



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Einfluss eines Isoflavon- und eines Resveratrolpräparats
auf die DNA-Stabilität des Menschen

Verfasserin

Anna-Magdalena Heger

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Wien, 2011

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 442

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Anthropologie

Betreuerin / Betreuer:

Ao. Univ.-Prof. Dr. Siegfried Knasmüller

Die Durchführung der Diplomarbeit erfolgte am
Institut für Krebsforschung der Medizinischen Universität Wien
unter Betreuung von
Ao. Univ.-Prof. Dr. Siegfried Knasmüller

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	IV
-----------------------------------	-----------

Tabellenverzeichnis.....	VI
---------------------------------	-----------

1 Einleitung und Fragestellung.....	1
--	----------

2 Literaturüberblick.....	2
----------------------------------	----------

2.1 Isoflavone.....	2
---------------------	---

2.1.1 Überblick, Struktur und Vorkommen.....	2
--	---

2.1.2 Absorption und Verstoffwechselung.....	5
--	---

2.1.3 Biologisch relevante Effekte.....	7
---	---

2.1.3.1 Molekulare Mechanismen.....	7
-------------------------------------	---

2.1.3.2 Antioxidative Effekte.....	10
------------------------------------	----

2.1.3.3 Schutz vor Krebserkrankungen.....	14
---	----

2.1.3.4 Schutz vor Herz-Kreislaferkrankungen.....	14
---	----

2.1.3.5 Isoflavone als Alternative zur Hormonersatztherapie.....	15
--	----

2.1.3.6 Schutz vor Osteoporose.....	16
-------------------------------------	----

2.1.3.7 Weitere gesundheitliche Wirkungen.....	17
--	----

2.2 Resveratrol.....	19
----------------------	----

2.2.1 Überblick, Struktur und Vorkommen.....	19
--	----

2.2.2 Absorption und Verstoffwechselung.....	21
--	----

2.2.3 Biologisch relevante Effekte.....	23
---	----

2.2.3.1 Molekulare Mechanismen.....	23
-------------------------------------	----

2.2.3.2 Antioxidative Effekte.....	25
------------------------------------	----

2.2.3.3 Schutz vor Krebserkrankungen.....	29
---	----

2.2.3.4 Schutz vor Herz-Kreislaferkrankungen.....	29
---	----

2.3 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und oxidative DNA-Schäden.....	31
---	----

2.3.1 Entstehung freier Radikale und gesundheitliche Auswirkungen.....	31
--	----

2.3.2 Schutzmechanismen vor ROS.....	32
--------------------------------------	----

2.4 Nachweis antioxidativer Effekte von Lebensmittelinhaltsstoffen.....	33
---	----

2.4.1 Einleitung.....	33
-----------------------	----

2.4.2	Messung von oxidiertem Low Density Lipoprotein.....	33
2.4.3	Totale Antioxidative Kapazität.....	35
2.4.4	Malondialdehyd.....	35
2.4.5	C-reaktives Protein.....	37
2.4.6	Grundlagen des SCGE-Tests.....	38
2.4.7	<i>In vitro</i> Studien.....	38
2.4.8	Einsatz von Einzelzellgelelektrophoresetests bei Humanstudien.....	39
3	Material und Methoden.....	42
3.1	Chemikalien: Herkunft der Materialien.....	42
3.1.1	Zusammensetzung der Präparate.....	43
3.2	Lösungen für den Komet Assay.....	44
3.3	Isolation der Lymphozyten.....	45
3.4	Durchführung der Komet Assays.....	47
3.5	<i>In vitro</i> Experimente.....	48
3.5.1	Behandlung der Zellen.....	48
3.5.2	Messung der Vitalität.....	48
3.5.3	Untersuchung gentoxischer Effekte.....	48
3.5.4	Herstellung der Objektträger.....	48
3.5.5	Experimente mit Wasserstoffperoxid.....	49
3.5.6	Untersuchungen mit Restriktionsenzymen.....	49
3.6	Durchführung der Humanstudie.....	50
3.6.1	Intervention und Probennahme.....	50
3.6.2	Bestimmung der Zellzahl und Vitalität.....	52
3.6.3	Auslösung von DNA-Migration mit Wasserstoffperoxid.....	52
3.6.4	Experimente mit Restriktionsenzymen.....	53
3.6.5	Auswertung der Objektträger.....	53
3.6.6	Bestimmung der LDL-Oxidation.....	53
3.6.7	Messung der totalen antioxidativen Kapazität.....	54
3.6.8	CRP-Messung.....	54
3.6.9	Statistik.....	54
4	Ergebnisse.....	55
4.1	Ergebnisse der <i>in vitro</i> Experimente.....	55

4.1.1	Resultate mit dem Isoflavonpräparat.....	55
4.1.2	Resultate mit dem Resveratrolpräparat.....	59
4.2	Ergebnisse der Humanstudien.....	62
4.2.1	Resultate mit dem Isoflavonpräparat.....	62
4.2.2	Resultate mit dem Resveratrolpräparat.....	65
4.3	Ergebnisse der biochemischen Analysen.....	67
4.3.1	Resultate mit dem Isoflavonpräparat.....	67
4.3.2	Resultate mit dem Resveratrolpräparat.....	69
5	Diskussion.....	70
5.1	Schutz vor oxidativen DNA-Schäden durch das Isoflavonpräparat.....	70
5.1.1	Ergebnisse der <i>in vitro</i> Experimente.....	71
5.1.2	Ergebnisse der Humanstudie.....	71
5.1.3	Beeinflussung biochemischer Redoxparameter.....	73
5.1.4	Wirkungen des Nachtkerzenöls.....	74
5.2	Schutz vor oxidativen DNA-Schäden durch das Resveratrolpräparat.....	75
5.2.1	Ergebnisse der <i>in vitro</i> Experimente.....	75
5.2.2	Ergebnisse der Humanstudie.....	76
5.2.3	Beeinflussung biochemischer Redoxparameter.....	78
5.2.4	Wirkungen weiterer Bestandteile des Präparats.....	79
6	Zusammenfassung.....	81
7	Summary.....	83
8	Literaturverzeichnis.....	85

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Strukturformeln von Östradiol-17 β und einiger Isoflavone.....	4
Abbildung 2	Schematisch Darstellung der Wirkung von Östrogenrezeptoren.....	2
Abbildung 3	Biologische Effekte von Isoflavonen.....	18
Abbildung 4	Strukturformeln von trans- und cis-Resveratrol und Piceatannol.....	19
Abbildung 5	Biologische Effekte von Resveratrol.....	30
Abbildung 6	Endogene und exogene Entstehung und Inaktivierung von ROS.....	31
Abbildung 7	Entstehung arteriosklerotischer Plaques durch LDL-Oxidation.....	34
Abbildung 8	Schematische Darstellung der Lipidperoxidation am Beispiel der Linolsäure.....	36
Abbildung 9	Verschiedene Endpunkte von Komet-Experimenten.....	40
Abbildung 10	Schematische Darstellung der Probenaufbereitung.....	46
Abbildung 11	Schematische Darstellung der Durchführung der Komet-Assays.....	47
Abbildung 12	Kalibration der Restriktionsenzyme.....	49
Abbildung 13	Ablauf der Interventionsstudie.....	52
Abbildung 14	Bestimmung der Zytotoxizität nach Inkubation mit der Isoflavonmischung.....	56
Abbildung 15	Bestimmung der Gentoxizität nach der Inkubation mit der Isoflavonmischung.....	56
Abbildung 16	Reduktion H ₂ O ₂ -induzierter DNA Migration durch die Isoflavonmischung.....	57
Abbildung 17	Beeinflussung der Bildung von oxidierten Purinen und Pyrimidinen durch Inkubation der Zellen mit dem Isoflavonpräparat.....	58
Abbildung 18	Bestimmung der Zytotoxizität nach Inkubation mit dem Resveratrolpräparat.....	59
Abbildung 19	Bestimmung der Gentoxizität nach der Inkubation mit dem Resveratrolpräparat.....	60
Abbildung 20	Reduktion H ₂ O ₂ -induzierter DNA Migration durch die Resveratrolmischung.....	60
Abbildung 21	Beeinflussung der Bildung von oxidierten Purinen und Pyrimidinen durch Inkubation der Lymphozyten mit dem Resveratrolpräparat.....	61
Abbildung 22	Auswirkung des Isoflavonpräparats auf die endogene DNA-Migration in peripheren Lymphozyten.....	62

Abbildung 23	Auswirkung des Isoflavonpräparats auf H ₂ O ₂ -induzierte DNA Migration in peripheren Lymphozyten.....	63
Abbildung 24	Beeinflussung der Bildung von oxidierten Purinen nach Einnahme des Isoflavonpräparats.....	64
Abbildung 25	Beeinflussung der Bildung von oxidierten Pyrimidinen nach Einnahme des Isoflavonpräparats.....	64
Abbildung 26	Auswirkung der Einnahme des Resveratrolpräparats auf die endogene DNA Migration in peripheren Lymphozyten.....	65
Abbildung 27	Auswirkung des Resveratrolpräparats auf H ₂ O ₂ -induzierte DNA Migration in peripheren Lymphozyten.....	66
Abbildung 28	Beeinflussung der Bildung von oxidierten Purinen nach Einnahme des Resveratrolpräparat.....	66
Abbildung 29	Beeinflussung der Bildung von oxidierten Pyrimidine nach Einnahme des Resveratrolpräparat.....	67
Abbildung 30	Auswirkung der Einnahme des Isoflavonpräparats auf die Oxidation von LDL (a), auf die totale antioxidative Kapazität (b) und auf die Konzentration von C-reaktiven Protein (c)	68
Abbildung 31	Auswirkung der Einnahme des Resveratrolpräparats auf die Oxidation von LDL (a), auf die totale antioxidative Kapazität (b) und auf die Konzentration von C-reaktiven Protein (c)	69

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Isoflavongehalte verschiedener Lebensmittel.....	3
Tabelle 2	<i>In vitro</i> SCGE-Untersuchungen über die antioxidative Wirksamkeit von Isoflavonen.....	11
Tabelle 3	Beispiele für Humanstudien über die antioxidative Wirksamkeit von isoflavonhaltigen Nahrungsmitteln.....	13
Tabelle 4	Vorkommen von Resveratrol in Lebensmitteln.....	20
Tabelle 5	<i>In vitro</i> SCGE-Untersuchungen über die antioxidative Wirksamkeit von Resveratrol.....	25
Tabelle 6	Nachweis antioxidativer Effekte von Resveratrol und resveratrolhaltigen Nahrungsmitteln in Tierexperimenten mittels SCGE-Test.....	26
Tabelle 7	Beispiele für Humanstudien hinsichtlich der antioxidativen Wirksamkeit von resveratrolhaltigen Nahrungsmitteln.....	28
Tabelle 8	Angaben über Bezeichnung, Abkürzung und Herkunft der verwendeten Chemikalien.....	42
Tabelle 9	Zusammensetzung des Isoflavonpräparats.....	43
Tabelle 10	Zusammensetzung des Resveratrolpräparats.....	43
Tabelle 11	Demografische Daten der Studienteilnehmer.....	50
Tabelle 12	Restriktionsplan während der Intervention.....	51

1 Einleitung und Fragestellung

In zahlreichen Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass Schäden, die durch Sauerstoffradikale verursacht werden, mit der Auslösung von Krebs, kardiovaskulären und neurodegenerativen Erkrankungen in Zusammenhang stehen [1]. Oxidativer Stress wird durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) verursacht und führt zu Veränderungen von Makromolekülen (z.B. Proteinen, Lipiden und DNA) und ihrer Funktionsfähigkeit. Die menschliche Nahrung enthält eine Vielzahl von Substanzen, die vor der Entstehung derartiger Schäden schützen. Dazu zählen neben Vitaminen (A, C und E) auch sekundäre Pflanzenstoffe, zu denen unter anderem auch Polyphenole wie Resveratrol und Isoflavone gehören [2].

In der vorliegenden Arbeit wurde die antioxidative Wirkung von zwei Nahrungsergänzungsmitteln, die Isoflavone und Resveratrol enthalten, auf die DNA-Stabilität humaner Lymphozyten mittels Einzelzellgelelektrophoresetests (SCGE-Test, Komet Assay) untersucht. Es sollte geklärt werden, ob es durch die Einnahme der Präparate zu einer Reduktion von ROS-induzierten Schäden der Erbsubstanz und der endogenen Bildung oxidierter Purine und Pyrimidine kommt. Zusätzlich wurden verschiedene biochemische Parameter des Redox-Zustandes gemessen, nämlich die Totale Antioxidative Kapazität (TAC), die Oxidation von Low Density Lipoproteinen (Oxo-LDL) und die Konzentration von C-reaktivem Protein (CRP).

Die Arbeit ist in zwei Abschnitte gegliedert. Im ersten Teil wird der Einfluss der Präparate auf Lymphozyten unter *in vitro* Bedingungen beschrieben, der zweite Teil betrifft die Wirkung der beiden Nahrungsergänzungsmittel beim Menschen. Dazu wurden zwei Interventionsstudien mit jeweils zwölf Teilnehmern durchgeführt, die die Präparate fünf Tage hindurch konsumierten. Von allen Probanden wurden vor Einnahme der ersten Tablette, am zweiten Tag, nach fünf Tagen, sowie nach einer zehntägigen „Wash-out“-Phase Blutproben gesammelt, aus denen das Plasma und die Lymphozyten gewonnen wurden. Mit den Zellen selbst wurden SCGE-Versuche mit verschiedenen Endpunkten durchgeführt, die Plasmaproben wurden zur Bestimmung der biochemischen Parameter verwendet.

2 Literaturüberblick

2.1 Isoflavone

2.1.1 Überblick, Struktur und Vorkommen

Isoflavone zählen zu den Flavonoiden und werden aufgrund ihrer funktionellen Ähnlichkeit zu steroidalen Östrogenen auch als Phytoöstrogene bezeichnet [2]. Sie kommen in mehr als 300 Pflanzenarten vor und können von bestimmten Bakterien und Pilzarten synthetisiert werden [3]. Viele Isoflavone haben antimikrobielle und fungizide Wirkungen und dienen den Pflanzen zur Abwehr von Krankheiten [4]. Außerdem spielen sie bei der Signalübertragung und der Zellkommunikation eine Rolle und sind an der Symbiose der Pflanzen mit Knöllchenbakterien (Rhizobien) beteiligt. Diese sind in der Lage, Stickstoff aus der Luft zu binden und ihn in Verbindungen umzuwandeln, die von den Pflanzen aufgenommen und verwertet werden können [5].

In den 40er Jahren wurde die östrogene Wirkung von Pflanzeninhaltsstoffen erstmals beobachtet, da man bei australischen Schafen vermehrt Unfruchtbarkeit und Fehlgeburten feststellte. Die Gründe dafür waren Weiden, auf denen unter anderem Rotklee (*Trifolium pratense*) wuchs, der von den Tieren gefressen wurde. Diese Pflanze enthält große Mengen der Isoflavone Formononetin und Biochanin A, die somit die ersten Phytoöstrogene waren, die man identifizierte [6]. Auch bei Geparden des Zoos von Cincinnati wurde nach Verabreichung von sojahältigem Futter vermehrtes Auftreten von Infertilität beobachtet [7]. Aufgrund ihrer östrogenen Effekte wurden in den 50er Jahren einzelne Isoflavone an Nagern genauer untersucht, mit dem Ziel sie als Wachstumsbeschleuniger für die Futtermittelindustrie zu verwenden. Die Entdeckung dieser Phänomene führte dazu, dass man in den darauffolgenden Jahrzehnten vermehrt begann die östrogene Wirkung der Isoflavone zu erforschen. Seit 1996 sind Isoflavone als Nahrungsergänzungsmittel in Verwendung [8].

Die bekanntesten und am besten untersuchten Isoflavone sind Genistein und Daidzein, die vor allem in Soja und Sojaprodukten vorkommen. Der Gehalt ist abhängig von der Sorte der Sojapflanze, der geografischen Herkunft und der Erde, in der die Pflanzen wachsen, sowie dem Klima, dem Erntejahr, dem Reifegrad und der weiteren Verarbeitung der Bohnen. Im Allgemeinen nimmt die Menge der Isoflavone mit dem

Verarbeitungsgrad ab. Beispielsweise enthält Tofu nur mehr 6-20% des Gehalts der unverarbeiteten Bohnen [3].

Biochanin A und Formononetin sind methylierte Vorstufen von Genistein und Daidzein und kommen hauptsächlich in Rotklee vor (5 mg/g). In geringeren Mengen sind Isoflavone auch in Nüssen, Bohnen, Obst, Gemüse und Kaffee enthalten. Kuhnle et al. [9-14] publizierten eine Reihe von Arbeiten über den Phytoöstrogengehalt verschiedener Nahrungsmittel und Getränke. In Tabelle 1 sind die Isoflavonmengen einiger Lebensmittel aufgelistet.

Tabelle 1: Isoflavongehalte verschiedener Lebensmittel [10, 12, 15]

Lebensmittel	Isoflavongehalt (µg/100g)			
	Genistein	Daidzein	Glycitein	gesamt
Sojabohnen	33 500-120 100	45 200-113 800	3700-14 500	82 400-248 400
Sojamilch (mg/ml)	5200-16 800	2600-12 600	200-1600	8000-31 000
Tofu	11 100-30 400	7300-19 100	1500-3900	19 900-53 400
Sojasprossen	225	110	16	351
Instant-Kaffeepulver	594	153	162	913
Kichererbsen	79	16	9	607
Feuerbohnen	78	64	22	164
Kidneybohnen	26	15	32	73
Linsen	19	26	6	51
Fisolen	35	12	2	50
Zuckererbsen	<1	-	37	38
Mungobohnen	15	6	2	32
Erdnüsse, geröstet, gesalzen	70	4	56	154
Pistazien, geröstet, gesalzen	-	2	2	33
Walnüsse	11	1	<1	31
Mandeln	1	<1	<1	27
Haselnüsse	9	<1	<1	22
Petersilie	57	-	<1	59
Zwiebelringe	28	6	5	44
Maracujas	<1	42	<1	43
Datteln	19	5	6	35
Kirschen	2	5	13	20
Karotten	1	2	<1	4

Hoher Sojakonsum wird mit einer Abnahme der Inzidenz von hormonabhängigen Krankheiten in Zusammenhang gebracht. Beispielsweise zeigten epidemiologische Studien, dass in asiatischen Ländern, in denen eine soja- und isoflavonreiche Nahrung konsumiert wird, Brust- und Prostatakrebs seltener auftreten als in den westlichen Industriestaaten. Weiters wurde nachgewiesen, dass Asiaten, die in die USA auswanderten und anschließend ihre Ernährungsgewohnheiten änderten, ein höheres Risiko für die beiden Krebsformen aufwiesen [16]. In Japan beträgt die durchschnittliche Isoflavonaufnahme laut einer 2002 durchgeführten Ernährungsstudie 70 mg/Tag, in China zwischen 102 und 107 mg/Woche bei Männer und 77 bis 90 mg/Woche bei Frauen. Im Vergleich dazu lag der Isoflavonkonsum in der USA zwischen 1999 und 2000 nur zwischen 1,1 und 1,3 mg pro Tag [17].

Sowohl in Tier- als auch in Humanstudien konnten protektive Effekte von Phytoöstrogenen hinsichtlich Wechseljahresbeschwerden, Herz-Kreislauferkrankungen, Krebs, Osteoporose und bestimmten chronischen Nierenerkrankungen nachgewiesen werden. Neueren Untersuchungen zufolge beeinflussen Isoflavone auch das Immunsystem, indem sie entzündungshemmend wirken [18]. Abbildung 1 zeigt die Strukturformeln einiger Isoflavone und ihre chemisch-strukturelle Ähnlichkeit zu Östradiol.

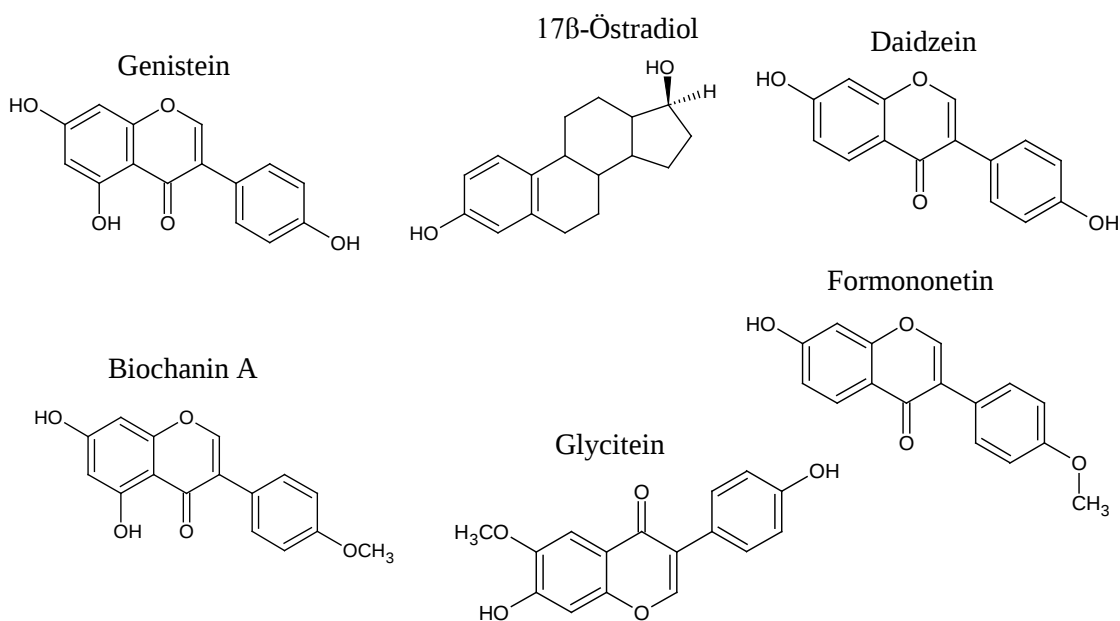


Abbildung 1: Strukturformeln von 17β-Östradiol und einiger Isoflavone

2.1.2 Absorption und Verstoffwechselung

Die chemische Form, in der Isoflavone in Nahrungsmitteln vorkommen, hat großen Einfluss auf ihre biologische Aktivität, die Bioverfügbarkeit und daher auch auf ihre gesundheitlich relevanten Effekte. Eine entscheidende Rolle bei der Aufnahme und Verstoffwechselung der Phytoöstrogene spielt die Mikroflora des Darms [19].

Die meisten Isoflavone kommen in Pflanzen als Glucoside vor, die biologisch weniger aktiv sind als die entsprechenden Aglykone [3]. Beispielsweise besitzen diese Glucoside geringere östrogene Wirkungen und können aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften und ihrem Molekulargewicht nur schlecht von den Enterozyten absorbiert werden. Die Verbindungen werden von bakteriellen Glucosidasen im Dünndarm hydrolysiert und in ihre aglykonen Formen (Daidzein, Genistein und Glycitein) umgewandelt. Diese werden über das Darmepithel aufgenommen oder im Dickdarm weiter metabolisiert. Darüber hinaus können Isoflavone über den enterohepatischen Kreislauf von der Leber mit der Gallenflüssigkeit wieder zurück in den Dünndarm gelangen und erneut metabolisiert und absorbiert werden. [19, 20].

Genistein wird in einem ersten Reaktionsschritt zu Dihydrogenistein und anschließend zu 6'-Hydroxy-O-demethylangolensin reduziert und zuletzt als p-Ethylphenol und 4-Hydroxyphenyl-2-propionsäure abgebaut [21]. Daidzein wird nach Reduktion zu Dihydrodaidzein entweder zu O-Demethylangolensin oder Equol umgewandelt. Nur etwa ein Drittel aller Menschen (in asiatischen Ländern bis zu 60 Prozent) besitzt die Fähigkeit, Equol zu bilden. Dies ist vermutlich ebenfalls auf individuelle Unterschiede der Zusammensetzung der Darmflora zurückzuführen. Equol besitzt eine höhere Bindungsaffinität an den Östrogenrezeptor, sowie eine höhere antioxidative Aktivität und antiandrogene Eigenschaften als andere Isoflavone, die gesundheitlichen Effekte der Phytoöstrogene hängen daher zu einem großen Teil von der Fähigkeit ab, dieses Stoffwechselprodukt zu bilden. Da die Bakterienflora im Darm und die Aktivität der Glucosidasen durch die Zusammensetzung der Nahrung beeinflusst werden, kann sich diese ebenfalls auf die Verstoffwechselung der Isoflavone und auf die Produktion von Equol auswirken. Beispielsweise führt eine vegetarische Ernährung mit einem hohen Anteil an Ballaststoffen, pflanzlichen Proteinen und wenig Fett dazu, dass vermehrt Equol gebildet wird [20].

Der Einfluss der Mikroflora des Darms auf die Verstoffwechselung von Phytoöstrogenen wurde durch eine Reihe von Untersuchungen belegt. Beispielsweise wurde nachgewiesen, dass der Metabolismus durch die Einnahme von Antibiotika gehemmt werden kann [22]. Außerdem wurde gezeigt, dass Säuglinge nach Verabreichung von sojähaltiger Babynahrung in den ersten vier Monaten kein Equol produzieren, da ihre Darmflora noch nicht ausreichend entwickelt ist [23].

Isoflavone werden relativ schnell absorbiert und sind bereits nach 30 Minuten bis zwei Stunden im Plasma nachweisbar. Dies ist durch eine zusätzliche Aufnahme aus Magen und Duodenum ins Blut erklärbar. Nach vier bis acht Stunden kommt es infolge des enterohepatischen Kreislaufs erneut zu einem Anstieg der Konzentration im Plasma [20]. Ein Großteil der Daidzein- und Genisteinmenge wird innerhalb von 24 Stunden wieder ausgeschieden [3].

Setchell et al. [24] untersuchten die Pharmakokinetik von Daidzein und Genistein beim Menschen, indem sie die Verbindungen mit ^{13}C markierten. Die Bioverfügbarkeit und die maximale Serumkonzentration von Genistein waren signifikant höher als jene von Daidzein. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Absorption der Isoflavone limitiert ist, da ab einer bestimmten Menge ein Sättigungseffekt auftritt. Die Untersuchungen von Decross et al. [25] und Zubik et al. [26] zeigen deutlich, dass die Aufnahme von Equol über den Dickdarm höher ist als jene von Daidzein und dass seine Plasmakonzentrationen langsamer sinken als die anderer Isoflavone.

Durch sojareiche Ernährung, die etwa 50 mg Isoflavone pro Tag enthält, können Plasmakonzentrationen von 50-800 ng/ml Daidzein, Genistein und Equol erreicht werden. Diese Mengen entsprechen den Konzentrationen, die im Plasma der japanischen Bevölkerung gefunden wurden und reichen aus, um positive Gesundheitseffekte auszulösen [19].

2.1.3 Biologisch relevante Effekte

Isoflavone können im Körper auf verschiedene Weise physiologische Prozesse verändern und dadurch die menschliche Gesundheit beeinflussen. In diesem Kapitel werden die wichtigsten gesundheitlichen Effekte der Phytoöstrogene und die zugrunde liegenden Mechanismen beschrieben. Abbildung 3 (siehe Seite 18) gibt einen schematischen Überblick über die biologischen Wirkungen der Isoflavone.

2.1.3.1 Molekulare Mechanismen

Die Hauptwirkung der Isoflavone besteht in der Fähigkeit aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu steroidalen Hormonen an Östrogenrezeptoren (ER) von Zellen zu binden. Diese kommen im Körper in zwei Isoformen vor, als ER- α und ER- β und ihre Verteilung ist je nach Organ und Gewebe unterschiedlich [3]. ER- α kommt vor allem in Nieren, Nebennieren, Hypophyse, Brustgewebe, Haut, Skelettmuskulatur und Leber vor, ER- β findet man in größeren Mengen in Prostata, Lunge, Blase, Gehirn, Knochengewebe und im Gastrointestinaltrakt. Eierstöcke, Hoden und Uterus besitzen beide Isoformen. Die Verteilung der Rezeptoren liefert eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Wirkungen der Isoflavone. Durch ihre Bindung an die ER werden diese entweder aktiviert oder inhibiert, da sie unzugänglich für Östrogenmoleküle werden. Auf diese Weise besitzen Isoflavone sowohl östrogene Wirkungen, können aber auch antagonistische und somit antiöstrogene Effekte auslösen [27, 28].

Die Wirkungen der Isoflavone sind vom Östrogenspiegel im Körper abhängig. Bei hohen Konzentrationen an endogenen Östrogenen, wie sie während der Follikelphase des Menstruationszyklus auftreten, blockieren Phytoöstrogene die ER. In der Menopause können sie hingegen den niedrigen Östrogenspiegel ausgleichen [3].

Die Bindungsaffinität der Isoflavone an die Rezeptoren ist wesentlich geringer als diejenige von 17 β -Östradiol und ist innerhalb der Gruppe recht unterschiedlich. Während Genistein im Vergleich zu Östradiol eine Affinität von 4% an den ER- α und 87% an den ER- β besitzt, sind es bei Daidzein 0,1% bzw. 0,5% [29]. Equol hat die höchste Bindungsaffinität und löst daher die stärksten östrogenen Effekte unter den Daidzeinmetaboliten aus [20].

Im Allgemeinen zählen Östrogenrezeptoren zu den nukleären Rezeptoren und werden im Cytosol durch Bindung eines Liganden aktiviert, ein geringer Teil kommt

allerdings auch als membrangebundene Form vor. Diese sind nicht direkt an der Regulation von Transkriptionsvorgängen beteiligt, sondern aktivieren intrazelluläre Mechanismen. Dazu zählen beispielsweise Änderungen der Ionenkonzentrationen und der Membranpermeabilität von Zellen, sowie die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO). Auf diese Weise kommt es zur Erweiterung von Blutgefäßen (Vasodilatation) und erhöhter Aktivität der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS). Außerdem können die neuronale Erregbarkeit und in Folge das Zentralnervensystem und kognitive Funktionen beeinflusst werden [3]. Abbildung 2 zeigt schematisch die Wirkungen von Östrogenrezeptoren.

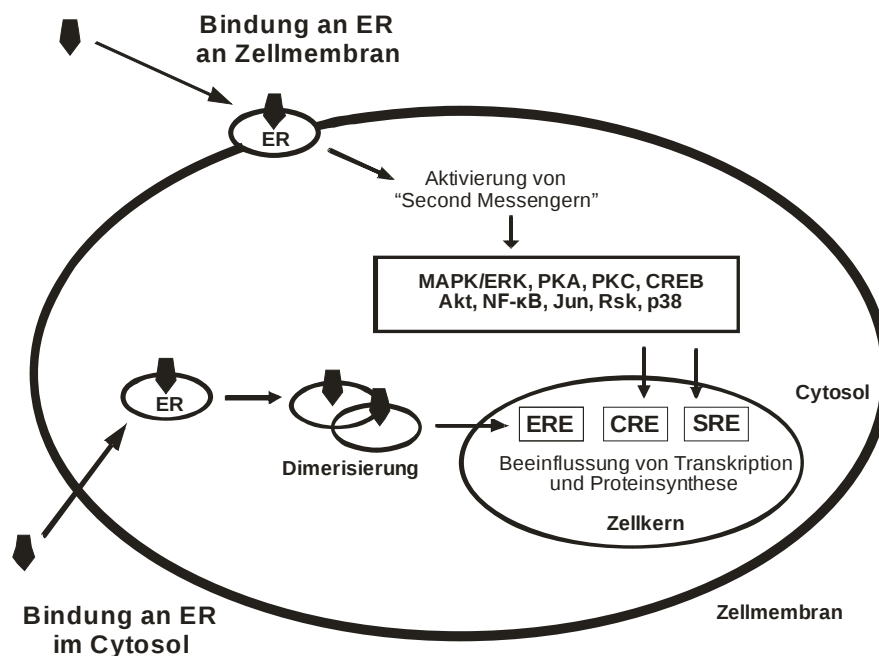


Abbildung 2: Schematisch Darstellung der Wirkung von Östrogenrezeptoren. Isoflavone bzw. Östrogene binden an die Rezeptoren, die sich im Cytosol oder an der Zellmembran befinden, und beeinflussen über verschiedene Signalwege Transkriptionsvorgänge und die Proteinsynthese. Die Bindung an einen intrazellulären Östrogenrezeptor führt zur Dimerisierung mit einem weiteren Rezeptor. Dieser Komplex bindet im Zellkern an das „Estrogen Response Element“ (ERE) des Zielgens, das in weiterer Folge verstärkt transkribiert wird. Durch Bindung eines Östrogens oder Isoflavons an den membrangebundenen Rezeptor kommt es zur Aktivierung sekundärer Botenstoffe („Second Messenger“). Diese binden wiederum an bestimmte DNA-Sequenzen (CRE, SRE), die die Transkription aktivieren [30]. Abkürzungen: ER – Östrogenrezeptor, ERE - Estrogen Response Element, MAPK/ERK – Mitogen Activated Proteinkinase/Extracellular signal Regulated Kinase, PKA – Proteinkinase A, PKC – Proteinkinase C, CREB – cAMP response element-binding Protein, CRE - cAMP-Response-Element, SRE - Serum-Response-Element.

Die Regulation des Hormonstoffwechsels wird von den Isoflavonen auch unabhängig von der Bindung an die Östrogenrezeptoren beeinflusst. Sie hemmen beispielsweise die Aktivität der 5 α -Reduktase und der Aromatase, die für die Umwandlung von Testosteron zu 5 α -Dihydrotestosteron bzw. Östradiol zuständig sind. Darüber hinaus verstärken Isoflavone die Synthese des Sexhormon-bindenden Globulins (SHBG), wodurch vermehrt endogene Östrogene gebunden werden können [3].

Isoflavone haben nicht nur phytoöstrogene Wirkungen, sondern sind auch in der Lage intrazelluläre Signalwege und das Zellwachstum zu beeinflussen. Sie hemmen *in vitro* die Zellproliferation verschiedener Tumorzelllinien und können Apoptose auslösen [31]. Akiyama et al. [32] entdeckten 1987, dass Genistein *in vitro* Tyrosinkinasen und dadurch die von diesem Protein kontrollierten Signalwege inhibieren kann. Diese Enzyme spielen bei Wachstumsvorgängen und Karzinogenese eine wesentliche Rolle und sind in Krebszellen oft überexprimiert.

Darüber hinaus inhibiert Genistein die Topoisomerasen I und II und Histidinkinasen, was sowohl antiproliferative als auch proapoptotische Effekte zur Folge hat. In verschiedenen Brustkrebszelllinien konnte man durch Behandlung der Zellen mit diesem Isoflavon Apoptose auslösen und Änderungen in der Expression von Genen beobachten, die mit Überlebensvorgängen von Zellen in Zusammenhang stehen [33, 34]. Außerdem wurde nachgewiesen, dass Genistein den NF- κ B- und den Akt-Signalweg beeinflussen kann. NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der eine wichtige Rolle bei Entzündungsprozessen und Zellwachstum spielt und bei Überexpression Apoptose verhindert. Genistein inhibiert die Aktivierung von NF- κ B, aber auch die Bindung des Moleküls an die DNA. Der Akt-Signalweg ist ein weiterer wichtiger Mechanismus, der das Überleben einer Zelle beeinflusst. Er wird ebenfalls durch Genistein inhibiert, was schlussendlich zur Apoptose führt [16].

Isoflavone können nicht nur in die Krebsentstehung eingreifen, sondern haben auch Einfluss auf den Verlauf der Kanzerogenese wie Metastasierung und Angiogenese. Genistein verringert *in vitro* die Expression von *c-erbB-2*, einem Gen, das mit der Ausbreitung von Krebszellen im Körper in Zusammenhang steht [35]. Des Weiteren inhibiert das Isoflavon TGF- β -kontrollierte Signalwege, die an der Regulation von Angiogenese, der Bildung neuer Blutgefäße, beteiligt sind [36].

2.1.3.2 Antioxidative Effekte

Viele gesundheitlich relevante Effekte der Phytoöstrogene, insbesondere die Prävention vor koronaren Herzerkrankungen und verschiedenen Krebsarten, stehen möglicherweise mit ihren antioxidativen Eigenschaften in Zusammenhang. Isoflavone erhöhen die Aktivität von antioxidativen Enzymen (Katalase, Superoxiddismutase und Glutathionperoxidase), die im Körper Radikale inaktivieren, die Bildung von Wasserstoffperoxid und des Superoxidanions hemmen und oxidative Schäden verhindern, indem sie an bestimmte Stellen der DNA binden und diese schützen. Außerdem können sie durch ihre Hydroxylgruppen Elektronen abgeben und Radikale dadurch direkt abfangen [2]. Die Position dieser Hydroxylgruppen auf den Phenolringen ist ein entscheidender Faktor für die Stärke ihrer antioxidativen Aktivität. Mitchell et al. [37] untersuchten die Wirkungen verschiedener Isoflavone und derer Metaboliten in FRAP- und TEAC-Assays (siehe Kapitel 2.4.3) und zeigten, dass Equol die stärksten antioxidativen Effekte besitzt.

Isoflavone beeinflussen auch die Expression von Genen und Signalwegen, die mit oxidativem Stress in Zusammenhang stehen. Beispielsweise wird der Transkriptionsfaktor NF- κ B durch freie Radikale aktiviert. Genistein kann die Aktivierung dieses Proteins im Cytosol inhibieren oder indirekt beeinflussen, indem es vor der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies schützt. Dieser Effekt konnte auch *in vitro* mit humanen Lymphozyten und in einer Humanstudie, in der ein isoflavonhaltiges Präparat verabreicht wurde, beobachtet werden [16].

Darüber hinaus verhindern Isoflavone die Oxidation von Low Density Lipoproteinen (LDL, siehe Kapitel 2.4.2), indem sie an die Moleküle binden und sie auf diese Weise vor Angriffen durch Oxidantien schützen. Vor allem mit Genistein wurde in verschiedenen *in vitro* Untersuchungen eine protektive Wirkung vor LDL-Oxidation festgestellt [38-40].

In Einzelzellgelelektrophoretetests (SCGE-Tests) wurden Schutzeffekte von Isoflavonen gegenüber ROS-induzierten DNA-Schäden mit verschiedenen Zelllinien unter *in vitro* Bedingungen nachgewiesen. Bei diesen Untersuchungen wurde nach Inkubation der Zellen mit verschiedenen Isoflavonen (Genistein, Daidzein und Equol) eine Abnahme von Wasserstoffperoxid-induzierten Schäden beobachtet. In Tabelle 2 sind Ergebnisse einiger *in vitro* Studien aufgelistet.

Tabelle 2: *In vitro* SCGE-Untersuchungen über die antioxidative Wirksamkeit von Isoflavonen¹

Isoflavon-konzentration	Testsystem	Behandlung	Ergebnis	Ref.
Genistein/Daidzein 0.01–2.5 µM/24 h 2.5–20 µM /24 h	Humane Lymphozyten, Jurkat T-Zellen	500 µmol/L H ₂ O ₂	↓ Sensivität gegenüber H ₂ O ₂	[41]
Genistein 0.01–1µmol/l Equol 0.01 -100µmol/l	Humane Lymphozyten	500 mmol/l H ₂ O ₂	↓ Sensivität gegenüber H ₂ O ₂	[42]
Genistein 0.01–100 µM	Humane Spermatozoen	H ₂ O ₂	↓ Sensivität gegenüber H ₂ O ₂	[43]
Genistein 1–30 µM/24h	Prostata- krebszellen	19 µM H ₂ O ₂	↓ Sensivität gegenüber H ₂ O ₂	[44]
Genistein-8-C- Glucosid 2.5-10 µM	NIH 3T3-Zellen	H ₂ O ₂	↓ Sensivität gegenüber H ₂ O ₂	[45]
Genistein-8-C- Glucoside 5 und 7.5 µM	CHO-Zellen	H ₂ O ₂	↓ Sensivität gegenüber H ₂ O ₂	[46]

¹⁾ Abkürzungen: ↓ - Abnahme

Auch in Tierexperimenten und Humanstudien wurden die antioxidativen Effekte der Isoflavone untersucht, indem entweder Isoflavone oder sojähaltige Nahrungsmittel und Supplemente verabreicht wurden.

In einem Versuch mit Ratten wurde den Tieren ein Monat lang isoflavonhaltiges Sojapulver verabreicht. Nach der Behandlung wurde ein Rückgang der DNA-Strangbrüche in Leukozyten und ein Anstieg der totalen antioxidativen Kapazität beobachtet [47]. Cai und Wei [48] untersuchten die Beeinflussung der Aktivitäten antioxidativer Enzyme durch Genistein bei Mäusen und konnten erhöhte Aktivität von Katalase in Dünndarm, Leber und Niere, sowie von Superoxiddismutase und Glutathionperoxidase in der Haut und von Glutathionreduktase in Dünndarm und Haut feststellen. Nach sechsmonatiger Gabe von Formononetin kam es in Mäusen ebenfalls zu einer Erhöhung von antioxidativ wirksamen Enzymen und zu einem Rückgang der Produktion von Malondialdehyd (MDA) [49].

Auch in einer Studie mit Ratten, denen eine sojaproteinhaltige Diät verabreicht wurde, konnten antioxidative Wirkungen nachgewiesen werden. Nach zwölf Monaten

waren die MDA-Werte in den Mitochondrien der Leber um ein Drittel reduziert und der Glutathionspiegel war 35% höher als in der Kontrollgruppe. Die Expression der antioxidativen Enzyme Mangan-Superoxiddismutase (MnSOD) und Cytochrom-c-Oxidase waren signifikant erhöht [50].

In einer weiteren Untersuchung, in der Ratten Genistein konsumierten (20 mg/kg b.w., 5 Tage), wurden Schutzeffekte vor 7,12-Dimethylbenz(a)anthracen (DMBA)-induzierten Chromosomenaberrationen und eine Reduktion der polychromatischen Erythrozyten mit Kleinkernen beobachtet [51]. Nach Behandlung von Mäusen mit Benzo(a)pyren kam es durch Genisteinverabreichung zu einem Rückgang der DNA-Strangbrüche, Mikrokerne und Chromosomenaberrationen [52].

Mitchell et al. [53] publizierten die Ergebnisse einer Humanstudie, in der die Probanden entweder Soja-, Reis- oder Kuhmilch zu sich nahmen. Nach vier Wochen kam es zu einer Abnahme der endogenen Bildung oxidierten Pyrimidine in der Sojamilchgruppe, allerdings wurden weder eine Reduktion der DNA-Migration noch protektive Effekte gegenüber H_2O_2 detektiert. In einer aktuelleren SCGE-Untersuchung mit einem Nahrungsergänzungsmittel, das 80 mg Isoflavone aus Soja, Reis und Leinsamen enthielt, konnten nach siebentägiger Einnahme keine Effekte auf die DNA-Stabilität beobachtet werden [54]. Davis et al. [55] und Djuric et al. [56] fanden nach dreiwöchiger Verabreichung von Isoflavonpräparaten einen Rückgang von 5-Hydroxymethyl-2'-deoxyuridin (5-OHmdU), einem Marker für DNA-Oxidation.

Auch in Bezug auf die Änderungen biochemischer Parameter sind die Ergebnisse der bisherigen Interventionsstudien widersprüchlich. Tikkanen et al. [57] stellten nach zweiwöchiger Einnahme von isoflavonhaltigen Sojariegeln eine verringerte Oxidierbarkeit der LDL-Partikel fest. In zwei weiteren Humanstudien kam es ebenfalls zu einem Rückgang der LDL-Oxidation [58, 59]. In anderen Untersuchungen wurden im Gegensatz dazu keine Veränderungen dieses Parameters durch die Phytoöstrogene gefunden [60, 61].

Die Bestimmung der Endprodukte der Lipidperoxidation (siehe Kapitel 2.4.2) ist eine weitere Methode, um oxidativen Stress nachzuweisen. Als Parameter können MDA im Serum und die F2-Isoprostankonzentrationen im Harn oder im Plasma gemessen werden. Die Einnahme von Isoflavonen ergaben in mehreren Studien keine Abnahme des MDA [59, 61, 62], allerdings konnten Wiseman et al. [59] einen Rückgang der

Isoprostankonzentration nach Konsum von Sojaburgern feststellen. Tabelle 3 gibt einen Überblick über die bisher durchgeführten Humanstudien, die mit isoflavonhaltigen Nahrungsmitteln durchgeführt wurden.

Tabelle 3: Beispiele für Humanstudien über die antioxidative Wirksamkeit von isoflavonhaltigen Nahrungsmitteln

Studiendesign ¹	n ²	Ergebnis ³	Ref.
Sojamilch, Reismilch oder Kuhmilch 1 L/Tag, 28 Tage	10	↔ Sensitivität gegenüber H ₂ O ₂ ↔ Strangbrüche ↓ oxidierte Pyrimidine in Lymphozyten	[53]
Nahrungsergänzungsmittel mit Phytoöstrogenen 80 mg/ Tag, 7 Tage	10	↔ Strangbrüche in Lymphozyten	[54]
Isoflavonhaltiges Nahrungsergänzungsmittel 100 mg/Tag, 21 Tage	6	↓ 5-OHmdU in Lymphozyten	[55]
Isoflavonhaltiges Nahrungsergänzungsmittel 50 mg bzw. 100 mg/Tag, 21 Tage	12	↓ 5-OHmdU in Lymphozyten	[56]
3 Sojariegel/Tag, 14 Tage 12 mg Genistein/Riegel 7 mg Daidzein/Riegel	6	↓ OxoLDL im Plasma	[57]
Isoflavonhaltige Diät 86 mg/Tag, 1 Monat	31	↓ OxoLDL im Plasma	[58]
Isoflavonhaltiges Nahrungsergänzungsmittel 86 mg/Tag, 4 Monate	14	↔ OxoLDL im Plasma	[60]
Isoflavonhaltige Diät 50 mg/1000 kcal, 42 Tage	42	↔ OxoLDL im Plasma ↑ MDA im Plasma ↔ F2-Isoprostane im Harn	[61]
Isoflavonhaltiges Nahrungsergänzungsmittel 86 mg/Tag, 1 Monat	23	↔ MDA im Plasma	[62]
Sojaburger, 17 Tage 21.2 mg Daidzein 34.8 mg Genistein	24	↓ OxoLDL im Plasma ↔ MDA im Plasma ↓ F2-Isoprostane im Harn	[59]
Isoflavonhaltiges Nahrungsergänzungsmittel 55 mg/Tag, 56 Tage	59	↔ F2-Isoprostane im Harn	[63]

¹⁾ mg-Mengen beziehen sich auf die Gesamtmenge an Isoflavonen

²⁾ n – Zahl der Teilnehmer

³⁾ Abkürzungen: 5-OHmdU - 5-Hydroxymethyl-2'-deoxyuridin, MDA – Malondialdehyd, ↑ - Anstieg, ↓ - Abnahme, ↔ keine Änderung

2.1.3.3 Schutz vor Krebserkrankungen

In asiatischen Ländern ist die Inzidenz für hormonabhängige Krebserkrankungen, wie Brust- und Prostatakrebs, geringer als in Europa oder den USA. Diese Beobachtung wird unter anderem auf eine sojareiche Ernährung zurückgeführt. So wurde bei asiatischen Auswanderern, die ihre Ernährungsgewohnheiten an die der westlichen Industrieländer anpassten (erhöhter Konsum von Fleisch und Fleischprodukten, geringere Aufnahme von Ballaststoffen und Sojabohnen), ein höheres Auftreten dieser Krebsarten beobachtet [3]. Für die präventive Wirkung der Isoflavone werden vor allem ihre antiöstrogenen bzw. antiandrogenen Eigenschaften verantwortlich gemacht. Beispielsweise wird die Entstehung von Prostatakrebs mit einem erhöhten Dihydrotestosteronspiegel in Zusammenhang gebracht, dessen Synthese durch Isoflavone beeinflusst wird [17]. In verschiedenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass endogen gebildete Östrogene an der Entstehung von Brustkrebs beteiligt sind. Sie erhöhen die Proliferation des Gewebes und beeinflussen das Wachstum von östrogensensitiven neoplastischen oder präneoplastischen Zellen. Ein frühes Einsetzen der Menstruation und ein später Beginn der Wechseljahre, kurze und regelmäßige Menstruationszyklen sowie ein hoher Östrogenspiegel bei postmenopausalen Frauen gelten als Risikofaktoren für Brustkrebs [19, 64]. Isoflavone senken durch erhöhte SHBG-Synthese die Menge an freien Östrogenen im Körper und verändern durch ihre Bindung an die ER verschiedene östrogenabhängige Signalwege [6].

Die antioxidativen Effekte der Isoflavone, die zuvor schon genauer beschrieben wurden, sind eine weitere mögliche Erklärung für die präventive Wirkung gegenüber Krebserkrankungen.

2.1.3.4 Schutz vor Herz-Kreislaufkrankungen

Die Inzidenz für kardiovaskuläre Erkrankungen ist in den westlichen Industriestaaten achtmal höher als in asiatischen Ländern [65]. Neben erblichen Faktoren werden auch unterschiedliche Ernährungsgewohnheiten dafür verantwortlich gemacht [3].

Das Risiko für Herz-Kreislaufkrankungen ist bei premenopausalen Frauen geringer als bei Männern, da Östrogene kardioprotektive Effekte besitzen. Diese Beobachtung konnte durch den Einsatz der Hormonersatztherapie während der Wechseljahre bestätigt werden. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Isoflavone

geht man davon aus, dass diese auf dieselbe Art präventiv gegenüber kardiovaskulären Erkrankungen wirken wie die Östrogene selbst [50].

Klinische Studien zeigten, dass es nach Verzehr von Soja zu einer Senkung des LDL-Cholesterins und der Serum-Triglyzeride sowie zu einer Erhöhung des HDL-Cholesterins kommt [62, 66-68]. Anderson et al. [69] publizierten eine Metaanalyse über die cholesterinsenkende Wirkung von Sojaproteinen, die zu 60-70% auf Isoflavone zurückgeführt wird.

Es gibt eine Reihe von Mechanismen, die mit der Verhinderung von Herz-Kreislaufkrankungen in Zusammenhang stehen und die dafür sprechen, dass Isoflavone die Risiken reduzieren. Beispielsweise können sie den Lipidstoffwechsel beeinflussen, das Thromboserisiko senken, indem sie die Thrombozytenaggregation hemmen, und als Antioxidantien wirken [3, 70]. Darüber hinaus verändern die Phytoöstrogene den Gefäßtonus durch verschiedene Mechanismen, die zu einer Erweiterung der Gefäße führen bzw. einer Gefäßverengung und dadurch einer Erhöhung des Blutdrucks entgegenwirken. Durch die Bindung an die Östrogenrezeptoren kommt es zur erhöhten Expression der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) und vermehrten Produktion von Stickstoffmonoxid (NO). Die Freisetzung von NO bewirkt eine Relaxion der glatten Gefäßmuskulatur, was zu einer Gefäßerweiterung führt [3]. Mahn et al. [50] konnten nach Verabreichung von Isoflavonen an Ratten eine Verringerung des Blutdrucks und eine gleichzeitige Erhöhung der eNOS-Expression beobachten.

Des weiteren können Isoflavone den renalen Blutfluss und die Natriumausscheidung erhöhen und auf diese Weise den Blutdruck beeinflussen [3].

2.1.3.5 Isoflavone als Alternative zur Hormonersatztherapie

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass in asiatischen Ländern die Inzidenz von Wechseljahrsbeschwerden und Osteoporose niedriger ist als in den westlichen Industrieländern. Während der Menopause kommt es im Körper zu Veränderungen, die zu einer verminderten Funktion der Eierstöcke und dadurch zu einer geringeren Östrogenproduktion führen, die für die verschiedenen klimakterischen Beschwerden verantwortlich gemacht wird [28].

Seit 1942 wird die Hormonersatztherapie (HET) eingesetzt, um Wechseljahresbeschwerden wie Hitzewallungen, Stimmungsschwankungen und Müdigkeit zu lindern [71]. Des Weiteren wurde angenommen, dass sich die Einnahme von Östrogenen während der Menopause positiv auf das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und Osteoporose auswirkt [72]. In den letzten Jahren zeigte sich allerdings ein Zusammenhang zwischen HET und dem erhöhtem Auftreten von Brustkrebs und Herz-Kreislauferkrankungen [71]. Daher werden Phytoöstrogene vermehrt als Alternative verwendet, da diese ebenfalls östrogene Wirkungen besitzen [72]. Beispielsweise wurde in mehreren Studien eine Reduktion der Hitzewallungen nach Einnahme von isoflavonhaltigen Nahrungsergänzungsmitteln beobachtet [73, 74]. Vor allem hinsichtlich der Verringerung des Osteoporoserisikos wurden in verschiedenen Humanstudien positive Zusammenhänge mit dem Konsum von Soja und Phytoöstrogenen gefunden, daher werden diese Effekte im nachfolgenden Kapitel genauer beschrieben.

2.1.3.6 Schutz vor Osteoporose

Epidemiologische Studien zeigten einen Zusammenhang zwischen einer geringeren Osteoporoseinzidenz bei asiatischen Frauen und einer sojareichen Ernährung. Während der Menopause erhöht sich durch die verminderte Östrogenproduktion das Osteoporoserisiko. Isoflavone können aufgrund ihrer östrogenen Eigenschaften positiv auf die Aufrechterhaltung der Knochensubstanz wirken [75]. *In vitro* und Tierversuche zeigen, dass Isoflavone den Knochenaufbau durch die Osteoblasten fördern und den Abbau durch die Osteoklasten hemmen. Durch die Inhibition von Tyrosinkinasen und der Auslösung von Apoptose kann die Aktivität der Osteoklasten vermindert werden. Der Auf- und Abbau von Knochen wird auch durch das Zusammenspiel der beiden Proteine Osteoprotegerin und „Receptor Activator of NF- κ B Ligand“ (RANKL) gesteuert, deren Konzentrationen ebenfalls durch höhere Genisteinaufnahmen beeinflusst werden können.

Knochenzellen besitzen größere Mengen des Östrogenrezeptors β , an den Isoflavone mit einer höheren Affinität binden. Dadurch können die Phytoöstrogene die Bildung von Osteoblasten direkt durch Aktivierung oder Inhibierung der Rezeptoren

oder indirekt durch Mechanismen wie die erwähnte Hemmung von Tyrosinkinasen und Topoisomerasen II beeinflussen [28].

Des Weiteren wurde in einer Humanstudie nachgewiesen, dass erhöhte Aufnahme von tierischem Eiweiß zu vermehrter Kalziumausscheidung führt, die durch Konsum von Sojaproteinen vermindert wurde [76]. Tierversuche zeigten nach Verabreichung von Soja ebenfalls einen Anstieg der intestinalen Kalziumaufnahme [77].

In einer Reihe von Humanstudien konnte nachgewiesen werden, dass erhöhter Verzehr von soja- bzw. isoflavonhaltigen Nahrungsmitteln zur Prävention von Osteoporose beitragen kann [78-82]. Bei postmenopausalen Frauen nahm die Knochendichte abhängig von der Dosis und der Einnahmedauer zu. Ebenso konnte man veränderte Konzentrationen von spezifischen Biomarkern des Knochenauf- und -abbaus messen, beispielsweise einen Anstieg von Osteokalzin im Serum und Reduktion der N-Telopeptide und des Desoxypyridolin im Harn [83-87]. Allerdings waren diese Effekte meist gering und in einigen Studien, vor allem bei prämenopausalen Frauen, wurde keine Wirkung der Isoflavone gefunden [88-90].

Trotzdem könnte der Einsatz von Isoflavone eine Alternative für die Osteoporoseprävention sein, da sie im Gegensatz zur Hormonersatztherapie keine gesundheitlichen Risiken aufweisen [3].

2.1.3.7 Weitere gesundheitliche Wirkungen

Die Wirkung der Isoflavone auf kognitive Funktionen wurde in einigen Studien untersucht. Es ist belegt, dass Substanzen wie Östradiol über die Blut-Hirn-Schranke zum Gehirn gelangen können. Bei postmenopausalen Frauen wurde nach Langzeitverabreichung von Soja oder isolierten Isoflavonen ein positiver Einfluss auf das Lernverhalten, das logische Denkvermögen und organisatorische Fähigkeiten festgestellt. Auch nach einwöchiger Isoflavoneinnahme kam es zu einer Verbesserung der kognitiven Eigenschaften. Diese Ergebnisse stimmen mit der Beobachtung überein, dass die Inzidenz von Demenz in der asiatischen Bevölkerung geringer ist als in den westlichen Industriestaaten [3].

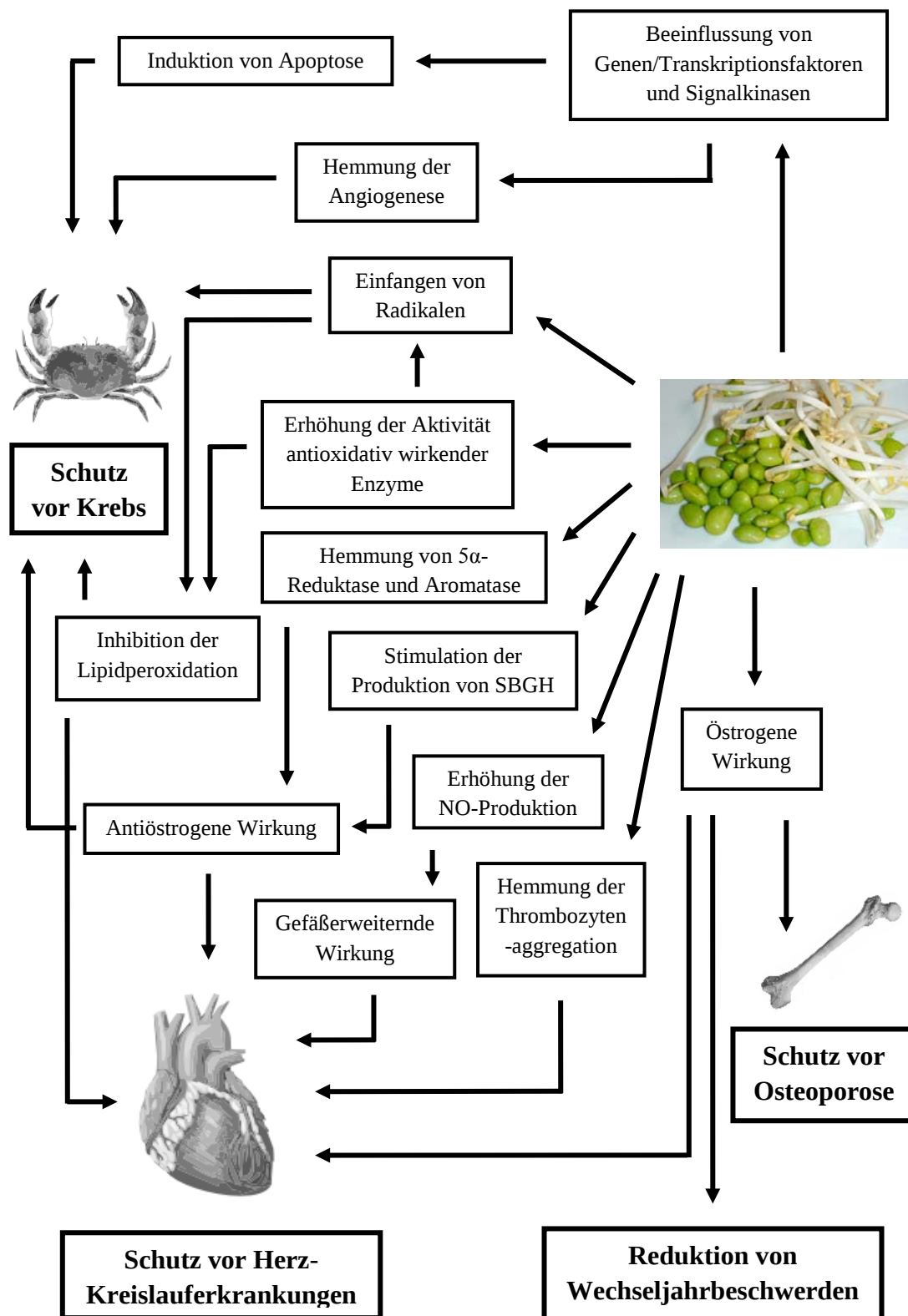


Abbildung 3: Biologische Effekte von Isoflavonen

2.1 Resveratrol

2.1.1 Überblick, Struktur und Vorkommen

Resveratrol (3,5,4'-Trihydroxystilben) ist ein Phytoalexin und kommt vor allem in Weintrauben, Maulbeeren, Erdnüssen und Preiselbeeren vor. Die Verbindung wurde erstmals 1940 in den Wurzeln von *Veratrum grandiflorum* O. Loes und 1963 in den Wurzeln der Knöterich-Pflanzen (*Polygonum cuspidatum*) gefunden und isoliert [91]. 1976 gelang der Nachweis in Weintrauben und 1992 in Wein [92]. Chemisch gesehen zählt die Substanz aufgrund der beiden phenolischen Ringe zu den Polyphenolen und kann in *cis*- oder *trans*-Konfiguration vorliegen. Durch ultraviolette Strahlung wird die *trans*-Form in die *cis*-Form umgewandelt. Lichtgeschützt ist *trans*-Resveratrol für einige Monate stabil [93]. Abbildung 4 zeigt die Strukturformel der beiden Isomere, sowie die von Piceatannol, einem Stoffwechselprodukt von Resveratrol, das eine zusätzliche Hydroxylgruppe besitzt.

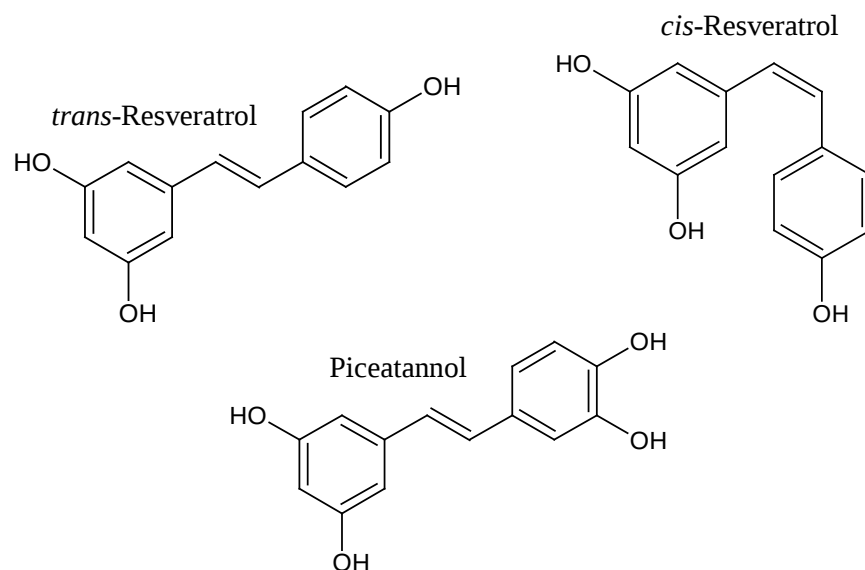


Abbildung 4: Strukturformeln von *trans*- und *cis*-Resveratrol und Piceatannol

Pflanzen erhöhen die Produktion von Resveratrol, wenn sie Infektionen (Befall durch Botrytis) oder Umweltbelastungen wie ultravioletter Strahlung, Temperaturschwankungen und Ozon ausgesetzt sind [94]. Die Synthese findet ausschließlich in der Schale von Weintrauben, nicht aber im Fruchtfleisch statt. Rotweine enthalten mit 0,1 bis 15mg/L deutlich höhere Mengen des Polyphenols als Weißweine mit

durchschnittlich 0,24 mg/L, da die Schalen der Früchte während der Fermentation länger mit dem Wein in Kontakt bleiben. Der Resveratrolgehalt von Weinen variiert stark, da er von verschiedenen Faktoren wie zum Beispiel der Traubensorte, der geografischen Herkunft der Früchte, der Jahreszeit oder der Verarbeitung abhängig ist. Auch die Dicke der Schalen, ultraviolette Strahlung und Botrytis-Infektionen beeinflussen die Produktion des Phytoalexins [95]. Wang et al. [96] untersuchten den Gehalt von sieben verschiedenen italienischen Rotweinen und fanden Konzentrationen zwischen 1,98 und 6,83 mg/L, während Burns et al. [97] bei kalifornischem Pinot Noir Werte bis 18 mg/L messen konnten. Tabelle 4 gibt einen Überblick über die Resveratrolkonzentrationen verschiedener Lebensmittel.

Tabelle 4: Vorkommen von Resveratrol in Lebensmitteln

Lebensmittel	Resveratrolgehalt	Ref.
Schalen von Weintrauben	50-100 mg/g	[92]
Rotweine	0,1 bis 15 mg/L	[95]
Weißweine	0,24 mg/L	[98]
Weintrauben	0,16-3,54 µg/g	[99]
Erdnüsse	0,022-1,798 µg/g	[100]
Erdnussbutter (Durchschnitt aus 7 Sorten)	0,814 µg/g	[101]
<i>Polygonum cuspidatum</i> (Wurzel, getrocknet)	3,77 mg/g	[102]
Idatori-Tee (aus Wurzel von <i>Polygonum cuspidatum</i>)	0,68 mg/L	[97]
Roter Weintraubensaft (<i>trans</i> -Resveratrol)	0,5 mg/L	[91]
Weißer Weintraubensaft	0,05 mg/L	[99]
Cranberrysaft (Durchschnitt, <i>trans</i> -Resveratrol)	0,2 mg/L	[91]
Pistazien (Durchschnitt, <i>trans</i> -Resveratrol)	0,09-1,67 µg/g	[103]
Heidelbeeren	16 ng/g	[99]

In den letzten Jahrzehnten stieg der Bekanntheitsgrad von Resveratrol aufgrund des sogenannten „Französischen Paradoxons“. Dieser Begriff entstand durch die Beobachtung, dass es bei der französischen Bevölkerung trotz hohen Konsums an gesättigten Fettsäuren zu einem wesentlich geringeren Auftreten von Herz-Kreislauf-erkrankungen kommt. Dieses Phänomen wurde auf den regelmäßigen Genuss von Rotwein zurückgeführt [104].

1997 veröffentlichten Jang et al. [105] eine Arbeit über die chemopräventiven Effekte von Resveratrol und weckten dadurch sowohl das Interesse der Forscher als auch das der Öffentlichkeit. In den folgenden Jahren wurden zahlreiche Untersuchungen über die molekularen Grundlagen der antikarzinogenen Eigenschaften des Polyphenols durchgeführt, die in der Publikation von Kundu et al. [106] zusammengefasst werden.

2. 2. 2 Verstoffwechselung

Aufgrund der verschiedenen gesundheitlichen Effekte, die Resveratrol zugeschrieben werden, ist die Absorption und weitere Verstoffwechselung der Substanz von besonderer Bedeutung. In Pflanzen kommt das Polyphenol hauptsächlich in glycosylierten Formen vor (3-O- β -D-Glucoside). Die entsprechenden Verbindungen werden als Piceide bezeichnet und sind stabiler, da sie durch die Glycosylierung vor enzymatischen Oxidationsprozessen geschützt sind. Resveratrol kann von den Zellen des Darms nur in seiner aglyconen Form aufgenommen werden, daher müssen die Glucoside zuerst in ihre entsprechenden Aglycone umgewandelt werden. Diese Reaktion wird durch die im Verdauungstrakt vorkommenden Glycosidasen katalysiert. Die Absorption ist daher von dem Verhältnis zwischen glycosyliertem und aglyconem Resveratrol in Nahrungsmitteln und der Expression und Aktivität der Verdauungsenzyme abhängig [107].

Nach der Aufnahme über den Darm werden die Resveratrolaglycone in Glucuronid- und Sulfat-Konjugate umgewandelt und gelangen anschließend in den Blutkreislauf. Durch Glucuronidasen und Sulfatidasen wird ein Großteil der Polyphenole wieder dekonjugiert und von der Leber aufgenommen, wo die Verbindungen entweder durch den enterohepatischen Kreislauf über die Galle erneut in den Darm transportiert oder konjugiert und ins Blut abgegeben werden. Von dort gelangen sie in verschiedene Gewebe oder werden über die Niere ausgeschieden.

Die Absorption, Verstoffwechselung und Ausscheidung von Resveratrol wurden sowohl in Tierexperimenten, als auch in Humanstudien und mit humanen Ziellinien untersucht. Nach der Aufnahme sind die Resveratrolkonzentrationen im Blut gering und auch die Halbwertszeit der Verbindung ist relativ kurz. Der Grund dafür ist die rasche Verstoffwechselung des Polyphenols im Darm und in der Leber [108]. In Versuchen mit Ratten wurde gezeigt, dass nach Konsum von Tritium-markiertem Resveratrol mehr als

die Hälfte der Verbindung von den Tieren absorbiert wurde. Die höchste Konzentration des Polyphenols wurde sowohl im Blut als auch im Serum nach 30 Minuten gemessen [109]. Nach intravenöser Verabreichung von *trans*-Resveratrol (15 mg/kg) wurde ein rascher Abfall der Agluconkonzentrationen beobachtet, die Halbwertszeit der Substanz betrug acht Minuten. Vier bis acht Stunden später kam es zu einem erneuten Anstieg der Plasmakonzentration, der dadurch erklärt wurde, dass die Verbindungen über den enterohepatischen Kreislauf von der Leber über die Galle wieder in den Darm transportiert und abermals absorbiert wurden. Dieser Effekt wurde ebenfalls mit glycosyliertem Resveratrol und nach oraler Verabreichung (50 mg/kg) beobachtet [110].

In einer Studie von Miksits et al. [111] wurde die Sulfatierung von Resveratrol in der menschlichen Leber untersucht. In Anwesenheit von 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat wurden durch Massen- und Kernspinresonanzspektroskopie drei Metabolite detektiert (*trans*-Resveratrol-3-O-4'-O-disulfat, *trans*-Resveratrol-4'-O-sulfat und *trans*-Resveratrol-3-O-sulfat). Diese Reaktionen wurden von verschiedenen Sulfontransferasen katalysiert.

Walle et al. [112] untersuchten in einer Humanstudie die Aufnahme von Resveratrol im Körper, seine Bioverfügbarkeit und die weitere Verstoffwechselung. Dazu wurde sechs Probanden 25 mg radioaktiv (¹⁴C) markiertes Resveratrol pro Tag oral und intravenös verabreicht (0,2 mg/P/T). Obwohl die Absorptionsrate bei etwa 70% lag, wurde nur eine geringe Menge der Verbindung (< 5 ng/ml) in unveränderter Form im Blut gefunden. Die Halbwertszeit der Substanz bzw. seiner Metaboliten im Plasma betrug durchschnittlich neun Stunden. Um festzustellen nach welcher Zeit Resveratrol verstoffwechselt wird wurde das Plasma nach intravenöser Verabreichung untersucht. Nach einer halben Stunde wurde der Großteil der Substanz in Sulfat-Konjugate umgewandelt. Diese fand man auch nach oraler Verabreichung im Plasma, darüber hinaus wurden auch Glucuronid-Konjugate detektiert.

Auch in einer Studie von Goldberg et al [113] wurde die Absorption von drei Polyphenolen aus Rotwein an zwölf Probanden untersucht. Der höchste Serumspiegel (416 und 471 µg/L) wurde bei *trans*-Resveratrol nach einer halben Stunde gefunden. Die Ausscheidung im Urin nach 24 Stunden entsprach 16,5% der verabreichten Gesamtdosis.

Resveratrol wird im Körper durch das Cytochrom P450-Enzym CYP1B1 in Piceatannol und zwei weitere Mono- und Dihydroxyresveratrolverbindungen umgewandelt. Piceatannol besitzt ebenfalls chemopräventive Eigenschaften und kommt in Weinen vor, allerdings in weitaus geringeren Mengen als Resveratrol [114].

Da nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* zahlreiche positive Effekte von Resveratrol nachgewiesen wurden, aber nur ein geringer Teil des Moleküls unverändert ins Blut gelangt, nimmt man an, dass teilweise unbekannte Stoffwechselprodukte für die vielfältigen Wirkungen im Körper verantwortlich sind [91, 115].

2.2.3 Biologisch relevante Effekte

Der Konsum von Resveratrol wird aufgrund seiner pharmakologischen Eigenschaften mit zahlreichen positiven Gesundheitseffekten in Zusammenhang gebracht. Das Polyphenol soll vor allem das Risiko für Herz-Kreislauferkrankungen und Krebs senken, aber auch vor der Entstehung von neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimer, Parkinson und Chorea Huntington schützen, sowie antioxidative, antivirale und anti-aging Effekte besitzen [115]. Abbildung 5 (siehe Seite 30) gibt einen schematischen Überblick über die verschiedenen biologischen Wirkungen von Resveratrol.

2.2.3.1 Molekulare Mechanismen

Die protektiven Effekte von Resveratrol unterliegen einer Reihe von molekularen Mechanismen. Diese betreffen Wachstumsvorgänge, Apoptose, Entzündungsprozesse und antioxidative Eigenschaften, die in einem eigenen Kapitel genauer beschrieben werden [115].

Beispielsweise inhibiert Resveratrol Ribonukleotidreduktasen, die während der DNA-Synthese die Umwandlung von Ribonukleotiden zu den jeweiligen Desoxynukleotiden katalysieren [115]. Den Enzymen wird eine wichtige Rolle in der Therapie von Krebserkrankungen zugeschrieben, da sie in erhöhten Mengen von Tumorzellen produziert werden. Ribonukleotidreduktasen benötigen für ihre Aktivierung Tyrosylradikale, daher können sie durch Antioxidantien wie Resveratrol, die freie Radikale binden, inhibiert werden [114]. Des weiteren hemmt das Polyphenol DNA-Polymerasen, die ebenfalls für die Replikation der Erbsubstanz benötigt werden.

Resveratrol induziert den programmierten Zelltod (Apoptose), indem es vermehrt p53 expremiert, Sirtuin-1 aktiviert (siehe unten) und antiapoptotische Genprodukte wie Bcl-2, Bcl-Xl oder Survivin hinunter reguliert. Außerdem kann das Polyphenol die Expression von entzündungsfördernden Proteinen wie COX-2, TNF und CRP unterdrücken und in die Zellproliferation eingreifen, indem es die Zellteilung inhibiert und den Zellzyklus beeinflusst [93].

Des weiteren kann Resveratrol aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu Diethylstilbestrol als Phytoöstrogen wirken und an Östrogen-Rezeptoren binden. Dadurch können hormoninduzierte Prozesse wie Proliferation, Transformation oder Progression von Zellen vermindert werden. Auch dies wird mit protektiven Effekten gegenüber Herz-Kreislauferkrankungen und Krebs in Zusammenhang gebracht [91, 115]. Die östrogene Wirkung konnte allerdings nur mit *trans*-Resveratrol nachgewiesen werden [6].

In mehreren Studien wurde eine Verlängerung der Lebensdauer bei verschiedenen Lebewesen wie *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* durch Resveratrol festgestellt. Weiters fand man, dass das Molekül, ähnlich wie bei kalorischer Restriktion, Gene aktiviert, die für die Sirtuinsynthese kodieren. Sirtuine sind Enzyme, die zu den NAD⁺-abhängigen Deacetylasen (Histon-Deacetylasen der Klasse III) zählen und mit Alterungsprozessen in Zusammenhang stehen. Eine Reduktion der Kalorienaufnahme vermindert Entzündungsprozesse, Arteriosklerose, Insulinresistenz und Alterungsvorgänge. Baur und seiner Mitarbeiter [116] untersuchten den Einfluss von Resveratrol auf die Lebensspanne von Mäusen, indem sie eine kalorienreiche mit einer normalen Ernährung verglichen. Dabei stellten sie fest, dass die Lebensdauer durch Resveratrol erhöht wurde.

2.2.3.2 Antioxidative Effekte

Die antioxidative Wirkung von Resveratrol ist vor allem darauf zurückzuführen, dass die Substanz in der Lage ist Sauerstoffradikale einzufangen und antioxidativ wirksame Enzyme zu erhöhen. Beispielsweise beobachteten Li et al. [117] nach Inkubation von glatten Muskelzellen der Rattenaorta mit dem Polyphenol einen Anstieg der Konzentrationen von Superoxiddismutase, Katalase, Glutathion, Glutathionreduktase, Glutathionperoxidase und Glutathion-S-Transferase. Auch mit humanen Lymphozyten wurde nach Resveratrolbehandlung eine verstärkte Aktivität von Glutathionperoxidase, Glutathionreduktase und Glutathion-S-Transferase und erhöhte Glutathionspiegel gemessen [118]. Darüber hinaus schützt Resveratrol *in vitro* durch Chelatierung von Kupfer oder Einfangen von freien Radikalen vor der Auslösung von Lipidperoxidation [91].

In einer Reihe von *in vitro* Untersuchungen konnten antioxidative Effekte von Resveratrol mittels SCGE-Tests nachgewiesen werden. Dabei verwendete man hauptsächlich Wasserstoffperoxid, um oxidative Schäden auszulösen. Dieses Verfahren wurde auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzt; es beruht auf der Messung der DNA-Migration in einem elektrischen Feld. Einige Ergebnisse der bisher durchgeführten *in vitro* Experimente sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: *In vitro* SCGE-Untersuchungen über die antioxidative Wirksamkeit von Resveratrol

Resveratrol-konzentration	Testsystem	Behandlung	Ergebnis ¹	Ref.
6.25-25 µM	Humane Lymphozyten	50 µM H ₂ O ₂	↓ Sensivität gegenüber H ₂ O ₂	[119]
10–100 µM	Humane Lymphozyten	H ₂ O ₂	↓ Sensivität gegenüber H ₂ O ₂	[118]
10–250 µM 10-100 µM	Glioma C6 Zellen (Ratte)	1 mM H ₂ O ₂ , 0.5 h 0.1 und 0.5 mM, 6h	↓ Sensivität gegenüber H ₂ O ₂	[120]
1.25 - 5 µM	Leukämiezelllinie (L1210, K562, HL-60)	H ₂ O ₂	↓ Sensivität gegenüber H ₂ O ₂	[121]
5 und 10 µM	Brustzelllinie (MCF-10A)	DMBA ¹	↓ Sensivität gegenüber DMBA	[122]

¹⁾ Abkürzungen: DMBA - 7,12- Dimethylbenz-anthracen, ↓ - Abnahme

Nach Behandlung mit 6,25-100 μM Resveratrol wurden mit humanen Lymphozyten deutliche Schutzeffekte gegenüber H_2O_2 -induzierter DNA-Migration gefunden [118, 119]. Auch in Glioma-Zellen von Ratten stellte man einen Rückgang der DNA-Schäden unter diesen experimentellen Bedingungen fest [120].

Die antioxidative Wirkung von Resveratrol und resveratrolhaltigen Nahrungsmitteln wurde auch in Tierexperimenten und humanen Interventionsstudien nachgewiesen; einige Ergebnisse sind in den Tabellen 6 und 7 zusammengefasst.

Untersuchungen mit Ratten zeigten einen Rückgang der DNA-Strangbrüche nach Verabreichung von Traubensaft [123] und eine Reduktion der endogenen Bildung von oxidierten Purinen und Pyrimidinen nach Einnahme von Polyphenolen aus Rotwein [124]. In einer Studie mit Mäusen wurden der akute und der chronische Einfluss von Alkohol auf Zellen aus verschiedenen Teilen des Gehirns untersucht. Sowohl nach drei als auch nach dreißig Tagen fand man eine signifikante Abnahme von DNA-Schäden durch Verabreichung von Resveratrol. [125].

Tabelle 6: Nachweis antioxidativer Effekte von Resveratrol und resveratrolhaltigen Nahrungsmitteln in Tierexperimenten mittels SCGE-Test

Studiendesign	Testsystem	Ergebnis ¹	Ref.
3 Gruppen: Kontrolle, herkömmlicher und Biotraubensaft aus roten Trauben (7 $\mu\text{l/g}$ b.w., zweimal täglich) Einmalige Dosis von Tetrachlormethan (CCl_4 , 3 ml/kg) 30 Tage, n=24	Ratten, Lymphozyten	↓ Strangbrüche ↓ Sensivität gegenüber CCl_4 ↓ Lipidperoxidation (TBARS)	[123]
Rotweinpolyphenole (57 mg/kg b.w.) 10 Tage, n=22	F344 Ratten, Colonmukosazellen	↔ Strangbrüche ↓ oxidierte Purine ↓ oxidierte Pyrimidine	[124]
Resveratrol (25, 50 u. 100 mg/kg b.w.) 3 Tage 5.0 g in 20% Ethanol/kg b.w. Resveratrol (10, 20 u. 40 mg/kg b.w.) 30 Tage 5.0 g in 20% Ethanol/kg b.w.	Maus, Zellen aus verschiedenen Gehirnregionen	↓ Strangbrüche ↓ Strangbrüche	[125]

¹⁾ Abkürzungen: TBARS - Thiobarbitursäure-Reaktive Substanzen-Test, ↑ - Anstieg, ↓ - Abnahme, ↔ - keine Änderung

Bis jetzt wurden noch keine Humanstudien über die Wirkung von reinem Resveratrol auf die DNA mittels Einzelzellgelelektrophoresetests durchgeführt, es gibt aber eine Reihe von Publikationen über die Effekte resveratrolhaltiger Getränke und Nahrungsmitteln.

Giovannelli et al. [126] veröffentlichten vor kurzem eine Studie über den Einfluss des Polyphenolgehalts von Weinen auf die DNA-Stabilität. Dazu wurde den Probanden über ein Monat ein halber Liter dealkoholisierter Wein verabreicht und es wurden weder protektive Effekte gegenüber ROS-induzierten DNA-Schäden, noch ein Rückgang der oxidierten Purine gefunden.

2005 wurde von Arendt et al. [127] eine Studie mit alkoholhätigem und alkoholfreiem Rotwein durchgeführt. Nach einmaliger Verabreichung kam es zwar zu vermehrten Strangbrüchen der DNA, aber auch zu einer Abnahme der Empfindlichkeit gegenüber H_2O_2 . In einer weiteren Untersuchung wurde eine Reduktion der Strangbrüche nach sechswöchigem Rotweinkonsum beobachtet, allerdings wurden keine protektiven Effekte gegenüber Wasserstoffperoxid beobachtet. Auch in einer Studie mit rotem Traubensaft kam es nach achtwöchiger Intervention zu einem Rückgang der Strangbrüche [128].

Eindeutige Schutzeffekte von Rotwein vor ROS-induzierte Schäden wurden in einer Studie von Fenech et al. gefunden. Nach einmaligem Konsum von 300 ml Rotwein wurde nach Inkubation mit H_2O_2 eine signifikante Abnahme der Mikrokerne beobachtet [129].

In einigen Studien konnte ein positiver Einfluss von resveratrolhaltigen Getränken auf biochemische und klinische Parameter nachgewiesen werden. Whitehead et al. [130] zeigten nach einmaligem Konsum von Rot- oder Weißwein einen Anstieg der antioxidativen Kapazität. Dieser Effekt konnte durch drei weitere Untersuchungen mit Rotwein und konzentriertem Traubensaft, bei der ebenfalls eine Reduktion des oxidierten LDLs gemessen wurde, bestätigt werden [131-133]. Auch in einer Studie, in denen die Probanden getrocknete Weintrauben bzw. deren Schalen konsumierten, kam es zu einem Rückgang der LDL-Oxidation [134]. In einer früheren Untersuchung hatte weder der Konsum von Rot- noch Weißwein Einfluss auf die Oxidation von LDL [135].

Tabelle 7: Beispiele für Humanstudien hinsichtlich der antioxidativen Wirksamkeit von resveratrolhaltigen Nahrungsmitteln

Studiendesign	n ¹	Ergebnis ²	Ref.
Dealkoholisierte Weine mit unterschiedlichen Polyphenolgehalt Resveratrolgehalt: 7,2 mg/L (Rotwein), 0,2 mg/L (Weißwein) 500 ml/Tag, 1 Monat	21	↔ Sensitivität gegenüber H ₂ O ₂ ↔ oxidierten Purine	[126]
Rotwein (RW, 200 ml), Dealkoholisierter Rotwein (DRW, 175 ml), Wasser (200 ml) einmalige Verabreichung	27	↑ Strangbrüche mit RW und DRW nach 6h ↓ Sensitivität gegenüber H ₂ O ₂ nach 6 h kein Effekt nach 1,5 h	[127]
Rotwein (200 ml), Dealkoholisierter Rotwein (175 ml), Wasser (200 ml) 6 Wochen	74	↓ Strangbrüche mit RW ↔ Sensitivität gegenüber H ₂ O ₂	[127]
Roter Traubensaft 480 ml/Tag, 8 Wochen	67	↓ Strangbrüche	[128]
Rotwein oder Weißwein 300 ml, einmalige Verabreichung	4	↓ H ₂ O ₂ -induzierte Mikrokerne nach 1h	[129]
Rotwein oder Weißwein 300 ml, einmalige Verabreichung	9	↑ Antioxidative Kapazität	[130]
Konzentrat aus rotem Traubensaft 125 ml/Tag, 7 Tage	7	↑ Antioxidative Kapazität ↓ Oxo-LDL	[131]
Getrocknete Weintrauben (50 g) oder deren Schale (200 g) Resveratrolgehalt: 1,38 mg/kg (Schale) einmalige Verabreichung	8	↓ Oxo-LDL	[134]
Rotwein 300 ml, einmalige Verabreichung Probanden (Diabetiker) nahmen gleichzeitig Mahlzeit zu sich	20	↓ Oxo-LDL	[132]
Rot- und Weißwein 400 ml/Tag, 2 Wochen	17	↓ Oxo-LDL	[133]
Dealkoholisierter Rot- und Weißwein 550 ml/Tag, 4 Wochen	24	↔ Oxo-LDL	[135]
Polyphenolreiches Traubenpulver Resveratrolgehalt: 1,6 mg/kg 36 g/Tag, 4 Wochen	44	↓ F2-Isoprostane	[136]

¹⁾ n – Zahl der Teilnehmer

²⁾ ↑ - Anstieg, ↓ - Abnahme, ↔ keine Änderung

2.2.3.3 Schutz vor Krebserkrankungen

Aufgrund seiner Fähigkeit, in die verschiedenen Stufen der Karzinogenese einzugreifen, wird Resveratrol als potentieller Wirkstoff für die Chemoprevention und Behandlung von Krebserkrankungen angesehen. Die protektiven Wirkungen betreffen vor allem Brust-, Prostata-, Haut- und Lungenkrebs sowie gastrointestinale Tumore [115]. In Tierversuchen mit Ratten wurde gezeigt, dass das Polyphenol die Entstehung von Tumoren die durch Karzinogene wie 7,12-Dimethylbenzanthracen (DMBA), N-Nitroso-N-methylbenzylamin (NMBA) oder 1,2-Dimethylhydrazin (DMH) ausgelöst wurden, reduziert [137-139]. Auch in mehreren *in vitro* Versuchen mit verschiedenen Tumorzelllinien wie Leukämie-, Darm-, Brust-, Prostata- und Ösophaguszellen wurde nach Inkubation mit Resveratrol der Zellzyklus gehemmt und Apoptose induziert [115]. Darüber hinaus unterdrückt das Polyphenol die Expression von Genen, welche die Angiogenese und Metastasierung fördern. [140].

Die antioxidative Eigenschaften der Substanz, die ebenfalls für die krebsschützenden Wirkungen verantwortlich gemacht werden, wurden im vorherigen Kapitel (2.2.3.2) genauer beschrieben.

2.2.3.4 Schutz vor Herz-Kreislaufferkrankungen

Die kardioprotektive Wirkung ergibt sich aus zwei Beobachtungen. Einerseits wurde bei der französischen Bevölkerung trotz fett- und cholesterinreicher Ernährung eine geringere Verbreitung von ischämischen Herz-Kreislaufferkrankungen festgestellt („Französisches Paradoxon“). Andererseits gibt es eine Reihe epidemiologischer Studien, in denen eine niedrigere Inzidenz von koronaren Herzerkrankungen nach moderatem Konsum resveratrolhaltiger Getränke beobachtet wurde [93]. Die protektiven Effekte vor Herz-Kreislaufferkrankungen können durch verschiedene Mechanismen erklärt werden. Resveratrol fördert die Vasorelaxation, sorgt für die Intakthaltung der Endothelien der Blutgefäße und schützt vor ischämische Reperfusionsschäden. Darüber hinaus wirkt es durch Inhibition von LDL-Oxidation protektiv gegen Arteriosklerose und vermindert die Aggregation von Blutplättchen [94].

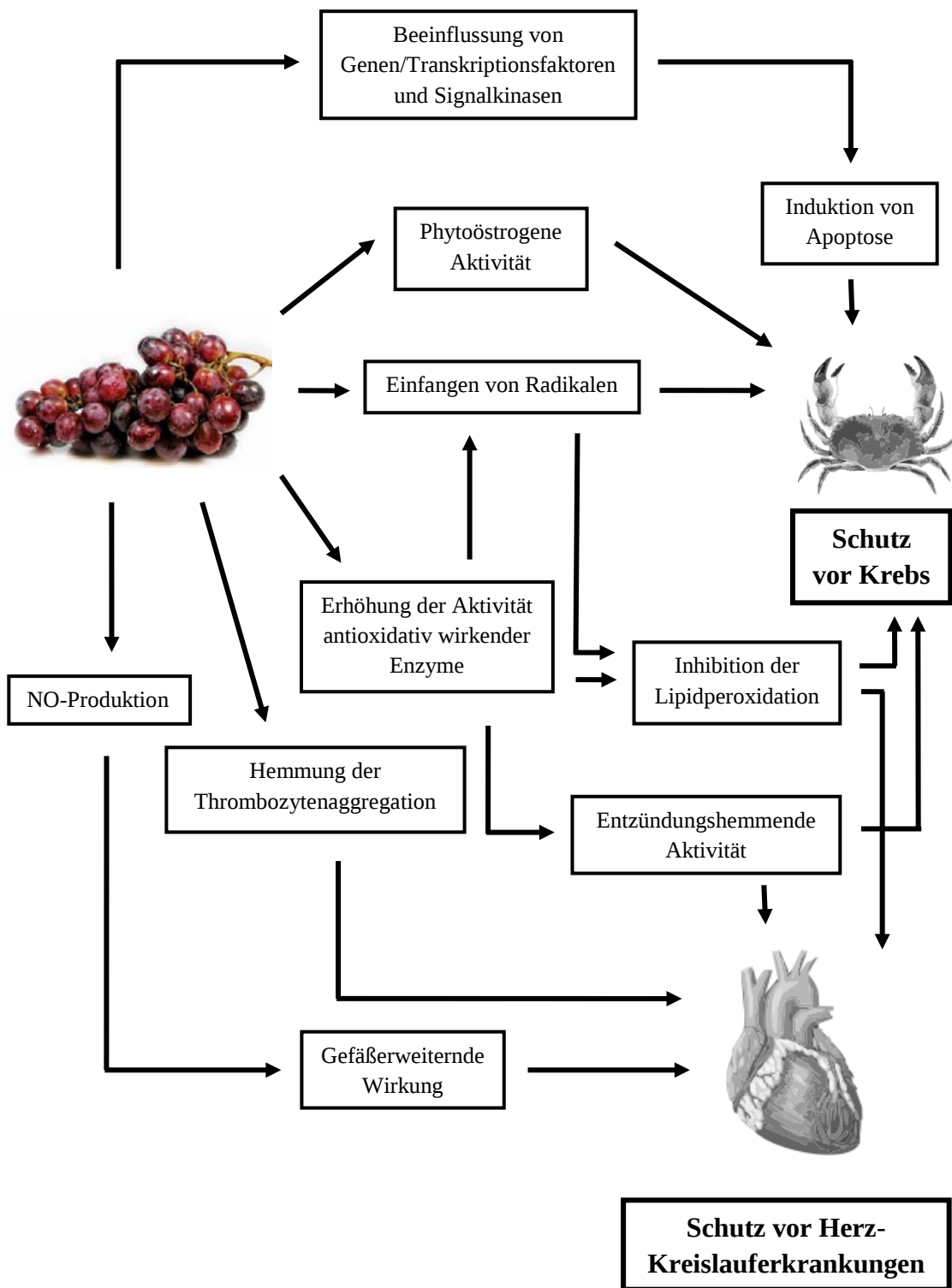


Abbildung 5: Biologische Effekte von Resveratrol

2.3 Reaktive Sauerstoffspezies und oxidative DNA-Schäden

2.3.1 Entstehung freier Radikale und gesundheitliche Auswirkungen

Sauerstoff (O_2) ist in seiner molekularen Form aufgrund seiner Elektronenkonfiguration reaktionsträge. Für bestimmte biologische Prozesse ist es allerdings erforderlich, dass er mit anderen Molekülen reagiert. Dazu muss er in Formen vorliegen, die als reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bezeichnet werden. Diese können in Radikale und Nichtradikale unterteilt werden; zu den ersteren zählen das Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$), das Hydroxylradikal ($HO^{\cdot}$), das Hydroperoxylradikal ($HO_2^{\cdot}$) und das Peroxylradikal ($ROO^{\cdot}$), die sich alle dadurch auszeichnen, dass sie in ihrer äußeren Elektronenhülle ungepaarte Elektronen besitzen. Um in einen stabileren Zustand zu gelangen, geben sie Elektronen entweder ab oder nehmen diese auf; dies erklärt ihre hohe Reaktivität. Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zählt nicht zu den Radikalen, ist aber ebenfalls sehr reaktiv, da es leicht zerfällt [1, 141].

ROS werden endogen während der Zellatmung, der Immunabwehr und durch enzymatische Vorgänge (z.B. durch Reaktionen der Xanthinoxidase) gebildet, belasten den Körper aber auch durch exogene Quellen, beispielsweise durch bestimmte Nahrungsmittel, Medikamente und Zigarettenrauch (siehe Abbildung 6) [2].

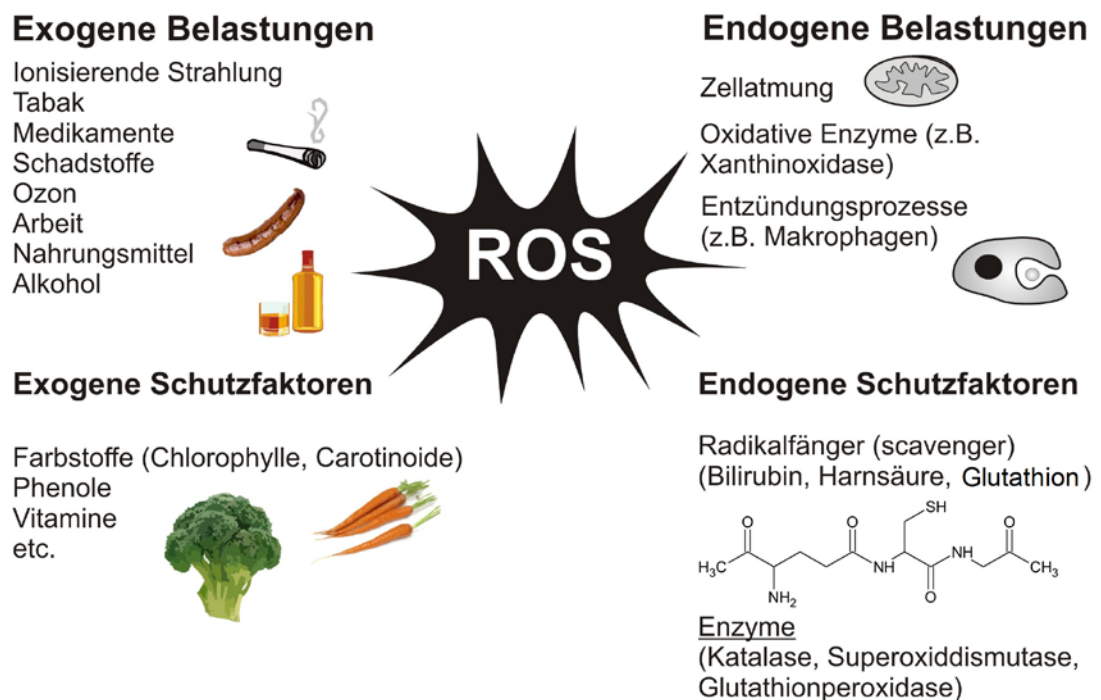


Abbildung 6: Endogene und exogene Entstehung und Inaktivierung von ROS

Da Sauerstoffradikale eine Vielzahl körpereigener Moleküle angreifen, können sie die Entstehung bestimmter Krankheiten, wie Krebs, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Arthritis, auslösen [1]. Ein Beispiel ist die Oxidation von Low Density Lipoproteinen, die mit der Bildung von Arteriosklerose in Zusammenhang steht (Details siehe Kapitel 2.4.2).

Die Auslösung von oxidativen Schäden wird normalerweise durch Abwehrmechanismen des Körpers unter Kontrolle gehalten, die im folgenden Kapitel genauer erklärt werden. Liegt ein Ungleichgewicht zwischen der Entstehung freier Radikale und deren Inaktivierung vor, kommt es zu oxidativem Stress, der zu Veränderungen zahlreicher zellulären Bestandteile (Proteinen, Lipiden, DNA, RNA) führt [142].

2.3.2 Schutzmechanismen vor ROS

Um Zellen vor ROS-induzierten Schäden zu schützen entwickelte der menschliche Körper eine Reihe von Mechanismen, die freie Radikale inaktivieren [143]. Dazu zählen Enzyme wie Glutathionperoxidase (GPx), Superoxiddismutase (SOD) und Katalase. SOD katalysiert die Umwandlung von Superoxidanionen in Wasserstoffperoxid. Dieses kann anschließend von Glutathionperoxidasen zu Wasser abgebaut werden. Im Verlauf der Reaktion entsteht oxidiertes Glutathion, das durch Glutathionreduktase reduziert wird. Als Kofaktoren für diese Enzymsysteme fungieren Spurenelemente wie Zink und Selen.

Zusätzlich gibt es eine Reihe von antioxidativ wirkenden Molekülen, die im menschlichen Körper synthetisiert werden. Beispielsweise hemmt Bilirubin die Peroxidation von Lipiden, Harnsäure wirkt antioxidativ gegenüber wasserlöslichen Radikalen [2].

Auch Nahrungsmittel enthalten Antioxidantien, die in der Lage sind Radikale entweder direkt einzufangen („Scavenging“) oder indirekt zu deaktivieren, indem sie die Aktivität von antioxidativ wirkenden Enzymen erhöhen [14]. Dazu zählen die Vitamine A, C und E, Carotinoide, aber auch Polyphenole wie Resveratrol und Isoflavone [2]. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss dieser beiden Substanzen auf ROS induzierte DNA-Schädigung untersucht. Zusätzlich wurden diverse biochemische Parameter gemessen, die den Redoxzustand reflektieren.

2.4 Testverfahren zum Nachweis antioxidativer Effekte von Lebensmittelinhaltsstoffen

2.4.1 Einleitung

Um oxidative DNA-Schäden und Schutzeffekte von antioxidativ wirksamen Substanzen nachzuweisen, wurde eine Vielzahl von Methoden entwickelt. Im Allgemeinen kann man sie in folgende Kategorien unterteilen. (1) physikalische Messungen, (2) chemische Methoden, die antioxidativ wirkende Substanzen detektieren, (3) biochemische Verfahren, die geeignet sind, um die Oxidation von Makromolekülen und ihre Oxidationsprodukte nachzuweisen und (4) Methoden, mit denen antioxidativ wirkende Enzyme und Transkriptionsfaktoren erfasst werden. Die Arbeit von Knasmüller et al. [144] gibt eine Übersicht über die diversen Verfahren.

In den nachfolgenden Abschnitten werden die Grundlagen einiger Methoden beschrieben, die in Humanstudien eingesetzt werden, um antioxidative Eigenschaften von Lebensmittelinhaltsstoffen zu messen.

2.4.2 Messung von oxidiertem Low Density Lipoprotein

Low Density Lipoprotein (LDL) besteht aus einem Glykoprotein (apoB), freiem Cholesterin, Cholesterinestern, Phospholipiden, Triglyzeriden und fettlöslichen Vitaminen. Seine Funktion besteht darin, Cholesterin zu peripheren Zellen zu transportieren [145]. Die Oxidation von LDL wird neben anderen Faktoren für die Entstehung von Arteriosklerose verantwortlich gemacht. Durch oxidativen Stress kommt es zu Veränderungen des Moleküls, die dadurch vermehrt an sogenannte „Scavenger-Rezeptoren“ von Makrophagen binden. Diese werden anschließend in Schaumzellen umgewandelt, was zur Bildung von arteriosklerotischen Plaques führt (Abbildung 7). Oxidiertes LDL bzw. seine Folgeprodukte können darüber hinaus auch die Expression von Genen beeinflussen, wodurch es zur vermehrten Bildung der Scavenger-Rezeptoren, Interleukin 1 oder Adhensionsmolekülen kommt [146].

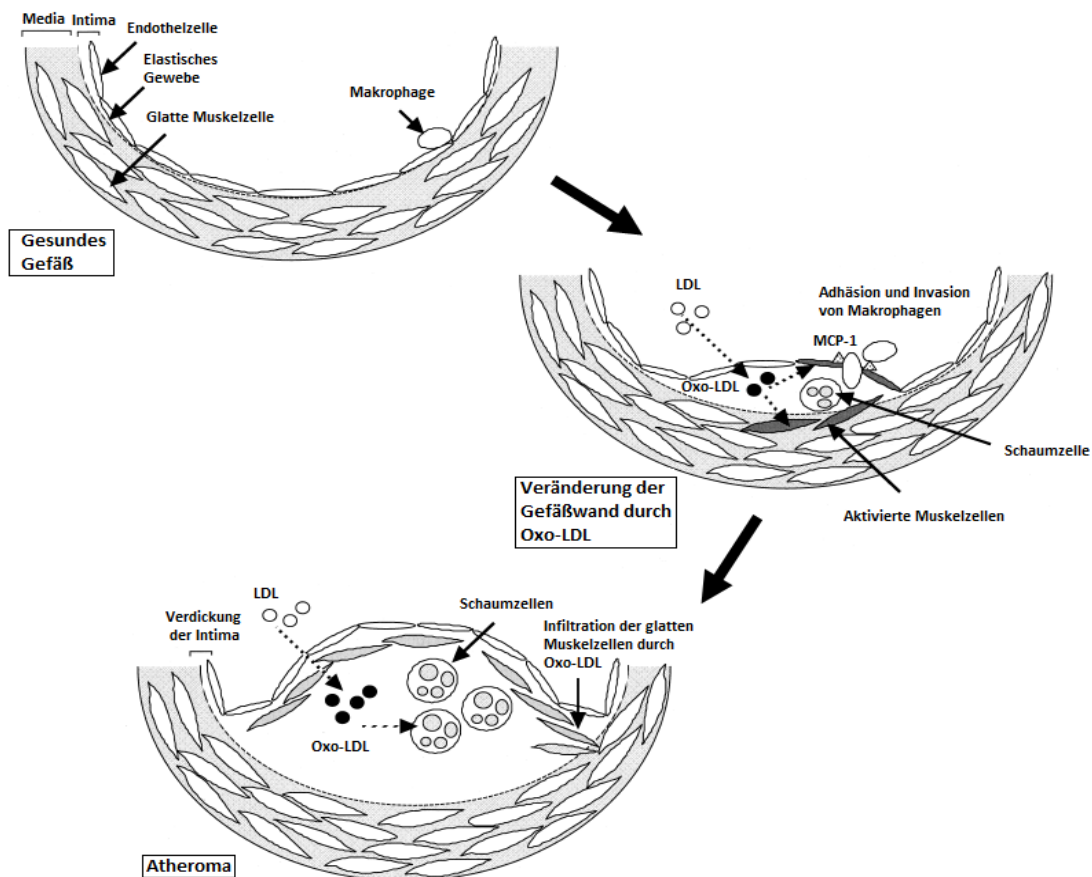


Abbildung 7: Entstehung arteriosklerotischer Plaques durch LDL-Oxidation (modifiziert nach Itabe et al., 2003 [147]). Durch das oxidierte LDL werden die Endothelzellen dazu angeregt, Adhäsionsmoleküle und Chemokine, wie das „Macrophage Chemoattractant Protein-1“ (MCP-1) zu produzieren, was dazu führt, dass Monozyten in die Innenseiten der Gefäßwände eingelagert und zu Makrophagen differenziert werden. Diese werden durch Aufnahme von Oxo-LDL in Schaumzellen umgewandelt, die mit glatten Muskelzellen und Kollagen arteriosklerotische Plaques (Atherome) bilden. Wenn diese Struktur rupturiert, kommt es zur Aktivierung von Thrombozyten; dies kann in weiterer Folge zur Entstehung eines Thrombus führen.

Die Messung der Oxidation von Low Density Lipoprotein basiert auf der Autoxidation von Linolsäure oder LDL und wird durch *in vitro* Exposition mit Cu^{2+} oder andere Azo-Initiatoren ausgelöst. Darüber hinaus kann man die Oxidation von LDL durch einen enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (ELISA) im Plasma bestimmen [14].

2.4.3 Totale Antioxidative Kapazität (TAC)

Zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität wurden zwei Arten von Verfahren entwickelt. Zum einen kann die Fähigkeit von Substanzen gemessen werden, ein Elektron zu transferieren und auf diese Weise Verbindungen wie Radikale, Carbonyle und Metalle zu reduzieren. In diese Kategorie fallen die Bestimmung des „Ferric Iron Reducing Antioxidant Parameter“ (FRAP), der „Trolox Equivalent Antioxidant Capacity“ (TEAC) und der „Diphenyl-1-Pikrylhydrazyl“-Test (DPPH). Die zweite Methode zur Messung der antioxidativen Kapazität beruht auf der Fähigkeit von Substanzen, freie Radikale durch Abgabe von Wasserstoff abzufangen. Dazu zählen der „Oxygen Radical Absorbance Capacity“-Test (ORAC), die Messung der „Total Radical Trapping Antioxidant Parameter“ (TRAP) und der „Total Oxidant Scavenging Capacity“ (TOSC). Auch die Bestimmung der Inhibition der Oxidation von Linolensäure und der Low Density Lipoproteine zählt zur zweiten Kategorie [144].

In der vorliegenden Studie wurde die totale antioxidative Kapazität mit Hilfe des TRAP-Tests bestimmt. Dieser beruht auf der Bildung von Peroxylradikalen durch 2,2'-Azobis-(2,4-amidinopropan)dihydrochlorid (AAPH) in den Plasmaproben. Während der Oxidation wird der Sauerstoffverbrauch bestimmt, der durch die Anwesenheit von Antioxidantien verlangsamt wird. Die Zeitspanne dieser Reaktion wird gemessen und mit einem Standard (Trolox) verglichen [148].

2.4.4 Malondialdehyd

Malondialdehyd (MDA) wird als Marker verwendet, um oxidativen Stress nachzuweisen. Die Verbindung entsteht als Produkt der Lipidperoxidation und auch bei der Synthese von Prostaglandinen.

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren sind leicht oxidierbar, da sie zwischen ihren Doppelbindungen reaktive Methylengruppen besitzen [149]. Die Lipidperoxidation ist eine Kettenreaktion, bei der zuerst ein Fettsäureradikal entsteht, welches durch molekularen Sauerstoff in ein Peroxidradikal umgewandelt wird. Dieses bildet mit einer zweiten Fettsäure ein Fettsäureperoxid und ein weiteres Fettsäureradikal. Werden Lipide in Zellmembranen oxidiert, beeinträchtigt dies ihre Funktion erheblich. In weiterer Folge kann es zu einer veränderten Membranpermeabilität und Zerstörung der Rezeptoren kommen [2]. Die Oxidation von Lipiden steht mit der Entstehung von

Arteriosklerose in Zusammenhang. In Abbildung 8 ist der Ablauf der Lipidperoxidation am Beispiel der Linolsäure schematisch dargestellt.

Malondialdehyd ist ein Abbauprodukt oxidierter Lipide und kann zelluläre Makromoleküle verändern, indem es Addukte wie Deoxyguanosin und Deoxyadenosin bildet. Außerdem wurde in zahlreichen Untersuchungen nachgewiesen, dass es Proteine verändern kann [150].

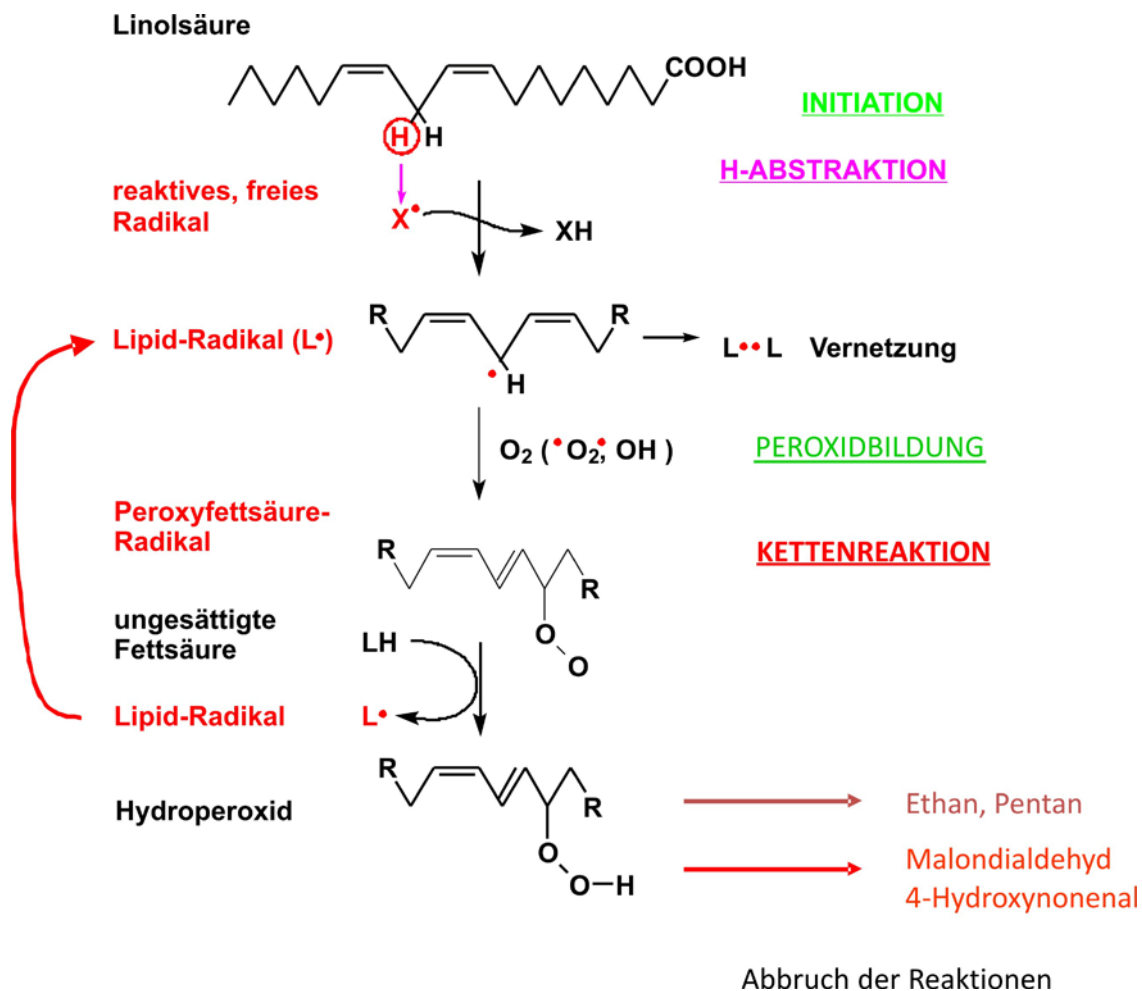


Abb. 8: Schematische Darstellung der Lipidperoxidation am Beispiel der Linolsäure. Durch Angriff eines Radikals (z.B. eines Hydroxylradikals, $HO^\bullet$) entsteht aus der Fettsäure ein Lipidradikal ($L^\bullet$), das durch Oxidation in ein Peroxylradikal umgewandelt wird. Aufgrund der Reduktion der Ausgangssäure durch dieses Radikal entsteht ein weiteres Lipidradikal, das die Kettenreaktion in Gang hält. Durch Inaktivierung des Peroxylradikals (z.B. durch Vitamin E) kommt es zum Abbruch der Reaktion.

Der Nachweis des Aldehyds kann durch den Thiobarbitursäure-Reaktive Substanzen-Test (TBARS) erfolgen, der auf der Fällung von Proteinen nach Erhitzen beruht. Dabei wird aus MDA und Thiobarbitursäure ein rosa-farbiger Komplex gebildet, der spektrophotometrisch quantifiziert wird. Die Methode wurde häufig kritisiert, da die Probenaufarbeitung unter unphysiologischen Bedingungen stattfindet und, statt der MDA-Konzentration der ursprünglichen Probe, die Menge der Verbindung, die während des Erhitzens entsteht, gemessen wird. Außerdem reagieren auch andere Moleküle wie Zucker, Aminosäuren und Bilirubin mit Thiobarbitursäure. Diese Störfaktoren können durch Verwendung von HPLC beseitigt werden, was die Aussagekraft der Methode erhöht [14].

2.4.5 C-reaktives Protein

C-reaktives Protein (CRP) wird seit langer Zeit als Marker für akute und chronische Entzündungen verwendet. Es zählt zu den sogenannten „Akute-Phasen-Proteinen“ und wird in der Leber gebildet. Im Rahmen von Entzündungsprozessen kommt es zu einem Anstieg des Proteins im Blut, der (beginnend bei weniger als 1 µg/mL beim gesunden Menschen) bis zu 1000 µg/mL betragen kann [151]. Die Halbwertszeit von CRP im Plasma beträgt ca. 19 Stunden, der Referenzbereich liegt < 0,5 mg/dl und ist alters- und geschlechtsunabhängig. Die Konzentration des CRPs wird im Serum oder Plasma mittels Immunnephelometrie oder Immunturbidimetrie bestimmt [152].

Da die CRP-Konzentration schneller ansteigt oder abfällt als die anderer Akute-Phasen-Proteine, ist es ein idealer Marker, um den Verlauf von Erkrankungen und therapeutische Erfolge zu erfassen. In den letzten Jahren wurde ein Zusammenhang zwischen dem Anstieg von C-reaktivem Protein und kardiovaskulären Erkrankungen beobachtet. Eine Reihe von epidemiologischen Studien zeigte, dass bei höheren CRP-Spiegeln im Blut das Risiko für Herzinfarkte und Schlaganfälle steigt [153]. Auch bei vielen Krebsarten kommt es zu einem Anstieg der CRP-Konzentrationen, was durch den Zusammenhang zwischen Entzündungsprozessen und der Entstehung von Krebs erklärt wird. Die Bestimmung des Proteins ist eine kostengünstige und einfache Methode und könnte daher zukünftig auch als Marker für die Prognose und die Nachbehandlung bei Krebspatienten verwendet werden [154].

2.4.6 Grundlagen des SCGE-Tests

Bereits 1984 entwickelten Östling und Johanson [155] ein Protokoll für Einzelzellelektrophoretetests (Single Cell Gel Electrophoresis, SCGE, Komet Assay) unter neutralen Bedingungen und konnten damit Doppelstrangbrüche der DNA nachweisen. Nachfolgend wurde die Methode durch Singh und Tice [156, 157] modifiziert, die die Experimente unter alkalischen Bedingungen durchführten. Dadurch wurde es möglich Einzelstrangbrüche zu erfassen. Diese entstehen nicht nur durch primäre DNA-Schäden, sondern auch während der DNA-Reparatur.

Der SCGE-Test beruht darauf, dass Zellen mittels Agarose auf einen Objektträger fixiert und lysiert werden, um die Zellmembranen, RNA und Proteine aufzulösen. Die Zellkerne werden in ein elektrisches Feld gebracht, in der die DNA-Bruchstücke zum negativen Pol wandern. Abhängig vom Ausmaß der Schädigung entsteht auf diese Weise eine Struktur, die dem Schweif eines Kometen ähnelt und durch einen Fluoreszenzfarbstoff sichtbar gemacht und mikroskopisch ausgewertet werden kann. Die Größe und Intensität des Kometenschweifs geben die Menge der DNA-Strangbrüche wieder [158].

2.4.7 *In vitro* Studien

Mit SCGE-Experimenten ist es möglich, DNA-Schäden in einer Vielzahl von Zellen nachzuweisen. Neben humanen werden auch mit tierischen Zellen aus verschiedenen Organen und Geweben, sowie mit Pflanzenzellen und niedrigen Algen Untersuchungen durchgeführt. *In vitro* Studien können sowohl mit Zelllinien, als auch mit Primärzellen durchgeführt werden [159]. Wesentliche Voraussetzung ist die schonende Isolierung der Zellkerne. Die Inkubationszeit ist ebenfalls von entscheidender Bedeutung für die Ergebnisse, da die Kometen in Folge von Reparaturprozessen nach einer bestimmten Zeit wieder verschwinden [160]. Auch bei Untersuchungen, die Schutz vor oxidativen DNA-Schäden betreffen, wurden häufig *in vitro* SCGE-Tests eingesetzt.

2.4.8 Einsatz von Einzelzellgelelektrophoretetests bei Humanstudien

In den letzten Jahren gewann der Komet Assay immer mehr an Bedeutung, um antioxidative Effekte von Nahrungsmitteln und deren Inhaltsstoffen nachzuweisen. 1996 wurde dieses Verfahren zum ersten Mal in einer humanen Interventionsstudie mit Vitaminen angewendet [161]. Seither werden diese zunehmend bei der Untersuchung über die Auswirkungen von Ernährungsfaktoren auf die DNA-Stabilität eingesetzt, da diese Technik weniger arbeitsaufwändig und kostengünstiger ist als andere Methoden [158].

Bis 2009 wurden 84 Interventionsstudien veröffentlicht, in denen der Komet Assay verwendet wurde. Die aktuelleren Untersuchungen wurden überwiegend mit pflanzlichen Nahrungsmitteln und Säften durchgeführt, nur wenige Experimente betrafen einzelne Nahrungsinhaltsstoffe. In den meisten Fällen wurden die Versuche nach dem von Collins und seinen Mitarbeitern entwickeltem Protokoll für periphere Lymphozyten durchgeführt [158]. Die Zellen werden dabei entweder unbehandelt verwendet, um endogene DNA-Schädigung (Einzel- und Doppelstrangbrüche) und apurine Stellen zu detektieren, oder zuvor mit radikalbildenden Substanzen (Wasserstoffperoxid) oder ausgewählten Karzinogenen (heterozyklische aromatische Amine, Acrylamid etc.) inkubiert. Zusätzlich ist es möglich die Zellkerne mit DNA-Restriktionsenzymen zu behandeln, um die Entstehung von endogen gebildeten oxidierten Basen zu erfassen [158]. 2001 entwickelten Collins und seine Mitarbeiter eine Technik, mit der es möglich ist, Reparaturprozesse (Basenaustausch- und Nukleotidreparaturen) zu untersuchen [160]. Abbildung 9 gibt einen Überblick über die verschiedenen Endpunkte der Komet-Messungen.

Hoelzl et al. [158] analysierten das Design der bisher durchgeführten Studien. In den meisten Fällen verwendete man ein sequentielles Design, nur bei 17% wurden „Cross-Over“-Untersuchungen durchgeführt. Verschiedene Autoren betonen, dass die Qualität durch Kontrolle der Nahrungsaufnahme während einer „Run-in“-Phase und während der Intervention selbst verbessert werden kann. Dadurch ist es möglich, Störungen durch Nahrungsinhaltsstoffe zu eliminieren. Auch durch „Wash-Out“-Phasen kann die Aussagekraft von Interventionsstudien verbessert werden. Diese Aspekte wurden in der vorliegenden Arbeit berücksichtigt, aus Zeit- und Kostengründen war es jedoch nicht möglich, Placebogruppen mitzuführen.

Etwa in der Hälfte der Studien mit Nahrungsinhaltsstoffen wurde eine signifikante Abnahme der Bildung oxidierter Basen beziehungsweise eine geringere Sensitivität der DNA gegenüber ROS-induzierten Schäden gefunden. Allerdings konnte nur bei einem Drittel der Experimente, in denen die DNA Migration unter Standardbedingungen untersucht wurde, ein Rückgang der Schädigung beobachtet werden [158].

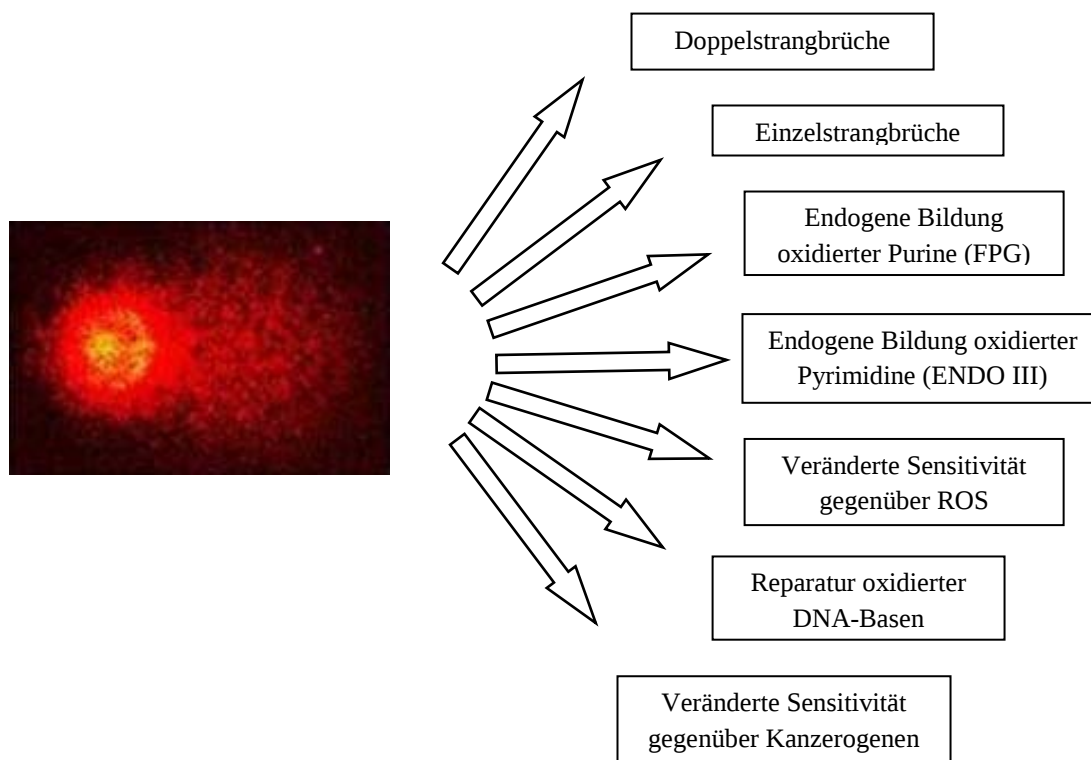


Abbildung 9: Verschiedene Endpunkte von Komet-Experimenten

Protektive Effekte wurden nicht nur mit verschiedenen Vitaminen und sekundären Pflanzenstoffen gefunden, sondern auch mit einigen Gemüse- und Obstsorten oder Getränken, wie zum Beispiel mit Kiwi- oder Blutorangensaft, Tomatenpüree und Zwiebeln [162, 163]. In Untersuchungen, in denen die Probanden Kohlsprossen [164] oder Kresse [165] konsumierten, fand man ebenfalls starke Schutzeffekte und auch in Experimenten mit Gallussäure, die in Mangos und Rhabarber vorkommt, wurden DNA-schützende Eigenschaften nachgewiesen; diese Effekte waren deutlich stärker als die von Vitamin C und E [158]. Nicht nur mit Obst- und Gemüse

und deren Inhaltsstoffe wurden Interventionsstudien durchgeführt, sondern ebenfalls mit Kaffee und Rotwein. Nach Kaffeekonsum nahm die Bildung der oxidierten Purine und Pyrimidine ab, und auch nach Behandlung der Zellen mit Wasserstoffperoxid, Trp-P-2 und BPDE kam es zu einer Reduktion der DNA-Migration [166, 167]. Die Untersuchungen mit Rotwein werden in Kapitel 2.2.3.2 genauer beschrieben. Einen Überblick über die bisher publizierten Studien geben die Arbeiten von Hoelzl und von Moller und Loft [158, 162, 163].

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Tabelle 8: Angaben über Bezeichnung, Abkürzung und Herkunft der verwendeten Chemikalien

Chemikalien	Abkürzung	Firma	Verwendung
Lymphozytenisolierung			
Histopaque - 1077	Ficoll	Sigma ¹⁾	Dichte-Gradientenzentrifugation
RPMI 1640	RPMI	Sigma ¹⁾	Zellkulturmedium
Chemikalien für die Durchführung der Komet-Assay			
Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt	LMP Agarose	Invitrogen Life Technologies ²⁾	Auftragen der Zellen auf Objektträger
Agarose mit hohem Schmelzpunkt	NMP Agarose	Invitrogen Life Technologies ²⁾	Beschichtung der Objektträger
Rinderserumalbumin	BSA	Sigma ¹⁾	Enzypuffer
2-Amino-2-(hydroxy-methyl)-1,3-propanediol	Tris	Sigma ¹⁾	Lyselösung, Neutralisationspuffer
di-Methylsulfoxid	DMSO	Merck ³⁾	Lösungsmittel
Di-Natriumhydrogen-phosphatdihydrat	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Merck ³⁾	PBS-Lösung
Ethidiumbromid	EtBr	Sigma ¹⁾	Färbelösung für Objektträger
Ethylendiamin-tetraaceticacid	EDTA	Sigma ¹⁾	Lyselösung, Elektrophoresepuffer, Enzypuffer
Hydrogenchlorid	HCl	Merck ³⁾	pH-Wert Einstellung
Kaliumchlorid	KCl	Merck ³⁾	PBS-Lösung
Kaliumdihydrogen-phosphat	KH ₂ PO ₄	Merck ³⁾	PBS-Lösung
Natriumchlorid	NaCl	Merck ³⁾	PBS-Lösung, Lyselösung, Enzypuffer
Natriumhydroxid	NaOH	Sigma ¹⁾	PBS-Lösung, Lyselösung, Elektrophoresepuffer, Enzypuffer,
N-2-Hydroxyethyl-pipera-zin-N'-2-ethansulfonsäure	Hepes	Sigma ¹⁾	Enzypuffer
Polyethylenglycol-tert-octylphenylether	Triton X-100	Sigma ¹⁾	Lyselösung
Trypanblau	TrB	Sigma ¹⁾	Vitalitätstest
Enzyme für die Durchführung der Komet-Assay			
Endonuclease III	ENDO III	Laboratory of DNA Repair ⁴⁾	Detektion oxidierter Pyrimidine
Formamidopyrimidin-glycosylase	FPG	Laboratory of DNA Repair ⁴⁾	Detektion oxidierter Purine
Induktion von ROS-Schäden			
Wasserstoffperoxid	H ₂ O ₂	Merck ³⁾	Induktion von DNA-Schäden

¹⁾ Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland; ²⁾ Invitrogen Life Technologies Ltd, Paisley, Schottland; ³⁾ Merck, Darmstadt, Deutschland; ⁴⁾ Laboratory of DNA-Repair, Dr. Karel Angelis, Prag, Tschechische Republik; ⁵⁾ Merckodia AB, Uppsala, Schweden

3.1.1 Zusammensetzung der Präparate

In den Tabellen 9 und 10 sind die Zusammensetzungen der beiden untersuchten Präparate aufgeführt. Die Inhaltsstoffe des Isoflavonpräparats stammten aus Sojapflanzen und aus Rotklee. Mittels HPLC wurde die Art und der Gehalt der Isoflavone bestimmt. Des weiteren enthält das Präparat neben Phytoöstrogenen auch Nachtkerzenöl, das vor allem aus Omega-6-Fettsäuren wie Linolsäure und Gamma-Linolensäure besteht.

Tabelle 9: Zusammensetzung des Isoflavonpräparats

Inhaltsstoffe	Gehalt/ Tablette	Isoflavon	Gehalt/Tablette
Standardisierter Rotklee-Extrakt	200 mg	Daidzin	24,6 mg
davon 40 mg Isoflavone		Genistin	4,0 mg
Standardisierter Soja-Extrakt	125 mg	Ononin	4,0 mg
davon 50 mg Isoflavone		Daidzein	17,8 mg
Nachtkerzenöl	90 mg	Sissotrin	1,3 mg
		Genistein	15,2 mg
		Formononetin	35,5 mg
		Biochanin A	12,5 mg

Das Resveratrolpräparat beinhaltet zusätzlich Inhaltsstoffe von roten Weintrauben wie Proanthocyanidine und Anthocyane, Polyphenole aus Oliven, Lykopen, Vitamin C und Citrusbioflavonoide.

Tabelle 10: Zusammensetzung des Resveratrolpräparats

Inhaltsstoffe	Gehalt/Tablette
Resveratrol (aus Weintrauben)	2 mg
Polyphenol-Extrakt aus Weintrauben	100 mg
Olivenpolyphenol-Extrakt	50 mg
Lykopen (aus Tomaten)	3 mg
Vitamin C	100 mg
Citrus-Bioflavonoide	30 mg

Die Dosierung der Präparate wurde so gewählt, dass die aufgenommenen Mengen bioaktiver Inhaltsstoffe jenen entsprachen, die auch über die Nahrung konsumiert werden können. Die tägliche Isoflavonmenge, die in der vorliegenden

Interventionsstudie von den Probanden konsumiert wurde, entspricht dem Verzehr von etwa 350 g Sojabohnen [168]. Die Resveratrolmenge kann mit dem Konsum von ein bis drei Litern Rotwein aufgenommen werden [97].

3.2 Lösungen für den Komet Assay

Für den Komet Assay wurden folgende Lösungen hergestellt:

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

8 g NaCl, 1,15 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g KCl und 0,2 g KH_2PO_4 wurden in einem Liter Aqua bidest. Die Salze wurden gelöst und durch Zugabe von HCl ein pH Wert von 7,4 eingestellt.

Lyselösung

2,5 M NaCl (146,1 g), 100 mM EDTA (37,2 g) und 10 mM Tris (1,2 g) wurden in einem Liter Aqua bidest. gelöst. Mit NaOH wurde ein pH Wert von 10,0 eingestellt.

Die Lösung wurde im Kühlschrank bei +4°C gelagert. Vor dem Gebrauch wurden Triton X-100 (1%) und DMSO (10%) zugefügt und die Lösung im Kühlschrank bei +4°C mehrere Stunden gelagert.

Elektrophoresepuffer

Von NaOH und EDTA wurden Stammlösungen hergestellt. Für 10 N NaOH Lösung wurden 400 g in 1000 ml Aqua bidest. gelöst. Für 200 mM EDTA Lösung wurden 14,89 g in 200 ml Aqua bidest. gelöst. Die Flüssigkeiten wurden bei Raumtemperatur gelagert.

Vor dem Gebrauch wurden 84 ml NaOH-Stammlösung und 14 ml EDTA-Stocklösung mit kaltem Aqua bidest. auf 2700 ml aufgefüllt. Mit dem pH-Meter wurde überprüft, ob der pH-Wert über 13 lag.

Neutralisationspuffer

0,4 M Tris (48,5 g) wurde in einem Liter Aqua bidest. gelöst, mit konzentrierter HCl wurde ein pH Wert von 7,5 eingestellt.

Enzympuffer

5,9 g NaCl, 9,52 g Hepes, 0,186 g EDTA und 0,2 g BSA wurden in einem Liter Aqua bidest. gelöst. Durch Zugabe von KOH wurde ein pH Wert von 8,0 eingestellt.

3.3 Isolation der Lymphozyten

Pro Teilnehmer wurden 10 ml Blut in drei Heparinröhrchen (Vacutainer Systems, Becton Dickinson, Erembodegem, Belgien) abgenommen. Nachfolgend wurde das Blut zentrifugiert (Sigma, Laboratory Centrifuges 4K15; 650 g, 10 min, Temperatur 4 °C). Das Plasma (obere helle Phase) wurde für das Einfrieren der Lymphozyten und für Messungen der oxidativen Parameter gesammelt und bei 4 °C aufbewahrt bzw. bei -80 °C tiefgefroren. Das restliche Blut wurde mit 4 ml RPMI pro Heparinröhrchen mit einer Pipette gemischt, nachfolgend auf zwei Röhrchen (Accuspin 50 ml, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) mit jeweils 15 ml Histopaque aufgeteilt und zentrifugiert (800 g, 15 min, Temperatur 16 °C). Dadurch erfolgte eine sequenzielle Trennung der Blutzellen. Die Reihenfolge der Phasen von oben nach unten war: RPMI, Lymphozyten (in Form eines hellweißen Ringes), Histopaque und Erythrozyten. Die Lymphozyten wurden mit Pipetten abgesaugt und in Röhrchen (50 ml) mit 12 ml RPMI transferiert. Die Suspensionen wurden zentrifugiert (332 g, 10 min, Temperatur 16 °C), der Überstand wurde dekantiert und die Pellets in je 12 ml RPMI aufgelöst und erneut zentrifugiert (332 g, 10 min, Temperatur 16 °C). Die Lymphozyten wurden mit je 4,8 ml RPMI und 1,2 ml Plasma gemischt und auf 8 Cryoröhrchen (2 ml, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) verteilt. Anschließend wurden pro Röhrchen 300 µl RPMI, 300 µl Plasma und 150 µl DMSO zupipettiert. Die Röhrchen wurden in Polystyrolboxen über Nacht bei -80 °C schonend tiefgefroren und nachfolgend in flüssigem Stickstoff gelagert. Abbildung 10 zeigt schematisch den Ablauf der Probenaufarbeitung.

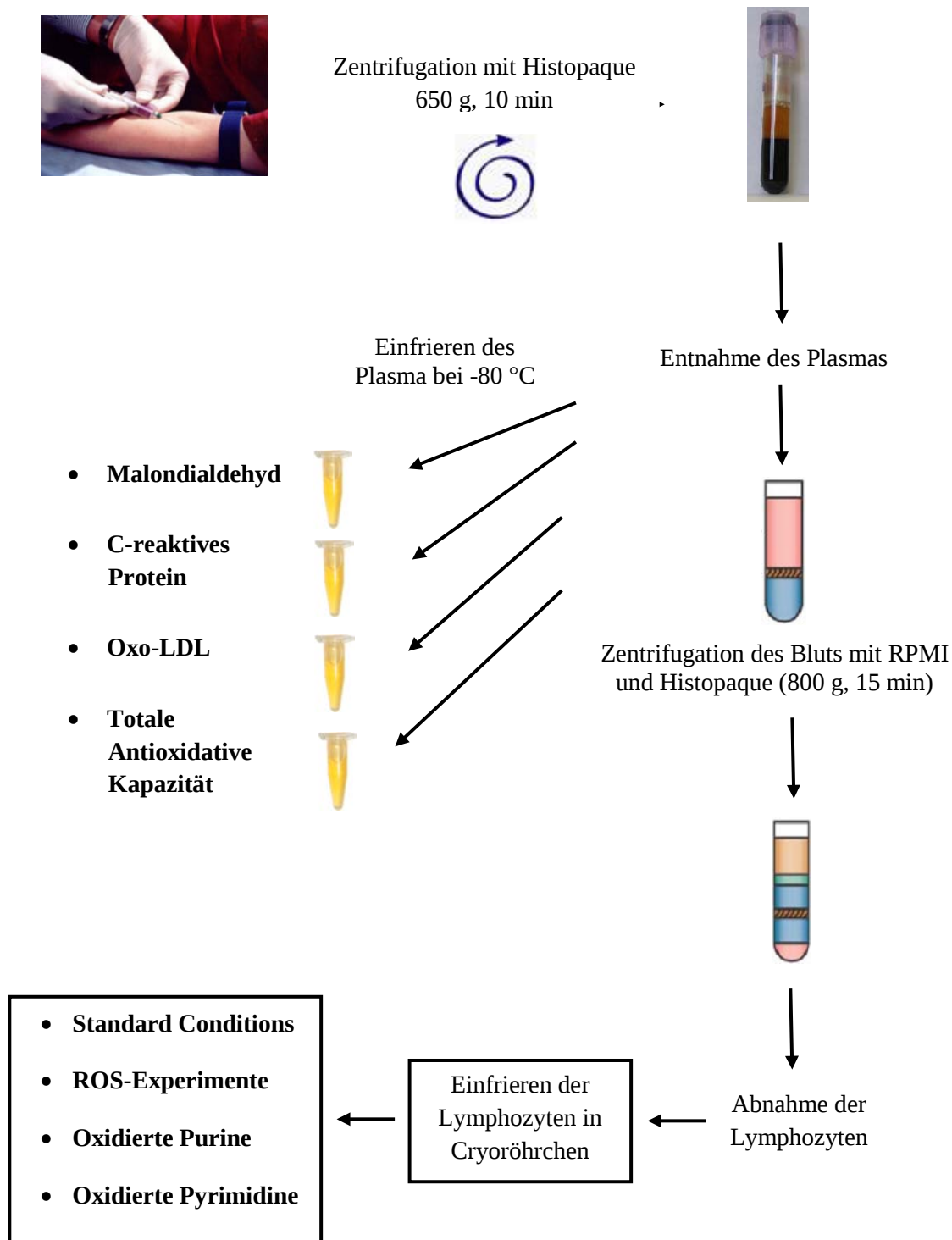


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Probenaufbereitung

3.4 Durchführung der Komet Assays

Die vorliegende Studie bestand aus zwei Serien von Experimenten. Vor Beginn der Interventionsstudie wurden *in vitro* Versuche mit den Nahrungsergänzungsmitteln durchgeführt, in denen periphere humane Lymphozyten als Indikatorzellen verwendet wurden. Diese Untersuchungen sind in Kapitel 3.5 beschrieben, die Experimente der Humanstudie in Kapitel 3.6. Alle Versuche wurden entsprechend den internationalen Richtlinien für SCGE-Tests durchgeführt [157].

Sowohl für die *in vitro* Experimente als auch in der Humanstudie wurden eingefrorene Lymphozyten verwendet. Die Zellen wurden bei 37 °C aufgetaut, zentrifugiert (200 g, 3 min, Temperatur 4 °C) und das Pellet in 400 µl RPMI gelöst [169].

Vor der Durchführung der SCGE-Experimente wurde die Zellzahl und die Vitalität der Lymphozyten mit Trypanblau bestimmt [170]. Dazu wurden 20 µl der Zellsuspensionen mit 20 µl Trypanblau vermischt. Nach einer Minute Einwirkzeit wurden 10 µl in die Zählkammer (0,1 mm Tiefe, 9 Großquadrate zu je 1 mm², geeicht) pipettiert und das Verhältnis zwischen lebenden Zellen (ungefärbt) und toten Zellen (blau) ermittelt. Anschließend wurden pro Messpunkt drei Objektträger hergestellt und je 50 Zellen (insgesamt 150 Zellen) ausgewertet. Die Durchführung des Komet Assays ist in Abbildung 11 schematisch dargestellt.

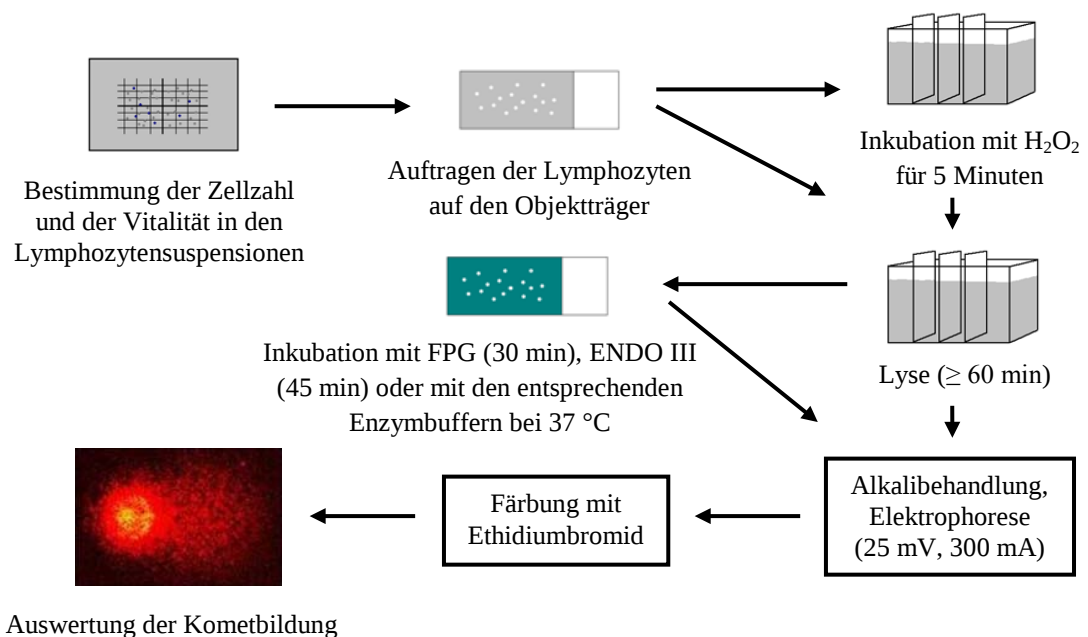


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Durchführung der Komet-Assays

3.5 *In vitro* Experimente

3.5.1 Behandlung der Zellen

Die Einzelkomponenten der Präparate (siehe Tabellen 9 und 10) wurden gemischt, sodass die Gesamtmengen dem Inhalt einer Tablette (ohne Überzugsmittel) entsprachen, und in DMSO gelöst. Anschließend wurden sie sterilfiltriert, den Lymphozyten in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt und eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

3.5.2 Messung der Vitalität

Um die geeigneten Konzentrationen für die Einzelzellgelelektrophorettests zu ermitteln, wurde die akute Toxizität der Lösungen mittels Trypanblaufärbung bestimmt [170]. Für die nachfolgenden Versuche wurden nur jene Substanzkonzentrationen verwendet, bei denen die Vitalität der Zellen nach Inkubation $\geq 80\%$ betrug.

3.5.3 Untersuchung gentoxischer Effekte

In diesen Experimenten wurde die Auslösung von DNA-Migration durch die beiden Nahrungsergänzungsmittel untersucht. Für die Versuche wurden Konzentrationen des Resveratrolgemisches zwischen 125 µg/ml und 250 µg/ml verwendet. Im Fall des Isoflavonpräparats wurde eine Dosierung zwischen 55 µg/ml und 183 µg/ml eingesetzt.

3.5.4 Herstellung der Objektträger

Die Objektträger wurden mit 1,5% NMP Agarose beschichtet und über Nacht getrocknet. Die Lymphozytensuspensionen wurden mit 100 µl 0,5% LMP Agarose (in PBS, 37 °C) vermischt und aufgetragen. Die Objektträger wurden auf Eis gelegt bis die Agarose gehärtet war und im Kühlschrank mehrere Stunden in Lyselösung aufbewahrt. Danach wurden sie in eine mit Elektrophorespuffer gefüllte Horizontalelektrophoresekammer (237 mm x 118 mm, Renner GmbH, Darmstadt, Deutschland) eingeordnet. Nach 20 Minuten Inkubation, in der sich die doppelsträngige DNA durch die basische Pufferlösung (pH-Wert > 13) in Einzelstränge löst, wurde die Elektrophorese gestartet. Die Elektrophoresedauer betrug 20 Minuten (300 mA und 25 V). Danach wurden die Objektträger zweimal fünf Minuten mit Neutralisationspuffer und nachfolgend mit Aqua bidest. gewaschen und an der Luft getrocknet.

3.5.5 Experimente mit Wasserstoffperoxid

Um die Schutzeffekte der Nahrungsergänzungsmittel *in vitro* zu untersuchen, wurden die Lymphozyten nach einstündiger Inkubation 5 Minuten mit Wasserstoffperoxid (50 μ M, auf Eis) behandelt. Die Konzentration und die Expositionszeit wurden aufgrund von Ergebnissen früherer Dosis-Wirkungsexperimente ausgewählt [171].

3.5.6 Untersuchungen mit Restriktionsenzymen

Um die Entstehung endogen gebildeter oxidierter Purine und Pyrimidine zu messen, wurden die Zellen mit den Restriktionsenzymen Formamidopyrimidinglycosylase (FPG) und Endonuclease III (ENDO III) behandelt. Die Experimente wurden nach dem Protokoll von Collins et al. [172] durchgeführt. In einem Vorexperiment wurde die Aktivität der Enzyme überprüft und die optimalen Mengen der Enzyme bestimmt, die für die maximale Auslösung von DNA-Schäden erforderlich sind. In Abbildung 12 sind die Ergebnisse der Kalibrationsversuche grafisch dargestellt. Die Enzyme wurden mit Enzympuffer verdünnt, nach Lyse auf die Objektträger pipettiert und für 30 (FPG) beziehungsweise 45 Minuten (ENDO III) bei 37 °C inkubiert.

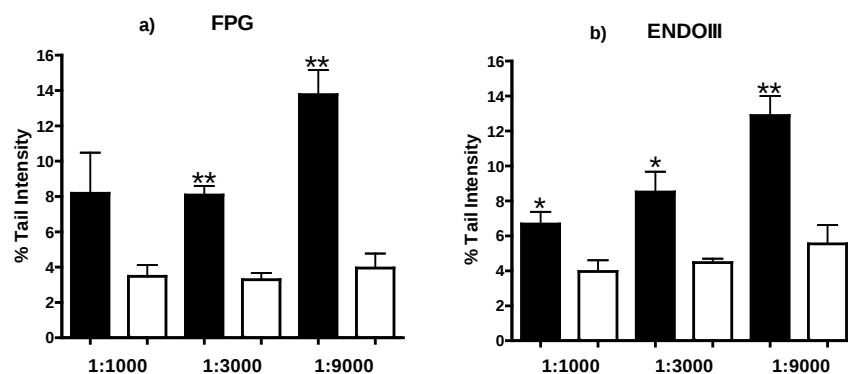


Abbildung 12: Kalibration der Restriktionsenzyme. Um die geeignete Konzentrationen der Restriktionsenzyme für die Hauptexperimente zu ermitteln, wurden 3 verschiedene Verdünnungen getestet (1:1000, 1:3000 und 1:9000). Die Zellen wurden auf die Objektträger aufgetragen, lysiert und für 30 bzw. 45 Minuten mit den beiden Restriktionsenzymen inkubiert. Nach der Elektrophorese wurde die DNA-Migration bestimmt. Die schwarzen Balken zeigen die Tail Intensity der mit den jeweiligen Konzentrationen behandelten Zellen, die weißen Balken stellen die Ergebnisse mit den entsprechenden Enzympuffern dar. Pro Messpunkt wurden drei Objektträger ausgewertet und jeweils 50 Zellen gezählt. **** statistische Signifikanz: $p < 0,05$, $p < 0,01$ (t-Test für unverbundene Stichproben)

3.6 Durchführung der Humanstudie

3.6.1 Intervention und Probennahme

An jeder der beiden Interventionsstudien nahmen zwölf Personen teil. Das Alter der Probanden lag zwischen 23 und 53 Jahren. Alle Teilnehmer waren gesunde Nichtraucher, die während der Restriktions- und Interventionsphase keine Medikamente (außer hormonelle Kontrazeptiva) und Nahrungssupplemente einnahmen. Die demografischen Daten sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Demografische Daten der Studienteilnehmer¹

Parameter	Frauen (n=7)	Männer (n=5)
Alter	25,2 ± 3,1	30,2 ± 12,8
Größe (cm)	165 ± 6,0	181 ± 4,6
Gewicht (kg)	63,0 ± 7,6	76,8 ± 7,4
BMI	23,0 ± 2,4	23,4 ± 1,6

¹⁾ Mittelwerte und Standardabweichungen

Fünf Tage vor Beginn der Studie wurden die Probanden ersucht, eine Nahrungsrestriktion einzuhalten, um den Verzehr größerer Mengen von Nahrungsmitteln zu verhindern, die Antioxidantien enthalten (Tabelle 12) und so die interindividuellen Schwankungen zu reduzieren. Außerdem wurden die Teilnehmer ersucht, während der Dauer der Studie keine Nahrungsergänzungsmittel und Medikamente zu sich zu nehmen. Auch die Ausübung von Extremsport (intensives Fitness- und Krafttraining, Marathon) sollte vor und während der Interventionsphase vermieden werden, da bekannt ist, dass körperliche Anstrengung zu oxidativen Schäden führt [173]. Der Zeitplan der Probennahme ist in Abbildung 13 grafisch dargestellt.

Die Studienteilnehmer nahmen innerhalb von fünf aufeinanderfolgenden Tagen täglich je 3 Tabletten des Nahrungsergänzungsmittels (jeweils eine am Vormittag, zu Mittag und am Abend) zu sich. Von allen Probanden wurden vor der Einnahme, am zweiten Tag, nach fünftägiger Einnahme sowie nach einer zehntägigen „Wash-out“-Phase Blutproben in Heparinröhrchen (Vacutainer Systems, Becton Dickinson, Erembodegem, Belgien) abgenommen; diese erfolgten zwei Stunden nach Einnahme der ersten Tablette. Die persönlichen Daten der Teilnehmer, Ernährungsgewohnheiten,

Puls und Blutdruck wurden protokolliert, ebenso Komplikationen, die während der Einnahme auftraten.

Die gesammelten Proben wurden kodiert, die Lymphozyten mittels Gradientenzentrifugation isoliert und anschließend in Cryoröhrchen (2 ml, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) mit PBS aufgeteilt (die Codes waren nur dem Projektleiter bekannt). Die Plasma- und Blutproben für die Messung der biochemischen Parameter wurden an die beteiligten Labors weitergeleitet. Zu den Zeitpunkten T0, T1, T2 und T3 wurden alle Parameter, die die verschiedenen Endpunkte der DNA-Stabilität betrafen, gemessen.

Tabelle 12: Restriktionsplan während der Intervention

Gruppen	Einschränkung (Restriktion)	Alternativen
Getränke	<u>Erlaubt mit Einschränkung:</u> 1 Tasse/ Tag Kaffee, Schwarztee, Rotbuschtee <u>Erlaubt mit Einschränkung:</u> 200ml Fruchtsaft/Tag, Coca-Cola, Energiedrinks Kein Traubensaft <u>Kein Alkohol</u> (250ml Bier/Woche erlaubt) (kein Alkohol am Abend vor der Blutabnahme)	Kräuterlimonade, Mineralwasser, Milch, Tee (Kräutertee, Tees ohne Vitaminzusätze)
Getreide- produkte	<u>Erlaubt mit Einschränkung:</u> Vollkornbrot (1 Scheibe/Tag), Müsli (höchstens 100g/Tag)	Schwarzbrot, Weißbrot, Nudeln, Nockerl,
Gemüse/ Hülsen- früchte	<u>Erlaubt mit Einschränkung:</u> bis zu 100g/ Tag Kohlrabi, Rotkraut, Kohl, Karfiol, Rettich, Karotten, Kohlsprossen, Paprika, Tomaten, Mais, Keine Erdnüsse, keine Sojaprodukte	Zucchini, Gurken, Kartoffeln, Salat, Bohnen, Linsen, Erbsen, Pilze
Obst	<u>Erlaubt mit Einschränkung:</u> bis zu 100g/ Tag Zitronen, Nektarinen, Clementinen, Grapefruit Kiwi, Mango, Papaya, Sanddornbeere, Erdbeeren, Hagebutten, Marillen, Orangen Keine Weintrauben	Äpfel, Birnen, Bananen, Wassermelonen, Pfirsiche
Sonstiges	Keine Vitamintabletten, keine Medikamenteneinnahme Keine Lebensmittel mit zugesetzten Vitaminen oder Antioxidantien (z.B. Frühstücksflocken, Müsli, bestimmte Wurstsorten...) Kein exzessiver Sport	

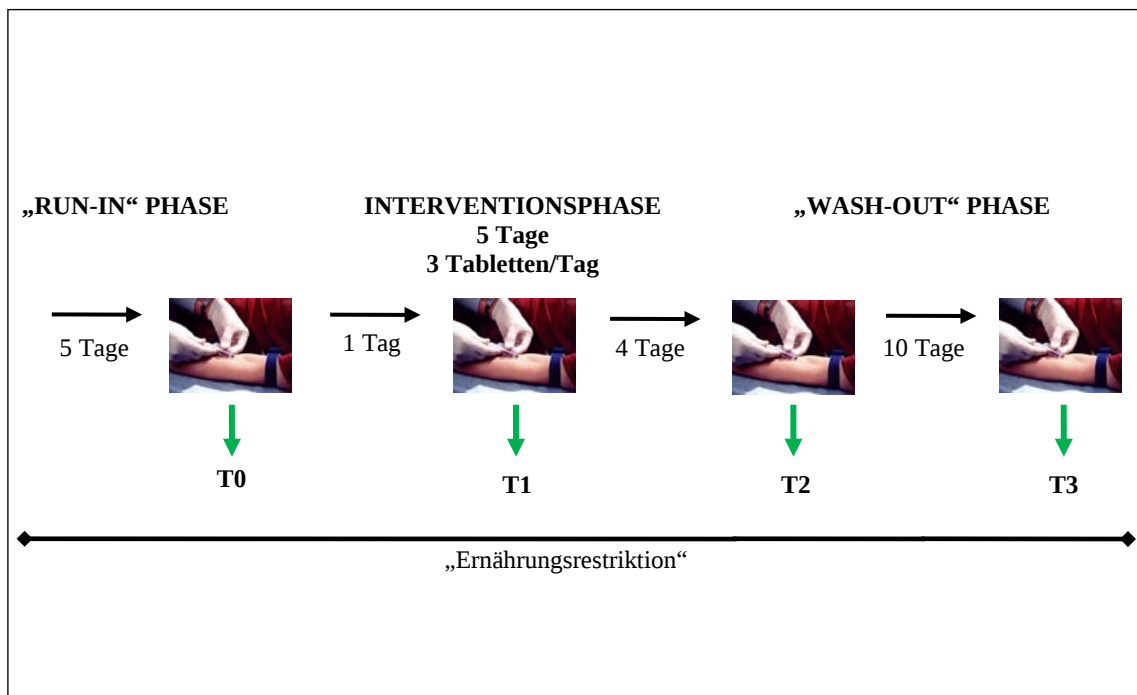


Abbildung 13: Ablauf der Interventionsstudie

3.6.2 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Nach dem Auftauen der Lymphozyten wurden in einer Neubauerzählkammer die Vitalität und die Zellzahl ermittelt [170]. Die Lebensfähigkeit betrug in allen Fällen $\geq 80\%$. Durch die Bestimmung der Zellzahl konnte die Menge der Volumina berechnet werden, die erforderlich waren, um die für die Komet-Experimente benötigte Menge Zellen pro Objektträger auftragen zu können. Für die Bestimmung der DNA-Migration unter Standardbedingungen wurden 50 000 Zellen pro Objektträger verwendet, in den Versuchen mit H_2O_2 waren es 100 000 und für die Experimente mit den Restriktionsenzymen wurden 40 000 Zellen eingesetzt.

3.6.3 Auslösung von DNA-Migration mit Wasserstoffperoxid

Die Lymphozytensuspensionen wurden mit LMA-Agarose gemischt und auf die Objektträger aufgetragen. Anschließend wurden sie bei 4°C fünf Minuten mit je $50\ \mu\text{M}$ H_2O_2 in PBS behandelt und dreimal mit PBS gewaschen [174].

3.6.4 Experimente mit Restriktionsenzymen

Nach der Lyse wurden die Lymphozyten mit den Restriktionsenzymen Formamidopyrimidinglycosylase (FPG) und Endonuclease III (ENDOIII) behandelt. Anschließend wurden die Objektträger in eine mit Elektrophorespuffer gefüllte Horizontalelektrophoresekammer (237 mm x 118 mm, Renner GmbH, Darmstadt, Deutschland) gelegt und 40 min inkubiert, um doppelsträngige DNA in Einzelstränge überzuführen. Nach 30-minütiger Elektrophorese (300 mA und 25 V) wurden die Objektträger zweimal je acht Minuten mit Neutralisationslösung und einmal mit Aqua bidest. gewaschen und an der Luft getrocknet.

3.6.5 Auswertung der Objektträger

Um die DNA zu färben wurden die Objektträger mit Ethidiumbromid behandelt und mit einem Fluoreszenzmikroskop (Nikon 027012, Quecksilberdampflampe Osram HB10101AF, Grünfilter 520 nm, Objektiv Nikon Plan Fluor 10/0,3 Vergrößerung) ausgewertet. Mit einer Videokamera (JVC TK-C1360 1/2-in. CCD) wurde das mikroskopische Bild auf den Computer übertragen. Die Erfassung der DNA-Migration erfolgte durch ein computergestütztes Auswerteprogramm (Komet Assay IV, Perceptive Instruments, UK). Um die Migration zu messen, wurde der prozentuelle Anteil der DNA im Tail bestimmt.

3.6.6 Bestimmung der LDL-Oxidation

Die Bestimmung der Konzentrationen des oxidierten LDLs wurde mit einem enzymgekoppelten Immunadsorptionstest („ELISA-Kit“, oxidized LDL ELISA, Mercodia AB, Uppala, Schweden) durchgeführt. Nach dem Auftauen der Plasmaproben wurden sie verdünnt (1:6561), in ELISA-Platten pipettiert und für zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Platten mit einer Pufferlösung gewaschen und Enzymkonjugatlösung zugefügt. Zuletzt wurden Tetramethylbenzidin (TMB) zugesetzt und die Absorption mit einem Plattenlesegerät (Fluorstar Optima Mikroplate reader, BMG Lab Technologies, Offenburg, Deutschland) gemessen. Die Konzentrationen des oxidierten LDL wurden durch Anfertigung einer Kalibrationskurve ermittelt.

3.6.7 Messung der totalen antioxidativen Kapazität

Die totale antioxidative Kapazität wurde mit dem TRAP-Test bestimmt, der auf der Bildung von Peroxylradikalen beruht. Die Messungen wurden am Institut für Ernährungswissenschaften der Universität Wien unter der Aufsicht von Prof. K.-H. Wagner durchgeführt.

3.6.8 CRP-Messung

Um die Konzentration des CRPs zu ermitteln wurde in der vorliegenden Humanstudie ein turbidometrischer Immuntest durchgeführt. Für die Messung wurde das Plasma der Probanden verwendet und mit einem Analysegerät von Olympus (OSR6299) bestimmt; die Reagenzien wurden entsprechend dem Protokoll des Herstellers verwendet. Die Messungen wurden unter Aufsicht von Prof. T. Szekeres im AKH Wien durchgeführt.

3.6.9 Statistik

Hauptzielgrößen der vorliegenden Untersuchung waren die Endpunkte der DNA-Schädigung. Aufgrund früherer Experimente wurde angenommen, dass bei 12 Teilnehmern eine 34%ige Änderung der Bildung oxidativer Basen bei Verwendung von drei Parallelmessungen mit einer statistischen Power von 90% (Signifikanz-Level 5%) detektiert werden kann [167]. Unter der Voraussetzung einer relativen Standardabweichung von 56%, wie sie sich aus früheren Untersuchungen ergab [167], ist bei 12 Personen und drei Messungen pro Person eine standardisierte Effektstärke von 0,62 notwendig, um diesen Unterschied auf dem 5%-Signifikanzniveau mit 90% Power zu sichern.

Eine inferenzstatistische Auswertung wurde ausschließlich für die Hauptzielgröße (Prozent DNA im „Tail“) durchgeführt. Sie erfolgte nach Arcus-sinus-Transformation, die erfahrungsgemäß die Korrelation der Varianz mit dem Mittelwert beseitigt und darüber hinaus die Verteilung der Werte an eine Normalverteilung annähert. Nachfolgend wurde eine ANOVA für abhängige Stichproben durchgeführt. Der zentrale Vergleich erfolgte gegen den Ausgangswert (T0) mittels linearer Kontraste (T1-T0, T2-T0 und T3-T0).

Die statistische Auswertung der *in vitro* Versuche und der biochemischen Parameter erfolgte mittels unabhängigem t-Tests.

4 Ergebnisse

Der Ergebnissteil ist in zwei Unterkapitel aufgeteilt. Im ersten Teil werden die Resultate der *in vitro* Versuche beschrieben, die vor der Interventionsstudie durchgeführt wurden. Der zweite Abschnitt betrifft die Ergebnisse der beiden Humanstudien, und zwar sowohl die der SCGE-Experimente, als auch die Messungen der biochemischen Parameter.

4.1 Ergebnisse der *in vitro* Experimente

Vor Beginn des Hauptexperiments wurden mit beiden Nahrungsergänzungsmitteln *in vitro* Experimente durchgeführt, um festzustellen, ob und in welchen Konzentrationen die Substanzen akut toxisch und gentoxisch wirken und ob DNA-schützende Effekte nachweisbar sind.

In Vorversuchen wurden die Zellen mit unterschiedlichen Mengen von DMSO inkubiert, um zu klären, ob es durch das Lösungsmittel per se zu DNA-Schäden kommt. Konzentrationen unter 3% hatten weder zytotoxische Wirkung, noch lösten sie Strangbrüche aus. Auch die ROS-Experimente und die endogene Bildung oxidierter Purine und Pyrimidine wurden durch die Substanz nicht beeinflusst.

4.1.1 Resultate mit dem Isoflavonpräparat

Die Lymphozyten wurden mit Suspensionen der isoflavonhaltigen Tabletten 60 Minuten inkubiert. Vor der Durchführung der SCGE-Experimente wurde die akute Toxizität bestimmt. Bei der höchsten untersuchten Dosis (219 µg/ml) nahm die Lebensfähigkeit der Zellen im Vergleich zur Kontrolle um 27% ab (Abbildung 14).

Die Ergebnisse der Gentoxizitätsexperimente sind in Abbildung 15 grafisch dargestellt. Mit Konzentrationen zwischen 110 µg/ml bis 183 µg/ml wurde ein signifikanter Anstieg der DNA-Migration detektiert.

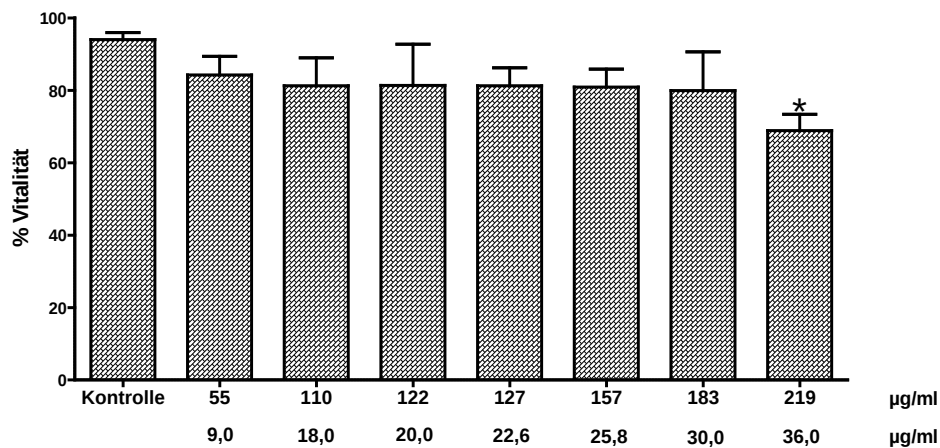


Abbildung 14: Bestimmung der Zytotoxizität nach Inkubation mit der Isoflavonmischung.

Die Zellen wurden 60 min mit unterschiedlichen Mengen des Isoflavongemisches inkubiert. Anschließend wurde, wie in Kapitel 3.4 beschrieben, die Vitalität mit Trypanblau bestimmt. In der x-Achse sind die Gesamtmengen aller Inhaltsstoffe in µg/ml Inkubationslösung angeführt, in der zweiten Zeile sind die Isoflavonmengen in µg/ml abgebildet. Die Balken zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen der Resultate, die mit drei Parallelkulturen erhalten wurden. * statistische Signifikanz: $p \leq 0,05$ (t-Test für unverbundene Stichproben).

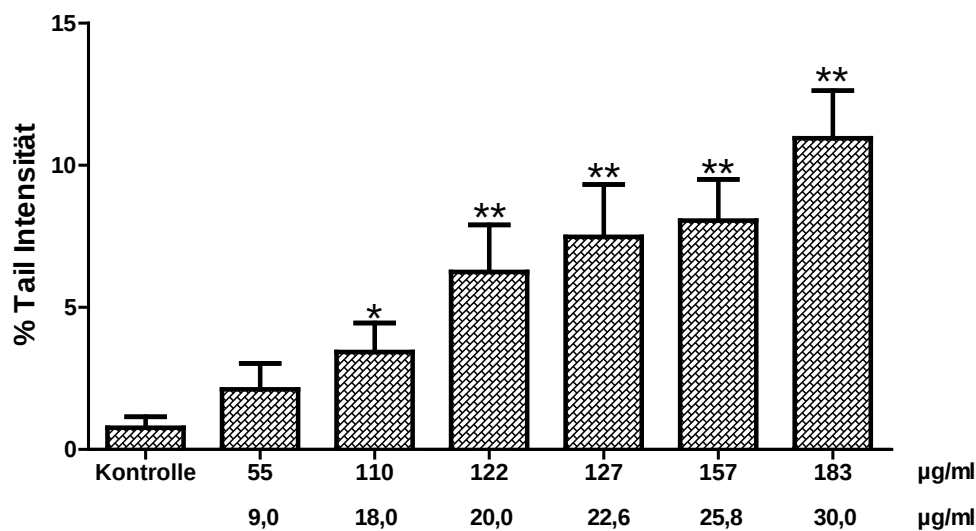


Abbildung 15: Bestimmung der Gentoxizität nach der Inkubation mit der Isoflavonmischung.

Die Lymphozyten wurden für eine Stunde mit unterschiedlichen Mengen des Isoflavongemisches inkubiert und anschließend auf die Objektträger aufgetragen. Nach der Lyse der Zellen wurde die Elektrophorese durchgeführt. Pro Konzentration wurden drei Objektträger hergestellt und jeweils 50 Zellen ausgewertet. In der x-Achse sind die Gesamtmengen aller Inhaltsstoffe in µg/ml Inkubationslösung angeführt, in der zweiten Zeile sind die Isoflavonmengen in µg/ml abgebildet. Die Balken geben die Mittelwerte und Standardabweichungen der Resultate wieder, die mit drei Parallelkulturen pro Messpunkt erhalten wurden. *** statistische Signifikanz: $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$ (t -Test für unverbundene Stichproben).

In Abbildung 16 sind die Resultate zusammengefasst, die nach Wasserstoffperoxidbehandlung in Gegenwart der Isoflavone erhalten wurden. Es wurde eine signifikante Abnahme der Kometbildung gefunden, wobei der deutlichste Effekt bei der mittleren Konzentration gefunden wurde. Unter diesen Versuchsbedingungen nahm die ROS-induzierte DNA-Migration um 65% ab.

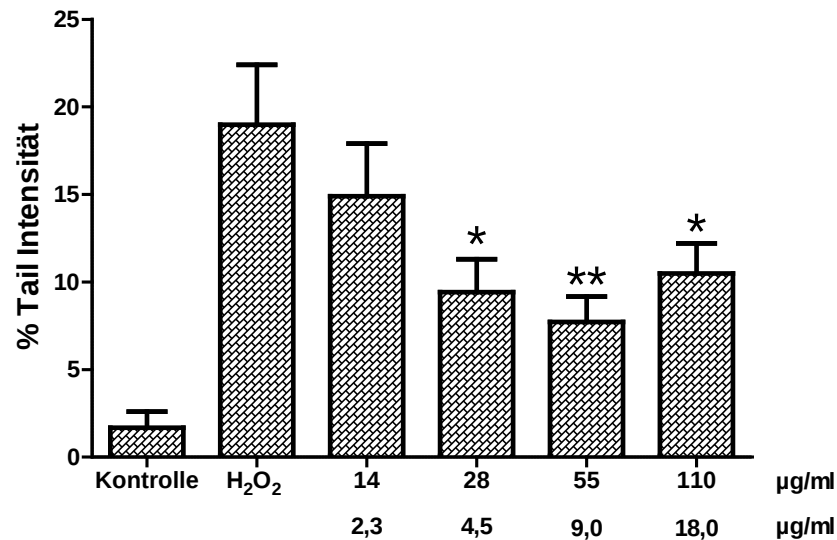


Abbildung 16: Reduktion H₂O₂-induzierter DNA Migration durch die Isoflavonmischung. Die Lymphozyten wurden wie in Kapitel 3.5.5 beschrieben nach einstündiger Inkubation mit dem Isoflavongemisch für fünf Minuten mit 50µM H₂O₂ behandelt. Die weitere Durchführung der Experimente erfolgte wie in Legende von Abbildung 15 beschrieben. In der x-Achse sind die Gesamtmengen aller Inhaltsstoffe in µg/ml Inkubationslösung angeführt, in der zweiten Zeile sind die Isoflavonmengen in µg/ml abgebildet. *** statistische Signifikanz: $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$ (t-Test für unverbundene Stichproben).

Die mit den Restriktionsenzymen erhaltenen Resultate sind in Abbildung 17 grafisch dargestellt. Mit beiden Enzymen wurde ein Anstieg der DNA-Migration nach Behandlung der Zellkerne beobachtet. In Gegenwart des Isoflavonpräparats kam es zu einem Rückgang der DNA-Migration, der im Fall von FPG ein Ausmaß von 54% erreichte und statistisch signifikant war. Mit ENDO III waren die Schutzeffekte nicht signifikant.

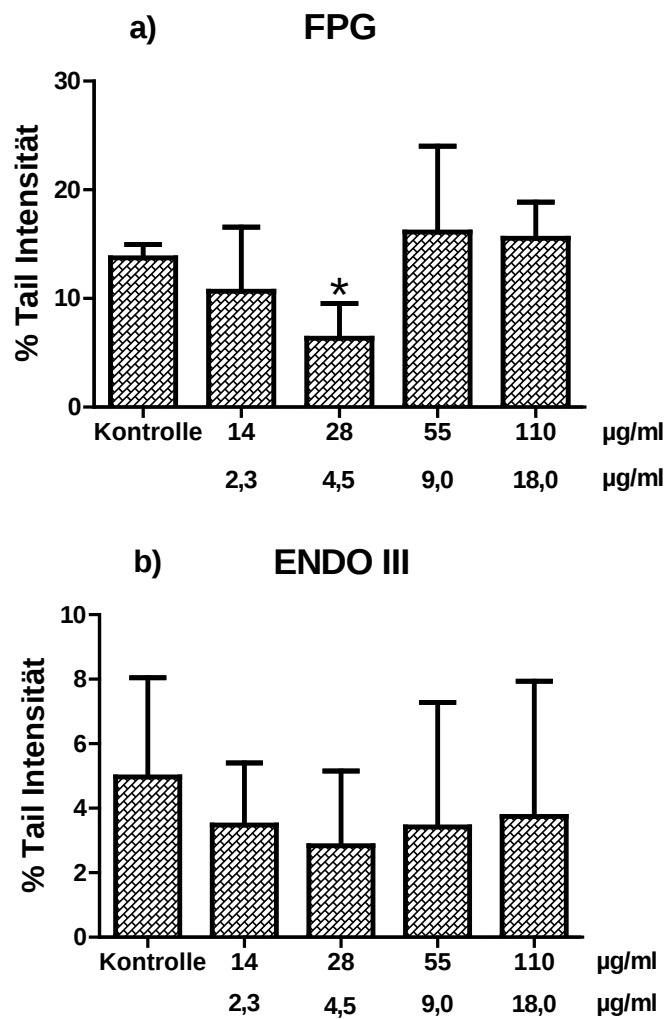


Abbildung 17: Beeinflussung der Bildung von oxidierten Purinen und Pyrimidinen durch Inkubation der Zellen mit dem Isoflavonpräparat. Die Zellkerne wurden wie in Kapitel 2.5.6 mit den Enzymen behandelt. Dabei wurden diese nach einem zuvor durchgeführten Kalibrationsversuch in einer Konzentration von 1:1000 verwendet. Die Zellen wurden auf die Objektträger aufgetragen, lysiert und für 30 bzw. 45 Minuten mit den beiden Restriktionsenzymen inkubiert. Nach der Elektrophorese wurde die DNA-Migration bestimmt. In der x-Achse sind die Gesamtmengen aller Inhaltsstoffe in µg/ml Inkubationslösung angeführt, in der zweiten Zeile sind die Isoflavonmengen in µg/ml abgebildet. Die Balken stellen die Mittelwerte nach Abzug der Kontrollwerte (Buffer) dar. * statistische Signifikanz $p < 0,05$ (t-Test für unverbundene Stichproben).

4.1.2 Resultate mit dem Resveratrolpräparat

Die Zellen wurden mit den Inhaltsstoffen der Tabletten 60 Minuten inkubiert. Vor der Durchführung der SCGE-Experimente wurde die akut toxische Wirkung des Präparats untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 grafisch dargestellt. Die akute Toxizität war relativ schwach, bei der höchsten untersuchten Dosis (750 µg/ml) nahm die Lebensfähigkeit der Zellen um 14% ab.

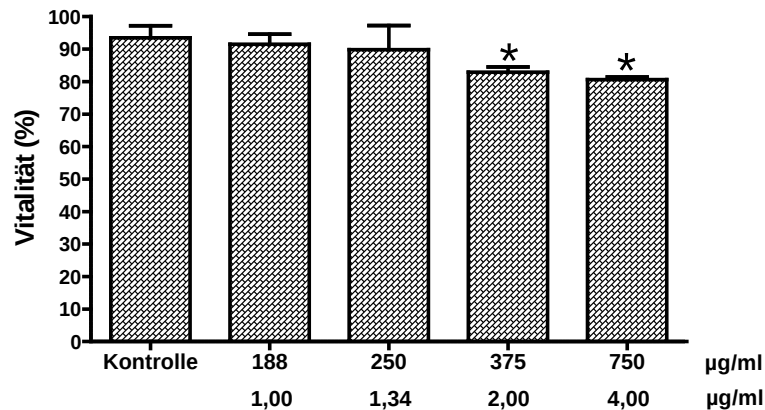


Abbildung 18: Bestimmung der Zytotoxizität nach Inkubation mit dem Resveratrolpräparat. Die Zellen wurden 60 min mit unterschiedlichen Mengen des Resveratrolgemisches inkubiert. Anschließend wurde, wie in Kapitel 3.4 beschrieben, die Vitalität mit Trypanblau bestimmt. In der x-Achse sind die Gesamtmengen aller Inhaltsstoffe in µg/ml Inkubationslösung angeführt, in der zweiten Zeile ist die enthaltene Resveratrolmenge in µg/ml abgebildet. Die Balken zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen der Resultate, die mit drei Parallelkulturen erhalten wurden. * statistische Signifikanz: $p \leq 0,05$ (t-Test für unverbundene Stichproben).

Anschließend wurde die Auslösung von Kometen unter Standardbedingungen untersucht. Abbildung 19 zeigt die Ergebnisse der SCGE-Experimente mit unterschiedlichen Substanzkonzentrationen. Eine signifikante Steigerung der DNA-Migration wurde mit Konzentrationen ≥ 188 µg/ml detektiert.

Die nachfolgenden Untersuchungen mit Wasserstoffperoxid und den Restriktionsenzymen wurden unter Bedingungen durchgeführt, bei denen mit den aus dem Präparat hergestellten Lösungen keine signifikanten gentoxischen Effekte auftraten, d.h. die höchste verwendete Konzentration lag bei 150 µg/ml. Die Resultate der H₂O₂-Experimente sind in Abbildung 20 dargestellt. Es wurde eine eindeutige Abnahme der Kometbildung detektiert, wobei der stärkste Effekt mit der niedrigsten Konzentration beobachtet wurde. Unter diesen Bedingungen nahm die ROS-induzierte DNA-Migration um 67% ab.

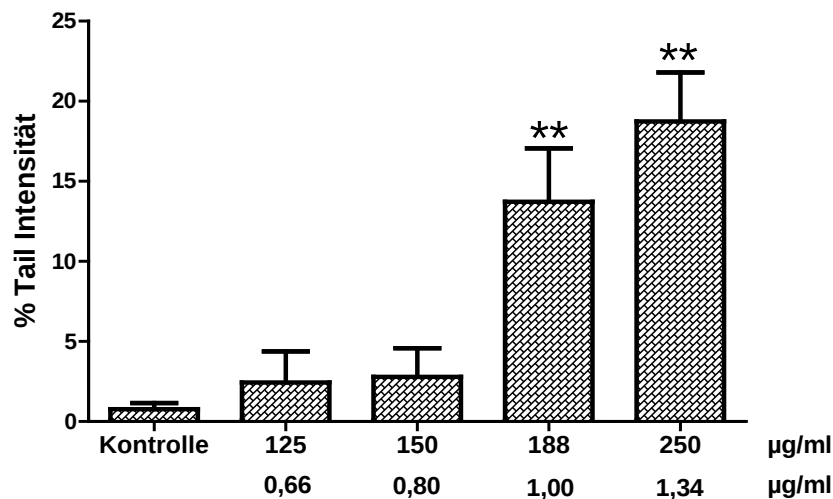


Abbildung 19: Bestimmung der Genotoxizität nach der Inkubation mit dem Resveratrolpräparat. Die humanen Lymphozyten wurden für eine Stunde mit unterschiedlichen Mengen des Resveratrolgemisches inkubiert und anschließend auf die Objektträger aufgetragen. Nach der Lyse der Zellen wurde die Elektrophorese durchgeführt. Pro Konzentration wurden drei Objektträger hergestellt und jeweils 50 Zellen ausgewertet. In der x-Achse sind die Gesamtmengen aller Inhaltsstoffe in µg/ml Inkubationslösung angeführt, in der zweiten Zeile ist die enthaltene Resveratrolmenge in µg/ml abgebildet. Die Balken geben die Mittelwerte und Standardabweichungen der Resultate wieder, die mit drei Parallelkulturen pro Messpunkt erhalten wurden. ** statistische Signifikanz: $p \leq 0,01$ (t-Test für unverbundene Stichproben).

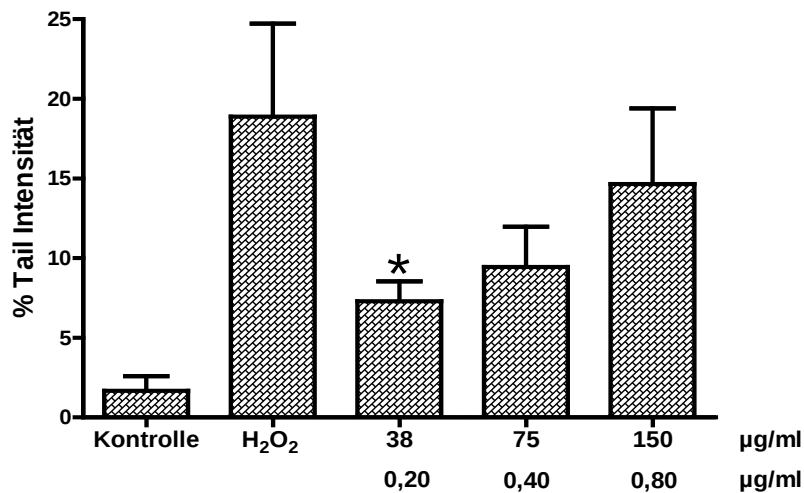


Abbildung 20: Reduktion H₂O₂-induzierter DNA Migration durch die Resveratrolmischung. Die Lymphozyten wurden wie in Kapitel 3.5.5 beschrieben nach einstündiger Inkubation mit dem Resveratrolgemisch fünf Minuten mit 50 µM H₂O₂ behandelt. Die weitere Durchführung der Experimente erfolgte wie in Legende von Abbildung 19 beschrieben. In der x-Achse sind die Gesamtmengen aller Inhaltsstoffe in µg/ml Inkubationslösung angeführt, in der zweiten Zeile ist die enthaltene Resveratrolmenge in µg/ml abgebildet.* statistische Signifikanz: $p \leq 0,05$ (t-Test für unverbundene Stichproben).

Die mit den Restriktionsenzymen erhaltenen Resultate sind in Abbildung 21 grafisch dargestellt. Mit beiden Enzymen wurde ein Anstieg der DNA-Migration nach Behandlung der Zellkerne beobachtet. In Gegenwart des Resveratrolpräparats nahm das Ausmaß der DNA-Migration deutlich ab. Im Fall von FPG betrug der Rückgang der DNA-Schädigung zwischen 62% mit der höchsten und 67% mit der niedrigsten verwendeten Konzentration. Der Schutzeffekt war über den gesamten untersuchten Bereich statistisch signifikant. Mit ENDO III kam es zu einer deutlich geringeren Abnahme zwischen 11% bis 27%, die keine Signifikanz erreichte.

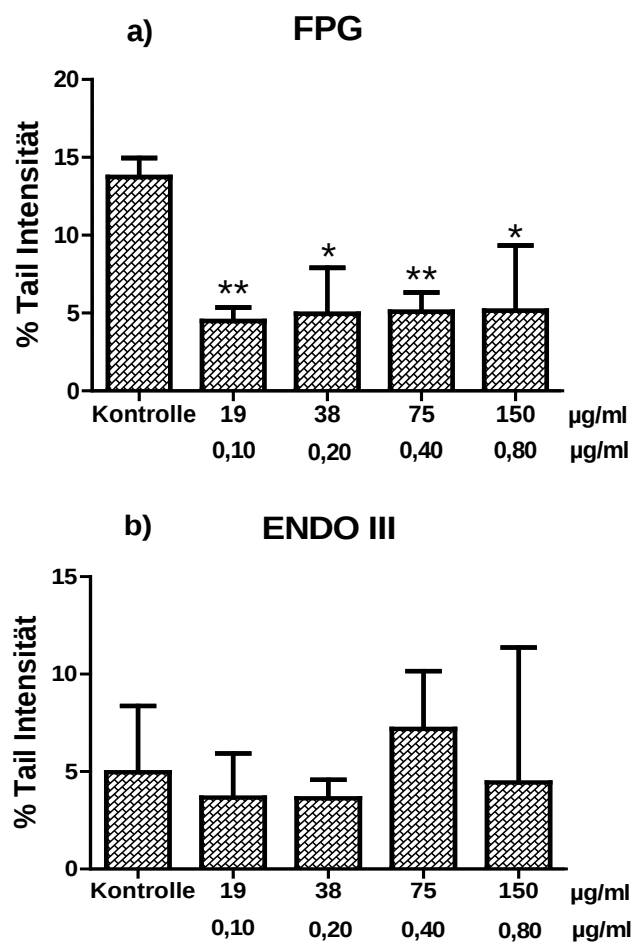


Abbildung 21: Beeinflussung der Bildung von oxidierten Purinen und Pyrimidinen durch Inkubation der Lymphozyten mit dem Resveratrolpräparat. Die Zellkerne wurden wie in Kapitel 3.5.6 mit den Enzymen behandelt. Die Durchführung der Experimente erfolgte wie in der Legende von Abbildung 17 beschrieben. In der x-Achse sind die Gesamtmengen aller Inhaltsstoffe in µg/ml Inkubationslösung angeführt, in der zweiten Zeile ist die enthaltenen Resveratrolmenge in µg/ml abgebildet. Die Balken stellen die Mittelwerte nach Abzug der Kontrollwerte (Buffer) dar, die mit drei Parallelkulturen gemessen wurden. *** statistische Signifikanz: $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$ (t-Test für unverbundene Stichproben).

4.2 Ergebnisse der Humanstudie

Die Humanstudie wurde durchgeführt, um zu klären, ob durch die Einnahme eines Isoflavon- bzw. Resveratrolpräparats die Bildung von Einzel- und Doppelstrangbrüchen in peripheren Lymphozyten verändert und ob die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber ROS beeinflusst wird. Des weiteren wurde der Einfluss der beiden Nahrungsergänzungsmittel auf die endogene Bildung oxidierteter Pyrimidin- und Purinbasen untersucht.

In Kapitel 4.2.1 werden zuerst die Resultate, die mit dem Isoflavonpräparat erhalten wurden, beschrieben, Kapitel 4.2.2 betrifft die Ergebnisse der Untersuchung des Resveratrolpräparats.

4.2.1 Resultate mit dem Isoflavonpräparat

Abbildung 22 zeigt die Auswirkung der Einnahme des Isoflavonpräparats auf die DNA-Migration in peripheren Lymphozyten unter Standardbedingungen. Nach fünftägiger Einnahme kam es zu einem Rückgang der DNA-Schädigung um 13%, der statistisch nicht signifikant war.

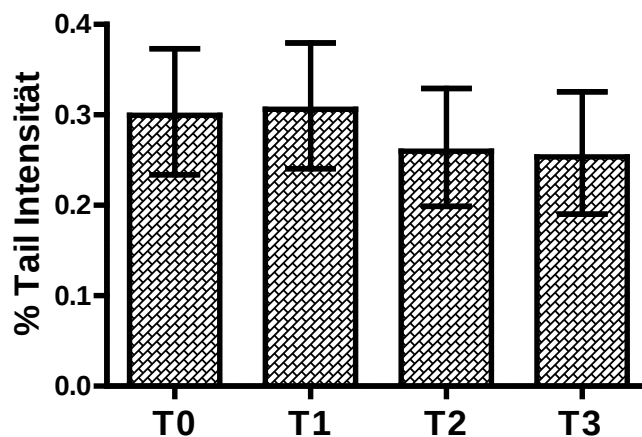


Abbildung 22: Auswirkung des Isoflavonpräparats auf die endogene DNA-Migration in peripheren Lymphozyten. Die Probanden der Studie nahmen über einen Zeitraum von fünf Tagen jeweils drei Tabletten des Präparats ein. Vor der Intervention, nach einem Tag, nach fünf Tagen und nach einer zehntägigen „wash-out“-Phase wurde ihnen Blut abgenommen und die Zellen wie in Kapitel 3.3 beschrieben isoliert. Pro Zeitpunkt wurden von jeder Probe drei Objektträger hergestellt und jeweils 50 Zellen ausgewertet. Die Balken zeigen die Mittelwerte und die Standardabweichungen.

Die Auswirkung bei H_2O_2 -induzierter DNA-Migration ist in Abbildung 23 grafisch dargestellt. Sowohl nach eintägiger (14%) als auch nach fünftägiger Einnahme (20%) des Isoflavonpräparats kam es zu einem Rückgang der DNA-Schäden, der zum Zeitpunkt T2 signifikant war.

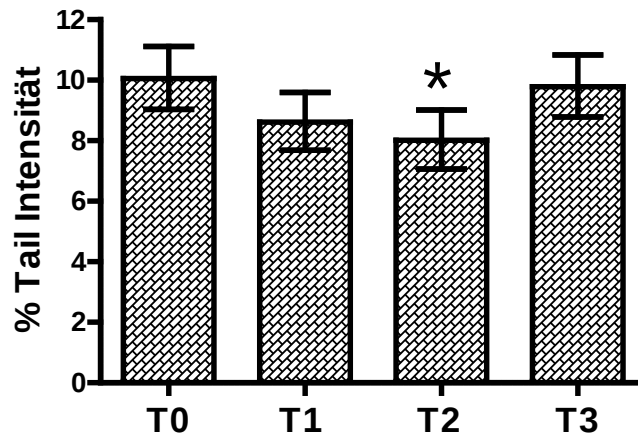


Abbildung 23: Auswirkung des Isoflavonpräparats auf H_2O_2 -induzierte DNA Migration in peripheren Lymphozyten. Die Lymphozyten wurden wie in Kapitel 3.6.3 beschrieben für fünf Minuten mit $50\mu\text{M}$ H_2O_2 behandelt. Die weitere Durchführung der Experimente erfolgte wie in Legende von Abbildung 22 beschrieben. Die Balken zeigen die Mittelwerte und die Standardabweichungen. * statistische Signifikanz: $p \leq 0,05$ (ANOVA-Test)

Abbildung 24 und 25 zeigen die Resultate, die mit den Restriktionsenzymen erhalten wurden. Nach Behandlung der Zellen mit FPG (oxidierte Purine) kam es nach der Intervention zu einer statistisch signifikanten Abnahme der DNA-Schäden um 50%. Nach einem und nach fünf Tagen war ein Rückgang der oxidierten Pyrimidine (mit ENDO III bestimmt) zu beobachten, der aber nur nach eintägiger Tabletteneinnahme signifikant war.

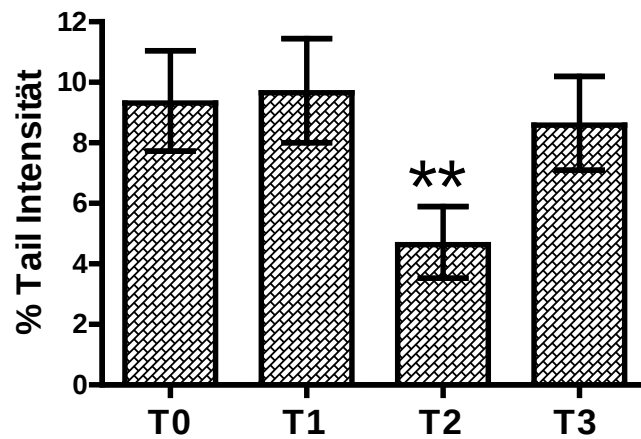


Abbildung 24: Beeinflussung der Bildung von oxidierten Purinen nach Einnahme des Isoflavonpräparats. Die Zellkerne wurden wie in Kapitel 3.6.4 mit den Enzymen behandelt. Dabei wurden diese nach einem zuvor durchgeführten Kalibrationsversuch in einer Konzentration von 1:1000 verwendet. Die Durchführung der Experimente erfolgte wie in der Legende von Abbildung 17 beschrieben. Pro Messpunkt wurden drei Objektträger ausgewertet und jeweils 50 Zellen gezählt. Die Balken stellen die Mittelwerte nach Abzug der Kontrollwerte (Buffer) dar. ** statistische Signifikanz: $p \leq 0,01$ (ANOVA-Test)

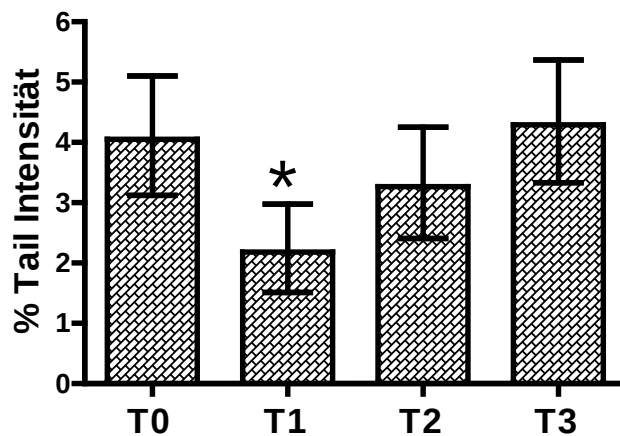


Abbildung 25: Beeinflussung der Bildung von oxidierten Pyrimidinen nach Einnahme des Isoflavonpräparats. Die Durchführung der Experimente erfolgte wie in der Legende von Abbildung 17 beschrieben. Die Balken stellen die Mittelwerte nach Abzug der Kontrollwerte (Buffer) dar. * statistische Signifikanz: $p \leq 0,05$ (ANOVA-Test)

4.2.2 Resultate mit dem Resveratrolpräparat

In Abbildung 26 sind die Ergebnisse der SCGE-Versuche unter Standardbedingungen dargestellt. Dabei kam es zu einem geringfügigen Anstieg der endogenen DNA-Migration nach einem (9%) und nach fünf Tagen (24%), der statistisch nicht signifikant war.

Die Resultate, die nach H_2O_2 -Behandlung der Zellen gefunden wurden, sind in Abbildung 27 dargestellt. Nach Einnahme des Präparats kam es zu einer geringfügig erhöhten Empfindlichkeit (15%) der Zellen gegenüber ROS-induzierter DNA-Schädigung; dieser Effekt war statistisch nicht signifikant.

Die mit den Restriktionsenzymen erhaltenen Ergebnisse sind in den Abbildungen 28 und 29 grafisch dargestellt. Bei den oxidierten Purinen (durch Formamidopyrimidinglycosylase bestimmt) kam es nach der Intervention zu einem Rückgang der DNA-Schäden (12% nach einem Tag und 16% nach fünf Tagen). Die durch die oxidierten Pyrimidine ausgelöste DNA-Migration (Endonuclease III) nahm nach eintägiger Einnahme geringfügig und nach fünf Tagen um 18% ab. Die Effekte waren mit beiden Enzymen nicht signifikant.

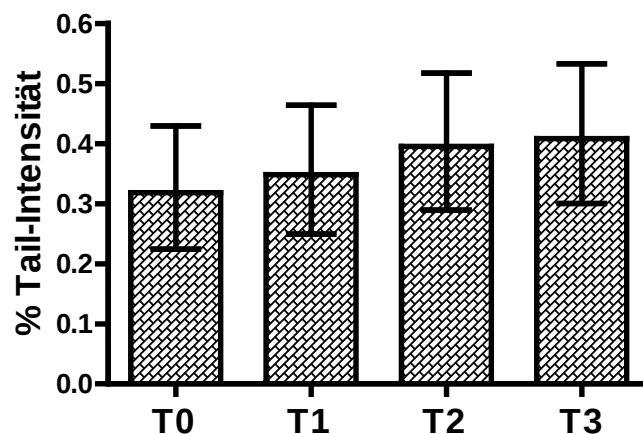


Abbildung 26: Auswirkung der Einnahme des Resveratrolpräparats auf die endogene DNA Migration in peripheren Lymphozyten. Die Probanden der Studie nahmen über einen Zeitraum von fünf Tagen jeweils drei Tabletten des Präparats ein. Vor der Intervention, nach einem Tag, nach fünf Tagen und nach einer zehntägigen „wash-out“-Phase wurde Blut abgenommen und die Zellen wie in Kapitel 3.3 beschrieben isoliert. Pro Zeitpunkt wurden drei Objektträger hergestellt und jeweils 50 Zellen ausgewertet. Die Balken zeigen die Mittelwerte und die Standardabweichungen.

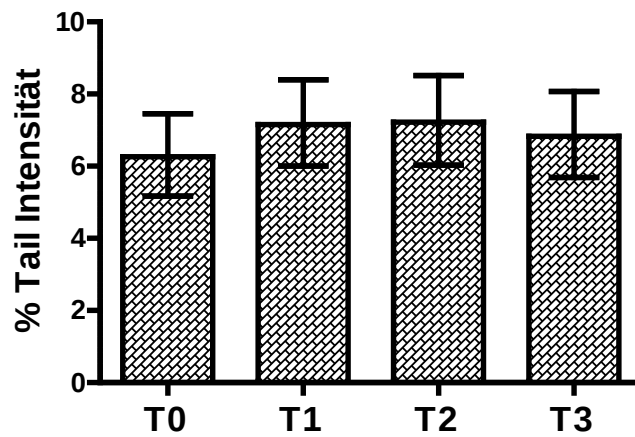


Abbildung 27: Auswirkung des Resveratrolpräparats auf H_2O_2 -induzierte DNA Migration in peripheren Lymphozyten. Die Lymphozyten wurden wie in Kapitel 3.6.3 für fünf Minuten mit $50\mu M$ H_2O_2 behandelt. Die weitere Durchführung der Experimente erfolgte wie in Legende von Abbildung 22 beschrieben. Die Balken zeigen die Mittelwerte und die Standardabweichungen.

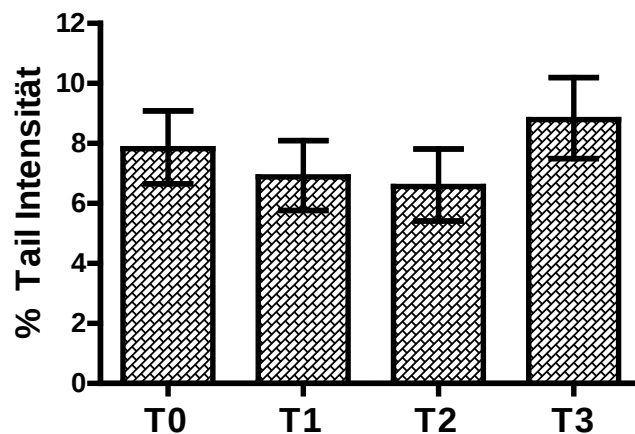


Abbildung 28: Beeinflussung der Bildung von oxidierten Purinen nach Einnahme des Resveratrolpräparat. Die Zellkerne wurden wie in Kapitel 3.6.4 beschrieben mit FPG oder dem entsprechenden Enzymbuffer inkubiert, die Durchführung der Experimente erfolgte wie in der Legende von Abbildung 17 beschrieben. Pro Messpunkt wurden drei Objektträger ausgewertet und jeweils 50 Zellen gezählt. Die Balken stellen die Mittelwerte nach Abzug der Kontrollwerte (Buffer) dar.

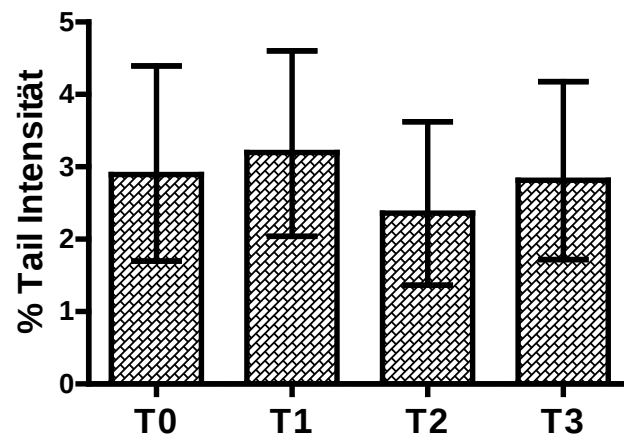


Abbildung 29: Beeinflussung der Bildung von oxidierten Pyrimidine durch nach Einnahme des Resveratrolpräparat. Die Zellkerne wurden mit ENDO III oder dem entsprechenden Enzympuffer inkubiert, die Durchführung der Experimente erfolgte wie in der Legende von Abbildung 17 beschrieben. Die Balken stellen die Mittelwerte nach Abzug der Kontrollwerte (Buffer) dar.

4.3 Ergebnisse der biochemischen Analysen

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Messungen der LDL-Oxidation, der totalen antioxidativen Kapazität und des C-reaktiven Proteins beschrieben. Kapitel 4.3.1 zeigt die Resultate, die nach Einnahme des Isoflavonpräparats erhalten wurden, in Kapitel 4.3.2 werden die Auswirkungen des Resveratrolpräparats auf die biochemischen Parameter beschrieben.

4.3.1 Resultate mit dem Isoflavonpräparat

In Abbildung 30a sind die Ergebnisse der Messung der LDL-Oxidation im Plasma dargestellt. Nach eintägiger Einnahme des Präparats kam es zu einem geringfügigen Anstieg des oxidierten LDLs, der jedoch statistisch nicht signifikant war. Die Resultate der Messung der totalen antioxidativen Kapazität sind in Abbildung 30b grafisch dargestellt. Während und nach der Intervention konnten keine signifikanten Änderungen detektiert werden. Bei der Messung des C-reaktiven Proteins kam es an keinem der Zeitpunkte zu einer Veränderung der Plasmakonzentrationen (Abbildung 30c).

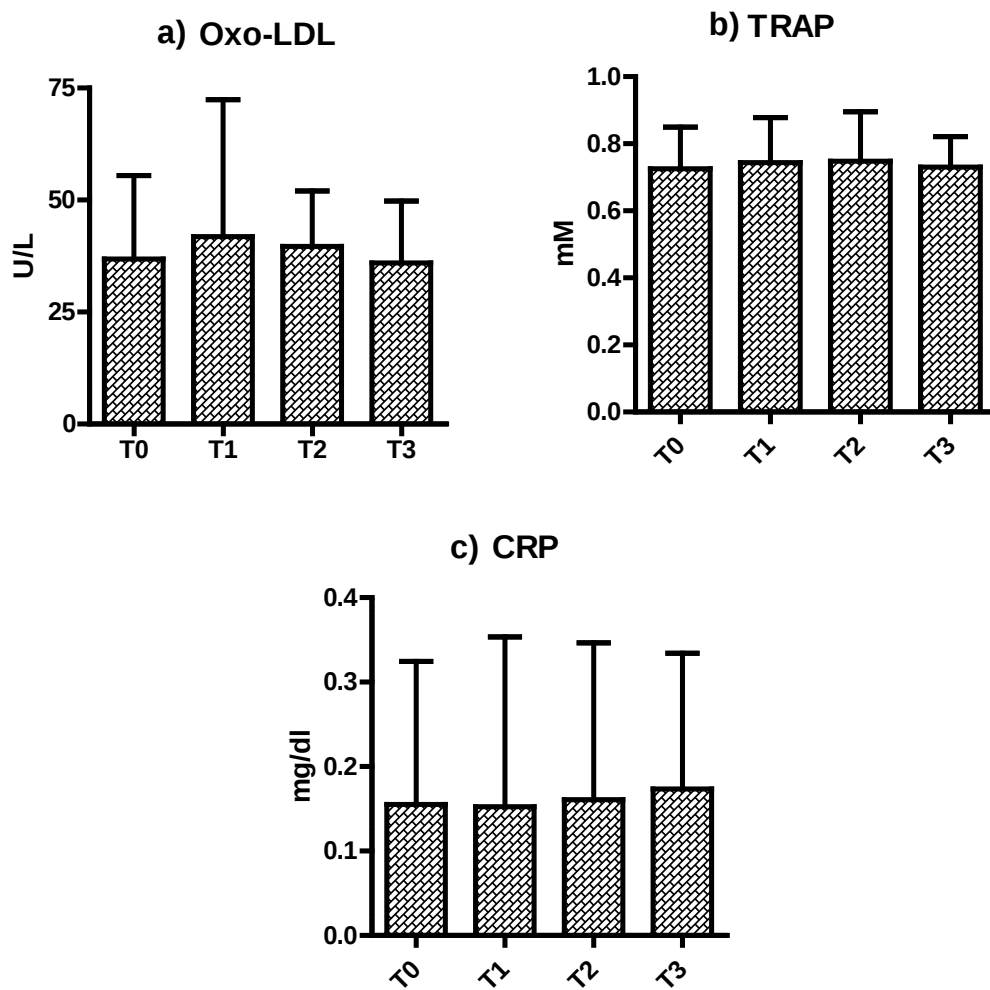


Abbildung 30: Auswirkung der Einnahme des Isoflavonpräparats auf die Oxidation von LDL (a), auf die totale antioxidative Kapazität (b) und auf die CRP-Konzentration (c). Die Balken zeigen die Mittelwerte und die Standardabweichungen. Die Daten wurden mittels unabhängigen t-Test statistisch ausgewertet.

4.3.2 Resultate mit dem Resveratrolpräparat

Abbildung 31a zeigt die Ergebnisse der Beeinflussung der LDL-Oxidation im Plasma. Weder nach eintägiger noch nach fünftägiger Einnahme des Präparats kam es zu einer Änderung dieses Parameters. Die Resultate der Messung der totalen antioxidativen Kapazität sind in Abbildung 31b grafisch dargestellt. Während und nach der Intervention wurden keine signifikanten Änderungen detektiert. Bei der Messung des C-reaktiven Proteins ergab sich nach eintägiger Einnahme des Nahrungsergänzungsmittels eine geringfügige Erhöhung der Konzentration, die aber statistisch nicht signifikant war (Abbildung 31c).

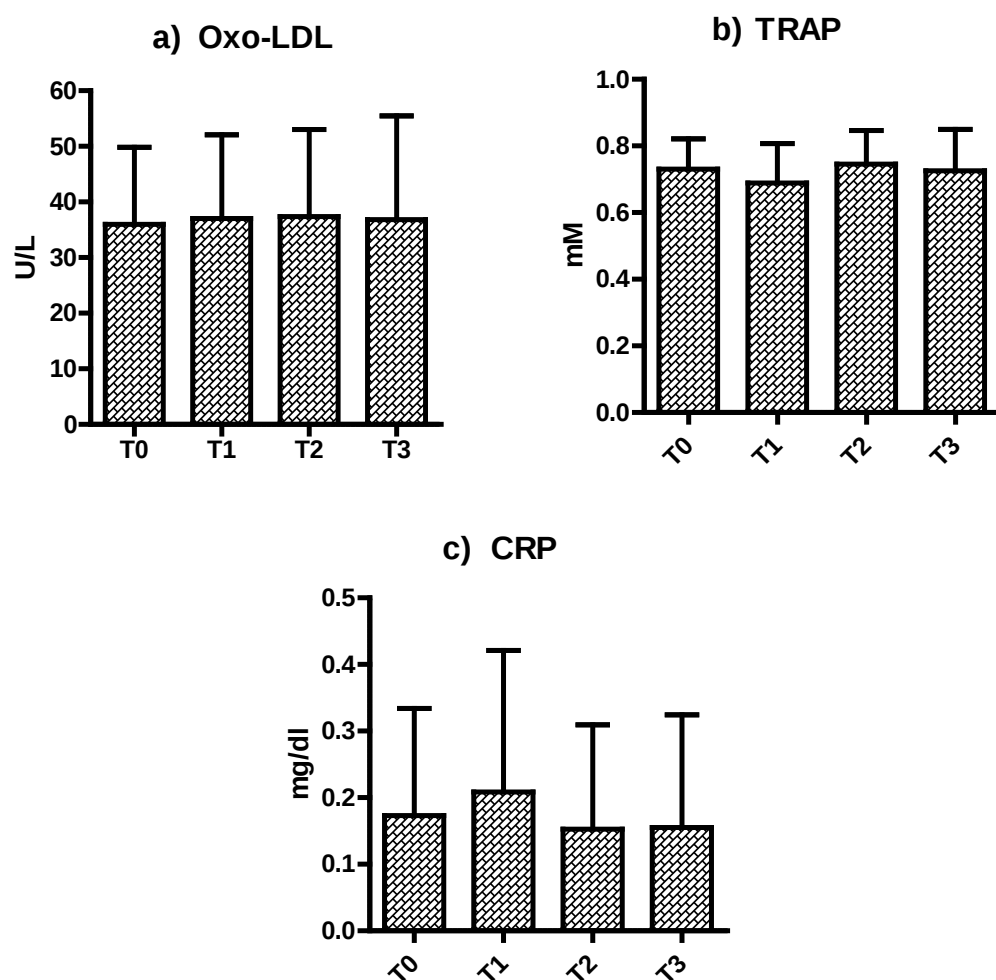


Abbildung 31: Auswirkung der Einnahme des Resveratrolpräparats auf die Oxidation von LDL (a), auf die totale antioxidative Kapazität (b) und auf die CRP-Konzentration (c). Die Balken zeigen die Mittelwerte und die Standardabweichungen. Die Daten wurden mittels unabhängigen t-Test statistisch ausgewertet.

5 Diskussion

Dieses Kapitel besteht aus zwei Hauptteilen. Der erste betrifft die Wirkungen des isoflavonhaltigen Nahrungsergänzungsmittels, der zweite die des Resveratrolpräparats. In den entsprechenden Unterkapiteln werden die Ergebnisse der *in vitro* Experimente und der Humanstudien hinsichtlich der Beeinflussung der DNA-Stabilität durch die beiden Nahrungsergänzungsmitteln diskutiert. Die letzten Abschnitte beinhalten die Analyse der biochemischen Parameter und die möglichen Effekte weiterer Bestandteile der beiden Präparate.

5.1 Schutz vor oxidativen DNA-Schäden durch das Isoflavonpräparat

Wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben, enthielt das Präparat Soja- und Rotkleeextrakte. Der Gesamtgehalt der Isoflavone betrug 90 mg pro Tablette. Das aus Sojapflanzen stammende Extrakt zeichnet sich durch einen hohen Gehalt von Genistein und Daidzein aus, während im Rotkleeextrakt Formononetin und Biochanin A dominieren. Die Isoflavonmenge, die von den Probanden eingenommen wurde (3 Tabletten/Tag), entspricht dem Verzehr von etwa 350 g gekochten Sojabohnen [168]. Zusätzlich enthielt das Präparat eine geringe Menge Nachtkerzenöl, das vor allem Omega-6-Fettsäuren wie Linolsäure und Gamma-Linolensäure enthält.

Aus früheren Experimenten ist bekannt, dass eine der wichtigsten Wirkungsweisen der in den Extrakten enthaltenen Phytoöstrogene die rezeptorvermittelte Interaktion mit dem Östrogenhaushalt ist (siehe Kapitel 2.1.3.1, Seite 7) [3]. Darüber hinaus wurden (wie in Kapitel 2.1.3.2 beschrieben) mit Genistein, Daidzein und Equol antioxidative Effekte gefunden, allerdings ist die Evidenz für die Inaktivierung freier Sauerstoffradikale derzeit vorwiegend auf Resultate beschränkt, die unter *in vitro* Bedingungen detektiert wurden.

5.1.1 Ergebnisse der *in vitro* Experimente

Die in den Abbildungen 14-17 (Seiten 56-58) beschriebenen Ergebnisse der *in vitro* Experimente mit dem Isoflavonpräparat zeigen deutlich, dass die Behandlung der Zellen mit den Phytoöstrogenen zu Schutzwirkungen vor endogen zugesetzten freien Sauerstoffradikalen führt. Außerdem wurde eine Reduktion der Bildung oxidierten Purine und Pyrimidine in peripheren Lymphozyten beobachtet. Der U-förmige Verlauf der Kurven kann durch die Tatsache erklärt werden, dass das Präparat per se bei höheren Konzentrationen DNA-Schäden auslöst. Dosierungen $\geq 110 \mu\text{g/ml}$ führten zu einem signifikanten Anstieg der DNA-Migration unter Standardbedingungen. Auch mit anderen antioxidativ wirkenden Verbindungen, beispielsweise mit Quercetin [175], Vitamin C [176] und Carotinoiden [177], wurden in *in vitro* Experimenten bei unphysiologisch hohen Dosierungen die Auslösung von DNA-Schäden beobachtet, die auf Freisetzung von Radikalen (Haber-Weiss-Fenton-Reaktion) zurückzuführen sind.

Diese Ergebnisse stimmen mit den Resultaten früherer *in vitro* Experimente überein, die mit den einzelnen Inhaltsstoffen des Präparats durchgeführt wurden. In diesen Untersuchungen wurden humane Lymphozyten und verschiedene Zelllinien mit Genistein, Daidzein oder Equol behandelt und Schutzeffekte gegenüber Wasserstoffperoxid-induzierter DNA-Schädigung gefunden. Bei den Versuchen mit Lymphozyten lagen die Konzentrationen der Isoflavone zwischen 2,54 und 635 ng/ml bei Genistein und Daidzein und zwischen 2,42 ng und 27 $\mu\text{g/ml}$ bei Equol (siehe Tabelle 2, Seite 11. Diese Dosierungen waren größtenteils niedriger als die in den vorliegenden Experimenten eingesetzten Mengen der Phytoöstrogene, die in den H_2O_2 -Versuchen zwischen 2,3 und 18 $\mu\text{g/ml}$ lagen. Da aber in dieser Untersuchung keine Reinsubstanzen, sondern ein Gemisch aus verschiedenen Isoflavonen verwendet wurde, ist es schwierig die Ergebnisse mit den Befunden der früheren Experimente zu vergleichen.

5.1.2 Ergebnisse der Humanstudie

In der Humanstudie wurde keine Beeinflussung der DNA-Migration unter Standardbedingungen gefunden, allerdings kam es zu einem signifikanten Rückgang der Empfindlichkeit gegenüber ROS-induzierter DNA-Schädigung. Auch die Bildung oxidierten Purine und Pyrimidine war nach Einnahme des Isoflavonpräparats reduziert.

Diese Resultate stimmen teilweise mit den Ergebnissen einer Studie überein, die von Mitchell et al. [53] durchgeführt wurde. In dieser konsumierten die Teilnehmer über einen Zeitraum von vier Wochen täglich einen Liter Soja-, Reis- oder Kuhmilch. Wie in der vorliegenden Untersuchung kam es zu einer Abnahme der oxidierten Pyrimidine. Da der Rückgang nur nach Konsum der Sojamilch zu sehen war, ist anzunehmen, dass der Effekt auf Isoflavone und/oder andere Sojainhaltsstoffe zurückzuführen ist. Im Gegensatz zum Isoflavonpräparat hatte keine der drei Milchsorten Einfluss auf ROS-induzierte DNA-Schädigung. Der Isoflavongehalt der Getränke wurde in dieser Studie nicht ermittelt, je nach Sorte enthält ein Liter Sojamilch ca. 100 mg der Phytoöstrogene. Diese Menge ist wesentlich geringer als die Dosierung, die in der vorliegenden Untersuchung von den Probanden konsumiert wurde. Die protektive Wirkung vor Wasserstoffperoxid lässt sich möglicherweise auf die höhere Menge an Phytoöstrogenen zurückführen.

Weder in der Sojamilchstudie, noch in einer weiteren Untersuchung mit einem isoflavonhaltigen Nahrungsergänzungsmittel [54] wurde ein Rückgang der DNA-Schädigung unter Standardbedingungen gefunden. Diese Ergebnisse stimmen mit den Resultaten der vorliegenden Interventionsstudie überein, in der ebenfalls kein signifikanter Einfluss auf die DNA-Migration festgestellt wurde.

Im Gegensatz zu den Humanstudien wurde in Experimenten mit Ratten nach einmonatiger Verabreichung eines isoflavonhaltigen Sojapulvers ein Rückgang der Strangbrüche beobachtet [47]. In dieser Untersuchung wurde den Tieren eine sojahältige Diät verabreicht, die 3,12 g Isoflavone/kg enthielt. Umgerechnet auf den Menschen würde das etwa dem täglichen Konsum von 11 g der Phytoöstrogene entsprechen [178]. Diese Dosis ist um ein Vielfaches höher als die in den früheren Humanstudien (50-100 mg/Tag) und der vorliegenden Untersuchung (270 mg/Tag) von den Teilnehmern konsumierten Mengen. Die protektive Wirkung in den Tierexperimenten ist daher wahrscheinlich durch die höhere Dosierung der Isoflavone erklärbar.

5.1.3 Beeinflussung biochemischer Redoxparameter

In der vorliegenden Untersuchung kam es bei keinem der untersuchten Zeitpunkte zu einer signifikanten Änderung der biochemischen Parameter. Diese Ergebnisse stimmen teilweise mit den Resultaten anderer Studien überein, in denen ebenfalls keine Beeinflussung des Redoxstatus durch den Konsum isoflavonhaltiger Nahrungsmittel festgestellt wurde. Beispielsweise konnten weder Samman et al. [60] noch Vega-Lopez et al. [61] in humanen Interventionsstudien einen Rückgang der Konzentrationen von oxidiertem LDL durch die Aufnahme von Phytoöstrogenen beobachten. In der ersten Untersuchung nahmen die Probanden über einen Zeitraum von zwei Monaten zweimal täglich ein Präparat ein, das 43 mg Isoflavone enthielt, in der zweiten konsumierten die Teilnehmer 42 Tage eine isoflavonhaltige Diät (50 mg Isoflavone/1000 kcal). Auch die Parameter der Lipidperoxidation (MDA, F2-Isoprostane) wurden durch die Nahrungssupplementation nicht verändert [61-63].

In drei weiteren Untersuchungen wurde hingegen eine Reduktion dieser Marker gefunden [57-59]. Allerdings wurden den Probanden in diesen Studien sojähaltige Produkte verabreicht, die neben Isoflavonen auch andere bioaktive Substanzen enthielten, daher ist es fraglich, ob die protektiven Wirkungen tatsächlich auf die Phytoöstrogene zurückzuführen sind.

Wiseman et al. [59] fanden nach Konsum von Sojaburgern eine deutliche Verminderung der Ausscheidung von F2-Isoprostanen im Harn, allerdings war die täglich aufgenommene Isoflavonmenge gering (21,2 mg Daidzein und 34,8 mg Genistein). Es ist daher auch in diesem Fall möglich, dass andere Nahrungsinhaltsstoffe für den Rückgang der Lipidperoxidation verantwortlich waren. Neben Isoflavonen enthalten Sojabohnen auch Protease-Inhibitoren, Flavonoide und Saponine sowie einen hohen Ballaststoffanteil [2]. Es ist nicht auszuschließen, dass diese Substanzgruppen für die Schutzeffekte, die in den verschiedenen Humanstudien beobachtet wurden, verantwortlich waren.

In einer Studie von Nikander et al. [179] wurde nach dreimonatiger Einnahme von Isoflavontabletten (114 mg/Person/Tag) kein Einfluss auf die Konzentration von C-reaktivem Protein im Plasma der Probanden detektiert. Diese Resultate stimmen mit denen der vorliegenden Humanstudie überein, in der es, trotz höherer Dosierung (270 mg/Tag), ebenfalls zu keinen Veränderungen dieses Entzündungsparameters kam.

5.1.4 Wirkungen des Nachtkerzenöls

Das im Isoflavonpräparat enthaltene Nachtkerzenöl wird aus den Samen der gemeinen Nachtkerze (*Oenothera biennis*) gewonnen und zur symptomatischen Behandlung von Neurodermitis und rheumatoider Arthritis verwendet. Des weiteren kann das Öl prämenstruelle und Wechseljahrbeschwerden lindern und wird zunehmend auch in Bezug auf therapeutische Effekte bei anderen Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Krebs, Asthma und Schizophrenie untersucht. Die biologischen Wirkungen des Öls werden den Omega-6-Fettsäuren zugeschrieben, die die Funktion von Immunzellen und die Eicosanoidsynthese beeinflussen und dadurch in Entzündungsprozesse eingreifen können [180].

De La Cruz et al. [181] untersuchten die antioxidativen Effekte von Nachtkerzenöl in Experimenten mit Kaninchen. Nach sechswöchiger Verabreichung kam es zu einem deutlichen Rückgang der TBARS-Konzentrationen, einem Marker für Lipidperoxidation, in Leber, Gehirn, Herz, Aorta und Thrombozyten und zu einer Erhöhung der Aktivität der Enzyme Glutathionreduktase und -transferase. Die Nahrung der Tiere wurde in diesem Experiment mit 15% Nachtkerzenöl angereichert. Umgerechnet auf den Menschen würde diese Menge einer Dosierung von ca. 600 g pro Tag entsprechen [182]. In der vorliegenden Untersuchung konsumierten die Probanden hingegen täglich lediglich 270 mg des Öls, daher ist es unwahrscheinlich, dass die Schutzeffekte des Isoflavonpräparats auf das Nachtkerzenöl zurückzuführen sind.

5.2 Schutz vor oxidativen DNA-Schäden durch das Resveratrolpräparat

Wie bereits im Kapitel 2.2.1 erwähnt, wurde in zahlreichen Studien postuliert, dass Resveratrol für das „French Paradox“ verantwortlich ist und protektive Effekte vor Herz-Kreislauf- und Krebserkrankungen mit der Aufnahme des Polyphenols in Zusammenhang stehen [115].

Diese Hypothese wurde durch Befunde erhärtet, die zeigten, dass Resveratrol antioxidative Eigenschaften besitzt. Es ist bekannt, dass oxidative Veränderungen von Makromolekülen, insbesondere von Low Density Lipoproteinen (LDL), für die Auslösung von kardiovaskulären Erkrankungen mitverantwortlich sind [146]. Da die Auslösung von Mutationen in Onkogenen das Auftreten von malignen Erkrankungen begünstigen kann, spielen oxidative Schäden der Erbsubstanz auch bei der Krebsentstehung eine zentrale Rolle [183]. Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass Resveratrol Apoptose induziert und andere Prozesse, die mit der Entwicklung von Tumoren in Zusammenhang stehen, beispielsweise die DNA-Synthese und die Zellteilung, beeinflusst [93]. Inwieweit diese molekularen Mechanismen mit antioxidativen Eigenschaften in Zusammenhang gebracht werden können, ist nicht klar. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, könnten neben dem Schutz vor oxidativen DNA-Schäden auch andere Mechanismen für die gesundheitlichen Effekte von Resveratrol verantwortlich sein. Kapitel 2.2.3 gibt eine Übersicht über die diversen biologischen Wirkungen des Polyphenols.

5.2.1 Ergebnisse der *in vitro* Experimente

Wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben, war in den *in vitro* Versuchen mit peripheren Lymphozyten ein deutlicher Schutzeffekt nachweisbar. Bei allen verwendeten Konzentrationen nahm das Ausmaß der Bildung oxidierten Purine zwischen 62% und 67% ab, bei den oxidierten Pyrimidinen waren die Effekte geringer und erreichten keine Signifikanz. Auch in den Experimenten mit Wasserstoffperoxid wurde eine deutliche Schutzwirkung gefunden. Am stärksten war die Inhibition der Kometbildung bei einer Konzentration von 38 µg/ml, bei der die DNA-Schädigung um 67% zurückging (Abb. 20, Seite 60).

Diese Befunde bestätigen die Ergebnisse früherer *in vitro* Untersuchungen, in denen ebenfalls Lymphozyten [118, 119] und verschiedene Säugerzelllinien [120, 121] mit Resveratrol behandelt wurden (siehe Tabelle 5, Seite 21). Die erforderlichen Substanzmengen waren in diesen Versuchen wesentlich höher und lagen zwischen 1,4 und 22,8 µg/ml. In den vorliegenden H₂O₂-Experimenten wurden niedrigere Resveratrolkonzentrationen (zwischen 0,2 und 0,8 µg/ml) eingesetzt. Da aber nicht die Reinsubstanz, sondern ein Substanzgemisch untersucht wurde, sind die Schutzeffekte möglicherweise auf die Wirkungen anderer Inhaltsstoffe und/oder auf synergistische Effekte zurückzuführen.

Auch mit anderen Komponenten des Präparats, beispielsweise mit Vitamin C [184] und Lycopin [185], wurden in *in vitro* Experimenten Schutzeffekte gegenüber H₂O₂ nachgewiesen, die Dosierung der Substanzen war in diesen Untersuchungen allerdings ebenfalls höher als in den mit dem Resveratrolpräparat durchgeführten Versuchen.

Der in der vorliegenden Arbeit gemessene Rückgang der Kometbildung führt nicht notwendigerweise zur Verhinderung der Auslösung vererbbarer Mutationen, da die Strangbrüche, die zur Kometbildung führen, durch Reparaturprozesse eliminiert werden können [160]. Im Fall von Resveratrol ist es jedoch bekannt, dass die Substanz unter *in vitro* Bedingungen auch die Auslösung von Kleinkernen verhindert, die durch numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen entstehen [186]. Beispielsweise wurde in Experimenten mit Mäusen nach Verabreichung von 100 mg Resveratrol/kg Körpergewicht in Knochenmarkszellen die Bildung von Chromosomenaberrationen, die durch Bestrahlung ausgelöst wurden, inhibiert [187]. Diese Effekte können als Konsequenz der Inhibition von oxidativ ausgelösten Primärschäden erklärt werden.

5.2.2 Ergebnisse der Humanstudie

Im Gegensatz zu den *in vitro* Ergebnissen ergab die vorliegende Humanstudie keine Hinweise auf Schutzeffekte vor oxidativen DNA-Schäden. Diese Beobachtung stimmt mit den Resultaten früherer Untersuchungen überein, in denen ebenfalls keine Schutzwirkungen von Resveratrol nachgewiesen wurden. Beispielsweise fanden Matsuoka et al. [188] nach sechsmonatiger Verabreichung des Polyphenols in

Tierexperimenten mit Mäusen keine Schutzeffekte vor Kaliumbromat-induzierten DNA-Schäden.

Wie erwähnt wurden auch einige Studien mit Rot- und Weißwein durchgeführt, wobei unklar ist, ob die Effekte durch Resveratrol oder durch andere Inhaltsstoffe ausgelöst wurden. In einer Untersuchung von Fenech et al. [129] wurden zwar Schutzwirkungen vor radikalinduzierter Kleinkernentstehung in Lymphozyten nach Rotweinkonsum gefunden, allerdings traten ähnliche Effekte auch nach Konsum von Weißwein auf, der wesentlich niedrigere Konzentrationen an Resveratrol enthält.

Die vorliegenden Befunde deuten darauf hin, dass der Konsum von Resveratrol unter Normalbedingungen zu keinen Schutzeffekten führt und machen es fraglich, ob die dem Polyphenol zugeschriebenen antioxidativen Eigenschaften für die positiven Gesundheitseffekte, die in epidemiologischen Untersuchungen gefundenen und auf den Konsum von Rotwein zurückgeführt wurden, verantwortlich sind. Wie erwähnt gibt es eine Reihe anderer Mechanismen, die ebenfalls eine Rolle spielen könnten.

Betrachtet man die Verstoffwechselung von Resveratrol, so zeigt sich, dass die Verbindung im Körper des Menschen sehr schnell in Glucuronid- und Sulfat-Konjugate und in weitere Stoffwechselprodukte wie Piceatannol umgewandelt wird, sodass die Ausgangssubstanz bereits nach kurzer Zeit aus dem Serum verschwindet (siehe Kapitel 2.2.2, Seite 21) [189, 190]. Die biologischen Wirkungen der Stoffwechselprodukte sind von der Anzahl und Position der Hydroxylgruppen und Doppelbindungen und der Isomerie der Moleküle abhängig. *Trans*-Stilben mit einer 4'-Hydroxygruppe weist beispielsweise höhere chemopräventive Effekte auf als Resveratrol [121]. Aktuelle *in vitro* Untersuchungen zeigen, dass Piceatannol die Transkription von *Nrf2* beeinflusst und die Expression zahlreicher anderer Gene auslöst, die für antioxidativ wirksame Enzyme wie die Hämoxxygenase-1 kodieren [191]. Des Weiteren inhibiert die Verbindung die Aktivierung von NF-κB und die Transkription von Cyclooxygenase-2, die beide mit der Auslösung von Entzündungsprozessen in Zusammenhang stehen [192].

Ovesna et al. [121] verglichen die antioxidative Wirkung von *trans*-Resveratrol, Piceatannol und 3,3',4,4',5,5'-Hexahydroxy-*trans*-Stilben in verschiedenen Zelllinien. Diese wurden mit H₂O₂ inkubiert und nachfolgend die DNA-Migration in SCGE-Tests bestimmt. Alle drei Substanzen verursachten einen Rückgang der DNA-Schädigung; die

Schutzeffekte waren mit Piceatannol und 3,3',4,4',5,5'-Hexahydroxy-*trans*-Stilben stärker als mit *trans*-Resveratrol. Auch andere Untersuchungen zeigten, dass die antioxidativen Effekte von Piceatannol stärker sind, als jene von Resveratrol. Beispielsweise wurde nach Behandlung von Tumorzellen mit den beiden Substanzen durch Piceatannol mehr freie Radikale gebunden und eine stärkere Wachstumshemmung beobachtet [193]. Allerdings sind auch diese Befunde auf *in vitro* Experimente beschränkt, sodass sie nicht direkt auf den Menschen übertragen werden können.

5.2.3 Beeinflussung biochemischer Redoxparameter

Wie in Abbildung 31 in Kapitel 4.3.2 (Seite 69) dargestellt, wurden die diversen biochemischen Parameter nach Einnahme des Resveratrolpräparats nicht maßgeblich beeinflusst. In einer früheren Interventionsstudie fand man jedoch nach Konsum von Rot- und Weißwein eine signifikante Erhöhung der antioxidativen Kapazität im Plasma. Da der Anstieg durch Weißwein geringer war, ist es wahrscheinlich, dass die in Rotwein in höheren Mengen vorkommenden Polyphenole für die Effekte verantwortlich sind [130]. Auch in einer Studie mit einem Konzentrat aus rotem Traubensaft fand man nach einer Woche eine signifikante Erhöhung der antioxidativen Kapazität im Serum und einen Rückgang der Oxo-LDL-Konzentration im Plasma [131].

Fuhrman et al. [133] stellten nach zweiwöchigem Konsum von 400 ml Rotwein ebenfalls eine Abnahme der LDL-Oxidation fest, während die gleiche Menge Weißwein keinen Einfluss auf diesen Parameter hatte. Diese Ergebnisse stimmen nicht mit einer nachfolgend durchgeführten Studie überein, in der die Teilnehmer ähnliche Mengen an Rot- und Weißwein über einen Zeitraum von vier Wochen zu sich nahmen, aber keine Veränderung der Oxidation von LDL beobachtet wurde [135].

In einer aktuelleren Publikation, in der die Probanden entweder getrocknete Weintrauben oder deren Schalen konsumierten, wurde ebenfalls eine Reduktion der LDL-Oxidation festgestellt [134]. Da Resveratrol im Fruchtfleisch nicht enthalten ist und der Schutzeffekt nach dem Konsum der Traubenschale nicht stärker war als in der Untersuchung mit ganzen Früchten, ist anzunehmen, dass das Polyphenol nicht oder bestenfalls nur teilweise für die Effekte verantwortlich ist.

Zern et al. [136] fanden nach vierwöchiger Einnahme eines polyphenolreichen Pulvers, das aus Weintrauben hergestellt wurde, eine reduzierte Ausscheidung von F2-Isoprostanen im Harn. Allerdings enthielt das Präparat neben Resveratrol auch weitere Flavonoide wie Quercetin und Kaempferol, die ebenfalls für die Effekte verantwortlich sein könnten. Des weiteren war die tägliche Aufnahme der Verbindung mit 58 µg/pro Person um ein Vielfaches geringer als die in der vorliegenden Untersuchung verwendete Dosis (6 mg/P/T).

In allen bisherigen Humanstudien, in denen man antioxidative Parameter untersuchte, konsumierten die Probanden resveratrolhaltige Getränke und Nahrungsmittel wie Weintrauben oder Pistazien, es wurden jedoch bisher keine Untersuchungen mit der Reinsubstanz publiziert. Nur in drei der erwähnten Studien wurde der Resveratrolgehalt mit chemisch analytischen Verfahren ermittelt. Die täglichen Aufnahmemengen lagen in diesen Untersuchungen zwischen 58 µg und 3,6 mg pro Person. Da aber eine Vielzahl anderer bioaktiver Inhaltsstoffe in den untersuchten Getränken und Nahrungsmitteln enthalten sind, ist es nicht möglich die Schutzeffekte ausschließlich dem Resveratrol zuschreiben.

5.2.4 Wirkungsweise weiterer Bestandteile des Präparats

Wie in Kapitel 3.1.1 erwähnt enthielt das Nahrungsergänzungsmittel neben reinem Resveratrol und phenolreichem Traubenextrakt in geringen Mengen auch Polyphenole aus Olivenöl, Flavonoide aus Zitrusfrüchten, Lycopin und Vitamin C (siehe Tabelle 10, Seite 43). Über die letzten beiden Substanzen liegen bereits Ergebnisse aus Interventionsstudien vor, in denen die oxidative Schädigung von DNA-Basen beim Menschen untersucht wurde.

In Untersuchungen von Anderson et al. [194] und Mastaloudis et al. [195], in denen 60, 1000 oder 6000 mg Vitamin C pro Tag verabreicht wurden, waren keine Effekte feststellbar. Auch einmalige Gabe von 500 mg des Vitamins pro Person hatten keine Auswirkung auf die DNA-Stabilität [196]. Allerdings kam es in anderen Komet-Studien nach Einnahme von 250 mg und 1000 mg Vitamin C in peripheren Lymphozyten zu deutlichen Schutzeffekten gegenüber H₂O₂-induzierter DNA-Schädigung [197, 198]. In der vorliegenden Untersuchung nahmen die Probanden eine Dosis von 300 mg/Tag zu sich, es konnte jedoch kein Einfluss auf die DNA-Migration

festgestellt werden. Die protektiven Wirkungen, die in den früheren Studien gefunden wurden, sind möglicherweise durch die längere Einnahmezeit (42 Tage bzw. zwölf Wochen) erklärbar.

Mit Lycopin wurden in einer Reihe von Untersuchungen Hinweise auf Schutzeffekte gefunden [199-202], allerdings wurden die meisten Studien mit Tomaten oder daraus hergestellten Produkten durchgeführt, die zwischen 6 und 16,5 mg des Carotinoids enthielten. In einer Untersuchung mit reinem Lycopin (12 mg/Tag) konnten Zhao et al. [203] nach 57 Tagen in SCGE-Experimenten mit Lymphozyten einen Rückgang der endogenen DNA-Schäden unter Standardbedingungen nachweisen, es wurden aber keine protektive Wirkung gegenüber H_2O_2 beobachtet. Die in der vorliegenden Studie von den Probanden aufgenommene Tagesdosis lag mit 9 mg pro Teilnehmer im Bereich der früheren Untersuchungen.

Salvini et al. [204] beobachteten nach achtwöchiger Einnahme von 50 mg Olivenöl/Tag in Komet Assays eine signifikante Abnahme der DNA-Schädigung in Lymphozyten, die mit polyphenolreichem Öl ausgeprägter war. In einer späteren Untersuchung, in der die Probanden verschiedene Olivenöle mit unterschiedlichen Polyphenolgehalten konsumierten, wurde darüber hinaus ein Rückgang der 8oxodG-Konzentrationen im Urin nachgewiesen. Da dieser Effekt aber unabhängig vom verabreichten Öl auftrat, schloss man daraus, dass die Polyphenole nicht für die Schutzwirkungen verantwortlich waren [205].

6 Zusammenfassung

Isoflavone und Resveratrol sind pflanzliche Phenole, die in der menschlichen Nahrung vorkommen und denen positive gesundheitliche Effekte wie Schutz vor Krebs und Herz-Kreislauferkrankungen zugeschrieben werden.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es festzustellen, ob der Konsum von zwei kommerziell vermarkteten Nahrungsergänzungsmitteln, die entweder Resveratrol oder Isoflavone enthalten, den Menschen vor DNA-Schäden schützt und zur Verbesserung des Redox-Gleichgewichts beiträgt. Ergebnisse früherer *in vitro* Experimente und tierexperimenteller Studien legen diese Vermutung nahe.

Die Inhaltsstoffe der beiden Nahrungsergänzungsmittel wurden *in vitro* in Einzelzellgelelektrophoresetests (SCGE-Assays) mit Lymphozyten untersucht. Anschließend wurden zwei Interventionsstudien mit jeweils 12 Probanden durchgeführt. Nach einer „run-in“-Phase konsumierten die Teilnehmer das Isoflavonpräparat, das Soja- und Rotkleeextrakte enthielt (270 mg Isoflavone/P/T), bzw. das Resveratrolpräparat (6 mg Resveratrol/P/T). Zu Beginn der Studie, sowie nach einem und fünf Tagen und nach einer zehntägigen „wash-out“-Phase wurden Blutproben abgenommen und das Ausmaß der DNA-Schädigung unter Standardbedingungen bestimmt. Diese Messungen ermöglichen Aussagen über Einzel- und Doppelstrangbrüche. Zusätzlich wurden Änderungen der Empfindlichkeit der Zellen gegenüber reaktiver Sauerstoffspezies, sowie der endogenen Bildung oxidierten Purine und Pyrimidine durch Einsatz von läsionsspezifischer Restriktionsenzyme (Formamidopyrimidinglycosylase, FPG und Endonuclease III, ENDO III) ermittelt. Weiters wurden eine Reihe biochemischer Parameter im Plasma bestimmt. Dazu zählten die Messung der gesamten antioxidativen Kapazität (TAC), die mit dem „TRAP“-Test erfasst wurde, sowie die Bestimmung der Konzentrationen von oxidiertem Low Density Lipoprotein und C-reaktivem Protein (einem Marker für Entzündungsprozesse).

In den *in vitro* Experimenten wurden mit beiden Präparaten Schutzeffekte vor oxidativen DNA-Schäden gefunden (Abnahme der Empfindlichkeit gegenüber ROS-induzierten DNA-Schäden und Reduktion der Bildung oxidierten DNA-Basen). In der humanen Interventionsstudie wurde mit dem Resveratrolpräparat kein Hinweis auf Schutz vor oxidativen und nicht-oxidativen Schäden der Erbsubstanz festgestellt, auch die biochemischen Parameter veränderten sich durch die Einnahme des Präparats nicht.

Im Gegensatz dazu wurde mit den Isoflavonen ein Rückgang der durch ROS induzierten DNA-Migration beobachtet (Abnahme der Kometbildung um 20%). Die endogene Bildung von FPG-empfindlichen Stellen (die auf Bildung oxidierter Purine zurückgeht) wurde ebenfalls signifikant (50%) reduziert, die diversen Redox-Parameter veränderten sich durch die Intervention nicht.

Die in der vorliegenden Untersuchung von den Teilnehmern konsumierten Isoflavon- und Resveratrolmengen können durch Verzehr von Lebensmitteln erreicht werden, die diese Phenole enthalten (z.B. von ein bis drei Litern Rotwein oder 350 g Sojabohnen pro Person pro Tag). Die Resultate der vorliegenden Untersuchung deuten darauf hin, dass eventuelle positive Gesundheitseffekte von resveratrolhaltigen Lebensmitteln nicht mit den antioxidativen Eigenschaften des Phenols in Zusammenhang stehen, während dies bei den Isoflavonen möglicherweise der Fall ist.

7 Summary

Isoflavones and resveratrol are plant derived phenolics which are found in human food and several positive health effects including protection against cancer and cardiovascular diseases have been attributed to their consumption. The aim of the current investigation was to find out if the intake of two commercially marketed dietary supplements which contain either isoflavones or resveratrol protect humans against DNA-damage and whether they cause an improvement of the redox status. The results of earlier *in vitro* experiments and animal studies support such an assumption.

Both supplements were tested under *in vitro* conditions in single cell gel electrophoresis assays with human lymphocytes. Subsequently, two human intervention trials with twelve participants were conducted. After a “run in”- phase the participants consumed either the isoflavone preparation which contains extracts of soy and red clover (total content 270 mg of isoflavones/person/day) or alternatively the resveratrol preparation which contains 6.0 mg of the phenol/person/day. Blood samples were collected at the beginning of the study, after one and five days of consumption and also after a ten days “wash out”-period and the extent of DNA damage was determined under standard conditions. These measurements provide information about single and double strand breaks. In addition, also changes of the sensitivity towards reactive oxygen species were determined by hydrogen peroxide treatment of the cells. Furthermore, the endogenous formation of oxidized purines and pyrimidines was detected by use of lesion specific restriction enzymes (FPG and endonuclease III). A number of biochemical parameters were determined in plasma, including the measurement of total antioxidant capacity (TAC) with the TRAP assay, oxidized low density lipoprotein and C-reactive protein (a marker of inflammation).

In the *in vitro* experiments protective effects against oxidative DNA damage were seen with both supplements, i.e. reduction of sensitivity against ROS-induced DNA damage and reduction of formation of oxidized DNA bases. In the human intervention trial, no indication of protection against oxidative and non-oxidative damage of the genetic material was found after the resveratrol consumption. Also the biochemical parameters were not altered after intake of the supplement. On the contrary, reduction of ROS-induced DNA-migration was observed with the isoflavones (reduction of comet formation by 20%), also the endogenous formation of FPG-

sensitive sites which is due to formation of oxidized purines was significantly reduced. None of the biochemical redox parameters was altered in the course of the study.

The amounts of isoflavones and resveratrol which were consumed by the participants can be achieved after intake of foods which contain these phenolics (for example one to three liters of red wine or 350 grams of soy beans). The results of the present study indicate that the presumptive positive health effects of resveratrol containing foods are not related to the antioxidant properties of this phenolic, while this may be the case for isoflavone-containing food.

8 Literaturverzeichnis

1. Knasmüller, S., et al., *Use of conventional and -omics based methods for health claims of dietary antioxidants: a critical overview*. Br J Nutr, 2008. 99 E Suppl 1: p. ES3-52.
2. Watzl, B. and C. Leitzmann, *Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln*. 1999, Stuttgart: Hippokrates Verlag GmbH. 254.
3. Pilsakova, L., I. Riečanský, and F. Jagla, *The physiological actions of isoflavone phytoestrogens*. Physiol Res, 2010.
4. Dixon, R.A. and D. Ferreira, *Genistein*. Phytochemistry, 2002. 60(3): p. 205-11.
5. Rolfe, B.G., *Flavones and isoflavones as inducing substances of legume nodulation*. Biofactors, 1988. 1(1): p. 3-10.
6. Cornwell, T., W. Cohick, and I. Raskin, *Dietary phytoestrogens and health*. Phytochemistry, 2004. 65(8): p. 995-1016.
7. Setchell, K.D., et al., *Dietary estrogens--a probable cause of infertility and liver disease in captive cheetahs*. Gastroenterology, 1987. 93(2): p. 225-33.
8. Messina, M., *A brief historical overview of the past two decades of soy and isoflavone research*. J Nutr, 2010. 140(7): p. 1350S-4S.
9. Kuhnle, G.G.C., et al., *Variability of phytoestrogen content in foods from different sources*. Food Chemistry, 2009. 113(4): p. 1184-1187.
10. Kuhnle, G.G.C., et al., *Phytoestrogen content of fruits and vegetables commonly consumed in the UK based on LC-MS and C-13-labelled standards*. Food Chemistry, 2009. 116(2): p. 542-554.
11. Kuhnle, G.G., et al., *Phytoestrogen content of cereals and cereal-based foods consumed in the UK*. Nutr Cancer, 2009. 61(3): p. 302-9.
12. Kuhnle, G.G., et al., *Phytoestrogen content of beverages, nuts, seeds, and oils*. J Agric Food Chem, 2008. 56(16): p. 7311-5.
13. Kuhnle, G.G., et al., *Phytoestrogen content of foods of animal origin: dairy products, eggs, meat, fish, and seafood*. J Agric Food Chem, 2008. 56(21): p. 10099-104.
14. Knasmüller, S., et al., *Chemoprevention of Cancer and DNA Damage by Dietary Factors*. 2009, Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH Co. KGaA.
15. Eisenbrand, G., *Isoflavones as phytoestrogens in food supplements and dietary foods for special medical purposes. Opinion of the Senate Commission on Food Safety (SKLM) of the German Research Foundation (DFG)-(shortened version)*. Mol Nutr Food Res, 2007. 51(10): p. 1305-12.
16. Sarkar, F.H. and Y. Li, *Mechanisms of cancer chemoprevention by soy isoflavone genistein*. Cancer Metastasis Rev, 2002. 21(3-4): p. 265-80.
17. Song, W.O., et al., *Soy isoflavones as safe functional ingredients*. J Med Food, 2007. 10(4): p. 571-80.
18. Sakai, T. and M. Kogiso, *Soy isoflavones and immunity*. J Med Invest, 2008. 55(3-4): p. 167-73.
19. Setchell, K.D. and A. Cassidy, *Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health*. J Nutr, 1999. 129(3): p. 758S-767S.
20. Yuan, J.P., J.H. Wang, and X. Liu, *Metabolism of dietary soy isoflavones to equol by human intestinal microflora--implications for health*. Mol Nutr Food Res, 2007. 51(7): p. 765-81.
21. Coldham, N.G., et al., *Comparative metabolism of genistin by human and rat gut microflora: detection and identification of the end-products of metabolism*. Xenobiotica, 2002. 32(1): p. 45-62.
22. Blair, R.M., et al., *Treatment with antibiotics reduces plasma equol concentration in cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis)*. J Nutr, 2003. 133(7): p. 2262-7.

23. Setchell, K.D., et al., *Isoflavone content of infant formulas and the metabolic fate of these phytoestrogens in early life*. Am J Clin Nutr, 1998. 68(6 Suppl): p. 1453S-1461S.
24. Setchell, K.D., et al., *Comparing the pharmacokinetics of daidzein and genistein with the use of ¹³C-labeled tracers in premenopausal women*. Am J Clin Nutr, 2003. 77(2): p. 411-9.
25. Decroos, K., et al., *Isolation and characterisation of an equol-producing mixed microbial culture from a human faecal sample and its activity under gastrointestinal conditions*. Arch Microbiol, 2005. 183(1): p. 45-55.
26. Zubik, L. and M. Meydani, *Bioavailability of soybean isoflavones from aglycone and glucoside forms in American women*. Am J Clin Nutr, 2003. 77(6): p. 1459-65.
27. McEwen, B.S., *Invited review: Estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms*. J Appl Physiol, 2001. 91(6): p. 2785-801.
28. Castelo-Branco, C. and M.J. Cancelo Hidalgo, *Isoflavones: effects on bone health*. Climacteric, 2010.
29. Kuiper, G.G., et al., *Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta*. Endocrinology, 1998. 139(10): p. 4252-63.
30. Martin, V.T. and M. Behbehani, *Ovarian hormones and migraine headache: understanding mechanisms and pathogenesis--part I*. Headache, 2006. 46(1): p. 3-23.
31. Bingham, S.A., et al., *Phyto-oestrogens: where are we now?* Br J Nutr, 1998. 79(5): p. 393-406.
32. Akiyama, T., et al., *Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases*. J Biol Chem, 1987. 262(12): p. 5592-5.
33. Li, Y., M. Bhuiyan, and F.H. Sarkar, *Induction of apoptosis and inhibition of c-erbB-2 in MDA-MB-435 cells by genistein*. Int J Oncol, 1999. 15(3): p. 525-33.
34. Li, Y., et al., *Induction of apoptosis in breast cancer cells MDA-MB-231 by genistein*. Oncogene, 1999. 18(20): p. 3166-72.
35. Tan, M., J. Yao, and D. Yu, *Overexpression of the c-erbB-2 gene enhanced intrinsic metastasis potential in human breast cancer cells without increasing their transformation abilities*. Cancer Res, 1997. 57(6): p. 1199-205.
36. Kim, H., T.G. Peterson, and S. Barnes, *Mechanisms of action of the soy isoflavone genistein: emerging role for its effects via transforming growth factor beta signaling pathways*. Am J Clin Nutr, 1998. 68(6 Suppl): p. 1418S-1425S.
37. Mitchell, J.H., et al., *Antioxidant efficacy of phytoestrogens in chemical and biological model systems*. Arch Biochem Biophys, 1998. 360(1): p. 142-8.
38. Hodgson, J.M., et al., *Soybean isoflavonoids and their metabolic products inhibit in vitro lipoprotein oxidation in serum*. Journal of Nutritional Biochemistry, 1996. 7(12): p. 664-669.
39. Kerry, N. and M. Abbey, *The isoflavone genistein inhibits copper and peroxy radical mediated low density lipoprotein oxidation in vitro*. Atherosclerosis, 1998. 140(2): p. 341-7.
40. Kapiotis, S., et al., *Genistein, the dietary-derived angiogenesis inhibitor, prevents LDL oxidation and protects endothelial cells from damage by atherogenic LDL*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. 17(11): p. 2868-74.
41. Foti, P., et al., *Comparison between daidzein and genistein antioxidant activity in primary and cancer lymphocytes*. Arch Biochem Biophys, 2005. 433(2): p. 421-7.
42. Sierens, J., et al., *Effect of phytoestrogen and antioxidant supplementation on oxidative DNA damage assessed using the comet assay*. Mutat Res, 2001. 485(2): p. 169-76.
43. Sierens, J., et al., *In vitro isoflavone supplementation reduces hydrogen peroxide-induced DNA damage in sperm*. Teratog Carcinog Mutagen, 2002. 22(3): p. 227-34.

44. Raschke, M., et al., *Genistein protects prostate cells against hydrogen peroxide-induced DNA damage and induces expression of genes involved in the defence against oxidative stress*. *Carcinogenesis*, 2006. 27(11): p. 2322-30.
45. Rucinska, A. and T. Gabryelak, *Effect of genistein-8-C-glucoside from *Lupinus luteus* on DNA damage assessed using the comet assay in vitro*. *Cell Biol Int*, 2009. 33(2): p. 247-52.
46. Rucinska, A., S. Kirko, and T. Gabryelak, *Effect of the phytoestrogen, genistein-8-C-glucoside, on Chinese hamster ovary cells in vitro*. *Cell Biol Int*, 2007. 31(11): p. 1371-8.
47. Park, E., et al., *Soy isoflavone supplementation alleviates oxidative stress and improves systolic blood pressure in male spontaneously hypertensive rats*. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 2005. 51(4): p. 254-9.
48. Cai, Q. and H. Wei, *Effect of dietary genistein on antioxidant enzyme activities in SENCAR mice*. *Nutr Cancer*, 1996. 25(1): p. 1-7.
49. Mu, H., et al., *Research on antioxidant effects and estrogenic effect of formononetin from *Trifolium pratense* (red clover)*. *Phytomedicine*, 2009. 16(4): p. 314-9.
50. Mahn, K., et al., *Dietary soy isoflavone induced increases in antioxidant and eNOS gene expression lead to improved endothelial function and reduced blood pressure in vivo*. *FASEB J*, 2005. 19(12): p. 1755-7.
51. Pugalendhi, P., et al., *Antigenotoxic effect of genistein against 7,12-dimethylbenz[a]anthracene induced genotoxicity in bone marrow cells of female Wistar rats*. *Pharmacol Rep*, 2009. 61(2): p. 296-303.
52. Khan, T.H., et al., *Soy isoflavones inhibits the genotoxicity of benzo(a)pyrene in Swiss albino mice*. *Hum Exp Toxicol*, 2005. 24(3): p. 149-55.
53. Mitchell, J.H. and A.R. Collins, *Effects of a soy milk supplement on plasma cholesterol levels and oxidative DNA damage in men--a pilot study*. *Eur J Nutr*, 1999. 38(3): p. 143-8.
54. Woodside, J.V., et al., *Short-term phytoestrogen supplementation alters insulin-like growth factor profile but not lipid or antioxidant status*. *J Nutr Biochem*, 2006. 17(3): p. 211-5.
55. Davis, J.N., et al., *Soy isoflavone supplementation in healthy men prevents NF-kappa B activation by TNF-alpha in blood lymphocytes*. *Free Radic Biol Med*, 2001. 30(11): p. 1293-302.
56. Djuric, Z., et al., *Effect of soy isoflavone supplementation on markers of oxidative stress in men and women*. *Cancer Lett*, 2001. 172(1): p. 1-6.
57. Tikkanen, M.J., et al., *Effect of soybean phytoestrogen intake on low density lipoprotein oxidation resistance*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(6): p. 3106-10.
58. Jenkins, D.J., et al., *Effect of soy protein foods on low-density lipoprotein oxidation and ex vivo sex hormone receptor activity--a controlled crossover trial*. *Metabolism*, 2000. 49(4): p. 537-43.
59. Wiseman, H., et al., *Isoflavone phytoestrogens consumed in soy decrease F(2)-isoprostane concentrations and increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans*. *Am J Clin Nutr*, 2000. 72(2): p. 395-400.
60. Samman, S., et al., *The effect of supplementation with isoflavones on plasma lipids and oxidisability of low density lipoprotein in premenopausal women*. *Atherosclerosis*, 1999. 147(2): p. 277-83.
61. Vega-Lopez, S., et al., *Plasma antioxidant capacity in response to diets high in soy or animal protein with or without isoflavones*. *Am J Clin Nutr*, 2005. 81(1): p. 43-9.
62. Campbell, M.J., et al., *Effect of red clover-derived isoflavone supplementation on insulin-like growth factor, lipid and antioxidant status in healthy female volunteers: a pilot study*. *Eur J Clin Nutr*, 2004. 58(1): p. 173-9.
63. Hodgson, J.M., et al., *Isoflavonoids do not inhibit in vivo lipid peroxidation in subjects with high-normal blood pressure*. *Atherosclerosis*, 1999. 145(1): p. 167-72.

64. Messina, M.J. and C.E. Wood, *Soy isoflavones, estrogen therapy, and breast cancer risk: analysis and commentary*. Nutr J, 2008. 7: p. 17.
65. Beaglehole, R., *International trends in coronary heart disease mortality, morbidity, and risk factors*. Epidemiol Rev, 1990. 12: p. 1-15.
66. Teede, H.J., et al., *Dietary soy has both beneficial and potentially adverse cardiovascular effects: a placebo-controlled study in men and postmenopausal women*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. 86(7): p. 3053-60.
67. Wangen, K.E., et al., *Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic and mildly hypercholesterolemic postmenopausal women*. Am J Clin Nutr, 2001. 73(2): p. 225-31.
68. Washburn, S., et al., *Effect of soy protein supplementation on serum lipoproteins, blood pressure, and menopausal symptoms in perimenopausal women*. Menopause, 1999. 6(1): p. 7-13.
69. Anderson, J.W., B.M. Johnstone, and M.E. Cook-Newell, *Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids*. N Engl J Med, 1995. 333(5): p. 276-82.
70. Ososki, A.L. and E.J. Kennelly, *Phytoestrogens: a review of the present state of research*. Phytother Res, 2003. 17(8): p. 845-69.
71. Shook, L.L., *An update on hormone replacement therapy: health and medicine for women: a multidisciplinary, evidence-based review of mid-life health concerns*. Yale J Biol Med, 2011. 84(1): p. 39-42.
72. Wuttke, W., et al., *Phytoestrogens for hormone replacement therapy?* J Steroid Biochem Mol Biol, 2002. 83(1-5): p. 133-47.
73. van de Weijer, P.H. and R. Barentsen, *Isoflavones from red clover (Promensil) significantly reduce menopausal hot flush symptoms compared with placebo*. Maturitas, 2002. 42(3): p. 187-93.
74. Evans, M., et al., *The effect of synthetic genistein on menopause symptom management in healthy postmenopausal women: a multi-center, randomized, placebo-controlled study*. Maturitas, 2011. 68(2): p. 189-96.
75. Ishimi, Y., *Soybean isoflavones in bone health*. Forum Nutr, 2009. 61: p. 104-16.
76. Breslau, N.A., et al., *Relationship of animal protein-rich diet to kidney stone formation and calcium metabolism*. J Clin Endocrinol Metab, 1988. 66(1): p. 140-6.
77. Arjmandi, B.H., et al., *Bone-sparing effect of soy protein in ovarian hormone-deficient rats is related to its isoflavone content*. Am J Clin Nutr, 1998. 68(6 Suppl): p. 1364S-1368S.
78. Alekel, D.L., et al., *Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women*. Am J Clin Nutr, 2000. 72(3): p. 844-52.
79. Harkness, L.S., et al., *Decreased bone resorption with soy isoflavone supplementation in postmenopausal women*. J Womens Health (Larchmt), 2004. 13(9): p. 1000-7.
80. Lydeking-Olsen, E., et al., *Soy milk or progesterone for prevention of bone loss--a 2 year randomized, placebo-controlled trial*. Eur J Nutr, 2004. 43(4): p. 246-57.
81. Newton, K.M., et al., *Soy protein and bone mineral density in older men and women: a randomized trial*. Maturitas, 2006. 55(3): p. 270-7.
82. Potter, S.M., et al., *Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women*. Am J Clin Nutr, 1998. 68(6 Suppl): p. 1375S-1379S.
83. Arjmandi, B.H., et al., *One year soy protein supplementation has positive effects on bone formation markers but not bone density in postmenopausal women*. Nutr J, 2005. 4: p. 8.
84. Scheiber, M.D., et al., *Dietary inclusion of whole soy foods results in significant reductions in clinical risk factors for osteoporosis and cardiovascular disease in normal postmenopausal women*. Menopause, 2001. 8(5): p. 384-92.

85. Uesugi, S., et al., *Effects of isoflavone supplements on bone metabolic markers and climacteric symptoms in Japanese women*. *Biofactors*, 2004. 22(1-4): p. 221-8.
86. Uesugi, T., et al., *Evidence of estrogenic effect by the three-month-intervention of isoflavone on vaginal maturation and bone metabolism in early postmenopausal women*. *Endocr J*, 2003. 50(5): p. 613-9.
87. Mori, M., et al., *Soy isoflavones improve bone metabolism in postmenopausal Japanese women*. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2004. 31 Suppl 2: p. S44-6.
88. Kreijkamp-Kaspers, S., et al., *Effect of soy protein containing isoflavones on cognitive function, bone mineral density, and plasma lipids in postmenopausal women: a randomized controlled trial*. *JAMA*, 2004. 292(1): p. 65-74.
89. Nagata, C., et al., *Soy product intake and serum isoflavonoid and estradiol concentrations in relation to bone mineral density in postmenopausal Japanese women*. *Osteoporos Int*, 2002. 13(3): p. 200-4.
90. Anderson, J.J., et al., *Soy isoflavones: no effects on bone mineral content and bone mineral density in healthy, menstruating young adult women after one year*. *J Am Coll Nutr*, 2002. 21(5): p. 388-93.
91. Baur, J.A. and D.A. Sinclair, *Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence*. *Nat Rev Drug Discov*, 2006. 5(6): p. 493-506.
92. Gusman, J., H. Malonne, and G. Atassi, *A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol*. *Carcinogenesis*, 2001. 22(8): p. 1111-7.
93. Harikumar, K.B. and B.B. Aggarwal, *Resveratrol: a multitargeted agent for age-associated chronic diseases*. *Cell Cycle*, 2008. 7(8): p. 1020-35.
94. Hao, H.D. and L.R. He, *Mechanisms of cardiovascular protection by resveratrol*. *J Med Food*, 2004. 7(3): p. 290-8.
95. Fremont, L., *Biological effects of resveratrol*. *Life Sci*, 2000. 66(8): p. 663-73.
96. Wang, Y., et al., *An LC-MS method for analyzing total resveratrol in grape juice, cranberry juice, and in wine*. *J Agric Food Chem*, 2002. 50(3): p. 431-5.
97. Burns, J., et al., *Plant foods and herbal sources of resveratrol*. *J Agric Food Chem*, 2002. 50(11): p. 3337-40.
98. Klinge, C.M., et al., *Estrogenic activity in white and red wine extracts*. *J Agric Food Chem*, 2003. 51(7): p. 1850-7.
99. Mukherjee, S., J.I. Dudley, and D.K. Das, *Dose-dependency of resveratrol in providing health benefits*. *Dose Response*, 2010. 8(4): p. 478-500.
100. Sanders, T.H., R.W. McMichael, Jr., and K.W. Hendrix, *Occurrence of resveratrol in edible peanuts*. *J Agric Food Chem*, 2000. 48(4): p. 1243-6.
101. Ibern-Gomez, M., et al., *Resveratrol and piceid levels in natural and blended peanut butters*. *J Agric Food Chem*, 2000. 48(12): p. 6352-4.
102. Vastano, B.C., et al., *Isolation and identification of stilbenes in two varieties of *Polygonum cuspidatum**. *J Agric Food Chem*, 2000. 48(2): p. 253-6.
103. Tokusoglu, O., M.K. Unal, and F. Yemis, *Determination of the phytoalexin resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) in peanuts and pistachios by high-performance liquid chromatographic diode array (HPLC-DAD) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)*. *J Agric Food Chem*, 2005. 53(12): p. 5003-9.
104. Lippi, G., et al., *Moderate red wine consumption and cardiovascular disease risk: beyond the "French paradox"*. *Semin Thromb Hemost*, 2010. 36(1): p. 59-70.
105. Jang, M., et al., *Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes*. *Science*, 1997. 275(5297): p. 218-20.
106. Kundu, J.K. and Y.J. Surh, *Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: mechanistic perspectives*. *Cancer Lett*, 2008. 269(2): p. 243-61.
107. Signorelli, P. and R. Ghidoni, *Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises*. *J Nutr Biochem*, 2005. 16(8): p. 449-66.

108. Asensi, M., et al., *Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability*. Free Radic Biol Med, 2002. 33(3): p. 387-98.
109. Soleas, G.J., et al., *Absorption of trans-resveratrol in rats*. Methods Enzymol, 2001. 335: p. 145-54.
110. Marier, J.F., et al., *Metabolism and disposition of resveratrol in rats: extent of absorption, glucuronidation, and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. 302(1): p. 369-73.
111. Miksits, M., et al., *Sulfation of resveratrol in human liver: evidence of a major role for the sulfotransferases SULT1A1 and SULT1E1*. Xenobiotica, 2005. 35(12): p. 1101-19.
112. Walle, T., et al., *High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans*. Drug Metab Dispos, 2004. 32(12): p. 1377-82.
113. Goldberg, D.M., J. Yan, and G.J. Soleas, *Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects*. Clin Biochem, 2003. 36(1): p. 79-87.
114. Szekeres, T., et al., *Resveratrol and resveratrol analogues--structure-activity relationship*. Pharm Res, 2010. 27(6): p. 1042-8.
115. Saiko, P., et al., *Resveratrol and its analogs: defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad?* Mutat Res, 2008. 658(1-2): p. 68-94.
116. Baur, J.A., et al., *Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet*. Nature, 2006. 444(7117): p. 337-42.
117. Li, Y., Z. Cao, and H. Zhu, *Upregulation of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes by the red wine polyphenol, resveratrol in cultured aortic smooth muscle cells leads to cytoprotection against oxidative and electrophilic stress*. Pharmacol Res, 2006. 53(1): p. 6-15.
118. Yen, G.C., P.D. Duh, and C.W. Lin, *Effects of resveratrol and 4-hexylresorcinol on hydrogen peroxide-induced oxidative DNA damage in human lymphocytes*. Free Radic Res, 2003. 37(5): p. 509-14.
119. Liu, G.A. and R.L. Zheng, *Protection against damaged DNA in the single cell by polyphenols*. Pharmazie, 2002. 57(12): p. 852-4.
120. Quincozes-Santos, A., et al., *Resveratrol attenuates oxidative-induced DNA damage in C6 Glioma cells*. Neurotoxicology, 2007. 28(4): p. 886-91.
121. Ovesna, Z., et al., *Antioxidant activity of resveratrol, piceatannol and 3,3',4,4',5,5'-hexahydroxy-trans-stilbene in three leukemia cell lines*. Oncol Rep, 2006. 16(3): p. 617-24.
122. Leung, H.Y., et al., *The red wine polyphenol resveratrol reduces polycyclic aromatic hydrocarbon-induced DNA damage in MCF-10A cells*. Br J Nutr, 2009. 102(10): p. 1462-8.
123. Dani, C., et al., *Antioxidant and antigenotoxic activities of purple grape juice--organic and conventional--in adult rats*. J Med Food, 2009. 12(5): p. 1111-8.
124. Dolara, P., et al., *Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats*. Mutat Res, 2005. 591(1-2): p. 237-46.
125. Guo, L., et al., *Direct in vivo evidence of protective effects of grape seed procyanidin fractions and other antioxidants against ethanol-induced oxidative DNA damage in mouse brain cells*. J Agric Food Chem, 2007. 55(14): p. 5881-91.
126. Giovannelli, L., et al., *Effects of de-alcoholised wines with different polyphenol content on DNA oxidative damage, gene expression of peripheral lymphocytes, and haemorheology: an intervention study in post-menopausal women*. Eur J Nutr, 2010.
127. Arendt, B.M., et al., *Single and repeated moderate consumption of native or dealcoholized red wine show different effects on antioxidant parameters in blood and*

- DNA strand breaks in peripheral leukocytes in healthy volunteers: a randomized controlled trial (ISRCTN68505294).* Nutr J, 2005. 4: p. 33.
128. Park, Y.K., et al., *Daily grape juice consumption reduces oxidative DNA damage and plasma free radical levels in healthy Koreans.* Mutat Res, 2003. 529(1-2): p. 77-86.
 129. Fenech, M., C. Stockley, and C. Aitken, *Moderate wine consumption protects against hydrogen peroxide-induced DNA damage.* Mutagenesis, 1997. 12(4): p. 289-96.
 130. Whitehead, T.P., et al., *Effect of red wine ingestion on the antioxidant capacity of serum.* Clin Chem, 1995. 41(1): p. 32-5.
 131. Day, A.P., et al., *Effect of concentrated red grape juice consumption on serum antioxidant capacity and low-density lipoprotein oxidation.* Ann Nutr Metab, 1997. 41(6): p. 353-7.
 132. Ceriello, A., et al., *Red wine protects diabetic patients from meal-induced oxidative stress and thrombosis activation: a pleasant approach to the prevention of cardiovascular disease in diabetes.* Eur J Clin Invest, 2001. 31(4): p. 322-8.
 133. Fuhrman, B., A. Lavy, and M. Aviram, *Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation.* Am J Clin Nutr, 1995. 61(3): p. 549-54.
 134. Kamiyama, M., et al., *Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by Nagano purple grape (Vitis vinifera x Vitis labrusca).* J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 2009. 55(6): p. 471-8.
 135. de Rijke, Y.B., et al., *Red wine consumption does not affect oxidizability of low-density lipoproteins in volunteers.* Am J Clin Nutr, 1996. 63(3): p. 329-34.
 136. Zern, T.L., et al., *Grape polyphenols exert a cardioprotective effect in pre- and postmenopausal women by lowering plasma lipids and reducing oxidative stress.* J Nutr, 2005. 135(8): p. 1911-7.
 137. Banerjee, S., C. Bueso-Ramos, and B.B. Aggarwal, *Suppression of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinogenesis in rats by resveratrol: role of nuclear factor-kappaB, cyclooxygenase 2, and matrix metalloprotease 9.* Cancer Res, 2002. 62(17): p. 4945-54.
 138. Li, Z.G., et al., *Suppression of N-nitrosomethylbenzylamine (NMBA)-induced esophageal tumorigenesis in F344 rats by resveratrol.* Carcinogenesis, 2002. 23(9): p. 1531-6.
 139. Sengottuvelan, M., P. Viswanathan, and N. Nalini, *Chemopreventive effect of trans-resveratrol--a phytoalexin against colonic aberrant crypt foci and cell proliferation in 1,2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis.* Carcinogenesis, 2006. 27(5): p. 1038-46.
 140. Cemeli, E., A. Baumgartner, and D. Anderson, *Antioxidants and the Comet assay.* Mutat Res, 2009. 681(1): p. 51-67.
 141. Halliwell, B., *Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life.* Plant Physiol, 2006. 141(2): p. 312-22.
 142. McCord, J.M., *The evolution of free radicals and oxidative stress.* Am J Med, 2000. 108(8): p. 652-9.
 143. Kaliora, A.C., G.V. Dedoussis, and H. Schmidt, *Dietary antioxidants in preventing atherosclerosis.* Atherosclerosis, 2006. 187(1): p. 1-17.
 144. Wagner, K.-H., et al., *Methods to determine total antioxidant capacity and oxidative damage, in Chemoprevention of Cancer and DNA Damage by Dietary Factors,* S. Knasmueller, et al., Editors. 2009, Wiley-VCH.
 145. Esterbauer, H., et al., *Autoxidation of human low density lipoprotein: loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes.* J Lipid Res, 1987. 28(5): p. 495-509.

146. Witztum, J.L. and D. Steinberg, *The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans?* Trends Cardiovasc Med, 2001. 11(3-4): p. 93-102.
147. Itabe, H., *Oxidized low-density lipoproteins: what is understood and what remains to be clarified.* Biol Pharm Bull, 2003. 26(1): p. 1-9.
148. Wayner, D.D., et al., *Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins.* FEBS Lett, 1985. 187(1): p. 33-7.
149. Marnett, L.J., *Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde.* Mutat Res, 1999. 424(1-2): p. 83-95.
150. Lykkesfeldt, J., *Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking.* Clin Chim Acta, 2007. 380(1-2): p. 50-8.
151. Du Clos, T.W. and C. Mold, *C-reactive protein: an activator of innate immunity and a modulator of adaptive immunity.* Immunol Res, 2004. 30(3): p. 261-77.
152. Neumeister, B., I. Besenthal, and B.O. Böhm, *Klinikleitfaden Labordiagnostik.* Vol. 4. 2009, München: Urban & Fischer. 785.
153. Mortensen, R.F., *C-reactive protein, inflammation, and innate immunity.* Immunol Res, 2001. 24(2): p. 163-76.
154. Wang, C.S. and C.F. Sun, *C-reactive protein and malignancy: clinico-pathological association and therapeutic implication.* Chang Gung Med J, 2009. 32(5): p. 471-82.
155. Ostling, O. and K.J. Johanson, *Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells.* Biochem Biophys Res Commun, 1984. 123(1): p. 291-8.
156. Singh, N.P., et al., *A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells.* Exp Cell Res, 1988. 175(1): p. 184-91.
157. Tice, R.R., et al., *Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing.* Environ Mol Mutagen, 2000. 35(3): p. 206-21.
158. Hoelzl, C., et al., *Use of single cell gel electrophoresis assays for the detection of DNA-protective effects of dietary factors in humans: recent results and trends.* Mutat Res, 2009. 681(1): p. 68-79.
159. Anderson, D., T.W. Yu, and D.B. McGregor, *Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure.* Mutagenesis, 1998. 13(6): p. 539-55.
160. Collins, A.R., et al., *Inter-individual differences in repair of DNA base oxidation, measured in vitro with the comet assay.* Mutagenesis, 2001. 16(4): p. 297-301.
161. Duthie, S.J., et al., *Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes.* Cancer Res, 1996. 56(6): p. 1291-5.
162. Moller, P. and S. Loft, *Oxidative DNA damage in human white blood cells in dietary antioxidant intervention studies.* Am J Clin Nutr, 2002. 76(2): p. 303-10.
163. Moller, P. and S. Loft, *Dietary antioxidants and beneficial effect on oxidatively damaged DNA.* Free Radic Biol Med, 2006. 41(3): p. 388-415.
164. Hoelzl, C., et al., *Consumption of Brussels sprouts protects peripheral human lymphocytes against 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) and oxidative DNA-damage: results of a controlled human intervention trial.* Mol Nutr Food Res, 2008. 52(3): p. 330-41.
165. Gill, C.I., et al., *Watercress supplementation in diet reduces lymphocyte DNA damage and alters blood antioxidant status in healthy adults.* Am J Clin Nutr, 2007. 85(2): p. 504-10.
166. Steinkellner, H., et al., *Coffee consumption induces GSTP in plasma and protects lymphocytes against (+/-)-anti-benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide induced DNA-damage: results of controlled human intervention trials.* Mutat Res, 2005. 591(1-2): p. 264-75.
167. Bichler, J., et al., *Coffee consumption protects human lymphocytes against oxidative and 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole acetate (Trp-P-2) induced DNA-*

- damage: results of an experimental study with human volunteers. *Food Chem Toxicol*, 2007. 45(8): p. 1428-36.
168. Devi, M.K.A., et al., *Functional attributes of soybean seeds and products, with reference to isoflavone content and antioxidant activity*. *Food Chemistry*, 2009. 114(3): p. 771-776.
 169. Duthie, S.J., et al., *Cryopreserved versus freshly isolated lymphocytes in human biomonitoring: endogenous and induced DNA damage, antioxidant status and repair capability*. *Mutagenesis*, 2002. 17(3): p. 211-4.
 170. Lindl, T. and J. Bauer, *Zell- und Gewebekultur*. 1994, Gustave Fischer: Stuttgart, Jena, New York. p. 94-96.
 171. Hölzl, C., *Schutzeffekte von Kohlsprossen vor freien Sauerstoffradikalen und heterozyklischen Amin*. 2004, Diplomarbeit, Universität Wien.
 172. Collins, A., et al., *Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications*. *Environ Mol Mutagen*, 1997. 30(2): p. 139-46.
 173. Palazzetti, S., et al., *Overloaded training increases exercise-induced oxidative stress and damage*. *Can J Appl Physiol*, 2003. 28(4): p. 588-604.
 174. Shaposhnikov, S.A., et al., *Single-cell gel electrophoresis (the comet assay): loops or fragments?* *Electrophoresis*, 2008. 29(14): p. 3005-12.
 175. Szeto, Y.T., A.R. Collins, and I.F. Benzie, *Effects of dietary antioxidants on DNA damage in lysed cells using a modified comet assay procedure*. *Mutat Res*, 2002. 500(1-2): p. 31-8.
 176. Harreus, U., et al., *The influence of high doses of vitamin C and zinc on oxidative DNA damage*. *Anticancer Res*, 2005. 25(5): p. 3197-201.
 177. Lowe, G.M., et al., *Lycopene and beta-carotene protect against oxidative damage in HT29 cells at low concentrations but rapidly lose this capacity at higher doses*. *Free Radic Res*, 1999. 30(2): p. 141-51.
 178. Pass, D. and G. Freeth, *The rat*. ANZCCART News, 1993. 6(4): p. 1-4.
 179. Nikander, E., et al., *Evidence of a lack of effect of a phytoestrogen regimen on the levels of C-reactive protein, E-selectin, and nitrate in postmenopausal women*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003. 88(11): p. 5180-5.
 180. Bayles, B. and R. Usatine, *Evening primrose oil*. *Am Fam Physician*, 2009. 80(12): p. 1405-8.
 181. De La Cruz, J.P., et al., *Antioxidant potential of evening primrose oil administration in hyperlipemic rabbits*. *Life Sci*, 1999. 65(5): p. 543-55.
 182. Ma, X., et al., *In vivo MR imaging of plaque disruption and thrombus formation in an atherosclerotic rabbit model*. *Int J Cardiovasc Imaging*, 2011.
 183. Franco, R., et al., *Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis*. *Cancer Lett*, 2008. 266(1): p. 6-11.
 184. Anderson, D., et al., *The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay*. *Mutat Res*, 1994. 307(1): p. 261-71.
 185. Astley, S.B., et al., *DNA damage and susceptibility to oxidative damage in lymphocytes: effects of carotenoids in vitro and in vivo*. *Br J Nutr*, 2004. 91(1): p. 53-61.
 186. Quincozes-Santos, A., et al., *Actions of redox-active compound resveratrol under hydrogen peroxide insult in C6 astroglial cells*. *Toxicol In Vitro*, 2010. 24(3): p. 916-20.
 187. Carsten, R.E., et al., *Resveratrol reduces radiation-induced chromosome aberration frequencies in mouse bone marrow cells*. *Radiat Res*, 2008. 169(6): p. 633-8.
 188. Matsuoka, A., et al., *A pilot study of evaluation of the antioxidative activity of resveratrol and its analogue in a 6-month feeding test in young adult mice*. *Food Chem Toxicol*, 2008. 46(3): p. 1125-30.

189. Potter, G.A., et al., *The cancer preventative agent resveratrol is converted to the anticancer agent piceatannol by the cytochrome P450 enzyme CYP1B1*. Br J Cancer, 2002. 86(5): p. 774-8.
190. Urpi-Sarda, M., et al., *HPLC-tandem mass spectrometric method to characterize resveratrol metabolism in humans*. Clin Chem, 2007. 53(2): p. 292-9.
191. Lee, H.H., et al., *Piceatannol induces heme oxygenase-1 expression in human mammary epithelial cells through activation of ARE-driven Nrf2 signaling*. Arch Biochem Biophys, 2010. 501(1): p. 142-50.
192. Son, P.S., et al., *Piceatannol, a catechol-type polyphenol, inhibits phorbol ester-induced NF- κ B activation and cyclooxygenase-2 expression in human breast epithelial cells: cysteine 179 of IKK β as a potential target*. Carcinogenesis, 2010. 31(8): p. 1442-9.
193. Hung, L.M., et al., *Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes*. Cardiovasc Res, 2000. 47(3): p. 549-55.
194. Anderson, D., et al., *The effects of vitamin C supplementation on biomarkers of oxygen radical generated damage in human volunteers with "low" or "high" cholesterol levels*. Environ Mol Mutagen, 1997. 30(2): p. 161-74.
195. Mastaloudis, A., et al., *Endurance exercise results in DNA damage as detected by the comet assay*. Free Radic Biol Med, 2004. 36(8): p. 966-75.
196. Choi, S.W., et al., *Vitamins C and E: acute interactive effects on biomarkers of antioxidant defence and oxidative stress*. Mutat Res, 2004. 551(1-2): p. 109-17.
197. Wu, T.C., et al., *Vitamin E and vitamin C supplementation in patients with chronic obstructive pulmonary disease*. Int J Vitam Nutr Res, 2007. 77(4): p. 272-9.
198. Brennan, L.A., et al., *The effect of vitamin C or vitamin E supplementation on basal and H₂O₂-induced DNA damage in human lymphocytes*. Br J Nutr, 2000. 84(2): p. 195-202.
199. Riso, P., et al., *Does tomato consumption effectively increase the resistance of lymphocyte DNA to oxidative damage?* Am J Clin Nutr, 1999. 69(4): p. 712-8.
200. Riso, P., et al., *Lycopene and vitamin C concentrations increase in plasma and lymphocytes after tomato intake. Effects on cellular antioxidant protection*. Eur J Clin Nutr, 2004. 58(10): p. 1350-8.
201. Porrini, M. and P. Riso, *Lymphocyte lycopene concentration and DNA protection from oxidative damage is increased in women after a short period of tomato consumption*. J Nutr, 2000. 130(2): p. 189-92.
202. Porrini, M., et al., *Daily intake of a formulated tomato drink affects carotenoid plasma and lymphocyte concentrations and improves cellular antioxidant protection*. Br J Nutr, 2005. 93(1): p. 93-9.
203. Zhao, X., et al., *Modification of lymphocyte DNA damage by carotenoid supplementation in postmenopausal women*. Am J Clin Nutr, 2006. 83(1): p. 163-9.
204. Salvini, S., et al., *Daily consumption of a high-phenol extra-virgin olive oil reduces oxidative DNA damage in postmenopausal women*. Br J Nutr, 2006. 95(4): p. 742-51.
205. Machowetz, A., et al., *Effect of olive oils on biomarkers of oxidative DNA stress in Northern and Southern Europeans*. FASEB J, 2007. 21(1): p. 45-52.

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name: Anna-Magdalena Heger

Geburtsdatum: 27.03.1985

Geburtsort: Wien

Staatsbürgerschaft: Österreich

Familienstand: ledig

Ausbildung

1995-2003	BG/BRG Waidhofen/Thaya
2003-2004	Studium der Veterinärmedizin, Veterinärmedizinische Universität Wien
2004-2011	Studium der Biologie/Anthropologie, Universität Wien
2009-2011	Diplomarbeit am Institut für Krebsforschung, Univ. Klinik für Innere Medizin I, Medizinische Universität Wien, Arbeitsgruppe Chemische Sicherheit und Krebsprävention

Berufspraxis

10/2008-2/2010	Tätigkeit als studentische Mitarbeiterin (Tutorin), Sezierkurs für Anthropologen, Universität Wien
ab 06/2009	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Krebsforschung in der Arbeitsgruppe Chemische Sicherheit und Krebsprävention (experimentelle Arbeit, Literaturrecherche, Durchführen und Koordinieren einer humanen Interventionsstudie)

Wissenschaftliche Publikationen

Heger, A., Jandl B., Ferk F., Misik M., Knasmüller S.(2010) Gesundheitliche Effekte von Lycopin. Die Ernährung, Volume 34, Seite 306-322