

Institut für Ernährungswissenschaft
Justus-Liebig-Universität Gießen

Untersuchungen zur immunmodulatorischen Wirkung von Phytoöstrogenen

Dissertation zum Erlangen des Doktorgrades im Fachbereich
„Agrarwissenschaften, Ökotropologie und Umweltmanagement“
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von Dipl. oec. troph. Sandra Gredel

erstellt am Institut für Ernährungsphysiologie
der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel in Karlsruhe

Gutachter: Prof. Dr. Clemens Kunz, Dr. habil. Dr. Bernhard Watzl

Disputation am 20. Juli 2005

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	v
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	5
2.1 Immunsystem	5
2.1.1 Elemente des Immunsystems	5
2.1.2 Immunsystem und Krebs	9
2.2 Phytoöstrogene	10
2.2.1 Chemische Struktur und Vorkommen in Lebensmitteln	11
2.2.2 Metabolismus	15
2.2.3 Physiologische Effekte	18
2.3 Einfluss der Phytoöstrogene auf das Immunsystem	22
2.3.1 In vitro-Studien mit Isoflavonen	24
2.3.2 Tierexperimentelle Studien mit Isoflavonen	24
2.3.3 Humanstudien mit Isoflavonen	28
2.3.4 Studien mit Lignanen	29
2.4 Ziele und Inhalte der Arbeit	30
3 Materialien, Lösungen und Geräte	33
3.1 Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	33
3.2 Lösungen	36
3.3 Kultivierung der Zelllinien	40
3.4 Geräte	41
4 Studiendesigns und Methoden	43
4.1 In vitro-Experimente mit Jurkat	43

4.1.1	Studiendesign	43
4.1.2	Proliferation	43
4.1.3	Bestimmung der Zellvitalität im Proliferationsansatz	44
4.1.4	Apoptose und Nekrose	45
4.2	In vitro-Experimente mit PBMC des Menschen	47
4.2.1	Studiendesign	47
4.2.2	Isolierung mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut	48
4.2.3	Mitogen-aktivierte Proliferation	48
4.2.4	Apoptose und Nekrose	49
4.2.5	Zytotoxische Aktivität natürlicher Killerzellen	50
4.2.6	Mitogen-aktivierte Zytokinproduktion	52
4.2.7	Inhibierungsversuche mit Antiöstrogenen	55
4.3	Experimente mit Milzzellen der Maus	56
4.3.1	Studiendesign	56
4.3.2	Isolierung von Lymphozyten aus der Milz	56
4.3.3	Mitogen-aktivierte Proliferation	57
4.3.4	Aktivität Natürlicher Killerzellen	57
4.3.5	Phagozytische Aktivität der Granulozyten und Monozyten	58
4.3.6	Mitogen-aktivierte Zytokinproduktion	59
4.4	Humanstudie	60
4.4.1	Studiendesign	60
4.4.2	Lymphozytensubpopulationen	61
4.4.3	Mitogen-aktivierte Proliferation	62
4.4.4	Zytotoxische Aktivität Natürlicher Killerzellen	63
4.4.5	Mitogen-aktivierte Zytokinproduktion	63
4.5	Statistische Auswertung	64
5	Ergebnisse	67
5.1	In vitro-Experimente mit Jurkat	67
5.1.1	Proliferation und Zellvitalität	67
5.1.2	Apoptose und Nekrose	69
5.2	In vitro-Experimente mit PBMC des Menschen	70
5.2.1	Proliferation	70
5.2.2	Apoptose und Nekrose	71
5.2.3	Zytotoxische Aktivität Natürlicher Killerzellen	71
5.2.4	Zytokine	71

5.2.5	Inhibierungsversuche mit Antiöstrogenen	76
5.3	Experimente mit Milzzellen der Maus	78
5.3.1	Mitogen-aktivierte Proliferation	78
5.3.2	Zytotoxische Aktivität Natürlicher Killerzellen	78
5.3.3	Phagozytische Aktivität der Granulozyten und Monozyten . .	78
5.3.4	Mitogen-aktivierte Zytokinproduktion	79
5.4	Humanstudie	79
5.4.1	Mitogen-aktivierte Proliferation	82
5.4.2	Anteil und zytotoxische Aktivität Natürlicher Killerzellen . . .	82
5.4.3	T-Lymphozyten und Zytokine	82
5.5	Zusammenfassung beobachteter Effekte in den Teilstudien	85
6	Diskussion	87
6.1	In vitro-Experimente	87
6.1.1	Lösungsmittelleffekte	87
6.1.2	Apoptose, Nekrose, Zellvitalität und Proliferation	87
6.1.3	Zytotoxische Aktivität der NK-Zellen und Zytokinproduktion	91
6.1.4	Mögliche Mechanismen der Phytoöstrogeneffekte	93
6.1.5	Zusammenfassung	99
6.2	Experimente mit Milzzellen der Maus	101
6.2.1	Einordnung und Bewertung der Ergebnisse	101
6.2.2	Mögliche Mechanismen	103
6.2.3	Zusammenfassung	105
6.3	Humanstudie	105
6.3.1	Einordnung und Bewertung der Ergebnisse	105
6.3.2	Mögliche Mechanismen	108
6.3.3	Zusammenfassung	109
6.4	Zusammenfassende Bewertung der Studien dieser Arbeit	109
6.4.1	Übersicht	109
6.4.2	Bedeutung und Übertragbarkeit der Ergebnisse	110
6.4.3	Schlussfolgerungen	112
	Anhang	115
	Literaturverzeichnis	129

Abkürzungsverzeichnis

BrdU	Bromdesoxy-Uridin
BSA	Bovines Serumalbumin
Con A	Concanavalin A
<i>Dai</i>	Daidzein
DiO	3,3'-Diocetadecyloxacarbocyanin-Perchlorat
<i>DMA</i>	O-Desmethylangolensin
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<i>End</i>	Enterodiol
<i>Enl</i>	Enterolacton
<i>Eq</i>	Equol
ER	Estrogen Receptor
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter, Durchflusszytometer
FBS	Fötales Rinderserum
FITC	Fluoresceinthiocyanat
FL	Fluoreszenzdetektor (am Durchflusszytometer)
FSC	Forward Scatter (am Durchflusszytometer)
Ful	Fulvestrant
<i>Gen</i>	Genistein
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
LPS	Lipopolysaccharid
<i>Mat</i>	Matairesinol
MTP	Mikrotiterplatte

NK-	Natürliche Killer-
NKT-	Natürliche Killer-T-
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PI	Propidiumjodid
p.o.	per os
PÖ	Phytoöstrogene
PS	Polystyrol
PTK	Protein-Tyrosin-Kinase
<i>Sec</i>	Secoisolariciresinol
SERM	Selective Estrogen Receptor Modulator
SSC	Sideward Scatter (am Durchflusszytometer)
Tam	Tamoxifen
T _c	zytotoxische T-Zellen
T _h	T-Helfer-Zellen
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TZR	T-Zell-Rezeptor

1 Zusammenfassung

Hintergrund

Phytoöstrogene sind eine Gruppe sekundärer Pflanzenstoffe, deren bedeutendste Stoffklassen die Isoflavone und die Lignane darstellen. Isoflavone werden vom Menschen vor allem mit Sojaprodukten, Lignane mit Vollkornprodukten und Leinsaat aufgenommen. Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass Personen mit hohem Verzehr dieser Lebensmittel bzw. hohem Plasmaspiegel von Phytoöstrogenen und ihrer Metabolite ein geringeres Erkrankungsrisiko für Osteoporose, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und östrogenabhängige Tumorarten wie Brust- und Prostatakrebs aufweisen. Des Weiteren geht aus bisher veröffentlichten Studien hervor, dass Phytoöstrogene einen gewissen Einfluss auf das Immunsystem ausüben. Durch welche Mechanismen diese Effekte vermittelt werden, ob Phytoöstrogene verantwortlich für diese präventiven Effekte sind oder nur Marker darstellen, und ob die Immunmodulation ein Teil des Mechanismus der Krankheitsprävention ist, ist bisher ungeklärt.

Auf dem Gebiet der Immunmodulation durch Phytoöstrogene beschäftigt sich eine Reihe von Studien mit der Wirkung von Isoflavonen, darunter vor allem Genistein, auf verschiedene Zelllinien oder auf Immunparameter von Mäusen und Ratten. In vitro-Studien und tierexperimentelle Studien mit den in der westlichen Ernährung relevanten Lignanarten fehlen, und es existieren nur fünf Humanstudien mit Interventionscharakter. Lediglich eine davon beschäftigt sich mit dem Einfluss von Lignanarten auf das Immunsystem. Zudem sind die zugrunde liegenden Mechanismen unzureichend bekannt. Diskutiert wird die Vermittlung über Östrogenrezeptoren, die Wirkung als Protein-Tyrosin-Kinase-Inhibitoren oder als Antioxidantien.

Ziele und Inhalte dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es daher,

1. aufzuklären, inwieweit Phytoöstrogene einschließlich ihrer Metabolite ausgewählte Parameter des Immunsystems modulieren können und dabei die Wirkung von Lignanenen in gleicher Weise zu betrachten wie die von Isoflavonen.
2. im Ansatz zu ermitteln, welche Mechanismen an einer Modulation beteiligt sind.
3. zu diskutieren, welche Bedeutung die Ergebnisse auch im Hinblick auf eine mögliche Tumorprävention besitzen.

Zur Aufklärung von Art und Ausmaß der Immunmodulation wurde ein breites Spektrum immunologischer Methodik verwendet. Ausgehend von der Jurkat T-Zelllinie über isolierte periphere Blutleukozyten des Menschen und das Modell der Tg.NK Maus bis zur Interventionsstudie am Menschen wurde der Einfluss von insgesamt acht Phytoöstrogenen und ihrer Metabolite auf im Ganzen 13 Immunparameter betrachtet. Um eine Aussage über die Vermittlung möglicher Effekte über die Östrogenrezeptoren zu ermöglichen, wurden in vitro zwei verschiedene Typen von Antiöstrogenen eingesetzt.

Ergebnisse

Phytoöstrogenkonzentrationen über 10 μM bis 50 μM verringerten die Vitalität, Proliferation, NK-Aktivität und Zytokinproduktion von Jurkat T-Lymphozyten und primären humanen mononukleären Zellen des peripheren Bluts und steigerten die Apoptose- und Nekroserate der Jurkat-Zellen. Diese Effekte waren vor allem bei den Isoflavonen Genistein und Equol zu sehen, Lignane waren weit weniger wirksam. Sojaproteinisolat führte bei jungen, aber nicht bei erwachsenen Tg.NK Mäusen zur Steigerung der lytischen Aktivität von Natürlichen Killerzellen und Verringerung der Phagozytoseleistung der Granulozyten. Beim Menschen korrelierte nach Aufnahme phytoöstrogenreicher Lebensmittel die renale Ausscheidung einzelner Phytoöstrogene, besonders der Lignane und deren Metabolite, positiv mit dem Anteil Natürlicher Killerzellen und negativ mit dem Anteil von T_h - und T_c -Lymphozyten im peripheren Blut.

Als mögliche Mechanismen kommen in vitro vor allem toxische Effekte zum Tragen, direkte Wirkungen über Östrogenrezeptoren können ausgeschlossen werden. Die Aktivitätsveränderungen der NK-Zellen und Granulozyten im Mausmodell sind vermutlich auf systemische antiöstrogene Effekte zurückzuführen, während die Populationsverschiebungen in der humanen Interventionsstudie auf noch ungeklärten Mechanismen beruhen.

Schlussfolgerungen

Eine normale Mischkost, die phytoöstrogenreiche Lebensmittel enthält, führt nicht zu Plasmakonzentrationen, die in vitro Funktionsstörungen von Lymphozyten verursachen. Dagegen können Personen, die Supplemente zu sich nehmen und Säuglinge, die mit Formulanahrung auf Sojabasis ernährt werden, Phytoöstrogengehalte im Plasma erreichen, die nahe an Konzentrationen heranreichen, die in vitro die Funktion der Zellen beeinträchtigte. Dies müsste im Hinblick auf den Verbraucherschutz kritisch überprüft werden.

Ferner lässt die Interventionsstudie am Menschen keinen Schluss über eine mögliche Tumoprävention durch phytoöstrogenreiche Lebensmittel zu, da die Ausscheidung einzelner Nahrungsöstrogene, besonders der Lignane und deren Metabolite, mit dem Anteil Natürlicher Killerzellen positiv, mit dem Anteil von T_h - und T_c -Lymphozyten negativ korreliert ist. Auch wenn die Antwort der Zellen auf Mitogenaktivierung nicht beeinträchtigt wurde, lässt sich nicht ausschließen, dass durch eine länger dauernde Zufuhr von Phytoöstrogenen auch Wirkungen auf die Funktion der Zellen sichtbar wären. Dies sollte in weiteren Versuchen beobachtet werden.

2 Einleitung

2.1 Immunsystem

2.1.1 Elemente des Immunsystems

Das Immunsystem lässt sich als eine Organisation aus Geweben, Zellen und Verbindungen definieren, die darauf spezialisiert sind, den Körper gegen schädliche Fremdstoffe zu verteidigen. Es wird in angeborene und erworbene (adaptive) Abwehr eingeteilt (s. Abb. 2.1). Eine ausführliche Beschreibung des Immunsystems und Grundlage der hier dargestellten Zusammenfassung stellt das Lehrbuch „Immunobiology“ dar [Janeway et al. 2005].

Die Gewebe des Immunsystems setzen sich aus den primären lymphatischen Geweben – Knochenmark und Thymus – und den sekundären lymphatischen Geweben – Lymphknoten, Milz und Mucosa-assoziierte lymphatische Gewebe (Rachen- und Gaumenmandeln, Blinddarm, Peyersche Plaques) – zusammen. Alle zellulären Bestandteile des Immunsystems entstehen aus den hämatopoetischen Stammzellen im roten Knochenmark. B-Zellen, Granulozyten und Monozyten verlassen ausdifferenziert das Knochenmark, anschließend differenzieren sich Monozyten kontinuierlich zu Makrophagen weiter. T-Zellen werden im Thymus einer Selektion unterworfen, wobei über 95 % der Zellen durch Apoptose eliminiert werden.

Haben Fremdkörper die erste Barriere der Körperoberflächen aus Enzymen und Schleim überwunden, treten ihnen als zweite Barriere die Elemente der angeborenen Abwehr entgegen. Die Moleküle des Komplementsystems markieren Mikroorganismen als fremd und machen sie damit anfälliger für Makrophagen und Neutrophile, die die Eindringlinge phagozytieren und Bruchstücke davon auf ihrer Oberfläche präsentieren. Natürliche Killerzellen zerstören virusinfizierte und maligne Zellen. Die dritte Barriere für Fremdkörper sind die spezialisierten Zellen der erworbenen Abwehr. Antigen-präsentierende Zellen phagozytieren fremde Substanzen und präsentieren in den Lymphknoten Bruchstücke davon B- und T-Lymphozyten. Jede

Angeborene Abwehr	Erworbene Abwehr
• Kein Lerneffekt • Immer gleich bleibende, sofort potente Reaktion auf einen Erreger • Phagozyten: – Neutrophile Granulozyten – Monozyten – Makrophagen • Zellen, die Entzündungsmediatoren ausschütten: – Makrophagen – Basophile Granulozyten – Mastzellen – Eosinophile Granulozyten • Natürliche Killerzellen • Komplementsystem • Akute Phase Proteine • Zytokine	• Lernprozess nötig • Reaktion wird erst beim Zweitkontakt mit einem Fremdkörper effizient. • Lymphozyten: – B-Zellen – T-Zellen • Antigen-präsentierende Zellen

Abbildung 2.1: Charakteristika und Elemente der angeborenen und erworbenen Abwehr

dieser Zellen besitzt eine bestimmte von 10^{15} möglichen Rezeptorvarianten. Zellen, deren Rezeptor auf das präsentierte Antigen passt, proliferieren, schütten Zytokine aus und entwickeln sich zu Effektorzellen, Antikörper produzierenden Plasmazellen oder Gedächtniszellen.

Elemente und Funktionen des Immunsystems, die für diese Arbeit wichtig sind, sind im Folgenden aufgeführt.

Monozyten/Makrophagen Monozyten wandern aus der Blutbahn in Gewebe im ganzen Körper ein und reifen dort zu Makrophagen. In besonders großer Zahl kommen sie im Bindegewebe, im Gastrointestinaltrakt, in der Milz und entlang der Kupffer-Zellen der Leber, der interstitiellen Zellen und Alveolarzellen der Lunge vor. Im ruhenden Stadium phagozytieren sie Zelldebris. Kommen sie mit Interferon (IFN) γ , Lipopolysaccharid (LPS) oder Mannose in Kontakt, gehen sie in das Stadium der Hyperaktivität über. Die Zellen gewinnen an Größe, sezernieren unter anderem Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) α , erhöhen ihre Anzahl an Lysosomen und steigern die Produktion reaktiver Sauerstoffverbindungen und die Expression von MHC-II, einem Membranprotein zur Präsentation von Fremdprotein. In diesem Stadium fungieren Makrophagen als exzellente Phagozyten und Antigen-präsentierende Zellen. Sinkt die Konzentration von aktivierenden Antigenen und Zytokinen, gehen sie wieder in das Stadium der Ruhe über.

Neutrophile Granulozyten zirkulieren in der Blutbahn, wo sie den größten Anteil der Leukozyten ausmachen. Sie wandern bei Entzündungen – vermittelt von Selektinen, Integrinen und Chemoattraktoren – durch die Endothelwand in die entsprechenden Gewebe ein und unterstützen Makrophagen bei der Phagozytose, worauf sie spezialisiert sind.

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) zerstören Antigen-unabhängig fremde, intrazellulär infizierte und maligne Zellen. Diese weisen sich durch anhaftende Immunglobulin G- (IgG-) Antikörper, durch fremde MHC-Komplexe oder durch fremde und veränderte Proteine in körpereigenen MHC I-Komplexen aus. Erkennt eine NK-Zelle eine solche Zelle, stehen ihr zwei Arten der Elimination zu Verfügung. Zum Einen kann durch Interaktion zwischen Fas-Rezeptor und Fas-Liganden direkt Apoptose in der Zielzelle ausgelöst werden, zum Anderen kann die NK-Zelle Perforin in die Membran der Zielzelle einfügen und durch die entstandenen Poren zytotoxische Granzyme injizieren. Dies führt

indirekt ebenfalls zur Apoptose. NK-Zellen tragen das Zelladhäsionsmolekül CD56 in unterschiedlicher Dichte, wodurch sie sich nach Analyse im Durchflussszytometer in zwei Untergruppen einteilen lassen. CD56^{dim}-Zellen machen den größten Anteil aus zeigen vor allem lytische Aktivität. 1-5 % der NK-Zellen sind CD56^{bright}, produzieren IFN- γ und TNF- α und wirken vorwiegend immunregulatorisch Jacobs [2002]. NK-Zellen werden durch Interferone α und β und Interleukin-12 (IL-12) aktiviert.

T-Zellen besitzen hauptsächlich regulatorische Aufgaben. Sie sind durch das Vorhandensein des T-Zell-Rezeptors (TZR) auf der Zellmembran gekennzeichnet. Untergruppen weisen sich durch ein Expressionsmuster bestimmter Rezeptoren und bestimmter Zytokine aus. So unterscheidet man drei Sorten T-Helfer-Zellen (T_h1 , T_h2 und T_h3), regulatorische (T_r1 -) und zytotoxische (T_c -) T-Zellen und natürliche Killer- (NK-)T-Zellen (s. Abb. 2.2).

T-Zellen verlassen das Knochenmark ohne T-Zell-Rezeptor und ohne dessen Corezeptoren CD4 und CD8. Im Cortex des Thymus exprimieren sie dann niedrige Konzentrationen des TZR mit beiden assoziierten Proteinen und tragen eine große Anzahl Fas-Antigene auf ihrer Oberfläche, die Apoptosesignale in die Zelle leiten. Bei der positiven und negativen Selektion im Cortex und in der Medulla werden solche Zellen eliminiert, deren TZR das körpereigene MHC-I-Molekül nicht sicher erkennen oder an körpereigene Proteine binden, die in diesem MHC-I präsentiert werden. Nach diesem Vorgang verlassen reife T-Zellen den Thymus, die eine große Zahl des T-Zell-Rezeptors auf ihrer Oberfläche tragen, der entweder mit CD4 oder mit CD8 assoziiert ist.

Zytokine sind als kleine, lösliche Proteine, die von einzelnen Zellen gebildet werden, sowohl Botenstoffe innerhalb des Immunsystems als auch Mittler zwischen dem Immunsystem und anderen Systemen des Organismus. Sie bilden somit ein integriertes Netzwerk, das die Immunantwort reguliert. IFN- γ wird u. a. von T_h1 - und T_c -Zellen produziert und aktiviert vor allem Makrophagen. IL-2 wird von T_h1 -Zellen gebildet, um die eigene Zellteilung und die von NK-Zellen zu verstärken, IL-4 wird von T_h2 -Zellen synthetisiert und aktiviert B-Lymphozyten und autostimulatorisch T_h2 -Zellen. TNF- α wird u. a. von Makrophagen produziert und löst lokale Entzündungsreaktionen aus. Das ebenfalls von Makrophagen produzierte IL-12 aktiviert NK-Zellen und induziert die Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen zu T_h1 -Zellen.

Gruppe	Eigenschaften
T_h1	Produktion von IL-2 und IFN- γ , Aktivierung von Makrophagen und T-Zell-vermittelter Zytotoxizität
T_h2	Produktion von IL-4, IL-5 und IL-13, Induktion der Antikörperproduktion
T_h3 , T_r1	Produktion von IL-4 und TGF- β , T_h3 zusätzlich IL-10 Hemmung der T_h1 -Antwort
T_c	Elimination von virusinfizierten Zellen
NKT	Phänotyp wie T-Zellen, Aktivitätscharakteristika wie NK-Zellen

Abbildung 2.2: Charakteristika und Funktionen von T-Lymphozyten

2.1.2 Immunsystem und Krebs

Neben der Abwehr von Krankheitserregern wird dem Immunsystem auch eine Rolle in der Tumorbekämpfung zugeschrieben. Burnet prägte 1967 den Begriff der „Tumor-Immunosurveillance“ und beschrieb damit die Beobachtung, dass Personen mit eingeschränkter Immunfunktion häufiger an Tumoren litten [Burnet 1967]. Die Vermutung war, dass Elemente des Immunsystems, vor allem NK-Zellen, entartete Zellen eliminieren und so das Entstehen eines Tumors unterbinden bzw. sein Wachstum einschränken.

Tatsächlich spielen NK-Zellen eine wichtige Rolle in der Tumorbekämpfung. Bestimmte Membranrezeptoren, wie der NKG2D-DAP10-Komplex, interagieren mit Liganden, die von Zellen unter Bedingungen exprimiert werden, die auch zu Zelltransformationen führen, und deren Expression in vielen Epithelkarzinomzellen erhöht ist [Smyth et al. 2001]. Außerdem reduzieren entartete Zellen die Expression von MHC-I-Molekülen und umgehen damit die Erkennung durch Antigen-präsentierende Zellen. MHC-I sind Liganden für inhibitorische Rezeptoren der NK-Zellen, ihr Fehlen stimuliert die lytische Aktivität dieser Zellen. Im Tiermodell konnte bei Mäusen ohne funktionierende NK-Zellen deren krebsprotektive Wirkung nachgewiesen werden [Haliotis et al. 1985]. Auch beim Menschen zeigen sich Zusammenhänge zwischen erniedrigter NK-Aktivität und erhöhter Tumorzinzidenz [Garner et al. 1983; Imai et al. 2000].

Weitere Faktoren der Immunreaktion auf maligne Zellen sind die erworbene Abwehr und die Produktion des regulatorischen Zytokins IFN- γ . Mäuse, deren IFN-

γ -Signalkaskade oder Lymphozytenreifung unterbrochen waren, bekämpften weniger effizient chemisch induzierte Tumore und entwickelten häufiger spontane maligne Tumore [Kaplan et al. 1998; Shankaran et al. 2001]. Leukozyten, insbesondere Antigen-präsentierende Zellen, erkennen transformierte Zellen an sogenannten Tumor-assoziierten Antigenen. Die Erkennung wird durch erhöhte Expression von MHC-I als Reaktion auf IFN- γ verstärkt [Smyth et al. 2001].

Die angeborenen und adaptiven Mechanismen der Abwehr führen zur Elimination immunsensibler Tumoren, aber auch zur Selektion immunresistenter Tumoren, die als Folge der hohen Mutationsfähigkeit der Tumorzellen und ihrer Anpassung an die immer spezifischer werdende Immunabwehr auftreten. Statt des statischen Begriffs „Tumour immunosurveillance“ ist also eher vom wechselwirkenden „Cancer immunoediting“ zu sprechen [Shankaran et al. 2001].

2.2 Phytoöstrogene

Phytoöstrogene sind eine Gruppe von sekundären Pflanzenstoffen, die als Östrogenmodulatoren, das heißt als Östrogenagonisten und -antagonisten, wirken. Sie werden in die vier Hauptklassen Isoflavone, Lignane, Coumestane und Prenylflavonoide eingeteilt. Gemeinsam ist ihnen ihre diphenolische Struktur, die eine Ähnlichkeit zum 17 β -Östradiol aufweist (s. Abb. 2.3) und die eine wichtige Voraussetzung für die Bindung an den Östrogenrezeptor darstellt. Ob sie dabei eher als Agonisten oder Antagonisten wirken, hängt ab von ihrer Konzentration, dem Rezeptorstatus, der Gegenwart endogener Östrogene, dem Zielgewebe und anderen Faktoren. Ihre östrogene Wirkung beträgt nur 1/100 bis 1/1000 der Wirkung von Östradiol, sie können aber im Plasma in 100- bis 10000-fach höherer Konzentration vorliegen als endogene Östrogene. Phytoöstrogene werden im Gastrointestinaltrakt und in Körpergeweben intensiv verstoffwechselt und üben zusammen mit ihren Metaboliten vielfältige Effekte auf den Organismus aus. Der Begriff „Nahrungsöstrogene“ umfasst sowohl die von der intestinalen Mikroflora und die vom Menschen synthetisierten Metabolite als auch die in den Pflanzen enthaltenen Vorläufer. Struktur, Quellen, Stoffwechsel und Wirkungen der Isoflavone sind gut untersucht, wohingegen es wenige Daten zu Lignanen, Coumestanen und Prenylflavonoiden gibt.

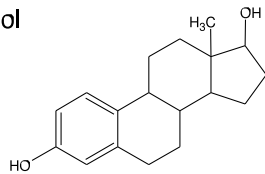
Einen Überblick über Chemie und Metabolismus der Phytoöstrogene geben Setchell und Adlercreutz [1988]; Kurzer und Xu [1997]; Setchell [1998]; Tham et al. [1998];

Ren et al. [2001]; Murphy und Hendrich [2002]; Wang [2002] und das Committee on Toxicity [2003].

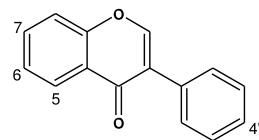
2.2.1 Chemische Struktur und Vorkommen in Lebensmitteln

Isoflavone (Abb. 2.3) sind Derivate der 3-Phenylchromone und unterscheiden sich von den Flavonen durch die Position der Verknüpfung von Chromon- und Phenolring. Sie dienen in der Pflanze unter anderem als Resistenzfaktoren und Vorstufen der Abwehrstoffe. Aus der großen Zahl bisher identifizierter Isoflavone haben nur wenige, darunter Genistein, Daidzein, Glycitein, Biochanin A und Formononetin eine Bedeutung für die menschliche Ernährung. Sie sind in Leguminosen, allen voran in der Sojabohne, und in Klee- und Luzernesprossen zu finden (s. Tab. 2.1). Im Lebensmittel liegen sie vor allem als β -Glukoside, aber auch als 6''-O-Malonylglukoside und 6''-O-Acetylglukoside vor. Der Anteil der Aglykone ist dagegen gering. Der Gesamtgehalt an Isoflavonen im Lebensmittel hängt ab von der Pflanzenart und -sorte, dem Standort, Umweltbedingungen und der industriellen Verarbeitung. So haben Sojamehl und -Konzentrate einen hohen Isoflavongehalt, Sojamilch und Säuglingsmilchnahrungen auf Sojabasis einen eher niedrigen. Die industrielle Verarbeitung wirkt sich auf den Anteil an konjugierten und nichtkonjugierten Verbindungen aus. Nichtfermentierte Sojaprodukte enthalten höhere Anteile an Glykosiden, fermentierte Sojaprodukte hingegen höhere Anteile Aglykone, die während der Fermentation durch enzymatische Hydrolyse entstehen. Erhitzung führt zur Umlagerung der Malonyl- zu Acetylglukosiden und zu den stabileren β -Glukosiden. [Kurzer und Xu 1997]

Lignane bilden zusammen mit Lignin einen Teil der Zellwand von Pflanzen. Ihr Grundgerüst besteht aus zwei 8,8'-verknüpften Phenylpropan-Einheiten, wobei sich die Vielfalt an Verbindungen durch zusätzliche Sauerstoff- oder Kohlenstoff-Kohlenstoff-Brücken ergibt (s. Abb. 2.3). Die wichtigsten Vertreter sind Secoisolariciresinol und Matairesinol, daneben kommen Pinoresinol, Syringaresinol und Lariciresinol vor. Sie sind in der Pflanze mit verschiedenen Zuckerresten konjugiert, Secoisolariciresinol liegt z.B. hauptsächlich als Diglykosid vor. Lignane sind im Pflanzenreich weit verbreitet, wobei Leinsaat den höchsten Gehalt an Lignanen aufweist. In Europa stellt Getreide die Lebensmittelgruppe mit dem höchsten Anteil an der Lignanzufuhr mit der Nahrung dar. Weitere, nicht unwesentliche Quellen sind Beeren und

17 β -Östradiol

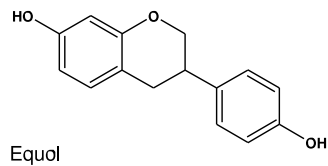
Isoflavone



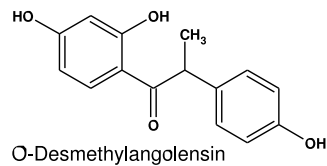
Grundstruktur Isoflavon

Isoflavon
Genistein
Daidzein
Glycitein
Biochanin A
Formononetin

5	6	7	4'
H	H	H	H
OH	H	OH	OH
H	H	OH	OH
H	OMe	OH	OH
OH	H	OH	OMe
H	H	OH	OMe

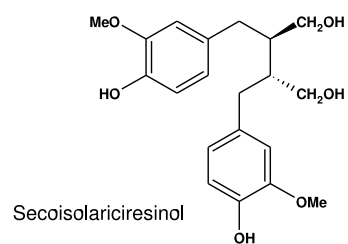


Equol

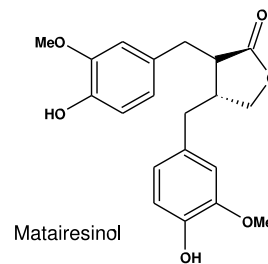


O-Desmethylangolensin

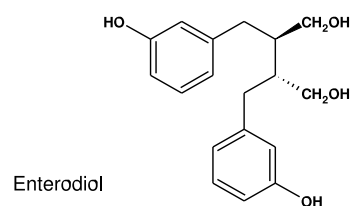
Lignane



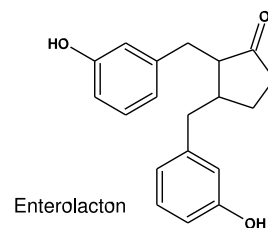
Secoisolariciresinol



Matairesinol

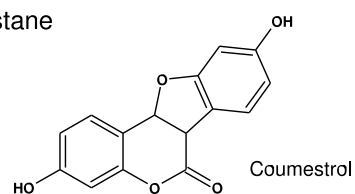


Enterodiol



Enterolacton

Coumestane



Coumestrol

Abbildung 2.3: Struktur von 17 β -Östradiol und ausgewählter Phytoöstrogene

Tabelle 2.1: Isoflavon- und Lignangehalte [$\mu\text{g}/100\text{g}$] verschiedener Lebensmittel

Produkt	<i>Gen</i>	<i>Dai</i>	<i>Sec</i>	<i>Mat</i>
Sojamehl	96 900	67 400	130	0
Tofu	21 300	7 600	0	0
Sojadrink	2 100	700	0	0
Sojaöl	0,4	0,02	1,2	0,2
Sojasoße	Spuren	20,5	26,9	0
Kichererbsen	76,3	11,4	8,4	0
Mungobohnen	365	9,7	172	0,25
Mungosprossen	1 902	745	468	0,87
Erdnüsse	82,6	49,7	333	Spuren
Leinsaat	0	0	369 900	1 087
Sonnenblumenkerne	13,9	8,0	610	0
Weizen (ganzes Korn)	0	0	32,9	2,6
Weizen (Weißmehl)	Spuren	Spuren	8,1	0
Weizenkleie	6,9	3,5	110	0
Roggenvollkornmehl	0	0	47,1	65,0
Roggenkleie	0	0	132	167
Brot ^a	17,1	5,0	n.a.	n.a.
Karotten	1,7	1,6	192	2,86
Brokkoli	6,6	4,7	414	23,1
Champignons	117	20,2	8,3	0
Fleisch ^a	n.d.	n.d.	n.a.	n.a.
Fleisch- und Wurstwaren ^a	4,4	2,3	n.a.	n.a.
Schwarztee (Blätter)	0	29,0	1 590	197
Grüntee (Blätter)	n.d.	Spuren	2 460	186
Instantkaffee (Pulver)	0	0	716	n.d.
Säuglingsformula (Soja) ^b	8 100-9 200	4 400-5 500	n.a.	n.a.
Säuglingsformula (Kuhmilch) ^b	n.d.	n.d.	n.a.	n.a.

Gesamt-Phytoöstrogengehalte nach Hydrolyse; n.a.=nicht analysiert, n.d.=nicht detektiert. *Gen*=Genistein, *Dai*=Daidzein, *Sec*=Secoisolariciresinol, *Mat*=Matairesinol. Quellen: Adlercreutz und Mazur 1997, außer ^a)Clarke und Lloyd 2004, ^b)Irvine et al. 1998

Tee, insbesondere Grün- und Schwarztee. Durchschnittliche Lignanwerte sind aus Tab. 2.1 ersichtlich. [Setchell und Adlercreutz 1988]

Coumestane (s. Abb. 2.3) spielen in der menschlichen Ernährung nur eine untergeordnete Rolle. Wichtigste Vertreter sind Coumestrol und 4'-Methoxycoumestrol. Diese kommen in Luzernen (besonders deren Sprossen), einigen Bohnenarten und Futterpflanzen vor. Coumestrol ist eines der Phytoöstrogene mit der höchsten östrogenen Aktivität [Murphy und Hendrich 2002], was in der Tierernährung von Bedeutung ist.

Prenylflavonoide, darunter 6-Prenylnaringenin, 8-Prenylnaringenin, Xanthohumol und Isoxanthohumol, kommen in hoher Konzentration in Hopfen vor. Ob durch die Aufnahme von Bier endogene Effekte auftreten, wird zur Zeit untersucht. [Stevens und Page 2004]

Wie hoch die durchschnittliche tägliche Aufnahme von Phytoöstrogenen ist, wird noch diskutiert. Die traditionelle asiatische Ernährung enthält viele Sojaprodukte und daher eine große Menge Isoflavone. Mit der üblichen Ernährung westlicher Länder führen sich Europäer und US-Amerikaner relativ wenig Isoflavone zu. Allerdings ist vermutlich der Isoflavongehalt der modernen westlichen Ernährung aufgrund des gestiegenen Verzehrs von mit Sojaprotein hergestellten Lebensmitteln (Brot aus Backmischungen, Wurst) höher als allgemein angenommen [Clarke und Lloyd 2004]. Vor diesem Hintergrund erklärt sich der große Unterschied in der Phytoöstrogen-Aufnahme westlicher Nationen in Tab. 2.2.

Tabelle 2.2: Durchschnittliche tägliche Phytoöstrogen-Aufnahme in μg

	<i>Gen</i>	<i>Dai</i>	<i>Sec</i>	<i>Mat</i>
Chinesen ^a	25400 (35000)		1900 (900)	
US-Amerikaner ^b	338 (2119)	289 (2104)	622 (357)	23 (19)
Finnen ^c	482 (381)	306 (291)	396 (1571)	38 (18)
Briten ^d	2260	840		

In Klammern: Standardabweichung

^a)Mei et al. 2001, Isoflavone (*Gen*, *Dai*, *For*, *Bio*) und Lignane (*Sec*, *Mat*, *End*, *Enl*).

^b)de Kleijn et al. 2001 ^c)Valsta et al. 2003 ^d)Clarke und Lloyd 2004

2.2.2 Metabolismus

Im Gastrointestinaltrakt werden Phytoöstrogen-Glukoside durch endogene und mikrobielle β -Glukosidasen hydrolysiert und die Aglykone freigesetzt. Sie sind weiterhin Substrate für Mikroorganismen des Gastrointestinaltrakts. Die Intestinalflora ist verantwortlich für die große Schwankungsbreite der Metabolitenkonzentration im Plasma und Urin und wird ihrerseits beeinflusst durch das Lebensalter, Einnahme von Medikamenten, Ernährung und andere Faktoren. Abbildung 2.4 zeigt eine Übersicht über den bakteriellen Metabolismus der Phytoöstrogene, die wichtigsten Metabolite sind in Abb. 2.3 dargestellt.

Die 4'-Methylether von Genistein und Daidzein, Biochanin A und Formononetin werden demethyliert. Genistein wird zu Dihydrogenistein und 6'-hydroxy-O-DMA weiter metabolisiert [Kurzer und Xu 1997], Daidzein wird zu Dihydrodaidzein und anschließend zu O-Desmethylangolensin und zum Isoflavan Equol reduziert. Zur Synthese von Equol sind offensichtlich nur 30-40 % der Bevölkerung befähigt. Ursachen dafür können die Zusammensetzung der Mikroflora des Gastrointestinaltrakts sein [Bowey et al. 2003], aber auch die Transitzeit und das Redoxpotenzial des Darminhalts. Diese Parameter lassen sich durch die Diät beeinflussen [Setchell und Adlercreutz 1988], wobei der Einfluss des Fett-, Kohlenhydrat- und Ballaststoffgehalts der Nahrung auf die Equolproduktion widersprüchlich ist [Rowland et al. 2000]. Außerdem scheint die Produktion von Equol durch mehrtägige Zufuhr von Isoflavonen induzierbar zu sein [Murphy und Hendrich 2002].

Matairesinol wird zu Enterolacton dehydroxyliert und demethyliert. Secoisolariciresinol wird durch Dehydroxylierung und Demethylierung zu Enterodiol umgesetzt, die weitere Oxidation liefert Enterolacton. Enterodiol und Enterolacton sind Nahrungsöstrogene, die in Pflanzen nicht enthalten sind, sondern nur bei Tieren und dem Menschen auftreten. Daher spricht man auch von „Säugerlignanen“.

Die Absorption der Phytoöstrogen-Aglykone und ihrer Metabolite findet im Dün- und Dickdarm statt [Committee on Toxicity 2003], der Mechanismus ist noch ungeklärt. Angenommen wird eine passive Diffusion, aber offensichtlich existiert eine Sättigung der Resorption bei hohen Dosen [Setchell et al. 2003]. Nach Absorption werden die Nahrungsöstrogene durch UDP-Glucuronyltransferase und Sulfotransferase der Intestinalmucosa und der Leber mit Glucuronsäure und Sulfat konjugiert [Murphy und Hendrich 2002], im Fall des Genisteins sind im Plasma etwa 53 % dieses Isoflavons glucuronidiert und 21 % sulfatiert [Zhang et al. 2003]. Diese Kon-

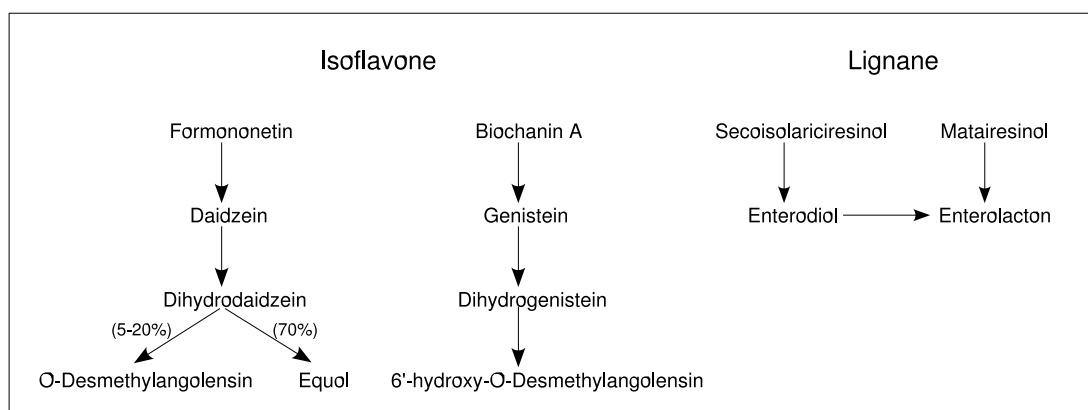


Abbildung 2.4: Bakterieller Metabolismus von Isoflavonen und Lignanen (nach Setchell und Adlercreutz 1988; Kurzer und Xu 1997)

jugate zirkulieren im Blutkreislauf, der Anteil der Aglykone ist mit ca. 26 % bei Genistein nicht so gering wie gemeinhin angenommen [Zhang et al. 2003]. Genistein und Daidzein erscheinen schon 15 Minuten nach dem Verzehr im Plasma, wobei die Konzentrationen nach zwei Stunden deutlich ansteigen und nach zwei bis zwölf Stunden ihren Höhepunkt erreichen, abhängig von der Dosis und der Darreichungsform [Rowland et al. 2003; Setchell et al. 2003]. Lignane erscheinen erst nach über acht Stunden im Plasma [Mazur et al. 2000; Rowland et al. 2003], Equol nach 24-36 Stunden [Rowland et al. 2003; Setchell et al. 2003]. Die Halbwertszeiten der Isoflavone im Plasma betragen je nach Substanz fünf bis acht Stunden [dto.], Basiswerte werden erst nach über 48 Stunden wieder erreicht [Setchell et al. 2003]. Plasmakonzentrationen von Nahrungsöstrogenen im Steady State sind aus Tab. 2.3 ersichtlich. Der bei manchen Personen beobachtete mehrfache Anstieg der Konzentration im Plasma weist auf einen ausgeprägten enterohepatischen Kreislauf hin, bestätigt wird dies durch die Beobachtung biliärer Ausscheidung von Nahrungsöstrogen-Glucuroniden bei Ratten [Watanabe et al. 1998; Janning et al. 2000].

Pharmakokinetische Studien mit Lignanzen sind schwierig durchzuführen, da diese Klasse der Phytoöstrogene in einer immens großen Anzahl unterschiedlicher Nahrungsmittel vorkommt und in Humanstudien praktisch nicht zu eliminieren sind.

Der größte Teil der Isoflavone und ihrer bekannten Metabolite wird über den Urin ausgeschieden, nur ein geringer Teil mit dem Stuhl [Watanabe et al. 1998]. Die Wiederfindungsrate der Isoflavone beträgt etwa 30 % [Rowland et al. 2003], was auf einen intensiven Metabolismus schließen lässt, von dem ein erheblicher Anteil noch

Tabelle 2.3: Plasmakonzentrationen [nmol/l] von Nahrungsöstrogenen beim Menschen

	<i>Gen</i>	<i>Dai</i>	<i>DMA</i>	<i>Eq</i>	<i>Mat</i>	<i>End</i>	<i>Enl</i>
Finnen (weibl., omnivor) ^a	7,7	6,4	0,7	1,6	0,2	2,5	33,3
Finnen (weibl., vegetarisch) ^a	44,8	50,0	7,7	1,5	0,5	17,3	252,6
Japaner (männl., omnivor) ^b	389,4	280,4	73,3	12,4	1,1	1,1	10,5
Säuglinge (gestillt) ^c	10,2	5,7	-	-	-	-	-
Säuglinge (Sojaformula) ^c	2530	1160	-	-	-	-	-

Quellen: ^{a)}Adlercreutz et al. 1993 ^{b)}Adlercreutz et al. 1994 ^{c)}Setchell et al. 1997

unbekannt ist. Auch ist davon auszugehen, dass ein Teil der Nahrungsöstrogene in Zellen und Organen zumindest vorübergehend gespeichert werden. Einen Überblick über die Verteilung von Genistein und Daidzein auf verschiedene Organe der Ratte gibt Tabelle 2.4 und auf ausgewählte Kompartimente des Menschen Tabelle 2.5. Das Ausmaß der Verteilung und Speicherung bestimmt die Abbau- und Ausscheidungskinetik und damit die Konzentration und Verfügbarkeit der Phytoöstrogene, was das Auftreten physiologischer Effekte beeinflusst.

Tabelle 2.4: Gewebeverteilung von Genistein und Daidzein in der Ratte

	Genistein ($\mu\text{mol/l}$) ^{a)}	Genistein (ng/g) ^{b)}	Daidzein ($\mu\text{g/g}$) ^{c)}
Plasma	6,0 (<5 %) / 7,9 (<5 %)	785 / 836	33
Brustdrüse	0,8 (24 %) / 2,4 (49 %)		
Uterus	- / 1,4 (100 %)	- / 253	
Ovarien	- / 1,1 (80 %)	- / 250	
Prostata	1,1 (45 %) / -	278 / -	
Testes	0,6 (11 %) / -	117 / -	2
Leber	0,7 (34 %) / 7,3 (77 %)	980 / 2666	28
Gehirn	0,04 (100 %) / 0,06 (50 %)	69 / 28	6
Thymus		95 / 63	
Milz		84 / 85	16

Daten für männliche/weibliche Tiere, Daidzein nur für männliche Tiere; Zahlen in Klammern: % Aglykon. ^{a)}Chang et al. 2000, 500 mg/kg Futter; ^{b)}Coldham und Sauer 2000, 4 mg/kg p.o.; ^{c)}Yueh und Chu 1977, 40 mg/kg i.v.

Lignane werden, im Gegensatz zu Isoflavonen, zu etwa gleichen Teilen mit Urin und Stuhl ausgeschieden [Mazur et al. 2000]. Die Autoren berichten von Wiederfindungs-

Tabelle 2.5: Vergleich der Nahrungsöstrogen-Konzentration in Plasma, Prostataflüssigkeit, Brustgewebe und Lymphozyten des Menschen

		Dai	Eq	End	Enl
Hong Kong ^{a)}	Plasma	31,3	3,8	1,7	6,2
	Prostata	70	171,6	1,6	31
Portugal ^{a)}	Plasma	1,3	0,35	0,36	3,9
	Prostata	4,6	1,72	13,5	162
Großbritannien, nach Intervention ^{b)}	Plasma	ca. 80	ca. 20	Spuren	<10
	Brust	27,3	5,3		7,2
Deutschland, nach Intervention ^{c)}	Plasma	112			
	Lymphozyten	679			

In ng/ml bzw. ng/mg. ^{a)}Morton et al. 1997 ^{b)}Hargreaves et al. 1999 ^{c)}Rüfer 2005

raten im Urin zwischen 23 % und 438 %, was auf unterschiedlich hohe Grundwerte und Unterschiede in der Zusammensetzung der individuellen Darmflora zurückgeführt wird.

2.2.3 Physiologische Effekte

Wechselwirkungen mit dem System der Geschlechtshormone

Phytoöstrogene sind wegen der phenolischen Ringe und des Abstands ihrer Hydroxylgruppen in der Lage, an die Östrogenrezeptoren (ER) zu binden, allerdings mit einer um mehrere Größenordnungen geringeren Bindungsaffinität als Östradiol. Ihre Bindungsaffinität zum ER- β ist, im Gegensatz zum Östradiol, deutlich größer als zum ER- α (s. Tab. 2.6). Dies und das unterschiedliche Expressionsmuster der Östrogenrezeptoren in Zellen und Geweben kann die Wirkungsweise der Phytoöstrogene beeinflussen. Weiterhin von Einfluss ist auch die Affinität des Rezeptor-Liganden-Komplexes zum Östrogen-Response-Element oder anderen DNA-Bindungsstellen und die Wechselwirkungen des Komplexes mit anderen Rezeptoren.

ER-unabhängige Effekte auf das System der Geschlechtshormone sind zum einen die Inhibierung mehrerer Enzyme wie der 17 β -Hydroxysteroid Oxidoreduktasen I und II, der Aromatase, der Steroidsulfatase und Steroidsulfotransferase und zum anderen Wechselwirkungen mit dem System des Geschlechtshormon-bindenden Protein (Sex Hormone Binding Globulin, SHBG) [Kurzer und Xu 1997; Santti et al. 1998]. Phytoöstrogene besetzen Bindungsstellen am SHBG, was die Konzentration und daraus

Tabelle 2.6: Bindungsaffinität von Östradiol und Phytoöstrogenen zum Östrogenrezeptor (ER) [Kuiper et al. 1998] und des Rezeptor-Liganden-Komplexes zum Östrogen-Response-Element (ERE) [Kostelac et al. 2003]

	ER- α		ER- β	
	ER	ERE	ER	ERE
Östradiol	100	100	100	100
Coumestrol	20	15	140	40
Equol		0,86		2
Genistein	4	0,2	87	25
Daidzein	0,09	<0,01	0,5	3,3

folgend die Verfügbarkeit von endogenen Hormonen erhöht. Der gegenteilige Effekt, nämlich eine Erniedrigung ihrer Verfügbarkeit, resultiert aus der Fähigkeit der Phytoöstrogene, die Synthese von SHBG zu steigern.

Diese Erkenntnisse aus der zellulären Physiologie führten zur Hypothese, dass Phytoöstrogene in den Mechanismus der fetalen Differenzierung zum männlichen oder weiblichen Erscheinungsbild eingreifen. Tierversuche mit Nagern zeigten, dass die Zufuhr von Phytoöstrogenen gerade von der Pränatalzeit bis zur Pubertät Veränderungen der Geschlechtshormon-Konzentration, des Zyklus und der Histologie des Reproduktionstraktes mit sich bringt [Gallo et al. 1999; Lewis et al. 2003]. Dies konnte bisher beim Menschen nicht eindeutig bestätigt werden, was neben ethischen Gründen auch deshalb schwierig ist, da im Tierversuch wesentlich höhere Phytoöstrogen-Mengen eingesetzt und zum Teil intravenös verabreicht werden. Säuglingsmilchformula auf Sojabasis ist allerdings eine reichhaltige und häufig genutzte Phytoöstrogen-Quelle in einer für die Geschlechtsentwicklung sensiblen Zeit. Sie führen zu Phytoöstrogen-Konzentrationen im Plasma, die fünf Größenordnungen über der Konzentration von endogenem Östrogen liegen und um ein mehrfaches über den Konzentrationen, die beim Erwachsenen hormonelle Effekte haben [Setchell et al. 1997]. Eindeutig negative Effekte auf die Sexualfunktionen, außer verlängerter Menstruationsblutung mit stärkeren Beschwerden, konnten aber bisher nicht nachgewiesen werden.

Es wird diskutiert, ob die schwach östrogenen Effekte von Phytoöstrogenen bei Frauen Wechseljahrsbeschwerden verringern, allerdings wird in Studien von enormen Placeboeffekten berichtet [Baber et al. 1999; Knight et al. 2001]. Bei prämenopau-

salen Frauen können Phytoöstrogene die Konzentrationen von Hormonen des Menstruationszyklus verringern und die Zyklusdauer verlängern. Das damit korrelierte geringere Brustkrebsrisiko könnte sich dadurch erklären, dass der Körper im Lauf des Lebens weniger endogenem Östrogen ausgesetzt ist (s.u.), denn Isoflavon-reiche Lebensmittel scheinen einen eher östrogenen Stimulus auf die Brust auszuüben [Hargreaves et al. 1999].

Bei Männern ließen sich keine signifikanten Veränderungen des Hormonsystems durch Phytoöstrogene feststellen [Allen et al. 2001; Nagata et al. 2001].

Phytoöstrogene und Krebs

Die Eigenschaft der Phytoöstrogene, als Östrogenmodulatoren bzw. als schwache Antiöstrogene zu wirken, und die Beobachtung, dass in Populationen mit hohem Verzehr von Sojaprodukten das Risiko östrogenabhängiger Krebsarten geringer ist, führte zu der Hypothese, dass Phytoöstrogene präventiv gegen solche Krebsarten wirken. Fall-Kontroll-Studien weisen auf den Zusammenhang zwischen hohem Phytoöstrogen-Plasmaspiegel und niedrigem Brustkrebsrisiko hin [Pietinen et al. 2001; Murkies et al. 2000], weiterhin gibt es Hinweise auf die Wichtigkeit der Aufnahme von Sojaprodukten in Kindheit und Jugend [Shu et al. 2001]. Prospektive Studien konnten bisher allerdings keinen protektiven Effekt von Phytoöstrogenen bestätigen [Peeters et al. 2003; Keinan-Boker et al. 2004].

Die Ergebnisse aus tierexperimentellen und in vitro-Studien sind widersprüchlich. Zwar verringert Genistein im Futter von adoleszenten Ratten die Inzidenz und Wachstumsrate von durch Dimethylbenzanthrazen induzierten Mammatumoren [Lamartiniere et al. 2002], andererseits stimuliert dieses Isoflavon dosisabhängig das Wachstum von implantierten menschlichen Brustkrebszellen (MCF-7) in Mäusen [Allred et al. 2001] und die Proliferation dieser Zellen in vitro [Hsieh et al. 1998].

Die Mechanismen, mittels derer Phytoöstrogene auf die Entstehung oder Ausbreitung von Tumoren Einfluss nehmen, werden noch diskutiert. In Frage kommen zum Einen Wechselwirkungen mit dem System der endogenen Östrogene. So können Phytoöstrogene den Menstruationszyklus verlängern und damit die lebenslange Exposition gegenüber Östradiol verringern [Bingham et al. 1998], oder sie erniedrigen die Konzentration an frei zirkulierenden und damit verfügbaren endogenen Östrogenen mittels Anhebung des SHBG-Spiegels [Adlercreutz und Mazur 1997]. Zum anderen können tumorprotektive Wirkungen auch auf der Inhibierung von Proteinkinasen

oder auf antioxidativen Eigenschaften und Effekten auf Zellwachstum und Differenzierung beruhen. Zahlreiche in vitro-Effekte von Phytoöstrogenen, wie Modulation des Zellzyklus, Proliferationshemmung oder Induktion von Apoptose, geben einen Hinweis auf Wirkmechanismen und auf Möglichkeiten der Prävention oder Therapie von Krebs [Spinozzi et al. 1994; Su et al. 2000].

Demgegenüber können Phytoöstrogene auch die Entstehung von Tumoren begünstigen. So belegen mehrere Studien die Genotoxizität von Isoflavonen in vitro [Morris et al. 1998; Pool-Zobel et al. 2000; Kulling et al. 2002]. 75 μM Coumestrol und 25 μM Genistein führen zu Chromosomenstrangbrüchen, Chromatidaustausch und Bildung von Mikronuklei in primären humanen Blutlymphozyten [Kulling et al. 1999]. 25 μM Genistein beträgt nur das Zehnfache des Plasmaspiegels, der bei Säuglingen mit Sojaformula gefunden wurde (vgl. Tab. 2.3 auf Seite 17) und leicht mit einer Überdosierung von Phytoöstrogen-Supplementen erreicht werden kann. Die Bildung von Mikronuklei wurde auch durch Formononetin und Biochanin A induziert, Daidzein hingegen zeigte auch in Konzentrationen bis 100 μM keine Effekte [Kulling et al. 2002]. Als mögliche Mechanismen werden die Aktivität von Coumestrol als interkalativer Topoisomerase II-Inhibitor und von Genistein als nicht-interkalativer Topoisomerase II-Inhibitor und Protein-Tyrosin-Kinase-Inhibitor diskutiert. Ergänzt werden diese Befunde von Pool-Zobel et al. [2000]. Die Autoren fanden Chromosomenstrangbrüche in HT29 Kolonkarzinomzellen bei 100 μM Genisteinglucuronid bzw. O-Desmethylangolensin. Primäre humane Kolonzellen zeigten allerdings keine Chromosomenschädigungen oder oxidierte Purin- und Pyrimidinbasen nach Inkubation mit Genistein in Konzentrationen von 12,5 bis 50 μM .

Im Gegensatz zu den Isoflavonen wurden für die Lignane Matairesinol, Secoisolariciresinol, Enterodiol und Enterolacton keine genotoxische Wirkung gefunden [Kulling et al. 1998].

Weitere physiologische Effekte

Die Einflüsse von isoflavonreichen Lebensmitteln auf den Stoffwechsel der Schilddrüse, die Entstehung von Osteoporose und das Auftreten von Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind intensiv untersucht. Eine Übersicht über Studien zu diesen Themen gibt der Bericht „Phytoestrogens and Health“ [Committee on Toxicity 2003].

2.3 Einfluss der Phytoöstrogene auf das Immunsystem

Der Einfluss von Östrogenen auf das Immunsystem zeigt sich unter anderem durch die höhere Prävalenz von Autoimmunerkrankungen bei Frauen und ihre stärkere Reaktion auf Immunisierungen [Verthelyi 2001]. In verschiedenen Experimenten wurde die Wirkung des Hauptvertreters der endogenen Östrogene, 17β -Östradiol, untersucht. So sank nach in vivo-Gabe von Östradiol die Aktivität der NK-Zellen, nicht aber in vitro [Hanna und Schneider 1983; Curran et al. 2001; Keller et al. 2001]. Die Thymusmasse und Anzahl der Thymozyten sank im Tierversuch, die Apoptoserate der Thymozyten stieg, gleichzeitig verringerte sich der Anteil vor allem der $CD4^+CD8^+$ T-Zellen im Thymus [Screpanti et al. 1989; Rijhsinghani et al. 1996; Yellayi et al. 2002]. Ebenfalls rückgängig war die Produktion von IL-6 in vitro und ex vivo [Rogers und Eastell 2001; Berg et al. 2002] und von TNF- α in vitro [Ralston et al. 1990; Rogers und Eastell 2001; Zhang et al. 2001]. Die Produktion von IFN- γ stieg in vitro, blieb ex vivo aber unverändert [Karpuzoglu-Sahin et al. 2001; Berg et al. 2002]. Diese Effekte können über Östrogenrezeptoren vermittelt sein, die auf Leukozyten nachgewiesen werden konnten (s. Tab. 2.5), und es ist anzunehmen, dass Phytoöstrogene in ihrer Eigenschaft als schwache Östrogenagonisten ebenfalls Zellen und Organe des Immunsystems beeinflussen. Die Affinität von Phytoöstrogenen zu ER- β ist höher als zu ER- α (s. Tab. 2.6 auf Seite 19), und einige der Gewebe, die ER- β in hohem Maß exprimieren, wie Thymus und Hypophyse, sind lymphatische Organe oder beeinflussen die Immunantwort [Enmark et al. 1997]. Zudem unterscheidet sich die Genantwort zwischen den ER abhängig vom Liganden und dem gebundenen Response-Element auf der DNA [Paech et al. 1997]. So vermittelt Östradiol über ER- α Transkriptionssignale, über ER- β aber Transkriptionshemmung, während Antiöstrogene über ER- β wiederum die Transkription aktivieren. Daneben können Effekte von Phytoöstrogenen auch über andere Wege als über die direkte Interaktion mit ER der Immunzellen vermittelt werden, wie z.B. über die schon erwähnten Wechselwirkungen mit Enzymen der Östrogensynthese, dem SHBG (s. Abschnitt 2.2.3 auf Seite 18) oder über die hypothalamisch-hypophysäre Achse mit Beeinflussung der Sekretion von immunsuppressiven Glukokortikoiden [Da Silva 1999].

	Maus			Mensch					
	Törnwall et al. 1999	Curran et al. 2001	Benten et al. 2002	Enmark et al. 1997	Cohen et al. 1983	Weusten et al. 1986	Cutolo et al. 1996	Suenaga et al. 1998	Henderson et al. 2003
Thymusdrüse				ER- β^+		ER $^+$			
CD4 $^-$ CD8 $^-$ T-Zellen	ER- α^+ ER- β^+								
T $_h$ -Zellen	ER- α^+ ER- β^-				ER $^-$			ER $^+$	
T $_c$ -Zellen	ER- α^+ ER- β^-				ER $^+$			ER $^+$	
B-Zellen	ER- α^+ ER- β^-		ER- α^+ ER- β^-					ER $^+$	
Monozyten/ Makrophagen							ER $^+$	ER $^+$	
NK-Zellen		ER- α^+ ER- β^+							ER- α^- ER- β^+

Abbildung 2.5: Östrogenrezeptoren auf Zellen des Immunsystems.
Arbeiten von 1998 und früher: nur ER- α bekannt

2.3.1 In vitro-Studien mit Isoflavonen

Genistein, Genisteinglukuronid und Daidzeinglukuronid führten in vitro bei einer Konzentration bis 5 μM zu einer Steigerung der basalen und IL-2-induzierten NK-Aktivität um 10 % bis 15 % [Zhang et al. 1999]. Höhere Konzentrationen bewirkten einen Abfall der NK-Aktivität, wobei der Effekt von Genisteinglukuronid über Daidzeinglukuronid zu Genistein zunahm. Letzteres verringerte bei 50 μM die lytische Aktivität der NK-Zellen um 15 % gegenüber der Kontrolle. Daidzein erhöhte in einer Konzentration von bis zu 10 μM die mitogen-aktivierte Proliferation und die IL-2- und IL-3-Produktion von Milzzellen der Maus um bis zu 40 % [Wang et al. 1997]. Genistein hatte in dieser Studie bis 10 μM keinen Einfluss auf die Proliferation, hemmte allerdings bei 1 μM die IL-3-Produktion und bei 10 μM die IL-2-Produktion um 25 % bzw. 15 %. In einer Konzentration von 37 μM wirkte Genistein inhibierend auf T-Zell-Proliferation, IL-2-Produktion und IL-2-Rezeptor-Expression [Atluru et al. 1991; Atluru und Atluru 1991]. Die IL-2-vermittelte Phosphorylierung des IL-2-Rezeptors wurde ebenfalls verringert, was zu einer geringeren Affinität zur Protein-Tyrosin-Kinase p56lck und damit einer reduzierten NK-Aktivität führte [Nishio et al. 1994]. Darüber hinaus war bei 37 μM Genistein in vitro die Leukotrien B₄-Produktion verringert. Die NO-Produktion von RAW 264.7 Makrophagen, einer von der Maus stammenden Zelllinie, reduzierte sich unter Genistein-, Daidzein- und Glycitein-Einfluss mit einem IC₅₀-Wert von 50 μM (Genistein) bzw. 100 μM (Daidzein, Glycitein) [Sheu et al. 2001]. Die TNF- α -Produktion dieser Zelllinie wurde durch >30 μM Genistein erniedrigt und durch >60 μM Daidzein erhöht [Wang und Mazza 2002]. Die Vitalität der eingesetzten Zellen wurde durch die Isoflavone bis zu einer Konzentration von 125 μM nicht beeinflusst. Andere Autoren fanden allerdings schon bei 25 μM genotoxische Effekte (s. Abschnitt 2.2.3).

2.3.2 Tierexperimentelle Studien mit Isoflavonen

Die Anzahl der tierexperimentellen Studien zur Aufklärung des Einflusses von Phytoöstrogenen auf das Immunsystem ist überschaubar. Die meisten Studien wurden mit Genistein durchgeführt, das den Tieren entweder mit dem Futter gegeben oder gastral, subkutan oder intervenös appliziert wurde. Tierstudien über den Effekt von Lignan auf immunologische Parameter fehlen.

In einer Konzentration von 0,1 mg/kg Körpergewicht (KG) und Tag reduzierte Genistein beim Meerschweinchen nach Behandlung der Darmmukosa mit Trinitrobenzol-

sulfonsäure die NO-Produktion und Granulozyteninfiltration [Sadowska-Krowicka et al. 1998]. Bei der Maus erhöhte es die Resistenz gegen eine injizierte Lungentumorlinie, vermutlich durch Stimulation der zellulären Immunität [Guo et al. 2001]. So waren in dieser Studie bei einer gastralen Gabe von bis zu 20 mg/kg KG/d die Zytotoxizität von T_c -Zellen und IL-2-stimulierten NK-Zellen um etwa 60 % erhöht. Dagegen war die lytische Aktivität unstimulierter NK-Zellen, die Phagozytoseaktivität der Monozyten, die Produktion von IgM und IgG und die Anzahl der B-, T_c -, T_h - und NK-Zellen in der Milz unverändert (s. auch Abb. 2.6).

Die Effekte von Genistein auf verschiedene Immunmarker bei der Ratte sind allerdings inkonsistent. Guo et al. [2002b] fütterten Ratten während der Trage- und Laktationszeit mit Futter, das mit 300 mg bzw. 800 mg Genistein/kg versetzt war und seziierten die Mutter- und Jungtiere am Tag nach dem Entwöhnen. Anschließend wurden das Gewicht und die Zellzahl von Thymus und Milz, Leukozytensubpopulationen und die lytische Aktivität der NK-Zellen bestimmt. In einer weiteren Studie [Guo et al. 2002a] erhielten Ratten während der Trage- und Laktationszeit und an 42 Folgetagen Futter, das mit 25 mg, 250 mg bzw. 1250 mg Genistein/kg versetzt war. Nach der Sektion wurde das Gewicht von Thymus und Milz, die Zellzahl und Leukozytensubpopulationen in der Milz, die lytische Aktivität der NK-Zellen und die IgM-Antwort auf ein Antigen bestimmt. Die Ergebnisse unterscheiden sich erheblich voneinander abhängig von der Generation, dem Geschlecht und der Dauer der Exposition. So waren in der ersten Studie [Guo et al. 2002b] bei den Muttertieren keine Veränderungen der T-Zell-Subpopulationen zu finden, wohl aber bei den Jungtieren, während bei den Muttertieren die Zellzahl der Milz verringert war, bei den Jungtieren allerdings nicht. Dagegen war bei den männlichen Jungtieren der zweiten Studie [Guo et al. 2002a] die Zellzahl der Milz erhöht. Eine Übersicht über die Ergebnisse dieser beiden Studien zeigt Abb. 2.7.

Abbildung 2.6: Einfluss von Genistein und Daidzein auf verschiedene Immunparameter der Maus

		Thymus					Milz							
		Gewicht	Zellzahl	% CD4 ⁺ CD8 ⁺	% CD4 ⁻ CD8 ⁻	% T _h	% T _c	Gewicht	% T _h	% T _c	% B	% NK	NK-Aktivität	sonstige Ergebnisse
Genistein														
Guo et al.	2001								/	/	/	/	↑	Elimination durch T _c ↑, Monozyten-, IgM- und IgG-Response /, Proliferation↑
Yellayi et al.	2002	a	↓	↓	↓	/	↓	/						Apoptose im Thymus↑
		b	↓						↓	↓				Humorale Immunität↓, Lymphozytopenie
		c	↓											
Yellayi et al.	2003													Zellvermittelte Immunantwort ↓, CD4 ⁺ und CD8 ⁺ ↓ in poplitealen Lymphknoten
Daidzein														
Zhang et al.	1997	↑						/						Elimination durch Monozyten↑, IgM-Response↑, Anteil peripherer T-Zellen↑

↓Rückgang; ↑Anstieg; / kein Effekt

Guo et al. 2001: 0, 2, 6 oder 20 mg/kg Körpergewicht (KG)/d gastral über 28 Tage. Alter bei Sektion: 12-14 Wochen.

Yellayi et al. 2002 a: 0, 2, 8, 20, 80 oder 200 mg/kg KG/d subkutan über 7 bzw. 21 Tage. Alter bei Sektion: ca. 16 Wochen.

Yellayi et al. 2002 b: 0, 8, 20 oder 80 mg/kg KG/d subkutan über 5 Wochen. Alter bei Sektion: 8-9 Wochen.

Yellayi et al. 2002 c: 0, 1000 oder 1500 mg/kg Futter über 12 Tage. Alter bei Sektion: 6-7 Wochen.

Yellayi et al. 2003: 0, 8, 20 oder 80 mg/kg KG/d subkutan bzw. 1000 oder 1500 mg/kg Futter über 28 Tage. Alter bei Sektion: 8-9 Wochen.

Zhang et al. 1997: 0, 10, 20 oder 40 mg/kg KG/d gastral über 7 Tage. Alter bei Sektion: 8-10 Wochen.

Abbildung 2.7: Einfluss von Genistein auf verschiedene Immunparameter der Ratte

		Thymus						Milz										
		Gewicht	Zellzahl	% CD4 ⁺ CD8 ⁺	% CD4 ⁻ CD8 ⁻	% T _h	% T _c	Gewicht	Zellzahl	% CD4 ⁺ CD8 ⁺	% CD4 ⁻ CD8 ⁻	% T _h	% T _c	% B	% NK	% Makrophagen	NK-Aktivität	IgM-Antwort
Guo et al. 2002b	F0	/	/	/	/	/	/	/	↓	↑	/	/	↓		/		/	
	F1 _m	/	/	/	/	↓	/	/	/						/		↑	
	F1 _w	/	/	↑	↓	↓	/	/	/						/		↓	
Guo et al. 2002a	F0	/						/				↓	/	/	/	/	↑	/
	F1 _m	↑						↑	↑			/	/	/	↓	/	↑	/
	F1 _w	/						↑	/			↑	↑	↓	↓	/	↓	↑

↓Rückgang; ↑Anstieg; / kein Effekt

Guo et al. 2002b: 0, 300 oder 800 mg/kg Futter während der Trage- und Laktationszeit.

Alter der Jungen bei Sektion: 3 Wochen.

Guo et al. 2002a: 0, 25, 250 oder 1250 mg/kg Futter während der Trage- und Laktationszeit und an 42 Folgetagen. Alter der Jungen bei Sektion: 9 Wochen.

Yellayi et al. [2002] berichten von verringertem Thymusgewicht bei Mäusen bei subkutaner Injektion von bis zu 200 mg Genistein/kg KG bzw. 1000 bis 1500 mg Genistein/kg Futter (s. Abb. 2.6). Die Gabe von Genistein erhöhte die Apoptoserate im Thymus der Tiere und erniedrigte den Anteil der $CD4^+CD8^+$ und der cytotoxischen T-Zellen im Thymus, der T_h - und der T_c -Zellen in der Milz und die Gesamtlymphozytenzahl im Blut. Die humorale Immunität gegen das Antigen KLH (Keyhole Limpet Hämocyanin) war ebenfalls erniedrigt. Die Autoren ermittelten Genistein-Serumkonzentrationen von etwa $1 \mu\text{mol/l}$ in der Gruppe mit 2500 mg/kg Futter und Höchstkonzentrationen von über $70 \mu\text{mol/l}$ nach Injektion von 200 mg/kg Körpergewicht (vgl. dazu Tab. 2.3 auf Seite 17). Unter gleichen Versuchsbedingungen war die zellvermittelte Immunität, gemessen an der Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ und der Zellinfiltration an die befallene Stelle, verringert und auch die Anzahl der $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen in poplitealen Lymphknoten erniedrigt [Yellayi et al. 2003]. Die Autoren stellten außerdem fest, dass die suppressiven Effekte von Genistein auf die zellvermittelte Immunität innerhalb von vier Wochen nach Beenden der Injektionen aufgehoben waren. Der ER-Antagonist ICI 182780 (Fulvestrant) blockierte nur einen Teil des durch Genistein verursachten Rückgangs des Thymusgewichts und der zellvermittelten Immunität, was auf eine Kombination von ER-vermittelten und nicht ER-vermittelten Effekten hinweist.

Die orale Gabe von 20 und 40 mg Daidzein pro kg Körpergewicht führten bei Mäusen zu gesteigertem Thymusgewicht, das Gewicht der Milz wurde nicht beeinflusst. Die Phagozytoserate und hämolytische Aktivität der Milzzellen und die Anzahl der T-Zellen im peripheren Blut war dagegen erhöht. [Zhang et al. 1997] (s. auch Abb. 2.6).

2.3.3 Humanstudien mit Isoflavonen

Es gibt nur sehr wenige Interventionsstudien oder epidemiologische Studien, die den Einfluss von Isoflavonen auf das Immunsystem des Menschen untersuchen. Cordle und Ostrom verglichen verschiedene Immunmarker von Säuglingen, die in den ersten drei Lebensmonaten mit Säuglingsmilchnahrung auf Sojabasis ernährt wurden, mit denen gestillter Kinder [Cordle et al. 2002; Ostrom et al. 2002]. Die Säuglinge der Sojaformula-Gruppe hatten eine leicht veränderte Antikörperantwort auf die vorgenommenen Impfungen und an einzelnen Untersuchungszeitpunkten unterschiedliche Anteile der Lymphozytensubpopulationen.

In einer weiteren Studie nahmen Frauen und Männer im Cross-over-Versuch jeweils vier Wochen eine sojafreie, eine Isoflavon-arme (10 mg/Tag) und eine Isoflavon-reiche Ernährung (73 mg/Tag) zu sich. Die Autoren konnten keine Konzentrationsveränderungen des C-reaktiven Proteins, von Serumamyloid A und von TNF- α feststellen. Einzig IL-6 war im Serum der teilnehmenden Frauen nach der Isoflavon-reichen Ernährung erhöht. [Jenkins et al. 2002]

An 20 postmenopausalen Frauen wurde placebo-kontrolliert der Einfluss von 100 mg Isoflavonen/Tag auf verschiedene Marker der Immunfunktion untersucht [Paes 2001]. Nach vierwöchiger Intervention waren zwar in der Interventionsgruppe die Plasmakonzentrationen von Genistein und Daidzein stark erhöht, jedoch unterschied sich die Höhe der Lymphozyten-Subpopulationen, der NK-Aktivität, der Proliferation und der IFN- γ - und der IL-2-Produktion nicht zwischen den beiden Gruppen.

2.3.4 Studien mit Lignan

Der Einfluss der Lignane auf das Immunsystem ist noch sehr unzureichend erforscht. Ein Großteil der Arbeiten sind Studien über immunologische Wirkungen von Lignan aus traditionellen asiatischen Arzneimittelpflanzen, die in der Ernährung, insbesondere der westlichen Industrienationen, keine Bedeutung haben. Beispielsweise sei hier das Arctigenin genannt, das *in vitro* im Konzentrationsbereich von 0,3 bis 32 μ M die TNF- α -Produktion der Makrophagen-Zelllinie RAW264.7 inhibiert und die NO-Produktion je nach Stimulierung moduliert, ohne die Zellvitalität zu beeinflussen [Cho et al. 1999].

Leinsaat als bedeutende Quelle von Secoisolariciresinol wurde an Patienten mit systemischem Lupus erythematoses, einer Autoimmunkrankheit, die mit einer Ablagerung von Immunkomplexen in den kleinen Blutgefäßen und damit einhergehenden Entzündungen gekennzeichnet ist, verabreicht. Eine Dosis von 15 bis 30 g/Tag führte zu einem leichten Anstieg des Komplement C3 während der Intervention und zu einem signifikanten Rückgang in der anschließenden Auswaschphase. Neutrophile Granulozyten exprimierten während der Intervention vorübergehend weniger CD11b. Komplement C4, T_h-, helper inducer-, suppressor inducer-, T_c- und NK-Zellen blieben unverändert. Ob die erwähnten Effekte dem Lignan Secoisolariciresinol, dem hohen Anteil von alpha-Linolensäure oder anderen Verbindungen in Leinsaat zuzuschreiben sind, ist allerdings unklar. [Clark et al. 1995]

2.4 Ziele und Inhalte der Arbeit

Auf dem Gebiet der Immunmodulation durch Phytoöstrogene beschäftigt sich eine Reihe von Studien mit der Wirkung von Isoflavonen, darunter vor allem Genistein, auf verschiedene Zelllinien oder auf Immunparameter von Mäusen und Ratten. In vitro-Studien und tierexperimentelle Studien mit den in der westlichen Ernährung relevanten Lignaneneinheiten fehlen, und es existieren nur fünf Humanstudien mit Interventionscharakter zur Wirkung der Phytoöstrogene auf das Immunsystem. Lediglich eine davon beschäftigt sich mit der immunmodulatorischen Wirkung von Lignaneneinheiten.

Da zumindest in vitro und am Tiermodell Einflüsse von Isoflavonen auf Immunparameter erkennbar sind, stellt sich die Frage nach den zugrunde liegenden Mechanismen. Diskutiert wird vor allem die Vermittlung über Östrogenrezeptoren, doch scheinen auch andere Wege beteiligt zu sein. Welche dies sind, und welchen Anteil sie an der Gesamtwirkung haben, ist unbekannt.

Großes Interesse genießt zur Zeit die Möglichkeit der Prävention von Krankheiten, darunter besonders Krebserkrankungen, durch eine angepasste Ernährung. Da phytoöstrogenreiche Lebensmittel möglicherweise einen präventiven Effekt auf Brust- und Prostatakrebs ausüben, wäre es interessant zu erfahren, welchen Anteil daran eine Immunmodulation durch diese Lebensmittel besitzt.

Ziel dieser Arbeit war es daher zu beschreiben, inwieweit Phytoöstrogene und ihre Metabolite ausgewählte Parameter des Immunsystems modulieren können und dabei die Wirkung von Lignaneneinheiten in gleicher Weise zu betrachten wie die von Isoflavonen. Eventuelle Ergebnisse sollten auch im Hinblick auf die mögliche Tumörprävention diskutiert werden, zumal die Arbeit im Rahmen des von der Europäischen Union geförderten Projekts „Phytoprevent“ durchgeführt wurde, das die präventive Wirkung von Phytoöstrogenen auf Brust- und Prostatakrebs thematisiert. Außerdem sollte versucht werden, an einer Modulation beteiligte Mechanismen im Ansatz aufzuklären.

Zur Ermittlung von Art und Ausmaß der Immunmodulation wurde ein breites Spektrum der immunologischen Methodik verwendet:

- Der Einfluss der acht Phyto- bzw. Nahrungsöstrogene Genistein, Daidzein, O-Desmethyldangolensin, Equol, Secoisolariciresinol, Matairesinol, Enterodiol und Enterolacton auf Proliferation, Vitalität, Apoptose- und Nekroseneigung der humanen T-Zelllinie Jurkat.

- Die Wirkung der genannten Phytoöstrogene auf mitogen-aktivierte Proliferation, Apoptose- und Nekroseneigung, lytische Aktivität Natürlicher Killerzellen und mitogen-aktivierte Zytokinproduktion isolierter humaner mononukleärer Zellen des peripheren Bluts in vitro. Beeinflussung der beobachteten Effekte durch Antiöstrogene.
- Supplementierung des Futters von Tg.NK Mäusen mit Sojaproteinisolat und deren Effekt auf mitogen-aktivierte Proliferation, lytische Aktivität Natürlicher Killerzellen, phagozytische Aktivität von Granulozyten und Monozyten und mitogen-aktivierte Zytokinproduktion isolierter Milzzellen ex vivo.
- Supplementierung gesunder männlicher Probanden mit isoflavon- oder lignanreichen Lebensmitteln und Korrelation der renalen Ausscheidung der erwähnten acht Phytoöstrogene mit der Größe ausgewählter Lymphozytensubpopulationen, der mitogen-aktivierten Proliferation, der lytischen Aktivität Natürlicher Killerzellen und der mitogen-aktivierte Zytokinproduktion isolierter mononukleärer Zellen des peripheren Bluts ex vivo.

3 Materialien, Lösungen und Geräte

3.1 Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Annexin-V-FLUOS	Roche Diagnostics, Mannheim
Anti-IL-2 (biotinylated)	R&D Systems, Wiesbaden
Anti-IL-2 (mouse monoclonal IgG _{2α})	R&D Systems, Wiesbaden
Anti-IL-4 (biotinylated)	Perbio Science, Erembodegem, B
Anti-IL-4 (polyclonal)	Perbio Science, Erembodegem, B
Blutröhrchen Lithium-Heparin	Sarstedt Monovette, Nümbrecht
Bovines Serumalbumin, Fraktion V (BSA)	Roche Diagnostics, Mannheim
CD3 (FITC)	Becton Dickinson, Heidelberg
CD4 (PE)	Becton Dickinson, Heidelberg
CD8 (Cy-Chrome)	Becton Dickinson, Heidelberg
CD56 (Cy-Chrome)	Becton Dickinson, Heidelberg
Concanavalin A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dihydrorhodamin 123	Molecular Probes, Leiden, NL
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
3,3'-Dioctadecyloxacarbocyanin-Perchlorat	Molecular Probes, Leiden, NL
E. coli (Bioparticles BODYPY FL)	Molecular Probes, Leiden, NL
FACS Clean	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Flow	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Lysing Solution	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Rinse	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Röhrchen (PS, 12x75 mm, Falcon)	BD Biosciences, Heidelberg
Fötale Rinderserum (FBS)	Invitrogen, Karlsruhe

HEPES	VWR International, Bruchsal
H ₂ SO ₄ , p.A.	Roth, Karlsruhe
H ₂ O ₂ Peroxidase Lösung, KPL	Dunn Labortechnik, Asbach
H ₃ PO ₄ , p.A.	Roth, Karlsruhe
Fulvestrant, ICI 182780	Tocris, Bristol, GB
Interferon- γ Testkit DuoSet (human)	R&D Systems, Wiesbaden
Interferon- γ Testkit DuoSet (Maus)	R&D Systems, Wiesbaden
Interleukin-2 (rekombinant human)	R&D Systems, Wiesbaden
Interleukin-2 Testkit DuoSet (Maus)	R&D Systems, Wiesbaden
Interleukin-4 Standard (rekombinant human)	Perbio Science, Erembodegem, B
Isoton II	Beckman Coulter, Krefeld
KCl, p.A.	VWR International, Bruchsal
KHCO ₃ , p.A.	VWR International, Bruchsal
KH ₂ PO ₄ , p.A.	VWR International, Bruchsal
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Lipopolysaccharid E.coli 0111:B4 (LPS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Lymphozytenpräparationsmedium	PAA Laboratories, Pasching, A
Meerrettichperoxidase-Streptavidin	R&D Systems, Weinheim
96-Loch-MTP CellStar, Flat Bottom, steril	Greiner Bio-One, Frickenhausen
96-Loch-MTP Immuno Plate, Maxisorp	Nunc, Wiesbaden
NaCl, reinst	VWR International, Bruchsal
Na ₂ EDTA, p.A.	Serva, Heidelberg
NH ₄ Cl	VWR International, Bruchsal
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O, p.A.	VWR International, Bruchsal
NaN ₃ , p.A.	Sigma-Aldrich / Fluka, Taufkirchen
NaOH, p.A.	VWR International, Bruchsal
Opsonizing Reagent	Molecular Probes, Leiden, NL
Östradiol	Calbiochem, Bad Soden
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PBS mit Ca/Mg (Nr. 14040-091)	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin	Invitrogen, Karlsruhe
Polypropylenröhrchen Falcon, 15 ml / 50 ml	VWR International, Bruchsal
Proliferation ELISATestkit mit BrdU	Roche Diagnostics, Mannheim
Propidiumjodid	Molecular Probes, Leiden, NL
Reaktionsgefäße Eppendorf, 1,5 ml / 2 ml	VWR International, Bruchsal
RPMI 1640 Medium	Invitrogen, Karlsruhe

Siebgewebe 100 μ m	VWR International, Bruchsal
Staurosporin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sterilfilter	Schleicher & Schuell, Dassel
Streptavidin-HRP	R&D Systems, Wiesbaden
Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Tamoxifen	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TMB Peroxidase Substrat, KPL	Dunn Labortechnik, Asbach
TNF- α Testkit CytoSet (human)	Biosource, Solingen
TNF- α Testkit DuoSet (Maus)	R&D Systems, Wiesbaden
Trypanblau 0,4 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ZAP-Oglobin II Lyselösung	Beckman Coulter, Krefeld
Zellkulturflaschen Nunc T ₂₅ , T ₈₀	VWR International, Bruchsal

Phytoöstrogene (PÖ)

Daidzein	Tokyo Kasei Kogyo, Tokyo, J
Enterodiol	Sigma-Aldrich / Fluka, Taufkirchen
Enterolacton	Sigma-Aldrich / Fluka, Taufkirchen
Equol	Plantech, Reading, GB
Genistein	Tokyo Kasei Kogyo, Tokyo, J
Matairesinol	Plantech, Reading, GB
O-Desmethylangolensin	Plantech, Reading, GB
Secoisolariciresinol	Plantech, Reading, GB

Zellen

Jurkat	DSMZ, Braunschweig
K562	DSMZ, Braunschweig
YAC-1	DSMZ, Braunschweig

Kenngrößen der fluoreszenzmarkierten Reagenzien

	Farbstoff	Emissionsmaximum	Detektor
Annexin-V-Fluos	FITC	525 nm	FL-1
Anti-CD3	FITC	525 nm	FL-1
Anti-CD4	PE	575 nm	FL-2
Anti-CD8	Cy-Chrome	670 nm	FL-3
Anti-CD56	Cy-Chrome	670 nm	FL-3
DiO	DiO	501 nm	FL-1
<i>E.coli</i>	BODYPY FL	513 nm	FL-1
Propidiumjodid	PI	635 nm	FL-3

3.2 Lösungen

ACK-Lysepuffer

150 mM NH_4Cl , 1 M KHCO_3 , 10 mM Na_2EDTA

8,29 g NH_4Cl

1,00 g KHCO_3

37,20 mg Na_2EDTA

in 800 ml $\text{H}_2\text{O}_{bidest}$ lösen, auf pH 7,2 bis 7,4 einstellen, mit $\text{H}_2\text{O}_{bidest}$ auf 1000 ml auffüllen, steril filtrieren. Lagerung bei 4°C.

Antiöstrogen-Stammlösungen für Inhibierungsversuche

Fulvestrant und Tamoxifen wurden in einer Konzentration von 100 mM in DMSO gelöst, aliquotiert und bei -20°C maximal einen Monat gelagert.

Stammlösungen für Einzelversuche wurden entsprechend den PÖ-Lösungen hergestellt.

Concanavalin A-Stammlösung

1 mg/ml PBS, Lagerung in Aliquots bei -20°C.

DiO-Stammlösung (3 mM)

2,645 mg DiO in 1 ml DMSO lösen (Ultraschallbad), Lagerung lichtgeschützt bei 4°C.

HEPES (1,25 M)

60,18 g HEPES in 200 ml H₂O_{bidest} lösen (Ultraschallbad), steril filtrieren, Lagerung bei 4°C.

Inkubationspuffer zur Messung der Apoptose

10 mM HEPES/NaOH, pH 7,4, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl₂

1,204 g HEPES

1,644 g NaCl

0,147 g CaCl₂

HEPES mit H₂O_{bidest} auf 500 ml auffüllen, mit NaOH auf pH 7,4 einstellen. NaCl und CaCl₂ mit dieser Lösung auf 200 ml auffüllen. Lagerung bei 4°C.

Interleukin-2 für NK-Aktivität

120 IU/l = 9,23 ng/l

10,00 µg Interleukin-2 (rekombinant human)

14,00 mg BSA

37,33 µl HCl (1 M)

BSA in 9,296 ml H₂O_{bidest} lösen, HCl zufügen, durch 0,2 µm-Filter steril filtrieren. IL-2 in 1,0833 ml dieser Lösung aufnehmen, Lagerung in Aliquots von 10 µl bei -20°C, direkt vor Gebrauch mit Komplettmedium 1:200 auf 600 IU/ml verdünnen.

Komplettmedium für humane Zellen

RPMI 1640 mit 10 % FBS, 1 % Penicillin-/Streptomycin und 1 % L-Glutamin

500 ml RPMI 1640

50 ml Fötales Rinderserum (30 min bei 56°C hitzeinaktiviert)

5 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung

5 ml L-Glutamin-Lösung

Lösungen in der RPMI-Flasche vereinen, gut mischen, Lagerung bei 4°C.

Komplettmedium für Mauszellen

RPMI 1640 mit 5 % FBS, 1 % Penicillin-/Streptomycin, 1 % L-Glutamin und 25 mM HEPES

- 500 ml RPMI 1640
- 25 ml Fötales Rinderserum (30 min bei 56°C hitzeinaktiviert)
- 5 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung
- 5 ml L-Glutamin-Lösung
- 10 ml HEPES (1,25 M in H₂O_{bidest}, steril filtriert)

Lipopolysaccharid-Stammlösung

20 µg/ml H₂O_{bidest}, Lagerung in Aliquots bei -20°C.

Markierungslösung zur Messung der Apoptose

10 µl Annexin-V-FLUOS Stammlösung in 500 µl Inkubationspuffer verdünnen und 10 µl Propidiumjodidlösung (50 µg/ml) zufügen. Markierungslösung frisch ansetzen, vor Licht schützen und sofort verbrauchen.

Na-Azid-PBS (0,1 %)

1 g NaN₃ in 1 l PBS (ohne Ca/Mg) lösen, Lagerung bei 4°C.

Paraformaldehyd (1 %)

- 1 g Paraformaldehyd
- 100 ml wässrige NaCl-Lösung, 15 mM
- 1 ml NaOH-Lösung, 1 M

Paraformaldehyd in 15 mM NaCl lösen, 1 M NaOH zugeben, auf 60°C erwärmen und auf pH 7,4 einstellen.

PBS ohne Calcium und Magnesium

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄

80,0 g NaCl

2,0 g KCl

2,0 g KH₂PO₄

14,4 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O

in 1 l H₂O_{bidest} lösen, autoklavieren, zum Gebrauch mit H₂O_{bidest} 1:10 verdünnen und auf pH 7,4 einstellen. Lagerung bei 4°C.

PBS/Tween

0,05 % (v/v) Tween 20 in PBS ohne Ca/Mg, Lagerung bei Raumtemperatur.

Phytoöstrogen-Stammlösungen für Einzelversuche

Mit den PÖ wurden 20 mM Stammlösungen mit 60 % DMSO und 40 % PBS (ohne Ca/Mg) hergestellt. Dazu wurden die Substanzen in der entsprechenden Menge DMSO gelöst, PBS zugefügt und die Lösungen aliquotiert bei -20°C gelagert. Genistein wurde wöchentlich frisch angesetzt, die übrigen PÖ monatlich.

Phytoöstrogen-Stammlösungen für Inhibierungsversuche

Mit Genistein und Equol wurden 20 mM Stammlösungen mit 40 % DMSO und 60 % PBS (ohne Ca/Mg) hergestellt. Dazu wurden die PÖ in der entsprechenden Menge DMSO gelöst, PBS zugefügt und die Lösungen aliquotiert bei -20°C gelagert. Genistein wurde wöchentlich frisch angesetzt, Equol konnte einen Monat lang gelagert werden.

2 % PTB

2 g BSA in 100 ml PBS/Tween lösen. Lösung am Tag des Gebrauchs frisch ansetzen.

4 % PTB

4 g BSA in 100 ml PBS/Tween lösen. Lösung am Tag des Gebrauchs frisch ansetzen.

Propidiumjodid zur Messung der NK-Aktivität (0,525 mg/ml)

5,25 mg Propidiumjodid in 10 ml Kompletmedium lösen (Ultraschallbad), Lagerung lichtgeschützt bei 4°C.

Propidiumjodid zur Messung der Apoptose (50 μ g/ml)

0,5 mg Propidiumjodid in 10 ml PBS ohne Ca/Mg lösen (Ultraschallbad), Lagerung lichtgeschützt bei 4°C.

Propidiumjodid zur Messung der Phagozytoseaktivität (33,3 μ g/ml)

166,5 μ g Propidiumjodid in 1 ml PBS (ohne Ca/Mg) lösen. Daraus 1:5 mit PBS verdünnt die Arbeitslösung herstellen. Lagerung beider Lösungen bei 4°C.

Quenchlösung zur Messung der Phagozytoseaktivität

Trypanblau 1:10 mit PBS ohne Ca/Mg verdünnt.

3.3 Kultivierung der Zelllinien

Jurkat und K562

Die humanen Zelllinien Jurkat und K562 wurden in Kompletmedium in T₈₀-Zellkulturflaschen bei 37°C, 95 % Luftfeuchte und 5 % CO₂-Gehalt kultiviert. Um die Zellen in logarithmischem Wachstum zu halten, wurden sie jeden zweiten Tag in einer Dichte von 10⁷ vitalen Zellen/20 ml in frisches Medium gebracht. Nach maximal 70 Passagen wurden die Zellen entsorgt und durch frische ersetzt.

YAC-1

Die Maus-Zelllinie YAC-1 wurde unter den gleichen Bedingungen kultiviert wie Jurkat und K562. Beim Mediumwechsel wurden die Zellen allerdings nur in einer Dichte von 5 · 10⁶ Zellen/20 ml ausgebracht.

3.4 Geräte

Analysenwaage Precisa 1620C	Precisa Instruments, Dietikon, CH
CO ₂ -Inkubator IR 1500 Einstellungen: 37°C, 95 % Luftfeuchte, 5 % CO ₂	Flow Laboratories, Meckenheim
Coulter Z2 Particle Count & Size Analy- zer mit 100 µl-Kapillare	Beckman-Coulter, Krefeld
FACS Calibur Durchflusszytometer mit Cell Quest Software Version 3.1f Laser: 488nm Argon-Laser Detektoren: FL1: 530 nm; FL2: 585 nm; FL3: 650 nm	BD Biosciences, Heidelberg
Feinwaage Mettler AE 163	Mettler-Toledo, Schwerzenbach, CH
Kühlzentrifuge Jouan CR422	Jouan, Fernwald
Mikroskop Leica DM LS	Leica, Wetzlar
pH-Messgerät Mettler Toledo MP220	Mettler-Toledo, Schwerzenbach, CH
Sicherheitswerkbank	Heraeus Instruments, Hanau
Thermomax Microplate Reader mit SOFTmax Version 2.34	Molecular Devices, Ismaning
Thermomixer S437	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallbad Elma Transsonic Digital	Elma, Pforzheim

4 Studiendesigns und Methoden

4.1 In vitro-Experimente mit Jurkat

4.1.1 Studiendesign

Zellen der Jurkat T-Zelllinie wurden mit den Isoflavonen Daidzein und Genistein, ihren Metaboliten O-Desoxymethylangolensin und Equol, mit den Lignanen Matairesinol und Secoisolariciresinol und ihren Metaboliten Enterodiol und Enterolacton in Konzentrationen von 1 nM bis 100 μ M inkubiert. Anschließend wurde ihre Proliferation, Zellvitalität, Apoptose- und Nekroserate in Abhängigkeit von der Art und Konzentration der PÖ bestimmt. Alle Tests wurden zumindest 5-fach angesetzt.

4.1.2 Proliferation

Testprinzip Die Proliferationsrate wurde mit Hilfe eines kommerziellen BrdU-ELISA (5-Brom-2'-Deoxyuridin Enzyme Linked Immunosorbent Assay) bestimmt. Dabei wird das Ausmaß der Proliferation indirekt über den Einbau von BrdU statt Thymidin in die DNA sich teilender Zellen ermittelt. An das inkorporierte BrdU bindet nach partieller Denaturierung der DNA ein Peroxidase-gekoppelter Antikörper. Die Peroxidase setzt anschließend das zugegebene 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in das blaue TMB-Kation um, das sich nach Zugabe von Schwefelsäure gelb färbt und photometrisch bestimmt wird. Je größer dabei die Extinktion, desto mehr BrdU wurde eingebaut und desto mehr proliferierende Zellen waren im Testansatz vorhanden.

Testansatz Die 20 mM PÖ-Stammlösungen wurden mit Kompletmedium auf 400 μ M (1,2 % DMSO) verdünnt, für alle weiteren Verdünnungsschritte wurde Kompletmedium mit 1,2 % DMSO (v/v) und 0,8 % PBS (v/v) eingesetzt. Die

Endkonzentration von DMSO betrug somit in allen Ansätzen 0,3 %.

Nachdem die Randvertiefungen einer 96-Loch Flat Bottom Mikrotiterplatte zum Schutz vor Verdunstung mit PBS gefüllt waren, wurden in die restlichen Vertiefungen je 100 μl einer Jurkat-Zellsuspension mit 10^5 Zellen/ml, 50 μl Komplettmedium und PÖ-Lösung pipettiert. Dabei wurden pro PÖ drei Parallelansätze angelegt; zwei zur späteren BrdU-Markierung und eine als Blindwert. Die PÖ-Endkonzentrationen reichten von 10^{-4} M bis 10^{-9} M. Zusätzlich wurden eine Kontrolle mit Komplettmedium und eine Kontrolle mit Komplettmedium mit 3 % DMSO und 2 % PBS angesetzt. Die Platten inkubierten 48 h im Brutschrank, anschließend wurde der BrdU-ELISA nach Herstellerangaben durchgeführt.

Messung und Auswertung Die Extinktion des gelben Farbstoffs wurde im Microplate Reader bei 450 nm (Messwert) und 650 nm (Korrekturwert) gemessen, der Korrekturwert vom Messwert abgezogen, aus Mehrfachmessungen das arithmetische Mittel bestimmt und davon die korrigierte Extinktion des Blindwerts abgezogen.

4.1.3 Bestimmung der Zellvitalität im Proliferationsansatz

Testprinzip Die Membran absterbender und abgestorbener Zellen wird durchlässig für Propidiumjodid (PI), ein Fluoreszenzfarbstoff, der in die DNA dieser Zellen interkaliert. Bei der Messung am Durchflusszytometer können somit vitale (PI-negative) und nicht vitale (PI-positive) Zellen voneinander unterschieden werden.

Testansatz Beim Füllen jeder Mikrotiterplatte für die Proliferationsbestimmung wurde analog eine Platte mit den drei PÖ-Konzentrationen 10^{-8} M, 10^{-5} M und 10^{-4} M zur Bestimmung der Zellvitalität angesetzt. Nach 48 h Inkubation unter den gleichen Bedingungen wie für die Messung der Proliferation wurde der Inhalt von jeweils drei gleich befüllten Vertiefungen in ein FACS-Röhrchen vereinigt und die Vertiefungen drei Mal mit je 200 μl Komplettmedium gewaschen. Anschließend wurde in jedes FACS-Röhrchen 30 μl PI zugefügt, gemischt, 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und bis zur Messung lichtgeschützt auf Eis gelagert. Als Positivkontrolle wurden 300 μl Jurkat-Zellsuspension mit $4 \cdot 10^4$ Zellen/ml 3 min im Thermomixer erhitzt. Nach Zugabe von 30 μl PI inkubierten diese ebenso für 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Für die Messung am Durchflusszytometer wurden 300 μl Komplettmedium zugefügt.

Messung und Auswertung Die Messung der Ansätze am Durchflusszytometer fand bei hoher Durchflussrate bis 10^4 Zellereignisse statt. Zur Auswertung wurde ein Histogramm der vom Fluoreszenzkanal (FL) -3 detektierten Ereignisse erstellt (s. Abb. 4.1). Zur Abgrenzung der vitalen Zellen wurde der Marker M1 gesetzt, alle PI-positiven und somit abgestorbenen Zellen wurden durch Setzen des Markers M2 erfasst. Die Zellvitalität wurde als Anteil vitaler Zellen an der gesamten gemessenen Zellzahl errechnet.

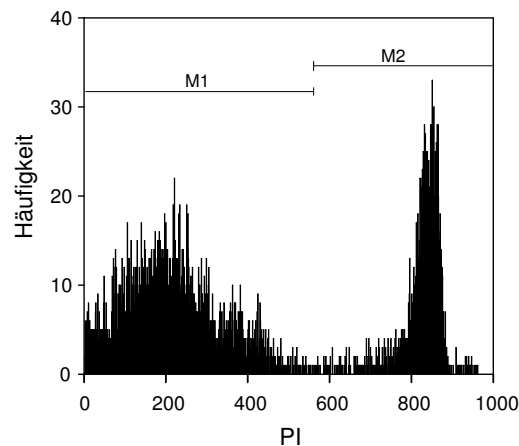


Abbildung 4.1: Messung der Vitalität von Jurkat-Zellen. Im Histogramm sind vitale Zellen mit niedriger PI-Fluoreszenz unter dem Marker M1 erfasst, geschädigte Zellen mit hoher Fluoreszenz unter dem Marker M2.

4.1.4 Apoptose und Nekrose

Testprinzip Der Nachweis von Apoptose mittels Annexin-V-FLUOS beruht auf Veränderungen der Zellmembran in frühen Stadien der Apoptose. Eine dieser Veränderungen bei früh-apoptotischen Zellen ist die Translokation des Phospholipids Phosphatidylserin von der zytoplasmatischen Membranseite zur Außenseite der Zellmembran. Annexin besitzt als phospholipid-bindendes Protein eine hohe Bindungsaffinität zu Phosphatidylserin und bindet in Abhängigkeit von Calcium daran. An Annexin ist der Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszein gebunden, der im Durchflusszytometer sichtbar gemacht wird. Bei dieser Färbemethode werden neben apoptotischen auch spät-apoptotische und nekrotische Zellen erfasst, da Annexin ebenso an die Phosphatidylserin-Reste von Membranen dieser Zellen bindet. Die Gegenfärbung mit Propidiumjodid (PI) macht apoptotische Zellen sauber getrennt von anderen geschädigten Zellen darstellbar, da nur die Membran letzterer durchlässig für PI ist.

Für die zu analysierenden Zellen ergab sich somit folgendes Färbemuster, das mit Hilfe des Durchflusszytometers sichtbar gemacht wurde:

Apoptotische Zellen: Annexin⁺, PI⁻

Spätaoptotische und nekrotische Zellen: Annexin⁺, PI⁺

Vitale Zellen: Annexin⁻, PI⁻

Als Apoptoserate wird der Anteil der apoptotischen Zellen an der Gesamtzahl der beobachteten Zellen bezeichnet, Nekroserate analog.

Testansatz Die 20 mM PÖ-Stammlösungen wurden mit Komplettmedium auf 1 mM (3 % DMSO) verdünnt, für alle weiteren Verdünnungsschritte wurde Komplettmedium mit 3 % DMSO (v/v) und 2 % PBS (v/v) eingesetzt. Die Endkonzentration von DMSO betrug somit in allen Ansätzen 0,3 %.

In FACS-Röhrchen wurden je 400 μ l Komplettmedium vorgelegt, 50 μ l einer Suspension mit 10^7 Jurkat-Zellen/ml und 50 μ l der jeweiligen PÖ-Lösung zugefügt. Alle PÖ wurden in den Konzentrationen 10^{-4} , $5 \cdot 10^{-5}$, 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} und 10^{-8} M getestet. Zusätzlich wurde bei *Dai*, *DMA*, *Mat*, *Sec*, *End* und *Enl* die Konzentration von 10^{-9} M untersucht. Die kompletten Ansätze einschließlich der Kontrollen sind aus Tab. 4.1 ersichtlich.

Tabelle 4.1: Pipettierschema für die Ansätze zur Messung der Apoptose und Nekrose

Ansatz	Medium	Jurkat	3 % DMSO	Staurosporin	PÖ
Mediumkontrolle	450 μ l	50 μ l			
DMSO-Kontrolle	400 μ l	50 μ l	50 μ l		
Positivkontrolle	400 μ l	50 μ l		50 μ l (10 μ M)	
Testansatz mit PÖ	400 μ l	50 μ l			50 μ l

Nach 24 h Inkubation im Brutschrank wurden die Ansätze 5 min bei 200 g und 20°C zentrifugiert, die Überstände abgesaugt und die Zellen mit 1 ml PBS (mit Ca/Mg) resuspendiert. Wiederum wurde zentrifugiert und abgesaugt und die Zellen mit 50 μ l Markierungslösung vorsichtig gemischt. Die Ansätze inkubierten 10 min im Dunkeln bei Raumtemperatur und wurden anschließend mit 400 μ l Inkubationspuffer versetzt. Bis zur durchflusszytometrischen Messung lagerten die Röhrchen

maximal 30 min lichtgeschützt auf Eis.

Messung und Auswertung Am Durchflusszytometer wurde die Grünfluoreszenz von Annexin-V-FLUOS vom Detektor FL-1 und die Orangetfluoreszenz von PI am FL-3 bei hoher Durchflussrate gemessen, bei der Akquisition der Daten wurden 10^4 Zellereignisse erfasst. Im Punktdiagramm FSC/SSC wurde Zelldebris durch Setzen eines Gates auf vollständige Zellen ausgeschlossen, im Punktdiagramm Annexin/PI durch Anpassen des Quadrantenmarkers an die einzelnen Zellwolken der prozentuale Anteil der jeweiligen Zellen an der Gesamtzahl der Zellen im Gate ermittelt. Im linken unteren Quadranten sind die vitalen Zellen lokalisiert (Annexin⁻, PI⁻, s.o.), im rechten unteren Quadranten die apoptotischen Zellen und im rechten oberen Quadranten spät-apoptotische und nekrotische Zellen.

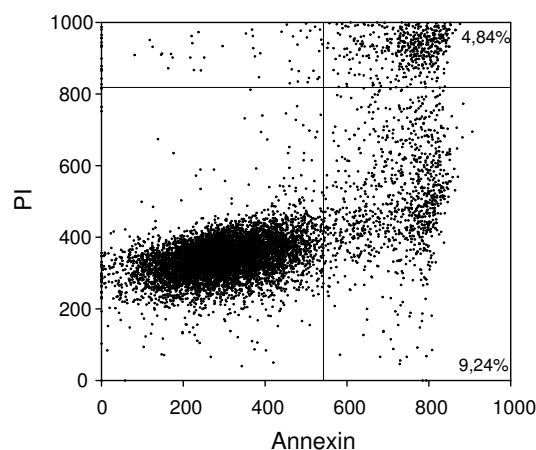


Abbildung 4.2: Messung der Apoptose- und Nekroserate von Jurkat-Zellen. Im Streudiagramm sind vitale Zellen unten links abgebildet, apoptotische, Annexin-markierte Zellen unten rechts und nekrotische, Annexin/PI doppelt markierte Zellen oben rechts, jeweils mit Angabe ihres Anteils an der Gesamtzellzahl.

4.2 In vitro-Experimente mit PBMC des Menschen

4.2.1 Studiendesign

Zwischen Oktober 2002 und November 2003 wurde vier gesunden Männern wiederholt venöses Blut in ein Lithium-Heparin-Bluttröhrchen entnommen. Aus dem Blut

wurden mononukleäre Zellen (PBMC) isoliert und diese 24 Stunden mit den Isoflavonen Daidzein und Genistein und ihren Metaboliten O-Desoxymethylangolensin und Equol und mit den Lignanen Matairesinol und Secoisolariciresinol und ihren Metaboliten Enterodiol und Enterolacton in Konzentrationen von 10^{-9} bis $5 \cdot 10^{-5}$ M inkubiert. Anschließend wurde die Apoptose- und Nekroserate der PBMC, die lytische Aktivität der Natürlichen Killerzellen und die mitogen-aktivierte Proliferation und Zytokinproduktion der PBMC ermittelt. Um den Anteil des Östrogenrezeptors an der Wirkung von Genistein und Equol auf die Zytokinproduktion von PBMC zu bestimmen, wurden Inhibierungsversuche durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit den genannten PÖ in hoher Konzentration und den Antiöstrogenen Fulvestrant und Tamoxifen inkubiert und im Zellkulturüberstand die Zytokine IFN- γ , IL-2 und TNF- α gemessen.

4.2.2 Isolierung mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut

Vor Beginn der Isolierung wurden alle Lösungen auf Raumtemperatur vorgewärmt. 9 ml aus einer Armvene entnommenes Blut wurden mit 6 ml PBS ohne Ca/Mg verdünnt und vorsichtig auf je 4 ml Lymphozytenpräparationsmedium in zwei 15 ml-Falconröhrchen geschichtet. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 400 g und 20°C wurde jeweils die mittlere Schicht mit mononukleären Zellen mittels einer Pasteurpipette in ein neues Röhrchen überführt, auf 15 ml mit PBS aufgefüllt und 10 min bei 400 g und 20°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 15 ml PBS resuspendiert und die Suspension wiederum 10 min bei 400 g und 20°C zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurden die Zellen in 2 ml Kompletmedium resuspendiert und die Zellkonzentration bestimmt. Dazu wurden 20 μ l Zellsuspension und 2 Tropfen ZAP-Oglobin zur Lyse der Erythrozyten in 10 ml Isoton gegeben und gut gemischt. Anschließend wurde am Coulter Zellzähler die Anzahl der Zellen mit einem Volumen von >35 Femtoliter in 500 μ l Suspension bestimmt und die Suspension mit Kompletmedium auf die gewünschte Zellkonzentration eingestellt.

4.2.3 Mitogen-aktivierte Proliferation

Testprinzip Bei diesem Test wird die proliferative Reaktion der eingesetzten Zellen auf das Mitogen Concanavalin A bestimmt. Nach Inkubation mit diesem Mitogen

folgt die Ermittlung der Proliferationsrate nach dem im Abschnitt 4.1.2 auf Seite 43 beschriebenen BrdU-ELISA.

Testansatz Die 20 mM PÖ-Stammlösungen wurden mit Komplettmedium und DMSO auf 200 μM (0,8 % DMSO) verdünnt, für alle weiteren Verdünnungsschritte wurde Komplettmedium mit 0,8 % DMSO (v/v) eingesetzt. Die Endkonzentration von DMSO betrug somit in allen Ansätzen 0,2 %.

Nachdem die Randvertiefungen einer 96-Loch Flat Bottom Mikrotiterplatte zum Schutz vor Verdunstung mit PBS gefüllt waren, wurden in die restlichen Vertiefungen je 50 μl Zellsuspension mit $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml und 50 μl PÖ-Lösung oder Komplettmedium (Mediumkontrolle) oder 0,8 % DMSO in Komplettmedium (DMSO-Kontrolle) und 100 μl Concanavalin A (10 $\mu\text{g/ml}$) pipettiert. Dabei wurden pro PÖ vier Vertiefungen angesetzt; drei zur späteren BrdU-Markierung und eine als Blindwert. Die PÖ-Endkonzentrationen reichten von $5 \cdot 10^5$ M bis 10^{-9} M. Die Zellen inkubierten 5 Tage im Brutschrank, anschließend wurde der BrdU-ELISA nach Herstellerangaben durchgeführt.

Messung und Auswertung wurden analog zur Messung der Proliferation der Jurkat-Zellen am Microplate-Reader vorgenommen (s. Abschnitt 4.1.2).

4.2.4 Apoptose und Nekrose

Testprinzip Die Apoptose- und Nekroserate wurde wie in Abschnitt 4.1.4 auf Seite 45 beschrieben mittels Annexin/PI-Doppelfärbung und Messung am Durchflussszytometer durchgeführt.

Testansatz Die 20 mM PÖ-Stammlösungen wurden mit Komplettmedium und DMSO auf 300 μM (1,2 % DMSO) verdünnt, für alle weiteren Verdünnungsschritte wurde Komplettmedium mit 1,2 % DMSO (v/v) eingesetzt. Die Endkonzentration von DMSO betrug somit in allen Ansätzen 0,2 %.

In FACS-Röhrchen wurden je 250 μl Zellsuspension mit $2 \cdot 10^6$ PBMC/ml und 50 μl der jeweiligen PÖ-Lösung gemischt. Alle PÖ wurden in den Konzentrationen $5 \cdot 10^{-5}$, 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} und 10^{-9} M getestet. Die Ansätze einschließlich der Kontrollen sind aus Tab. 4.2 ersichtlich.

Tabelle 4.2: Pipettierschema für die Ansätze zur Messung der Apoptose und Nekrose

Ansatz	PBMC	Medium	1,2 % DMSO	Staurosporin	PÖ
Mediumkontrolle	250 μ l	50 μ l			
DMSO-Kontrolle	250 μ l		50 μ l		
Positivkontrolle	250 μ l			50 μ l (6 μ M)	
Testansatz mit PÖ	250 μ l				50 μ l

Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank wurden die Ansätze 5 min bei 200 g und 20°C zentrifugiert, die Überstände abgesaugt und die Zellen mit 1 ml PBS (mit Ca/Mg) resuspendiert. Wiederum wurde zentrifugiert und abgesaugt und die Zellen mit 50 μ l Markierungslösung vorsichtig gemischt. Die Ansätze inkubierten 10 min im Dunkeln bei Raumtemperatur und wurden anschließend mit 400 μ l Inkubationspuffer versetzt. Bis zur durchflusszytometrischen Messung lagerten die Röhrchen maximal 30 min lichtgeschützt auf Eis.

Messung und Auswertung fanden analog zur Bestimmung der Apoptose- und Nekroserate der Jurkat-Zellen am Durchflusszytometer statt (s. Abschnitt 4.1.4 auf Seite 47)

4.2.5 Zytotoxische Aktivität natürlicher Killerzellen

Testprinzip NK-Zellen werden mit einer Tumor-Zelllinie (Zielzellen, K562) und dem DNA-Fluoreszenzfarbstoff PI inkubiert. Lysierte Zellen werden durch PI markiert, da deren Membran durch Perforin der NK-Zellen durchlässig für diesen Farbstoff ist. Zur Unterscheidung zwischen Zielzellen und PBMC werden die Zielzellen vor Ansetzen des Tests mit dem stabilen Membranfluoreszenzfarbstoff 3,3'-Diocadecyloxacarbocyanin-Perchlorat (DiO) angefärbt. Bei der Messung am Durchflusszytometer erscheinen vitale Targetzellen einfach (DiO^+) und lysierte Zielzellen doppelt positiv (DiO^+/PI^+) gefärbt. Als NK-Aktivität wird der prozentuale Anteil doppelt positiver Zellen an der Gesamtzahl der K562-Zielzellen bezeichnet.

Färben der Zielzellen K562-Zellen wurden am Tag vor Durchführung des Versuchs passagiert, um eine möglichst hohe Vitalität (niedriger Kontrollwert) zu er-

halten. Am Tag des Experiments erfolgte die Färbung mit DiO. Dafür wurden die K562-Zellen in frischem Kompletmedium auf 10^6 vitale Zellen/ml eingestellt, in einem FACS-Röhrchen 2 ml der Suspension mit 20 μ l der DiO-Stammlösung vermischt und die Mischung 20 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 5 min bei 200 g und 20°C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, das Pellet mit zimmerwarmem PBS resuspendiert und mit mehrmaligem Nachspülen in ein 15 ml-Röhrchen überführt. Es folgte eine weitere 5-minütige Zentrifugation bei 200 g und 20°C und zwei weitere Waschschrte mit PBS. Dann wurden die Zellen in 1 ml Kompletmedium aufgenommen, die Zellzahl nach Färbung mit Trypanblau unter dem Mikroskop bestimmt und die Suspension auf 10^6 vitale Zellen/ml eingestellt. Unmittelbar vor Ansetzen des Tests wurde die Suspension mit Kompletmedium 1:10 auf 10^5 Zellen/ml verdünnt.

Testansatz Die 20 mM PÖ-Stammlösungen wurden mit Kompletmedium und DMSO auf 300 μ M (1,2 % DMSO) verdünnt, für alle weiteren Verdünnungsschrte wurde Kompletmedium mit 1,2 % DMSO (v/v) eingesetzt. Die Endkonzentration von DMSO betrug somit in allen Ansätzen 0,2 %.

In FACS-Röhrchen wurden je 200 μ l Zellsuspension mit $3,75 \cdot 10^6$ PBMC/ml mit 50 μ l IL-2 (600 IU/ml) bzw. 50 μ l Kompletmedium und 50 μ l der jeweiligen PÖ-Lösung vermischt. Die IL-2-Konzentration im Röhrchen betrug damit 100 IU/ml bzw. 7,69 ng/ml. Alle PÖ wurden in den Konzentrationen $5 \cdot 10^{-5}$, 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} und 10^{-9} M getestet. Folgende Ansätze dienten als Kontrollen:

Kontrolle für spontane Lyse: 300 μ l Kompletmedium

Mediumkontrolle: 200 μ l Zellsuspension + 50 μ l IL-2 / Kompletmedium + 50 μ l Kompletmedium

DMSO-Kontrolle: 200 μ l Zellsuspension + 50 μ l IL-2 / Kompletmedium + 50 μ l Kompletmedium mit 1,2 % DMSO

Die Ansätze inkubierten 24 h im Brutschrank, dann wurden in jedes Röhrchen 30 μ l PI (0,252 mg/ml) und 300 μ l Zielzellsuspension zugefügt. Das Verhältnis von Effektor- zu Ziellzellen (E/T-Ratio) betrug somit 25:1. Der Inhalt wurde kurz auf dem Vortex gemischt, 2,5 min bei 120 g und 20°C zentrifugiert und 2 h 15 min im Brutschrank inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Röhrchen auf Eis gestellt, bis zur Messung am selben Tag lichtgeschützt auf Eis gelagert und direkt vor dem Messen auf dem Vortex gemischt.

Tabelle 4.3: Pipettierschema für die Ansätze zur Messung der NK-Aktivität (in μl)

	Ansatz	PBMC	IL-2	Medium	PE	1,2 % DMSO
ohne IL-2	Kontrolle	-	-	300	-	-
	Mediumkontrolle	200	-	100	-	-
	DMSO-Kontrolle	200	-	50	-	50
	Testansatz mit PE	200	-	50	50	-
mit IL-2	Mediumkontrolle	200	50	50	-	-
	DMSO-Kontrolle	200	50	-	-	50
	Testansatz mit PE	200	50	-	50	-

Messung und Auswertung Zur Messung am Durchflusszytometer wurde ein Diagramm für FL-1 (DiO) und FL-3 (PI) mit einem Live-Gate auf DiO-positive, d.h. Zielzellen geöffnet. Die Empfindlichkeit der Detektoren wurde mit Hilfe je eines Histogramms für FL-1 und FL-3 so eingestellt, dass der Großteil der Fluoreszenz bei der Messung des Kontrollansatzes im Histogramm zwischen 10^0 und 10^1 (FL-1) und 10^2 und 10^3 (FL-3) dargestellt wurde. Die Datenaufnahme endete nach dem Erfassen von 5000 Zielzellen. PI^+ -Zellen besitzen am FL-3 eine stärkere Fluoreszenz als PI^- -Zellen. Alle Zielzellen oberhalb einer bestimmten Grenzfluoreszenz wurden als lysiert gezählt und ihr Anteil an der Gesamtzahl der Zielzellen berechnet. Die NK-Aktivität ist demnach der Anteil lysierter Zellen im Testansatz abzüglich des Anteils lysierter Zellen im Kontrollansatz für spontane Lyse.

4.2.6 Mitogen-aktivierte Zytokinproduktion

Testprinzip Nach Induktion der Sekretion von $\text{IFN-}\gamma$, IL-2 und IL-4 durch Con A und von $\text{TNF-}\alpha$ durch LPS kann die Zytokinkonzentration im Zellkultur-Überstand durch kolorimetrischen ELISA bestimmt werden.

Testansatz Die 20 mM PÖ-Stammlösungen wurden mit Komplettmedium und DMSO auf 200 μM (0,8 % DMSO) verdünnt, für alle weiteren Verdünnungsschritte wurde Komplettmedium mit 0,8 % DMSO (v/v) eingesetzt. Die Endkonzentration von DMSO betrug somit in allen Ansätzen 0,2 %.

In die Vertiefungen einer 96-Loch-Mikrotiterplatte wurden für die Stimulation der Zytokinproduktion folgende Volumina PBMC-Suspension ($2 \cdot 10^6$ Zellen/ml) pipetiert: $\text{IFN-}\gamma$: 4 x 50 μl ; IL-2, IL-4 und $\text{TNF-}\alpha$: je 2 x 50 μl . 50 μl PÖ-Lösung

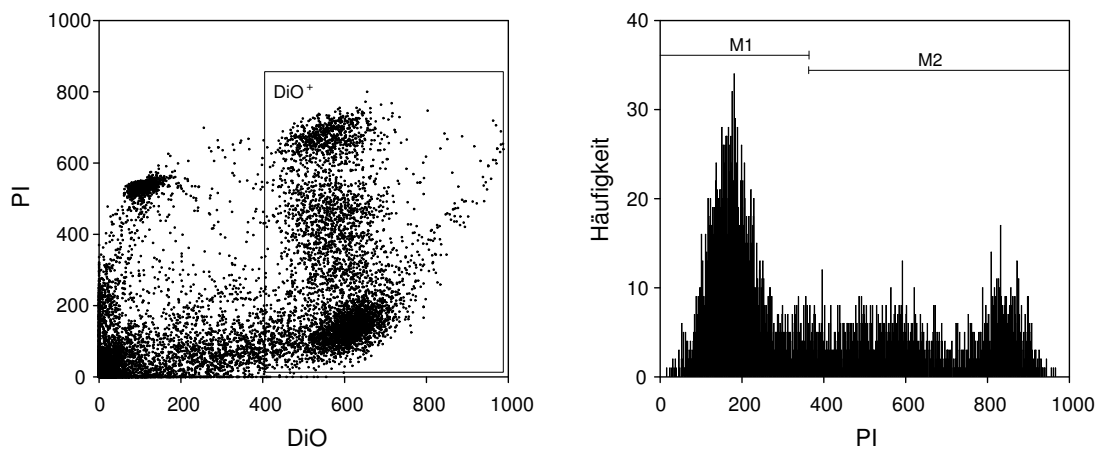


Abbildung 4.3: Messung der NK-Aktivität. Im Streudiagramm werden DiO-markierte K562-Zellen erfasst und diese im Histogramm abhängig von der PI-Fluoreszenzintensität dargestellt. Unter dem Marker M2 erfasste Zellen sind lysiert.

oder Kompletmedium (Mediumkontrolle) oder 0,8 % DMSO in Kompletmedium (DMSO-Kontrolle) wurden zugegeben. Für die Stimulierung der IFN- γ -, IL-2 und IL-4-Produktion wurde Con A 1:100 in Kompletmedium verdünnt (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), die TNF- α -Produktion wurde mit 1:500000 verdünntem LPS (20 ng/ml) stimuliert. Je 100 μl dieser Lösungen wurden zu den Zellen gegeben (Endkonzentrationen von 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Con A und 10 ng/ml LPS). Nach 24 h Inkubation im Brutschrank wurden die Platten bei 300 g und 20°C 10 min zentrifugiert, 130 μl des Überstands abgenommen, die vier bzw. zwei Überstände jedes Zytokins in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß vereinigt und bis zur Durchführung des ELISA bei -20°C gelagert.

IFN- γ -ELISA Die Konzentration von IFN- γ wurde mit Hilfe eines kommerziellen Testkits nach Herstellerangaben bestimmt.

IL-2-ELISA Zur Bestimmung der IL-2-Konzentration wurde ein aus Einzelkomponenten entwickelter kolorimetrischer ELISA durchgeführt. Dafür wurde eine Maxi-sorp-Mikrotiterplatte über Nacht mit 50 μl Coating-Antikörper (3 μg monoklonaler Anti-IL-2/ml PBS) pro Ansatz bei 4°C inkubiert und anschließend 5 mal mit PBS/Tween gewaschen. Freie Bindungsstellen wurden mit 100 μl 2 % PTB/Ansatz 1 h bei 37°C blockiert. Danach wurde die Platte wiederum 5 mal mit PBS/Tween gewaschen. Eine Standard-Verdünnungsreihe aus rekombinantem IL-2 wurde hergestellt mit einer Maximalkonzentration von 2000 pg IL-2/ml Kompletmedium und

1:2-Verdünnungen bis 31,25 pg/ml und 50 μ l Standard bzw. unverdünnte Probe pro Ansatz in je zwei Ansätze (Doppelbestimmung) pipettiert. Nach 2 h Inkubation bei Raumtemperatur wurden 50 μ l Detection-Antikörper (50 ng biotinylierter Anti-IL-2/ml PTB) pro Ansatz zugegeben und weitere 2 h inkubiert. Anschließend wurde die Platte 5 mal mit PBS/Tween gewaschen, 100 μ l Streptavidin-HRP (1:200 in PTB verdünnt) pro Ansatz pipettiert und 30 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Nach 5-maligem Waschen wurden 100 μ l einer 1:1-Mischung von TMB-Peroxidase Substrat und Peroxidase-Lösung in jeden Ansatz gegeben, 20 min im Dunkeln inkubiert und die Reaktion mit je 50 μ l 1 M H_2SO_4 abgestoppt. Direkt anschließend wurde am Microplate-Reader die Extinktion bei 450 nm mit Wellenlängenkorrektur bei 570 nm bestimmt. Mit der dazugehörigen Software wurde eine doppelt-logarithmische Kalibrierkurve ermittelt, anhand derer die Konzentration des Zytokins in den Überständen errechnet werden konnte.

IL-4-ELISA Auch die IL-4-Konzentration in den Zellkulturüberständen wurde mit einem aus Einzelkomponenten entwickelten kolorimetrischen ELISA bestimmt. Eine Maxisorp-Mikrotiterplatte wurde über Nacht mit 100 μ l Coating-Antikörper (2,5 μ g polyklonaler Anti-IL-4/ml PBS) bei 4°C inkubiert und anschließend dekantiert. Freie Bindungsstellen wurden mit 200 μ l 4 % PTB/Ansatz 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Danach wurde die Platte 3 mal mit PBS/Tween gewaschen. Eine Standard-Verdünnungsreihe aus rekombinantem IL-4 wurde hergestellt mit einer Maximalkonzentration von 400 pg IL-4/ml Komplettmedium und 1:2-Verdünnungen bis 6,25 pg/ml und 50 μ l Standard bzw. unverdünnte Probe pro Ansatz in je zwei Ansätze (Doppelbestimmung) pipettiert. Nach 1 h Inkubation bei Raumtemperatur wurden 50 μ l Detection-Antikörper (200 ng biotinylierter Anti-IL-4/ml PTB) pro Ansatz zugegeben und eine weitere Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Platte analog zur Bestimmung der IL-2-Konzentration mit Streptavidin-HRP, Peroxidase-Substrat und -Lösung und H_2SO_4 behandelt und am Microplate-Reader gemessen. Waschschritte erfolgten allerdings weiterhin nur 3-fach.

TNF- α -ELISA Die Konzentration von TNF- α wurde mit Hilfe eines kommerziellen Testkits nach Herstellerangaben bestimmt, die Proben wurden beim Auftragen auf die Mikrotiterplatte 1:20 mit Komplettmedium verdünnt.

4.2.7 Inhibierungsversuche mit Antiöstrogenen

Testprinzip PBMC wurden unter Mitogenaktivierung mit den PÖ Genistein bzw. Equol und den Antiöstrogenen Tamoxifen bzw. Fulvestrant im gleichen Ansatz inkubiert. Anschließend wurde die Zytokinkonzentration im Zellkultur-Überstand durch kolorimetrischen ELISA bestimmt.

Testansatz Die 20 mM PÖ-Stammlösungen wurden mit Komplettmedium und DMSO auf 200 μM (0,4 % DMSO) verdünnt, Tamoxifen und Fulvestrant auf $4 \cdot 10^{-7}$ M (0,4 % DMSO). Die Endkonzentration von DMSO im Ansatz betrug 0,2 %. In die Vertiefungen einer 96-Loch-Mikrotiterplatte wurden für die Stimulation der Zytokinproduktion folgende Volumina PBMC-Suspension ($2 \cdot 10^6$ Zellen/ml) pipettiert: IFN- γ : 4 x 50 μl ; IL-2, IL-4 und TNF- α : je 2 x 50 μl . 0,4 % DMSO in Komplettmedium, PÖ und Antiöstrogene wurden nach dem Pipettierschema in Tab. 4.4 zugegeben. Für die Stimulierung der IFN- γ -, IL-2 und IL-4-Produktion wurde Con A 1:50 in Komplettmedium verdünnt (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), die TNF- α -Produktion wurde mit $1:10^6$ verdünntem LPS (40 ng/ml) stimuliert. Je 50 μl dieser Lösungen wurden zu den Zellen gegeben (Endkonzentrationen von 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Con A und 10 ng/ml LPS). Nach 24 h Inkubation im Brutschrank wurden die Platten bei 300 g und 20°C 10 min zentrifugiert, 130 μl des Überstands abgenommen, die vier bzw. zwei Überstände jedes Zytokins in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß vereinigt und bis zur Durchführung des ELISA bei -20°C gelagert.

Tabelle 4.4: Pipettierschema für Inhibierungsversuche

Ansatz	PBMC	0,4 % DMSO	Tam	Ful	Gen	Eq	Mitogen
DMSO-Kontrolle	50 μl	100 μl	-	-	-	-	50 μl
Tamoxifen	50 μl	50 μl	50 μl	-	-	-	50 μl
Fulvestrant	50 μl	50 μl	-	50 μl	-	-	50 μl
Genistein	50 μl	50 μl	-	-	50 μl	-	50 μl
Equol	50 μl	50 μl	-	-	-	50 μl	50 μl
Gen + Tam	50 μl	-	50 μl	-	50 μl	-	50 μl
Eq + Tam	50 μl	-	50 μl	-	-	50 μl	50 μl
Gen + Ful	50 μl	-	-	50 μl	50 μl	-	50 μl
Eq + Ful	50 μl	-	-	50 μl	-	50 μl	50 μl

Messung und Auswertung Die Konzentration der im Überstand vorhandenen Zytokine wurde wie im Abschnitt 4.2.6 beschrieben bestimmt.

4.3 Experimente mit Milzzellen der Maus

4.3.1 Studiendesign

Zur Ermittlung der präventiven Wirkung von Isoflavonen auf Brustkrebs wurde vom dänischen Projektpartner, dem Dänischen Institut für Lebensmittel- und Veterinärforschung (Danmarks Fødevareforskning) in Kopenhagen eine Studie mit Tg.NK Mäusen durchgeführt. Dieser transgene Mäusestamm trägt das c-neu Onkogen, das mittels MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus) im Milchdrüsengewebe exprimiert wird und zu multiplen Adenokarzinomen in allen Milchdrüsen führt [Muller et al. 1988]. Vier Gruppen weiblicher Mäuse erhielten ab dem 25. Lebenstag ein fettreiches und ballaststoffarmes Futter und zusätzlich das Sojaproteinisolat Prevastein in unterschiedlicher Konzentration (0, 18, 90, 270 mg/kg Futter). Prevastein enthält als Hauptkomponenten 29 % Kohlenhydrate, 17,6 % Protein und 46 % Isoflavone, davon 66,5 % Genistein, 32,3 % Daidzein und 1,2 % Glycitein. Im Alter von 10 bzw. 28 Wochen wurden die Tiere seziert, die Milchdrüsen histologisch untersucht und 22 bzw. 60 Milzen in Kompletmedium gekühlt über Nacht an die Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel in Karlsruhe geschickt. Dort wurden aus den Milzen Lymphozyten isoliert, mit denen folgende Tests durchgeführt wurden: Zytotoxische Aktivität der Natürlichen Killerzellen, phagozytische Aktivität der Granulozyten und Monozyten und mitogen-aktivierte Proliferation und Zytokinproduktion.

4.3.2 Isolierung von Lymphozyten aus der Milz

Vor Beginn der Isolierung wurden alle Lösungen auf Raumtemperatur vorgewärmt. Jede Milz wurde einzeln in einer Petrischale mit Hilfe zweier Pinzetten zerrieben. Anschließend wurden die Lymphozyten mit Hilfe von Kompletmedium mittels einer Pasteurpipette in einen mit Siebgewebe (Maschenweite 100 μm) abgeschlossenen und mit Watte gestopften Spritzenkolben zur Filtration überführt. Das Filtrat mit den Lymphozyten wurde in einem 15 ml-Falconröhrchen aufgefangen und Watte und Spritzenkolben mit Kompletmedium bis zum Auffüllen des Falconröhrchens gespült. Es folgte eine 10-minütige Zentrifugation des Röhrchens bei 200 g und 4°C.

Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 5 ml ACK-Lysepuffer resuspendiert. Nach 5-minütiger Lyse der Erythrozyten bei Raumtemperatur und mit gelegentlichem Schütteln wurde die Suspension mit Kompletmedium auf 15 ml aufgefüllt und wiederum unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die Lymphozyten wurden ein weiteres Mal mit Kompletmedium gewaschen und anschließend in 5 ml Medium suspendiert.

Zum Bestimmen der Zellzahl wurden 10 μ l Suspension mit 190 μ l Trypanblau gemischt und unter dem Mikroskop ausgezählt. Anschließend wurde die Suspension auf 10^7 Zellen/ml eingestellt.

4.3.3 Mitogen-aktivierte Proliferation

Testprinzip Nach Inkubation mit dem Mitogen Concanavalin A wird die proliferative Reaktion der eingesetzten Zellen mittels des in Abschnitt 4.1.2 auf Seite 43 beschriebenen BrdU-ELISA bestimmt.

Testansatz Aus den Lymphozyten wurde eine Verdünnung mit $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml hergestellt und je 100 μ l dieser Suspension in 4 Vertiefungen (Dreifachbestimmung mit Kontrolle) einer sterilen 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert, deren Randwells mit PBS gefüllt waren. Con A wurde 1:100 in Kompletmedium verdünnt (10 μ g/ml) und je 100 μ l dieser Lösung zu den Zellen gegeben (5 μ g/ml Endkonzentration). Nach fünftägiger Inkubation im Brutschrank wurde die Zellproliferation mittels BrdU-ELISA nach Herstellerangaben bestimmt.

Messung und Auswertung wurden analog zur Messung der Proliferation der Jurkat-Zellen am Microplate-Reader vorgenommen (s. Abschnitt 4.1.2 auf Seite 44)

4.3.4 Aktivität Natürlicher Killerzellen

Testprinzip Die NK-Aktivität wurde wie im Abschnitt 4.2.5 auf Seite 50 beschrieben mittels Kokultivierung der Milzzellen mit einer Zielzelllinie ermittelt.

Färben der Zielzellen Als Zielzellen zur Bestimmung der zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen der Maus diente die Zelllinie YAC-1. Die Färbung wurde analog zum Färben der K562 (Abschnitt 4.2.5) durchgeführt.

Testansatz Mit den Lymphozyten wurde eine Verdünnung von $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml hergestellt. In FACS-Röhrchen wurden in dieser Reihenfolge Komplettmedium, Effektorzellen, PI-Lösung und Zielzellen nach unten aufgeführtem Schema pipettiert. Die Ansätze wurden kurz auf dem Vortex geschüttelt, 2,5 min bei 120 g und 20°C zentrifugiert und anschließend 2 h 15 min im Brutschrank inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Röhrchen auf Eis gestellt, bis zur Messung lichtgeschützt auf Eis gelagert und direkt vor dem Messen auf dem Vortex gemischt.

Tabelle 4.5: Pipettierschema für die Ansätze zur Messung der NK-Aktivität der Maus

Verhältnis Effektor:Zielzelle	Medium	Effektorzellen	PI	Zielzellen
Kontrolle	300 μ l	-	30 μ l	300 μ l
25:1	-	300 μ l	30 μ l	300 μ l

Messung und Auswertung wurden ebenfalls analog zum im Abschnitt 4.2.5 auf Seite 51 beschriebenen Verfahren am Durchflusszytometer durchgeführt.

4.3.5 Phagozytische Aktivität der Granulozyten und Monozyten

Testprinzip Fluoreszenzmarkierte und opsonierte *E.coli* werden im Testansatz von Granulozyten und Monozyten phagozytiert. Bei der durchflusszytometrischen Messung können Granulozyten und Monozyten auf Grund ihrer Streulichteigenschaften abgegrenzt werden. Der Anteil der Zellen mit Phagozytoseaktivität sowie die Intensität dieser Aktivität ist dadurch bestimmt, dass die *E.coli* im Inneren der Phagozyten ein Fluoreszenzsignal abgeben.

Opsonierung der E.coli 10 mg *E.coli* ($3 \cdot 10^9$ Partikel) wurden möglichst lichtgeschützt in 500 μ l sterilem PBS (ohne Ca/Mg) gelöst, gut gevortext und im Ultraschallbad noch vorhandene Aggregate vereinzelt. Das opsonierende Reagenz wurde in 500 μ l sterilem H_2O_{bidest} gelöst, mit den *E.coli* auf dem Vortex gut gemischt und anschließend bei 37°C im Wasserbad 1 h im Dunkeln inkubiert. Die nun opsonierten *E.coli* wurden in ein 15 ml-Röhrchen überführt, mit PBS auf ca. 14 ml aufgefüllt und 15 min bei 800 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und

der Waschvorgang noch zweimal wiederholt. Danach wurden die *E.coli* in 3 ml PBS resuspendiert (10^9 Partikel/ml), auf dem Vortex gemischt und so lange ins Ultraschallbad gestellt, bis keine Aggregate mehr vorhanden waren. Dies wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Die Suspension wurde anschließend in 30 μ l-Portionen aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Testansatz 100 μ l der Stammsuspension mit 10^7 Zellen/ml wurden in einem FACS-Röhrchen mindestens 10 min auf Eis gekühlt. Oponierte und vorgekühlte *E.coli* (10^9 /ml) wurden 1:2 mit PBS verdünnt und 5 μ l der Verdünnung zu den gekühlten Zellen gegeben. Der Ansatz auf dem Vortex gemischt, 10 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert und anschließend sofort wieder auf Eis gestellt. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 100 μ l eiskalte Quenclösung mit dem Ansatz vermischt und sofort danach 3 ml PBS zugegeben. Es folgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 250 g und 4°C und nach Absaugen des Überstands ein abermaliger Waschschritt. Die Zellen wurden fixiert durch 20-minütige Inkubation mit 2 ml FACS Lysing Solution (1:10 verdünnt mit $\text{H}_2\text{O}_{bidest}$ und vorgewärmt auf Raumtemperatur) im Dunkeln. Nach Zentrifugation (5 min, 250 g, 4°C) und Absaugen des Überstands wurde der Ansatz wiederum mit 3 ml PBS gewaschen und anschließend auf Eis lichtgeschützt gelagert. Zur Abgrenzung von Debris wurden die Zellen mit 300 μ l PI-Lösung versetzt, 10 min auf Eis im Dunkeln inkubiert und innerhalb von 30 min am Durchflusszytometer gemessen.

Messung und Auswertung Im Dotplot der Detektoren für SSC und FSC wurde je ein Gate auf Monozyten und Granulozyten gesetzt und ein FL-1-Histogramm für jede Zellart geöffnet. Mit Hilfe der Histogramme konnte der Anteil der Zellen mit Phagozytoseaktivität bestimmt werden und aus der Histogrammstatistik die mittlere Fluoreszenzintensität der Zellen abgelesen werden, was der Anzahl der pro Zelle aufgenommenen Bakterien entspricht.

4.3.6 Mitogen-aktivierte Zytokinproduktion

Testprinzip Nach Induktion der Produktion bzw. Sekretion von $\text{IFN-}\gamma$ und IL-2 durch Con A und von $\text{TNF-}\alpha$ durch LPS kann die Zytokinkonzentration im Zellkultur-Überstand durch kolorimetrischen ELISA bestimmt werden.

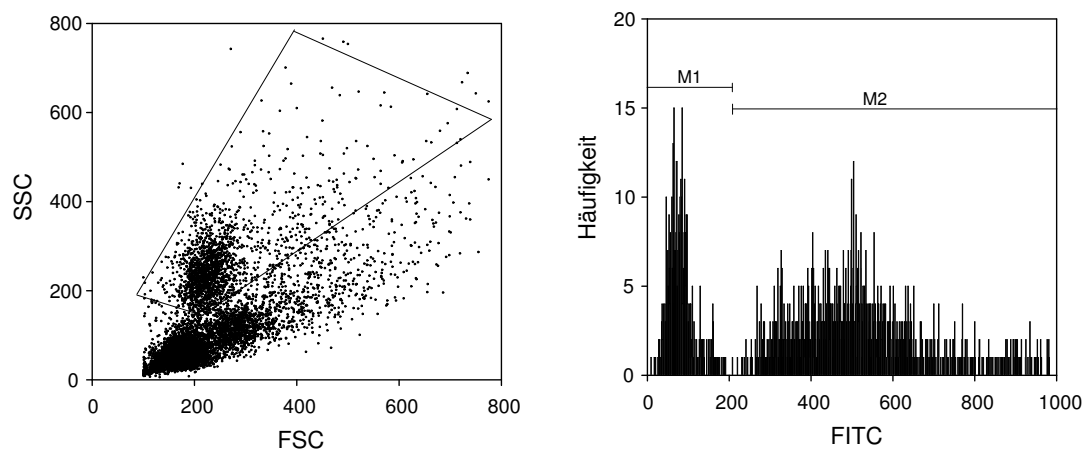


Abbildung 4.4: Messung der Phagozytoseaktivität von Granulozyten. Im Streudiagramm wird die Population der Granulozyten in einem Gate eingegrenzt und im Histogramm abhängig von der Fluoreszenzintensität dargestellt. Unter dem Marker M2 sind Zellen mit phagozytierten *E.coli* erfasst.

Testansatz In die Vertiefungen einer 96-Loch-Mikrotiterplatte wurden für die Bestimmung jedes Zytokins je 4 x 100 μl der Stammsuspension (10^7 Zellen/ml) pipetiert. Für die Stimulierung der IFN- γ - und IL-2-Produktion wurde Con A 1:100 in Komplettmedium verdünnt (10 $\mu\text{g/ml}$), die TNF- α -Produktion wurde mit 1:500000 verdünntem LPS (20 ng/ml) stimuliert. Je 100 μl dieser Lösungen wurden zu den Zellen gegeben (Endkonzentrationen von 5 $\mu\text{g/ml}$ Con A und 10 ng/ml LPS). Nach 24 h Inkubation im Brutschrank wurden die Platten bei 300 g und 20°C 10 min zentrifugiert, 130 μl des Überstands abgenommen, die vier Überstände jedes Zytokins in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß vereinigt und bis zur Messung bei -20°C gelagert.

Messung und Auswertung Die Konzentrationen von IFN- γ , IL-2 und TNF- α wurde mit einem kommerziellen ELISA-Testkit nach Herstellerangaben kolorimetrisch bestimmt.

4.4 Humanstudie

4.4.1 Studiendesign

Die Humanstudie wurde beim britischen Projektpartner BIBRA International in Carshalton, Surrey, GB, durchgeführt. Gesunde männliche Probanden wurden ei-

nem Screening unterworfen und verzehrten sieben Tage lang zusätzlich zu ihrer üblichen Ernährung PÖ-reiche Lebensmittel in Form von Sojaprodukten und einem Roggen-Leinsaat-Brot (ca. 40 mg Isoflavone bzw. Lignane/Tag). Danach wurde im Urin die Konzentration von Equol und Enterolacton bestimmt und die Männer einer „Isoflavongruppe“ (n=21) oder einer „Lignangruppe“ (n=18) in der Weise zugeteilt, dass in jeder Gruppe Probanden mit niedriger und hoher Equol- bzw. Enterolactonausscheidung vorhanden waren.

Während der Interventionsphase verzehrten die Probanden 18 Tage lang Sojaprodukte (Isoflavongruppe) oder Roggen-Leinsaat-Brot (Lignangruppe) zusätzlich zu ihrer üblichen Ernährung. Zwischen dem 19. und 21. Tag erhielten alle Probanden einer Gruppe die gleiche phytoöstrogenreiche Ernährung. Vor und nach der Intervention wurde 24-h-Urin gesammelt und Nüchternblut abgenommen. Letzteres wurde über Nacht an die Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel in Karlsruhe verschickt, um daraus mononukleäre Zellen zu isolieren. Diese Zellen wurden folgenden Tests unterworfen: Prozentualer Anteil bestimmter Lymphozytensubpopulationen, zytotoxische Aktivität der Natürlichen Killerzellen und mitogen-aktivierte Proliferation und Zytokinproduktion.

Am Folkhälsan Forschungszentrum der Universität Helsinki wurden neben der renalen Ausscheidung endogener Östrogene und ihrer Abbauprodukte die Konzentrationen der PÖ und ihrer Metabolite im Urin und die Konzentration von Equol und Enterolacton im Plasma bestimmt.

4.4.2 Lymphozytensubpopulationen

Testprinzip Die verschiedenen Zellpopulationen des Blutes sind unter anderem durch die Exprimierung bestimmter Oberflächenmarker, sogenannte CD-Marker (CD = Cluster of Differentiation) charakterisiert. Werden fluoreszenzmarkierte Antikörper für die spezifischen Marker der zu untersuchenden Zellarten eingesetzt, können am Durchflusszytometer die Populationen voneinander unterschieden werden.

Testansatz Aus jedem Blutröhrchen wurden je 100 μ l Vollblut in zwei FACS-Röhrchen (Probe und Isotypkontrolle) pipettiert und lichtgeschützt auf Eis gestellt. Zur Probe wurden je 5 μ l des jeweiligen fluoreszenzmarkierten CD-Markers gegeben, zur Isotypkontrolle je 5 μ l der entsprechenden Antikörper-Isotypen. Die analysierten Markerkombinationen sind aus Tabelle 4.6 ersichtlich.

Tabelle 4.6: Kombinationen der analysierten CD-Marker

Markerkombination	Subpopulationen
CD3 CD4 CD8	Anteil der T-Helfer-Zellen ($CD3^+CD4^+$) und der cytotoxischen T-Zellen ($CD3^+CD8^+$)
CD3 CD56	Anteil der natürlichen Killerzellen ($CD3^-CD56^+$)

Die Röhrchen wurden auf dem Vortex geschüttelt und bei Raumtemperatur lichtgeschützt 30 min inkubiert. Nach Zugabe von 2 ml FACS-Lysing Solution (1:10 mit H_2O_{bidest} verdünnt) wurden die Röhrchen wieder auf dem Vortex gemischt, 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und 5 min bei 250 g und 20°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet mit 2 ml Na-Azid-PBS-Lösung gewaschen. Nach abermaliger 5-minütiger Zentrifugation bei 250 g und 20°C und Absaugen des Überstands wurden zum Zellpellet 500 μ l 1 %ige Paraformaldehydlösung zugegeben und die Proben bis zur Messung maximal 24 h lichtgeschützt auf Eis gestellt.

Messung und Auswertung Am Durchflusszytometer wurde ein Live-Gate auf die Lymphozytenpopulation im Streulichtdiagramm FSC/SSC gesetzt und die Messung bei 10000 Ereignissen im Gate beendet.

T-Lymphozyten (CD3/CD4/CD8): Die Zellen im Gate wurden in einem FITC/PE- (s. Abb. 4.5) und einem FITC/Cy-Chrome-Punktdiagramm abgebildet. $CD3^+CD4^+$ - und $CD3^+CD8^+$ - Zellen befinden sich im oberen rechten Quadranten. Der prozentuale Anteil dieser Populationen in der Probe abzüglich des Anteils in der Isotypkontrolle stellt schließlich den Anteil der Subpopulation an der Gesamtpopulation dar.

NK-Zellen ($CD3^-CD56^+$): Die Zellen im Gate wurden in einem FL-1/FL-3-Punktdiagramm abgebildet. $CD3^-CD56^+$ -Zellen befinden sich im linken oberen Quadranten.

4.4.3 Mitogen-aktivierte Proliferation

Testprinzip Nach Inkubation mit dem Mitogen Concanavalin A wird die proliferative Reaktion der eingesetzten Zellen mittels des in Abschnitt 4.1.2 auf Seite 43 beschriebenen BrdU-ELISA bestimmt.

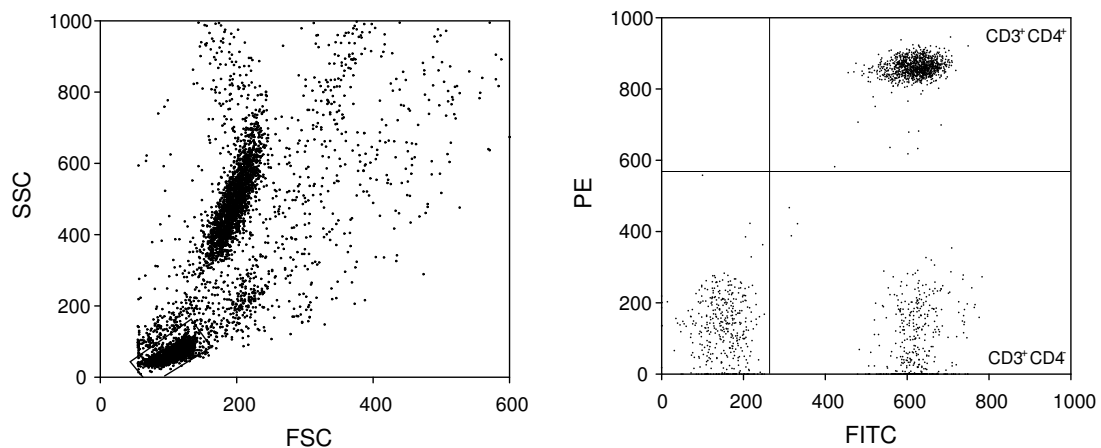


Abbildung 4.5: Messung des Anteils der T_h -Zellen. Im FSC/SSC-Streudiagramm wird die Population der Lymphozyten in einem Gate erfasst und im FITC/PE-Streudiagramm abgebildet. Im Quadranten oben rechts wird die $CD3^+CD4^+$ doppelt markierte T_h -Population dargestellt.

Testansatz Je 100 μl einer Zellsuspension mit 10^6 Zellen/ml wurden in 4 Vertiefungen (Dreifachbestimmung mit Kontrolle) einer sterilen 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert, deren Randwells mit PBS gefüllt waren. Con A wurde 1:100 in Komplettmedium verdünnt (10 $\mu\text{g/ml}$) und je 100 μl dieser Lösung zu den Zellen gegeben (5 $\mu\text{g/ml}$ Endkonzentration). Nach fünftägiger Inkubation im Brutschrank wurde die Zellproliferation mittels BrdU-ELISA nach Herstellerangaben bestimmt.

Messung und Auswertung wurden analog zur Messung der Proliferation der Jurkat-Zellen am Microplate-Reader vorgenommen (s. Abschnitt 4.1.2 auf Seite 44).

4.4.4 Zytotoxische Aktivität Natürlicher Killerzellen

Die zytotoxische Aktivität natürlicher Killerzellen wurde nach dem im Abschnitt 4.2.5 auf Seite 50 beschriebenen Prinzip und Testansatz mit der Zelllinie K562 als Zielzellen bestimmt.

4.4.5 Mitogen-aktivierte Zytokinproduktion

Testprinzip Nach Induktion der Produktion bzw. Sekretion von $\text{IFN-}\gamma$, IL-2 und IL-4 durch Con A und von $\text{TNF-}\alpha$ durch LPS kann die Zytokinkonzentration im Zellkultur-Überstand durch kolorimetrischen ELISA bestimmt werden.

Testansatz In die Vertiefungen einer 96-Loch-Mikrotiterplatte wurden für die Stimulation der Zytokinproduktion folgende Volumina PBMC-Suspension ($2 \cdot 10^6$ Zellen/ml) pipettiert: IFN- γ : 4 x 100 μ l; IL-2, IL-4 und TNF- α : je 2 x 100 μ l. Für die Stimulierung der IFN- γ -, IL-2- und IL-4-Produktion wurde Con A 1:100 in Komplettmedium verdünnt (10 μ g/ml), die TNF- α -Produktion wurde mit 1:500000 verdünntem LPS (20 ng/ml) stimuliert. Je 100 μ l dieser Lösungen wurden zu den Zellen gegeben (Endkonzentrationen von 5 μ g/ml Con A und 10 ng/ml LPS). Nach 24 h Inkubation im Brutschrank wurden die Platten bei 300 g und 20°C 10 min zentrifugiert, 130 μ l des Überstands abgenommen, die vier bzw. zwei Überstände jedes Zytokins in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß vereinigt und bis zur Messung bei -20°C gelagert.

Messung und Auswertung Die Durchführung der ELISA ist im Abschnitt 4.2.6 auf Seite 53 beschrieben.

4.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit der Software StatView (Version 5, SAS Institute, Cary, NC, USA) durchgeführt. Die Normalverteilung der Messwerte wurde mit dem Kolmogoroff-Smirnoff-Test überprüft, Unterschiede zwischen den Gruppen mit Varianzanalyse (One-way ANOVA) und den Post-Hoc-Tests Dunnet (Einfluss verschiedener PÖ-Konzentrationen auf Jurkat-Zellen und PBMC; Mäusestudie) und Tukey-Kramer (Inhibierungsversuche mit Antiöstrogenen).

Bei der Auswertung der In vitro-Experimente wurden die PÖ-Ansätze mit der jeweils parallel angesetzten DMSO-Kontrolle verglichen, um Lösungsmittelleffekte, Tagesschwankungen der Zellvitalität und interindividuelle Unterschiede zu korrigieren. Dazu wurde der Wert der DMSO-Kontrolle für die statistische Analyse gleich 100 % gesetzt. Im Vergleich dazu höhere bzw. niedrigere Werte ergaben sich dann als größer oder kleiner 100 %. In den Abbildungen stellt die DMSO-Kontrolle die Abszisse dar, die Werte der PÖ werden als positive bzw. negative prozentuale Abweichung dargestellt. Abgebildet sind, wie bei den Daten der Mäusestudie, das arithmetische Mittel und der Standardfehler des Mittelwerts.

Zur Auswertung der Humanstudie wurden nur die Werte der zweiten Blutentnahme, d.h. nach der Intervention, herangezogen und mit Hilfe des Spearman Rangkorrelationstests mit der Ausscheidung von PÖ und Metaboliten im 24-h-Urin korreliert.

Die Substanzen, mit denen der Test durchgeführt wurde, waren die gleichen wie die in den In vitro-Tests verwendeten: Daidzein, Genistein, Equol, O-DMA, Secoisolariciresinol, Matairesinol, Enterodiol und Enterolacton. Als statistisch bedeutsam wurde ein Rangkorrelationskoeffizient Rho von über 0,4 kombiniert mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ betrachtet und Korrelationspaare, die diesen Bedingungen genügten, wurden einer linearen Regression unterzogen. Ein Korrelationskoeffizient von $> 0,2$ kombiniert mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurde als relevant angesehen.

5 Ergebnisse

5.1 In vitro-Experimente mit Jurkat

Das zur Lösung der Phytoöstrogene (PÖ) verwendete DMSO war in einer Konzentration von 0,3 % in den Testansätzen vorhanden. Es verringerte die Proliferation der Jurkat-Zellen um 7 %. Zellvitalität, Apoptose- und Nekroserate wurden nicht beeinflusst. Die im folgenden dargestellten PÖ-Effekte wurden immer auf den Lösungsmittel-Kontrollwert bezogen, wodurch Lösungsmittelleffekte rechnerisch nicht miterfasst wurden.

5.1.1 Proliferation und Zellvitalität

Genistein (*Gen*) hemmte die Proliferation fast vollständig bei einer Konzentration von 100 μM (10^{-4} M). Die Proliferationsveränderungen der restlichen untersuchten *Gen*-Konzentrationen erwiesen sich als nicht signifikant. Auch die Zellvitalität war bei 100 μM *Gen* um 24 % verringert.

Daidzein (*Dai*) führte in einer Konzentration von 100 μM zu einer geringen, jedoch statistisch signifikanten Abnahme der Zellvitalität um 1 %, die übrigen Konzentrationen bewirkten keine signifikante Veränderung und hatten keinen Einfluss auf die Proliferationsrate.

Equol (*Eq*) beeinflusste weder die Proliferationsrate noch die Zellvitalität.

O-Desmethylangolensin (*DMA*) in einer Konzentration von 100 μM führte zu einer Abnahme der Proliferation um 27 %, die Vitalität der Zellen blieb unbeeinflusst.

Unter den Lignanenen bewirkten nur Matairesinol (*Mat*) und Enterolacton (*Enl*) eine Veränderung der Zellvitalität. 100 μM verringerten die Vitalität um 1,1 % bzw. 0,4 %. Die Proliferationsrate blieb durch diese wie auch durch die übrigen Lignane unbeeinflusst.

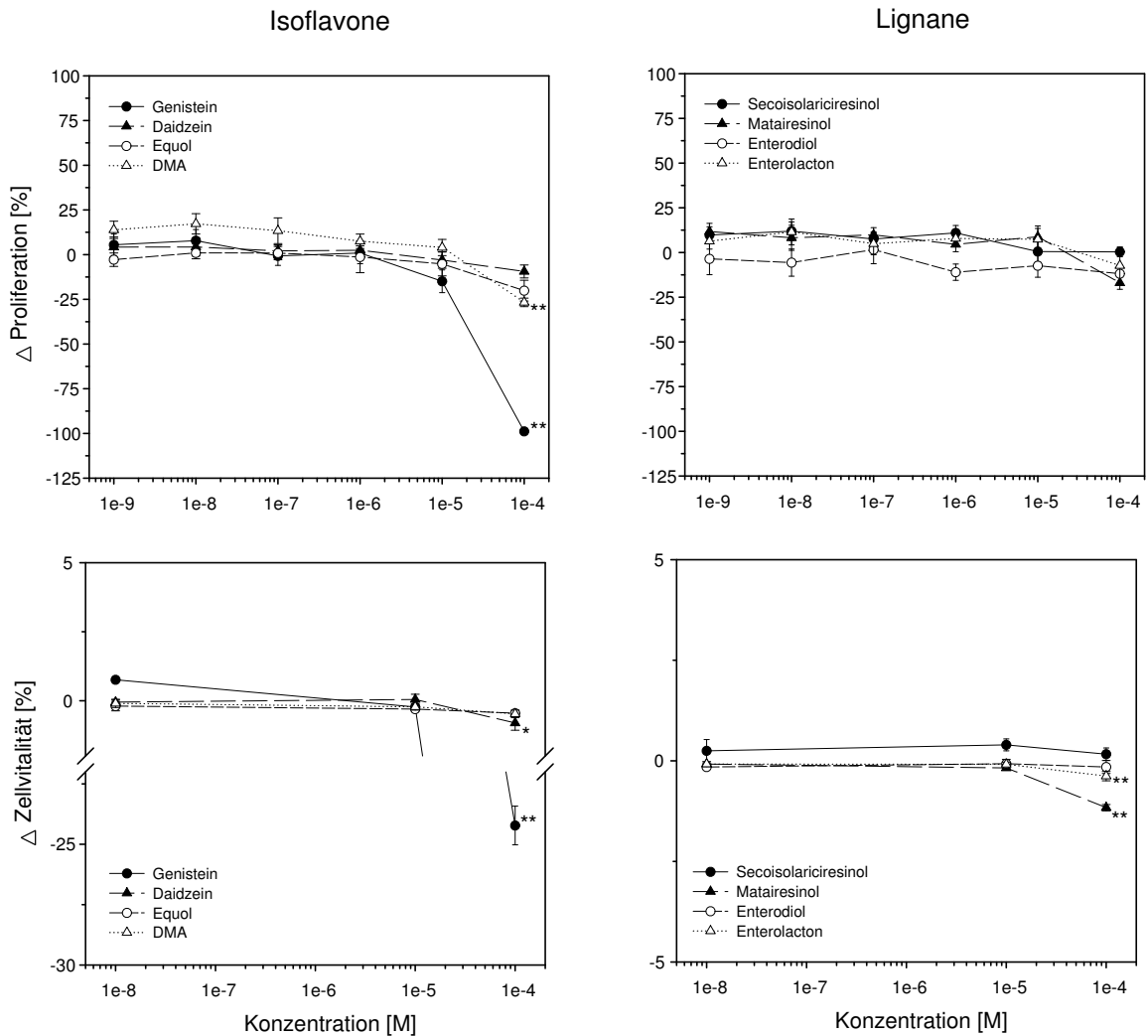


Abbildung 5.1: Relative Veränderung der Proliferationsrate und Zellvitalität von Jurkat-Zellen nach Inkubation mit Phytoöstrogenen.
 $n > 5$. * $p < 0,05$

Die biologische Relevanz der zwar statistisch signifikanten, jedoch sehr geringen Veränderungen der Zellvitalität durch *Dai*, *Mat* und *Enl* ist fraglich und wird im Abschnitt 6.1.2 auf Seite 87 genauer diskutiert.

5.1.2 Apoptose und Nekrose

Die Jurkat-Zellen wurden mit dem Apoptoseinduktor Staurosporin inkubiert, um anhand dieser Positivkontrolle die Ergebnisse der PÖ-induzierten Apoptose einordnen und bewerten zu können. Nach 24 h waren 41 % der Zellen apoptotisch (11-faches der DMSO-Kontrolle) und 29 % der Zellen nekrotisch (16-faches der DMSO-Kontrolle).

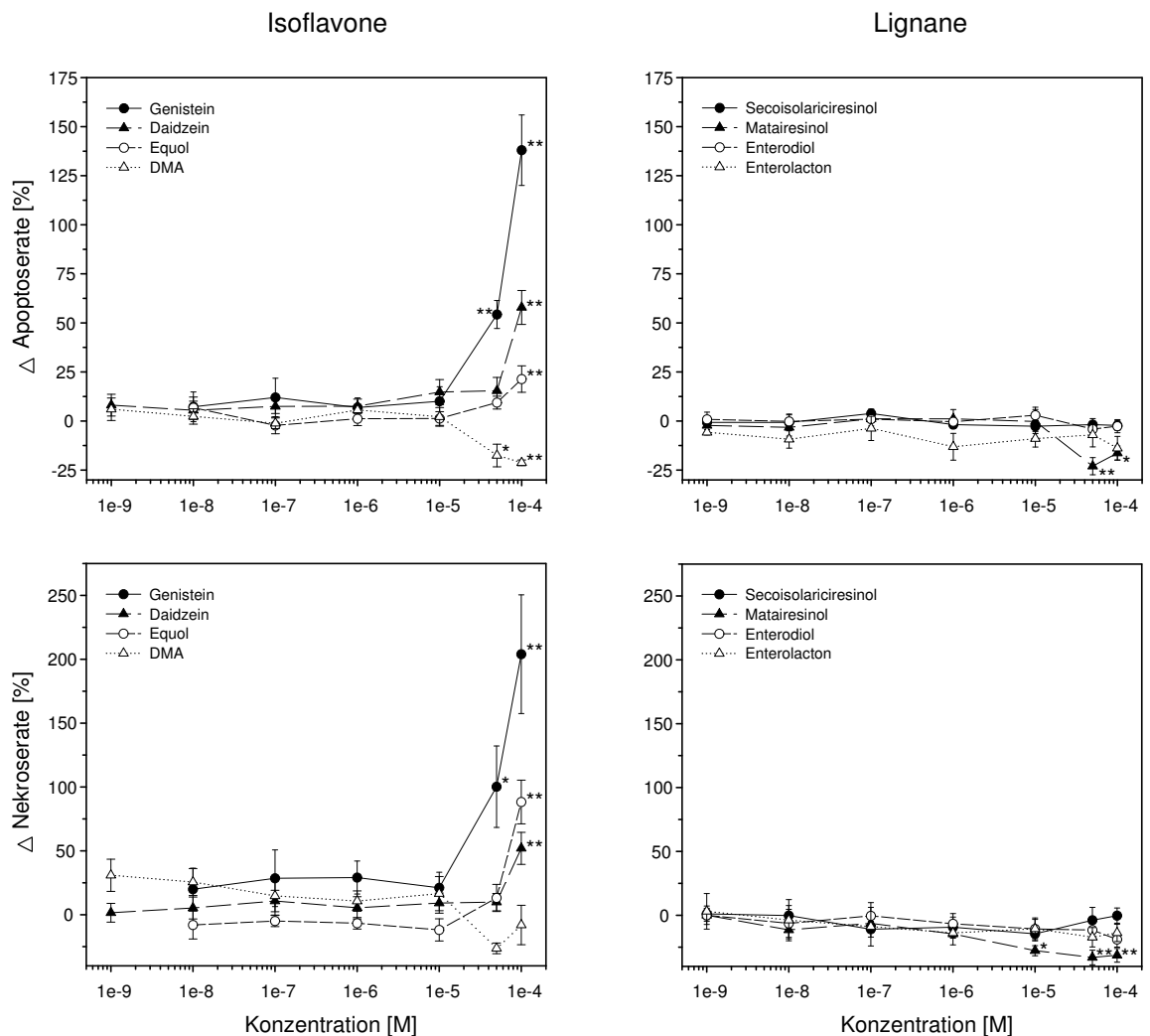


Abbildung 5.2: Relative Veränderung der Apoptose- und Nekroserate von Jurkat-Zellen nach Inkubation mit Phytoöstrogenen.

n>5. *p<0,05; **p<0,01

Gen in Konzentrationen von 50 μM und 100 μM führte zu einer Zunahme der Apoptose von 54 % bzw. 138 %. Auch die Nekrose war um 100 % (50 μM) und 204 % (100 μM) gesteigert.

Dai führte zu einem weit schwächeren, aber noch immer ausgeprägten Anstieg der Apoptose, und zwar um 58 % bei einer Konzentration von 100 μM . Der Anteil nekrotischer Zellen war im 100 μM -Ansatz um 52 % gegenüber der Kontrolle erhöht.

Eq verursachte einen Anstieg der Apoptose um 21 % (100 μM) und der Nekrose um 88 % (100 μM) und bei *DMA*-Konzentrationen von 100 μM nahm die Apoptoserate um 21 % gegenüber der Kontrolle ab.

Mat verringerte die Rate der Apoptose um 23 % bei 50 μM und 16 % bei 100 μM , der Anteil nekrotischer Zellen sank um 33 % bei 50 μM und um 31 % bei 100 μM . Secoisolariciresinol (*Sec*), Enterodiol (*End*) und *Enl* hatten keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Rate der Apoptose und Nekrose bei Jurkat-Zellen.

5.2 In vitro-Experimente mit PBMC des Menschen

Zur Lösung der PÖ im Kompletmedium wurde DMSO verwendet, das in den Ansätzen in einer Endkonzentration von 0,2 % vorhanden war. Außer der zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen wurden alle Parameter dadurch beeinflusst. Die mitogen-aktivierte Proliferation war ohne DMSO im Inkubationsansatz um 10 % höher, die Apoptose- und Nekroserate um 13 % bzw. 5 %, die ex-vivo Produktion von IFN- γ , IL-2 und IL-4 um 13 %, 23 % bzw. 46 %, und die Produktion von TNF- α war um 12 % niedriger. Durch die Transformation der Werte aus den PÖ-Ansätzen auf die DMSO-Kontrolle als Basis wurden diese Unterschiede herausgerechnet.

5.2.1 Proliferation

Die mitogen-aktivierte Proliferation der Lymphozyten wurde durch *Gen* stark gehemmt. 10 μM (10^{-5} M) führten zu einer Reduktion um 39 %, 50 μM führten zu einer fast vollständigen Proliferationshemmung. *Dai* und *Mat* inhibierten die Proliferation jeweils um 41 % (Abb. 5.3).

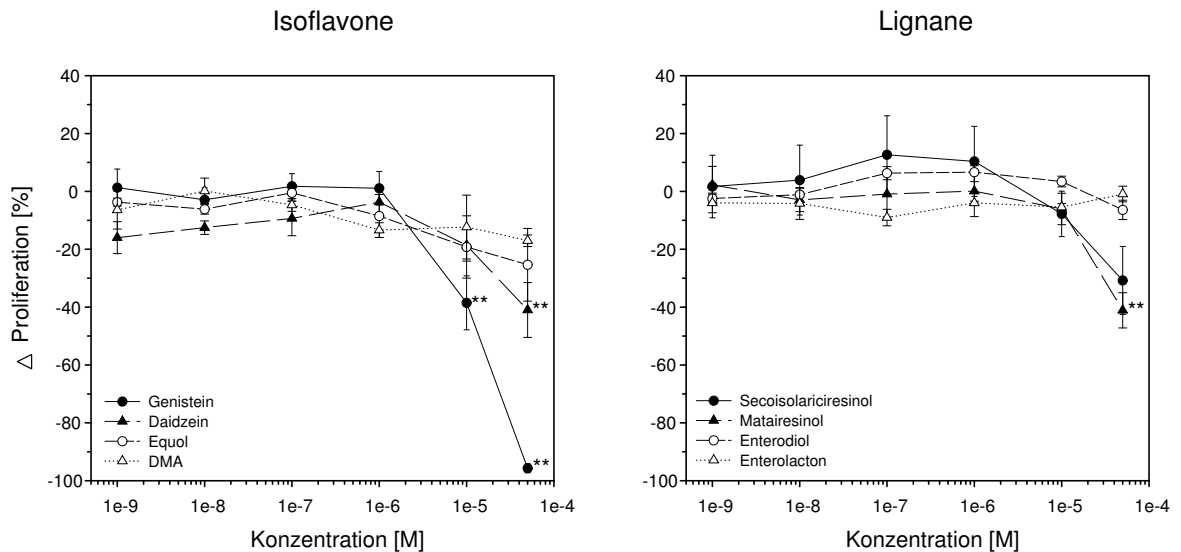


Abbildung 5.3: Relative Veränderung der Proliferation nach Inkubation von PBMC in vitro mit Phytoöstrogenen. n=4. *p<0,05 **p<0,01.

5.2.2 Apoptose und Nekrose

Keines der eingesetzten PÖ hatte in den untersuchten Konzentrationen signifikante Effekte auf die Rate der Apoptose. *Sec* beeinflusste als einziges PÖ die Nekroserate, wobei 50 μ M zu einer Erhöhung um 25 % führten (s. Abb. 5.4).

5.2.3 Zytotoxische Aktivität Natürlicher Killerzellen

50 μ M *Gen* bzw. *Dai* reduzierten die NK-Aktivität um 62 % bzw. 21 %, 10 μ M *Gen* bewirkte eine Inhibierung um 13 %. Die übrigen PÖ zeigten keine statistisch signifikante Wirkung auf die lytische Aktivität der Natürlichen Killerzellen (Abb. 5.5). Wurden die Leukozyten mit 100 IU IL-2/ml stimuliert, war die inhibierende Wirkung von *Gen* verringert. Lediglich in der Konzentration von 50 μ M war die lytische Aktivität der NK-Zellen um 26 % bzw. erniedrigt. Die mit 11 % geringer ausfallende Inhibierung durch 50 μ M Equol erreichte dagegen nach der Stimulation mit IL-2 statistische Signifikanz.

5.2.4 Zytokine

Gen und *Eq* erwiesen sich als die potentesten Inhibitoren der Zytokinproduktion (s. Abb. 5.6). *Gen* verringerte in einer Konzentration von 50 μ M die Sekretion von IFN-

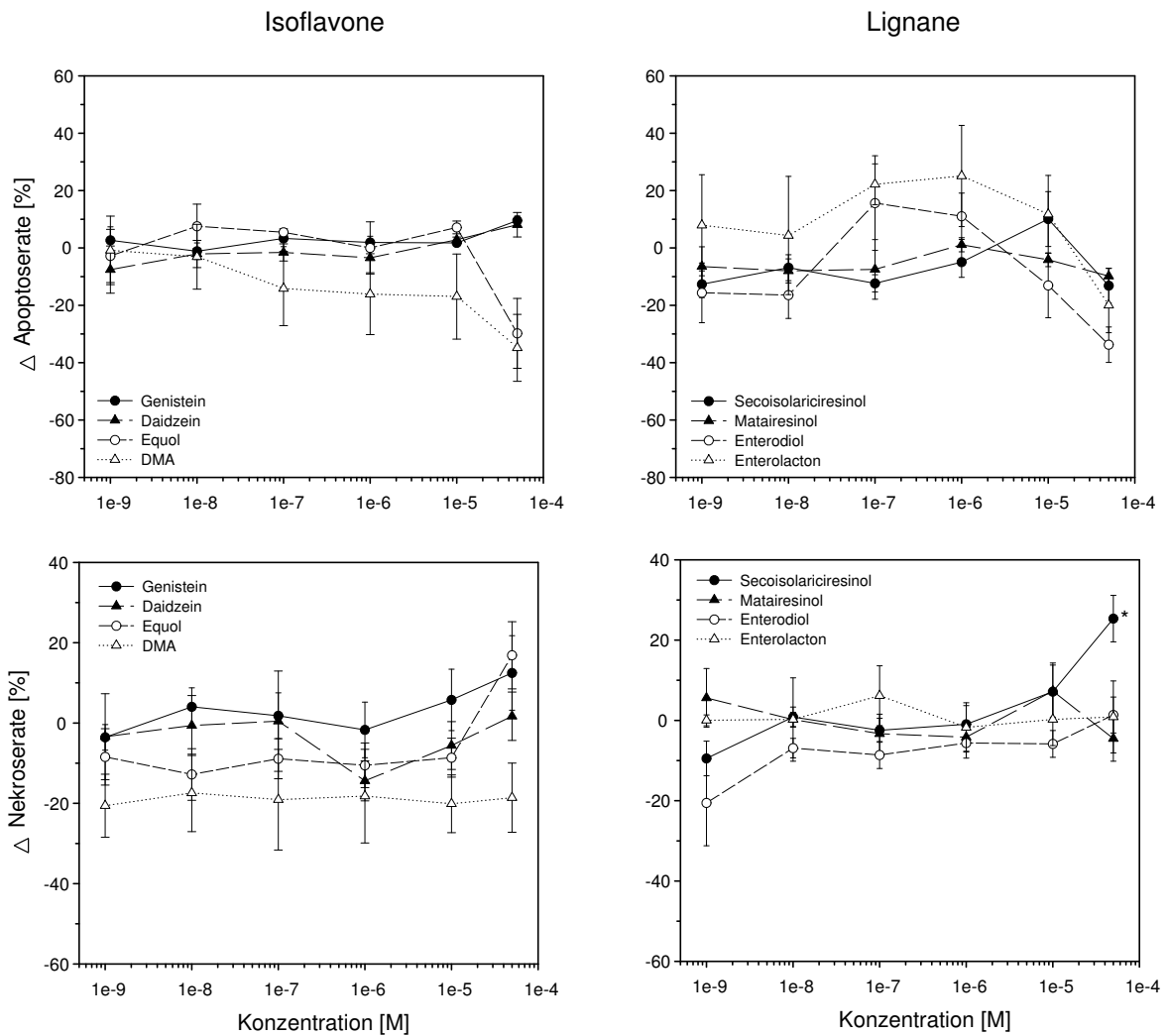


Abbildung 5.4: Relative Veränderung der Apoptose- und Nekroserate nach Inkubation von PBMC in vitro mit Phytoöstrogenen. $n > 3$. * $p < 0,05$.

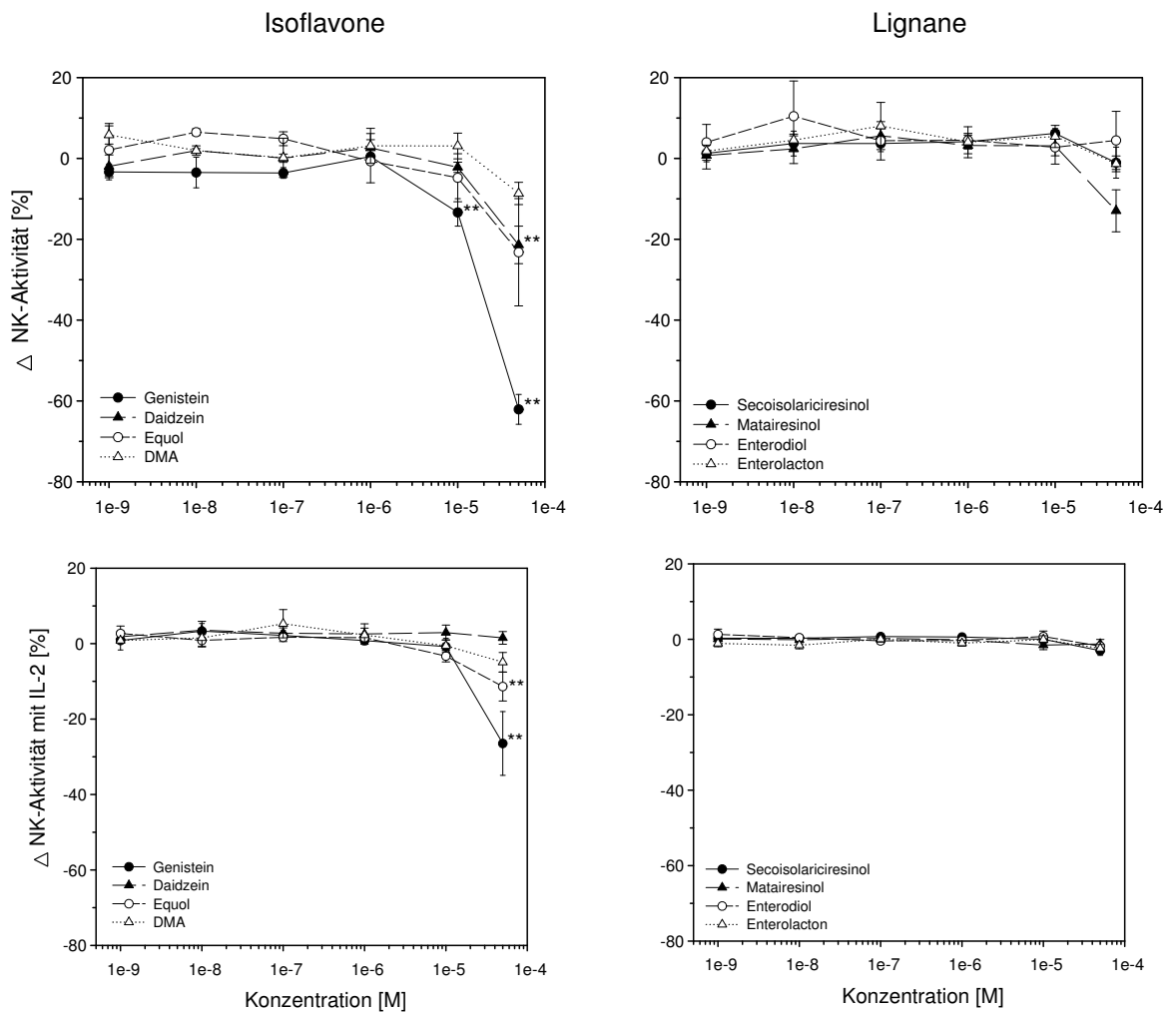


Abbildung 5.5: Relative Veränderung der NK-Aktivität nach Inkubation von PBMC in vitro mit Phytoöstrogenen (oben) und mit Phytoöstrogenen und 100 IU IL-2/ml (unten).
 $n > 3$. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$.

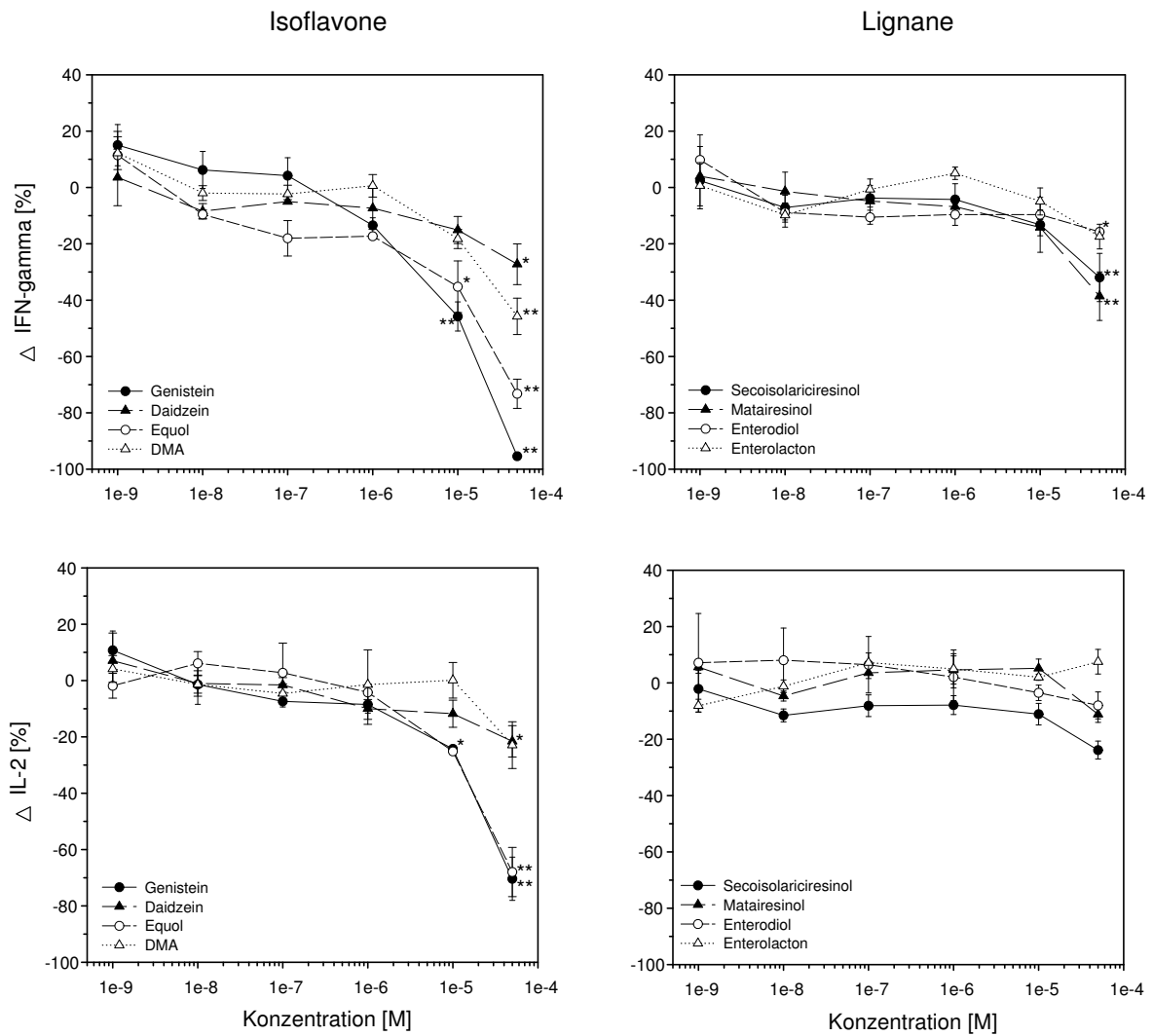


Abbildung 5.6: Relative Veränderung der Zytokinproduktion nach Inkubation von PBMC in vitro mit Phytoöstrogenen. n=4. *p<0,05 **p<0,01.

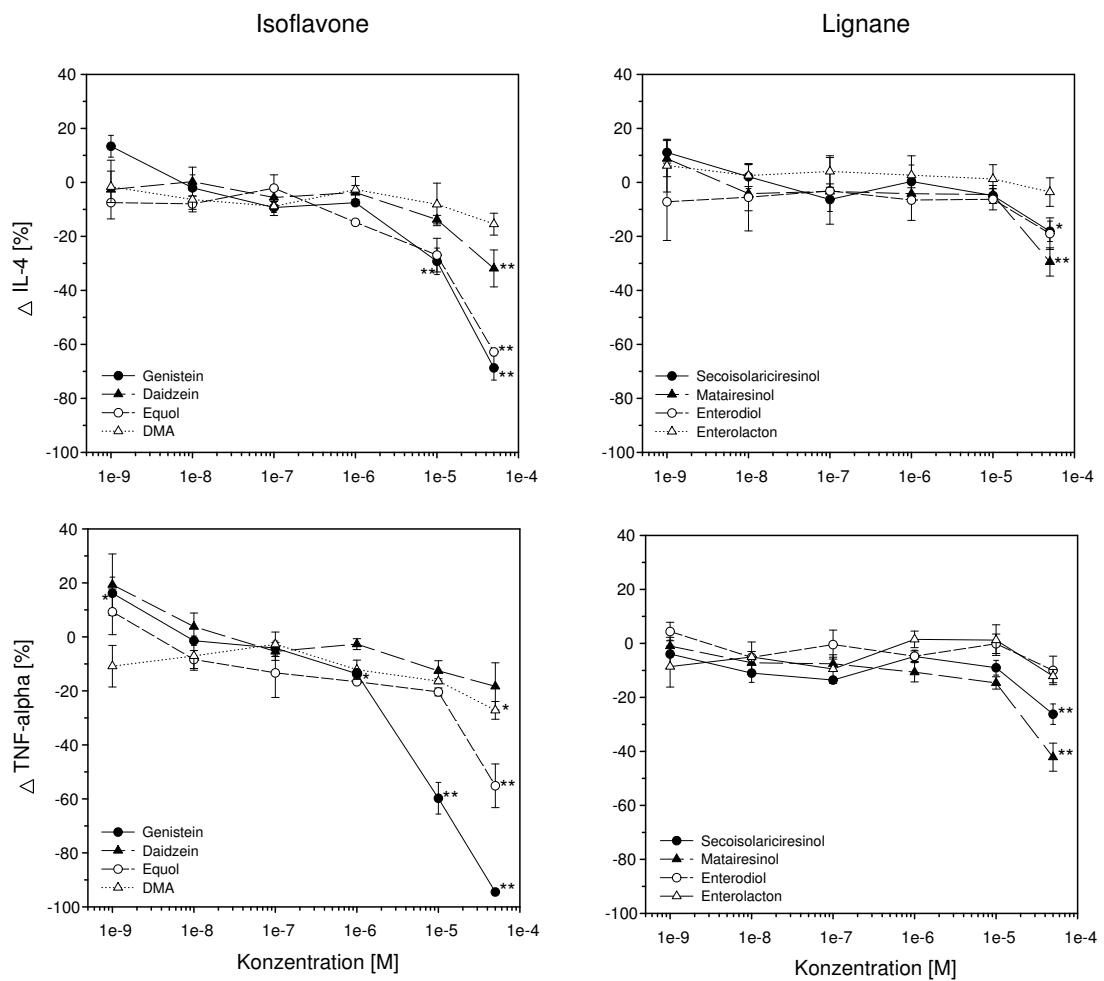


Abbildung 5.6: Relative Veränderung der Zytokinproduktion nach Inkubation von PBMC mit Phytoöstrogenen. n=4. *p<0,05 **p<0,01. (Fortsetzung)

γ und TNF- α um jeweils über 90 % sowie die Sekretion von IL-2 und IL-4 um je etwa 70 %. Bereits 10 $\mu\text{mol/l}$ in der Zellsuspension führten zu einer Reduktion um 24 % bis 60 %. Die TNF- α -Produktion der Monozyten reagierte besonders empfindlich auf *Gen*. 1 μM dieses PÖ erniedrigte sie um 14 % ($p < 0,05$) und 1 nM erhöhte sie um 16 % ($p < 0,05$). Die Inhibierung der Zytokinausschüttung durch *Eq* war etwas geringer als durch *Gen*.

50 μM *Dai* verringerte die Konzentration von IFN- γ , IL-2 und IL-4 um 27 %, 22 % bzw. 32 %, niedrigere Konzentrationen waren wirkungslos. 50 μM *DMA* senkten die Sekretion von TNF- α um 27 % und von IFN- γ um 46 %.

Die pflanzlichen Lignane *Mat* und *Sec* waren bezüglich der Zytokinproduktion wirkungsvoller als ihre Metabolite *End* und *Enl*. Die Konzentration von IFN- γ , IL-4 und TNF- α im Zellkulturüberstand war nach Inkubation mit 50 μM dieser Substanzen um 11 % bis 42 % geringer. Niedrigere Konzentrationen hatten keine Effekte. Inkubation mit *Enl* bewirkte keine Änderung der Zytokinausschüttung, während 50 μM *End* die Sekretion von IFN- γ um 16 % senkte.

5.2.5 Inhibierungsversuche mit Antiöstrogenen

Mit dem Einsatz der Antiöstrogene Fulvestrant und Tamoxifen sollte geklärt werden, inwieweit die in den vorangegangenen Abschnitten beschriebenen Effekte der PÖ auf die untersuchten Immunmarker über die Östrogen-Rezeptoren vermittelt wurden. Die Zytokinproduktion stellte den empfindlichsten Marker dar und *Gen* und *Eq* waren die PÖ mit dem größten Einfluss. Abbildung 5.7 zeigt die Ergebnisse der Koinkubation von PBMC mit Antiöstrogenen und diesen beiden Isoflavonen.

Die Inkubation der Zellen mit 100 nM Antiöstrogenen allein beeinflusste die Zytokinproduktion nicht, mit Ausnahme der Verringerung der IL-2-Konzentration durch Fulvestrant im Überstand um 29 %. Die Unterdrückung der Sekretion von IFN- γ , IL-2, IL-4 und TNF- α durch 50 μM *Gen* bzw. *Eq* wurde weder durch Tamoxifen noch durch Fulvestrant aufgehoben.

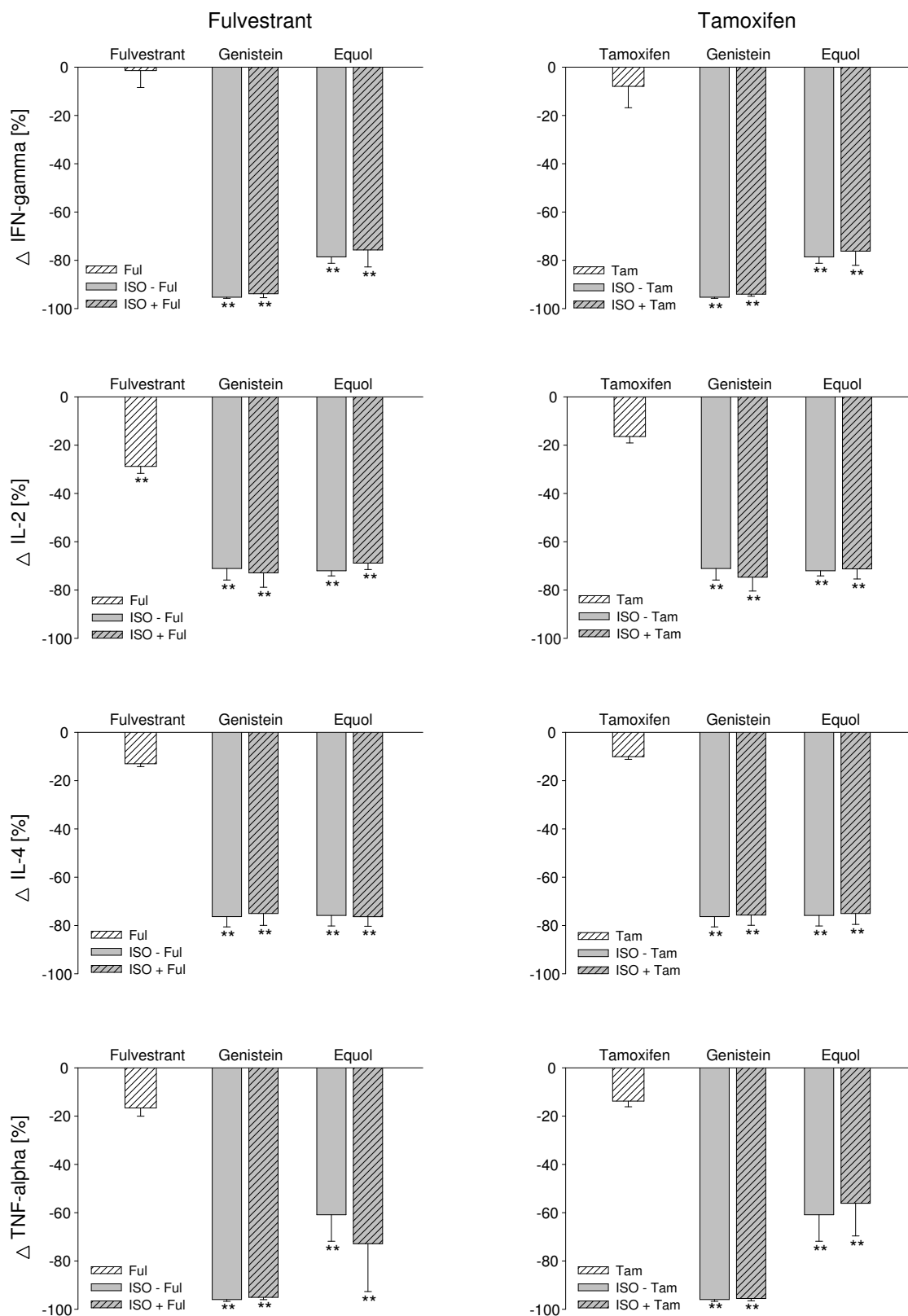


Abbildung 5.7: Zytokinproduktion bei gleichzeitiger Inkubation von PBMC mit Isoflavonen und Antiöstrogenen. Ful=Fulvestrant, Tam=Tamoxifen. n=3. *p<0,05 **p<0,01 gegenüber der DMSO-Kontrolle.

5.3 Experimente mit Milzzellen der Maus

5.3.1 Mitogen-aktivierte Proliferation

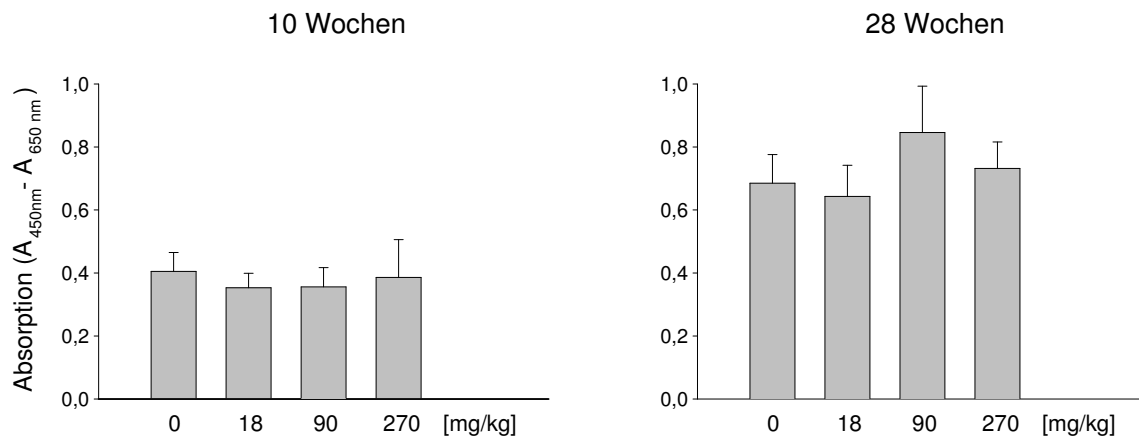


Abbildung 5.8: Mitogen-aktivierte Proliferation nach 10-wöchiger Intervention (n=5-6) bzw. nach 28-wöchiger Intervention mit Isoflavonen (n=11-14).

Die Bereitschaft der Milzzellen, auf einen Mitogenreiz zu proliferieren, ist nach 10 Lebenswochen weniger ausgeprägt als nach 28 Wochen (s. Abb. 5.8). Die Isoflavondosis im Futter hatte darauf allerdings keinen Einfluss.

5.3.2 Zytotoxische Aktivität Natürlicher Killerzellen

Die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen (s. Abb. 5.9) war nach 10-wöchiger Intervention mit Isoflavonen in allen Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. In der Hochdosis-Gruppe mit 240 mg/kg zeigte sich der Effekt am deutlichsten. Nach 28 Wochen war der Anteil lysierter Zellen in den Interventionsgruppen auf das Maß der Kontrollgruppe zurückgefallen und es waren keine Unterschiede mehr zwischen den Gruppen zu finden.

5.3.3 Phagozytische Aktivität der Granulozyten und Monozyten

Zu keinem der beiden Sektionszeitpunkte war der Anteil phagozytierender Granulozyten oder Monozyten durch die Gabe des Isoflavonpräparats beeinflusst. Die mitt-

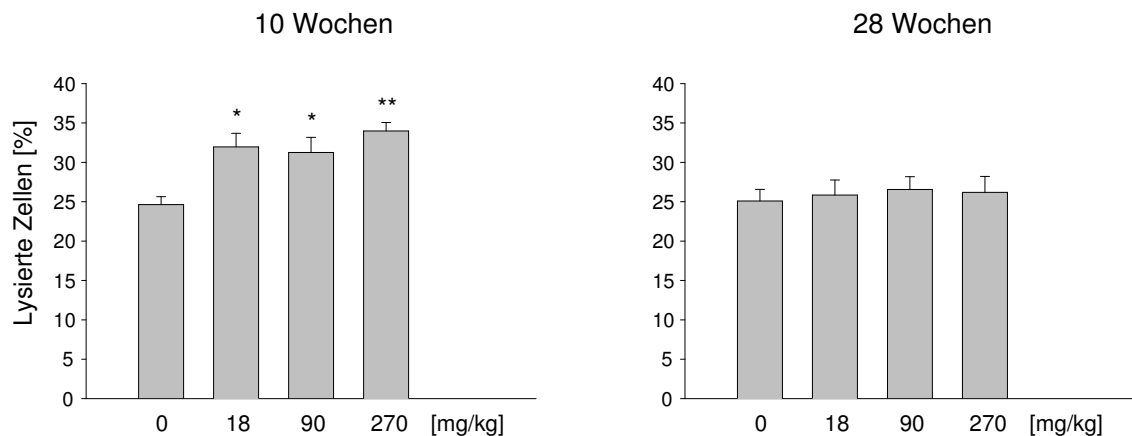


Abbildung 5.9: Zytotoxische Aktivität der NK-Zellen nach 10-wöchiger Intervention (n=5-6) bzw. nach 28-wöchiger Intervention mit Isoflavonen (n=11-14). *p<0,05 **p<0,01.

lere Phagozytoseintensität einzelner Granulozyten war allerdings bei den jüngeren Tieren in der Niedrig- und der Hochdosisgruppe signifikant verringert (Abb. 5.10).

5.3.4 Mitogen-aktivierte Zytokinproduktion

Bei der Sektion nach 28 Wochen wurden deutlich höhere IFN- γ -Werte gemessen als nach 10 Wochen, innerhalb einer Sektion unterschieden sie sich jedoch nicht signifikant (Abb. 5.11). Insgesamt wurde für keines der Zytokine ein signifikanter Einfluss durch das Isoflavon-Supplement festgestellt.

5.4 Humanstudie

Von den 21 Teilnehmern der Isoflavongruppe wurden die Daten eines Probanden ausgeschlossen, der statt eines 24-Stunden Urins Spontanurin abgegeben hatte. Des Weiteren wurde die IFN- γ -Analyse eines weiteren Probanden nicht verwendet, weil der Messwert für dieses Zytokin außergewöhnlich hoch lag. Aus der Lignangruppe mit ursprünglich 17 Teilnehmern flossen die Werte eines Probanden wegen unklarer CD4- und CD8-Befunde nicht in die Analyse ein, ebenso wenig wie die Daten für NK-Aktivität und Anteil der CD56⁺Zellen, da letztere aufgrund außergewöhnlich hoher Kontrollwerte nicht ausgewertet werden konnten.

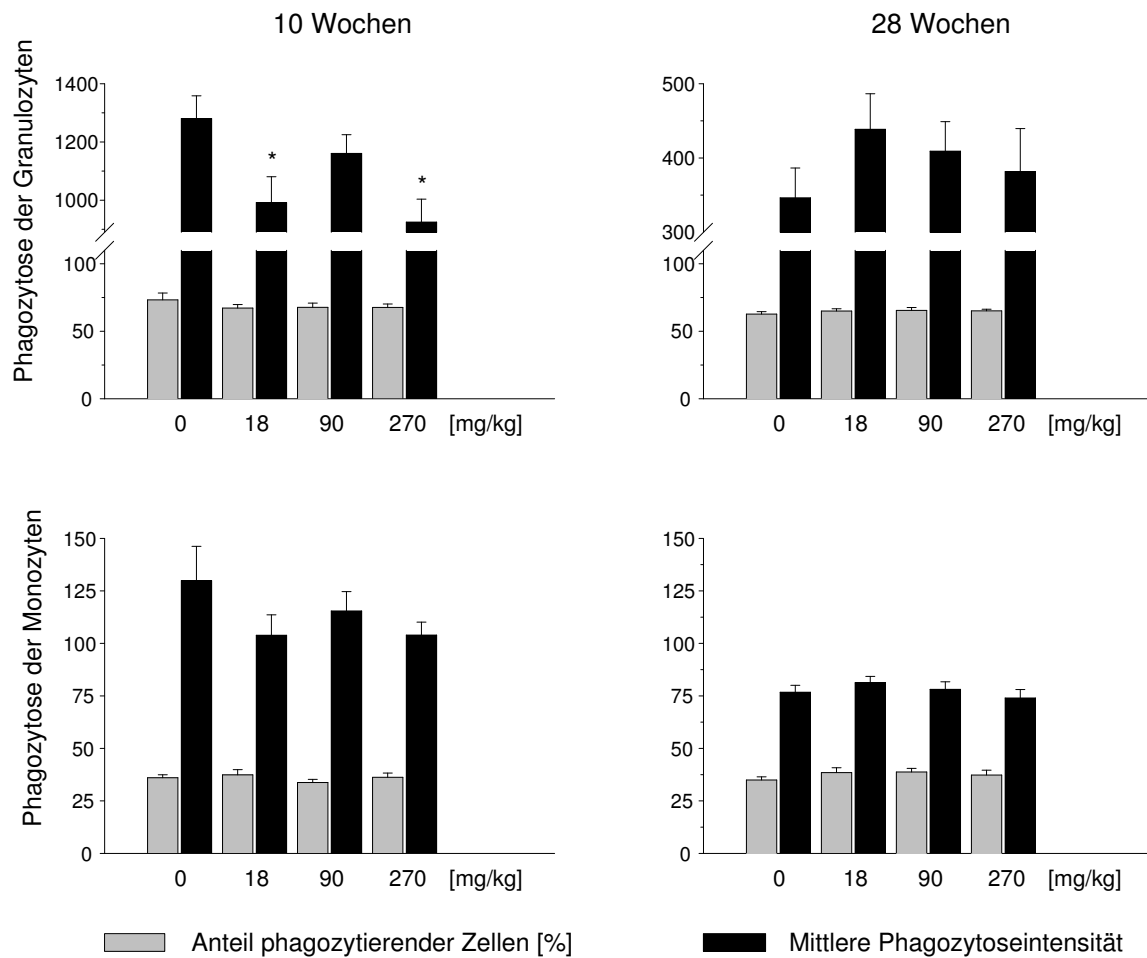


Abbildung 5.10: Phagozytische Aktivität der Granulozyten und Monozyten nach 10-wöchiger Intervention (n=5-6) bzw. nach 28-wöchiger Intervention mit Isoflavonen (n=11-14). * $p < 0,05$.

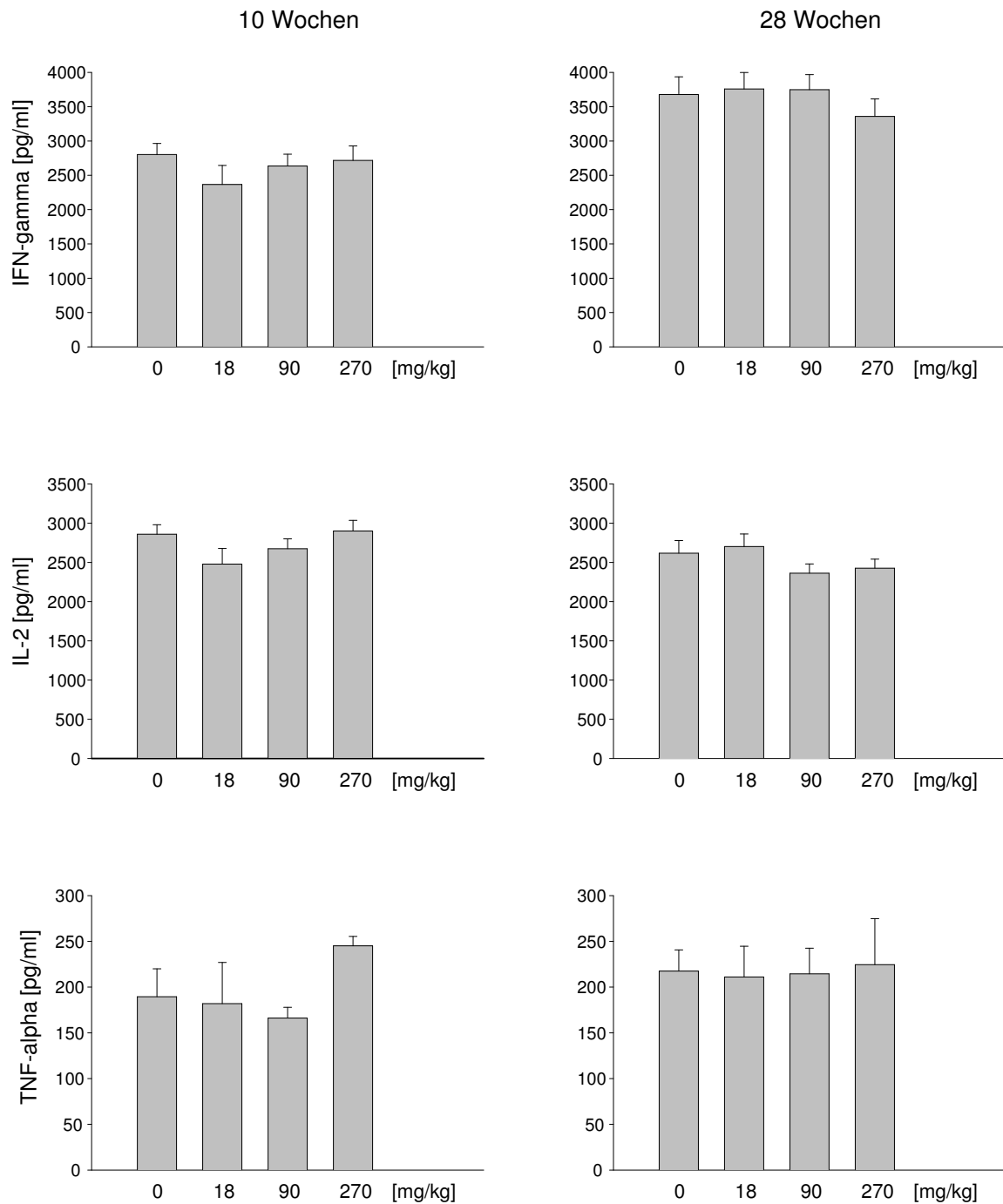


Abbildung 5.11: Mitogen-aktivierte Produktion von IFN- γ , IL-2 und TNF- α nach 10-wöchiger Intervention (n=5-6) bzw. nach 28-wöchiger Intervention mit Isoflavonen (n=11-14).

5.4.1 Mitogen-aktivierte Proliferation

Die Ausscheidung keines der analysierten PÖ korrelierte mit der mitogen-aktivierten Lymphozytenproliferation. Auf eine grafische Darstellung wurde daher verzichtet, Einzeldaten finden sich im Anhang auf Seite 127.

5.4.2 Anteil und zytotoxische Aktivität Natürlicher Killerzellen

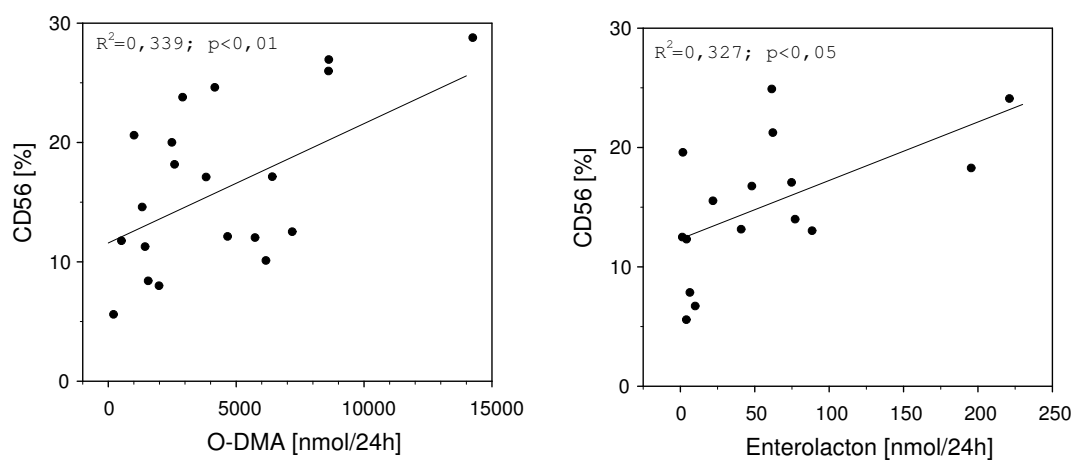


Abbildung 5.12: Abhängigkeit des Anteils der CD56⁺ NK-Zellen von der Phytoöstrogenausscheidung mit dem Urin.

Die Ausscheidung von *DMA* und *Enl* korrelierte positiv mit dem Anteil CD56⁺ NK-Zellen in den Lymphozyten des peripheren Bluts (Abb. 5.12). Daneben war eine höhere *DMA*-Ausscheidung mit einer schwach erhöhten NK-Aktivität verbunden ($\rho_{DMA}=0,343$).

5.4.3 T-Lymphozyten und Zytokine

Es wurde eine Korrelation zwischen der Konzentration an *Mat* und *End* im Urin und dem Anteil der beiden Lymphozytenfraktionen CD4⁺- und CD8⁺-Zellen ermittelt (Abb. 5.13). *Mat* korrelierte negativ mit CD4⁺-Zellen und der CD4/CD8-Ratio. Eine hohe *End*-Ausscheidung hing mit einem geringeren Anteil CD8⁺ und einem höheren Anteil CD4⁺ Zellen zusammen, letzteres war allerdings statistisch nicht signifikant und wurde daher nicht abgebildet (Daten im Anhang auf S. 127). Dennoch war die

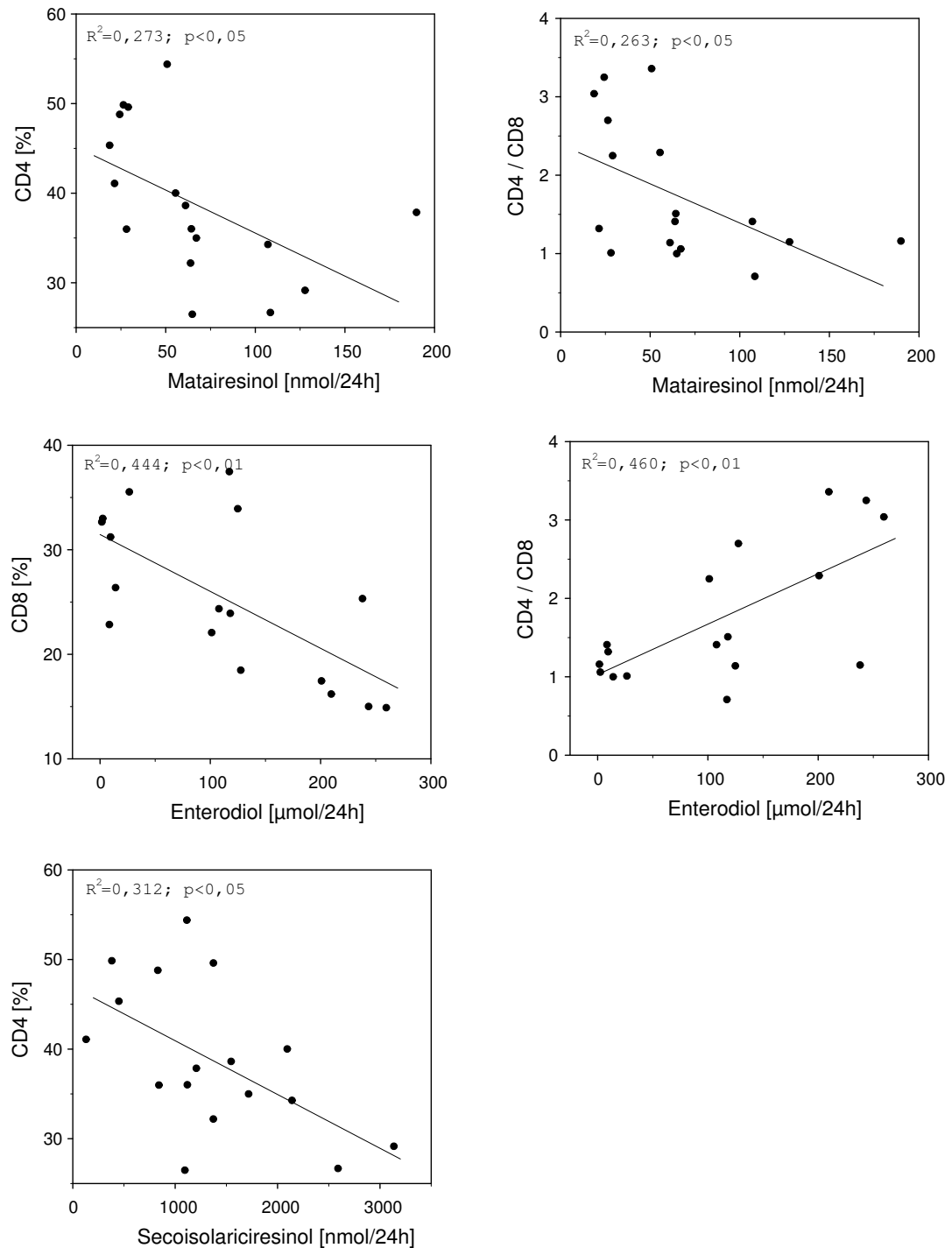


Abbildung 5.13: Abhängigkeit des Anteils der CD4⁺-Zellen, der CD8⁺-Zellen und des CD4/CD8-Verhältnisses von der Phytoöstrogenausscheidung mit dem Urin.

CD4/CD8-Ratio positiv mit der *End*-Konzentration im Urin korreliert. Wie *Mat* korrelierte auch *Sec* negativ mit dem Anteil der CD4⁺-Zellen. Allerdings lassen sich keine Zusammenhänge zwischen verändertem Anteil an CD4⁺-Zellen und der Ausschüttung von Zytokinen ex vivo erkennen.

5.5 Zusammenfassung beobachteter Effekte in den Teilstudien

Tabelle 5.1: Effekte nach Inkubation von Jurkat und PBMC mit Phytoöstrogenen

	<i>Gen</i>	<i>Dai</i>	<i>Eq</i>	<i>DMA</i>	<i>Sec</i>	<i>Mat</i>	<i>End</i>	<i>Enl</i>
Jurkat								
Proliferation	↓100 μ M			↓100 μ M				
Zellvitalität	↓100 μ M	↓100 μ M				↓100 μ M		↓100 μ M
Apoptose	↑≥50 μ M	↑100 μ M	↑100 μ M	↓≥50 μ M		↓≥50 μ M		
Nekrose	↑≥50 μ M	↑100 μ M	↑100 μ M			↓≥10 μ M		
PBMC								
Proliferation	↓≥10 μ M	↓50 μ M				↓50 μ M		
Apoptose								
Nekrose					↑50 μ M			
NK-Aktivität	↓≥10 μ M	↓50 μ M						
NK-Aktivität (IL-2)	↓ 50 μ M		↓50 μ M					
IFN- γ	↓≥10 μ M	↓50 μ M	↓≥10 μ M	↓50 μ M	↓50 μ M	↓50 μ M	↓50 μ M	
IL-2	↓≥10 μ M	↓50 μ M	↓50 μ M					
IL-4	↓≥10 μ M	↓50 μ M	↓50 μ M		↓50 μ M	↓50 μ M		
TNF- α	↑1 nM; ↓≥1 μ M		↓50 μ M	↓50 μ M	↓50 μ M	↓50 μ M		

↑ Stimulation, $p < 0,05$; ↓ Suppression, $p < 0,05$; leeres Feld: kein Effekt

Tabelle 5.2: Effekte nach Verfütterung von Isoflavonen an Mäuse

	10 Wochen	28 Wochen
Proliferation		
zytotoxische Aktivität der NK-Zellen	$\uparrow \geq 18$ mg/kg	
Phagozytose Granulozyten	$\downarrow 18$ und 270 mg/kg	
Phagozytose Monozyten		
IFN- γ		
IL-2		
TNF- α		

$\uparrow$ Stimulation, $p < 0,05$; $\downarrow$ Suppression, $p < 0,05$; leeres Feld: kein Effekt

Tabelle 5.3: Effekte am Menschen nach Intervention mit PÖ-reichen Lebensmitteln

	<i>Gen</i>	<i>Dai</i>	<i>Eq</i>	<i>DMA</i>	<i>Sec</i>	<i>Mat</i>	<i>End</i>	<i>Enl</i>
Proliferation								
% CD56 ⁺				$\uparrow$				$\uparrow$
zytotox. Aktivität der NK-Zellen								
% CD4 ⁺					$\downarrow$	$\downarrow$		
% CD8 ⁺							$\downarrow$	
% CD4 ⁺ / % CD8 ⁺						$\downarrow$	$\uparrow$	
IFN- γ								
IL-2								
IL-4								
TNF- α								

$\uparrow$ positive Korrelation mit $R^2 > 0,2$ und $p < 0,05$.

$\downarrow$ negative Korrelation mit $R^2 < -0,2$ und $p < 0,05$.

leeres Feld: kein Effekt

6 Diskussion

6.1 In vitro-Experimente

6.1.1 Lösungsmittelleffekte

An den Auswirkungen des Lösungsmittels DMSO zeigt sich deutlich, wie unterschiedlich verschiedene Zelltypen auf bestimmte Substanzen reagieren. Während 0,3 % DMSO im Ansatz auf Proliferation, Vitalität, Apoptose- und Nekroserate von Jurkat-Zellen kaum Einfluss haben, reagieren primäre PBMC deutlich auch auf die geringere Konzentration von 0,2 %. Vor allem die Zytokinproduktion ist ein empfindlicher Parameter. So ging unter DMSO-Einfluss die Sekretion von IL-4 durch PBMC um etwa ein Drittel gegenüber der RPMI-Kontrolle zurück. Dadurch, dass die hier dargestellten Phytoöstrogeneffekte aber immer auf den Lösungsmittel-Kontrollwert bezogen wurden, sind Lösungsmittelleffekte nicht miterfasst.

6.1.2 Apoptose, Nekrose, Zellvitalität und Proliferation

Grundsätzlich sind die Ergebnisse der Apoptose- und Nekrose-Messung bei Jurkat-Zellen zurückhaltend zu interpretieren, da bei den äußerst niedrigen Ausgangswerten durch die Transformation der Daten in Bezug auf die DMSO-Kontrolle häufig signifikante Unterschiede auftraten, deren biologische Relevanz fraglich ist. Ähnliches ist zu den Nekrosewerten der PBMC zu sagen. In der Kontrolle waren 2,3 % bis 4,0 % der Zellen nekrotisch, eine Steigerung von 25 %, wie im Fall des Secoisolariciresinols, bedeutet einen Anstieg der Nekroserate von 3,1 auf 3,9 %. Dieser Wert liegt sogar noch unterhalb des höchsten Kontrollwertes, der bei der Bestimmung des Einflusses von DMA gemessen wurde. Vermutlich aufgrund der höheren untransformierten Werte von 10,3 % bis 16,2 % erreichte keine der durch Phytoöstrogene verursachte Änderung der Apoptoserate von PBMC ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$.

Die Verringerung der Zellvitalität durch Daidzein, Matairesinol und Enterolacton um 0,4 % bis 1 % war aufgrund der geringen Varianz der Messwerte statistisch signifikant. Änderungen von diesem marginalen Ausmaß liegen jedoch innerhalb der normalen physiologischen Schwankung und sind biologisch unbedeutend.

Genistein

100 μM Genistein hemmte die Proliferation von Jurkat-Zellen nahezu vollständig, was zum Teil auf zytotoxische Effekte dieses Phytoöstrogens zurückzugehen scheint. So waren 25 % der Zellen zum Zeitpunkt der Proliferationsmessung bereits letal, während in der Kontrolle noch 99 % der Zellen vital waren. Die übrigen Zellen im 100 μM -Ansatz waren zwar vital, aber offensichtlich in ihrer Proliferation deutlich gehemmt.

Bei der Apoptosemessung konnte die hohe Letalitätsrate nicht in diesem Ausmaß beobachtet werden. Zwar wurden Apoptose- und Nekroserate durch 100 μM Genistein signifikant auf das doppelte bzw. dreifache gesteigert, aber absolut war dies eine Steigerung von 2,5 % auf 6,4 % apoptotische bzw. von 1,5 % auf 4,3 % nekrotische Zellen. Das heißt, dass 89 % der Zellen im Annexinansatz keine äußeren Zeichen einer Zellschädigung aufwiesen, gegenüber 75 % vitaler Zellen im Proliferationsansatz. Dieser Unterschied kann durch die unterschiedlich lange Inkubationsdauer erklärt werden. Die Zellen im Proliferationsansatz waren bis zur Messung 48 h Phytoöstrogenen ausgesetzt, die Zellen im Ansatz zur Apoptose-/Nekrose-Bestimmung nur 24 h. Zudem wurden Zellen zur Proliferation in einer Dichte von $2,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml ausgesät, Zellen zur Apoptose-Messung in einer Dichte von $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml, also fast zehnfach so dicht.

Ähnlich wie Jurkat-Zellen stellten mononukleäre Zellen bei 100 μM Genistein in der Kulturlösung die Proliferation nahezu vollständig ein. Da die Zellvitalität im Proliferationsansatz der PBMC nicht erfasst wurde, ist darüber keine Aussage möglich. Es ist aber davon auszugehen, dass auch diese primären Zellen zum Teil letal waren und zum Teil die Zellteilung durch Genistein unterbunden wurde.

Auch andere Arbeitsgruppen konnten dosisabhängige Wachstumshemmungen durch Genistein beobachten. Spinozzi et al. [1994] berichten von einer gegenüber der Kontrolle signifikant geringeren Zahl von Jurkat-Zellen ab etwa 18 μM Genistein nach 72 h, die deutlichsten Effekte auf die Zellzahl zeigten sich bei etwa 110 μM . Bereits nach 48 h waren wie in der vorliegenden Arbeit antiproliferative Effekte nachzuwei-

sen. Hirano et al. [1994] zeigten, dass Genistein schon nach 24 h die Proliferation der humanen Leukämie-Zelllinien HL-60 und MOLT-4 mit einer IC_{50} von 3,7 nM bzw. 10,5 μ M hemmt. Auch an humanen PBMC hatte Genistein proliferations-suppressive Effekte [Atluru et al. 1991; Chiaffarino et al. 1994], an primären Milzzellen der Maus konnten Wang et al. [1997] allerdings keinen Effekt von Genistein (0,01 bis 10 μ M) auf die Proliferation finden. Dies könnte an der Inkubationsdauer von nur 24 h liegen, gegenüber 5 Tagen bei den PBMC in der vorliegenden Arbeit.

Daidzein und Equol

Die Effekte von Daidzein und Equol waren bei weitem nicht so ausgeprägt wie jene von Genistein. Der Rückgang der Vitalität der Jurkat-Zellen durch 100 μ M Daidzein war nicht stark genug, um die Proliferation signifikant zu verringern. Die um 58 % (Daidzein) bzw. 21 % (Equol) gesteigerte Apoptose und die um 52 % bzw. 88 % erhöhte Nekrose waren absolut betrachtet gering, die Kontrollwerte betrugen 3 % für Apoptose und 1 % für Nekrose.

Wie auch Genistein hatten Daidzein und Equol keinen Einfluss auf die Apoptose- und Nekroserate von PBMC. Jedoch verringerte Daidzein die Proliferationsrate dieser Zellen deutlich. Dies steht im Gegensatz zur Arbeit von Wang et al. [1997], die im mittleren Konzentrationsbereich zwischen 0,01 μ M und 10 μ M Daidzein-induzierte Proliferationssteigerungen an Mitogen-stimulierten Milzzellen der Maus nachwiesen. Hirano et al. [1994] fanden hingegen keinerlei Effekt von Daidzein auf die Proliferation von HL-60 und MOLT-4, die 24 h lang bis zu einer Konzentration von 39 μ M inkubiert wurden. Ursache hierfür könnte die Verwendung unterschiedlicher Zelltypen sein, wie auch bei der vorliegenden Arbeit am Unterschied zwischen Jurkat und PBMC zu erkennen ist.

Die Wirkung von Equol auf Zellen des Immunsystems wurde bisher nicht untersucht. Auf die Östrogenrezeptor- (ER-) negative humane Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 hatte Equol im Konzentrationsbereich von 0,1 μ M bis 10 μ M einen schwach antiproliferativen Effekt, im Gegensatz zu den ER positiven Zelllinien MCF-7 und BG-1, deren Proliferation durch Equol bis auf das Doppelte gesteigert wurde [Schmitt et al. 2001].

Desmethylangolensin

Die Apoptoserate der Jurkat-Zellen nahm bei 50 μM Desmethylangolensin im Ansatz im Vergleich zur Kontrolle deutlich ab, der Rückgang der Nekroserate erreichte keine statistische Signifikanz. Die Proliferationsrate ging ebenfalls leicht, aber trotzdem hochsignifikant zurück. Dieses Phänomen könnte dadurch erklärt werden, dass DMA Apoptose- und Mitose-Signale gleichermaßen unterdrückt. Zur Wirkung von DMA auf Leukozyten lagen bisher ebenfalls keine Daten vor. Die Substanz erniedrigte allerdings ER-unabhängig in einer Konzentration von 10 μM die Proliferation von MCF-7- und BG-1-Zellen um über 50 % [Schmitt et al. 2001].

Secoisolariciresinol

Secoisolariciresinol erhöhte die Nekrose von PBMC deutlich, beeinträchtigte aber weder die Apoptose- noch die Proliferationsrate. Auch die gemessenen Parameter der Jurkat-Zelllinie blieben unbeeinträchtigt von dieser Substanz im verwendeten Konzentrationsbereich. Im Gegensatz dazu berichten Banskota et al. [2004] von erniedrigter Apoptoserate bei primären Leberzellen der Maus und L929 Fibrosarkomzellen und geringeren Leberzellschädigungen durch die Applikation von Secoisolariciresinol. Bei diesen Experimenten wurden allerdings die Tiere bzw. die Zellkulturen durch D-Galactosamin, LPS bzw. $\text{TNF-}\alpha$ vorgeschädigt. Die Autoren beschreiben, dass das Lignan die Produktion der proinflammatorischen Zytokine $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IFN-}\gamma$ hemmt und vermuten, dass es zusätzlich durch seine antioxidative Wirkung die oxidativen Schädigungen, die aus den proinflammatorischen Zytokinen folgen, unterbindet. Da in den hier vorgestellten Experimenten die Zellen keinem besonderen oxidativen Stress unterlagen, ist in dieser Hinsicht auch keine Wirkung des Secoisolariciresinol zu erwarten.

Matairesinol

Die durch Matairesinol erniedrigte Apoptose- und Nekroserate steht im Widerspruch zur gesunkenen Vitalität der Jurkat-Zellen. Die Proliferationsrate wurde dadurch jedoch nicht beeinflusst, was sich leicht erklären lässt, wenn man die untransformierten Werte betrachtet. Durch Matairesinol wurde der Anteil apoptotischer bzw. nektotischer Zellen von 3,8 % auf 3,1 % bzw. von 1,5 % auf 1,0 % gesenkt. Trotz statistischer Signifikanz sind diese Unterschiede, ebenso wie der Rückgang der Zellvitalität, marginal. PBMC zeigten keine veränderte Apoptose- und Nekroseneigung, aber eine

erniedrigte Proliferationsrate. Dies ist in Übereinstimmung mit den Effekten von Matairesinol auf die humane Leukämie-Zelllinien HL-60, deren Proliferation schon bei physiologischen Konzentrationen gehemmt wurde ($IC_{50} = 0,11 \mu\text{M}$) [Hirano et al. 1994]. Dabei war die halbmaximale Toxizität bei primären Blutlymphozyten ähnlich hoch wie bei HL-60 ($17,2 \mu\text{M}$). Wie unterschiedlich verschiedene Zelllinien jedoch reagieren, zeigt die Reaktion der von dieser Arbeitsgruppe ebenfalls getesteten Linie MOLT-4. Deren Proliferationsrate ging erst bei $16,3 \mu\text{M}$ um 50 % zurück. Ob diese Matairesinol-Konzentration schon toxisch war, wurde nicht untersucht.

Enterodiol und Enterolacton

$100 \mu\text{M}$ Enterolacton verringerte die Vitalität der Jurkat-Zellen um 0,4% gegenüber der Kontrolle, was trotz statistischer Signifikanz biologisch als nicht relevant anzusehen ist. Somit kann man sagen, dass Enterodiol und Enterolacton keine Effekte auf die gemessenen intrinsischen Immunparameter hatten. Dies wird durch die Untersuchungen von Hirano et al. [1994] unterstützt, die bis zu einer Konzentration von $33 \mu\text{M}$ keinerlei Einfluss von Enterodiol auf die Proliferationsrate von HL-60 und MOLT-4 finden konnten.

6.1.3 Zytotoxische Aktivität der NK-Zellen und Zytokinproduktion

Genistein und Daidzein

Die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen wurde durch $10 \mu\text{M}$ und $50 \mu\text{M}$ Genistein um bis zu 62 % und durch $50 \mu\text{M}$ Daidzein um 21 % gesenkt. Bezüglich Genistein ähneln diese Ergebnisse den Werten anderer Autoren. Nishio et al. [1994] berichten von bis zu 32 % geringerer NK-Aktivität nach 3-tägiger Inkubation der Effektorzellen mit $37 \mu\text{M}$ Genistein, und Zhang et al. [1999] fanden schwach erniedrigte NK-Aktivität nach 30 min Vorinkubation mit $50 \mu\text{M}$ Genistein. Diese Arbeitsgruppe beobachtete allerdings auch einen deutlichen Anstieg der lytischen Aktivität der NK-Zellen bei Genistein-Konzentrationen von $5 \mu\text{M}$ und darunter, was in den eigenen Untersuchungen nicht zu erkennen ist. Es könnte sein, dass Genistein bei der vergleichsweise kurzen Inkubationsdauer von insgesamt 5 h positive Effekte erzielt, diese Wirkung aber nach 24 h, wie in dieser Arbeit, durch negative Auswirkungen des Isoflavons auf die Zellen wieder ausgeglichen wurde.

Der Einfluss von Daidzein auf die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen primärer Blutlymphozyten wurde bisher nicht beschrieben. Einzig Zhang et al. [1999] zeigen eine verstärkende Wirkung von Daidzein-Glukuronid. Ein Vergleich des Paares Genistein / Genistein-Glukuronid in der selben Arbeit zeigt allerdings, dass aus der Wirkung des Glukuronids nicht auf die des Aglykons geschlossen werden kann.

Zhang et al. [1999] stimulierten ebenfalls die NK-Zellen mit IL-2. Dabei fanden sie eine um 7 % bis 17 % gesteigerte lytische Aktivität dieser Zellen, aber keinen Unterschied im Verlauf des Aktivitätsrückgangs in Abhängigkeit von der Isoflavon-Konzentration. In der vorliegenden Arbeit wurde die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen hochsignifikant um 49 % durch IL-2 gesteigert. Zur IL-2-Konzentration im Ansatz von Zhang et al. liegen keine genauen Angaben vor. Nach der Methodenbeschreibung scheint sie aber um etwa die Hälfte niedriger zu sein als in der vorliegenden Arbeit, was die geringer ausfallende Stimulierung erklärt. Im Gegensatz zu den Experimenten von Zhang et al. verhinderte in der vorliegenden Arbeit eine Stimulation mit IL-2 den Rückgang der lytischen Aktivität deutlich. Dies könnte durch die höhere basale Steigerung der lytischen Aktivität bedingt sein, aber auch mit der gewählten Methode zusammenhängen. Ein wichtiger Unterschied zwischen den hier dargestellten Experimenten zur zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen und den Arbeiten von Zhang et al. [1999] und Nishio et al. [1994] ist nämlich, dass beide Autoren die NK-Aktivität nicht durchflusszytometrisch bestimmten, sondern mittels ^{51}Cr -Freisetzung aus den Zielzellen, was die doppelte Inkubationszeit verlangt. Außerdem unterscheidet sich die Dauer der Vorinkubation mit Isoflavonen erheblich. Zhang et al. [1999] inkubierten die Effektorzellen vor Zugabe der Zielzellen 30 min und Nishio et al. [1994] 72 h lang, gegenüber 24 h bei den eigenen Untersuchungen.

Die Zytokinproduktion wurde durch Genistein besonders stark und durch Daidzein zwar signifikant, aber nicht so ausgeprägt beeinträchtigt. Chiaffarino et al. [1994] berichten ebenfalls, dass 37 μM Genistein die IL-2-Produktion humaner PBMC um 75 % erniedrigte. Dies steht im Widerspruch zur Arbeit von Wang et al. [1997], die deutlich verstärkende Effekte von Daidzein und nur schwach ausgeprägte Effekte von Genistein auf die Produktion von IL-2 und IL-3 durch Milzzellen der Maus beschreiben. Allerdings hat die Arbeitsgruppe die Auswirkung von 50 μM Genistein nicht getestet, eine Konzentration, die bei den eigenen Untersuchungen die Zytokinproduktion hochsignifikant um über 60% hemmte. Methodische Unterschiede, wie geringere Mitogenkonzentration, höhere Zelldichte und Ethanol als Lösungsmittel zusätzlich zu DMSO könnten für die stark anregende Wirkung des Daidzeins ver-

antwortlich sein, wichtiger ist jedoch wahrscheinlich die Art der Zellen. Womöglich unterscheiden sich Zellen der Maus in ihrer Reaktion sehr stark von Zellen des Menschen und Lymphozyten der Milz wiederum von PBMC.

Equol, Desmethylangolensin und Lignane

Die Inhibierung der Zytokinproduktion der Immunzellen durch $\geq 10 \mu\text{M}$ Equol und $50 \mu\text{M}$ Desmethylangolensin, Matairesinol bzw. Secoisolariciresinol wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Außer Studien mit Genistein und Daidzein sind zum Einfluss von Phytoöstrogenen auf die Zytokinproduktion keine Untersuchungen veröffentlicht.

6.1.4 Mögliche Mechanismen der Phytoöstrogeneffekte

Effekte aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu endogenen Östrogenen

Ein naheliegender Wirkungsmechanismus der Phytoöstrogene ist die Beeinflussung von Immunzellen über den Östrogenrezeptor (ER). Da Zellen des Immunsystems sowohl ER- α als auch ER- β exprimieren (s. Tab. 2.5 auf Seite 23), wurde untersucht, ob sich die von Phytoöstrogenen verursachte Hemmung der Zytokinproduktion durch Antiöstrogene verhindern lässt. Genistein und Equol wurden als Phytoöstrogene ausgewählt, weil sie die ausgeprägtesten Effekte aufwiesen, und die Zytokinproduktion erwies sich als empfindlichster der hier untersuchten Immunparameter. Als Antiöstrogene wurden Tamoxifen und Fulvestrant verwendet. Tamoxifen ist ein Wirkstoff, der in der Brustkrebstherapie eingesetzt wird, und abhängig von der Dosis, dem Wirkort und dem endogenen Östrogenstatus östrogene oder antiöstrogene Wirkung entfaltet [Wakeling 1995, 2000]. Daher wird es auch als selektiver Östrogenrezeptor-Modulator (Selective Estrogen Receptor Modulator, SERM) bezeichnet. Allerdings wäre es möglich, dass seine Wirkung am ER der ebenfalls biphasischen Wirkung der Phytoöstrogene sehr ähnlich ist und es die immunsuppressiven Effekte von Genistein und Equol noch verstärkt. Aus diesem Grund wurde zusätzlich Fulvestrant eingesetzt, das als reiner Östrogenrezeptor-Blocker gilt [Wakeling 1995, 2000]. Östradiol selbst verringert *in vitro* in Konzentrationen zwischen 1 nM und $1 \mu\text{M}$ die Produktion von IL-6, TNF- α , IL-1 β und IL-1-Rezeptorantagonisten in unstimulierten PBMC [Ralston et al. 1990; Rogers und Eastell 2001], verstärkt aber die Aktivität des IFN- γ -Promotors und erhöht die IFN- γ -mRNA-Konzentration [Fox et al. 1991]. *In vivo*

stimuliert das Hormon die Zytokinproduktion. Karpuzoglu-Sahin et al. [2001] berichten von verstärkter IL-2-mRNA- und IFN- γ -Produktion bei kastrierten Mäusen, denen Östradiolimplantate eingesetzt worden waren, während die Konzentration von IL-4-mRNA unbeeinflusst blieb. Verthelyi [2001] zeigt, dass Östradiol bei Tier und Mensch die Produktion der Zytokine IL-4, IL-6 und IL-10 stimuliert.

Weder Tamoxifen noch Fulvestrant konnten die durch Isoflavone verursachte Hemmung der Zytokinproduktion aufheben oder verringern. Genistein und Equol üben deshalb wahrscheinlich ihre Wirkung auf die Zytokinproduktion nicht über den ER aus. Auch beim Vergleich von Wildtyp- mit ER- α -Knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass Genistein und Sojaprotein die IFN- γ -Produktion in der Milz unabhängig vom ER- α erniedrigen [Curran et al. 2004]. Genistein und besonders Equol sind unter den acht hier verwendeten Phytoöstrogenen die beiden mit der höchsten östrogenen Wirksamkeit [Adlercreutz 1990]. Die deutlich schwächeren Effekte der übrigen getesteten Phytoöstrogene auf die Zytokinproduktion sind daher sehr wahrscheinlich ebenfalls nicht ER-vermittelt.

Die Tatsache, dass die eingesetzten Antiöstrogene die Verringerung der Zytokinsynthese nicht aufhoben, lässt nur bedingt den Schluss zu, dass Genistein und Equol auch die anderen Immunparameter nicht mittels ER beeinflussen. Laut Haeryfar et al. [2000] wird die NK-Aktivität in vitro durch Tamoxifen gesteigert. Dieser Effekt tritt allerdings nur auf, wenn zumindest die Zielzellen mit Tamoxifen behandelt wurden, Inkubation nur der NK-Zellen mit Antiöstrogen hatte keine Änderung der Lyserate zur Folge. Tamoxifen beeinflusst also nicht die zytotoxische Aktivität der Killerzellen, sondern sensibilisiert die Zielzellen. Ähnliche Ergebnisse lieferten die Untersuchungen mit NK-Zellen von Ratten [Baral et al. 1996]. Da die in diesen Versuchen eingesetzten Zielzellen P815 den „klassischen“ ER- α nicht exprimieren, wurde die inhibitorische Wirkung von Tamoxifen entweder durch ER- β oder über andere Signalwege als über die Östrogenrezeptoren vermittelt. Dass ER- α an der Östrogensensitivität der NK-Zellen nicht beteiligt ist, konnten auch Curran et al. [2001] darlegen. Die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen in vitro ging in Experimenten dieser Arbeitsgruppe nach in vivo-Behandlung von ER- α -knockout-Mäusen und Wildtyp-Mäusen mit Östradiol gleichermaßen zurück. Da auf NK-Zellen sowohl ER- α als auch ER- β nachgewiesen wurde, kann der Signalweg über letzteren nicht ausgeschlossen werden. Allerdings könnte die in vivo-Gabe von Östradiol auch systemische Wirkungen haben, die nicht direkt über Östrogenrezeptoren der NK-Zellen vermittelt werden, wie Stimulation der SHBG-Produktion oder Interaktion

mit Enzymen der Östrogensynthese.

Die Zellproliferation durch Equol dagegen wird offensichtlich mittels ER beeinflusst. Schmitt et al. [2001] berichten, dass das Nahrungsöstrogen im Konzentrationsbereich von 0,1 μM bis 10 μM auf die ER-negative humane Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 einen schwach antiproliferativen, auf die ER-positiven Zelllinien MCF-7 und BG-1 dagegen einen stark proliferativen Effekt hatte. In der vorliegenden Arbeit hemmte Equol das Wachstum der ER-negativen Jurkat-Zellen ebenfalls schwach, hatte aber keinen Einfluss auf die Proliferation der ER-positiven PBMC. Letzteres kann daran liegen, dass in den Tumorzelllinien MCF-7 und BG-1 proliferationshemmende Mechanismen ausgeschaltet sind und die Zellen so ungehindert auf einen östrogenen Stimulus reagieren. Der antiproliferative Effekt von Equol aber kann aufgrund der Erkenntnisse mit Jurkat und MDA-MB-231 nicht mit ER-vermittelten Mechanismen zusammenhängen.

Inhibierung der Protein-Tyrosin-Kinase-Aktivität

Die Aktivierung eines Rezeptors auf der Zelloberfläche wird über eine Kaskade von Signalen an das Zellinnere weitergeleitet. Einen großen Anteil daran hat die Phosphorylierung von Proteinen an Tyrosinresten. Enzyme, die diese Phosphorylierung katalysieren, sind Protein-Tyrosin-Kinasen (PTK). Am T-Zell-Rezeptor (TZR, vgl. Abb. 6.1) ist die Tyrosin-Phosphorylierung ein frühes Signal der Rezeptoraktivierung und essentiell für beide Wege der Signaltransduktion, nämlich der Aktivierung der Proteinkinase C und der Ausschüttung von intrazellulärem Calcium. Genistein ist ein Inhibitor von PTK [Akiyama et al. 1987] und hemmt allgemein die T-Zell-Tyrosinkinaseaktivität. Zusätzlich inhibiert es die Kinaseaktivität und Autophosphorylierung der PTK p56lck und die Tyrosinphosphorylierung der ζ -Untereinheit des TZR, welche frühe Ereignisse der T-Zell-Aktivierung sind [Mustelin et al. 1990; Trevillyan et al. 1990]. Als Folge davon ist die Expression von IL-2, der α -Kette des IL-2-Rezeptors und die Zellproliferation verringert. Baldari und Telford [1994] dagegen berichten von verstärktem TZR-Signal nach Inkubation mit Genistein in Konzentrationen (20-40 μM), die bei Mustelin et al. [1990] und Trevillian et al. [1990] zu verringerter Aktivität geführt hatten. Sie konnten erst ab 40 μM Genistein eine Inhibierung der T-Zell-Signaltransduktion feststellen. Als Erklärung vermuten Baldari und Telford [1994] die Existenz einer regulatorischen PTK, die für die Hemmung der TZR-Effekte im Rahmen eines Rückkopplungsmechanismus zuständig ist und deren Hemmung die TZR-Wirkung aufrechterhalten lässt. Ein weiterer Erklärungsansatz

sind Unterschiede zwischen den eingesetzten Zelllinien. Baldari und Telford [1994] arbeiteten mit Jurkat-Zellen, im Gegensatz zu Mustelin et al. [1990] und Trevillian et al. [1990], die primäre mononukleäre Blutzellen für ihre Experimente genutzt hatten.

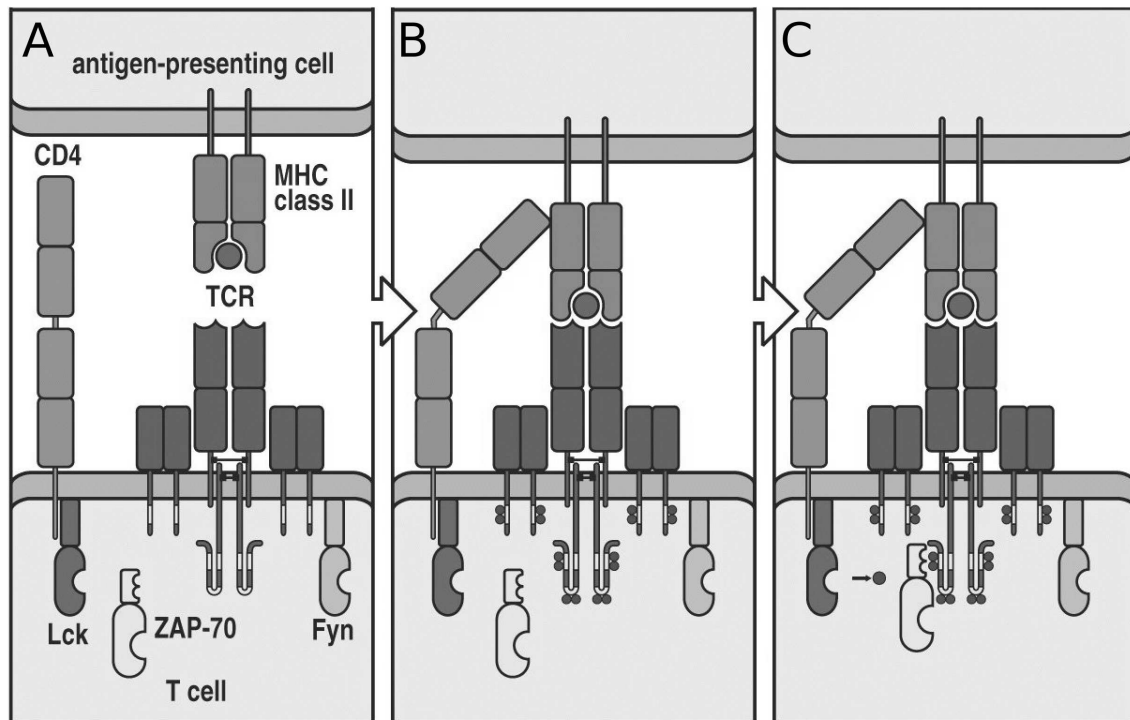


Abbildung 6.1: Signaltransduktion am T-Zell-Rezeptor [nach Janeway et al. 2005].

- A. In der ruhenden T-Zelle sind die intrazellulären Tyrosinreste des Rezeptors nicht phosphoryliert.
- B. Aktivierung des Rezeptors und der Corezeptoren führt zur Assoziation mit den PTK p56lck und p59fyn und Phosphorylierung der Tyrosinreste.
- C. Die PTK ZAP-70 assoziiert mit der phosphorylierten ζ -Kette des Rezeptors und wird wiederum phosphoryliert und aktiviert. Weitere Schritte der Signaltransduktion, wie Aktivierung der Proteinkinase C und Ausschüttung von intrazellulärem Calcium folgen.

Die Aktivität von PTK ist ebenso essentiell für die Funktion von NK-Zellen [Einspahr et al. 1991]. Genistein erniedrigt in NK-Zellen die durch IL-2 vermittelte Phosphorylierung des IL-2-Rezeptors und der p56lck [Nishio et al. 1994]. Dies führt zu einer geringeren Affinität von p56lck zum Rezeptor und zu einer Hemmung der Signaltransduktion mit der Folge, dass die zytotoxische Aktivität der Zellen zurück geht. In einer gemischten Kultur aus peripheren Blutzellen kann durch Hemmung der PTK in T-Zellen also die Ausschüttung von Zytokinen erniedrigt und dadurch die Aktivierung nachfolgender Mechanismen unterbunden werden. Ein Beispiel ist die geringere

IL-2-Produktion durch T-Zellen und die deshalb schwächere lytische Aktivität der NK-Zellen, die noch mehr verringert wird durch die Hemmung NK-Zellen spezifischer PTK. Dass durch Zugabe von IL-2 in den Inkubationsansatz die Inhibierung abgeschwächt wurde, bestätigt diese Hypothese. Ein Rückgang der IL-2-Produktion der im gleichen Ansatz vorhandenen T-Zellen könnte demnach zumindest für einen Teil des Rückgangs der NK-Aktivität bei hohen Isoflavon-Konzentrationen verantwortlich sein.

Da Genistein in Experimenten häufig aufgrund seiner inhibitorischen Wirkung auf PTK eingesetzt wird, liegen zu diesem Isoflavon zahlreiche Untersuchungen vor. Ob aber die in dieser Arbeit gefundene Inhibierung mehrerer Immunmarker durch verschiedene Phytoöstrogene in supraphysiologischen Konzentrationen ebenfalls durch die Interaktion mit PTK zustande gekommen sind, lässt sich daraus nicht ableiten. Im Gegenteil, Schultze-Mosgau et al. [1998] berichten, dass zwar Genistein, aber nicht Equol, Enterodiol und Enterolacton PTK hemmen, die mit dem EGF-Rezeptor assoziiert sind. Der EGF-Rezeptor besitzt strukturelle Ähnlichkeit mit dem TZR; an ihm wurde die inhibitorische Wirkung von Genistein auf PTK zum ersten Mal beschrieben.

Beeinflussung des Zellzyklus und Genotoxizität

Die Proliferation von Zellen findet im Rahmen des Zellzyklus statt, der sich in die beiden Hauptphasen Mitose und Interphase einteilen lässt (Abb. 6.2). Die Mitose (M-Phase) ist die Phase der Zellteilung. Die Interphase wird wiederum unterteilt in G₀-, G₁-, S- und G₂-Phase. Die G₀-Phase ist das Stadium der Ruhe, aus dem die Zelle, unterbrochen durch Wachstumsfaktoren, in die G₁- und nachfolgend in die S-Phase übergeht. In dieser Phase findet die Replikation der DNA statt, deren korrekter Ablauf in der G₂-Phase kontrolliert wird, bevor sich die Zelle erneut teilt. Der Übergang zwischen den Phasen des Zellzyklus wird durch cyklinabhängige Proteinkinasen kontrolliert und reguliert. Wichtige Kontrollpunkte sind der Übergang in die S-Phase, in denen die DNA vor der Replikation auf Schäden untersucht wird, und der Übergang in die M-Phase. Bei Mutationen werden je nach Schweregrad Reparaturmechanismen oder die Apoptose eingeleitet. [Vermeulen et al. 2003]

In mehreren Studien wurde der Einfluss von Isoflavonen auf den Zellzyklus belegt. Genistein führte in Konzentrationen von 18 bis 37 μM zu einem G₂/M-Arrest von Jurkat-Zellen, bei 78 bis 111 μM wurde zusätzlich der Übergang in die S-Phase

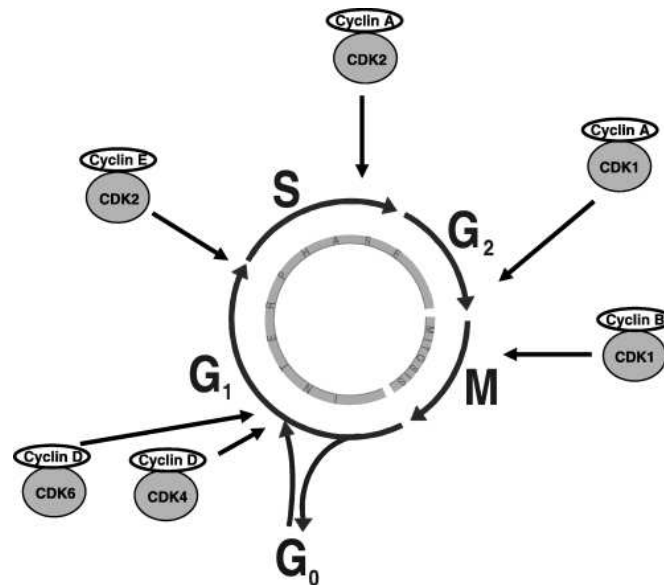


Abbildung 6.2: Phasen des Zellzyklus [Vermeulen et al. 2003]

gestört [Spinozzi et al. 1994]. Als Folge der Blockade des Zellzyklus wurden die Apoptose und Nekrose eingeleitet. Die Inhibierung der Zellteilung durch Genistein wurde an Prostataepithelzellen bestätigt und insofern ergänzt, als auch Equol und Daidzein den Zellzyklus blockierten, allerdings in der G₀/G₁-Phase [Hedlund et al. 2003]. Daraus folgend war die Proliferation der Zellen verringert, wobei Equol die stärkste Wirkung hatte und die Proliferation bei 10 μM um 80 % verringerte. Auch die Proliferation von Harnwegsepithelzellen wurde durch Genistein und Daidzein mit einem IC₅₀ von 11-90 μM bzw. 80-200 μM verringert, wobei Genistein den Zellzyklus in der G₂/M-Phase blockierte und damit Apoptose auslöste, und Daidzein in einer Konzentration von 200 μM ohne Beeinflussung des Zellzyklus zur Apoptose führte [Su et al. 2000]. Interessanterweise waren in dieser Untersuchung maligne Harnwegsepithelzellen empfindlicher, während bei benignen Zellen kein Einfluss auf den Zellzyklus zu erkennen war.

Als Ursache der beschriebenen Störungen des Zellzyklus kann die Inhibierung der PTK ausgeschlossen werden, da der PTK-Inhibitor Herbimycin A im Experiment keine Apoptose auslöste [McCabe und Orrenius 1993]. Vielmehr gilt Genistein als Topoisomerase II-Hemmer [Markovits et al. 1989], und Equol und Daidzein könnten die Topoisomerase ebenfalls beeinflussen, da die meisten Substanzen, die mit Topoisomerase II wechselwirken, den Zellzyklus in der S- und G₂/M-Phase blockieren [Spinozzi et al. 1994].

Weiterhin könnten Phytoöstrogene direkt die DNA schädigen und dadurch eine geordnete Replikation unterbinden. Genistein induzierte im Experiment die Bildung von Mikronuklei und Chromosomenaberrationen, während Daidzein, Matairesinol, Secoisolariciresinol, Enterodiol und Enterolacton im Experiment keine Auswirkungen auf Endpunkte genetischer Schäden hatten [Kulling et al. 1998, 2002]. Die Genotoxizität von Genistein (ab 5 μM) konnte von anderen Autoren bestätigt und um die Wirkung von Equol (ab 18 μM) und O-DMA (ab 1 μM) auf die Bildung von Mikronuklei ergänzt werden [Schmitt et al. 2003; Di Virgilio et al. 2004]. Zu Daidzein ist die Datenlage widersprüchlich. Schmitt et al. [2003] konnten keine Induktion von Mikronuklei bis zu einer Konzentration von 100 μM Daidzein beobachten, während Di Virgilio et al. [2004] dies schon bei Konzentrationen ab 50 μM fanden.

Sonstige Effekte

Neben den beschriebenen, von mehreren Arbeitsgruppen bestätigten Wirkmechanismen der Phytoöstrogene auf Immunparameter wurden weitere Mechanismen vorgeschlagen. Nach Park [1999] inhibieren die Isoflavone Genistein und Daidzein in Konzentrationen ab 10 μM bis 50 μM die Glucoseaufnahme von Zellen und führen dadurch zu einer Hemmung der Zellfunktion. Des Weiteren könnte auch die Hemmung der Prostaglandin H_2 -Synthase-Aktivität durch Genistein ($\text{IC}_{50} = 7 \mu\text{M}$) die Verringerung der immunologischen Aktivität verursachen [Kniss et al. 1996]. Dieser Mechanismus hängt eng mit der Wirkung der Phytoöstrogene als Antioxidantien zusammen [Rimbach et al. 2003].

6.1.5 Zusammenfassung

Bei einem Überblick über die hier beschriebenen Wirkungen der Phytoöstrogene auf ausgewählte Parameter der Immunfunktion und über mögliche Wirkmechanismen (Abb. 6.3) fällt auf, dass in hohen Konzentrationen fast durchweg immunsuppressive Effekte auftraten, während immunstimulierende Niedrigdosiseffekte ausblieben. Ferner können für die hier gefundenen Effekte ER-vermittelte Mechanismen ausgeschlossen werden. Am wahrscheinlichsten ist wohl die Beeinflussung der Zellfunktionen durch toxische Effekte, da, wie oben und auf Seite 21 dargelegt, Genistein über 5 μM , Equol über 20-75 μM , DMA über 1 μM und eventuell Daidzein über 50 μM genotoxisch sind. Leider wurde im Zuge der Experimente dieser Arbeit keine Messung der Zellvitalität bei PBMC durchgeführt, sodass sich nur spekulieren lässt,

Wechselwirkungen mit dem System endogener Östrogene

- direkte Beeinflussung der Immunzellen mittels deren ER
- systemische Effekte
 - Beeinflussung der Synthese endogener Östrogene
 - Wechselwirkungen mit SHBG
 - Effekte auf die hypothalamisch-hypophysäre Achse

Inhibierung der PTK

- Beeinflussung der Proliferation und Funktion regulatorischer Zellen
- Beeinflussung der Funktion zytotoxischer und Antikörper produzierender Zellen

Beeinflussung des Zellzyklus und Genotoxizität

- Blockierung des Zellzyklus
- Induktion von Mikronuklei

Sonstige Effekte

- Inhibierung der Glucoseaufnahme in die Zelle
- Inhibierung der Prostaglandin H₂-Synthase
- Antioxidative Wirkung

Abbildung 6.3: Mögliche Mechanismen der Phytoöstrogeneffekte

dass der Rückgang der Zellfunktionen durch hohe Konzentrationen aller Phytoöstrogene zu einem erheblichen Anteil durch einen Rückgang der Zellvitalität verursacht wurde. Häufig wird in der Literatur ein Rückgang von Zellfunktionen beschrieben, ohne dass die Vitalität der Zellen laut Test mit Trypanblau beeinträchtigt war [Atluru et al. 1991; Atluru und Atluru 1991; Sheu et al. 2001]. Trypanblau dringt aber nur in diejenigen Zellen ein, deren Membran geschädigt ist. Ist der Zellzyklus blockiert und/oder werden Zellen apoptotisch, bleibt die Membranintegrität noch eine Zeit lang erhalten, während die Funktionen der Zellen nicht weiter ausgeführt werden und die Zellen zu einem späteren Zeitpunkt zugrunde gehen.

Wahrscheinlich beeinträchtigte eine Kombination aus Hemmung der PTK-Aktivität und Störung des Zellzyklus die Funktion der untersuchten Zellen. Am Anfang der Kette von Mechanismen könnte ein Rückgang der Proliferation stehen, verursacht durch Hemmung der PTK-Aktivität und Störung des Zellzyklus, der die Zahl der Zytokin produzierenden Zellen erniedrigt. Eine gestörte Signaltransduktion könnte die Zytokinproduktion weiter verringern, und eine niedrigere Zytokinkonzentration im umgebenden Milieu der Zellen verringert wiederum Proliferation und NK-Aktivität.

6.2 Experimente mit Milzzellen der Maus

Die Gabe des Isoflavonpräparats Prevastein an Tg.NK Mäuseweibchen erhöhte die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen und erniedrigte die Phagozytoseintensität von Granulozyten. Diese Veränderungen waren aber nur bei zehn Wochen alten Jungtieren erkennbar. Bei der terminalen Sektion mit 28 Wochen unterschieden sich die gemessenen Immunparameter nicht zwischen den Gruppen.

6.2.1 Einordnung und Bewertung der Ergebnisse

Eine Erhöhung der lytischen Aktivität der NK-Zellen konnte auch bei 12 bis 14 Wochen alten Mäusen beobachtet werden, die eine tägliche orale Gabe von 20 mg Genistein pro kg Körpergewicht erhielten [Guo et al. 2001]. Allerdings mussten dafür die Zellen mit IL-2 stimuliert werden. Die lytische Aktivität unstimulierter Zellen unterschied sich nicht von der der Kontrolle. Die Zytotoxizität von T_c-Zellen wurde schon durch eine Gabe von 6 mg/kg erhöht, während bei dieser Konzentration der Anteil der CD8⁺- wie auch der NK-Zellen unverändert blieb. Die basale Proliferation von Milzzellen wurde in den Untersuchungen von Guo et al. ebenfalls gesteigert.

Diese Effekte sollen nach Ansicht der Autoren zu der erhöhten Resistenz der mit Genistein supplementierten Tiere gegen transplantierte Lungenkrebszellen beigetragen haben.

Im Vergleich dazu berichten Yellayi et al. [2002; 2003] von negativen Effekten der Genistein-Supplementation. Subkutane tägliche Injektionen in Dosierungen von 8 bis 200 mg Genistein/kg Körpergewicht führten zu erhöhter Apoptose im Thymus, verringertem Thymusgewicht, Rückgang der CD4⁺CD8⁺ doppelt-positiven Zellen in Thymus, Milz und poplitealen Lymphknoten, peripherer Lymphozytopenie und verringerter humoraler und zellulärer Immunität. Einige Effekte waren besonders bei erwachsenen Tieren erst ab einer Dosis von 80 mg/kg erkennbar, bei juvenilen Mäusen führten jedoch schon 8 mg/kg zu signifikant niedrigeren Werten für Thymusgewicht, Anteil der Lymphozyten und CD4⁺-Zellen und humorale Immunität. Die Reversibilität der Behandlung belegten die Autoren mit einer vierwöchigen Erholungsphase ohne Genisteininjektionen am Beispiel der zellulären Immunität [Yellayi et al. 2003].

In einer weiteren Studie konnte ebenfalls eine immunsuppressive Wirkung von Genistein und Sojaprotein belegt werden [O'Connor et al. 2002]. Ratten, die mit Isoflavonen oder Sojaprotein supplementiertes Futter erhielten, stießen ins Abdomen transplantierte Herzen zu einem späteren Zeitpunkt ab als Kontrolltiere. Außerdem verringerte die intraperitoneale Injektion von 20 mg Genistein/kg KG/d über sieben Tage die IFN- γ -Produktion ex vivo. Vermutlich aufgrund der niedrigeren Dosierung konnte ein vergleichbarer Effekt auf die Zytokinproduktion in der hier vorgestellten Arbeit nicht beobachtet werden.

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Mäuse nahmen mit dem Futter je nach Dosisgruppe 1,1 mg, 3,4 mg bzw. 12,7 mg Genistein pro kg Körpergewicht (KG) auf. Damit lag die Zufuhr zwar im Bereich der Dosierungen von Guo et al. [2001] und Yellayi et al. [2002], aber durch die Art der Genisteinzufuhr sind die Ergebnisse nicht direkt miteinander vergleichbar. Yellayi et al. applizierten Genistein subkutan und umgingen damit die Metabolisierung im Gastrointestinaltrakt und den First-Pass-Effekt der Leber. Dadurch waren die initialen Genistein-Konzentrationen im Serum mit 6 $\mu\text{mol/l}$ bei Zufuhr von 8 mg/kg KG wesentlich höher als bei oraler Applikation, fielen aber auch schnell wieder auf basale Werte zurück. Eine orale Zufuhr führt zu wesentlich geringeren Serumwerten, wie 0,7 $\mu\text{mol/l}$ bei Zufuhr von 12,7 mg/kg KG in der vorliegenden Arbeit. Durch die stetige Zufuhr vor allem durch Genistein im Futter wird diese Serumkonzentration über einen längeren Zeitraum

aufrechterhalten. Die ausgeprägt negativen Effekte, von denen Yellayi et al. berichten, können durch die wiederholt sehr hohen Genisteinkonzentrationen verursacht worden sein, während gleichbleibend niedrige Konzentrationen wie bei Guo et al. [2001] eher positive Effekte zu haben scheinen.

Peritoneale Makrophagen von Mäusen zeigten nach 7-tägiger gastraler Gabe von 20 und 40 mg Daidzein/kg KG eine gesteigerte Phagozytoserate, 10 mg/kg KG blieben ohne Effekt [Zhang et al. 1997]. Die Mäuse der vorliegenden Arbeit nahmen täglich 0,6 mg, 2,0 mg bzw. 7,3 mg Daidzein/kg KG auf. Auch die Hochdosisgruppe liegt somit unter der Konzentration, die bei Zhang et al. keine Wirkung hatte. Dabei trat sogar eine Verringerung der Phagozytoseaktivität einzelner Monozyten in der Niedrig- und Hochdosisgruppe auf. Dies kann mehrere Gründe haben. Zum einen bestimmten Zhang et al. die Phagozytoserate peritonealer Makrophagen mit einer in vivo-Methode. Im Gegensatz dazu wurde in der vorliegenden Arbeit ex vivo die Phagozytoserate und -aktivität von Monozyten, der Vorläufer der Makrophagen, in der Milz bestimmt. Zum anderen ist das hier eingesetzte Prevastein ein Sojaproteinisolat mit einer Mischung unterschiedlichster Isoflavone und anderer Inhaltsstoffe, während Zhang et al. [1997], aber auch Guo et al. [2001] und Yellayi et al. [2002; 2003] reines Daidzein bzw. Genistein eingesetzt hatten.

Zusätzlich zu gesteigerter Proliferation und zytotoxischer Aktivität der NK- und T_c-Zellen konnten Guo et al. [2001] eine verstärkte Bekämpfung transplantierter Lungentumore feststellen. In der vorliegenden Arbeit kam es trotz erhöhter lytischer Aktivität der NK-Zellen in jungem Alter zu einer erhöhten Anzahl von Tumoren/Maus und zu erhöhter durchschnittlicher Tumorgroße bei den Tg.NK Mäusen [Thomsen 2005] (s. Abb 6.4). Die beschriebene Wirkung der Isoflavone auf Immunparameter der juvenilen Maus haben also keinen protektiven Einfluss auf die Entstehung von Tumoren der Brustdrüse bei den Tieren dieses für Brustkrebs anfälligen Stamms.

6.2.2 Mögliche Mechanismen

Über die Mechanismen der Isoflavonwirkung auf NK-Aktivität und Phagozytose kann nur spekuliert werden. Eine Möglichkeit ist die Beeinflussung der Prostaglandinsynthese durch Daidzein [Zhang et al. 1997]. Danach würde die Oxidation von Arachidonsäure in der Biosynthese von Prostaglandinen verhindert und der Spiegel der immunsuppressiven Prostaglandine erniedrigt. Allerdings sind dafür hohe Isoflavonkonzentrationen nötig. Niedrige Konzentrationen von Daidzein oder Genistein,

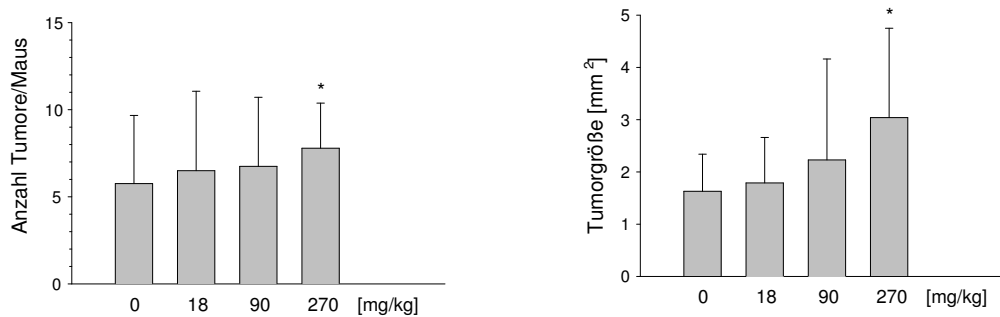


Abbildung 6.4: Anzahl der Tumoren pro Maus und die durchschnittliche Tumorgröße bei 28 Wochen alten Tg.NK Mäusen nach unterschiedlich hoher Dosierung mit Isoflavonen [Thomsen 2005]. * $p < 0,05$

wie in der vorliegenden Arbeit, stimulieren eher die Prostaglandinsynthese [Degen 1990].

Antiöstrogene Effekte von Genistein könnten für die von Guo et al. [2001] beobachtete gesteigerte zytotoxische Aktivität der NK- und T_c -Zellen verantwortlich sein, was vor dem Hintergrund der Suppression der lytischen Aktivität der NK-Zellen durch Östradiol plausibel ist [Curran et al. 2001]. Tatsächlich könnte dies auch die Ursache für die ganz ähnlichen Beobachtungen in der vorliegenden Arbeit sein. Bei den jugendlichen Tg.NK Mäusen war demnach die gesteigerte zytotoxische Aktivität der NK-Zellen eine Folge der antiöstrogenen Wirkung der Isoflavone, während die Effekte bei den erwachsenen Weibchen durch deren hohe Östrogenspiegel überdeckt wurden. Dies steht scheinbar im Gegensatz zu den Ergebnissen aus den in vitro-Experimenten, bei denen ER-vermittelte Effekte ausgeschlossen wurden. Im in vivo-Modell der Maus können aber noch weitere, indirekte antiöstrogene Wirkungen der Phytoöstrogene zum Tragen kommen, wie die Inhibierung von Enzymen der Östrogen- und die Steigerung der SHBG-Biosynthese.

Warum allerdings hohe Isoflavondosen zu verstärktem Tumorwachstum führten, kann damit nicht erklärt werden. Möglicherweise hängt dies mit der für diesen Mäusestamm charakteristischen Expression des *c-neu* Onkogens im Milchdrüsengewebe zusammen, das ein Protein kodiert, das zum Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) homolog ist [Muller et al. 1988]. EGF vermittelt Proliferationssignale über Protein-Tyrosin-Kinasen und es könnte sein, dass Genistein als bekannter Inhibitor der PTK mit der Signalkaskade des aktivierten *c-neu* Onkogens in einer Weise wechselwirkt, die zu verstärktem Tumorwachstum führt.

6.2.3 Zusammenfassung

Die Ergebnisse der hier vorgestellten Studie mit Isoflavonen an Mäusen lassen den Schluss zu, dass Isoflavone in jungem Alter die Elimination transformierter oder virusinfizierter Zellen zumindest bei diesem Mausmodell verbessern, während als Wirkmechanismus systemische antiöstrogene Effekte vermutet werden können. Allerdings ist in Abhängigkeit von der Dosis keine oder eine negative Wirkung auf die Tumörprävention zu erwarten. Die geringere Phagozytoseintensität der einzelnen Zellen könnte die Abwehr von Erregern oder die Elimination von Fremdkörpern verschlechtern. Diese Annahmen gelten allerdings nur für juvenile Tiere nur dieses Mausmodells. Der Vergleich mit Studien, die an anderen Mausstämmen mit veränderter Methodik und Einzelsubstanzen durchgeführt wurden [Zhang et al. 1997; Guo et al. 2001; Yellayi et al. 2002, 2003], zeigt, dass die dokumentierten Effekte extrem abhängig vom Versuchsdesign sind und Rückschlüsse auf andere Tierspezies und erst recht auf Wirkungen beim Menschen nicht möglich sind.

6.3 Humanstudie

6.3.1 Einordnung und Bewertung der Ergebnisse

Diejenigen Phytoöstrogene, die *in vitro* die ausgeprägtesten Effekte auf die untersuchten Immunparameter hatten, nämlich Genistein und Equol, hatten *in vivo* keinen Einfluss auf die Immunfunktion. Unter den Isoflavonen korrelierte einzig die Konzentration von O-DMA im Urin mit dem Anteil der NK-Zellen im peripheren Blut. Dagegen hing eine erhöhte Lignanausscheidung mit einer Verschiebung der Lymphozyten-Subpopulationen zusammen, was aber keinen signifikanten Einfluss auf die Produktion der Zytokine *ex vivo* hatte.

Unabhängig von den Korrelationen zwischen Immunmarkern und der Ausscheidung der Phytoöstrogene mit dem Urin fällt die große Variationsbreite der Ausscheidung auf (s. Tab. 6.1). Dies bestätigt einmal mehr die große Varianz der Metabolisierung im Gastrointestinaltrakt, die schon im Abschnitt 2.2.2 auf Seite 15 erwähnt wurde. Alle Probanden einer Interventionsgruppe hatten die gleiche Menge Phytoöstrogene zu sich genommen. Im Gegensatz dazu konnten Ritchie et al. [2004] die Genistein- und Daidzein-Aufnahme mit Lebensmitteln sehr gut mit der renalen Ausscheidung dieser Phytoöstrogene korrelieren. Dies allerdings nur, wenn die Autoren die Wer-

te zweier Probanden von der Regressionsanalyse ausschlossen. Außerdem lag die mittlere Aufnahme bei 11 mg Genistein und Daidzein pro Tag, nur ein Viertel der Gesamtisoflavonmenge der vorliegenden Arbeit. Es könnte also sein, dass bei höherer Zufuhr die Exkretion stärker streut.

Tabelle 6.1: PÖ-Ausscheidung im Urin von Männern [nmol/24 h] nach dreiwöchiger Supplementation mit PÖ-reichen Lebensmitteln

		Minimum	Maximum	$\bar{x}$
Isoflavongruppe	Genistein	1210	10870	5660
	Daidzein	2315	9390	6097
	Equol	13	20320	4827
	DMA	205	14249	4282
Lignangruppe	Secoisolariciresinol	130	3135	1361
	Matairesinol	19	190	65
	Enterodiol	1602	259547	112406
	Enterolacton	<1	221	54

Eine vierwöchige placebo-kontrollierte und doppel-blind durchgeführte Intervention mit 100 mg Isoflavonen/Tag hatte keinen Effekt auf bestimmte Immunparameter postmenopausaler Frauen [Paes 2001]. Die Parameter beinhalteten den Anteil der T_h -, T_c -, B- und NK-Zellen, die lytische Aktivität der NK-Zellen und die mitogen-aktivierte Proliferation und Produktion von IFN- γ und IL-2. Dass Paes keinen Einfluss auf den Anteil der NK-Zellen feststellen konnte, kann am Design der Studie und an der Art der Auswertung liegen. Die Autorin verglich die Ausprägung der Immunmarker zwischen der Interventions- und der Placebogruppe, denen jeweils neun Frauen angehörten. Die Studienteilnehmer in der Isoflavongruppe der vorliegenden Arbeit waren 20 Männer, und die Ausprägung der Immunmarker wurde mit der renalen Ausscheidung von vier ausgewählten Phytoöstrogenen korreliert. Diese Ausscheidung hatte eine sehr große Variationsbreite, genauso wie die Plasmakonzentration in der Studie von Paes ($\text{var}_{\text{Gen}}=0,2-1,2 \mu\text{M}$, $\bar{x}=0,4 \mu\text{M}$). Diese Variationsbreite wird durch den individuell unterschiedlichen Isoflavon-Metabolismus verursacht und könnte die Ausprägung der Immunmarker bedingen.

Hier stellt sich auch die Frage nach der Vergleichbarkeit von Plasma- und Urinwerten. Setchell et al. [2003] untersuchten die lineare Korrelation zwischen Plasmakonzentration von Daidzein bzw. Genistein und der Konzentration dieser Isoflavone im 24 h-Urin. Für Daidzein fanden sie nur einen schwachen, für Genistein jedoch

einen starken statistisch signifikanten Zusammenhang. Aus der hier beschriebenen Humanstudie liegen Plasmawerte für Equol und Enterolacton vor, die beide hochsignifikant mit der Ausscheidung im 24 h-Urin korrelieren (s. Abb. 6.5). Man kann also davon ausgehen, dass in der vorliegenden Arbeit Probanden mit hoher renaler Phytoöstrogenausscheidung hohe Plasmawerte des jeweiligen Phytoöstrogens aufwiesen und umgekehrt.

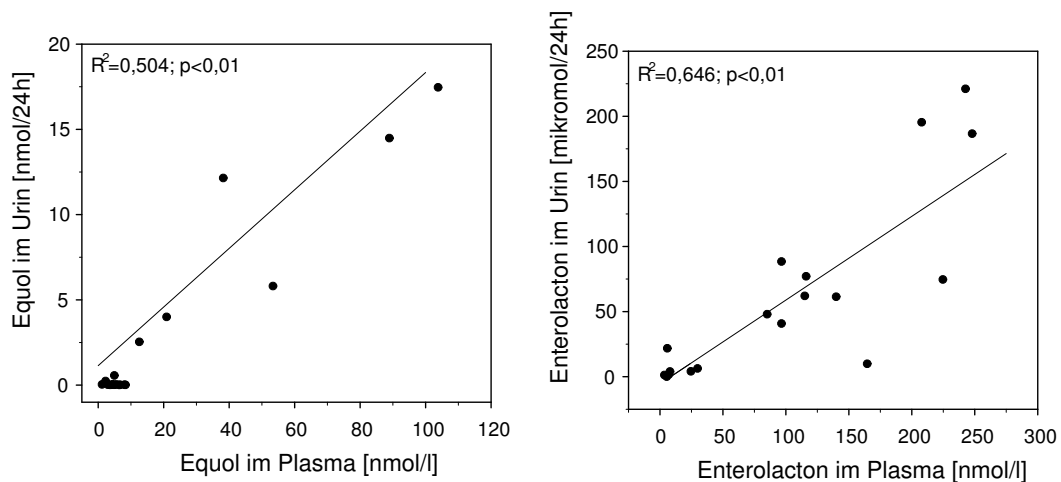


Abbildung 6.5: Lineare Korrelation zwischen der Plasmakonzentration von Equol und Enterolacton und der Ausscheidung dieser Metabolite im 24 h-Urin am Tag 22 der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Intervention mit PÖ-reichen Lebensmitteln.

Nach jeweils vierwöchiger Supplementation mit 0 mg, 10 mg bzw. 73 mg Isoflavonen pro Tag konnten bei 23 Männern und 18 postmenopausalen Frauen keine Effekte auf die Konzentration von inflammatorischen Proteinen und TNF- α im Serum gefunden werden. Einzig bei den teilnehmenden Frauen war nach der Phase mit 73 mg Isoflavonen pro Tag der Gehalt von IL-6 im Serum erhöht [Jenkins et al. 2002].

In einer weiteren Studie wurden 6 Frauen und 2 Männer jeweils 4 Wochen lang mit 15 g, 30 g bzw. 45 g Leinsaat pro Tag supplementiert. Es wurden keine Auswirkungen auf die Konzentration von Komplement C4 im Serum und auf den Anteil verschiedener Lymphozyten-Subpopulationen festgestellt [Clark et al. 1995]. Komplement C3 war während der Intervention leicht erhöht und ging im Lauf der Auswaschphase deutlich zurück, und CD11b auf neutrophilen Granulozyten wurde schon während der Intervention geringer exprimiert. Untereinheiten von Komplement C3 opsonieren Fremdkörper bzw. wirken inflammatorisch, und CD11b ist ebenfalls ein Protein, das die Phagozytose stimuliert. Die Intervention hatte also gegensätzliche Effekte. Außerdem decken sich die Ergebnisse von Clark et al. bezüglich der Wirkung des

Leinsaatverzehr auf die Populationen von T_h - und NK-Zellen nicht mit jenen der vorliegenden Arbeit. Ursachen können, wie oben schon dargestellt, die geringe Zahl der Studienteilnehmer bei gleichzeitig großer Variationsbreite der Lignankonzentration im Serum sein.

6.3.2 Mögliche Mechanismen

Die östrogene Wirksamkeit der von Jenkins et al. [2002] eingesetzten Isoflavone könnte nach Ansicht der Autoren Ursache für den Rückgang der IL-6-Konzentration im Serum der teilnehmenden Frauen gewesen sein. Sollte dieser Mechanismus tatsächlich für die hier dargestellten Zusammenhänge zwischen der Ausscheidung einzelner Phytoöstrogene und der Ausprägung bestimmter Immunparameter verantwortlich sein, müsste dieser Effekt bei dem Phytoöstrogen mit der höchsten östrogenen Wirksamkeit, Equol, auf jeden Fall zu sehen sein. Da dies nicht so ist, wurde die Immunmodulation in der hier dargestellten Humanstudie nicht über Östrogenrezeptoren auf den Leukozyten erreicht. Systemische östrogene Effekte lassen sich allerdings nicht ausschließen.

Lignane sind Antagonisten für den Rezeptor des plättchenaktivierenden Faktors, womit sich die antiinflammatorischen Effekte der von Clark et al. [1995] eingesetzten Leinsamen erklären ließen. Der plättchenaktivierende Faktor besitzt tatsächlich proinflammatorische Wirkungen, jedoch exprimieren diejenigen Leukozytenpopulationen, die in der vorliegenden Arbeit auf veränderte Lignanausscheidung reagierten, nämlich NK-Zellen und T-Lymphozyten, keine Rezeptoren für diesen Faktor [Müller et al. 1993].

Toxische Effekte und die Beeinflussung von Protein-Tyrosin-Kinasen scheinen ebenfalls unwahrscheinlich, da vor allem Populationsverschiebungen stattfanden, die zudem kaum Einfluss auf die Reaktion der Zellen auf mitogene Reize hatten.

Da vor allem die Ausscheidung der Lignane mit Veränderungen bei Immunparametern korrelierte, könnte man vermuten, dass andere Inhaltsstoffe des Leinsamens die Ursache für die Effekte darstellen. Zu nennen sind hier ungesättigte Fettsäuren und Ballaststoffe. Die im verwendeten Brot verbackene Leinsaat war zwar nicht entfettet, es wurden aber nur die Samenhülsen verwendet, deren Lignangehalt deutlich höher ist als der der ganzen Saat. Damit ist allerdings auch der Fettgehalt wesentlich geringer und die zusätzliche Zufuhr gesättigter Fettsäuren über diese Quelle ist als marginal zu betrachten. Gleiches gilt für die Ballaststoffzufuhr. Die mit dem

Studienbrot zugeführten Mengen sind gegenüber der Tageszufuhr von Ballaststoffen vernachlässigbar.

Damit kann nur darüber spekuliert werden, ob die zugeführten Isoflavone und Lignane lediglich ein Marker für Veränderungen sind, die durch andere Inhaltsstoffe der Lebensmittel verursacht wurden, oder ob sie, und wenn ja, mittels welcher Mechanismen, selbst die Auslöser der beobachteten Immunmodulationen waren.

6.3.3 Zusammenfassung

Die bei der hier vorgestellten Humanstudie aufgetretenen Zusammenhänge zwischen der renalen Ausscheidung von Phytoöstrogenen und der Ausprägung bestimmter Immunparameter betreffen vor allem Lignane und deren Metabolite einerseits und Lymphozytenpopulationen andererseits. Welche Mechanismen diesen Beobachtungen zugrunde liegen, ist völlig unklar. Weiterhin ist nur eine begrenzte Aussage darüber möglich, welche biologische Relevanz diese Ergebnisse besitzen, da sich nur etwa 2 % der Lymphozyten eines Menschen zu einem bestimmten Zeitpunkt (i.e. der Blutentnahme) im peripheren Blut aufhalten. Populationsverschiebungen in diesem kleinen Kompartiment finden nicht unbedingt in gleicher Weise in der Gesamtheit der Lymphozyten statt. Vielmehr ist davon auszugehen, dass die Vergrößerung oder Verkleinerung einer Population im peripheren Blut durch Austauschvorgänge zwischen den einzelnen Pools resultiert. Die Regulation dieses Austauschs und ihre biologische Bedeutung beim Gesunden sind noch unbekannt [Westermann und Pabst 1990].

6.4 Zusammenfassende Bewertung der Studien dieser Arbeit

6.4.1 Übersicht

In vitro hatten Phytoöstrogene, besonders Isoflavone, in supraphysiologischen Konzentrationen fast durchweg suppressive Effekte auf die Funktion der eingesetzten Zellen. Diese Effekte wurden nicht direkt durch Östrogenrezeptoren auf den Zellen vermittelt, sondern hatten wahrscheinlich unter anderem in der Hemmung von Protein-Tyrosin-Kinasen und in Störungen des Zellzyklus ihre Ursache. Dies beeinträchtigte vermutlich die Proliferation und die Zytokinproduktion der Zellen, wobei

eine geringere Zellzahl und eine niedrige Zytokinproduktion pro Zelle die Zytokin-konzentration im Ansatz noch weiter verringert, was wiederum die NK-Aktivität und die Proliferation beeinträchtigt.

Im Modell der Tg.NK Maus wurde bei jungen Tieren die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen gesteigert und die Phagozytoseintensität der Granulozyten verringert. Ersteres könnte die Elimination virusinfizierter und transformierter Zellen verbessern, letzteres die Elimination von Bakterien und anderen Fremdkörpern verschlechtern. Als mögliche Mechanismen kommen antiöstrogene Effekte in Betracht.

In der Humanstudie waren hohe renale Ausscheidungen von DMA und Enterolacton mit einem hohen Anteil Natürlicher Killerzellen im peripheren Blut korreliert, während die übrigen Lignane mit einer Verringerung von T_h - bzw. T_c -Zellen zusammenhängen. Ersteres spricht für tumorprotektive Wirkungen, letzteres könnte die Reaktion des Organismus auf Infektionen abschwächen. Die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen und die Antwort der Lymphozyten auf Mitogenaktivierung blieb allerdings trotz der Verschiebungen der Populationen unbeeinflusst. Hinweise auf mögliche Mechanismen gibt es nicht.

6.4.2 Bedeutung und Übertragbarkeit der Ergebnisse

Die Plasmakonzentrationen der Phytoöstrogene bei Maus ($c_{Gen}=0,71 \mu\text{M}$, $c_{Dai}=0,59 \mu\text{M}$) und Mensch ($c_{Eq} \leq 0,10 \mu\text{M}$, $c_{Enl} \leq 0,24 \mu\text{M}$) lagen unter den Konzentrationen, die in vitro immunsuppressive Effekte auslösten. Dies erklärt die fehlende Toxizität bei den in vivo-Experimenten. Auch Asiaten, die traditionell viele Sojabasierte Lebensmittel verzehren, erreichen nur etwa $0,4 \mu\text{mol}$ Genistein/l Plasma ([Adlercreutz et al. 1993], vgl. auch Tab. 2.3 auf Seite 17), unterliegen also nicht der Gefahr der akuten Schädigung. Allerdings ist es möglich, durch Supplemente Konzentrationen im Plasma zu erreichen, die in vitro toxisch sind oder nur eine Größenordnung unter toxischen Konzentrationen liegen. Paes [2001] berichtet von bis zu $1,2 \mu\text{mol}$ Genistein/l Plasma durch Zufuhr von 100 mg Isoflavon-Supplement täglich. In der vorliegenden Arbeit sank in vitro die Antwort von Monozyten auf Mitogen schon bei $1 \mu\text{M}$ Genistein im Ansatz. Alle erhobenen Parameter der PBMC außer der Apoptose- und Nekroserate wurden durch $10 \mu\text{M}$ Genistein beeinflusst, das ist nur das achtfache der bei Paes erreichten Konzentration. Säuglinge, die mit Formelnahrung auf Sojabasis ernährt werden, erreichen sogar $2,5 \mu\text{M}$ [Setchell et al. 1997]. Zudem kann im Gewebe die Konzentration von Nahrungsöstrogenen ein Mehrfaches

der Plasmakonzentration betragen (vgl. Tab. 2.5). Andererseits sind etwa 75 % der im Plasma vorliegenden Phytoöstrogene glukuronidiert bzw. sulfatiert [Zhang et al. 2003], während in vitro Aglykone eingesetzt wurden. Genisteinglukuronid erhöhte in vitro die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen stärker als das Aglykon [Zhang et al. 1999]. Ansonsten ist über die Unterschiede in der biologischen Aktivität zwischen den Konjugaten und Aglykonen noch wenig bekannt, sodass sich keine Aussage darüber treffen lässt, ob die Konjugierung der Phytoöstrogene in vivo ihre biologische Aktivität eher erhöht oder erniedrigt.

Der Genisteingehalt im Plasma der Tg.NK Mäuse betrug in der Hochdosisgruppe im Mittel $0,7 \mu\text{M}$. Tiere dieser Gruppe hatten in jungem Alter eine höhere lytische Aktivität der NK-Zellen und eine höhere phagozytische Aktivität der Granulozyten, wiesen aber in hohem Alter die höchste Tumorzinzidenz und die größten Tumore auf. Menschliche Säuglinge können, wie oben erwähnt, $2,5 \mu\text{M}$ Genistein im Plasma erreichen. Dies muss nicht zwangsläufig mit den gleichen immunologischen Befunden und dem gleichen Tumorrisiko einhergehen, da die eingesetzten Tg.NK Mäuse im Gegensatz zu gesunden Säuglingen bereits ein aktiviertes Onkogen exprimierten. Der von Guo et al. [2001] verwendete Mäusestamm B6C3F1 hatte unter Zufuhr von 6 mg Genistein/kg KG eine höhere Resistenz gegen eingepflanzte Lungentumore. Im Vergleich dazu nimmt ein vier Monate alter Säugling mit Sojaformel etwa 7-8 mg Genistein/kg KG zu sich [Setchell et al. 1997], könnte also nach den Ergebnissen von Guo et al. vor der Entstehung und Ausbreitung von Tumoren besser geschützt sein als gestillte Säuglinge. Wie schwierig solche Ergebnisse zu interpretieren sind, zeigt eine Studie mit Säuglingen im ersten Lebensjahr, die mit Formulanahrung auf Sojabasis bzw. Kuhmilchformel oder Muttermilch ernährt worden waren [Cordle et al. 2002; Ostrom et al. 2002]. Die Kinder wiesen gewisse Unterschiede bezüglich ihrer Leukozytensubpopulationen, Morbidität und Immunantwort auf Impfungen auf. Die Sojagruppe hatte allerdings nicht durchgängig höhere oder niedrigere Werte für Leukozytensubpopulationen und Immunantwort im Vergleich zur Kuh-/Muttermilchgruppe, einzig die Inzidenz von Diarrhoe und Mittelohrentzündung war in der Sojagruppe höher. Wie schon weiter oben erwähnt, sind Ergebnisse aus Studien mit Zelllinien oder Tieren sehr von der verwendeten Zellart bzw. Tierstamm abhängig, sodass sie sich nur mit Abstrichen auf den Menschen übertragen lassen.

Es ist wichtig zu beachten, dass in der Maus- und in der Humanstudie nicht isolierte Substanzen eingesetzt wurden, sondern Sojaproteinisolat bzw. phytoöstrogenreiche

Lebensmittel. Die beobachteten Effekte müssen nicht zwangsläufig von den darin enthaltenen Isoflavonen oder Lignanen herrühren, sondern können auch durch andere Inhaltsstoffe hervorgerufen worden sein. In diesem Fall würden Phytoöstrogene nur als Marker für eine Ernährung dienen, die reich an anderen biologisch aktiven Substanzen ist. Diesen Zusammenhang könnte eine humane Interventionsstudie mit isolierten Phytoöstrogenen klären.

6.4.3 Schlussfolgerungen

Immunmodulation durch Phytoöstrogene

Phytoöstrogenkonzentrationen über 10 μM bis 50 μM verringerten die Vitalität, Proliferation, NK-Aktivität und Zytokinproduktion von Jurkat T-Lymphozyten und primären humanen mononukleären Zellen des peripheren Bluts und steigerten die Apoptose- und Nekroserate der Jurkat-Zellen. Diese Effekte waren vor allem bei den Isoflavonen Genistein und Equol zu sehen, Lignane waren weit weniger wirksam. Sojaproteinisolat führte bei jungen, aber nicht bei erwachsenen Tg.NK Mäusen zur Steigerung der lytischen Aktivität von Natürlichen Killerzellen und Verringerung der Phagozytoseleistung der Granulozyten. Beim Menschen korrelierte nach Aufnahme phytoöstrogenreicher Lebensmittel die renale Ausscheidung einzelner Nahrungsöstrogene, besonders der Lignane und deren Metabolite, positiv mit dem Anteil Natürlicher Killerzellen und negativ mit dem Anteil von T_h - und T_c -Lymphozyten im peripheren Blut.

Beteiligte Mechanismen

In vitro kommen vor allem toxische Effekte zum Tragen, direkte Wirkungen über Östrogenrezeptoren können ausgeschlossen werden. Die Aktivitätsveränderungen der NK-Zellen und Granulozyten im Mausmodell sind vermutlich auf systemische antiöstrogene Effekte zurückzuführen, während die Populationsverschiebungen in der humanen Interventionsstudie auf noch ungeklärten Mechanismen beruhen.

Bedeutung der Ergebnisse

Eine normale Mischkost, die Phytoöstrogen-reiche Lebensmittel enthält, führt nicht zu Plasmakonzentrationen, die in vitro Funktionsstörungen von Lymphozyten verursachen. Dagegen können Personen, die Supplemente zu sich nehmen und Säuglinge,

die mit Formulanahrung auf Sojabasis ernährt werden, Phytoöstrogengehalte im Plasma erreichen, die nahe an Konzentrationen heranreichen, die *in vitro* die Funktion der Zellen beeinträchtigte. Dies müsste im Hinblick auf den Verbraucherschutz kritisch überprüft werden.

Ferner lässt die Interventionsstudie am Menschen keinen Schluss über eine mögliche Tumorprävention durch phytoöstrogenreiche Lebensmittel zu, da die Ausscheidung einzelner Nahrungsöstrogene, besonders der Lignane und deren Metabolite, mit dem Anteil Natürlicher Killerzellen positiv, mit dem Anteil von T_h - und T_c -Lymphozyten negativ korreliert ist. Die biologische Relevanz dieser Ergebnisse ist auch insofern unklar, als die Funktion der Zellen nicht beeinflusst wurde. Jedoch wurde dieser Effekt mit lediglich 100 g Brot, das mit Roggenkleie und Leinsaathülsen angereichert war, innerhalb von 3 Wochen erreicht, und man kann nicht ausschließen, dass durch eine längere Intervention auch Wirkungen auf die Funktion der Zellen sichtbar wären. Dies sollte in weiteren Versuchen beobachtet werden.

Die Aktivitätsveränderungen von NK-Zellen und Granulozyten bei Tg.NK Mäusen stehen nicht im Zusammenhang mit einer Erhöhung des Tumorrisikos durch hohe Isoflavondosen. Vielmehr wurde vermutlich durch ein Zusammenspiel der Isoflavone mit dem aktivierten Onkogen des transgenen Mausmodells das Tumorstadium begünstigt. Somit lässt sich das Ergebnis nicht direkt auf den Menschen übertragen, da das humane Analog dieses Onkogens (c-erbB-2) nur für einen Teil der Brustkrebserkrankungen des Menschen verantwortlich ist. Sollte allerdings eine Mutation in diesem Gen vorliegen, sollte von der Zufuhr von Isoflavonen eher abgeraten werden.

Anhang

Tabelle A1: Effekte nach Inkubation von Jurkat-Zellen mit PÖ (absolute Werte)

Proliferation (Absorption $A_{450nm} - A_{650nm}$)

	Gen		Dai		Eq		DMA		Sec		Mat		End		Enl	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
0,001µM	1,341	0,079	1,325	0,143	1,355	0,116	1,334	0,022	1,494	0,087	1,356	0,085	1,261	0,109	1,292	0,092
0,01µM	1,374	0,098	1,323	0,137	1,404	0,099	1,374	0,034	1,503	0,093	1,315	0,118	1,240	0,112	1,377	0,124
0,1µM	1,266	0,084	1,279	0,080	1,407	0,113	1,324	0,036	1,399	0,089	1,335	0,092	1,324	0,080	1,304	0,125
1µM	1,281	0,074	1,294	0,110	1,364	0,136	1,263	0,043	1,446	0,067	1,272	0,092	1,166	0,064	1,352	0,085
10µM	1,083	0,091	1,225	0,116	1,313	0,108	1,220	0,039	1,511	0,074	1,323	0,108	1,211	0,077	1,318	0,079
100µM	0,015	0,003	1,145	0,104	1,096	0,064	0,862	0,031	1,374	0,068	1,010	0,072	1,164	0,099	1,129	0,118
DMSO	1,280	0,084	1,267	0,116	1,405	0,133	1,181	0,056	1,497	0,041	1,214	0,062	1,336	0,138	1,239	0,075
Medium	1,436	0,067	1,293	0,174	1,402	0,122	1,145	0,049	1,511	0,089	1,281	0,115	1,508	0,166	1,474	0,044

Vitalität (% vitale Zellen)

	Gen		Dai		Eq		DMA		Sec		Mat		End		Enl	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
0,01 µM	99,44	0,04	99,29	0,04	99,35	0,12	99,31	0,02	99,28	0,16	99,33	0,02	99,24	0,12	99,38	0,10
10µM	99,16	0,03	99,39	0,06	98,97	0,15	99,18	0,03	99,45	0,04	99,23	0,07	99,31	0,17	99,38	0,07
100 µM	75,95	0,82	98,54	0,16	98,98	0,11	98,93	0,02	99,24	0,05	98,25	0,07	99,16	0,14	99,14	0,13
DMSO	99,36	0,08	99,34	0,11	99,35	0,10	99,40	0,11	99,16	0,18	99,41	0,03	99,41	0,14	99,43	0,04
Medium	99,52	0,08	99,26	0,09	99,30	0,06	99,26	0,13	99,23	0,20	99,31	0,13	99,46	0,07	99,55	0,07

Tabelle A1: Effekte nach Inkubation von Jurkat-Zellen mit PÖ (absolute Werte) - Fortsetzung

Apoptose (% apoptotische Zellen)

	Gen		Dai		Eq		DMA		Sec		Mat		End		Enl	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
0,001µM			3,61	0,15			3,77	0,18	3,39	0,11	3,67	0,25	3,17	0,10	3,26	0,14
0,01µM	3,88	0,45	3,51	0,05	3,22	0,09	3,65	0,16	3,39	0,16	3,61	0,16	3,14	0,09	3,12	0,13
0,1 µM	4,15	0,68	3,59	0,08	2,95	0,07	3,53	0,15	3,54	0,10	3,78	0,17	3,19	0,12	3,30	0,14
1 µM	3,91	0,43	3,59	0,12	3,06	0,11	3,76	0,11	3,35	0,07	3,78	0,23	3,15	0,14	2,97	0,16
10 µM	4,04	0,56	3,82	0,13	3,06	0,06	3,63	0,14	3,32	0,10	3,72	0,25	3,23	0,08	3,13	0,14
50 µM	5,57	0,51	3,84	0,17	3,31	0,10	2,93	0,18	3,34	0,05	3,00	0,05	3,02	0,12	3,11	0,19
100 µM	8,52	0,76	5,24	0,11	3,67	0,20	2,80	0,07	3,33	0,09	3,14	0,23	3,09	0,20	2,96	0,18
DMSO	3,63	0,32	3,36	0,17	3,03	0,08	3,56	0,09	3,42	0,09	3,77	0,25	3,16	0,14	3,46	0,15
Staurosporin	38,37	3,18	42,96	1,38	34,67	2,11	36,93	0,65	40,82	2,14	38,94	2,47	40,10	1,43	33,31	1,63
Medium	3,70	0,51	3,32	0,14	2,97	0,05	3,55	0,10	3,22	0,04	3,91	0,19	3,06	0,14	3,36	0,10

Nekrose (% nekrotische Zellen)

	Gen		Dai		Eq		DMA		Sec		Mat		End		Enl	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
0,001µM			1,45	0,12			1,76	0,16	1,50	0,12	1,46	0,06	1,49	0,28	1,05	0,09
0,01µM	1,67	0,14	1,52	0,17	1,23	0,15	1,68	0,07	1,45	0,09	1,29	0,06	1,30	0,12	0,95	0,04
0,1 µM	1,82	0,29	1,60	0,17	1,28	0,08	1,53	0,16	1,30	0,09	1,37	0,05	1,41	0,18	0,91	0,05
1 µM	1,84	0,14	1,53	0,18	1,25	0,08	1,50	0,12	1,32	0,09	1,25	0,11	1,33	0,17	0,91	0,10
10 µM	1,75	0,18	1,57	0,16	1,16	0,07	1,56	0,16	1,26	0,12	1,06	0,04	1,26	0,13	0,92	0,07
50 µM	2,81	0,36	1,59	0,15	1,54	0,24	1,00	0,06	1,40	0,13	0,95	0,09	1,27	0,16	0,97	0,06
100 µM	4,25	0,52	2,18	0,20	2,61	0,42	1,21	0,17	1,47	0,12	1,01	0,08	1,15	0,12	0,89	0,07
DMSO	1,48	0,15	1,43	0,06	1,36	0,12	1,36	0,07	1,49	0,14	1,48	0,08	1,47	0,23	1,08	0,14
Staurosporin	16,87	1,85	27,62	2,95	18,93	1,19	23,01	3,69	28,71	4,48	31,27	3,44	20,31	3,43	14,64	2,44
Medium	1,52	0,22	1,38	0,10	1,09	0,09	1,40	0,10	1,21	0,08	1,33	0,08	1,34	0,16	0,89	0,06

Tabelle A2: Effekte nach Inkubation von Jurkat-Zellen mit PÖ (transformiert auf DMSO = 0)

Proliferation

		Gen		Dai		Eq		DMA		Sec		Mat		End		Enl	
		MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
0,001 µM	10 ⁻⁹	5,51	6,03	4,2	5,65	-2,83	3,76	13,85	4,85	9,78	4,61	11,74	4,56	-3,55	8,86	6,33	4,42
0,01 µM	10 ⁻⁸	7,8	6,23	4,27	5,03	0,95	3,28	17,24	5,68	11,94	5,21	8,2	7,02	-5,66	7,6	11,5	7,23
0,1 µM	10 ⁻⁷	-0,7	5,33	2,06	3,4	0,88	3,75	13,36	7,22	7,54	4,05	9,83	4,05	1,59	7,85	4,85	6,12
1 µM	10 ⁻⁶	0,92	5,99	2,45	2,45	-1,34	8,77	7,48	4,03	10,95	4,13	4,53	4,11	-11,02	4,54	7,84	2,77
10 µM	10 ⁻⁵	-14,91	6,35	-3,02	4,6	-5,22	6,67	3,98	4,53	0,51	5,82	8,79	6,1	-7,4	6,42	7,36	6,09
100 µM	10 ⁻⁴	-98,83	0,2	-9,41	3,61	-20,14	5,81	-26,7	2,39	0,36	2,72	-16,99	3,59	-11,87	4,94	-7,36	10,05
DMSO	0,3%	0		0		0		0		0		0		0		0	
Medium (alle PE)		6,68	2,06														

Vitalität

		Gen		Dai		Eq		DMA		Sec		Mat		End		Enl	
		MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
0,01µM	10 ⁻⁸	0,76	0,05	-0,05	0,09	-0,19	0,17	-0,1	0,15	0,25	0,28	-0,08	0,03	-0,15	0,05	-0,08	0,06
10 µM	10 ⁻⁵	-0,23	0,06	0,04	0,19	-0,3	0,07	-0,22	0,12	0,4	0,15	-0,18	0,06	-0,07	0,11	-0,09	0,05
100 µM	10 ⁻⁴	-24,22	0,8	-0,81	0,26	-0,45	0,08	-0,48	0,14	0,17	0,15	-1,16	0,08	-0,15	0,16	-0,38	0,12
DMSO	0,3%	0		0		0		0		0		0		0		0	
Medium (alle PE)		0,018	0,048														

Tabelle A2: Effekte nach Inkubation von Jurkat-Zellen mit PÖ (transformiert auf DMSO = 0) - Fortsetzung

Apoptose

		Gen		Dai		Eq		DMA		Sec		Mat		End		Enl	
		MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
0,001 µM	10 ⁻⁹			8,09	5,55			6,01	5,73	-0,7	2,55	-2,26	3,43	0,84	3,69	-5,75	1,35
0,01 µM	10 ⁻⁸	7,24	7,56	5,46	4,67	6,78	5,43	2,31	3,9	-0,72	4,28	-3,26	4,41	-0,2	3,35	-9,3	4,52
0,1 µM	10 ⁻⁷	12,01	9,81	7,45	3,64	-2,24	4,26	-1,15	2,72	3,81	2,29	1,12	3,65	0,97	1,66	-3,76	6,17
1 µM	10 ⁻⁶	6,85	4,9	7,5	3,66	1,15	3,46	5,59	1,44	-1,83	1,78	1,12	4,73	-0,37	0,61	-13,13	6,82
10 µM	10 ⁻⁵	10,07	7,41	14,75	6,37	1,27	3,5	2,12	4,76	-2,64	2,82	-0,27	6,13	2,93	4,08	-8,96	4,32
50 µM	5x10 ⁻⁵	54,28	7,12	15,39	6,8	9,37	3,28	-17,57	5,76	-1,85	3,09	-23,02	4,35	-4,13	2,82	-7,06	6,13
100 µM	10 ⁻³	138	17,96	57,87	8,66	21,37	6,75	-21,29	1,42	-2,25	2,5	-16,32	3,59	-2,63	3,33	-13,87	6,02
DMSO	0,3%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Medium (alle PE)		-0,730	1,53														

Nekrose

		Gen		Dai		Eq		DMA		Sec		Mat		End		Enl	
		MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
0,001 µM	10 ⁻⁹			1,53	7,35			30,87	12,61	1,08	4,4	0,04	7,21	-0,02	4,76	3,07	13,94
0,01 µM	10 ⁻⁸	19,93	16,5	5,27	8,6	-8,07	10,92	25,57	10,57	-0,22	7,84	-11,46	6,91	-6,35	10,99	-3,81	16,11
0,1 µM	10 ⁻⁷	28,55	22,18	10,73	8,39	-4,94	4,38	14,69	14,98	-10,92	6,13	-6,3	5,81	-0,46	10,39	-8,92	15,12
1 µM	10 ⁻⁶	29,12	12,91	5,39	8,69	-6,7	4,53	10,68	7,98	-9,33	7,91	-14,64	8,55	-6,7	8,05	-13,81	4,14
10 µM	10 ⁻⁵	21,04	12,2	9,1	7,88	-11,88	8,67	16,53	13,37	-14,54	5,51	-27,73	3,95	-10,72	7,5	-10,63	8,53
50 µM	5x10 ⁻⁵	100,23	31,86	9,88	6,79	13,15	10,63	-26,35	4,19	-3,87	10,08	-33,06	5,73	-11,61	7,49	-17,2	7,59
100 µM	10 ⁻³	203,98	46,5	51,98	12,54	88,24	17,12	-8,06	15,45	-0,25	5,95	-31,34	5,38	-18,94	5,97	-13,8	6,76
DMSO	0,3%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Medium (alle PE)		-6,14	3,39														

Tabelle A3: Effekte nach Inkubation von PBMC mit PÖ (absolute Werte)

Proliferation (Absorption)

		Gen		Dai		Eq		DMA		Sec		Mat		End		Enl	
		MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
0,001 µM	10 ⁻⁹	0,762	0,214	0,618	0,155	0,996	0,177	0,952	0,139	1,648	0,102	1,682	0,149	1,722	0,202	1,709	0,197
0,01 µM	10 ⁻⁸	0,727	0,200	0,674	0,211	1,005	0,155	0,946	0,150	1,678	0,100	1,604	0,150	1,773	0,181	1,710	0,176
0,1 µM	10 ⁻⁷	0,769	0,220	0,680	0,199	0,996	0,164	1,014	0,202	1,831	0,161	1,615	0,096	1,895	0,214	1,625	0,178
1 µM	10 ⁻⁶	0,788	0,270	0,724	0,206	0,976	0,173	0,947	0,193	1,798	0,155	1,634	0,124	1,878	0,219	1,711	0,186
10 µM	10 ⁻⁵	0,548	0,263	0,667	0,253	0,739	0,200	0,895	0,172	1,507	0,116	1,540	0,106	1,789	0,256	1,695	0,167
50 µM	5x10 ⁻⁵	0,042	0,022	0,510	0,221	0,541	0,229	0,785	0,121	1,128	0,164	0,984	0,171	1,653	0,211	1,748	0,203
DMSO	0,2%	0,781	0,257	0,781	0,257	1,034	0,181	1,034	0,181	1,663	0,175	1,663	0,175	1,795	0,179	1,795	0,179
Medium	0	0,909	0,239	0,909	0,239	1,100	0,202	1,100	0,202	1,738	0,160	1,738	0,160	1,909	0,250	1,909	0,250

Apoptose (% apoptotische Zellen)

		Gen		Dai		Eq		DMA		Sec		Mat		End		Enl	
		MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
0,001 µM	10 ⁻⁹	16,53	2,57	15,56	3,27	13,69	4,22	15,27	1,86	13,00	3,48	13,58	3,51	9,41	2,78	11,58	3,30
0,01 µM	10 ⁻⁸	16,00	2,57	15,76	2,56	15,07	4,32	14,94	1,79	14,01	3,78	13,46	3,64	9,21	2,40	10,85	2,56
0,1 µM	10 ⁻⁷	16,42	2,16	15,85	2,47	14,59	3,36	13,39	2,55	13,09	3,38	13,85	4,13	12,03	1,54	12,41	1,33
1 µM	10 ⁻⁶	16,31	2,42	15,91	3,01	14,07	4,28	13,21	2,93	14,01	3,56	14,57	3,66	11,65	1,31	12,75	2,07
10 µM	10 ⁻⁵	16,33	2,46	16,60	2,51	14,85	3,55	12,99	2,88	15,42	2,93	13,86	3,55	9,01	0,96	11,32	1,50
50 µM	5x10 ⁻⁵	17,49	2,49	17,26	2,46	10,06	3,81	10,18	2,24	12,61	2,88	12,60	2,57	7,22	1,68	8,22	1,40
DMSO	0,2%	16,04	2,38	16,18	2,51	13,80	3,03	15,79	2,28	14,91	3,91	14,28	3,39	10,73	1,92	10,34	1,73
Medium	0	17,04	3,00	17,08	2,93	15,89	4,69	16,60	2,83	17,09	3,95	16,31	3,37	13,15	2,52	12,98	1,81

Nekrose (% nekrotische Zellen)

		Gen		Dai		Eq		DMA		Sec		Mat		End		Enl	
		MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
0,001 µM	10 ⁻⁹	2,27	0,34	2,25	0,33	2,73	0,05	3,08	0,26	2,75	0,17	3,12	0,11	2,63	0,53	3,09	0,51
0,01 µM	10 ⁻⁸	2,41	0,31	2,37	0,38	2,60	0,04	3,19	0,24	3,09	0,27	3,02	0,41	3,09	0,58	3,11	0,54
0,1 µM	10 ⁻⁷	2,37	0,34	2,34	0,38	2,72	0,01	3,07	0,07	2,98	0,25	2,89	0,25	3,04	0,61	3,22	0,32
1 µM	10 ⁻⁶	2,30	0,35	1,98	0,19	2,67	0,01	3,12	0,11	3,01	0,20	2,90	0,34	3,10	0,50	3,05	0,57
10 µM	10 ⁻⁵	2,42	0,28	2,20	0,29	2,75	0,31	3,11	0,28	3,27	0,31	3,26	0,43	3,09	0,49	3,14	0,66
50 µM	5x10 ⁻⁵	2,60	0,38	2,38	0,31	3,52	0,46	3,16	0,28	3,85	0,41	2,90	0,39	3,37	0,66	3,19	0,77
DMSO	0,2%	2,33	0,31	2,34	0,28	3,00	0,18	4,03	0,79	3,05	0,21	3,02	0,31	3,29	0,54	3,09	0,48
Medium	0	2,55	0,40	2,45	0,26	2,99	0,15	3,57	0,43	3,38	0,14	3,21	0,17	3,23	0,28	3,27	0,50

Tabelle A3: Effekte nach Inkubation von PBMC mit PÖ (absolute Werte) - Fortsetzung

NK ohne IL-2 (% lysierte Zellen)

		Gen		Dai		Eq		DMA		Sec		Mat		End		Enl	
		MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
0,001 µM	10 ⁻⁹	59,11	11,21	56,72	10,75	40,69	8,33	42,17	8,59	55,51	10,89	55,86	10,85	65,18	4,98	65,01	4,74
0,01 µM	10 ⁻⁸	58,78	11,22	58,90	10,65	40,83	8,07	40,99	8,01	56,11	10,57	56,32	10,66	67,05	3,87	65,60	5,19
0,1 µM	10 ⁻⁷	59,65	11,93	58,03	10,85	42,02	8,15	41,42	7,60	55,82	10,04	58,21	10,92	65,18	4,68	66,31	3,84
1 µM	10 ⁻⁶	61,16	11,06	58,41	9,50	41,50	7,88	41,18	6,66	56,26	10,30	57,17	11,05	65,67	5,18	65,32	4,82
10 µM	10 ⁻⁵	53,02	10,48	57,19	11,18	38,59	7,43	42,08	6,88	57,97	11,20	56,98	10,84	64,31	4,62	65,37	4,70
50 µM	5x10 ⁻⁵	24,15	6,20	47,02	10,77	31,94	7,46	38,31	6,49	53,53	10,18	48,11	9,55	64,55	3,56	63,03	4,45
DMSO	0,2%	61,49	11,80	58,06	10,85	40,46	7,03	40,71	7,64	54,41	10,30	54,79	9,92	63,07	6,03	63,45	5,22
Medium	0	62,35	9,79	58,87	9,00	39,74	7,03	39,65	8,27	51,33	10,49	53,70	10,77	60,88	5,39	62,92	5,20

NK mit IL-2 (% lysierte Zellen)

		Gen		Dai		Eq		DMA		Sec		Mat		End		Enl	
		MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
0,001 µM	10 ⁻⁹	78,98	6,52	77,78	7,14	72,78	5,19	71,32	6,32	77,38	10,06	78,13	9,68	83,62	2,51	82,63	3,53
0,01 µM	10 ⁻⁸	81,09	7,06	78,95	6,84	71,62	5,70	71,47	5,31	77,60	9,76	77,74	9,99	83,01	3,23	82,25	3,60
0,1 µM	10 ⁻⁷	80,32	7,30	78,50	7,20	72,19	5,57	73,86	4,59	77,55	10,30	77,97	10,05	82,32	3,41	83,54	3,14
1 µM	10 ⁻⁶	79,30	7,41	78,06	6,48	72,13	5,52	72,11	5,61	77,79	9,95	78,43	9,35	82,43	3,59	82,66	3,23
10 µM	10 ⁻⁵	78,27	8,03	78,51	6,88	68,91	6,33	70,13	5,70	77,45	9,87	76,71	9,76	83,14	2,45	83,41	2,96
50 µM	5x10 ⁻⁵	59,78	11,39	77,98	8,25	63,47	7,47	67,12	5,94	75,20	9,47	77,76	9,04	81,14	3,11	81,46	2,92
DMSO	0,2%	78,89	7,96	76,73	7,91	71,10	5,79	70,81	6,55	87,04	2,05	87,64	2,68	82,68	3,52	83,54	3,42
Medium	0	84,68	4,50	79,54	6,49	72,07	5,61	71,04	6,13	77,24	9,96	78,21	10,05	82,74	2,38	84,30	1,98

IFN-gamma (pg/ml)

		Gen		Dai		Eq		DMA		Sec		Mat		End		Enl	
		MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
0,001 µM	10 ⁻⁹	872,1	237,0	828,1	268,3	778,3	156,2	802,1	189,1	938,6	243,3	1050,4	181,9	1181,1	232,8	1244,8	243,4
0,01 µM	10 ⁻⁸	813,1	218,7	755,0	230,9	701,5	142,0	667,9	168,7	847,7	213,3	1018,8	191,5	1052,3	225,4	1187,5	250,5
0,1 µM	10 ⁻⁷	791,5	215,9	766,0	225,3	663,4	149,2	639,8	147,2	885,6	225,4	996,9	197,7	1033,6	234,6	1292,8	275,9
1 µM	10 ⁻⁶	708,5	218,9	778,7	240,2	655,3	139,7	665,1	162,1	889,0	230,1	1015,9	228,0	1032,6	244,6	1347,6	299,6
10 µM	10 ⁻⁵	471,2	169,2	709,9	237,8	488,8	125,9	539,5	130,0	846,7	264,7	940,4	215,9	1069,6	253,1	1229,1	254,9
50 µM	5x10 ⁻⁵	33,6	10,3	614,5	211,8	143,2	66,2	379,8	117,2	668,3	211,8	711,4	193,3	993,0	234,9	1175,6	288,3
DMSO	0,2%	803,9	244,6	806,7	238,1	752,3	161,0	649,5	148,1	906,6	224,5	1080,2	240,8	1186,4	272,3	1310,6	302,7
Medium	0	956,5	289,4	1012,0	316,9	896,3	191,2	699,9	159,5	887,0	231,0	1226,6	251,4	1224,6	303,0	1528,2	329,8

Tabelle A3: Effekte nach Inkubation von PBMC mit PÖ (absolute Werte) - Fortsetzung

IL-2 (pg/ml)

		Gen		Dai		Eq		DMA		Sec		Mat		End		Enl	
		MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
0,001 µM	10 ⁻⁹	968,6	262,4	1021,7	321,1	230,9	58,7	390,3	104,6	649,4	62,9	661,2	57,8	897,1	195,4	861,8	116,0
0,01 µM	10 ⁻⁸	848,8	215,6	880,7	232,5	242,9	69,6	372,5	95,0	588,7	46,8	597,8	55,8	900,5	164,5	914,8	162,4
0,1 µM	10 ⁻⁷	835,5	245,9	884,7	247,2	230,6	62,9	375,4	106,3	611,3	53,6	651,3	65,6	893,3	157,0	984,6	188,2
1 µM	10 ⁻⁶	826,0	240,8	827,0	256,6	229,0	60,6	387,0	112,3	611,3	45,0	659,3	76,0	852,7	148,9	974,2	197,6
10 µM	10 ⁻⁵	705,1	226,3	833,6	272,1	164,6	55,8	379,3	91,3	586,9	30,0	659,0	62,0	805,3	122,4	934,6	166,6
50 µM	5x10 ⁻⁵	251,7	100,9	745,0	259,3	56,3	25,0	302,4	85,3	505,4	38,9	557,8	56,8	787,1	95,8	1024,8	138,9
DMSO	0,2%	920,0	284,0	914,4	265,1	242,8	66,9	386,6	107,3	666,4	53,9	626,8	55,5	821,1	122,9	930,3	147,1
Medium	0	1292,6	312,8	1243,0	326,4	297,9	81,4	459,8	118,5	749,3	69,7	724,1	121,1	855,7	122,7	982,2	203,9

IL-4 (pg/ml)

		Gen		Dai		Eq		DMA		Sec		Mat		End		Enl	
		MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
0,001 µM	10 ⁻⁹	16,96	1,31	14,30	2,01	20,48	3,81	22,45	5,24	28,47	5,16	29,97	5,77	25,12	5,29	29,51	6,75
0,01 µM	10 ⁻⁸	14,76	1,56	14,73	1,23	20,22	4,01	20,44	4,53	26,36	5,20	26,10	4,46	25,46	5,68	28,65	6,52
0,1 µM	10 ⁻⁷	13,57	1,06	13,98	1,41	20,51	3,64	19,58	3,96	24,09	4,72	26,75	5,11	26,14	4,94	29,05	7,03
1 µM	10 ⁻⁶	13,91	1,32	14,29	1,50	18,50	3,38	19,75	4,37	26,21	5,73	26,83	5,42	25,52	5,43	28,21	5,82
10 µM	10 ⁻⁵	10,50	0,70	12,80	1,31	15,04	3,79	19,19	5,39	24,00	3,55	26,59	5,36	26,16	5,09	28,20	5,79
50 µM	5x10 ⁻⁵	4,62	0,62	10,18	1,53	6,46	2,08	17,28	4,04	20,85	3,73	18,87	2,56	22,96	4,82	26,38	5,69
DMSO	0,2%	15,04	1,41	14,79	1,30	20,80	4,16	20,06	3,95	25,42	4,11	27,95	5,63	27,69	6,78	27,54	6,81
Medium	0	26,51	2,79	28,18	3,79	31,54	6,70	28,12	6,49	35,17	6,73	35,06	6,03	33,74	6,52	36,05	7,92

TNF-alpha (pg/ml)

		Gen		Dai		Eq		DMA		Sec		Mat		End		Enl	
		MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
0,001 µM	10 ⁻⁹	7304,5	1852,7	8522,3	2748,3	9607,5	2217,8	7803,8	2190,1	12240,8	1004,1	13939,5	893,7	13303,8	1825,8	11254,8	1772,4
0,01 µM	10 ⁻⁸	6080,8	1342,4	7174,3	2248,5	8188,8	1655,2	7856,3	1637,0	11430,0	1180,6	13172,0	1339,7	11972,0	1728,4	11508,5	2040,9
0,1 µM	10 ⁻⁷	5964,3	1375,1	6201,3	1606,7	7824,8	1670,1	8037,0	1603,9	11129,0	1129,4	13198,8	1513,2	12530,5	1657,9	11158,3	1950,4
1 µM	10 ⁻⁶	5408,3	1268,0	6567,5	1791,6	7752,8	1730,2	7590,3	1342,8	12351,5	1537,6	12619,3	1028,0	12219,8	1644,7	12197,3	2070,5
10 µM	10 ⁻⁵	2369,3	555,6	5754,5	1544,2	7160,0	1564,7	7295,3	1320,8	11880,5	1658,4	12121,3	1156,5	12589,0	1620,4	12084,5	2228,0
50 µM	5x10 ⁻⁵	306,6	43,1	5418,5	1757,1	2884,3	1017,3	6413,3	1222,5	9617,3	1300,8	8265,3	1102,8	11815,5	1905,3	10987,0	1656,5
DMSO	0,2%	6233,5	1433,7	6685,3	1792,0	8407,8	1779,5	8778,8	1640,4	12935,0	1468,4	14208,5	1334,2	12653,3	1816,7	12734,3	1681,8
Medium	0	4146,3	842,2	4475,5	1065,7	8221,8	1764,5	8355,0	1933,8	11712,5	615,4	12801,3	1037,3	12186,8	1625,5	11946,5	1859,4

Tabelle A4: Effekte nach Inkubation von PBMC mit PÖ (transformiert auf DMSO = 0)

Proliferation

		Gen		Dai		Eq		DMA		Sec		Mat		End		Enl	
		MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
0,001 µM	10 ⁻⁹	1,3	6,43	-16	5,51	-3,73	1,37	-6,4	6,63	1,69	10,81	2,24	6,42	-2,47	1,49	-3,98	3,39
0,01 µM	10 ⁻⁸	-2,91	4,11	-12,54	2,33	-6,17	1,69	0,15	4,43	3,89	12,08	-2,96	4,04	-1,12	0,92	-4,17	5,5
0,1 µM	10 ⁻⁷	1,76	4,36	-9,34	5,97	-0,49	2,85	-4,7	2,19	12,65	13,48	-0,93	7,92	6,31	2,27	-9,04	2,85
1 µM	10 ⁻⁶	1,07	5,8	-3,69	4,6	-8,51	7,42	-13,37	2,54	10,38	12,11	0,09	8,8	6,65	3,27	-3,97	0,6
10 µM	10 ⁻⁵	-38,5	9,32	-18,65	5,48	-19,21	10,78	-12,33	11,04	-7,77	7,85	-6,07	5,42	3,42	1,83	-5,45	1,25
50 µM	5x10 ⁻⁵	-95,69	1,57	-41	9,47	-25,37	12,58	-17,04	2	-30,79	11,78	-41,12	6,09	-6,39	3,34	-0,92	2,71
DMSO	0,2%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Medium (alle PE)		10,17	2,28														

Apoptose

		Gen		Dai		Eq		DMA		Sec		Mat		End		Enl	
		MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
0,001 µM	10 ⁻⁹	2,68	4,69	-7,56	8,22	-2,8	9,28	-0,86	11,94	-12,66	4,65	-6,48	6,88	-15,65	10,41	7,92	17,62
0,01 µM	10 ⁻⁸	-1,15	2,89	-2,1	4,75	7,55	7,73	-3,08	11,3	-6,88	4,52	-8	4,21	-16,44	8,13	4,34	20,61
0,1 µM	10 ⁻⁷	3,33	2,88	-1,57	2,98	5,47	1,19	-14,14	12,95	-12,34	3	-7,49	10,4	15,64	16,5	22,19	7,13
1 µM	10 ⁻⁶	1,92	2,17	-3,48	5,16	0	9,1	-16,11	14,11	-4,94	5,32	1,11	2,46	11,04	8,07	25,09	17,65
10 µM	10 ⁻⁵	1,75	0,69	2,87	0,94	7,16	2,24	-16,95	14,83	10,07	9,56	-4,15	2,38	-13,08	11,25	11,73	13,54
50 µM	5x10 ⁻⁵	9,56	1,56	8,1	4,28	-29,78	12,19	-34,83	11,66	-13,16	6,06	-9,84	2,72	-33,73	6,18	-19,99	9,55
DMSO	0,2%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Medium (alle PE)		13,49	2,27														

Nekrose

		Gen		Dai		Eq		DMA		Sec		Mat		End		Enl	
		MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
0,001 µM	10 ⁻⁹	-3,57	3,2	-3,4	10,71	-8,44	7,02	-20,6	7,85	-9,47	4,31	5,61	7,32	-20,55	10,66	0,03	1,36
0,01 µM	10 ⁻⁸	4,04	4,73	-0,62	7,47	-12,81	6,43	-17,41	9,64	0,84	2,5	0,22	10,39	-6,91	2,43	0,26	1,78
0,1 µM	10 ⁻⁷	1,82	5,7	0,47	12,49	-8,89	4,99	-19,09	12,53	-2,45	2,99	-3,32	4,88	-8,62	3,36	6,16	7,45
1 µM	10 ⁻⁶	-1,71	6,93	-14,4	4,98	-10,53	5,56	-18,2	11,66	-0,96	4,65	-4,18	3,5	-5,63	3,76	-1,75	6,14
10 µM	10 ⁻⁵	5,76	7,64	-5,6	5,96	-8,63	4,85	-20,11	7,19	7,17	7,12	7,3	6,47	-5,85	3,33	0,26	6,53
50 µM	5x10 ⁻⁵	12,47	9,28	1,69	6,02	16,87	8,36	-18,59	8,61	25,35	5,79	-4,53	5,63	1,35	4,48	0,86	8,97
DMSO	0,2%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Medium (alle PE)		5,25	2,08														

Tabelle A4: Effekte nach Inkubation von PBMC mit PÖ (transformiert auf DMSO = 0) - Fortsetzung

NK ohne IL-2

		Gen		Dai		Eq		DMA		Sec		Mat		End		Enl	
		MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
0,001 µM	10 ⁻⁹	-3,33	1,96	-1,95	2,82	2,1	6,56	5,82	2,25	1,27	2,1	0,73	3,34	3,98	4,44	1,82	1,47
0,01 µM	10 ⁻⁸	-3,48	3,79	1,95	1,17	6,51	0,82	1,94	0,49	3,69	3,07	2,38	3,64	10,45	8,71	4,52	1,07
0,1 µM	10 ⁻⁷	-3,59	1,32	0,07	1,03	4,87	1,72	0,15	4,86	3,7	2,01	5,59	1,77	4,37	4,74	8,03	5,84
1 µM	10 ⁻⁶	0,48	2,03	2,61	3,56	-0,69	5,33	3,12	4,32	4,14	1,35	3,2	3,01	4,5	3,33	4,06	1,73
10 µM	10 ⁻⁵	-13,35	3,4	-2,19	1,26	-4,77	5,93	3,09	3,19	6,21	1,19	3,1	2,44	2,74	4,14	5,44	2,73
50 µM	5x10 ⁻⁵	-62,09	3,69	-21,39	4,64	-23,21	13,28	-8,67	2,75	-1,04	3,84	-12,95	5,2	4,47	7,18	-1,33	1,95
DMSO	0,2%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Medium (alle PE)		-1,46	2,88														

NK mit IL-2

		Gen		Dai		Eq		DMA		Sec		Mat		End		Enl	
		MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
0,001 µM	10 ⁻⁹	0,83	2,5	1,81	1,52	2,69	1,97	0,84	0,45	0,3	0,34	0,08	0,65	1,31	1,39	-1,11	0,86
0,01 µM	10 ⁻⁸	3,31	2,02	3,56	2,35	0,85	1,57	1,52	2,4	0,28	0,54	-0,11	1,08	0,44	0,43	-1,57	0,95
0,1 µM	10 ⁻⁷	2,18	1,29	2,75	1,44	1,68	1,11	5,29	3,75	0,74	0,24	0,23	0,7	-0,41	0,69	0,05	0,79
1 µM	10 ⁻⁶	0,81	1,08	2,55	2,7	1,59	0,8	2,27	1,85	0,62	0,34	-0,13	0,8	-0,31	0,77	-1,03	0,79
10 µM	10 ⁻⁵	-0,78	2,18	2,93	1,99	-3,3	1,53	-0,59	1,61	0,03	1,2	-1,54	1,2	0,74	1,45	-0,08	1,04
50 µM	5x10 ⁻⁵	-26,46	8,46	1,52	1,68	-11,38	3,83	-4,94	2,58	-3	1,27	-1,24	1,2	-1,81	0,45	-2,42	1,04
DMSO	0,2%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Medium (alle PE)		2,351	1,092														

IFN-gamma

		Gen		Dai		Eq		DMA		Sec		Mat		End		Enl	
		MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
0,001 µM	10 ⁻⁹	15,04	7,31	3,56	10,05	11,45	8,45	12,2	5,83	2,4	1,92	4,02	10,54	9,79	8,95	0,63	8,19
0,01 µM	10 ⁻⁸	6,23	6,57	-8,43	2,71	-9,57	1,56	-1,98	2,63	-7,13	4,4	-1,37	6,83	-8,88	3,42	-9,81	4,28
0,1 µM	10 ⁻⁷	4,21	6,34	-5,01	0,68	-18,04	6,29	-2,32	3,13	-3,76	3,21	-4,83	5,57	-10,56	2,49	-0,65	3,66
1 µM	10 ⁻⁶	-13,43	2,67	-7,37	7,5	-17,31	0,79	0,6	4	-4,27	5,6	-6,82	3,68	-9,63	3,82	5,04	2,2
10 µM	10 ⁻⁵	-45,8	5,17	-15,09	4,82	-35,24	9,18	-18,27	3,41	-13,25	9,74	-14,18	2,97	-9,66	1,69	-4,96	4,79
50 µM	5x10 ⁻⁵	-95,39	0,68	-27,25	7,23	-73,22	5,19	-45,75	6,45	-31,94	8,56	-38,59	8,61	-15,77	1,32	-17,43	4,4
DMSO	0,2%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Medium (alle PE)		13,24	2,23														

Tabelle A4: Effekte nach Inkubation von PBMC mit PÖ (transformiert auf DMSO = 0) - Fortsetzung

IL-2

		Gen		Dai		Eq		DMA		Sec		Mat		End		Enl	
		MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
0,001 µM	10 ⁻⁹	10,76	6,83	7,07	9,81	-1,84	4,42	4,12	4,75	-2,14	6,65	5,6	2,18	7,17	17,48	-8,1	2,29
0,01 µM	10 ⁻⁸	-1,4	7,04	-1,04	4,52	6,12	4,17	-1,39	3,1	-11,54	2,28	-4,66	1,78	8,04	11,43	-1,2	2,24
0,1 µM	10 ⁻⁷	-7,38	1,99	-1,58	2,63	2,75	10,55	-4,59	3,43	-8,1	3,85	3,58	2,04	6,45	10,03	7,19	3,42
1 µM	10 ⁻⁶	-8,47	3,08	-9,97	5,58	-4,21	2,51	-1,43	12,33	-7,88	3,36	4,6	4,98	2,06	8,3	4,95	6,75
10 µM	10 ⁻⁵	-24,25	1,31	-11,78	4,81	-25,14	0,2	0,1	6,32	-11,1	3,83	5,18	3,27	-3,52	2,72	2	1,1
50 µM	5x10 ⁻⁵	-70,36	7,67	-21,56	5,56	-67,96	8,74	-22,93	8,3	-23,85	3,2	-11,13	2,9	-8	4,78	7,52	4,36
DMSO	0,2%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Medium (alle PE)		23,06	4,330														

IL-4

		Gen		Dai		Eq		DMA		Sec		Mat		End		Enl	
		MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
0,001 µM	10 ⁻⁹	13,39	4,04	-2,66	10,86	-7,49	0,69	-1,63	5,82	11,1	4,68	8,8	6,69	-7,18	14,31	6,2	9,78
0,01 µM	10 ⁻⁸	-2,02	4,82	0,28	5,37	-7,97	2,95	-6,4	3,58	2,11	4,42	-4,17	6,35	-5,5	12,47	2,56	4,1
0,1 µM	10 ⁻⁷	-9,31	1,84	-5,6	3,15	-2,14	4,93	-8,85	3,43	-6,33	4,46	-3,35	2,8	-3,15	12,34	4,03	5,84
1 µM	10 ⁻⁶	-7,52	1,26	-3,77	2,61	-14,78	0,41	-2,64	4,83	0,34	6,11	-4,2	2,22	-6,55	7,52	2,66	7,18
10 µM	10 ⁻⁵	-29,24	4,91	-13,8	1,58	-26,94	6,23	-8,17	7,88	-4,89	2,65	-4,49	3,33	-6,27	3,89	1,24	5,33
50 µM	5x10 ⁻⁵	-68,71	4,51	-31,87	6,85	-62,78	0,27	-15,46	4,05	-18,12	3,78	-29,45	5,24	-18,98	5,85	-3,59	5,27
DMSO	0,2%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Medium (alle PE)		46,41	5,02														

TNF-alpha

		Gen		Dai		Eq		DMA		Sec		Mat		End		Enl	
		MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
0,001 µM	10 ⁻⁹	16,17	5,98	19,34	11,38	9,3	8,47	-10,85	7,71	-3,93	5,12	-1,01	3,25	4,41	3,43	-8,59	7,58
0,01 µM	10 ⁻⁸	-1,41	1,73	3,8	5,06	-8,39	3,32	-7,04	5,28	-11	3,42	-7,19	4,18	-5,18	0,49	-5,04	5,55
0,1 µM	10 ⁻⁷	-4,14	2,59	-5,38	3,29	-13,32	9,11	-2,74	4,54	-13,57	1,21	-7,59	2,49	-0,45	5,37	-9,48	5,27
1 µM	10 ⁻⁶	-13,62	0,63	-2,69	2,01	-16,62	0,53	-12,16	3,57	-4,84	2,31	-10,66	3,6	-4,74	1,99	1,51	3,07
10 µM	10 ⁻⁵	-59,75	5,87	-12,58	3,76	-20,38	1,46	-16,42	0,93	-9,02	2,73	-14,64	2,27	-0,14	3,59	1,22	5,67
50 µM	5x10 ⁻⁵	-94,49	0,86	-18,33	8,75	-55,14	8,09	-27,21	3,3	-26,21	3,79	-42,14	5,2	-10	5,28	-12,11	2,45
DMSO	0,2%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Medium (alle PE)		-12,01	2,58														

Tabelle A5: Effekte nach Verfütterung eines Sojaproteinisolats an Mäuse

10 Wochen

Konzentration	Proliferation		NK-Aktivität		TNF-alpha		IL-2		IFN-gamma	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
0 mg/kg	0,405	0,060	24,64	1,00	189,5	30,5	2859,6	121,4	2802,8	160,7
18 mg/kg	0,353	0,046	31,96	1,72	181,9	45,0	2478,5	199,3	2366,2	277,3
90 mg/kg	0,356	0,061	31,26	1,92	166,1	11,8	2674,5	125,7	2636,2	170,7
270 mg/kg	0,386	0,120	33,98	1,07	245,1	10,2	2901,0	135,8	2717,0	212,0

Konzentration	Granulozyten				Monozyten			
	Phagozytoserate		Phagozytoseintensität		Phagozytoserate		Phagozytoseintensität	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
0 mg/kg	73,23	5,09	1280,09	78,29	36,01	1,45	129,83	16,38
18 mg/kg	67,16	2,60	991,42	89,16	37,39	2,48	103,84	9,73
90 mg/kg	67,71	3,15	1160,59	64,29	33,75	1,49	115,42	9,25
270 mg/kg	67,63	2,53	924,83	78,82	36,25	2,02	103,94	6,20

28 Wochen

Konzentration	Proliferation		NK-Aktivität		TNF-alpha		IL-2		IFN-gamma	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
0 mg/kg	0,685	0,091	25,09	1,47	217,5	23,1	2617,9	161,0	3676,6	258,7
18 mg/kg	0,643	0,099	25,85	1,91	211,1	33,6	2703,0	159,2	3757,7	240,5
90 mg/kg	0,846	0,147	26,56	1,63	214,5	28,0	2362,8	117,2	3748,5	219,5
270 mg/kg	0,732	0,084	26,19	2,02	224,5	50,3	2426,3	114,8	3358,4	255,3

Konzentration	Granulozyten				Monozyten			
	Phagozytoserate		Phagozytoseintensität		Phagozytoserate		Phagozytoseintensität	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
0 mg/kg	62,68	1,82	346,39	40,09	34,95	1,51	76,72	3,30
18 mg/kg	64,96	1,68	438,57	47,96	38,45	2,33	81,25	3,01
90 mg/kg	65,43	2,15	409,14	39,83	38,78	1,69	78,12	3,60
270 mg/kg	65,12	1,15	381,55	57,99	37,29	2,35	74,00	4,01

Tabelle A6: Effekte am Menschen nach Intervention mit PÖ-reichen Lebensmitteln - Spearmans Rangkorrelation

	Gen		Dai		Eq		DMA		Mat		Sec		End		Enl	
	Rho	p	Rho	p	Rho	p	Rho	p	Rho	p	Rho	p	Rho	p	Rho	p
CD3 ⁺	-0,262	0,2541	-0,316	0,1687	0,149	0,5164	-0,161	0,4831	-0,289	0,2473	-0,306	0,2204	-0,272	0,2765	-0,480	0,0547
CD3 ⁺ CD4 ⁺	-0,008	0,9739	-0,203	0,3762	0,128	0,5774	-0,164	0,4749	-0,718	0,0041	-0,534	0,0326	0,409	0,1016	0,123	0,6240
CD3 ⁺ CD8 ⁺	-0,116	0,6138	-0,081	0,7234	0,117	0,6092	-0,081	0,7234	0,520	0,0377	0,331	0,1857	-0,615	0,0139	-0,453	0,0697
CD4/8	0,129	0,5730	0,008	0,9739	-0,065	0,7781	0,008	0,9739	-0,568	0,0231	-0,376	0,1330	0,580	0,0203	0,404	0,1063
CD3 CD56 ⁺	0,147	0,5206	0,496	0,0305	-0,376	0,1013	0,535	0,0196	0,115	0,6569	0,006	0,9818	0,162	0,5310	0,541	0,0361
NK-Aktivität	0,208	0,3657	0,295	0,1989	-0,206	0,3692	0,343	0,1351	-0,079	0,7584	-0,100	0,6985	0,074	0,7758	0,150	0,5613
Proliferation	0,124	0,5898	0,182	0,4268	0,081	0,7246	-0,067	0,7718	-0,265	0,2897	-0,191	0,4444	0,113	0,6520	0,172	0,4925
IFN-gamma	-0,316	0,1803	-0,423	0,0728	-0,230	0,9229	-0,216	0,3599	0,181	0,4682	0,066	0,7912	-0,265	0,2897	-0,245	0,3269
IL-2	0,000	>0,9999	-0,257	0,2623	0,030	0,8957	-0,244	0,2883	-0,191	0,4444	-0,069	0,7837	-0,265	0,2897	-0,230	0,3568
IL-4	0,114	0,6195	0,150	0,5132	-0,072	0,7543	-0,409	0,0743	-0,361	0,1488	-0,005	0,8503	0,013	0,9590	-0,067	0,7893
TNF-alpha	-0,047	0,8390	0,065	0,7781	-0,250	0,2766	0,063	0,7831	0,333	0,1824	0,152	0,5433	-0,355	0,1552	-0,042	0,8676

kursiv: Regression berechnet

Tabelle A7: Effekte am Menschen nach Intervention mit PÖ-reichen Lebensmitteln - Lineare Regression

	Achsenabschnitt + Konfidenzintervalle		Steigung + Konfidenzintervalle		
	R ²	p	Wert	95% Unterer	95% Oberer
Dai - CD56	0,147	0,095	8,179	-2,204	18,561
DMA - CD56	0,339	0,007	11,583	7,244	15,921
Enl - CD56	0,327	0,021	12,340	8,852	15,828
Mat - CD4	0,273	0,032	45,144	38,369	51,918
Mat - CD8	0,167	0,103	20,956	14,448	27,463
Mat - CD4/CD8	0,263	0,035	2,390	1,678	3,101
End - CD8	0,444	0,004	31,459	26,653	36,264
End - CD4/CD8	0,460	0,003	1,028	0,478	1,579
Sec - CD4	0,312	0,020	46,932	39,403	54,461

Urin: nmol/24h
Plasma: nmol/l

Literaturverzeichnis

- [Adlercreutz 1990] ADLERCREUTZ, H.: Western diet and Western diseases: some hormonal and biochemical mechanisms and associations. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 201 (1990), 3–23
- [Adlercreutz et al. 1993] ADLERCREUTZ, H. ; FOTSIS, T. ; LAMPE, J. ; WAHALA, K. ; MAKELA, T. ; BRUNOW, G. ; HASE, T.: Quantitative determination of lignans and isoflavonoids in plasma of omnivorous and vegetarian women by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 215 (1993), 5–18.
- [Adlercreutz et al. 1994] ADLERCREUTZ, H. ; FOTSIS, T. ; WATANABE, S. ; LAMPE, J. ; WAHALA, K. ; MAKELA, T. ; HASE, T.: Determination of lignans and isoflavonoids in plasma by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry. *Cancer Detect Prev* 18 (1994), 259–71
- [Adlercreutz und Mazur 1997] ADLERCREUTZ, H. ; MAZUR, W.: Phyto-oestrogens and Western diseases. *Ann Med* 29 (1997), 95–120.
- [Akiyama et al. 1987] AKIYAMA, T. ; ISHIDA, J. ; NAKAGAWA, S. ; OGAWARA, H. ; WATANABE, S. ; ITOH, N. ; SHIBUYA, M. ; FUKAMI, Y.: Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem* 262 (1987), 5592–5.
- [Allen et al. 2001] ALLEN, N. E. ; APPLEBY, P. N. ; DAVEY, G. K. ; KEY, T. J.: Soy milk intake in relation to serum sex hormone levels in British men. *Nutr Cancer* 41 (2001), 41–46.
- [Allred et al. 2001] ALLRED, C. D. ; ALLRED, K. F. ; JU, Y. H. ; VIRANT, S. M. ; HELFERICH, W. G.: Soy diets containing varying amounts of genistein stimulate growth of estrogen-dependent (MCF-7) tumors in a dose-dependent manner. *Cancer Res* 61 (2001), 5045–50.

- [Atluru et al. 1991] ATLURU, D. ; JACKSON, T. M. ; ATLURU, S.: Genistein, a selective protein tyrosine kinase inhibitor, inhibits interleukin-2 and leukotriene B4 production from human mononuclear cells. *Clin Immunol Immunopathol* 59 (1991), 379–87.
- [Atluru und Atluru 1991] ATLURU, S. ; ATLURU, D.: Evidence that genistein, a protein-tyrosine kinase inhibitor, inhibits CD28 monoclonal-antibody-stimulated human T cell proliferation. *Transplantation* 51 (1991), 448–50.
- [Baber et al. 1999] BABER, R. J. ; TEMPLEMAN, C. ; MORTON, T. ; KELLY, G. E. ; WEST, L.: Randomized placebo-controlled trial of an isoflavone supplement and menopausal symptoms in women. *Climacteric* 2 (1999), 85–92.
- [Baldari und Telford 1994] BALDARI, C. T. ; TELFORD, J. L.: Dissection of T cell antigen receptor signaling using protein tyrosine kinase inhibitors. *Eur J Immunol* 24 (1994), 1046–52.
- [Banskota et al. 2004] BANSKOTA, A. H. ; NGUYEN, N. T. ; TEZUKA, Y. ; LE TRAN, Q. ; NOBUKAWA, T. ; KURASHIGE, Y. ; SASAHARA, M. ; KADOTA, S.: Secoisolariciresinol and isotaxiresinol inhibit tumor necrosis factor- α -dependent hepatic apoptosis in mice. *Life Sci* 74 (2004), 2781–92.
- [Baral et al. 1996] BARAL, E. ; NAGY, E. ; BERCZI, I.: Modulation of lymphokine-activated killer cell-mediated cytotoxicity by estradiol and tamoxifen. *Int J Cancer* 66 (1996), 214–8.
- [Benten et al. 2002] BENTEN, W. P. ; STEPHAN, C. ; WUNDERLICH, F.: B cells express intracellular but not surface receptors for testosterone and estradiol. *Steroids* 67 (2002), 647–54.
- [Berg et al. 2002] BERG, G. ; EKERFELT, C. ; HAMMAR, M. ; LINDGREN, R. ; MATTHIESEN, L. ; ERNERUDH, J.: Cytokine changes in postmenopausal women treated with estrogens: a placebo-controlled study. *Am J Reprod Immunol* 48 (2002), 63–9.
- [Bingham et al. 1998] BINGHAM, S. A. ; ATKINSON, C. ; LIGGINS, J. ; BLUCK, L. ; COWARD, A.: Phyto-oestrogens: where are we now? *Br J Nutr* 79 (1998), 393–406.

- [Bowey et al. 2003] BOWEY, E. ; ADLERCREUTZ, H. ; ROWLAND, I.: Metabolism of isoflavones and lignans by the gut microflora: a study in germ-free and human flora associated rats. *Food Chem Toxicol* 41 (2003), 631–6.
- [Burnet 1967] BURNET, F. M.: Immunological aspects of malignant disease. *Lancet* 1 (1967), 1171–4.
- [Chang et al. 2000] CHANG, H. C. ; CHURCHWELL, M. I. ; DELCLOS, K. B. ; NEWBOLD, R. R. ; DOERGE, D. R.: Mass spectrometric determination of Genistein tissue distribution in diet-exposed Sprague-Dawley rats. *J Nutr* 130 (2000), 1963–70.
- [Chiaffarino et al. 1994] CHIAFFARINO, F. ; BIFFI, M. ; LUCIANO, A. ; GROMO, G. ; LEONI, F.: Involvement of multiple protein kinases in CD3-mediated activation of human T lymphocytes. *Cell Immunol* 153 (1994), 39–51.
- [Cho et al. 1999] CHO, J. Y. ; KIM, A. R. ; YOO, E. S. ; BAIK, K. U. ; PARK, M. H.: Immunomodulatory effect of arctigenin, a lignan compound, on tumour necrosis factor- α and nitric oxide production, and lymphocyte proliferation. *J Pharm Pharmacol* 51 (1999), 1267–73.
- [Clark et al. 1995] CLARK, W. F. ; PARBTANI, A. ; HUFF, M. W. ; SPANNER, E. ; SALIS, H. de ; CHIN-YEE, I. ; PHILBRICK, D. J. ; HOLUB, B. J.: Flaxseed: a potential treatment for lupus nephritis. *Kidney Int* 48 (1995), 475–80.
- [Clarke und Lloyd 2004] CLARKE, D. B. ; LLOYD, A. S.: Dietary exposure estimates of isoflavones from the 1998 UK Total Diet Study. *Food Addit Contam* 21 (2004), 305–16.
- [Cohen et al. 1983] COHEN, J. H. ; DANIEL, L. ; CORDIER, G. ; SAEZ, S. ; REVILLARD, J. P.: Sex steroid receptors in peripheral T cells: absence of androgen receptors and restriction of estrogen receptors to OKT8-positive cells. *J Immunol* 131 (1983), 2767–71.
- [Coldham und Sauer 2000] COLDHAM, N. G. ; SAUER, M. J.: Pharmacokinetics of [(14)C]Genistein in the rat: gender-related differences, potential mechanisms of biological action, and implications for human health. *Toxicol Appl Pharmacol* 164 (2000), 206–15.
- [Committee on Toxicity 2003] COMMITTEE ON TOXICITY: Phytoestrogens and health. Food Standards Agency. 2003

- [Cordle et al. 2002] CORDLE, C. T. ; WINSHIP, T. R. ; SCHALLER, J. P. ; THOMAS, D. J. ; BUCK, R. H. ; OSTROM, K. M. ; JACOBS, J. R. ; BLATTER, M. M. ; CHO, S. ; GOOCH, 3rd ; PICKERING, L. K.: Immune status of infants fed soy-based formulas with or without added nucleotides for 1 year: part 2: immune cell populations. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 34 (2002), 145–53.
- [Curran et al. 2001] CURRAN, E. M. ; BERGHAUS, L. J. ; VERNETTI, N. J. ; SAPORITA, A. J. ; LUBAHN, D. B. ; ESTES, D. M.: Natural killer cells express estrogen receptor-alpha and estrogen receptor-beta and can respond to estrogen via a non-estrogen receptor-alpha-mediated pathway. *Cell Immunol* 214 (2001), 12–20.
- [Curran et al. 2004] CURRAN, E. M. ; JUDY, B. M. ; NEWTON, L. G. ; LUBAHN, D. B. ; ROTTINGHAUS, G. E. ; MACDONALD, R. S. ; FRANKLIN, C. ; ESTES, D. M.: Dietary soy phytoestrogens and ERalpha signalling modulate interferon gamma production in response to bacterial infection. *Clin Exp Immunol* 135 (2004), 219–25.
- [Cutolo et al. 1996] CUTOLO, M. ; ACCARDO, S. ; VILLAGGIO, B. ; BARONE, A. ; SULLI, A. ; COVIELLO, D. A. ; CARABBIO, C. ; FELLI, L. ; MICELI, D. ; FARRUGGIO, R. ; CARRUBA, G. ; CASTAGNETTA, L.: Androgen and estrogen receptors are present in primary cultures of human synovial macrophages. *J Clin Endocrinol Metab* 81 (1996), 820–7.
- [Da Silva 1999] DA SILVA, J. A.: Sex hormones and glucocorticoids: interactions with the immune system. *Ann N Y Acad Sci* 876 (1999), 102–17; discussion 117–8.
- [Degen 1990] DEGEN, G. H.: Interaction of phytoestrogens and other environmental estrogens with prostaglandin synthase in vitro. *J Steroid Biochem* 35 (1990), 473–9.
- [Di Virgilio et al. 2004] DI VIRGILIO, A. L. ; IWAMI, K. ; WATJEN, W. ; KAHL, R. ; DEGEN, G. H.: Genotoxicity of the isoflavones genistein, daidzein and equol in V79 cells. *Toxicol Lett* 151 (2004), 151–62.
- [Einspahr et al. 1991] EINSPAHR, K. J. ; ABRAHAM, R. T. ; BINSTADT, B. A. ; UEHARA, Y. ; LEIBSON, P. J.: Tyrosine phosphorylation provides an early and requisite signal for the activation of natural killer cell cytotoxic function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (1991), 6279–83.

- [Enmark et al. 1997] ENMARK, E. ; PELTO-HUIKKO, M. ; GRANDIEN, K. ; LAGERCRANTZ, S. ; LAGERCRANTZ, J. ; FRIED, G. ; NORDENSKJOLD, M. ; GUSTAFSSON, J. A.: Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 82 (1997), 4258–65.
- [Fox et al. 1991] FOX, H. S. ; BOND, B. L. ; PARSLow, T. G.: Estrogen regulates the IFN-gamma promoter. *J Immunol* 146 (1991), 4362–7.
- [Gallo et al. 1999] GALLO, G. ; CANTELMO, F. ; DISTEFANO, M. ; FERLINI, C. ; ZANNONI, G. F. ; RIVA, A. ; MORAZZONI, P. ; BOMBARDELLI, E. ; MANCUSO, S. ; SCAMBIA, G.: Reproductive effects of dietary soy in female Wistar rats. *Food Chem Toxicol* 37 (1999), 493–502.
- [Garner et al. 1983] GARNER, W. L. ; MINTON, J. P. ; JAMES, A. G. ; HOFFMANN, C. C.: Human breast cancer and impaired NK cell function. *J Surg Oncol* 24 (1983), 64–6.
- [Guo et al. 2001] GUO, T. L. ; MCCAY, J. A. ; ZHANG, L. X. ; BROWN, R. D. ; YOU, L. ; KARROW, N. A. ; GERMOLEC, D. R. ; WHITE, Jr.: Genistein modulates immune responses and increases host resistance to B16F10 tumor in adult female B6C3F1 mice. *J Nutr* 131 (2001), 3251–8.
- [Guo et al. 2002a] GUO, T. L. ; WHITE, Jr. ; BROWN, R. D. ; DELCLOS, K. B. ; NEWBOLD, R. R. ; WEIS, C. ; GERMOLEC, D. R. ; MCCAY, J. A.: Genistein modulates splenic natural killer cell activity, antibody-forming cell response, and phenotypic marker expression in F(0) and F(1) generations of Sprague-Dawley rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 181 (2002), 219–27.
- [Guo et al. 2002b] GUO, T. L. ; ZHANG, X. L. ; BARTOLUCCI, E. ; MCCAY, J. A. ; WHITE, Jr. ; YOU, L.: Genistein and methoxychlor modulate the activity of natural killer cells and the expression of phenotypic markers by thymocytes and splenocytes in F0 and F1 generations of Sprague-Dawley rats. *Toxicology* 172 (2002), 205–15.
- [Haeryfar et al. 2000] HAERYFAR, S. M. ; NAGY, E. ; BARAL, E. ; KREPART, G. ; LOTOCKI, R. ; BERCZI, I.: Antiestrogens affect both pathways of killer cell-mediated oncolysis. *Anticancer Res* 20 (2000), 1849–53.

- [Haliotis et al. 1985] HALIOTIS, T. ; BALL, J. K. ; DEXTER, D. ; RODER, J. C.: Spontaneous and induced primary oncogenesis in natural killer (NK)-cell-deficient beige mutant mice. *Int J Cancer* 35 (1985), 505–13.
- [Hanna und Schneider 1983] HANNA, N. ; SCHNEIDER, M.: Enhancement of tumor metastasis and suppression of natural killer cell activity by beta-estradiol treatment. *J Immunol* 130 (1983), 974–80.
- [Hargreaves et al. 1999] HARGREAVES, D. F. ; POTTEN, C. S. ; HARDING, C. ; SHAW, L. E. ; MORTON, M. S. ; ROBERTS, S. A. ; HOWELL, A. ; BUNDRED, N. J.: Two-week dietary soy supplementation has an estrogenic effect on normal premenopausal breast. *J Clin Endocrinol Metab* 84 (1999), 4017–24.
- [Hedlund et al. 2003] HEDLUND, T. E. ; JOHANNES, W. U. ; MILLER, G. J.: Soy isoflavonoid equol modulates the growth of benign and malignant prostatic epithelial cells in vitro. *Prostate* 54 (2003), 68–78.
- [Henderson et al. 2003] HENDERSON, T. A. ; SAUNDERS, P. T. ; MOFFETT-KING, A. ; GROOME, N. P. ; CRITCHLEY, H. O.: Steroid receptor expression in uterine natural killer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 88 (2003), 440–9.
- [Hirano et al. 1994] HIRANO, T. ; GOTOH, M. ; OKA, K.: Natural flavonoids and lignans are potent cytostatic agents against human leukemic HL-60 cells. *Life Sci* 55 (1994), 1061–9.
- [Hsieh et al. 1998] HSIEH, C. Y. ; SANTELL, R. C. ; HASLAM, S. Z. ; HELFERICH, W. G.: Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 58 (1998), 3833–8.
- [Imai et al. 2000] IMAI, K. ; MATSUYAMA, S. ; MIYAKE, S. ; SUGA, K. ; NAKACHI, K.: Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* 356 (2000), 1795–9.
- [Irvine et al. 1998] IRVINE, C. H. ; FITZPATRICK, M. G. ; ALEXANDER, S. L.: Phytoestrogens in soy-based infant foods: concentrations, daily intake, and possible biological effects. *Proc Soc Exp Biol Med* 217 (1998), 247–53.
- [Jacobs 2002] JACOBS, R.: Nicht einfach nur Killer: NK-Zellen sind auch wichtige Regulatorzellen. *Immunologie aktuell* 2 (2002), 114–5.

- [Janeway et al. 2005] JANEWAY, C. A. ; TRAVERS, P. ; M., Walport ; J, Shlomchik M.: *Immunobiology: the immune system in health and disease*. 6. New York : Garland Science Publishing, 2005
- [Janning et al. 2000] JANNING, P. ; SCHUHMACHER, U. S. ; UPMEIER, A. ; DIEL, P. ; MICHNA, H. ; DEGEN, G. H. ; BOLT, H. M.: Toxicokinetics of the phytoestrogen daidzein in female DA/Han rats. *Arch Toxicol* 74 (2000), 421–30.
- [Jenkins et al. 2002] JENKINS, D. J. ; KENDALL, C. W. ; CONNELLY, P. W. ; JACKSON, C. J. ; PARKER, T. ; FAULKNER, D. ; VIDGEN, E.: Effects of high- and low-isoflavone (phytoestrogen) soy foods on inflammatory biomarkers and proinflammatory cytokines in middle-aged men and women. *Metabolism* 51 (2002), 919–24.
- [Kaplan et al. 1998] KAPLAN, D. H. ; SHANKARAN, V. ; DIGHE, A. S. ; STOCKERT, E. ; AGUET, M. ; OLD, L. J. ; SCHREIBER, R. D.: Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998), 7556–61.
- [Karpuzoglu-Sahin et al. 2001] KARPUZOGLU-SAHIN, E. ; ZHI-JUN, Y. ; LENGI, A. ; SRIRANGANATHAN, N. ; ANSAR AHMED, S.: Effects of long-term estrogen treatment on IFN-gamma, IL-2 and IL-4 gene expression and protein synthesis in spleen and thymus of normal C57BL/6 mice. *Cytokine* 14 (2001), 208–17.
- [Keinan-Boker et al. 2004] KEINAN-BOKER, L. ; VAN DER SCHOUW, Y. T. ; GROBBEE, D. E. ; PEETERS, P. H. M.: Dietary phytoestrogens and breast cancer risk. *Am J Clin Nutr* 79 (2004), 282–8.
- [Keller et al. 2001] KELLER, E. T. ; ZHANG, J. ; YAO, Z. ; QI, Y.: The impact of chronic estrogen deprivation on immunologic parameters in the ovariectomized rhesus monkey (*Macaca mulatta*) model of menopause. *J Reprod Immunol* 50 (2001), 41–55.
- [de Kleijn et al. 2001] KLEIJN, M. J. de ; SCHOUW, Y. T. van der ; WILSON, P. W. ; ADLERCREUTZ, H. ; MAZUR, W. ; GROBBEE, D. E. ; JACQUES, P. F.: Intake of dietary phytoestrogens is low in postmenopausal women in the United States: the Framingham study(1-4). *J Nutr* 131 (2001), 1826–32.
- [Knight et al. 2001] KNIGHT, D. C. ; HOWES, J. B. ; EDEN, J. A. ; HOWES, L. G.:

- Effects on menopausal symptoms and acceptability of isoflavone-containing soy powder dietary supplementation. *Climacteric* 4 (2001), 13–18.
- [Kniss et al. 1996] KNISS, D. A. ; ZIMMERMAN, P. D. ; SU, H. C. ; FERTEL, R. H.: Genistein suppresses EGF-induced prostaglandin biosynthesis by a mechanism independent of EGF receptor tyrosine kinase inhibition. *Prostaglandins* 51 (1996), 87–105.
- [Kostelac et al. 2003] KOSTELAC, D. ; RECHKEMMER, G. ; BRIVIBA, K.: Phytoestrogens modulate binding response of estrogen receptors alpha and beta to the estrogen response element. *J Agric Food Chem* 51 (2003), 7632–5.
- [Kuiper et al. 1998] KUIPER, G. G. ; LEMMEN, J. G. ; CARLSSON, B. ; CORTON, J. C. ; SAFE, S. H. ; SAAG, P. T. van der ; BURG, B. van der ; GUSTAFSSON, J. A.: Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139 (1998), 4252–63.
- [Kulling et al. 1998] KULLING, S. E. ; JACOBS, E. ; PFEIFFER, E. ; METZLER, M.: Studies on the genotoxicity of the mammalian lignans enterolactone and enterodiol and their metabolic precursors at various endpoints in vitro. *Mutat Res* 416 (1998), 115–24.
- [Kulling et al. 2002] KULLING, S. E. ; LEHMANN, L. ; METZLER, M.: Oxidative metabolism and genotoxic potential of major isoflavone phytoestrogens. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 777 (2002), 211–8.
- [Kulling et al. 1999] KULLING, S. E. ; ROSENBERG, B. ; JACOBS, E. ; METZLER, M.: The phytoestrogens coumestrol and genistein induce structural chromosomal aberrations in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Arch Toxicol* 73 (1999), 50–4.
- [Kurzer und Xu 1997] KURZER, M. S. ; XU, X.: Dietary phytoestrogens. *Annu Rev Nutr* 17 (1997), 353–81
- [Lamartiniere et al. 2002] LAMARTINIERE, C. A. ; COTRONEO, M. S. ; FRITZ, W. A. ; WANG, J. ; MENTOR-MARCEL, R. ; ELGAVISH, A.: Genistein chemoprevention: timing and mechanisms of action in murine mammary and prostate. *J Nutr* 132 (2002), 552S–558S.

- [Lewis et al. 2003] LEWIS, R. W. ; BROOKS, N. ; MILBURN, G. M. ; SOAMES, A. ; STONE, S. ; HALL, M. ; ASHBY, J.: The effects of the phytoestrogen genistein on the postnatal development of the rat. *Toxicol Sci* 71 (2003), 74–83.
- [Markovits et al. 1989] MARKOVITS, J. ; LINASSIER, C. ; FOSSE, P. ; COUPRIE, J. ; PIERRE, J. ; JACQUEMIN-SABLON, A. ; SAUCIER, J. M. ; LE PECQ, J. B. ; LARSEN, A. K.: Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II. *Cancer Res* 49 (1989), 5111–7.
- [Mazur et al. 2000] MAZUR, W. M. ; UEHARA, M. ; WAHALA, K. ; ADLERCREUTZ, H.: Phyto-oestrogen content of berries, and plasma concentrations and urinary excretion of enterolactone after a single strawberry-meal in human subjects. *Br J Nutr* 83 (2000), 381–7.
- [McCabe und Orrenius 1993] MCCABE, Jr. ; ORRENIUS, S.: Genistein induces apoptosis in immature human thymocytes by inhibiting topoisomerase-II. *Biochem Biophys Res Commun* 194 (1993), 944–50.
- [Mei et al. 2001] MEI, J. ; YEUNG, S. S. ; KUNG, A. W.: High dietary phytoestrogen intake is associated with higher bone mineral density in postmenopausal but not premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 86 (2001), 5217–21.
- [Morris et al. 1998] MORRIS, S. M. ; CHEN, J. J. ; DOMON, O. E. ; MCGARRITY, L. J. ; BISHOP, M. E. ; MANJANATHA, M. G. ; CASCIANO, D. A.: p53, mutations, and apoptosis in genistein-exposed human lymphoblastoid cells. *Mutat Res* 405 (1998), 41–56.
- [Morton et al. 1997] MORTON, M. S. ; CHAN, P. S. ; CHENG, C. ; BLACKLOCK, N. ; MATOS-FERREIRA, A. ; ABRANCHES-MONTEIRO, L. ; CORREIA, R. ; LLOYD, S. ; GRIFFITHS, K.: Lignans and isoflavonoids in plasma and prostatic fluid in men: samples from Portugal, Hong Kong, and the United Kingdom. *Prostate* 32 (1997), 122–8.
- [Müller et al. 1993] MÜLLER, E. ; DAGENAIS, P. ; ALAMI, N. ; ROLAPLESZCZYNSKI, M.: Identification and functional characterization of platelet-activating factor receptors in human leukocyte populations using polyclonal anti-peptide antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993), 5818–22.
- [Muller et al. 1988] MULLER, W. J. ; SINN, E. ; PATTENGALE, P. K. ; WALLACE,

- R. ; LEDER, P.: Single-step induction of mammary adenocarcinoma in transgenic mice bearing the activated c-neu oncogene. *Cell* 54 (1988), 105–15.
- [Murkies et al. 2000] MURKIES, A. ; DALAIS, F. S. ; BRIGANTI, E. M. ; BURGER, H. G. ; HEALY, D. L. ; WAHLQVIST, M. L. ; DAVIS, S. R.: Phytoestrogens and breast cancer in postmenopausal women: a case control study. *Menopause* 7 (2000), 289–96.
- [Murphy und Hendrich 2002] MURPHY, P. A. ; HENDRICH, S.: Phytoestrogens in foods. *Adv Food Nutr Res* 44 (2002), 195–246
- [Mustelin et al. 1990] MUSTELIN, T. ; COGGESHALL, K. M. ; ISAKOV, N. ; ALTMAN, A.: T cell antigen receptor-mediated activation of phospholipase C requires tyrosine phosphorylation. *Science* 247 (1990), 1584–7.
- [Nagata et al. 2001] NAGATA, C. ; TAKATSUKA, N. ; SHIMIZU, H. ; HAYASHI, H. ; AKAMATSU, T. ; MURASE, K.: Effect of soymilk consumption on serum estrogen and androgen concentrations in Japanese men. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 10 (2001), 179–184.
- [Nishio et al. 1994] NISHIO, K. ; MIURA, K. ; OHIRA, T. ; HEIKE, Y. ; SAIJO, N.: Genistein, a tyrosine kinase inhibitor, decreased the affinity of p56lck to beta-chain of interleukin-2 receptor in human natural killer (NK)-rich cells and decreased NK-mediated cytotoxicity. *Proc Soc Exp Biol Med* 207 (1994), 227–33.
- [O'Connor et al. 2002] O'CONNOR, T. P. ; LIESEN, D. A. ; MANN, P. C. ; ROLANDO, L. ; BANZ, W. J.: A high isoflavone soy protein diet and intravenous genistein delay rejection of rat cardiac allografts. *J Nutr* 132 (2002), 2283–87.
- [Ostrom et al. 2002] OSTROM, K. M. ; CORDLE, C. T. ; SCHALLER, J. P. ; WINSHIP, T. R. ; THOMAS, D. J. ; JACOBS, J. R. ; BLATTER, M. M. ; CHO, S. ; GOOCH, 3rd ; GRANOFF, D. M. ; FADEN, H. ; PICKERING, L. K.: Immune status of infants fed soy-based formulas with or without added nucleotides for 1 year: part 1: vaccine responses, and morbidity. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 34 (2002), 137–44.
- [Paech et al. 1997] PAECH, K. ; WEBB, P. ; KUIPER, G. G. ; NILSSON, S. ; GUSTAFSSON, J. ; KUSHNER, P. J. ; SCANLAN, T. S.: Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science* 277 (1997), 1508–10.

- [Paes 2001] PAES, C. M.: Soy isoflavone supplementation does not alter lymphocyte proliferation and cytokine production in postmenopausal women. Virginia State University, Master Thesis. 2001
- [Park 1999] PARK, J. B.: Flavonoids are potential inhibitors of glucose uptake in U937 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 260 (1999), 568–74.
- [Peeters et al. 2003] PEETERS, P. H. ; KEINAN-BOKER, L. ; SCHOUW, Y. T. van der ; GROBBEE, D. E.: Phytoestrogens and breast cancer risk. Review of the epidemiological evidence. *Breast Cancer Res Treat* 77 (2003), 171–83.
- [Pietinen et al. 2001] PIETINEN, P. ; STUMPF, K. ; MANNISTO, S. ; KATAJA, V. ; UUSITUPA, M. ; ADLERCREUTZ, H.: Serum enterolactone and risk of breast cancer: a case-control study in eastern Finland. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10 (2001), 339–44.
- [Pool-Zobel et al. 2000] POOL-ZOBEL, B. L. ; ADLERCREUTZ, H. ; GLEI, M. ; LIEGIBEL, U. M. ; SITTLINGON, J. ; ROWLAND, I. ; WAHALA, K. ; RECHKEMMER, G.: Isoflavonoids and lignans have different potentials to modulate oxidative genetic damage in human colon cells. *Carcinogenesis* 21 (2000), 1247–52.
- [Ralston et al. 1990] RALSTON, S. H. ; RUSSELL, R. G. ; GOWEN, M.: Estrogen inhibits release of tumor necrosis factor from peripheral blood mononuclear cells in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 5 (1990), 983–8.
- [Ren et al. 2001] REN, M. Q. ; KUHN, G. ; WEGNER, J. ; CHEN, J.: Isoflavones, substances with multi-biological and clinical properties. *Eur J Nutr* 40 (2001), 135–46.
- [Rijhsinghani et al. 1996] RIJHSINGHANI, A. G. ; THOMPSON, K. ; BHATIA, S. K. ; WALDSCHMIDT, T. J.: Estrogen blocks early T cell development in the thymus. *Am J Reprod Immunol* 36 (1996), 269–77.
- [Rimbach et al. 2003] RIMBACH, G. ; DE PASCUAL-TERESA, S. ; EWINS, B. A. ; MATSUGO, S. ; UCHIDA, Y. ; MINIHANE, A. M. ; TURNER, R. ; VAFEIADOU, K. ; WEINBERG, P. D.: Antioxidant and free radical scavenging activity of isoflavone metabolites. *Xenobiotica* 33 (2003), 913–25.
- [Ritchie et al. 2004] RITCHIE, M. R. ; MORTON, M. S. ; DEIGHTON, N. ; BLAKE, A. ; CUMMINGS, J. H.: Plasma and urinary phyto-oestrogens as biomarkers of intake: validation by duplicate diet analysis. *Br J Nutr* 91 (2004), 447–57.

- [Rogers und Eastell 2001] ROGERS, A. ; EASTELL, R.: The effect of 17beta-estradiol on production of cytokines in cultures of peripheral blood. *Bone* 29 (2001), 30–4.
- [Rowland et al. 2003] ROWLAND, I. ; FAUGHNAN, M. ; HOEY, L. ; WAHALA, K. ; WILLIAMSON, G. ; CASSIDY, A.: Bioavailability of phyto-oestrogens. *Br J Nutr* 89 Suppl 1 (2003), S45–58.
- [Rowland et al. 2000] ROWLAND, I. R. ; WISEMAN, H. ; SANDERS, T. A. ; ADLERCREUTZ, H. ; BOWEY, E. A.: Interindividual variation in metabolism of soy isoflavones and lignans: influence of habitual diet on equol production by the gut microflora. *Nutr Cancer* 36 (2000), 27–32
- [Rüfer 2005] RÜFER, C.: persönliche Mitteilung. 2005
- [Sadowska-Krowicka et al. 1998] SADOWSKA-KROWICKA, H. ; MANNICK, E. E. ; OLIVER, P. D. ; SANDOVAL, M. ; ZHANG, X. J. ; ELOBY-CHILDESS, S. ; CLARK, D. A. ; MILLER, M. J.: Genistein and gut inflammation: role of nitric oxide. *Proc Soc Exp Biol Med* 217 (1998), 351–7.
- [Santti et al. 1998] SANTTI, R. ; MAKELA, S. ; STRAUSS, L. ; KORKMAN, J. ; KOSTIAN, M. L.: Phytoestrogens: potential endocrine disruptors in males. *Toxicol Ind Health* 14 (1998), 223–37.
- [Schmitt et al. 2001] SCHMITT, E. ; DEKANT, W. ; STOPPER, H.: Assaying the estrogenicity of phytoestrogens in cells of different estrogen sensitive tissues. *Toxicol In Vitro* 15 (2001), 433–9.
- [Schmitt et al. 2003] SCHMITT, E. ; METZLER, M. ; JONAS, R. ; DEKANT, W. ; STOPPER, H.: Genotoxic activity of four metabolites of the soy isoflavone daidzein. *Mutat Res* 542 (2003), 43–8.
- [Schultze-Mosgau et al. 1998] SCHULTZE-MOSGAU, M. H. ; DALE, I. L. ; GANT, T. W. ; CHIPMAN, J. K. ; KERR, D. J. ; GESCHER, A.: Regulation of c-fos transcription by chemopreventive isoflavonoids and lignans in MDA-MB-468 breast cancer cells. *Eur J Cancer* 34 (1998), 1425–31.
- [Screpanti et al. 1989] SCREPANTI, I. ; MORRONE, S. ; MECO, D. ; SANTONI, A. ; GULINO, A. ; PAOLINI, R. ; CRISANTI, A. ; MATHIESON, B. J. ; FRATI, L.:

- Steroid sensitivity of thymocyte subpopulations during intrathymic differentiation. Effects of 17 beta-estradiol and dexamethasone on subsets expressing T cell antigen receptor or IL-2 receptor. *J Immunol* 142 (1989), 3378–83.
- [Setchell 1998] SETCHELL, K. D.: Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *Am J Clin Nutr* 68 (1998), 1333S–1346S.
- [Setchell et al. 2003] SETCHELL, K. D. ; FAUGHNAN, M. S. ; AVADES, T. ; ZIMMER-NECHEMIAS, L. ; BROWN, N. M. ; WOLFE, B. E. ; BRASHEAR, W. T. ; DESAI, P. ; OLDFIELD, M. F. ; BOTTING, N. P. ; CASSIDY, A.: Comparing the pharmacokinetics of daidzein and genistein with the use of ¹³C-labeled tracers in premenopausal women. *Am J Clin Nutr* 77 (2003), 411–9.
- [Setchell et al. 1997] SETCHELL, K. D. ; ZIMMER-NECHEMIAS, L. ; CAI, J. ; HEUBI, J. E.: Exposure of infants to phyto-oestrogens from soy-based infant formula. *Lancet* 350 (1997), 23–7.
- [Setchell und Adlercreutz 1988] SETCHELL, K. D. R. ; ADLERCREUTZ, H.: Mammalian lignans and Phyto-oestrogens. Recent studies on their formation, metabolism and biological role in health and disease. In: ROWLAND, I. (Hrsg.): *Role of the gut flora in toxicity and cancer*. London : Academic Press Limited, 1988, 315–345
- [Shankaran et al. 2001] SHANKARAN, V. ; IKEDA, H. ; BRUCE, A. T. ; WHITE, J. M. ; SWANSON, P. E. ; OLD, L. J. ; SCHREIBER, R. D.: IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410 (2001), 1107–11.
- [Sheu et al. 2001] SHEU, F. ; LAI, H. H. ; YEN, G. C.: Suppression effect of soy isoflavones on nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. *J Agric Food Chem* 49 (2001), 1767–72.
- [Shu et al. 2001] SHU, X. O. ; JIN, F. ; DAI, Q. ; WEN, W. ; POTTER, J. D. ; KUSHI, L. H. ; RUAN, Z. ; GAO, Y. T. ; ZHENG, W.: Soyfood intake during adolescence and subsequent risk of breast cancer among Chinese women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10 (2001), 483–8.
- [Smyth et al. 2001] SMYTH, M. J. ; GODFREY, D. I. ; TRAPANI, J. A.: A fresh

- look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol* 2 (2001), 293–9.
- [Spinozzi et al. 1994] SPINOZZI, F. ; PAGLIACCI, M. C. ; MIGLIORATI, G. ; MORACA, R. ; GRIGNANI, F. ; RICCARDI, C. ; NICOLETTI, I.: The natural tyrosine kinase inhibitor genistein produces cell cycle arrest and apoptosis in Jurkat T-leukemia cells. *Leuk Res* 18 (1994), 431–9.
- [Stevens und Page 2004] STEVENS, J. F. ; PAGE, J. E.: Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! *Phytochemistry* 65 (2004), 1317–30
- [Su et al. 2000] SU, S. J. ; YEH, T. M. ; LEI, H. Y. ; CHOW, N. H.: The potential of soybean foods as a chemoprevention approach for human urinary tract cancer. *Clin Cancer Res* 6 (2000), 230–6.
- [Suenaga et al. 1998] SUENAGA, R. ; EVANS, M. J. ; MITAMURA, K. ; RIDER, V. ; ABDON, N. I.: Peripheral blood T cells and monocytes and B cell lines derived from patients with lupus express estrogen receptor transcripts similar to those of normal cells. *J Rheumatol* 25 (1998), 1305–12.
- [Tham et al. 1998] THAM, D. M. ; GARDNER, C. D. ; HASKELL, W. L.: Clinical review 97: Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence. *J Clin Endocrinol Metab* 83 (1998), 2223–35.
- [Thomsen 2005] THOMSEN, A. R.: persönliche Mitteilung. 2005
- [Törnwall et al. 1999] TÖRNWALL, J. ; CAREY, A. B. ; FOX, R. I. ; FOX, H. S.: Estrogen in autoimmunity: expression of estrogen receptors in thymic and autoimmune T cells. *J Gend Specif Med* 2 (1999), 33–40.
- [Trevillyan et al. 1990] TREVILLYAN, J. M. ; LU, Y. L. ; ATLURU, D. ; PHILLIPS, C. A. ; BJORND AHL, J. M.: Differential inhibition of T cell receptor signal transduction and early activation events by a selective inhibitor of protein-tyrosine kinase. *J Immunol* 145 (1990), 3223–30.
- [Valsta et al. 2003] VALSTA, L. M. ; KILKKINEN, A. ; MAZUR, W. ; NURMI, T. ; LAMPI, A. M. ; OVASKAINEN, M. L. ; KORHONEN, T. ; ADLERCREUTZ, H. ; PIETINEN, P.: Phyto-oestrogen database of foods and average intake in Finland. *Br J Nutr* 89 Suppl 1 (2003), S31–8.

- [Vermeulen et al. 2003] VERMEULEN, K. ; BOCKSTAELE, D. R. van ; N., Berneman Z.: The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 36 (2003), 131–49.
- [Verthelyi 2001] VERTHELYI, D.: Sex hormones as immunomodulators in health and disease. *Int Immunopharmacol* 1 (2001), 983–93.
- [Wakeling 1995] WAKELING, A. E.: Use of pure antioestrogens to elucidate the mode of action of oestrogens. *Biochem Pharmacol* 49 (1995), 1545–9.
- [Wakeling 2000] WAKELING, A. E.: Similarities and distinctions in the mode of action of different classes of antioestrogens. *Endocr Relat Cancer* 7 (2000), 17–28.
- [Wang und Mazza 2002] WANG, J. ; MAZZA, G.: Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor alpha in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages. *J Agric Food Chem* 50 (2002), 4183–89.
- [Wang 2002] WANG, L. Q.: Mammalian phytoestrogens: enterodiol and enterolactone. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 777 (2002), 289–309.
- [Wang et al. 1997] WANG, W. ; HIGUCHI, C. M. ; ZHANG, R.: Individual and combinatory effects of soy isoflavones on the in vitro potentiation of lymphocyte activation. *Nutr Cancer* 29 (1997), 29–34
- [Watanabe et al. 1998] WATANABE, S. ; YAMAGUCHI, M. ; SOBUE, T. ; TAKAHASHI, T. ; MIURA, T. ; ARAI, Y. ; MAZUR, W. ; WAHALA, K. ; ADLERCREUTZ, H.: Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (kinako). *J Nutr* 128 (1998), 1710–5.
- [Westermann und Pabst 1990] WESTERMANN, J. ; PABST, R.: Lymphocyte subsets in the blood: a diagnostic window on the lymphoid system? *Immunol Today* 11 (1990), 406–10.
- [Weusten et al. 1986] WEUSTEN, J. J. ; BLANKENSTEIN, M. A. ; H., Gmelig-Meyling F. ; J., Schuurman H. ; KATER, L. ; THIJSEN, J. H.: Presence of oestrogen receptors in human blood mononuclear cells and thymocytes. *Acta Endocrinol* 112 (1986), 409–14.
- [Yellayi et al. 2002] YELLAYI, S. ; NAAZ, A. ; SZEWCZYKOWSKI, M. A. ; SATO, T. ; WOODS, J. A. ; CHANG, J. ; SEGRE, M. ; ALLRED, C. D. ; HELFERICH,

- W. G. ; COOKE, P. S.: The phytoestrogen genistein induces thymic and immune changes: A human health concern? *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002), 7616–21.
- [Yellayi et al. 2003] YELLAYI, S. ; ZAKROCZYMSKI, M. A. ; SELVARAJ, V. ; VALLI, V. E. ; GHANTA, V. ; HELFERICH, W. G. ; COOKE, P. S.: The phytoestrogen genistein suppresses cell-mediated immunity in mice. *J Endocrinol* 176 (2003), 267–74.
- [Yueh und Chu 1977] YUEH, T. L. ; CHU, H. Y.: The metabolic fate of daidzein. *Sci Sin* 20 (1977), 513–21.
- [Zhang et al. 1997] ZHANG, R. ; LI, Y. ; WANG, W.: Enhancement of immune function in mice fed high doses of soy daidzein. *Nutr Cancer* 29 (1997), 24–8
- [Zhang et al. 2001] ZHANG, X. ; WANG, L. ; ZHANG, H. ; GUO, D. ; QIAO, Z. ; QIAO, J.: Estrogen inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α release from murine macrophages. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 23 (2001), 169–73.
- [Zhang et al. 2003] ZHANG, Y. ; HENDRICH, S. ; MURPHY, P. A.: Glucuronides are the main isoflavone metabolites in women. *J Nutr* 133 (2003), 399–404.
- [Zhang et al. 1999] ZHANG, Y. ; SONG, T. T. ; CUNNICK, J. E. ; MURPHY, P. A. ; HENDRICH, S.: Daidzein and genistein glucuronides in vitro are weakly estrogenic and activate human natural killer cells at nutritionally relevant concentrations. *J Nutr* 129 (1999), 399–405.