human populations. At very low ISO plasma levels of < 1000 nM in females and very high levels of 3641 nM in males less pronounced or no effects were obtained on adipose tissue.

In the absence of effects on sexual organ weights, no indications for severe acute endocrine disrupting effects were observed on sexual organs at achieved plasma concentrations.

ISO appeared to modulate mRNA gene expression of signaling pathways involved in lipid metabolism of liver and adipose tissue and adipose inflammatory processes. A possible hypothesis is that ISO improves dynamics of fat cell turnover in lean females, while it appears that in males, regulation of *de novo* lipogenesis plays a minor role and improved utilization of fatty acids and triglycerides might most be responsible for slight reductions in adipose deposition and triglyceride levels of intact animals.

Conclusion: The results of this study suggest that a lifelong dietary ISO exposure resulting in plasma levels that can similarly be achieved in human diminishes visceral adipose deposition and hypertrophy in female, but not in male rats. A balanced adipose tissue homeostasis can be beneficial in the prevention of obesity, associated metabolic diseases and cancer. Human relevance needs to be addressed in further investigations.

1 Einleitung

Übergewicht und Adipositas stellen ein weltweites Problem dar und betreffen vor allem Frauen und Männer der Altersgruppe über 55 Jahre. Die Ursachen sind vielfältig und stellen die Wissenschaft vor große Herausforderungen im Hinblick auf die Vorbeugung und Therapie von Übergewicht (WHO 2000).

Viszerales Übergewicht ist durch eine übermäßige Fettgewebseinlagerung in abdominale Körperbereiche charakterisiert. Es fördert die Entwicklung des Metabolischen Syndroms, einer Kombination mehrerer metabolischer Störungen, die sich gegenseitig begünstigen, mit Folgeerkrankungen wie Diabetes Typ II und kardiovaskulären Erkrankungen (Després und Lemieux 2006). Darüber hinaus ist Übergewicht laut Evaluation der IARC (*International Agency for Research on Cancer*) mit einem erhöhten Risiko für einige Krebserkrankungen assoziiert, darunter vor allem Dickdarm-, Speiseröhren-, Nieren-, Prostata-, Ovar- und Brustkrebs (postmenopausal), sowie Endometriumskarzinome (Lauby-Secretan et al. 2016; Vainio et al. 2002).

Nach der Menopause steigt für Frauen das Risiko für metabolische Erkrankungen und Krebs nochmals an, da ein Absinken der Estrogenspiegel viszerales Übergewicht fördert (Carr 2013). Auch Männer zeigen mit abfallenden Testosteronspiegeln im Alter ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Übergewicht (Wespes und Schulman 2002).

Epidemiologische Studien deuten auf einen Zusammenhang zwischen der geringen Prävalenz für Übergewicht und assoziierten Folgeerkrankungen in asiatischen Ländern und einer sojaisoflavonreichen Ernährung hin (Adlercreutz und Mazur 1997; Roccisano 2012). Studien am Tiermodell und in Zellen liefern zudem Hinweise, dass Isoflavone die viszerale Fetteinlagerung minimieren, sowie positive Wirkung auf den Lipid- und Glucosestoffwechsel haben (Orgaard und Jensen 2008). So könnte Soja als fester Bestandteil in der Ernährung ein hoffnungsvoller Ansatz zur Vorbeugung von alters- bzw. hormoninduziertem Übergewicht und weiteren metabolischen Folgeerkrankungen sowie einigen Krebserkrankungen sein.

Im Nachfolgenden findet sich zunächst eine kurze Einführung zu den physiologischen Grundlagen, der Entstehung und den Auswirkungen von Übergewicht sowie den Einflüssen der Steroidhormone auf das Fettgewebe und den Fettstoffwechsel. Weiterhin werden die Isoflavone vorgestellt, sowie der bisherige wissenschaftliche Kenntnisstand zur Wirkung aus *in vivo* und *in vitro* Studien zusammengefasst.

1.1 Übergewicht und die physiologischen Grundlagen

Übergewicht und Adipositas haben in den letzten Jahren vor allem in den Industrieländern deutlich zu genommen. Nach Angaben der World Health Organisation (WHO) waren im Jahr 2016 39% der über 18-jährigen weltweit übergewichtig und 13% sogar adipös. Die alarmierende Entwicklung zu steigendem Übergewicht ist vor allem auf exogene Faktoren wie eine übermäßige Energiezufuhr und mangelnde Bewegung zurückzuführen (WHO 2018).

1.1.1 Definition

Gerade für den Vergleich von Übergewichtsstatistiken zwischen verschiedenen Populationen wird der Body-Mass-Index (BMI: (Körpergewicht in kg) / (Körperlänge in m)^2) häufig als Maß herangezogen. Laut WHO ist Übergewicht durch einen BMI von 25 bis 30 kg/m^2 definiert, wohingegen Adipositas ab einem BMI von 30 kg/m^2 beginnt (WHO 2000). Mittlerweile gilt es jedoch als umstritten, ob der BMI wirklich das geeignete Maß für die Bestimmung von Übergewicht bzw. Adipositas ist, da Einflussfaktoren wie Geschlecht, ethnische Herkunft sowie die Körperkomposition nicht berücksichtigt werden und der BMI somit nur begrenzte Genauigkeit liefert. Dies gilt auch für alternde Menschen, da häufig auftretende Muskelmasseverluste und Abnahmen der Körpergröße mit dieser Methode nicht berücksichtigt werden (Wunderlich 2012).
Da das Risiko für metabolische Folgeerkrankungen von Übergewicht hauptsächlich mit der Ansammlung intra-abdominalen (viszeralen) Fettgewebes korreliert (Després und Lemieux 2006), sind Methoden zur Bestimmung der Fettverteilung eine sinnvolle Ergänzung zum BMI. Hier stellt die Messung des Taillenumfangs ein einfaches Maß zur Beurteilung der viszeralen Fettdepots dar und sollte bei Personen mit einem BMI ≥ 25 kg/m² daher stets zusätzlich erhoben werden werden (Lean et al. 1995). Bei dieser Methode werden Frauen bei einem Taillenumfang von ≥ 80 cm bzw. Männer bei ≥ 94 cm als übergewichtig definiert, bei ≥ 88 cm bei Frauen bzw. ≥ 102 cm bei Männern liegt eine abdominale Adipositas vor. Eine weitere Möglichkeit bietet die Bestimmung des Taillen-Hüft-Quotienten, die zusätzlich die Konstitution der gluteofemoralen Muskeln und des Beckenknochens miteinbezieht (WHO 2000).

1.1.2 Biologie der Adipozyten und Fettgewebsplastizität

Das Fettgewebe ist unterteilt in braunes Fettgewebe, das vornehmlich an der Thermoregulation beteiligt ist und hauptsächlich in Neugeborenen vorzufinden ist, sowie

weißes Fettgewebe, das als Speicher-, Bau- und Isolierfett dient und zu dem eine endokrine Funktion aufweist. Die zentralen Aufgaben des weißen Fettgewebes umfassen die Energiespeicherung (Lipogenese) und Energiebereitstellung (Lipolyse).
Bei einem Überangebot an Energie über die Nahung bzw. vermindertem Energieverbrauch kommt es verstärkt zur Synthese und Einlagerung von Triglyzeriden in Adipozyten, der so genannten Lipogenese. Dazu können Fettsäuren entweder in der Leber oder dem Fettgewebe neusynthetisiert werden (*de novo* Lipogenese) oder es werden über die Nahrung zugeführte Fettsäuren genutzt. Hier spielt die Lipoproteinlipase (LPL) eine wichtige Rolle, da sie die Hydrolyse von Triglyzeriden veranlasst, die in Lipoproteinen gespeichert sind und so die Spaltprodukte für die adipozytäre Triglyzeridspeicherung zugänglich macht. Signalgeber zur Lipogenese sind Insulin, erhöhte Blutglucosespiegel sowie Glucocorticoide.
Damit der Adipozyt Triglyzeride aufbauen kann, ist er essenziell auf die Zufuhr von Glucose angewiesen. Vermittelt durch Insulin, wird Glucose über den Glucosetransporter 4 (GLUT4) in den Adipozyten aufgenommen und kann in Form von Glykogen gespeichert, durch Glykolyse und mitochondriale Oxidation der Energiegewinnung zugeführt werden oder als Glyzerol-3-Phosphat in der Lipogenese eingesetzt werden. Über diesen Weg liefert es den Kohlenstoff für den Glyzerinanteil der Triglyzeride (Wirth 2007). Die Glucoseverwertung in den Adipozyten macht jedoch nur ca. 2-4% des gesamten Glucoseverwertung des Körpers nach der Nahrungsaufnahme aus (Virtanen et al. 2002).
Bei einem Energiemangel z.B. in Folge einer Nahrungskarenz oder einem erhöhten Energiebedarf kommt es dagegen zur Lipolyse, das heißt einer Spaltung der gespeicherten Triglyzeride durch Lipasen in Fettsäuren und Glyzerin. Diese können dann über Lipoproteine ins Blut abgegeben werden und an den Bedarfsort transportiert werden.
Im gesunden Organismus herrscht ein Gleichgewicht zwischen Lipogenese und Lipolyse, das je nach Energiebilanz angepasst werden kann und einer strengen hormonellen Regulation unterliegt (Wirth 2007).

Die Entstehung von Übergewicht ist gekennzeichnet durch eine starke Zunahme der Körperfettmasse in Form von weißem Fettgewebe. Dies weist eine hohe Plastizität auf, die durch eine Vergrößerung und Vermehrung von Adipozyten ermöglicht wird. Bei einem Überangebot an Glucose und Lipiden aus der Nahrung tritt zunächst eine Volumenzunahme der Adipozyten ein (adipozytäre Hypertrophie), bei der vermehrt Triglyzeride eingelagert werden. Dabei kann der Adipozyt auf ca. das 10-fache seiner Ausgangsgröße expandieren (Jo et al. 2012). Zum anderen ist eine verstärkte Adipogenese möglich, bei der es zu einer stärkeren Ausdifferenzierung von Praeadipozyten, zu reifen Adipozyten kommt (adipozytäre Hyperplasie) (Wirth 2007).

Spalding *et al.* zeigten, dass die Anzahl der Adipozyten im Menschen schon früh in der Kindheit festgelegt wird und unabhängig von Übergewicht oder Gewichtsreduzierung im Erwachsenenalter mehr oder weniger konstant bleibt. Trotzdem gibt es einen dynamischen Prozess von Zelltod und -erneuerung, bei dem ca. 10% der Adipozyten in Erwachsenen jährlich ersetzt werden (Spalding et al. 2008). Es wird jedoch vermutet, dass es bei Erreichen einer gewissen Fettzellgröße und bei anhaltendem Übergewicht über eine längere Zeitspanne zu einer Rekrutierung neuer Adipozyten kommen kann (Tchoukalova et al. 2010; Q. A. Wang et al. 2013). Dieser Hintergrund zur Fettzelldynamik macht deutlich, warum adipogene Faktoren in der Kindheit den Weg für Adipositas und metabolische Erkrankungen im Erwachsenenalter ebnen und so eine Reduktion des Gewichts bzw. der Fettdepots erschweren (Arner und Spalding 2010).

Die adipozytäre Hypertrophie stellt die wichtigste Stellgröße in der Lipidspeicherung dar und ist am stärksten mit metabolischen Veränderungen bei Übergewicht assoziiert. Bei anhaltend positiver Energiebilanz gelangt die Speicherkapazität hypertropher Adipozyten an ihre Grenzen und es kommt zu einer ektopen Lipidablagerung in Muskulatur, Leber und andere Organe, die so in ihrer metabolischen Funktionen eingeschränkt werden (Wirth 2007).

In hypertrophem Fettgewebe tritt ein vermehrtes nekrotisches Zellsterben mit einer verstärkten Makrophageninfiltration auf (Cinti et al. 2005). Zudem sind hypertrophe Adipozyten insulinresistenter als kleine Adipozyten (J. I. Kim et al. 2015), und sezernieren selbst mehr inflammatorische Zytokine (siehe auch 1.1.3). All diese Faktoren tragen damit zur Entstehung von Diabetes Typ II, Atherosklerose und einiger Krebserkrankungen bei (Biddinger und Kahn 2006).

1.1.3 Endokrine Funktion des Fettgewebes

Neben seiner Hauptaufgabe, der Speicherung und Mobilisierung von Lipiden, hat das Fettgewebe auch eine wichtige Funktion als endokrines Organ. Bereits 1987 konnte nachgewiesen werden, dass im Fettgewebe Estrogene und andere Steroidhormone über die vorhandene Aromataseaktivität synthetisiert werden können (Siiteri 1987). Heute weiß man, dass es zudem eine Vielzahl weiterer Botenstoffe, die Adipokine, sezerniert, welche den Energiestoffwechsel und die Insulinsensitivität maßgeblich beeinflussen können. Zu dieser Gruppe gehören über 600 bioaktive Moleküle, darunter Leptin, Adiponektin, proinflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor (TNF) -α, monocyte chemotactic protein (MCP) 1 und Interleukin (IL) 6, aber auch antiinflammatorisches IL10 (Fain et al. 2004; Wajchenberg 2000).

In adipösem Fettgewebe mit hypertrophen Adipozyten kommt es zu einer verstärkten Produktion an inflammatorischen Zytokinen und einer verminderten Produktion an antiinflammatorischen Zytokinen. Hohe Gewebekonzentrationen dieser Zytokine inhibieren die Adipozytendifferenzierung und Fettsäuresynthese, wohingegen die Lipolyse gefördert wird (H. Wang und Ye 2015). Eine systemische Entzündungsreaktion im Rahmen von Übergewicht fördert zudem das Metabolische Syndrom und ist an der Entstehung von Insulinresistenz, Diabetes Typ II und kardiovaskulären Erkrankungen beteiligt (Freitas Lima et al. 2015; Nishimura et al. 2009).

Leptin ist ein Adipokin, das auf den Hypothalamus wirkt und über seine appetitzügelnde Wirkung und eine Steigerung des Energieumsatzes zur Regulation der Fettgewebseinlagerung beiträgt (Jéquier 2002). Die Leptinspiegel von Mensch und Nager korrelieren mit der Fettgewebsmasse aber auch mit den Insulinspiegeln im Blut (Fried et al. 2000). Leptin ist in der Lage auf die Glucosehomöostase einzuwirken, indem es die Glucosespiegel senkt (D'souza et al. 2017) sowie, über die Regulation von Transkriptionsfaktoren wie SREBP 1 (*sterol regulatory element binding protein 1)* und nachgeschalteter Gene, auf die Fettsäuresynthese wirkt (Soukas et al. 2000). Bei dauerhaft erhöhten Leptinspiegeln, die häufig bei ernährungsbedingtem Übergewicht auftreten, ist der Transport über die Blut-Hirnschranke eingeschränkt und die Bindung an Leptinrezeptoren im Hypothalamus herabgesetzt. Dadurch kommt es zu einer Leptinresistenz, die wichtige Rückkopplungsmechanismen im Hypothalamus verhindert (Della-Fera et al. 2001; Jéquier 2002).

Ein weiteres Adipokin, das von Adipozyten sezerniert wird, ist Adiponektin. Es wirkt antiinflammatorisch und kann den Glucosemetabolismus positiv beeinflussen, indem es eine Erhöhung der Insulinsensitivität vermittelt und zusätzliche den Energieverbrauch in Leber und Muskel stimuliert sowie hemmend auf die Gluconeogenese wirkt (Berg et al. 2001; Lihn et al. 2005; Yamauchi et al. 2003). Bei Übergewicht sind die Adiponektinspiegel im Blut reduziert, da hypertrophierte Adipozyten des viszeralen Fettgewebes eine verminderte Adiponektinsekretion aufweisen (Drolet et al. 2009).

1.1.4 Lipidstoffwechsel

Triglyzeride stellen den wichtigsten Energiespeicher des Körpers dar und werden vor allem im Fettgewebe eingelagert. Sie können einerseits durch die Nahrung aufgenommen oder vom Körper selbst synthetisiert werden. Der Lipidstoffwechsel umfasst die Aufnahme, den Ab- und Umbau, sowie den Transport von Fetten im Körper. Er wird unterteilt in den exogenen und den endogenen Lipidstoffwechsel. Die Leber ist der zentrale Ort an dem

Triglyzeride aus der Nahrung zu Fettsäuren und Cholesterol prozessiert werden, um anschließend über die Lipoproteine in die peripheren Gewebe wie z.B. das Fettgewebe transportiert zu werden.

Der exogene Fettstoffwechsel umfasst Prozesse, die nach der Aufnahme von Nahrungsfetten einsetzen. Nach Zerkleinerung der Nahrung im Mund und der Emulgierung im Magen beginnt im Dünndarm die eigentliche Fettverdauung. Hier spalten Pankreaslipasen die Triglyzeride in Glyzerin, Monoacylglyzerin und freie Fettsäuren. Zusammen mit Gallensäuren und Phospholipiden der Galle bilden sie Micellen, die über die Enterozyten resorbiert werden können. Kurz- und mittelkettige Fettsäuren gelangen über die Pfortader direkt in die Leber, langkettige Fettsäuren und Glyzerin werden zunächst wieder zu Triglyzeriden zusammengebaut und gemeinsam mit Cholesterol in Chylomikronen transferiert. Diese gelangen über die Lymphe in den venösen Brutkreislauf und letztendlich zur Leber. Auf dem Weg dorthin können Triglyzeride durch LPL im Gefäßendothel des Fettgewebes und der Muskulatur lipolytisch zu Monoacylglyzerin und freien Fettsäuren abgebaut werden und über die β-Oxidation zur Energiegewinnung genutzt werden oder im Zuge der Lipogenese in Adipozyten gespeichert werden. Die cholesterinreichen Chylomikronen-*Remnants* gelangen zurück zur Leber und werden dort recycelt.

Im endogenen Fettstoffwechsel dagegen werden die körpereigenen Lipoproteine hepatischen Ursprungs, die dem Transport von Lipiden und Cholesterin dienen, um- und abgebaut. Die Lipoproteine werden an Hand ihrer Dichte bzw. ihres jeweiligen Anteils an Proteinen und Lipiden in fünf Fraktionen eingeteilt. Man unterscheidet Chylomikronen, VLDL (*Very Low Density Lipoproteine*) sowie seine Metabolite IDL (*Intermediate Density Lipoprotein*) und LDL (*Low Density Lipoprotein*), mit denen Lipide in die Peripherie transportiert werden. Dem gegenüber steht der reverse Cholesteroltransport, bei dem HDL (*High Density Lipoprotein)* Cholesterin aus den übrigen Zellen des Körpers zurück in die Leber transportiert (Wächtershäuser und Stein 2007).

Über verschiedene Rezeptoren gelangen die Lipoproteine in die entsprechenden Zielgewebe, wo sie je nach Stoffwechsellage unterschiedliche Aufgaben erfüllen können. Ein großer Teil der aufgenommenen Lipide wird schrittweise über die β-Oxidation zur Energiegewinnung genutzt. Umgekehrt können Lipide bei einem Überangebot an Nahrung in Adipozyten gespeichert werden. Zudem wird überschüssiges Acetyl-CoA, das bei der Glykolyse anfällt, ebenfalls zu Lipiden synthetisiert und in Fettdepots eingelagert.

Des Weiteren sind Lipide wichtige Bausteine in der Synthese von Gallensäure, Steroidhormonen und werden zum Aufbau von Zellmembranen benötigt (Wächtershäuser und Stein 2007).

Eine erhöhte Energiezufuhr über die Nahrung führt zu einer Störung des Lipidstoffwechsels, auch Dyslipidämie genannt, bei der die Cholesterin- und/oder Triglyzeride und/oder die

Lipoproteinspiegel krankhaft erhöht (HDL vermindert) sind. Die ungünstige Verteilung der Blutlipide ist eine der vier Säulen des sogenannten Metabolischen Syndroms (Alberti et al. 2005), auf das im Abschnitt 1.1.7 näher eingegangen wird.

1.1.5 Transkriptionelle Kontrolle

Die Adipogenese, Fettgewebshomöostase und der Lipidstoffwechsel unterliegen einem komplexen Steuerungssystem aus Transkriptionsfaktoren und Botenstoffen. Zentrale Steuerelemente der Adipogenese sind nukleäre Transkriptionsfaktoren wie C/EBPs (*CCAAT/enhancer-binding proteins*), SREBPs (*sterol regulatory element binding proteins*) und PPARs (*Peroxisom-Proliferator activated receptors*). Die Differenzierung von Praeadipozyten zu ausgereiften weißen Adipozyten wird durch frühe Differenzierungsmarker der C/EBPs Familie vermittelt. Sie koordinieren die Transkription diverser Adipozyten-spezifischer Gene und terminieren die mitotische Teilung des Zellklons. Es setzt sich eine adipogene Transkriptionskaskade in Gang in der vor allem PPARγ aktiviert wird. Im späteren Verlauf kommt es zu einem Mitosestopp und anschließend zur terminalen Adipozytendifferenzierung und einer vermehrten Einlagerung von Triglyzeriden (Lipogenese) (Gregoire et al. 1998; Rosen 2005).

PPARs sind nukleäre Transkriptionsfaktoren ähnlich des Leber-X-Rezeptors, die durch endogene Agonisten wie Fettsäuren, aber auch durch pharmakologische Substanzen aktiviert werden. Bei Binden eines Liganden an die Ligandenbindungsdomäne der PPARs kommt es zu einer Dimerisierung mit dem Retinsäurerezeptor RXR. Anschließend folgt die Bindung an entsprechende DNA-Sequenzen, wodurch eine Transkriptionskaskade in Gang gesetzt wird. Während PPARγ auf die Expression von Genen wirkt, die an der Adipozytendifferenzierung beteiligt sind, die Lipidspeicherung in Adipozyten vermitteln und die Glucosehomöostase beeinflussen (Siersbæk et al. 2010), kontrolliert PPARα die Transkription von Genen, die an der Lipolyse beteiligt sind, kurbelt die β-Oxidation der Fettsäuren an und reduziert so die Lipidspiegel in Blut und Leber. Beide PPARs wirken zudem inflammatorisch auf Entzündungsprozesse im Körper (R. M. Evans et al. 2004; Mandard et al. 2004). Ein dritter weniger erforschter Subtyp ist PPAR*β*/*δ.* Er wird ubiquitär exprimiert und soll ebenfalls an der β-Oxidation beteiligt sein (Tanaka et al. 2003).

Ein weiterer wichtiger Transkriptionsfaktor in der Regulierung mehrerer lipogener Schlüsselgene der Adipogenese und Lipidhomöostase ist SREBP 1c. Im Fettgewebe und in der Leber kontrolliert es Gene wie die Fettsäuresynthase (FAS) und die Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC), die an der Fettsäuresynthese beteiligt sind. Es wird durch Insulin aktiviert und ist auch am Glucosemetabolismus der Lipogenese beteiligt (Eberlé et al. 2004;

Horton et al. 2002). Außerdem ist es in der Lage PPARγ zu aktivieren, indem es auf die Expression in Adipozyten wirkt (Fajas et al. 1999) und die Produktion von PPARγ Liganden stimuliert (J. B. Kim et al. 1998). Bei Übergewicht kommt es zu einer verminderten Expression an SREBP 1c im Fettgewebe, um dem vorherrschenden Überangebot an Fettsäuren entgegenzuwirken (Kolehmainen et al. 2001).

1.1.6 Einfluss der Sexualhormone auf das weiße Fettgewebe

Sexualhormone haben großen Einfluss auf den Metabolismus, die Akkumulation und Verteilung des weißen Fettgewebes (Newell-Fugate 2017). Sowohl Estrogen- (ER) als auch Androgenrezeptoren (AR) werden im Fettgewebe exprimiert (S. B. Pedersen et al. 1996) und stellen neben nicht-genomischen Effekten einen Mechanismus zur Sexualhormon-gesteuerten Regulation diverser Proteine dar. Die Lokalisation der Fettdepots (viszeral vs. subkutan) und die damit verbundenen Unterschiede in der metabolischen Aktivität und Adipokinsekretion der Adipozyten spielen eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von metabolischen Störungen (Wajchenberg 2000).

Männer und Frauen zeigen eine unterschiedliche Fettgewebsverteilung. Während Frauen das weiße Fett eher subkutan vor allem im Hüft- und Gesäßbereich einlagern, kommt es bei Männern vorwiegend zur viszeralen Fettgewebsablagerung in zentralen Bereichen des Körpers. Dieser geschlechtsspezifische Unterschied in der Körperfettverteilung lässt sich auf die ER vermittelte Wirkung von Estrogenen zurückführen (Karastergiou *et al.* 2012). Das Tiermodell der ovariektomierten Ratte bietet sich dabei für Untersuchungen zur Wirkung von Estrogenen auf das Fettgewebe an. Eine Entfernung der Ovarien führt zu einer Zunahme des Körpergewichtes, primär über eine erhöhte Fettgewebseinlagerung in viszerale Fettdepots sowie eine gestörte Glucosehomöostase, wohingegen eine Substitution mit 17-β Estradiol (E2) zu einer Reduzierung des Körpergewichts mit einer Fettgewebsreduktion und -umverteilung führt und zusätzlich die Glucosehomöostase verbessert (Clegg et al. 2006; K. E. Davis et al. 2013; D'Eon et al. 2005).
Estrogene fördern die subkutane Fettgewebsverteilung, indem sie die Zahl der antilipolytisch wirksamen α2A- adrenergen Rezeptoren in subkutanen, nicht aber in viszeralen Adipozyten hochregulieren (Steen B. Pedersen et al. 2004). Zudem können Estrogene sowohl über die Inhibierung der Lipoproteinlipase (LPL) die Lipogenese in Adipozyten reduzieren, als auch indirekt Einfluss auf die Lipolyse nehmen, indem sie die Hormonsensitive Lipase (HSL) induzieren oder die Fettsäureoxidation erhöhten (Cooke und Naaz 2004).

Auf der anderen Seite scheinen Estrogene die Ausdifferenzierung von Adipozytenvorläufern depot- und geschlechtsspezifisch zu stimulieren. Studien an epididymalen, parametrialen und subkutanen Präadipozyten der Ratte zeigen, dass E2 die Proliferation und Differenzierung ausschließlich von subkutanen Präadipozyten weiblicher Tiere stimulierte, während es in männlichen Tieren keine Wirkung zeigte. Testosteron dagegen konnte die Adipogenese in epididymalen Präadipozyten hemmen und wirkte so eher antiadipogen. Es wird vermutet, dass diese Effekte auf eine veränderte Genexpression von IGF (*Insulin Growth Factor*) und PPARγ zurückzuführen sind (Dieudonne et al. 2000). Auch in humanen Präadipozyten konnte E2 die Proliferation dosisabhängig stimulieren, wobei die Wirkung in weiblichen Präadipozyten stärker war als in männlichen. Estron und Dihydrotestosteron zeigten im Gegensatz dazu weder in subkutanen noch omentalen Präadipozyten beider Geschlechter eine Wirkung (Anderson et al. 2001).
Auch im männlichen Organismus haben Estrogene eine entscheidende Funktion im weißen Fettgewebe (Cooke et al. 2017). Studien an ERα-knockout-Mäusen belegen dies. Ein systemisches Ausschalten des ERα, sowie ein spezifisches Ausschalten des adipozytären ERα führte in beiden Geschlechtern zu erhöhter viszeraler Fettgewebseinlagerung mit vergrößerten Adipozyten und einer erhöhten Inflammation des Fettgewebes (K. E. Davis et al. 2013; Heine et al. 2000).
Von Adipozyten sezernierte Adipokine wie Leptin und Adiponektin stehen ebenfalls unter dem Einfluss von Estrogenen. Über die Modulation der Expression von Leptin-spezifischen Rezeptoren im Hypothalamus sind Estrogene in der Lage die Leptinsensitivität zu erhöhen (Clegg et al. 2006). Zudem konnte eine inverse Korrelation zwischen Estrogenspiegeln postmenopausaler Frauen und der Sekretion von Adiponektin, das an der Regulation des Glucosespiegels sowie des Fettsäureabbaus beteiligt ist, nachgewiesen werden (Miyatani et al. 2008).

Estrogene wirken kardioprotektiv, indem sie die Serumlipoproteine modulieren. Eine Schlüsselrolle spielt HDL, welches für den Transport von Lipiden zurück zur Leber verantwortlich ist. Estrogene und Testosteron wirken gegensätzlich auf den HDL-Rezeptor. Testosteron reguliert den HDL-Rezeptor in der Leber, sowie in Makrophagen hoch und sorgt damit für eine erhöhte Lipidaufnahme in HDL und eine erhöhte Aufnahme von HDL in die Leber. Estrogene bewirken gegenteilig eine Suppression des HDL-Rezeptors und reduzieren somit die hepatische Lipidaufnahme (Graf et al. 2001). Die Hepatische Triglyzerid-Lipase (HTGL) ist ein Enzym, welches an der Metabolisierung von HDL beteiligt ist. Auch hier zeigt sich ein Sexualdimorphismus. Estrogene reduzieren die HTGL, während Testosteron zu einem Anstieg der HTGL führt (Langer et al. 2002).

Ein Absinken der endogenen Sexualhormonproduktion, die als Folge des Alterungsprozesses bei Mann und Frau oder einer Gonadektomie auftreten, geht häufig mit der Entstehung von Übergewicht einher. Laut Angaben des Statistischen Bundesamtes aus dem Jahr 2017 wies die Altersgruppe von 65 – 70 Jahren den höchsten Anteil an Übergewichtigen in Deutschland auf. Davon galten 42% als übergewichtig und 23% als adipös (Statistisches Bundesamt 2017). Damit ist diese Altersgruppe stärker betroffen als alle anderen. Neben einem Ungleichgewicht im Energiehaushalt und einem verlangsamten Stoffwechsel stellen hormonelle Veränderungen mit dem Alter einen nicht zu vernachlässigenden Faktor dar (Mathus-Vliegen et al. 2012).

Die Menopause der Frau, die meist im Alter von 45 - 60 Jahren eintritt, ist charakterisiert durch eine Erschöpfung der Ovarialfollikel mit einem einhergehenden Absinken der Estrogenspiegel. Diese hormonelle Umstellungsphase ist begleitet von vasomotorischen Beschwerden wie Hitzewallungen, Schweißausbrüchen, sowie vaginaler Trockenheit, Schlafstörungen und Stimmungsschwankungen (Leidenberger et al. 2009). Im späteren Verlauf, der postmenopausalen Phase, setzten Muskel- und Knochenmasseabbau ein und es folgt eine sukzessive Umverteilung der Fettreserven. Von der typisch gynoiden „Birnenform“ der Körpersilhouette, bei der das Depotfett vor allem subkutan in Bereichen wie Hüfte, Gesäß und Oberschenkeln eingelagert ist, findet eine Umverteilung hin zur androiden Fettverteilung in zentrale, intraabdominale Depots statt. Man spricht von der so genannten „Apfelform“, bei der die Fettansammlungen die inneren Bauchorgane umgeben (Karastergiou et al. 2012). Dieses viszerale Fett ist sehr stoffwechselaktiv und kann schnell mobilisiert werden. Mit dem venösen Blutstrom gelangen Fettsäuren und Triglyzeride des viszeralen Fettgewebes auf direktem Weg über die Pfortader in die Leber. Zudem ist im viszeralen Fettgewebe die Adipozytendichte geringer als z.B. im subkutanen Fettgewebe. Damit ist es weniger insulinsensitiv und hat eine geringere Kapazität für die Aufnahme von Triglyzeriden oder Fettsäuren (Ibrahim 2010). Daher kommt es in der Menopause häufig zu einer ungünstigen Verschiebung des Lipoproteinprofils und der Serumlipide, die im Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko für koronare Herzerkrankungen stehen (Stevenson et al. 1993). Eine weitere Folgeerscheinung, die mit erhöhtem viszeralen Körperfett assoziiert ist, ist die Insulinresistenz und damit das erhöhte Risiko für Diabetes Typ II (Després und Lemieux 2006).

Ob es beim Mann eine korrespondierende „Andropause“ gibt, ist nach wie vor umstritten (Pines 2011; Wespes und Schulman 2002). Anders als der Abfall der Estrogenspiegel bei Frauen, sinken die Testosteronspiegel im Alterungsprozess des Mannes eher schleichend und bleiben häufig unbemerkt. Faktoren, die zu einem Testosteronmangel führen sind vielfältig. Aufgeführt werden vor allem eine eingeschränkte Funktion der Leydigzellen des Hodens, sowie eine verminderte Produktion des Sexualhormon-bindenden Globulins

(SHBG). Die verminderte hormonelle Aktivität wird als Hypogonadismus bezeichnet. Bei einem sekundären Hypogonadismus im alternden Mann spricht man vom „partiellen Androgendefizit des alternden Mannes“ (PADAM) oder Altershypogonadismus. Häufig beobachtete Symptome sind neben Libidoverlust, erektiler Dysfunktion und Haarausfall ähnlich wie in der Frau auch eine Abnahme der Muskelmasse, Knochendichteverlust und Übergewicht mit einer Zunahme des viszeralen Fettgewebes (Pötzsch 2003; Wespes und Schulman 2002).

Umgekehrt kann Übergewicht beim Mann zu einem Mangel an freiem und bioverfügbarem Testosteron führen (Glass et al. 1977; Zumoff et al. 1990). Ursächlich hierfür ist eine Reduktion des Sexualhormon-bindenden Globulins (SHGB) und eine Unterdrückung der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse (HHG-Achse) (Vermeulen et al. 1993). Zusätzlich kann eine erhöhte Aromataseaktivität im Fettgewebe zu einer Reduktion der Testosteronspiegel beitragen, indem Testosteron vermehrt in E2 konvertiert wird (Cohen 2001). E2 wiederrum senkt die Testosteronspiegel, indem es die Gonadotropinausschüttung in der Hypophyse inhibiert (Finkelstein et al. 1991; Raven et al. 2006).

Eine klinisch manifestierte Adipositas-assoziierte Form des sekundären Hypogonadismus wird auch als MOSH (*Male Obesity Associated Secondary Hypogonadism*) bezeichnet, und weist ähnliche Symptome auf, wie der klassische Hypogonadismus (Grossmann 2018).

Die Rolle der Estrogene im Mann galt lange Zeit als unverstanden. Abdominales Übergewicht beim alternden Mann ist zwar mit einem Abfall der Testosteronspiegel assoziiert (Vermeulen A et al. 1999), da Testosteron jedoch über die Aromatase in Estradiol umgewandelt wird, ist ein Testosterondefizit auch eng mit einem Abfall in den Estrogenspiegeln verknüpft (Rochira und Carani 2017). Nach neueren Kenntnissen scheinen Estrogene eine große Rolle bei der Fettakkumulation im alternden Mann zu spielen (Finkelstein et al. 2013; M. E. Jones et al. 2001; Maffei et al. 2007), wohingegen der Muskelschwund im Mann hauptsächlich über die Testosteronreduktion vermittelt wird (Finkelstein et al. 2013). Zudem gibt es Hinweise, dass Estrogene auch auf den Muskel wirken (Lowe et al. 2010) und sowohl im weiblichen, als auch im männlichen Organismus den Erhalt und die Regeneration der Muskelmasse fördern und so auch zu einer verbesserten Glucosehomöostase beitragen können (Velders et al. 2012; Weigt et al. 2012).

Die Hormonersatztherapie (HET) mit Estrogenen, galt lange Zeit als Mittel der Wahl bei der Therapie und Prävention von postmenopausalen Symptomen, bot gleichzeitig auch ein wirksames Mittel zur Vorbeugung von Übergewicht und metabolischen Folgeerkrankungen (Santen et al. 2010). Auf Grund der hohen Inzidenz von hormonellen Krebserkrankungen wie z.B. Brustkrebs, Gebärmutter- und Ovarialkarzinome (Beral et al. 2005, 2007; Gray 2003) im Zusammenhang mit Estrogenbehandlungen aber auch wegen des erhöhten Schlaganfall-

und Thromboserisikos (Rossouw et al. 2002) ist die HET in den letzten Jahren zunehmend in die Kritik geraten (Lobo 2017).

Im Mann werden extreme Formen des Testosteronmangels, wie sie auch bei einem Altershypogonadismus auftreten können, ebenfalls durch Hormonsubstitution behandelt. Doch auch die Testosteronsubstitution geht mit einem erhöhten Risiko für Erkrankungen wie Prostatakrebs und kardiovaskuläre Erkrankungen einher (Wespes und Schulman 2002).

Dies führte dazu, dass bei der Suche nach einem risikofreien Ersatz neben chemischen selektiven Estrogenrezeptormodulatoren (SERMs) und Aromataseinhibitoren (beim Mann) auch Phytoestrogene in den Fokus der Forschung gelangten. Neure wissenschaftliche Erkenntnisse zur Rolle der Estrogene in der Regulation des Körpergewichts und Fettgewebes im männlichen Organismus machen estrogenwirksame Substanzen wie Isoflavone auch interessant für den Einsatz zur Prophylaxe und Therapie von Übergewicht und Begleiterkrankungen bei Hypogonadismus im Mann (Rubinow 2017).

1.1.7 Folgen von Übergewicht

Abdominales Übergewicht ist einer der Hauptrisikofaktoren für das Metabolische Syndrom, das mit Herzkreislauferkrankungen und Diabetes Typ II einhergeht. Es ist definiert durch erhöhtes viszerales Körperfett, atherogene Dyslipidämie, Bluthochdruck und erhöhte Blutglucosespiegel im Zusammenspiel mit verminderter Insulinsensitivität (Beilby 2004; Després und Lemieux 2006).

Viszerales Übergewicht des hypertrophen Phänotyps ist häufiger mit metabolischen Folgeerkrankungen wie Diabetes Typ II assoziiert als subkutanes Übergewicht (Wajchenberg 2000). Hypertrophe Adipozyten des viszeralen Fettgewebes weisen eine verminderte Insulinsensitivität auf und sind damit resistent für die antilipolytische Wirkung von Insulin. Gleichzeitig sind sie jedoch empfindlicher für die Katecholamin induzierte Lipolyse (Klöting et al. 2007). Erhöhte Konzentrationen an freien Fettsäuren, die in Folge der Lipolyse ins Blut gelangen, führen zu einer Vielzahl an pathophysiologischen Reaktionen, die neben anderen Einflussfaktoren an der Entstehung einer Insulinresistenz beteiligt sind. Zum einen blockieren freie Fettsäuren die Glucoseaufnahme in den Muskel indem sie die insulinvermittelte Translokation des Glukosetransporters GLUT 4 in die Plasmamembran hemmen (Mukherjee et al. 2013). Zur Energiegewinnung wird so vermehrt die Fettsäureoxidation genutzt und die Glucoseverwertung nimmt im Gegenzug ab (Martins et al. 2012; Randle et al. 1963). Zusätzlich wird die durch Insulin vermittelte Hemmung der Glykogenolyse und Gluconeogenese in der Leber unterbunden (Basu et al. 2005; Boden et al. 2001). Die Zirkulation freier Fettsäuren und erhöhte Blutglucosespiegel tragen zu einer verstärkten

Insulinsekretion des Pankreas und einem verminderten Insulinabbau in der Leber bei (Mukherjee et al. 2013). Dadurch kommt es zu einer Steigerung der Insulinkonzentration im Blut und einer Verringerung der Insulinrezeptoren in den Geweben. Dies kann letztendlich zu einer gestörten Funktion der β-Zellen des Pankreas führen, die in Folge weniger oder gar kein Insulin mehr produzieren. Bleibt dieser Zustand länger erhalten, kommt es zu einer irreversiblen Schädigung und damit zu Diabetes Typ II (Carpentier et al. 1999; Hennes et al. 1997). Man vermutet, dass die Ausschüttung inflammatorischer Zytokine zudem die Entstehung einer Insulinresistenz fördert, indem die Signalwirkung von Insulin in der Zelle gestört wird (Nishimura et al. 2009).

Zudem werden durch die erhöhte Lipolyserate vermehrt Very-Low-Density-Lipoproteine (VLDL) in der Leber gebildet. Dies kann zu einer Erhöhung der Serumlipide, der so genannten Hyperlipidämie führen. Auch Nahrungsfette, die über den Darm aufgenommen werden, verweilen durch die veränderte Stoffwechsellage länger im Blut und tragen so zu einem Anstieg der Blutlipide bei. So entstehen vermehrt triglyzeridreiche LDL, VLDL und HDL Partikel. Besonders die kleinen, dichten LDL Partikel werden als hoch atherogen betrachten, weil sie leicht oxidieren sowie mit Makrophagen in der Blutgefäßwand interagieren können und so zur Entstehung von Atherosklerose beitragen (Després und Lemieux 2006; Freitas Lima et al. 2015; Jung und Choi 2014).

Eine wissenschaftliche Evidenz besteht außerdem für die Assoziation zwischen Übergewicht bzw. Adipositas und Krebs (Dobbins et al. 2013; Keum et al. 2015). So ist ein erhöhter Körperfettanteil mit der Entstehung und Progression einiger Krebserkrankungen assoziiert, darunter vor allem Dickdarm-, Speiseröhren-, Nieren-, Prostata-, Ovar- und Brustkrebs (postmenopausal), sowie Endometriumskarzinome (Lauby-Secretan et al. 2016).

Gerade das Fettgewebe spielt eine wichtige Rolle bei der Krebsentstehung und -progression, da viele Tumore in direkter Nähe zum Fettgewebe entstehen. Es ist bekannt, dass Tumorzellen mit dem umgebenden Gewebe und der damit verbundenen Mikroumgebung, dem sogenannten „Stroma“ interagieren und so Einflüssen ausgesetzt sind, die das Tumorwachstum begünstigen. Übergewicht moduliert die Mikroumgebung der Tumorzellen auf vielfältige Weise, darunter über gesteigerte Inflammationsprozesse, Makrophageninfiltration, Hypoxie, aber auch dysregulierte Sexualhormonspiegel über eine erhöhte Aromataseaktivität und gesteigerte Ausschüttung an Wachstumsfaktoren wie IGF (Cozzo et al. 2017).

Laut der IARC (*International Agency for Research on Cancer*) könnte somit eine Reduktion des Körpergewichts und Körperfettanteils über die Ernährung sowie physische Aktivität das persönliche Risiko einiger Krebsarten um 18% senken und den Verlauf von bestehenden Krebserkrankungen positiv beeinflussen (Vainio et al. 2002).

1.2 Isoflavone

1.2.1 Vorkommen und Charakterisierung

Isoflavone sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, die unter anderem bei der Abwehr von Pathogenen und als Signalgeber bei der Symbioseregulation zur Stickstofffixierung beteiligt sind. Sie kommen hauptsächlich in Leguminosen wie Soja (*Glycine max*), aber auch in Rotklee (*Trifolium paratense*) sowie der Kudzu-Pflanze (*Pueraria montana*) vor. Die Sojabohne weist dabei den höchsten Gehalt an Isoflavonen auf. Chemisch gesehen gehören Isoflavone zu den Diphenolen und werden auf Grund ihrer estrogenähnlichen räumlichen Struktur und schwach estrogenen Wirkung als Phytoestrogene bezeichnet. Die drei wichtigsten Vertreter der Isoflavone sind Genistein (GEN), Daidzein (DAI) und Glycitein (GLY), die in der Sojabohne im Verhältnis 10:8:1 vorliegen (Kulling und Watzl 2003). Zwei weitere Isoflavone sind Formononetin und Biochanin A. Bei diesen Verbindungen handelt es sich um die 4'-O-Methylderivate von DAI und GEN, die überwiegend in Klee- und Alfalfasprossen vorkommen.

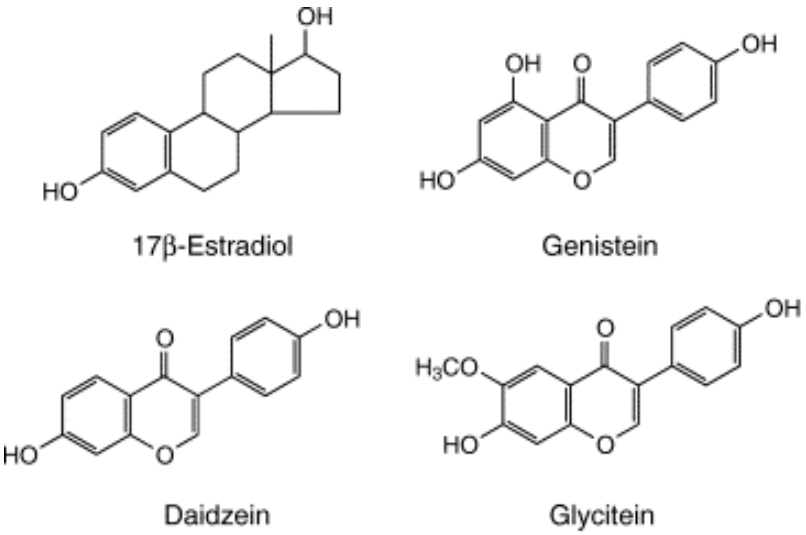

Abbildung 1.1 Chemische Struktur von 17-β-Estradiol (E2) im Vergleich zu den 3 wichtigsten Isoflavonen Genistein (GEN), Daidzein (DAI) und Glycitein (GLY) dargestellt in Aglykonform (nach Dang & Löwik 2005).

1.2.2 Aufnahmemengen im Menschen

Je nach Art und Zusammensetzung der aufgenommenen Lebensmittel variiert die tägliche Aufnahme an Isoflavonen stark. In asiatischen Ländern, wo vorwiegend fermentierte Sojaprodukte wie Tempeh, Miso und Natto basale Bestandteile der Ernährung sind, werden Aufnahmemengen von ca. 8 - 50 mg pro Tag erreicht (Mortensen et al. 2009). Meist beginnt der Konsum von Soja in diesen Ländern schon im frühen Alter und führt so zu einer mehr oder weniger kontinuierlichen Isoflavonexposition über die gesamte Lebensspanne. In westlichen Ländern dagegen, wo Soja nicht Teil der traditionellen Ernährung ist, fällt die Aufnahmemenge mit weniger als 1 – 2 mg dagegen deutlich geringer aus (EFSA 2015; Mortensen et al. 2009). Hauptquellen sind hier neben vorwiegend unfermentierten Sojaprodukten wie Sojamilch und Tofu, häufig auch „versteckte“ Isoflavone in verarbeiteten Lebensmitteln wie Backwaren, aber auch Fisch und Fleisch, die über sojamehlhaltiges Tierfutter mit Isoflavonen angereichert sind. Daher wird vermutet, dass die wahren Aufnahmemengen teilweise etwas höher liegen, als häufig kalkuliert (Clarke et al. 2013). Man kann annehmen, dass eine Exposition mit Isoflavonen in westlichen Nationen eher spät im Leben durch gezielte Einnahme sojahaltiger Produkte und Nahrungsergänzungsmittel eintritt und eher sporadisch oder phasenweise erfolgt.

Der hohe Anteil an ungesättigten Fettsäuren und hochwertigen Proteinen in der Sojabohne machen Sojaprodukte in westlichen Bevölkerungsgruppen als Nahrungsmittel immer beliebter. Zudem nimmt der Trend hin zu veganer und vegetarischer Ernährung zu, bei der Sojaprodukte wie Tofu und Sojamilch einen wichtigen Fleisch- und Milchersatz darstellen (Rizzo und Baroni 2018). Über eine vegetarische oder vegane Ernährung mit erhöhtem Sojakonsum sind Aufnahmemengen von bis zu 20 mg pro Tag beschrieben worden, die damit jedoch nicht an die durch traditionell asiatische Ernährungsgewohnheiten erreichten Aufnahmemengen heranreichen (EFSA 2015).

Darüber hinaus kann eine sehr frühe Exposition in Säuglingen über die Muttermilch oder Säuglingsnahrung erfolgen. Während die Aufnahmemengen über die Muttermilch relativ gering sind, können durch eine sojabasierte Säuglingsnahrung Aufnahmemengen von bis zu 12 mg/Tag/Säugling erreicht werden (Mortensen et al. 2009)

1.2.3 Pharmakokinetik

Die Absorption und Bioverfügbarkeit der Isoflavone ist abhängig von ihrer Form (Aglykon oder Glucosid), die die Löslichkeit im Intestinallumen, sowie die bakterielle und intestinale Metabolisierung beeinflusst. Weiterhin ist bekannt, dass eine Vielzahl anderer Faktoren Einfluss auf die Bioverfügbarkeit in Mensch und Tier nehmen. Zu diesen Faktoren gehören

neben der Verarbeitung und Matrix des Nahrungsmittels bzw. Futtermittels, auch das Geschlecht, Alter, und die Zusammensetzung der bakteriellen Darmflora des Konsumenten (Mortensen et al. 2009).

In der Sojabohne liegen Isoflavone vorwiegend als Zuckerkonjugate β-glykosidisch gebunden vor, wohingegen sie in erhitzten oder fermentierten Sojaprodukten, die traditionell in der asiatischen Küche verwendet werden, als freie Aglykonform vorliegen.

Nach oraler Aufnahme werden die Glucoside zunächst durch bakterielle β-Glucosidasen oder membrangebundene β-Glucosidasen des Dünndarms hydrolysiert und dann über die Darmwand absorbiert, während die Aglykonform direkt resorbiert werden kann. So wird DAI zunächst zu Dihydrodaidzein (DH-DAI) reduziert, welches anschließend durch Bakterien unter Spaltung des C-Rings zu O-Desmethylangolensin (ODMA) oder unter Erhalt des C-Rings zu Equol verstoffwechselt wird (Abbildung 1.2). GEN dagegen wird hauptsächlich zu Dihydrogenistein (DH-GEN) und 6'-O-Desmethylangolensin verstoffwechselt (Mortensen et al. 2009).

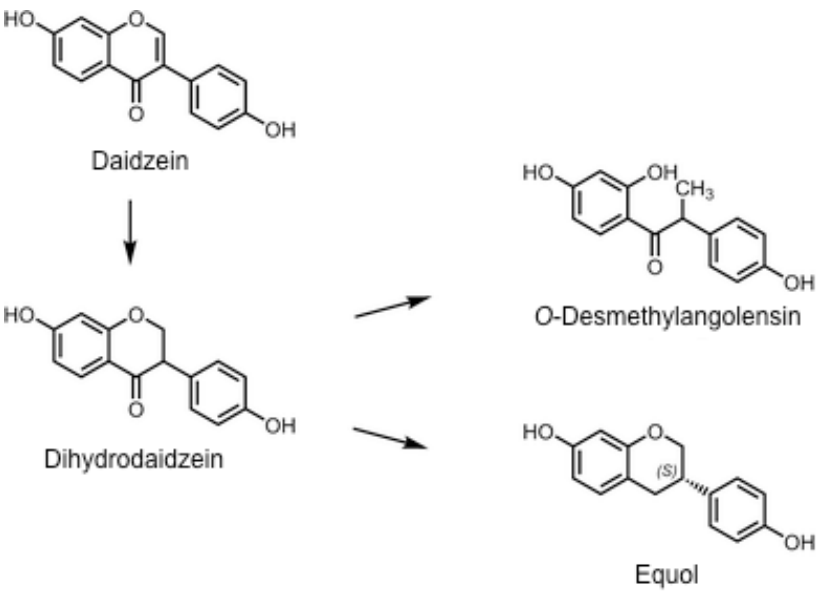

Abbildung 1.2 Metabolisierung von Daidzein durch Darmbakterien (nach Hüser *et al.* 2018)

Die Zusammensetzung der Darmmikrobiota bestimmt darüber welcher bakterielle Metabolit in welchem Umfang gebildet wird. Die verschiedenen Metabolite sind wiederum unterschiedlich in ihrer biologischen Aktivität. Unkonjugiertes GEN besitzt eine höhere biologische Aktivität als sein Präkursor und zeigt eine ähnlich hohe Bindungsaffinität zum ER-β wie GEN (Barnes 2010). Jedoch nur ca. 30% der westlichen Bevölkerung und 50 – 60% der asiatischen Bevölkerung besitzen Darmbakterien, die sie dazu befähigen Equol zu bilden, der andere Teil produziert ausschließlich den biologisch weniger aktiven Metaboliten

ODMA (Bolca et al. 2007). Frankenfeld et al. konnten zeigen, dass die Fähigkeit zur Equol-Bildung zu einem gewissen Maß einer genetischen Kontrolle unterliegt, aber auch andere Umweltfaktoren eine Rolle bei der Ausprägung des Phänotyps spielen können (Frankenfeld et al. 2004). Ratten sind hingegen ausnahmslos zur Equolbildung befähigt (Axelson und Setchell 1981), wodurch eine Vergleichbarkeit von Tier- und Humanstudien erschwert wird.

Equol wird eine Vielzahl an Effekte zugeschrieben, die im Allgemeinen mit einer sojareichen Ernährung in Verbindung gebracht werden. Trotzdem ist nach wie vor nicht geklärt, ob Equol hauptverantwortlich für positive Effekte auf hormonabhängige Erkrankungen wie Osteoporose, kardiovaskuläre Erkrankungen sowie Brust- und Prostatakrebs ist und ob die spezifischen Metabolisierungstypen (Equol-Bildner und Nicht-Equol-Bildner) in Assoziation zu den Effekten stehen (Lampe 2009; Shor et al. 2012).

Obwohl ODMA durch die Spaltung eines Phenolrings strukturell weiter vom Estrogen entfernt ist als Equol, konnte in *in vitro* Studien ebenfalls eine antagonistische Wirkung auf den AR (Pfitscher et al. 2008; Takeuchi et al. 2009), agonistische Wirkung auf den ER (C. S. Hwang et al. 2006; Kinjo et al. 2004), sowie antiproliferative Effekte auf Krebszellen der Brust (Kinjo et al. 2004; Magee et al. 2004; Schmitt et al. 2001) und Prostata (Raschke et al. 2006) nachgewiesen werden. Zwar ist die Wirkung *in vivo* auf Grund der Glucuronidierung von ODMA verändert, jedoch scheint es, dass neben Equol auch diesem Metaboliten eine gewisse physiologische Relevanz zugeschrieben werden kann (Frankenfeld 2011).

Nach erfolgter Absorption werden die Isoflavone in der Leber im Zuge des Phase-I-Fremdstoffmetabolismus von Cytochrom P450-abhängigen Monooxidasen hydroxyliert und im anschließend im Phase-II-Fremdstoffmetabolismus glucuronidiert oder sulfatiert. Es folgt eine schneller Transport in Organe und Zielgewebe, wobei die Halbwertszeit im Plasma 6 – 8 h beträgt (Manach et al. 2005; Mortensen et al. 2009).

Die Ausscheidung der Isoflavone erfolgt überwiegend renal und zu einem geringen Teil auch biliär (Mortensen et al. 2009). Mit der Galle gehen Isoflavone in den enterohepatischen Kreislauf ein. Sie gelangen erneut in den Darm, wo sie weiter mikrobiell metabolisiert und die entstandenen Aglykone reabsorbiert werden können (Sfakianos et al. 1997).

Die durchschnittlichen Isoflavon-Plasmaspiegel (Summe aus GEN, DAI und Equol) in japanischen Männern und Frauen, die sich traditionell ernährten, liegen bei jeweils 874 und 806 nM (Morton et al. 2002). Bei einer westlichen Ernährungsweise liegen die Plasmaspiegel mit ca. 10 nM deutlich niedriger (Adlercreutz und Mazur 1997).

Isoflavone und ihre Metabolite liegen im Plasma und Urin überwiegend in ihrer konjugierten Form als Glucuronide und in geringeren Konzentrationen auch als Sulfatkonjugate vor (Mortensen et al. 2009). Der Anteil an Aglykonen im Plasma beträgt dagegen nur 1 – 2 % und Glucoside sind gar nicht vorzufinden (Kulling und Watzl 2003). Der Konjugationsgrad der

Isoflavone im Plasma bestimmt unter anderem über die biologische Aktivität. So wurde für die Aglykone eine höhere biologische Aktivität in Bezug auf die estrogene Wirkung festgestellt als für die konjugierten Metabolite (Islam et al. 2015; Pugazhendhi et al. 2008; Setchell et al. 2011).

Pharmakokinetikstudien an GEN in Nagern zeigen, dass die Bioverfügbarkeit von Gesamt-GEN in der Ratte zwischen 20 und 60% liegt. In Mäuse werden teilweise sogar um die 90% erreicht. Dabei ist die Bioverfügbarkeit an GEN-Aglykonen ca. 10-fach niedriger als an Gesamt-GEN. Zudem zeigt sich eine geschlechtsabhängige Pharmakokinetik, wobei weiblichen Nager eine höhere Bioverfügbarkeit aufweisen, als männliche. Als Ursache dafür wird ein effizienteres enterohepatisches Recycling von Isoflavonen und der Einfluss von Estrogenen auf metabolisierende Enzyme und Transporter vermutet (Z. Yang et al. 2012). Im Menschen ist die Bioverfügbarkeit großen interindividuellen Unterschieden ausgesetzt und variiert zudem mit der Lebensmittelquelle der Isoflavone. Die Wiederfindungsrate im Urin beträgt hier ca. 10 – 30%. (Z. Yang et al. 2012).

Der Transport von Isoflavonen im Plasma findet größtenteils über Plasmaproteine statt (Csanády et al. 2002) wodurch die Bioverfügbarkeit in den Zielgeweben und damit die Wirkung beeinflusst wird. Für DAI konnte nachgewiesen werden, dass ca. 50% gebunden an Lipoproteine, hier vor allem LDL, transportiert werden (Rüfer et al. 2009). Im Vergleich zu Estrogenen ist die Bindungsaffinität von Isoflavonen zu Serumproteinen jedoch geringer, wodurch sich ihre Bioverfügbarkeit im Gewebe gegenüber Estrogenen erhöht (Nagel et al. 1998).

Es gibt Hinweise, dass Isoflavone die Blut-Hirn-Schranke passieren können und plazentagängig sind (Degen et al. 2002; Weber et al. 1999). In Mensch und Tier konnten Isoflavone in zahlreichen Körperflüssigkeiten wie Muttermilch, Fruchtwasser oder Plasma der Nabelschnur, sowie zahlreichen Geweben darunter Brust, Schilddrüse und Prostata, die als potentielle Zielorgane gelten, nachgewiesen werden (Chang et al. 2000; Coldham und Sauer 2000; Gu et al. 2005; Hüser et al. 2018; Lampe 2003; Yasuda et al. 2005). Während in den meisten Flüssigkeiten und Geweben niedrigere oder ähnlich hohe Konzentrationen gemessen wurden wie im Plasma, lagen die Isoflavonkonzentrationen in der Prostataflüssigkeit teilweise sogar höher (Gardner et al. 2009; Morton et al. 1997). Zudem vermutet man, dass die lipophilen Isoflavonaglykone in Geweben und Organen des Körpers akkumulieren können und so die biologische Halbwertszeit im Körper erhöhen (Penza et al. 2007).

1.2.4 Wirkmechanismen

Die biologische Aktivität der Isoflavone wird überwiegend über genomische Wirkmechanismen vermittelt. Wie das körpereigene E2 sind Isoflavone in der Lage an den ER zu binden und so unterschiedliche Genkaskaden zu aktivieren. Abhängig von der Estrogenkonzentration im umliegenden Gewebe können sie sowohl agonistische als auch antagonistische Wirkungen auf den ER ausüben. Während agonistische, additive Effekte der Isoflavone vorwiegend unter niedrigen endogenen Estrogenkonzentrationen (postmenopausal) auftreten, kommt es bei höheren endogenen Estrogenspiegel (prämenopausal), durch kompetitive Bindung der Isoflavone an den Rezeptor zu antagonistischen Wirkung (C. S. Hwang et al. 2006).

Die Bindungsaffinität der Isoflavone zu den zwei Subtypen ERα bzw. ERβ entspricht nur 1/1000 bzw. 1/3 gegenüber der von E2. Damit ist die Bindungsaffinität der Isoflavone zum ERβ deutlich höher als zum ERα. Ihr estrogenes Potential erreichen sie durch die vergleichsweise hohen Plasmakonzentrationen, die bei isoflavonreicher Ernährung, die des körpereigenen E2 um das 100 – 1000 -fache übersteigen können. Auch untereinander unterscheiden sich die verschiedenen Isoflavone in ihrer Bindungsaffinität, wobei GEN, vor Equol und DAI die höchste besitzt (Kuiper et al. 1998). Die Bindungsaffinität ist jedoch nicht der einzige Faktor, der die Transkriptionsaktivität beeinflusst. So spielt auch die Fähigkeit zur Rekrutierung von Co-Regulatoren und das Auslösen weiterer transkriptioneller Funktionen von ERα und ERβ eine wichtige Rolle (Mortensen et al. 2009).

Studien zur Gewebeverteilung von ER zeigen, dass ERα eine mittlere bis hohe Expression in Uterus, Ovarien, Hoden und Niere aufweist, wohingegen ERβ überwiegend in Uterus, Ovarien, Hoden, Prostata, Knochen, Lunge und Hirn exprimiert wird (Kuiper et al. 1997).

Aufgrund der Unterschiede in der Bindungsaffinität zu den beiden Rezeptortypen und der spezifischen Verteilung der zwei ER auf unterschiedlichen Organen und Geweben im Körper, werden die Isoflavone zur Wirkstoffklasse der pflanzlichen selektiven Estrogenrezeptor Modulatoren (Phyto-SERMs) gezählt. Sie sind in der Lage in einigen Organen und Geweben eine estrogene Wirkung zu erzielen, wohingegen sie keine oder gar antiestrogene Wirkung auf andere Gewebe zeigen (Cos et al. 2003). Dies deutet an, dass Isoflavone ganz unterschiedliche Wirkungen im Körper haben können.

Neben estrogenen Effekten, sind auch Effekte zur Modulierung steroidogener Enzyme durch Isoflavone beschrieben worden, die zu einer Veränderung der Androgenspiegel führen. Auch konnte eine antagonistische Wirkung auf den AR für GEN nachgewiesen werden (B. A. Evans et al. 1995).

Neben der vermittelten Wirkung über ER und AR können Isoflavone jedoch auch unabhängig von Steroidrezeptoren wirken. Sie sind in der Lage die Aromatase und 17*β*-Hydroxysteroid-

Dehydrogenase, Schlüsselenzyme der Estrogen- und Androgensynthese, zu inhibieren (Adlercreutz et al. 1993; Mäkelä et al. 1998; McVey et al. 2004) und SHBG zu stimulieren (Mousavi und Adlercreutz 1993).
Neuere Studien deuten darauf hin, dass Isoflavone auch über epigenetische Mechanismen wirken können und so zur Vorbeugung der Krebsentstehung beitragen können (Pudenz et al. 2014). In *in vitro* Versuchen wurden zudem tumorhemmende Eigenschaften wie die Hemmung von Tyrosinkinasen, Topoisomerasen und antiangiogenetische Eigenschaften nachgewiesen (Akiyama et al. 1987; Fotsis et al. 1993; Okura et al. 1988). Des Weiteren besitzen sie wie viele andere Polyphenole antioxidative und antiinflammatorische Eigenschaften, das heißt, sie können freie Radikale abfangen, die H_2O_2 Bildung im Körper eindämmen oder Zytokine inhibieren (Mortensen et al. 2009; Rimbach et al. 2003; Yu et al. 2016).
Isoflavone können zudem die nukleären PPAR Subtypen α, γ und δ aktivieren und so in den Lipid- und Glucosemetabolismus eingreifen. Effekte wie eine gesteigerte β-Oxidation, Verringerung der Triglyzeridspiegel, sowie verbesserte Insulinsensitivität, aber auch negative, adipogene Effekte wie eine gesteigerte Ausdifferenzierung von Adipozyten mit erhöhter Fetteinlagerung lassen sich auf diesen Mechanismus als PPAR-Agonist zurückführen (Dang 2009; Mezei 2006).

1.2.5 Biologische Wirkung und Toxizität

Epidemiologische Untersuchungen, vornehmlich zwischen westlichen und asiatischen Bevölkerungsgruppen, weisen auf einen Zusammenhang zwischen einer isoflavonreichen Ernährung und der geringen Prävalenz für einige Krankheitsbilder wie hormonabhängige Krebsarten, hier vor allem Brust und Prostatakrebs, aber auch Osteoporose, Diabetes Typ II und Adipositas hin (Adlercreutz 1995).
Zahlreiche *in vitro* Versuche und tierexperimentelle Studien, aber auch klinische Studien im Menschen wurden in den letzten Jahrzehnten durchgeführt, um die Wirksamkeit von Isoflavonen näher zu untersuchen. So gibt es Hinweise auf eine gesundheitsförderliche Wirkung, aber auch Hinweise für unerwünschte Wirkungen auf die Gesundheit. Isolierte Isoflavone, die als pflanzliche Alternative zu Hormonersatztherapie für Frauen in den Wechseljahren beworben werden und frei verkäuflich sind, gerieten in die Kritik, da solch hormonell wirksamen Substanzen mit Risiken für die Gesundheit verbunden sein können (BfR 2007). Zwar werden bei Einhaltung der von der europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA, *European Food Safety Authority*) empfohlenen Dosierung von 100 mg/Tag (EFSA 2015) Aufnahmemengen erreicht wie bei einer sojareichen Ernährung,

jedoch werden pflanzliche Präparate von Anwendern häufig in ihrer Wirkung unterschätzt und die empfohlene Dosierungen kann schnell überschritten werden.
Auf Grund mangelnder Beweiskraft der bisherigen Datenlage im Menschen hat die EFSA alle bisher beantragten *health claims* (engl. gesundheitsbezogene Angaben) für Isoflavone zur Wirkung auf postmenopausale Beschwerden, Blutlipide, kardiovaskuläre Erkrankungen, Knochen- und Prostatagesundheit im Menschen abgelehnt (EFSA 2011, 2012).
Isoflavone scheinen basierend auf den bisherigen mechanistischen und epidemiologischen Studien großes Potential in der Vorbeugung von Erkrankungen und in Bezug auf den Erhalt der körperlichen Gesundheit zu bieten (Setchell und Cassidy 1999). Besonders die Langzeitwirkung von Isoflavonen und eine frühe Exposition über die Ernährung sind bisher noch nicht ausreichend erforscht.

1.2.5.1 Wirkung auf Wechseljahresbeschwerden und Osteoporose

Häufige Begleiterscheinungen der Wechseljahre sind vasomotorische Störungen, wie Hitzewallungen und Nachtschweiß (Leidenberger et al. 2009). Epidemiologische Studien zur niedrigeren Inzidenz von Wechseljahresbeschwerden bei japanischen Frauen (Somekawa et al. 2001) führten zu der Hypothese, dass die lebenslange Aufnahme an Isoflavonen über die Ernährung mit der niedrigeren Inzidenz für menopausale Symptome in Verbindung stehen könnte (Howes et al. 2006). Aufgrund der postulierten Wirkung auf Wechseljahres-beschwerden und als pflanzliche Alternative zur herkömmlichen Hormonersatztherapie sind Isoflavone zunehmend auch in isolierter Form als Nahrungsergänzungsmittel rezeptfrei im Handel erhältlich. Jedoch nach heutiger Datenlage konnten klinisch relevante Effekte auf vasomotorische Störungen, mit isolierten Isoflavonen bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden (S. R. Davis 2001; Lethaby et al. 2013).
In der postmenopausalen Phase kommt es durch das Absinken der Estrogenspiegel zudem zu einer Abnahme der Knochendichte und damit zu einer erhöhten Inzidenz für Osteoporose (Wend et al. 2012). Auch Männer haben im fortschreitenden Alterungsprozess ein erhöhtes Osteoporoserisiko (Khosla et al. 2001). Es gibt Hinweise, dass Isoflavone die Knochenhomöostase beeinflussen können, indem sie die Knochenresorption aufhalten und Knochenneubildung fördern (X. Zheng et al. 2016). In Studien an ovariektomierten Ratten konnten eine osteoprotektive Wirkung von GEN beobachtet werden (Hertrampf et al. 2007; Sehmisch et al. 2010). In postmenopausalen Frauen konnte jedoch die positive Wirkung von Isoflavonen auf den Knochen bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden (Messina 2014).

1.2.5.2 Wirkung auf die Schilddrüse

Einige *in vivo* und *in vitro* Studien deuten darauf hin, dass Isoflavone die HHT-Achse beeinflussen und so die Konzentration an Thyroidhormonen wie Triiodthyronin (T3) und Thyroxin bzw. Tetraiodthyronin (T4) sowie Thyroidea-stimulierendem Hormon (TSH) im Körper beeinflussen, sowie goitrogene Wirkung auf die Schilddrüse ausüben können. Dabei sollen Isoflavone als Substrat für die Thyroidperoxidase dienen können und bei Iodmangel direkt inhibitorische Wirkung vermitteln (Divi et al. 1997; Doerge und Sheehan 2002; Silverstein et al. 2014; Sošić-Jurjević und Filipović 2014). Besonders ältere Frauen und Frauen in den Wechseljahren, die erhöhte TSH und erniedrigte T3/T4 Serumspiegel aufweisen, tragen ein erhöhtes Risiko für eine Schilddrüsenunterfunktion (Schindler 2003) und könnten deshalb bei einer Isoflavonsupplementierung einem potentiell höheren Risiko für Nebenwirkungen auf die Schilddrüse ausgesetzt sein. Humanstudien liefern bislang allerdings keine Hinweise, dass Isoflavone negative Auswikung auf die Schilddrüse gesunder Frauen haben, die ausreichend mit Iod versorgt sind (Hüser et al. 2018).

1.2.5.3 Wirkung auf hormonabhängige Krebsarten

Epidemiologische Studien geben Hinweise, dass Isoflavone kanzeroprotektive Eigenschaften in Bezug auf hormonabhängige Krebserkrankungen haben (Adlercreutz 1995; M. M. Lee et al. 2003; A. H. Wu et al. 2008). Auf der anderen Seite stehen Isoflavone als potentieller „endokriner Disruptor“ unter Verdacht estrogenabhängige Tumore zu fördern und unerwünschte Wirkungen auf Reproduktionsorgane wie Uterus und Brustdrüse, sowie die Schilddrüse hervorzurufen (Patisaul und Jefferson 2010).

In tierexperimentellen und klinischen Studien konnte belegt werden, dass Isoflavone sowohl proliferationshemmend als auch proliferationsfördernd sowohl auf weibliche sowie auf männliche Reproduktionsorgane wirken können (Andres et al. 2011). Zumeist sind die differentiellen Effekte von Isoflavonen auf Unterschiede in der Dosierung und im Expositionszeitraum zurückzuführen.

Eine antiproliferative Wirkung auf Mamakarzinome konnte in weiblichen Ratten beobachtet werden, die präpubertär mit GEN behandelt wurden. Dieser Effekt beschränkt sich auf die frühe Exposition in der die Ausdifferenzierung der Brustdrüse stattfindet und trat nicht in adulten Ratten auf (Lamartiniere et al. 1995). Des Weiteren konnten kanzeroprotektive Effekte auf die Prostata festgestellt werden (J. Wang et al. 2002, 2007).

Auf der anderen Seite stehen Studien, die eine krebsfördernde Wirkung der Isoflavone zeigen. Langzeit-Kanzerogenese Studien in Ratten weisen auf kanzerogene Wirkung von GEN in weiblichen Tieren mit einem leicht erhöhten Auftreten von Brustdrüsen- und

Hypophysentumoren. Zusätzlich kam es in der höchsten Dosis (40 mg/kg KGW/Tag) zu einem verfrühten Einsetzen von unregelmäßigen Estruszyklen. Männliche Tiere hingegen zeigten keine erhöhte Tumorrate (National Toxicology Program 2008).
In anderen Studien wird über die proliferationsstimulierende Wirkung von Isoflavonen auf Brustkrebszellen in vivo und in vitro berichtet (de Lemos 2001; Shike et al. 2014; A. H. Wu et al. 2008), sowie über proliferative und karzinogene Effekte am Uterus (Newbold et al. 2001) und der Prostata (Chau et al. 2007). In weiteren Studien an ovariektomierten Ratten führte eine 3-monatige GEN Gabe zu einer Zunahme des Uterusgewichtes, sowie zu hyperplastischen Veränderungen des vaginalen Epithels. Zusätzlich wurde eine gesteigerte Proliferation und Expression des Progesteronrezeptors in der Mamma festgestellt (Rimoldi et al. 2007).

Auf Grund der potentiell tumorfördernden Wirkung vor allem in der Brust und Schilddrüse konnte eine sichere Anwendung von isolierten Isoflavonen vor allem für Frauen in und nach der Menopause längere Zeit nicht garantiert werden (BfR 2007). Aufgrund der mangelnden Datenlage im Menschen und unzureichenden Hinweisen auf negative Effekte auf die beschriebenen Zielorgane kam die EFSA in einer Stellungnahme aus dem Jahr 2015 zu dem Schluss, dass eine hinreichend sichere Anwendung von Isoflavonpräparaten für gesunde Frauen nach der Menopause und die Allgemeinbevölkerung gegeben sei, sofern eine Dosierung von 100 mg pro Tag über einen maximalen Anwendungszeitraum von 10 Monaten eingehalten wird. Ausgenommen von dieser Stellungnahme seien bestimmte Risikogruppen wie Frauen, die bereits eine Krebserkrankung der Brustdrüse oder Gebärmutter hatten, oder aktuell davon betroffen sind (EFSA 2015). Zu gleichem Schluss kamen auch Hüser et al. in einer aktuellen Zusammenfassung der Datenlage zur Sicherheit von Isoflavonen in Bezug auf das Brustgewebe und die Schilddrüse (Hüser et al. 2018).

1.2.5.4 Wirkung auf Blutlipide und koronare Herzerkrankungen

Erhöhte Konzentrationen an Blutlipiden, die häufig mit Übergewicht einhergehen, gelten als ein wichtiger Faktor in der Entstehung von koronaren Herzerkrankungen. Eine Vielzahl an Studien in Nagern zeigt, dass Isoflavone in der Lage sind Triglyzeride und Cholesterol im Serum zu senken. In weiblichen Ratten konnte isoliertes, über das Futter verabreichtes DAI das Serumcholesterol, sowie Cholesterin in der Leber in intakten und ovariektomierten Tieren signifikant senken. GEN dagegen führte zu einer veränderten Genexpression von Genen, die am Cholesterolmetabolismus beteiligt sind (Bhattarai et al. 2017). Weitere in vivo (Kirk et al. 1998) und in vitro (Mullen et al. 2004; Owen et al. 2004) Studien zeigen, dass die

positive Wirkung auf die Plasmacholesterolspiegel auf eine Steigerung der hepatischen LDL-Rezeptoraktivität zurückzuführen ist.

Einige klinische Studien im Menschen konnten ähnliche Effekte von reduzierten LDL- und Cholesterolspiegeln nach erfolgter sojareicher Diät mit unterschiedlichem Isoflavongehalt nachweisen (Evans et al. 1995; Jenkins et al. 2002; Lichtenstein et al. 2002; Santo et al. 2008). Metaanalysen deuten zudem auf eine kardioprotektive Wirkung in postmenopausalen Frauen durch eine Verbesserung der endothelial Funktion (Chan et al. 2011; Li et al. 2010) und positive Effekte auf den Blutdruck hin (X. X. Liu et al. 2012).

Bei einer Vielzahl der Studien wurden Isoflavone zusammen mit Sojaprotein eingesetzt, dem eine kardiorotektive Wirkung nachgesagt wird. Daher ist unklar, ob Sojaproteine alleine für diese Effekte verantwortlich sind oder die Kombination mit Isoflavonen oder sogar anderen Sojainhaltstoffen einen entscheidenden Einfluss haben (Sacks et al. 2006).

Die amerikanische Gesundheitsbehörde FDA (*Food and Drug Administration*) hat im Jahr 1999 Sojaprotein zur Prophylaxe von Herzerkrankungen in den USA zugelassen und wies deutlich darauf hin, dass es keine Evidenz für eine Rolle der Isoflavone in der cholesterolsenkenden Wirkung des Sojaproteins gäbe („Food labeling“ 1999). Im Jahr 2017 hat die FDA diesen *health claim* jedoch wieder zurückgezogen nachdem Metaanalysen gezeigt haben, dass die Studienlage zu den positiven Effekten von Sojaproteinen zu schwach ist (FDA 2017).

Darüber hinaus konnten positive Effekte zu isolierten Isoflavonen auf die Blutlipide aus Tierexperimenten im Menschen bisher nicht hinreichend bestätigt werden. Vielmehr könnten die Effekte auch auf anderen Bestandteilen von Soja wie Pflanzenfasern und mehrfach ungesättigten Fettsäuren zurückzuführen sein (Sacks et al. 2006).

1.2.5.5 Wirkung auf das Fettgewebe

Das Fettgewebe gilt als das größte endokrine Organ und bietet damit ein klassisches Zielgewebe für estrogenwirksame Substanzen wie die Isoflavone.

Eine Vielzahl an *in vitro* und *in vivo* Studien untersucht den Einfluss von Isoflavonen auf die Fettgewebseinlagerung und Adipozyten. Die Studienlage ist jedoch heterogen und deutet sowohl auf positive als auch auf negative Effekte der Isoflavone auf das Fettgewebe hin.

In einem Großteil der Studien in männlichen und weiblichen Nagern führte eine subakute Isoflavonexposition zu einer Reduktion des Fettgewebes und damit auch des Körpergewichts. Meist konnten zusätzlich die Größe der Adipozyten des viszeralen Fettgewebes verringert werden, was auf einen antilipogenen Effekt schließen lässt (Cederroth et al. 2007; Cooke und Naaz 2005; Lephart 2014; Naaz et al. 2003; Penza et al.

2006). In anderen Studien wird über eine erhöhte Apoptoserate im Fettgewebe berichtet (H.-K. Kim et al. 2006). Diese antiadipogene Wirkung der Isoflavone scheint besonders über den ERβ, vermittelt zu sein und geht mit einer Verminderung der Expression adipogener Gene einher (Naaz et al. 2003; Penza et al. 2006).

In vitro Studien unterstützen die *in vivo* Beobachtungen und zeigen, dass Isoflavone eine antiadipogene Wirkung auf Adipozyten haben, indem sie die Differenzierung von Präadipozyten während der Adipogenese inhibieren (Dang et al. 2003; Harmon et al. 2002; Park et al. 2009). Zudem konnte gezeigt werden, dass sie die Lipogenese in ausgereiften Adipozyten inhibieren und die Lipolyse steigern (Harmon und Harp 2001; Szkudelska et al. 2000).

Einige Studien deuten jedoch auch auf eine adipogene bzw. lipogene Wirkung der Isoflavone. In männlichen Mäusen bewirkte eine subakute Isoflavongabe über das Futter eine erhöhte viszerale Fetteinlagerung mit gesteigerter Adipozytengröße. Es kam zudem zu einer verstärkten Expression PPARγ-kontrollierter Gene der Adipogenese (Penza et al. 2006; Zanella et al. 2014). Diese Wirkung wurde bisher nur in männlichen Tieren unter fettarmer Standardernährung beschrieben und trat vor allem bei niedrigen GEN Plasmakonzentrationen von ≤ 100 nM auf. Bei hohen Plasmakonzentrationen von ca. 220 nM hingegen trat ähnlich wie bei Weibchen eine Reduktion des viszeralen Fettgewebes ein (Penza et al. 2006). Mechanistische Untersuchungen an ER-transfizierten embryonalen Fibroblasten der Maus deuten darauf hin, dass diese adipogenen Effekte von GEN auf die Aktivierung von PPARγ zurückzuführen sind und die Anwesenheit des ERβ benötigen. Zudem ist die Wirkung abhängig vom Differenzierungsstadium der Adipozyten (Zanella et al. 2014).

In *in vitro* Studien an undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen wurde gezeigt, dass GEN konzentrationsabhängig sowohl ERs als auch PPARγ, aktivieren kann, die jeweils gegenteilige Wirkung auf die Adipogenese und Lipogenese haben (Dang et al. 2003). Die Balance zwischen der Aktivierung und Inhibierung beider Transkriptionsfaktoren scheint deshalb ein entscheidender Faktor bei der Determinierung der Effekte von GEN auf das Fettgewebe zu sein (Chirumbolo 2015; Dang 2009; Dang und Löwik 2004).

Die differentielle Wirkung der Isoflavone auf das Fettgewebe und den Fettmetabolismus deutet auf die Komplexität der Wirkung und wirft weitere Fragen über die Einflüsse von Faktoren wie Geschlecht (endogenem Sexualhormonstatus), Aufnahmemenge und Expositionszeitpunkt auf.

1.3 Zielstellung

In vivo Studien an Nagern zeigen ein heterogenes Bild in Bezug auf die Wirkung von Isoflavonen auf das Körpergewicht und das viszerale Fettgewebe. Während in einigen Studien an weiblichen Nagern eine antiadipogene Wirkung beschrieben wird, ist in männlichen Nagern konzentrationsabhängig auch eine adipogene Wirkung zu beobachten. Dabei scheinen Zeitpunkt der Exposition, Dosis, Alter, Geschlecht und der Ernährungsstatus der Tiere einen erheblichen Einfluss auf die Wirkung zu haben. Nur wenige Studien bilden realistische Expositionsszenarien hinsichtlich Aufnahmeweg und Aufnahmemengen ab und nur selten wird die Auswirkung einer kontinuierlichen, lebenslangen Isoflavonexposition ab der perinatalen Phase untersucht.
Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher die Einflüsse einer lebenslangen isoflavonreichen Ernährung auf die Entwicklung von Übergewicht, die viszerale Fettakkumulation und den Fettstoffwechsel in männlichen und weiblichen Wistar-Ratten zu untersuchen und zu vergleichen. Dabei wurde die Isoflavonwirkung in normalernährten und überernährten sowie zusätzlich gonadektomierten Tieren getestet. Potentielle Wirkmechanismen auf lipogene und inflammatorische Prozesse erfolgten anhand von molekularbiologischen Untersuchungen der Genexpression auf mRNA Ebene. Die Isoflavonexposition erfolgte über das Futter in Konzentrationen, die zu vergleichbar hohen Plasmaisoflavonspiegeln führten wie sie auch durch sojareiche Ernährung in ostasiatischen Bevölkerungsgruppen erreicht werden.

Folgende Fragestellungen ergaben sich als Grundlage für die Arbeit:

- Wie beeinflusst eine lebenslange orale Isoflavonaufnahme die Körpergewichtsentwicklung, viszerale Fettakkumulation und den Fettstoffwechsel in normalgewichtigen und übergewichtigen
  a) weiblichen Ratten
  und
  b) männlichen Ratten?

- Wie wirken Isoflavone auf die Regulationsmechanismen des Fettstoffwechsels?

- Können Isoflavone einer mit Übergewicht assoziierten Inflammation im Fettgewebe entgegenwirken?

- Gibt es Unterschiede in der Wirkung zwischen einer Kurzzeit- und Langzeitexposition mit Isoflavonen?

Diese Fragen konnten mittels der Auswertung von zwei Tierversuchen und nachfolgenden molekularbiologischen und histologischen Untersuchungen beantwortet werden, was im folgenden Teil der Arbeit beschrieben wird.

2 Material & Methoden

2.1 Versuchstiere

Zu allen durchgeführten tierexperimentellen Studien lag eine Genehmigung der Versuchsvorhaben gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes der zuständigen Regionalbehörde LANUV NRW vor. Für die Zucht der im Versuch verwendeten Tiere wurden Wistar-Ratten (Janvier Labs, Le Genest Saint Isle, Frankreich) geliefert. Die Tiere wurden bei einer Temperatur von ca. 21 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 50–70% und einem 12-h-Tag-Nacht-Rhythmus unter Bereitstellung von Futter und Wasser *ad libitum* in den Versuchstieranlagen der Deutschen Sporthochschule Köln gehalten. Nach einer 14-tägigen Eingewöhnungsphase erfolgte die Verpaarung der Elterntiere (P0) für eine Woche. Hierzu wurde jeweils ein Männchen mit zwei Weibchen im so genannten *Triomating* (Lohmiller und Swing 2006) verpaart. Bei nachgewiesener Trächtigkeit durch Körpergewichtskontrolle wurden die Weibchen bis zur Geburt einzeln gehalten, um ein genaueres Monitoring der aufgenommenen Isoflavonmengen zu gewährleisten. Der Tag der Geburt wurde als postnataler Tag (PND) 1 definiert. Die Jungtiere (F1) wurden am Tag der Geburt nach dem *Cross-Fostering* Verfahren (Krinke 2000) mit Tieren aus Würfen des gleichen Tages und der gleichen Futtergruppe (mit bzw. ohne ISO) durchmischt und gleichmäßig auf die Muttertiere verteilt. Kurz nach dem Abstillen (~PND 21) wurden die Jungtiere nach Geschlechtern getrennt und in Gruppen von bis zu 6 Tieren pro Käfig gehalten Das Gewicht, sowie der Futterverbrauch wurden 2 x wöchentlich erfasst, um den Gesundheitszustand und die körperliche Entwicklung der Tiere zu kontrollieren.

2.2 Futtersorten und Isoflavonextrakt

Im Versuch kamen zwei verschiedene Futtersorten in Pellettform zur Anwendung. Zum einen ein phytoestrogenarmes und normokalorisches Standardfutter für Ratten und Mäuse (R/M-H, 10 mm, phytoestrogen-arm, Ssniff GmbH Soest, Deutschland), das als Kontrollfutter (CON) diente. Zum anderen ein Spezialfutter für Ratten und Mäuse (EF R/M acc. D12451 (I) mod., Ssniff GmbH, Soest, Deutschland), dass zur Induktion von Übergewicht und assoziierten Folgenerscheinungen konzipiert wurde. Dieses sogenannte WD Futter (WD = westliche Diät) weist im Vergleich zum Kontrollfutter einen leicht erhöhten Kaloriengehalt (18,9 vs. 12,8 MJ/kg Futter) auf und ist durch den erhöhten Anteil an Saccharose/Dextrose mit 32% und Fett mit 23% sowie einem hohen Cholesterolgehalt von 175 mg/kg Futter einer westlichen Ernährung nachempfunden. Eine detaillierte Nährstoffzusammensetzung (Angaben Ssniff GmbH, Soest, Deutschland) beider Futtersorten im Vergleich ist Tabelle 2.1 zu entnehmen.

Tabelle 2.1 Zusammensetzung des Kontrollfutters (CON) und des WD Futters (WD = westliche Diät)

	CON	**WD**
Energiegehalt		
Bruttoenergie [MJ/kg]	16,50	22,60
Nettoenergie[#] [MJ/kg]	12,80	18,90
Energie aus Kohlenhydraten [%]	57,00	32,00
Energie aus Protein [%]	34,00	26,00
Energie aus Fett [%]	9,00	42,00
Rohnährstoffe		
Rohprotein [%]	19,30	22,50
N freie Extraktstoffe [%]	55,10	40,70
Stärke [%]	36,10	6,70
Saccharose [%]	3,10	20,10
Glucose [%]	/	11,60
Rohfett [%]	3,30	23,10
Fettsäuren [%]		
C 12:0	/	0,02
C 14:0	0,01	0,29
C 16:0	0,39	5,15
C 16:1	0,01	0,62
C 18:0	0,06	2,83
C 18:1	0,51	8,99
C 18:2	1,49	3,19
C 18:3	0,19	0,37
C 20:0	0,01	0,01
C 20:1	0,02	/
C 20:4	/	0,35
C 20:5	/	/
C 22:6	/	/
Cholesterin [mg/kg Futter]	/	175
Rohfaser [%]	4,40	4,00
Iod	2,10	0,85
Rohasche [%]	6,00	5,90

Mineralien, Vitamine und Spurenelemente nicht dargestellt. [#] Umsetzbare Energie aus den verdaulichen Rohnährstoffen; berechnet nach der Schätzformel für Schweine der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (GfE)

Dem jeweiligen Futter für die Isoflavongruppen wurde vom Hersteller ein kommerziell erhältliches sojabasiertes Isoflavonextrakt (NovaSoy®, ADM, Decatur, Illinois, USA) entsprechend einer Dosis von ca. 400 ppm beigemischt. Nachfolgende Analysen des Futters ergaben einen Gesamtisoflavongehalt (als Aglykonäquivalente) von 467 mg/kg Futter (CON ISO) und 431 mg/kg Futter (WD ISO).

Zur Kontrolle der Stabilität des Extrakts und zur genauen Charakterisierung des Isoflavongehalts erfolgte eine Analyse des Isoflavonprofils in den mit Isoflavonen angereicherten Futtersorten jeweils nach Erhalt der Futterlieferung und am Ende des Experiments. Die gemittelten Werte sind in Tabelle 2.2 dargestellt. Es konnte sichergestellt werden, dass der Isoflavongehalt während der Lagerung des Futters (Kontrollfutter bei Raumtemperatur; WD Futter bei 4 °C) stabil blieb.

Tabelle 2.2 Isoflavonprofile in isoflavonangereichertem Kontrollfutter (CON ISO) und WD Futter (WD ISO). Gemittelte Werte aus jeweils zwei Messungen (vor bzw. nach dem Versuch).

	CON ISO			**WD ISO**		
	Gehalt	RDS	Gehalt	Gehalt	RDS	Gehalt
Analyte	[mg/g Futter]	[%]	[%]	[mg/g Futter]	[%]	[%]
Genistein	0,010	3,121	1,291	0,007	4,076	0,949
Genistin	0,330	3,065	44,617	0,317	3,396	46,061
6''-O-Ac-Genistin	0,023	3,241	3,070	0,020	3,557	2,877
6''-O-Mal-Genistin	n.d.		0,000	n.d.		0,000
Daidzein	0,014	1,835	1,952	0,010	3,278	1,426
Daidzin	0,273	3,549	36,850	0,261	3,743	37,882
6''-O-Ac-Daidzin	0,018	3,388	2,477	0,019	4,699	2,740
6''-O-Mal-Daidzin	n.d.		0,000	n.d.		0,000
Glycitein	0,004	4,461	0,523	n.d.		0,000
Glycitin	0,061	3,327	8,269	0,055	4,069	8,065
6''-O-Ac-Glycitin	0,007	8,040	0,950	n.d.		0,000
6''-O-Mal-Glycitin	n.d.		0,000	n.d.		0,000
Gesamt-Analyte	0,740	3,194	100,0	0,688	3,520	100,0
Summe Genistein als Aglykonäquivalente	0,229	2,972	49,016	0,216	3,337	50,131
Summe Daidzein als Aglykonäquivalente	0,191	3,375	40,934	0,179	3,742	41,664
Summe Glycitein als Aglykonäquivalente	0,047	3,141	10,050	0,035	4,069	8,206
Gesamt-Isoflavonäquivalente	**0,467**	3,149	100,0	**0,431**	3,503	100,0

Mittelwerte aus fünf unabhängigen Bestimmungen; n.d. = nicht detektiert; RSD = relative Standard-abweichung

2.3 Versuchsdesign

Die Elterntiere (P0) erhielten entsprechend der Gruppen das jeweilige Kontrollfutter mit bzw. ohne Isoflavone. So erfolgte die Isoflavonexposition bereits während der Verpaarung und wurde über die Trächtigkeit der Muttertiere hinweg, bis in die Stillzeit fortgesetzt (Abbildung 2.1). Dadurch konnte für die nachfolgende Generation (F1) eine *in utero* Exposition während der embryonalen/fötalen Phase und später eine pränatale Exposition über die Muttermilch gewährleistet werden. Ab der Stillzeit hatten die Jungtiere entsprechend ihrer Gruppenzuordnung freien Zugang zum jeweiligen Futter. Die Isoflavonexposition über das Futter wurde bis zum Ende des Versuchs fortgeführt (Weibchen: ~ PND 170; Männchen: ~ PND 173).

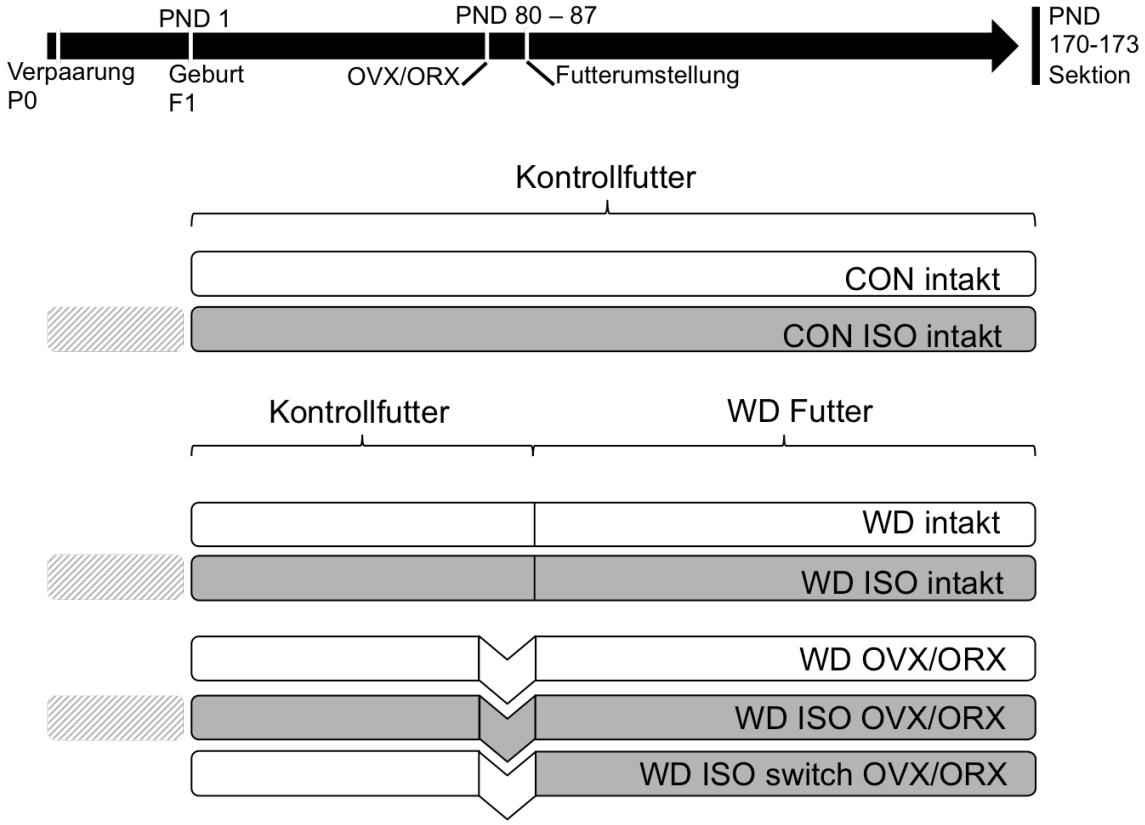

Abbildung 2.1 Versuchsdesign und experimentelle Gruppen. F1 = Filialgeneration; OVX/ORX = Ovari- bzw. Orchiektomie; P0 = Parentalgeneration; PND = postnataler Tag

Alle Gruppen (n = 6 - 8) sind auf normokalorischem Kontrollfutter aufgewachsen. Zwei intakten Kontrollgruppen behielten das Kontrollfutter mit bzw. ohne Isoflavone (CON bzw. CON ISO) bis zum Ende des Versuchs bei. In den übrigen 5 Gruppen sollte über eine 12-wöchige Gabe des WD Futters Übergewicht induziert werden. Dazu wurden zunächst 3 Gruppen am PND 80 (Weibchen; Männchen: ~ PND 85) gonadektomiert, indem den Weibchen unter Narkose die Ovarien (OVX) und den Männchen die Hoden (ORX)

vollständig entfernt wurden. Die übrigen 2 Gruppen dienten als intakte Vergleichsgruppe (intakt). Zwei bis drei Tage nach der Gonadektomie (Weibchen: ~ PND 83; Männchen: ~PND 87) erfolgte die Umstellung auf das WD Futter mit bzw. ohne Isoflavone (WD bzw. WD ISO). Intakte Gruppen erhielten das WD Futter zur gleichen Zeit.
Eine spezielle Gruppe an OVX bzw. ORX Tieren, die auf isoflavonfreiem Futter aufgewachsen ist, erhielt mit Umstellung auf das WD Futter auch die Isoflavonbeimischung im Futter (WD ISO switch OVX bzw. WD ISO switch ORX). Diese Gruppe sollte eine kurzzeitige Isoflavonexposition über die Ernährung bei älteren Frauen und Männern in der Menopause bzw. Andropause nachahmen, die häufig unter Übergewicht leiden.

2.4 Sektion und Probengewinnung

An PND 170 (Weibchen) bzw. PND 173 (Männchen) erfolgte die Tötung der Tiere mit Hilfe einer Kleintierguillotine. Intakte Weibchen wurden alle in der gleichen Zyklusphase (Proestrus) getötet. Das Blut wurde in Natriumcitrat-Probenröhrchen und Serumprobenröhrchen direkt nach der Dekapitation aus der Hauptschlagader aufgefangen und bei 4 °C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert. Das viszerale Körperfett (periovarielles, perirenales und omentales Fett) wurde entnommen und gewogen. Für die histologischen Analysen wurden definierte Fettgewebsstücke aus dem perirenalen Bereich unmittelbar nach dem Wiegen für ca. 4 h in Formaldeydlösung (4% v/v; pH 7,0) fixiert. Die Leber wurde mit physiologischer Kochsalzlösung gespült, entnommen und bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gefroren. Des Weiteren erfolgten die Entnahme und das Wiegen von Ovarien, Uterus, Testes, Prostata, Samenblase, *Os tibia*, *Musculus soleus*, M*usculus gastrocnemius* sowie *Musculus levator ani*. Für zukünftige Untersuchungen wurden Proben von allen entnommenen Organen jeweils fixiert und/oder in Stickstoff tiefgefroren.
Für die Gewinnung des Serums und Plasmas wurden die Proben nach der Sektion für 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und bei -20 °C gelagert.

2.5 Bestimmung der Adipozytengrößen

Für die Herstellung von histologischen Dünnschnitten müssen die zuvor in Formaldehydlösung fixierten Gewebe frei von Wasser sein. Diese Dehydrierung erfolgte schrittweise, um eine potenzielle Gewebeschädigung zu vermeiden. Dazu wurde das Fettgewebe zunächst in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50 – 100 %) entwässert, anschließend in Xylol überführt und mit Paraffin durchtränkt. Das verwendete Protokoll ist in Tabelle 2.3 dargestellt.

Tabelle 2.3 Protokoll zur Entwässerung der fixierten Gewebe sowie anschließende Paraffineinbettung

	Medium	**Dauer der Inkubation**
1.	Ethanol 50% (v/v)	5 h
2.	Ethanol 70% (v/v)	Über Nacht bis zu 3 Tage (Sammeln der Proben von 3 verschiedenen Sektionstagen)
3.	Ethanol 80% (v/v)	5 h
4.	Ethanol 95% (v/v)	Über Nacht
5.	Ethanol 100% (v/v)	7 h
6.	Xylol/Ethanol (1:1)	Über Nacht
7.	Xylol (I)	6 h
8.	Xylol (II)	Über Nacht
9.	Paraffin (I)	8 h
10.	Paraffin (II)	Über Nacht
11.	Ausblocken	-

Das Gewebe wurde in Paraffin ausgeblockt, bei einer Stärke von ca. 7 µm am Rotationsmikroskop geschnitten und auf Polysin-Objektträger gezogen, sowie für ca. 30 min im Wärmeschrank bei 60 °C erwärmt. Zur Färbung wurden die Schnitte zunächst wieder entparaffiniert. Dazu wurde das Gewebe mit Hilfe von Xylol (3 x 10 min) von Paraffin befreit und anschließend über eine absteigende Alkoholreihe (100, 96, 70% Ethanol und *aqua dest*.; je 2 x 5 min) rehydriert.

Die Fettgewebsschnitte wurden mit Hämatoxylin/Eosin für jeweils 3 min gefärbt. Zwischen den Färbeschritten erfolgte ein 3-minütiges Bläuen unter fließendem Leitungswasser. Anschließend wurden die Schnitte kurz in *aqua dest.* gespült, über die aufsteigende Alkoholreihe (je 2 min 70%, 96%, 100%, Xylol) entwässert und nass aus Xylol mit Entellan eingedeckt. Die Aufnahmen der Fettzellen erfolgten über ein Lichtmikroskop mit angeschlossener Kamera (Axiovert 200M, Zeiss, Jena, Deutschland) und entsprechender Software AxioVison rel. 4.8. Die Bestimmung der Adipozytengröße erfolgte anschließend über das Bildbearbeitungsprogramm ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

2.6 Isoflavonanalytik

Die Bestimmung der Konzentration an Isoflavonen im Sojaextrakt, im Futter sowie im Blutplasma wurde am Max-Rubner-Institut in Karlsruhe in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Sabine Kulling von Dr. Sebastian Soukup durchgeführt.

Für die Bestimmung des Isoflavongehaltes des Novasoy®650 Extraktes und der verwendeten Futter wurde die HPLC-DAD-Methode, wie bereits in Molzberger et al. beschrieben, angewandt (Molzberger et al. 2013). Für die Bestimmung der Isoflavone im WD Futter wurden die Proben zusätzlich einer Fettextraktion mit Heptan unterzogen.

Die Quantifizierung der Isoflavone und der gebildeten Metabolite im Plasma der Ratten erfolgte mittels UHPLC MS/MS nach zuvor beschriebener Methode (Soukup et al. 2014), jedoch mit nachfolgenden Abänderungen. Das Plasma wurde aufgetaut (100 µl), mit 5 µl internem Standard (5 µM $^{13}C_3$-DAI und 5 µM $^{13}C_3$-GEN-7-GlcA in DMSO) versetzt und mit 400 µl Wasser verdünnt. Die Metabolite DAI-4'-GlcA-7-S und GEN-4'-GlcA-7-S wurden zusätzlich zu den beschriebenen Metaboliten analysiert.

Standards für [2,3,4-$^{13}C_3$]Daidzein ($^{13}C_3$-DAI) und [2,3,4-$^{13}C_3$]Genistein-7-β-D-Glucuronid ($^{13}C_3$-GEN-7-GlcA) wurden von Nigel Botting und Nawaf Al-Maharik (University of St. Andrews, UK) bezogen. Weitere Isoflavon-Standardsubstanzen wurden selbst hergestellt oder von verschiedenen Herstellern bezogen. Zusätzlich wurden Daidzein-4´-β-D-Glucuronid-7-Sulfat (DAI-4'-GlcA-7-S) und Genistein-4´-β-D-Glucuronid-7-Sulfat (GEN-4'-GlcA-7-S) von Toronto Research Chemicals (North York, Kanada) bezogen.

Die Messbedingungen sind in Anhang 1 gegeben. Kalibrationskurven wurden über die Analyse des Plasmas ermittelt. Die unteren Quantifizierungs- und Detektionsgrenzen (engl. *limit of quantification* = LOQ und *limit of detection* = LOD) der Isoflavone und ihrer Metabolite im Plasma sind in Anhang 2 aufgeführt. Für die Berechnung der Plasmakonzentrationen von DAI und GEN wurden sowohl DAI und GEN als auch ihre Konjugate (Aglykonäquivalente) herangezogen. In den weiblichen Tieren konnte aufgrund einer Verschleppung an DAI innerhalb des Messgerätes keine genaue Konzentration der DAI-Aglykone bestimmt werden. Die Kontrollgruppe war davon jedoch nicht betroffen, da die Messung an einem anderen Tag durchgeführt wurde. DAI-Aglykone wurden daher aus der Bestimmung der Gesamt-Aglykonäquivalente im Plasma der Weibchen ausgeschlossen. Wie aus einem vergleichbaren Tierversuch in weiblichen Wistar Ratten unseres Labors bekannt ist, macht DAI-Aglykon selbst nur 1 – 3% der Gesamt-Aglykonäquivalente der Weibchen aus und spielt daher bei der Betrachtung der Gesamtisoflavonspiegel eine untergeordnete Rolle (Blei et al. 2014).

2.7 Blutanalysen

Die Bestimmung der Serumlipidspiegel erfolgte am Institut für Kreislaufforschung und Sportmedizin, Präventive und rehabilitative Sport- und Leistungsmedizin der Deutschen Sporthochschule Köln. Die Triglyzeridspiegel im Serum wurden colorimetrisch mit Hilfe des „ABX Pentra Trirides CP“ Kits (ABX Diagnostics, Montpellier, Frankreich) nach Anleitung entsprechend der Herstellerangaben bestimmt. Cholesterin, HDL und LDL Spiegel wurden photometrisch mit entsprechenden Kits („Cholesterol, CHOD-PAP“, „Cholesterol HDL direct, immunoinhibition“, „Cholesterol LDL, direct, enzymatic selektive protection“, jeweils DIALAB, Wiener, Neudorf, Österreich) bestimmt. Die Messungen erfolgten im Cobas Mira Plus Chemistry Analyzer Roche/Hitachi (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz).
Serum Konzentrationen von Leptin, Thyroxin (T4) und IGF-1 (*insulin like growth factor 1*) wurden mit Hilfe eines ELISA Kits für Ratten (mouse/rat leptin ELISA E06, Mediagnost, Reutlingen, Deutschland; T4 ELISA DET4105T100; IGF-1 mouse/rat ELISA DEE025, Demeditec Diagnostics, Kiel, Deutschland) in der Klinik für Rinder an der Tierärztlichen Hochschule Hannover bei JProf. Dr. Marion Schmicke bestimmt.

2.8 Genexpressionsanalysen

2.8.1 RNA-Extraktion, -Isolation und Konzentrationsbestimmung

Die Gesamt-RNA wurde aus den gefrorenen Gewebeproben mit Hilfe der TRIzol® Methode (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) gewonnen. Dazu wurde das Gewebe zunächst unter ständiger Kühlung mit flüssigem Stickstoff im Mörser fein pulverisiert. 100 – 200 mg des Gewebepulvers wurden mit Trizol (ca. 1 mL/100 mg Gewebe) versetzt und gemischt. Das Homogenisieren der Trizol-Gewebelösung und der Zellaufschluss wurden durch mehrmaliges Aufziehen durch eine feine Kanüle (0,40x12 mm) und einem anschließenden Einfrierprozess bei -196 °C unterstützt. Die gefrorenen RNA Proben wurden auf Eis aufgetaut und bei 4 °C für 5 min bei 12 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Dieser Schritt wurde für die Fettgewebsproben wiederholt, um den hohen Lipidanteil zu entfernen, der die Analysen stören könnte. Der Überstand wurde mit Chloroform (0.2 mL/mL eingesetztem Trizol) versetzt und für 2 – 3 min bei RT inkubiert sowie für 15 min bei 12 000 g und 4 °C zentrifugiert. Das Gemisch trennt sich in eine obere klare wässrige Phase, eine milchige Schicht, sowie eine untere rosagefärbte Trizolphase. Die oberste wässrige Phase enthält die RNA und wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß transferiert. Durch Zugabe von eiskaltem Isopropanol (0.5 mL/ 1mL

eingesetztem Trizol) wurde die RNA gefällt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min und Zentrifugation bei 12 000 g für weitere 10 min bei 4 °C formte sich ein gelartiges Pellet. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde 3-mal in eiskaltem 75%-igen Ethanol (1 mL/ mL eingesetztem Trizol) gewaschen. Dazu wurde das Pellet einige Male gevortext und zwischen den Waschschritten bei 7500 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet einige Minuten getrocknet. Das RNA-Pellet wurde anschließend in 50 – 100 µL RNAse freiem Wasser bei 55 °C für 5 min im Heizblock gelöst. Die RNA-Konzentration der Einzelproben wurde im Photospektrometer (Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen sowie deren Reinheit bestimmt. Zusätzlich wurde die Integrität der RNA mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese überprüft.
Die RNA-Einzeltierproben wurden zu gleichen Teilen (je 1 µg) gruppenweise vereint („gepoolt“), erneut die Integrität über Gelelektrophorese kontrolliert und die Konzentration bestimmt.

2.8.2 cDNA Synthese

Die zuvor extrahierte Gesamt-RNA ist ein Gemisch aus ribosomaler RNA (rRNA), Transfer-RNA (tRNA) und nur zu ca. 2% *Messenger*-RNA (mRNA). Um die RNA in Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) einsetzen zu können, muss sie zunächst in komplementäre DNA (*complementary DNA* = cDNA), umgeschrieben werden.
Mit Hilfe des QuantiTect® Reverse Transcription Kits (Qiagen, Hilden, Germany) wurde je 1 µL RNA pro Behandlungsgruppe in c-DNA transkribiert. Zunächst erfolgte der Verdau von genomischer DNA durch Zugabe von 2 µL gDNA wipeout Puffer und 14 µL RNAse freiem Wasser. Die Inkubation für 2 min bei 45 °C erfolgte im FlexCycler2 (Analytik Jena AG, Jena, Deutschland). 1 µL der gereinigten RNA diente als Verdaukontrolle in der später durchgeführten PCR. Zur cDNA Synthese wurden 4 µL RT Puffer 5x, 1 µL RT primer Mix mit Oligo-dT-Primern und 1 µL reverse Transkriptase (RT) hinzugegeben und für 15 min bei 45 °C sowie weitere 3 min bei 95 °C inkubiert. Die Leber und Fett Proben wurden jeweils 1:5 bzw. 1:1 mit RNAse freiem Wasser verdünnt und bei -20 °C gelagert.

2.8.3 qRT-PCR

Die quantitative *real-time* PCR (qRT-PCR) ermöglicht die Untersuchung der Genexpression bestimmter Zielgene in diversen Geweben. Diese Methode basiert auf der relativen

Quantifizierung der RNA Genexpression im Bezug auf ein konstitutiv exprimiertes Referenzgen (Haushaltsgen) wie z.B. die Cytochrome C Oxidase Untereinheit 1A.
Vor der eigentlichen Genexpressionsanalyse erfolgte eine Kontroll-PCR in der die RNA sowie das verwendete RNase-freie Wasser auf gDNA-Kontaminationen geprüft wurden. Alle eingesetzten Primer (Tabelle 2.4) wurden eigens für die PCR intron-überspannend mit Hilfe des Programms Primer3 (http://primer3.wi.mit.edu/) designt, um eine Amplifikation von genomischer DNA zu vermeiden. Jedes Primerpaar wurde in einer PCR hinsichtlich der Effizienz der Reaktion überprüft und die optimale Einstellung der Mengenverhältnisse an Reaktionslösungen und PCR Einstellungen (Annealing-Temperatur etc.) wurden für die jeweiligen Primer ermittelt.

Tabelle 2.4 Aufstellung der verwendeten Primer (Ratte) der qPCR

Gen		Primersequenz (5´-3´)	Referenz
	fwd	CGTCACAGCCCATGCATTCG	
1A (Referenzgen in Leber)	rev	CTGTTCATCCTGTTCCAGCTC	Weigt et al.,2013
HPRT 1 (Referenzgen in Fettgewebe)	fwd	AGGACCTCTCGAAGTGTTGG	
	rev	TGGCCACATCAACAGGACTC	
	fwd	GGAGCCATGGATTGCACATT	
SREBP 1c	rev	AGGAAGGCTTCCAGAGAGGA	
	fwd	CATCCCGCACCTTCTTCTAC	
ACC	rev	CCTCTGTCAGCTGCTTCTCC	
	fwd	GGCTAGAGACCTTGGCACTG	
FAS	rev	TAGCCCTCTGCTCTGGTCAC	Weigt et al., 2013
	fwd	GGCTGCTATAATTTGCTGTGG	
PPARα	rev	TTCTTGATGACCTGCACGAG	Weigt et al., 2013
	fwd	GCCCTTTGGTGACTTTATGG	
PPARγ	rev	CATCTTCTGGAGCACCTTGG	Weigt et al., 2013
	fwd	AGTTGCCTTCTTGGACTGA	
IL6	rev	CAGAATTGCCATTGCACAAC	
	fwd	CCTGCTCTTACTGGCTGGAG	
IL10	rev	TCCAGCTGGTCCTTCTTTTG	Velders et al., 2012
	fwd	TCCACATTCGGAGGCTAAAG	
MCP1	rev	ACGTGAAGGTTCAAGGATGC	Velders et al., 2012

2.8.4 Auswertung der qRT-PCR

Die relative Genexpression wurde mit Hilfe der ΔΔ-Ct Methode bestimmt (Pfaffl 2001). Hierbei wird die Expression des Zielgens auf die Expression eines nicht regulierten, konstant exprimierten Referenzgens (Haushaltsgen) bezogen. In der Leber wurde als Referenzgen Cytochrom C Oxidase Untereinheit 1A (1A) und im Fettgewebe Hypoxanthin

Phosphoribosyltransferase 1 (HPRT 1) verwendet. Zur Berechnung wurde der Cycle threshold (Ct) für Ziel- und Referenzgen bestimmt. Dabei beschreibt der Ct-Wert den Zeitpunkt bzw. den Zyklus in der exponentiellen Phase, bei dem die Fluoreszenz erstmals über den Hintergrundwert ansteigt. Je niedriger der Ct Wert ist, desto höher ist die Anfangsmenge an cDNA in der Probe. Als Kontrollgruppe diente jeweils die isoflavonfrei aufgewachsene Kontrollfuttergruppe (CON intakt). Es wurden jeweils mindestens 3 RT-PCRs mit 2 – 3 unabhängig voneinander synthetisierten cDNAs ausgewertet.

$$\Delta Ct_{Testgruppe} = Ct_{Zielgen} - Ct_{Referenzgen}$$

Der ΔΔ-Ct Wert wird berechnet, indem der Δ-Ct der Testgruppe von dem der Kontrollgruppe abgezogen wird:

$$\Delta\Delta Ct = Ct_{Testgruppe} - Ct_{Kontrollgruppe}$$

Die relative Genexpression wird dargestellt als:

$$\text{Relative Genexpression („fold induction“)} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

2.9 Statistische Auswertung

Die tabellarische Aufarbeitung der Rohdaten erfolgte mit Hilfe des Programms Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) und die graphische Darstellung mit Hilfe der Graphik-/Statistiksoftware GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).
Die statistische Auswertung der Daten zu Körper- und Organgewichten, Adipozytengrößen, Blutfettwerten, sowie Leptinspiegeln wurden mit Hilfe der Statistik-Software „R“ analysiert (R Core Team 2014). Gruppeneffekte von Futter, OVX/ORX und ISO wurden über geplante orthogonale Kontraste analysiert, die auf vorherigen Versuchen und daraus abgeleiteten Effektstärken beruhen. Dabei erfolgten die Vergleiche zwischen folgenden Effekten:

- CON vs. WD (Effekt des WD Futters verglichen mit Kontrollfutter)
- WD intakt vs. WD OVX/ORX (Effekt der Ovari- bzw. Orchiektomie verglichen mit intakten Tieren, die WD Futter erhielten)
- CON intakt vs. CON ISO intakt (Effekt der Isoflavone in intakten Tieren, die Kontrollfutter erhielten)
- WD intakt vs. WD ISO intakt (Effekt de Isoflavone in intakten Tieren, die WD Futter erhielten)

- WD OVX/ORX vs. WD ISO OVX/ORX (Effekt der Isoflavone in ovari- bzw orchiektomierten Tieren, die WD Futter erhielten).

Effekte der Kurzzeit-Exposition mit Isoflavonen wurden *post-hoc* getestet:

- WD OVX/ORX vs. WD ISO OVX/ORX und WD ISO switch OVX/ORX (Effekte der Isoflavone in ovari- bzw. orchiektomierten Tieren, die WD Futter erhielten)
- WD ISO OVX/ORX vs. WD ISO switch OVX/ORX (Effekte einer späteren kurzfristigen Isoflavonexposition in ovari-, bzw. orchiektomierten Tieren, die WD Futter erhielten)

Bei fehlenden Daten wurden die Kontraste entsprechend angepasst.

Es wurde ein lineares Modell für die Daten erstellt und dessen Residuen auf Normalverteilung und homogene Variation mittels Verteilungstests und regressionsanalytischen Plots geprüft. Aufgrund von Varianzheterogenität und fehlender Normalverteilung der Residuen wurde eine robuste ANOVA (r Paket „robustbase“, Funktion „lmrob“) durchgeführt. Einzelne *post-hoc* Vergleiche, die nicht in den geplanten Kontrasten berücksichtigt waren, z.B. WD ISO switch OVX gegen entsprechende Gruppen wurden über Welch´s t-Test (r base, Funktion „t-test“) mit $\alpha = 0.025$ ermittelt. Dieses eher konservative Signifikanzniveau wurde gewählt, um α-Fehler des Typs I durch die zusätzlichen Tests zu vermeiden. Die ISO Konzentration im Plasma wurde mit Hilfe einer robusten ANOVA (r package „WRS2“, Funktion “lincon“) ausgewertet.

Die graphische Darstellung erfolgte mittels Streudiagrammen unter zusätzlicher Angabe von Mittelwerten und Standardabweichungen (horizontale und vertikale Linien).

Korrelationen zwischen Leptinspiegeln im Serum und viszeraler Fettmasse oder Adipozytengröße wurden mit Hilfe des Spearman Rang Korrelationskoeffizienten (r) bestimmt.

Zur Auswertung der Genexpressionsanalysen (die ΔΔ-Ct Werte wurden zuvor $\log_2$ transformiert) und Isoflavonspiegel im Plasma erfolgte eine einfaktorielle ANOVA nach Kruskal-Wallis über alle Gruppen. Bei statistischer Signifikanz ($p \leq 0,05$) erfolgte anschließend ein t-Test nach Mann-Whitney zwischen den zu vergleichenden Behandlungsgruppen.

Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind mit * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und ***$p \leq 0,001$ definiert und in der Abbildung kenntlich gemacht.

3 Ergebnisse

3.1 Effekte von Isoflavonen in weiblichen Wistar Ratten

3.1.1 Tägliche Futteraufnahmemenge und Energieaufnahme

Zur besseren Vergleichbarkeit und Standardisierung des Versuchs wurden die tägliche Futteraufnahme und die daraus resultierende Isoflavonexposition der Tiere kontrolliert. Dabei liefert die Futteraufnahmemenge wichtige Hinweise auf eine mögliche Präferenz bzw. Abneigung zu den unterschiedlichen Futtersorten, die sich in der Körpergewichtsentwicklung wiederspiegeln würde. Zusätzlich zur Futteraufnahmemenge wurde die tägliche Energieaufnahme ermittelt, da im Versuch Futtersorten mit unterschiedlichem Energiegehalt (CON vs. WD) verwendet wurden.

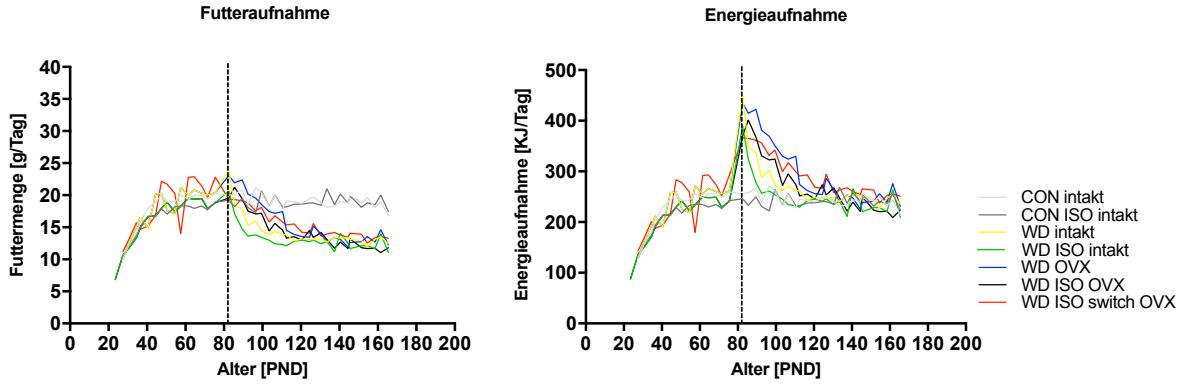

Abbildung 3.1 Futter- und Energieaufnahme der weiblichen Ratten über die gesamte Versuchsdauer. Die Graphen zeigen die gemittelte tägliche Futter- bzw. Energieaufnahme in Abhängigkeit vom Alter (PND) der Tiere. Die gestrichelte vertikale Linie markiert den Zeitpunkt der Umstellung auf das WD Futter in den entsprechenden Gruppen.

Die Weibchen zeigten in der Adoleszenzphase von PND 28 bis PND 50 eine deutliche Steigerung der Futteraufnahme bis hin zu 18 – 20 g/Tag (Abbildung 3.1). Bis auf tagesabhängige Schwankungen blieb diese Futteraufnahmemenge in den Kontrollfuttergruppen bis zum Versuchsende gleich. Die Tiere der Gruppen, die ab PND 83 auf WD Futter wechselten, reduzierten innerhalb der nächsten 4 Wochen nach der Futterumstellung ihren Futterkonsum auf ca. 11 – 14 g/Tag und behielten dies bis zum Versuchsende bei. Der Zusatz von Isoflavonen im Futter hatte weder in den Kontrollfuttergruppen noch in den WD Futtergruppen Einfluss auf die durchschnittliche Futteraufnahmemenge und deutet somit auf eine gute Palatabilität (=Schmackhaftigkeit) des Isoflavonfutters.

Die adulten Tiere der Kontrollfuttergruppen zeigten eine gleichbleibende Energieaufnahme von durchschnittlich 240 KJ/Tag/Tier. Da die Energieaufnahme mit der Futteraufnahmemenge korreliert, zeigte sich bei den Tieren der WD Futtergruppe ein deutlicher Anstieg in der Energieaufnahme zum Zeitpunkt der Futterumstellung (PND 83) als die Tiere ihre Futteraufnahme noch nicht herabreguliert hatten. Innerhalb der nächsten 4 Wochen reduzierte sich parallel zur Aufnahmemenge auch die Energieaufnahme. In dieser Phase lag die Energieaufnahme der ovariektomierten Gruppen stets leicht über der der intakten Gruppen. Zum PND 110 hatte sich die Energieaufnahme aller Gruppen bei ca. 230 – 260 KJ/Tag/Tier eingependelt. Somit war die Energieaufnahme ab PND 110 in allen Gruppen auf einem ähnlichen Niveau von ca. 240 KJ/Tag/Tier.

3.1.2 Isoflavonaufnahme aus dem Futter

Die Berechnung der (theoretischen) Isoflavonaufnahme erfolgte basierend auf den Isoflavonkonzentrationen im Futter, der durchschnittlichen Futteraufnahmemenge und dem mittleren Körpergewicht der jeweiligen Gruppen an PND 83 und PND 170 erfolgte die Berechnung. Die Isoflavonaufnahme an PND 83 und 170 sowie die finalen Isoflavonplasmaspiegel am Ende des Experiments sind in Abbildung 3.2 dargestellt. Zum Zeitpunkt der Umstellung auf WD Futter (PND 83) betrug die Isoflavonaufnahme der intakten Kontrollfuttergruppe 39 mg/kg KGW, die der intakten WD Gruppe 34 mg/kg KGW, die der ovariektomierten WD Gruppe 32 mg/kg KGW und die der spätexponierten WD Gruppe 31 mg/kg KGW/Tag. Am Ende des Experiments (PND 170) ist die Isoflavonaufnahme in den Kontrollfuttergruppe gegenüber der Ausgangsmessung nahezu gleichgeblieben, während die WD Gruppen um ca. 50% reduzierte Isoflavonaufnahmemengen aufwiesen. In den isoflavonfreien Futtergruppen konnte keine Aufnahmemenge ermittelt werden, da die gemessenen Isoflavonkonzentrationen im Futter unter dem detektierbaren Schwellenwert (<LOD) lagen.

Die Reduktion in der Futteraufnahme mit Umstellung auf das WD Futter führte zu einer verringerten Isoflavonaufnahme. Vergleicht man die Gruppen an PND 170, so weisen alle drei WD Gruppen mit durchschnittlich 14 mg/kg KGW eine geringere Isoflavonaufnahme auf (-62%) als Tiere der Kontrollfuttergruppe mit 37 mg/kg KGW.

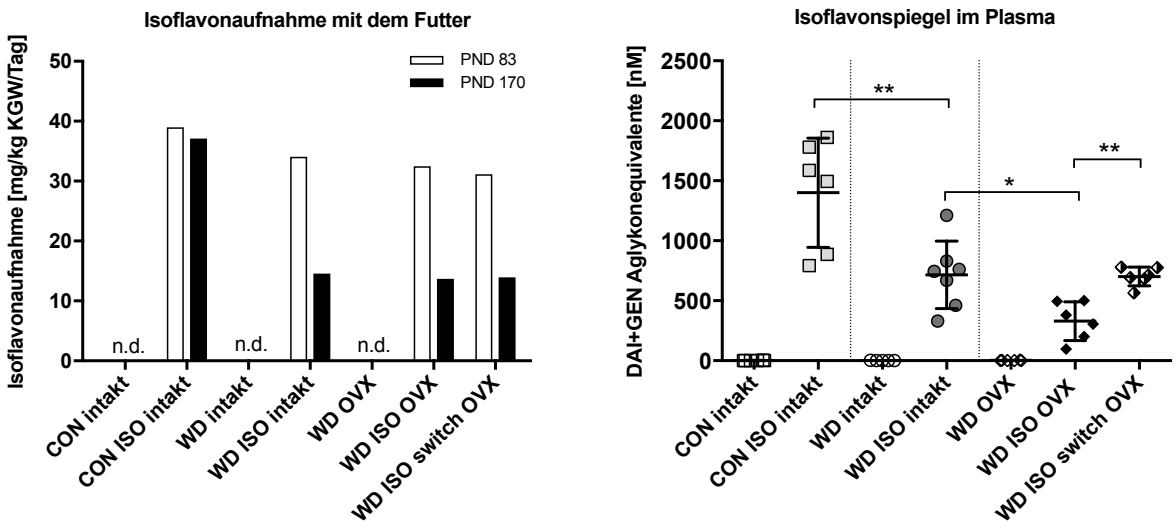

Abbildung 3.2 Berechnete Isoflavonaufnahme der Weibchen an PND 83 und PND 170 sowie Isoflavonspiegel im Plasma zum Zeitpunkt der Sektion dargestellt als Summe der Daidzein (DAI) und Genistein (GEN) Aglykonäquivalente. Die Isoflavonaufnahme ist auf Basis der durchschnittlichen Futteraufnahme sowie des Körpergewichts am entsprechen postnatalen Tag (PND) berechnet. Das Balkendiagramm zeigt Mittelwerte, das Streudiagramm zeigt Mittelwerte ± Standardabweichung (SD). (*) kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mit: * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$; n.d. = nicht detektiert (<LOD)

Die berechneten Aufnahmemengen an Isoflavonen korrelieren mit den tatsächlich gemessenen Isoflavonspiegeln im Blutplasma der Tiere (Abbildung 3.2), die an PND 170 zum Zeitpunkt der Sektion gemessen wurden. Wie zu erwarten war, zeigten alle isoflavonfreien Futtergruppen vernachlässigbare Isoflavonplasmaspiegel von ≤ 2 nM.

Innerhalb der intakten Gruppen hatten WD Tiere mit 715 ± 282 nM um ca. 53% ($p < 0,008$) reduzierte Isoflavonspiegel gegenüber den Tieren, die das Kontrollfutter bekamen (1400 ± 455 nM). Innerhalb der WD Gruppen wiesen ovariektomierte Tiere mit kontinuierlicher Isoflavonexposition mit 330 ± 162 nM um ca. 51% ($p < 0,022$) niedrigere Isoflavonspiegel auf als die der intakten Tiere gleicher Futtergruppe, während ovariektomierte Tiere mit später Isoflavonexposition (ISO switch) mit 702 ± 78 nM ähnlich hohe Isoflavonspiegel aufwiesen wie die intakten Tiere gleicher Futtergruppe (WD ISO intakt).

3.1.3 Isoflavonmetabolitenspektrum im Plasma

Die Metabolisierung durch Darmbakterien sowie der Phase-II-Fremdstoffmetabolismus haben einen entscheidenden Einfluss auf die Aufnahme, Bioverfügbarkeit und biologische Aktivität der Isoflavone (Mortensen et al. 2009). Daher wurde das Metabolitenspektrum an Isoflavonen im Plasma analysiert (Tabelle 3.1). Zur übersichtlicheren Darstellung sind die

Anteile der jeweiligen Phase-II-Metabolite von GEN und DAI am Gesamtspektrum zusätzlich als Kreisdiagramm dargestellt (Abbildung 3.3).

In den ISO-Gruppen der Weibchen konnte der bakterielle DAI Metabolit Equol in seiner glucuronidierten Form (Equol-7-Glc) in Konzentrationen von 110 – 190 nM detektiert werden (Tabelle 3.1). Dabei wiesen intakte Tiere der WD Gruppe mit 190 nM die höchsten Plasmakonzentrationen an Equolmetaboliten auf. Der DAI Metabolit ODMA wurde dagegen nur zu 0,5 nM bzw. 0,7 nM in intakten Tieren der Kontrollfuttergruppe bzw. in intakten WD Tieren detektiert.

Tabelle 3.1 Plasmakonzentrationen an Isoflavonmetaboliten in den weiblichen Ratten der Isoflavon-Futtergruppen (ISO). Mittelwert ± SD [nM]

Analyte	CON ISO intakt (n=6)	WD ISO intakt (n=7)	WD ISO OVX (n=6)	WD ISO switch OVX (n=6)
Aglykon-äquivalente (DAI+GEN)	1435,5 ± 471,3	676,2 ± 276,6	329,5 ± 161,7	702 ± 78,4
GEN	10,3 ± 6,7	4,8 ± 3,8	1,3 ± 1,2	3,9 ± 3,7
GEN-4'-GlcA	19,4 ± 8,8	1,2 ± 3,7	n.d.	n.d.
GEN-7-GlcA	660,9 ± 199,9	307,9 ± 126,6	132,8 ± 68,6	297 ± 37,9
GEN-4'-S	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GEN-7-S	n.d. (1,3; n=1)	n.d.	n.d.	n.d.
GEN-7,4'-DS	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GEN-7-GlcA-4'-S	13 ± 8	8,1 ± 5	9,2 ± 5,5	22,7 ± 4,1
GEN-4'-GlcA-7-S	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
DAI	34,8 ± 18,4	< 50#	< 50#	< 50#
DAI-4'-GlcA	43,4 ± 21	16,4 ± 7,4	8,4 ± 5,8	19,5 ± 2,8
DAI-7-GlcA	621 ± 211,4	323,2 ± 140	158,7 ± 77,1	320,6 ± 43,5
DAI-4'-S	4,3 ± 3,4	0,4 ± 1	0,6 ± 1,0	1,3 ± 1,3
DAI-7-S	10 ± 6,4	4,2 ± 2,6	3,8 ± 1,8	6,6 ± 3,7
DAI-7,4'-DS	4,6 ± 3,2	2,8 ± 1,2	4 ± 2,5	7,7 ± 3,5
DAI-7-GlcA-4'-S	12 ± 7,6	6,5 ± 3	9,5 ± 5,1	20,4 ± 4,8
DAI-4'-GlcA-7-S	1,5 ± 0,9	0,8 ± 0,2	1,2 ± 0,6	2 ± 0,7
DH-GEN	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
DH-DAI	n.d. (1,3; n=1)	n.d.	n.d.	n.d.
ODMA	0,5	0,7 ± 0,6	n.d. (0,5; n=1)	n.d.
6'OH-ODMA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Equol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Equol-7-GlcA	176,4 ± 63,1	190,1 ± 38,5	110,2 ± 38,4	111 ± 29,3
Equol-4'-S	n.d.	n.d. (4,9; n=1)	n.d. (4,5; n=1)	2 ± 2,3

n.d. = nicht detektiert (<LOD); DAI = Daidzein; DS = Disulfat; GEN =Genistein; GlcA = Glucuronid; S = Sulfat; DH = Dihydro; ODMA = O-Desmethylangolensin; Aglykonäquivalente (DAI+GEN) = Summe aus DAI und DAI Konjugaten sowie GEN und GEN Konjugaten. Für die Berechnung der Mittelwerte wurden Werte mit LOD> x <LOQ als LOQ/2 und n.d. als 0 gesetzt.

Auf Grund einer DAI Verschleppung innerhalb des Geräts konnten keine genauen Konzentrationen an DAI-Aglykonen bestimmt werden und wurden daher bei der Berechnung der Aglykonäquivalente ausgeschlossen.

Des Weiteren zeigt sich im Phase-II-Metabolitenspektrum von GEN bzw. DAI ein deutlich geringerer Anteil an freien Aglykonen (< 5%) verglichen mit den konjugierten Isoflavonmetaboliten (Abbildung 3.3).

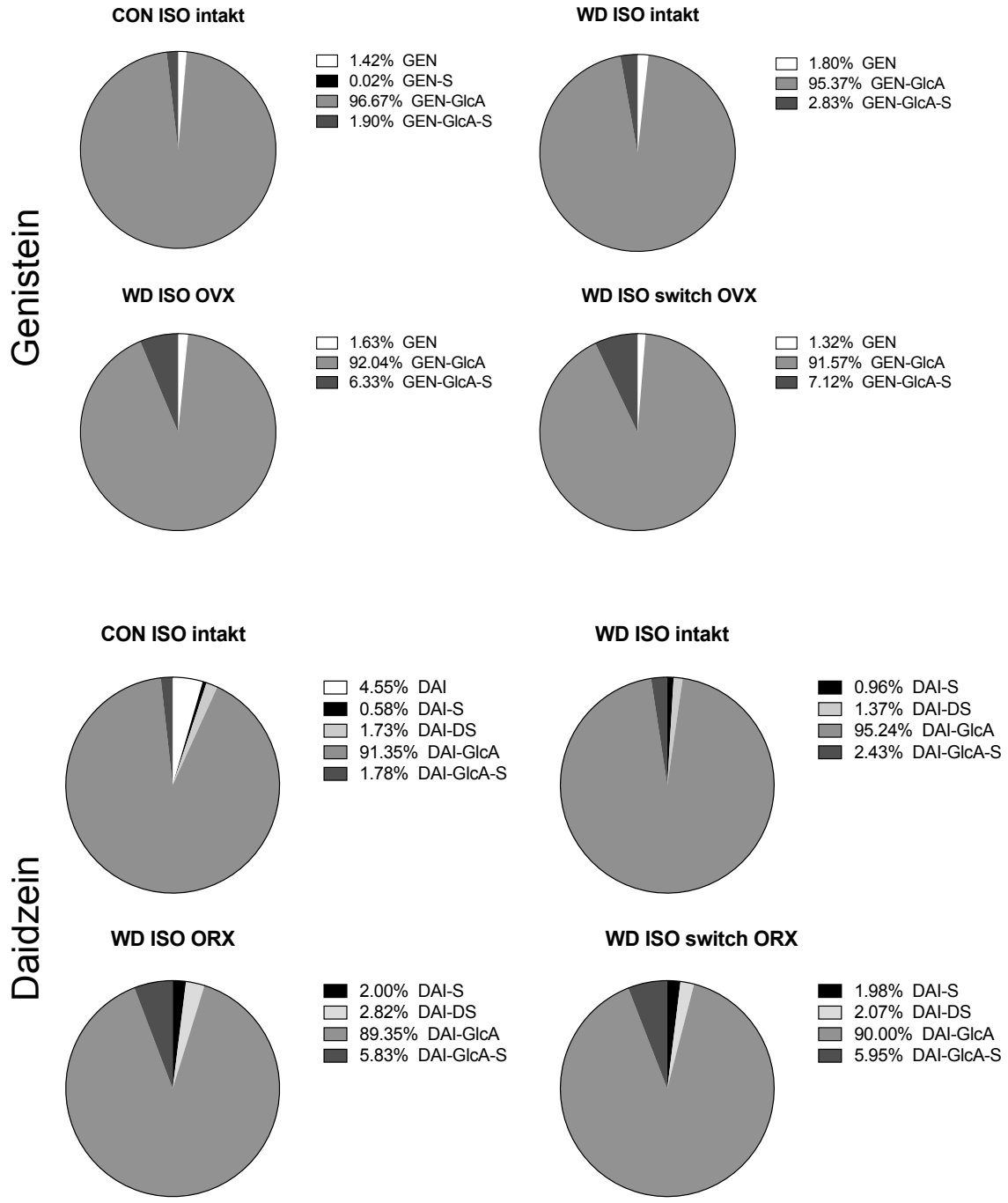

Abbildung 3.3 Phase-II-Metabolitenspektrum von Genistein und Daidzein im Plasma der Weibchen (ISO Gruppen) dargestellt als Kreisdiagramm mit der prozentualen Verteilung der jeweiligen Metabolite (DAI-Aglykone für WD Gruppen ausgeschlossen). DAI = Daidzein; DS = Disulfat; GEN = Genistein; GlcA = Glucuronid; S = Sulfat

In intakten Weibchen beträgt der Anteil freier Aglykone an der Summe der ISO-Aglykonäquivalente 1,4 – 1,8% für GEN und ca. 4,5% für DAI (nur CON ISO intakt). In ovariektomierten Tieren liegt der Anteil an freien Aglykonen bei 1,3 – 1,6% für GEN, für DAI konnten auf Grund einer DAI Verschleppung innerhalb des Geräts keine genauen Konzentrationen der freien Aglykone gemessen werden.Sowohl in intakten als auch in ovariektomierten Weibchen konnten DAI bzw. GEN-Glucuronide als Hauptmetabolite (90 – 95% der jeweiligen Aglykonäquivalente) identifiziert werden. Lediglich in der Verteilung der sulfatierten Konjugate (< 10%) zeigen sich leichte Unterschiede zwischen den Gruppen. Verglichen mit den intakten Tieren steigt hier der Anteil an sulfatierten Glucuroniden sowohl bei GEN als auch bei DAI nach Ovariektomie von ca. 2% auf 6% der jeweiligen Aglykonäquivalente an.

3.1.4 Körpergewichtsentwicklung

Zwischen dem Abstillen und PND 80 gab es keine Unterschiede in der Körpergewichtsentwicklung (Abbildung 3.4). Während die intakten Kontrollfuttergruppen ab PND 80 kaum mehr an Körpergewicht zunahmen, zeigte sich nach der Futterumstellung eine deutliche Steigerung des Körpergewichts in allen WD Futtergruppen. Die ovariektomierten Gruppen wiesen dabei eine stärkere Gewichtszunahme auf, als die intakten Gruppen. Der Körpergewichtsverlauf der Tiere, die kontinuierlich mit Isoflavonen exponiert waren, lag in allen Futtergruppen stets unter der Vergleichsgruppe ohne Isoflavone.

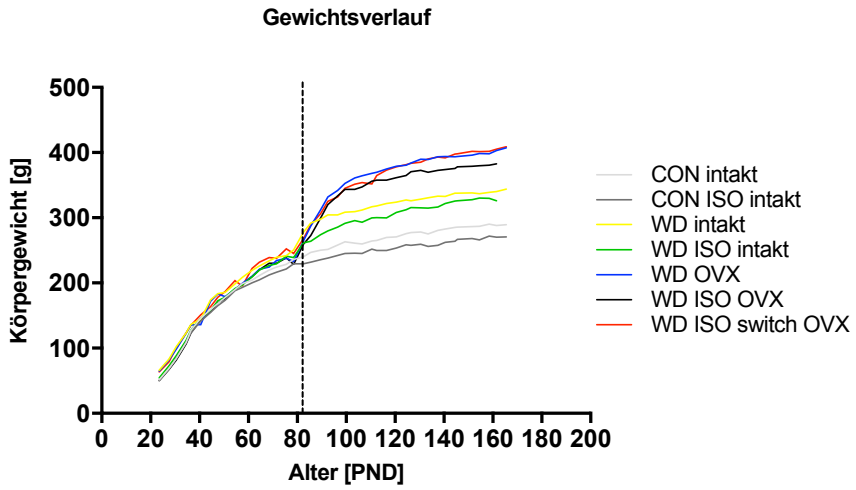

Abbildung 3.4 Körpergewichtsverläufe der weiblichen Ratten vom Tag des Abstillens bis zum Ende des Versuchs. Die Grafik zeigt das gemittelte Körpergewicht der verschiedenen Gruppen in Abhängigkeit vom Alter über die Dauer des Versuchs. Die gestrichelte vertikale Linie markiert den Zeitpunkt der Umstellung auf das WD Futter in entsprechenden Gruppen.

3.1.5 Terminales Körpergewicht, viszerale Fettgewebsmasse, Adipozytengrößen und Leptinspiegel

Nach 12-wöchiger Gabe des WD Futters konnte in allen WD Gruppen der Weibchen Übergewicht induziert werden. Dies zeigte sich in einem gesteigerten Körpergewicht ($p < 0,0001$), erhöhtem viszeralem Körperfett ($p < 0,0001$) und einer Zunahme in der Adipozytengröße ($p = 0,0002$) im Vergleich zu den Kontrollfuttergruppen (Abbildung 3.5 A, B, C, G). Innerhalb der intakten Gruppen war das Körpergewicht der WD Gruppe um 25% und die Fettmasse um 64% gegenüber der Kontrollfuttergruppe erhöht. Die Ovariektomie führte zu einer zusätzlichen Steigerung des Körpergewichts um 20% ($p = 0,005$), sowie einer tendenziellen (nicht statistisch signifikanten) Steigerung der viszeralen Fettmasse um 38% ($p = 0,075$) gegenüber den intakten Tieren, die WD Futter bekamen. Zusätzlich zeigte sich jedoch durch die Ovariektomie eine stärkere Streuung der Messwerte, welche sich in höheren Standardabweichungen (SD) verglichen mit den intakten Tieren äußerte.

Die stärksten Effekte durch Isoflavongabe konnten in den normalgewichtigen Kontrollfuttergruppen festgestellt werden. Hier führte die Exposition mit Isoflavonen zu einem statistisch signifikant niedrigeren Körpergewicht (-5%, $p = 0,03$), einer Verringerung der viszeralen Körperfettmasse (-41%, $p < 0,0001$), einer Verkleinerung der Adipozytendurchmesser (-30%, $p << 0,0001$), sowie zu niedrigeren Serumleptinspiegeln (-45%, $p < 0,0001$) verglichen mit intakten Tieren der Vergleichsgruppe ohne Isoflavone. Innerhalb der WD Gruppen führte die kontinuierliche Isoflavongabe in ovariektomierten Tieren zu einer Verringerung des viszeralen Körperfetts (-20%, $p = 0,034$) und tendenziell (nicht statistisch signifikanten) verringerten Serumleptinspiegeln (-34%, $p = 0,092$) verglichen mit der Vergleichsgruppe ohne Isoflavone.

Durch die kurzzeitige Gabe von Isoflavonen zeigten sich dagegen keine Unterschiede in den untersuchten Parametern verglichen zur ovariektomierten Gruppe ohne Isoflavongabe. An Hand der Korrelationsanalysen von Leptinspiegeln und der viszeralen Fettmasse bzw. der durchschnittlichen Adipozytengröße konnte gezeigt werden, dass die Leptinspiegel jeweils mit der viszeralen Fettmasse sowie mit der Adipozytengröße ansteigen (Abbildung 3.5 E und F).

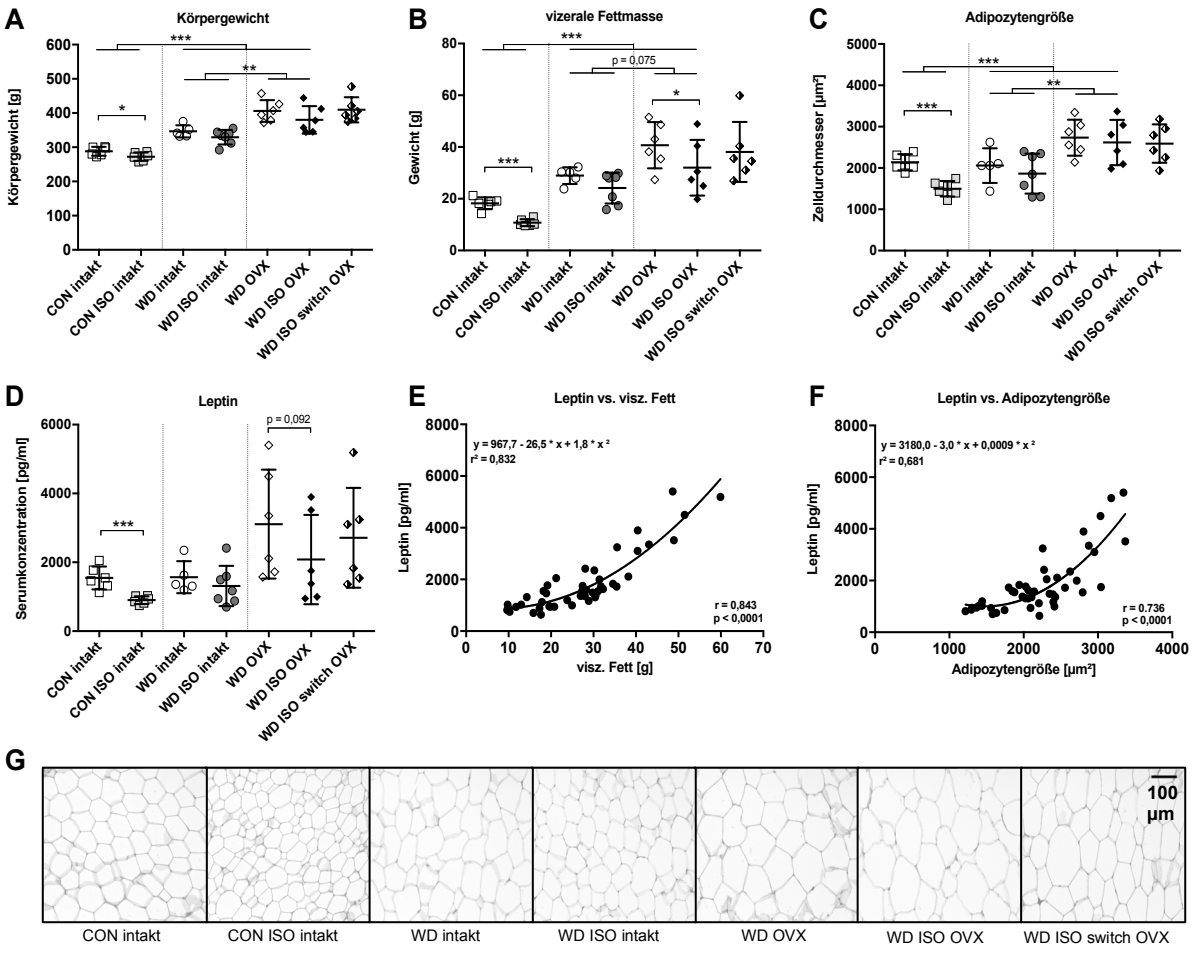

Abbildung 3.5 Effekte einer isoflavonreichen Ernährung auf Körpergewicht (A), viszerale Fettmasse (B), Adipozytengröße (C), Leptinspiegel (D), Korrelation zwischen Leptin und viszeralem Fett (E) sowie Leptin und Adipozytengröße (E) sowie repräsentative Aufnahmen von Adipozyten der verschiedenen Behandlungsgruppen (G). Streudiagramme zeigen Mittelwerte ± Standardabweichung (SD). (*) kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mit: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$. Korrelationsanalysen (E, F) erfolgten polynominal (2. Grades). Die Geradengleichung sowie das Bestimmtheitsmaß (r^2) sind jeweils in der oben linken Ecke de Graphen angegeben. Die statistische Analyse erfolgte über die Rangkorrelationsanalyse nach Spearman. Spearmans´s rho (r) und p-Werte sind jeweils in der unteren rechten Ecke des Graphen angegeben.

3.1.6 T4-Spiegel im Serum

Da Isoflavone unter Verdacht stehen, die Schilddrüsenfunktion im weiblichen Organismus zu beeinträchtigen, wurden zusätzlich die T4 Konzentration im Serum der weiblichen Ratten bestimmt. Die Ergebnisse zeigen eine Reduktion ($p = 0,027$) der T4 Serumkonzentration in den WD Gruppen im Vergleich zu den Kontrollfuttergruppen (Abbildung 3.6). Durch die Ovariektomie wurde gegenüber den intakten WD Tieren die Reduktion der T4-Spiegel nochmals verstärkt ($p = 0,024$), wohingegen die Isoflavonexposition das Absinken in den ovariektomierten Gruppen verhindern konnte ($p = 0,045$).

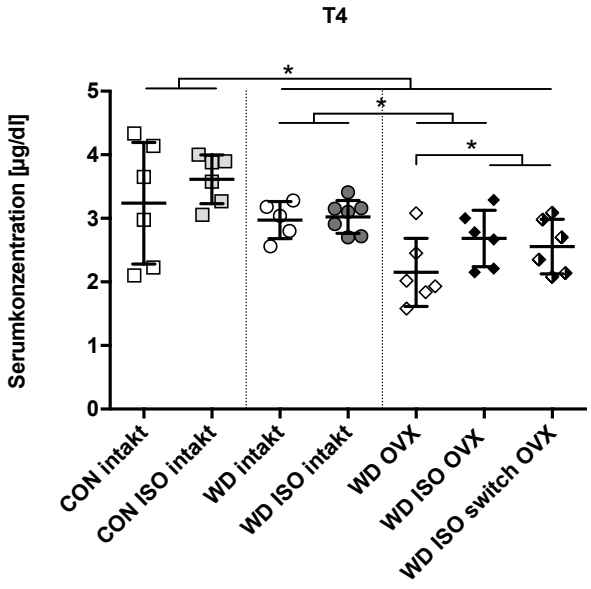

Abbildung 3.6 T4 Serumspiegel weiblicher Ratten zum Zeitpunkt der Sektion. Streudiagramme zeigen Mittelwerte ± Standardabweichung (SD). * kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede mit * $p < 0,05$.

3.1.7 Muskel- und Knochengewichte

Um Hinweise auf Unterschiede in der Körperkomposition zu ermitteln, wurden die Gewichte von *M. soleus* und *M. gastrocnemius* (Abbildung 3.7) als Indikatoren für Effekte auf die Muskelmasse herangezogen. Zusätzlich wurde das Gewicht des Tibia Knochens bestimmt, um etwaige Effekte auf die Knochenmasse zu detektieren.

Das WD Futter führte zu statistisch signifikant erhöhten Muskelgewichten im *M. soleus* (+31%, $p < 0,0001$) und *M. gastrocnemius* (+20%, $p < 0,0001$) in den intakten und ovariektomierten Gruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Innerhalb der ovariektomierten Gruppen waren die *M. soleus* Gewichte der mit Isoflavonen exponierten Gruppen gegenüber der Gruppe ohne Isoflavonexposition erhöht (+20%, $p < 0,0001$).

Ovariektomierte Tiere der WD Gruppen zeigten gegenüber den intakten Tieren der WD Gruppe erhöhte *M. gastrocnemius* Gewichte (+11%, $p < 0,0001$). Innerhalb der ovariektomierten Gruppen war der *M. gastrocnemius* in Tieren, die erst spät mit Isoflavonen exponiert wurden gegenüber den kontinuierlich exponierten Tieren erhöht (+7%, $p = 0,004$).

Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede im Knochengewicht des *O. tibia* festgestellt werden. Dennoch zeigt sich, dass es in Tieren der WD Gruppe eine Tendenz zu leicht erhöhten Gewichten des Tibia Knochens gibt.

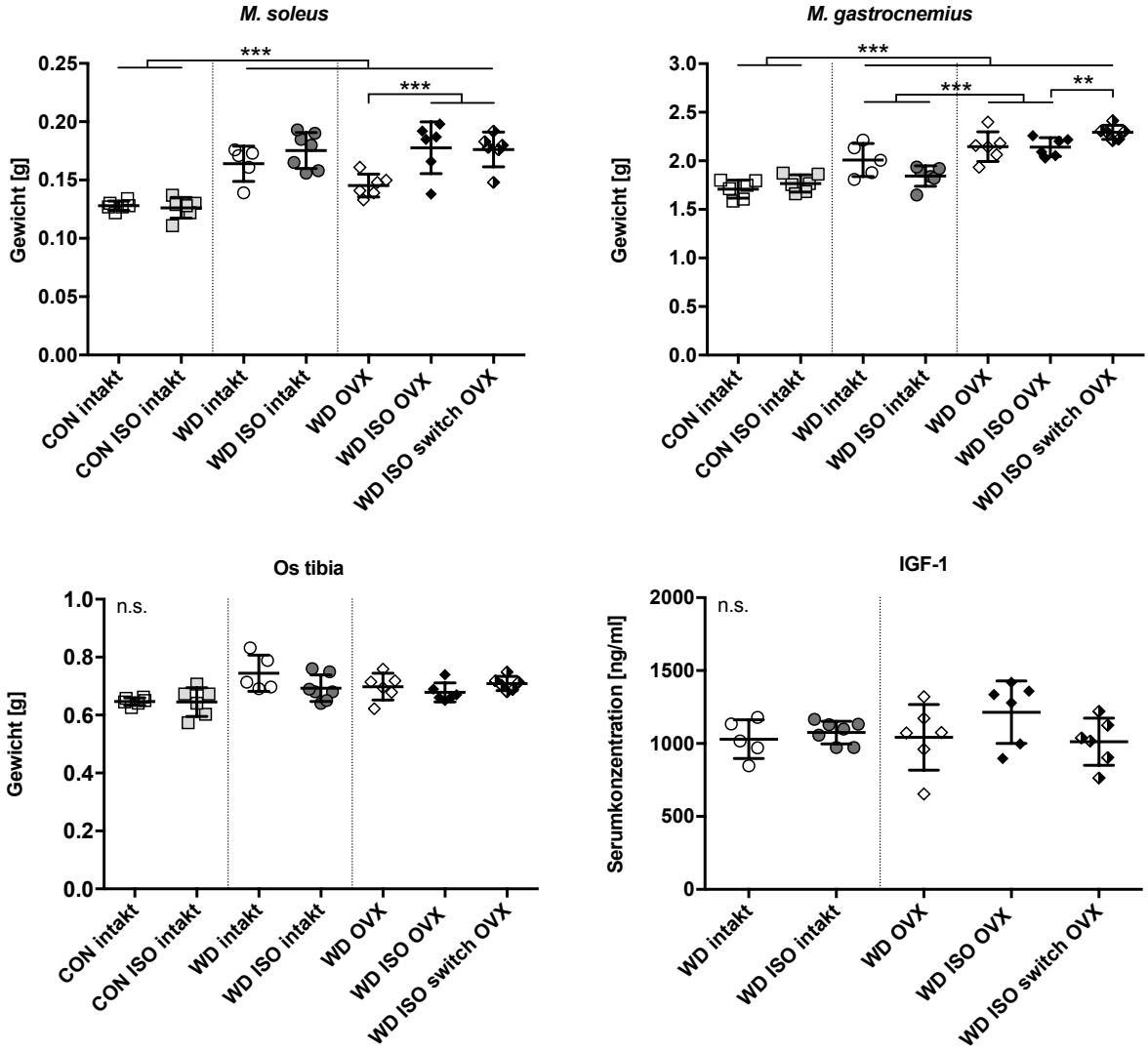

Abbildung 3.7 Absolute Muskelgewichte von *M. soleus* und *M. gastrocnemius* und das Knochengewicht von *O. tibia* in CON und WD Gruppen sowie IGF-1 Serumspiegel in WD Gruppen der Weibchen. Streudiagramme zeigen Mittelwerte ± Standardabweichung (SD). (*) kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mit * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ und ***$p < 0,001$; n.s. = nicht signifikant ($p > 0,05$)

Da Effekte auf die Muskelmasse oft mit einer veränderten metabolischen Aktivität einhergehen, wurde zusätzlich der Wachstumsfaktor IGF-1 im Serum der WD Gruppen bestimmt. Hier zeigten sich weder in den intakten noch in den ovariektomierten Tieren statistisch signifikante Unterschiede durch die Isoflavongabe.

3.1.8 Uterusgewicht

Der Uterus ist ein primäres Zielorgan für endogene und exogen zugeführte Estrogene. Er reagiert auf Estrogene zunächst mit einer Zunahme des Gewichts durch vermehrte Wassereinlagerung und langfristig durch Zellproliferation des Uterusepithels (Groothuis et al. 2007). Damit ist das Uterusfeuchtgewicht ein wichtiger Parameter zur Evaluierung des estrogenen Potentials einer Substanz und wird auch in *in vivo* Screening-assays wie dem Uterotrophen Assay bestimmt.

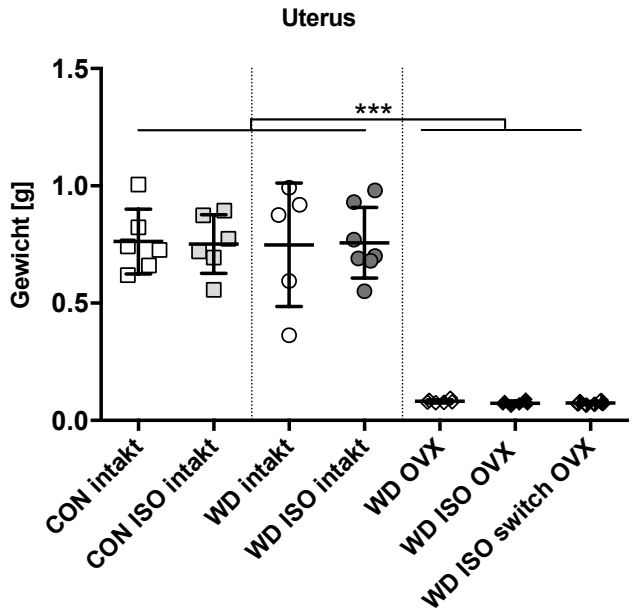

Abbildung 3.8 Absolutes Uterusgewicht weiblicher Ratten. Das Streudiagramm zeigt Mittelwerte ± Standardabweichung (SD). (*) kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mit ***p < 0,001.

Wie erwartet zeigten ovariektomierte Tiere gegenüber den intakten Tieren statistisch signifikant verringerte absolute Uterusgewichte von bis zu 93% (p < 0,001; Abbildung 3.8). Die Isoflavongabe zeigte weder in den intakten noch in den ovariektomierten Gruppen Effekte auf die Uterusfeuchtgewichte.

3.1.9 Serumlipide

Lediglich in ovariektomierten, aber nicht in intakten Tieren, konnte ein Anstieg an Gesamtcholesterin (p << 0,001), HDL (p << 0,001) und LDL (p << 0,001) im Serum der WD Futtergruppen im Vergleich zur Kontrollfuttergruppe beobachtet werden, wohingegen die Triglyzeridspiegel von der Ovariektomie unbeeinflusst blieben (Abbildung 3.9). Isoflavone hatten keinen Einfluss auf die Blutlipide.

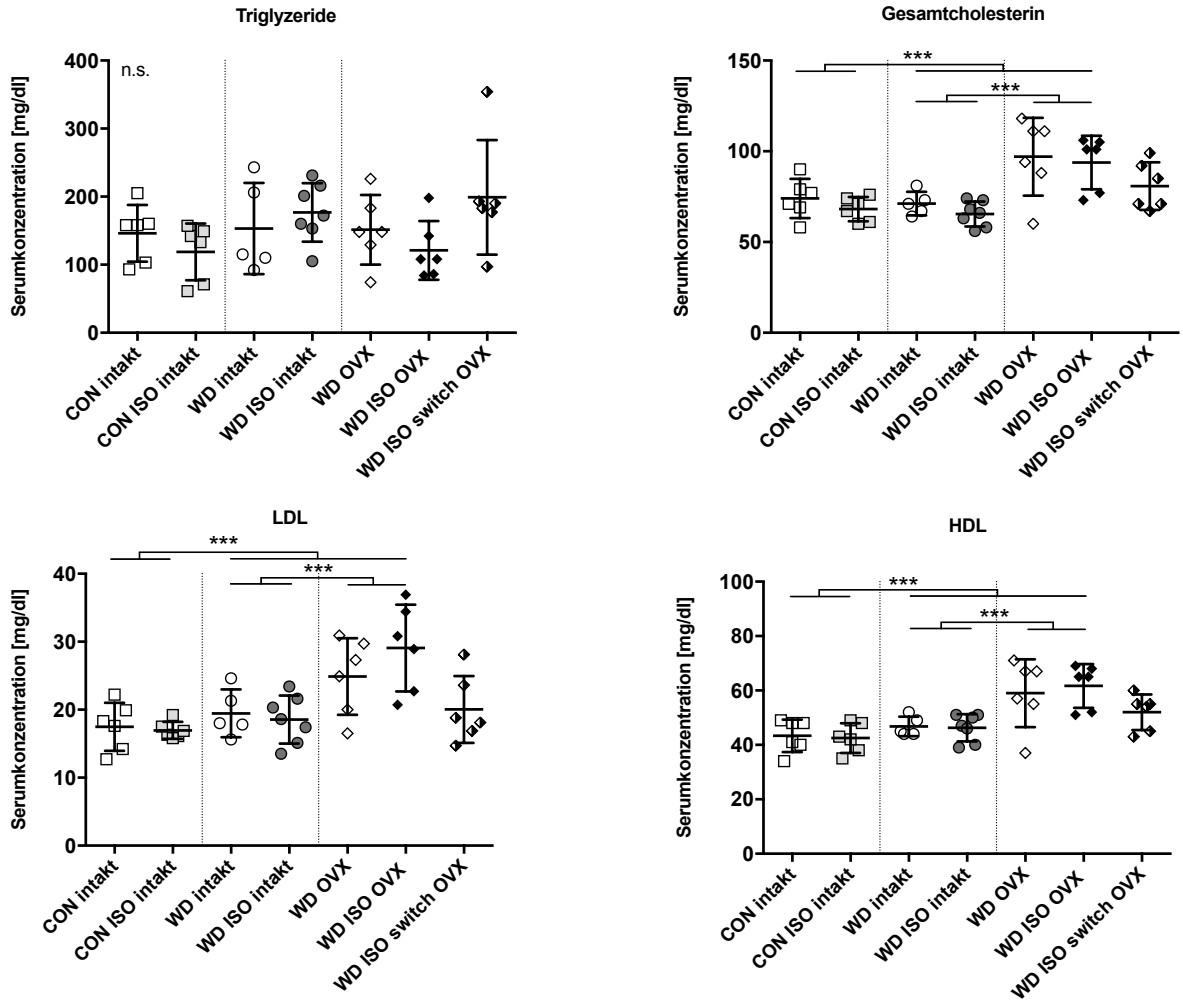

Abbildung 3.9 Serumlipide weiblicher Ratten am Ende des Versuchs (PND 170). Streudiagramme zeigen Mittelwerte ± Standardabweichung (SD). (*) kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede mit *** $p < 0{,}001$; n.s. = nicht signifikant ($p > 0{,}05$)

3.1.10 Genexpressionsanalysen verschiedener Markergene des Fettstoffwechsels in Leber- und Fettgewebe

Übergewicht in Folge einer fett- und kohlenhydrathaltigen Ernährung geht mit veränderten Prozessen im Leber- und Fettgewebe einher. Darunter zählen vor allem die Lipogenese, Fettsäureoxidation und Fettgewebsspeicherung. Um Effekte der Isoflavone auf diese Vorgänge näher zu beleuchten, wurden Genexpressionsanalysen auf mRNA Ebene zu ausgewählten Markergenen im Leber- und Fettgewebe der weiblichen Ratten durchgeführt (Abbildung 3.10). SREBP 1c ist ein Transkriptionsfaktor der hauptsächlich in der Leber, aber auch im weißen Fettgewebe die Transkription von Genen reguliert, die für die *de novo* Lipogenese aus Glucose verantwortlich sind. Die Induktion der Transkription von SREBP 1c erfolgt hauptsächlich durch Insulin, kann aber auch durch den Leber-X-Rezeptor erfolgen

(Ferré und Foufelle 2007). Weiterhin spielt es eine Rolle bei der Adipozytendifferenzierung (J. B. Kim und Spiegelman 1996).

Während in der Leber die Expression von SREBP 1c in den intakten und ovariektomierten Tieren der WD Gruppe verglichen mit den Kontrollfuttergruppen kaum verändert war (Abbildung 3.10 A), war im Fettgewebe eine Reduktion der Expression in intakten Tieren unter WD Futter zu beobachten (Abbildung 3.10 B). Im Gegensatz dazu sind die SREBP 1c Expressionsspiegel der ovariektomierten Tiere trotz des WD Futters auf ähnlichem Niveau wie die der Kontrollfuttergruppe.

Innerhalb der Kontrollfuttergruppen waren Isoflavone in der Lage die SREBP 1c Genexpression in der Leber statistisch signifikant zu senken. Im Fettgewebe erfolgte mit Isoflavonen eine leichte Steigerung der Genexpression innerhalb der Kontrollfuttergruppen. In den ovariektomierten Gruppen konnte eine kurzzeitige Isoflavongabe (ISO switch) die SREBP 1c Genexpression leicht senken.

Eines der Zielgene von SREBP 1c ist FAS, ein Schlüsselenzym in der Fettsäuresynthese. In der Leber folgt die Genexpression von FAS keinem deutlichen Muster (Abbildung 3.10 C). Es zeigt sich eine leicht verminderte Expression in intakten Tieren der WD Gruppen. Isoflavone führten in ovariektomierten Tieren zu einer verringerten Expression von FAS in der Leber. Im Fettgewebe dagegen sind die Expressionsspiegel unabhängig vom Futter oder der Behandlung auf einem ähnlichen Niveau (Abbildung 3.10 D). Lediglich in den intakten Kontrollfuttergruppen zeigte sich mit Isoflavonen eine statistisch signifikante Steigerung der Genexpression um den Faktor 5. In den ovariektomierten WD Gruppen zeigte sich eine leichte Verringerung der FAS Genexpression bei kurzzeitiger Isoflavongabe (ISO switch) im Vergleich zur langzeitexponierten Gruppe.

ACC ist ein wichtiges Enzym, das an der Fettsäuresynthese in Leber und Fettgewebe beteiligt ist und ebenfalls über SREBP 1c reguliert wird. Sowohl in der Leber als auch im Fettgewebe zeigte sich eine verminderte Genexpression an ACC in intakten Tieren der WD Gruppe gegenüber der Kontrollfuttergruppe (Abbildung 3.10 E und F). In der Leber konnte durch die Exposition mit Isoflavonen die Genexpression in Tieren der Kontrollfuttergruppe herabreguliert werden (Abbildung 3.10 E). In intakten Tieren der WD Gruppe zeigte sich ein gegenteiliger Effekt. Hier liegt die Genexpression mit Isoflavonen höher als ohne. In ovariektomierten Gruppen war keine Regulation durch Isoflavone erkennbar.

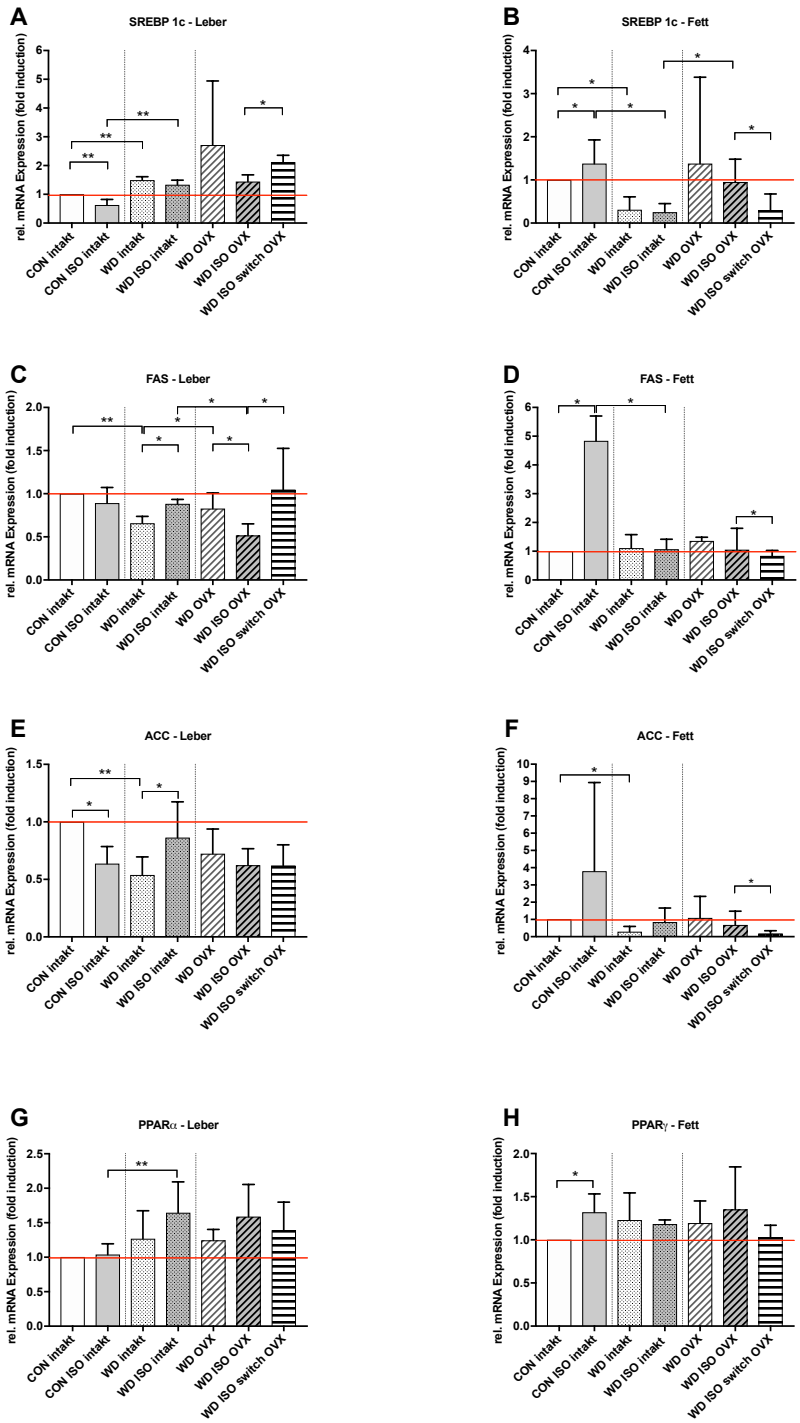

Abbildung 3.10 Relative mRNA Expression von SREBP 1c, FAS, ACC, PPARα bzw. γ in jeweils Leber und Fettgewebe weiblicher Ratten. Die mRNA Spiegel wurden jeweils auf ein unreguliertes Haushaltsgen (Leber: 1A; Fettgewebe: HPRT 1) normalisiert und sind relativ zur Kontrollgruppe (horizontale Linie) angegeben. Balken zeigen Mittelwerte ± 95% Konfidenzintervall. (*) kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mit * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$.

Im Fettgewebe ist die Genexpression von ACC in den intakten Kontrollfuttergruppen ähnlich wie bei FAS durch Isoflavone tendenziell hochreguliert (Abbildung 3.10 F). Durch die hohe Streuung konnte hier jedoch keine statistische Signifikanz erreicht werden. Ähnlich wie bei FAS weist die ovariektomierte Gruppe, die kurzzeitig mit Isoflavonen exponiert wurde niedrigere Expressionsspiegel auf, als die der kontinuierlich exponierten Tiere.

Ein weiterer untersuchter Marker waren Transkriptionsfaktoren der PPAR Familie, die eine Vielzahl an lipogener Gene regulieren. PPARα wird vornehmlich in der Leber exprimiert und reguliert die Expression von Genen, die bei der β-Oxidation von Fettsäuren und beim Metabolismus von Lipoproteinen eine Rolle spielen. Damit wirkt es hauptsächlich auf die Blutlipide. PPARγ dagegen wird hauptsächlich im Fettgewebe exprimiert, wo es die Aufnahme freier Fettsäuren steuert und auf die Differenzierung von Adipozyten und Makrophagen wirkt. Zudem wirkt PPARγ auf den Glucosestoffwechsel und kann die Insulinsensitivität beeinflussen (R. M. Evans et al. 2004).

In der Leber intakter WD Gruppen zeigte sich eine leichte Steigerung der PPARα Genexpression im Vergleich zu den Kontrollfuttergruppen (Abbildung 3.10 G). Die zusätzliche Ovariektomie zeigte keine Effekte. Tendenzen zu einer leicht erhöhten Genexpression von PPARα deuteten sich in den isoflavonexponierten WD Gruppen an. Diese Unterschiede gegenüber der Vergleichsgruppe ohne Isoflavone waren jedoch nicht statistisch signifikant.

Im Fettgewebe war die PPARγ Expression innerhalb der Kontrollfuttergruppen durch die Isoflavongabe leicht erhöht (Abbildung 3.10 H), wobei die Expression auf ähnlichem Niveau lag, wie das der WD Gruppen. Es zeigten sich keine weiteren Unterschiede zwischen den verschiedenen Futter- oder Behandlungsgruppen.

3.1.11 Genexpressionsanalysen inflammationsassoziierter Markergene im Fettgewebe

Im Fettgewebe wurden zusätzlich Marker untersucht, die in Inflammationsprozesse involviert sind. Dazu gehören die Zytokine IL6 und IL10 sowie MCP1, ein Marker, der eine potentielle Makrophageninfiltration im Gewebe anzeigt (Abbildung 3.11).

Die IL6 Expression war in WD Gruppen verglichen mit den Kontrollgruppen leicht gesteigert. Dieser Effekt konnte bei zusätzlicher Ovariektomie verglichen mit den intakten WD Gruppen nochmals verstärkt werden.

Die Genexpression des antiinflammatorisch wirkenden IL10 war im Gegensatz dazu in den intakten WD Tieren gegenüber den Kontrollfuttergruppen statistisch signifikant reduziert. Bei zusätzlicher Ovariektomie konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden.

Die Genexpression von IL6 und MCP1 konnte durch Isoflavone innerhalb der intakten Kontrollfuttergruppe als auch innerhalb der intakten WD Gruppen reduziert werden. Bei IL10

zeigt sich eine reduzierte Genexpression durch Isoflavongabe in den Kontrollfuttergruppen. Eine kontinuierliche Isoflavongabe konnte dagegen die IL10 Expression in ovariektomierten Tieren gegenüber der isoflavonfreien Vergleichsgruppe steigern, wobei die kurzzeitige Isoflavongabe zu einer reduzierten Genexpression gegenüber der isoflavonfreien ovariektomierten Gruppe führte.

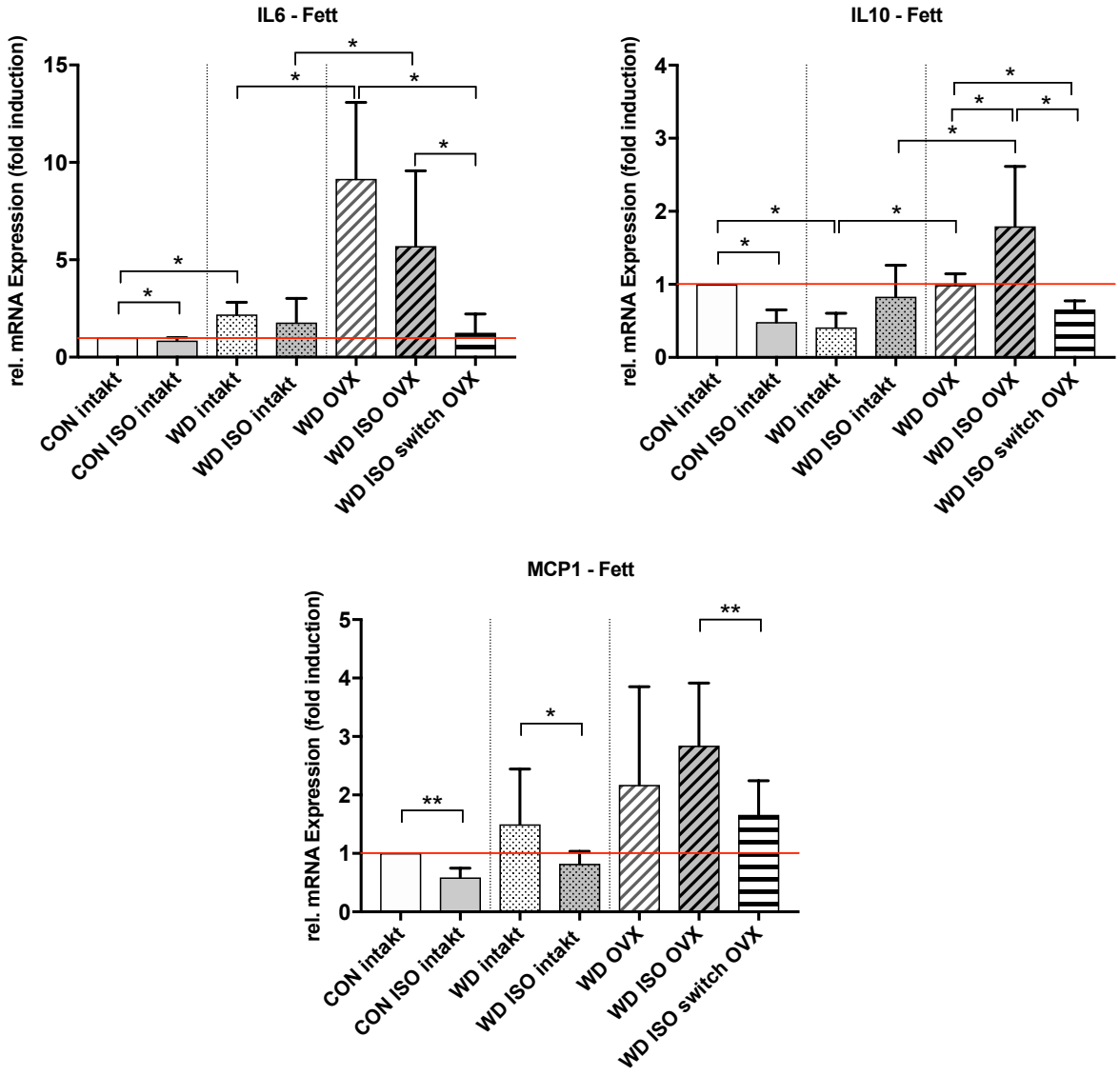

Abbildung 3.11 Relative mRNA Expression der Entzündungsmarker IL6, IL10 und MCP1 im Fettgewebe weiblicher Ratten. Die mRNA Spiegel wurden auf ein unreguliertes Haushaltsgen (HPRT 1) normalisiert und sind relativ zur Kontrollgruppe (horizontale Linie) angegeben. Balken zeigen Mittelwerte ± 95% Konfidenzintervall. (*) kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mit * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$.

3.2 Effekte von Isoflavonen in männlichen Wistar Ratten

3.2.1 Tägliche Futteraufnahmemenge und Energieaufnahme

In Abbildung 3.12 sind die tägliche Futteraufnahmemenge und die Energieaufnahme über das Futter dargestellt. Zwischen PND 28 und PND 50 (Adoleszenzphase) zeigte sich eine deutliche Steigerung der Futteraufnahmemenge, die unabhängig vom Isoflavonzusatz im Futter war. Zwischen PND 50 und PND 85 stagnierte die Futteraufnahmemenge bei ca. 28 - 30 g/Tag. In den Tagen nach der Umstellung auf das WD Futter (PND 87) war ein deutlicher Abfall (-30%) der Futteraufnahmemenge in den entsprechenden Gruppen zu beobachten, wohingegen die der Kontrollfuttergruppen bis auf leichte tagesabhängige Schwankungen unverändert blieben.

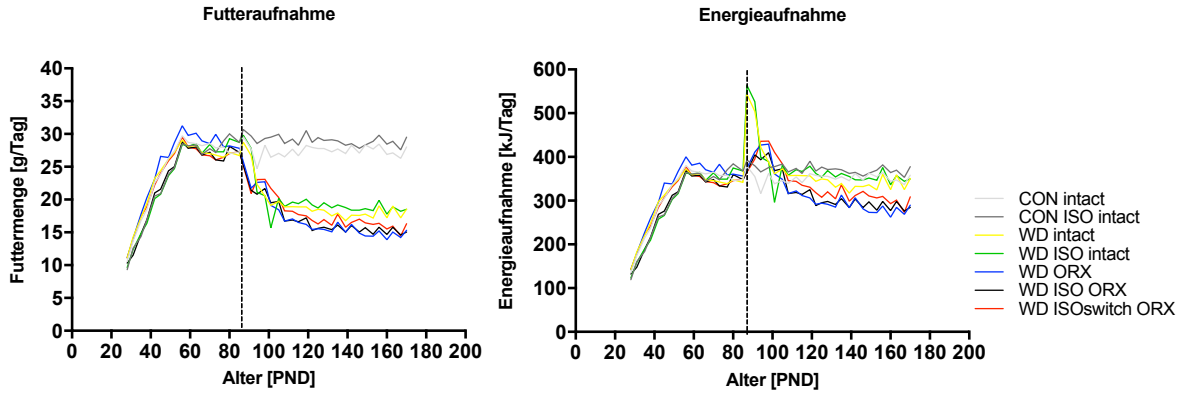

Abbildung 3.12 Futter- und Energieaufnahme der männlichen Ratten gemessen über die gesamte Versuchsdauer. Die Graphen zeigen die gemittelte tägliche Futter- bzw. Energieaufnahme in Abhängigkeit vom Alter (PND) der Tiere. Die gestrichelte vertikale Linie markiert den Zeitpunkt der Umstellung auf das WD Futter in den entsprechenden Gruppen.

Zwischen PND 100 und PND 170 pendelten sich die Aufnahmemengen in den WD Futtergruppen auf ca. 18 g/Tag in den intakten Tieren ein, wohingegen die orchiektomierten Tiere mit um die 15 g/Tag leicht darunter lagen. Dabei hatte der Zusatz von Isoflavonen im Futter weder in den Kontrollfuttergruppen noch in den WD Futtergruppen Einfluss auf die durchschnittliche Futteraufnahmemenge und deutet damit auf eine gute Palatabilität des Isoflavonfutters.

Betrachtet man die tägliche Energieaufnahme, so zeigte sich durch die Umstellung auf das WD Futter ein starker Anstieg (+36%) in den intakten Tieren um PND 87. Parallel zur Futteraufnahmemenge sank anschließend jedoch auch die Energieaufnahme in entsprechenden Gruppen innerhalb einer Woche auf das gleiche Niveau (ca. 400 KJ/Tag) wie das der Kontrollfuttergruppen. Da der Futterkonsum kurz nach der Orchiektomie

aufgrund des Zustandes der Tiere nach Narkose eingeschränkt war, fiel der Anstieg bei den ORX Tieren zunächst für wenige Tage schwächer aus. Zwischen PND 100 und PND 170 pendelte sich die Energieaufnahme bei den intakten Tieren auf ca. 330 – 370 KJ/Tag ein, wohingegen die orchiektomierten Tiere mit ca. 270 – 300 KJ/Tag deutlich darunter lagen. Auch hier ist zeigt der Isoflavonzusatz im Futter keinen Einfluss auf die Energieaufnahme.

3.2.2 Isoflavonaufnahme aus dem Futter

Kurz nach der Umstellung auf das WD Futter an PND 85 betrugen die errechneten Isoflavonaufnahmemengen in der intakten Kontrollfuttergruppe 36 mg/kg KGW, in der intakten WD Gruppe 32 mg/kg KGW, in der ovariektomierten WD Gruppe 27 mg/kg KGW und in der spätexponierten WD Gruppe 26 mg/kg KGW/Tag. Gegen Ende des Experiments (PND 170) zeigen alle Gruppen eine Verringerung der Aufnahme gegenüber der Ausgangsmessung. Vergleicht man die Aufnahmemengen am PND 170 untereinander, so zeigten Tiere der WD Gruppe mit 15 mg/kg KGW (WD ISO intakt) und 14 mg/kg KGW (WD ISO ORX und WD ISO switch ORX) eine um ca. 50% reduzierte Isoflavonaufnahme gegenüber der Kontrollfuttergruppe mit 28 mg/kg KGW. In den Isoflavonfreien Futtergruppen konnte keine Aufnahmemenge ermittelt werden, da die gemessenen Isoflavonkonzentrationen im Futter unter dem detektierbaren Schwellenwert (<LOD) lagen.

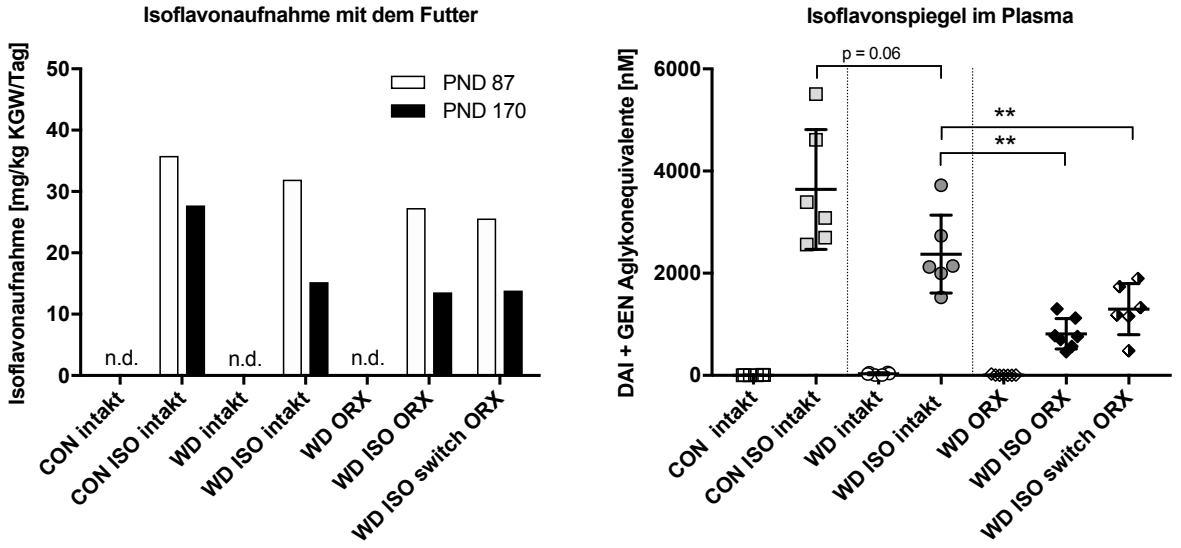

Abbildung 3.13 Berechnete Isoflavonaufnahme der Männchen an PND 87 und PND 170 sowie Isoflavonspiegel im Plasma zum Zeitpunkt der Sektion dargestellt als Summe der Daidzein (DAI) und Genistein (GEN) Aglykonäquivalente. Die Isoflavonaufnahme wurde auf Basis der durchschnittlichen Futteraufnahme sowie des Körpergewichts am entsprechen postnatalen Tag (PND) berechnet. Das Balkendiagramm zeigt Mittelwerte, das Streudiagramm zeigt Mittelwerte ± Standardabweichung (SD). (*) kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mit: ** $p < 0,01$; n.d. = nicht detektiert (<LOD)

Die berechneten Aufnahmemengen an Isoflavonen korrelierten mit den tatsächlich gemessenen Isoflavonspiegeln im Blutplasma der Tiere, die am Tag der Sektion (ca. PND 173) gemessen wurden (Abbildung 3.13).

In den intakten Tieren der Kontrollgruppe mit Isoflavonzugabe betrugen die gemessenen mittleren Plasmaspiegel an Isoflavonen 3641 ± 1172 nM, wohingegen in der WD Gruppe mit Isoflavonzugabe 2374 ± 764 nM (-35%, p = 0,06) gemessen wurden. Orchiektomierte Tiere zeigten gegenüber den intakten Tieren der WD Gruppe statistisch signifikant reduzierte Plasmaspiegel von 814 ± 298 nM (-66%, p = 0,001). Die kurzzeitige Exposition mit Isoflavonen von PND 87 bis PND 173 führte zu Plasmaspiegeln von 1298 ± 500 nM (-45%, p = 0,09). Tiere der Futtergruppen ohne Isoflavonzugabe zeigten wie erwartet geringe Isoflavonspiegel von unter 50 nM.

3.2.3 ISO-Metabolitenspektrum im Plasma

In Tabelle 3.2 ist das Metabolitenspektrum der Isoflavone im Plasma der männlichen Ratten aufgeführt. Zur übersichtlicheren Darstellung sind die Anteile der jeweiligen GEN und DAI Phase-II-Metabolite am Gesamtspektrum zusätzlich als Kreisdiagramm dargestellt (Abbildung 3.14).

In Analysen zum Metabolitenspektrum im Plasma der Männchen konnte der bakterielle Metabolit Equol sowohl in glucuronidierter Form (Equol-7-Glc) in Konzentrationen von 65 – 141 nM, als auch in geringen Mengen (<5 nM) in sulfatierter Form (Equol-4'-S) detektiert werden (Tabelle 3.2). Bis auf die intakte Kontrollfuttergruppe konnte in nahezu allen Gruppen eine geringe Konzentration an ODMA von 1,6 nM detektiert werden.

Des Weiteren zeigte sich im Phase-II-Metabolitenspektrum von GEN und DAI ein deutlich geringerer Anteil an freien Aglykonen (<2%) verglichen mit den konjugierten ISO-Metaboliten (Tabelle 3.2). In intakten Männchen betrug der Anteil freier Aglykone an GEN- bzw. DAI-Aglykonäquivalenten 0,3 – 0,4% für GEN und 0,7 – 0,8% für DAI. In orchiektomierten Tieren lag der Anteil an freien Aglykonen dagegen bei 0,8 - 1% für GEN und 1,2 - 1,4% für DAI.

Zwischen intakten und orchiektomierten Tieren zeigte sich ein deutlicher Unterschied im Phase-II-Metabolitenprofil von DAI bzw. GEN. Auffällig war vor allem eine Verschiebung der Anteile an Konjugaten an den jeweiligen Gesamt-Aglykonäquivalenten.

Tabelle 3.2 Plasmakonzentrationen von Isoflavonmetaboliten in den männlichen Ratten der Isoflavon-Gruppen (ISO). Mittelwert ± SD [nM]

Analyte	CON ISO intakt (n=6)	WD ISO intakt (n=6)	WD ISO ORX (n=7)	WD ISO switch ORX (n=6)
Aglykon-äquivalente (DAI+GEN)	3641,2 ± 1171,7	2374,2 ± 763,6	813,7 ± 297,9	1297,8 ± 500
GEN	7,7 ± 6,0	2,9 ± 1,1	2,5 ± 1,4	4,8 ± 3,5
GEN-4'-GlcA	n.d. (11,6; n=2)	n.d.	n.d.	n.d. (11,6; n=1)
GEN-7-GlcA	361,9 ± 132,0	118,1 ± 37,1	187,1 ± 68,9	236,6 ± 99,6
GEN-4'-S	8,6 ± 6,5	4,8 ± 2,1	n.d. (1,7; n=1)	1,7 ± 1,9
GEN-7-S	5,0 ± 4,2	2,5 ± 1,6	n.d. (1,3; n=2)	1,8 ± 2,0
GEN-7,4'-DS	260,4 ± 218,7	143,7 ± 71,7	18,1 ± 7,3	59,0 ± 46,2
GEN-7-GlcA-4'-S	1212,8 ± 289,9	594,8 ± 185,4	115,2 ± 58,9	220,3 ± 112,7
GEN-4'-GlcA-7-S	8,7 ± 6,0	2,9 ± 1,2	n.d. (2,1; n=1)	1,1 ± 1,2
DAI	13,0 ± 7,1	11,4 ± 4,3	5,8 ± 2,4	10,1 ± 6,7
DAI-4'-GlcA	31,7 ± 9,6	10,8 ± 6,6	13,5 ± 4,7	16,7 ± 8,3
DAI-7-GlcA	231,3 ± 47,8	112,4 ± 30,7	192,9 ± 75,5	214,5 ± 82,1
DAI-4'-S	24,1 ± 12,7	26,0 ± 13,0	5,4 ± 1,4	10,3 ± 4,5
DAI-7-S	41,3 ± 24,2	41,3 ± 17,5	16,5 ± 5,4	27,5 ± 13,8
DAI-7,4'-DS	769,8 ± 404,1	847,2 ± 340,7	165,0 ± 64,1	342,6 ± 174,4
DAI-7-GlcA-4'-S	641,8 ± 87,8	444,6 ± 116,2	87,7 ± 51,2	144,4 ± 75,7
DAI-4'-GlcA-7-S	19,4 ± 5,4	11,0 ± 3,5	3,0 ± 1,0	4,5 ± 2,0
DH-GEN	n.d. (1,3; n=1)	n.d.	n.d.	n.d.
DH-DAI	n.d. (1,3; n=1)	1,3 ± 0,0	n.d. (1,3; n=1)	0,8 ± 0,6
ODMA	n.d. (1,5; n=1)	1,6 ± 0,9	1,6 ± 0,9	1,7 ± 2,1
6'OH-ODMA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Equol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Equol-7-GlcA	141,2 ± 23,6	65,0 ± 26,8	91,9 ± 32,5	106,3 ± 24,3
Equol-4'-S	3,9 ± 4,7	1,7 ± 1,0	0,6 ± 0,4	3,5 ± 4,1

n.d. = nicht detektiert (<LOD); DAI = Daidzein; DS = Disulfat; GEN =Genistein; GlcA = Glucuronid; S = Sulfat; DH = Dihydro; ODMA = O-Desmethylangolensin; Aglykonäquivalente (DAI+GEN) = Summe aus DAI und DAI Konjugaten sowie GEN und GEN Konjugaten. Für die Berechnung der Mittelwerte wurden Werte mit LOD> x <LOQ als LOQ/2 und n.d. als 0 gesetzt.

In intakten Tieren waren sulfatierte Metabolite wie DAI-7,4´-disulfat und DAI-7-glucuronid-4-sulfat, gefolgt von DAI-7-glucuronid vorherrschend. Für GEN waren die Hauptmetabolite in intakten Tieren GEN-7-glucuronid-4-sulfat und GEN-7-glucuronid, gefolgt von GEN-7,4´-disulfat. In orchiektomierten Tieren verschob sich das Metabolitenprofil. Verglichen zu intakten Tieren stieg der Anteil an unsulfatierten DAI- und GEN-Glucuroniden, wohingegen der Anteil an sulfatierten Metaboliten (Glucuronid-4-Sulfat und Disulfat) abnahm.

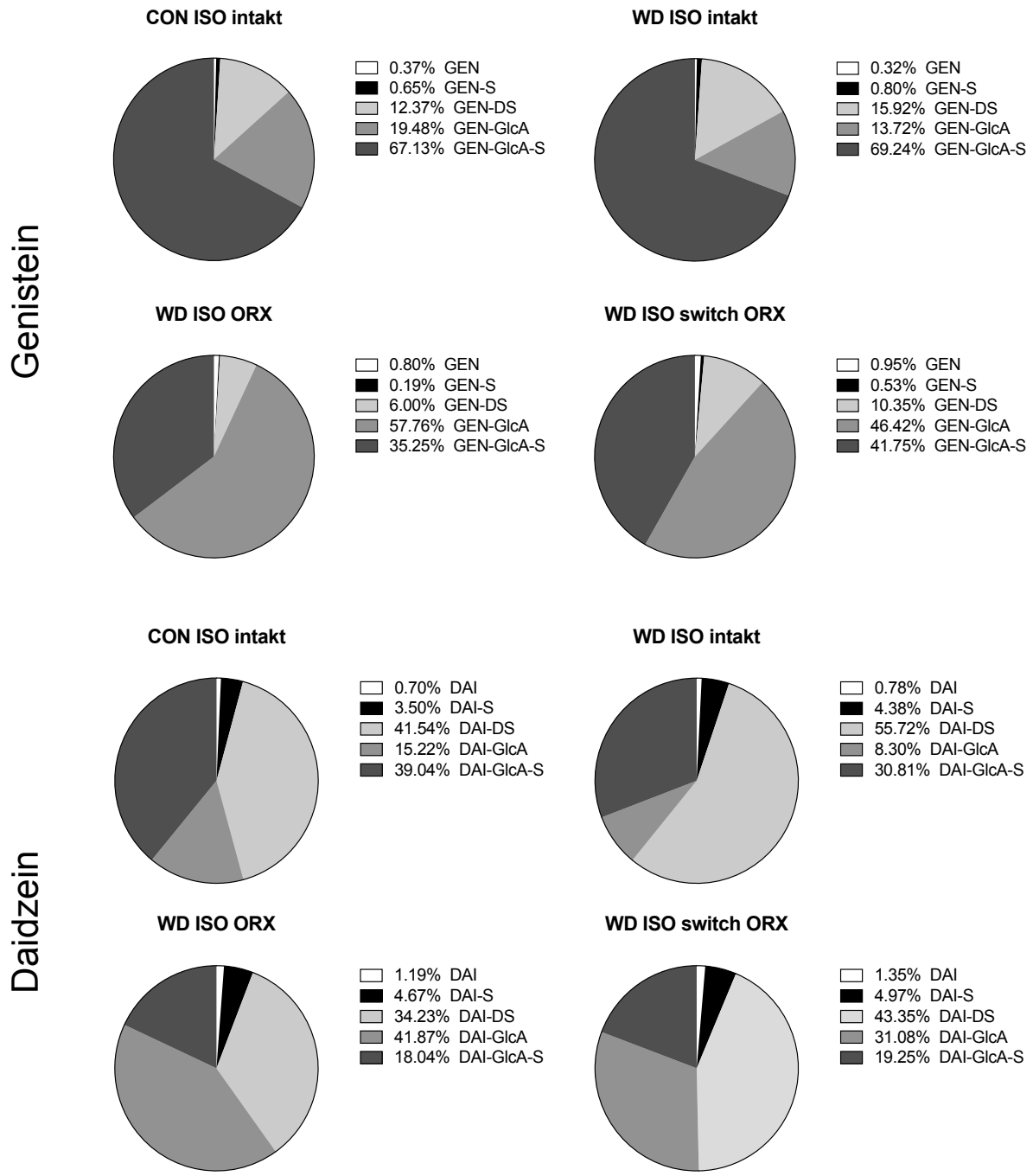

Abbildung 3.14 Phase-II-Metabolitenspektrum von Genistein und Daidzein im Plasma der Männchen (ISO Gruppen) dargestellt als Kreisdiagramm mit der prozentualen Verteilung der jeweiligen Metabolite. DAI = Daidzein; DS = Disulfat; GEN =Genistein; GlcA = Glucuronid; S = Sulfat

3.2.4 Körpergewichtsentwicklung und terminales Körpergewicht

Zwischen dem Abstillen und PND 83 gab es keine Unterschiede in der Körpergewichtsentwicklung zwischen den verschiedenen Gruppen (Abbildung 3.15). Orchiektomierte Tiere zeigten zum Zeitpunkt der ORX (PND 83) einen leichten Gewichtsabfall. Dieser konnte jedoch zeitnah wieder aufgeholt werden, so dass alle Gruppen bereits ab PND 100 wieder das gleiche Durchschnittsgewicht hatten. Am Ende des Experiments (Sektion an PND 173) konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede im terminalen Körpergewicht zwischen den Futter- und Behandlungsgruppen festgestellt werden.

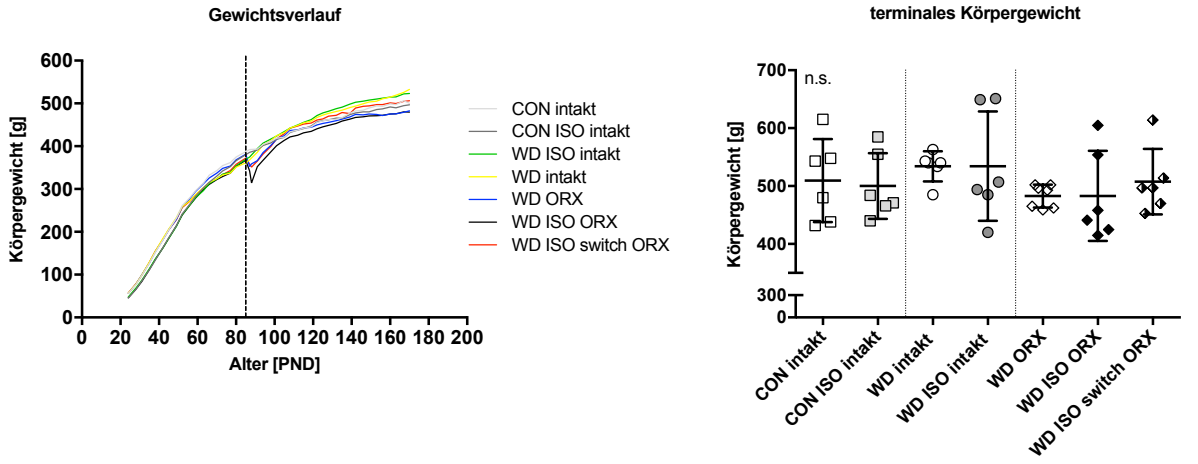

Abbildung 3.15 Körpergewichtsverläufe der männlichen Ratten vom Tag des Abstillens bis zum Ende des Versuchs und terminales Körpergewicht am Tag der Sektion (PND 173). Die gestrichelte vertikale Linie (im Gewichtsverlauf) markiert den Zeitpunkt der Umstellung auf das WD Futter in den entsprechenden Gruppen. Das Streudiagramm zeigt Mittelwerte ± Standardabweichung (SD). n.s. = nicht signifikant ($p > 0,05$)

3.2.5 Körpergewichtszunahme, viszerale Fettgewebsmasse, Adipozytengrößen und Leptinspiegel

Da das termina Körpergewicht keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen aufwies, wurde zusätzlich die Gewichtszunahme zwischen PND 80 (kurz vor der Orchiektomie und Umstellung auf das WD Futter in entsprechenden Gruppen) und PND 173 (Abbildung 3.16) analysiert. Hier zeigten intakte Tiere der WD Gruppe gegenüber den intakten Tieren der Kontrollfuttergruppe eine Gewichtszunahme von 35%. Insgesamt betrachtet nahmen die orchiektomierten Tiere im gleichen Zeitraum weniger an Gewicht zu als die intakten Tiere der WD Gruppe ($p = 0,001$). Orchiektomierte Tiere der WD Gruppe mit Isoflavonzugabe nahmen gegenüber den Tieren der Vergleichsgruppe ohne Isoflavonzugabe

14% mehr an Gewicht zu, wenn sie lebenslang mit Isoflavonen exponiert wurden. Orchiektomierte Tiere, die erst nach der Orchiektomie ab PND 87 mit Isoflavonen exponiert wurden, nahmen im Mittel sogar 31% mehr an Gewicht zu als die Vergleichsgruppe ohne Isoflavonzugabe (p = 0,06).

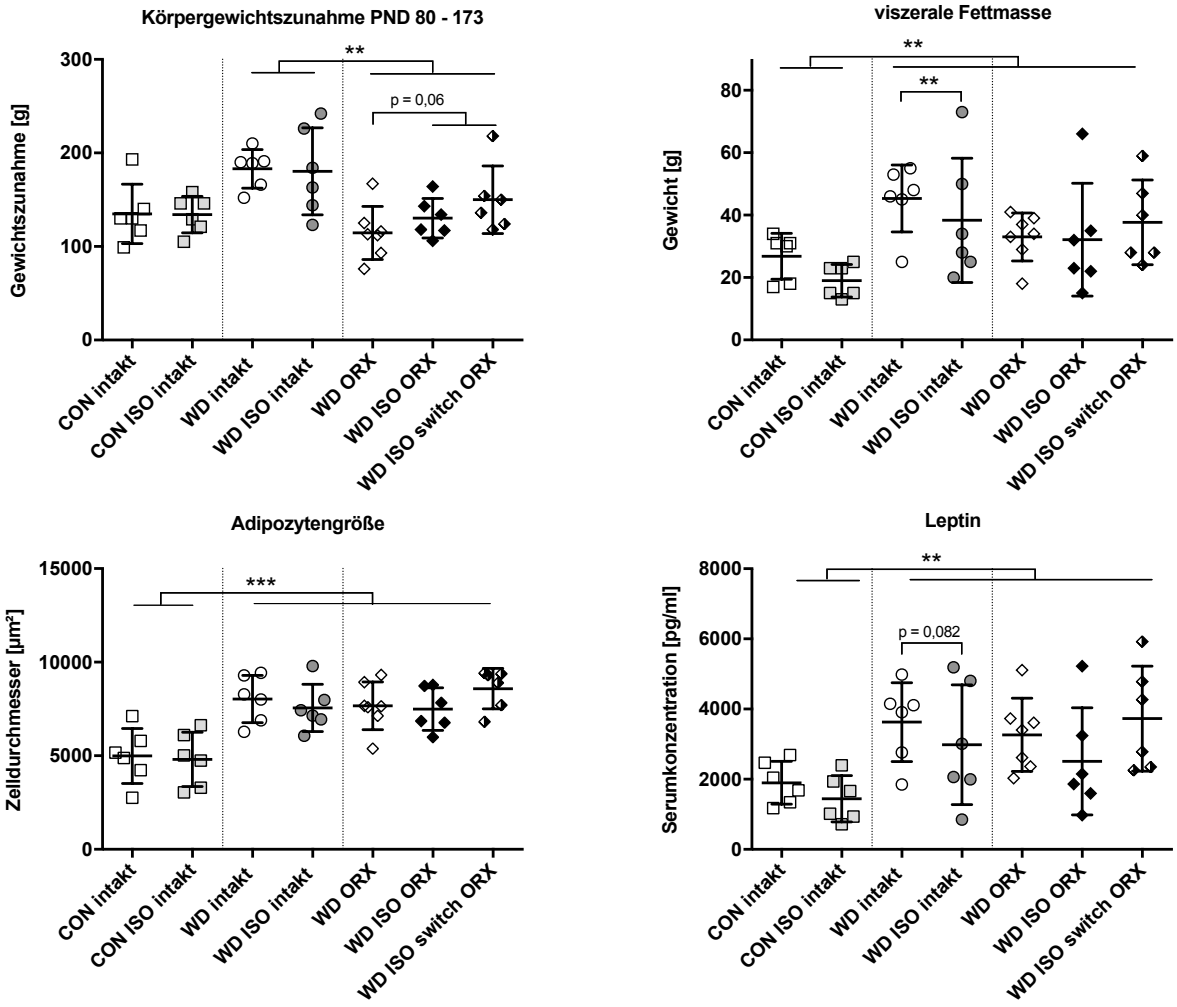

Abbildung 3.16 Körpergewichtszunahme zwischen PND 80 und PND 173 sowie viszerale Fettmasse, Adipozytengröße und Leptinspiegel in männlichen Ratten zum Zeitpunkt der Sektion. Streudiagramme zeigen Mittelwerte ± Standardabweichung (SD). (*) kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mit: ** p < 0,01 und *** p < 0,001.

Am Ende des Experiments (PND 173) zeigte sich in den Tieren der WD Gruppe eine um durchschnittlich 63% (p ≤ 0,001) erhöhte viszerale Fettgewebsmasse verglichen mit den Tieren der Kontrollfuttergruppe. In intakten Tieren der WD Gruppe zeigte sich mit Isoflavonzugabe eine leichte Reduktion der viszeralen Fettgewebsmasse um 15% (p = 0,004) verglichen mit isoflavonfrei aufgewachsenen Tieren. Innerhalb der orchiektomierten

Gruppen hingegen gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Gruppen mit und ohne Isoflavonzugabe.

Um detaillierte Einblicke in die Lipidspeicherung zu erlangen, erfolgte eine anschließende Analyse der Adipozytengrößen in histologischen Präparaten der perirenalen Körperfettdepots der Ratten. WD Tiere zeigten im Vergleich zu Tieren der Kontrollfuttergruppen eine Vergrößerung der Adipozyten um ca. 61% ($p < 0,001$), wohingegen die Orchiektomie und die Isoflavonexposition keinen Einfluss auf die Adipozytengrößen hatten.

Leptin, ein Zytokin, welches von Adipozyten sezerniert wird, war im Serum der WD Gruppen gegenüber den Kontrollfuttergruppe im Schnitt um ca. 93% ($p = 0,001$) erhöht. Eine zusätzliche Orchiektomie und Isoflavonzugabe hatten vergleichbar mit den Adipozytengrößen zwar keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Leptinspiegel im Serum, dennoch zeigte sich in intakten WD Tieren trotz hoher Streuung der Messwerte eine leichte Tendenz ($p = 0,082$) zu verminderten Leptinspiegeln, die analog zu Effekten in der viszeralen Fettmasse zu sein scheint.

3.2.6 Muskel- und Knochengewichte

Weder das WD Futter noch die Isoflavongabe zeigten Auswirkungen auf die Muskelgewichte von *M. soleus, M. gastrocnemius und M. levator ani* sowie auf das Knochengewicht von *O. tibia* (Abbildung 3.17). Verglichen mit den intakten Gruppen zeigten die ovariektomierten Gruppen eine statistisch signifikante Verringerung der absoluten Gewichte des androgensensitiven *M. levator ani* um ca. 62% ($p < 0,001$).

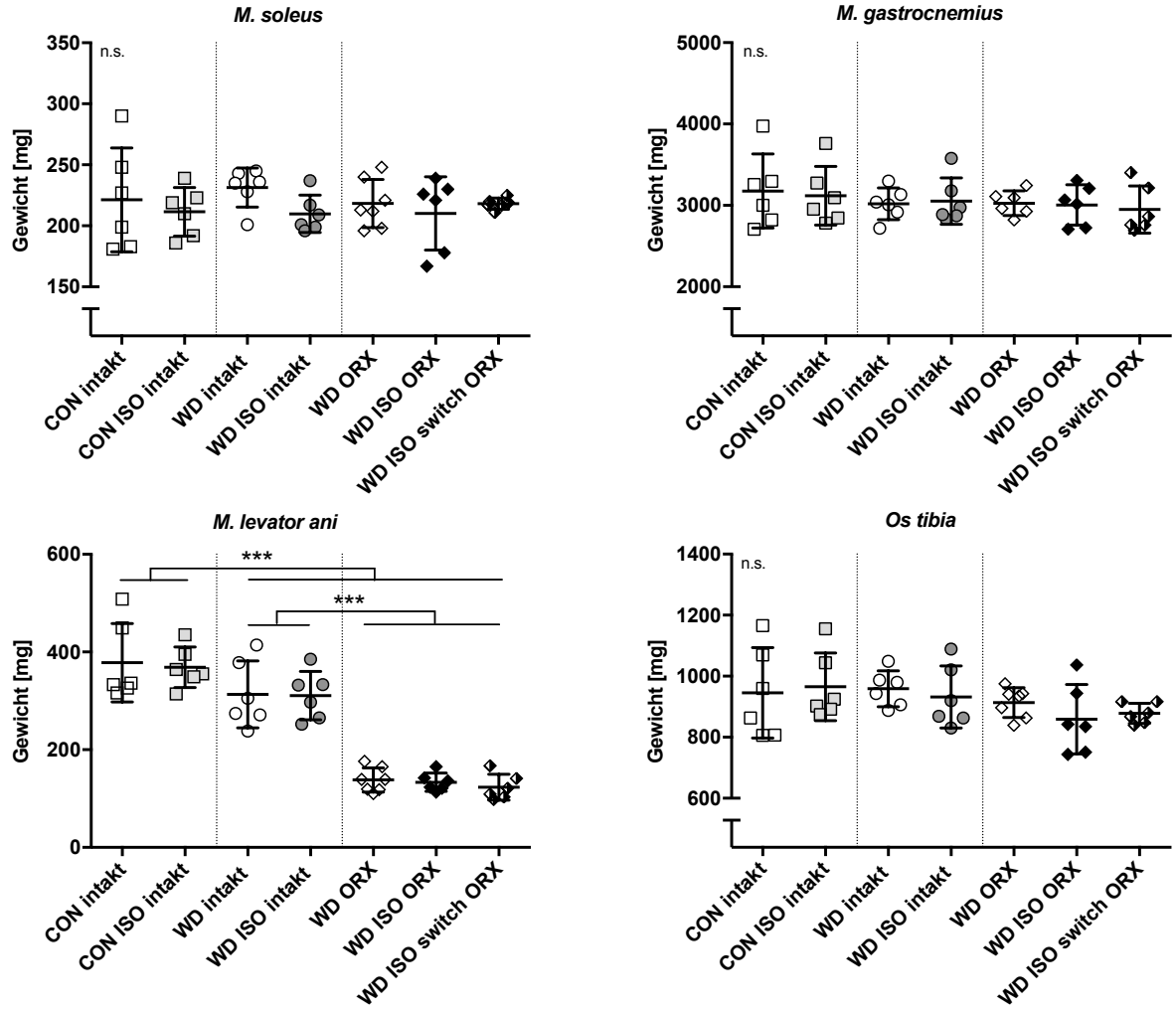

Abbildung 3.17 Absolutes Muskelgewicht von *M. soleus* (A), *M. gastrocnemius* (B) und *M. levator ani* sowie das Knochengewicht des *O. tibia* in männlichen Ratten. Streudiagramme zeigen Mittelwerte ± Standardabweichung (SD). (*) kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mit: *** $p < 0{,}001$; n.s. = nicht signifikant

3.2.7 Gewichte männlicher Sexualorgane

Die männlichen Sexualorgane stellen einen sensiblen Parameter für die hormonelle Wirkung von Substanzen dar. Veränderungen im Gewicht können Hinweise auf eine endokrin disruptive Wirkung von Substanzen geben.

In Hoden und Samenblase zeigten sich weder durch das WD Futter noch durch die Isoflavonzugabe Gewichtsunterschiede (Abbildung 3.18). In der Prostata zeigen sich mit WD Futter keine Unterschiede, jedoch führte die Isoflavongabe in der WD Gruppe zu einer minimalen, dennoch statistisch signifikanten Erhöhung des absoluten Prostatagewichts (+6%, $p = 0{,}003$). Wie erwartet zeigten orchiektomierte Tiere statistisch signifikant verringerte Gewichte der Samenblase und Prostata von bis zu 98% ($p < 0{,}001$).

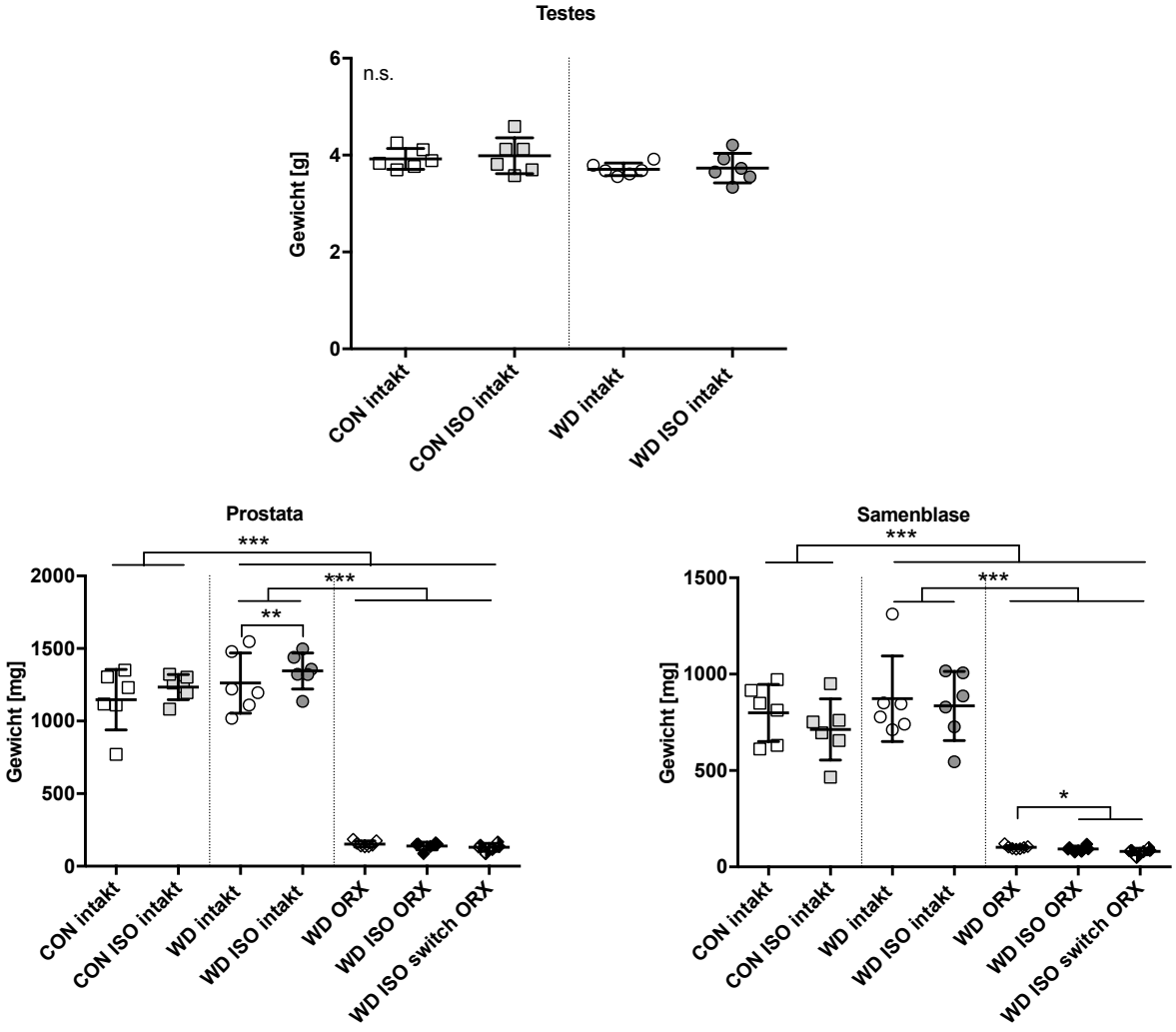

Abbildung 3.18 Absolute Gewichte der Testes (nur intakte Tiere), der Prostata sowie der Samenblase der Männchen. Streudiagramme zeigen Mittelwerte ± Standardabweichung (SD). (*) kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mit: * p < 0,05; ** p < 0,01 und *** p < 0,001; n.s. = nicht signifikant

3.2.8 Serumlipide

Tiere der WD Gruppe wiesen höhere LDL- und HDL-Spiegel (p < 0,001), in der Tendenz auch höhere Gesamtcholesterolspiegel (p = 0,079) auf als Tiere der Kontrollfuttergruppen, wohingegen die Triglyzeridspiegel unverändert blieben (Abbildung 3.19). Innerhalb der WD Gruppen wiesen orchiektomierte Tiere niedrigere Triglyzeridspiegel auf als intakte Tiere gleicher Futtergruppe (p = 0,002). Gesamtcholesterol, LDL und HDL blieben nach Ovariektomie unverändert. Innerhalb der intakten WD Gruppe konnten Isoflavone die Triglyzeridspiegel statistisch signifikant verringern (p = 0,002). Unter den orchiektomierten Gruppen hingegen zeigten sich bei Tieren, die erst nach der Orchiektomie Isoflavone zugeführt bekamen (WD ISO switch ORX) leicht erhöhte Triglyzerid- (p = 0,008) und HDL-

Spiegel (p = 0,012) gegenüber den kontinuierlich exponierten Tieren (WD ISO ORX). Die hohen Triglyzeridspiegel in letzterer Gruppe können jedoch zu einem Großteil auf zwei Tiere zurückgeführt werden, deren Werte stark von den anderen abweichen.

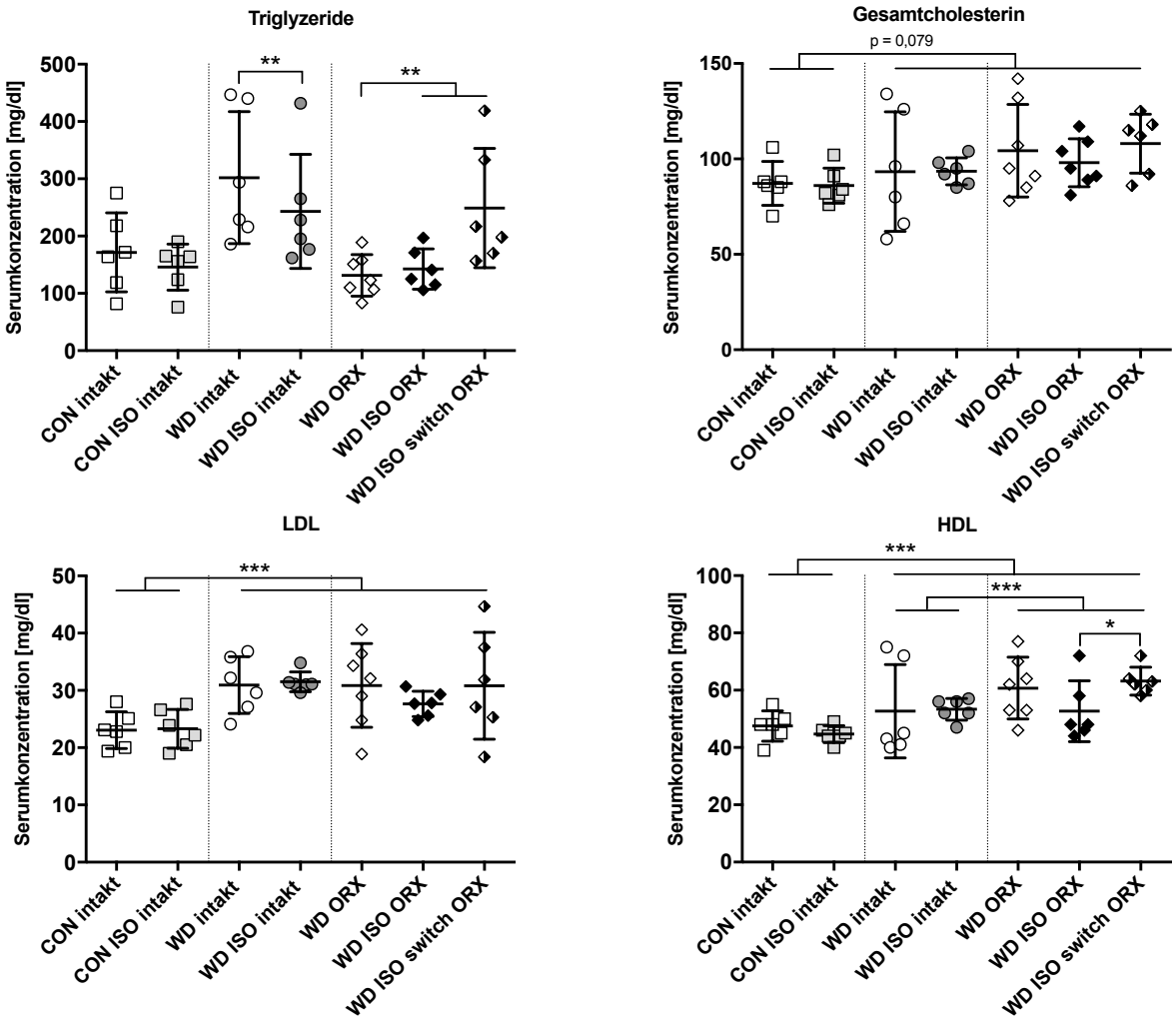

Abbildung 3.19 Serumlipide männlicher Ratten am Ende des Versuchs (PND 173). Streudiagramme zeigen Mittelwerte ± Standardabweichung (SD). (*) kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mit: ** p < 0,01 und *** p < 0,001.

3.2.9 Genexpressionsanalysen verschiedener Markergene des Fettstoffwechsels im Fettgewebe

In den Männchen erfolgte die Untersuchung der lipogenen Markergene SREBP 1c, FAS, ACC und PPARγ (Abbildung 3.20) ausschließlich im Fettgewebe.

Die mRNA Expression von SREBP 1c, FAS und ACC war in allen WD Gruppen (intakt und ORX) gegenüber der Kontrollfuttergruppe deutlich reduziert. Während bei SPEBP 1c und ACC Isoflavone zu einem Absinken der mRNA Spiegel in der Kontrollgruppe führten, blieben

die mRNA Spiegel von FAS in der Kontrollgruppe bei Isoflavongabe unverändert. Für alle drei Gene kam es in den WD Gruppen mit Isoflavonen zu einem Anstieg der Expressionsspiegel. Innerhalb der orchiektomierten Tiere konnte nur die lebenslange Exposition mit Isoflavonen einen Anstieg der Expression erzielen, nicht aber die Kurzzeit-Exposition (ISO switch).

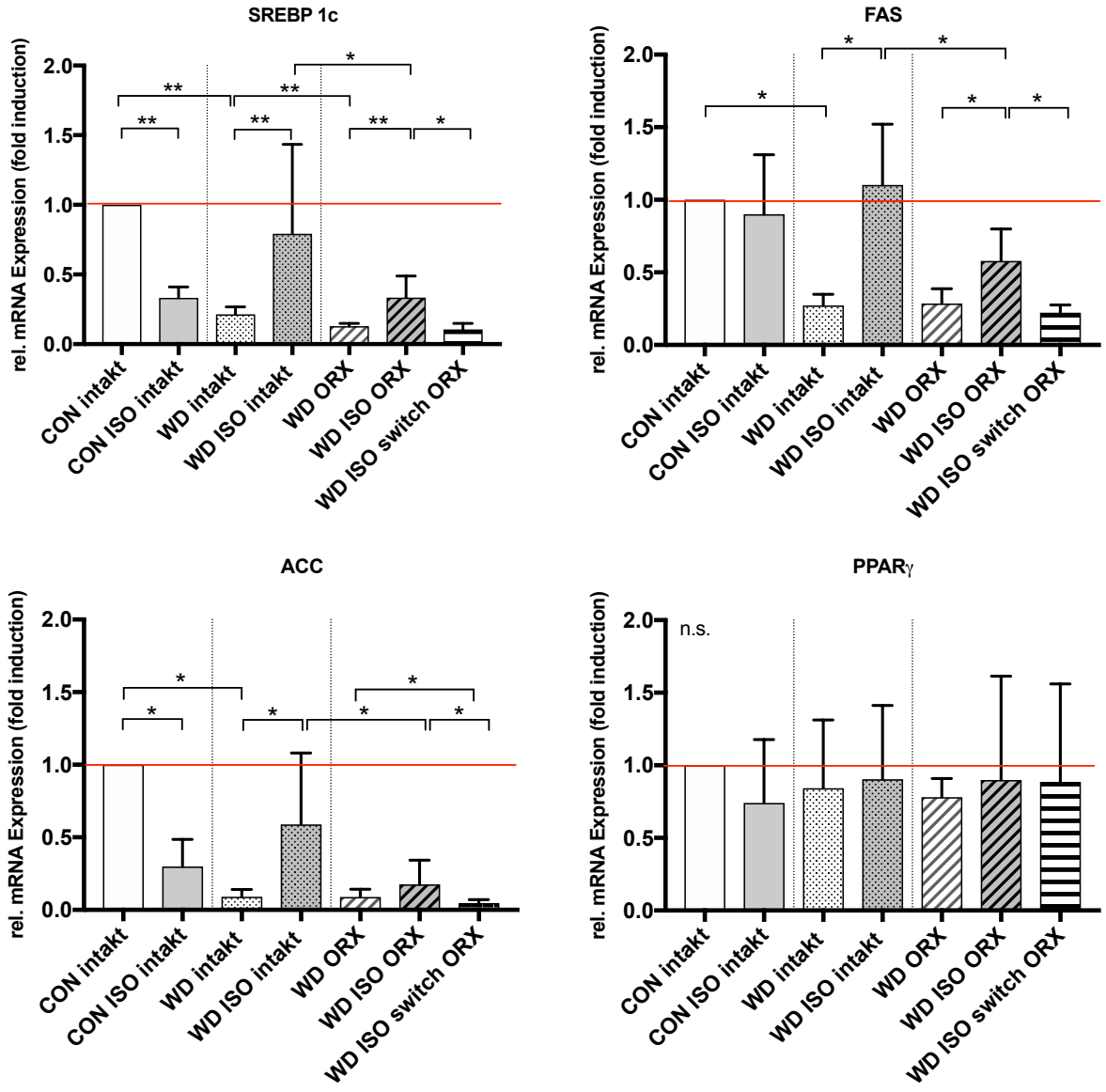

Abbildung 3.20 Relative mRNA Expression von SREBP 1c, FAS, ACC und PPARγ im Fettgewebe männlicher Ratten. Die mRNA Spiegel wurden auf ein unreguliertes Haushaltsgen (HPRT 1) normalisiert und sind relativ zur Kontrollgruppe (horizontale Linie) angegeben. Balken zeigen Mittelwerte ± 95% Konfidenzintervall. (*) kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mit: * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$; n.s. = nicht signifikant ($p > 0,05$)

Die Expression von PPARγ blieb dagegen unreguliert. Weder das WD Futter noch die Orchiektomie oder Isoflavonexposition führten zu einer Änderung der Genexpression gegenüber den jeweiligen Vergleichsgruppen.

3.2.10 Genexpressionsanalysen inflammationsassoziierter Markergene des Fettgewebes

Bei der Betrachtung der inflammatorischen Zytokine zeichnet sich eine leichte Erhöhung der Expression von IL6 in Folge des WD Futters in intakten und orchiektomierten Tieren ab, die durch die Isoflavone in der Tendenz leicht reduziert wurde (Abbildung 3.21). Die Unterschiede zwischen den Gruppen, sind jedoch nicht statistisch signifikant, was auf eine hohe Varianz zwischen den Werten zurückzuführen sein könnte.
Verglichen mit IL6 sind die Expressionsunterschiede zwischen den Gruppen bei MCP1 noch geringer und bewegen sich in Bereichen, die um das 0,5-fache von der Kontrolle abweichen. Hier konnte ebenfalls keine statistische Signifikanz zwischen den Gruppen festgestellt werden.

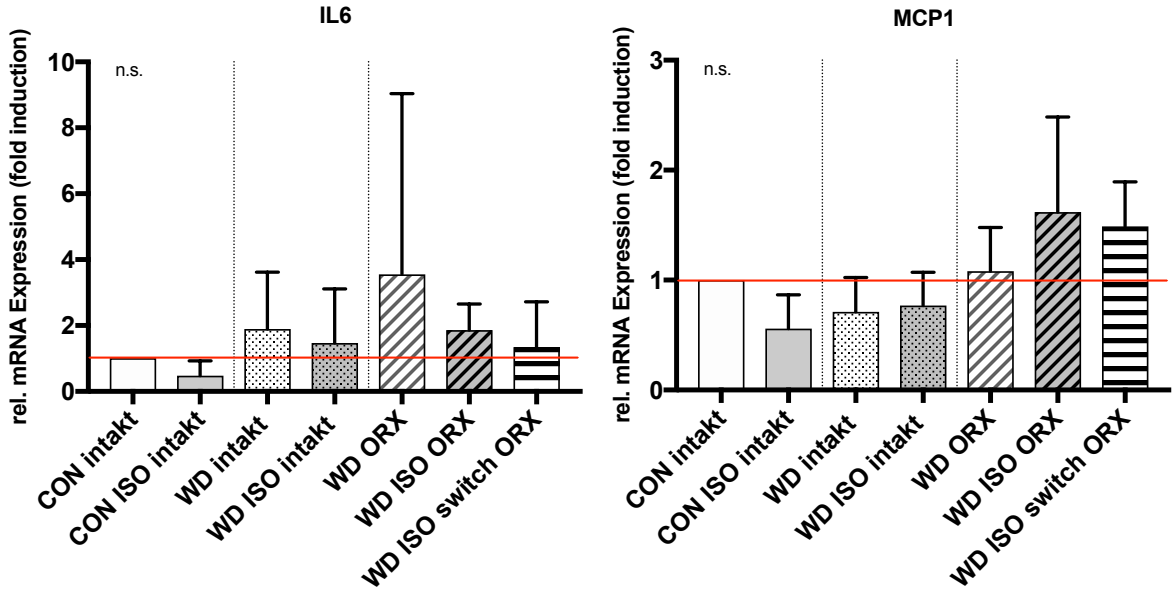

Abbildung 3.21 Relative mRNA Expression der Entzündungsmarker IL6 und MCP1 im Fettgewebe männlicher Ratten. Die mRNA Spiegel wurden auf ein unreguliertes Haushaltsgen (HPRT 1) normalisiert und sind relativ zur Kontrollgruppe (horizontale Linie) angegeben. Balken zeigen Mittelwerte ± 95% Konfidenzintervall. n.s. = nicht signifikant ($p > 0,05$)

4 Diskussion

Isoflavonen wird eine positive Wirkung auf das Körpergewicht und die Fettgewebsakkumulation zugeschrieben. Während in einigen Studien an weiblichen Nagern eine antiadipogene Wirkung beschrieben wird (Cederroth et al. 2007; H.-K. Kim et al. 2006; Naaz et al. 2003; Penza et al. 2006), ist in männlichen Nagern konzentrationsabhängig auch eine adipogene Wirkung zu beobachten (Penza et al. 2006; Zanella et al. 2014). Dabei scheint der Zeitpunkt der Exposition, das Geschlecht, der Ernährungsstatus der Tiere, sowie die Dosis einen erheblichen Einfluss auf die Wirkung zu haben. Nur wenige Studien bilden realistische Expositionsszenarien hinsichtlich Aufnahmeweg und Aufnahmemengen ab und selten wird die Auswirkung einer kontinuierlichen, lebenslangen Isoflavonexposition ab der perinatalen Phase untersucht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher die Einflüsse einer lebenslangen isoflavonreichen Ernährung auf die Entwicklung von Übergewicht, die viszerale Fettakkumulation und den Fettstoffwechsel in männlichen und weiblichen Ratten zu untersuchen und zu vergleichen. Dabei wurde die Isoflavonwirkung in normalernährten und überernährten sowie zusätzlich gonadektomierten Tieren getestet.

4.1 Isoflavonaufnahme und Plasmaspiegel

Ein entscheidender Aspekt dieser Studie waren die Isoflavonspiegel im Plasma der Tiere. Diese sollten vergleichbar sein mit Plasmakonzentrationen in Menschen, die sich isoflavonreich ernähren. Gleichzeitig sollten zu hohe Plasmaspiegel vermieden werden, die adverse Effekte auf das endokrine System mit sich bringen könnten.

Da bereits die Muttertiere vor der Verpaarung CON ISO Futter erhielten, kann angenommen werden, dass die Tiere bereits *in utero* und in der Laktationsphase zu geringem Umfang mit Isoflavonen exponiert waren, da dies bereits in anderen Studien an Ratten nachgewiesen werden konnte (Doerge et al. 2001; Doerge et al. 2006; Fritz et al. 1998; Lamartiniere 2002; Müller, Basso, et al. 2016). Die Exposition mit Isoflavonen über die Plazenta und später über die Muttermilch ist jedoch recht gering (Doerge 2011). Studien an Nagern zeigen, dass die Isoflavonspiegel in Föten und neonatalen Jungtieren meist 10- bis 20-fach niedriger liegen als die Plasmakonzentrationen der isoflavonreich ernährten Muttertiere (Doerge et al. 2001; Lamartiniere 2002).

Studien unserer Arbeitsgruppe in Ratten ergaben, dass ein zu unserem Versuch vergleichbares Isoflavonfutter mit einer Dosis von ca. 500 mg/kg Futter zu Isoflavonplasmaspiegeln in Jungtieren von lediglich 36 ± 11 nM an PND 5 bzw. 109 ± 41 nM

an PND 15 führte. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass diese Tiere postnatal täglich eine glucose- und maisölhaltige Kontrolllösung hinzugefüttert bekamen und die Aufnahme von Muttermilch und damit von Isoflavonen beeinträchtigt gewesen sein könnte (Müller, Soukup, et al. 2016).

Eine frühe Exposition mit Isoflavonen während der perinatalen Phase kann auf biologische Prozesse im Körper wirken und so schon früh auf die Ausprägung von Erkrankungen einwirken ((Badger et al. 2002); siehe auch weiterführende Diskussion Kapitel 4.8).

Um PND 16 begannen die Tiere mit der Aufnahme fester Nahrung zusätzlich zur Muttermilch und wurden ab PND 21 schließlich abgestillt. In dieser Zeit erfolgte die Isoflavonexposition zunächst über das angereicherte Kontrollfutter mit Isoflavonkonzentrationen von 467 mg/kg Futter (CON ISO), später dann über das angereicherte WD Futter mit Konzentrationen von 431 mg/kg Futter (WD ISO). Ein bis zwei Wochen nach Umstellung auf das WD Futter erfolgte eine Anpassung des Fressverhaltens der Tiere an die erhöhte Nährstoffdichte des Futters. Dadurch kam es jedoch zu einer Abnahme in der Isoflavonaufnahmemenge von ca. 62% in Weibchen und 50% in Männchen. Die Palatabilität des Futters schien dabei nicht durch den erhöhten Fettgehalt beeinträchtigt gewesen zu sein, da die Tiere in den ersten Tagen nach der Futterumstellung eine nahezu gleichbleibende Aufnahme zeigten, die erst im späteren Verlauf abnahm. Zur besseren Vergleichbarkeit mit anderen Studien und zur Überprüfung der systemischen Verfügbarkeit der aufgenommenen Isoflavone wurden am Ende des Versuchs die Plasmaisoflavonspiegel (Summe aus unkonjugiertem und konjugiertem GEN und DAI) aller Tiere gemessen. Diese betrugen in Weibchen 330 – 1400 nM und in Männchen 814 – 3641 nM und waren größtenteils abhängig vom verwendeten Futter. Während die Kontrollfuttergruppen die höchsten Plasmaspiegel in beiden Geschlechtern aufwiesen, lagen die Plasmaspiegel der intakten WD Gruppe mit Unterschieden von 53% in den Weibchen und 35% in den Männchen deutlich darunter. Dies spiegelt die Anpassung der Futteraufnahmemenge nach Umstellung auf das WD Futter wider. Es ist jedoch davon auszugehen, dass in den ersten Wochen nach Futterumstellung noch ähnlich hohe Isoflavonspiegel erreicht werden konnten wie in der Kontrollfuttergruppe, da der Futterkonsum in den WD Gruppen nur langsam abfiel.

Ein weiterer Einflussfaktor auf die Futteraufnahme und damit auf die Isoflavonaufnahme stellte die Gonadektomie dar. Während die Weibchen keine Unterschiede in der Futteraufnahme nach Ovariektomie zeigten, ist bei den Männchen eine Verringerung der Futteraufnahme nach Orchiektomie zu beobachten. Der um ca. 20% niedrigere Futterkonsum der orchiektomierten Männchen im Vergleich zu den intakten Männchen der WD Gruppe ist mitverantwortlich für die Unterschiede in der Isoflavonaufnahmemenge und daraus resultierende niedrige Plasmaisoflavonspiegel.

Testosteron und E2 sind in der Lage über die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse (HHG-Achse) die Nahrungsaufnahme zu beeinflussen. Eine Gonadektomie in Nagern hat unterschiedliche Auswirkungen auf das Fressverhalten. Während Weibchen ihren Futterkonsum nach Ovariektomie durch ein Anstieg im Mahlzeitenvolumen steigerten, reagieren Männchen mit einer Abnahme des Futterkonsums durch eine verringerte Mahlzeitenfrequenz (Asarian und Geary 2013; Blaustein und Wade 1976; Chai et al. 1999; Gentry und Wade 1976). Diese Effekte lassen sich durch eine Substitution mit E2 bzw. Testosteron wieder rückgängig machen. Die Steuerung des Fressverhaltens ist auf eine Vielzahl an peripherer Rückkopplungsmechanismen zurückzuführen und kann über den Estrogenrezeptor vermittelt werden (Geary 2004). Der Mechanismus wie Testosteron auf das Fressverhalten wirkt ist bisher noch nicht genau geklärt (Asarian und Geary 2013).

Isoflavone unterliegen dem enterohepatischen Kreislauf, so dass ca. 7 Stunden nach der Aufnahme die höchsten Plasmaspiegel im Blut erreicht werden (Chang et al. 2000; Sfakianos et al. 1997). Besonders auffällig in unserem Versuch ist, dass die Männchen im Vergleich zu den Weibchen insgesamt höhere Plasmaisoflavonspiegel aufwiesen. Während in den intakten Männchen der Kontrollfuttergruppe mit 3641 nM im Mittel die höchsten Isoflavonspiegel gemessen wurden, so wurden bei den Weibchen der gleichen Gruppe nur 1400 nM gemessen. Dieser Unterschied in der Bioverfügbarkeit im Plasma von ca. 60% scheint zunächst durch den unterschiedlichen Futterkonsum erklärbar, der in der Kontrollfuttergruppe in Männchen mit ca. 30 g/Tag deutlich höher lag als in den Weibchen mit 20 g/Tag. Dennoch ist die berechnete relative Isoflavonaufnahmemenge (PND 170) mit 39 mg/kg KGW/Tag in Weibchen bzw. 36 mg/kg KGW/Tag in Männchen ähnlich hoch, da Männchen höhere Körpervolumina aufweisen.

Ein möglicher Erklärungsansatz für die Unterschiede in der Bioverfügbarkeit zwischen Männchen und Weibchen könnte in der geschlechtsabhängigen Pharmakokinetik der Isoflavone liegen. Coldham und Sauer konnten zeigen, dass männliche Ratten bei gleicher Verabreichungsdosis, höhere GEN-Konzentrationen im Plasma aufwiesen als Weibchen. Dies galt besonders für die Absorption 0,5 – 2,5 h nach Verabreichung. Dies führten sie auf eine höhere Clearance und anschließende Akkumulation von GEN in der Leber weiblicher Ratten zurück (Coldham und Sauer 2000). Weitere Aspekte der geschlechtsspezifischen Metabolisierung der Isoflavone werden in Kapitel 4.2 näher diskutiert.

Interessanterweise war in beiden Geschlechtern eine Verringerung der Plasmaspiegel (Männchen: - 66%; Weibchen: - 51%) nach erfolgter Gonadektomie zu beobachten. Zwar spielt der um 20% verringerter Futterkonsum in den orchiektomierten Männchen eine gewisse Rolle, doch gemessenen an den prozentualen Abnahmen scheint der starke Unterschied in den Isoflavonspiegeln nicht allein dadurch erklärbar zu sein. Zudem wiesen Weibchen keine Abnahme im Futterkonsum auf.

Soukup et al. führten geringere Gesamt-Isoflavonspiegeln von über 58% in orchiektomierten gegenüber intakten männlichen Ratten auf eine veränderte Expression an Transporterproteinen zurück, die für den Transport von Phase-II-Metaboliten in Leber und Niere verantwortlich sind. Die damit verbundene verstärkte renale Ausscheidung und vermindere Effizienz des enterohepatischen Kreislaufs könnte somit die niedrigeren Plasmaspiegel nach Gonadektomie erklären (Soukup et al. 2017).

Wie es zur Abnahme der Isoflavonspiegel nach Gonadektomie in den Weibchen kam, bleibt nach wie vor offen. Studien an weiblichen Mäusen deuten jedoch an, dass die hormonellen Umstellungen im Zuge einer Ovariektomie zu einer Veränderung der bakteriellen Zusammensetzung der Darmflora führen können. Eine veränderte bakterielle Metabolisierung der Isoflavone kann so die Bioverfügbarkeit beeinflussen (D.-H. Lee et al. 2017).

Die Vergleichbarkeit der Isoflavonspiegel zwischen Mensch und Versuchstier ist ein entscheidender Aspekt bei der Relevanz der Studie für die Humansituation. Die tägliche Aufnahmemenge an Isoflavonen im Menschen variiert mit den regionalen Ernährungsgewohnheiten in Abhängigkeit von der Isoflavonquelle und Art des Nahrungsmittels. So führt eine traditionell asiatische Ernährung mit einem hohen Anteil an Sojaprodukten zu Aufnahmemengen von 8 – 50 mg/ Tag, wohingegen mit einer westlichen Ernährungsweise Aufnahmemengen von 2 mg selten überschritten werden (Mortensen et al. 2009). Basierend auf epidemiologischen Untersuchungen in japanischen Männern und Frauen im Alter von >40 Jahren wurden durchschnittliche Isoflavon-Plasmaspiegel (Summe aus GEN, DAI und Equol) von jeweils 874 bzw. 806 nM beobachtet (Morton et al. 2002). In anderen Studien im Menschen, die eine standardisierte sojaproteinreiche Nahrung mit der tatsächlich erreichten Plasmakonzentration abglichen, führten Aufnahmemengen von ca. 50 mg/kg KGW in Nicht-Equol-Bildnern zu Plasmakonzentrationen von 1300 nM, wohingegen in Equolbildner 2160 nM erreicht wurden. Dies verdeutlicht, das starke interindividuelle Unterschiede in den Plasmakonzentrationen im Menschen auftreten und partiell auch höhere Werte erreicht werden können (van der Velpen et al. 2014). Die beschriebenen Konzentrationen entsprechen in etwa den Serumkonzentrationen, die im vorliegenden Versuch in weiblichen Ratten sowie in orchiektomierten männlichen Ratten erreicht wurden. Die antiadipogenen Effekte in den Weibchen sind demnach auf Isoflavonplasmaspiegel zurückzuführen, die bei sojareicher Ernährung auch im Menschen erreichet werden können. Die deutlich höheren Plasmaisoflavonspiegel in intakten Männchen liegen dagegen außerhalb des physiologischen Bereichs, den man über eine isoflavonreiche Ernährung im Menschen erreichen kann. Identisch hohe Plasmaisoflavonspiegel von 2390 – 3470 nM wurden in Folge einer Isoflavon-supplementation von 100 mg/kg KGW in postmenopausalen Frauen beobachtet (van der Velpen et al. 2014).

4.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede im Isoflavonmetabolitenspektrum

Die biologische Aktivität der Isoflavone ist stark abhängig von der Art der Biotransformation im Körper. Spezies- und Geschlechtsunterschiede nehmen Einfluss auf den Phase-II-Metabolismus der Isoflavone und können zu Veränderungen im Metabolitenspektrum im Blut führen. Das Metabolitenspektrum hat wiederum Auswirkung auf die Bioverfügbarkeit im Zielgewebe und beeinflusst damit die Wirkung. Es wird vermutet, dass Unterschiede in der Biotransformation einen Erklärungsansatz für geschlechtsspezifische Wirkung der Isoflavone liefern können (Soukup et al. 2016).

Equol gilt als ein Metabolit, dem ein Großteil der biologischen Wirkung der Isoflavone zugeschrieben wird. Im Gegensatz zu Menschen, die je nach ethnischer Herkunft bzw. Zusammensetzung der bakteriellen Darmflora nur zu 30 – 60 % zur Equol-Bildung befähigt sind, sind Ratten ausnahmslos Equol-Bildner (Axelson und Setchell 1981; Bolca et al. 2007; Soukup et al. 2016). Im vorliegenden Versuch konnten Equolmetabolite im Plasma für beide Geschlechter nachgewiesen werden. Trotz niedrigerer Gesamtisoflavonspiegel in den Weibchen, war die Konzentration an Equolmetaboliten im Plasma höher als in den Männchen und betraf vor allem die intakte Kontrollgruppe und die intakte WD Gruppe.

Ob die niedrigeren Equolspiegel ein möglicher Grund für die schwächere Wirkung auf das Fettgewebe in den Männchen sind, bleibt offen, da im vorliegenden Versuch nur 2 von 8 möglichen Equolmetaboliten untersucht wurden und so keine quantitative Aussage über die Equolbildung möglich ist.

Ein ähnliches Phänomen wie bei Equol zeigt sich jedoch auch bei den absoluten Konzentrationen an freien GEN- und DAI-Aglykonen in den Weibchen, die teilweise fast doppelt so hoch waren wie in Männchen. Ein Blick auf die prozentuale Verteilung der Phase-II-Metabolite von GEN bzw. DAI in den intakten Männchen und Weibchen der Kontrollgruppe bestätigt dies. Hier lagen die Aglykonanteile in Weibchen mit 1,4% (GEN) und 4,5% (DAI) höher als in Männchen mit 0,4% (GEN) und 0,7% (DAI). Der Effekt betraf damit vor allem die intakte Kontrollgruppe, in der auch in Weibchen die stärksten Effekte auf das Fettgewebe zu verzeichnen waren. Zu den DAI-Aglykonspiegeln der anderen Gruppen kann in den Weibchen keine weitere Aussage getroffen werden, da die Messungen auf Grund einer Verschleppung gestört wurden.

Neben Equol werden freie Aglykone an GEN und DAI zu einem großen Teil für die biologische Aktivität der Isoflavone verantwortlich gemacht. Sie sind lipophil und können schnell über passive Diffusion Membranen passieren und sich so schnell im Gewebe verteilen und akkumulieren (Penza et al. 2007; Setchell et al. 2011). Zudem weisen sie ein höheres estrogenes Potential auf als konjugierte Isoflavonmetabolite (Islam et al. 2015). Die erhöhten Aglykonspiegel könnten ein möglicher Erklärungsansatz dafür sein, warum

weibliche Tiere trotz geringerer Gesamtisoflavonplasmaspiegel stärkere Effekte im Fettgewebe zeigten als Männchen, und innerhalb der weiblichen Tiere die intakte Kontrollgruppe die stärksten Effekte aufwies.

Darüber hinaus könnte die geschlechtsspezifische Wirkung in der unterschiedlichen Gewebeverfügbarkeit von Isoflavonen in Weibchen und Männchen begründet liegen. Die Arbeitsgruppe um Coldham konnte zeigen, dass weibliche Ratten eine höhere Bioverfügbarkeit von GEN-Äquivalenten in Geweben wie Leber und den Reproduktionsorganen aufwiesen als männliche Ratten, obwohl die Isoflavonplasmaspiegel der Männchen höher lagen als die der Weibchen. Dieser Effekt wurde auf ein effizienteres enterohepatisches Recycling, eine höhere Clearance und eine niedrigere Plasmabindungsrate in weiblichen gegenüber männlichen Tieren zurückgeführt (Coldham und Sauer 2000).

Den größten Anteil am Metabolitenspektrum machen jedoch nicht die Aglykone, sondern die Isoflavonkonjugate aus. Sowohl GEN als auch DAI lagen in den Weibchen zu über 90% glucuronidiert, überwiegend als 7-Glucuronid, vor. Im Unterschied dazu lagen bei den Männchen über 80% der ISO in sulfatierter Form vor. Die stärkere Sulfatierung in Männchen spiegelt sich auch in einem kleinen Anteil an sulfatiertem Equol wider, wohingegen in den Weibchen lediglich das glucuronidierte Equol zu finden war.

Die geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Isoflavonmetabolisierung in Nagern wurden bereits zuvor beschrieben. Soukup et al. führten den erhöhten Anteil an Disulfaten und Sulfoglucuroniden im Serum männlicher Ratten nach Isoflavonaufnahme auf eine erhöhte Sulfotransferaseaktivität zurück (Soukup et al. 2016), was mechanistisch darin zu begründen ist, dass männliche im Vergleich zu weiblichen Ratten eine erhöhte mRNA Expression an verschiedenen Sulfotransferasen in der Leber aufweisen (L. Liu und Klaassen 1996a, 1996b).

Durch die Orchiektomie in Männchen kam es zu einer Verschiebung der Anteile an konjugierten Metaboliten hin zur überwiegend glucuronidierten Form und glich sich damit leicht dem weiblichen Metabolitenprofil an. Soukup et al. konnten zeigen, dass diese Verschiebung von Sulfatkonjugaten zu überwiegend Glucuroniden im Plasma auf eine durch die Orchiektomie verminderte Expression an entsprechenden Sulfotransferasen in der Leber zurückzuführen ist und durch Testosteron vermittelt wird (Soukup et al. 2017). Die Art der Konjugation kann entscheidende Einflüsse auf das estrogene Potential von Isoflavonen haben. So führen eine Monoglucuronidierung und -sulfatierung an C4-Position von DAI zu einem verminderten estrogenen Potential gegenüber den Aglykonen, wohingegen eine Monosulfatierung an C7-Position zu einer Erhöhung des estrogenen Potentials führt (Islam et al. 2015; Kinjo et al. 2004; Pugazhendhi et al. 2008; Y. Zhang et al. 1999). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Konjugation Einfluss auf den aktiven Transport über

Transportproteine von Isoflavonen ins Gewebe hat und damit die Bioverfügbarkeit beeinflusst. Nachgewiesen wurde dies an Transportproteinen, die in zahlreichen Geweben exprimiert werden, und deren Transportmechanismus selektiv nur für einige Isoflavonkonjugate erfolgt (Grosser et al. 2015).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse zum Metabolitenspektrum im Blut der Ratten, dass es im Rahmen des Phase-II-Metabolismus sowohl im Anteil freier Isoflavonaglykone im Plasma als auch in der Konjugation der Isoflavone geschlechtsspezifische Unterschiede gibt, die zu Unterschieden in der Bioverfügbarkeit und damit zu einer veränderten biologischen Wirkung in Männchen und Weibchen geführt haben könnten.

4.3 Die Wirkung der Isoflavone auf das Körpergewicht und die viszerale Fettakkumulation

Epidemiologische Studien weisen auf einen Zusammenhang zwischen einer isoflavonreichen Ernährung in ostasiatischen Ländern und einer verringerten Prävalenz an Übergewicht und den damit verbundenen Folgeerkrankungen wie Diabetes Typ II, Atherosklerose und einigen Krebserkrankungen hin (Adlercreutz und Mazur 1997). Tierversuche und klinische Studien zeigen hingegen ein heterogenes Bild in Bezug auf die Wirkung von Isoflavonen auf das Körpergewicht und den Körperfettanteil.

Im vorliegenden Tierversuch konnte gezeigt werden, dass weibliche normalgewichtige Ratten trotz unverändertem Futterkonsum weniger an Körpergewicht zugelegt haben als die Vergleichsgruppe (-5%), wenn sie von Geburt an lebenslang Isoflavone mit dem Futter bekamen. Auf eine Zunahme des Körpergewichts durch das WD Futter und bei zusätzlicher Ovariektomie hatten Isoflavone dagegen keine Wirkung.

Deutlichere Effekte konnten in der viszeralen Fettmasse der Weibchen beobachtet werden. Hier zeigte sich eine verminderte Ausprägung der viszeralen Körperfettdepots bei kontinuierlicher Isoflavonexposition in normalgewichtigen Kontrolltieren (-41%), aber auch in ovariektomierten Tieren die WD Futter bekamen (-20%).

Die unterschiedliche Effektstärke der Isoflavone auf die Körpergewichtsentwicklung und Fettgewebsakkumulation konnte bereits in Studien an Mäusen beobachtet werden. In einer Studie von Kim et al. konnte eine 3-wöchige Fütterung mit GEN das Körpergewicht in ovariektomierten Mäusen um lediglich 9% senken, während die Fettdepots um ca. 19 – 22% verringert werden konnten (H.-K. Kim et al. 2006). Naaz *et al.* konnten durch mit dem Futter verabreichtes GEN über 12 Tage eine Reduktion der Fettdepots um 37 – 57% in ovariektomierten Mäusen erzielen, obwohl das Körpergewicht nahezu unverändert blieb (Naaz et al. 2003). Dies verdeutlicht, dass Isoflavone spezifisch auf das Fettgewebe wirken und die beobachteten Effekte nicht auf eine gesamte Körpergewichtsreduktion oder gar auf eine verminderte Energieaufnahme zurückzuführen sind.

Das weiße Fettgewebe weist eine hohe Plastizität auf. Bei einem Überangebot an Energie aus der Nahrung, steigt die insulininduzierte Lipogenese in den Adipozyten und es werden verstärkt Triglyzeride eingelagert. Es kommt zu einer Größenzunahme der Adipozyten, einer sogenannten adipozytären Hypertrophie (Wirth 2007). Deutlich wurde dies in allen WD Tieren, besonders aber in den zusätzlich ovariektomierten Weibchen, die mit einer Zunahme an Körpergewicht und viszeralem Fettgewebe auch vergrößerte Adipozyten aufwiesen.

Estrogene sind in der Lage die Proliferation und Differenzierung von Adipozyten zu beeinflussen (Anderson et al. 2001). Zudem wirken sie einer Fetteinlagerung entgegen, indem sie die Lipogenese über die Aktivität der LPL herabsetzten und steigern die Lipolyse, indem sie die hormonsensitive Lipase induzieren (Cooke und Naaz 2004). Ein Absinken der endogenen E2 Spiegel, wie es auch in diesem Versuch in Weibchen durch die Ovariektomie simuliert wurde, geht daher häufig mit einer Zunahme der viszeralen Fettdepots einher (Toth et al. 2001).

Einige Studien in Nagetieren deuten an, dass Isoflavone über ihre estrogene Wirkung in der Lage sind ebenfalls direkt auf den Füllungszustand der Adipozyten zu wirken und so viszerale Fettdepots zu reduzieren (Cederroth et al. 2007; H.-K. Kim et al. 2006; Naaz et al. 2003; Penza et al. 2006).

In den hier untersuchten Weibchen der normalgewichtigen Kontrollfuttergruppen waren die Adipozyten um ca. 30% kleiner, wenn die Tiere lebenslang Isoflavone bekamen. In den WD Gruppen dagegen, die verringerte Plasmaisoflavonspiegel aufwiesen, blieb der Effekt auf die Adipozyten aus.

Tierstudien in Mäusen deuten auf eine konzentrations- bzw. dosisabhängige Wirkung der Isoflavone auf Adipozyten. In Naaz et al. führte die Verabreichung von GEN über die Nahrung in ovariektomierten Mäusen zu einer signifikanten Verringerung des Fettgewebes und der Adipozytenumfänge. Serumkonzentrationen an GEN, die eine Wirkung im Fettgewebe erzielten, lagen im Bereich zwischen 1,79 µM und 3,81 µM. Bei niedrigerer Dosierung hingegen, die Serumkonzentrationen von 1 µM erzielte, blieben die positiven Effekte auf das Fettgewebe aus (Naaz et al. 2003). Andere Studien in Mäusen zeigen, dass die antiadipogene Wirkung bereits ab Serumkonzentrationen von 0,1 µM GEN auftritt (Penza et al. 2006).

Die Beobachtungen zur konzentrationsabhängigen Wirkung der Isoflavone in Nagern werden zusätzlich durch *in vitro* Studien bestätigt, die die Wirkung von Isoflavonen auf die Lipogenese und Lipolyse untersuchen. In isolierten Rattenadipozyten konnten GEN und DAI bereits ab Konzentrationen von 0,01 mM die basale und Insulin induzierte Lipogenese inhibieren und die basale Lipolyse stimulieren (Kandulska et al. 1999). Diese inhibitorische Wirkung auf die Lipogenese ist eng verknüpft mit dem Glucosetransport und -metabolismus

in Adipozyten. Bazuine et al. konnten zeigen, dass GEN den Glucosetransporter GLUT-4 inhibiert und so die Glucoseaufnahme in die Adipozyten unterbindet (Bazuine et al. 2005).
Bei Konzentrationen von 1 mM zeigte sich gegenteiliger Effekt im Adipozyt, hier unterdrückten GEN und DAI eine Epinephrine induzierte Lipolyse (Kandulska et al. 1999). Damit zeigt sich, dass Isoflavone je nach Konzentration unterschiedliche Wirkung auf die Adipozyten haben können.
Die Gewebekonzentration an Isoflavonen beeinflusst die biologische Aktivität und Wirkung der Isoflavonen in entsprechenden Zielgeweben. In *in vitro* Versuchen werden meist Konzentrationen eingesetzten, die die Gewebespiegel in vivo um ein Vielfaches übersteigen und sind daher nur bedingt auf die in vivo Situation übertragbar. In der vorliegenden Arbeit wurden die Isoflavonkonzentrationen ausschließlich im Plasma, jedoch nicht im Fettgewebe bestimmt. Auch in der Literatur gibt es bislang nur wenige Daten zur Bioverfügbarkeit von Isoflavonen im Fettgewebe. In einer Pharmakokinetikstudie, in denen Ratten eine Dosis von 12,5 mg/kg GEN über eine Schlundsonde verabreicht bekamen, wurden die höchsten Konzentrationen im Gastrointestinaltrakt (3 – 19 µg/g), der Leber (1 – 2 µg/g), dem Plasma (0,78 – 0,84 µg/g) und den Reproduktionsorganen wie Uterus, Ovar, Vagina und Prostata (0,1 – 0,45 µg/g) gemessen. Die GEN Konzentration im abdominalen Fettgewebe waren dagegen mit 0,037 ± 0,016 µg/g in Männchen und 0,051 ± 0,026 µg/g in Weibchen im Vergleich eher gering, was auf die hydrophilen Eigenschaften der GEN-Konjugate zurückgeführt wurde (Coldham und Sauer 2000). Es ist damit anzunehmen, dass die Isoflavonspiegel im Fettgewebe auch im hier vorliegenden Versuch unter den erreichten Plasmaisoflavonspiegeln liegen.
Die in unserem Versuch maximal erreichten Isoflavonspiegel von ca. 1,4 µM wurden in Weibchen der normalgewichtigen Kontrollfuttergruppe gemessen, die auch die deutlichsten Effekte in der Reduktion des Körpergewichts, der viszeralen Körperfettmasse und Adipozytengröße zeigten. Bei übergewichtigen Weibchen der WD Gruppen hingegen, deren Isoflavonspiegel zu Versuchsende bei unter 1 µM lagen, fielen Effekte auf das Fettgewebe schwächer aus oder blieben sogar ganz aus. Möglicherweise ist die antiadipogene Wirkung der Isoflavone auf die Fettgewebseinlagerung durch die niedrigen Plasmaisoflavonspiegel abgeschwächt worden. Beim Vergleich der beiden WD Gruppen scheint es zunächst paradox, dass die ovariektomierten Weibchen trotz vergleichsweise niedriger Isoflavonspiegel von 0,3 µM, dennoch eine leichte Reduktion der viszeralen Fettdepots aufwiesen und somit stärker auf die Isoflavone zu reagieren scheinen als die intakten Weibchen, bei denen keine Veränderung zu beobachten war. Möglicherweise spielt hier zusätzlich die Einwirkung der endogenen Estrogene auf die ER-Expression im Gewebe eine Rolle. In Studien an ovariektomierten Ratten konnte beobachtet werden, dass ein Absinken der E2 Spiegel zu einer Erhöhung der Proteinspiegel an ERβ im Fettgewebe, sowie zu

verringerten PPARγ Spiegeln führt (Tomicek et al. 2011). Vor dem Hintergrund, dass die Wirkung von GEN überwiegend über den ERβ vermittelt wird und Isoflavone zudem konzentrationsabhängig als PPARγ Agonist wirken (Chirumbolo 2015; Naaz et al. 2003; Penza et al. 2006; Zanella et al. 2014), ist es vorstellbar, dass die veränderte Ansprechbarkeit in ovariektomierten Weibchen auf diesen Mechanismus zurückzuführen ist. Dies deutet an, dass Weibchen sensibler auf die antiadipogene Wirkung von Isoflavonen reagieren, wenn sie zuvor ovariektomiert wurden und damit einen der Postmenopause ähnlichen Zustand aufweisen.

In den männlichen Tieren machte sich die erhöhte Energiezufuhr durch das WD Futter zwar nicht im Körpergewicht, dafür aber in einer erhöhten viszeralen Fettgewebsmasse und vergrößerten Adipozyten bemerkbar. Zusätzlich kam es zu einer Steigerung der Körpergewichtszunahme ab PND 80 als die Umstellung auf das WD Futter erfolgte.
In intakten Tieren der WD Gruppe führte die lebenslange Isoflavongabe zu einer verringerten Einlagerung von viszeralem Körperfett. Diese Verringerung von 15% fiel jedoch deutlich schwächer aus als in den intakten Weibchen (41%). Die Isoflavonplasmaspiegel der Männchen lagen in entsprechender Gruppe mit 2,4 µM über dem Konzentrationsbereich, bei dem eine antilipogene Wirkung in Weibchen gezeigt wurde. Zudem blieb eine Veränderung in den Adipozytengrößen mit Isoflavonen aus. Dies lässt vermuten, dass die Wirkung auf das Fettgewebe weniger durch eine reduzierte Lipideinlagerung in den Adipozyten des viszeralen Fettgewebes, als durch andere Prozesse, wie etwa eine Reduktion der Adipozytenanzahl zu Stande kam.
Wie sich auch in unserem Versuch bestätigt, korreliert eine erhöhte Fettgewebsmasse und eine adipozytäre Hypertrophie mit den Leptinspiegeln im Blut. Erhöhte Leptinspiegel in Folge von Übergewicht sind häufig mit einer Leptinresistenz verbunden und stehen im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen und Krebs (Garofalo und Surmacz 2006; Rahmouni und Haynes 2004).
Neben einer Steigerung des Energieverbrauchs durch Fasten und körperliche Aktivität, kann eine Reduktion des Fettgewebes zu einem Absinken der Leptinspiegel beitragen und damit langfristig die Leptinsensitivität erhöhen (Jéquier 2002). Eine verbesserte Leptinsensitivität trägt zu einer verbesserten Lipidhomöostase bei, da Leptin an der Regulation der Lipogenese im Fettgewebe und anderen Organen beteiligt ist, in denen es zu ektopen Lipidablagerungen kommen kann (Jéquier 2002; Jiang et al. 2009; Soukas et al. 2000).
Die verminderte Fettgewebseinlagerung durch Isoflavone und eine Reduktion der Adipozytengröße, und damit der Kapazität Leptin zu produzieren, trägt somit sekundär zu einer Reduzierung der Leptinspiegel bei.

Dies zeigte sich sowohl in den Weibchen der Kontrollfuttergruppe, als auch in geringeren Ausmaßen in der ovariektomierten Gruppe, in denen bei verminderter Fettgewebseinlagerungen nach lebenslanger Isoflavongabe auch niedrigere Leptinspiegel im Blut gemessen wurden. In den Männchen der intakten WD Gruppe, die eine leicht verringerte Fettgewebseinlagerung nach lebenslanger Isoflavonexposition zeigten, konnte zumindest ein Trend (nicht statistisch signifikant) zu verringerten Leptinspiegeln erreicht werden.
Neben dem sekundären Einfluss durch eine Reduktion der Fettdepots, können Isoflavone auch direkt auf die Leptinfreisetzung in den Adipozyten einwirken. In einer Studie in männlichen Ratten konnte GEN die Leptinsekretion unterbinden, ohne die Genexpression zu beeinflussen. Als zugrundeliegender Mechanismus wird eine Hemmung des Glucosestoffwechsels durch Isoflavone vermutet. GEN ist in der Lage den Glucosetransport und die Glykolyse in Adipozyten zu stören, sowie die Insulinwirkung herabzusetzten (Szkudelski et al. 2005). Insulin und Glucose gelten wiederum als Signalgeber für die Stimulation der Leptinsekretion und ein gestörter Glucosetransport in die Zelle kann somit die Leptinsekretion hemmen (Mueller et al. 1998; Wellhoener et al. 2000).

Einige andere Studien deuten bereits darauf hin, dass Isoflavone geschlechtsspezifisch auf die Fettgewebsakkumulation und den Lipidstoffwechsel wirken. Studien in normalgewichtigen Nagern, die den Einfluss von Isoflavonen auf das Körpergewicht und Fettgewebe in beiden Geschlechtern verglichen, konnten zeigen, dass eine Reduktion des Körpergewichts und der Fettgewebsmasse durch Isoflavone in Weibchen ausgeprägter war als in Männchen (Cederroth et al. 2007; Lephart 2014).
Einige Studien in Mäusen weisen sogar auf eine adipogene Wirkung von Isoflavonen in Männchen hin. In einer Studie an männlichen Mäusen, die über 147 Tage ein mit Soja angereichertes fettarmes Futter bekamen oder denen über 15 Tage GEN oral verabreicht wurde, kam es zu einem Anstieg des viszeralen Fettgewebes und einer gesteigerten Adipogenese (Zanella et al. 2014). Zur besseren Vergleichbarkeit fehlen hier jedoch Angaben zu den Plasmaisoflavonspiegeln. In einer Studie von Penza et al. führten vermeintlich ernährungsrelevante Dosen an isoliertem GEN, die mit Serumkonzentrationen von 98 nM einhergingen, zu einem Anstieg der Fettgewebsmasse in männlichen Mäusen, wohingegen keine Änderung in Weibchen festgestellt wurde. Bei höheren Serumkonzentrationen von 223 nM, kam es in beiden Geschlechtern zu einer Reduktion der Fettgewebsmasse wie sie in gleichem Maße auch durch eine Behandlung mit E2 herbeigeführt werden konnte (Penza et al. 2006).
Diese Beobachtungen führen zu der Annahme, dass eine estrogene Aktivität der Isoflavone von der verabreichten Konzentration, aber auch vom Geschlecht und den damit

verbundenen endogenen E2 Spiegeln abhängt. Ähnliches bestätigen auch andere Studien, die zeigten, dass eine antilipogene Wirkung der Isoflavone erst bei hohen Plasmakonzentrationen von über 1,75 µM erreicht wurde, die in der Maus bereits adverse Effekte auf den Uterus, wie eine Uterotrophie, bewirkt haben (Naaz et al. 2003). In der hier vorliegenden Studie liefern Daten zu den Gewichten einiger Sexualorganen beider Geschlechter und hormonsensitiver Muskeln (*M. levator ani*) in den Männchen keine Hinweise auf adverse Wirkung der Isoflavone unter den erzielten Plasmaspiegeln. Zwar zeigte sich ein statistisch signifikanter Anstieg des Prostatagewichts nach Isoflavonexposition in der intakten WD Gruppe um 6%, doch ist dieser Anstieg so minimal, dass er als biologisch nicht relevant angesehen werden kann. Dennoch fehlen zur genauen Beurteilung des endokrin disruptiven Potentials weitere Parameter wie z.B. die Untersuchung der Keimdrüsen, der Pubertätseintritt über das *vaginal opening* bzw. *balano-preputial separation* oder die Kontrolle des Zyklus.

Die adipogene Wirkung wurde bisher in der Literatur nur für männliche Mäuse, nicht jedoch für Ratten beschrieben und konnte auch in unserem Versuch nicht beobachtet werden. In einer Studie von Müller et al. konnte bei gleichem CON ISO Futter mit ähnlichen hohen erzielten Plasmaisoflavonspiegel von 3400 nM in männlichen Wistar Ratten ebenfalls keine Veränderung der viszeralen Fettmasse beobachtet werden (Müller, Basso, et al. 2016). Dies deutet an, dass der adipogene Effekt in Männchen auch speziesabhängig sein könnte. Vergleichende Untersuchungen zum Isoflavonmetabolitenspektrum im Serum von Mensch, Maus und Ratte haben gezeigt, dass die Maus (3,1 – 26,0%) einen wesentlich höheren Anteil an biologisch aktiven Aglykonen aufweist als der Mensch (0,5 – 1,3%) und die Ratte (0,5 – 3,1%), bei denen die Aglykonmetabolisierungsrate näher beieinander liegt (Soukup et al. 2016). Es wird vermutet das Aglykone die biologisch aktivste Form der Isoflavone sind und neben Equol für die meisten biologischen Effekte verantwortlich sind. Zudem konnte in der Maus gezeigt werden, dass Aglykone bereits nach kurzer Exposition im Körper akkumulieren, wo sie jederzeit mobilisiert werden können (Penza et al. 2007).

Thyroidhormone sind ein wichtiger Regulator der Energiehomöostase und wirken auch auf die Fettgewebsakkumulation im Körper. Über den Thyroidrezeptor (TR) regulieren sie den Cholesterol- und Glucosemetabolismus und wirken zudem auf die hepatische Insulinsensitivität (Mullur et al. 2014). Ein Absinken der Sexualhormone kann besonders im weiblichen Organismus mit Veränderungen der Schilddrüsenhormonspiegel einhergehen und die Schilddrüsenfunktion beeinträchtigen (Schindler 2003). Eine Schilddrüsenunterfunktion ist mit einer Fetteinlagerung assoziiert und kann so zu Übergewicht führen. Zudem kann Überwicht sekundär ebenfalls Einfluss auf die Schilddrüsenhormone nehmen (Pearce 2012).

In unserem Versuch zeigte sich dies in einem Abfall der T4 Spiegel im Serum der WD Weibchen, hier besonders in ovariektomierten Tieren. Isoflavone verhinderten ein Absinken der T4 Spiegel signifikant. Dies ist in Übereinstimmung mit Daten aus Primaten die zeigen, dass eine Langzeitfütterung mit Isoflavonen den Abfall der T4 Serumspiegel in Folge einer Gonadektomie antagonisieren konnte und zudem die Progesteronspiegel erhöhte (Silverstein et al. 2014). Es wird angenommen, dass ein veränderter Sexualhormonstatus die Synthese und Stabilität der Transportproteine für die Thyroidhormone sowie die HHT-Achse beeinflusst (Tahboub und Arafah 2009). Die Wirkung der Isoflavone auf die HHT-Achse könnte somit zu den beobachteten kompensatorischen Effekten auf die T4-Spiegel geführt haben und deutet auf eine potenziell regulierende Wirkung in Bezug auf die Schilddrüsenfunktion. Eine Einordnung der physiologischen Bedeutung dieser Ergebnisse ist jedoch schwierig, da andere schilddrüsenassoziierte Parameter nicht bestimmt wurden.

4.4 Wirkung der Isoflavone auf die Skelettmuskulatur

Sarkopenie bezeichnet den fortschreitenden Abbau der Muskelmasse und -kraft mit dem Alter. Einer der Hauptursachen, die zu einem Muskelabbau und Kraftverlust im Alter führen, ist ein Absinken der Sexualhormonspiegel und damit einhergehende Veränderungen in Inflammationsprozessen, Muskelregeneration und Proteinsynthese (Brown 2008).
Das männliche Sexualhormon Testosteron ist ein anabol wirkendes Hormon, das unter anderem Einfluss auf die Körperkomposition und Fettgewebsverteilung im männlichen Organismus hat (Katznelson et al. 2011; Mårin et al. 1992). Die Orchiektomie bewirkt ein Absinken der Androgenspiegel, das die Tiere in einen Zustand versetzen soll, der ähnlich der Andropause beim Mann ist und Veränderungen der Körperzusammensetzung mit sich bringt. Die Orchiektomie in den Männchen führte verglichen mit den intakten Tieren der WD Gruppe zu einer schwächeren Gewichtszunahme ab PND 80. Die viszerale Fettgewebsmasse sowie die Skelettmuskulatur blieben davon jedoch unbeeinflusst. In orchiektomierten männlichen Ratten konnten Isoflavone einer verminderten Körpergewichtzunahme nach Orchiektomie entgegenwirken, ohne die viszerale Körperfettmasse oder die Adipozytengröße maßgeblich zu beeinflussen. Dies lässt zunächst vermuten, dass ein Abfall der endogenen Androgenspiegel zu einer Veränderung der Körperzusammensetzung geführt haben könnte, der durch die Isoflavone kompensiert wurde. In unserem Versuch war es jedoch nicht möglich eine Verschiebung der Körperzusammensetzung in Männchen abzubilden, da unter Isoflavongabe keine Unterschiede im Gewicht der Muskeln oder der Fettmasse festgestellt wurden. Auch das Gewicht des Tibiaknochens zeigte keine Veränderungen, was potentiell auf eine Veränderung der Knochenmasse bzw. dichte hätte schließen lassen können.

Bei Betrachtung der Wirkung auf die Muskelmasse in den Weibchen, deutet sich dagegen an, dass Isoflavone den Erhalt der Muskelmasse positiv beeinflussen können. Hier verhinderten Isoflavone eine durch die Ovariektomie ausgelöste Abnahme der Muskelmasse im *M. soleus*, teilweise auch im *M. gastrocnemius*.

In der Skelettmuskulatur werden beide ER exprimiert, womit sie zu den estrogen-responsiven Geweben gehört. Die positive Wirkung von Estrogenen auf die Regenerationsfähigkeit, Muskelkontraktionskraft und Glucosehomöostase der Skelettmuskeulatur ist bereits hinlänglich in der Literatur beschrieben (Lowe et al. 2010). Durch ein Absinken der Estrogenspiegel in postmenopausalen Frauen, aber auch im ovariektomierten Tiermodell, kommt es zu einem Muskelmasse- und Muskelkraftverlust. Mechanistisch liegt dem der Verlust an Muskelfasern ausgelöst durch erhöhte Apoptose, Inflammations- und Oxidationsprozesse sowie strukturelle Veränderungen des Myosinmoleküls zu Grunde (Brown 2008; Lowe et al. 2010). Die Folgen sind neben der verringerten Kraft auch eine verminderte Insulinsensitivität des Muskels. Besonders die Kombination aus Übergewicht und Sarkopenie fördert so metabolische Folgeerkrankungen (Cleasby et al. 2016).

Als estrogensensitives Gewebe bietet die Skelettmuskulatur auch ein potentielles Zielorgan für Isoflavone. In postmenopausalen Frauen und estrogendefizienten Nagern können Isoflavone einem Verfall der Muskelmasse entgegenwirken, der durch ein Absinken der E2-Spiegel induziert wurde. Wie humane Interventionsstudien, aber auch Studien in Ratten zeigen, wird die effektivste Wirkung auf den Muskelmasse- und Muskelkrafterhalt nach der Menopause mit einer Kombination aus moderatem Training und Isoflavonen erzielt (Aubertin-leheudre et al. 2007; Moeller et al. 2003; J. Wu et al. 2004; W. Zheng et al. 2017).

Die diskutierten Mechanismen, wie Isoflavone auf die Muskulatur wirken, sind vielfältig. In einer Studie in Mäusen von Tabata et al. war bereits eine 1-wöchige Gabe von Isoflavon-Agykonen mit dem Futter in der Lage einer Atrophie des *M. gastrocnemius* ausgelöst durch Denervierung entgegenzuwirken. Als zu Grunde liegender Mechanismus wurde eine gehemmte Apoptose in den Muskelfasern vermutet (Tabata et al. 2017).

Möglich ist, dass die Effekte von Isoflavonen im Muskel über eine estrogene Wirkung auf den ERβ vermittelt werden, wie sie auch für E2 und andere ERβ-Agonisten beschrieben werden (Moran et al. 2007; Velders et al. 2012; Weigt et al. 2012). Velders et al. konnten in Ratten zeigen, dass GEN ähnlich wie auch E2 die MHC-1 (myosin-heavy-chain = schwere Kette des Myosinmoleküls) Expression stimuliert, indem es über den ERβ wirkt (Velders et al. 2010). Die schwere Kette des Myosins hat eine entscheidende Funktion für die Muskelkontraktion und eine verbesserte MHC Komposition in Muskelfasern kann somit zum Erhalt einer gesunden Muskelfunktion beitragen.

Zum anderen ist eine IGF-1 vermittelte Wirkung auf die Muskelregeneration und das Muskelwachstum möglich, wie es bereits für GEN und andere ERβ-Agonisten in männlichen Nagern beschrieben wurde (Velders et al. 2012). IGF-1 ist ein systemisch zirkulierendes Peptidhormon, dass an der Signalübermittlung von proliferativen und apoptotischen Prozessen beteiligt ist (J. I. Jones und Clemmons 1995). E2 und ER-Agonisten führen zu einer erhöhten IGF-1 Expression und setzen eine Signalkaskade in Gang, die über eine Aktivierung von Satellitenzellen, die Muskelregeneration und das Muskelwachstum fördert (Enns und Tiidus 2008; Velders et al. 2012). Zumindest auf systemischer Ebene konnte dies in unserem Versuch nicht bestätigt werden, da es zu keiner Veränderung der gemessenen IGF-1 Serumspiegel der Weibchen kam. Untersuchungen zu IGF-1 Gewebespiegeln im Muskel wären eine Option für weiterführende Studien zur anabolen Wirkung der Isolfavone.

Genexpressionsanalysen im *M. soleus* weiblicher ovariektomierter Ratten, die mit dem gleichen WD Futter ernährt wurden wie unsere, demonstrieren, dass ERβ-Agonisten sowie in geringerer Intensität auch GEN die Expression lipogener Gene wie SREBP 1c und FAS herunterregulieren kann und so einer ektopen Fettablagerung im Muskel entgegenwirkt (Weigt et al. 2013). Zusätzlich muss berücksichtigt werden, dass Übergewicht zu einer leichten Steigerung der Muskelmasse und Muskelkraft in den Extremitäten führen kann, wobei die gewichtsbezogene Leistung geringer ausfällt als bei Normalgewicht (Lafortuna et al. 2005). Dieser Kompensationseffekt konnte auch in den weiblichen intakten Ratten beobachtet werden, die unter WD Futter signifikant erhöhte Muskelgewichte des *M. soleus* aufwiesen.
Bei parallel erfolgenden antilipogenen und anabolen Effekten von Isoflavonen auf den Muskel, wäre eine Betrachtung der Muskelgewichte nicht ausreichend, da sich die Effekte gegenseitig aufheben. Dies könnte erklären, warum in männlichen Tieren Effekte auf den *M. soleus* und *M. gastrocnemius* ausblieben. Zur genauen Aufklärung muskulärer Effekte bedarf es daher zukünftig einer Analyse der gesamten Magermasse des Körpers sowie histologischen, aber auch molekularbiologischen Untersuchungen der Skelettmuskeln.
Unsere Daten deuten darauf hin, dass Isoflavone den Erhalt der Muskelmasse im weiblichen Organismus bei Absinken der Estrogenspiegel fördern und zu einer gesunden Muskelfunktion beitragen können. Eine Wirkung auf den Muskelmasseerhalt in Männchen nach Orchiektomie konnte in diesem Versuch zwar nicht gezeigt werden, wurde in männlichen Ratten aber bereits für E2 und anderen ERβ-Agonisten beschrieben (Velders et al. 2012) und lässt vermuten, dass Isoflavone auch im männlichen Organismus über ERβ-vermittelte Signalwege auf die Skelettmuskulatur wirken könnten.

Der Skelettmuskel ist einer der wichtigsten Orte der ß-Oxidation von Fettsäuren. Ein ausgewogenes Verhältnis von Muskelmasse und Fett sowie eine gesunde Muskelfunktion sind somit wichtig für die Balance der Energiehomöostase im Körper.

4.5 Wirkung der Isoflavone auf die Blutlipide

Ein Risikofaktor für die Ausprägung kardiovaskulärer Erkrankungen und eine der vier Säulen des Metabolischen Syndroms ist die ungünstige Verteilung der Lipoproteine im Serum. Im Rahmen einer solchen Dyslipidämie kommt es zu erhöhten Triglyzerid-, LDL- und VLDL-Spiegeln, bei häufig erniedrigten HDL-Spiegeln. Viszerales Übergewicht, Insulinresistenz, aber auch der Abfall in der Sexualhormonproduktion im Alter, können zu einer solchen Dyslipidämie führen (Carr 2013; Després und Lemieux 2006; Jung und Choi 2014; Muller et al. 2005; Stevenson et al. 1993).

Isoflavone gelten als hoffnungsvolle Alternative bei der Therapie und Prävention der Dyslipidämie, da einige Studien zeigen, dass sie den Fettmetabolismus und mit ihm die Blutlipide positiv beeinflussen (S. Kim et al. 2004; Kirk et al. 1998; Y. M. Lee et al. 2006; Uesugi et al. 2001; J.-Y. Yang et al. 2006).

In unserem Versuch kam es durch das WD Futter mit seinem erhöhten Anteil an ungesättigten Fettsäuren und Cholesterin zu einer Steigerung des Gesamtcholesterins, der LDL- und HDL-Spiegel im Serum ovariektomierter weiblicher Tiere. In den intakten Tieren der WD Gruppe konnte dagegen kein Unterschied zur Kontrollfuttergruppe erzielt werden. Anders als in Weibchen, kam es in allen WD Gruppen der Männchen zum erwarteten Anstieg der Serumlipidwerte von Triglyzeriden, Cholesterol, LDL und HDL. Dies verdeutlicht, dass die Ernährung und der Füllungszustand der Lipidspeicher einen starken Einfluss auf die Blutfettwerte nehmen.

Isoflavone führten in intakten Männchen zu einer leichten Reduktion der Triglyzeride, die auch eine leicht verminderte viszerale Fettmasse aufwiesen. In Weibchen blieb eine Wirkung der Isoflavone dagegen gänzlich aus. Dies verdeutlicht, dass die Isoflavonexposition generell eher eine schwächere Wirkung auf die Blutlipide hatte. Unsere Beobachtungen decken sich mit Ergebnissen aus einer Studie von Weigt et al. 2013, die keine Verbesserung der Blutlipide bei 10-wöchiger Fütterung mit GEN-haltigem Futter in übergewichtigen ovariektomierter Ratten festgestellt haben (Weigt et al. 2013).

Andere Studien in Nagern zeigen, dass Isoflavone in der Lage sind Triglyzeride und Cholesterol und Lipoproteine im Serum positiv zu beeinflussen. Bhattarai et al. demonstrieren, dass eine 4-wöchige Behandlung von weiblichen Sprague-Dawley Ratten mit isoliertem DAI über die Nahrung das Serumcholesterol, sowie Cholesterin in der Leber in intakten und ovariektomierten Tieren signifikant senken konnte. In einer mit isoliertem GEN

behandelte Gruppe blieb diese Wirkung aus, dafür kam es hier zu einer veränderten Expressionsmuster an Genen, die am Cholesterolmetabolismus beteiligt sind (Bhattarai et al. 2017). Besonders das LDL-Cholesterol, das an der Bildung der atherosklerotischen Plaques beteiligt ist und somit das kardiovaskuläre Risiko erhöht, kann durch Isoflavone gesenkt werden (Y. M. Lee et al. 2006; J.-Y. Yang et al. 2006). *In vivo* Studien an LDL-Rezeptor defizienten Knockout-Mäusen demonstrieren, dass die Reduktion der Plasmacholesterolspiegel auf eine Steigerung der hepatischen LDL-Rezeptoraktivität zurückzuführen ist (Kirk et al. 1998). *In vitro* Studien in HepG2 Leberzellen unterstützen diese Theorie und deuten auf eine vorangeschaltete Regulation über SREBPs (Mullen et al. 2004; Owen et al. 2004). Der LDL-Rezeptor zählt zu den Genen, die vermittelt durch das Sterol-regulierende-Element (SRE) über SREBP 2 reguliert werden. Mullen et al. konnten in hepatischen HepG2 zellen zeigen, dass Isoflavone in der Lage sind SREBP 2 und die Expression SRE-regulierte Gene zu induzieren und so die hepatische Aufnahme von LDL über eine erhöhte LDL-Rezeptoraktivität oder –expression zu erhöhen. Basierend auf diesen Erkenntnissen *in vitro*, würde sich eine erhöhte LDL-Aufnahme in einer erhöhten Plasma-Cholesterol-Clearance *in vivo* äußern, so die Autoren. SREBP 1 hingegen, das vornehmlich an der Regulation der Fettsäuresynthese beteiligt ist, war in der zuvor beschriebenen Studie nicht deutlich reguliert (Mullen et al. 2004). Dies deutet zunächst daraufhin, dass Isoflavone hauptsächlich an der Regulation der Cholesterolbiosynthese und dem Cholesterolmetabolismus beteiligt sind.

Die physiologische Bedeutsamkeit der Erkenntnisse aus *in vitro* Studien lässt sich allerdings schwer abschätzen, da hier häufig sehr hohe Konzentrationen an Isoflavonen zum Einsatz kamen, die *in vivo* selten erreicht werden. In *in vivo* Studien, in denen von einer positiven Wirkung auf die Blutlipide berichtet wird, sind Isoflavone zudem häufig zusammen mit Sojaproteinen verabreicht worden. Da Sojaproteine alleine bereits hypocholesterolämische Effekte erzielen können, ist anzunehmen, dass diese zu einer potentiellen Wirkung isolierter Isoflavone beitragen, sie modulieren oder sogar gänzlich dafür verantwortlich sind (Sacks et al. 2006). Zudem zeigen Metaanalyen zur blutlipid-senkenden Wirkung isolierter Isoflavone im Menschen ein heterogenes Bild und bestätigt oftmals nicht die Wirkung im Tierexperiment (Taku et al. 2007; Weggemans und Trautwein 2003).

Ein interessanter Aspekt bei der Betrachtung der Lipoproteinspiegel ist, dass die Lipoproteine Einfluss auf die Wirksamkeit der Isoflavone nehmen können. Da der Transport von Isoflavonen im Blut zu 50% über Lipoproteine erfolgt (Rüfer et al. 2009), könnte der veränderte Lipoproteinmetabolismus in Folge des WD Futters zu einer verminderten Gewebeverfügbarkeit geführt haben und damit zur schwächeren Wirkung von Isoflavonen auf das Fettgewebe in WD Tieren beigetragen haben. Auf Grund fehlender Daten zu

Isoflavongewebespiegeln kann dieser Theorie an dieser Stelle jedoch nicht weiter nachgegangen werden.

4.6 Wirkung auf die mRNA Expression von Markergenen des Fettstoffwechsels in Leber- und Fettgewebe

Das Ausmaß der Fettakkumulation im Körper wird maßgeblich durch die Balance aus Triglyzeridsynthese und –abbau (Lipogenese/Lipolyse) bestimmt (Song et al. 2018). Neben der Zufuhr von Fettsäuren über die Nahrung, stellt auch die *de novo* Lipogenese in der Leber und im Fettgewebe einen wichtigen Stoffwechselweg dar, der Fettsäuren für die Triglyzeridsynthese bereitstellt (Wong und Sul 2010). Dabei wird die *de novo* Lipogenese auf Transkriptionsebene über ernährungsbedingte, hormonelle und metabolische Stimuli reguliert (Sanders und Griffin 2016; Strable und Ntambi 2010).

Zur mechanistischen Aufklärung der Isoflavonwirkung auf den Lipidstoffwechsel wurde eine auf mRNA basierende Genexpressionsanalyse lipogener Marker des Leber- (nur Weibchen) und Fettgewebes der Tiere durchgeführt.

Der Transkriptionsfaktor SREBP 1c spielt eine zentrale Rolle bei der Vermittlung zwischen nutritiven bzw. hormonellen Stimuli und reguliert die Expression nachgeschalteter lipogener Enzyme wie ACC und FAS in Leber und Fettgewebe (Eberlé et al. 2004). Bei einer erhöhten Nahrungs- bzw. Energiezufuhr in Form von Kohlenhydraten kommt es zu erhöhten Glucosespiegeln und damit zu einem Anstieg der Insulinkonzentration im Blut. Insulin verstärkt die Transkription von SREBP 1c in der Leber und im Fettgewebe und kurbelt so die Signaltransduktion nachgeschalteter Gene der *de novo* Fettsäuresynthese und Cholesterolsynthese an (Kersten 2001).

In den Weibchen konnte mit WD Futter eine leichte Steigerung der SREBP 1c Expression in der Leber beobachtet werden. Die erhöhte PPARα Expression, die für Übergewicht charakteristisch ist, deutet zudem auf eine verstärkte Fettsäuremobilisation und einen veränderten Lipoproteinmetabolismus in der Leber (Memon et al. 2013), und spiegelt sich auch in erhöhten Serumkonzentrationen an Cholesterol der übergewichtigen Weibchen wieder.

Im Fettgewebe war dagegen die Genexpression lipogene Marker wie SREBP 1c, FAS und ACC unter WD Futter verglichen mit der Kontrollfuttergruppe unverändert oder sogar vermindert. Diese Beobachtungen sind ähnlich zu Ergebnissen anderen Studien in Nagern unter stark fetthaltiger Ernährung, die bei erhöhter viszeraler Fettakkumulation erniedrigte Proteinexpression an lipogenen Enzymen, darunter auch FAS, im Fettgewebe aufwiesen (Jiang et al. 2009). In genetisch veränderten Leptin-defizienten Mäusen, die Übergewicht ausbilden, zeigte sich eine verminderte mRNA-Expression von SREBP 1c und anderer

adipogener bzw. lipogener Gene (Nadler et al. 2000; Soukas et al. 2000). Auch im Menschen zeigt sich bei Übergewicht eine verminderte Expression von SREBP 1c im Fettgewebe (Kolehmainen et al. 2001) .

Diese Beobachtungen weisen auf einen Adaptionsmechanismus als Antwort auf die erhöhte Energie- bzw. Fettzufuhr mit der Nahrung. Das verwendete WD Futter hat gegenüber dem Kontrollfutter neben einem erhöhten Anteil an Einfach- und Zweifachzuckern auch einen erhöhten Anteil an Fett (3% in CON vs. 20% in WD). Dieser setzt sich vor allem aus einfachgesättigten und ungesättigten Fettsäuren zusammen. Ein erhöhte Zufuhr an Fettsäuren und Triglyzeriden mit der Nahrung kann zu einer Reduktion der *de novo* Lipogenese und damit zur verminderten Expression an lipogener Gene in den Adipozyten führen (Duarte et al. 2014; Tang et al. 2016), wohingegen in der Leber die Expression lipogener Gene stimuliert wird (Lin et al. 2005). Bereits in anderen Studien unserer Arbeitsgruppe, die mit dem gleichen Futter in Ratten durchgeführt wurden, kam es zu einer verminderten Expression an lipogenen Markern wie SREBP 1c und besonders auch FAS im Fettgewebe. In der Leber dagegen führte das Futter zu einer gegenüber der Kontrollgruppe erhöhten Expression (Weigt et al. 2013). Damit bestätigt sich, dass die unterschiedliche Regulation lipogener Gene in Leber und Fettgewebe auf den hohen Fettgehalt des Futters zurückzuführen sein könnte.

Auch Leptin kann die Fettsäure- und Triglyzeridsynthese regulieren, indem es die Expression von SREBP 1c und nachgeschalteter lipogener Gene unterdrückt (Jiang et al. 2009; Soukas et al. 2000). Wie sich auch in unserem Versuch zeigte, führen Überernährung und Übergewicht zur Ausprägung von erhöhten Leptinspiegeln (Hyperleptinämie). Für den liporegulatorischen Effekt des Leptins, ist jedoch eine funktionsfähige Leptinsensitivität der Zellen erforderlich, die bei Übergewicht meist nicht mehr gegeben ist (Jéquier 2002). Bei einer verminderten Ansprechbarkeit auf Leptin bliebe somit eine Regulation von SREBP 1c aus. Dies könnte eine weitere mögliche Ursache für die leicht erhöhte hepatische SREBP 1c Expression in WD ernährten und ovariektomierten Weibchen sein.

Die kontinuierliche Isoflavonexposition führte in Weibchen der Kontrollfuttergruppe zu einer verminderten mRNA Expression von SREBP 1c und ACC, sowie in ovariektomierten Tieren zu einer verminderten Expression von SREBP 1c und FAS in der Leber. PPARα hingegen blieb unreguliert. Dies könnte darauf hindeuten, dass Isoflavone auf die *de novo* Fettsäuresynthese in der Leber wirken. Dieser Effekt ist vor allem auf die normalgewichtigen Weibchen der Kontrollfuttergruppe beschränkt, zeigt sich aber auch in ovariektomierten Weibchen, die besonders starkes Übergewicht aufwiesen. Damit deuten unsere Beobachtungen an, dass Isoflavone auf mRNA Expressionsebene auf Regulationsmechanismen zur Kontrolle der Lipogenese einwirken können. Welche

Auswirkungen dies auf Proteinebene hat, konnte an Hand unseres Versuchs nicht geklärt werden. Daher sind auch die physiologischen Auswirkungen nicht eindeutig in Korrelation zu setzen. Andere Studien in Ratten unter ähnlicher fett- und glucosereicher Ernährung zeigen, dass GEN in der Lage ist, über eine Reduktion der hepatischen Lipidsynthese sowie eine Steigerung der Fettsäureoxidation, einer Fettakkumulation in der Leber und damit einer hepatischen Steatose vorzubeugen (Y. M. Lee et al. 2006).

Einer der Mechanismen wie Isoflavone den Lipidstoffwechsel beeinflussen können, ist die Wirkung auf Signalwege, die durch Transkriptionsfaktoren wie SREBPs in Gang gesetzt werden. Auch in *in vitro* Versuchen an isolierten HepG2 Leberzellen war GEN in der Lage die Expression von SREBP 1c und weiteren Zielgenen der Transkriptionskaskade, wie unter anderem FAS und ACC, herunter zu regulieren. Als ursächlicher Mechanismus wurde die Inhibierung der Side-1 Protease Expression aufgeführt, die für den Abspaltungsprozess bei der Aktivierung von SREBP verantwortlich ist (Shin et al. 2007).

In den Weibchen deutete sich zudem eine leichte Tendenz zu erhöhten PPARα Genexpression in intakten Tieren der WD Gruppe an, die lebenslang mit Isoflavonen exponiert wurden.

GEN und DAI, nicht aber GLY, sind in der Lage an PPARs zu binden und sie über Phosphorylierung zu aktivieren (Dang et al. 2003; S. Kim et al. 2004; Shen et al. 2006). PPARs gelten als Lipidsensoren. Bei einer physiologischen Aktivierung durch Fettsäuren, aber auch z.B. durch pharmakologisch wirksame Liganden, kommt es zur Transaktivierung von Genen, die an der Regulation der Adipogenese, des Lipidstoffwechsels und der Glucosehomöostase beteiligt sind sowie in Inflammationsprozesse eingreifen können (R. M. Evans et al. 2004). PPARα wird vor allem in der Leber exprimiert und wirkt dort auf Prozesse zur β-Oxidation von Fettsäuren (Botta et al. 2018).

Aktuelle Studien in männlichen Ratten, die ein vergleichbares fetthaltiges Futter wie in unserem Versuch erhielten, demonstrieren, dass GEN die Expression von Genen erhöht, die an der Fettsäureoxidation in der Leber beteiligt sind, darunter PPARα und die Acyl-CoA-Oxidase. Gleichzeitig inhibiert es Gene, die an der Lipidsynthese beteiligt sind. Dadurch konnten die Plasmalipide positiv beeinflusst werden und eine verminderten Fettakkumulation in der Leber erreicht werden (H. Liu et al. 2017). Eine Aktivierung von PPARα kann auch auf SREBP 1c vermittelte Genkaskade wirken, indem es die Expression von SREBP 1c über eine Hemmung der Leber-X-Rezeptor-Signalwege unterdrückt. So kann so über die Regulation nachgeschalteter Gene die Lipogenese herunter reguliert werden (Yoshikawa et al. 2003). Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung von PPARα durch GEN zu einer verstärkten Expression kataboler Enzyme des Lipidstoffwechsels führt (S. Kim et al. 2004). Da eine Aktivierung von PPARs durch Liganden wie Isoflavone nicht zwangsläufig mit

einer Erhöhung der Genexpression an PPARs einher geht, sondern vielmehr die Expression nachgeschalteter Gene beeinflusst, ließe sich erklären warum die Regulation der PPARα Expression nur schwach ausgeprägt war. Auf Grund fehlender Daten zu nachgeschalteter Gene von PPARα und der Signalkaskade auf Proteinebene, kann in unserem Versuch damit keine direkte Aussage über die β-Oxidation der Fettsäuren getroffen werden.
Zwar wurden die hepatischen Expressionsspiegel lipogener Marker nicht in den Männchen bestimmt, denkbar wäre aber, dass Isoflavone hier zu einer erhöhten ß-Oxidation der Fettsäuren geführt haben und so zu einer verbesserten Nutzung der Triglyzeride zur Energiegewinnung in der Leber und anderen Geweben beigetragen haben. Dafür sprechen die erniedrigten Triglyzeridspiegel und die verminderte Lipidspeicherung im viszeralen Fettgewebe in der intakten WD Gruppe, die Isoflavone bekam.

Im Fettgewebe der intakten Männchen der Kontrollfuttergruppe sowie in gonadektomierten Männchen und Weibchen konnte ähnlich wie in der Leber SREBP 1c, FAS und ACC durch eine späte Exposition mit Isoflavonen herabreguliert werden. In den normalgewichtigen Weibchen der Kontrollfuttergruppe kam es mit Isoflavonen gegenüber der isoflavonfreien Gruppe jedoch zu einer erhöhten mRNA Expression aller untersuchter adipogener Marker (SREBP 1c, FAS, ACC und PPARγ), obwohl Körpergewichte, die Fettgewebsmasse und Adipozytengrößen durch Isoflavone in diesen Gruppen vermindert waren. Dies deutet darauf hin, dass sich die Regulation lipogener Markergene im Fettgewebe von der in der Leber der unterscheidet. Da diese veränderte Regulation nur in der Kontrollfuttergruppe der Weibchen zu beobachten war, spielt möglicherweise auch das Futter bzw. der Ernährungszustand der Tiere eine Rolle bei der Wirkung auf die Genexpression.
Auch in intakten und orchiektomierten Männchen der WD Gruppe lagen die Expressionsspiegel an SREBP 1c, FAS und ACC bei kontinuierlicher Isoflavonexposition verglichen mit der jeweils isoflavonfrei aufgewachsenen Gruppe höher, überschritten aber nicht die Kontrollfuttergruppe wie in den Weibchen. Zusammen mit den schwächeren Wirkungen der Isoflavone auf die Fettgewebsakkumulation könnte dies darauf hindeuten, dass die *de novo* Lipogenese bei den Männchen auf einem physiologischen Niveau blieb. Zudem blieb auch die PPARγ Expression in Männchen unreguliert.
Eine mögliche Theorie, die den Zusammenhang zwischen der erhöhten Expression lipogener Gene im Fettgewebe und der verminderte Fettakkumulation in Weibchen erklären könnte, ist die Beeinflussung der Apoptose und der Erneuerung von Adipozyten durch Isoflavone. *In vitro* Studien an 3T3-L1 Adipozyten zeigen, dass GEN die AMP-aktivierte Proteinkinase aktiviert und so zu einer Inhibierung der Adipozytendifferenzierung und zu einer Apoptose ausdifferenzierter Adipozyten führt (J.-T. Hwang et al. 2005; Rayalam et al.

2007). Auch Kim et al. konnten zeigen, dass die Behandlung von ausdifferenzierten Adipozyten mit GEN zu einer erhöhten Apoptose führt. Die physiologischen Auswirkungen im Organismus wurden anschließend *in vivo* Studien an ovariektomierten Mäusen bestätigt. Hier führte eine 3-wöchige Fütterung mit Isoflavonen zu einer Reduzierung des Körpergewichts und des viszeralen Fettgewebes, die auf eine erhöhte Apoptoserate im viszeralen Fettgewebe zurückgeführt werden konnte (H.-K. Kim et al. 2006).

Die leicht erhöhte mRNA Expression von PPARγ in den Kontrollfuttergruppen der Weibchen könnte auf eine mögliche Aktivierung von PPARγ durch Isoflavone hindeuten. PPARγ wird vornehmlich im Fettgewebe exprimiert und beeinflusst dort die Adipogenese und Lipolyse (Botta et al. 2018; Tontonoz et al. 1994). Isoflavone sind in der Lage über die Aktivierung von PPARγ eine erhöhte Adipozytendifferenzierung zu erzielen und gleichzeitig die Insulin-stimulierte Glucoseaufnahme in Adipozyten zu erhöhen (Cho et al. 2010).

Folglich könnte eine PPARγ Aktivierung durch Isoflavone zu einer verstärkten Ausdifferenzierung von neuen Adipozyten in der intakten Kontrollfuttergruppe geführt haben. Junge, kleine Adipozyten weisen während ihrer Reifung eine erhöhte Lipogenese und damit eine erhöhte Expression adipogener Gene wie SREBP, FAS und ACC auf (Gregoire et al. 1998; Rosen 2005). Damit ließe sich erklären, warum trotz erhöhter mRNA Expression lipogener Gene eine verminderte Adipozytengröße der weiblichen Kontrollfuttergruppe bei Isoflavonexposition zu beobachten war.

Kleine „junge“ Adipozyten haben eine höhere Kapazität Lipide einzulagern, dabei sind sie zudem insulinsensitiver als große hypertrophe Adipozyten, die in ihrem hyperlipolytischen Zustand inflammatorische Prozesse auslösen können (Cinti et al. 2005; Ibrahim 2010; J. I. Kim et al. 2015). Eine stetige Erneuerung bestehender Adipozyten könnte somit zu einer Regulation der Fettgewebshomöostase beitragen und einer Insulinresistenz, sowie Inflammation vorbeugen. In Humanstudien konnte gezeigt werden, dass im Fettgewebe ein Gleichgewicht zwischen Apoptose und Adipogenese herrscht, bei der jährlich ca. 10% der Adipozyten erneuert werden (Spalding et al. 2008). Eine leichte Verschiebung des Apoptose/Adipogenese Gleichgewichts zu Gunsten der Apoptoserate, könnte bereits positive Auswirkungen auf die Fettgewebsmasse haben (Arner und Spalding 2010). Dennoch muss beachtet werden, dass im vorliegenden Versuch die adipozytäre Apoptose nicht näher untersucht wurde und auch die Adipozytenzahl nicht bestimmt wurde, weshalb dieser Theorie an dieser Stelle nicht weiter nachgegangen werden kann.

In unserem Versuch scheint diese Wirkung auf die Weibchen der Kontrollfuttergruppe beschränkt zu sein, die im Verhältnis zu WD Gruppen weniger exogene Fette über die Nahrung aufnehmen und damit vermutlich einen physiologischen Fettmetabolismus

aufweisen. Bei einem bereits gestörten Fettmetabolismus in übergewichtigen Tieren der WD Gruppen könnte die Wirkung der Isoflavone eingeschränkt sein.
Zum anderen müssen auch hier die unterschiedlichen Isoflavonplasmaspiegel zwischen der Kontrollfutter- und WD Gruppe sowie die möglicherweise veränderte Bioverfügbarkeit von Isoflavonen im Gewebe, die durch die erhöhten Lipoproteinspiegel im Plasma durch WD Futter zu Stande gekommen sein könnte, mit in die Bewertung der Effekte einfließen.
In Reportergenassays mesenchymaler Stammzellen, die zu Adipozyten heranreifen können, konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von PPARγ durch Isoflavone konzentrationsabhängig erfolgt. In niedriger Konzentration (< 1 µM) wirkt GEN estrogen und inhibiert die Adipogenese über die Bindung an ERs. In hohen Konzentrationen (> 1 µM) hingegen wirkt es als PPARγ-Ligand und bewirkt eine Hochregulation der Adipogenese (Dang et al. 2003). Möglich wäre, dass Isoflavone nur in Weibchen der Kontrollfuttergruppe zu einer PPARγ Aktivierung geführt haben, die höhere Plasmaisoflavonspiegel aufwiesen als die WD Gruppe. Da uns jedoch keine Isoflavonspiegel des Fettgewebes vorliegen, ist ein direkter Vergleich zu *in vitro* Studien schwierig.
Die Theorie zur konzentrationsabhängigen Aktivierung von PPARs und ERs durch Isoflavone besagt außerdem, dass sich beide Rezeptortypen gegenseitig auf transkriptioneller Ebene beeinflussen können und so eine Art Interaktion (*cross-talk)* ausüben. So können isoflavonaktivierte PPARs zu einem antiestrogenen Effekt beitragen, indem sie die ER-vermittelte Transkriptionsaktivität herunterregulieren. Umgekehrt kann die Aktivierung von ERs durch Isoflavone Einfluss auf die PPAR-vermittelte Transkriptionsaktivität haben (Dang et al. 2003; Dang und Löwik 2004). Als mögliche zu Grunde liegende Mechanismen werden die Cofaktor vermittele Inhibierung der PPAR-Transaktivierung und die Blockierung der ER an das estrogen responsive Element (ERE) diskutiert (Houston et al. 2003).

Anhand der untersuchten mRNA Expression der Markergene ist es schwierig genaue Rückschlüsse auf die mechanistischen Hintergründe zur verminderten viszeralen Fettakkumulation in Weibchen zu ziehen. Dennoch deutet sich an, dass die hepatische *de novo* Lipogenese durch Isoflavone herunterreguliert werden kann. Die biologische Bedeutsamkeit dieser Ergebnisse bleibt jedoch offen, da sich die Effekte nicht in den Blutlipiden der Weibchen wiederspiegeln. Im Fettgewebe scheint die Isoflavonwirkung auf die *de novo* Lipogenese sowohl in Männchen als auch in Weibchen eine eher untergeordnete Rolle zu spielen. Möglich ist das eine Verringerung des viszeralen Fettgewebes der Weibchen auch durch andere Prozesse, wie eine erhöhte Apoptoserate bei gleichzeitiger Fettzellerneuerung zu Stande gekommen sein könnte. Zur Klärung der genauen Ursachen bedarf es daher weiterer mechanistischer Untersuchungen.

4.7 Wirkung auf die mRNA Expression inflammationsassoziierter Markergene im Fettgewebe

Bei einer Entgleisung der Adipogenese kann es zu einer verstärkten Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen im Fettgewebe sowie zu einer verstärkten Infiltration von Makrophagen kommen, die selbst ebenfalls Zytokine sezernieren (Weisberg et al. 2003). Diese chronischen Inflammationsprozesse des adipösem Fettgewebes, fördern eine systemische Insulinresistenz und tragen so zur Entstehung von Diabetes Typ II bei und fördern die Entstehung von atherosklerotischen Plaques in der Gefäßwand (Freitas Lima et al. 2015). Zudem gelten sie als Krebsmediatoren und stellen eine Ursachen für die erhöhte Krebsinzidenz bei Übergewicht und Adipositas dar (Deng et al. 2016).

Die erhöhte Expression an IL6 im Fettgewebe WD ernährter Weibchen deutet in unserem Versuch darauf hin, dass die erhöhte Fettgewebseinlagerung mit inflammatorischen Prozessen in intakten, besonders aber in ovariektomierten Weibchen einher gegangen sein könnte. Zusätzlich kam es in diesen Gruppen zu einer erhöhten MCP1 Expression, die auf eine vermehrte Makrophagenrekrutierung hindeutet. In männlichen Ratten zeigten sich dagegen keine statistisch signifikanten Expressionsunterschiede von IL6 und MCP1 im Vergleich zur Kontrollfuttergruppe. Dies könnte andeuten, dass inflammatorische Prozesse hier generell weniger stark ausgeprägt waren. Der Grund dafür könnte in der ebenfalls schwächeren Ausprägung des Übergewichts mit einer schwächeren Zunahme an Fettgewebe in WD Gruppen liegen.

Hinzu kommt, dass im Gegensatz zu Zytokinen wie IL6 und IL10, die auch von Adipozyten sezerniert werden, MCP1 überwiegend durch Makrophagen sezerniert wird (Yoshimura et al. 1989). Bei einer geringen Makrophageninfiltration würde eine Genexpression an MCP1 daher so gering ausfallen, dass Expressionsunterschiede schwierig zu bewerten sind. Eine histologische Untersuchung des Fettgewebes hinsichtlich einer Makrophageninfiltration, könnte hier detailliertere Aufschlüsse geben.

Isoflavone konnten die mRNA Expression von MCP1 in intakten Weibchen und die IL6 Expression in ovariektomierten Weibchen gegenüber der jeweiligen Vergleichsgruppe senken. Gleichzeitig wurde die Genexpression des antiinflammatorischen Markers IL10 durch Isoflavone in übergewichtigen Weibchen hochreguliert. Dies könnte andeuten, dass Isoflavone in der Lage waren eine antiinflammatorische Wirkung im Fettgewebe weiblicher Tiere auszuüben. Diese Wirkung zeigte sich in Männchen nur in der Tendenz, jedoch nicht statistisch signifikant und bestätigt damit die geringere Wirkung der Isoflavone in den Männchen.

Die Hypothese zur antiinflammatorischen Wirkung der Isoflavone wird durch Ergebnisse aus *in vitro* und *in vivo* Studien, sowie Humanstudien unterstützt, die ebenfalls auf eine antiinflammatorische Wirkung der Isoflavone hindeuten (Yu et al. 2016). Sakamoto *et al.* konnten in Experimenten an Adipozyten zeigen, dass DAI die Expression inflammations-assoziierter Gene wie MCP1 und IL6 reduziert und so Inflammation im Fettgewebe mildern konnte. Der Effekt wurde auf eine Aktivierung von PPARα und PPARγ und eine Inhibierung der c-Jun N-terminale Kinase (JNK) Stoffwechselweges zurückgeführt (Sakamoto et al. 2014). In einer *in vivo* Studie an ovariektomierten Ratten, die zusätzlich ein Futter mit erhöhtem Fettanteil bekamen, konnten Sojaisoflavone oxidativen Stress und Inflammationsprozesse vermindern, die vom Fettgewebe ausgingen. So konnten erhöhte TNF-α Plasmaspiegel reduziert werden und die Expression an inflammatorischen Zytokine wie MCP1 verringert werden (Panneerselvam et al. 2016).

Eine systemische Inflammation, die auch durch Adipositas ausgelöst werden kann, ist ein Ausgangspunkt für kardiovaskuläre Erkrankungen (Després und Lemieux 2006). Isoflavone zeigten im Tiermodell positive Wirkung auf inflammatorische Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems, die häufig auch mit Übergewicht assoziiert sind (Anthony et al. 1998; Mezei et al. 2003; Yamakoshi et al. 2000). Als zentraler Mechanismus wird auch hier die Wirkung als PPAR-Agonist beschrieben (Chacko et al. 2007).

Inflammatorische Prozesse im Fettgewebe, die bei Übergewicht entstehen, sind zudem eng mit der Krebsentstehung und Tumorproliferation assoziiert (Cozzo et al. 2017; Deng et al. 2016). Besonders zu erwähnen sind hier Krebserkrankungen der Brustdrüse, des Eierstocks und der Prostata, da sie besonders nah an lipidreichen Strukturen wie dem Brustfettgewebe, dem periovariellen bzw. periprostatischen Fettgewebe lokalisiert sind (Calle und Kaaks 2004; Hsing et al. 2007; Simpson und Brown 2013; W. Zhang 2011). Neben der inflammatorischen Mikroumgebung einer Tumorzellen, spielen auch Faktoren wie eine systemische Hyperinsulinämie sowie eine Dysregulation der Sexualhormonproduktion im umliegenden Gewebe eine Rolle bei der Tumorentstehung im Zusammenhang mit Übergewicht (Cozzo et al. 2017).

Es wird vermutet, dass Isoflavone über ihre antiinflammatorische Wirkung zur Prävention und Therapie einiger Krebserkrankungen beitragen können (Yu et al. 2016).

In einer klinischen Studie in Prostatakrebspatienten führte eine Intervention mit soja-isoflavonhaltigem Brot zu einer Reduktion inflammatorischer Zytokine und Myeloid-Suppressorzellen, die beide an der Regulation von Entzündungsreaktionen sowie der Krebsentstehung und -progression beteiligt sind (Lesinski et al. 2015). Auch die Verabreichung von Isoflavonen in Kombination mit Curcumin, einem Wirkstoff aus Gelbwurz, konnte sowohl in *in vitro* Studien an einer Prostatakrebszelllinie, aber auch in klinischen

Studien an Männern mit gesunder Prostata eine antioxidative und antiinflammatorische Wirkung erzielen und die Produktion von prostataspezifischen Antigenen inhibieren, die ein Indikator für inflammatorische Prozesse in der Prostata darstellen (Ide et al. 2010).
In Humanstudien in postmenopausalen Frauen mit Metabolischem Syndrom zeigte sich nach sojareicher Diät eine verbesserte endotheliale Funktion und ein positiver Einfluss auf zu Grunde liegende inflammatorische Prozesse wie die Reduktion von IL18 und c-reaktivem Protein (Azadbakht et al. 2007). Zudem führte eine 2-wöchige Verabreichung von Sojamilch in postmenopausalen Frauen zu einer Reduktion der Serumkonzentrationen an TNF-α , IL1α und Monozyten (Huang et al. 2016). Hingegen blieb in anderen Studien an postmenopausalen Frauen ein Effekt durch Isoflavone auf inflammatorische Marker aus. Als einer der Ursachen wurde die fehlende Equolproduktion in älteren postmenopausalen Frauen herangezogen, die für einen Großteil der Isoflavonwirkungen verantwortlich gemacht wird (Mangano et al. 2013).
Eine Reduktion inflammatorischer Prozesse im Fettgewebe kann das Risiko für die Entstehung von adipositasassoziierten Erkrankungen wie Diabetes Typ II, kardiovaskulären Erkrankungen und Krebs minimieren (Deng et al. 2016; Nishimura et al. 2009). Eine antiinflammatorische Wirkung der Isoflavone in adipösem Fettgewebe, wie sie sich in diesem Versuch andeutet, könnte damit einen hoffnungsvollen Ansatz zur Vorbeugung metabolischer Erkrankungen und bestimmter Krebserkrankungen bieten, die im Zusammenhang mit Adipositas stehen.

4.8 Einfluss der Expositionszeit auf die antiadipogene Wirkung der Isoflavone

Die positive Wirkung der Isoflavone auf die viszerale Fettgewebseinlagerung und assoziierte Parameter, wie die Adipozytengröße und Leptinspiegel beschränkte sich in unserm Versuch auf Tiere die lebenslang bzw. schon *in utero* und in der postnatalen Phase mit Isoflavonen exponiert wurden. Bei einer 12-wöchigen Exposition in der adulten Phase (ISO switch) blieb der positive Effekt in Weibchen aus. Da diese subchronische Exposition nur in ovariektomierten Tieren getestet wurde und eine entsprechende Vergleichsgruppe in normalgewichtigen und übergewichtigen intakten Tieren fehlt, lässt sich nicht eindeutig sagen, ob es bei Plasmakonzentrationen ähnlich der intakten Kontrollgruppen und unter anderem Ernährungszustand zu einer Wirkung nach kurzzeitiger Gabe gekommen wäre.
Dennoch scheint sich der Wirkungseintritt in Bezug auf den Expositionszeitraum von Isoflavonen je nach Gewebe zu unterscheiden. So zeigte sich die Wirkung auf die Muskelmasse des *M. soleus* in den Weibchen auch nach kurzzeitiger Isoflavongabe.
Es gibt Hinweise, dass die Exposition mit Isoflavonen in frühen sensiblen Entwicklungsphasen (z.B. neonatal, pubertär), zu physiologischen Veränderungen führen

kann, die die Ausprägung von Erkrankungen im Erwachsenenalter verhindern oder beeinflussen (Badger et al. 2002). Zu erwähnen sind hier vor allem die Wirkung auf Knochen, Prostata und Brustgewebe (Blei et al. 2014; E. Dinsdale 2011; Fritz et al. 2002; Messina und Hilakivi-Clarke 2009; Tomar und Shiao 2008; Warri et al. 2008). Ein interessanter Mechanismus, der im Zusammenhang mit der antikanzerogenen Wirkung von Isoflavonen diskutiert wird, ist die epigenetische Modulation. Hierbei kommt es zu Veränderungen des Erbmaterials wie DNA-Methylierungen, Acetylierungen oder Histonmodifikationen, die die Genaktivitäten modifizieren und so die Entstehung von Krebs beeinflussen können. Nach dieser Theorie entscheidet auch der Expositionszeitraum von Isoflavonen, über die Wirkung auf die Ausprägung einer Erkrankung und damit auch über die positive Wirkung auf die Gesundheit (Pudenz et al. 2014). Die epigenetische Modulation wird damit auch als Ursache für die geringe Prävalenz einiger Erkrankungen in ost-asiatischen Ländern angesehen und könnte erklären, warum amerikanisch-asiatische Immigrantinnen ein 60% höheres Brustkrebsrisiko haben, wenn sie in westlichen Ländern geboren wurden, im Gegensatz zu Immigrantinnen, die in östlichen bzw. asiatischen Ländern geboren wurden (Ziegler et al. 1993).

Zur Wirkung von Isoflavonen in frühen Entwicklungsphasen während der Anlage des Fettgewebes *in vivo* existieren bislang nur wenige Studien. Die Arbeitsgruppe um Dolinoy et al. konnte in Agouti-Mäusen zeigen, dass eine maternale GEN Supplementation mit dem Futter während der Trächtigkeit Übergewicht in den Jungtieren verhindern konnte und darüberhinaus zu einer Veränderung der Fellfarbe führte. Als ursächlich wird eine Hypermethylierung am fetalen Genom angesehen, die bis ins adulte Alter bestehen bleibt. Die verwendete Konzentration an Isoflavonen im Futter betrug 250 mg/kg und liegt damit in Bereichen, die über eine sojareiche Ernährung auch im Menschen erreicht werden können (Dolinoy et al. 2006).

Kausale Zusammenhänge zwischen epigenetischen Veränderungen auf DNA-Ebene und den direkten physiologischen Ausprägungen im Tiermodell und im Menschen sind bisher noch wenig erforscht. Die Studie von Dolinoy et al. deutet jedoch an, dass die epigenetische Modulation bei der Wirkung von Isoflavonen auf die Fettgewebshomöostase eine Rolle spielen könnte.

Das Fettgewebe ist sensibel für die frühe Einwirkung von exogenen Einflüssen. Bereits während der 14. bis 23. Schwangerschaftswoche kommt es zur Adipogenese im Fötus (Poissonnet et al. 1983). Während der frühen Kindheit und Adoleszenz wird das weiße Fettgewebe und damit die Zahl der Adipozyten angelegt. Es konnte gezeigt werden, dass die Adipozytenzahl im Erwachsenenalter jedoch relativ konstant bleibt. Diese Homöostase wird über die Balance zwischen Adipogenese und Apoptose aufrecht erhalten. Selbst bei der Entwicklung von Übergewicht mit einer Steigerung der Fettgewebsmasse oder einer

Gewichtsreduktion bleibt die Adipozytenzahl in Erwachsenen nahezu gleich. Die frühe Adipogenese determiniert folglich maßgeblich die Speicherkapazität des Fettgewebes im Erwachsenen (Spalding et al. 2008). Es lässt sich daraus schließen, dass die Regulierung der Adipogenese während der fötalen Entwicklung und im frühen Kindesalter ein wichtiger Faktor in der Kontrolle von Übergewicht im Erwachsenenalter sein kann (Arner und Spalding 2010). Da Isoflavone in der Lage sind die frühe Adipozytendifferentierung, die Adipogenese und Apoptose von Adipozyten zu beeinflussen (J.-T. Hwang et al. 2005; H.-K. Kim et al. 2006; Liao et al. 2008; Rayalam et al. 2007; Valli et al. 2018), könnte sich somit eine frühe Exposition mit Isoflavonen während der Anlage der Fettdepots positiv auf die Speicherkapazität der Adipozyten auswirken. Dies lässt vermuten, dass eine eine Isoflavonexposition in Föten über die Plazenta oder eine isoflavonreiche Ernährung schon früh auf entscheidende Entwicklungsprozesse im Fettgewebe wirken kann und damit der Entstehung von Übergewicht zu einem späteren Zeitpunkt im Leben vorbeugen könnte.

Bei der Erwägung zur Nutzung von Isoflavonen in der Vorbeugung von Übergewicht, sollte jedoch berücksichtigt werden, dass Isoflavone bei Exposition in frühen Entwicklungsphasen und bei sehr hohen Dosen endokrin disruptive Wirkung mit sich bringen können. Hier ist vor allem die Exposition über Säuglingsernährung mit Sojamilch zu erwähnen, bei der es zu sehr hohen Plasmakonzentration kommen kann und für die in Nagern bereits adverse Effekte auf das Reproduktions- und Hormonsystem (E. C. Dinsdale et al. 2011; Elsa C. Dinsdale und Ward 2010; Jefferson et al. 2009; Müller, Soukup, et al. 2016) sowie eine Steigerung der Fettakkumulation in der postnatalen Phase weiblicher Ratten beschrieben wurden (Strakovsky et al. 2014). Aber auch bei der Exposition über die Muttermilch wurden bereits adverse Effekte auf die Geschlechtsorgane weiblicher Nager beobachtet (Z. Liu et al. 2008). Eine hohe Exposition während früher Entwicklungsphasen sollte daher differenziert betrachtet werden.

4.9 Übertragbarkeit auf den Menschen

In zahlreiche klinische Interventionsstudien wurde die Wirkung von Isoflavonen auf unterschiedliche Gesundheitsaspekte im Menschen untersucht. Vor allem postmenopausale Frauen lagen bisher im Fokus der Forschung, in denen die Wirksamkeit auf Wechseljahresbeschwerden, hormonabhängige Krebserkrankungen, aber auch auf die Blutlipide bzw. Lipoproteine untersucht wurden (Messina 2014, 2016). Die Datenlage zur Wirkung auf die Blutlipide ist heterogen und deutet an, dass nicht die Isoflavone allein für positive Effekte verantwortlich gemacht werden können (Sacks et al. 2006). Zudem gibt es bislang nur wenige Hinweise zu einer Gewichts- bzw. Fettgewebsreduktion nach

subchronischer Isoflavonexposition im Menschen (Goodman-Gruen und Kritz-Silverstein 2001; Sites et al. 2007). Dennoch deuten epidemiologische Studien auf einen Zusammenhang von sojareicher Ernährung und der geringere Ausprägung von Übergewicht und assoziierten Erkrankungen (Adlercreutz und Mazur 1997; Roccisano 2012). Welche genaue Rolle Isoflavone im Zuge einer lebenslangen sojareichen Ernährung bei der Ausprägung von Übergewicht spielen, ist bislang kaum erforscht. Die vorliegende Arbeit sollte daher Einblicke in die Wirkung von Isoflavonen auf das Fettgewebe liefern, die auch im Menschen von Bedeutung sein könnten.

Bei der Interpretation der Relevanz der Ergebnisse für den Menschen muss jedoch die unterschiedliche Physiologie von Nagetier und Mensch berücksichtigt werden.

Ein Aspekt, der die Übertragbarkeit auf den Menschen erschwert, ist die unterschiedliche Metabolisierung der Isoflavone, die auf Unterschiede in der bakteriellen Darmflora und Enzymausstattung zurückzuführen sind (Bolca et al. 2007; Setchell et al. 2011; Soukup et al. 2016). Während Nager wie Ratten und Mäuse ausnahmslos zur Equolbildung befähigt sind, sind lediglich 30 – 60% der Menschen Equol-Bildner (Bolca et al. 2007). Daher muss ein klarer Unterschied zwischen Equol-Bildnern und Nicht-Equol-Bildnern gemacht werden, bevor Vergleiche zu Tierdaten erfolgen. Hinsichtlich des relativ geringen Anteils an biologisch aktiven Isoflavonaglykonen am Phase-II-Metabolitenspektrum im Plasma, sind Ratten dem Menschen ähnlicher als z.B. Mäuse, die eine schwächer ausgeprägte Isoflavonkonjugation aufweisen und daher höhere Aglykonspiegel haben (Setchell et al. 2011). Im Gegensatz zu Ratten ist eine geschlechtsspezifische Phase-II-Metabolisierung im Menschen bislang nicht beobachtet worden (Soukup et al. 2016).

Des Weiteren ist zu bedenken, dass in diesem Versuch ein standardisierter Sojaextrakt zum Einsatz kam, der einer Isoflavonzusammensetzung in der Sojabohne gleicht, jedoch nicht vollständig einer sojabasierten Ernährung im Menschen gleichzusetzen ist. Die in diesem Versuch gewählte Verabreichung über das Futter bietet einige Vorteile gegenüber der sonst gebräuchlichen Verabreichung über die Schlundsonde, wie eine gleichmäßigere Verteilung der Dosis über den Tag und die Kombination mit in andere Nahrungsbestandteilen des Futters, die Einfluss auf die Aufnahme im Darm nehmen können. Dennoch zeigen sich einige wichtige Unterschiede zu einer sojabasierten Ernährung im Menschen. In sojahaltigen Nahrungsmitteln sind Isoflavone in eine bestimmte Nahrungsmatrix eingebunden. Dabei kann z.B. der Anteil an Sojaproteinen und Lignanen die Wirkung von Isoflavonen zusätzlich beeinflussen. Auch die Zubereitung und Weiterverarbeitung z.B. Erhitzung und Fermentierung haben einen bedeutenden Einfluss auf die Aufnahme und biologische Verfügbarkeit der Isoflavone und führt zu großen Varianzen in den Isoflavonplasmaspiegeln sojareich ernährter Personen (Mortensen et al. 2009).

Des Weiteren gibt es Unterschiede in den lipogenen Stoffwechselwegen zwischen Mensch und Ratte, die zu einer veränderten Wirkung von Isoflavonen im Fettgewebe führen könnten. Letexier et al. konnten zeigen, dass Menschen eine geringere Expression von ChREBP und niedrigere SREBP 1c, FAS und ACC Proteinspiegel im Fettgewebe aufweisen als Ratten und damit die lipogene Kapazität in Adipozyten eingeschränkt ist (Letexier et al. 2003).
Damit wird deutlich, dass ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Einflüsse in Mensch und Tier über die Wirksamkeit der Isoflavone entscheiden kann. Vor diesem Hintergrund bilden die Ergebnisse dieser Arbeit eine Grundlage für weitere Untersuchungen hinsichtlich der Relevanz im Menschen.

4.10 Limitationen des Versuchs und Ausblick

Ein wichtiger Faktor, der die Wirksamkeit und Wirkungsrichtung der Isoflavone auf den Fettstoffwechsel beeinflusst ist die Dosis und letztendlich die Konzentration, die im Blut und Gewebe ankommt. Dazu ist es essenziell die Plasmaisoflavonkonzentration zu ermitteln. Da im durchgeführten Versuch ein möglichst natürlicher Expositionsweg gewählt wurde, der ähnlich der Isoflavonaufnahme über die Nahrung beim in Menschen ist, und dennoch eine gute Charakterisierung und Dosierung ermöglicht, wurde die Beimischung isolierter Isoflavone zu dem Futter gewählt. Die Schwierigkeit bei solch einem Fütterungsversuch liegt darin, vergleichbare Plasmaspiegel innerhalb der Gruppen zu erzielen, die eine gute Vergleichbarkeit der Wirkung ermöglichen. Die Verabreichung über das Futter hat dabei den Nachteil, dass eine stetige Dosierung vom Fressverhalten der Tiere abhängig ist, das im Laufe des Versuchs schwanken kann. Die Reduktion des Futterkonsums der WD Futtergruppe führte zu einer niedrigeren Exposition mit Isoflavonen und dies zeigte sich am Ende des Versuchs in den reduzierten Plasmaspiegeln. Um dem vorzubeugen müsste die Isoflavonmenge im Futter entsprechend angeglichen werden. Da die Exposition während der frühen Entwicklung einen entscheidenden Einfluss auf die Entstehung von Übergewicht haben könnte, wäre zudem ein Monitoring der Plasmaspiegel zu ein bis zwei Zeitpunkten während des laufenden Versuchs sinnvoll. So könnte eine bessere Kontrolle der Exposition über den gesamten Versuchszeitraum gewährleistet werden. Auch die Messung der Gewebespiegel im viszeralen Fettgewebe und der Leber wären eine sinnvolle Ergänzung, um eine Aussage über die Gewebeverfügbarkeit machen zu können.
Im vorliegenden Versuch wurden, bis auf das stetige Monitoring des Körpergewichts und Futterkonsums, alle Parameter terminal erhoben. Die Fettgewebsuntersuchungen und die Genexpression stellen so nur einen Ist-Zustand zum Ende des Experiments dar. Interessant wäre es, das Fettgewebe und die Adipozytenzahl, sowie –größe bereits in der juvenilen

Phase zu untersuchen und/oder mit verschiedenen Kohorten zu arbeiten, um mögliche Effekte während früher Entwicklungsphasen aufzudecken zu können.
Wie dieser Versuch zeigt, kann es durch estrogen wirkende Substanzen wie den Isoflavonen zu Veränderungen der Körperzusammensetzung kommen, die nicht allein über die viszerale Fettgewebsmasse und ausgewählte Muskelgewichte abbildbar sind. Daher wäre eine Dual-Röntgen-Absorptiometrie (DEXA-Messung) eine mögliche Methode, um in zukünftigen Untersuchen detailliertere Informationen über den Fett-, Muskel- und Knochenmasseanteil im Körper über die gesamte Versuchsdauer zu erhalten. Zudem könnte in zusätzlichen histologischen Muskelfaseranalysen ein Effekt auf den Erhalt der Muskelmasse nach Gonadektomie näher beleuchtet werden.

5 Gesamtbetrachtung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Einflüsse einer lebenslangen isoflavonreichen Ernährung auf die Entwicklung von Übergewicht, die viszerale Fettakkumulation und den Fettstoffwechsel in männlichen und weiblichen Ratten untersucht und verglichen. Dabei wurde die Isoflavonwirkung in normalernährten und überernährten sowie zusätzlich gonadektomierten Tieren getestet.
Der Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Ratten zeigt, dass Isoflavone eine differentielle Wirkung auf das Fettgewebe haben, die vom Geschlecht, Ernährungszustand, Hormonstatus und den erreichten Isoflavonplasmakonzentrationen abhängt.
In Weibchen führte eine lebenslange Isoflavongabe zu einer Verringerung des Körpergewichts und der viszeralen Fettgewebseinlagerung, die sich teilweise auch in einer verringerten Lipideinlagerung in Adipozyten sowie verringerten Leptinspiegeln wiederspiegelt. In den Männchen konnte lediglich eine sehr geringe Veränderung auf das Fettgewebe beobachtet werden, dass sich jedoch nicht im absoluten Körpergewicht bemerkbar machte. In Weibchen beschränkten sich die Effekte vor allem auf intakte normalernährte Tiere, sowie auf übergewichtige ovariektomierte Tiere. In Männchen dagegen wurden Effekte auf das Fettgewebe nur in intakten Tieren, die WD Futter erhielten, beobachtet. Eine Steigerung des Körpergewichtes und Fettgewebes bei Isoflavonexposition, wie es stellenweise in der Literatur für männliche Mäuse beschrieben wird, wurde in der vorliegenden Studie nicht beobachtet.
Da die jeweiligen Isoflavonplasmakonzentrationen in den verschiedenen Futter- und Behandlungsgruppen variieren, ist zu vermuten, dass die unterschiedliche Effektstärke zwischen den Gruppen vor allem von den Plasmakonzentrationen abhängt.

Die deutlichsten Effekte auf das Fettgewebe zeigten sich in Tieren mit Isoflavonplasmaspiegeln von 1 - 2 µM, die bei sojareicher Ernährung auch im Menschen erreicht werden können (Morton et al. 2002; van der Velpen et al. 2014). Mit sehr niedrigen Plasmaspiegeln von < 1 µM in den Weibchen und sehr hohen Plasmaspiegeln von 3,6 µM in den Männchen konnten dagegen schwächere bis keine Effekte im Fettgewebe erzielt werden. Auch die Gonadektomie hatte einen Einfluss auf die Wirksamkeit der Isoflavone. Ovariektomierte Weibchen reagierten trotz relativ niedriger Plasmaisoflavonspiegel von 0,3 µM sensibler auf die antiadipogene Wirkung der Isoflavone.

Je nach Plasma bzw. Gewebekonzentration binden Isoflavone an unterschiedliche Transkriptionsfaktoren wie ERs und PPARs und können so antiadipogene, aber auch adipogene Wirkung erzielen (Dang 2009; Dang und Löwik 2004). Isoflavoneffekte auf den Adipozyten können so sehr komplex sein und zusätzlich in Abhängigkeit von Geschlecht und Ernährungszustand der Tiere variieren. Die unterschiedliche Ansprechbarkeit des männlichen Fettgewebes könnte zum anderen auch in einer unterschiedlichen Metabolisierung der Isoflavone gegenüber den Weibchen begründet sein. Männliche Tiere wiesen eine höhere Plasmakonzentration an Sulfatkonjugaten auf, wogegen in Weibchen überwiegend glucuronidierte Phase-II-Metabolite zu finden waren. Zudem war die Plasmakonzentration an biologisch aktiven Aglykonen trotz erhöhter Gesamtisoflavonspiegel in Männchen niedriger. Weiblichen Ratten wird zudem eine effizienteres enterohepatisches Recycling der Isoflavone zugeschrieben, was zu einer erhöhten Bioverfügbarkeit in entsprechenden Zielgeweben führt (Coldham und Sauer 2000).

Die Daten zur mRNA Expression deuten an, dass Isoflavone in Abhängigkeit vom Ernährungszustand der Tiere auf die Genexpression einiger Markergene des Lipidstoffwechsels in Leber und Fettgewebe Einfluss nehmen können, sowie in übergewichtiger Tiere die Expression von Markergenen beeinflussen können, die an Prozessen zur antiinflammatorischen Wirkung im viszeralen Fettgewebe beteiligt sind.

Eine Hypothese zur Wirkung der Isoflavone in den Weibchen ist, dass eine verbesserte Fettzellerneuerung zur antiadipogenen Wirkung durch Isoflavone im viszeralen Fettgewebe normalgewichtiger Weibchen beigetragen haben könnte. Auch eine epigenetische Modulation durch Isoflavone während der *in utero* sowie perinatalen Exposition, ist ein möglicher Mechanismus, der den antiadipogenen Effekt erklären könnte und in folgenden Untersuchungen näher betrachtet werden müsste.

Ein Nebenaspekt dieser Arbeit, war die Untersuchung der Skelettmuskulatur, die uns Einblicke in eine Änderung der Körperzusammensetzung nach Isoflavonexposition liefern sollte. Hier deutete sich an, dass eine lebenslange, aber auch eine subchronische Exposition, den Muskelabbau nach Estrogenabfall in ovariektomierten Weibchen aufhalten kann. Diese Hinweise liefern eine interessante Grundlage für weiterführende Forschung an

Isoflavonen und ihrer Wirkung auf die Körperzusammensetzung und den Muskelabbau in postmenopausalen Frauen.

Die vorliegenden Ergebnisse zur regulierenden Wirkung von Isoflavonen auf die Fettgewebsakkumulation und adipozytäre Hyperplasie in weiblichen Ratten zeigen, dass eine lebenslange moderate Isoflavonexposition zur Balance der Fettgewebshomöostase beitragen kann und so einen hoffnungsvollen Ansatz zur Vorbeugung von viszeralem Übergewicht und damit assoziierten metabolischen Erkrankungen und Krebs bieten könnte. Die Relevanz für den Menschen gilt es jedoch in weiterführenden Studien näher zu untersuchen, da Speziesunterschiede im Isoflavonmetabolismus eine Übertragbarkeit erschweren.

Im Zuge des wachsenden Trends hin zur vegetarischen bzw. veganen Ernährung gewinnt derzeit auch die Verwendung von Sojaprodukten als Bestandteil einer ausgewogenen Ernährung zunehmend an Bedeutung. Weiterführende Studien könnten damit auch einen Beitrag zur Bewertung und Einordnung gesundheitlicher Aspekte einer sojareichen vegetarischen Ernährungsform liefern.

Zwar zeigten sich bei den in unserem Versuch erreichten Plasmaspiegeln keine Hinweise auf eine akute adverse Wirkung im Hinblick auf die Sexualorgane, dennoch gilt es Risiken einer möglichen endokrin-disruptiven Wirkung auf das Hormonsystem und die Reproduktionsorgane bei der Exposition in bestimmten Personengruppen und Entwicklungsphasen zu berücksichtigen.

Literaturverzeichnis

Adlercreutz, H. (1995). Phytoestrogens: epidemiology and a possible role in cancer protection. *Environmental Health Perspectives*, *103*(Suppl 7), 103–112.

Adlercreutz, H., Bannwart, C., Wähälä, K., Mäkelä, T., Brunow, G., Hase, T., et al. (1993). Inhibition of human aromatase by mammalian lignans and isoflavonoid phytoestrogens. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *44*(2), 147–153.

Adlercreutz, H., & Mazur, W. (1997). Phyto-oestrogens and Western diseases. *Annals of Medicine*, *29*(2), 95–120.

Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., et al. (1987). Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *The Journal of Biological Chemistry*, *262*(12), 5592–5595.

Alberti, K. G. M., Zimmet, P., & Shaw, J. (2005). The metabolic syndrome—a new worldwide definition. *The Lancet*, *366*(9491), 1059–1062. doi:10.1016/S0140-6736(05)67402-8

Anderson, L. A., McTernan, P. G., Barnett, A. H., & Kumar, S. (2001). The effects of androgens and estrogens on preadipocyte proliferation in human adipose tissue: influence of gender and site. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *86*(10), 5045–5051. doi:10.1210/jcem.86.10.7955

Andres, S., Abraham, K., Appel, K. E., & Lampen, A. (2011). Risks and benefits of dietary isoflavones for cancer. *Critical Reviews in Toxicology*, *41*(6), 463–506. doi:10.3109/10408444.2010.541900

Anthony, M. S., Clarkson, T. B., & Williams, J. K. (1998). Effects of soy isoflavones on atherosclerosis: potential mechanisms. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *68*(6 Suppl), 1390S-1393S. doi:10.1093/ajcn/68.6.1390S

Arner, P., & Spalding, K. L. (2010). Fat cell turnover in humans. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *396*(1), 101–104. doi:10.1016/j.bbrc.2010.02.165

Asarian, L., & Geary, N. (2013). Sex differences in the physiology of eating. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *305*(11), R1215–R1267. doi:10.1152/ajpregu.00446.2012

Aubertin-leheudre, M., Lord, C., Khalil, A., & Dionne, I. J. (2007). Effect of 6 months of exercise and isoflavone supplementation on clinical cardiovascular risk factors in obese postmenopausal women: a randomized, double-blind study. *Menopause*, *14*(4), 624–629. doi:10.1097/gme.0b013e31802e426b

Axelson, M., & Setchell, K. D. (1981). The excretion of lignans in rats -- evidence for an intestinal bacterial source for this new group of compounds. *FEBS letters*, *123*(2), 337–342.

Azadbakht, L., Kimiagar, M., Mehrabi, Y., Esmaillzadeh, A., Hu, F. B., & Willett, W. C. (2007). Soy consumption, markers of inflammation, and endothelial function: a cross-over study in postmenopausal women with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*, *30*(4), 967–973. doi:10.2337/dc06-2126

Badger, T. M., Ronis, M. J. J., Hakkak, R., Rowlands, J. C., & Korourian, S. (2002). The Health Consequences of Early Soy Consumption. *The Journal of Nutrition*, *132*(3), 559S-565S. doi:10.1093/jn/132.3.559S

Barnes, S. (2010). The Biochemistry, Chemistry and Physiology of the Isoflavones in Soybeans and their Food Products. *Lymphatic Research and Biology*, *8*(1), 89–98. doi:10.1089/lrb.2009.0030

Basu, R., Chandramouli, V., Dicke, B., Landau, B., & Rizza, R. (2005). Obesity and type 2 diabetes impair insulin-induced suppression of glycogenolysis as well as gluconeogenesis. *Diabetes*, *54*(7), 1942–1948.

Bazuine, M., van den Broek, P. J. A., & Maassen, J. A. (2005). Genistein directly inhibits GLUT4-mediated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *326*(2), 511–514. doi:10.1016/j.bbrc.2004.11.055

Beilby, J. (2004). Definition of Metabolic Syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association Conference on Scientific Issues Related to Definition. *The Clinical Biochemist Reviews*, *25*(3), 195–198.

Beral, V., Bull, D., Reeves, G., & Million Women Study Collaborators. (2005). Endometrial cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet (London, England)*, *365*(9470), 1543–1551. doi:10.1016/S0140-6736(05)66455-0

Beral, V., Million Women Study Collaborators, Bull, D., Green, J., & Reeves, G. (2007). Ovarian cancer and hormone replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet (London, England)*, *369*(9574), 1703–1710. doi:10.1016/S0140-6736(07)60534-0

Berg, A. H., Combs, T. P., Du, X., Brownlee, M., & Scherer, P. E. (2001). The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nature Medicine*, *7*(8), 947–953. doi:10.1038/90992

BfR. (2007, Oktober 29). Isolierte Isoflavone sind nicht ohne Risiko - Aktualisierte Stellungnahme Nr. 039/2007 des BfR vom 29. Oktober 2007 - isolierte_isoflavone_sind_nicht_ohne_risiko.pdf. http://www.bfr.bund.de/cm/343/isolierte_isoflavone_sind_nicht_ohne_risiko.pdf. Zugegriffen: 4. November 2017

Bhattarai, K., Adhikari, S., Fujitani, M., & Kishida, T. (2017). Dietary daidzein, but not genistein, has a hypocholesterolemic effect in non-ovariectomized and ovariectomized female Sprague-Dawley rats on a cholesterol-free diet. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *81*(9), 1805–1813. doi:10.1080/09168451.2017.1350562

Biddinger, S. B., & Kahn, C. R. (2006). From mice to men: insights into the insulin resistance syndromes. *Annual Review of Physiology*, *68*, 123–158. doi:10.1146/annurev.physiol.68.040104.124723

Blaustein, J. D., & Wade, G. N. (1976). Ovarian influences on the meal patterns of female rats. *Physiology & Behavior*, *17*(2), 201–208.

Blei, T., Soukup, S. T., Schmalbach, K., Pudenz, M., Möller, F. J., Egert, B., et al. (2014). Dose-dependent effects of isoflavone exposure during early lifetime on the rat mammary gland: Studies on estrogen sensitivity, isoflavone metabolism, and DNA methylation. *Molecular Nutrition & Food Research*, *59*(2), 270–283. doi:10.1002/mnfr.201400480

Boden, G., Chen, X., & Stein, T. P. (2001). Gluconeogenesis in moderately and severely hyperglycemic patients with type 2 diabetes mellitus. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, *280*(1), E23-30. doi:10.1152/ajpendo.2001.280.1.E23

Bolca, S., Possemiers, S., Herregat, A., Huybrechts, I., Heyerick, A., De Vriese, S., et al. (2007). Microbial and dietary factors are associated with the equol producer phenotype in healthy postmenopausal women. *The Journal of nutrition*, *137*(10), 2242–2246.

Botta, M., Audano, M., Sahebkar, A., Sirtori, C. R., Mitro, N., & Ruscica, M. (2018). PPAR Agonists and Metabolic Syndrome: An Established Role? *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(4). doi:10.3390/ijms19041197

Brown, M. (2008). Skeletal muscle and bone: effect of sex steroids and aging. *Advances in Physiology Education*, *32*(2), 120–126. doi:10.1152/advan.90111.2008

Calle, E. E., & Kaaks, R. (2004). Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nature Reviews Cancer*, *4*(8), 579–591. doi:10.1038/nrc1408

Carpentier, A., Mittelman, S. D., Lamarche, B., Bergman, R. N., Giacca, A., & Lewis, G. F. (1999). Acute enhancement of insulin secretion by FFA in humans is lost with prolonged FFA elevation. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *276*(6), E1055–E1066. doi:10.1152/ajpendo.1999.276.6.E1055

Carr, M. C. (2013). The Emergence of the Metabolic Syndrome with Menopause. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *88*(6), 2404 –2411. doi:10.1210/jc.2003-030242

Cederroth, C. R., Vinciguerra, M., Kühne, F., Madani, R., Doerge, D. R., Visser, T. J., et al. (2007). A phytoestrogen-rich diet increases energy expenditure and decreases adiposity in mice. *Environmental Health Perspectives*, *115*(10), 1467–1473. doi:10.1289/ehp.10413

Chacko, B. K., Chandler, R. T., D'Alessandro, T. L., Mundhekar, A., Khoo, N. K. H., Botting, N., et al. (2007). Anti-inflammatory effects of isoflavones are dependent on flow and human endothelial cell PPARgamma. *The Journal of Nutrition*, *137*(2), 351–356. doi:10.1093/jn/137.2.351

Chai, J. K., Blaha, V., Meguid, M. M., Laviano, A., Yang, Z. J., & Varma, M. (1999). Use of orchiectomy and testosterone replacement to explore meal number-to-meal size relationship in male rats. *The American Journal of Physiology*, *276*(5 Pt 2), R1366-1373.

Chan, Y.-H., Lam, T.-H., Lau, K.-K., Yiu, K.-H., Siu, C.-W., Li, S.-W., et al. (2011). Dietary intake of phytoestrogen is associated with increased circulating endothelial progenitor cells in patients with cardiovascular disease. *European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation: Official Journal of the European Society of Cardiology, Working Groups on Epidemiology & Prevention and Cardiac Rehabilitation and Exercise Physiology*, *18*(3), 360–368. doi:10.1177/1741826710389385

Chang, H. C., Churchwell, M. I., Delclos, K. B., Newbold, R. R., & Doerge, D. R. (2000). coldham. *The Journal of nutrition*, *130*(8), 1963–1970.

Chau, M. N., El Touny, L. H., Jagadeesh, S., & Banerjee, P. P. (2007). Physiologically achievable concentrations of genistein enhance telomerase activity in prostate cancer cells via the activation of STAT3. *Carcinogenesis*, *28*(11), 2282–2290. doi:10.1093/carcin/bgm148

Chirumbolo, S. (2015). Genistein as a nature-derived PPAR agonist in adipogenesis and weight gain. *European Journal of Nutrition*, *54*(3), 489–491. doi:10.1007/s00394-015-0848-7

Cho, K. W., Lee, O.-H., Banz, W. J., Moustaid-Moussa, N., Shay, N. F., & Kim, Y.-C. (2010). Daidzein and the daidzein metabolite, equol, enhance adipocyte differentiation and PPARgamma transcriptional activity. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *21*(9), 841–847. doi:10.1016/j.jnutbio.2009.06.012

Cinti, S., Mitchell, G., Barbatelli, G., Murano, I., Ceresi, E., Faloia, E., et al. (2005). Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *Journal of Lipid Research*, *46*(11), 2347–2355. doi:10.1194/jlr.M500294-JLR200

Clarke, D. B., Lloyd, A. S., Lawrence, J. M., Brown, J. E., Storey, L., Raats, M., et al. (2013). Development of a food compositional database for the estimation of dietary intake of

phyto-oestrogens in a group of postmenopausal women previously treated for breast cancer and validation with urinary excretion. *British Journal of Nutrition*, *109*(12), 2261–2268. doi:10.1017/S0007114512004394

Cleasby, M. E., Jamieson, P. M., & Atherton, P. J. (2016). Insulin resistance and sarcopenia: mechanistic links between common co-morbidities. *The Journal of Endocrinology*, *229*(2), R67-81. doi:10.1530/JOE-15-0533

Clegg, D. J., Brown, L. M., Woods, S. C., & Benoit, S. C. (2006). Gonadal hormones determine sensitivity to central leptin and insulin. *Diabetes*, *55*(4), 978–987.

Cohen, P. G. (2001). Aromatase, adiposity, aging and disease. The hypogonadal-metabolic-atherogenic-disease and aging connection. *Medical Hypotheses*, *56*(6), 702–708. doi:10.1054/mehy.2000.1169

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. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *164*(2), 206–215. doi:10.1006/taap.2000.8902

Cooke, P. S., & Naaz, A. (2004). Role of Estrogens in Adipocyte Development and Function. *Experimental Biology and Medicine*, *229*(11), 1127–1135.

Cooke, P. S., & Naaz, A. (2005). Effects of estrogens and the phytoestrogen genistein on adipogenesis and lipogenesis in males and females. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, *73*(7), 472–473. doi:10.1002/bdra.20142

Cooke, P. S., Nanjappa, M. K., Ko, C., Prins, G. S., & Hess, R. A. (2017). Estrogens in Male Physiology. *Physiological Reviews*, *97*(3), 995–1043. doi:10.1152/physrev.00018.2016

Cos, P., Bruyne, T. D., Apers, S., Berghe, D. V., Pieters, L., & Vlietinck, A. J. (2003). Phytoestrogens: Recent Developments. *Planta Medica*, *69*(07), 589–599. doi:10.1055/s-2003-41122

Cozzo, A. J., Fuller, A. M., & Makowski, L. (2017). Contribution of Adipose Tissue to Development of Cancer. *Comprehensive Physiology*, *8*(1), 237–282. doi:10.1002/cphy.c170008

Csanády, G. A., Oberste-Frielinghaus, H. R., Semder, B., Baur, C., Schneider, K. T., & Filser, J. G. (2002). Distribution and unspecific protein binding of the xenoestrogens bisphenol A and daidzein. *Archives of Toxicology*, *76*(5–6), 299–305. doi:10.1007/s00204-002-0339-5

Dang, Z. C. (2009). Dose-dependent effects of soy phyto-oestrogen genistein on adipocytes: mechanisms of action. *Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity*, *10*(3), 342–349. doi:10.1111/j.1467-789X.2008.00554.x

Dang, Z. C., Audinot, V., Papapoulos, S. E., Boutin, J. A., & Löwik, C. (2003). Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPARγ) as a Molecular Target for the Soy Phytoestrogen Genistein. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(2), 962–967. doi:10.1074/jbc.M209483200

Dang, Z. C., & Löwik, C. (2004). The balance between concurrent activation of ERs and PPARs determines daidzein-induced osteogenesis and adipogenesis. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, *19*(5), 853–861. doi:10.1359/JBMR.040120

Davis, K. E., D. Neinast, M., Sun, K., M. Skiles, W., D. Bills, J., A. Zehr, J., et al. (2013). The sexually dimorphic role of adipose and adipocyte estrogen receptors in modulating adipose tissue expansion, inflammation, and fibrosis. *Molecular Metabolism*, *2*(3), 227–242. doi:10.1016/j.molmet.2013.05.006

Davis, S. R. (2001). Phytoestrogen therapy for menopausal symptoms? *BMJ : British Medical Journal*, *323*(7309), 354–355.

de Lemos, M. L. (2001). Effects of soy phytoestrogens genistein and daidzein on breast cancer growth. *The Annals of Pharmacotherapy*, *35*(9), 1118–1121. doi:10.1345/aph.10257

Degen, G. H., Janning, P., Diel, P., Michna, H., & Bolt, H. M. (2002). Transplacental transfer of the phytoestrogen daidzein in DA/Han rats. *Archives of Toxicology*, *76*(1), 23–29. doi:10.1007/s00204-001-0305-7

Della-Fera, M. A., Qian, H., & Baile, C. A. (2001). Adipocyte apoptosis in the regulation of body fat mass by leptin. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, *3*(5), 299–310. doi:10.1046/j.1463-1326.2001.00112.x

Deng, T., Lyon, C. J., Bergin, S., Caligiuri, M. A., & Hsueh, W. A. (2016). Obesity, Inflammation, and Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, *11*(1), 421–449. doi:10.1146/annurev-pathol-012615-044359

D'Eon, T. M., Souza, S. C., Aronovitz, M., Obin, M. S., Fried, S. K., & Greenberg, A. S. (2005). Estrogen regulation of adiposity and fuel partitioning. Evidence of genomic and non-genomic regulation of lipogenic and oxidative pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(43), 35983–35991. doi:10.1074/jbc.M507339200

Després, J.-P., & Lemieux, I. (2006, Dezember 13). Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*. Special Features. doi:10.1038/nature05488

Dieudonne, M. N., Pecquery, R., Leneveu, M. C., & Giudicelli, Y. (2000). Opposite effects of androgens and estrogens on adipogenesis in rat preadipocytes: evidence for sex and site-related specificities and possible involvement of insulin-like growth factor 1 receptor and peroxisome proliferator-activated receptor gamma2. *Endocrinology*, *141*(2), 649–656. doi:10.1210/endo.141.2.7293

Dinsdale, E. (2011, August 23). *Transgenerational Effects of Early Exposure to Soy Isoflavones on Reproductive Health and Bone Development in CD-1 Mice* (Thesis). Abgerufen von https://tspace.library.utoronto.ca/handle/1807/29524

Dinsdale, E. C., Chen, J., & Ward, W. E. (2011). Early Life Exposure to Isoflavones Adversely Affects Reproductive Health in First but Not Second Generation Female CD-1 Mice. *Journal of Nutrition*, *141*(11), 1996–2002. doi:10.3945/jn.111.142281

Dinsdale, Elsa 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

Divi, R. L., Chang, H. C., & Doerge, D. R. (1997). Anti-thyroid isoflavones from soybean: isolation, characterization, and mechanisms of action. *Biochemical Pharmacology*, *54*(10), 1087–1096.

Dobbins, M., Decorby, K., & Choi, B. C. K. (2013). The Association between Obesity and Cancer Risk: A Meta-Analysis of Observational Studies from 1985 to 2011. *ISRN Preventive Medicine*, *2013*. doi:10.5402/2013/680536

Doerge, D. R., Churchwell, M. I., Chang, H. C., Newbold, R. R., & Delclos, K. B. (2001). Placental transfer of the soy isoflavone genistein following dietary and gavage administration to Sprague Dawley rats. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*, *15*(2), 105–110.

Doerge, D. R. (2011). Bioavailability of soy isoflavones through placental/lactational transfer and soy food. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *254*(2), 145–147. doi:10.1016/j.taap.2010.10.018

Doerge, D. R, & Sheehan, D. M. (2002). Goitrogenic and estrogenic activity of soy isoflavones. *Environmental Health Perspectives*, *110*(Suppl 3), 349–353.

Doerge, D. R., Twaddle, N. C., Churchwell, M. I., Newbold, R. R., & Delclos, K. B. (2006). Lactational transfer of the soy isoflavone, genistein, in Sprague–Dawley rats consuming dietary genistein. *Reproductive Toxicology*, *21*(3), 307–312. doi:10.1016/j.reprotox.2005.09.007

Dolinoy, D. C., Weidman, J. R., Waterland, R. A., & Jirtle. (2006). Maternal Genistein Alters Coat Color and Protects Avy Mouse Offspring from Obesity by Modifying the Fetal Epigenome. *Environmental Health Perspectives*, *114*(4), 567–572. doi:10.1289/ehp.8700

Drolet, R., Bélanger, C., Fortier, M., Huot, C., Mailloux, J., Légaré, D., & Tchernof, A. (2009). Fat depot-specific impact of visceral obesity on adipocyte adiponectin release in women. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, *17*(3), 424–430. doi:10.1038/oby.2008.555

D'souza, A. M., Neumann, U. H., Glavas, M. M., & Kieffer, T. J. (2017). The glucoregulatory actions of leptin. *Molecular Metabolism*, *6*(9), 1052. doi:10.1016/j.molmet.2017.04.011

Duarte, J. A. G., Carvalho, F., Pearson, M., Horton, J. D., Browning, J. D., Jones, J. G., & Burgess, S. C. (2014). A high-fat diet suppresses de novo lipogenesis and desaturation but not elongation and triglyceride synthesis in mice. *Journal of Lipid Research*, *55*(12), 2541–2553. doi:10.1194/jlr.M052308

Eberlé, D., Hegarty, B., Bossard, P., Ferré, P., & Foufelle, F. (2004). SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie*, *86*(11), 839–848. doi:10.1016/j.biochi.2004.09.018

EFSA. (2011). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to soy isoflavones and protection of DNA, proteins and lipids from oxidative damage (ID 1286, 4245), maintenance of normal blood LDL cholesterol concentrations (ID 1135, 1704a, 3093a), reduction of vasomotor symptoms associated with menopause (ID 1654, 1704b, 2140, 3093b, 3154, 3590), maintenance of normal skin tonicity (ID 1704a), contribution to normal hair growth (ID 1704a, 4254), "cardiovascular health" (ID 3587), treatment of prostate cancer (ID 3588) and "upper respiratory tract" (ID 3589) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*, *9*(7), n/a-n/a. doi:10.2903/j.efsa.2011.2264

EFSA. (2012). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to soy isoflavones and maintenance of bone mineral density (ID 1655) and reduction of vasomotor symptoms associated with menopause (ID 1654, 1704, 2140, 3093, 3154, 3590) (further assessment) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*, *10*(8), 2847. doi:10.2903/j

EFSA. (2015). Risk assessment for peri- and post-menopausal women taking food supplements containing isolated isoflavones. *EFSA Journal*, *13*(10), n/a-n/a. doi:10.2903/j.efsa.2015.4246

Enns, D. L., & Tiidus, P. M. (2008). Estrogen influences satellite cell activation and proliferation following downhill running in rats. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, *104*(2), 347–353. doi:10.1152/japplphysiol.00128.2007

Evans, B. A., Griffiths, K., & Morton, M. S. (1995). Inhibition of 5 alpha-reductase in genital skin fibroblasts and prostate tissue by dietary lignans and isoflavonoids. *The Journal of Endocrinology*, *147*(2), 295–302.

Evans, R. M., Barish, G. D., & Wang, Y.-X. (2004). PPARs and the complex journey to obesity. *Nature Medicine*, *10*(4), 355–361. doi:10.1038/nm1025

Fain, J. N., Madan, A. K., Hiler, M. L., Cheema, P., & Bahouth, S. W. (2004). Comparison of the Release of Adipokines by Adipose Tissue, Adipose Tissue Matrix, and Adipocytes

from Visceral and Subcutaneous Abdominal Adipose Tissues of Obese Humans. *Endocrinology*, *145*(5), 2273–2282. doi:10.1210/en.2003-1336

Fajas, L., Schoonjans, K., Gelman, L., Kim, J. B., Najib, J., Martin, G., et al. (1999). Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Molecular and Cellular Biology*, *19*(8), 5495–5503.

FDA. (2017). Press Announcements - Statement from Susan Mayne, Ph.D., on proposal to revoke health claim that soy protein reduces risk of heart disease. WebContent. https://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm582744.htm. Zugegriffen: 15. März 2019

Ferré, P., & Foufelle, F. (2007). SREBP-1c Transcription Factor and Lipid Homeostasis: Clinical Perspective. *Hormone Research in Paediatrics*, *68*(2), 72–82. doi:10.1159/000100426

Finkelstein, J. S., O'Dea, L. S., Whitcomb, R. W., & Crowley, W. F. (1991). Sex steroid control of gonadotropin secretion in the human male. II. Effects of estradiol administration in normal and gonadotropin-releasing hormone-deficient men. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *73*(3), 621–628. doi:10.1210/jcem-73-3-621

Finkelstein, J. S., Lee, H., Burnett-Bowie, S.-A. M., Pallais, J. C., Yu, E. W., Borges, L. F., et al. (2013). Gonadal Steroids and Body Composition, Strength, and Sexual Function in Men. *The New England journal of medicine*, *369*(11), 1011–1022. doi:10.1056/NEJMoa1206168

Food labeling: health claims; soy protein and coronary heart disease. Food and Drug Administration, HHS. Final rule. (1999). *Federal Register*, *64*(206), 57700–57733.

Fotsis, T., Pepper, M., Adlercreutz, H., Fleischmann, G., Hase, T., Montesano, R., & Schweigerer, L. (1993). Genistein, a dietary-derived inhibitor of in vitro angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*(7), 2690–2694.

Frankenfeld, C. L., Atkinson, C., Thomas, W. K., Goode, E. L., Gonzalez, A., Jokela, T., et al. (2004). Familial correlations, segregation analysis, and nongenetic correlates of soy isoflavone-metabolizing phenotypes. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, *229*(9), 902–913.

Frankenfeld, C. L. (2011). O-Desmethylangolensin: The Importance of Equol's Lesser Known Cousin to Human Health12. *Advances in Nutrition*, *2*(4), 317–324. doi:10.3945/an.111.000539

Freitas Lima, L. C., Braga, V. de A., do Socorro de França Silva, M., Cruz, J. de C., Sousa Santos, S. H., de Oliveira Monteiro, M. M., & Balarini, C. de M. (2015). Adipokines, diabetes and atherosclerosis: an inflammatory association. *Frontiers in Physiology*, *6*. doi:10.3389/fphys.2015.00304

Fried, S. K., Ricci, M. R., Russell, C. D., & Laferrère, B. (2000). Regulation of Leptin Production in Humans. *The Journal of Nutrition*, *130*(12), 3127S-3131S. doi:10.1093/jn/130.12.3127S

Fritz, W. A., Coward, L., Wang, J., & Lamartiniere, C. A. (1998). Dietary genistein: perinatal mammary cancer prevention, bioavailability and toxicity testing in the rat. *Carcinogenesis*, *19*(12), 2151–2158.

Fritz, W. A., Wang, J., Eltoum, I.-E., & Lamartiniere, C. A. (2002). Dietary genistein down-regulates androgen and estrogen receptor expression in the rat prostate. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *186*(1), 89–99. doi:10.1016/S0303-7207(01)00663-3

Gardner, C. D., Oelrich, B., Liu, J., Feldman, D., Franke, A. A., & Brooks, J. D. (2009). Prostatic soy isoflavone concentrations exceed serum levels after dietary supplementation. *The Prostate*, *69*(7), 719–726. doi:10.1002/pros.20922

Garofalo, C., & Surmacz, E. (2006). Leptin and cancer. *Journal of Cellular Physiology*, *207*(1), 12–22. doi:10.1002/jcp.20472

Geary, N. (2004). The Estrogenic Inhibition of Eating. In E. M. Stricker & S. C. Woods (Hrsg.), *Neurobiology of Food and Fluid Intake* (S. 307–345). Boston, MA: Springer US. doi:10.1007/0-306-48643-1_12

Gentry, R. T., & Wade, G. N. (1976). Androgenic control of food intake and body weight in male rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *90*(1), 18–25. doi:10.1037/h0077264

Glass, A. R., Swerdloff, R. S., Bray, G. A., Dahms, W. T., & Atkinson, R. L. (1977). Low serum testosterone and sex-hormone-binding-globulin in massively obese men. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *45*(6), 1211–1219. doi:10.1210/jcem-45-6-1211

Goodman-Gruen, D., & Kritz-Silverstein, D. (2001). Usual Dietary Isoflavone Intake Is Associated with Cardiovascular Disease Risk Factors in Postmenopausal Women. *The Journal of Nutrition*, *131*(4), 1202–1206.

Graf, G. A., Roswell, K. L., & Smart, E. J. (2001). 17beta-Estradiol promotes the up-regulation of SR-BII in HepG2 cells and in rat livers. *Journal of Lipid Research*, *42*(9), 1444–1449.

Gray, S. (2003). Breast cancer and hormone-replacement therapy: the Million Women Study. *Lancet (London, England)*, *362*(9392), 1332; author reply 1332. doi:10.1016/S0140-6736(03)14598-9

Gregoire, F. M., Smas, C. M., & Sul, H. S. (1998). Understanding Adipocyte Differentiation. *Physiological Reviews*, *78*(3), 783–809. doi:10.1152/physrev.1998.78.3.783

Groothuis, P. G., Dassen, H. H. N. M., Romano, A., & Punyadeera, C. (2007). Estrogen and the endometrium: lessons learned from gene expression profiling in rodents and human. *Human Reproduction Update*, *13*(4), 405–417. doi:10.1093/humupd/dmm009

Grosser, G., Döring, B., Ugele, B., Geyer, J., Kulling, S. E., & Soukup, S. T. (2015). Transport of the soy isoflavone daidzein and its conjugative metabolites by the carriers SOAT, NTCP, OAT4, and OATP2B1. *Archives of Toxicology*, *89*(12), 2253–2263. doi:10.1007/s00204-014-1379-3

Grossmann, M. (2018). Hypogonadism and male obesity: Focus on unresolved questions. *Clinical Endocrinology*, *89*(1), 11–21. doi:10.1111/cen.13723

Gu, L., Laly, M., Chang, H. C., Prior, R. L., Fang, N., Ronis, M. J. J., & Badger, T. M. (2005). Isoflavone Conjugates Are Underestimated in Tissues Using Enzymatic Hydrolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(17), 6858–6863. doi:10.1021/jf050802j

Harmon, A. W., & Harp, J. B. (2001). Differential effects of flavonoids on 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *280*(4), C807-813. doi:10.1152/ajpcell.2001.280.4.C807

Harmon, A. W., Patel, Y. M., & Harp, J. B. (2002). Genistein inhibits CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBPbeta) activity and 3T3-L1 adipogenesis by increasing C/EBP homologous protein expression. *The Biochemical Journal*, *367*(Pt 1), 203–208. doi:10.1042/BJ20020300

Heine, P. A., Taylor, J. A., Iwamoto, G. A., Lubahn, D. B., & Cooke, P. S. (2000). Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-α knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(23), 12729–12734. doi:10.1073/pnas.97.23.12729

Hennes, M. M. I., Dua, A., & Kissebah, A. H. (1997). Effects of Free Fatty Acids and Glucose on Splanchnic Insulin Dynamics. *Diabetes*, *46*(1), 57–62. doi:10.2337/diab.46.1.57

Hertrampf, T., Gruca, M. J., Seibel, J., Laudenbach, U., Fritzemeier, K. H., & Diel, P. (2007). The bone-protective effect of the phytoestrogen genistein is mediated via ER alpha-dependent mechanisms and strongly enhanced by physical activity. *Bone*, *40*(6), 1529–1535. doi:10.1016/j.bone.2007.02.006

Horton, J. D., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *The Journal of Clinical Investigation*, *109*(9), 1125–1131. doi:10.1172/JCI15593

Houston, K. D., Copland, J. A., Broaddus, R. R., Gottardis, M. M., Fischer, S. M., & Walker, C. L. (2003). Inhibition of proliferation and estrogen receptor signaling by peroxisome

proliferator-activated receptor gamma ligands in uterine leiomyoma. *Cancer Research*, *63*(6), 1221–1227.

Howes, L. G., Howes, J. B., & Knight, D. C. (2006). Isoflavone therapy for menopausal flushes: a systematic review and meta-analysis. *Maturitas*, *55*(3), 203–211. doi:10.1016/j.maturitas.2006.03.008

Hsing, A. W., Sakoda, L. C., & Chua, S. (2007). Obesity, metabolic syndrome, and prostate cancer. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *86*(3), s843-857.

Huang, C., Pang, D., Luo, Q., Chen, X., Gao, Q., Shi, L., et al. (2016). Soy Isoflavones Regulate Lipid Metabolism through an AKT/mTORC1 Pathway in Diet-Induced Obesity (DIO) Male Rats. *Molecules*, *21*(5), 586. doi:10.3390/molecules21050586

Hüser, S., Guth, S., Joost, H. G., Soukup, S. T., Köhrle, J., Kreienbrock, L., et al. (2018). Effects of isoflavones on breast tissue and the thyroid hormone system in humans: a comprehensive safety evaluation. *Archives of Toxicology*, *92*(9), 2703–2748. doi:10.1007/s00204-018-2279-8

Hwang, C. S., Kwak, H. S., Lim, H. J., Lee, S. H., Kang, Y. S., Choe, T. B., et al. (2006). Isoflavone metabolites and their in vitro dual functions: they can act as an estrogenic agonist or antagonist depending on the estrogen concentration. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *101*(4–5), 246–253. doi:10.1016/j.jsbmb.2006.06.020

Hwang, J.-T., Park, I.-J., Shin, J.-I., Lee, Y. K., Lee, S. K., Baik, H. W., et al. (2005). Genistein, EGCG, and capsaicin inhibit adipocyte differentiation process via activating AMP-activated protein kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *338*(2), 694–699. doi:10.1016/j.bbrc.2005.09.195

Ibrahim, M. M. (2010). Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity*, *11*(1), 11–18. doi:10.1111/j.1467-789X.2009.00623.x

Ide, H., Tokiwa, S., Sakamaki, K., Nishio, K., Isotani, S., Muto, S., et al. (2010). Combined inhibitory effects of soy isoflavones and curcumin on the production of prostate-specific antigen. *The Prostate*, *70*(10), 1127–1133. doi:10.1002/pros.21147

Islam, M. A., Bekele, R., vanden Berg, J. H. J., Kuswanti, Y., Thapa, O., Soltani, S., et al. (2015). Deconjugation of soy isoflavone glucuronides needed for estrogenic activity. *Toxicology in Vitro*, *29*(4), 706–715. doi:10.1016/j.tiv.2015.01.013

Jefferson, W. N., Doerge, D., Padilla-Banks, E., Woodling, K. A., Kissling, G. E., & Newbold, R. (2009). Oral Exposure to Genistin, the Glycosylated Form of Genistein, during Neonatal Life Adversely Affects the Female Reproductive System. *Environmental Health Perspectives*, *117*(12), 1883–1889. doi:10.1289/ehp.0900923

Jenkins, D. J. A., Kendall, C. W. C., Jackson, C.-J. C., Connelly, P. W., Parker, T., Faulkner, D., et al. (2002). Effects of high- and low-isoflavone soyfoods on blood lipids, oxidized LDL, homocysteine, and blood pressure in hyperlipidemic men and women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *76*(2), 365–372. doi:10.1093/ajcn/76.2.365

Jéquier, E. (2002). Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *967*, 379–388.

Jiang, L., Wang, Q., Yu, Y., Zhao, F., Huang, P., Zeng, R., et al. (2009). Leptin Contributes to the Adaptive Responses of Mice to High-Fat Diet Intake through Suppressing the Lipogenic Pathway. *PLOS ONE*, *4*(9), e6884. doi:10.1371/journal.pone.0006884

Jo, J., Shreif, Z., & Periwal, V. (2012). Quantitative dynamics of adipose cells. *Adipocyte*, *1*(2), 80–88. doi:10.4161/adip.19705

Jones, J. I., & Clemmons, D. R. (1995). Insulin-Like Growth Factors and Their Binding Proteins: Biological Actions. *Endocrine Reviews*, *16*(1), 3–34. doi:10.1210/edrv-16-1-3

Jones, M. E., Thorburn, A. W., Britt, K. L., Hewitt, K. N., Misso, M. L., Wreford, N. G., et al. (2001). Aromatase-deficient (ArKO) mice accumulate excess adipose tissue. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *79*(1–5), 3–9.

Jung, U. J., & Choi, M.-S. (2014). Obesity and Its Metabolic Complications: The Role of Adipokines and the Relationship between Obesity, Inflammation, Insulin Resistance, Dyslipidemia and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(4), 6184–6223. doi:10.3390/ijms15046184

Kandulska, K., Nogowski, L., & Szkudelski, T. (1999). Effect of some phytoestrogens on metabolism of rat adipocytes. *Reproduction Nutrition Development*, *39*(4), 497–501.

Karastergiou, K., Smith, S. R., Greenberg, A. S., & Fried, S. K. (2012). Sex differences in human adipose tissues - the biology of pear shape. *Biology of Sex Differences*, *3*(1), 13. doi:10.1186/2042-6410-3-13

Katznelson, L., Finkelstein, J. S., Schoenfeld, D. A., Rosenthal, D. I., Anderson, E. J., & Klibanski, A. (2011). Increase in bone density and lean body mass during testosterone administration in men with acquired hypogonadism. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. doi:10.1210/jcem.81.12.8954042

Kersten, S. (2001). Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Reports*, *2*(4), 282–286. doi:10.1093/embo-reports/kve071

Keum, N., Greenwood, D. C., Lee, D. H., Kim, R., Aune, D., Ju, W., et al. (2015). Adult weight gain and adiposity-related cancers: a dose-response meta-analysis of prospective observational studies. *Journal of the National Cancer Institute*, *107*. http://dx.doi.org/10.1093/jnci/djv088. Zugegriffen: 15. März 2019

Khosla, S., Melton, L. J., & Riggs, B. L. (2001). Estrogens and bone health in men. *Calcified Tissue International*, *69*(4), 189–192.

Kim, H.-K., Nelson-Dooley, C., Della-Fera, M. A., Yang, J.-Y., Zhang, W., Duan, J., et al. (2006). Genistein Decreases Food Intake, Body Weight, and Fat Pad Weight and Causes Adipose Tissue Apoptosis in Ovariectomized Female Mice. *The Journal of Nutrition*, *136*(2), 409–414.

Kim, J. B., & Spiegelman, B. M. (1996). ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes & Development*, *10*(9), 1096–1107.

Kim, J. B., Wright, H. M., Wright, M., & Spiegelman, B. M. (1998). ADD1/SREBP1 activates PPARgamma through the production of endogenous ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(8), 4333–4337.

Kim, J. I., Huh, J. Y., Sohn, J. H., Choe, S. S., Lee, Y. S., Lim, C. Y., et al. (2015). Lipid-Overloaded Enlarged Adipocytes Provoke Insulin Resistance Independent of Inflammation. *Molecular and Cellular Biology*, *35*(10), 1686–1699. doi:10.1128/MCB.01321-14

Kim, S., Shin, H.-J., Kim, S. Y., Kim, J. H., Lee, Y. S., Kim, D.-H., & Lee, M.-O. (2004). Genistein enhances expression of genes involved in fatty acid catabolism through activation of PPARalpha. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *220*(1–2), 51–58. doi:10.1016/j.mce.2004.03.011

Kinjo, J., Tsuchihashi, R., Morito, K., Hirose, T., Aomori, T., Nagao, T., et al. (2004). Interactions of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta (III). Estrogenic activities of soy isoflavone aglycones and their metabolites isolated from human urine. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, *27*(2), 185–188.

Kirk, E. A., Sutherland, P., Wang, S. A., Chait, A., & LeBoeuf, R. C. (1998). Dietary isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BL/6 mice but not LDL receptor-deficient mice. *The Journal of Nutrition*, *128*(6), 954–959.

Klöting, N., Stumvoll, M., & Blüher, M. (2007). Biologie des viszeralen Fetts. *Der Internist*, *48*(2), 126–133. doi:10.1007/s00108-006-1781-x

Kolehmainen, M., Vidal, H., Alhava, E., & Uusitupa, M. I. J. (2001). Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c (SREBP-1c) Expression in Human Obesity. *Obesity Research*, *9*(11), 706–712. doi:10.1038/oby.2001.95

Krinke, G. (2000). *The Laboratory Rat*. Academic Press.

Kuiper, G. G. J. M., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Häggblad, J., Nilsson, S., & Gustafsson, J. A. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*, *138*(3), 863–870.

Kuiper, G. G. J. M., Lemmen, J. G., Carlsson, B., Corton, J. C., Safe, S. H., van der Saag, P. T., et al. (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor β. *Endocrinology*, *139*(10), 4252–4263. doi:10.1210/endo.139.10.6216

Kulling, S. E., & Watzl, B. (2003). Phytoöstrogene. *Ernährungs-Umschau : Forschung & Praxis, ERNAEHR UMSCH*, *50*(6), 234–239.

Lafortuna, C. L., Maffiuletti, N. A., Agosti, F., & Sartorio, A. (2005). Gender variations of body composition, muscle strength and power output in morbid obesity. *International Journal of Obesity*, *29*(7), 833–841. doi:10.1038/sj.ijo.0802955

Lamartiniere, C. A. (2002). Daidzein: Bioavailability, Potential for Reproductive Toxicity, and Breast Cancer Chemoprevention in Female Rats. *Toxicological Sciences*, *65*(2), 228–238. doi:10.1093/toxsci/65.2.228

Lamartiniere, C. A., Moore, J., Holland, M., & Barnes, S. (1995). Neonatal Genistein Chemoprevents Mammary Cancer. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, *208*(1), 120–123. doi:10.3181/00379727-208-43843

Lampe, J. W. (2003). Isoflavonoid and Lignan Phytoestrogens as Dietary Biomarkers. *The Journal of Nutrition*, *133*(3), 956S-964S. doi:10.1093/jn/133.3.956S

Lampe, J. W. (2009). Is equol the key to the efficacy of soy foods? *The American Journal of Clinical Nutrition*, *89*(5), 1664S-1667S. doi:10.3945/ajcn.2009.26736T

Langer, C., Gansz, B., Goepfert, C., Engel, T., Uehara, Y., von Dehn, G., et al. (2002). Testosterone up-regulates scavenger receptor BI and stimulates cholesterol efflux from macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *296*(5), 1051–1057.

Lauby-Secretan, B., Scoccianti, C., Loomis, D., Grosse, Y., Bianchini, F., & Straif, K. (2016). Body Fatness and Cancer — Viewpoint of the IARC Working Group. *New England Journal of Medicine*, *375*(8), 794–798. doi:10.1056/NEJMsr1606602

Lean, M. E., Han, T. S., & Morrison, C. E. (1995). Waist circumference as a measure for indicating need for weight management. *BMJ : British Medical Journal*, *311*(6998), 158–161.

Lee, D.-H., Kim, M. J., Song, E.-J., Kim, J. H., Ahn, J., Nam, Y.-D., et al. (2017). Nutrikinetic study of genistein metabolites in ovariectomized mice. *PLOS ONE*, *12*(10), e0186320. doi:10.1371/journal.pone.0186320

Lee, M. M., Gomez, S. L., Chang, J. S., Wey, M., Wang, R.-T., & Hsing, A. W. (2003). Soy and Isoflavone Consumption in Relation to Prostate Cancer Risk in China. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, *12*(7), 665–668.

Lee, Y. M., Choi, J. S., Kim, M. H., Jung, M. H., Lee, Y. S., & Song, J. (2006). Effects of dietary genistein on hepatic lipid metabolism and mitochondrial function in mice fed

high-fat diets. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, *22*(9), 956–964. doi:10.1016/j.nut.2005.12.014

Leidenberger, F. A., Strowitzki, T., & Ortmann, O. (2009). *Klinische Endokrinologie für Frauenärzte*. Springer.

Lephart, E. (2014). Noble Rats Display Decreased Weight Gain and Visceral Adiposity via Lifelong Exposure to an Isoflavone-Rich Diet. *Journal of Nutritional Health & Food Science*, *2*(1), 1–6. doi:10.15226/jnhfs.2014.00114

Lesinski, G. B., Reville, P. K., Mace, T. A., Young, G. S., Ahn-Jarvis, J., Thomas-Ahner, J., et al. (2015). Consumption of soy isoflavone enriched bread in men with prostate cancer is associated with reduced proinflammatory cytokines and immunosuppressive cells. *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*, *8*(11), 1036–1044. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-14-0464

Letexier, D., Pinteur, C., Large, V., Fréring, V., & Beylot, M. (2003). Comparison of the expression and activity of the lipogenic pathway in human and rat adipose tissue. *Journal of Lipid Research*, *44*(11), 2127–2134. doi:10.1194/jlr.M300235-JLR200

Lethaby, A., Marjoribanks, J., Kronenberg, F., Roberts, H., Eden, J., & Brown, J. (2013). Phytoestrogens for menopausal vasomotor symptoms. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, (12), CD001395. doi:10.1002/14651858.CD001395.pub4

Li, S.-H., Liu, X.-X., Bai, Y.-Y., Wang, X.-J., Sun, K., Chen, J.-Z., & Hui, R.-T. (2010). Effect of oral isoflavone supplementation on vascular endothelial function in postmenopausal women: a meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *91*(2), 480–486. doi:10.3945/ajcn.2009.28203

Liao, Q.-C., Li, Y.-L., Qin, Y.-F., Quarles, L. D., Xu, K.-K., Li, R., et al. (2008). Inhibition of adipocyte differentiation by phytoestrogen genistein through a potential downregulation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 activity. *Journal of Cellular Biochemistry*, *104*(5), 1853–1864. doi:10.1002/jcb.21753

Lichtenstein, A. H., Jalbert, S. M., Adlercreutz, H., Goldin, B. R., Rasmussen, H., Schaefer, E. J., & Ausman, L. M. (2002). Lipoprotein response to diets high in soy or animal protein with and without isoflavones in moderately hypercholesterolemic subjects. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *22*(11), 1852–1858.

Lihn, A. S., Pedersen, S. B., & Richelsen, B. (2005). Adiponectin: action, regulation and association to insulin sensitivity. *Obesity Reviews*, *6*(1), 13–21. doi:10.1111/j.1467-789X.2005.00159.x

Lin, J., Yang, R., Tarr, P. T., Wu, P.-H., Handschin, C., Li, S., et al. (2005). Hyperlipidemic effects of dietary saturated fats mediated through PGC-1beta coactivation of SREBP. *Cell*, *120*(2), 261–273. doi:10.1016/j.cell.2004.11.043

Liu, H., Zhong, H., Yin, Y., & Jiang, Z. (2017). Genistein has beneficial effects on hepatic steatosis in high fat-high sucrose diet-treated rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, *91*, 964–969. doi:10.1016/j.biopha.2017.04.130

Liu, L., & Klaassen, C. D. (1996a). Ontogeny and hormonal basis of female-dominant rat hepatic sulfotransferases. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *279*(1), 386–391.

Liu, L., & Klaassen, C. D. (1996b). Ontogeny and hormonal basis of male-dominant rat hepatic sulfotransferases. *Molecular Pharmacology*, *50*(3), 565–572.

Liu, X. X., Li, S. H., Chen, J. Z., Sun, K., Wang, X. J., Wang, X. G., & Hui, R. T. (2012). Effect of soy isoflavones on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases: NMCD*, *22*(6), 463–470. doi:10.1016/j.numecd.2010.09.006

Liu, Z., Zhang, X., Li, L., Zhang, W., Cui, W., Song, Y., et al. (2008). Effects of Lactational Exposure to Soy Isoflavones on Reproductive System in Neonatal Female Rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, *102*(3), 317–324. doi:10.1111/j.1742-7843.2007.00172.x

Lobo, R. A. (2017). Hormone-replacement therapy: current thinking. *Nature Reviews Endocrinology*, *13*(4), 220–231. doi:10.1038/nrendo.2016.164

Lohmiller, J. J., & Swing, S. P. (2006). Chapter 6 - Reproduction and Breeding. In M. A. Suckow, S. H. Weisbroth, & C. L. Franklin (Hrsg.), *The Laboratory Rat (Second Edition)* (S. 147–164). Burlington: Academic Press. doi:10.1016/B978-012074903-4/50009-1

Lowe, D. A., Baltgalvis, K. A., & Greising, S. M. (2010). Mechanisms behind Estrogens' Beneficial Effect on Muscle Strength in Females. *Exercise and sport sciences reviews*, *38*(2), 61–67. doi:10.1097/JES.0b013e3181d496bc

Maffei, L., Rochira, V., Zirilli, L., Antunez, P., Aranda, C., Fabre, B., et al. (2007). A novel compound heterozygous mutation of the aromatase gene in an adult man: reinforced evidence on the relationship between congenital oestrogen deficiency, adiposity and the metabolic syndrome. *Clinical Endocrinology*, *67*(2), 218–224. doi:10.1111/j.1365-2265.2007.02864.x

Magee, P. J., McGlynn, H., & Rowland, I. R. (2004). Differential effects of isoflavones and lignans on invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells in vitro. *Cancer Letters*, *208*(1), 35–41. doi:10.1016/j.canlet.2003.11.012

Mäkelä, S., Poutanen, M., Kostian, M. L., Lehtimäki, N., Strauss, L., Santti, R., & Vihko, R. (1998). Inhibition of 17beta-hydroxysteroid oxidoreductase by flavonoids in breast and prostate cancer cells. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and*

Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.), *217*(3), 310–316.

Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *81*(1 Suppl), 230S-242S.

Mandard, S., Müller, M., & Kersten, S. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, *61*(4), 393–416. doi:10.1007/s00018-003-3216-3

Mangano, K. M., Hutchins-Wiese, H. L., Kenny, A. M., Walsh, S. J., Abourizk, R. H., Bruno, R. S., et al. (2013). Soy proteins and isoflavones reduce interleukin-6 but not serum lipids in older women: a randomized controlled trial,. *Nutrition research (New York, N.Y.)*, *33*(12), 1026–1033. doi:10.1016/j.nutres.2013.08.009

Mårin, P., Holmäng, S., Jönsson, L., Sjöström, L., Kvist, H., Holm, G., et al. (1992). The effects of testosterone treatment on body composition and metabolism in middle-aged obese men. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, *16*(12), 991–997.

Martins, A. R., Nachbar, R. T., Gorjao, R., Vinolo, M. A., Festuccia, W. T., Lambertucci, R. H., et al. (2012). Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function. *Lipids in Health and Disease*, *11*(1), 30. doi:10.1186/1476-511X-11-30

Mathus-Vliegen, E. M. H., Basdevant, A., Finer, N., Hainer, V., Hauner, H., Micic, D., et al. (2012). Prevalence, Pathophysiology, Health Consequences and Treatment Options of Obesity in the Elderly: A Guideline. *Obesity Facts*, *5*(3), 460–483. doi:10.1159/000341193

McVey, M. J., Cooke, G. M., & Curran, I. H. A. (2004). Altered testicular microsomal steroidogenic enzyme activities in rats with lifetime exposure to soy isoflavones. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *92*(5), 435–446. doi:10.1016/j.jsbmb.2004.08.002

Memon, R. A., Tecott, L. H., Nonogaki, K., Beigneux, A., Moser, A. H., Grunfeld, C., & Feingold, K. R. (2013). Up-Regulation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPAR-α) and PPAR-γ Messenger Ribonucleic Acid Expression in the Liver in Murine Obesity: Troglitazone Induces Expression of PPAR-γ-Responsive Adipose Tissue-Specific Genes in the Liver of Obese Diabetic Mice1. *Endocrinology*. doi:10.1210/endo.141.11.7771

Messina, M. (2014). Soy foods, isoflavones, and the health of postmenopausal women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *100*(suppl_1), 423S-430S. doi:10.3945/ajcn.113.071464

Messina, M. (2016). Soy and Health Update: Evaluation of the Clinical and Epidemiologic Literature. *Nutrients*, *8*(12). doi:10.3390/nu8120754

Messina, M., & Hilakivi-Clarke, L. (2009). Early intake appears to be the key to the proposed protective effects of soy intake against breast cancer. *Nutrition and Cancer*, *61*(6), 792–798. doi:10.1080/01635580903285015

Mezei, O. (2006). Dietary isoflavone supplementation modulates lipid metabolism via PPAR - dependent and -independent mechanisms. *Physiological Genomics*, *26*(1), 8–14. doi:10.1152/physiolgenomics.00155.2005

Mezei, O., Banz, W. J., Steger, R. W., Peluso, M. R., Winters, T. A., & Shay, N. (2003). Soy Isoflavones Exert Antidiabetic and Hypolipidemic Effects through the PPAR Pathways in Obese Zucker Rats and Murine RAW 264.7 Cells. *The Journal of Nutrition*, *133*(5), 1238–1243.

Miyatani, Y., Yasui, T., Uemura, H., Yamada, M., Matsuzaki, T., Kuwahara, A., et al. (2008). Associations of circulating adiponectin with estradiol and monocyte chemotactic protein-1 in postmenopausal women. *Menopause*, *15*(3), 536–541. doi:10.1097/gme.0b013e31815c85ed

Moeller, L. E., Peterson, C. T., Hanson, K. B., Dent, S. B., Lewis, D. S., King, D. S., & Alekel, D. L. (2003). Isoflavone-rich soy protein prevents loss of hip lean mass but does not prevent the shift in regional fat distribution in perimenopausal women. *Menopause (New York, N.Y.)*, *10*(4), 322–331. doi:10.1097/01.GME.0000054763.94658.FD

Molzberger, A. F., Soukup, S. T., Kulling, S. E., & Diel, P. (2013). Proliferative and estrogenic sensitivity of the mammary gland are modulated by isoflavones during distinct periods of adolescence. *Archives of Toxicology*, *87*(6), 1129–1140. doi:10.1007/s00204-012-1009-x

Moran, A. L., Nelson, S. A., Landisch, R. M., Warren, G. L., & Lowe, D. A. (2007). Estradiol replacement reverses ovariectomy-induced muscle contractile and myosin dysfunction in mature female mice. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, *102*(4), 1387–1393. doi:10.1152/japplphysiol.01305.2006

Mortensen, A., Kulling, S. E., Schwartz, H., Rowland, I., Ruefer, C. E., Rimbach, G., et al. (2009). Analytical and compositional aspects of isoflavones in food and their biological effects. *Molecular Nutrition & Food Research*, *53*(S2), 266–309. doi:10.1002/mnfr.200800478

Morton, M. S., Chan, P. S., Cheng, C., Blacklock, N., Matos-Ferreira, A., Abranches-Monteiro, L., et al. (1997). Lignans and isoflavonoids in plasma and prostatic fluid in men: samples from Portugal, Hong Kong, and the United Kingdom. *The Prostate*, *32*(2), 122–128.

Morton, M. S., Arisaka, O., Miyake, N., Morgan, L. D., & Evans, B. A. (2002). Phytoestrogen concentrations in serum from Japanese men and women over forty years of age. *The Journal of nutrition*, *132*(10), 3168–3171.

Mousavi, Y., & Adlercreutz, H. (1993). Genistein is an effective stimulator of sex hormone-binding globulin production in hepatocarcinoma human liver cancer cells and suppresses proliferation of these cells in culture. *Steroids*, *58*(7), 301–304. doi:10.1016/0039-128X(93)90088-5

Mueller, W. M., Gregoire, F. M., Stanhope, K. L., Mobbs, C. V., Mizuno, T. M., Warden, C. H., et al. (1998). Evidence that glucose metabolism regulates leptin secretion from cultured rat adipocytes. *Endocrinology*, *139*(2), 551–558. doi:10.1210/endo.139.2.5716

Mukherjee, B., Hossain, C. M., Mondal, L., Paul, P., & Ghosh, M. K. (2013). Obesity and Insulin Resistance: An Abridged Molecular Correlation. *Lipid insights*, *6*, 1–11. doi:10.4137/LPI.S10805

Mullen, E., Brown, R. M., Osborne, T. F., & Shay, N. F. (2004). Soy isoflavones affect sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) and SREBP-regulated genes in HepG2 cells. *The Journal of Nutrition*, *134*(11), 2942–2947.

Müller, D. R., Basso, F., Kurrat, A., Soukup, S. T., Niehoff, A., Kulling, S. E., & Diel, P. (2016). Dose-dependent effects of isoflavone exposure during early lifetime on development and androgen sensitivity in male Wistar rats. *Molecular Nutrition & Food Research*, *60*(2), 325–336. doi:10.1002/mnfr.201500559

Müller, D. R., Soukup, S. T., Kurrat, A., Liu, X., Schmicke, M., Xie, M.-Y., et al. (2016). Neonatal isoflavone exposure interferes with the reproductive system of female Wistar rats. *Toxicology Letters*, *262*, 39–48. doi:10.1016/j.toxlet.2016.08.001

Muller, M., Grobbee, D. E., den Tonkelaar, I., Lamberts, S. W. J., Schouw, V. D., & T, Y. (2005). Endogenous Sex Hormones and Metabolic Syndrome in Aging Men. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *90*(5), 2618–2623. doi:10.1210/jc.2004-1158

Mullur, R., Liu, Y.-Y., & Brent, G. A. (2014). Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiological Reviews*, *94*(2), 355–382. doi:10.1152/physrev.00030.2013

Naaz, A., Yellayi, S., Zakroczymski, M. A., Bunick, D., Doerge, D. R., Lubahn, D. B., et al. (2003). The Soy Isoflavone Genistein Decreases Adipose Deposition in Mice. *Endocrinology*, *144*(8), 3315–3320. doi:10.1210/en.2003-0076

Nadler, S. T., Stoehr, J. P., Schueler, K. L., Tanimoto, G., Yandell, B. S., & Attie, A. D. (2000). The expression of adipogenic genes is decreased in obesity and diabetes mellitus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(21), 11371–11376.

Nagel, S. C., vom Saal, F. S., & Welshons, W. V. (1998). The effective free fraction of estradiol and xenoestrogens in human serum measured by whole cell uptake assays: physiology of delivery modifies estrogenic activity. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, *217*(3), 300–309.

National Toxicology Program. (2008). Toxicology and carcinogenesis studies of genistein (Cas No. 446-72-0) in Sprague-Dawley rats (feed study). *National Toxicology Program Technical Report Series*, (545), 1–240.

Newbold, R. R., Banks, E. P., Bullock, B., & Jefferson, W. N. (2001). Uterine adenocarcinoma in mice treated neonatally with genistein. *Cancer research*, *61*(11), 4325–4328.

Newell-Fugate, A. E. (2017). The role of sex steroids in white adipose tissue adipocyte function. *Reproduction*, *153*(4), R133–R149. doi:10.1530/REP-16-0417

Nishimura, S., Manabe, I., & Nagai, R. (2009). Adipose tissue inflammation in obesity and metabolic syndrome. *Discovery Medicine*, *8*(41), 55–60.

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. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *157*(1), 183–189.

Orgaard, A., & Jensen, L. (2008). The Effects of Soy Isoflavones on Obesity. *Experimental Biology and Medicine*, *233*(9), 1066–1080. doi:10.3181/0712-MR-347

Owen, A. J., Roach, P. D., & Abbey, M. (2004). Regulation of low-density lipoprotein receptor activity by estrogens and phytoestrogens in a HepG2 cell model. *Annals of Nutrition & Metabolism*, *48*(4), 269–275. doi:10.1159/000080462

Panneerselvam, S., Packirisamy, R. M., Bobby, Z., Elizabeth Jacob, S., & Sridhar, M. G. (2016). Soy isoflavones (Glycine max) ameliorate hypertriglyceridemia and hepatic steatosis in high fat-fed ovariectomized Wistar rats (an experimental model of postmenopausal obesity). *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *38*, 57–69. doi:10.1016/j.jnutbio.2016.08.007

Park, H. J., Della-Fera, M. A., Hausman, D. B., Rayalam, S., Ambati, S., & Baile, C. A. (2009). Genistein inhibits differentiation of primary human adipocytes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *20*(2), 140–148. doi:10.1016/j.jnutbio.2008.01.006

Patisaul, H. B., & Jefferson, W. (2010). The pros and cons of phytoestrogens. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *31*(4), 400–419. doi:10.1016/j.yfrne.2010.03.003

Pearce, E. N. (2012). Thyroid hormone and obesity. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity*, *19*(5), 408–413. doi:10.1097/MED.0b013e328355cd6c

Pedersen, S. B., Fuglsig, S., Sjøgren, P., & Richelsen, B. (1996). Identification of steroid receptors in human adipose tissue. *European Journal of Clinical Investigation*, *26*(12), 1051–1056.

Pedersen, Steen B., Kristensen, K., Hermann, P. A., Katzenellenbogen, J. A., & Richelsen, B. (2004). Estrogen controls lipolysis by up-regulating alpha2A-adrenergic receptors directly in human adipose tissue through the estrogen receptor alpha. Implications for the female fat distribution. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *89*(4), 1869–1878. doi:10.1210/jc.2003-031327

Penza, M., Montani, C., Romani, A., Vignolini, P., Ciana, P., Maggi, A., et al. (2007). Genistein accumulates in body depots and is mobilized during fasting, reaching estrogenic levels in serum that counter the hormonal actions of estradiol and organochlorines. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, *97*(2), 299–307. doi:10.1093/toxsci/kfm036

Penza, M., Montani, C., Romani, A., Vignolini, P., Pampaloni, B., Tanini, A., et al. (2006). Genistein Affects Adipose Tissue Deposition in a Dose-Dependent and Gender-Specific Manner. *Endocrinology*, *147*(12), 5740–5751. doi:10.1210/en.2006-0365

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, *29*(9), e45.

Pfitscher, A., Reiter, E., & Jungbauer, A. (2008). Receptor binding and transactivation activities of red clover isoflavones and their metabolites. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *112*(1–3), 87–94. doi:10.1016/j.jsbmb.2008.08.007

Pines, A. (2011). Male menopause: is it a real clinical syndrome? *Climacteric: The Journal of the International Menopause Society*, *14*(1), 15–17. doi:10.3109/13697137.2010.507442

Poissonnet, C. M., Burdi, A. R., & Bookstein, F. L. (1983). Growth and development of human adipose tissue during early gestation. *Early Human Development*, *8*(1), 1–11.

Pötzsch, B. (2003). *Praxis der Männergesundheit: Prävention, schulmedizinische Fakten, ganzheitlicher Zugang ; 86 Tabellen*. Georg Thieme Verlag.

Pudenz, M., Roth, K., & Gerhauser, C. (2014). Impact of Soy Isoflavones on the Epigenome in Cancer Prevention. *Nutrients*, *6*(10), 4218–4272. doi:10.3390/nu6104218

Pugazhendhi, D., Watson, K. A., Mills, S., Botting, N., Pope, G. S., & Darbre, P. D. (2008). Effect of sulphation on the oestrogen agonist activity of the phytoestrogens genistein and daidzein in MCF-7 human breast cancer cells. *Journal of Endocrinology*, *197*(3), 503–515. doi:10.1677/JOE-07-0384

R Core Team. (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. http://www.R-project.org/

Rahmouni, K., & Haynes, W. G. (2004). Leptin and the cardiovascular system. *Recent Progress in Hormone Research*, *59*, 225–244.

Randle, P. J., Garland, P. B., Hales, C. N., & Newsholme, E. A. (1963). The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet (London, England)*, *1*(7285), 785–789.

Raschke, M., Wähälä, K., & Pool-Zobel, B. L. (2006). Reduced isoflavone metabolites formed by the human gut microflora suppress growth but do not affect DNA integrity of human prostate cancer cells. *The British Journal of Nutrition*, *96*(3), 426–434.

Raven, G., de Jong, F. H., Kaufman, J.-M., & de Ronde, W. (2006). In men, peripheral estradiol levels directly reflect the action of estrogens at the hypothalamo-pituitary level to inhibit gonadotropin secretion. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *91*(9), 3324–3328. doi:10.1210/jc.2006-0462

Rayalam, S., Della-Fera, M. A., Yang, J.-Y., Park, H. J., Ambati, S., & Baile, C. A. (2007). Resveratrol potentiates genistein's antiadipogenic and proapoptotic effects in 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of Nutrition*, *137*(12), 2668–2673. doi:10.1093/jn/137.12.2668

Rimbach, G., Pascual-Teresa, S. D., Ewins, B. A., Matsugo, S., Uchida, Y., Minihane, A. M., et al. (2003). Antioxidant and free radical scavenging activity of isoflavone metabolites. *Xenobiotica*, *33*(9), 913–925. doi:10.1080/0049825031000150444

Rimoldi, G., Christoffel, J., Seidlova-Wuttke, D., Jarry, H., & Wuttke, W. (2007). Effects of Chronic Genistein Treatment in Mammary Gland, Uterus, and Vagina. *Environmental Health Perspectives*, *115*(Suppl 1), 62–68. doi:10.1289/ehp.9367

Rizzo, G., & Baroni, L. (2018). Soy, Soy Foods and Their Role in Vegetarian Diets. *Nutrients*, *10*(1). doi:10.3390/nu10010043

Roccisano, D. (2012). Soy Consumption and Obesity. *Food and Nutrition Sciences*, *03*(02), 260–266. doi:10.4236/fns.2012.32038

Rochira, V., & Carani, C. (2017). Estrogen Deficiency in Men. In M. Simoni & I. T. Huhtaniemi (Hrsg.), *Endocrinology of the Testis and Male Reproduction* (S. 797–828). Cham: Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-44441-3_27

Rosen, E. D. (2005). The transcriptional basis of adipocyte development. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, *73*(1), 31–34. doi:10.1016/j.plefa.2005.04.004

Rossouw, J. E., Anderson, G. L., Prentice, R. L., LaCroix, A. Z., Kooperberg, C., Stefanick, M. L., et al. (2002). Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*, *288*(3), 321–333.

Rubinow, K. B. (2017). Chapter 24: Estrogens and Body Weight Regulation in Men. *Advances in experimental medicine and biology*, *1043*, 285–313. doi:10.1007/978-3-319-70178-3_14

Rüfer, C. E., Kulling, S. E., Möseneder, J., Winterhalter, P., & Bub, A. (2009). Role of plasma lipoproteins in the transport of the soyabean isoflavones daidzein and daidzein-7-O-β-d-glucoside. *British Journal of Nutrition*, *102*(6), 793–796. doi:10.1017/S0007114509297224

Sacks, F. M., Lichtenstein, A., Van Horn, L., Harris, W., Kris-Etherton, P., Winston, M., & American Heart Association Nutrition Committee. (2006). Soy protein, isoflavones, and cardiovascular health: an American Heart Association Science Advisory for professionals from the Nutrition Committee. *Circulation*, *113*(7), 1034–1044. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.171052

Sakamoto, Y., Naka, A., Ohara, N., Kondo, K., & Iida, K. (2014). Daidzein regulates proinflammatory adipokines thereby improving obesity-related inflammation through PPARγ. *Molecular Nutrition & Food Research*, *58*(4), 718–726. doi:10.1002/mnfr.201300482

Sanders, F. W. B., & Griffin, J. L. (2016). De novo lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, *91*(2), 452–468. doi:10.1111/brv.12178

Santen, R. J., Allred, D. C., Ardoin, S. P., Archer, D. F., Boyd, N., Braunstein, G. D., et al. (2010). Postmenopausal hormone therapy: an Endocrine Society scientific statement. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *95*(7 Suppl 1), s1–s66. doi:10.1210/jc.2009-2509

Santo, A. S., Cunningham, A. M., Alhassan, S., Browne, R. W., Burton, H., Leddy, J. J., et al. (2008). NMR analysis of lipoprotein particle size does not increase sensitivity to the effect of soy protein on CVD risk when compared with the traditional lipid profile. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie Appliquee, Nutrition Et Metabolisme*, *33*(3), 489–500. doi:10.1139/H08-023

Schindler, A. E. (2003). Thyroid function and postmenopause. *Gynecological Endocrinology: The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, *17*(1), 79–85.

Schmitt, E., Dekant, W., & Stopper, H. (2001). Assaying the estrogenicity of phytoestrogens in cells of different estrogen sensitive tissues. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*, *15*(4–5), 433–439.

Sehmisch, S., Erren, M., Kolios, L., Tezval, M., Seidlova-Wuttke, D., Wuttke, W., et al. (2010). Effects of isoflavones equol and genistein on bone quality in a rat osteopenia model. *Phytotherapy research: PTR*, *24 Suppl 2*, S168-174. doi:10.1002/ptr.3060

Setchell, K. D. R., Brown, N. M., Zhao, X., Lindley, S. L., Heubi, J. E., King, E. C., & Messina, M. J. (2011). Soy isoflavone phase II metabolism differs between rodents and humans: implications for the effect on breast cancer risk. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *94*(5), 1284–1294. doi:10.3945/ajcn.111.019638

Setchell, K. D. R., & Cassidy, A. (1999). Dietary Isoflavones: Biological Effects and Relevance to Human Health. *The Journal of Nutrition*, *129*(3), 758–758.

Sfakianos, J., Coward, L., Kirk, M., & Barnes, S. (1997). Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats. *The Journal of nutrition*, *127*(7), 1260–1268.

Shen, P., Liu, M. H., Ng, T. Y., Chan, Y. H., & Yong, E. L. (2006). Differential effects of isoflavones, from Astragalus membranaceus and Pueraria thomsonii, on the activation of PPARalpha, PPARgamma, and adipocyte differentiation in vitro. *The Journal of Nutrition*, *136*(4), 899–905.

Shike, M., Doane, A. S., Russo, L., Cabal, R., Reis-Filho, J. S., Gerald, W., et al. (2014). The Effects of Soy Supplementation on Gene Expression in Breast Cancer: A Randomized Placebo-Controlled Study. *Journal of the National Cancer Institute*, *106*(9), dju189. doi:10.1093/jnci/dju189

Shin, E. S., Lee, H. H., Cho, S. Y., Park, H. W., Lee, S. J., & Lee, T. R. (2007). Genistein downregulates SREBP-1 regulated gene expression by inhibiting site-1 protease expression in HepG2 cells. *The Journal of Nutrition*, *137*(5), 1127–1131.

Shor, D., Sathyapalan, T., Atkin, S. L., & Thatcher, N. J. (2012). Does equol production determine soy endocrine effects? *European Journal of Nutrition*, *51*(4), 389–398. doi:10.1007/s00394-012-0331-7

Siersbæk, R., Nielsen, R., & Mandrup, S. (2010). PPARγ in adipocyte differentiation and metabolism – Novel insights from genome-wide studies. *FEBS Letters*, *584*(15), 3242–3249. doi:10.1016/j.febslet.2010.06.010

Siiteri, P. K. (1987). Adipose tissue as a source of hormones. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *45*(1), 277–282. doi:10.1093/ajcn/45.1.277

Silverstein, M. G., Kaplan, J. R., Appt, S. E., Register, T. C., & Shively, C. A. (2014). Effect of soy isoflavones on thyroid hormones in intact and ovariectomized cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis). *Menopause (New York, N.Y.)*, *21*(10), 1136–1142. doi:10.1097/GME.0000000000000223

Simpson, E. R., & Brown, K. A. (2013). Minireview: Obesity and Breast Cancer: A Tale of Inflammation and Dysregulated Metabolism. *Molecular Endocrinology*, *27*(5), 715–725. doi:10.1210/me.2013-1011

Sites, C. K., Cooper, B. C., Toth, M. J., Gastaldelli, A., Arabshahi, A., & Barnes, S. (2007). Effect of a Daily Supplement of Soy Protein on Body Composition and Insulin

Secretion in Postmenopausal Women. *Fertility and sterility*, *88*(6), 1609–1617. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.01.061

Somekawa, Y., Chiguchi, M., Ishibashi, T., & Aso, T. (2001). Soy intake related to menopausal symptoms, serum lipids, and bone mineral density in postmenopausal Japanese women. *Obstetrics and Gynecology*, *97*(1), 109–115.

Song, Z., Xiaoli, A. M., & Yang, F. (2018). Regulation and Metabolic Significance of De Novo Lipogenesis in Adipose Tissues. *Nutrients*, *10*(10). doi:10.3390/nu10101383

Sošić-Jurjević, B., & Filipović, B. (2014). Soy Isoflavones Interfere With Thyroid Hormone Homeostasis in Orchidectomized Middle-Aged Rats. *Toxicology and applied pharmacology*. doi:10.1016/j.taap.2014.04.018

Soukas, A., Cohen, P., Socci, N. D., & Friedman, J. M. (2000). Leptin-specific patterns of gene expression in white adipose tissue. *Genes & Development*, *14*(8), 963–980.

Soukup, S. T., Al-Maharik, N., Botting, N., & Kulling, S. E. (2014). Quantification of soy isoflavones and their conjugative metabolites in plasma and urine: an automated and validated UHPLC-MS/MS method for use in large-scale studies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *406*(24), 6007–6020. doi:10.1007/s00216-014-8034-y

Soukup, S. T., Helppi, J., Müller, D. R., Zierau, O., Watzl, B., Vollmer, G., et al. (2016). Phase II metabolism of the soy isoflavones genistein and daidzein in humans, rats and mice: a cross-species and sex comparison. *Archives of Toxicology*, *90*(6), 1335–1347. doi:10.1007/s00204-016-1663-5

Soukup, S. T., Müller, D. R., Kurrat, A., Diel, P., & Kulling, S. E. (2017). Influence of testosterone on phase II metabolism and availability of soy isoflavones in male Wistar rats. *Archives of Toxicology*, *91*(4), 1649–1661. doi:10.1007/s00204-016-1853-1

Spalding, K. L., Arner, E., Westermark, P. O., Bernard, S., Buchholz, B. A., Bergmann, O., et al. (2008). Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*, *453*(7196), 783–787. doi:10.1038/nature06902

Statistisches Bundesamt (2017). Bevölkerungsanteile in Deutschland nach Körpermaßen (BMI) und Altersgruppen 2017 | Umfrage. *Statista*. https://de.statista.com/statistik/daten/studie/256578/umfrage/bevoelkerungsanteile-in-deutschland-nach-koerpermassen-bmi-und-altersgruppen/. Zugegriffen: 22. April 2019

Stevenson, J. C., Crook, D., & Godsland, I. F. (1993). Influence of age and menopause on serum lipids and lipoproteins in healthy women. *Atherosclerosis*, *98*(1), 83–90.

Strable, M. S., & Ntambi, J. M. (2010). Genetic control of de novo lipogenesis: role in diet-induced obesity. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, *45*(3), 199–214. doi:10.3109/10409231003667500

Strakovsky, R. S., Lezmi, S., Flaws, J. A., Schantz, S. L., Pan, Y.-X., & Helferich, W. G. (2014). Genistein Exposure During the Early Postnatal Period Favors the Development of Obesity in Female, But Not Male Rats. *Toxicological Sciences*, *138*(1), 161–174. doi:10.1093/toxsci/kft331

Szkudelska, K., Nogowski, L., & Szkudelski, T. (2000). Genistein affects lipogenesis and lipolysis in isolated rat adipocytes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *75*(4–5), 265–271.

Szkudelski, T., Nogowski, L., Pruszyńska-Oszmałek, E., Kaczmarek, P., & Szkudelska, K. (2005). Genistein restricts leptin secretion from rat adipocytes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *96*(3–4), 301–307. doi:10.1016/j.jsbmb.2005.04.033

Tabata, S., Aizawa, M., Kinoshita, M., Ito, Y., Kawamura, Y., Takebe, M., et al. (2017). The influence of isoflavone for denervation-induced muscle atrophy. *European Journal of Nutrition*. doi:10.1007/s00394-017-1593-x

Tahboub, R., & Arafah, B. M. (2009). Sex steroids and the thyroid. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, *23*(6), 769–780. doi:10.1016/j.beem.2009.06.005

Takeuchi, S., Takahashi, T., Sawada, Y., Iida, M., Matsuda, T., & Kojima, H. (2009). Comparative study on the nuclear hormone receptor activity of various phytochemicals and their metabolites by reporter gene assays using Chinese hamster ovary cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, *32*(2), 195–202.

Taku, K., Umegaki, K., Sato, Y., Taki, Y., Endoh, K., & Watanabe, S. (2007). Soy isoflavones lower serum total and LDL cholesterol in humans: a meta-analysis of 11 randomized controlled trials. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *85*(4), 1148–1156. doi:10.1093/ajcn/85.4.1148

Tanaka, T., Yamamoto, J., Iwasaki, S., Asaba, H., Hamura, H., Ikeda, Y., et al. (2003). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(26), 15924–15929. doi:10.1073/pnas.0306981100

Tang, Y., Wallace, M., Sanchez-Gurmaches, J., Hsiao, W.-Y., Li, H., Lee, P. L., et al. (2016). Adipose tissue mTORC2 regulates ChREBP-driven de novo lipogenesis and hepatic glucose metabolism. *Nature Communications*, *7*. doi:10.1038/ncomms11365

Tchoukalova, Y. D., Votruba, S. B., Tchkonia, T., Giorgadze, N., Kirkland, J. L., & Jensen, M. D. (2010). Regional differences in cellular mechanisms of adipose tissue gain with overfeeding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(42), 18226–18231. doi:10.1073/pnas.1005259107

Tomar, R. S., & Shiao, R. (2008). Early life and adult exposure to isoflavones and breast cancer risk. *Journal of Environmental Science and Health. Part C, Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews*, *26*(2), 113–173. doi:10.1080/10590500802074256

Tomicek, N. J., Lancaster, T. S., & Korzick, D. H. (2011). Increased Estrogen Receptor β in Adipose Tissue is Associated with Increased Intracellular and Reduced Circulating Adiponectin Protein Levels in Aged Female Rats. *Gender medicine*, *8*(5), 325–333. doi:10.1016/j.genm.2011.05.010

Tontonoz, P., Hu, E., & Spiegelman, B. M. (1994). Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*, *79*(7), 1147–1156.

Toth, M. J., Poehlman, E. T., Matthews, D. E., Tchernof, A., & MacCoss, M. J. (2001). Effects of estradiol and progesterone on body composition, protein synthesis, and lipoprotein lipase in rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *280*(3), E496–E501. doi:10.1152/ajpendo.2001.280.3.E496

Uesugi, T., Toda, T., Tsuji, K., & Ishida, H. (2001). Comparative study on reduction of bone loss and lipid metabolism abnormality in ovariectomized rats by soy isoflavones, daidzin, genistin, and glycitin. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, *24*(4), 368–372.

Vainio, H., Kaaks, R., & Bianchini, F. (2002). Weight control and physical activity in cancer prevention: international evaluation of the evidence. *European journal of cancer prevention: the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, *11 Suppl 2*, S94-100.

Valli, V., Heilmann, K., Danesi, F., Bordoni, A., & Gerhäuser, C. (2018). Modulation of Adipocyte Differentiation and Proadipogenic Gene Expression by Sulforaphane, Genistein, and Docosahexaenoic Acid as a First Step to Counteract Obesity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Research article. doi:10.1155/2018/1617202

van der Velpen, V., Hollman, P. C., van Nielen, M., Schouten, E. G., Mensink, M., van't Veer, P., & Geelen, A. (2014). Large inter-individual variation in isoflavone plasma concentration limits use of isoflavone intake data for risk assessment. *European Journal of Clinical Nutrition*, *68*(10), 1141–1147. doi:10.1038/ejcn.2014.108

Velders, M., Schleipen, B., Fritzemeier, K. H., Zierau, O., & Diel, P. (2012). Selective estrogen receptor-β activation stimulates skeletal muscle growth and regeneration. *The FASEB Journal*, *26*(5), 1909–1920. doi:10.1096/fj.11-194779

Velders, M., Solzbacher, M., Schleipen, B., Laudenbach, U., Fritzemeier, K. H., & Diel, P. (2010). Estradiol and genistein antagonize the ovariectomy effects on skeletal muscle myosin heavy chain expression via ER-beta mediated pathways. *The Journal of*

Steroid Biochemistry and Molecular Biology, *120*(1), 53–59. doi:10.1016/j.jsbmb.2010.03.059

Vermeulen, A., Kaufman, J. M., Deslypere, J. P., & Thomas, G. (1993). Attenuated luteinizing hormone (LH) pulse amplitude but normal LH pulse frequency, and its relation to plasma androgens in hypogonadism of obese men. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *76*(5), 1140–1146. doi:10.1210/jcem.76.5.8496304

Vermeulen A, S, G., & Jm, K. (1999). Testosterone, body composition and aging. *Journal of endocrinological investigation*, *22*(5 Suppl), 110–116.

Virtanen, K. A., Lönnroth, P., Parkkola, R., Peltoniemi, P., Asola, M., Viljanen, T., et al. (2002). Glucose uptake and perfusion in subcutaneous and visceral adipose tissue during insulin stimulation in nonobese and obese humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *87*(8), 3902–3910. doi:10.1210/jcem.87.8.8761

Wächtershäuser, A., & Stein, J. (2007). [Lipid and lipoprotein metabolism]. *Pharmazie in Unserer Zeit*, *36*(2), 98–107.

Wajchenberg, B. L. (2000). Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue: Their Relation to the Metabolic Syndrome. *Endocrine Reviews*, *21*(6), 697–738. doi:10.1210/edrv.21.6.0415

Wang, H., & Ye, J. (2015). Regulation of Energy Balance by Inflammation: Common Theme in Physiology and Pathology. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, *16*(1), 47–54. doi:10.1007/s11154-014-9306-8

Wang, J., Eltoum, I.-E., & Lamartiniere, C. A. (2002). Dietary genistein suppresses chemically induced prostate cancer in Lobund-Wistar rats. *Cancer Letters*, *186*(1), 11–18.

Wang, J., Eltoum, I.-E., & Lamartiniere, C. A. (2007). Genistein chemoprevention of prostate cancer in TRAMP mice. *Journal of Carcinogenesis*, *6*(1), 3. doi:10.1186/1477-3163-6-3

Wang, Q. A., Tao, C., Gupta, R. K., & Scherer, P. E. (2013). Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nature Medicine*, *19*(10), 1338–1344. doi:10.1038/nm.3324

Warri, A., Saarinen, N. M., Makela, S., & Hilakivi-Clarke, L. (2008). The role of early life genistein exposures in modifying breast cancer risk. *British Journal of Cancer*, *98*(9), 1485–1493. doi:10.1038/sj.bjc.6604321

Weber, K. S., Jacobson, N. A., Setchell, K. D., & Lephart, E. D. (1999). Brain Aromatase and 5α-Reductase, Regulatory Behaviors and Testosterone Levels in Adult Rats on Phytoestrogen Diets. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, *221*(2), 131–135. doi:10.1046/j.1525-1373.1999.d01-66.x

Weggemans, R. M., & Trautwein, E. A. (2003). Relation between soy-associated isoflavones and LDL and HDL cholesterol concentrations in humans: a meta-analysis. *European Journal of Clinical Nutrition*, *57*(8), 940–946. doi:10.1038/sj.ejcn.1601628

Weigt, C., Hertrampf, T., Kluxen, F. M., Flenker, U., Hülsemann, F., Fritzemeier, K. H., & Diel, P. (2013). Molecular effects of ER alpha-and beta-selective agonists on regulation of energy homeostasis in obese female Wistar rats. *Molecular and cellular endocrinology*, *377*(1), 147–158.

Weigt, C., Hertrampf, T., Zoth, N., Fritzemeier, K. H., & Diel, P. (2012). Impact of estradiol, ER subtype specific agonists and genistein on energy homeostasis in a rat model of nutrition induced obesity. *Molecular and cellular endocrinology*, *351*(2), 227–238. doi:10.1016/j.mce.2011.12.013

Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., & Ferrante, A. W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation*, *112*(12), 1796–1808. doi:10.1172/JCI19246

Wellhoener, P., Fruehwald-Schultes, B., Kern, W., Dantz, D., Kerner, W., Born, J., et al. (2000). Glucose Metabolism Rather Than Insulin Is a Main Determinant of Leptin Secretion in Humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *85*(3), 1267–1271. doi:10.1210/jcem.85.3.6483

Wend, K., Wend, P., & Krum, S. A. (2012). Tissue-specific effects of loss of estrogen during menopause and aging. *Frontiers in Endocrinology of Aging*, *3*, 19. doi:10.3389/fendo.2012.00019

Wespes, E., & Schulman, C. C. (2002). Male andropause: myth, reality, and treatment. *International Journal of Impotence Research*, *14 Suppl 1*, S93-98. doi:10.1038/sj.ijir.3900798

WHO. (2000). Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organization Technical Report Series*, *894*, i–xii, 1–253.

WHO. (2018, Februar 16). Fact sheets: Obesity and overweight. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight. Zugegriffen: 17. März 2019

Wirth, A. (2007). *Adipositas: Ätiologie, Folgekrankheiten, Diagnose, Therapie*. Springer Berlin Heidelberg.

Wong, R. H., & Sul, H. S. (2010). Insulin signaling in fatty acid and fat synthesis: a transcriptional perspective. *Current opinion in pharmacology*, *10*(6), 684–691. doi:10.1016/j.coph.2010.08.004

Wu, A. H., Yu, M. C., Tseng, C.-C., & Pike, M. C. (2008). Epidemiology of soy exposures and breast cancer risk. *British journal of cancer*, *98*(1), 9–14. doi:10.1038/sj.bjc.6604145

Wu, J., Wang, X., Chiba, H., Higuchi, M., Nakatani, T., Ezaki, O., et al. (2004). Combined intervention of soy isoflavone and moderate exercise prevents body fat elevation and

bone loss in ovariectomized mice. *Metabolism: Clinical and Experimental*, *53*(7), 942–948.

Wunderlich, S. (2012). Overweight and Obesity among Older Adults: How should Obesity be Determined? *Journal of Obesity & Weight Loss Therapy*, *02*(08). doi:10.4172/2165-7904.1000147

Yamakoshi, J., Piskula, M. K., Izumi, T., Tobe, K., Saito, M., Kataoka, S., et al. (2000). Isoflavone aglycone-rich extract without soy protein attenuates atherosclerosis development in cholesterol-fed rabbits. *The Journal of Nutrition*, *130*(8), 1887–1893. doi:10.1093/jn/130.8.1887

Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A., Yokomizo, T., Kita, S., et al. (2003). Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*, *423*(6941), 762–769. doi:10.1038/nature01705

Yang, J.-Y., Lee, S.-J., Park, H.-W., & Cha, Y.-S. (2006). Effect of genistein with carnitine administration on lipid parameters and obesity in C57Bl/6J mice fed a high-fat diet. *Journal of Medicinal Food*, *9*(4), 459–467.

Yang, Z., Kulkarni, K., Zhu, W., & Hu, M. (2012). Bioavailability and Pharmacokinetics of Genistein: Mechanistic Studies on its ADME. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, *12*(10), 1264–1280.

Yasuda, S., Wu, P.-S., Okabe, M., Tachibana, H., & Yamada, K. (2005). Tissue-specific Distribution of Genistein, Daidzein and Bisphenol A in Male Sprague-Dawley Rats after Intragastric Administration. *Food Science and Technology Research*, *11*(2), 187–193. doi:10.3136/fstr.11.187

Yoshikawa, T., Ide, T., Shimano, H., Yahagi, N., Amemiya-Kudo, M., Matsuzaka, T., et al. (2003). Cross-Talk between Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) α and Liver X Receptor (LXR) in Nutritional Regulation of Fatty Acid Metabolism. I. PPARs Suppress Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c Promoter through Inhibition of LXR Signaling. *Molecular Endocrinology*, *17*(7), 1240–1254. doi:10.1210/me.2002-0190

Yoshimura, T., Robinson, E. A., Tanaka, S., Appella, E., & Leonard, E. J. (1989). Purification and amino acid analysis of two human monocyte chemoattractants produced by phytohemagglutinin-stimulated human blood mononuclear leukocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *142*(6), 1956–1962.

Yu, J., Bi, X., Yu, B., & Chen, D. (2016). Isoflavones: Anti-Inflammatory Benefit and Possible Caveats. *Nutrients*, *8*(6). doi:10.3390/nu8060361

Zanella, I., Marrazzo, E., Biasiotto, G., Penza, M., Romani, A., Vignolini, P., et al. (2014). Soy and the soy isoflavone genistein promote adipose tissue development in male mice on a low-fat diet. *European Journal of Nutrition*. doi:10.1007/s00394-014-0786-9

Zhang, W. (2011). The role of inflammation in breast cancer and prostate cancer. *Clinical Oncology and Cancer Research*, *8*(2), 77. doi:10.1007/s11805-011-0563-y

Zhang, Y., Song, T. T., Cunnick, J. E., Murphy, P. A., & Hendrich, S. (1999). Daidzein and genistein glucuronides in vitro are weakly estrogenic and activate human natural killer cells at nutritionally relevant concentrations. *The Journal of Nutrition*, *129*(2), 399–405. doi:10.1093/jn/129.2.399

Zheng, W., Hengevoß, J., Soukup, S. T., Kulling, S. E., Xie, M., & Diel, P. (2017). An isoflavone enriched diet increases skeletal muscle adaptation in response to physical activity in ovariectomized rats. *Molecular Nutrition & Food Research*, *61*(10), n/a-n/a. doi:10.1002/mnfr.201600843

Zheng, X., Lee, S.-K., & Chun, O. K. (2016). Soy Isoflavones and Osteoporotic Bone Loss: A Review with an Emphasis on Modulation of Bone Remodeling. *Journal of Medicinal Food*, *19*(1), 1–14. doi:10.1089/jmf.2015.0045

Ziegler, R. G., Hoover, R. N., Pike, M. C., Hildesheim, A., Nomura, A. M., West, D. W., et al. (1993). Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. *Journal of the National Cancer Institute*, *85*(22), 1819–1827.

Zumoff, B., Strain, G. W., Miller, L. K., Rosner, W., Senie, R., Seres, D. S., & Rosenfeld, R. S. (1990). Plasma free and non-sex-hormone-binding-globulin-bound testosterone are decreased in obese men in proportion to their degree of obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *71*(4), 929–931. doi:10.1210/jcem-71-4-929

6 Anhang

Anhang 1 UHPLC MS/MS Messparameter und *multiple reaction monitoring* (MRM) Einstellungen (AB Sciex QTrap 5500) für Daidzein-4'-β-D-glucuronid-7-sulfat (DAI-4'-GlcA-7-S) und Genistein-4'-β-D-glucuronid-7-sulfat (GEN-4'-GlcA-7-S).

Analyt	Transition	Mass 1	Mass 2	RT [min]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
	1	509	253	8,98	-95	-50	-7
DAI-4'-GlcA-7-S	2	509	429,1	8,98	-95	-30	-15
	1	524,9	269	9,95	-85	-50	-13
GEN-4'-GlcA-7-S	2	524,9	445	9,95	-85	-30	-15

MRM *detection window:* 60 s; *target scan time:* 0.4 s; RT = *retention time;* DP = *declustering potential*; CE = *collision energy voltage*; CXP = *collision cell exit potential;* DAI = Daidzein; GEN = Genistein; GlcA = Glucuronid; S = Sulfat.

Anhang 2 Quantifizierungs- (LOQ = limit of quantification) und Nachweisgrenzen (LOD = *limit of detection)* der Isoflavone und Isoflavonmetabolite im Rattenplasma.

Analyt	LOQ [nM]	LOD [nM]
GEN	1,9	0,6
GEN-4'-GlcA	23,3	7
GEN-7-GlcA	17,5	5,3
GEN-4'-S	3,5	1
GEN-7-S	2,5	0,8
GEN-4',7-DS	4,6	1,4
GEN-7-GlcA-4'-S	1,1	0,3
GEN-4'-GlcA-7-S	4,2	1,3
DAI	5	1,5
DAI-4'-GlcA	13,7	4,1
DAI-7-GlcA	7,1	2,1
DAI-4'-S	2	0,6
DAI-7-S	1,3	0,4
DAI-4',7-DS	1,5	0,4
DAI-7-GlcA-4'-S	2,1	0,6
DAI-4'-GlcA-7-S	1,4	0,4
DH-GEN	2,5	0,8
6'-Hydroxyl-ODMA	6,5	1,9
DH-DAI	2,5	0,8
ODMA	1	0,3
Equol	661,5	198,5
Equol-7-GlcA	27,9	8,4
Equol-4'-S	1,5	0,5

DAI = Daidzein; GEN = Genistein; GlcA = Glucuronid; S = Sulfat; DH = Dihydro-; ODMA = O-Desmethyl-angolensin; DS = Disulfat