

Institut für Ernährungswissenschaft
Nachwuchsgruppe Ballaststoffe und metabolisches Syndrom
des Deutschen Instituts für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke

**„Der Einfluss von diätetisch verabreichten Sojaisoflavonen auf den
Homocysteinmetabolismus und die Endothelfunktion
bei gesunden, postmenopausalen Frauen“**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

„doctor rerum naturalium“

(Dr. rer. nat.)

in der Wissenschaftsdisziplin „Ernährungswissenschaft“

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von
Manja Reimann
geboren am 10.04.1975

Potsdam, August 2005

„Sage nicht, ein Paß sei unüberwindlich;
wenn du hinaufsteigst, kannst du ihn überschreiten.
Sage nicht, es ist weit, du kannst es nicht erdulden;
Wer geht, langt auch an.“

Mongolisch

INHALTSVERZEICHNIS

Tabellenverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis.....	V
Abkürzungen	VI
1 Zusammenfassung	1
2 Abstract	2
3 Einleitung.....	3
4 Grundlagen.....	5
4.1 Die Arteriosklerose.....	5
4.1.1 Epidemiologie	5
4.1.2 Pathogenese.....	5
4.1.3 Östrogenwirkungen im Herz-Kreislaufsystem	7
4.1.3.1 Pharmakologie, Östrogenrezeptor und Wirkungsmechanismen.....	7
4.1.3.2 Hormonersatztherapie	9
4.1.3.3 Hormonersatztherapie und Herz-Kreislaufkrankungen: Beobachtungsstudien	10
4.1.3.4 Humanstudien	10
4.1.3.5 Kardioprotektive Mechanismen von Östrogen	11
4.1.3.5.1 Arteriosklerose und Gefäßreaktivität.....	11
4.1.3.5.2 Gefäßtonus	12
4.1.3.5.3 Wirkungen auf Blutlipide	13
4.1.3.5.4 Hämostatische Wirkungen	14
4.1.3.5.5 Homocystein	14
4.1.3.5.6 Weitere Östrogenwirkungen.....	15
4.2 Isoflavone – Charakteristik, östrogene Aktivität und Effekte auf das Herz-Kreislaufsystem	16
4.2.1 Definition, Chemie und Vorkommen	16
4.2.2 Östrogene Aktivität.....	18

4.2.3	Isoflavone und deren Wirkungen im Herz-Kreislaufsystem.....	19
4.2.3.1	Wirkungen auf Blutlipide	20
4.2.3.2	Gefäßwand und Gefäßfunktion.....	21
4.2.3.3	Antioxidative Eigenschaften von Isoflavonen	23
4.2.3.4	Entzündliche Prozesse und Zelladhäsion.....	23
4.2.3.5	Isoflavone, Plättchenaktivität und Thrombogenese	25
4.3	Nichtinvasive Messung der Endothelfunktion: Wirkungen von Östrogenen, Isoflavonen und Homocystein.....	26
4.3.1	Methodik der flussinduzierten Vasodilatation	26
4.3.2	Steroidhormone und Endothelfunktion	28
4.3.3	Isoflavone und Endothelfunktion	28
4.3.4	Homocystein – Risikofaktor einer Endotheldysfunktion.....	29
4.3.4.1	Homocystein-Östrogeninteraktion und Endothelfunktion.....	30
4.3.5	ADMA – ein neuer kardiovaskulärer Risikofaktor	30
4.4	Ziele der vorliegenden Arbeit.....	31
5	Studiendesign und Untersuchungsmethoden.....	32
5.1	Studiendesign	32
5.1.1	Probandenrekrutierung und Anforderungsprofil	33
5.1.1.1	Informationsveranstaltung	34
5.1.2	Studienablauf.....	35
5.1.2.1	Run-in.....	35
5.1.2.2	Erste Intervention.....	35
5.1.2.3	Wash-out	35
5.1.2.4	Zweite Intervention und Studienabschluss	36
5.2	Studienlebensmittel und Compliance.....	36
5.3	Untersuchungsmethoden.....	37
5.3.1	Anthropometrie	37
5.3.2	Gelegenheitsblutdruckmessungen	38
5.3.3	Blutuntersuchungen	38
5.3.4	Endothelfunktionsmessungen	40
5.3.5	Urinuntersuchungen.....	42

5.3.6	Erfassung der Energie- und Nährstoffzufuhr	44
5.3.7	Statistische Auswertung	44
6	Ergebnisse.....	46
6.1	Veränderung im Stichprobenumfang und allgemeine Charakteristika	46
6.2	Compliance und Phytoöstrogenausscheidung	47
6.3	Energieaufnahme und anthropometrische Parameter	50
6.4	Gelegenheitsblutdruckmessung	51
6.5	Veränderung der Blutparameter	51
6.6	Endothelfunktion und Blutfluss.....	53
6.7	Einfluss des Equolstatus	54
6.8	Ländereffekte	55
7	Diskussion.....	57
7.1	Schlussfolgerung.....	69
8	Literaturverzeichnis.....	IX
9	Anhang.....	XXIX
	Danksagung.....	LXXXII
	Selbständigkeitserklärung	LXXXIII
	Curriculum Vitae.....	LXXXIV
	Publikationen.....	LXXXVI

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 4-1	Gewebeverteilung und relative Bindungsaffinitäten der Östrogenrezeptoren.....	18
Tabelle 4-2	Potentielle Wirkungsmechanismen von Isoflavonen im kardiovaskulären System.....	20
Tabelle 4-3	Endothelial sezernierte Faktoren.....	27
Tabelle 5-1	Kriterienkatalog des zweistufigen Auswahlverfahrens.....	34
Tabelle 5-2	Zusammensetzung des Isoflavonextraktes	37
Tabelle 5-3	Übersicht der biochemischen Parameter	39
Tabelle 6-1	Zusammensetzung der Subkohorten entsprechend der Nationalität zu Beginn und nach Beendigung der Interventionsstudie	46
Tabelle 6-2	Charakteristika der Studienpopulation.....	46
Tabelle 6-3	Serumkonzentrationen der Phytoöstrogene zum Ende der Intervention	48
Tabelle 6-4	Vergleich der Nährstoff- und Vitaminaufnahme während der Intervention	50
Tabelle 6-5	Blutdruckwerte im Studienverlauf.....	51
Tabelle 6-6	Veränderung der Blutwerte im Studienverlauf.....	52
Tabelle 6-7	Korrelationsmatrix (Spearman's Rho Korrelationskoeffizient) mit N=89 zu Beginn jeder Interventionsperiode.....	53
Tabelle 6-8	Gefäßdiameter, mittlere Blutflussgeschwindigkeit und deren relative Veränderungen nach mechanischer und pharmakologischer Stimulation	53
Tabelle 6-9	Vergleich der absoluten Differenzen erhobener Blutwerte unter Berücksichtigung des Equolstatus	54
Tabelle 6-10	Einfluss des Equolstatus auf die Veränderung der funktionellen Gefäßparameter.....	55
Tabelle 6-11	Vergleich der absoluten Differenzen erhobener Blutparameter in Abhängigkeit von der Nationalität	56

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 4-1 Vereinfachte Darstellung des Pathomechanismus der Arterioskleroseentstehung	6
Abbildung 4-2 Alternativen der östrogenabhängigen Modulierung der Transkription durch ER α -ER β - Homo- und Heterodimere	8
Abbildung 4-3 Mechanismen der Relaxation glatter Muskelzellen durch Stickstoffmonoxid (NO) und zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP).....	13
Abbildung 4-4 Östrogene und Isoflavone im Strukturvergleich.....	16
Abbildung 5-1 Studiendesign	33
Abbildung 5-2 Der Gefäßdurchmesser der Arteria brachialis wird zu drei Zeitpunkten gemessen.....	42
Abbildung 6-1 Vergleich der absoluten Veränderungen der Phytoöstrogenausscheidung	47
Abbildung 6-2 Klassifikation der Studienteilnehmer (N=89) hinsichtlich des Equolstatus.....	49
Abbildung 6-3 Vergleich der Prävalenz von Equolproduzenten in Abhängigkeit von der Nationalität	49
Abbildung 6-4 Veränderung der Nitrit/Nitratkonzentration (NOx) im Verlaufe der Intervention.....	55
Abbildung 7-1 Homocysteinmetabolismus und ADMA-Bildung	64
Abbildung 7-2 Potentielle Mechanismen der Isoflavonwirkung auf den Stickstoffmonoxidmetabolismus..	67
Abbildung 7-3 Schematische Darstellung der Mechanismen und Auswirkungen eines Anstiegs von Homocystein	68

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADMA	asymmetrisches Dimethyl-L-Arginin
AHA	American Heart Association
ANOVA	univariate Varianzanalyse
AP-1	Aktivatorprotein-1
BH4	Tetrahydrobiopterin
BLS	Bundeslebensmittelschlüssel
BMI	Body Mass Index
Ka-K-MLCK	Kalzium-Kalium-abhängige Myosinleichtkettenkinase (engl. myosin light chain kinase)
CBS	Cystathionin- β -Synthase
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
COX	Cyclooxygenase
CVD	Herz-Kreislaufkrankungen (engl. cardiovascular disease)
DAG	Diacylglycerin
DAI	Daidzein
Δ	Differenz (Delta)
DBP	diastolischer Blutdruck
DDAH	Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase
DELFI	Dissociation Enhanced Lanthanide Fluorescent ImmunoAssay
DIfE	Deutsches Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke
DK	Dänemark
E ₂	17- β Östradiol
EC	Endothelzellen (engl. endothelial cells)
ED	endotheliale Dysfunktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	serologische Antikörperdiagnostik mittels Enzymimmunoassay
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
EPIC	European Prospective Investigation into Nutrition and Cancer
EQU	Equol
ER	Östrogenrezeptor
ERE	Östrogen responsables Element
ERT	Östrogensatztherapie (engl. estrogen replacement therapy)
ET-1	Endothelin-1
FDA	Food and Drug Administration
FSH	follikelstimulierendes Hormon
FMD	endothelabhängige flussinduzierte Vasodilatation
GC	Gesamtcholesterin

GEN	Genistein
GLM	Gemischtes Lineares Modell
GLY	Glycitein
GPx	Glutathionperoxidase
GTN-MD	endothelunabhängige nitroglycerininduzierte Vasodilatation
HDL	high density lipoprotein
HERS	Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study
HRT	Hormonersatztherapie (engl. hormone replacement therapy)
HSP 90	Hitzeschockprotein 90
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
IP ₃ R	Inositoltrisphosphatrezeptor
K-Mg-ATPase	Kalium-Magnesium-abhängige Adenosintriphosphatase
LDL	low density lipoprotein
LH	luteinisierendes Hormon
L-NA	N ^G -L-Arginin
L-NMMA	N ^G -monomethyl-L-Arginin
MAP	mittlerer arterieller Druck (engl. mean arterial pressure)
MAPK	mitogenaktivierbare Proteinkinase
MCP-1	Monozyten chemotaktisches Protein-1
MLCP	Myosinleichtkettenphosphatase (engl. myosin light chain phosphatase)
MTHFR	5, 10-Methylentetrahydrofolatreduktase
MW	Mittelwert
Na	Natrium
NADPH Ox	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat-Oxidase
NF-κB	nuclear factor-kappa B
NOx	Stickstoffmonoxidmetabolite
N	Stichprobenumfang
ONOO [•]	Peroxynitrit
P	Signifikanzniveau
PABA	para-Aminobenzoessäure
PAHA	para-Aminohippursäure
PAI-1	Plasminogenaktivator-1
PGI	Prostazyklin
PKG	Proteinkinase G
PLC	Phospholipase C

PRMT	Proteinargininmethyltransferase
PWV	Pulswellengeschwindigkeit (engl. pulse wave velocity)
RE	Retinoläquivalent
ROCC	rezeptorabhängige Kalziumkanäle
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosylmethionin
SBP	systolischer Blutdruck
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SMC	Myozyten, glatte Muskelzellen (engl. smooth muscle cells)
SOD	Superoxiddismutase
Soy+	Sojaweiweiß mit Isoflavonen
Soy-	Sojaweiweiß nach Extraktion der Isoflavone
SPI	Sojaproteinisolat
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TAVM	mittlere Flussgeschwindigkeit des Blutes (engl. time average velocity mean)
TG	Triglyzeride
tHcy	Gesamthomocystein
TNF	Tumornekrosefaktor
TVP	textured vegetable protein
UK	Großbritannien
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	vascular endothelial growth factor
VOCC	spannungsabhängige Kalziumkanäle
WHI	Women´s Health Initiative

1 Zusammenfassung

Einleitung: Homocystein (tHcy) gilt als unabhängiger kardiovaskulärer Risikofaktor und korreliert eng mit einer endothelialen Dysfunktion, welche nichtinvasiv mittels der flussinduzierten Vasodilatation (FMD) messbar ist. Experimentelle Hyperhomocysteinämie ist mit einer reduzierten Bioverfügbarkeit von endothelialen Stickstoffmonoxid (NO) bei gleichzeitig erhöhten Spiegeln des kompetitiven Inhibitors der NO-Biosynthese asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) assoziiert. *In-vivo* senkt eine Östrogenbehandlung neben tHcy auch die ADMA-Spiegel und verbessert signifikant die Endothelfunktion. Hinsichtlich ihrer Wirkung als selektive Östrogenrezeptormodulatoren wird angenommen, dass Phytoöstrogene, speziell Sojaisoflavone, ähnliche Effekte hervorrufen.

Zielstellung: Innerhalb einer europäischen, multizentrischen, doppelblinden Interventionsstudie an 89 gesunden, postmenopausalen Frauen wurde der Einfluss von Sojaisoflavonen auf den Homocysteinmetabolismus, den Blutdruck und die *in-vivo* Endothelfunktion untersucht. Die cross-over Studie umfasste zwei achtwöchige Interventionsperioden, die von einer gleichlangen Wash-out-Phase unterbrochen waren. Die Zuteilung zum Isoflavon- (50 mg/d) oder Plazeboregime für die erste Interventionsphase erfolgte randomisiert. Endpunkterhebungen fanden jeweils in den Wochen 0 und 8 der Interventionsperioden statt.

Ergebnisse: Die renale Ausscheidung von Genistein, Daidzein und Equol war während der Isoflavonintervention signifikant erhöht ($P > 0,001$). Die Phytoöstrogene hatten weder einen Effekt auf die tHcy-Konzentration ($P = 0,286$), noch auf ADMA, Erythrozytenfolat und Vitamin B-12 ($P > 0,05$) im Plasma. Während die Summe aus Nitrat und Nitrit (NOx), welche die NO-Bioverfügbarkeit reflektiert, im Verlaufe der Plazebobehandlung abfiel, wurde ein leichter Anstieg bei der Isoflavonsupplementation beobachtet (Δ Wo8-Wo0: $-2,60$ [-8,75; 2,25] vs. $1,00$ [-6,65; 7,85] $\mu\text{mol/L}$ $P < 0,001$), was zu einem signifikanten Behandlungseffekt führte. Weiterhin wurde eine positive Korrelation zwischen ADMA und Vitamin B-12 gefunden ($R = 0,252$; $P = 0,018$). Die flussinduzierte Vasodilatation ($P = 0,716$), ein Maß für die Endothelfunktion, blieb durch die Isoflavonbehandlung unbeeinflusst, obwohl sich diese über die Zeit insgesamt verbesserte ($P > 0,001$). Bis auf einen marginalen Anstieg des systolischen Wertes ($P = 0,032$) im Vergleich zur Plazebobehandlung blieb der Blutdruck während der Isoflavonintervention unverändert.

Schlußfolgerung: Im Gegensatz zu Östrogen übten Sojaisoflavone weder einen Einfluss auf die *in-vivo* Endothelfunktion noch auf die traditionellen und neuen kardiovaskulären Risikofaktoren den Blutdruck, tHcy und ADMA aus. Demzufolge ist der gesundheitliche Nutzen isolierter Isoflavone hinsichtlich einer Prävention hormonmangelbedingter Erkrankungen in gesunden postmenopausalen Frauen fraglich.

2 Abstract

Background: Homocysteine (tHcy) is a strong and independent risk factor for cardiovascular disease. Hyperhomocysteinemia contributes to endothelial dysfunction as assessed by flow-mediated vasodilation (FMD). The mechanisms by which homocysteine generates endothelial dysfunction remain incompletely understood although a growing body of data suggests that the bioavailability of nitric oxide (NO) is reduced. The principal competitive inhibitor of endothelial NO-synthase asymmetric dimethylarginine (ADMA) may play a central role in homocysteine related dysfunction as it is derived from homocysteine metabolism. Cardiovascular risk factor modification has suggested beneficial effects of estrogen on endothelial function by lowering homocysteine and ADMA levels. We hypothesize that phytoestrogens particular isoflavones act in a similar manner.

Objective & Methods: The effects of soy isoflavones on homocysteine metabolism and endothelial function were investigated within a multi-centre, double blind, cross-over intervention trial in 89 European postmenopausal women. Subjects consumed either fruit cereal bars with or without soy isoflavones (50 mg/d) for 8 weeks each with a 8 weeks washout period in between. Endpoint measurements were during both treatment phases at baseline and weeks 8, respectively.

Results: Urinary phytoestrogens increased significantly after isoflavone intervention ($P < 0.001$). Isoflavone supplementation did affect neither plasma total homocysteine ($P = 0.286$) nor ADMA, vitamin B-12 or folate ($P < 0.05$). Isoflavones had a favorable effect on NO-metabolism assessed by analysis of NO-metabolites (NOx) nitrite and nitrate. While NOx concentration significantly decreased during placebo there was a slight increase after isoflavone supplementation leading to a significant treatment difference (Δ wk8-wk0: -2.60 [-8.75 ; 2.25] vs. 1.00 [-6.65 ; 7.85] $\mu\text{mol/L}$ $P < 0.001$). There was no association between total homocysteine and ADMA whereas a positive correlation was found for ADMA and vitamin B-12 ($R = 0.252$; $P = 0.018$). The endothelial function model did not demonstrate any difference between either treatment regime ($P = 0.716$), although endothelial function assessed by flow-mediated vasodilation improved in general ($P < 0.001$). A potential adverse effect was noted, with an elevation in systolic blood pressure ($P = 0.032$) whereas diastolic blood pressure and mean arterial pressure remained unaffected.

Conclusion: Soy isoflavones did not have beneficial effects on endothelial function as well as on traditional and novel cardiovascular risk factors like plasma homocysteine, blood pressure and ADMA as observed for estrogen treatment. The health benefit of isolated isoflavones in healthy postmenopausal women is questionable.

3 Einleitung

Herz-Kreislauferkrankungen stellen die häufigste Todesursache von Frauen in Industrieländern dar ¹. Das kardiovaskuläre Risiko steigt rapide mit dem Einsetzen der Menopause. Dieser Anstieg wird hauptsächlich auf den Rückgang der endogenen Östrogenproduktion zurückgeführt ². Verschiedene Risikofaktoren werden durch die Menopause negativ beeinflusst. So finden unerwünschte Verschiebungen im Blutgerinnungs- und hämolytischen System statt ³. Postmenopausale Frauen weisen außerdem höhere endogene Spiegel von HDL-Cholesterin ⁴ und der atherogenen Aminosäure Homocystein ⁵ auf als premenopausale Frauen. Homocystein ist eine nicht am Proteinaufbau beteiligte Aminosäure des Methioninstoffwechsels. Erhöhte Konzentrationen gelten als unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen ⁶ und korrelieren eng mit einer gestörten Endothelfunktion ^{7,8}. Eine Endotheldysfunktion (ED) entwickelt sich früh im arteriosklerotischen Prozess und gilt als geeigneter surrogater Marker für die Progression der Arteriosklerose ⁹. Die ED ist durch eine Störung der endothelvermittelten NO-abhängigen Tonusregulation gekennzeichnet, welche *in-vivo* nichtinvasiv über die flussinduzierte endothelabhängige Vasodilatation (FMD) mittels hochauflösendem Ultraschall messbar ist ¹⁰. Die brachiale FMD korreliert eng mit der koronaren Endothelfunktion ¹¹ und stellt einen guten Prädiktor für kardiovaskuläre Ereignisse dar ¹². Die altersbedingte Abnahme der Endothelfunktion verzeichnet mit dem Eintritt in die Wechseljahre eine Progression ¹³, während eine Östrogentherapie die Endothelfunktion verbessert ¹⁴.

Neueste Studien belegen, dass erhöhte Konzentrationen von asymmetrischem Dimethylarginin (ADMA), einer Aminosäure, die bei der posttranslationalen Modifikation von Proteinen entsteht, ebenso mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko verbunden ist ¹⁵. ADMA ist ein kompetitiver Inhibitor der endothelialen NO-Synthase (eNOS) und gilt als neuer Risikofaktor für eine ED ¹⁶. Hervorzuheben ist, dass ein Zusammenhang zwischen ADMA und dem Homocysteinmetabolismus besteht, da die Methylgruppen in ADMA von S-Adenosylmethionin stammen, aus welchem nach Demethylierung S-Adosylhomocystein hervorgeht ¹⁷. Eine weitere Gemeinsamkeit besteht darin, dass beide Aminosäuren der Kontrolle der körpereigenen Geschlechtshormone unterliegen. Eine Östrogentherapie konnte nicht nur erfolgreich die endogenen Homocysteinspiegel sondern auch die ADMA-Konzentration in postmenopausalen Frauen senken ^{18,19}.

Hinsichtlich der mit einer Östrogenapplikation verbundenen Risiken ²⁰ stellen pflanzliche Östrogene (Phytoöstrogene) insbesondere die Sojaisoflavone eine potentielle Alternative zur herkömmlichen Hormontherapie dar. Soja und Sojaprodukte sind besonders reichhaltig an den Isoflavonen Genistein, Daidzein und Glycitein ²¹ und liefern den Hauptanteil aller Phytoöstrogene in der menschlichen Ernährung. Der Konsum von Isoflavonen ist in asiatischen Ländern ²² 20- bis 50-fach höher als in den westlichen Industrieländern ²³. Die weitaus niedrigere Prävalenz von Herz-Kreislauferkrankungen, postmenopausalen Symptomen und Osteoporose in den Ländern mit habituellem Sojaverzehr wird zumindest teilweise auf die hohe Aufnahme von Phytoöstrogenen zurückgeführt ²⁴. Hinsichtlich der strukturellen Ähnlichkeit zum endogenen Geschlechtshormon binden Isoflavone an beide Östrogenrezeptoren (ER) α und β ²⁵, und wirken in Abhängigkeit von der endogenen Östrogenkonzentration selektiv als Agonisten oder Antagonisten ²⁶. Analog zu Östrogen hemmen Isoflavone die Replikation und Migration von glatten Gefäßmuskelzellen ²⁷ und inhibieren eine Neointimabildung in

Versuchstieren ²⁸. Neben potenten konzentrationsabhängigen vasodilatatorischen Eigenschaften ²⁹ konnten positive Effekte auf die *in-vivo* Endothelfunktion demonstriert werden ³⁰.

Es gibt bisher nur wenige Daten bezüglich einer Isoflavonaufnahme und der endogenen Homocystein- und ADMA-Konzentrationen. In einer aktuellen epidemiologischen Studie war eine hohe Aufnahme von Sojaprodukten invers mit der Plasmahomocysteinkonzentration assoziiert ³¹. Jedoch ist der Wissensstand über die Auswirkungen von Isoflavonen auf Homocystein und ADMA wegen des geringen Umfanges von kontrollierten Interventionsstudien sehr begrenzt.

Im Rahmen einer europäisch angelegten Interventionsstudie wurden die physiologischen Wirkungen von diätetisch verabreichten Phytoöstrogenen auf das Herz-Kreislaufsystem postmenopausaler Frauen untersucht. Zahlreiche kardiovaskuläre Risikomarker in Plasma und Serum wurden mit modernen molekularbiologischen Methoden analysiert. Zudem erfolgte die Erfassung funktioneller Parameter des Gefäßsystems mittels nichtinvasiver Techniken. Diese Arbeit diskutiert im Wesentlichen die Auswirkungen von Isoflavonen auf den Homocysteinmetabolismus und die Gefäßwandfunktion bei postmenopausalen Frauen.

4 Grundlagen

4.1 Die Arteriosklerose

4.1.1 Epidemiologie

Die Mehrzahl aller in den westlichen Industrienationen auftretenden Todesfälle sind die Folge von destruktiven arteriosklerotischen Gefäßwandveränderungen, der Hauptursache für Herz-Kreislaufkrankungen (CVD) wie koronare Herzerkrankung, Schlaganfall und periphere Gefäßerkrankung³². Obwohl in den letzten Jahrzehnten die Mortalitätsrate sank, war die Abnahme bei Frauen weniger stark ausgeprägt als bei Männern³³. Infolge der steigenden Lebenserwartung und der damit einhergehenden Verschiebung der Altersstruktur ist jedoch die absolute Zahl steigend³⁴. Im direkten Vergleich zwischen den Geschlechtern ist die Gesamtsterblichkeit an Herz-Kreislaufkrankungen bei Männern und Frauen ähnlich, jedoch setzt der altersbedingte Anstieg der CVD-Mortalität bei Frauen erst etwa 10 Jahre später ein¹. Da Herz-Kreislaufkrankungen bei Frauen vor dem 50. Lebensjahr relativ selten auftreten, wurde bis Ende des Zwanzigsten Jahrhunderts ein Zusammenhang mit dem Östrogenverlust in der Menopause assoziiert². Dies führte zu einer Flut von Studien, die die Wirkungen von Östrogen auf das kardiovaskuläre System in postmenopausalen Frauen untersucht haben. Zweifelsfrei konnten kardioprotektive Effekte von Östrogen auf das Gefäßsystem nachgewiesen werden, die insbesondere auf einer günstigen Beeinflussung des Blutlipidprofils^{35,36} sowie der Gefäßfunktion und Gefäßwandstruktur beruhen³⁷⁻⁴¹. In klinischen Studien^{20,42,43} und Meta-Analysen^{44,45} wurde jedoch keine Abnahme der CVD-Mortalität unter Hormoneinnahme (Hormonersatztherapie, HRT) beobachtet. Im Gegenteil, in den ersten Jahren ist die HRT sogar mit einem höheren CVD-Risiko verbunden, welches in den Folgejahren jedoch wieder auf das Anfangsniveau absinkt. Zusammengenommen scheint Östrogen allein verabreicht einen neutralen Effekt auf das Herz-Kreislaufsystem zu haben. Derzeit wird davon ausgegangen, dass die protektiven Wirkungen von Östrogen auf das Gefäßsystem von dessen negativen Effekten (Kapitel 4.1.3.4) überdeckt werden⁴⁶.

4.1.2 Pathogenese

Wiederholte Schädigungen der Gefäßwand resultieren in einer Aktivierung endothelialer Abwehr- und Schutzmechanismen. Diese sind durch eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen, eine erhöhte Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen, eine Stimulierung der Thrombozytenaggregation sowie durch eine vermehrte Produktion von Sauerstoffradikalen gekennzeichnet [Abb 4-1]. Eine permanente Aktivierung dieses proinflammatorischen, prokoagulatorischen und proadhäsiven Stimulus führt über Jahre zu einer irreversiblen Schädigung des Gefäßes, gekennzeichnet durch Entartung in einen pathologisch fibroproliferativen Prozess unter Bildung fibröser Fettstreifen⁴⁷. Durch Einlagerung von Lipiden und Bindegewebe sowie durch Migration und Proliferation von Makrophagen und glatten Muskelzellen transformieren die Fettstreifen zu instabilen arteriosklerotischen Plaques^{48,49}.

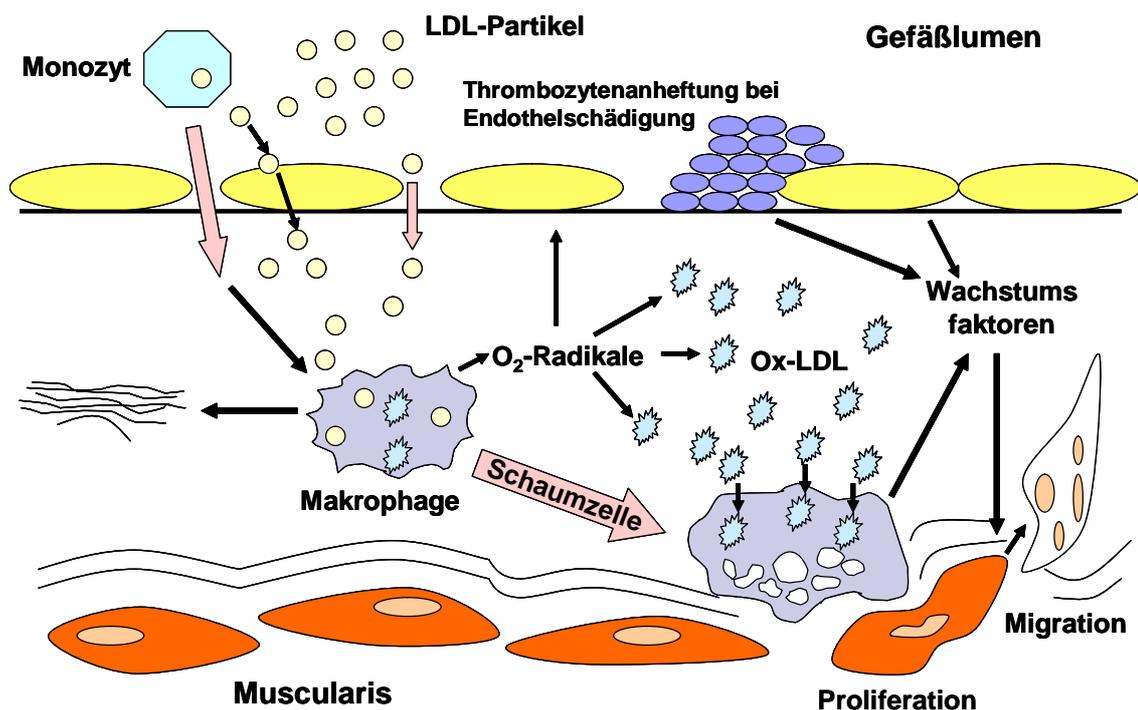


Abbildung 4-1 Vereinfachte Darstellung des Pathomechanismus der Arterioskleroseentstehung

Kardiovaskuläre Risikofaktoren führen zu einer Schädigung und vermehrten Permeabilität des Endothels, so dass LDL-Partikel infiltrieren können. Reaktive Sauerstoffspezies aus Leukozyten, Endothelzellen und Myozyten oxidieren die LDL-Partikel (Ox-LDL). Letztere induzieren die Freisetzung chemotaktischer Substanzen aus den Endothelzellen und Myozyten, wodurch die Infiltration von Monozyten und deren Transformation zu Makrophagen gefördert wird. Makrophagen sezernieren Superoxidionen (O₂-Radikale), welche das Apolipoprotein B der Ox-LDL modifizieren. Diese hochmodifizierten Ox-LDL werden mittels Phagozytose über den Scavengerrezeptor von Makrophagen internalisiert. Da keine Rückkopplungshemmung stattfindet, erfolgt eine unkontrollierte Aufnahme der Ox-LDL, wodurch die Makrophagen zu lipidbeladenen Schaumzellen konvertieren. Ox-LDL sind zytotoxisch und erhöhen so die Permeabilität des Endothels. Monozyten und Makrophagen sezernieren weitere chemotaktisch aktive Substanzen, Wachstumsfaktoren und Prostanoiden. Diese begünstigen eine weitere Monozyteninfiltration, die Proliferation und Migration von Myozyten sowie die Thrombozytenaggregation. Mit fortschreitendem Prozess bilden sich Ansammlungen von Schaumzellen, Fettstreifen und Bindegewebswucherungen, wodurch das Gefäßlumen eingeengt wird. [Quelle: A.J. Lusis, Nature (2000) 407(Sep): 233-241; Abb. nach Hahn et. al. Ernährungsumschau (2002) 49(5):172-177]

Das Gefäßendothel ist für die Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase von besonderer Wichtigkeit. In seiner Funktion als para- und endokrines Organ ist es für die antithrombotischen, antiinflammatorischen und antiadhäsiven Eigenschaften der Gefäßwand verantwortlich. Es fungiert als Regulator von Gefäßtonus und Blutdruck, und dient der Aufrechterhaltung von Gefäßwandarchitektur und Gefäßpermeabilität. Neben der Modulierung von Lipidstoffwechsel und Lipidintegration spielt es eine entscheidende Rolle in der Regulation der Leukozyten-Gefäßwand-Interaktion⁵⁰. Störungen dieser grundlegenden Funktionen des Gefäßendothels werden unter dem Begriff endotheliale Dysfunktion zusammengefasst. Infolge des Ungleichgewichtes vasoaktiver Substanzen, entzündungsmodulierender Stoffe, Wachstumsfaktoren sowie gerinnungsfördernder und -hemmender Mediatoren ist eine endotheliale Dysfunktion durch Vasokonstriktion, Entzündung, Migration, Proliferation und Transformation glatter Gefäßmuskelzellen, Thrombenbildung und vermehrte

Monozytenadhäsion gekennzeichnet. Personen mit ein oder mehreren kardiovaskulären Risikofaktoren weisen häufiger eine endotheliale Dysfunktion auf als andere. In Individuen mit subklinischer Arteriosklerose wurde eine erhöhte Monozytenadhäsion, Monozytenmigration sowie eine gesteigerte Proliferation glatter Muskelzellen nachgewiesen⁵¹. Im Fortschreiten des arteriosklerotischen Prozesses äußert sich die Gefäßdysfunktion durch eine Beeinträchtigung des Gefäßtonus, was sich durch Vasokonstriktion nach Verabreichung des potenten Vasodilators Acetylcholin veranschaulichen lässt^{52,53}.

Kardiovaskuläre Risikofaktoren, wie Alter, Geschlecht, Hyperlipidämie, Bluthochdruck und Rauchen, korrelieren eng mit einer endothelialen Dysfunktion^{10,54-56}. Die Therapie von Hyperlipidämie und Bluthochdruck sowie die Einstellung des Rauchens führen zu einer deutlichen Verbesserung der Endothelfunktion^{54,57,58}.

Noch bis vor einigen Jahren wurde angenommen, dass Angina Pectoris, Myokardinfarkt und Schlaganfall Folgeereignisse einer fortgeschrittenen destruktiven Gefäßwandveränderung darstellen, bei der die Plaques das Gefäßlumen fast vollständig verschließen. Nach und nach wurde dieses Konzept widerlegt, als nachgewiesen wurde, dass die Syndrome Ausdruck des Schweregrades der vorliegenden Obstruktionen sind und diese mit dem raschen Fortschreiten des Krankheitsprozesses assoziiert sind⁵⁹. Morphologische Analysen solcher Läsionen deuten auf Plaquebrüche und intraluminale Thrombenbildung hin⁴⁹. Tatsächlich beschrieb Davis et al., dass 95 % aller unerwarteten Todesfälle auf Plaqueeruptionen zurückzuführen sind⁶⁰. Entzündliche Prozesse innerhalb der Plaques erhöhen die Anfälligkeit für Brüche, begünstigen die Gerinnselbildung unter Beeinträchtigung der Sauerstoffversorgung des Myokards (Ischämie) und führen letztendlich zum klinischen Erkrankungsbild. Therapeutische Maßnahmen werden im akuten Krankheitsfall gezielt zur Auflösung von Thromben eingesetzt, um eine Perfusion des Herzmuskels zu gewährleisten⁶¹.

4.1.3 Östrogenwirkungen im Herz-Kreislaufsystem

4.1.3.1 Pharmakologie, Östrogenrezeptor und Wirkungsmechanismen

Die weiblichen Sexualhormone, insbesondere die Östrogene, regulieren das Wachstum, die Differenzierung und die Funktion von Geweben innerhalb und außerhalb des Geschlechtssystems. Die Klassifizierung der Östrogene erfolgt in steroidale und nicht-steroidale Formen⁶². Innerhalb dieser werden natürliche und synthetische Östrogene unterschieden. Im menschlichen Körper zirkulieren vornehmlich drei natürliche Östrogen derivative: das von den Ovarien synthetisierte Östradiol und Östriol sowie das in der Peripherie gebildete und wichtigste zirkulierende Östrogen Östronsulfat⁶². Die Sekretion des von den ovariellen Granulosazellen gebildeten Östradiols ist hauptsächlich vom Vorhandensein der Follikel abhängig. Die Zahl der Follikel nimmt in den letzten zehn Jahren vor dem Einsetzen der Menopause rapide ab⁶³ und erreicht mit der letzten Menstruation den Nullpunkt. Der Verlust der Follikel geht mit einer stark verminderten Östrogenproduktion einher. Die Plasmaspiegel erreichen dann nicht mal ein Zehntel der ehemaligen Östrogenkonzentrationen⁶⁴.

Der Östrogenrezeptor (ER) gehört zur Superfamilie von Proteinen, die die Wirkungen von Steroidhormonen auf nukleärer Ebene vermitteln⁶⁵. Diese intrazellulär lokalisierten Rezeptoren fungieren als ligandenaktivierbare

Transkriptionsfaktoren und regulieren die Synthese spezifischer mRNA und Proteine ⁶⁵. Sie bestehen aus einer Ligandenbindungsdomäne, einer DNA-Bindungsdomäne und einer hypervariablen Region – dem A-Terminus ⁶⁶. Die sehr große Ligandenbindungsdomäne ist strukturell sowie funktionell äußerst komplex ⁶⁷. N-terminal gelegen ist die Transkriptionsaktivierungsfunktion (AF-1), die ligandenunabhängig bei DNA-Bindung die Transkription aktiviert. C-terminal befindet sich die ligandenabhängige Transkriptionsaktivierungsfunktion (AF-2), deren Aktivität durch Bindung oder Interaktion mit co-regulatorischen Proteinen reguliert wird [Abb. 4-2] ⁶⁸. Der inaktive im Zytoplasma befindliche ER ist mit dem Hitzeschockprotein 90 (HSP 90) komplexiert. Infolge der Bindung eines Liganden unterliegt der ER Konformationsänderungen unter Abdissoziation des HSP 90 ⁶⁹. Nach Dimerisierung des ER-Ligandenkomplexes mit einem weiteren ER transloziert das Dimerkonstrukt in den Zellkern. Dort triggert es nach Bindung an palindromische Promotorsequenzen, dem Östrogenbindungselement (ERE; engl. estrogen responsible element), Transkriptionsprozesse [Abb. 4-2]. Die ER-DNA-Bindung bewirkt die Rekrutierung weiterer co-regulatorischer Proteine und anderer Transkriptionsfaktoren, die letztendlich zusammen mit dem ER und der DNA einen Präinitiationskomplex bilden. ERs regulieren die Transkription nicht nur durch Bindung an deren verwandtes responsables Element, sondern auch durch Protein-Proteininteraktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren ⁶⁸. Bisher wurden zwei Isoformen des Östrogenrezeptors identifiziert: ER α und ER β ²⁵.

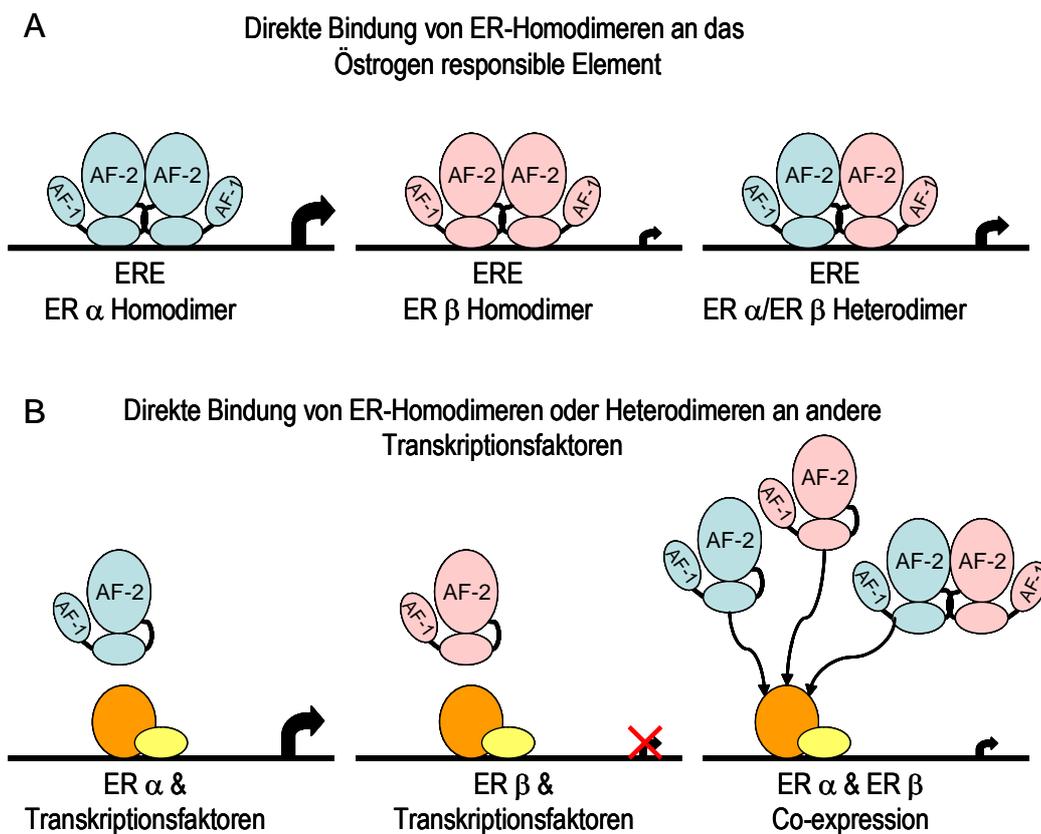


Abbildung 4-2 Alternativen der östrogenabhängigen Modulation der Transkription durch ER α -ER β -Homo- und Heterodimere

Schematische Darstellung der ER-Subtypen mit der am N-Terminus gelegenen ligandenunabhängigen Aktivierungsfunktion (AF-1) und der am C-Terminus befindlichen ligandenabhängigen Aktivierungsfunktion (AF-2), in der Ligandenbindungsdomäne gelegen. Unterschiedliche Aktivierungsmuster der ER-vermittelten Transkription durch Bindung an das Östrogen responsible Element (ERE). Die relativen östrogenabhängigen Transkriptionsaktivitäten sind durch die Stärke der Pfeile gekennzeichnet. ER α und ER β sind dargestellt in blau bzw. weiß [Quelle: Matthews & Gustafsson *Molecular Interventions* (2003) 3: 281-292].

Ein Großteil der Östrogenwirkungen scheint auf dessen Bindung an den ER zu beruhen. Dass die östrogene Aktivität nicht zwingend an eine steroidale Konfiguration gebunden ist, beweisen eine Reihe strukturell ähnlicher nichtsteroidaler Substanzen, die ebenfalls östrogenwirksam sind. Die meisten Liganden besitzen vergleichbare Bindungsaffinitäten zu ER α und ER β , mit Ausnahme von Phytoöstrogenen (pflanzlichen Hormonen), die selektiv an ER β binden ²⁵. Die „absolute östrogene Aktivität“ einer Substanz ist schwierig zu ermitteln, da die Bindungsaffinität nicht unmittelbar mit der biologischen Aktivität gleichzusetzen ist. Divergenzen in der Effektivität von Östrogenen oder von anderen Substanzen mit östrogenen und antiöstrogenen Aktivität kommen vor allem durch die unterschiedliche Verteilung der ER-Subtypen im Körper zustande. Der ER β ist hauptsächlich in den Ovarien, den Testes, der Prostata, dem Gastrointestinaltrakt, dem Gefäßsystem sowie im Skelettsystem und im Gehirn lokalisiert, während ER α im Hypothalamus und im Uterus dominiert [siehe auch Tab. 4-1] ^{25,27}. Die Verteilung der ER-Isoformen lässt vermuten, dass eine selektive Bindung an ER β für die schützenden Mechanismen im Herz-Kreislaufsystem verantwortlich ist, ohne jedoch das Uteruswachstum zu stimulieren ²⁷. Das Vorhandensein beider ER-Subtypen in Endothelzellen sowie in glatten Gefäßmuskelzellen ist bekannt, jedoch sind die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen einer ER-Wirkung in der Gefäßwand noch weitestgehend ungeklärt ⁶⁵. Hervorzuheben ist, dass die Rezeptordichte in arteriosklerotischen Läsionen bei postmenopausalen Frauen verringert ist ⁷⁰, während eine vermehrte Expression von ER β nach Gefäßverletzung festgestellt wurde ⁷¹.

Die Beteiligung von spezie- und gewebsspezifischen co-regulatorischen Proteinen (Inhibitoren und Aktivatoren) der Genaktivität ist ausschlaggebend für die außerordentliche Komplexität und Intransparenz der Hormonwirkungen ⁶⁹. Zudem modulieren Östrogene eine Vielzahl von nichtgenomischen Prozessen, wie den Ionenfluß von Ionenkanälen, die Aggregation von Membranrezeptoren sowie Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen von Proteinen ⁷²⁻⁷⁴.

4.1.3.2 Hormonersatztherapie

Das Klimakterium ist durch ein Defizit an Östrogen, Progesteron und Androgen gekennzeichnet. Die Behandlung klimakterischer Beschwerden mit Östrogensupplementen wird bereits seit über 50 Jahren praktiziert ⁷⁵. Ob die Kurz- und Langzeitfolgen des Hormonmangels in die Kategorie physiologisch oder pathologisch einzuordnen sind, wird bis heute kontrovers diskutiert. Der erfolgreiche Einsatz von Östrogenen zur kurzzeitigen Behandlung der Wechseljahrssymptome ist gut belegt. Zum Schutz vor unkontrolliertem Zellwachstum in der Gebärmutter erhalten Frauen mit intaktem Uterus die kontinuierliche oder sequenzielle Hormonersatztherapie (HRT), eine Kombination aus Östrogen und Progesteron ⁷⁶, während Frauen ohne Uterus die Östrogensatztherapie verabreicht wird. Hinsichtlich der mit einer Langzeitapplikation verbundenen Risiken sollte die HRT nach derzeitigem Kenntnisstand nicht mehr zum Schutz vor Folgeerkrankungen bei Hormonmangel verabreicht, sondern wird nur noch zur kurzfristigen Behandlung von Wechseljahrsbeschwerden - und auch hier nur unter sorgfältiger Abwägung des individuellen Risikos – empfohlen werden ⁷⁵.

4.1.3.3 Hormonersatztherapie und Herz-Kreislaufkrankungen: Beobachtungsstudien

Die gefäßschützende Eigenschaft von Östrogen wurde zunächst auf der Grundlage epidemiologischer Daten postuliert. In zahlreichen Kohorten- und Fall-Kontrollstudien erfolgte die Einschätzung der Effektivität einer HRT anhand kardiovaskulärer Endpunkte wie Mortalität, Myokardinfarkt, dem Grad koronarer Stenosen, Inzidenz von Stents oder Bypassen ⁷⁷. Die Studien variieren erheblich bezüglich ihrer Endpunkte, des Designs, und der statistischen Auswertung. Früheren epidemiologischer Studien und Metaanalysen zufolge sinkt das kardiovaskuläre Risiko mit HRT um 40-50 % ^{78,79}. Trotz hoher Reliabilität und Präzision solcher Daten, widerlegen neueste Plazebo-kontrollierte Interventionsstudien ^{20,80} sowie aktuelle Metaanalysen ^{44,45} nun die in den frühen neunziger Jahren gemachten Beobachtungen. Das kardiovaskuläre Risiko bleibt demzufolge unter alleiniger Östrogensubstitution unverändert, während eine kombinierte Östrogen-Progestin-Therapie das Risiko, insbesondere für Ereignisse wie Schlaganfall oder Lungenembolie, deutlich erhöht ⁸¹. Vermutlich neutralisiert eine Aktivierung solcher prothrombotischen Prozesse die zweifelsohne vorhandenen protektiven Wirkungen von Östrogen auf das Herz-Kreislaufsystem. Eine zusätzliche Verabreichung des Östrogenantagonisten Progesteron dürfte das unter Östrogen noch gut austarierte Gleichgewicht zwischen positiven und negativen kardiovaskulären Wirkungen zugunsten eines erhöhten Risikos verschieben.

Neben Bias¹ im Studiendesign kann trotz scheinbar homogener sozioökonomischer Studienpopulationen das Vorhandensein von nicht unmittelbar sichtbaren Gruppenunterschieden die Ergebnisse beeinflussen. Frauen mit HRT haben im Durchschnitt ein höheres Bildungsniveau, einen niedrigeren Blutdruck und niedrigere Plasmacholesterinspiegel, treiben mehr Sport und nehmen aktiver an gesundheitlichen Vorsorgemaßnahmen teil als jene, die eine Hormoneinnahme entweder ablehnen oder gar nicht erst in Betracht ziehen ². Demnach sind HRT-Anwenderinnen bereits zu Beginn der Therapie einem niedrigeren CVD-Risiko ausgesetzt. Kritisch zu betrachten ist außerdem die Tatsache, dass die Mehrzahl der frühen epidemiologischen Studien auf Östrogensersatztherapie und nicht auf der kombinierten Östrogen-Progestin-Therapie basieren, wie sie für Frauen mit intaktem Uterus gewöhnlich verschrieben wird ⁷⁶. Dies ist von entscheidender Relevanz, da Progesteron die kardioprotektiven Eigenschaften von Östrogen antagonisieren kann ⁸². Die wenigen hierzu durchgeführten Human- und Tierstudien weisen auf eine negative Beeinflussung der Blutlipidspiegel, der arteriellen Vasodilatation, des Blutflusses und der Arterioskleroseentwicklung in Abhängigkeit von der Art des applizierten Progesterons hin ^{42,83}. Diese Confounder können in ihrer Gesamtheit dazu beigetragen haben, dass der Nutzen einer HRT in Kohorten- und Fall-Kontroll-Studien in den frühen neunziger Jahren überschätzt wurde.

4.1.3.4 Humanstudien

Negative Schlagzeilen großer Interventionsstudien der letzten Jahre haben dazu geführt, dass in jüngster Zeit der Wert einer HRT für die Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen in Frage gestellt und zugleich intensiv nach alternativen Therapien geforscht wird.

Die Women's Health Initiative (WHI-Studie) war die erste randomisierte, plazebo-kontrollierte Interventionsstudie zur Primärprävention, die an 16.608 gesunden, postmenopausalen Frauen im Alter von 50-79 Jahren mit

¹ Verzerrung

intaktem Uterus durchgeführt wurde. Der Interventionsarm mit kontinuierlicher HRT (0,625 mg/d konjugiertes Equineöstrogen [CEE] plus 2,5 mg/d Medroxyprogesteronacetat) musste nach 5,2 Jahren vorzeitig abgebrochen werden, da der Nutzen-Risiken-Index die zulässige Grenze überstieg⁸⁰. Die geschätzten relativen Risiken (nominal 95 % Konfidenzintervall [CI]) beliefen sich für die koronare Herzerkrankung auf 1,29 (1,02-1,63) mit 286 Fällen; für Brustkrebs auf 1,26 (1,00-1,59) mit 290 Fällen; für Schlaganfall auf 1,41 (1,07-1,85) mit 212 Fällen; für Lungenembolie auf 2,13 (1,39- 3,25) mit 101 Fällen; für Darmkrebs auf 0,63 (0,43-0,92) mit 112 Fällen; für Gebärmutterkrebs auf 0,83 (0,47-1,47) mit 47 Fällen; für Hüftfrakturen auf 0,66 (0,45-0,98) mit 106 Fällen; und für sonstige Todesfälle auf 0,92 (0,74-1,14) mit 331 Fällen⁸⁰. Das Thromboserisiko erreichte im ersten Jahr der Intervention das Maximum und fiel zum Ende der Intervention wieder ab.

Ähnliche Ergebnisse wurden in der ersten Plazebo-kontrollierten Interventionsstudie zur Sekundärintervention (Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study, HERS) erzielt²⁰. Die doppel-blinde, randomisierte „HERS“-Studie untersuchte die Effekte oral verabreichter kombinierter HRT in 2.763 postmenopausalen Frauen mit vorbestehender koronarer Herzerkrankung. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich der Häufigkeit kardiovaskulärer Ereignisse einschließlich Myokardinfarkt, koronare Gefäßneubildung, instabile Angina, kongestives Herzversagen, Hirninsulte, transiente Ischämien und periphere arterielle Gefäßerkrankung ermittelt. Lediglich beim Blutlipidprofil konnte eine signifikante Verbesserung in der Verum-Gruppe im Vergleich zu Plazebo beobachtet werden²⁰. Die Inzidenz arterieller Gefäßerkrankungen stieg im ersten Jahr signifikant (RR=1,52) und fiel dann kontinuierlich zum Ende der 4-jährigen Intervention auf ein RR von 0,67. Die HRT war in den ersten 12 Monaten mit einem 50 % gesteigerten Risiko für Myokardinfarkte sowie mit einem fast 3-fach erhöhten Risiko für venöse Thrombosen und Lungenembolien (RR 2,89; 95% CI 1,50-5,58) assoziiert. Zwar sank die Rate kardiovaskulärer Ereignisse nach dem ersten Jahr wieder, jedoch war der Unterschied zwischen den Gruppen über 4 Jahre betrachtet nicht signifikant²⁰. Auch nach 6,8 Jahren Follow-up (HERS II) konnte keine positive Bilanz bezüglich der präventiven Wirkung einer HRT gezogen werden^{84,85}.

Zwei Faktoren, die die Östrogeneffekte in der HERS-Studie wesentlich beeinflusst haben dürften, sind die kontinuierliche Einnahme von Progesteron und von weiteren Medikamenten. Von daher ist die Aussage der HERS-Studie weitgehend begrenzt.

4.1.3.5 Kardioprotektive Mechanismen von Östrogen

4.1.3.5.1 Arteriosklerose und Gefäßreaktivität

Die Wirkungen einer HRT auf das Herz-Kreislaufsystem sind am eingehendsten im Primatenmodell untersucht worden⁸⁶. Um einen künstlichen Hormonmangel zu erzeugen, wurden die Affen zunächst oophorektomiert und dann einem der drei Behandlungsregime randomisiert zugeordnet: Plazebo, Östrogensatztherapie oder kombinierte HRT mit kontinuierlicher oder zyklischer Einnahme von Progesteron. Die Affen erhielten über 2 Jahre eine atherogene Kost und wurden anschließend zur vollständigen Untersuchung des Blutgefäßsystems getötet⁸⁷. Die Einnahme von Östrogen reduzierte arteriosklerotische Plaques um 50 % bzw. 70 % (Hormonimplantate bzw. orale Therapie)⁸⁶. Im HRT-Regime liess sich dieser Effekt nur nach zyklischer Verabreichung von Progesteron beobachten⁸³. Andere Studien mit diesem Tiermodell zeigten kein vermehrtes Auftreten kardiovaskulärer

Ereignisse infolge der Hormonbehandlung nach künstlich induziertem Gefäßtrauma auf⁸⁸. In einer zu Beginn der neunziger Jahre durchgeführten Studie konnte eine Verbesserung der acetylcholininduzierten Vasodilatation arteriosklerotischer Gefäße nach Östrogenbehandlung demonstriert werden⁵³. In den Folgejahren wurde der antiatherogene Effekt von Östrogen auch in anderen Tiermodellen bestätigt⁸⁹.

Die Beobachtung, dass Östrogen ein weiteres Fortschreiten des arteriosklerotischen Prozesses nur in milden oder moderaten Läsionen, nicht aber bei fortgeschrittenen Stadien inhibierte⁹⁰, deutete auf eine Modulation vasoprotektiver Mechanismen des Endothels hin. Der Beweis wurde bereits Anfang der neunziger Jahre durch die Arbeit von Williams et al.⁵² erbracht. Jene infundierten intrakoronar den Vasodilator Acetylcholin bei ovariectomierten Primaten, welche zuvor entweder mit oder ohne Östrogen behandelt wurden. Während bei den Primaten ohne Östrogenbehandlung eine paradoxe Konstriktion der Koronararterien zu beobachten war, erfolgte in jenen mit Östrogenbehandlung eine leichte Vasodilatation. Zudem reduzierte Östrogen das Ausmaß von Plaques in den Koronarien.

Endothelzellen exprimieren ER α und ER β in etwa gleichem Verhältnis. Das Vorhandensein zahlreicher funktioneller Abnormalitäten bei Gefäßmuskelzellen und Blutgefäßen von ER β -Knockout-Mäusen und die vermehrte Expression von ER β nach Gefäßverletzung verdeutlichen dessen Stellenwert für die Regulation der Gefäßfunktion^{27,91}. Die Fähigkeit von Östrogen, konzentrationsabhängig die Migration und Replikation glatter Gefäßmuskelzellen zu hemmen^{27,41,92}, dürfte einen grundlegenden Mechanismus darstellen, durch den Östrogen effizient vor Intimaverdickung schützt. Diese antiproliferative Wirkung setzt das Vorhandensein von Östrogenrezeptoren voraus⁶⁵ und wird durch Progesterin gehemmt⁹³. Daneben ist Östrogen in der Lage, die Reendothelialisierung nach katheterinduzierter Gefäßverletzung zu fördern^{39,94}.

4.1.3.5.2 Gefäßtonus

Veränderungen der Gefäßreaktivität durch Östrogen werden partiell auf eine erhöhte Bioverfügbarkeit von endotheliale Stickstoffmonoxid (NO) zurückgeführt⁹⁵. Östrogen aktiviert in einem nichtgenomischen ER α -abhängigen Prozess das Schlüsselenzym für die NO-abhängige Vasodilatation – die endotheliale NO-Synthase (eNOS)⁹⁶. Diese schnelle Aktivierung der eNOS ist in arteriosklerotischen Arterien beeinträchtigt. *In vitro* Studien weisen außerdem auf eine langfristige Stimulierung der NO-Synthase durch eine vermehrte Expression der eNOS hin^{97,98}. Tatsächlich sind zahlreiche Teilsequenzen des ERE im Promotorbereich des eNOS-Gens nachgewiesen worden⁹⁹.

NO ist für die vaskuläre Homöostase von besonderer Bedeutung. Als potenter Vasodilator ist es nicht ausschließlich für die Regulation von Blutdruck und Gefäßtonus verantwortlich, sondern moduliert ebenso wichtige Interaktionen zwischen Gefäßwand und Blutzellen (Monozyten, Thrombozyten) und ist maßgeblich an der Aufrechterhaltung der antiinflammatorischen und antiaggregatorischen Eigenschaften der Gefäßwand beteiligt¹⁰⁰. Die Regulation der Bioverfügbarkeit dieses multifunktionalen Mediators dürfte für die gefäßschützende Eigenschaft von Östrogen ausschlaggebend sein¹⁰¹. Die Modulierung der NO-abhängigen Vasodilatation durch Östrogen wurde anhand von geschlechtsspezifischen Unterschieden in der Freisetzung von NO demonstriert¹⁰². Ebenso konnte ein niedrigerer Basaltonus sowie eine verminderte Vasokonstriktion nach

Verabreichung von gefäßverengenden Substanzen in Gefäßen weiblicher Ratten beobachtet werden ¹⁰³. Trotz der offensichtlichen Evidenz für eine Regulation der eNOS-Aktivität durch Östrogen werden Interferenzen des Steroidhormons mit nachgeschalteten Signalwegen („downstream“ der NO-Interaktion) nicht ausgeschlossen. NO kurbelt durch Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase „downstream“² die Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) an [Abb. 4-3] ¹⁰⁴. cGMP initiiert als ‚second messenger‘ die Relaxation glatter Gefäßmuskelzellen vornehmlich über einen Proteinkinase G gesteuerten Mechanismus. Letzterer vermittelt die Phosphorylierung verschiedener Schlüsselproteine der Vasodilatation, darunter der kalziumabhängigen ATPase des Sarkoplasmas, der Kalzium-Magnesium-abhängigen ATPase des Sarkolems sowie der Kalzium-Kalium-abhängigen Myosinleichtkettenkinase (engl. myosin light chain kinase) und der Myosinleichtkettenphosphatase (engl. myosin light chain phosphatase) ¹⁰⁵. Inwieweit Östrogen in diese Prozesse eingreift, ist derzeit noch unklar.

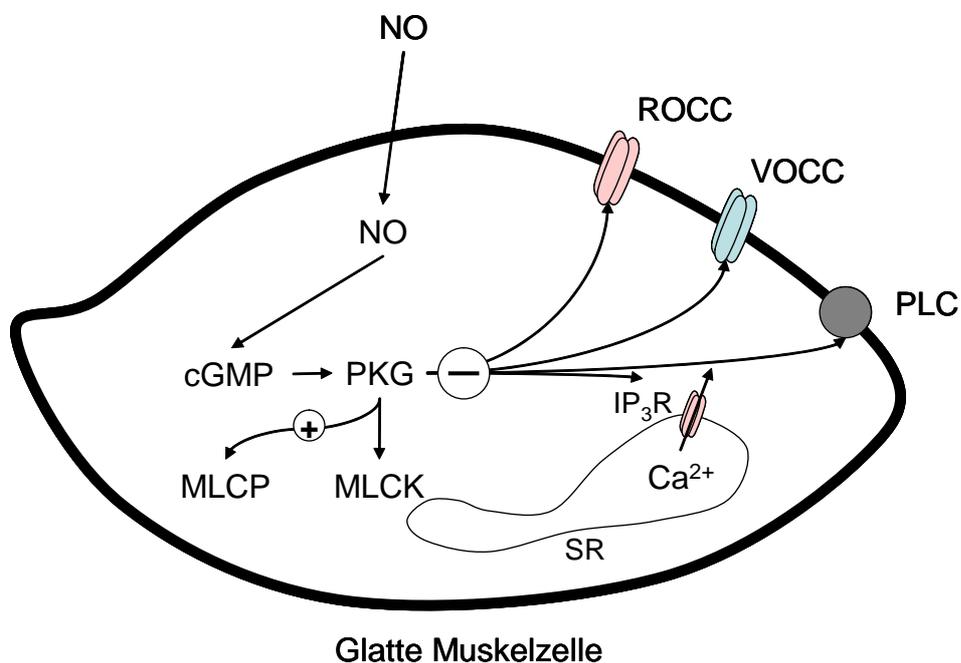


Abbildung 4-3 Mechanismen der Relaxation glatter Muskelzellen durch Stickstoffmonoxid (NO) und zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP)

Die Relaxation wird über einen Proteinkinase G (PKG) abhängigen Prozess gesteuert. Dieser bewirkt die Verminderung der intrazellulären Kalziumkonzentration, die Aktivierung der MLCP (engl. myosin light chain phosphatase) und die Hemmung der MLCK (engl. myosin light chain kinase). cGMP inhibiert membrangebundene Kalziumkanäle wie rezeptorabhängige (ROCC) und spannungsabhängige Kalziumkanäle (VOCC) oder intrazelluläre Kalziumrezeptoren wie den Inositoltrisphosphatrezeptor (IP₃R). SR=sarkoplasmatisches Retikulum

4.1.3.5.3 Wirkungen auf Blutlipide

Obwohl hormonell bedingte Veränderungen im Lipidprofil nur für 25 % bis 50 % der Reduktion des Herz-Kreislaufisikos durch Östrogen verantwortlich sein dürften ¹⁰⁶, zählt dieser Mechanismus dennoch zu den bedeutendsten aller bislang postulierten. In zahlreichen aktuellen Interventionsstudien liess sich die in den späten

² unterhalb der Guanylatzyklasereaktion im Signalweg

achziger Jahren gemachte Beobachtung, dass eine Hormonersatztherapie einen günstigen Einfluss auf das Blutlipidprofil hat, bestätigen^{35,42}. Mit Östrogen wurde eine Senkung der Gesamt- (GC) und LDL-Cholesterinkonzentrationen (LDL-C) von 5 % - 15 % erreicht, während der HDL-Cholesterinspiegel (HDL-C) um 10 % gesteigert werden konnte¹⁰⁷. Die Modulierung der HDL-Konzentration ist von besonderem Belang, da niedriges Plasma HDL-C positiv mit der CVD-Mortalität von Frauen assoziiert ist¹⁰⁸. Die antioxidative Aktivität von Östrogen schützt ferner vor der Bildung oxidativ veränderter atherogener LDL-Partikel¹⁰⁹, die eine wichtige Rolle im Initiationsprozess der Arteriosklerose spielen. Neben der vorteilhaften Beeinflussung des Lipidmetabolismus ist eine Östrogensupplementation signifikant mit einer Erhöhung der Triglyzeridkonzentration (TG)^{35,42,107} - einem guten Prädiktor der CVD-Sterblichkeit von Frauen¹⁰⁸ - assoziiert.

4.1.3.5.4 *Hämostatische Wirkungen*

Das Thromboserisiko steigt im Verlauf des arteriosklerotischen Prozesses signifikant an. Die vermehrte Expression von Metalloproteinasen und anderen Enzymen mit proteolytischer Aktivität (z.B. plasminogen activator inhibitor 1, PAI-1) innerhalb der Plaques vermindert deren Stabilität und erhöht somit die Gefahr von Plaquebrüchen deutlich. Die WHI⁸⁰ und HERS²⁰ Studie, aber auch andere Studien^{45,110} weisen auf ein deutlich erhöhtes Thromboserisiko vor allem in den ersten Jahren einer Hormonapplikation hin. In kurzfristigen Interventionen erfolgte eine Stimulation der Hyperkoagulation nach Hormoneinnahme¹¹¹⁻¹¹³. Allerdings sind die Studienkollektive relativ begrenzt, um definitive Aussagen treffen zu können. Hinsichtlich des prothrombotischen Potentials von Östrogen wird die HRT nur noch für die kurzfristige Behandlung von Wechseljahrsbeschwerden, nicht jedoch für einen langfristigen Einsatz zur Prävention von Osteoporose und Herz-Kreislaufkrankungen empfohlen.

4.1.3.5.5 *Homocystein*

Moderate Hyperhomocysteinämie tritt häufig in westlichen Industrienationen auf und ist mit einem erhöhten Risiko für Schlaganfall, kardiovaskuläre Erkrankung, periphere arterielle Gefäßerkrankung sowie venöser Thrombose assoziiert^{114,115}. Der Homocysteinmetabolismus unterliegt unter anderem dem Einfluss der Geschlechtshormone¹¹⁶. Das offenbart sich vor allem dadurch, dass Männer generell höhere Plasma Homocysteinkonzentrationen haben als Frauen vergleichbaren Alters¹¹⁷, und dass postmenopausale Frauen höhere Homocysteinspiegel aufweisen als prämenopausale Frauen⁵. Dementsprechend vermindert eine HRT signifikant die Gesamthomocysteinkonzentration im Blut postmenopausaler Frauen¹¹⁸⁻¹²⁰. Für die Prävention von Herz-Kreislaufkrankungen spielt die Beeinflussung des Homocysteinmetabolismus durch HRT möglicherweise eine wichtige Rolle. Im Durchschnitt wurde der Homocysteinspiegel in randomisierten, Plazebo-kontrollierten Interventionsstudien mit sequenzieller HRT und mit ERT um 10 % gesenkt^{118,119,121}. Konzentrationsabhängige Reduktionen des Homocysteinspiegels von 4 % bis 14 % erfolgten ebenfalls mit Raloxifen, einem selektiven Östrogenrezeptormodulator¹¹⁸. In Langzeitstudien konnte das niedrigere Homocysteinniveau über einen Zeitraum von 2 Jahren gehalten werden¹¹⁸, was auf die Einstellung eines neuen metabolischen Gleichgewichtes hindeutet. Der genaue Mechanismus dieser Östrogenwirkung ist noch nicht eindeutig geklärt. Es wird ein Zusammenhang mit einer erhöhten Methioninsynthaseaktivität in den Nieren¹²² einem Enzym, das für die

Remethylierung von Homocystein zu Methionin verantwortlich ist, sowie mit einer gesteigerten Transaminierung von Methionin ¹²³ vermutet.

4.1.3.5.6 *Weitere Östrogenwirkungen*

Zahlreiche weitere Östrogenwirkungen wurden bisher demonstriert, darunter Veränderungen im Renin-Aldosteron-System ^{124,125}, eine günstige Beeinflussung des Kohlenhydratmetabolismus ¹²⁶ und der Gesamtkörperfettverteilung ¹²⁷ sowie eine Reduktion zirkulierender Entzündungsparameter wie E-Selektin, VCAM-1 (engl. vascular cell adhesion molecule 1) und ICAM-1 (engl. intercellular adhesion molecule 1), die Ausdruck für die Plaquestabilität sind ^{128,129}.

Endothelin-1 (ET-1) ist einer der potentesten Vasokonstriktoren im menschlichen Organismus und wichtigster Gegenspieler von endotheliale NO. Frauen weisen im Vergleich zu Männern geringere Endothelinkonzentrationen auf. Insbesondere während der Schwangerschaft verzeichnet die endogene Endothelinproduktion einen Rückgang. Auf der Basis von Ergebnissen randomisierter, kontrollierter Interventionsstudien schlussfolgerten Baal et al. (1999), dass eine HRT die Konzentration von ET-1 senkt ¹³⁰. Übereinstimmend wurde vor kurzem *in-vitro* eine Hemmung der Transkriptionsaktivität des Gens für das Endothelin-Converting-Enzym-1 ¹³¹ sowie *in-vivo* eine Reduktion der ET-1 Konzentration ¹³² durch 17- β Östradiol nachgewiesen.

4.2 Isoflavone – Charakteristik, östrogene Aktivität und Effekte auf das Herz-Kreislaufsystem

4.2.1 Definition, Chemie und Vorkommen

Phytoöstrogene (pflanzliche Hormone) sind ubiquitär vorkommende sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe der Polyphenolklasse mit funktioneller Ähnlichkeit zu den endogenen Östrogenen des menschlichen Organismus. Ausgehend von ihrer chemischen Struktur werden drei Klassen unterschieden: die Isoflavone, Lignane und Coumestane. Isoflavone und Isoflavonglykoside sind die am häufigsten in der Natur vorzufindenden Phytoöstrogene, unter denen Genistein und Daidzein die höchste biologische Aktivität besitzen ¹³³. Das Isoflavongrundgerüst wird von zwei über einen heterozyklischen Pyronring (C) verbundenen Benzenringen (A+B) [Abb. 4-4(a)] gebildet. Die sterische Konfiguration des gesamten Moleküls, welche der von Östrogen ähnelt [Abb. 4-4(b)], erlaubt es den Isoflavonen, an die ERs zu binden und auf diese Weise die physiologische Wirkung des endogenen Steroidhormons zu modulieren. Das Vorhandensein der 4'-OH-Gruppe determiniert im Wesentlichen die Bindungsaffinität zum Östrogenrezeptor und damit deren östrogene Aktivität ¹³⁴. Verglichen mit 17- β -Östradiol ist die östrogene Wirkung der Isoflavone um den Faktor 100 bis 10.000 geringer ²⁶. Bei regelmäßigem Verzehr können jedoch Plasmakonzentrationen erreicht werden, die jene der Östrogene um das 100- bis 10.000-Fache übersteigen ²². In Abhängigkeit von der Konzentration der endogenen Steroidhormone vermitteln Isoflavone sowohl östrogene als auch antiöstrogene Wirkungen ¹³⁵. Unter Bedingungen einer ausreichenden endogenen Östrogenproduktion (z.B. Prämenopause) agieren Isoflavone als kompetitive Inhibitoren. In Östrogenmangelsituationen (z.B. Postmenopause) ahmen sie jedoch durch Bindung an den Östrogenrezeptor die Wirkung des endogenen Steroidhormons nach.

Isoflavone werden fast ausschließlich von Leguminosen gebildet. Wichtigste Nahrungsquelle für den Menschen ist die Sojabohne, in der die Isoflavonisomeren Genistein, Daidzein und Glycitein in nennenswerten Mengen zu finden sind ²¹. Isoflavone liegen in der Pflanze zumeist gebunden am Sojaprotein als hochpolare β -Glykoside vor, die bei der Lebensmittelproduktion durch Einwirkung von Hitze oder durch mikrobielle enzymatische Hydrolyse während des Fermentationsprozesses (Miso, Tempeh) in Aglykone gespalten werden können ¹³⁶. Bei der

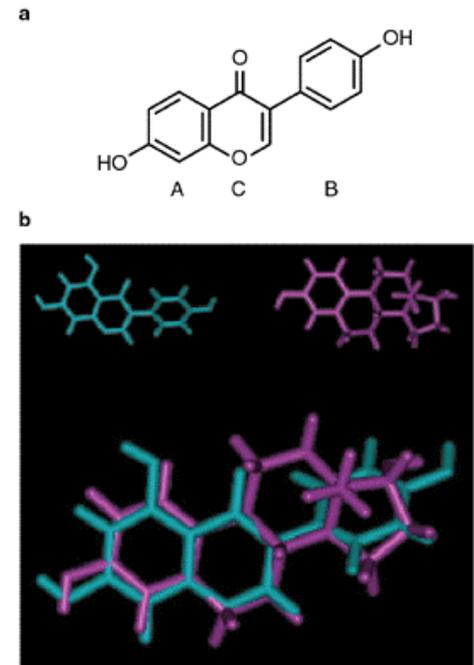


Abbildung 4-4 Östrogene und Isoflavone im Strukturvergleich

(a) Isoflavongrundgerüst, (A+B) Benzen; (C) Pyron (b) Isoflavone besitzen strukturelle Ähnlichkeit zum weiblichen Hormon Östrogen und gehören deshalb zu den Phytoöstrogenen. Dargestellt sind Genistein (hellblau) und Östradiol (violett), das potenteste östrogene Hormon. [Quelle: Cassidy et al., Exp Rev 2000 (5):1-15]

Herstellung des in westlichen Industrienationen weit verbreiteten Sojaöls und Sojalecithins werden die Isoflavone im technologischen Prozess mit dem Sojaprotein abgetrennt. Diese Sojaprodukte enthalten daher nur Spuren dieser bioaktiven Substanzen¹³⁶. Schätzungen zufolge liegt die durchschnittliche tägliche Isoflavonaufnahme in Populationen mit traditionellem Sojaverzehr bei 20-50 mg²² verglichen mit 1 mg in den westlichen Ländern²³.

Die hydrolytische Abstaltung des Zuckerrestes durch zytosolische und Bürstensaum- β -Glukosidasen ist Voraussetzung für die intestinale Absorption der Isoflavone¹³⁷. Wegen ihrer hohen Lipophilie erfolgt die Resorption der Aglykone vermutlich über nichtionische passive Diffusion. Nicht resorbierte Isoflavone werden im Dickdarm durch bakterielle β -Glukosidasen gespalten und anschließend einem weiteren reduktiven Metabolismus durch die Darmflora unterzogen¹³⁸. Die Verstoffwechslung von Daidzein erfolgt über Zwischenstufen zu O-Demethylangolensin und Equol, einem hormonell aktiven Metaboliten¹³⁹. Das Ausmaß der Equolbildung ist vor allem von der Zusammensetzung der Darmflora abhängig und unterliegt großen interindividuellen Schwankungen. Nur zwei Drittel aller Menschen sind in der Lage, Equol zu bilden (Equolbildner)¹⁴⁰. Analog zum Daidzeinmetabolismus wird Genistein zunächst zu 6'-Hydroxy-O-methylangolensin verstoffwechselt und partiell weiter zu p-Ethylphenol abgebaut¹³⁹. Im Unterschied zum Daidzein erfolgt jedoch keine Bildung des analogen Equolmetaboliten. Die Isoflavone sowie ihre reduktiven Metaboliten werden nach Resorption und Transport im Pfortaderblut zur Leber durch Phase-II-Enzyme entweder unter Bildung von Monoglukuroniden und Sulfaten konjugiert oder – jedoch in wesentlich geringerem Umfang - durch Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen hydroxyliert. Die Ausscheidung dieser Metaboliten erfolgt vorwiegend renal^{141,142}. Nur ein geringer Teil wird biliär ausgeschieden und kann nach Dekonjugation durch die Darmflora erneut resorbiert werden (enterohepatischer Kreislauf)¹⁴³. Die Isoflavonkonzentrationen im Urin reflektieren relativ zuverlässig die Isoflavonaufnahme mit der Nahrung und korrelieren eng mit den Serumkonzentrationen¹⁴⁴. Bei mäßigem Sojaverzehr können Plasmakonzentrationen von 50-800 ng/mL erreicht werden, die die endogenen Östrogenspiegel prämenopausaler Frauen von 40-80 pg/mL bei weitem übersteigen¹⁴⁵. Maximale Konzentrationen sind bereits 8 bis 10 Stunden nach Sojaverzehr messbar¹⁴⁶. Interessanterweise unterliegt die Serumisoflavonkonzentration sehr großen interindividuellen Schwankungen selbst dann, wenn eine standardisierte Verabreichung erfolgt¹⁴⁷. Insbesondere die Zusammensetzung der Darmflora¹⁴⁰, Unterschiede zwischen den Geschlechtern, eine Einnahme von Antibiotika und das Vorhandensein von gastrointestinalen Erkrankungen haben signifikanten Einfluss auf die Isoflavonbioverfügbarkeit¹⁴⁸.

Die Interpretation von Studien mit Isoflavonen setzt das Verständnis der unterschiedlichen Isoflavonquellen voraus. Isoflavone sind in zahlreichen Varianten verfügbar, unter anderem als konzentrierte Isoflavonextrakte, als modifiziertes und konzentriertes Sojapulver (TVP, engl. textured vegetable protein), als Sojaproteinisolat (SPI, engl. soy protein isolate), als Sojaprodukte *per se* (Tofu, Miso, Tempeh, Sojaflocken) und als Lebensmittel mit Sojabestandteilen (Sojabrot). SPI ist das in klinischen Studien am häufigsten eingesetzte Isoflavonsubstrat. Nicht nur der Proteinanteil sondern ebenso die Isoflavonkonzentration all dieser Produkte ist großen Schwankungen unterworfen. Die Isoflavonkonzentrationen gleicher Produkte variieren außerdem erheblich in Abhängigkeit vom Hersteller¹⁴⁹. Grundsätzlich bleibt nach Extraktion der Kohlenhydrate und Fette das reine Protein zurück, an welchem nicht nur Isoflavone, sondern auch weitere bioaktive Substanzen, wie Saponine, gebunden sind.

4.2.2 Östrogene Aktivität

In Abhängigkeit von der Expression der jeweiligen Östrogenrezeptorisoform (ER α und ER β) und dem Vorhandensein von regulatorischen Proteinen, sogenannten Co-aktivatoren und Co-repressoren, vermitteln Phytoöstrogene sowohl östrogene als auch antiöstrogene Wirkungen im Zielgewebe ^{25,150,151}. Die Liganden wirken nicht nur als Antagonisten oder Agonisten, sondern können ebenso partielle oder selektive Aktivität aufweisen ^{152,153}. Trotz intensiver Bemühungen, die Bindungsaffinität verschiedener Isoflavone für beide ER zu bestimmen, bleibt das Verständnis der biologischen Aktivität dieser Substanzen aufgrund der äußerst komplexen Liganden-ER-Interaktion relativ begrenzt ¹⁵⁴. Das biologische Potential eines entsprechenden Isoflavons variiert in Abhängigkeit vom methodischen Aspekt erheblich zwischen den einzelnen Studien. In der Mehrzahl der Studien diente das potenteste endogene Östrogen 17- β Östradiol als Referenzsubstanz, dessen östrogene Aktivität willkürlich mit dem Faktor 100 gleichgesetzt wurde. Vergleichsweise sind die relativen Potenzen für Coumestrol 0,202, für Genistein 0,084, für Equol 0,061, für Daidzein 0,013, für Biochanin A < 0,006 und für Formononetin < 0,006 ¹⁵⁵. Wichtig für das Verständnis der Isoflavonwirkungen ist die Tatsache, dass die Bindungsaffinität der Isoflavone nicht mit dem biologischen Outcome korrespondiert. Ursache dafür sind nicht nur Unterschiede in ihren Bindungsaffinitäten ²⁵, sondern ebenso in ihrem Potential die ER-ERE Bindung zu aktivieren ¹⁵⁶. Phytoöstrogene, speziell Genistein vermag, die transkriptionelle Aktivität mit ER β tausendfach stärker zu triggern als mit ER α , während die Bindungsaffinität nur um den Faktor 30 variiert ^{150,157}. Außerdem erfolgt eine effektivere Modulation der Signalwege durch Bindung an ER β im Sättigungsbereich ¹⁵⁷. Ursächlich für diese Divergenz scheint die Fähigkeit der Phytoöstrogene, selektiv Co-regulatoren für ER β zu rekrutieren ¹⁵⁷, während 17- β Östradiol relativ unselektiv regulatorische Proteine für beide Östrogenrezeptoren aktiviert. Entsprechend vermittelt Östrogen das gesamte Wirkungsspektrum im kardiovaskulären System sowohl mit positiven als auch mit negativen Effekten, während Phytoöstrogene nur einen Teil der Östrogenwirkungen modulieren.

Tabelle 4-1 Gewebeverteilung und relative Bindungsaffinitäten der Östrogenrezeptoren

[Quelle: Cassidy et al. ExpRev 2000 (5):1-15]

ER	Verteilung im Gewebe	Relative Bindungsaffinität ^a		
		Östrogen	Anti-Östrogen	Phytoöstrogen
ER α	Nebennierendrüse, Brust, Niere, Ovarien, Testes, Uterus	17- β Östradiol (E ₂): 100 % 17- β Östradiol: 58 %	4-OH-Tamoxifen: 178 %	Genistein: 5 %
ER β	Gallenblase, Knochen, Gehirn, Brust, Ovarien, Prostata, Gefäßsystem, Uterus, Darm	17- β Östradiol (E ₂): 100 % 17- β Östradiol: 11%	4-OH-Tamoxifen: 339 %	Genistein: 36 %

^a Die relative Bindungsaffinität ist das Verhältnis der Konzentration von 17- β Östradiol (E₂) und des jeweiligen Gegenspielers, welche notwendig ist, um 50 % des radioaktiv markierten Liganden vom ER zu verdrängen (i.e.S. Ratio der IC₅₀ Werte). Die relative Bindungsaffinität von E₂ wurde willkürlich 100 gesetzt. Das Isoflavon Genistein hat mit 36 % eine stärkere Affinität zum ER β im Vergleich zum ER α (5 %).

Neben den komplexen Interaktionen zwischen den beteiligten Komponenten: Ligand, ER, ERE und regulatorischen Proteinen ist für die kardiovaskulären Effekte die höhere Genaktivität von ER β im vaskulären Gewebe von außerordentlicher Relevanz¹⁵⁸. Eine vermehrte Expression von ER β infolge einer Gefäßwandverletzung konnte in Endothel- sowie in glatten Gefäßmuskelzellen demonstriert werden²⁷. Dennoch scheint die durch 17- β Östradiol, Genistein und Daidzein hervorgerufene Hemmung einer Intimaneubildung nach Endotheldenudation³ ER-unabhängig zu sein³⁹. Studien mit ER-Knock-out-Mäusen weisen zudem auf eine äußerst komplexe Gewebsspezifität dieser Rezeptoren hin¹⁵⁹.

Die östrogene Aktivität von Isoflavonen wurde erstmals 1951 von Bennetts et al. beschrieben¹⁶⁰. Neben der fertilitätsmodulierenden Wirkung sind Isoflavone in der Lage, selektiv neuroendokrine Effekte hervorzurufen^{161,162}, die sexuelle Entwicklung zu hemmen¹⁶³ und das Uteruswachstum zu stimulieren^{164,165}. Bereits eine pränatale Phytoöstrogenexposition konnte die sexuelle Differenzierung erheblich beeinflussen¹⁶⁶. Während des zweiten Weltkrieges wurden Zyklusstörungen bei Frauen nach dem Verzehr von Tulpenzwiebeln, die reich an hormonell aktiven Substanzen sind, beobachtet¹⁶⁷. Ein vermehrter Sojaverzehr ist bei postmenopausalen Frauen außerdem mit einem erhöhten vaginalen Reifegrad assoziiert^{168,169}. Der erwartete östrogene Effekt von Soja konnte jedoch in Interventionsstudien bisher nicht eindeutig bestätigt werden¹⁷⁰⁻¹⁷². Dennoch, nach der Einnahme von Phytoöstrogenen wurden Veränderungen sowohl im Hormonmetabolismus¹⁷³⁻¹⁷⁶ als auch in der Zykluslänge prämenopausaler Frauen beobachtet^{162,177}. In Ländern, in denen Soja ein fester Bestandteil der traditionellen Ernährung ist, leiden postmenopausale Frauen weit weniger unter Wechseljahrsbeschwerden wie Hitzewellen und Schweißausbrüchen¹⁷⁸. Die geringere Inzidenz wird partiell auf den hohen Phytoöstrogenanteil in der Nahrung zurückgeführt. In zahlreichen Interventionsstudien wurde der Nutzen von Phytoöstrogenen zur Behandlung von klimakterischen Beschwerden untersucht, jedoch mit wenig überzeugenden Ergebnissen^{151,179-185}. Auf der Grundlage dieser Studien stellen weder Sojaproteinprodukte noch Isoflavone eine geeignete Alternative zur Behandlung von Wechseljahrsbeschwerden dar.

Hinsichtlich der hohen Selektivität und ausgeprägten Komplexität der endokrinen Wirkungen von Phytoöstrogenen bedarf es der individuellen Charakterisierung jeder einzelnen Substanz bezogen auf einen spezifischen Endpunkt¹⁸⁶.

4.2.3 Isoflavone und deren Wirkungen im Herz-Kreislaufsystem

Epidemiologischen Daten zufolge bietet eine phytoöstrogenreiche Ernährung einen gewissen Schutz vor Herz-Kreislauferkrankungen¹⁸⁷. Inverse Beziehungen wurden zwischen Sojakonsum und der Inzidenz von Herz-Kreislauferkrankungen, dem kardiovaskulären Risiko sowie der Anzahl vorliegender Risikofaktoren gefunden^{188,189}. Basierend auf diesen Erkenntnissen sind Phytoöstrogene in den vergangenen Jahren in den Mittelpunkt der kardiovaskulären Forschung gerückt. Im Hintergrund der mit einer HRT verbundenen Risiken ist die Akzeptanz pflanzlicher Produkte zur Behandlung von Wechseljahrsbeschwerden in der Bevölkerung enorm hoch¹⁹⁰.

³ katheterinduzierte Zerstörung der intimalen Gefäßschicht

Tabelle 4-2 Potentielle Wirkungsmechanismen von Isoflavonen im kardiovaskulären System

[Quelle: Cassidy et al. Exp Rev 2000 (5):1-15]

Eigenschaften	Mechanismen
antioxidative Aktivität	Hemmung der Oxidation von low-density lipoprotein (LDL) Stimulation antioxidativer Enzyme Induktion der Glutathionsynthese
cholesterinsenkende Wirkung	Stimulation der Gallensäuresekretion Erhöhung der LDL-Rezeptoraktivität Hemmung der Gallensäureresorption im Darm
genregulatorische Aktivität	Hemmung des NF- κ B-Signalweges Hemmung der Proteintyrosinkinaseaktivität Hemmung der induzierbaren NO-Synthase in Makrophagen Hemmung der Expression von Zelladhäsionsmolekülen und inflammatorischer Zytokine
Thrombozytenfunktion	Hemmung der Thrombozytenaggregation
direkte Effekte auf die Gefäßfunktion	Verbesserung der Endothelfunktion und der arteriellen Compliance Hemmung der Proliferation und Migration glatter Muskelzellen

4.2.3.1 Wirkungen auf Blutlipide

In der Mehrzahl aller Interventionsstudien sind die Auswirkungen von Soja oder Isoflavonen auf den Lipidmetabolismus untersucht worden. Im Primatenmodell reduzierte Sojaprotein die LDL-C- und VLDL-C-Spiegel um 30 bis 40 %¹⁹¹. Während die HDL-Konzentration in den meisten Studien unbeeinflusst blieb oder nur wenig stieg, konnte die cholesterinsenkende Wirkung, insbesondere für das nicht-HDL-Cholesterin durch weitere Tierexperimente^{192,193}, aber auch durch Humanstudien im sowohl männlichen¹⁹⁴ als auch weiblichen Geschlecht¹⁷⁷, bestätigt werden. Entsprechend deutlich wirkte eine Sojadiät der Entwicklung arteriosklerotischer Läsionen nach Ovariectomie⁴ entgegen^{89,193}. Das Ausmaß der Hemmung entsprach dem von Östrogen. Jedoch ist es spekulativ, ob dieser antiatherogene Effekt allein auf der günstigen Beeinflussung der Lipidspiegel beruht.

In einer 1995 an 38 klinischen Studien durchgeführten Metaanalyse wurde eine durchschnittliche Reduktion der GC-, LDL-C- und TG-Konzentrationen von 9,3 % (95 % CI 0,35 bis 0,85 mmol/L); 12,9 % (95 % CI 0,30 bis 0,82 mmol/L) und 10,5 % (95 % CI 0,003 bis 0,29 mmol/L) durch Sojaprotein (Durchschnitt 47 g/d) ermittelt¹⁹⁵. Auf der Basis dieser Ergebnisse erließ die Food and Drug Administration (FDA) ein ‚Health Claim‘, welches den Verzehr von täglich 25 g Sojaprotein als gesundheitsförderlich einstuft¹⁹⁶. Neben Mängeln im Studiendesign und in der statistischen Auswertung einiger der einbezogenen Studien liess die Tatsache, dass in der Hälfte aller Fälle keine oder nur marginale Abnahmen des Cholesterinspiegels erzielt wurden, Zweifel an der Gültigkeit des ‚Health Claim‘ aufkommen. Auch aktuellere Interventionsstudien konnten diese Zweifel nicht vollständig ausräumen¹⁹⁷⁻²⁰². Ob die hypocholesterämische Wirkung von Soja auf das Sojaprotein *per se* oder auf dessen Interaktion mit weiteren Komponenten in Soja zurückzuführen ist, ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. Zahlreiche Interventionen untersuchten in diesem Zusammenhang die Rolle der Isoflavone an Versuchstieren. Eine

⁴ Eierstockentfernung

Trennung der Sojaprotein-Isoflavon-Effekte wurde durch die randomisierte Applikation einer Sojadiät mit Isoflavonen (Soy+) und einer Sojadiät nach Alkoholextraktion der Isoflavone (Soy-) erreicht. In der Soy+ Gruppe waren die HDL- Spiegel generell höher und die LDL- und VLDL-Konzentrationen niedriger als in der Soy- Gruppe^{191,193,203}. Ungeachtet dessen bleiben Unklarheiten bezüglich der cholesterinsenkenden Aktivität von Isoflavonen, da Interventionen nach Rückführung des Alkoholextraktes und der reinen Isoflavone zum Sojaprotein^{204,205} oder nach Inkorporation der Isoflavone in eine andere Proteinmatrix (Casein, Lactalbumin)^{206,207} keinen positiven Effekt zeigten. Auch Humanstudien blieben hinsichtlich einer Identifikation der verantwortlichen Substanz im Sojaprotein erfolglos. Zwar wurde zwischen der Isoflavonkonzentration und der LDL- sowie VLDL-Konzentration eine Dosis-Wirkungsbeziehung ermittelt²⁰⁸⁻²¹⁰, die aber nicht in allen Studien konsistent war^{199,211}. Ebenso erfolgten nach Verabreichung von Isoflavonisolaten keine oder nur marginale Veränderungen der Blutlipide^{199,200,206,212-219}. Auf Grundlage der vorliegenden Studien ist der maximale cholesterinsenkende Effekt nur durch Aufnahme von intaktem Sojaprotein zu erreichen und kann nur eingeschränkt auf den Gehalt von Isoflavonen zurückgeführt werden. Komplexe Interaktionen zwischen Sojaprotein, Isoflavonen und anderen aktiven Komponenten der Sojamatrix (z.B. Phytine, Saponine) sind möglicherweise für diese Eigenschaft von Bedeutung²²⁰.

Da LDL dem Einfluss diverser anderer Faktoren unterworfen ist, stellt die initiale LDL-Konzentration einen wichtigen Confounder⁵ in klinischen Studien dar. Die durch Soja erzielten Reduktionen von LDL korrelierten signifikant mit den Ausgangscholesterinspiegeln^{199,208}. Weiterhin ist zu bedenken, dass die Wirkung von Isoflavonen in Abhängigkeit von der Darmflora individuell sehr unterschiedlich sein kann^{140,221}. Obwohl noch nicht experimentell bestätigt, wird davon ausgegangen, dass Equolproduzenten effektiver auf eine Isoflavonzufuhr reagieren als Nichtproduzenten²²².

Die cholesterinsenkende Eigenschaft von Soja basiert möglicherweise auf verschiedenen Mechanismen. Neben einer Hemmung der Cholesterinabsorption durch Sojaprotein²²³ konnte eine vorteilhafte Beeinflussung des Lipoproteinstoffwechsels durch Isoflavone^{204,224} und durch Sojapeptide²²⁵ nachgewiesen werden. Die Erhöhung der LDL-Rezeptoraktivität gekoppelt mit einer gesteigerten Gallensäuresekretion dürfte primär für die erhöhte Serum-LDL-Clearance verantwortlich sein^{226,227}.

4.2.3.2 Gefäßwand und Gefäßfunktion

Neben der cholesterinsenkenden Wirkung konnten direkte Effekte von Sojaprotein und Phytoöstrogenen auf die Gefäßwand demonstriert werden. Die Struktur der Gefäßwand wird entscheidend von endothelialen Faktoren beeinflusst. Das Endothel selbst bildet eine Barriere zwischen glatter Gefäßmuskulatur und mitogenen sowie chemotaktischen Substanzen. Endothelial gebildete Substanzen wie NO u.a. inhibieren die Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen, die Thrombozytenadhäsion und -aggregation sowie eine Interaktion von Leukozyten mit dem Endothel¹⁰⁰. Die mechanische Entfernung von Gefäßendothel durch Ballondilatation (engl. balloon catheter injury) induziert komplexe Interaktionen von sezernierten Faktoren aus geschädigten

⁵ Störfaktor: systematischer Fehler, der durch Verwechslung eines Expositionsfaktors mit einem anderen Faktor entsteht und zu einer Fehlinterpretation der Studienergebnisse führen kann.

Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Monozyten/Makrophagen und Thrombozyten⁴⁷. Dabei aktivieren freigesetzte mitogene Substanzen ruhende Muskelzellen, wodurch diese von einem normalen kontraktilem Phänotyp zu einem mehr proliferativen und sekretorisch aktiven Phänotyp transformieren. Die veränderten Muskelzellen wandern in die Intima, wo sie proliferieren und extrazelluläre Matrix synthetisieren²²⁸. Eine erhöhte Produktion mitogener Substanzen und eine verminderte Freisetzung endothelialer inhibitorischer Faktoren rufen eine unkontrollierte Hyperplasie mit Gefäßverengung hervor²²⁹. Es konnte gezeigt werden, dass Phytoöstrogene die Replikation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen *in-vitro*²⁷ ebenso effektiv hemmen, wie 17- β Östradiol. Genistein wurde außerdem als potenter Inhibitor einer Neointimabildung nach Ballondilatation identifiziert²⁸. Diese Proliferationshemmung war unabhängig vom ER-Signalweg und vergleichbar mit der von 17- β Östradiol³⁹. Obendrein sind Isoflavone offensichtlich in der Lage, über einen MAP-Kinase-gesteuerten Prozess in die Synthese extrazellulärer Matrix einzugreifen²³⁰. Diese *in-vitro* Daten implizieren eine potentielle Schutzwirkung von Phytoöstrogenen vor destruktiver Gefäßwandveränderung.

Die Integrität von Intima und Media ist Voraussetzung für die Aufrechterhaltung der normalen Gefäßwandfunktion. Eine wichtige Funktion der großen Leitungsgefäße ist es, den pulsatilen ventrikulären Blutfluß der Systole in einen gleichmäßigen Strom während der Diastole zu überführen (Windkesselfunktion) und damit die Versorgung der Koronarien und der peripheren Gefäße zu gewährleisten. Die sogenannte arterielle Compliance (Dehnbarkeit, Elastizität) wird vor allem durch das Verhältnis der Gefäßwandkomponenten Elastin, Kollagen und Proteoglykane sowie durch die Funktion der glatten Muskelzellen determiniert. Teede et al. (2003) untersuchten die Effekte von den Genistein- und Daidzeinvorläufern Biochanin A und Formononetin auf die biomechanischen Eigenschaften des arteriellen Gefäßsystems bei Männern und Frauen²³¹. Dabei konnte eine deutliche Verbesserung der Compliance im Formononetinregime beobachtet werden. In beiden Isoflavonregimen erfolgte außerdem eine vorteilhafte Verminderung der Pulswellengeschwindigkeit (PWV), welche ein indirektes Maß für die Steifheit der Gefäßwände darstellt. In anderen Studien verbesserte sich die arterielle Compliance in der Isoflavongruppe um jeweils 25 %^{213,214}. Daneben ermittelten van der Schouw et al. (2002) eine inverse Beziehung zwischen Phytoöstrogenverzehr und der PWV bei postmenopausalen Frauen²³². Zudem konnte nachgewiesen werden, dass der Schweregrad arteriosklerotischer Läsionen signifikant mit der Steifheit der Gefäßwände korreliert²³³.

Im Unterschied zur Compliancemesung spiegelt die endothelabhängige Vasodilatation zuverlässig die Integrität des Endothels wieder. Die endotheliale Freisetzung vasoaktiver Substanzen ist invasiv durch Infusion von Acetylcholin oder nichtinvasiv durch mechanische Beanspruchung (z.B. Dehnung) des Endothels einleitbar. In Tierversuchen erzeugte ein künstlich hervorgerufener Östrogenmangel eine Konstriktion nach Acetylcholininfusion, welche durch Applikation von 17- β Östradiol und Isoflavonen wieder aufgehoben werden konnte²³⁴. Im Primatenmodell rief die isoflavonhaltige Kost beim Vergleich von Soy+ und Soy-Diäten eine stärkere Vasodilatation arteriosklerotischer Gefäße hervor als Sojaprotein allein^{235,236}. Die kombinierte Verabreichung von Isoflavonen und Östrogen resultierte in einer Amplifikation des Effektes²³⁶. Zwar blieb diese Wirkung in einer vergleichbaren Studie aus, dennoch wurde eine deutliche Reduktion arteriosklerotischer Läsionen in der Soy+Gruppe festgestellt²⁰³. Ferner erfolgte nach Genisteininfusion in die Mikrozirkulation des

Unterarmes beim Menschen eine signifikante Erhöhung des Blutflusses infolge Vasodilatation²⁹. In mehreren *in-vitro* Studien wurde die konzentrationsabhängige vasodilatatorische Aktivität von Isoflavonen an Aortenringen eindeutig bestätigt^{133,237,238}. Diese Aktivität korrespondiert weitgehend mit der von 17- β Östradiol¹³³. Die Endothelabhängigkeit der isoflavoninduzierten Vasodilatation konnte durch Ausbleiben des Effektes nach Endothelentfernung sowie nach Applikation von eNOS-Antagonisten veranschaulicht werden. Neben der NO-Abhängigkeit sind möglicherweise auch kalziumantagonistischen und tyrosinkinaseabhängige Mechanismen an einer isoflavonvermittelten Vasodilatation beteiligt²³⁹⁻²⁴¹. In den letzten Jahren wurden zur Erhebung der Endothelfunktion zunehmend nichtinvasive Techniken in Humanstudien eingesetzt. Diese Studien werden ausführlicher in Abschnitt 4.3 diskutiert.

Trotz der vorliegenden Evidenz für das vasoaktive Potential von Phytoöstrogenen gibt es nur wenige Studien, die den Einfluss auf den 24-h Blutdruck untersuchten. Teede et al. (2001) konnten kleine, aber signifikante Reduktionen im Pulsdruck nach Verabreichung von Sojaprotein demonstrieren¹⁹⁸. Die Wirkung isolierter Isoflavone auf den Blutdruck ist bis dato noch nicht eindeutig definiert^{242,243}.

4.2.3.3 Antioxidative Eigenschaften von Isoflavonen

In Abhängigkeit von ihrer Struktur besitzen Phytoöstrogene eine mehr oder weniger stark ausgeprägte antioxidative Aktivität²⁴⁴. Ihre Fähigkeit, Radikale und Metallionen direkt zu deaktivieren, wird im Wesentlichen durch das Vorhandensein von Hydroxylgruppen in der C-5 und C-4' Position des Moleküls determiniert. Die antioxidative Aktivität von Isoflavonen, insbesondere Equol und Genistein, konnte *in-vitro* mit LDL-Cholesterin demonstriert werden^{245,246}. So wurde im Beisein von Phytoöstrogenen die experimentell induzierte LDL-Oxidation durch Verlängerung der Initiationsphase (engl. lag phase) signifikant gehemmt. Neben diesen direkten Effekten vermögen Phytoöstrogene die intrazelluläre antioxidative Kapazität durch Aktivierung protektiver Enzymsysteme (wie Katalase; Glutathionperoxidase, GPx; Superoxiddismutase, SOD) und durch Förderung der Bildung von Glutathion indirekt zu beeinflussen^{247,248}. Diese effektive Reduktion des oxidativen Stresses spielt mitunter eine wesentliche Rolle für die vasoprotektiven Eigenschaften der Isoflavone.

Im Gegensatz zu diesen Zellkulturstudien sind Ergebnisse von *in-vivo* Studien bisher nicht überzeugend. Bei einem Vergleich von Soy+ und Soy- Diäten bot die Soy+ Diät zwar einen effektiveren Schutz vor der LDL-Oxidation als die Soy-Diät^{249,250}, jedoch beruhte die erhöhte Resistenz von LDL gegenüber oxidativen Prozessen nicht auf einem vermehrten Einbau von Isoflavonen in die Partikel²⁵⁰. Die in einer anderen Studie beobachtete Hemmung der LDL-Oxidation erfolgte unabhängig von der Isoflavonkonzentration²⁵¹. Studien mit isolierten Isoflavonen blieben bisher erfolglos^{252,253}.

4.2.3.4 Entzündliche Prozesse und Zelladhäsion

Die Aktivierung des Endothels stellt einen wichtigen Schutzmechanismus der Gefäße zur Abwehr schädigender Einflüsse dar. Kennzeichen einer Endothelaktivierung ist die vermehrte Freisetzung chemotaktischer und inflammatorischer Zytokine sowie die gesteigerte Expression von vaskulären Zelladhäsionsmolekülen. Diese molekularen Veränderungen bewirken eine vermehrte Rekrutierung, Adhäsion und Migration von Leukozyten, die auch zentraler Ausgangspunkt für die Initiierung destruktiver Gefäßwandveränderungen sind. Entsprechend

korreliert die Konzentration zirkulierender Adhäsionsmoleküle mit dem Auftreten zukünftiger kardiovaskulärer Ereignisse ²⁵⁴. Die Synthese, Oberflächenexpression und Aktivität der Adhäsionsmoleküle werden vor allem durch inflammatorische Zytokine und Chemokine reguliert ²⁵⁵. Während P-Selektin und E-Selektin hauptsächlich für den ersten transienten Kontakt zwischen Leukozyten und Intima (Rollen) verantwortlich sind, bewirken ICAM-1 und VCAM-1 eine feste Anheftung an das Endothel ²⁵⁵. Nach Stimulation des Endothels erfolgt zunächst die schnelle Freisetzung von P-Selektin aus intrazellulären Speichern, wohingegen die Expression der anderen Adhäsionsmoleküle auf Basis der Transkription reguliert und durch Stimuli wie Interleukin-1 und Tumornekrosefaktor (TNF) induziert wird ²⁵⁶. Die meisten der für wichtige endotheliale Proteine kodierenden Gene besitzen in den Promotorregionen NF- κ B Erkennungssequenzen sowie AP-1 (engl. activator protein 1) Bindungsstellen für den c-fos Transkriptionsfaktor ²⁵⁷. Die Aktivität dieser Transkriptionsfaktoren wird im Wesentlichen durch den innerhalb der Zelle herrschenden Redoxstatus und durch Proteintyrosinkinasen reguliert. Dementsprechend sind Antioxidantien ²⁵⁸ und Tyrosinkinaseinhibitoren wie Genistein ²⁵⁹ in der Lage, die NF- κ B-Aktivierung wirksam zu blockieren, wogegen eine Daidzeinapplikation wirkungslos ist. Die kurzfristige Verabreichung von Isoflavonsupplementen verminderte *ex-vivo* die TNF α -stimulierte NF- κ B-Aktivierung ²⁶⁰. Eine Vorbehandlung von Endothelzellen mit dem potenten Proteintyrosinkinaseinhibitor Genistein resultierte in einer dosisabhängigen Hemmung der TNF α -induzierten Expression von Adhäsionsmolekülen ²⁶¹ und einer verminderten Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen ²⁶².

Unlängst konnte demonstriert werden, dass Isoflavone der Monozyteninfiltration auch durch Herunterregulation der MCP-1-Expression (engl. monocyte chemotactic protein-1) entgegensteuern können ²⁶³. In einer Studie mit MCP-1-Rezeptor-Knockout-Mäusen war der Verlust von MCP-1-Rezeptoren mit einer Reduktion arteriosklerotischer Läsionen assoziiert ²⁶⁴. Monozytäre Makrophagen repräsentieren den am häufigsten im Atherom vorkommenden Zelltyp. Im Rahmen von Entzündungsprozessen setzen Makrophagen durch Aktivierung der induzierbaren NOS (iNOS) zusätzlich zur basalen Produktion große Mengen an NO frei, welches in diesen Dimensionen zytotoxisch wirkt und Eindringlinge, Erreger oder veränderte Zellen abtötet. Eine stete Überproduktion von NO schädigt jedoch Endothelzellen und ist mit oxidativem Stress, chronischer Entzündung und letztendlich dem Verlust der vaskulären Homöostase verbunden ²⁶⁵. An Zellkulturen konnte gezeigt werden, dass Genistein und Daidzein in der Lage sind, die Interferon- γ -stimulierte NO-Produktion der iNOS zu hemmen ²⁶³. Hinsichtlich der Fähigkeit von Isoflavonen, den initialen Prozessen der Atherogenese entgegenzusteuern, könnte die Applikation von Phytoöstrogenen für die Primärprävention von Herz-Kreislaufkrankungen von großem Nutzen sein.

4.2.3.5 Isoflavone, Plättchenaktivität und Thrombogenese

Phytoöstrogene besitzen eine ausgeprägte antikoagulatorische Aktivität, die vor allem auf einer Hemmung der Thrombozytenaktivität und –aggregation basiert^{220,263}. Die grundlegenden molekularen Mechanismen sind noch nicht im Einzelnen bekannt. Es wird vermutet, dass die antioxidative Eigenschaft der Phytoöstrogene und deren Hemmung verschiedener Enzymsysteme, wie der Proteinkinase, der Phosphodiesterase oder auch der Lipoxxygenase hierbei eine Rolle spielen. Im Unterschied zu Östrogen^{112,266} wurde bisher in Interventionsstudien kein erhöhtes Thromboserisiko nach Einnahme von Soja bzw. Isoflavonen nachgewiesen²⁶⁷.

4.3 Nichtinvasive Messung der Endothelfunktion:

Wirkungen von Östrogenen, Isoflavonen und Homocystein

Das Endothel bildet eine einreihige Zellschicht, die das Lumen des arteriellen und venösen Gefäßsystems auskleidet. Es fungiert nicht nur als permeable Grenzmembran zwischen extra- und intravasalem Raum, sondern sezerniert ähnlich einer dynamisch arbeitenden endokrinen Drüse zahlreiche vasoaktive Substanzen, die an der Regulation von immunologischen Prozessen, der Gefäßwandarchitektur, der Blutgerinnung und Thrombozytenaggregation, dem Gefäßtonus und dem Blutdruck, sowie dem Stofftransport beteiligt sind ^{268,269}. Physiopathologische Stresssituationen setzen einen komplexen Prozess in Gang, der durch eine verstärkte endotheliale Ausschüttung von vasokonstriktiven, mitogenen, proinflammatorischen und prokoagulatorischen Substanzen und durch eine gesteigerte Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen gekennzeichnet ist ⁴⁷. Die Fähigkeit des Endothels, vasoaktive Substanzen als Antwort auf verschiedene Stimuli freizusetzen, reflektiert zumindest teilweise die Gesundheit desselben. Etablierte Risikofaktoren wie Rauchen, Dyslipidämie, Diabetes mellitus und Hypertonie wirken gefäßschädigend und können die regulatorischen Funktionen des Endothels beeinträchtigen. Da eine Störung der endothelialen Funktion bereits in der frühen präklinischen Phase einer makrovaskulären Erkrankung nachweisbar ist ¹⁰, kommt ihr in der Entwicklung von Arteriosklerose, Hypertonie, Thrombosen und Vasospasmen eine zentrale Bedeutung zu ²⁷⁰. Es ist entscheidend, dass nur ein intaktes Endothel in der Lage ist, die antiarteriosklerotischen Effekte von Östrogen zu vermitteln. Die in den Anfangsstadien einer Makroangiopathie sich entwickelnden Gefäßwandveränderungen sind in der Regel reversibel. Daher ist eine endotheliale Dysfunktion von grundlegender diagnostischer, therapeutischer und prognostischer Relevanz ²⁷¹. In Zellkulturstudien, isolierten Gefäßabschnitten, Tierversuchen und sogar in Humanstudien wurden verschiedene Methoden zur Diagnose einer gestörten endothelialen Balance getestet. Invasive Techniken erfassen Veränderungen des Blutflusses, des Gefäßwiderstandes und des Gefäßdurchmessers infolge Injektion vasoaktiver Substanzen ²⁷². Die hierbei am häufigsten eingesetzte Substanz ist Acetylcholin – ein potenter endothelabhängiger Vasodilatator. Im Unterschied zur invasiven Technik misst die nichtinvasive Methode Veränderungen im Gefäßdurchmesser nach flussinduzierter Stimulation des Gefäßendothels ¹⁰.

4.3.1 Methodik der flussinduzierten Vasodilatation

Der Gefäßtonus wird durch den Kontraktionszustand der glatten Muskelzellen determiniert und durch zirkulierende humorale Faktoren (Acetylcholin, Bradikinin, Angiotensin II) und hämodynamische Kräfte (z.B. Wandschubspannung, engl. shear stress) reguliert. Das Gefäßendothel fungiert dabei als Chemo- und Mechanosensor und sezerniert als Antwort auf diese Reize vasokonstriktorische oder vasodilatatorische Faktoren [Tab. 4-3]. Endotheliale Vasodilatoren sind NO, Prostazyklin und der endotheliale hyperpolarisierende Faktor, dagegen präsentieren Endothelin-1, Thromboxan A₂ und Prostaglandin H₂ wichtige Gegenspieler ²⁷³. Die Stimulation des Endothels mit einem Agonisten, wie z.B. Acetylcholin, bewirkt einen biphasischen Anstieg der

Tabelle 4-3 Endothelial sezernierte Faktoren

[Quelle: H. Drexler Am J Cardiol 1998 (82):3S-4S]

Vasodilatoren	Vasokonstriktoren
Stickstoffmonoxid	Angiotensin II
Bradykinin	Endothelin
Prostazyklin	Thromboxan A ₂
Endothelium-derived hyperpolarizing factor	Serotonin, Arachidonsäure, Prostaglandin H ₂ ,
Serotonin, Histamin, Substanz P	Thrombin, Nicotin
wachstumsstimulierende Faktoren	wachstumshemmende Faktoren
Platelet-derived growth factor	Stickstoffmonoxid, Prostazyklin
Basic fibroblast growth factor	Bradykinin
Insulin-like growth factor-1	Heparinsulfat
Endothelin, Angiotensin II	Transforming growth factor β
Adhäsionsmoleküle	Thrombolytische Faktoren
Endothelial leukocyte adhesion molecule	Tissue-type plasminogen activator
Intercellular adhesion molecule	Plasminogen activator inhibitor-1
Vascular cell adhesion moleküle	Thrombomodulin
*Serotonin fungiert als gefäßerweiternde (vasodilatatorisch) Substanz in normalen Blutgefäßen, jedoch produziert es eine paradoxe Gefäßverengung (Vasokonstriktion), wenn das Endothel beeinträchtigt ist.	

intrazellulären Kalziumkonzentration. Es wurde nachgewiesen, daß die Synthese endothelialer Vasodilatoren direkt von der Zellhyperpolarisierung abhängen ²⁷⁴. Um das Endothel vor einer mechanischen Schädigung zu schützen und eine adäquate Perfusion nachfolgender Organe zu gewährleisten, wird eine Vasodilatation auch durch eine gesteigerte Blutflussrate und eine damit einhergehende erhöhte Wandschubspannung ausgelöst. Die sogenannte flussinduzierte Vasodilatation (FMD) wird in Humanstudien zunehmend als Indikator für die Funktionsfähigkeit des Endothels eingesetzt, da eine gesteigerte Organperfusion (reaktive Hyperämie) durch kurzzeitige Minderdurchblutung (transiente Ischämie) nichtinvasiv induziert und mittels hochauflösenden Ultraschall gemessen werden kann ²⁷⁵. Wegen der minimalen Unterschiede in der Gefäßweite dürfen die Ausgangswerte nicht zu gering sein. Die Erhebung der FMD erfolgt daher für gewöhnlich an der Arteria brachialis des rechten Oberarmes. Die transiente Ischämie des Unterarmes wird experimentell durch eine für mindestens 4 Minuten auf 40 mmHg oberhalb des systolischen Blutdruckes aufgepumpte Blutdruckmanschette erzeugt. Der ischämische Stimulus ruft nach Deflation geringe aber detektierbare Veränderungen des Gefäßdurchmessers hervor. Diese Gefäßerweiterung beruht primär auf einer vermehrten endothelialen Freisetzung von NO ²⁷⁶, allerdings wurde auch eine Aktivierung mechanosensitiver nichtselektiver Kationenkanäle detektiert ²⁷⁷. Letztere ermöglichen einen direkten Kalziumeinstrom mit nachfolgender Hyperpolarisierung, wodurch die kalziumabhängige Synthese von NO aktiviert wird ²⁷⁴. Unabhängig davon wurde erst kürzlich der VEGF-Rezeptor-2 (engl. vascular endothelial growth factor receptor 2) als endothelialer Mechanotransduktor identifiziert, welcher über einen PI-3-K/Akt/Src-Signalweg ligandenunabhängig die eNOS aktiviert ²⁷⁸. Die NO-Abhängigkeit dieses Prozesses wurde 1995 von Joannides et al. durch Administration eines eNOS-Antagonisten (L-NMMA) bewiesen ²⁷⁹. Im Unterschied zu den Kontrollsubstanzen (u.a. Aspirin) blockierte L-NMMA die FMD zu 70 %.

Die Validierung der FMD erfolgte gegen Koronarangiographie. Es konnte eine gute Korrelation zwischen der koronaren Endothelfunktion und der brachialen FMD mit einem positiv prädiktiven Wert von 95 % ermittelt

werden ^{11,280}. Obwohl selten klinisch manifest, korreliert der Grad der arteriosklerotischen Gefäßwandveränderungen in der A. brachialis mit dem der Koronararterien und der Arteria Karotis ²⁶⁸. Kardiovaskuläre Risikofaktoren, einschließlich Rauchen, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie, männliches Geschlecht, Alter und Bluthochdruck sind mit einer verminderten FMD assoziiert ^{10,54-56}. Mit zunehmendem Alter erfolgt eine progressive Abnahme der Endothelfunktion ¹³. Daneben variiert die FMD in Abhängigkeit von externen Faktoren wie körperlicher Aktivität ²⁸¹ und Ernährung ²⁸². Eine einzelne fett- bzw. zuckerreiche Mahlzeit genügt, um die FMD um 50 % zu verringern ²⁸²⁻²⁸⁴. Neben diesen externen Confoundern erfordern ebenso die interindividuelle Beobachtbarvariabilität und die geringe Größe der zu erwartenden Veränderungen eine Durchführung der FMD unter standardisierten Bedingungen (z.B. nüchtern und in Ruhe) und von vorzugsweise derselben Person. Bei Vernachlässigung dieser Rahmenbedingungen sind die Ergebnisse wenig verlässlich ²⁸⁵. Die Confounder sind nicht nur im Studiendesign, sondern auch bei der Berechnung der Fallzahlen in Abhängigkeit von der individuellen Reproduzierbarkeit zu berücksichtigen. Beachtet man aber diese Faktoren, dann verfügt die FMD über eine hohe Genauigkeit und Reproduzierbarkeit ²⁸⁶.

4.3.2 Steroidhormone und Endothelfunktion

Bei postmenopausalen Frauen erhöht Östrogen den basalen Blutfluss, die Gefäßweite und vermindert den Gefäßwiderstand. In früheren Interventionsstudien erfolgte die Erhebung solcher Östrogeneffekte zumeist auf der Grundlage intraarterieller Acetylcholininfusion ^{52,272}. Die kurzzeitige Infusion von Östrogen verbesserte die Reaktion der Koronararterien auf Acetylcholin signifikant ²⁷². In neueren Studien wurde vermehrt auf nichtinvasive Verfahren, insbesondere die FMD zurückgegriffen. Fluktuationen der Endothelfunktion konnten in Abhängigkeit von der endogenen Östrogenproduktion nachgewiesen werden ²⁸⁷, mit einem Ansteigen der FMD in der folliculären und lutealen Phase (wenn die Östrogenspiegel hoch sind) und einem Absinken in der menstruellen Phase (wenn die Östrogenspiegel niedrig sind). Bei Frauen bis zum 50. Lebensjahr ist die FMD relativ konstant und nimmt mit Eintritt in die Wechseljahre stark ab ¹³. Beim männlichen Geschlecht hingegen ist eine Beeinträchtigung jener bereits in einem Alter von 40 Jahren messbar. Prämenopausale Frauen weisen im Vergleich zu postmenopausalen Frauen und Männern ähnlichen Alters eine höhere FMD auf, während dieser Unterschied bei postmenopausalen Frauen mit Hormonersatztherapie weniger stark ausgeprägt ist ²⁸⁸. Eine kurzfristige Verabreichung von Östrogen erhöht konzentrationsabhängig die FMD bei postmenopausalen Frauen ^{37,289}. Dagegen konnten nicht alle Interventionen mit langfristiger Östrogenadministration bisher Verbesserungen der FMD demonstrieren ^{14,30,38,290}. Unterschiede im Studiendesign, dem Behandlungsregimen, der Art (transdermal, oral, intravenös) und Dauer der Applikation erschweren einen Vergleich der Studienergebnisse.

4.3.3 Isoflavone und Endothelfunktion

Zwar wurde der Einfluss von Phytoöstrogenen und Sojaprotein auf die Endothelfunktion postmenopausaler Frauen in den letzten Jahren intensiv untersucht, jedoch ist es nicht möglich, aus den vorliegenden Ergebnissen eindeutige Schlussfolgerungen zu ziehen. In der ersten Studie erfolgte keine Veränderung der FMD nach achtwöchiger Verabreichung von 80 mg Isoflavonkonzentrat ²¹⁵. Dieser Negativeffekt wurde im Weiteren sowohl

mit isolierten Isoflavonen^{197,217,231,291} als auch mit Sojaprotein¹⁹⁸ bestätigt. Squadrito et. al. (2003) zeigten vor kurzem, dass die isolierte Gabe von Genistein die Endothelfunktion postmenopausaler Frauen ähnlich wie Östrogen verbessert. Diese Veränderungen wurden teilweise auf eine Erhöhung des NOx/Endothelin-1 Verhältnisses zurückgeführt³⁰. Weitere Studien folgten, die eine Verbesserung der FMD mit Sojaprotein nachwiesen^{200,292}.

4.3.4 Homocystein – Risikofaktor einer Endotheldysfunktion

Homocystein gilt als wichtiger, unabhängiger Risikofaktor einer endothelialen Dysfunktion⁸. Der Nachweis dafür wurde zunächst im Primatenmodell erbracht. In dieser Studie war eine experimentell induzierte, moderate Hyperhomocysteinämie mit einer beeinträchtigten *in-vivo* Endothelfunktion assoziiert²⁹³. Nach und nach konnte ein Zusammenhang zwischen Homocystein und endothelialer Dysfunktion auch in anderen Tierspezies^{294,295} und sogar im Menschen nachgewiesen werden^{296,297}. Die genauen Mechanismen einer durch Hyperhomocysteinämie hervorgerufenen endothelialen Dysfunktion sind noch nicht vollständig aufgeklärt, scheinen jedoch multifaktoriell zu sein. Weder die Expression der eNOS noch die nitroglycerininduzierte endothelunabhängige Vasodilatation sind während einer Homocysteinämie beeinträchtigt. Diese Erkenntnis weist auf eine relativ normale NO-Sensitivität der löslichen Guanylatzyklase in den glatten Muskelzellen hin²⁹⁸. Trotz normaler eNOS-Expression konnte eine beeinträchtigte NO-Bioverfügbarkeit bei Hyperhomocysteinämie beobachtet werden²⁹⁹. Über die Initiation reaktiver Sauerstoffspezies³⁰⁰ vermag Homocystein das Endothel nicht nur direkt zu schädigen, sondern auch eine oxidative Inaktivierung von NO³⁰¹, aber auch der eNOS²⁹⁹ hervorzurufen. Weiterhin wird ein Zusammenhang mit dem Inhibitor der eNOS - asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) vermutet, da zwischen beiden eine enge metabolische Beziehung besteht. Als kompetitiver Inhibitor bewirkt ADMA eine Entkopplung der eNOS und behindert dadurch die NO-Synthese³⁰². ADMA entsteht im normalen Proteinturnover bei der Hydrolyse von methylierten Proteinen. Die Methylierung von L-Argininresten innerhalb von Proteinen erfolgt im Rahmen der posttranslationalen Modifikation unter Wirkung von Proteinargininmethyltransferasen-1 (PRMT-1), die als Methylgruppdonor das Intermediat des Homocysteinmetabolismus S-Adenosylmethionin (SAM) nutzen und dabei den Vorläufer von Homocystein S-Adosylhomocystein (SAH) bilden³⁰³. Der metabolische Zusammenhang wurde sowohl *in-vitro*^{16,304} als auch in Humanstudien¹⁹ verdeutlicht, wo die diätetische Gabe von Methionin zu einem raschen Anstieg von Homocystein selbst und ADMA führte. Eine aktuelle Studie mit Cystathionin-β-synthasedefizienten Mäusen wies jedoch nach, dass oral zugeführtes Methionin nicht nur einen Anstieg von Homocystein sondern auch eine Akkumulation von SAH, einem potenten Inhibitor von SAM-abhängigen Transmethylierungsreaktionen, bewirkt²⁹⁴. Daraus wurde geschlossen, dass die Regulation der ADMA-Konzentration durch Homocystein möglicherweise über eine Beeinflussung des ADMA-Katabolismus gesteuert wird. Hinsichtlich Homocysteins oxidativer Eigenschaften und des Vorhandenseins von SH-Gruppen im katalytischen Zentrum des ADMA katabolisierenden Enzyms Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase 2 (DDAH-2), wird eine oxidative Inaktivierung nicht ausgeschlossen^{305,306}.

Ungeachtet der Interaktionen von Homocystein mit dem NO-Signalweg konnte jüngst ein Anstieg inflammatorischer Substanzen wie ICAM-1, MCP-1, Malondialdehyd sowie eine erhöhte Aktivität des

redoxsensitiven Transkriptionsfaktors NF- κ B nach experimentell induzierter Hyperhomocysteinämie beobachtet werden³⁰⁷. Erhöhte Konzentrationen inflammatorischer Moleküle stehen mit einer Endotheldysfunktion in engem Zusammenhang³⁰⁸⁻³¹⁰.

4.3.4.1 Homocystein-Östrogeninteraktion und Endothelfunktion

Die Rolle von Östrogen in der Prävention einer homocysteinvermittelten Endotheldysfunktion ist bisher nur in wenigen Studien untersucht worden. Smolders et al. (2004) testeten die Reaktion isolierter, vorkontrahierter Arteriolenringe von Ratten nach Inkubation mit Östrogen, einem Gemisch aus Östrogen und Homocystein sowie Östrogen in Kombination mit dem eNOS-Inhibitor L-NA³¹¹. Pathophysiologische Homocysteinkonzentrationen erhöhten die spontane Vasokonstriktion der Arteriolenringe um 6-10 % und inhibierten die durch Östrogen hervorgerufene endothelabhängige rapide (nichtgenomische) Vasodilatation. Ebenso wurde eine verminderte endothelabhängige Vasodilatation an koronaren Gefäßabschnitten von Schweinen nach Vorinkubation mit Homocystein im Vergleich zu Inkubationen mit Östrogen und mit einer Kombination aus Östrogen und Homocystein beschrieben³¹². Die Beeinträchtigung der Endothelfunktion ging mit einer deutlich gesteigerten Superoxidanionenproduktion und einer verminderten eNOS-Expression einher. Obwohl noch nicht durch Interventionsstudien *in-vivo* bestätigt, deuten diese Ergebnisse auf eine potentielle Schutzwirkung von Östrogen vor homocysteininduzierter Endotheldysfunktion hin.

4.3.5 ADMA – ein neuer kardiovaskulärer Risikofaktor

Neben Homocystein wurde kürzlich auch ADMA als Risikofaktor für eine ED identifiziert. ADMA-Konzentrationen sind erhöht in jungen, klinisch asymptomatischen Personen mit Hypercholesterinämie³¹³. Zudem korrespondieren ADMA-Spiegel mit dem Schweregrad einer makrovaskulären Erkrankung in Individuen mit peripherer arterieller Gefäßerkrankung und generalisierter Arteriosklerose¹⁵. Der ADMA-Anstieg in diesen Personen war mit einer verminderten NO-Produktion assoziiert, welche durch eine reduzierte renale Nitratexkretion, dem NO-Abbauprodukt, und eine beeinträchtigte endothelabhängige Vasodilatation nachgewiesen wurde. Darüberhinaus gilt ADMA als überaus starker Prädiktor von kardiovaskulären Ereignissen und der Gesamtmortalität in Hämodialysepatienten³¹⁴. In Personen ohne klinische Symptomatik korreliert die ADMA-Konzentration mit der karotidalen Intima-Media-Dicke³¹⁵. In einer weiteren Studie konnten ADMA und C-reaktives Protein (CRP) als unabhängige Prädiktoren der Progression intimaler Läsionen in Patienten mit renaler Dysfunktion, aber initial normaler Intima-Media-Dicke der A. Karotis identifiziert werden³¹⁶.

4.4 Ziele der vorliegenden Arbeit

Aktuelle Studien weisen auf eine effektive Senkung traditioneller (Blutdruck, Blutlipide etc.) und neuer kardiovaskulärer Risikomarker (Homocystein und ADMA) durch eine Östrogenbehandlung in postmenopausalen Frauen hin. Insbesondere Homocystein und ADMA stehen im Verdacht, eine endotheliale Dysfunktion mit eingeschränkter Bioverfügbarkeit des endothelialen Vasodilators NO hervorzurufen. Hormonersatztherapien konnten in der Vergangenheit erfolgreich die mittels NO-abhängiger flussinduzierter Vasodilatation gemessene Gefäßfunktion verbessern. Hinsichtlich eines deutlichen Anstiegs des Risikos von Thrombosen und malignen Erkrankungen im Zuge einer HRT-Anwendung steht heutzutage die Erforschung pflanzlicher Alternativen im Vordergrund.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden,

- ob diätetisch verabreichte Phytoöstrogene, speziell Sojaisoflavone, ebenso wie Östrogen einen positiven Einfluss auf die kardiovaskulären Risikofaktoren Blutdruck, Homocystein und ADMA bei postmenopausalen Frauen ausüben und
- inwieweit sich Veränderungen von Homocystein und ADMA auf die mittels FMD erhobene Endothelfunktion und die NO-Bioverfügbarkeit in dieser Zielgruppe auswirken und
- wie und mit welchen Unterschieden Equolproduzenten und Nichtequolproduzenten auf die erhobenen Endpunkte reagieren.

Diese Fragestellung wurde als ein Teilaspekt im Rahmen einer internationalen multizentrischen Interventionsstudie (Isoheart) bearbeitet. In dieser randomisierten, doppelblinden Studie wurden 117 europäischen Studienteilnehmerinnen in einer ersten achtwöchigen Interventionsphase täglich 50 mg Sojaisoflavone in Form von angereicherten Lebensmitteln oder ein identisches Plazebo verabreicht. In einer zweiten Interventionsphase erfolgte der Wechsel zum jeweils anderen Regime. Beide Interventionsphasen waren durch eine achtwöchige Wash-out-Phase voneinander getrennt.

5 Studiendesign und Untersuchungsmethoden

Die vorliegende Interventionsstudie ist zentraler Bestandteil eines von der Europäischen Kommission geförderten Forschungsprojektes ‚Isoheart‘ (isoflavones for reducing risk of coronary heart disease). Das Ziel dieser Interventionsstudie war es, die physiologischen Wirkungen von Sojaisoflavonen auf das Herz-Kreislauf-System postmenopausaler Frauen zu untersuchen. Die Interventionsstudie wurde in vier europäischen Zentren durchgeführt:

- The Royal Veterinary & Agricultural University, Department of Human Nutrition, Frederiksberg, Dänemark
- The University of Reading, Department of Food Science and Technology, Reading, Großbritannien
- Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione, Rom, Italien
- Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Potsdam-Rehbrücke, Nuthetal, Deutschland

Weitere Vertragspartner waren das Agrotechnical Research Institute ATO BV, Wageningen aus den Niederlanden, verantwortlich für Bioverfügbarkeitsstudien und die Produktion der Studienlebensmittel, sowie Unilever Research, Bedford (UK), welches die Analyse der Isoflavongehalte übernahm. Zahlreiche kardiovaskuläre Biomarker im Urin und Blut der europäischen Studienteilnehmerinnen wurden unter Anwendung neuester molekularbiologischer Methoden und proteombasierter Techniken in den verschiedenen europäischen Zentren analysiert. Zudem erfolgte die Erfassung funktioneller Parameter des Gefäßsystems, jedoch eingeschränkt in der deutschen und dänischen Subpopulation. In der vorliegenden Arbeit werden nur ausgewählte Parameter beschrieben und diskutiert, deren Analyse mit Ausnahme der Nitrit/Nitrat-Konzentration (NOx) und der Endothelfunktion von Kooperationspartnern des deutschen Zentrums erfolgten. Alle dargestellten Ergebnisse beziehen sich exklusive der Endothelfunktion auf die deutsche, dänische und britische Kohorte.

5.1 Studiendesign

Das Studienkonzept sah eine Gliederung in 5 Abschnitte vor [Abb. 5.1]:

Der erste Studienabschnitt umfasste zwei Phasen – die Rekrutierung und das Screening. Während die Rekrutierungsphase der Anwerbung potentieller Studienteilnehmer diente, erfolgte in einem Stufenverfahren in der zweiten Phase - dem Screening - die Auswahl geeigneter Probanden nach einem Kriterienkatalog.

Die eigentliche Studienphase begann mit der Run-in-Phase. Diese verfolgte das Ziel, die Phytoöstrogenaufnahme zu minimieren, um eine gemeinsame Ausgangsbasis für alle Studienteilnehmer zu schaffen. Die in dieser Periode erhobenen Messwerte dienten als Bezugsgröße (Baseline) für alle Ergebnisse aus den nachfolgenden Studienphasen.

Die Interventionsphase setzte sich aus zwei jeweils achtwöchigen Abschnitten (Arm-1 und Arm-2) zusammen, die durch eine achtwöchige interventionsfreie Phase (Wash-out-Phase) voneinander getrennt waren. Beide Interventionsphasen sahen eine Ernährungsintervention anhand zweier parallel geführter Studiengruppen mit einer Isoflavonphase und einer Placebophase vor. Die Zuteilung der Probanden zu einer der beiden Gruppen für die erste Intervention (Arm-1) erfolgte am Ende der Run-in-Phase randomisiert. Während der interventionsfreien Phase erfolgte ein Wechsel der Gruppen zum jeweils anderen Regime (Cross-over-Design) für die zweite

Intervention (Arm-2). Dieses Vorgehen ermöglichte eine Kontrolle innerhalb jeder Gruppe. Mit der Wash-out-Phase sollte die vollständige Clearance aller physiologischen durch die Ernährungsintervention potentiell beeinflussten Parameter sichergestellt werden.

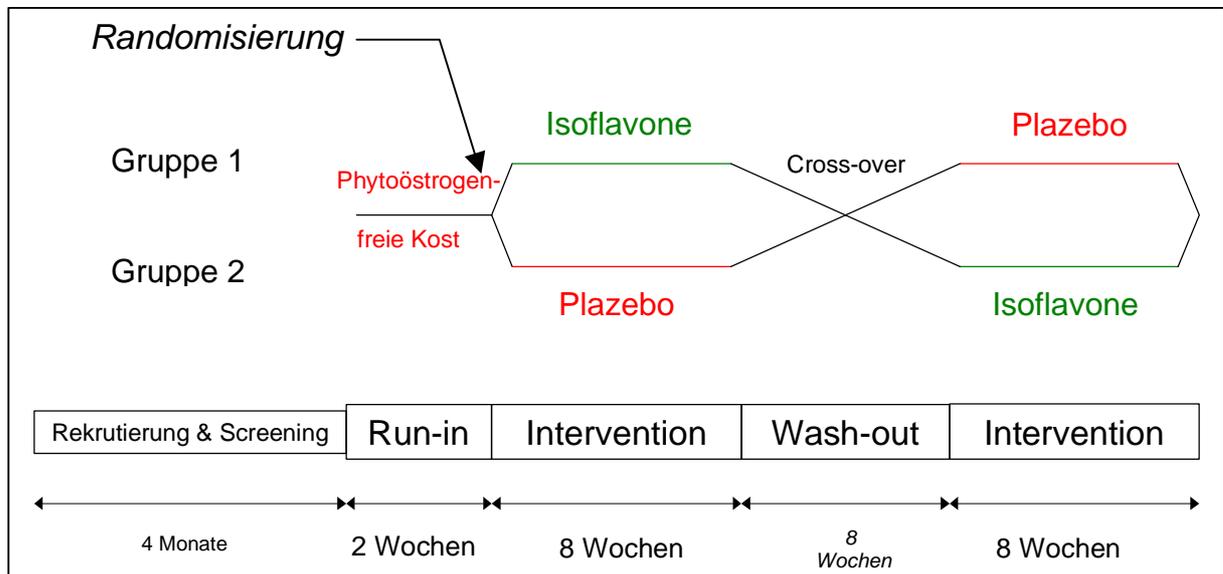


Abbildung 5-1 Studiendesign

5.1.1 Probandenrekrutierung und Anforderungsprofil

Gemäß Powerabschätzung und nach Einkalkulation von Dropouts wurde ein Stichprobenumfang von 35 Personen pro Zentrum angestrebt, um signifikante Veränderungen der Endothelfunktion nach Verabreichung der Isoflavone zu erzielen. Als Probanden kamen nur gesunde Personen mit einem leicht erhöhten Risiko für Herz-Kreislauferkrankungen in Betracht. Die Probandenrekrutierung erfolgte durch unterschiedliche Vorgehensweisen:

- Pressemitteilungen wurden in regionalen Zeitungen über die Pressestelle des Institutes veranlasst.
- Ehemalige Probanden der Abteilung wurden brieflich über die neue Studie in Kenntnis gesetzt. Umfangreiches Informationsmaterial wurde zur Verfügung gestellt.
- Zusätzlich wurden Informationsblätter in Frauenarztpraxen, gemeinnützigen Organisationen (Verein zweite Lebenshälfte) und öffentlichen Einrichtungen (Bibliothek, Urania, Charité) verteilt.

Die Rekrutierung und das Screening der deutschen Teilnehmer erstreckte sich von Januar bis einschließlich April 2003. Die Probandenauswahl erfolgte in einem zweistufigen Verfahren nach speziellen Ein- und Ausschlusskriterien [Tab. 5-1]. Mit Ausnahme der klinischen Parameter wurden alle Kriterien anhand eines standardisierten Fragebogens erfasst. Von insgesamt 385 Interessenten erwiesen sich 85 als potentiell geeignet. Im Rahmen einer morgendlichen Untersuchung im Studienzentrum wurde die endgültige Eignung der vorausgewählten Kandidaten festgestellt. Aus ärztlicher Sicht war diese gegeben, wenn das Ergebnis der medizinischen Anamnese, die Parameter der Nüchtern-Blutprobe und der Spontan-Urinprobe, sowie die

Ergebnisse der standardisierten anthropometrischen Messungen und der ambulanten Gelegenheitsblutdruckmessungen die Einschlusskriterien erfüllten. Von 55 so als geeignet ermittelten Frauen wurden 38 deutsche Studienteilnehmerinnen nach dem Zufallsprinzip ausgewählt.

5.1.1.1 Informationsveranstaltung

Vor Beginn der Run-in-Phase wurden die Probanden im Rahmen einer Informationsveranstaltung ausführlich über Zielsetzung und Ablauf der Interventionsstudie informiert. Danach erfolgte eine Einführung in die verschiedenen Untersuchungsmethoden und deren Voraussetzungen sowie eine ausführliche Einweisung in die Handhabung des Ernährungsprotokolls. Alle mündlich übermittelten Hinweise wurden ebenfalls in schriftlicher Form an die Studienteilnehmerinnen abgegeben. Diese Materialien enthielten neben Protokoll- und Durchführungsblätter für die einzelnen Untersuchungen ein individuell auf jede Probandin zugeschnittenes Studientagebuch. Dieses Buch beinhaltete einen detaillierten Zeitplan sowie eine Liste mit gängigen Sojaprodukten und anderen isoflavonhaltigen Lebensmitteln, die während der Studie gemieden werden sollten. Die Probanden wurden gebeten, ihren Riegelverzehr sowie eventuell auftretende Unverträglichkeiten, Erkrankungen und Medikamenteneinnahmen innerhalb des Studienzeitraumes auf speziell vorbereiteten Formularen zu dokumentieren. Durch das Unterschreiben der Einverständniserklärung wurde die Einwilligung zur Studienteilnahme abgegeben.

Tabelle 5-1 Kriterienkatalog des zweistufigen Auswahlverfahrens

<p>Einschlusskriterien:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Alter 45 - 70 Jahre • BMI 20 - 32 kg/m² • > 12 Monate seit letzter Menstruation
<p>Ausschlusskriterien des biochemischen Screening:</p> <ul style="list-style-type: none"> • wenn Postmenopause < 3 Jahre, Analyse von LH und FSH (<14 bzw. <41-124 IU/L) • Gesamtcholesterin > 8mmol/L • Triglyzeride > 3 mmol/L • Nüchtern-Glukose > 6,5 mmol/L • Hämoglobin < 120 g/L • pathologische Leber- oder Nierenwerte
<p>weitere Ausschlusskriterien:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hormonersatztherapie 6 Monate vor Studienbeginn • Stoffwechselerkrankungen (Diabetes mellitus, Hyperlipidämien) chronisch entzündliche Erkrankungen (Psoriasis, Arthritis, Morbus-Crohn etc.), Herz-Kreislaufkrankungen, Schlaganfall • unbehandelter Bluthochdruck > 160/90 mmHg • Einnahme von Antihypertensiva, Blutfettsenkern, Gerinnungshemmern (z.B. Aspirin), entzündungshemmenden Medikamenten (z.B. Ibuprofen) • Antibiotikaeinnahme oder Impfung 3 Monate vor Studienbeginn • Blut- oder Plasmaspende 4 Monate vor Studienbeginn • Rauchen und Ex-Raucher < 12 Monate • Einnahme von Nahrungsergänzungsmitteln, Vitamin- und Mineralstoffpräparaten • Verzehr von Sojaprodukten (> 4 Portionen/Woche) oder Einnahme von phytoöstrogenhaltigen Präparaten • alternative Ernährungsformen, z.B. Vegetarismus oder Reduktionsdiäten • intensive sportliche Betätigung > 2 Stunden pro Woche • bekannte Allergie gegen para-Aminobenzoesäure (PABA)

5.1.2 Studienablauf

5.1.2.1 Run-in

Die Einteilung der Studienteilnehmer erfolgte in 8 Gruppen (A-H) mit je 4 Personen bzw. (I) mit 6 Personen. Die Intervention wurde durch die Run-in-Phase eingeleitet. Gruppe A startete als Erste, während jede weitere Gruppe jeweils um einen Tag versetzt die Studie begann. Von diesem Zeitpunkt an sollte das Studientagebuch täglich geführt werden. Die Studienteilnehmer wurden gebeten, ihre habituelle Ernährung über den gesamten Studienzeitraum beizubehalten. Sojaprodukte und Supplemente jeder Art waren vom Verzehr ausgeschlossen. Zu Beginn der Run-in-Phase erfolgte für den ersten Interventionszeitraum basierend auf einer Stratifizierung nach Alter, BMI und Triglyzeriden eine randomisierte Zuordnung aller Probanden entweder zu Isoflavonen oder zu Placebo. Am letzten Tag der Run-in-Phase erfolgte die Erhebung der Baseline-Werte.

Die Messungen umfassten:

- drei aufeinander folgende Gelegenheitsblutdruckmessungen,
- Anthropometrie (Gewicht, Taille- und Hüftumfang),
- Blutabnahmen, nüchtern,
- 24-Stunden-Urinsammlung,
- Bestimmung der Endothelfunktion nichtinvasiv,
- 3-Tages-Schätzprotokoll,

und wurden zum Ende jeder Interventionsphase (Woche 8) und der Wash-out-Phase wiederholt.

Die Lebensmittel für die erste Intervention wurden nach der ersten Untersuchung im Studienzentrum an die Probanden verteilt. Die Codierung der Studienlebensmittel durch den Hersteller erfolgte zur Verblindung mit A und B. Sowohl die Untersucher als auch die Studienteilnehmer erhielten erst nach Auswertung der Ergebnisse die Information, welches Lebensmittel die Isoflavone enthielt.

5.1.2.2 Erste Intervention

Im Anschluss an die Run-in-Phase begann die erste achtwöchige Interventionsperiode. Während dieser Zeit nahmen die Studienteilnehmer täglich zwei Portionen der Studienlebensmittel zu sich und dokumentierten den Verzehr im Studientagebuch. In der vierten Woche von Arm-1 erfolgten eingeschränkt nüchtern-Blutabnahmen und Blutdruckmessungen. Alle Parameter der Run-in-Phase wurden dann erst wieder am Ende der ersten Intervention in der Woche 8 ermittelt. Die Kontrolle von Körpergewicht, Taillen-Hüfte-Umfang und Medikamenteneinnahmen erfolgte zu jedem Untersuchungstermin.

5.1.2.3 Wash-out

Nach Beendigung von Arm-1 folgte die achtwöchige Wash-out-Phase, die der physiologischen Clearance diente. Zur Beurteilung eines Übernahmeeffektes wurden alle Parameter zum Ende der Wash-out-Phase wiederholt erhoben. Die Richtlinien und Rahmenbedingungen der Studie mussten daher auch in dieser Periode eingehalten werden. Mit der Aushändigung der Lebensmittel für die zweite Interventionsperiode erfolgte der Wechsel der Studienteilnehmer von Isoflavonphase zur Placebophase und vice versa (cross-over).

5.1.2.4 Zweite Intervention und Studienabschluss

Von der Wash-out-Phase erfolgte ein nahtloser Übergang zum Arm-2. Alle Untersuchungen wurden zu denselben Zeitpunkten (Woche 4 und Woche 8) und im gleichen Umfang wie bereits in der ersten Intervention durchgeführt. Nach Abschluss der Studie bekamen die Probanden ihre individuellen Zwischenergebnisse in Form persönlicher Auswertungen ausgehändigt. Die Abschlussveranstaltung beschränkte sich im Wesentlichen auf die Besprechung der Gefäßfunktionsmessung und relevanter Blutparameter, deren Ergebnisse jeder Studienteilnehmer in einem verschlossenen Kuvert überreicht bekam.

5.2 Studienlebensmittel und Compliance

Als Matrix für den Isoflavonextrakt (Solgen 40, Solbar Ltd., Israel; kommerziell erhältlich) dienten Müsliriegel auf Basis von Trockenfrüchten (Health & Diet, Ltd, Manchester, United Kingdom). Diese wurden in vier verschiedenen Geschmacksrichtungen (Haselnuss, Himbeere, Apfel-Kardamon, Aprikose-Mandel) angeboten. Jeder Müsliriegel (40 g) enthielt durchschnittlich 652 kJ Energie, 2,6 g Protein, 17,3 g Kohlenhydrate, 8,5 g Fett, 1,8 g Ballaststoffe und 0,012 g Natrium. Die angereicherten Müsliriegel hatten einen durchschnittlichen Isoflavongehalt (MW \pm SEM) von 29 ± 2 mg mit einem Genistein-Daidzein-Verhältnis von 2:1. Als Placebo diente ein identisches Lebensmittel ohne Isoflavone. Bezüglich der Verpackung aber auch der Konsistenz und der Sensorik war kein Unterschied zwischen den Lebensmitteln mit und ohne Isoflavone ausmachbar, so dass eine vollständige Verblindung sichergestellt war. Durch den täglichen Verzehr von 2 Portionen erfolgte eine Gesamtisoflavonzufuhr von 50 mg/Tag in der Isoflavonphase. Diese Konzentration entsprach im Mittel der mit der habituellen Ernährung zugeführten Isoflavonmenge in Japan und im pazifischen Raum ^{189,317}. Zur möglichst vollständigen Resorption der Isoflavone wurde ein Müsliriegel am Morgen und einer am Nachmittag verzehrt. Wegen des hohen Energiegehaltes sollten die Müsliriegel unter Auslassung anderer Lebensmittel in die normale Ernährung integriert werden. Die Kontrolle der Riegeleinnahme (Compliance) erfolgte durch Messung der Isoflavonkonzentration sowohl im Plasma als auch Urin der Probanden und durch Eintrag im Studientagebuch. Entsprechend führten die Studienteilnehmer jeweils zum Ende der Run-in-Phase, der Wash-out-Phase sowie beider Interventionenphasen eine 24-Stunden-Urinsammlung durch.

Auf der Grundlage zahlreicher Interventionsstudien, die 1995 in einer Metaanalyse von Anderson ¹⁹⁵ zusammengefasst wurden, verabschiedete die U.S. Food and Drug Administration 1999 ein ‚Health Claim‘, welches Sojaprotein ein kardioprotektives Potential bescheinigt ³¹⁸. Später empfahl die American Heart Association (AHA) eine tägliche Aufnahme von 25 bis 50 g Sojaprotein zur Senkung des LDL-Cholesterinspiegels ¹⁹⁶. Die effektiv wirksame Isoflavondosis wurde jedoch bisher nicht ermittelt. Es gibt bislang nur empirische Schätzungen, die sich an Beobachtungen einer frühen Studie orientieren. Nach dieser Interventionsstudie rief eine tägliche Zufuhr von 40 mg Isoflavonen signifikante Veränderungen im Menstruationszyklus prämenopausaler Frauen hervor ¹⁷⁷. Die empirisch ermittelte Konzentration von ≥ 50 mg ist weitgehend akzeptiert und dient als Grundlage für heutige Interventionsstudien.

Die Müsliriegel wurden vor Studienbeginn und während der Intervention auf den Isoflavongehalt und deren prozentuale Zusammensetzung geprüft. Die Analyse erfolgte in den Laboren von Unilever Research (Bedford, UK) unter Anwendung eines auf monoklonalen Antikörpern basierenden DELFIA assay (Dissociation Enhanced Lanthanide Fluorescent ImmunoAssay) mittels des AutoDelfia 1235 automatic immunoassay system (Perkin Elmer, Boston, USA). Die mittlere Isoflavonkonzentration von 29 ± 2 mg blieb während des gesamten Studienzeitraumes stabil. Das Isoflavonverhältnis des Extraktes entsprach weitestgehend dem der Sojabohne ³¹⁹ mit Genistein 28,9 %, Daidzein 10,5 % und Glycitein 2,0 % (ausgedrückt als Aglykon und zugehörige Glykoside) [Tab. 5-2]. Neunundneunzig Prozent der Isoflavone lagen in glykosidischer Form vor.

Tabelle 5-2 Zusammensetzung des Isoflavonextraktes

Isoflavon Isomere	Glykoside+Aglykone [%]	Aglykonanteil [%]	Anteil des Konjugates [%]
Daidzin	9,80	5,99	95,03
Genistin	27,74	17,34	
Glycitin	1,83	1,17	
Malonyl-Daidzin	0,12	0,07	2,26
Malonyl-Genistin	0,76	0,47	
Malonyl-Glycitin	0,05	0,03	
Acetyl-Daidzin	0,02	0,01	0,59
Acetyl-Genistin	0,12	0,07	
Acetyl-Glycitin	0,10	0,07	
Daidzein	0,52	0,52	2,12
Genistein	0,28	0,28	
Glycitein	0,07	0,07	
Summe	41,43	26,10	
		Verhältnis [%]	
Gesamt Daidzin & Daidzein [%]		10,47	
Gesamt Genistin & Genistein [%]		28,90	
Gesamt Glycitin & Glycitein [%]		2,06	

5.3 Untersuchungsmethoden

5.3.1 Anthropometrie

Die anthropometrischen Messungen umfassten neben der Dokumentation der Körperhöhe (Anthropometer, Siber und Hegner, Zürich) die Bestimmung von Körpermasse (Söhnle-Waage, Murrhardt) sowie von Taille- und Hüftumfang. Auf Grundlage dieser Messdaten erfolgte die Kalkulation des Body Mass Index (BMI) und der Waist-to-Hip-Ratio (WHR) nach folgenden Formeln:

$$\text{BMI} = \frac{\text{Körpermasse [kg]}}{(\text{Körperhöhe m})^2}$$

$$\text{WHR} = \frac{\text{Taillenumfang [cm]}}{\text{Hüftumfang [cm]}}$$

5.3.2 Gelegenheitsblutdruckmessungen

Die Bestimmung des Gelegenheitsblutdrucks basierte auf dem oszillometrischen Messprinzip. Dazu wurde ein vollautomatisches Oberarmblutdruckmessgerät (Boso medicus memory, BOSCH + SOHN, Jungeningen) mit digitaler Anzeige eingesetzt. Die infolge der Pulswellenwanderung hervorgerufenen Druckschwankungen (Oszillationen) innerhalb der Manschette werden durch Veränderungen der Luftströmung im Druckventil registriert und vom Mikroprozessor ausgewertet. Der große Vorteil dieser Technik liegt darin, dass im Gegensatz zur Messmethode nach Korotkov oder Riva-Rocci kein Mikrofon erforderlich ist.

Der arterielle Blutdruck wird gewöhnlich an einem oberflächlich gelegenen Gefäß des Armes, der Arteria brachialis, gemessen. Um eine optimale Signalübertragung zu gewährleisten, muss darauf geachtet werden, dass die Manschette am Oberarm möglichst zentral an der Arteria brachialis im Abstand von etwa 2,5 cm zur Ellenbeuge angebracht wird. Durch Aufpumpen der Manschette auf suprasystolische Werte wird das Gefäß zunächst okkludiert. Sinkt der Manschettendruck in den Bereich des systolischen Blutdruckes, erzeugt die gegen die Manschette anprallende Pulsdruckwelle Druckschwankungen zunächst mit zunehmender Amplitude. Nach dem Erreichen des Maximums im Bereich des mittleren arteriellen Druckes (MAP) erfolgt mit weiterem Abfall des Manschettendruckes eine sukzessive Abnahme der Amplitude. Erst wenn der diastolische Blutdruck deutlich unterschritten wird, verschwinden die Oszillationen.

Die Gelegenheitsblutdruckmessung wurde unter standardisierten Rahmenbedingungen durchgeführt. Die Studienteilnehmer waren angehalten, unmittelbar vor der Blutdruckmessung eine schwere körperliche Beanspruchung sowie eine starke psychische Erregung zu vermeiden. Die Messungen erfolgten im Sitzen nach einer 10-minütigen Ruhepause. Die Beine durften nicht überkreuzt werden und der linke Arm wurde in leicht angewinkelter Position auf einem Tisch positioniert. Der Arm musste frei sein und durfte nicht durch zu eng anliegende Oberbekleidung abgeschnürt werden. Die Manschette wurde so angelegt, dass der untere Manschettenrand etwa 2 cm oberhalb der Ellenbeuge abschloss und der aufpumpbare Gummiteil an der Innenseite des Oberarms im Bereich der A. brachialis lokalisiert war. Zwei Messwiederholungen erfolgten im zweiminütigen Abstand. Die systolischen und diastolischen Werte jeder Erhebung wurden gemittelt und zur Berechnung des mittleren arteriellen Blutdrucks herangezogen.

$$\text{MAP} = \frac{\text{Systolischer Blutdruck} - \text{Diastolischer Blutdruck}}{3} + \text{Diastolischer Blutdruck} \quad [\text{mmHg}]$$

5.3.3 Blutuntersuchungen

Morgendliche Blutabnahmen erfolgten im nüchternen Zustand beim Screening und an jedem der sechs Untersuchungstermine im Studienzentrum (Run-in, Wash-out, Woche 4 und Woche 8 vom Arm-1 und Arm-2). Die Blutentnahme wurde im Sitzen mit Hilfe eines geschlossenen Blutabnahmesystems vom ärztlichen Personal durchgeführt. Für das biochemische Screening wurden 9 ml Serum durch eine S-Monovette® mit Gerinnungsaktivator und 2,7 ml Plasma durch eine S-Monovette® mit K-EDTA als Antikoagulans (Sarstedt

AG&Co.KG, Nürnbrecht, Deutschland) zur Analyse von Gonadotropinen (luteinisierendes Hormon (LH), follikelstimulierendes Hormon (FSH)), metabolischer Parameter (Glukose, GC, TG, HDL), Leber- und Nierenfunktionswerte (Aspartat-Aminotransferase, Alanin-Aminotransferase, Gamma-Glutamyl-Transferase, Kreatinin) sowie zur Blutbildbestimmung entnommen. Die Sammlung der Blutproben während der Studie erfolgte mittels BD Vacutainer™ Blutentnahmesystemen (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) [Tab. 5-3]. Von jedem Probanden wurde am Untersuchungstermin jeweils eine mittlere Blutmenge von 35 ml gewonnen. Alle Plasmablutproben wurden unmittelbar nach Entnahme für 10 min bei 4°C und 1.600 x g zentrifugiert, aufgearbeitet und bis zur Analyse eingefroren. Zur vollständigen Gerinnung wurde Serumblut erst 45 min nach der Blutentnahme für 15 min bei 4°C und 3.000 x g zentrifugiert, aufgearbeitet und ebenfalls tiefgefroren.

Tabelle 5-3 Übersicht der biochemischen Parameter

Parameter	Matrix	Antikoagulanzen	Aliquot	Lagerung
Nitrit/Nitrat	Plasma	Na-Heparin	0,5 ml	- 80 °C
ADMA	Plasma	K-EDTA	2 ml	- 80 °C
Homocystein	Plasma	K-EDTA	2 ml	- 80 °C
Vitamin B-12 Folat	Plasma	K-EDTA	0,5 ml	- 80 °C
Isoflavone	Serum	Gerinnungsaktivator	4 ml	- 20 °C

Die Bestimmung des Blutbildes erfolgte mit Hilfe des Hämatologie-Analyser COBAS MINOS STE (Hofman-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, Schweiz). Die klinisch-chemischen Parameter der Screeninguntersuchung wurden am Selektiv-Analyser COBAS MIRA S (Hofman-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, Schweiz) auf Basis enzymatischer Farbttests mit kommerziell erhältlichen Kits (Axon Lab AG, Schweiz) ermittelt. Die Analyse der Gonadotropine führte die Abteilung Endokrinologie, Diabetes und Ernährungsmedizin der Charité – Universitätsmedizin, Campus Benjamin-Franklin (Berlin, Deutschland) unter Verwendung des Chemilumineszenz-Immunoassay-Systems IMMULITE 2000 (DPC Biermann GmbH, Bad Nauheim, Deutschland) durch.

Die Konzentrationsbestimmung der Stickstoffmetaboliten NO_x – als Summe von Plasmanitrat und -nitrit - erfolgte in Anlehnung an eine modifizierte Variante des Farbttestes nach Griess unter Einsatz eines reduzierten Nicotinamiddinucleotidphosphat (NADPH)-abhängigen Nitratreduktaseassays in den Laboren des Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione (INRAN, Rom, Italien). Das beim Abbau von Stickstoffmonoxid durch Reaktion mit Oxyhämoglobin im Blut entstehende Nitrat und Nitrit wird bei dieser Methode als Stickstoffmonoxidrepräsentant eingesetzt und quantifiziert. Das vorhandene Nitrat wird hierbei durch Vorinkubation der Blutproben mit Nitrat-Reduktase (*Aspergillus niger*) und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase zu Nitrit reduziert. Diese Reduktion verhindert eine Interferenz mit NADP⁺ in der nachfolgenden Griessreaktion. Im Gegensatz zu den weitaus sensitiveren Fluoreszenztechniken besitzt diese Methode den Vorteil, dass sie

nicht durch Interferenzen mit Plasmaproteinen gestört werden kann. Die Genauigkeit dieser Methode liegt zwischen 98-102 %³²⁰. Der inter-assay Variationskoeffizient (CV) beträgt < 7 %.

Die Plasma Homocystein - und die Vitaminanalysen (Vitamin B-12, Folat) wurden in der Abteilung für Klinische Chemie der Universität Magdeburg unter Anwendung eines Fluoreszenz-Immuno-Assays (Axsym analyzer, Abbott Laboratories, Wiesbaden, Deutschland) durchgeführt. Das EDTA-Blut für die Homocysteinbestimmung wurde bis zur Separierung max. 15 min bei 4°C gelagert, um eine nachträgliche Erhöhung des Homocysteinspiegels durch erythrozytale Produktion zu verhindern. Hyperhomocysteinämie wurde als tHcy > 15 µmol/L definiert³²¹. Die inter-assay CVs für alle Methoden liegen unter 5 %.

Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) wurde unter Anwendung der ELISA-Technik im Zentrallabor des Saarländischen Universitätskrankenhauses (Abteilung für Klinische Chemie, Homburg, Deutschland) mittels eines kommerziell erhältlichen ADMA-ELISA-Kits (DLD Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland) bestimmt. Dieser kompetitive Enzym-Immuno-Assay wurde entsprechend den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Vor der Analyse erfolgte die Derivatisierung unter Bildung von N-Acyl-ADMA. Die Emission wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Die Genauigkeit dieser Methode basiert auf der Wiederfindungsrate von ADMA. Letztere beträgt 89-105 %. Der intra-assay CV liegt bei 6 % und der inter-assay CV bei 9,5 %.

Die Bestimmung von Genistein, Daidzein und Equol im Blut und im Urin erfolgte auf der Grundlage eines neuen, validierten auf monoklonalen Antikörpern basierenden DELFIA (Dissociation Enhanced Lanthanide Fluorescent ImmunoAssay) unter Verwendung des AutoDelfia 1235 automatic immunoassay system (Perkin Elmer, Boston, USA) in den Laboren von Unilever Research (Bedford, UK)³²². Zur Generierung des Signals wurden je 25 µl Plasma mit einem Europium-beladenen Tracer (Labmaster Diagnostics Ltd., Turku, Finnland) und einem spezifisch gegen das jeweilige Isoflavon gerichteten monoklonalen Maus-Antikörper (Fortune Kohen, Weizmann Institute, Rehovot, Israel) inkubiert. Zur Quantifizierung wurde das Signal der Serumprobe mit einer für das entsprechende Isoflavon generierten Standardkurve verglichen. Der intra-assay CV für Serumgenistein mit einer Konzentration von 462,5 nmol/L liegt bei 4 % und der inter-assay CV bei 0,8 %. Die intra- und inter-assay CVs für Serumequol mit einer Konzentration von 97,5 nmol/L und Serum Daidzein mit einer Konzentration von 157,2 nmol/L betragen 2,9 % und 1,9 % bzw. 3 % und 0,6 %. Die Analyse aller Proben erfolgte stets probandenweise.

5.3.4 Endothelfunktionsmessungen

Eine endotheliale Dysfunktion gilt als frühes Indiz für eine sich langsam entwickelnde Gefäßerkrankung^{10,268}. Die Diagnose erfolgt noch nicht routinemäßig, wird aber zu Forschungszwecken nichtinvasiv mittels der flussinduzierten Vasodilatation (FMD) gestellt. Die FMD, die auf einer endothelialen Freisetzung von NO basiert²⁷⁹, ist durch Einleiten einer reaktiven Hyperämie induzierbar²⁶⁸. Eine Vasodilatation infolge physikalischer Beanspruchung kann weitgehend ausgeschlossen werden, da sich die maximale Gefäßerweiterung erst 45 – 60 s nach reaktiver Hyperämie einstellt³²³, nämlich wenn die Flussgeschwindigkeit sich bereits wieder im Normbereich befindet. Die FMD hat einen positiv prädiktiven Wert für eine koronare ED²⁸⁰, während eine beeinträchtigte FMD mit kardiovaskulären Risikofaktoren assoziiert ist^{13,54,55}. Querschnitts- und Longitudinalstudien weisen auf eine Verbesserung der FMD durch Östrogen hin^{35,132,324,325}, wenngleich auch die

Ergebnisse von Interventionsstudien nicht immer überzeugend sind ²⁹⁰ (Kapitel 4.3.2). Limitierende Faktoren dieser Technik sind eine schlechte Reproduzierbarkeit und eine starke Beobachterabhängigkeit. Die FMD steht außerdem unter dem Einfluss externer Faktoren (Kapitel 4.3.1). Zyklusabhängige Veränderungen der FMD ²⁸⁷ wurden in dieser Studie ausgeschlossen, indem nur postmenopausale Frauen ohne HRT-Anwendung teilnehmen durften. Die FMD-Messungen wurden durch einen einzigen erfahrenen Beobachter unter kontrollierten Bedingungen in einem temperaturstabilen Raum in supinaler Position des Probanden nach 15 Minuten Ruhe durchgeführt. Die Untersuchung erfolgte aufgrund einer zu dieser Tageszeit höheren dilatatorischen Kapazität der Arteria brachialis generell am Nachmittag drei Stunden nach der letzten Mahlzeiteinnahme ³²⁶. Aus Gründen der vasomodulierenden Aktivität verschiedener Nährstoffe, vor allem Fett ^{282,283}, Vitamin C ³²⁷, Vitamin E ³²⁸ und Zucker ²⁸⁴, wurden am Untersuchungstag standardisierte Mahlzeiten verteilt. Diese enthielten maximal 10 g Fett, 20-30 mg Vitamin C und 3 mg Vitamin E. Die Aufnahme von Koffein und Alkohol in jeglicher Form war nicht gestattet. Auch musste die Einnahme vasoaktiver Medikamente 24 Stunden vor Messbeginn ausgesetzt werden. Weiterhin waren nur leichte körperliche Aktivitäten am Tage vor der Messung zu erlaubt ³²⁹. Der Einfluss von Nikotin wurde ausgeschlossen ³³⁰, indem nur Nichtraucher mit mindestens 12 Monaten Abstinenz an der Studie teilnehmen durften.

Im Rahmen der zu Studienbeginn stattfindenden Informationsveranstaltung wurden die Probanden mündlich sowie schriftlich durch Mitgabe von Merkblättern ausführlich über den Ablauf und die notwendigen Voraussetzungen der Gefäßfunktionsmessungen in Kenntnis gesetzt. Die standardisierten Mahlzeiten bekamen die Probanden am Tage der Messung bei ihrem morgendlichen Blutabnahmetermin im Studienzentrum ausgehändigt.

Studienprotokoll

Die Erhebung der flussinduzierten Vasodilatation erfolgte nach der von Celermajer et al. beschriebenen Methode ¹⁰. Die Arteria brachialis wurde im B-Mode mit Hilfe eines hochauflösenden 10 MHz linear Array Schallkopfes und einem Standard Acuson 128 XP/10c-System (Acuson, Mountain View, California) visualisiert. Der Schallkopf wurde circa 5 cm oberhalb der Ellenbeuge so positioniert, dass das Gefäß im Ultraschallbild longitudinal abgebildet war. Nach Auffinden der besten Schallkopfposition (Winkel > 60°) zur Darstellung der anterioren und posterioren Gefäßwand wurden Arm und Schallkopf für die Dauer der gesamten Untersuchung fixiert. Nach Aufnahme des Ruhedurchmessers erfolgte die Einleitung der reaktiven Hyperämie durch vierminütige Inflation einer am Unterarm befestigten Blutdruckmanschette auf suprasystolische Werte [Abb. 5-2]. Die FMD wurde 60 Sekunden nach reaktiver Hyperämie aufgezeichnet. Zur Kontrolle erfolgte im Anschluss an einen zweiten Ruhescan 10 Minuten nach reaktiver Hyperämie die Einleitung der endothelunabhängigen Vasodilatation (GTN-MD), welche ein Maß für die Funktion der glatten Muskelzellen darstellt ³³¹. Die GTN-MD wurde durch sublinguale Applikation von 400 µg Nitroglyzerin induziert und der Gefäßdurchmesser 4 Minuten später aufgenommen. Die Messung der arteriellen Flussgeschwindigkeit erfolgte mittels gepulsten Dopplersignal im 70° Winkel zum Blutgefäß zu allen vier Zeitpunkten.

Bildanalyse

Die Ultraschallbilder wurden auf einer optischen Diskette gespeichert und computergestützt (Qlab, Philips Medizin Systeme GmbH, Hamburg, Deutschland) durch zwei unabhängige, verblindete Beobachter ausgewertet. Die Analyse des Gefäßdurchmessers eines 5 bis 10 mm langen Gefäßabschnittes erfolgte enddiastolisch (kontinuierliche EKG-Triggerung) und von zwei unterschiedlichen Herzzyklen. Der Gefäßdurchmesser gemessen nach Hyperämie (FMD) und Nitroglyzerin (GTN-MD) wurde prozentual auf den Ruhediameter bezogen.

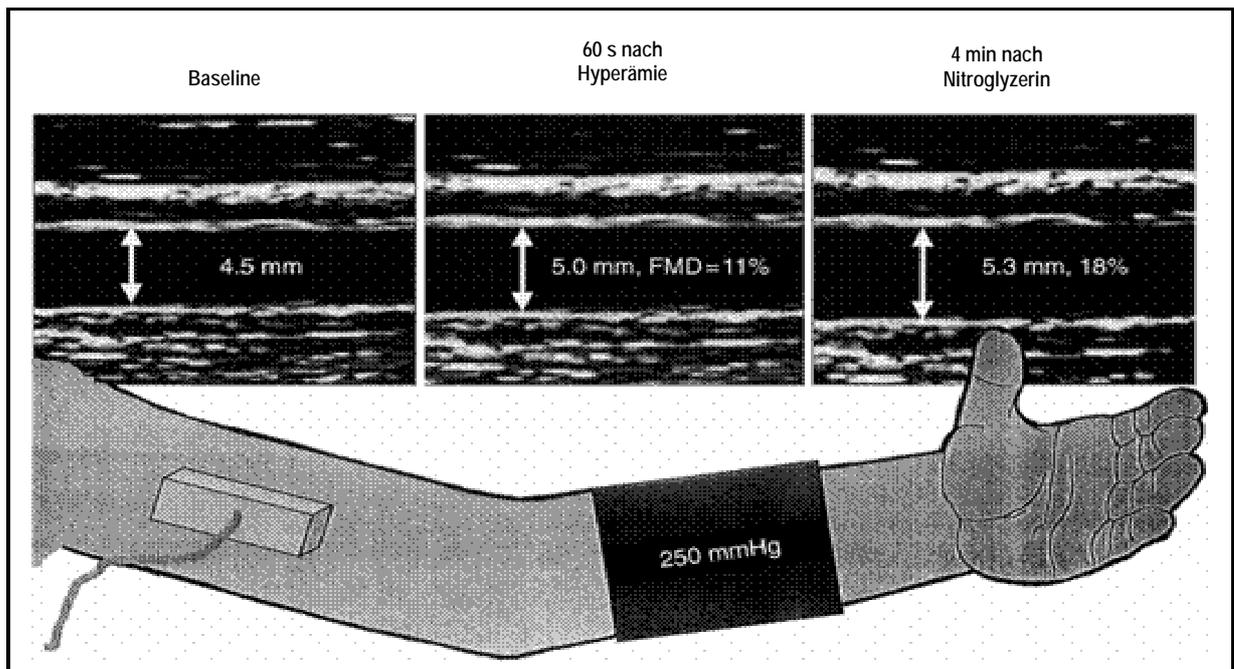


Abbildung 5-2 Der Gefäßdurchmesser der Arteria brachialis wird zu drei Zeitpunkten gemessen:

in Ruhe, während reaktiver Hyperämie, und nach Nitroglyzerinapplikation. Ein proximal zur Unterarmmanschette am Oberarm angebrachter hochauflösender Ultraschallkopf liefert zweidimensionale Ultraschallbilder des Blutgefäßes. (Quelle: Raitakari & Celermajer, Br J Clin Pharmacol 2000 50(5): 397-404)

5.3.5 Urinuntersuchungen

Das biochemische Screening schloss eine morgendliche Spontan-Urinprobe unter Anwendung der Mittelstrahlurintechnik (clean catch) ein. Unter Einsatz eines Urinstreifentests (Combur 9 Urinsticks, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) konnte das Vorhandensein aktuell vorliegender Entzündungen, Infektionen und Blutungen im Bereich der Nieren und Harnwege sowie extrarenaler Erkrankungen (Diabetes mellitus) bewertet werden.

Die Befolgung der Ernährungsintervention wurde durch die quantitative Beurteilung der zugeführten Isoflavone im 24-Stunden-Urin kontrolliert. Eine Analyse der Isoflavonausscheidung über den Urin ist insbesondere für die Beurteilung einer kurzzeitigen Isoflavonexposition über die Nahrung geeignet^{332,333}. Maximale Genistein- und Daidzeinurinkonzentrationen können bereits 8-12 Stunden nach oraler Zufuhr von Isoflavonglykosiden detektiert werden, während die vollständige renale Clearance innerhalb von 48 Stunden erfolgt^{145,146}.

Eine grundlegende Voraussetzung für die Messung der Isoflavonkonzentrationen ist die Vollständigkeit der 24-Stunden-Urinsammlung. Als Kontrollsubstanz und Bezugsgröße diente para-Aminobenzoessäure (PABA). PABA ist Bestandteil des Vitamin-B-Komplexes und gilt deshalb als unbedenklich. Auf der Grundlage der vollständigen renalen Clearance innerhalb von 24 Stunden wird PABA seit Jahren zur Überprüfung der Vollständigkeit von 24-Stunden-Urinsammlungen in Humanstudien eingesetzt ³³⁴. In der European Prospective Investigation into Nutrition and Cancer – EPIC Studie wurde in einer Kohorte von 1000 Personen eine Korrelation von 0,8 bis 0,9 zwischen dem Stickstoff-Gehalt der Urinproben und dem PABA-Gehalt ermittelt ³³⁵.

Die Absorption von PABA im Dünndarm erfolgt weitgehend unabhängig von Nahrungsbestandteilen und der PABA-Konzentration durch einfache Diffusion. In den Lebermikrosomen wird PABA durch Phase-II-Enzyme konjugiert oder acetyliert. Die dabei entstehenden Metabolite, darunter das Hauptabbauprodukt para-Aminohippursäure (PAHA), werden innerhalb von 24 Stunden vollständig über glomeruläre Filtration und aktive tubuläre Sekretion ausgeschieden.

Am Tage der Urinsammlung wurden drei Tabletten mit je 80 mg PABA (Fontane-Apotheke, Ludwigsfelde) zu den drei Hauptmahlzeiten eingenommen. Bei einer Wiederfindungsrate von 85-110 % PABA im 24-Stunden-Urin gilt die Sammlung als vollständig ³³⁶. Eine geringere Ausscheidungsquote ist auf eine nicht vollständig durchgeführte Urinsammlung oder eine nicht korrekte PABA-Einnahme zurückzuführen. Ausscheidungsquoten über 110 % können aus einer zusätzlichen Einnahme PABA-haltiger Medikamente (z.B. Paracetamol) resultieren. Die Probanden wurden ausführlich über den Zweck der PABA-Einnahme unterrichtet und auf einen Verzicht von Paracetamol während der 24-Stunden-Urinsammlung hingewiesen.

Der 24-Stunden-Urin wurde jeweils zum Ende der Studienphasen Run-in, Wash-out sowie beider Interventionsperioden am Tag vor einer nüchtern-Blutentnahme gesammelt. Vor Studienbeginn erfolgte eine ausführliche Einweisung der Studienteilnehmer in die Notwendigkeit der Urinsammlung sowie in die Handhabung der Materialien und der zugehörigen Urinprotokolle. Vor Ausgabe der Urinsammelbehälter (C. Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) bekamen diese zur Unterbindung des Geruchs und des Wachstums mikrobieller Keime 2 g kristalline Borsäure (Fluka, Buchs, Schweiz) zugesetzt und im Anschluss wurde das Leergewicht ermittelt. Nach Durchführung der jeweiligen Urinsammlung erfolgte die Bestimmung von Urinvolumen und –masse. Anschließend wurde der Urin gründlich homogenisiert, aliquotiert (Polypropylentubes, C. Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und bis zur Weiterverarbeitung bei –20 °C gelagert. Die PABA-Analyse und die quantitative Bestimmung der Isoflavonmetaboliten erfolgte in den Laboren von Unilever Research (Bedford, UK). Die PABA-Konzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 540 nm unter Verwendung einer Standardverdünnungsreihe nach alkalischer Hydrolyse der PABA Metaboliten ermittelt. Die Quantifizierung der Isoflavonmetabolite im Urin erfolgte in Anlehnung an das Protokoll für die Serum-Isoflavonbestimmung unter Einsatz des AutoDelfia Immuno-Assay Systems (Perkin Elmer, Boston, USA). Die Glukuronidierung der Isoflavonmetaboliten in der Leber durch Phase-II-Enzyme ist eine grundlegende Voraussetzung für die renale Ausscheidung dieser stark lipophilen Substanzen. Um Interferenzen mit den konjugierten Glukuronsäuregruppen zu vermeiden, wurden die Urinproben vor der Analyse mit Glukuronidase inkubiert.

5.3.6 Erfassung der Energie- und Nährstoffzufuhr

Zur Dokumentation der allgemeinen Ernährungsgewohnheiten sowie der Nährstoff- und Energiezufuhr während des Studienzeitraumes wurden 3-Tages-Schätzprotokolle eingesetzt. Anhand der Berechnung von Makronährstoffen sollte überprüft werden, ob sich die Ernährung, insbesondere die Energieaufnahme, während der Interventionsphasen durch den Konsum der Studienlebensmittel signifikant veränderte.

Die Mengen der verzehrten Lebensmittel und Getränke werden bei dieser Art von Verzehrprotokoll in haushaltsüblichen Maßen (Esslöffel, Teelöffel, Scheibe etc.) angegeben. Diese Methode ist zwar weniger präzise als der ‚Golden Standard‘ der prospektiven Ernährungserhebungsinstrumente – das Wiegeprotokoll – wird aber in Anbetracht der relativ einfachen Handhabung bevorzugt als Kontrollelement in Ernährungsinterventionen eingesetzt (Preparation and use of food based dietary guidelines, World Health Organisation, 1996).

Die Probanden wurden im Vorfeld intensiv im Umgang mit den Schätzprotokollen geschult. Diese Schulung beinhaltete neben einer Einweisung in die haushaltsüblichen Maße eine ausführliche Anleitung, wie die einzelnen Lebensmittel und Getränke protokolliert werden. Das 3-Tage-Schätzprotokoll wurde mit Ausnahme des Screenings einmal in jeder Studienphase geführt.

Die Auswertung der Schätzprotokolle der deutschen Teilnehmer erfolgte computergestützt mit der Ernährungssoftware Prodi 4.5/04 LE expert 2001 (Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart). Als Datenbasis für die Nährwertberechnung diente der Bundeslebensmittelschlüssel Version II.2 (BLS II.2, 1994).

Alle anderen Studienzentren nutzten nationale Datenbanken, die speziell auf die Verzehrsgewohnheiten des Landes zugeschnitten sind und Nährstoffangaben landestypischer Produkte enthalten (UK: Software WinDiets produced by Robert Gordon University Aberdeen, Datenbank: McCance and Widdowson's ‚The Composition of Foods‘ 6th Summary ed., 2002; Dänemark: Dankost 2000 dietary assessment software (National Food Agency); Italien: INRAN Diario 2.2³³⁷).

5.3.7 Statistische Auswertung

Alle in der vorliegenden Arbeit dargestellten Parameter sind als Median und Perzentile [25; 75] angegeben mit Ausnahme der Gruppencharakteristika und der Differenzen, die als Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt wurden. Die Auswertung von Behandlungsdifferenzen (Plazebo vs. Isoflavone) erfolgte mittels der PROC MIXED Prozedur (einem gemischten linearen Modell; GLM) in SAS 8.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC). Die Veränderungen von Baseline dienten dabei als unabhängige Variable. Bei fehlender Normalverteilung wurden die Originaldaten logarithmiert. Die Probandennummer wurde als zufälliger Faktor in das Modell mit einbezogen, um die Ergebnisse für alle postmenopausalen Frauen zu verallgemeinern und den Messwiederholungen Rechnung zu tragen. Das gemischte lineare Modell fand ebenso Anwendung bei der Testung auf Interventionseffekte (Woche 0 vs. Woche 24) und beim Vergleich der Baselinewerte in der Plazebo- und Isoflavonperiode. Da zu Beginn der Studie bereits eine randomisierte Stratifizierung bezüglich Alter, BMI und Triglyzeriden stattfand, wurden als feste Kovariaten der Baselinewert, die Behandlung (Plazebo/Isoflavone), die

Nationalität (nicht für Gefäßparameter), die Behandlungsreihenfolge (A/B), der Equolstatus und die Periodizität (nur für Blutdruck) definiert. Im Falle signifikanter Effekte wurden zusätzlich folgende Wechselwirkungen in das Modell mit eingeschlossen: Behandlungsreihenfolge*Behandlung, Baseline*Behandlung und Nationalität*Behandlung. Unterschiede zwischen den randomisierten Gruppen zu Baseline wurde unter Anwendung der univariaten Varianzanalyse (ANOVA) in SPSS 11.5 (SPSS Inc., Chicago, IL) ermittelt. Alle Korrelationen sind als Spearman Rho Koeffizient angegeben und wurden ebenfalls in SPSS berechnet. Für die Testung wurde ein zweiseitiges Signifikanzniveau von $P < 0,05$ festgelegt.

6 Ergebnisse

6.1 Veränderung im Stichprobenumfang und allgemeine Charakteristika

Von 133 Teilnehmern beendeten 117 Frauen die Studie. Die Drop-out Rate betrug 12 % (N=16). Insbesondere gesundheitliche Probleme und der hohe zeitliche Aufwand führten zum Ausscheiden einiger Teilnehmer. Tabelle 6-1 gibt Auskunft über die Anzahl der Studienteilnehmer in den einzelnen europäischen Subkohorten zu Beginn und zum Ende der Interventionsstudie.

Tabelle 6-1 Zusammensetzung der Subkohorten entsprechend der Nationalität zu Beginn und nach Beendigung der Interventionsstudie

Nationalität	Dänemark	Deutschland	Großbritannien	Italien
Einschluss	N=30	N=38	N=31	N=34
Studie beendet N=117	N=28 93 %	N=34 90 %	N=27 87 %	N=28 82 %

Aufgrund von Problemen bei der Aufbereitung des biologischen Materials der italienischen Subkohorte beziehen sich die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse nur auf Daten der dänischen, deutschen und britischen Studienpopulationen.

Wie bereits in Kapitel 5.1.2.1 beschrieben erfolgte die Zuordnung der Gruppen stratifiziert randomisiert nach Alter (P=0,292; one-way ANOVA), BMI (P=0,842) und Triglyzeriden (P=0,648). Trotz Ausscheidens einiger Studienteilnehmer erfolgte keine signifikante Veränderung der Gruppencharakteristika. Die Charakteristik der Gesamtpopulation (N=89) stellt sich wie folgt dar [Tab. 6-2]:

Tabelle 6-2 Charakteristika der Studienpopulation

N=89	Kohorte A ⁶		Kohorte B ⁶		Insgesamt	
	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM
Alter [Jahre]	59	0,75	58	0,86	59	0,57
BMI [kg/m ²]	24,6	0,46	24,5	0,42	24,5	0,31
SBP [mmHg]	124	2	121	3	123	2
DBP [mmHg]	77	1	74	1	76	1
Glukose [mmol/L]	5,21	0,07	5,05	0,07	5,13	0,05
GC [mmol/L]	5,96	0,12	6,19	0,15	6,07	0,09
LDL-C [mmol/L]	3,60	0,11	3,82	0,13	3,71	0,09
HDL-C [mmol/L]	1,84	0,06	1,83	0,06	1,84	0,04
Triglyzeride (mmol/L)	1,13	0,07	1,18	0,08	1,16	0,05

Standardfehler des Mittelwertes (SEM), Body Mass Index (BMI)

⁶ Kohorte A=Arm-1 Plazebo; Kohorte B=Arm-1 Isoflavone

Während der Intervention klagten 49 % der Studienteilnehmerinnen (DK N=8 vs. GER N=27 vs. UK N=9) über gastrointestinale Probleme, darunter vor allem Obstipation, Diarrhoe und Flatulenz. Diese Symptome traten sowohl während der Isoflavon- als auch während der Plazebophase auf. Eine isoflavonspezifische Reaktion wurde somit ausgeschlossen. Weiterhin berichteten Probanden vereinzelt über vermehrte Hitzewallungen (DK N=3, GER N=7, UK N=2), und insbesondere in der deutschen Kohorte wurde über eine erhöhte Reizbarkeit (N=7) und vermehrtes Brustziehen (N=4) geklagt. Die Veränderung der spezifischen Menopausensymptome war jedoch unabhängig von der Art der Behandlung.

6.2 Compliance und Phytoöstrogenausscheidung

Die Analyse der Phytoöstrogenausscheidung im 24-h Urin zur Baseline und in den Wochen 8 beider Interventionsphasen erfüllte zwei wichtige Zwecke. Einerseits gab sie Aufschluss über die basal endogen zirkulierende Phytoöstrogenmenge im Organismus zur Baseline, was insbesondere eine Abschätzung der Phytoöstrogenaufnahme mit der üblichen Ernährung zulässt. Andererseits wurde damit die Compliance der Probandinnen während der Intervention beurteilt, da ein Anstieg der Isoflavone im Plasma in der Isoflavonphase erwartet werden konnte. Die beiden randomisierten Gruppen unterschieden sich nicht signifikant bezüglich der basalen Phytoöstrogenexkretion ($P > 0,05$; one-way ANOVA). Wie erwartet stieg in der Isoflavonphase die Ausscheidung von Daidzein um das 50-fache (von 48,4 [30,0; 107,8] ng/mL auf 2420,0 [1645,0; 3330,0] ng/mL Urin, $P < 0,001$), von Genistein um das 21-fache (von 152,0 [107,0; 236,0] ng/mL auf 3170,0 [2425,0; 4445,0] ng/mL Urin; $P < 0,001$) und von Equol um das 2-fache (von 39,9 [27,0; 59,3] ng/mL auf 93,7 [54,9; 571,0] ng/mL Urin, $P < 0,001$), während sich die renale Phytoöstrogenexkretion in der Plazebophase nicht signifikant veränderte (DAI: von 55,2 [31,8; 136,5] auf 54,2 [29,9; 128,5] ng/mL Urin; GEN: von 156,0 [116,0; 215,0] auf 152,0 [96,3; 278,5] ng/mL Urin; EQU: von 43,7 [25,4; 60,2] auf 40,4 [29,7; 56,3] ng/mL Urin) [Abb. 6-1]. Große interindividuelle Schwankungsbreiten für die Phytoöstrogenausscheidung im Urin konnten dokumentiert werden.

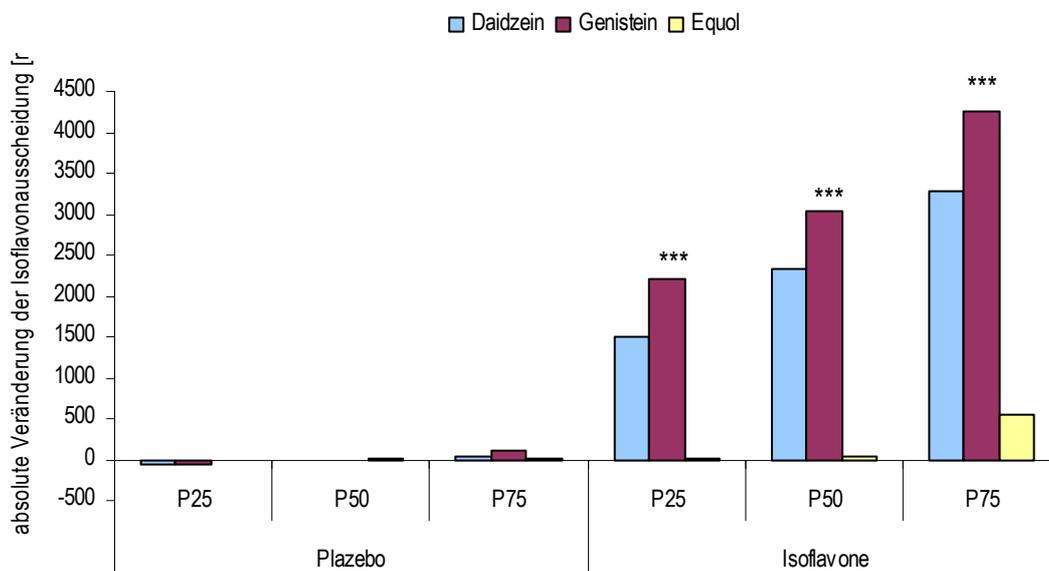


Abbildung 6-1 Vergleich der absoluten Veränderungen der Phytoöstrogenausscheidung, *** $P < 0,001$

Auch im Serum nahm die Isoflavonkonzentration erwartungsgemäß in der Isoflavonphase zu [Tab. 6-3].

Wie bereits in Kapitel 4.2 beschrieben zählen nur 30-50 % der Bevölkerung zu den so genannten Equolproduzenten, was sich deutlich in den Ergebnissen der paneuropäischen Interventionsstudie widerspiegelt [Abb. 6-2]. Die Kategorisierung in Equolproduzenten, grenzwertigen Equolproduzenten (Borderliner) und Nichtproduzenten basiert auf einer Definition von Setchell et al. (2002)³³⁸. Gemäß dieser erfolgt eine Einteilung in Equolproduzenten nur dann, wenn die Equolausscheidung im Urin den Grenzwert von 240 ng/mL (oder eine äquivalente Equolausbeute im Urin von > 0,45 mg/Tag) und die Konzentration im Serum 10 ng/mL überschreitet. Grenzwertige Equolproduzenten weisen vergleichbar hohe Ausscheidungsraten im Urin auf, haben jedoch wesentlich niedrigere Serumkonzentrationen (Borderliners > 240 ng/mL Urin, < 10 ng/mL Serum vs. Nichtproduzenten < 240 ng/mL Urin, < 10 ng/mL Serum).

Auffällig ist, dass keine homogene Verteilung der Equolproduzenten zwischen den einzelnen Subkohorten vorliegt [Abb. 6-3]. Während in der deutschen Studiengruppe die Hälfte aller Teilnehmerinnen (N=16) zu den Equolproduzenten gezählt werden können, ist die Prävalenz in der dänischen (N=6) und britischen (N=7) Subpopulation deutlich geringer (Germany 56,7 %, Denmark 20,0 %, UK 23,3 % P=0,036).

Länderunterschiede konnten für die Genistein- und Daidzeinausscheidung ermittelt werden (P<0,001). Während die britische Kohorte die höchste Ausscheidung von Genistein und Daidzein aufwies, hatten die deutschen Frauen die niedrigste Daidzeinexkretion (UK: 3015 ng/mL vs. DK: 2654 ng/mL, P=0,006 bzw. vs. GER: 1923 ng/mL, P<0,001) und die britische Kohorte die niedrigste Genisteinausscheidung (UK: 3591 mg/mL vs. GER: 2984 ng/mL, P=0,002 bzw. vs. DK: 2591 ng/mL, P<0,001).

Tabelle 6-3 Serumkonzentrationen der Phytoöstrogene zum Ende der Intervention

Zeitpunkt Woche 8	Behandlungsregimen		P
	Plazebo	Isoflavone	
Genistein [ng/mL]	0,69 [0,0; 2,65]	72,20 [38,70; 119,0]	<0,001
Daidzein [ng/mL]	8,41 [7,72; 9,82]	33,90 [22,30; 42,40]	<0,001
Equol [ng/mL]	0,01 [0,0; 0,27]	0,83 [0,38; 4,79]	<0,001

Angabe der Konzentrationen als Median und Perzentile [25;75]

Test auf signifikante Unterschiede in der Phytoöstrogenausscheidung Woche 8 mittels

one-way ANOVA; Baselinewerte unterscheiden sich nichtsignifikant (nicht abgebildet), adjustiert für Ausgangswerte

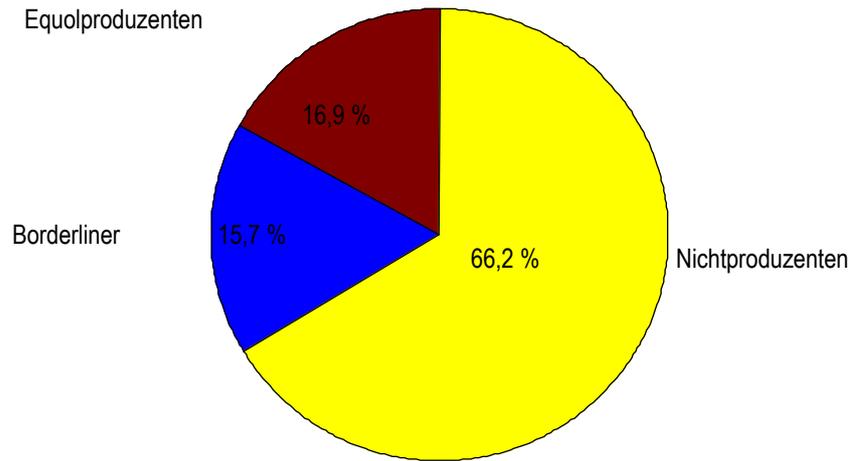


Abbildung 6-2 Klassifikation der Studienteilnehmer (N=89) hinsichtlich des Equolstatus

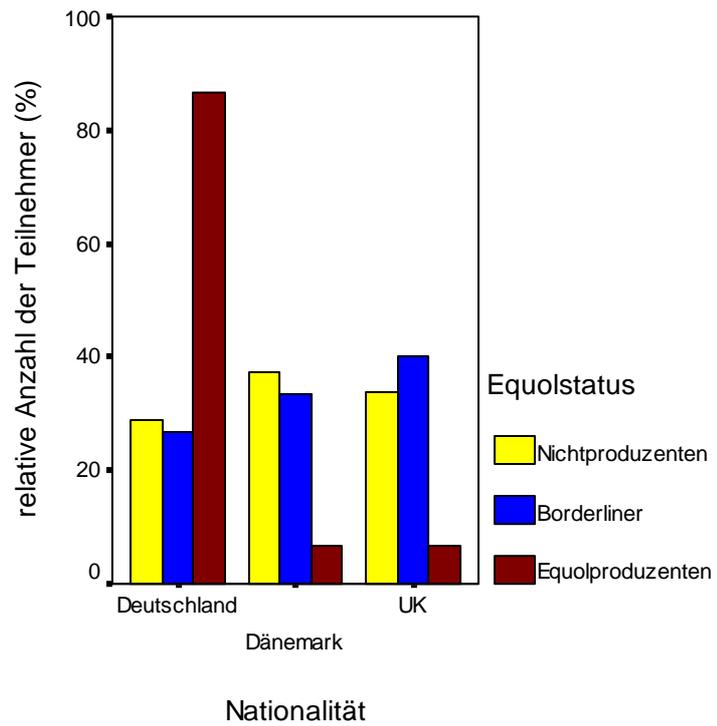


Abbildung 6-3 Vergleich der Prävalenz von Equolproduzenten in Abhängigkeit von der Nationalität, $P < 0,001$

6.3 Energieaufnahme und anthropometrische Parameter

Zu Studienbeginn und einmal innerhalb jeder Interventionsphase wurden die Ernährungsgewohnheiten der Studienteilnehmer über jeweils drei Tage nach den Vorgaben in den Schätzprotokollen dokumentiert. Mit diesem Ernährungserhebungsinstrument konnten etwaige Veränderungen der Ernährungsgewohnheiten während der Studienphase erfasst und evaluiert werden. Wie Tabelle 6-4 zeigt, gab es keine signifikanten Unterschiede in der Nährstoffzufuhr zwischen der Plazebo- und Isoflavonbehandlung. Im Vergleich zur Baseline konnte jedoch eine signifikant erhöhte Zufuhr von Energie (Baseline vs. Wo4 8,08 [7,20; 9,31] vs. 8,70 [7,57; 9,66] MJ $P < 0,001$), Fett (70,2 [56,6; 85,8] vs. 75,6 [63,9; 89,7] g $P = 0,002$), Kohlenhydraten (228,0 [204,1; 256,0] vs. 240,2 [212,2; 280,0] g $P < 0,001$), Ballaststoffen (21,7 [17,3; 28,0] vs. 25,0 [19,3; 29,7] g $P < 0,001$) und Vitamin E (9,06 [6,34; 13,0] vs. 12,30 [9,19; 15,02] mg $P < 0,001$) im Interventionsverlauf ermittelt werden, während die Versorgung mit Retinoläquivalenten (1041 [668; 1833] vs. 951 [678; 1493] μg $P = 0,015$) einen signifikanten Rückgang verzeichnete. Die Zunahme der Energiezufuhr während der Intervention war von einem signifikanten, aber relativ geringen Anstieg des BMI begleitet (Baseline vs. Wo 8 24,0 [22,5; 26,1] vs. 24,3 [22,6; 26,2] kg/m^2 $P < 0,001$), während der Taillen-Hüfte-Index unverändert blieb (0,79 [0,75; 0,83] vs. 0,80 [0,76; 0,85] cm $P = 0,530$).

Tabelle 6-4 Vergleich der Nährstoff- und Vitaminaufnahme während der Intervention

N=89	Baseline	Plazebo (P)	Isoflavone (IF)	P-IF	P Δ
		Woche 4			
Energie [MJ]	8,08 [7,20; 9,31]	8,80 [7,68; 9,70]	8,64 [7,39; 9,58]	-0,01 [-0,88; 0,98]	0,163
Fett [g]	70,2 [56,6; 85,8]	76,9 [64,2; 90,6]	73,4 [63,2; 88,8]	2,0 [-12,0; 10,2]	0,613
Cholesterin [mg]	269,9 [175,5; 338,8]	258,3 [190,0; 228,4]	244,2 [162,8; 340,0]	19,0 [-70,0; 80,0]	0,249
Kohlenhydrate [g]	228,0 [204,1; 256,0]	240,4 [209,5; 281,4]	240,0 [215,2; 280,0]	-1,93 [-30,4; 34,3]	0,749
Protein [g]	72,0 [60,0; 83,9]	73,1 [65,7; 82,5]	75,0 [62,2; 84,9]	0,2 [-9,97; 14,0]	0,330
Ballaststoffe [g]	21,7 [17,3; 28,0]	25,0 [19,3; 30,2]	24,7 [19,2; 29,7]	1,0 [-3,2; 4,4]	0,715
Alkohol [g]	9,03 [1,9; 16,9]	7,5 [0,10; 18,0]	10,6 [0,2; 17,4]	0,0 [-5,6; 2,1]	0,264
Folat [μg]	280,0 [231,0; 360,0]	275,8 [230,8; 329,2]	269,3 [230,0; 320,0]	10,0 [-40,0; 50,0]	0,779
Vit. B-12 [μg]	3,80 [2,86; 5,58]	4,05 [2,84; 5,98]	3,76 [2,90; 5,38]	0,28 [-1,34; 1,55]	0,314
Vit. B-6 [mg]	1,72 [1,50; 2,04]	1,70 [1,40; 2,10]	1,68 [1,32; 1,90]	0,10 [-0,20; 0,40]	0,037
Vit. C [mg]	139,4 [91,6; 213,0]	128,4 [80,3; 187,1]	119,4 [85,1; 172,0]	1,0 [-34,0; 53,2]	0,485
Vit. E [mg]	9,06 [6,34; 13,0]	12,6 [9,36; 16,6]	12,14 [8,85; 15,0]	0,54 [-1,49; 2,24]	0,326
RE [μg]	1041 [668; 1833]	1004 [800; 1496]	854 [543; 1491]	86,0 [-218; 528]	0,089

Angabe der Nährstoffzufuhr als Median und Perzentile [25; 75]. P-Wert repräsentiert Behandlungsunterschiede mit dem Baselinewert, der Nationalität und der Behandlungsreihenfolge als feste Kovariate (GLM): Isoflavone vs. Plazebo. Retinoläquivalent (RE)

6.4 Gelegenheitsblutdruckmessung

Im Vergleich zu Plazebo wurde während der Isoflavonintervention ein signifikanter Anstieg beim systolischen Blutdruck beobachtet ($P=0,032$) [Tab. 6-5]. Weder der diastolische noch der mittlere arterielle Blutdruck wurden durch die achtwöchige Isoflavonbehandlung signifikant beeinflusst ($P>0,05$). In der ersten Hälfte der Plazebobehandlung erfolgte zunächst ein signifikanter Abfall des Ruheblutdrucks (Baseline vs. Wo4 Systole 113 [102; 123] mmHg $P=0,001$, Diastole 72 [67; 76] mmHg $P=0,003$, MAP 85[80; 90] mmHg $P<0,001$). Zwar an Deutlichkeit reduziert, blieb der signifikante Unterschied beim systolischen Wert in den letzten vier Wochen der Behandlung bestehen. Der diastolische Blutdruck und der mittlere arterielle Blutdruck verzeichneten aufgrund der Annäherung an den Ausgangswert einen Signifikanzverlust. Über den gesamten Studienzeitraum war eine signifikante Abnahme beim Gelegenheitsblutdruck erkennbar (Systole Wo0 vs. Wo24: 117 [107; 128] vs. 115 [106; 126] mmHg, $P=0,035$; Diastole Wo0 vs. Wo24: 73 [68; 78] vs. 72 [68; 78] mmHg, $P=0,020$; MAP Wo0 vs. Wo24: 88 [82; 94] vs. 87 [81; 93] mmHg; $P=0,018$).

Tabelle 6-5 Blutdruckwerte im Studienverlauf

N=89	Plazebo			Isoflavone			P
	Baseline	Woche 4	Woche 8	Baseline	Woche 4	Woche 8	
Ambulanter Gelegenheitsblutdruck [mmHg]							
SBP	118 [107, 128]	113 [102, 123]	114 [107, 125]	115 [106, 128]	112 [105, 124]	116 [106, 126]	0,032
DBP	73 [69, 78]	72 [67, 76]	72 [68, 78]	73 [68, 79]	72 [67, 78]	73 [68, 78]	0,226
MAP	87 [82, 94]	85 [80, 90]	87 [81, 93]	88 [82, 94]	85 [80, 94]	87 [81, 93]	0,069

Blutdruckwerte sind als Median und Perzentile [25; 75] angegeben. P-Werte repräsentieren Behandlungsunterschiede mit dem Baselinewert, der Nationalität, der Behandlungsreihenfolge und dem Equolstatus als Kovariate (GLM): Isoflavone vs. Plazebo. SBP= systolischer Blutdruck, DBP=diastolischer Blutdruck, MAP= mittlerer arterieller Blutdruck

6.5 Veränderung der Blutparameter

Es gab keine signifikanten Unterschiede bei den Ausgangsblutwerten (Baseline) zwischen den Kohorten [Tab. 6-6]. Im gesamten Studienverlauf erfolgte eine signifikante Zunahme des Gesamthomocysteins ($P=0,003$), obwohl kein signifikanter Behandlungsunterschied zwischen der Isoflavon- und Plazebointervention festgestellt werden konnte ($P=0,286$). Auch blieben die ADMA-, Folat- und Vitamin B-12-Konzentrationen durch die Isoflavonintervention unbeeinflusst ($P>0,05$). Dennoch war ein signifikanter Abfall der Vitaminspiegel ($P<0,001$) sowie von ADMA ($P=0,003$) über den gesamten Studienzeitraum zu beobachten. Diese Veränderung erfolgte allerdings unabhängig von der Art der Behandlung ($P>0,05$). In der Plazebophase konnte weiterhin eine signifikante Reduktion der NOx-Konzentration ($P<0,001$) beobachtet werden, während der NOx-Spiegel bei der Isoflavonintervention weitgehend unverändert blieb ($P=0,813$). Der Unterschied zwischen Plazebo und Isoflavonen bestätigte sich als hochsignifikant ($P<0,001$).

Tabelle 6-6 Veränderung der Blutwerte im Studienverlauf

N=89	Baseline	Woche 8	Δ 8-0	P
Homocystein [$\mu\text{mol/L}$]				
Plazebo	9,74 [8,54; 11,52]	10,11 [9,02; 11,50]	0,29 [-0,45; 1,09]	0,286
Isoflavone	9,65 [8,78; 10,94]	10,28 [8,92; 11,87]	0,32 [-0,31; 0,93]	
Folat [nmol/L]				
Plazebo	27,3 [20,4; 34,9]	27,4 [19,7; 33,8]	-0,7 [-3,6; 3,3]	0,934
Isoflavone	25,7 [20,4; 35,6]	27,7 [18,8; 34,3]	-0,3 [-4,2; 2,6]	
Vitamin B-12 [pmol/L]				
Plazebo	392,4 [312,3; 467,2]	371,8 [298,3; 455,2]	-7,7 [-41,4; 23,9]	0,465
Isoflavone	406,0 [297,3; 451,5]	371,4 [281,5; 448,6]	-17,6 [-43,6; 16,2]	
ADMA [$\mu\text{mol/L}$]				
Plazebo	0,66 [0,59; 0,76]	0,67 [0,58; 0,75]	0,00 [-0,05; 0,04]	0,340
Isoflavone	0,68 [0,59; 0,76]	0,66 [0,58; 0,74]	-0,02 [-0,08; 0,03]	
NOx [$\mu\text{mol/L}$]				
Plazebo	24,0 [19,7; 32,4]	20,2 [16,2; 26,9]	-2,60 [-8,75; 2,25]	<0,001
Isoflavone	23,6 [17,6; 33,6]	23,8 [18,0; 33,7]	1,00 [-6,65; 7,85]	

Konzentrationen sind als Median und Perzentile [25; 75] angegeben. P Werte repräsentieren Behandlungsunterschiede mit dem Baselinewert der jeweiligen Variable, der Nationalität, der Behandlungsreihenfolge und dem Equolstatus als Kovariate (GLM) über die achtwöchige Interventionsphase: Plazebo vs. Isoflavone. Weitere Kovariaten für Homocystein & ADMA: Folat, Vitamin B-12. Δ absolute Veränderung der jeweiligen Variable (Differenz der P50-Werte) zum Zeitpunkt Woche 8. Nitrat/Nitrit (NOx), asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA)

Die Zusammenhänge zwischen den gemessenen Blutwerten zur Baseline waren generell schwach. Jedoch konnten Unterschiede zwischen den Korrelationskoeffizienten der einzelnen Studienphasen festgestellt werden [Tab. 6-7]. Erwartungsgemäß korrelierte Homocystein invers mit Plasma Vitamin B-12 ($P=0,024$), wobei eine positive Korrelation zwischen ADMA und Vitamin B-12 ermittelt wurde ($P=0,018$). Dagegen korrelierten weder ADMA noch Homocystein signifikant mit Blutlipidwerten, Blutdruck, BMI, Waist-to-Hip-Ratio oder NOx [Daten nicht abgebildet].

Tabelle 6-7 Korrelationsmatrix (Spearman's Rho Korrelationskoeffizient) mit N=89 zu Beginn jeder Interventionsperiode

	tHcy		ADMA		Folat		Vitamin B-12	
	P	IF	P	IF	P	IF	P	IF
ADMA	0,084	0,139						
Folat	-0,143	-0,057	-0,129	-0,199				
B-12	-0,136	-0,239*	0,252*	0,118	-0,136	0,015		
NOx	0,088	0,048	-0,109	-0,113	0,183	-0,068	-0,014	-0,062

Plazebo (P), Isoflavone (IF), asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA), Gesamthomocystein (tHcy), Stickstoffmonoxidmetabolite Nitrit und Nitrat (NOx); * P<0,05

6.6 Endothelfunktion und Blutfluss

Tabelle 6-8 zeigt die absoluten Werte des Gefäßdurchmessers der Arteria brachialis und der mittleren Blutflussgeschwindigkeit vor und nach Gefäßerweiterung auf der Basis mechanischer (Induktion von Hyperämie) und pharmakologischer (Applikation von Nitroglycerin) Stimulation sowie deren prozentuale Veränderung bezogen auf die basalen Messungen. Es konnte kein signifikanter Isoflavoneffekt auf die endothelabhängige, flussinduzierte Vasodilatation (FMD) demonstriert werden (P=0,716), obwohl eine signifikante Verbesserung der Endothelfunktion unabhängig von der Art der Behandlung zu verzeichnen war (0,42 [-2,87; 7,27] vs. 4,90 [1,69; 7,57] % P<0,001). Die Isoflavone übten auch keinen Einfluss auf die endothelunabhängige Nitroglycerin-induzierte Vasodilatation aus (GTN-MD, P=1,000). Ebenso blieb die mittlere Blutflussgeschwindigkeit nach der Isoflavoneinnahme unverändert (P=0,520).

Tabelle 6-8 Gefäßdiameter, mittlere Blutflussgeschwindigkeit und deren relative Veränderungen nach mechanischer und pharmakologischer Stimulation

N=28	Baseline	Plazebo	Isoflavone	P Δ
		Woche 8		
Durchschnittliche Blutflussgeschwindigkeit [cm/s]				
basal	0,21 [0,14; 0,27]	0,15 [0,10; 0,22]	0,11 [0,08; 0,16]	
nach Hyperämie	0,74 [0,60; 0,91]	0,50 [0,44; 1,20]	0,46 [0,36; 0,99]	
Relative Veränderung basal vs. nach Hyperämie [%]	266 [187; 405]	340 [200; 556]	301 [187; 459]	0,520
absolute Werte des brachialen Durchmessers [mm] und deren relative Veränderung zum Ausgangswert				
basal	3,18 [2,98; 3,54]	3,23 [2,95; 3,68]	3,39 [2,93; 3,69]	
nach Hyperämie	3,33 [2,96; 3,60]	3,48 [3,11; 3,89]	3,53 [3,13; 3,84]	
nach Nitroglycerin (GTN)	3,75 [3,32; 4,01]	3,95 [3,51; 4,37]	3,91 [3,66; 4,26]	
FMD [%] ⁱ	0,4 [-2,9; 7,3]	3,4 [1,6; 9,4]	5,7 [1,9; 7,3]	0,716
GTN-MD [%] ⁱⁱ	13,3 [9,7; 16,7]	14,2 [11,0; 17,6]	14,9 [11,4; 22,5]	1,000

Angabe als Median und Perzentile [25; 75]. P-Werte repräsentieren Gruppenunterschiede mit dem Baselinewert, dem Equolstatus und der Behandlungsreihenfolge als Kovariaten (GLM): Isoflavone vs. Plazebo. endothelabhängige flussinduzierte Vasodilatation (FMD), endothelunabhängige Nitroglycerin-induzierte Vasodilatation (GTN-MD)

6.7 Einfluss des Equolstatus

Wechselwirkungen zwischen dem Equolstatus und der Behandlungsart konnten für keinen der erhobenen Parameter ermittelt werden ($P > 0,05$). Auch hatte der Equolstatus keinen maßgeblichen Einfluss auf die absolute Differenz der gemessenen Blutwerte. Die NO_x -Konzentration war in allen Gruppen nicht signifikant reduziert ($P = 0,208$), wobei die Nichtequolproduzenten die geringste Abnahme aufwiesen [Tab. 6-9]. Ein ähnliches Muster jedoch in die entgegengesetzte Richtung konnte für den Gesamthomocysteinspiegel beobachtet werden ($P = 0,057$). Dieser erhöhte sich zum Ende der Intervention in allen Gruppen nicht signifikant, wobei die Equolproduzenten und Borderliner insgesamt stärkere Zunahmen verzeichneten. Die Vitaminversorgung verschlechterte sich nicht signifikant in den Kategorien Nichtproduzenten und Borderliner (Folat $P = 0,245$; Vitamin B-12 $P = 0,530$). Die geringste Abnahme der Vitamin B-12-Werte gab es bei den Equolproduzenten. Im Gegensatz zu den beiden anderen Gruppen verbesserte sich deren Folatversorgung tendenziell.

Tabelle 6-9 Vergleich der absoluten Differenzen erhobener Blutwerte unter Berücksichtigung des Equolstatus

Equolstatus		Differenz NO_x [$\mu\text{mol/L}$] Wo8-Wo0	Differenz ADMA [$\mu\text{mol/L}$] Wo8-Wo0	Differenz Homocystein [$\mu\text{mol/L}$] Wo8-Wo0	Differenz Plasma Vitamin B-12 [pmol/L] Wo8-Wo0	Differenz Plasmafolat [nmol/L] Wo8-Wo0
Nichtproduzenten	Mittelwert	-0,47	-0,02	0,22	-12,2	-0,77
	SEM	1,00	0,01	0,13	5,5	0,31
Borderliner	Mittelwert	-3,52	0,00	0,41	-11,5	-0,50
	SEM	2,35	0,01	0,18	10,4	0,53
Equolproduzenten	Mittelwert	-1,93	-0,03	0,90	-1,3	0,15
	SEM	2,09	0,01	0,35	9,4	0,59
Insgesamt (N=89)	Mittelwert	-1,23	-0,02	0,37	-10,2	-0,57
	SEM	0,85	0,01	0,11	4,3	0,25

Die Kovarianzanalyse identifizierte unabhängig von der Art der Behandlung eine signifikante Interaktion zwischen dem Equolstatus und der endothelabhängigen (FMD, $P = 0,049$) sowie der endothelunabhängigen (GTN-MD, $P = 0,002$) Vasodilatation [Tab. 6-10]. Aufgrund der geringen Fallzahl wurden die Equolproduzenten und Borderliner unter dem gemeinsamen Begriff Equolproduzenten zusammengefasst. So zeigte sich eine signifikante Verbesserung der FMD bei den Equolproduzenten im Vergleich zu den Nichtproduzenten. Umgekehrt verschlechterte sich die endothelunabhängige Vasodilatation bei den Equolproduzenten signifikant, während die Nichtproduzenten Zunahmen verzeichneten. Ein ähnliches Bild ergab sich für die Differenzen der durchschnittlichen Blutflussgeschwindigkeit (TAVM).

Tabelle 6-10 Einfluss des Equolstatus auf die Veränderung der funktionellen Gefäßparameter

Equolstatus		Differenz FMD (%)	Differenz GTN (%)	Differenz TAVM (%)
Nichtproduzent	Mittelwert	1,47	4,40	82,10
	SEM	1,14	1,51	39,04
Equolproduzent	Mittelwert	10,64	-8,34	-69,91
	SEM	2,61	4,27	76,67
Insgesamt N=28	Mittelwert	3,47	1,46	49,52
	SEM	1,17	1,68	35,48

Endothelabhängige flussinduzierte Vasodilatation (FMD), endothelunabhängige

Nitroglyzerin-induzierte Vasodilatation (GTN), mittlere Blutflussgeschwindigkeit (TAVM)

6.8 Ländereffekte

Zwischen Behandlung und Nationalität konnten nur für die NO_x-Werte signifikante Wechselwirkungen ermittelt werden. Die Behandlungsdifferenz bei den Stickstoffmetaboliten resultierte somit vor allem auf einem signifikanten Abfall während der Placebophase bei der britischen (P=0,002) und dänischen Subkohorte (P=0,002) [Abb. 6-4]. Ein Länderunterschied konnte ebenso für die Folat- und Vitamin B-12-Differenzen erfasst werden. Danach sind signifikante Abnahmen der Cobalaminwerte in der dänischen Studiengruppe (P=0,001) und tendenziell in der britischen Kohorte (P=0,057) zu verzeichnen. Ähnlich verhält es sich bei den Folatwerten. Auch hier verschlechterte sich die Folatversorgung signifikant in der britischen Kohorte (P=0,019) [Tab. 6-11].

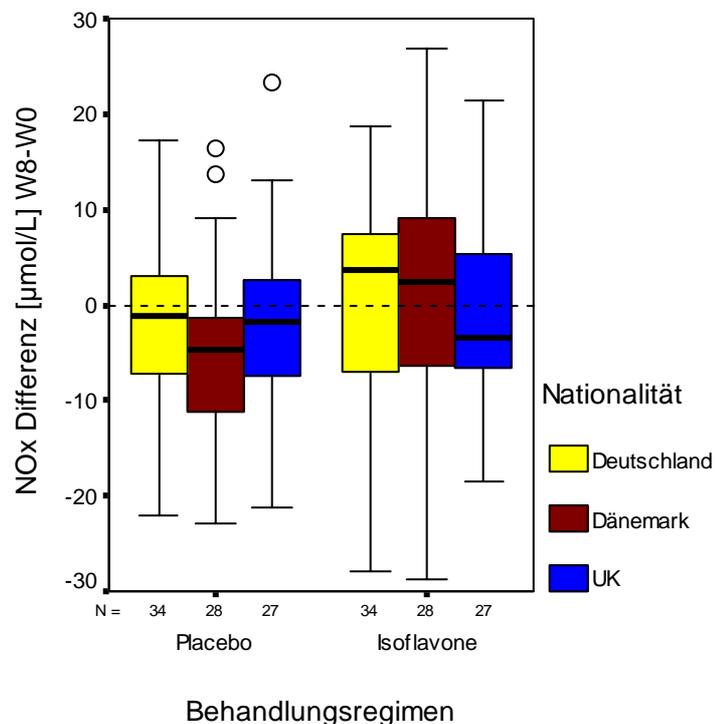
Abbildung 6-4 Veränderung der Nitrit/Nitratkonzentration (NO_x) im Verlaufe der Intervention

Tabelle 6-11 Vergleich der absoluten Differenzen erhobener Blutparameter in Abhängigkeit von der Nationalität

Nationalität		Differenz NOx [$\mu\text{mol/L}$] Wo8-Wo0	Differenz ADMA [$\mu\text{mol/L}$] Wo8-Wo0	Differenz Homocystein [$\mu\text{mol/L}$] Wo8-Wo0	Differenz Plasma Vitamin B-12 [pmol/L] Wo8-Wo0	Differenz Plasmafolat [nmol/L] Wo8-Wo0
Deutschland	Mittelwert	-0,43	-0,02	0,55	7,89	0,27
	SEM	1,31	0,01	0,19	8,71	0,39
Dänemark	Mittelwert	-1,67	-0,02	0,17	-41,37	-0,80
	SEM	1,78	0,01	0,17	10,33	0,28
UK	Mittelwert	-1,79	-0,01	0,35	-12,66	-1,36
	SEM	1,30	0,01	0,18	10,99	0,57
Insgesamt N=89	Mittelwert	-1,23	-0,02	0,37	-13,86	-0,57
	SEM	0,85	0,01	0,11	5,89	0,25

7 Diskussion

Seitdem groß angelegte Interventionsstudien^{20,80} mit dem Ziel der Primär- und Sekundärprävention von Herz-Kreislauferkrankungen auf ein erhöhtes Risiko von Thrombosen sowie Gebärmutter- und Brustkrebs nach langzeitiger Behandlung mit Hormon- bzw. Östrogenpräparaten verweisen, sind natürlich vorkommende pflanzliche Östrogene, vor allem Sojaisoflavone, in den Forschungsschwerpunkt gerückt. Hinsichtlich dieser in den letzten Jahren sich erhärtenden Tatsachen ist das Interesse der betroffenen Frauen an der Anwendung natürlicher Produkte gegen Wechseljahrsbeschwerden sehr hoch¹⁹⁰. Als natürliche selektive Östrogenrezeptormodulatoren (SERM) können Isoflavone in Abhängigkeit vom Hormonstatus sowohl pro- als auch antiöstrogene Wirkungen im Zielgewebe vermitteln^{25,177}. Diese Eigenschaft basiert auf der Fähigkeit, an beide Östrogenrezeptoren ER α und ER β zu binden, wobei eine höhere Affinität zum ER β besteht. ER β ist der dominierende ER im Gefäßsystem¹⁵⁸ und wird vermehrt nach Verletzung der Gefäßwand (z.B. katheterinduzierte Endotheldenuktion) in glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert²⁷. In zahlreichen Studien wurden signifikante Effekte von Isoflavonen auf das Gefäßsystem demonstriert. Analog zum Östrogen sind Isoflavone in der Lage, die Replikation und Migration von glatten Gefäßmuskelzellen *in-vitro* zu hemmen²⁷ und einer Neointimabildung nach katheterinduzierter Gefäßwandverletzung entgegen zu steuern³⁹. Oral applizierte Östrogene und isoflavonhaltiges Sojaprotein reduzieren signifikant die Plasmalipidkonzentration, die LDL-Oxidation und den Cholesterinestergehalt von LDL-Partikeln, wobei sich eine kombinierte Verabreichung beider Substanzen am effektivsten erwies. Intaktes Sojaprotein bietet einen effektiven Schutz vor der Bildung arteriosklerotischer Läsionen²⁰³. Isoflavone rufen konzentrationsabhängig eine Vasodilatation hervor und verbessern die Gefäßerweiterung nach Acetylcholingabe, wie auch schon mit Östrogen gezeigt werden konnte^{235,236}. In den letzten Jahren wurde ein signifikanter Einfluss von Isoflavonen auf die *in-vivo* Endothelfunktion unter Anwendung der endothelabhängigen flussinduzierten Vasodilatation (FMD) nachgewiesen^{30,213,214,292,339}. Da die FMD zuverlässig die Endothelfunktion reflektiert, dient es vor allem als guter prognostischer Marker für frühzeitige arteriosklerotische Gefäßwandveränderungen^{55,268}.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob die erfolgreiche Senkung der neuen kardiovaskulären Risikofaktoren Homocystein und ADMA durch Östrogen auch nach Applikation von Sojaisoflavonen an postmenopausale Frauen erreicht werden kann. Weiterhin sollten Ergebnisse von aktuellen Interventionsstudien, die den Einfluss einer Isoflavongabe auf die Endothelfunktion untersuchten, verifiziert werden. Da Homocystein und ADMA positiv mit einer endothelialen Dysfunktion korrelieren, wurden die Veränderungen während der Intervention im Zusammenhang mit der *in-vivo* Endothelfunktion und der Bioverfügbarkeit des endothelialen Vasodilators NO diskutiert.

In der vorliegenden Studie konnte weder ein Effekt von Isoflavonen auf Homocystein noch auf die zirkulierende ADMA-Konzentration in postmenopausalen Frauen beobachtet werden. Die in anderen Interventionsstudien mit Phytoöstrogenen hervorgerufene Verbesserung der Endothelfunktion konnte in dieser Studie nicht verifiziert

werden. Die Isoflavoneinnahme bot jedoch einen effektiven Schutz vor einem unvorteilhaften Absinken der zirkulierenden endothelialen NOx-Konzentration. Daneben wurde auch ein negativer Effekt der Isoflavonsupplementation verzeichnet, der sich in einem marginalen aber signifikanten Anstieg des systolischen Blutdruckes äußerte.

Warum generell nur ein geringer Effekt der Isoflavonintervention auf die interessierenden Parameter zu beobachten war, kann nach den in der Studie gewonnenen Resultaten nur hypothetisch beantwortet werden. Die für die Studie gewählte tägliche Dosis an Isoflavonen von 50 mg mit einem Verhältnis von Genistein zu Daidzein von 2:1 repräsentiert die typische Isoflavonaufnahme in asiatischen Ländern, wie z.B. Japan. Hinsichtlich der relativ kurzen Zeiträume der Interventionen mag die verabreichte Dosis zu gering gewesen sein, um eine signifikante Wirkung zu erreichen. Anhand der Analyse der Isoflavone in Serum und Urin kann zumindest bestätigt werden, dass die Isoflavone in den Supplementen biologisch verfügbar waren. Damit verbleibt die Wahrscheinlichkeit, dass Isoflavone nur in ihrem ursprünglichen Zustand, nämlich gebunden in der Sojaproteinmatrix, kardioprotektiv wirken. In vorangegangenen Studien wurde beispielsweise mit isoflavonreichem Sojaprotein eine größere Senkung des Gesamt- und LDL-Cholesterins erzeugt als mit isoflavonarmen Sojaprotein (nach Extraktion der Isoflavone).

Weiterhin ist zu bedenken, dass die Hypothese eines positiven Einflusses von Soja auf das Herz-Kreislaufsystem zunächst auf der Basis epidemiologischer Studien geschlussfolgert wurde. Laut jener ist die Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen in Ländern mit habituellem Sojaverzehr (und damit erhöhter Isoflavonaufnahme) deutlich geringer als in westlichen Industriestaaten. Klinische Studien, in denen der Wert von Sojaweiß oder Sojaisoiflavone bezüglich einer kardiovaskulären Primär- und Sekundärprävention untersucht wurde, lieferten nicht immer konsistente Ergebnisse. Die Exposition mit isoflavonhaltigen Sojaprodukten bereits im Kindesalter mag für Diskrepanzen zwischen epidemiologischen Studien und Interventionsstudien verantwortlich sein.

Ebenso klafft eine Lücke zwischen eindeutig kardioprotektiven Eigenschaften von Isoflavonen *in-vitro* und fehlenden Nachweisen *in-vivo*. Komplexe Vorgänge im menschlichen Organismus verändern möglicherweise die Eigenschaften von Isoflavonen. Nach Resorption im Darm unterliegen Phytoöstrogene in der Leber Konjugationsreaktionen. Unlängst wurde gezeigt, dass eine Konjugation mit Sulfat durch Sulfotransferasen die Eigenschaften der Phytoöstrogene, speziell deren antioxidative Fähigkeit, deutlich schmälern³⁴⁰. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, weshalb sich die in Zellkultur- und Organstudien gefundenen vaskuloprotektiven Effekte der Isoflavone oftmals nicht auf epidemiologisch-angewandter Ebene bestätigen lassen.

In der vorliegenden Studie erfolgte die Kontrolle der Compliance über die Isoflavonausscheidung im 24-h Urin der Studienteilnehmerinnen. Die renale Phytoöstrogenausscheidung zu Studienbeginn war in beiden randomisierten Gruppen vergleichsweise niedrig. Wie erwartet, zeigte sich ein deutlicher Anstieg von Genistein und Daidzein im Blut und Urin während des Verzehrs der isoflavonhaltigen Testlebensmittel. Analog jüngster Ergebnisse von Setchell et al. (2002)³⁴¹ konnte auch in der gegenwärtigen Studie der Daidzeinmetabolit Equol im Plasma und Urin von 30 % der Teilnehmerinnen identifiziert werden. Dieses Ergebnis geht konform mit Studien, die auf eine

hohe interindividuelle Variabilität in der Equolproduktion verwiesen haben ¹⁴⁰. Hierzu ist zu bemerken, dass die Hälfte aller Equolproduzenten der deutschen Kohorte angehörte. Trotz der Gabe äquivalenter Mengen von Isoflavonen in beiden Interventionsperioden konnten große interindividuelle Schwankungen bezüglich der Ausscheidung von Genistein, Daidzein und Equol im Urin der Studienteilnehmerinnen festgestellt werden. Beide Beobachtungen weisen auf signifikante Unterschiede im Isoflavonmetabolismus zwischen den Individuen einerseits ¹⁴⁰ und auf die außerordentliche Bedeutung der regionalbedingten Variation im Ernährungsmuster andererseits hin ³⁴². Dennoch reflektiert die renale Ausscheidung von Phytoöstrogenen immer noch verlässlich die Phytoöstrogenaufnahme über die Ernährung ³³³.

Seit nachgewiesen wurde, dass die Bindungskapazität zum Östrogenrezeptor und die antioxidative Kapazität von Equol größer ist, als die von dessen Precursor Daidzein wird angenommen, dass Personen in Abhängigkeit vom Equolstatus unterschiedlich auf eine diätetische Isoflavonsupplementation reagieren ³³⁸. Eine aktuelle Studie von Kreijkamp-Kaspers und Kollegen (2005) zeigte, dass die Veränderungen des Blutdrucks nach Gabe von Sojaprotein unterschiedlich sind, wenn die 202 postmenopausalen Frauen im Alter zwischen 60-75 Jahren in Equolproduzenten und Nichtequolproduzenten unterteilt werden ³⁴³. In der vorliegenden Studie wurden allerdings keine Unterschiede in den Konzentrationen der zirkulierenden Biomarker sowie der Endothelfunktion zwischen den Interventionsgruppen nach Kategorisierung in Equolproduzenten und Nichtequolproduzenten nachgewiesen. Ursächlich für diese Divergenz kann sein, dass die relativ jüngere Studienpopulation (Alter 45-70 Jahre) von vornherein einem niedrigeren kardiovaskulären Risiko ausgesetzt war und somit Unterschiede basierend auf dem Equolstatus nicht detektiert werden konnten.

Der endotheliale Vasodilator Stickstoffmonoxid (NO) gilt als einer der wichtigsten Mediatoren der östrogen- und isoflavongesteuerten Tonusregulation ⁹⁵. Dies wird dadurch deutlich, dass eine Entfernung des Endothels oder eine Vorbehandlung mit kompetitiven eNOS-Inhibitoren eine signifikante Hemmung des Relaxationprozesses isolierter Aortenringe zur Folge hat ^{237,238}. NO wird von der konstitutiven Isoform der endothelialen NO-Synthase (eNOS) aus dem Substrat L-Arginin gebildet ¹⁰⁰. Das Enzym ist membrangebunden und bindet in Abhängigkeit von der Kalziumkonzentration reversibel Calmodulin ³⁴⁴. Die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration resultiert in einer Aktivierung der eNOS ³⁴⁵. Im physiologischen Prozess wird NO kontinuierlich vom Endothel freigesetzt. Zusätzlich zu dieser basalen Produktion kann die NO-Synthese durch einen Anstieg hämodynamischer Kräfte um ein Vielfaches gesteigert werden. Eine Erhöhung der Blutflussrate und der mit dem Blutfluss assoziierten Wandschubspannung löst infolge einer vermehrten Ausschüttung endothelial gebildeten NOs und der Aktivierung mechanosensitiver nichtselektiver Kationenkanäle eine Vasodilatation aus ^{276,277,346}. Dieser Mechanismus schützt das Endothel vor mechanischer Schädigung und gewährleistet eine adäquate Blutversorgung nachgeschalteter Gewebe. Die flussinduzierte Vasodilatation macht sich diesen natürlichen Prozess zunutze, um die Funktionalität des Endothels wahrheitsgetreu widerzuspiegeln ¹¹.

Da NO auf molekularer Ebene mit Schlüsselprozessen der Atherogenese interferiert, wird es als ein gefäßschützender Faktor angesehen ¹⁰⁰. Eine reduzierte Bioverfügbarkeit von endothelial gebildeten NO spielt

somit eine zentrale Rolle in der Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion. Jene ist neben einer beeinträchtigten endothelialen Vasodilatation durch zahlreiche weitere Funktionsstörungen des Endothels wie durch eine erhöhte Adhäsivität, Entzündung, Zellproliferation, Vasokonstriktion und abnormale Blutgerinnung gekennzeichnet. Die endotheliale Dysfunktion ist bereits im frühen Stadium einer sich entwickelnden Arteriosklerose mittels der FMD nachweisbar. Letztere gilt daher als guter surrogater Marker einer makrovaskulären Erkrankung¹⁰. Eine beeinträchtigte NO-abhängige flussinduzierte Vasodilatation ist in Personen mit subklinischer Arteriosklerose nachweisbar und korreliert mit der Anzahl und Stärke kardiovaskulärer Risikofaktoren auf individueller Ebene^{10,55}. Auf Grund der nichtinvasiven Erhebung wird die FMD bevorzugt in klinischen Studien zur Beurteilung der Effektivität einer Intervention herangezogen.

In der gegenwärtigen Studie konnte die in zahlreichen *in-vitro*, *ex-vivo* und *in-vivo* Studien beobachtete vasodilatatorische und endothelschützende Wirkung von Isoflavonen nicht mittels FMD reflektiert werden. Die Daten sind in Konkordanz mit anderen Interventionen, die ebenfalls keinen signifikanten Einfluss von diätetisch verabreichten Sojaprotein oder Sojaisoflavonen auf die Endothelfunktion von Männern und postmenopausalen Frauen zeigten^{198,215,217,231}. Trotz eindeutiger *in-vitro* und *ex-vivo* Hinweise auf eine gefäßerweiternde Wirkung von Isoflavonen²⁹, wird hinsichtlich immer wiederkehrender Inkonsistenzen zwischen den Forschungsergebnissen von Humanstudien, die vasoprotektive Wirkung von Isoflavonen noch immer kontrovers diskutiert. Die bisherigen Interventionsstudien differieren bezüglich der Behandlungsdauer, der Art und Weise der Verabreichung und der Dosishöhe, Aspekte, die einen Vergleich zwischen den einzelnen Studien erschweren. Tatsächlich dauert es Jahrzehnte bis zur klinischen Manifestation einer makrovaskulären Erkrankung. So scheint es wenig verwunderlich, dass eine Verbesserung der Endothelfunktion meist nur nach langfristiger Isoflavoneinnahme (≥ 6 Monate) nachweisbar ist. In der gegenwärtigen Interventionsstudie verzehrten die Teilnehmerinnen angereicherte Müsliriegel über einen Zeitraum von 8 Wochen. Auch wenn diese Interventionsperiode als biologisch akzeptabel für eine klinische Studie angesehen wird, mag dieser Zeitraum zu kurz gewesen sein, um Effekte hormonell schwacher pflanzlicher Substanzen im Vergleich zur lebenslangen Exposition in epidemiologischen Studien wahrzunehmen. Derzeit existiert nur eine Studie, die einen signifikanten Anstieg der FMD bereits nach achtwöchiger Intervention mit Isoflavonen demonstrieren konnte²⁹². Allerdings ist hier Vorsicht vor einer Überbewertung der Ergebnisse geboten, da die Größe des Studienkollektivs sehr begrenzt war (N=18). Ferner sind zwei wichtige Unterschiede beim Vergleich mit der gegenwärtigen Studie auffällig. Erstens erfolgte die Verabreichung von isoflavonhaltigem Sojaproteinisolat. Das gleichzeitige Vorhandensein anderer Komponenten in der Sojaproteinmatrix wie Phytine, Saponine etc. könnte die Studienergebnisse grundlegend beeinflusst haben. Zweitens umfasste deren Studienpopulation nur Frauen mit einem stark erhöhten kardiovaskulären Risiko (Hyperlipidämie)³⁴⁷. Es ist möglich, dass der Zustand des Gefäßsystems der gesunden Teilnehmerinnen in der gegenwärtigen Studie noch nicht den Grenzbereich einer inkomensierbaren Schädigung erreicht hatte, wodurch folglich auch kein Nutzen einer isoflavonreichen Ernährung sichtbar würde³⁴⁸. Neben NO ist ein gesundes Endothel durch Sekretion zahlreicher anderer vasoaktiver Moleküle gekennzeichnet. Dazu gehören insbesondere Faktoren, die die Interaktionen von Blutzellen (Monozyten/Thrombozyten) mit den Endothelzellen regulieren. Frühes Ereignis im atheroproliferativen Prozess ist die vermehrte Aktivierung und

Anheftung von Monozyten an die Intima, deren Eindringen in die Gefäßwand und Differenzierung in LDL-fressende Makrophagen. Die für eine Monozytenaktivierung und -adhäsion von den Endothelzellen gebildeten Adhäsionsmoleküle und Chemokine wie ICAM-1, VCAM-1, E-Selektin und MCP-1, blieben durch die Isoflavonintervention ebenfalls unbeeinflusst und bestätigen damit das über die nichtinvasive Endothelfunktionsmessung ermittelte Resultat³⁴⁸.

Wie bereits erwähnt, gilt der Daidzeinmetabolit Equol als potenteres Phytoöstrogen als dessen Vorläufer Daidzein²²². Daher wird vermutet, dass möglicherweise nur die relativ begrenzte Gruppe der Equolproduzenten aus dem Verzehr von isoflavonhaltigen Lebensmitteln/Präparaten einem Nutzen bezüglich hormonsensitiver Endpunkte zieht³³⁸. In der vorliegenden Studie konnte diese Hypothese allerdings nicht bestätigt werden. Es wurde aber eindeutig nachgewiesen, dass die generelle Verbesserung der Endothelfunktion vor allem auf positiven Veränderungen bei den Equolproduzenten beruht. Jedoch traten diese Modifikationen sowohl während der Isoflavonphase als auch während der Placebointervention auf, wenn auch in geringerem Ausmaß. Zudem waren keine statistisch signifikanten Interaktionen zwischen dem Equolstatus und der Isoflavonbehandlung nachweisbar. Dies mag darauf hindeuten, dass die potentielle Regulation der Endothelfunktion durch Isoflavone nicht auf Interaktionen mit dem ER-Signalweg beruht.

Es gibt außerdem eine Reihe von Störfaktoren, die die FMD-Messung akut beeinflussen können^{54,282}. Wegen der geringen Größe der zu messenden Veränderungen im Gefäßdurchmesser und der Beobachterabhängigkeit ist es eminent wichtig, diese Methode unter kontrollierten Bedingungen durchzuführen. Berücksichtigt man aber all jene Störgrößen, stellt die FMD ein verlässliches und akkurates Werkzeug zur Erhebung der Endothelfunktion dar²⁸⁶. In Anlehnung an Coretti et al. (2002) wurde in dieser Studie ein standardisiertes Protokoll eingesetzt, welches neben einem detaillierten, zeitlich genau umrissenen Ablaufplan auch die notwendigen Rahmenbedingungen den durchführenden Zentren vorgab³⁴⁹. Abweichend von den in der Literatur beschriebenen Standardisierungen erfolgte die Durchführung der FMD allerdings nicht vollständig nüchtern, was die Studienergebnisse nachhaltig beeinflusst haben könnte.

Ein weiterer limitierender Faktor in der vorliegenden Studie dürfte möglicherweise die Kohortengröße gewesen sein. Die FMD erhöhte sich während der Isoflavonphase deutlich stärker als in der Placebophase. Jedoch konnte wegen der großen interindividuellen Unterschiede bei relativ geringer Personenzahl (N=28) unter Anwendung dieser störanfälligen Methode keine statistische Signifikanz zwischen den Behandlungsdifferenzen ermittelt werden. Um eine fünfprozentige Irrtumswahrscheinlichkeit in einer vergleichbaren Studie wie der vorliegenden (mit cross-over Design) für ein zweiseitiges Signifikanzniveau zu erreichen, hätte die Kohorte laut Liang et al. (1998) eine Größe von mindestens N=207 haben müssen³⁵⁰.

Die Hypertonie gilt als traditioneller Risikofaktor für Herz-Kreislaufkrankungen. In einer epidemiologischen Studie mit 7813 postmenopausalen Frauen im Alter zwischen 49 und 66 Jahren wurde festgestellt, dass der systolische Blutdruck und der mittlere arterielle Blutdruck am stärksten mit der CVD-Mortalität korrelieren³⁵¹. Es

gibt bis dato jedoch nur wenige Interventionsstudien, die den Einfluss von Isoflavonen auf den Blutdruck in postmenopausalen Frauen untersucht haben. In der gegenwärtigen Studie wurde ein leichter Anstieg des systolischen Wertes nach Isoflavoneinnahme beobachtet, während der diastolische Wert und der mittlere arterielle Blutdruck unverändert blieben. Die Blutdruckdaten sind jedoch vorsichtig zu interpretieren, da nur ambulante Gelegenheitsblutdruckmessungen vorgenommen wurden. Diese Art der Blutdruckmessung gibt allgemein Auskunft über den physischen Zustand der Person zu einem definierten Zeitpunkt. Hiermit lassen sich allenfalls Trends ableiten, aber keine Aussagen zur Abschätzung des kardiovaskulären Risikos treffen. Für die Beurteilung einer Zustandsveränderung und der Behandlungsbedürftigkeit eines Individuums ist die Erfassung des zirkadianen Rhythmus über die ambulante 24-h Blutdruckmessung (ABPM) unumgänglich ³⁵². Die ABPM korreliert besser mit der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität als konventionelle Blutdruckmessungen in der Klinik ^{352,353} und ist das Mittel der Wahl, um eine mögliche Überschätzung des Blutdruckes durch den ‚Weißer-Kittel-Effekt‘ auszuschließen ³⁵⁴.

Bisherige Studien haben außerdem gezeigt, dass Patienten mit einem beeinträchtigten nächtlichen Blutdruckabfall (Nondipping) öfter von ernsten kardiovaskulären Ereignissen betroffen zu sein scheinen als andere ³⁵⁵. Somit gilt der nächtliche Blutdruck als besserer Prädiktor eines Organschadens. Der Erfolg geeigneter Interventionsmaßnahmen wäre dementsprechend nur über Erstellung eines Tagesprofils mittels einer ABPM beurteilbar.

Der marginale Anstieg des systolischen Blutdruckes in der vorliegenden Studie während der Isoflavonphase ist auf einen Zentrumseffekt zurückzuführen und mag zumindest teilweise die angespannte psychische Situation der Teilnehmer (Weißer-Kittel-Effekt) zu dem gemessenen Zeitpunkt widerspiegeln. Ungeachtet dieser marginalen Blutdruckerhöhung stimmen die Ergebnisse mit denen von Hodgson et al. (1999) überein, die nach Verabreichung eines Isoflavonkonzentrates an gesunde Personen mit hochnormalem Blutdruck weder Veränderungen des Blutdruckes im Liegen und Stehen noch des ambulant gemessenen 24-Stundenblutdruckes dokumentieren konnten ²⁴². Dennoch wurde in der Vergangenheit eine effektive Senkung des Blutdruckes durch Applikation von isoflavonhaltigem Sojaprotein ^{184,198,356} und Isoflavonen aus Rotklee ²⁴³ erzielt. Demnach scheinen Isoflavone unter gewissen Umständen doch zu einer Senkung des Blutdruckes zu führen. Weshalb dieser Effekt in der vorliegenden Studie ausblieb, kann außer den methodischen Einschränkungen nicht ausreichend erklärt werden.

Homocystein (tHcy) gehört zu jenen kardiovaskulären Risikofaktoren, die eng mit einer gestörten flussinduzierten Vasodilatation korrelieren ^{357,358}. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine moderate experimentell induzierte Hyperhomocysteinämie zu einer raschen Beeinträchtigung der *in-vivo* Endothelfunktion führt ^{296,297}. Zahlreiche Studien haben bestätigt, dass eine kardiovaskuläre Risikomodifikation auf der Grundlage einer Östrogen- oder Hormonersatztherapie effektiv zur Senkung der endogenen Homocysteinkonzentration führt ³⁵⁹⁻³⁶², wobei analog zum Cholesterin Personen mit initial erhöhten Homocysteinspiegeln am meisten von der Maßnahme profitieren. Die enge Beziehung zum Hormonstatus wird vor allem dadurch deutlich, dass mit dem Eintritt in die Wechseljahre der Homocysteinspiegel bei Frauen stark ansteigt ³⁶³.

Hinsichtlich des unstrittigen Einflusses von Östrogenen auf den Homocysteinmetabolismus sind die Ergebnisse der gegenwärtigen Studie überraschend. Da angenommen wird, dass die Mehrheit der Isoflavoneffekte auf dem konventionellen ER-vermittelten Mechanismus basiert, wurde eine Abnahme von Homocystein nach einer Isoflavonsupplementation erwartet. Dass die Modulation der Homocysteinspiegel durch Östrogen zumindest partiell ER-gebunden erfolgen dürfte, lässt sich daraus ableiten, dass künstliche SERM wie Raloxifen die Homocysteinkonzentration im gleichen Ausmaß senken wie das endogene Geschlechtshormon^{118,121,361}. Ob andere Mechanismen eine Rolle spielen, ist derzeit noch nicht nachgewiesen. Zumindest sind bisher keine Interaktionen von Isoflavonen mit den tHcy-Spiegel regulierenden Enzymen bekannt, weder mit der Methioninsynthase dem für die Remethylierung von Homocystein zuständigen Enzym noch mit der die Transsulfurierung Homocysteins katalysierende Cystathionin- β -Synthase [Abb. 7-1].

In den wenigen Studien, die den Einfluss von Isoflavonen auf den Homocysteinmetabolismus untersucht haben, wurde Sojaproteinisolat als Vehikel anstelle von isolierten Isoflavonen genutzt. Der Vergleich des Interventionseffektes erfolgte für gewöhnlich gegen eine caseinangereicherte Diät. Die gegenwärtige Studie ist die Erste, die die Wirkung von reinem Isoflavonextrakt auf die zirkulierende Homocysteinkonzentration in postmenopausalen Frauen mit Plazebo vergleicht. In der Studie von Jenkins et al. (2002) wurden hyperlipidämischen Männern und postmenopausalen Frauen Sojaprotein mit entweder 10 mg/d oder 73 mg/d Isoflavonen über einen Monat verabreicht²¹¹. Eine marginale aber signifikante Senkung der Homocysteinspiegel wurde während der Diät mit niedrigem Isoflavonanteil beobachtet. Tonstad et al. (2002) untersuchten die Wirkung von 30 g oder 50 g Sojaproteinisolat mit einem Isoflavongehalt von 111 mg/d oder 185 mg/d über einen Zeitraum von 16 Wochen an gesunden Männern und postmenopausalen Frauen³⁶⁴. Im direkten Vergleich mit der caseinangereicherten Diät wurde der Homocysteinspiegel durch die Sojaproteindiät um 0,8 $\mu\text{mol/L}$ gesenkt. In Patienten mit Typ 2 Diabetes Mellitus reduzierte isoliertes Sojaprotein, welches 165 mg Isoflavone pro Tag lieferte, die Gesamthomocysteinkonzentration um 14 % im Gegensatz zu Casein³⁶⁵.

Die gegenwärtige Studie verglich nicht die Wirkung unterschiedlicher Proteinquellen miteinander, sondern spezifische an Sojaprotein gebundene Komponenten mit Plazebo. Somit kann diese Studie nicht direkt mit den anderen Interventionen verglichen werden. Casein hat im Gegensatz zu Sojaprotein einen wesentlich höheren Methioningehalt³⁶⁶. Aktuelle Humanstudien haben gezeigt, dass eine Methioningabe zu einem rasanten Anstieg von Plasmahomocystein führt²⁹⁷. Der Effekt in den mit Sojaproteinisolat erzielten Interventionsstudien ist daher eher der Proteinquelle als dem Isoflavongehalt zuzuschreiben.

Unabhängig von der Art der Intervention konnte im gesamten Studienverlauf eine signifikante Zunahme der Homocysteinspiegel beobachtet werden. Dieser Anstieg beruht möglicherweise auf einer signifikanten Abnahme der Cobalamin- und insbesondere der Folatspiegel. Die Aktivität der Methioninsynthase wird entscheidend von dem Vorhandensein des Kofaktors Vitamin B-12 und dem Methylgruppendonator 5-Methyltetrahydrofolat beeinflusst [Abb. 7-1]³⁰³. Eine Depletion von Vitamin B-12 und Folat beeinträchtigt die Aktivität dieses Enzyms erheblich, was eine Akkumulation von Homocystein in den Zellen begünstigt³⁶⁷⁻³⁶⁹. Tierexperimentell konnte eine schwere Hyperhomocysteinämie durch eine folatarne Ernährung induziert werden, welche neben einer gestörten

FMD auch mit erhöhter arterieller Permeabilität und einer beginnenden Reduktion der arteriellen Compliance assoziiert war³⁷⁰. Bei Zuführung von Folat und Vitamin B-12 erfolgt auch bei initial normalen Vitaminspiegeln eine Abnahme der Homocysteinkonzentration^{367,371,372}, was gleichzeitig mit einer Verbesserung der Endothelfunktion einhergeht³⁷².

Die allgemeine Verschlechterung der Vitaminplasmaspiegel während der Intervention kann gegebenenfalls auf eine Einschränkung des Konsums Folsäure- und Vitamin B-12-reicher Lebensmittel während der Ernährungsintervention zurückzuführen sein, obwohl dies anhand der Ernährungserhebung nicht bestätigt werden kann. Der Goldstandard – das Wiegeprotokoll - stellt ein geeignetes Instrument für die Schätzung der üblichen Folat- und Vitamin B-12-Aufnahme dar³⁷³. Die von uns eingesetzten 3-Tages-Schätzprotokolle sind jedoch weniger präzise in der Portionsgrößenangabe als das Wiegeprotokoll. Dieser Unterschied kann möglicherweise die Diskrepanz zwischen der Folat- und Vitamin B-12-Versorgung über die Ernährung und dem endogenen Versorgungsstatus erklären. Ein weiteres Problem von Schätzprotokollen für die Erfassung der Aufnahme von Mikronutrienten ist das Unterschätzen der Portionsgröße von ungesunden Lebensmitteln, während die Zufuhr von gesunden Lebensmitteln wie Obst und Gemüse häufig überschätzt wird. Insbesondere erwachsene Frauen konsumieren häufig kleinere Portionen als angegeben³⁷³. Zusätzlich erfolgt mit zunehmender Protokollierungsdauer die Abnahme der Compliance der Probanden.

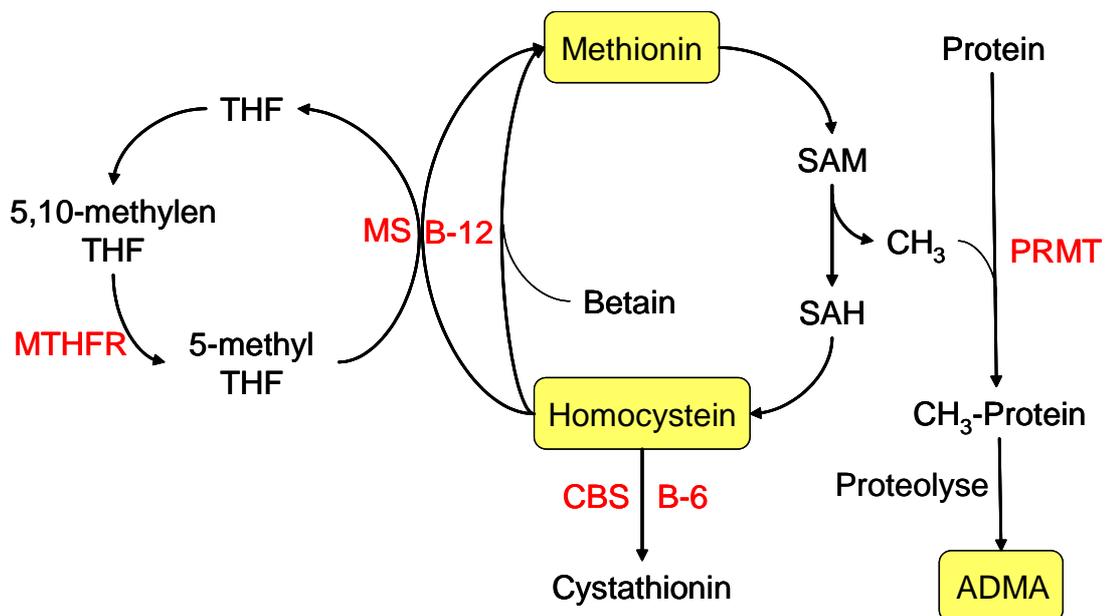


Abbildung 7-1 Homocysteinemetabolismus und ADMA-Bildung

Methionin wird zu S-Adosylmethionin (SAM) aktiviert, welcher den Methylgruppendonor für diverse Methyltransferreaktionen darstellt. S-Adosylhomocystein (SAH) entsteht beim Methyltransfer aus SAM. L-Homocystein wird durch reversible Hydrolyse aus SAH gebildet. Die Übertragung der Methylgruppen auf Protein während der posttranslationalen Modifikation wird durch die Proteinargininmethyltransferasen (PRMT) katalysiert. Hydrolyse von methylierten Proteinen führt zur Freisetzung von ADMA. Die Regulation der Homocysteinspiegel erfolgt auf Ebene der Remethylierung von Homocystein zu Methionin durch das Enzym Methioninsynthase (MS) und durch die Transsulfurierung von Homocystein zu Cystathionin durch die Cystathionin β -Synthase (CBS). Die Remethylierung erfordert Vitamin B-12 und 5-Methyltetrahydrofolat (5-methyl THF), welches durch die 5,10-Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR) gebildet wird. Die Transsulfurierung unterliegt einer Vitamin B-6-abhängigen Reaktion. In der Leber und Niere erfolgt die Remethylierung durch einen alternativen Weg mit Betain. [adaptiert aus: Lentz et al. *Atherosclerosis Supplements* 4 (2003) 61-65]

Die Mechanismen einer durch Homocystein hervorgerufenen Endotheldysfunktion sind bisher nur ungenügend geklärt. Obwohl die vorhandenen Daten sehr limitiert sind, wurden in den letzten Jahren verschiedene Hypothesen generiert. Homocystein hat nicht nur einen direkten Einfluss auf den Gefäßtonus^{295,374,375}, sondern zusätzlich besteht ein unmittelbarer Zusammenhang zur endothelialen Dysfunktion durch Begünstigung der Bildung arteriosklerotischer Plaques und der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen. Diese Prozesse tragen entscheidend zur Schädigung des Gefäßendothels und zur Reduktion der Gewebeelastizität bei^{376,377}. In Tierexperimenten war eine Exposition mit Homocystein mit einer Vasokonstriktion und einer verminderten Vasodilatationskapazität der Gefäße assoziiert^{295,374,375}. Dem mit einer Hyperhomocysteinämie einhergehenden oxidativen Stress kommt in der Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion zweifellos eine pathophysiologische Bedeutung zu³⁷⁸⁻³⁸⁰. Homocystein stellt nicht nur selbst eine Quelle für reaktive Sauerstoffradikale dar³⁰⁰, sondern ist außerdem Vorläufer von Cystein, dem Substrat für das wichtigste intrazelluläre Antioxidanz Glutathion. Ferner beeinträchtigt Homocystein die Funktion der Glutathionperoxidase, eines antioxidativ wirkenden Enzyms³⁷⁵. Zhang et al. (2000) wiesen nach, dass Homocystein infolge der vermehrten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) die Bioverfügbarkeit von merklich NO reduziert²⁹⁹. Dieser Effekt basiert im Wesentlichen auf der oxidativen Inhibierung der eNOS. eNOS Enzyme sind als Homodimere katalytisch aktiv und erfordern die Bindung von Kofaktoren wie Flavinadenindinucleotid (FAD), Flavinmononucleotid (FMN), Haem, Tetrahydrobiopterin (BH4) und Calmodulin für eine optimale Aktivität. Sauerstoff reagiert mit eNOS, in welcher BH4 NAD(P)H mit Arginin koppelt, um zu NO und Citrullin umgesetzt zu werden. Erfolgt eine Entkopplung infolge der oxidativen Inaktivierung von BH4, wird das Enzym zum Nettoproduzent von Superoxidradikalen. Aktuell wurde *in-vitro* mit Homocystein eine eingeschränkte NO-Synthese durch eine verminderte BH4-Verfügbarkeit nachgewiesen³⁸¹. Dieser Effekt war durch BH4-Inkubation reversibel³⁸². Der Abbau von NO erfolgt über eine schnelle Reaktion mit Superoxidanionen. Eine vermehrte Bildung von Superoxidanionen infolge eines Homocysteinüberangebots kann das fein austarierte Gleichgewicht zwischen NO und Superoxid empfindlich stören. NO wird, noch bevor es die glatte Muskulatur erreicht, durch Reaktion mit Superoxid nicht nur schnell inaktiviert, sondern bildet zusammen mit diesem ein noch potenteres Oxidanz, das Peroxynitrit (ONOO⁻)³⁰⁰. Eine zusätzliche Verschiebung des Glutathionperoxidstoffwechsels durch Homocystein kann die endotheliale antioxidative Kapazität weiter beeinträchtigen³⁸⁰, wodurch sowohl die basale NO-Produktion als auch die eNOS-Synthese betroffen ist.

Einen Anhaltspunkt für die endotheliale NO-Bioverfügbarkeit *in-vivo* kann die Messung der NO-Abbauprodukte Nitrit und Nitrat liefern³⁸³. Allerdings sollte bei der Diskussion der Ergebnisse beachtet werden, dass NOx kein realistisches Abbild der NO-Konzentration darstellt, da dieser Parameter von der individuellen Ernährung abhängig ist. Die Beeinflussung des NO-Stoffwechsels durch Isoflavone wurde erstmals *in-vivo* durch die Arbeitsgruppe von Squadrito (2002)³³⁹ direkt gemessen, und kann nun durch die vorliegende Studie verifiziert werden. Squadrito et al. applizierten postmenopausalen Frauen 54 mg/d Genistein über einen Zeitraum von 6 Monaten. Die durchschnittliche NOx-Konzentration stieg von 22 µmol/L auf 41 µmol/L nach der Intervention, wobei keine Veränderungen in der Placebogruppe sichtbar waren. Der Mechanismus dieser NOx Erhöhung wurde jedoch nicht beschrieben. In der vorliegenden Studie konnte im Vergleich zur Placebobehandlung eine

höhere Konzentration der NO-Stoffwechselprodukte Nitrit und Nitrat ermittelt werden, was möglicherweise einen Hinweis auf eine erhöhte NO-Verfügbarkeit gibt. Allerdings können hiermit keine Aussagen über die Bioaktivität von NO getroffen werden. Theoretisch kann eine vermehrte Bildung von NO_x auch durch die gesteigerte Inaktivierung von freiem NO reflektiert werden.

Grundsätzlich gibt es zwei Möglichkeiten, wie Isoflavone in den NO-Metabolismus eingreifen können. Diese betreffen zum einen die NO-Biosynthese und zum anderen den NO-Katabolismus [Abb. 7.2]. Isoflavone sind theoretisch in der Lage, die NO-Synthese durch Heraufregulation der eNOS-Expression zu stimulieren. Dies kann ganz klassisch über eine ER-Interaktion erfolgen, wie bereits mit Östrogen bewiesen wurde^{383,384}, oder über Inhibierung des NF-κB Signalweges^{258,260}. Tatsächlich konnten verschiedene Halbsequenzen des ERE aber auch Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor NF-κB im Promotorbereich der eNOS identifiziert werden³⁸⁵. Daneben wäre theoretisch eine nichtgenomische Aktivierung der eNOS via ER-Bindung möglich³⁸⁶. Niedrige endogen zirkulierende Östrogenkonzentrationen, wie sie bei postmenopausalen Frauen der Fall sind, bilden prinzipiell eine gute Basis für eine östrogenagonistische Wirkung der Isoflavone¹³⁵. Unabhängig von der klassischen ER-vermittelten Wirkweise wurde jüngst der Beweis einer ER-unabhängigen Stimulation der eNOS durch Genistein erbracht³⁸⁷. Grundlage für den Genisteineffekt war die Erhöhung der Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat, welches seinerseits die Aktivität der eNOS über einen Proteinkinase A-vermittelten Mechanismus stimulierte. Eine nichtgenomische Calveolin/Calmodulin-abhängige Erhöhung der eNOS Aktivität wurde außerdem mit Daidzein demonstriert³⁸⁸. Dies war nicht nur mit einer vermehrten NO-Freisetzung, sondern auch mit einer verbesserten acetylcholinvermittelten Vasodilatation assoziiert. Alternativ zur Stimulation des NO-Anabolismus, ist eine Interferenz von Isoflavonen mit dem oxidativen Abbau von NO durchaus denkbar, zumal die antioxidativen Fähigkeiten von Sojaiso flavonen und dem Metaboliten Equol eindeutig nachgewiesen sind^{245,389-393}. Das antioxidative Potential der Isoflavone umfasst jedoch nicht nur direkte radikaldeaktivierende Effekte (Quenchen), sondern auch indirekte Effekte, wie eine Aktivierung antioxidativer Enzyme, was die intrazelluläre antioxidative Kapazität zusätzlich erhöht³⁹⁴. Übereinstimmend konnte *in-vitro* eine gesteigerte Freisetzung von biologisch aktivem NO infolge einer effektiven Hemmung der Superoxidproduktion durch Equol demonstriert werden²⁴⁵.

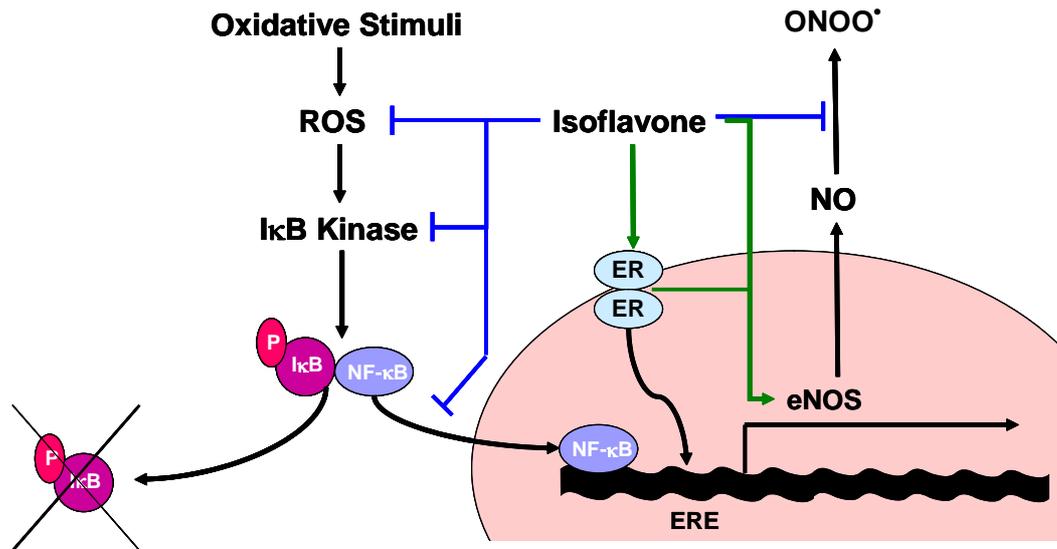


Abbildung 7-2 Potentielle Mechanismen der Isoflavonwirkung auf den Stickstoffmonoxidmetabolismus

Vereinfachtes Schema der redoxabhängigen Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB. In unstimulierten Zellen wird NF-κB via Sequestrierung durch Inhibitorproteine der IκB Familie aktiviert. Verschiedene Stimuli, die die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) ankurbeln, führen zu einer Phosphorylierung der inhibitorischen Untereinheit von IκB und zu dessen nachfolgender Proteolyse. Einmal freigesetzt transloziert NF-κB in den Nucleus und bindet an entsprechende Sequenzen im Promotorbereich des Gens für die endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS), wo er möglicherweise deren Expression inhibiert (eNOS). Isoflavone können der Aktivierung von NF-κB durch Verminderung der Sauerstoffradikale, Inhibierung der IκB Kinase, oder eine Behinderung der NF-κB Translokation und DNA-Bindung entgegensteuern. Eine Stimulation der eNOS-Expression durch Isoflavone kann theoretisch auch über eine Aktivierung des klassischen Östrogenrezeptor (ER)-Signalwegs durch Bindung an das Östrogen responsible Element (ERE) erfolgen. Andererseits können Isoflavone via ER-Bindung aber auch über ER-unabhängige Mechanismen die eNOS durch Phosphorylierung aktivieren. Die antioxidative Aktivität der Isoflavone schützt direkt vor einer oxidativen Inaktivierung von endothelialem Stickstoffmonoxid (NO). [adaptiert aus: Cassidy et al. Expert Rev Mol Med (2003) 5 (30) 1-15]

Die Präsenz von Homocystein *in-vitro* ist nicht nur durch eine Abnahme von NO, sondern auch durch eine deutliche Zunahme der ADMA-Produktion gekennzeichnet³⁹⁵. Dies ist nicht verwunderlich, denn das primär für den Abbau von ADMA verantwortliche Enzym Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase-2 (DDAH-2) ist extrem oxidationsanfällig und wird in Anwesenheit von Homocystein schnell inaktiviert³⁰⁴. Der kompetitive eNOS-Inhibitor ADMA gilt als der wichtigste physiologische Modulator der NO-Biosynthese³⁹⁶. Erhöhte ADMA-Konzentrationen stehen in einem direktem Zusammenhang mit einer gestörten Gefäßfunktion^{19,304,395} und sind positiv mit dem Schweregrad von Gefäßerkrankungen bei Patienten mit generalisierter Arteriosklerose korreliert¹⁵. *In-vitro* und *in-vivo* stimulierte ADMA die Adhäsion von Monozyten und inhibierte die NO-Bildung^{397,398}. Im Hintergrund dieser proatherogenen Wirkungen wird ADMA neben Homocystein als neuer Risikofaktor für eine endotheliale Dysfunktion angesehen. Das für die Synthese von ADMA verantwortliche Enzym Proteinargininmethyltransferase-1 (PRMT-1) stellt ein Verbindungsglied zwischen dem Homocystein- und ADMA-Metabolismus dar³⁹⁹. Diese katalysiert den Transfer von Methylgruppen aus S-Adenosylmethionin auf L-Arginin in Proteinen unter Bildung von S-Adenosylhomocystein, dem direkten Vorläufer von Homocystein [Abb. 7-1]³⁰³. Somit mündet ein erhöhter Durchsatz von Methionin nicht nur in einer vermehrten Homocysteinproduktion, sondern auch in einer Stimulation der ADMA-Biosynthese, wie *in-vitro* gezeigt werden konnte³⁹⁵.

Im Jahre 2001 konnten Boger et al. erstmals die Bedeutung der Homocystein-ADMA-Interaktion für die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion innerhalb einer Interventionsstudie veranschaulichen ¹⁹. Sydow und Münzels Konzept einer homocysteininitiierten Endotheldysfunktion integriert die komplexen Zusammenhänge zwischen Homocystein, oxidativem Stress, NO-Bioverfügbarkeit und ADMA ⁴⁰⁰. Danach verursacht die mit einer Hyperhomocysteinämie einhergehende Bildung von ROS via Aktivierung der PRMT-1 und Inhibierung der DDAH-2 eine Akkumulation von ADMA [Abb. 7-3]. Erhöhte ADMA-Konzentrationen hemmen dann nicht nur die NO-Biosynthese, sondern vermindern auch die L-Argininverfügbarkeit, was eine Entkopplung der eNOS zur Folge hat. Die kontinuierliche Einwirkung von ROS und die Potenzierung des oxidativen Stresses durch ADMA begünstigt eine weitere Schädigung des Endothels. Die Relevanz dieses Konzepts konnte unter Einsatz von Antioxidanzien veranschaulicht werden ⁴⁰¹.

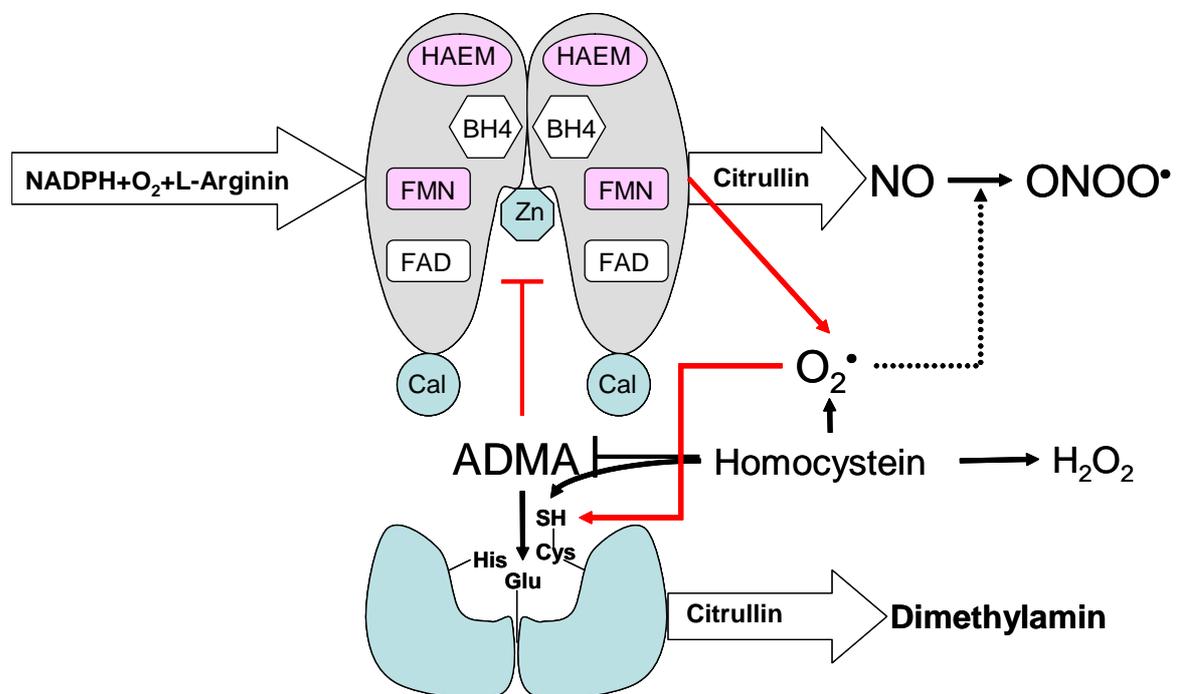


Abbildung 7-3 Schematische Darstellung der Mechanismen und Auswirkungen eines Anstiegs von Homocystein

Tetrahydrobiopterin (BH4) koppelt die NADPH-Oxidase innerhalb des endothelialen Stickstoffmonoxidsynthasekomplexes (eNOS) mit L-Arginin. Sauerstoff reagiert mit dem Enzym unter Generierung von Stickstoffmonoxid (NO) und Citrullin. eNOS agiert als Homodimer und enthält verschiedene Co-enzyme, wie Flavinmononucleotid (FMN), Flavinadenindinucleotid (FAD) und bindet Calmodulin (Cal). NO wird durch schnelle Reaktion mit Superoxidanionenradikalen (O_2^{\bullet}) zu Peroxynitrit ($ONOO^{\bullet}$), einem noch stärkeren Oxidanz, umgewandelt. Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) agiert als kompetitiver Inhibitor, welcher die eNOS entkoppelt und diese dabei zu einem Nettoproduzent von O_2^{\bullet} werden lässt. ADMA wird durch Dimethylarginin Dimethylaminohydrolasen (DDAH) zu Citrullin und Methylaminen hydrolysiert. Das für den Katabolismus verantwortliche Enzym besitzt innerhalb des aktiven Zentrums eine katalytische Triade bestehend aus Cystein (Cys249), Histidin (His162) und Glutaminsäure (Glu114). Homocystein reagiert wahrscheinlich mit Cystein unter Bildung einer kovalenten Disulfidbindung, wobei das Enzym inaktiviert wird. Die Inaktivierung führt zu einer Akkumulation von ADMA und folglich zu einer Inhibierung von eNOS mit verminderter NO-Biosynthese. Die vermehrte Bildung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und O_2^{\bullet} durch Homocystein begünstigt eine weitere Inaktivierung der DDAH und auch von NO selbst. Die verminderte Bioverfügbarkeit von NO fördert eine endotheliale Dysfunktion.

Die vorliegende Studie ist bisher die einzige, welche den Effekt von Isoflavonen auf die zirkulierende ADMA-Konzentration in postmenopausalen Frauen untersuchte. Mit diesem Negativergebnis kann ausgeschlossen werden, dass die Veränderungen der NOx-Konzentration während der Intervention auf einer Verschiebung der ADMA-Konzentration beruht. Die Beobachtungen sind divergent zu den Ergebnissen von aktuellen Interventionsstudien, die die Wirkung von Östrogen auf ADMA dieser Zielgruppe untersuchten^{18,402}. Teerlink et al. verabreichten gesunden postmenopausalen Frauen über einen Zeitraum von 2 Jahren 0,625 mg/d CEE (engl. conjugated equine estrogen), was bereits nach 6 Monaten zu einer 7,8 %-igen Senkung (95 % Konfidenzintervall -12,8 % bis -2,9 %; P=0,003) der ADMA-Konzentration führte¹⁸. Ähnliche Effekte (-11,6 % (95 % Konfidenzintervall -19,9 bis -3,3 %)) konnten Post et al. nach 12 Wochen sequenzieller HRT (2 mg 17- β Estradiol und 0,5 mg Trimegestone täglich) beobachten. In Tierversuchen wurde demonstriert, dass Östrogen nicht nur erfolgreich die Endothelfunktion verbessert, sondern dass dieser Effekt gleichzeitig mit einer Reduktion der ADMA-Spiegel gekoppelt ist⁴⁰³. Der Mechanismus für die Senkung der ADMA-Spiegel durch Östrogen ist bisher nicht beschrieben, erfolgt aber wahrscheinlich durch Aktivierung der DDAH⁴⁰⁴. Dieses *in-vitro* Ergebnis konnte allerdings bisher nicht durch *in-vivo* Studien in postmenopausalen Frauen belegt werden.

Zwei wichtige Aspekte müssen allerdings bei der Diskussion der ADMA-Werte berücksichtigt werden. Erstens ist die durchschnittliche ADMA-Konzentration der Studienteilnehmer in der vorliegenden Studie verglichen mit denen anderer Studienpopulationen innerhalb der physiologischen Grenzen⁴⁰². Zum anderen wären größere Veränderungen der ADMA-Konzentration eher bei Patienten mit initial erhöhten Werten zu erwarten. Zweitens liegen bisher keine Daten vor, die den für eine *in-vivo* ADMA-Reduktion minimalen Interventionszeitraum erfassen. Zudem sind keine Studien verfügbar, die die ADMA-Konzentration in Populationen mit traditionellem Isoflavonverzehr (in Form von Sojaprodukten o.a.) und mit einer westlich orientierten Ernährung vergleichen. Deshalb kann derzeit auch nicht beantwortet werden, ob eine Ernährungsweise, die reich an Isoflavonen oder Sojaprotein ist, die ADMA-Spiegel in der normalen Bevölkerung beeinflusst.

7.1 Schlussfolgerung

Die vorliegende Studie hat gezeigt, dass eine isoflavonreiche Ernährung keinen Einfluß auf die Endothelfunktion und die kardiovaskulären Risikomarker Homocystein, ADMA und den Blutdruck in gesunden postmenopausalen Frauen ausübt. Der gesundheitliche Nutzen einer Isoflavon supplementation in einer gesunden westlichen Bevölkerung ist daher fragwürdig. Dies ist in Übereinstimmung mit anderen Interventionsstudien, die weder eine vorteilhafte Beeinflussung der Blutlipidwerte²⁰⁵ noch typischer Menopausenbeschwerden (z.B. Hitzewellen)¹⁸² mit isolierten Isoflavonen nachweisen konnten. Auch sind Ergebnisse von Interventionen mit Schwerpunkt der Osteoporoseprävention⁴⁰⁵ und hormonabhängiger Krebsarten⁴⁰⁶ derzeit noch inkonsistent. Deshalb kann eine generelle Supplementation von isolierten Isoflavonen an gesunde postmenopausale Frauen in westlichen Ländern nicht empfohlen werden, auch wenn bisher keine ausreichenden Beweise einer schädlichen Wirkung vorliegen⁴⁰⁷.

8 Literaturverzeichnis

1. Mosca L, Manson JE, Sutherland SE, Langer RD, Manolio T, Barrett-Connor E. Cardiovascular disease in women: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. Writing Group. *Circulation*. 1997;96:2468-82.
2. Barrett-Connor E, Bush TL. Estrogen and coronary heart disease in women. *Jama*. 1991;265:1861-7.
3. Gebara OC, Mittleman MA, Sutherland P, Lipinska I, Matheney T, Xu P, Welty FK, Wilson PW, Levy D, Muller JE, et al. Association between increased estrogen status and increased fibrinolytic potential in the Framingham Offspring Study. *Circulation*. 1995;91:1952-8.
4. Matthews KA, Kuller LH, Sutton-Tyrrell K, Chang YF. Changes in cardiovascular risk factors during the perimenopause and postmenopause and carotid artery atherosclerosis in healthy women. *Stroke*. 2001;32:1104-11.
5. Hak AE, Polderman KH, Westendorp IC, Jakobs C, Hofman A, Witteman JC, Stehouwer CD. Increased plasma homocysteine after menopause. *Atherosclerosis*. 2000;149:163-8.
6. Graham IM, Daly LE, Refsum HM, Robinson K, Brattstrom LE, Ueland PM, Palma-Reis RJ, Boers GH, Sheahan RG, Israelsson B, Uiterwaal CS, Meleady R, McMaster D, Verhoef P, Witteman J, Rubba P, Bellet H, Wautrecht JC, de Valk HW, Sales Luis AC, Parrot-Rouland FM, Tan KS, Higgins I, Garcon D, Andria G, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project. *Jama*. 1997;277:1775-81.
7. Tawakol A, Omland T, Gerhard M, Wu JT, Creager MA. Hyperhomocyst(e)inemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation in humans. *Circulation*. 1997;95:1119-21.
8. Woo KS, Sanderson JE, Sun YY, Chook P, Cheung AS, Chan LT, Metreweli C, Lolin YI, Celermajer DS. Hyperhomocyst(e)inemia is a risk factor for arterial endothelial dysfunction in humans. *Circulation*. 2000;101:E116.
9. Poredos P. Endothelial dysfunction in the pathogenesis of atherosclerosis. *Int Angiol*. 2002;21:109-16.
10. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*. 1992;340:1111-5.
11. Takase B, Uehata A, Akima T, Nagai T, Nishioka T, Hamabe A, Satomura K, Ohsuzu F, Kurita A. Endothelium-dependent flow-mediated vasodilation in coronary and brachial arteries in suspected coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 1998;82:1535-9, A7-8.
12. Quyyumi AA. Prognostic value of endothelial function. *Am J Cardiol*. 2003;91:19H-24H.
13. Celermajer DS, Sorensen KE, Spiegelhalter DJ, Georgakopoulos D, Robinson J, Deanfield JE. Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women. *J Am Coll Cardiol*. 1994;24:471-6.
14. Lieberman EH, Gerhard MD, Uehata A, Walsh BW, Selwyn AP, Ganz P, Yeung AC, Creager MA. Estrogen improves endothelium-dependent, flow-mediated vasodilation in postmenopausal women. *Ann Intern Med*. 1994;121:936-41.
15. Boger RH, Bode-Boger SM, Thiele W, Junker W, Alexander K, Frolich JC. Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation*. 1997;95:2068-74.
16. Boger RH, Sydow K, Borlak J, Thum T, Lenzen H, Schubert B, Tsikas D, Bode-Boger SM. LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Circ Res*. 2000;87:99-105.
17. Lentz SR, Piegors DJ, Malinow MR, Heistad DD. Supplementation of atherogenic diet with B vitamins does not prevent atherosclerosis or vascular dysfunction in monkeys. *Circulation*. 2001;103:1006-11.
18. Teerlink T, Neele SJ, de Jong S, Netelenbos JC, Stehouwer CD. Oestrogen replacement therapy lowers plasma levels of asymmetrical dimethylarginine in healthy postmenopausal women. *Clin Sci (Lond)*. 2003;105:67-71.
19. Boger RH, Lentz SR, Bode-Boger SM, Knapp HR, Haynes WG. Elevation of asymmetrical dimethylarginine may mediate endothelial dysfunction during experimental hyperhomocyst(e)inaemia in humans. *Clin Sci (Lond)*. 2001;100:161-7.
20. Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, Vittinghoff E. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *Jama*. 1998;280:605-13.

21. Liggins J, Bluck LJ, Runswick S, Atkinson C, Coward WA, Bingham SA. Daidzein and genistein contents of vegetables. *Br J Nutr.* 2000;84:717-25.
22. Morton MS, Arisaka O, Miyake N, Morgan LD, Evans BA. Phytoestrogen concentrations in serum from Japanese men and women over forty years of age. *J Nutr.* 2002;132:3168-71.
23. de Kleijn MJ, van der Schouw YT, Wilson PW, Adlercreutz H, Mazur W, Grobbee DE, Jacques PF. Intake of dietary phytoestrogens is low in postmenopausal women in the United States: the Framingham study(1-4). *J Nutr.* 2001;131:1826-32.
24. Nagata C, Shimizu H, Takami R, Hayashi M, Takeda N, Yasuda K. Hot flushes and other menopausal symptoms in relation to soy product intake in Japanese women. *Climacteric.* 1999;2:6-12.
25. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology.* 1997;138:863-70.
26. Setchell KD, Cassidy A. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *J Nutr.* 1999;129:758S-767S.
27. Makela S, Savolainen H, Aavik E, Myllarniemi M, Strauss L, Taskinen E, Gustafsson JA, Hayry P. Differentiation between vasculoprotective and uterotrophic effects of ligands with different binding affinities to estrogen receptors alpha and beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:7077-82.
28. Finking G, Wohlfrom M, Lenz C, Wolkenhauer M, Eberle C, Brehme U, Bruck B, Hanke H. The effect of 17beta-estradiol, and the phytoestrogens genistein and daidzein on neointima development in endothelium-denuded female rabbit aortae--an in vitro study. *Endothelium.* 2000;7:99-107.
29. Walker HA, Dean TS, Sanders TA, Jackson G, Ritter JM, Chowienczyk PJ. The Phytoestrogen Genistein Produces Acute Nitric Oxide-Dependent Dilatation of Human Forearm Vasculature With Similar Potency to 17ss-Estradiol. *Circulation.* 2001;103:258-262.
30. Squadrito F, Altavilla D, Crisafulli A, Saitta A, Cucinotta D, Morabito N, D'Anna R, Corrado F, Ruggeri P, Frisina N, Squadrito G. Effect of genistein on endothelial function in postmenopausal women: a randomized, double-blind, controlled study. *Am J Med.* 2003;114:470-6.
31. Nagata C, Takatsuka N, Kawakami N, Shimizu H. Soy product intake and hot flashes in Japanese women: results from a community-based prospective study. *Am J Epidemiol.* 2001;153:790-3.
32. Barrett-Connor E. Sex differences in coronary heart disease. Why are women so superior? The 1995 Ancel Keys Lecture. *Circulation.* 1997;95:252-64.
33. Cardiovascular Health Branch DoCDCaCI, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, CDC. Trends in ischemic heart disease mortality - United States, 1980-1988. *Morb Mortal Week Rep.* 1992;41:548-556.
34. Association AH. Heart and Stroke Facts: Statistical Update. In: American Heart Association, Dallas, Texas; 1996.
35. Mercuro G, Vitale C, Fini M, Zoncu S, Leonardo F, Rosano GM. Lipid profiles and endothelial function with low-dose hormone replacement therapy in postmenopausal women at risk for coronary artery disease: a randomized trial. *Int J Cardiol.* 2003;89:257-65.
36. Nickelsen T, Creatsas G, Rechberger T, Depypere H, Erenus M, Quail D, Arndt T, Bonnar J. Differential effects of raloxifene and continuous combined hormone replacement therapy on biochemical markers of cardiovascular risk: results from the Euralox 1 study. *Climacteric.* 2001;4:320-31.
37. de Kleijn MJ, Wilmink HW, Bots ML, Bak AA, van der Schouw YT, Planellas J, Engelen S, Banga JD, Grobbee DE. Hormone replacement therapy and endothelial function. Results of a randomized controlled trial in healthy postmenopausal women. *Atherosclerosis.* 2001;159:357-65.
38. Guzic-Salobir B, Keber I, Seljeflot I, Arnesen H, Vrabec L. Combined hormone replacement therapy improves endothelial function in healthy postmenopausal women. *Journal of Internal Medicine.* 2001;250:508-515.
39. Finking G, Lenz C, Schochat T, Hanke H. Reduction of post injury neointima formation due to 17beta-estradiol and phytoestrogen treatment is not influenced by the pure synthetic estrogen receptor antagonist ICI 182,780 in vitro. *BMC Cardiovasc Disord.* 2002;2:13.
40. Nakamura Y, Suzuki T, Miki Y, Tazawa C, Senzaki K, Moriya T, Saito H, Ishibashi T, Takahashi S, Yamada S, Sasano H. Estrogen receptors in atherosclerotic human aorta: inhibition of human vascular smooth muscle cell proliferation by estrogens. *Mol Cell Endocrinol.* 2004;219:17-26.
41. Watanabe T, Akishita M, Nakaoka T, Kozaki K, Miyahara Y, He H, Ohike Y, Ogita T, Inoue S, Muramatsu M, Yamashita N, Ouchi Y. Estrogen receptor beta mediates the inhibitory effect of estradiol on vascular smooth muscle cell proliferation. *Cardiovasc Res.* 2003;59:734-44.

42. Effects of estrogen or estrogen/progestin regimens on heart disease risk factors in postmenopausal women. The Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Trial. The Writing Group for the PEPI Trial. *Jama*. 1995;273:199-208.
43. Vehkavaara S, Silveira A, Hakala-Ala-Pietila T, Virkamaki A, Hovatta O, Hamsten A, Taskinen MR, Yki-Jarvinen H. Effects of oral and transdermal estrogen replacement therapy on markers of coagulation, fibrinolysis, inflammation and serum lipids and lipoproteins in postmenopausal women. *Thromb Haemost*. 2001;85:619-25.
44. Acs N, Vajo Z, Miklos Z, Siklosi G, Paulin F, Felicetta JV, Szekacs B. The effects of postmenopausal hormone replacement therapy on hemostatic variables: a meta-analysis of 46 studies. *Gynecol Endocrinol*. 2002;16:335-46.
45. Miller J, Chan BK, Nelson HD. Postmenopausal estrogen replacement and risk for venous thromboembolism: a systematic review and meta-analysis for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*. 2002;136:680-90.
46. Kawano H, Motoyama T, Hirai N, Yoshimura T, Kugiyama K, Ogawa H, Okamura H, Yasue H. Effect of medroxyprogesterone acetate plus estradiol on endothelium-dependent vasodilation in postmenopausal women. *Am J Cardiol*. 2001;87:238-40, A9.
47. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-26.
48. Bauriedel G, Hutter R, Welsch U, Bach R, Sievert H, Luderitz B. Role of smooth muscle cell death in advanced coronary primary lesions: implications for plaque instability. *Cardiovasc Res*. 1999;41:480-8.
49. Marek JM, Koehler C, Aguirre ML, Westerband A, Gentile AT, Mills JL, Hunter GC. The histologic characteristics of primary and restenotic carotid plaque. *J Surg Res*. 1998;74:27-33.
50. Celermajer DS. Endothelial dysfunction: does it matter? Is it reversible? *J Am Coll Cardiol*. 1997;30:325-33.
51. Adams MR, McCredie R, Jessup W, Robinson J, Sullivan D, Celermajer DS. Oral L-arginine improves endothelium-dependent dilatation and reduces monocyte adhesion to endothelial cells in young men with coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 1997;129:261-9.
52. Williams JK, Adams MR, Klopstein HS. Estrogen modulates responses of atherosclerotic coronary arteries. *Circulation*. 1990;81:1680-7.
53. Williams JK, Anthony MS, Honore EK, Herrington DM, Morgan TM, Register TC, Clarkson TB. Regression of atherosclerosis in female monkeys. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:827-36.
54. Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, Bull C, Thomas O, Robinson J, Deanfield JE. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation*. 1993;88:2149-55.
55. Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, Robinson J, Deanfield JE. Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. *J Am Coll Cardiol*. 1994;24:1468-74.
56. Celermajer DS, Adams MR, Clarkson P, Robinson J, McCredie R, Donald A, Deanfield JE. Passive smoking and impaired endothelium-dependent arterial dilatation in healthy young adults. *N Engl J Med*. 1996;334:150-4.
57. Herrington DM, Werbel BL, Riley WA, Pusser BE, Morgan TM. Individual and combined effects of estrogen/progestin therapy and lovastatin on lipids and flow-mediated vasodilation in postmenopausal women with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 1999;33:2030-7.
58. Mancini GB. Emerging concepts: angiotensin-converting enzyme inhibition in coronary artery disease. *Cardiovasc Drugs Ther*. 1996;10 Suppl 2:609-12.
59. Theroux P, Fuster V. Acute coronary syndromes: unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction. *Circulation*. 1998;97:1195-206.
60. Davies MJ, Thomas A. Thrombosis and acute coronary-artery lesions in sudden cardiac ischemic death. *N Engl J Med*. 1984;310:1137-40.
61. Effectiveness of intravenous thrombolytic treatment in acute myocardial infarction. Gruppo Italiano per lo Studio della Streptochinasi nell'Infarto Miocardico (GISSI). *Lancet*. 1986;1:397-402.
62. Stanczyk FZ. Steroid hormones. In: Mishrell DR, Davajan, V., Lobo, R.A., eds., ed. *Infertility contraception and reproductive endocrinology*. 3rd ed. ed. Cambridge MA: Blackwell Scientific Publications, Inc.; 1991:69-70.
63. Richardson SJ, Senikas V, Nelson JF. Follicular depletion during the menopausal transition: evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion. *J Clin Endocrinol Metab*. 1987;65:1231-7.

64. Teede HJ. Hormone replacement therapy and the prevention of cardiovascular disease. *Hum Reprod Update*. 2002;8:201-15.
65. Baysal K, Losordo DW. Oestrogen receptors and cardiovascular disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1996;23:537-48.
66. Haynes MP, Li L, Russell KS, Bender JR. Rapid vascular cell responses to estrogen and membrane receptors. *Vascul Pharmacol*. 2002;38:99-108.
67. Katzenellenbogen BS. Estrogen receptors: bioactivities and interactions with cell signaling pathways. *Biol Reprod*. 1996;54:287-93.
68. Matthews J, Gustafsson JA. Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Interv*. 2003;3:281-92.
69. Tamrazi A, Carlson KE, Daniels JR, Hurth KM, Katzenellenbogen JA. Estrogen receptor dimerization: ligand binding regulates dimer affinity and dimer dissociation rate. *Mol Endocrinol*. 2002;16:2706-19.
70. Losordo DW, Kearney M, Kim EA, Jekanowski J, Isner JM. Variable expression of the estrogen receptor in normal and atherosclerotic coronary arteries of premenopausal women. *Circulation*. 1994;89:1501-10.
71. Lindner V, Kim SK, Karas RH, Kuiper GG, Gustafsson JA, Mendelsohn ME. Increased expression of estrogen receptor-beta mRNA in male blood vessels after vascular injury. *Circ Res*. 1998;83:224-9.
72. Stefano GB, Prevot V, Beauvillain JC, Cadet P, Fimiani C, Welters I, Fricchione GL, Breton C, Lassalle P, Salzet M, Bilfinger TV. Cell-surface estrogen receptors mediate calcium-dependent nitric oxide release in human endothelia. *Circulation*. 2000;101:1594-7.
73. Takeda-Matsubara Y, Nakagami H, Iwai M, Cui TX, Shiuchi T, Akishita M, Nahmias C, Ito M, Horiuchi M. Estrogen activates phosphatases and antagonizes growth-promoting effect of angiotensin II. *Hypertension*. 2002;39:41-5.
74. Kitazawa T, Hamada E, Kitazawa K, Gaznabi AK. Non-genomic mechanism of 17 beta-oestradiol-induced inhibition of contraction in mammalian vascular smooth muscle. *J Physiol*. 1997;499 (Pt 2):497-511.
75. Teede HJ. The menopause and HRT. Hormone replacement therapy, cardiovascular and cerebrovascular disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2003;17:73-90.
76. Beresford SA, Weiss NS, Voigt LF, McKnight B. Risk of endometrial cancer in relation to use of oestrogen combined with cyclic progestagen therapy in postmenopausal women. *Lancet*. 1997;349:458-61.
77. Sullivan JM, El-Zeky F, Vander Zwaag R, Ramanathan KB. Effect on survival of estrogen replacement therapy after coronary artery bypass grafting. *Am J Cardiol*. 1997;79:847-50.
78. Grodstein F, Stampfer M. The epidemiology of coronary heart disease and estrogen replacement in postmenopausal women. *Prog Cardiovasc Dis*. 1995;38:199-210.
79. Wolf PH, Madans JH, Finucane FF, Higgins M, Kleinman JC. Reduction of cardiovascular disease-related mortality among postmenopausal women who use hormones: evidence from a national cohort. *Am J Obstet Gynecol*. 1991;164:489-94.
80. Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama*. 2002;288:321-33.
81. Wassertheil-Smoller S, Hendrix SL, Limacher M, Heiss G, Kooperberg C, Baird A, Kotchen T, Curb JD, Black H, Rossouw JE, Aragaki A, Safford M, Stein E, Laowattana S, Mysiw WJ. Effect of estrogen plus progestin on stroke in postmenopausal women: the Women's Health Initiative: a randomized trial. *Jama*. 2003;289:2673-84.
82. Rosano GM, Vitale C, Silvestri A, Fini M. Metabolic and vascular effect of progestins in post-menopausal women. Implications for cardioprotection. *Maturitas*. 2003;46 Suppl 1:S17-29.
83. Adams MR, Register TC, Golden DL, Wagner JD, Williams JK. Medroxyprogesterone acetate antagonizes inhibitory effects of conjugated equine estrogens on coronary artery atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:217-21.
84. Grady D, Herrington D, Bittner V, Blumenthal R, Davidson M, Hlatky M, Hsia J, Hulley S, Herd A, Khan S, Newby LK, Waters D, Vittinghoff E, Wenger N. Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). *Jama*. 2002;288:49-57.
85. Hulley S, Furberg C, Barrett-Connor E, Cauley J, Grady D, Haskell W, Knopp R, Lowery M, Satterfield S, Schrott H, Vittinghoff E, Hunninghake D. Noncardiovascular disease outcomes during 6.8 years of

- hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). *Jama*. 2002;288:58-66.
86. Clarkson TB, Hughes CL, Klein KP. The nonhuman primate model of the relationship between gonadal steroids and coronary heart disease. *Prog Cardiovasc Dis*. 1995;38:189-98.
87. Clarkson TB. Estrogens, progestins, and coronary heart disease in cynomolgus monkeys. *Fertil Steril*. 1994;62:147S-151S.
88. Bellinger DA, Williams JK, Adams MR, Honore EK, Bender DE. Oral contraceptives and hormone replacement therapy do not increase the incidence of arterial thrombosis in a nonhuman primate model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:92-9.
89. Alexandersen P, Haarbo J, Breinholt V, Christiansen C. Dietary phytoestrogens and estrogen inhibit experimental atherosclerosis. *Climacteric*. 2001;4:151-9.
90. Brehme U, Bruck B, Gugel N, Wehrmann M, Hanke S, Finking G, Schmahl FW, Hanke H. Aortic plaque size and endometrial response in cholesterol-fed rabbits treated with estrogen plus continuous or sequential progestin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:1930-7.
91. Aavik E, du Toit D, Myburgh E, Frosen J, Hayry P. Estrogen receptor beta dominates in baboon carotid after endothelial denudation injury. *Mol Cell Endocrinol*. 2001;182:91-8.
92. Geraldes P, Sirois MG, Bernatchez PN, Tanguay JF. Estrogen regulation of endothelial and smooth muscle cell migration and proliferation: role of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1585-90.
93. Oparil S, Levine RL, Chen SJ, Durand J, Chen YF. Sexually dimorphic response of the balloon-injured rat carotid artery to hormone treatment. *Circulation*. 1997;95:1301-7.
94. White CR, Shelton J, Chen SJ, Darley-Usmar V, Allen L, Nabors C, Sanders PW, Chen YF, Oparil S. Estrogen restores endothelial cell function in an experimental model of vascular injury. *Circulation*. 1997;96:1624-30.
95. Darkow DJ, Lu L, White RE. Estrogen relaxation of coronary artery smooth muscle is mediated by nitric oxide and cGMP. *Am J Physiol*. 1997;272:H2765-73.
96. Chen Z, Yuhanna IS, Galcheva-Gargova Z, Karas RH, Mendelsohn ME, Shaul PW. Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest*. 1999;103:401-6.
97. Garcia-Duran M, de Frutos T, Diaz-Recasens J, Garcia-Galvez G, Jimenez A, Monton M, Farre J, Sanchez de Miguel L, Gonzalez-Fernandez F, Arriero MD, Rico L, Garcia R, Casado S, Lopez-Farre A. Estrogen stimulates neuronal nitric oxide synthase protein expression in human neutrophils. *Circ Res*. 1999;85:1020-6.
98. Vagnoni KE, Shaw CE, Phernetton TM, Meglin BM, Bird IM, Magness RR. Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. III. Ovarian and estrogen effects on NO synthase. *Am J Physiol*. 1998;275:H1845-56.
99. Haynes MP, Russell KS, Bender JR. Molecular mechanisms of estrogen actions on the vasculature. *J Nucl Cardiol*. 2000;7:500-8.
100. Gewaltig MT, Kojda G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovasc Res*. 2002;55:250-60.
101. Guetta V, Quyyumi AA, Prasad A, Panza JA, Waclawiw M, Cannon RO, 3rd. The role of nitric oxide in coronary vascular effects of estrogen in postmenopausal women. *Circulation*. 1997;96:2795-801.
102. Hayashi T, Fukuto JM, Ignarro LJ, Chaudhuri G. Basal release of nitric oxide from aortic rings is greater in female rabbits than in male rabbits: implications for atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:11259-63.
103. Binko J, Murphy TV, Majewski H. 17Beta-oestradiol enhances nitric oxide synthase activity in endothelium-denuded rat aorta. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1998;25:120-7.
104. Rapoport RM, Draznin MB, Murad F. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature*. 1983;306:174-6.
105. McDonald LJ, Murad F. Nitric oxide and cGMP signaling. *Adv Pharmacol*. 1995;34:263-75.
106. Bush TL, Barrett-Connor E, Cowan LD, Criqui MH, Wallace RB, Suchindran CM, Tyroler HA, Rifkind BM. Cardiovascular mortality and noncontraceptive use of estrogen in women: results from the Lipid Research Clinics Program Follow-up Study. *Circulation*. 1987;75:1102-9.
107. Darling GM, Johns JA, McCloud PI, Davis SR. Estrogen and progestin compared with simvastatin for hypercholesterolemia in postmenopausal women. *N Engl J Med*. 1997;337:595-601.

108. Bass KM, Newschaffer CJ, Klag MJ, Bush TL. Plasma lipoprotein levels as predictors of cardiovascular death in women. *Arch Intern Med.* 1993;153:2209-16.
109. Sack MN, Rader DJ, Cannon RO, 3rd. Oestrogen and inhibition of oxidation of low-density lipoproteins in postmenopausal women. *Lancet.* 1994;343:269-70.
110. Viscoli CM, Brass LM, Kernan WN, Sarrel PM, Suissa S, Horwitz RI. A clinical trial of estrogen-replacement therapy after ischemic stroke. *N Engl J Med.* 2001;345:1243-9.
111. Peverill RE, Teede HJ, Smolich JJ, Malan E, Kotsopoulos D, Tipping PG, McGrath BP. Effects of combined oral hormone replacement therapy on tissue factor pathway inhibitor and factor VII. *Clin Sci (Lond).* 2001;101:93-9.
112. Teede HJ, McGrath BP, Smolich JJ, Malan E, Kotsopoulos D, Liang YL, Peverill RE. Postmenopausal hormone replacement therapy increases coagulation activity and fibrinolysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1404-9.
113. Sidelmann JJ, Jespersen J, Andersen LF, Skouby SO. Hormone replacement therapy and hypercoagulability. Results from the Prospective Collaborative Danish Climacteric Study. *Bjog.* 2003;110:541-7.
114. Eikelboom JW, Lonn E, Genest J, Jr., Hankey G, Yusuf S. Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence. *Ann Intern Med.* 1999;131:363-75.
115. den Heijer M, Rosendaal FR, Blom HJ, Gerrits WB, Bos GM. Hyperhomocysteinemia and venous thrombosis: a meta-analysis. *Thromb Haemost.* 1998;80:874-7.
116. Wouters MG, Moorrees MT, van der Mooren MJ, Blom HJ, Boers GH, Schellekens LA, Thomas CM, Eskes TK. Plasma homocysteine and menopausal status. *Eur J Clin Invest.* 1995;25:801-5.
117. Boers GH, Smals AG, Trijbels FJ, Leermakers AI, Kloppenborg PW. Unique efficiency of methionine metabolism in premenopausal women may protect against vascular disease in the reproductive years. *J Clin Invest.* 1983;72:1971-6.
118. Mijatovic V, Netelenbos C, van der Mooren MJ, de Valk-de Roo GW, Jakobs C, Kenemans P. Randomized, double-blind, placebo-controlled study of the effects of raloxifene and conjugated equine estrogen on plasma homocysteine levels in healthy postmenopausal women. *Fertil Steril.* 1998;70:1085-9.
119. van Baal WM, Smolders RG, van der Mooren MJ, Teerlink T, Kenemans P. Hormone replacement therapy and plasma homocysteine levels. *Obstet Gynecol.* 1999;94:485-91.
120. Yildirim A, Aybar F, Tokgozoglu L, Yarali H, Kabakci G, Bukulmez O, Sinici I, Oto A. Effects of hormone replacement therapy on plasma homocysteine and C-reactive protein levels. *Gynecol Obstet Invest.* 2002;53:54-8.
121. Walsh BW, Paul S, Wild RA, Dean RA, Tracy RP, Cox DA, Anderson PW. The effects of hormone replacement therapy and raloxifene on C-reactive protein and homocysteine in healthy postmenopausal women: a randomized, controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:214-8.
122. Finkelstein JD, Harris BJ, Kyle WE. Methionine metabolism in mammals: kinetic study of betaine-homocysteine methyltransferase. *Arch Biochem Biophys.* 1972;153:320-4.
123. Blom HJ, Boers GH, van den Elzen JP, van Roessel JJ, Trijbels JM, Tangerman A. Differences between premenopausal women and young men in the transamination pathway of methionine catabolism, and the protection against vascular disease. *Eur J Clin Invest.* 1988;18:633-8.
124. Stevenson JC, Oladipo A, Manassiev N, Whitehead MI, Guilford S, Proudler AJ. Randomized trial of effect of transdermal continuous combined hormone replacement therapy on cardiovascular risk markers. *Br J Haematol.* 2004;124:802-8.
125. Higashi Y, Sanada M, Sasaki S, Nakagawa K, Goto C, Matsuura H, Ohama K, Chayama K, Oshima T. Effect of estrogen replacement therapy on endothelial function in peripheral resistance arteries in normotensive and hypertensive postmenopausal women. *Hypertension.* 2001;37:651-7.
126. Kanaya AM, Herrington D, Vittinghoff E, Lin F, Grady D, Bittner V, Cauley JA, Barrett-Connor E. Glycemic effects of postmenopausal hormone therapy: the Heart and Estrogen/progestin Replacement Study. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med.* 2003;138:1-9.
127. Sumino H, Ichikawa S, Yoshida A, Murakami M, Kanda T, Mizunuma H, Sakamaki T, Kurabayashi M. Effects of hormone replacement therapy on weight, abdominal fat distribution, and lipid levels in Japanese postmenopausal women. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2003;27:1044-51.
128. Stork S, von Schacky C, Angerer P. The effect of 17beta-estradiol on endothelial and inflammatory markers in postmenopausal women: a randomized, controlled trial. *Atherosclerosis.* 2002;165:301-7.

129. Van Baal WM, Emeis JJ, Kenemans P, Kessel H, Peters-Muller ER, Schalkwijk CG, van der Mooren MJ, Stehouwer CD. Short-term hormone replacement therapy: reduced plasma levels of soluble adhesion molecules. *Eur J Clin Invest.* 1999;29:913-21.
130. van Baal WM, Kooistra T, Stehouwer CD. Cardiovascular disease risk and hormone replacement therapy (HRT): a review based on randomised, controlled studies in postmenopausal women. *Curr Med Chem.* 2000;7:499-517.
131. Rodrigo MC, Martin DS, Eyster KM. Vascular ECE-1 mRNA expression decreases in response to estrogens. *Life Sci.* 2003;73:2973-83.
132. Vitale C, Fini M, Leonardo F, Rossini P, Cerquetani E, Onorati D, Rosano GM. Effect of estradiol valerate alone or in association with cyproterone acetate upon vascular function of postmenopausal women at increased risk for cardiovascular disease. *Maturitas.* 2001;40:239-45.
133. Chin-Dusting JP, Fisher LJ, Lewis TV, Piekarska A, Nestel PJ, Husband A. The vascular activity of some isoflavone metabolites: implications for a cardioprotective role. *Br J Pharmacol.* 2001;133:595-605.
134. Polkowski K, Mazurek AP. Biological properties of genistein. A review of in vitro and in vivo data. *Acta Pol Pharm.* 2000;57:135-55.
135. Kurzer MS. Hormonal effects of soy isoflavones: studies in premenopausal and postmenopausal women. *J Nutr.* 2000;130:660S-1S.
136. Coward L, Smith M, Kirk M, Barnes S. Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing. *Am J Clin Nutr.* 1998;68:1486S-1491S.
137. Setchell KD, Brown NM, Zimmer-Nechemias L, Brashear WT, Wolfe BE, Kirschner AS, Heubi JE. Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2002;76:447-53.
138. Chang YC, Nair MG. Metabolism of daidzein and genistein by intestinal bacteria. *J Nat Prod.* 1995;58:1892-6.
139. Setchell KD. Absorption and metabolism of soy isoflavones-from food to dietary supplements and adults to infants. *J Nutr.* 2000;130:654S-5S.
140. Rowland IR, Wiseman H, Sanders TA, Adlercreutz H, Bowey EA. Interindividual variation in metabolism of soy isoflavones and lignans: influence of habitual diet on equol production by the gut microflora. *Nutr Cancer.* 2000;36:27-32.
141. Adlercreutz H, Honjo H, Higashi A, Fotsis T, Hamalainen E, Hasegawa T, Okada H. Urinary excretion of lignans and isoflavonoid phytoestrogens in Japanese men and women consuming a traditional Japanese diet. *Am J Clin Nutr.* 1991;54:1093-100.
142. Kelly GE, Nelson C, Waring MA, Joannou GE, Reeder AY. Metabolites of dietary (soya) isoflavones in human urine. *Clin Chim Acta.* 1993;223:9-22.
143. Sfakianos J, Coward L, Kirk M, Barnes S. Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats. *J Nutr.* 1997;127:1260-8.
144. Ritchie MR, Morton MS, Deighton N, Blake A, Cummings JH. Plasma and urinary phyto-oestrogens as biomarkers of intake: validation by duplicate diet analysis. *Br J Nutr.* 2004;91:447-57.
145. Watanabe S, Yamaguchi M, Sobue T, Takahashi T, Miura T, Arai Y, Mazur W, Wahala K, Adlercreutz H. Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (kinako). *J Nutr.* 1998;128:1710-5.
146. King RA, Bursill DB. Plasma and urinary kinetics of the isoflavones daidzein and genistein after a single soy meal in humans. *Am J Clin Nutr.* 1998;67:867-72.
147. Rowland I, Faughnan M, Hoey L, Wahala K, Williamson G, Cassidy A. Bioavailability of phyto-oestrogens. *Br J Nutr.* 2003;89 Suppl 1:S45-58.
148. Dalais FS, Ebeling PR, Kotsopoulos D, McGrath BP, Teede HJ. The effects of soy protein containing isoflavones on lipids and indices of bone resorption in postmenopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2003;58:704-9.
149. Setchell KD, Brown NM, Desai P, Zimmer-Nechemias L, Wolfe BE, Brashear WT, Kirschner AS, Cassidy A, Heubi JE. Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *J Nutr.* 2001;131:1362S-75S.
150. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology.* 1998;139:4252-63.
151. Murkies AL, Lombard C, Strauss BJ, Wilcox G, Burger HG, Morton MS. Dietary flour supplementation decreases post-menopausal hot flushes: effect of soy and wheat. *Maturitas.* 1995;21:189-95.

152. Mueller SO, Simon S, Chae K, Metzler M, Korach KS. Phytoestrogens and Their Human Metabolites Show Distinct Agonistic and Antagonistic Properties on Estrogen Receptor (ER){alpha} and ER{beta} in Human Cells. *Toxicol Sci.* 2004.
153. Morito K, Aomori T, Hirose T, Kinjo J, Hasegawa J, Ogawa S, Inoue S, Muramatsu M, Masamune Y. Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta (II). *Biol Pharm Bull.* 2002;25:48-52.
154. Katzenellenbogen BS, Choi I, Delage-Mourroux R, Ediger TR, Martini PG, Montano M, Sun J, Weis K, Katzenellenbogen JA. Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands and receptor pharmacology. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2000;74:279-85.
155. Markiewicz L, Garey J, Adlercreutz H, Gurdip E. In vitro bioassays of non-steroidal phytoestrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1993;45:399-405.
156. Kostelac D, Rechkemmer G, Briviba K. Phytoestrogens modulate binding response of estrogen receptors alpha and beta to the estrogen response element. *J Agric Food Chem.* 2003;51:7632-5.
157. An J, Tzagarakis-Foster C, Scharschmidt TC, Lomri N, Leitman DC. Estrogen receptor beta-selective transcriptional activity and recruitment of coregulators by phytoestrogens. *J Biol Chem.* 2001;276:17808-14.
158. Hodges YK, Tung L, Yan XD, Graham JD, Horwitz KB, Horwitz LD. Estrogen receptors alpha and beta: prevalence of estrogen receptor beta mRNA in human vascular smooth muscle and transcriptional effects. *Circulation.* 2000;101:1792-8.
159. Curtis SH, Korach KS. Steroid receptor knockout models: phenotypes and responses illustrate interactions between receptor signaling pathways in vivo. *Adv Pharmacol.* 2000;47:357-80.
160. Bennetts HW, Underwood EJ. The oestrogenic effects of subterranean clover (*trifolium subterraneum*); uterine maintenance in the ovariectomised ewe on clover grazing. *Aust J Exp Biol Med Sci.* 1951;29:249-53.
161. Nicholls J, Lasley BL, Nakajima ST, Setchell KD, Schneeman BO. Effects of soy consumption on gonadotropin secretion and acute pituitary responses to gonadotropin-releasing hormone in women. *J Nutr.* 2002;132:708-14.
162. Kumar NB, Cantor A, Allen K, Riccardi D, Cox CE. The specific role of isoflavones on estrogen metabolism in premenopausal women. *Cancer.* 2002;94:1166-74.
163. Casanova M, You L, Gaido KW, Archibeque-Engle S, Janszen DB, Heck HA. Developmental effects of dietary phytoestrogens in Sprague-Dawley rats and interactions of genistein and daidzein with rat estrogen receptors alpha and beta in vitro. *Toxicol Sci.* 1999;51:236-44.
164. Hale GE, Hughes CL, Cline JM. Endometrial cancer: hormonal factors, the perimenopausal "window of risk," and isoflavones. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:3-15.
165. Burdette JE, Liu J, Lantvit D, Lim E, Booth N, Bhat KP, Hedayat S, Van Breemen RB, Constantinou AI, Pezzuto JM, Farnsworth NR, Bolton JL. *Trifolium pratense* (red clover) exhibits estrogenic effects in vivo in ovariectomized Sprague-Dawley rats. *J Nutr.* 2002;132:27-30.
166. Levy JR, Faber KA, Ayyash L, Hughes CL, Jr. The effect of prenatal exposure to the phytoestrogen genistein on sexual differentiation in rats. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1995;208:60-6.
167. Bickoff EM, Livingston AL, Booth AN. Estrogenic activity of coumestrol and related compounds. *Arch Biochem Biophys.* 1960;88:262-6.
168. Chiechi LM, Putignano G, Guerra V, Schiavelli MP, Cisternino AM, Carriero C. The effect of a soy rich diet on the vaginal epithelium in postmenopause: a randomized double blind trial. *Maturitas.* 2003;45:241-6.
169. Dalais FS, Rice GE, Wahlqvist ML, Grehan M, Murkies AL, Medley G, Ayton R, Strauss BJ. Effects of dietary phytoestrogens in postmenopausal women. *Climacteric.* 1998;1:124-9.
170. Penotti M, Fabio E, Modena AB, Rinaldi M, Omodei U, Vigano P. Effect of soy-derived isoflavones on hot flashes, endometrial thickness, and the pulsatility index of the uterine and cerebral arteries. *Fertil Steril.* 2003;79:1112-7.
171. Baird DD, Umbach DM, Lansdell L, Hughes CL, Setchell KD, Weinberg CR, Haney AF, Wilcox AJ, McLachlan JA. Dietary intervention study to assess estrogenicity of dietary soy among postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995;80:1685-90.
172. Maskarinec G, Williams AE, Inouye JS, Stanczyk FZ, Franke AA. A randomized isoflavone intervention among premenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002;11:195-201.
173. Cassidy A, Bingham S, Setchell K. Biological effects of isoflavones in young women: importance of the chemical composition of soyabean products. *Br J Nutr.* 1995;74:587-601.

174. Xu X, Duncan AM, Wangen KE, Kurzer MS. Soy consumption alters endogenous estrogen metabolism in postmenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000;9:781-6.
175. Lu LJ, Anderson KE, Grady JJ, Kohen F, Nagamani M. Decreased ovarian hormones during a soya diet: implications for breast cancer prevention. *Cancer Res.* 2000;60:4112-21.
176. Duncan AM, Underhill KE, Xu X, Lavalleur J, Phipps WR, Kurzer MS. Modest hormonal effects of soy isoflavones in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:3479-84.
177. Cassidy A, Bingham S, Setchell KD. Biological effects of a diet of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 1994;60:333-40.
178. Lock M. Ambiguities of aging: Japanese experience and perceptions of menopause. *Cult Med Psychiatry.* 1986;10:23-46.
179. Albertazzi P, Pansini F, Bonaccorsi G, Zanotti L, Forini E, De Aloysio D. The effect of dietary soy supplementation on hot flushes. *Obstet Gynecol.* 1998;91:6-11.
180. Kotsopoulos D, Dalais FS, Liang YL, McGrath BP, Teede HJ. The effects of soy protein containing phytoestrogens on menopausal symptoms in postmenopausal women. *Climacteric.* 2000;3:161-7.
181. Burke GL, Legault C, Anthony M, Bland DR, Morgan TM, Naughton MJ, Leggett K, Washburn SA, Vitolins MZ. Soy protein and isoflavone effects on vasomotor symptoms in peri- and postmenopausal women: the Soy Estrogen Alternative Study. *Menopause.* 2003;10:147-53.
182. Baber RJ, Templeman C, Morton T, Kelly GE, West L. Randomized placebo-controlled trial of an isoflavone supplement and menopausal symptoms in women. *Climacteric.* 1999;2:85-92.
183. Knight DC, Howes JB, Eden JA. The effect of Promensil, an isoflavone extract, on menopausal symptoms. *Climacteric.* 1999;2:79-84.
184. Washburn S, Burke GL, Morgan T, Anthony M. Effect of soy protein supplementation on serum lipoproteins, blood pressure, and menopausal symptoms in perimenopausal women. *Menopause.* 1999;6:7-13.
185. Han KK, Soares JM, Jr., Haidar MA, de Lima GR, Baracat EC. Benefits of soy isoflavone therapeutic regimen on menopausal symptoms. *Obstet Gynecol.* 2002;99:389-94.
186. Hughes CL, Jr., Chakinala MM, Reece SG, Miller RN, Schomberg DW, Jr., Basham KB. Acute and subacute effects of naturally occurring estrogens on luteinizing hormone secretion in the ovariectomized rat: Part 2. *Reprod Toxicol.* 1991;5:133-7.
187. Zhang X, Shu XO, Gao YT, Yang G, Li Q, Li H, Jin F, Zheng W. Soy food consumption is associated with lower risk of coronary heart disease in Chinese women. *J Nutr.* 2003;133:2874-8.
188. Goodman-Gruen D, Kritz-Silverstein D. Usual dietary isoflavone intake is associated with cardiovascular disease risk factors in postmenopausal women. *J Nutr.* 2001;131:1202-6.
189. Ho SC, Woo JL, Leung SS, Sham AL, Lam TH, Janus ED. Intake of soy products is associated with better plasma lipid profiles in the Hong Kong Chinese population. *J Nutr.* 2000;130:2590-3.
190. Koebnick C, Reimann M, Carlsohn A, Korzen-Bohr S, Buegel S, Hallund J, Rossi L, Branca F, Williams CM, Zunft HJF, O'Doherty-Jensen K. The acceptability of isoflavones as a treatment of menopausal symptoms: a European survey among postmenopausal women. *Climacteric*;in press.
191. Anthony MS, Clarkson TB, Hughes CL, Jr., Morgan TM, Burke GL. Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. *J Nutr.* 1996;126:43-50.
192. Blair RM, Appt SE, Bennetau-Pelissero C, Clarkson TB, Anthony MS, Lamothe V, Potter SM. Dietary soy and soy isoflavones have gender-specific effects on plasma lipids and isoflavones in golden Syrian f(1)b hybrid hamsters. *J Nutr.* 2002;132:3585-91.
193. Clarkson TB, Anthony MS, Morgan TM. Inhibition of postmenopausal atherosclerosis progression: a comparison of the effects of conjugated equine estrogens and soy phytoestrogens. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:41-7.
194. Bakhit RM, Klein BP, Essex-Sorlie D, Ham JO, Erdman JW, Jr., Potter SM. Intake of 25 g of soybean protein with or without soybean fiber alters plasma lipids in men with elevated cholesterol concentrations. *J Nutr.* 1994;124:213-22.
195. Anderson JW, Johnstone BM, Cook-Newell ME. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N Engl J Med.* 1995;333:276-82.
196. Erdman JW, Jr. AHA Science Advisory: Soy protein and cardiovascular disease: A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the AHA. *Circulation.* 2000;102:2555-9.

197. Blum A, Lang N, Vigder F, Israeli P, Gumanovsky M, Lupovitz S, Elgazi A, Peleg A, Ben-Ami M. Effects of soy protein on endothelium-dependent vasodilatation and lipid profile in postmenopausal women with mild hypercholesterolemia. *Clin Invest Med.* 2003;26:20-6.
198. Teede HJ, Dalais FS, Kotsopoulos D, Liang YL, Davis S, McGrath BP. Dietary soy has both beneficial and potentially adverse cardiovascular effects: a placebo-controlled study in men and postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:3053-60.
199. Lichtenstein AH, Jalbert SM, Adlercreutz H, Goldin BR, Rasmussen H, Schaefer EJ, Ausman LM. Lipoprotein response to diets high in soy or animal protein with and without isoflavones in moderately hypercholesterolemic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1852-8.
200. Steinberg FM, Guthrie NL, Villablanca AC, Kumar K, Murray MJ. Soy protein with isoflavones has favorable effects on endothelial function that are independent of lipid and antioxidant effects in healthy postmenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 2003;78:123-30.
201. Jenkins DJ, Kendall CW, Vidgen E, Vuksan V, Jackson CJ, Augustin LS, Lee B, Garsetti M, Agarwal S, Rao AV, Cagampang GB, Fulgoni V, 3rd. Effect of soy-based breakfast cereal on blood lipids and oxidized low-density lipoprotein. *Metabolism.* 2000;49:1496-500.
202. Dent SB, Peterson CT, Brace LD, Swain JH, Reddy MB, Hanson KB, Robinson JG, Alekel DL. Soy protein intake by perimenopausal women does not affect circulating lipids and lipoproteins or coagulation and fibrinolytic factors. *J Nutr.* 2001;131:2280-7.
203. Anthony MS, Clarkson TB, Bullock BC, Wagner JD. Soy protein versus soy phytoestrogens in the prevention of diet-induced coronary artery atherosclerosis of male cynomolgus monkeys. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:2524-31.
204. Tovar-Palacio C, Potter SM, Hafermann JC, Shay NF. Intake of soy protein and soy protein extracts influences lipid metabolism and hepatic gene expression in gerbils. *J Nutr.* 1998;128:839-42.
205. Anthony MSB, R.M. & Clarkson, T.B. Neither isoflavones nor the alcohol-extracted fraction added to alcohol-washed soy protein isolate restores the lipoprotein effects of soy protein isolate. *J Nutr.* 2002;132:583S (abs.).
206. Wagner JD, Schwenke DC, Greaves KA, Zhang L, Anthony MS, Blair RM, Shadoan MK, Williams JK. Soy protein with isoflavones, but not an isoflavone-rich supplement, improves arterial low-density lipoprotein metabolism and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:2241-6.
207. Greaves KA, Parks JS, Williams JK, Wagner JD. Intact dietary soy protein, but not adding an isoflavone-rich soy extract to casein, improves plasma lipids in ovariectomized cynomolgus monkeys. *J Nutr.* 1999;129:1585-92.
208. Crouse JR, 3rd, Morgan T, Terry JG, Ellis J, Vitolins M, Burke GL. A randomized trial comparing the effect of casein with that of soy protein containing varying amounts of isoflavones on plasma concentrations of lipids and lipoproteins. *Arch Intern Med.* 1999;159:2070-6.
209. Merz-Demlow BE, Duncan AM, Wangen KE, Xu X, Carr TP, Phipps WR, Kurzer MS. Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic, premenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 2000;71:1462-9.
210. Wangen KE, Duncan AM, Xu X, Kurzer MS. Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic and mildly hypercholesterolemic postmenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 2001;73:225-31.
211. Jenkins DJ, Kendall CW, Jackson CJ, Connelly PW, Parker T, Faulkner D, Vidgen E, Cunnane SC, Leiter LA, Josse RG. Effects of high- and low-isoflavone soyfoods on blood lipids, oxidized LDL, homocysteine, and blood pressure in hyperlipidemic men and women. *Am J Clin Nutr.* 2002;76:365-72.
212. Hodgson JM, Puddey IB, Beilin LJ, Mori TA, Croft KD. Supplementation with isoflavonoid phytoestrogens does not alter serum lipid concentrations: a randomized controlled trial in humans. *J Nutr.* 1998;128:728-32.
213. Nestel PJ, Yamashita T, Sasahara T, Pomeroy S, Dart A, Komesaroff P, Owen A, Abbey M. Soy isoflavones improve systemic arterial compliance but not plasma lipids in menopausal and perimenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:3392-8.
214. Nestel PJ, Pomeroy S, Kay S, Komesaroff P, Behrsing J, Cameron JD, West L. Isoflavones from red clover improve systemic arterial compliance but not plasma lipids in menopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:895-8.
215. Simons LA, von Konigsmark M, Simons J, Celermajer DS. Phytoestrogens do not influence lipoprotein levels or endothelial function in healthy, postmenopausal women. *Am J Cardiol.* 2000;85:1297-301.

216. Dewell A, Hollenbeck CB, Bruce B. The effects of soy-derived phytoestrogens on serum lipids and lipoproteins in moderately hypercholesterolemic postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:118-21.
217. Hale G, Paul-Labrador M, Dwyer JH, Merz CN. Isoflavone supplementation and endothelial function in menopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2002;56:693-701.
218. Hsu CS, Shen WW, Hsueh YM, Yeh SL. Soy isoflavone supplementation in postmenopausal women. Effects on plasma lipids, antioxidant enzyme activities and bone density. *J Reprod Med.* 2001;46:221-6.
219. Howes JB, Sullivan D, Lai N, Nestel P, Pomeroy S, West L, Eden JA, Howes LG. The effects of dietary supplementation with isoflavones from red clover on the lipoprotein profiles of post menopausal women with mild to moderate hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis.* 2000;152:143-7.
220. Peluso MR, Winters TA, Shanahan MF, Banz WJ. A cooperative interaction between soy protein and its isoflavone- enriched fraction lowers hepatic lipids in male obese Zucker rats and reduces blood platelet sensitivity in male Sprague-Dawley rats. *J Nutr.* 2000;130:2333-42.
221. Xu X, Harris KS, Wang HJ, Murphy PA, Hendrich S. Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in women. *J Nutr.* 1995;125:2307-15.
222. Duncan AM, Merz-Demlow BE, Xu X, Phipps WR, Kurzer MS. Premenopausal equol excretors show plasma hormone profiles associated with lowered risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000;9:581-6.
223. Greaves KA, Wilson MD, Rudel LL, Williams JK, Wagner JD. Consumption of soy protein reduces cholesterol absorption compared to casein protein alone or supplemented with an isoflavone extract or conjugated equine estrogen in ovariectomized cynomolgus monkeys. *J Nutr.* 2000;130:820-6.
224. Borradaile NM, de Dreu LE, Wilcox LJ, Edwards JY, Huff MW. Soya phytoestrogens, genistein and daidzein, decrease apolipoprotein B secretion from HepG2 cells through multiple mechanisms. *Biochem J.* 2002;366:531-9.
225. Lovati MR, Manzoni C, Gianazza E, Arnoldi A, Kurowska E, Carroll KK, Sirtori CR. Soy protein peptides regulate cholesterol homeostasis in Hep G2 cells. *J Nutr.* 2000;130:2543-9.
226. Kirk EA, Sutherland P, Wang SA, Chait A, LeBoeuf RC. Dietary isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BL/6 mice but not LDL receptor-deficient mice. *J Nutr.* 1998;128:954-9.
227. Baum JA, Teng H, Erdman JW, Jr., Weigel RM, Klein BP, Persky VW, Freels S, Surya P, Bakhit RM, Ramos E, Shay NF, Potter SM. Long-term intake of soy protein improves blood lipid profiles and increases mononuclear cell low-density-lipoprotein receptor messenger RNA in hypercholesterolemic, postmenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 1998;68:545-51.
228. Schiller NK, Timothy AM, Chen IL, Rice JC, Akers DL, Kadowitz PJ, McNamara DB. Endothelial cell regrowth and morphology after balloon catheter injury of alloxan-induced diabetic rabbits. *Am J Physiol.* 1999;277:H740-8.
229. Weidinger FF, McLenachan JM, Cybulsky MI, Fallon JT, Hollenberg NK, Cooke JP, Ganz P. Hypercholesterolemia enhances macrophage recruitment and dysfunction of regenerated endothelium after balloon injury of the rabbit iliac artery. *Circulation.* 1991;84:755-67.
230. Dubey RK, Gillespie DG, Imthurn B, Rosselli M, Jackson EK, Keller PJ. Phytoestrogens inhibit growth and MAP kinase activity in human aortic smooth muscle cells. *Hypertension.* 1999;33:177-82.
231. Teede HJ, McGrath BP, DeSilva L, Cehun M, Fassoulakis A, Nestel PJ. Isoflavones reduce arterial stiffness: a placebo-controlled study in men and postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1066-71.
232. van der Schouw YT, Pijpe A, Lebrun CE, Bots ML, Peeters PH, van Staveren WA, Lamberts SW, Grobbee DE. Higher usual dietary intake of phytoestrogens is associated with lower aortic stiffness in postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1316-22.
233. van Popele NM, Grobbee DE, Bots ML, Asmar R, Topouchian J, Reneman RS, Hoeks AP, van der Kuip DA, Hofman A, Witteman JC. Association between arterial stiffness and atherosclerosis: the Rotterdam Study. *Stroke.* 2001;32:454-60.
234. Yamaguchi K, Honda H, Wakisaka C, Tohei A, Kogo H. Effects of phytoestrogens on acetylcholine- and isoprenaline-induced vasodilation in rat aorta. *Jpn J Pharmacol.* 2001;87:67-73.
235. Honore EK, Williams JK, Anthony MS, Clarkson TB. Soy isoflavones enhance coronary vascular reactivity in atherosclerotic female macaques. *Fertil Steril.* 1997;67:148-54.
236. Williams JK, Anthony MS, Herrington DM. Interactive effects of soy protein and estradiol on coronary artery reactivity in atherosclerotic, ovariectomized monkeys. *Menopause.* 2001;8:307-13.

237. Catania MA, Crupi A, Firenzuoli F, Parisi A, Sturiale A, Squadrito F, Caputi AP, Calapai G. Oral administration of a soy extract improves endothelial dysfunction in ovariectomized rats. *Planta Med.* 2002;68:1142-4.
238. Mishra SK, Abbot SE, Choudhury Z, Cheng M, Khatab N, Maycock NJ, Zavery A, Aaronson PI. Endothelium-dependent relaxation of rat aorta and main pulmonary artery by the phytoestrogens genistein and daidzein. *Cardiovasc Res.* 2000;46:539-46.
239. Figtree GA, Griffiths H, Lu YQ, Webb CM, MacLeod K, Collins P. Plant-derived estrogens relax coronary arteries in vitro by a calcium antagonistic mechanism. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35:1977-85.
240. Nevala R, Lassila M, Finckenberg P, Pauku K, Korpela R, Vapaatalo H. Genistein treatment reduces arterial contractions by inhibiting tyrosine kinases in ovariectomized hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 2002;452:87-96.
241. Nevala R, Pauku K, Korpela R, Vapaatalo H. Calcium-sensitive potassium channel inhibitors antagonize genistein- and daidzein-induced arterial relaxation in vitro. *Life Sci.* 2001;69:1407-17.
242. Hodgson JM, Puddey IB, Beilin LJ, Mori TA, Burke V, Croft KD, Rogers PB. Effects of isoflavonoids on blood pressure in subjects with high-normal ambulatory blood pressure levels: a randomized controlled trial. *Am J Hypertens.* 1999;12:47-53.
243. Howes JB, Tran D, Brillante D, Howes LG. Effects of dietary supplementation with isoflavones from red clover on ambulatory blood pressure and endothelial function in postmenopausal type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2003;5:325-32.
244. Wei H, Bowen R, Cai Q, Barnes S, Wang Y. Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1995;208:124-30.
245. Hwang J, Wang J, Morazzoni P, Hodis HN, Sevanian A. The phytoestrogen equol increases nitric oxide availability by inhibiting superoxide production: an antioxidant mechanism for cell-mediated LDL modification. *Free Radic Biol Med.* 2003;34:1271-82.
246. Kapiotis S, Hermann M, Held I, Seelos C, Ehringer H, Gmeiner BM. Genistein, the dietary-derived angiogenesis inhibitor, prevents LDL oxidation and protects endothelial cells from damage by atherogenic LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:2868-74.
247. Guo Q, Rimbach G, Moini H, Weber S, Packer L. ESR and cell culture studies on free radical-scavenging and antioxidant activities of isoflavonoids. *Toxicology.* 2002;179:171-80.
248. Suzuki K, Koike H, Matsui H, Ono Y, Hasumi M, Nakazato H, Okugi H, Sekine Y, Oki K, Ito K, Yamamoto T, Fukabori Y, Kurokawa K, Yamanaka H. Genistein, a soy isoflavone, induces glutathione peroxidase in the human prostate cancer cell lines LNCaP and PC-3. *Int J Cancer.* 2002;99:846-52.
249. Wiseman H, O'Reilly JD, Adlercreutz H, Mallet AI, Bowey EA, Rowland IR, Sanders TA. 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;72:395-400.
250. Tikkanen MJ, Wahala K, Ojala S, Vihma V, Adlercreutz H. Effect of soybean phytoestrogen intake on low density lipoprotein oxidation resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:3106-10.
251. Jenkins DJ, Kendall CW, Connelly PW, Jackson CJ, Parker T, Faulkner D, Vidgen E. Effects of high- and low-isoflavone (phytoestrogen) soy foods on inflammatory biomarkers and proinflammatory cytokines in middle-aged men and women. *Metabolism.* 2002;51:919-24.
252. Hodgson JM, Puddey IB, Croft KD, Mori TA, Rivera J, Beilin LJ. Isoflavonoids do not inhibit in vivo lipid peroxidation in subjects with high-normal blood pressure. *Atherosclerosis.* 1999;145:167-72.
253. Samman S, Lyons Wall PM, Chan GS, Smith SJ, Petocz P. The effect of supplementation with isoflavones on plasma lipids and oxidisability of low density lipoprotein in premenopausal women. *Atherosclerosis.* 1999;147:277-83.
254. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Peetz D, Hafner G, Tiret L, Meyer J. Circulating cell adhesion molecules and death in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 2001;104:1336-42.
255. Dunon D, Piali L, Imhof BA. To stick or not to stick: the new leukocyte homing paradigm. *Curr Opin Cell Biol.* 1996;8:714-23.
256. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood.* 1994;84:2068-101.
257. Meidell RS. Southwestern Internal Medicine Conference: endothelial dysfunction and vascular disease. *Am J Med Sci.* 1994;307:378-89.
258. Saliou C, Valacchi G, Rimbach G. Assessing bioflavonoids as regulators of NF-kappa B activity and inflammatory gene expression in mammalian cells. *Methods Enzymol.* 2001;335:380-7.

259. Shames BD, Selzman CH, Pulido EJ, Meng X, Meldrum DR, McIntyre RC, Jr., Harken AH, Banerjee A. LPS-Induced NF-kappaB activation and TNF-alpha release in human monocytes are protein tyrosine kinase dependent and protein kinase C independent. *J Surg Res.* 1999;83:69-74.
260. Davis JN, Kucuk O, Djuric Z, Sarkar FH. Soy isoflavone supplementation in healthy men prevents NF-kappa B activation by TNF-alpha in blood lymphocytes. *Free Radic Biol Med.* 2001;30:1293-302.
261. Weber C, Negrescu E, Erl W, Pietsch A, Frankenberger M, Ziegler-Heitbrock HW, Siess W, Weber PC. Inhibitors of protein tyrosine kinase suppress TNF-stimulated induction of endothelial cell adhesion molecules. *J Immunol.* 1995;155:445-51.
262. McGregor PE, Agrawal DK, Edwards JD. Attenuation of human leukocyte adherence to endothelial cell monolayers by tyrosine kinase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;198:359-65.
263. Gottstein N, Ewins BA, Eccleston C, Hubbard GP, Kavanagh IC, Minihane AM, Weinberg PD, Rimbach G. Effect of genistein and daidzein on platelet aggregation and monocyte and endothelial function. *Br J Nutr.* 2003;89:607-16.
264. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2-/- mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature.* 1998;394:894-7.
265. Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest.* 1991;21:361-74.
266. Teede HJ, McGrath BP, Turner A, Majewski H. Effects of oral combined hormone replacement therapy on platelet aggregation in postmenopausal women. *Clin Sci (Lond).* 2001;100:207-13.
267. Sanders TA, Dean TS, Grainger D, Miller GJ, Wiseman H. Moderate intakes of intact soy protein rich in isoflavones compared with ethanol-extracted soy protein increase HDL but do not influence transforming growth factor beta(1) concentrations and hemostatic risk factors for coronary heart disease in healthy subjects. *Am J Clin Nutr.* 2002;76:373-7.
268. Sorensen KE, Kristensen IB, Celermajer DS. Atherosclerosis in the human brachial artery. *J Am Coll Cardiol.* 1997;29:318-22.
269. Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med.* 1990;323:27-36.
270. Bugiardini R, Manfredini O, Pizzi C, Fontana F, Morgagni G. Endothelial Function Predicts Future Development of Coronary Artery Disease. A Study of Women With Chest Pain and Normal Coronary Angiograms. *Circulation.* 2004.
271. Halcox JP, Schenke WH, Zalos G, Mincemoyer R, Prasad A, Waclawiw MA, Nour KR, Quyyumi AA. Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. *Circulation.* 2002;106:653-8.
272. Reis SE, Gloth ST, Blumenthal RS, Resar JR, Zacur HA, Gerstenblith G, Brinker JA. Ethinyl estradiol acutely attenuates abnormal coronary vasomotor responses to acetylcholine in postmenopausal women. *Circulation.* 1994;89:52-60.
273. Drexler H. Factors involved in the maintenance of endothelial function. *Am J Cardiol.* 1998;82:3S-4S.
274. Luckhoff A, Busse R. Calcium influx into endothelial cells and formation of endothelium-derived relaxing factor is controlled by the membrane potential. *Pflugers Arch.* 1990;416:305-11.
275. Preik M, Lauer T, Heiss C, Tabery S, Strauer BE, Kelm M. Automated ultrasonic measurement of human arteries for the determination of endothelial function. *Ultraschall Med.* 2000;21:195-8.
276. Koller A, Bagi Z. On the role of mechanosensitive mechanisms eliciting reactive hyperemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283:H2250-9.
277. Hoyer J, Kohler R, Haase W, Distler A. Up-regulation of pressure-activated Ca(2+)-permeable cation channel in intact vascular endothelium of hypertensive rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:11253-8.
278. Jin ZG, Ueba H, Tanimoto T, Lungu AO, Frame MD, Berk BC. Ligand-independent activation of vascular endothelial growth factor receptor 2 by fluid shear stress regulates activation of endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res.* 2003;93:354-63.
279. Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuiliez C, Luscher TF. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation.* 1995;91:1314-9.
280. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrangé D, Lieberman EH, Ganz P, Creager MA, Yeung AC, et al. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol.* 1995;26:1235-41.
281. Abbott RA, Harkness MA, Davies PS. Correlation of habitual physical activity levels with flow-mediated dilation of the brachial artery in 5-10 year old children. *Atherosclerosis.* 2002;160:233-9.

282. Ong PJ, Dean TS, Hayward CS, Della Monica PL, Sanders TA, Collins P. Effect of fat and carbohydrate consumption on endothelial function. *Lancet*. 1999;354:2134.
283. Zhao SP, Liu L, Gao M, Zhou QC, Li YL, Xia B. Impairment of endothelial function after a high-fat meal in patients with coronary artery disease. *Coron Artery Dis*. 2001;12:561-5.
284. Title LM, Cummings PM, Giddens K, Nassar BA. Oral glucose loading acutely attenuates endothelium-dependent vasodilation in healthy adults without diabetes: an effect prevented by vitamins C and E. *J Am Coll Cardiol*. 2000;36:2185-91.
285. Hardie KL, Kinlay S, Hardy DB, Wlodarczyk J, Silberberg JS, Fletcher PJ. Reproducibility of brachial ultrasonography and flow-mediated dilatation (FMD) for assessing endothelial function. *Aust N Z J Med*. 1997;27:649-52.
286. Sorensen KE, Celermajer DS, Spiegelhalter DJ, Georgakopoulos D, Robinson J, Thomas O, Deanfield JE. Non-invasive measurement of human endothelium dependent arterial responses: accuracy and reproducibility. *Br Heart J*. 1995;74:247-53.
287. Hashimoto M, Akishita M, Eto M, Ishikawa M, Kozaki K, Toba K, Sagara Y, Taketani Y, Orimo H, Ouchi Y. Modulation of endothelium-dependent flow-mediated dilatation of the brachial artery by sex and menstrual cycle. *Circulation*. 1995;92:3431-5.
288. Perregaux D, Chaudhuri A, Mohanty P, Bukhari L, Wilson MF, Sung BH, Dandona P. Effect of gender differences and estrogen replacement therapy on vascular reactivity. *Metabolism*. 1999;48:227-32.
289. Al-Khalili F, Eriksson M, Landgren BM, Schenck-Gustafsson K. Effect of conjugated estrogen on peripheral flow-mediated vasodilation in postmenopausal women. *Am J Cardiol*. 1998;82:215-8.
290. Teede HJ, Liang YL, Kotsopoulos D, Zoungas S, Craven R, McGrath BP. Placebo-controlled trial of transdermal estrogen therapy alone in postmenopausal women: effects on arterial compliance and endothelial function. *Climacteric*. 2002;5:160-9.
291. Lissin LW, Oka R, Lakshmi S, Cooke JP. Isoflavones improve vascular reactivity in post-menopausal women with hypercholesterolemia. *Vasc Med*. 2004;9:26-30.
292. Cuevas AM, Iribarra VL, Castillo OA, Yanez MD, Germain AM. Isolated soy protein improves endothelial function in postmenopausal hypercholesterolemic women. *Eur J Clin Nutr*. 2003;57:889-94.
293. Lentz SR, Sobey CG, Piegors DJ, Bhopatkar MY, Faraci FM, Malinow MR, Heistad DD. Vascular dysfunction in monkeys with diet-induced hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest*. 1996;98:24-9.
294. Dayal S, Bottiglieri T, Arning E, Maeda N, Malinow MR, Sigmund CD, Heistad DD, Faraci FM, Lentz SR. Endothelial dysfunction and elevation of S-adenosylhomocysteine in cystathionine beta-synthase-deficient mice. *Circ Res*. 2001;88:1203-9.
295. Ungvari Z, Pacher P, Rischak K, Szollar L, Koller A. Dysfunction of nitric oxide mediation in isolated rat arterioles with methionine diet-induced hyperhomocysteinemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:1899-904.
296. Chambers JC, McGregor A, Jean-Marie J, Obeid OA, Kooner JS. Demonstration of rapid onset vascular endothelial dysfunction after hyperhomocysteinemia: an effect reversible with vitamin C therapy. *Circulation*. 1999;99:1156-60.
297. Bellamy MF, McDowell IF, Ramsey MW, Brownlee M, Bones C, Newcombe RG, Lewis MJ. Hyperhomocysteinemia after an oral methionine load acutely impairs endothelial function in healthy adults. *Circulation*. 1998;98:1848-52.
298. Eberhardt RT, Forgione MA, Cap A, Leopold JA, Rudd MA, Trolliet M, Heydrick S, Stark R, Klings ES, Moldovan NI, Yaghoubi M, Goldschmidt-Clermont PJ, Farber HW, Cohen R, Loscalzo J. Endothelial dysfunction in a murine model of mild hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest*. 2000;106:483-91.
299. Zhang X, Li H, Jin H, Ebin Z, Brodsky S, Goligorsky MS. Effects of homocysteine on endothelial nitric oxide production. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000;279:F671-8.
300. Weiss N, Heydrick SJ, Postea O, Keller C, Keaney JF, Jr., Loscalzo J. Influence of hyperhomocysteinemia on the cellular redox state--impact on homocysteine-induced endothelial dysfunction. *Clin Chem Lab Med*. 2003;41:1455-61.
301. Li N, Yi FX, Rute E, Zhang DX, Slocum GR, Zou AP. Effects of homocysteine on intracellular nitric oxide and superoxide levels in the renal arterial endothelium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283:H1237-43.
302. Cooke JP. Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:2032-7.
303. Selhub J. Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr*. 1999;19:217-46.
304. Stühlinger MC, Tsao PS, Her J-H, Kimoto M. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway--role of asymmetric dimethylarginine. *American Heart Association*. 2001:2569-2575.

305. Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, Cooke JP. Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation*. 1999;99:3092-5.
306. Murray-Rust J, Leiper J, McAlister M, Phelan J, Tilley S, Santa Maria J, Vallance P, McDonald N. Structural insights into the hydrolysis of cellular nitric oxide synthase inhibitors by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Nat Struct Biol*. 2001;8:679-83.
307. Zhang R, Ma J, Xia M, Zhu H, Ling W. Mild hyperhomocysteinemia induced by feeding rats diets rich in methionine or deficient in folate promotes early atherosclerotic inflammatory processes. *J Nutr*. 2004;134:825-30.
308. Vallbracht KB, Schwimmbeck PL, Seeberg B, Kuhl U, Schultheiss HP. Endothelial dysfunction of peripheral arteries in patients with immunohistologically confirmed myocardial inflammation correlates with endothelial expression of human leukocyte antigens and adhesion molecules in myocardial biopsies. *J Am Coll Cardiol*. 2002;40:515-20.
309. Vitale C, Cerquetani E, Wajngarten M, Leonardo F, Silvestri A, Mercurio G, Fini M, Ramires JA, Rosano GM. In patients with coronary artery disease endothelial function is associated with plasma levels of C-reactive protein and is improved by optimal medical therapy. *Ital Heart J*. 2003;4:627-32.
310. Witte DR, Broekmans WM, Kardinaal AF, Klopping-Ketelaars IA, van Poppel G, Bots ML, Kluit C, Princen JM. Soluble intercellular adhesion molecule 1 and flow-mediated dilatation are related to the estimated risk of coronary heart disease independently from each other. *Atherosclerosis*. 2003;170:147-53.
311. Smolders RG, Sipkema P, Kenemans P, Stehouwer CD, Van Der Mooren MJ. Homocysteine impairs estrogen-induced vasodilation in isolated rat arterioles. *Menopause*. 2004;11:98-103.
312. Spencer TA, Chai H, Fu W, Ramaswami G, Cox MW, Conklin BS, Lin PH, Lumsden AB, Yao Q, Chen C. Estrogen blocks homocysteine-induced endothelial dysfunction in porcine coronary arteries(1,2). *J Surg Res*. 2004;118:83-90.
313. Boger RH, Bode-Boger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, Blaschke TF, Cooke JP. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation*. 1998;98:1842-7.
314. Zoccali C, Bode-Boger S, Mallamaci F, Benedetto F, Tripepi G, Malatino L, Cataliotti A, Bellanuova I, Fermo I, Frolich J, Boger R. Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet*. 2001;358:2113-7.
315. Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, Usui M, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T. [Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis]. *J Cardiol*. 1999;33:105-6.
316. Zoccali C, Benedetto FA, Maas R, Mallamaci F, Tripepi G, Malatino LS, Boger R. Asymmetric dimethylarginine, C-reactive protein, and carotid intima-media thickness in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13:490-6.
317. Somekawa Y, Chiguchi M, Ishibashi T, Aso T. Soy intake related to menopausal symptoms, serum lipids, and bone mineral density in postmenopausal Japanese women. *Obstet Gynecol*. 2001;97:109-15.
318. Food labeling: health claims; soy protein and coronary heart disease. Food and Drug Administration, HHS. Final rule. *Fed Regist*. 1999;64:57700-33.
319. Barnes S, Messina M. Introduction and satellite session at the fourth International Symposium on the Role of Soy in Preventing and Treating Chronic Disease. *J Nutr*. 2002;132:545S-546S.
320. Verdon CP, Burton BA, Prior RL. Sample pretreatment with nitrate reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase quantitatively reduces nitrate while avoiding interference by NADP+ when the Griess reaction is used to assay for nitrite. *Anal Biochem*. 1995;224:502-8.
321. Stanger O, Herrmann W, Pietrzik K, Fowler B, Geisel J, Dierkes J, Weger M. DACH-LIGA homocystein (german, austrian and swiss homocysteine society): consensus paper on the rational clinical use of homocysteine, folic acid and B-vitamins in cardiovascular and thrombotic diseases: guidelines and recommendations. *Clin Chem Lab Med*. 2003;41:1392-403.
322. Talbot D OR, Dadd T, Gani MM, Gautreau S, Piron J, Powell J, Kohen F, Barnard G, Adlercreutz H, Buegel S, Cassidy C. Development and Validation of rapid Monoclonal TR-FIA Assays for the Phytoestrogens Daidzein, Genistein and Equol and their use in the Isoheart Framework V EU Study. *Polyphenols Communications 2004 XXII International Conference on Polyphenols*. 2004:699-700.
323. Leeson P, Thorne S, Donald A, Mullen M, Clarkson P, Deanfield J. Non-invasive measurement of endothelial function: effect on brachial artery dilatation of graded endothelial dependent and independent stimuli. *Heart*. 1997;78:22-7.

324. Wakatsuki A, Ikenoue N, Shinohara K, Watanabe K, Fukaya T. Effect of lower dosage of oral conjugated equine estrogen on inflammatory markers and endothelial function in healthy postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:571-6.
325. Zegura B, Keber I, Sebestjen M, Borko E. Orally and transdermally replaced estradiol improves endothelial function equally in middle-aged women after surgical menopause. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;188:1291-6.
326. Ringqvist A, Caidahl K, Petersson AS, Wennmalm A. Diurnal variation of flow-mediated vasodilation in healthy premenopausal women. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;279:H2720-5.
327. Raitakari OT, Adams MR, McCredie RJ, Griffiths KA, Stocker R, Celermajer DS. Oral vitamin C and endothelial function in smokers: short-term improvement, but no sustained beneficial effect. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35:1616-21.
328. Neunteufl T, Kostner K, Katzenschlager R, Zehetgruber M, Maurer G, Weidinger F. Additional benefit of vitamin E supplementation to simvastatin therapy on vasoreactivity of the brachial artery of hypercholesterolemic men. *J Am Coll Cardiol.* 1998;32:711-6.
329. Lavrencic A, Salobir BG, Keber I. Physical training improves flow-mediated dilation in patients with the polymetabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:551-5.
330. Neunteufl T, Heher S, Kostner K, Mitulovic G, Lehr S, Khoschorur G, Schmid RW, Maurer G, Stefenelli T. Contribution of nicotine to acute endothelial dysfunction in long-term smokers. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39:251-6.
331. Adams MR, Robinson J, McCredie R, Seale JP, Sorensen KE, Deanfield JE, Celermajer DS. Smooth muscle dysfunction occurs independently of impaired endothelium-dependent dilation in adults at risk of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 1998;32:123-7.
332. Ritchie MR, Morton MS, Thompson AM, Deighton N, Blake A, Cummings JH, Steel CM. Investigation of the reliability of 24 h urine excretion as a biomarker of isoflavone exposure over time and over a wide range of isoflavone intakes. *Eur J Clin Nutr.* 2004.
333. Arai Y, Uehara M, Sato Y, Kimira M, Eboshida A, Adlercreutz H, Watanabe S. Comparison of isoflavones among dietary intake, plasma concentration and urinary excretion for accurate estimation of phytoestrogen intake. *J Epidemiol.* 2000;10:127-35.
334. Bingham SA. The use of 24-h urine samples and energy expenditure to validate dietary assessments. *Am J Clin Nutr.* 1994;59:227S-231S.
335. Kaaks R, Riboli E, van Staveren W. Sample size requirements for calibration studies of dietary intake measurements in prospective cohort investigations. *Am J Epidemiol.* 1995;142:557-65.
336. Jakobsen J, Pedersen AN, Ovesen L. Para-aminobenzoic acid (PABA) used as a marker for completeness of 24 hour urine: effects of age and dosage scheduling. *Eur J Clin Nutr.* 2003;57:138-42.
337. Leclercq C, Piccinelli R, Arcella D, Le Donne C. Food consumption and nutrient intake in a sample of Italian secondary school students: results from the INRAN-RM-2001 food survey. *Int J Food Sci Nutr.* 2004;55:265-77.
338. Setchell KD, Brown NM, Lydeking-Olsen E. The clinical importance of the metabolite equol-a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *J Nutr.* 2002;132:3577-84.
339. Squadrito F, Altavilla D, Morabito N, Crisafulli A, D'Anna R, Corrado F, Ruggeri P, Campo GM, Calapai G, Caputi AP, Squadrito G. The effect of the phytoestrogen genistein on plasma nitric oxide concentrations, endothelin-1 levels and endothelium dependent vasodilation in postmenopausal women. *Atherosclerosis.* 2002;163:339-47.
340. Rimbach G, Weinberg PD, de Pascual-Teresa S, Alonso MG, Ewins BA, Turner R, Minihane AM, Botting N, Fairley B, Matsugo S, Uchida Y, Cassidy A. Sulfation of genistein alters its antioxidant properties and its effect on platelet aggregation and monocyte and endothelial function. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1670:229-37.
341. Setchell KD, Brown NM, Desai PB, Zimmer-Nechimias L, Wolfe B, Jakate AS, Creutzinger V, Heubi JE. Bioavailability, disposition, and dose-response effects of soy isoflavones when consumed by healthy women at physiologically typical dietary intakes. *J Nutr.* 2003;133:1027-35.
342. Moreiras O, van Staveren WA, Cruz JA, Nes M, Lund-Larsen K. Intake of energy and nutrients. Euronut SENECA investigators. *Eur J Clin Nutr.* 1991;45 Suppl 3:105-19.
343. Kreijkamp-Kaspers S, Kok L, Bots ML, Grobbee DE, Lampe JW, van der Schouw YT. Randomized controlled trial of the effects of soy protein containing isoflavones on vascular function in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 2005;81:189-95.

344. Hecker M, Mulsch A, Bassenge E, Forstermann U, Busse R. Subcellular localization and characterization of nitric oxide synthase(s) in endothelial cells: physiological implications. *Biochem J.* 1994;299 (Pt 1):247-52.
345. Forstermann U, Pollock JS, Schmidt HH, Heller M, Murad F. Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:1788-92.
346. Davis ME, Grumbach IM, Fukai T, Cutchins A, Harrison DG. Shear stress regulates endothelial nitric-oxide synthase promoter activity through nuclear factor kappaB binding. *J Biol Chem.* 2004;279:163-8.
347. Fine JJ, Hall PA, Richardson JH. Predictive power of cardiovascular risk factors for detecting peripheral vascular disease. *South Med J.* 2004;97:951-4.
348. Hall WL, Vafeiadou K, Hallund J, Bugel S, Koebnick C, Reimann M, Ferrari M, Branca F, Talbot D, Dadd T, Nilson M, Dahlmann-Wright K, Gustafsson JA, Minihane AM, Williams C. Soy isoflavone enriched foods and inflammatory biomarkers of cardiovascular risk in postmenopausal women: interactions with genotype and equol production. *Am J Clin Nutr*;in press.
349. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, Vallance P, Vita J, Vogel R. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39:257-65.
350. Liang YL, Teede H, Kotsopoulos D, Shiel L, Cameron JD, Dart AM, McGrath BP. Non-invasive measurements of arterial structure and function: repeatability, interrelationships and trial sample size. *Clin Sci (Lond).* 1998;95:669-79.
351. van Trijp MJ, Grobbee DE, Peeters PH, van Der Schouw YT, Bots ML. Average blood pressure and cardiovascular disease-related mortality in middle-aged women. *Am J Hypertens.* 2005;18:197-201.
352. Stenehjem AE, Os I. Reproducibility of blood pressure variability, white-coat effect and dipping pattern in untreated, uncomplicated and newly diagnosed essential hypertension. *Blood Press.* 2004;13:214-24.
353. Ohkubo T, Hozawa A, Imai Y. Prognostic impact of 24-hour mean blood pressure and pulse pressure on stroke. *Circulation.* 2001;104:E160.
354. 2003 European Society of Hypertension-European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension. *J Hypertens.* 2003;21:1011-53.
355. Hoshida S, Kario K, Hoshida Y, Umeda Y, Hashimoto T, Kunii O, Ojima T, Shimada K. Associations between nondipping of nocturnal blood pressure decrease and cardiovascular target organ damage in strictly selected community-dwelling normotensives. *Am J Hypertens.* 2003;16:434-8.
356. Sagara M, Kanda T, M NJ, Teramoto T, Armitage L, Birt N, Birt C, Yamori Y. Effects of dietary intake of soy protein and isoflavones on cardiovascular disease risk factors in high risk, middle-aged men in Scotland. *J Am Coll Nutr.* 2004;23:85-91.
357. Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Cahalane S, Fowler B, Graham I. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med.* 1991;324:1149-55.
358. Woo KS, Chook P, Lolin YI, Cheung AS, Chan LT, Sun YY, Sanderson JE, Metreweli C, Celermajer DS. Hyperhomocyst(e)inemia is a risk factor for arterial endothelial dysfunction in humans. *Circulation.* 1997;96:2542-4.
359. Chiantera V, Sarti CD, Fornaro F, Farzati A, De Franciscis P, Sepe E, Borrelli AL, Colacurci N. Long-term effects of oral and transdermal hormone replacement therapy on plasma homocysteine levels. *Menopause.* 2003;10:286-91.
360. Cagnacci A, Malmusi S, Zanni AL, Alessandrini C, Caretto S, Volpe A. Comparison of the effect of oral and transdermal hormone therapy on fasting and postmethionine homocysteine levels. *Fertil Steril.* 2004;81:99-103.
361. Smolders RG, Vogelvang TE, Mijatovic V, van Baal WM, Neele SJ, Netelenbos JC, Kenemans P, van der Mooren MJ. A 2-year, randomized, comparative, placebo-controlled study on the effects of raloxifene on lipoprotein(a) and homocysteine. *Maturitas.* 2002;41:105-14.
362. Madsen JS, Kristensen SR, Klitgaard NA, Bladbjerg EM, Abrahamsen B, Stilgren L, Jespersen J. Effect of long-term hormone replacement therapy on plasma homocysteine in postmenopausal women: a randomized controlled study. *Am J Obstet Gynecol.* 2002;187:33-9.
363. Marchesoni D, Driul L, Plaino L, Villani MT, Becagli L, Mozzanega B. Menopause rather than estrogen modifies plasma homocysteine levels. *Int J Gynaecol Obstet.* 2003;81:293-7.

364. Tonstad S, Smerud K, Hoie L. A comparison of the effects of 2 doses of soy protein or casein on serum lipids, serum lipoproteins, and plasma total homocysteine in hypercholesterolemic subjects. *Am J Clin Nutr.* 2002;76:78-84.
365. Hermansen K, Sondergaard M, Hoie L, Carstensen M, Brock B. Beneficial effects of a soy-based dietary supplement on lipid levels and cardiovascular risk markers in type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care.* 2001;24:228-33.
366. Dudasova S, Grancicova E. Influence of casein and soy flour proteins on aminoacid content in the liver of experimental animals. *Physiol Res.* 1992;41:411-6.
367. Ubbink JB, Vermaak WJ, van der Merwe A, Becker PJ. Vitamin B-12, vitamin B-6, and folate nutritional status in men with hyperhomocysteinemia. *Am J Clin Nutr.* 1993;57:47-53.
368. Carmel R, Green R, Rosenblatt DS, Watkins D. Update on cobalamin, folate, and homocysteine. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program).* 2003:62-81.
369. Johnson MA, Hawthorne NA, Brackett WR, Fischer JG, Gunter EW, Allen RH, Stabler SP. Hyperhomocysteinemia and vitamin B-12 deficiency in elderly using Title IIIc nutrition services. *Am J Clin Nutr.* 2003;77:211-20.
370. Symons JD, Mullick AE, Ensunsa JL, Ma AA, Rutledge JC. Hyperhomocysteinemia evoked by folate depletion: effects on coronary and carotid arterial function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:772-80.
371. Holven KB, Haugstad TS, Holm T, Aukrust P, Ose L, Nenseter MS. Folic acid treatment reduces elevated plasma levels of asymmetric dimethylarginine in hyperhomocysteinemic subjects. *Br J Nutr.* 2003;89:359-63.
372. Woo KS, Chook P, Chan LL, Cheung AS, Fung WH, Qiao M, Lolin YI, Thomas GN, Sanderson JE, Metreweli C, Celermajer DS. Long-term improvement in homocysteine levels and arterial endothelial function after 1-year folic acid supplementation. *Am J Med.* 2002;112:535-9.
373. Green TJ, Allen OB, O'Connor DL. A three-day weighed food record and a semiquantitative food-frequency questionnaire are valid measures for assessing the folate and vitamin B-12 intakes of women aged 16 to 19 years. *J Nutr.* 1998;128:1665-71.
374. Ungvari Z, Koller A. Homocysteine reduces smooth muscle [Ca²⁺]_i and constrictor responses of isolated arterioles. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2001;37:705-12.
375. Upchurch GR, Jr., Welch GN, Fabian AJ, Freedman JE, Johnson JL, Keane JF, Jr., Loscalzo J. Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. *J Biol Chem.* 1997;272:17012-7.
376. van Guldener C, Stehouwer CD. Hyperhomocysteinemia, vascular pathology, and endothelial dysfunction. *Semin Thromb Hemost.* 2000;26:281-9.
377. Hofmann MA, Lalla E, Lu Y, Gleason MR, Wolf BM, Tanji N, Ferran LJ, Jr., Kohl B, Rao V, Kisiel W, Stern DM, Schmidt AM. Hyperhomocysteinemia enhances vascular inflammation and accelerates atherosclerosis in a murine model. *J Clin Invest.* 2001;107:675-83.
378. Tsen CM, Hsieh CC, Yen CH, Lau YT. Homocysteine altered ROS generation and NO accumulation in endothelial cells. *Chin J Physiol.* 2003;46:129-36.
379. Kanani PM, Sinkey CA, Browning RL, Allaman M, Knapp HR, Haynes WG. Role of oxidant stress in endothelial dysfunction produced by experimental hyperhomocyst(e)inemia in humans. *Circulation.* 1999;100:1161-8.
380. Weiss N, Heydrick S, Zhang YY, Bierl C, Cap A, Loscalzo J. Cellular redox state and endothelial dysfunction in mildly hyperhomocysteinemic cystathionine beta-synthase-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:34-41.
381. Topal G, Brunet A, Millanvoye E, Boucher JL, Rendu F, Devynck MA, David-Duflho M. Homocysteine induces oxidative stress by uncoupling of NO synthase activity through reduction of tetrahydrobiopterin. *Free Radic Biol Med.* 2004;36:1532-41.
382. Dhillon B, Badiwala MV, Maitland A, Rao V, Li SH, Verma S. Tetrahydrobiopterin attenuates homocysteine induced endothelial dysfunction. *Mol Cell Biochem.* 2003;247:223-7.
383. Caulin-Glaser T, Garcia-Cardena G, Sarrel P, Sessa WC, Bender JR. 17 beta-estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca²⁺ mobilization. *Circ Res.* 1997;81:885-92.
384. Muller-Delp JM, Lubahn DB, Nichol KE, Philips BJ, Price EM, Curran EM, Laughlin MH. Regulation of nitric oxide-dependent vasodilation in coronary arteries of estrogen receptor-alpha-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285:H2150-7.

385. Li H, Wallerath T, Forstermann U. Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. *Nitric Oxide*. 2002;7:132-47.
386. Chambliss KL, Yuhanna IS, Anderson RG, Mendelsohn ME, Shaul PW. ERbeta has nongenomic action in caveolae. *Mol Endocrinol*. 2002;16:938-46.
387. Liu D, Homan LL, Dillon JS. Genistein acutely stimulates nitric oxide synthesis in vascular endothelial cells by a cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent mechanism. *Endocrinology*. 2004;145:5532-9.
388. Sobey CG, Weiler JM, Boujaoude M, Woodman OL. Effect of short-term phytoestrogen treatment in male rats on nitric oxide-mediated responses of carotid and cerebral arteries: comparison with 17beta-estradiol. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;310:135-40.
389. Rimbach G, De Pascual-Teresa S, Ewins BA, Matsugo S, Uchida Y, Minihane AM, Turner R, Vafeiadou K, Weinberg PD. Antioxidant and free radical scavenging activity of isoflavone metabolites. *Xenobiotica*. 2003;33:913-25.
390. Yamakoshi J, Piskula MK, Izumi T, Tobe K, Saito M, Kataoka S, Obata A, Kikuchi M. Isoflavone aglycone-rich extract without soy protein attenuates atherosclerosis development in cholesterol-fed rabbits. *J Nutr*. 2000;130:1887-93.
391. Zhang L, Khan IA, Foran CM. Characterization of the estrogenic response to genistein in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2002;132:203-11.
392. Yousef MI, Kamel KI, Esmail AM, Baghdadi HH. Antioxidant activities and lipid lowering effects of isoflavone in male rabbits. *Food Chem Toxicol*. 2004;42:1497-503.
393. Choi C, Cho H, Park J, Cho C, Song Y. Suppressive effects of genistein on oxidative stress and NFkappaB activation in RAW 264.7 macrophages. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2003;67:1916-22.
394. Mizutani K, Ikeda K, Nishikata T, Yamori Y. Phytoestrogens attenuate oxidative DNA damage in vascular smooth muscle cells from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2000;18:1833-40.
395. Boger RH, Bode-Boger SM, Sydow K, Heistad DD, Lentz SR. Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in monkeys with hyperhomocyst(e)inemia or hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:1557-64.
396. Boger RH, Vallance P, Cooke JP. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a key regulator of nitric oxide synthase. *Atheroscler Suppl*. 2003;4:1-3.
397. Boger RH, Bode-Boger SM, Tsao PS, Lin PS, Chan JR, Cooke JP. An endogenous inhibitor of nitric oxide synthase regulates endothelial adhesiveness for monocytes. *J Am Coll Cardiol*. 2000;36:2287-95.
398. Chan JR, Boger RH, Bode-Boger SM, Tangphao O, Tsao PS, Blaschke TF, Cooke JP. Asymmetric dimethylarginine increases mononuclear cell adhesiveness in hypercholesterolemic humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:1040-6.
399. Böger RH, Bode-Boger SM. Asymmetric dimethylarginine, derangements of the endothelial nitric oxide synthase pathway, and cardiovascular diseases. *Semin Thromb Hemost*. 2000;26:539-45.
400. Sydow K, Munzel T. ADMA and oxidative stress. *Atheroscler Suppl*. 2003;4:41-51.
401. Jiang JL, Li NS, Li YJ, Deng HW. Probucol preserves endothelial function by reduction of the endogenous nitric oxide synthase inhibitor level. *Br J Pharmacol*. 2002;135:1175-82.
402. Post MS, Verhoeven MO, van der Mooren MJ, Kenemans P, Stehouwer CD, Teerlink T. Effect of hormone replacement therapy on plasma levels of the cardiovascular risk factor asymmetric dimethylarginine: a randomized, placebo-controlled 12-week study in healthy early postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:4221-6.
403. Dai Z, Zhu HQ, Jiang DJ, Jiang JL, Deng HW, Li YJ. 17beta-estradiol preserves endothelial function by reduction of the endogenous nitric oxide synthase inhibitor level. *Int J Cardiol*. 2004;96:223-7.
404. Holden DP, Cartwright JE, Nussey SS, Whitley GS. Estrogen stimulates dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity and the metabolism of asymmetric dimethylarginine. *Circulation*. 2003;108:1575-80.
405. Alekel DL, Germain AS, Peterson CT, Hanson KB, Stewart JW, Toda T. Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women. *Am J Clin Nutr*. 2000;72:844-52.
406. McMichael-Phillips DF, Harding C, Morton M, Roberts SA, Howell A, Potten CS, Bundred NJ. Effects of soy-protein supplementation on epithelial proliferation in the histologically normal human breast. *Am J Clin Nutr*. 1998;68:1431S-1435S.

407. Bloedon LT, Jeffcoat AR, Lopaczynski W, Schell MJ, Black TM, Dix KJ, Thomas BF, Albright C, Busby MG, Crowell JA, Zeisel SH. Safety and pharmacokinetics of purified soy isoflavones: single-dose administration to postmenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 2002;76:1126-37.

9 Anhang

Rekrutierungsmaterialien

Pressemitteilung für Printmedien

**TEILNEHMER FÜR EINE ERNÄHRUNGSSTUDIE
AM DEUTSCHEN INSTITUT FÜR ERNÄHRUNGSFORSCHUNG
IN POTSDAM-REHBRÜCKE GESUCHT**

Im Rahmen eines von der EU geförderten Forschungsprojektes wird das Deutsche Institut für Ernährungsforschung in naher Zukunft eine Ernährungsstudie durchführen. Ziel ist es, den gesundheitlichen Wert einer Soja-reichen Ernährung auf das Herz-Kreislauf-System von Frauen nach den Wechseljahren zu untersuchen.

Dafür werden interessierte *Frauen* im Alter *zwischen 45 – 70 Jahren* gesucht, die die *Wechseljahre* bereits *durchschritten* haben. Die Studienteilnehmerinnen sollen über 2 x 8 Wochen neben ihrer üblichen Kost Soja-angereicherte Lebensmittel verzehren. Vorgesehen sind Blut- und Urinuntersuchungen sowie nicht-invasive Messungen der Gefäßfunktion. Für die Teilnahme wird eine Aufwandsentschädigung gezahlt.

Interessentinnen werden gebeten, sich von Montag bis Freitag unter 033200 / 88-682 oder –667 in der Abteilung Interventionsstudien zu melden.

Aushang in gynäkologischen Praxen

!!Probandinnen gesucht!!



Liebe Patientinnen !

Das Deutsche Institut für Ernährungsforschung sucht noch weiterhin interessierte Frauen für ein im April diesen Jahres anlaufendes Forschungsprojekt der Europäischen Union.

In dieser 6 Monate andauernden Studie soll der Einfluss einer Soja-reichen Ernährung auf das Herz-Kreislauf-System von Frauen nach den Wechseljahren untersucht werden. Die ausliegende Studieninformation erläutert Ihnen kurz den wesentlichen Ablauf der Studie. Sollten Sie an einer Teilnahme interessiert sein, kontaktieren Sie bitte die verantwortliche Mitarbeiterin der Abteilung Interventionsstudien (*Telefonnummer siehe unten stehend zum Abreißen*).

Anschreiben an ehemalige Probanden

Frau

«Vorname» «Name»

«Adresse»

«PLZ» «Ort»

Rehbrücke, den 20.01.2003

Sehr geehrte Frau «Name»,

Ihre Anschrift haben wir unserer Probandendatei mit Adressen ehemaliger Studienteilnehmer(innen) der Abteilung Interventionsstudien entnommen, die an einer Teilnahme in neuen Projekten interessiert sind.

Im Rahmen eines Forschungsprojektes der Europäischen Union wird unsere Abteilung in naher Zukunft wieder eine Ernährungsstudie durchführen. Ziel dieser Studie ist es, die Wirkungen einer Sojareichen Ernährung auf das Herz-Kreislauf-System von Frauen nach den Wechseljahren zu untersuchen.

Dafür suchen wir interessierte Nichtraucherinnen im Alter zwischen 45 – 70 Jahren, die vor mindestens 1 Jahr ihre letzte Menstruation hatten. Wir möchten deshalb in den nächsten Tagen telefonisch mit Ihnen Kontakt aufnehmen. Sollten wir Ihr Interesse geweckt haben, lassen wir Ihnen gerne weitere Informationen zukommen. Für Fragen vorab steht Ihnen Frau Reimann unter der oben angegebenen Telefonnummer selbstverständlich gerne zur Verfügung.

Über eine Mitarbeit von Ihnen würden wir uns sehr freuen.

Mit freundlichen Grüßen

Dr. Oec. troph. Corinna Koebnick

Dipl. Ern. wiss. Manja Reimann

Informationsmaterial für angeschriebene ehemalige Probanden

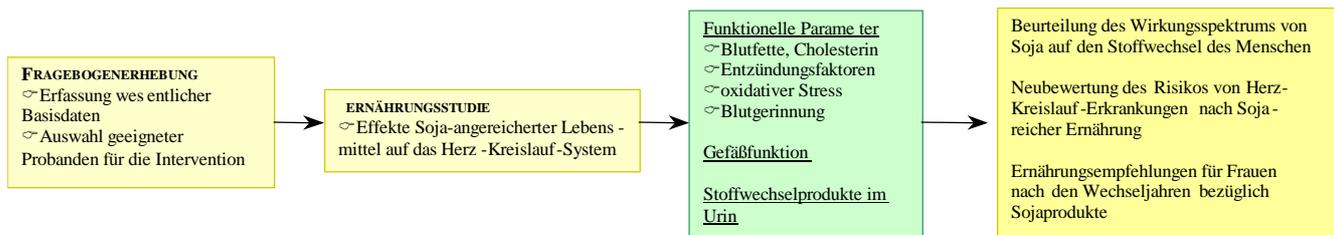
ISOHEART

Mit dem Eintritt in die Wechseljahre steigt das Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen bei Frauen sprunghaft. Für die Entwicklung charakteristischer Gefäßveränderungen wird der Verlust des weiblichen Geschlechtshormons Östrogen verantwortlich gemacht. In asiatischen Ländern mit einem hohen Verzehr an Soja und Sojaprodukten leiden deutlich weniger Frauen in der postmenopausalen (post = nach; Menopause = Wechseljahre) Lebensphase unter Herz-Kreislauf-Krankheiten. Die niedrigere Rate für derartige Erkrankungen wird auf positive Effekte bestimmter Inhaltsstoffe von Soja zurückgeführt.

Im Rahmen des ISOHEART-Projektes wird das Deutsche Institut für Ernährungsforschung in Zusammenarbeit mit weiteren europäischen Ländern eine Interventionsstudie an postmenopausalen Frauen im Alter von 45 – 70 Jahren durchführen, um:

- den Einfluss einer Sojareichen Ernährung auf das Herz-Kreislauf-System des weiblichen Organismus unter Bedingungen der reduzierten Östrogenproduktion zu erfassen.

Abb. 1: Studieninhalte des ISOHEART-Projektes



Die zu Beginn erfolgende Fragebogenerhebung (Abb. 1) dient als Grundlage, um geeignete Kandidatinnen für die sich anschließende Ernährungsstudie auszuwählen und wichtige Basisdaten der Studienteilnehmer zu erfassen.

Während der Studienperiode (Abb. 2) werden den Probandinnen über einen Zeitraum von 2 x 8 Wochen Sojaangereicherte Lebensmittel verabreicht und deren Effekte auf bestimmte Blut- und Urinparameter sowie auf die Reaktionsfähigkeit und Elastizität der Blutgefäße ermittelt.

Abb. 2: Aufbau der Interventionsstudie

	1 Woche	8 Wochen	8 Wochen	8 Wochen
20 postmenopausale Frauen	RUN IN	ISOFLAVONE	WASH OUT	PLAZEBO
20 postmenopausale Frauen	RUN IN	PLAZEBO	WASH OUT	ISOFLAVONE
		Blut- und Urinparameter + Verzehrsprotokolle + Gefäßelastizität + Blutdruck	PAUSE	Blut- und Urinparameter + Verzehrsprotokolle + Gefäßelastizität + Blutdruck

Aus den neugewonnenen Erkenntnissen des ISOHEART-Projektes wollen die beteiligten europäischen Studienzentren zusammen mit dem Deutschen Institut für Ernährungsforschung Ernährungsempfehlungen ableiten, um das Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen bei Frauen in der postmenopausalen Lebensphase zu verringern.

Anschreiben an interessierte Personen

Frau
«Vorname» «Zuname»
«Strasse»

«PLZ» «Ort»

Rehbrücke, den 14.03.2003

Sehr geehrte Frau «Zuname»,

für Ihr Interesse an unserer neuen Ernährungsstudie "Isoheart" möchten wir uns herzlich bedanken. Mit diesem Anschreiben möchten wir Ihnen einen ersten Einblick in unsere demnächst anlaufende Studie vermitteln. Zum besseren Verständnis soll zunächst eine kurze Erläuterung zum Titel der Studie gegeben werden.

Iso steht symbolisch für Isoflavone. heart ist ein englischer Begriff und bedeutet Herz. Isoflavone sind natürlich vorkommende pflanzliche Bestandteile, die in größeren Mengen in Sojabohnen zu finden sind. In asiatischen Ländern mit einem hohen Verzehr an Soja und Sojaprodukten, wie Japan oder China, leiden weit weniger Frauen nach den Wechseljahren unter bestimmten Beschwerden und Erkrankungen. Es wird angenommen, dass bisher noch undefinierte Inhaltsstoffe der Sojapflanzen für diese Effekte verantwortlich sind. Im Rahmen des Isoheart-Projektes möchten wir daher untersuchen, ob eine Diät – reich an natürlichem Isoflavon aus Soja - einen positiven Einfluss auf das Herz-Kreislauf-Geschehen von Frauen nach den Wechseljahren ausübt.

Isoheart ist ein europäisches Projekt, an dem Forschungseinrichtungen aus 5 Ländern beteiligt sind. Das Deutsche Institut für Ernährungsforschung (DI/E) als deutscher Partner möchte zusammen mit Ihnen seinen Beitrag zum Erkenntniszuwachs auf europäischer Ebene leisten. Die Erkenntnisse aus dem Isoheart-Projekt sollen der zukünftigen Entwicklung neuer therapeutischer Strategien dienen, mit denen sich das Herz-Kreislauf-Risiko von Frauen in und nach den Wechseljahren mindern lässt. Als Probandin unserer Studie tragen Sie also wesentlich zur Gewinnung solcher Erkenntnisse bei.

Wie Sie der beigefügten Studieninformation entnehmen können, ist unsere Studie in 5 Teile untergliedert. Im ersten Teil, dem sogenannten *Screening*, wird festgestellt, ob Sie aus medizinischer Sicht als Proband für unsere Studie geeignet sind. Daran schließt sich die eigentliche Studienzeit von 25 Wochen an, die sich aus einer *Run-in-Phase*, d.h. einer Eingewöhnungszeit von 1 Woche, und der eigentlichen *Interventionsphase* von zweimal 8 Wochen zusammensetzt. Letztere ist durch eine *Wash-out-Phase* (Unterbrechung) von ebenfalls 8 Wochen in zwei unabhängige Teile getrennt.

Wir würden uns freuen, wenn wir Sie als Probandin in unserer Abteilung begrüßen könnten. Dazu bitten wir Sie, den beiliegenden Fragebogen ausgefüllt *innerhalb der nächsten 10 Tage* an uns zurückzuschicken.

Den Termin für die Screening-Untersuchung werden wir Ihnen nach Erhalt des Fragebogens bekannt geben. Um uns die Terminplanung zu erleichtern, möchten wir Sie bitten, uns über den zeitlichen Rahmen eines bereits geplanten Urlaubes in Kenntnis zu setzen. Für die Organisation des Studienablaufes sind weiterhin Angaben zu Ihrer zeitlichen Verfügbarkeit wichtig. Verwenden Sie bitte dazu das vorgedruckte Formular und schicken Sie dieses zusammen mit dem Fragebogen an uns zurück.

Sollten Sie weitere Fragen haben, steht Ihnen meine Mitarbeiterin, Frau Manja Reimann, telefonisch unter 033200/88-682 gerne zur Verfügung.

Mit freundlichen Grüßen

Dr. Oec. troph Corinna Koebnick

Dipl. Ern. wiss. Manja Reimann

Informationsblatt für interessierte Personen (Blatt1-3)

I N F O R M A T I O N S B L A T T ZUR |soheart-**STUDIE**

Im Rahmen eines Forschungsvorhabens der Europäischen Union - dem Isoheart-Projekt - will das Deutsche Institut für Ernährungsforschung in Zusammenarbeit mit drei weiteren europäischen Studienzentren die Wirkung von bestimmten Inhaltsstoffen aus Sojabohnen, speziell von Isoflavonen, im Hinblick auf das Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen an Frauen nach den Wechseljahren untersuchen und bewerten.

Genauere Informationen zum Studienablauf finden Sie in dieser Informationsbroschüre. Sollten Sie Interesse haben, an der Isoheart-Studie mitzuwirken, lesen Sie sich bitte die folgenden Abschnitte aufmerksam durch.

Wie ist die Studie aufgebaut?

Die Studie ist in fünf Abschnitte gegliedert. Zunächst wird im sogenannten *Screening* festgestellt, ob Sie aus medizinischer Sicht als Proband für unsere Studie geeignet sind. Die Screening-Untersuchung umfasst eine Nüchtern-Blutabnahme, eine Urinabgabe, Messungen Ihres Körpergewichtes, Ihrer Körpergröße, des Taillen-Hüfte-Verhältnisses sowie des Gelegenheits-Blutdrucks. Daran schließt sich die eigentliche Studienzeit an (Abb. 1), die durch eine einwöchige *Run-in-Phase*, einer sogenannten Eingewöhnungszeit, eingeleitet wird. Die sich anknüpfende *Interventionsphase* von insgesamt 16 Wochen wird durch eine achtwöchige *Wash-out-Phase*, eine sogenannte Ruhephase, zweigeteilt. Während der beiden sich über jeweils 8 Wochen erstreckenden Interventionsphasen, ist die tägliche Einnahme eines Riegels vorgesehen, den Sie neben Ihrer normalen Kost zusätzlich verzehren. In der dazwischen liegenden Ruheperiode, der Wash-out-Phase, erhalten Sie von uns keine Lebensmittel und ernähren sich normal weiter. Blutabnahmen und Gewichtsmessungen werden zu Beginn und zum Ende jeder Interventionsphase sowie je einmal während der Interventionen erfolgen. Weitere Untersuchungen zu Beginn und zum Ende der achtwöchigen Interventionszeiträume umfassen Gelegenheitsblutdruck- und Gefäßfunktionsmessungen per Ultraschall durch einen Arzt sowie 24-Stunden-Urin-Sammlungen. Genauere Informationen zum Zeitpunkt der einzelnen Messungen entnehmen Sie bitte dem beiliegenden Zeitplan.

In einer der beiden Interventionsphasen sind die Ihnen zur Verfügung gestellten Lebensmittel mit natürlichen Isoflavonen (50 mg/Tag) aus Soja angereichert. In der entsprechend anderen Phase sind diese frei von diesen natürlichen Wirkstoffen (sogenannte Plazeboperiode). In welcher der beiden Interventionsphasen Sie die angereicherten Lebensmittel bzw. das Plazebo erhalten, erfahren weder Sie noch wir (doppelt verblindete Studie). Erst nach Abschluss der Studie wird uns dies vom Lebensmittelhersteller mitgeteilt.

Abbildung 1: Studienablauf schematisch



Ist eine Veränderung meines Lebensstils nötig?

Wichtig ist, dass sie Ihre üblichen Ernährungsgewohnheiten während des gesamten Studienzeitraumes beibehalten. Um eine Verfälschung der Studienergebnisse zu vermeiden, bitten wir Sie, 7 Tage vor Beginn und während der gesamten Dauer der Studie auf Soja und Sojaprodukte (Sojamilch, Sojakäse, mit Soja angereicherte Lebensmittel etc.) zu verzichten. Eine Liste mit den zu meidenden Sojaprodukten werden wir Ihnen zur Verfügung stellen. Zur Erfassung Ihrer Verzehrsgewohnheiten ist vor dem Beginn der Studie die Führung eines 7-Tage-Schätz-Protokolls vorgesehen. Während der Interventionen wird die Verzehrshäufigkeit einzelner Lebensmittelgruppen anhand von speziellen Fragebögen ermittelt.

Wie bereits im vorhergehenden Abschnitt erwähnt, werden Sie gebeten, viermal während des gesamten Studienzeitraumes Ihren 24-Stunden-Urin zu sammeln. Um die Vollständigkeit überprüfen zu können, ist es notwendig, während der Sammeltage 3 x täglich ein vitaminähnliches Präparat (PABA – genaue Bezeichnung para-Amino-Benzoessäure) einzunehmen.

Wir bitten Sie, uns alle Veränderungen vor und während der Studie anzuzeigen. Damit meinen wir unter anderem das Auftreten von Neuerkrankungen jeglicher Art, die Einnahme neu verordneter Medikamente oder das Absetzen von Präparaten, die Anwendung von Antibiotika, Beschwerden nach dem Verzehr der Isoflavon-haltigen Lebensmittel oder auch den einmaligen Gebrauch von Schmerzmitteln.

Sind durch die Teilnahme an der Studie nachteilige Auswirkungen auf meine Gesundheit zu erwarten?

Die Blutentnahme ist ein Routinevorgang, der durch fachkundiges, erfahrenes Personal durchgeführt wird. Die Menge des abgenommenen Blutes variiert zwischen 30-50 ml bei jedem Besuch. Die Blutabnahme erfolgt immer nüchtern. Am Vorabend sollten Sie vermeiden, große Mengen Alkohol zu sich zu nehmen.

Der während der 24-Std.-Urinsammlung einzunehmende Wirkstoff para-Amino-Benzoessäure (PABA) wird seit fast 20 Jahren in ernährungswissenschaftlichen Studien verwendet, ohne dass nachteilige Effekte bekannt sind. Falls eine Unverträglichkeit gegenüber diesem Wirkstoff bekannt ist oder Sie während der Einnahme allergisch auf PABA reagieren, teilen Sie uns das bitte unverzüglich mit.

Die den Lebensmitteln zugesetzten Isoflavone sind natürliche Bestandteile aus Sojapflanzen. Die Höhe der Einnahme in den bereitgestellten Lebensmitteln (50 mg/Tag) entspricht der geschätzten Menge, die die Menschen in China und Japan in der täglichen Nahrung konsumieren.

Werden die gewonnenen Resultate vertraulich behandelt (Datenschutz)?

Ihre Teilnahme an der Studie ist streng vertraulich. Die Ergebnisse der Studie werden durch Nummern anonymisiert und für Dritte unzugänglich aufbewahrt. Nach Abschluss aller Untersuchungen werden Ihr Name und Ihre Adresse gelöscht. Die gewonnenen Daten und Informationen aus der Studie werden ausschließlich in verschlüsselter Form anhand von Mittelwerten veröffentlicht oder präsentiert.

Werden mir die Ergebnisse der Studie mitgeteilt?

Auf Wunsch werden wir Ihnen die Ergebnisse der Screening-Blutuntersuchung zukommen lassen. Im Rahmen einer Informationsveranstaltung nach Abschluß der Studie möchten wir Ihnen die Möglichkeit geben, einen kleinen Einblick in die Studienergebnisse des Isoheart-Projektes zu erhalten.

Erhalte ich eine Aufwandsentschädigung?

Haben Sie bis zum Abschluß aller Untersuchungen an der Studie teilgenommen, erhalten Sie eine Aufwandsentschädigung in Höhe von 260 €.

Kann ich meine Teilnahme an der Studie noch absagen, nachdem ich die Zustimmungserklärung unterzeichnet habe?

Sie können jederzeit Ihre Teilnahme an der Studie ohne Angabe von Gründen beenden. Die gegebene Zustimmungserklärung ist in keiner Weise bindend. Mit Ihrer Unterschrift geben Sie lediglich Ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Studie und erklären sich bereit, Blut- und Urinproben abzugeben sowie an allen für die Studie notwendigen Untersuchungen mitzuwirken. Darüber hinaus bestätigen Sie mit der Unterzeichnung des Formulars, dass Sie das Informationsblatt gelesen haben und Sie ausreichend über den Studienablauf aufgeklärt wurden. Vor und auch während des gesamten Studienzeitraumes können Sie sich bei Fragen und Problemen jederzeit an die Betreuer der Studie wenden.

Wo befindet sich das Studienzentrum und wer sind meine Ansprechpartner?

Studienzentrum: Deutsches Institut für Ernährungsforschung
 Abteilung Interventionsstudien
 Arthur-Scheunert-Allee 114-116
 14558 Bergholz-Rehbrücke

Ansprechpartner: Manja Reimann Tel.: 033200/88-682

Isoheart - Screeningfragebogen

 Bitte gehen Sie den Fragebogen Frage für Frage durch. Kreuzen Sie immer nur ein Kästchen pro Frage an, es sei denn, es wird ausdrücklich darauf hingewiesen, dass Mehrfachantworten erlaubt sind.

Sollten Sie Schwierigkeiten beim Ausfüllen des Fragebogens haben, können Sie sich jederzeit an Frau Manja Reimann unter  033200 / 88-682 wenden.

1.	Vorläufige Probandennummer: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	Geburtsdatum : <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> 19 <input type="text"/> <input type="text"/> Tag Monat Jahr
2.	Gewicht: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> , <input type="text"/> kg	Körpergröße: <input type="text"/> , <input type="text"/> <input type="text"/> m
3.	Wieviele Personen leben ständig in ihrem Haushalt, Sie selbst eingeschlossen? eine Person..... <input type="checkbox"/> zwei oder mehr Personen..... <input type="checkbox"/> ➔ insgesamt <input type="text"/> <input type="text"/> ➔ davon Kinder (< 18 J) <input type="text"/> <input type="text"/>	
4.	Welchen Schulabschluß haben Sie? ( bei mehreren Abschlüssen nur den <u>höchsten</u> nennen) Hauptschulabschluß/Volksschulabschluß <input type="checkbox"/> Realschulabschluß (Mittlere Reife)..... <input type="checkbox"/> Abschluß Polytechnische Oberschule 10. Klasse (vor 1965 8. Klasse) <input type="checkbox"/> Fachhochschulreife (Abschluß einer Fachoberschule) <input type="checkbox"/> Abitur, allgemeine oder fachgebundene Hochschulreife (Gymnasium bzw. EOS)..... <input type="checkbox"/> Anderer Schulabschluß <input type="checkbox"/> Schule beendet ohne Abschluß <input type="checkbox"/>	
5.	In welchem Alter schlossen Sie die allgemeinbildende Schule (Grundschule – Abitur) ab? <input type="text"/> <input type="text"/> Jahren	
6.	Haben Sie eine abgeschlossene Berufsausbildung oder Hochschulausbildung? Wenn ja, welche? ( bei mehreren Abschlüssen nur den <u>höchsten</u> nennen) Lehre (Beruflich-betriebliche Ausbildung)..... <input type="checkbox"/> Berufsfachschule, Handelsschule (beruflich-schulische Ausbildung)..... <input type="checkbox"/> Fachschule (z.B. Technikerschule, Berufs- und Fachakademie) <input type="checkbox"/> Fachhochschule, Ingenieurschule <input type="checkbox"/> Universität, Hochschule <input type="checkbox"/> Anderen Ausbildungsabschluß..... <input type="checkbox"/> Kein beruflicher Abschluß <input type="checkbox"/>	

7.	Welche der folgenden Angaben trifft auf ihre derzeitige Situation zu?	<input type="checkbox"/>	
	Zur Zeit nicht berufstätig/arbeitslos gemeldet.....	<input type="checkbox"/>	
	Teilzeit- oder stundenweise berufstätig (< 15 Std/Woche)	<input type="checkbox"/>	
	Teilzeit-berufstätig (15 bis 34 Std/Woche).....	<input type="checkbox"/>	
	Voll berufstätig (≥ 35 Std/Woche)	<input type="checkbox"/>	
	Umschulung/Arbeitsförderungsmaßnahme	<input type="checkbox"/>	
	Ausschließlich Hausfrau	<input type="checkbox"/>	
	In Rente/pensioniert	<input type="checkbox"/>	
	Nichts davon trifft zu.....	<input type="checkbox"/>	
8.	Wurden bei Ihnen folgende Erkrankungen jemals ärztlich diagnostiziert? ✖ Bitte kreuzen sie in jeder Zeile das zutreffende Kästchen an !	<input type="checkbox"/>	
	Bluthochdruck.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Durchblutungsstörungen am Herzen, Verengung der Herzkranzgefäße, Angina pectoris	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	andere Gefäßerkrankungen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Herzinfarkt	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Herzschwäche	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Schlaganfall	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Durchblutungsstörungen der Beine oder des Gehirns	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Chronische Magen-Darm-Erkrankungen (Morbus Crohn, Colitis Ulcerosa, Divertikulose, Zöliakie)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Darmresektion	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Reizdarm	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Diabetes mellitus	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Erhöhte Blutfettwerte	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Erkrankungen der Geschlechtsorgane oder der Gebärmutter.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	entzündliche Erkrankungen (z.B. Schuppenflechte, Neurodermitis Rheumatoide Arthritis, chronische Polyarthritis etc.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Schilddrüsenerkrankung.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Allergien	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Welcher Art ?.....		
	Andere Erkrankungen		
		

9.	<p>Wurde bei Ihnen jemals eine Allergie gegen para-Aminobenzoesäure ärztlich diagnostiziert?</p> <p>ja..... <input type="checkbox"/></p> <p>nein..... <input type="checkbox"/></p> <p>Ich weiß nicht..... <input type="checkbox"/></p>																																				
10.	<p>Wurde bei Ihnen jemals eine Krebserkrankung (einschl. Leukämie) festgestellt?</p> <p>Nein, nie <input type="checkbox"/></p> <p>Ja, ich bin an Krebs erkrankt..... <input type="checkbox"/></p> <p>Ja, aber ich bin krebsfrei seit <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/><input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> (Jahr)..... <input type="checkbox"/></p>																																				
11.	<p>Nehmen Sie regelmäßig auf ärztliche Anweisung folgende Medikamente? ✳ Bitte kreuzen sie in jeder Zeile das zutreffende Kästchen an !</p> <table border="0" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th></th> <th style="text-align: center;">ja</th> <th style="text-align: center;">nein</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Blutdruck senkende Medikamente</td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Blutfettsenker, Cholesterinsenker</td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>entzündungshemmende Medikamente (Cortikoide, Immunsuppressiva)</td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Gerinnungshemmer (z.B. Aspirin, Heparin).....</td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Antibiotika, Sulfonamide</td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Aspirin</td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Ibuprofen</td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Insulin/orale Antidiabetika</td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Schilddrüsenhormone</td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>keine.....</td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>andere</td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> </tr> </tbody> </table> <p>➔ Bitte angeben:</p>		ja	nein	Blutdruck senkende Medikamente	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Blutfettsenker, Cholesterinsenker	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	entzündungshemmende Medikamente (Cortikoide, Immunsuppressiva)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Gerinnungshemmer (z.B. Aspirin, Heparin).....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Antibiotika, Sulfonamide	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Aspirin	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Ibuprofen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Insulin/orale Antidiabetika	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Schilddrüsenhormone	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	keine.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	andere	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	ja	nein																																			
Blutdruck senkende Medikamente	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																			
Blutfettsenker, Cholesterinsenker	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																			
entzündungshemmende Medikamente (Cortikoide, Immunsuppressiva)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																			
Gerinnungshemmer (z.B. Aspirin, Heparin).....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																			
Antibiotika, Sulfonamide	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																			
Aspirin	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																			
Ibuprofen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																			
Insulin/orale Antidiabetika	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																			
Schilddrüsenhormone	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																			
keine.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																			
andere	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																			
12.	<p>Wie oft nehmen Sie ohne ärztliche Anweisung Aspirin (z.B. gegen Kopfschmerzen)? Denken Sie bitte an die vergangenen 6 Monate!</p> <p>Täglich..... <input type="checkbox"/></p> <p>Mehrmals in der Woche..... <input type="checkbox"/></p> <p>Etwa einmal pro Woche..... <input type="checkbox"/></p> <p>Etwa zwei- bis dreimal im Monat</p> <p>Einmal im Monat oder seltener</p> <p>(fast) nie..... <input type="checkbox"/></p> <p>Falls Sie Aspirin ohne ärztliche Anweisung nehmen, wären Sie bereit, im Falle einer Studienteilnahme während des Studienzeitraumes auf eine Aspirineinnahme zu verzichten ?</p> <p>ja..... <input type="checkbox"/></p> <p>nein..... <input type="checkbox"/></p>																																				
13.	<p>Haben Sie in den vergangenen 3 Monaten Antibiotika eingenommen?</p> <p>ja..... <input type="checkbox"/></p> <p>nein..... <input type="checkbox"/></p>																																				

14.	<p>Nehmen Sie gelegentlich Abführmittel ein ?</p> <p>ja..... <input type="checkbox"/></p> <p>nein..... <input type="checkbox"/></p>
15.	<p>Litten Sie in den vergangenen 6 Monaten unter einer Entzündung des Magen-Darm-Traktes ?</p> <p>ja..... <input type="checkbox"/></p> <p>nein..... <input type="checkbox"/></p>
16.	<p>Bitte geben Sie an, wann Sie zuletzt akut erkrankt waren (Erkältung, Infektion, Grippe, Angina, Mittelohrentzündung etc.) !</p> <p style="text-align: center;"><input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/><input type="checkbox"/><input type="checkbox"/></p> <p style="text-align: center;">Monat Jahr</p>
17.	<p>Wann hatten Sie Ihre letzte Periode ?</p> <p>Ich bekomme meine Periode noch regelmäßig <input type="checkbox"/></p> <p>Ich bekomme meine Periode nur noch unregelmäßig <input type="checkbox"/></p> <p>Ich habe meine Periode seit einigen Monaten nicht mehr (< 1 Jahr) <input type="checkbox"/></p> <p>Meine letzte Periode liegt mehr als 1 Jahr aber weniger als 2 Jahre zurück..... <input type="checkbox"/></p> <p>Ich habe meine Periode seit mehr als 2 aber weniger als 5 Jahren nicht mehr <input type="checkbox"/></p> <p>Meine letzte Periode liegt mehr als 5 Jahre zurück..... <input type="checkbox"/></p> <p>Ich kann mich nicht mehr erinnern <input type="checkbox"/></p> <p>Ich weiß es nicht, da ich Hormone einnehme..... <input type="checkbox"/></p>
18.	<p>Befinden oder befanden Sie sich in einer Hormonersatztherapie (Einnahme synthetischer Hormone) ?</p> <p>Nein, noch nie <input type="checkbox"/></p> <p>Ja, ich nehme zur Zeit Hormone <input type="checkbox"/></p> <p>Ja, aber ich habe die Einnahme nach dem 30.09.02 beendet <input type="checkbox"/></p> <p>Ja, aber ich habe die Einnahme bereits vor dem 01.10.02 beendet <input type="checkbox"/></p>
19.	<p>Spenden Sie in regelmäßigen Abständen Blut ?</p> <p>ja..... <input type="checkbox"/></p> <p>nein..... <input type="checkbox"/></p> <p>Wenn ja, haben Sie in den letzten 2 Monaten Blut gespendet ?</p> <p>ja..... <input type="checkbox"/></p> <p>nein..... <input type="checkbox"/></p> <p>Würden Sie im Falle einer Studienteilnahme 2 Monate vor Studienbeginn und während des gesamten Studienzeitraumes auf das Blutspenden verzichten?</p> <p>ja..... <input type="checkbox"/></p> <p>nein..... <input type="checkbox"/></p>

20.	<p>Ist bis einschließlich Oktober eine Reise geplant, die eine Impfung erforderlich macht?</p> <p>ja..... <input type="checkbox"/></p> <p>➔ Zeitpunkt der Impfung: <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> (Monat)</p> <p>nein..... <input type="checkbox"/></p> <p>weiß nicht <input type="checkbox"/></p>
21.	<p>Falls Sie während der 8-wöchigen Interventionsphasen verreisen, wären Sie bereit, die von uns bereitgestellten Lebensmittel im Urlaub täglich zu verzehren?</p> <p>ja..... <input type="checkbox"/></p> <p>nein..... <input type="checkbox"/></p>
22.	<p>Haben Sie früher geraucht oder rauchen Sie zur Zeit ?</p> <p>Ich habe noch nie geraucht (bis auf ganz seltenes probieren) <input type="checkbox"/></p> <p>☞ Weiter mit Frage 23 !</p> <p>Ich rauche seit mindestens 1 Jahr nicht mehr <input type="checkbox"/></p> <p>Ich habe in den letzten 12 Monaten aufgehört zu rauchen..... <input type="checkbox"/></p> <p>Ich rauche zur Zeit..... ➔</p> <p>täglich <input type="checkbox"/></p> <p>gelegentlich <input type="checkbox"/></p>
23.	<p>Wieviele Zigaretten rauchen Sie für gewöhnlich bzw. haben Sie früher geraucht?..... täglich</p> <p><input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> Stück</p> <p>wöchentlich..... <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> Stück</p> <p>monatlich <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> Stück</p>
24.	<p>Halten Sie sich tagsüber oder abends häufiger in Räumen auf, in denen geraucht wird? ✖ Mehrfachantworten sind erlaubt!</p> <p>nein..... <input type="checkbox"/></p> <p>Ja, auf Arbeit <input type="checkbox"/></p> <p>Ja, zu Hause..... <input type="checkbox"/></p> <p>Ja, an anderen Orten..... <input type="checkbox"/></p>
25.	<p>Ernähren Sie sich strikt vegetarisch (kein Fisch, kein Fleisch)?</p> <p>Nein, nie <input type="checkbox"/></p> <p>Nein, ich esse aber selten Fleisch..... <input type="checkbox"/></p> <p>Nein, ich esse kein Fleisch nur Fisch <input type="checkbox"/></p> <p>Ja, immer..... <input type="checkbox"/></p>

26.	Wie oft essen Sie folgende Sojaprodukte ? Denken Sie bitte an die letzten 12 Monate!						
	✘ Bitte kreuzen sie in jeder Zeile das zutreffende Kästchen an !						
		täglich	Mehrmals/ Woche	Etwa 1 x/ Woche	Etwa 2- 3 x/ Monat	1 x / Monat u. seltener	(fast) nie
	1. Sojabohnen/Sojasprossen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	2. Sojamehl/-flocken/-schrot/-kleie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	3. Backwaren aus Sojamehl.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	4. Sojamilch/-joghurt/-desserts.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	5. Sojaöl	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	6. Tofu/Miso/Tempeh	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	7. Sojasoße	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	8. Fleischersatz auf Sojabasis.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	9. Sojateigwaren	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	10. Brotaufstriche/Pasten/Cremes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
11. Käse (Natto, Sufu).....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
12. andere Sojaprodukte.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Wären Sie bereit, im Falle einer Studienteilnahme 2 Wochen vor Studienbeginn und während des gesamten Studienzeitraumes auf den Verzehr von Soja und Sojaprodukten zu verzichten?							
ja.....						<input type="checkbox"/>	
Nein						<input type="checkbox"/>	
27.	Wie häufig trinken Sie folgende alkoholische Getränke?			Bier	Wein, Sekt, Fruchtwein	Hochprozentige alkoholische Getränke ¹	
	Mehrmals täglich	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			
	Täglich.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			
	Mehrmals in der Woche	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			
	Etwa einmal pro Woche	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			
	Etwa zwei- bis dreimal pro Monat.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			
	Einmal im Monat oder seltener.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			
	(fast) nie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			

¹ wie Weinbrand, Likör, Rum, klare Schnäpse etc.

28. Wie oft nehmen Sie folgende Nahrungsergänzungsmittel oder Vitamin- und Mineralstoffsupplemente zu sich? ✖ Bitte kreuzen Sie in jeder Zeile das zutreffende Kästchen an!

	gelegentlich	regelmäßig	nur im Winter	nie
Vitamine- u. Mineralstoffpräparate	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sojaweiweißpulver	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Nachtkerzenöl	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fischöle/Lebertran.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
pflanzliche Wirkstoffe	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Johanniskraut	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Knoblauchkapseln	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ginko biloba	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ballaststoffpräparate	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
andere	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Bitte angeben:				
Ich nehme keinerlei Supplemente	<input type="checkbox"/>			

Wären Sie bereit, im Falle einer Studienteilnahme 2 Monate vor Studienbeginn und während des gesamten Studienzeitraumes auf die Einnahme von Supplementen zu verzichten?

ja.....
nein.....

29. Wie oft führen Sie Diäten zur Gewichtsreduktion durch? Denken Sie bitte an die letzten 12 Monate!

Nie
selten, weniger als einmal im Jahr.....
etwa ein oder zweimal im Jahr.....
öfter als zweimal im Jahr
Ich versuche ständig abzunehmen

30. Praktizieren Sie eine spezielle Diät (z.B. Atkins Diät, Trennkost, Makrobiotische Diät, Weight Watchers, Veganismus)?

ja.....
Nein

Wenn ja, spezifizieren Sie bitte:

Diätform.....

31.	<p>Haben Sie in den vergangenen 6 Monaten an einer Klinischen Studie teilgenommen?</p> <p>ja..... <input type="checkbox"/></p> <p>Nein..... <input type="checkbox"/></p> <p>Wenn ja, spezifizieren Sie bitte:</p> <p>Art der Studie</p> <p>Zeitraum der Studie.....</p> <p>Studienzentrum</p>
32.	<p>Wie oft treiben sie Sport?</p> <p>Ich treibe nicht regelmäßig Sport..... <input type="checkbox"/></p> <p>Weniger als 1 Stunde in der Woche</p> <p>Regelmäßig, 1 bis 2 Stunden in der Woche</p> <p>Regelmäßig, 3 bis 4 Stunden in der Woche</p> <p>Regelmäßig, mehr als 4 Stunden in der Woche</p> <p>Bitte geben Sie die Sportart an:</p>
33.	<p>Haben Sie schon einmal von Isoflavonen gehört, bevor Sie von dieser Studie erfahren haben?</p> <p>Ja..... <input type="checkbox"/></p> <p>Nein..... <input type="checkbox"/></p> <p>Ich weiß nicht..... <input type="checkbox"/></p>
34.	<p>Wären Sie bereit, unabhängig von der Studienteilnahme einen mehrseitigen Fragebogen zur Erhebung der Akzeptanz von Sojaprodukten und angereicherten Lebensmitteln auszufüllen?</p> <p>Ja..... <input type="checkbox"/></p> <p>Nein..... <input type="checkbox"/></p>

Alles ausgefüllt und nichts vergessen?

Dann möchten wir uns recht herzlich für Ihre Mühe bedanken!



isoheart

Informations- und Studienmaterialien

Zeitplan

Studienphase	Termine/Zeit-aufwand	Aktivitäten
Screening	1 Termin	1 x Urinprobe 1 x Blutabnahme (nüchtern) 1 x Anthropometrie (Größe, Gewicht, Taillen-Hüfte-Verhältnis) 1 x Gelegenheits-Blutdruck
Informationsabend (Einführungs- veranstaltung)	1 Termin	Informationen zu <ul style="list-style-type: none"> • Studienablauf • 24-Stunden-Urin-Sammlungen • Gefäßfunktionsmessungen „Wie führe ich ein Ernährungsprotokoll?“ Austeilung der Urinbehälter
Run-in	1 Woche	1 x 3-Tage-Schätz-Protokoll 1 x Blutabnahme (nüchtern) 1 x 24-Stunden-Urin 1 x Gelegenheits-Blutdruck 1 x Anthropometrie 1 x Gefäßfunktionsmessung Vergabe der Lebensmittel für die erste Interventionsphase ⇒RANDOMISIERUNG: zufällige Zuteilung zu einer der zwei Interventionsgruppen
erste Intervention	8 Wochen	Isoflavon- und Plazebogruppe 1 x Blutabnahme (nüchtern) 1 x 24-Stunden-Urin 1 x Gelegenheits-Blutdruck 1 x Gefäßfunktionsmessung 1 x Anthropometrie
Wash-out	voraussichtlich 8 Wochen <i>7 Wochen in der letzten Woche</i>	 Studienurlaub 1 x 3-Tage-Schätz-Protokoll 1 x Blutabnahme (nüchtern) 1 x 24-Stunden-Urin 1 x Gelegenheits-Blutdruck 1 x Anthropometrie 1 x Gefäßfunktionsmessung Ausgabe der Lebensmittel für die zweite Interventionsphase
⇒CROSSOVER: Wechsel zwischen der Isoflavon- und Plazebogruppe		
zweite Intervention	8 Wochen	Isoflavon- und Plazebogruppe 1 x 3-Tage-Schätz-Protokoll 1 x Blutabnahme (nüchtern) 1 x 24-Stunden-Urin 1 x Gelegenheits-Blutdruck 1 x Gefäßfunktionsmessung 1 x Anthropometrie 1 x Fragebogen zur sensorischen Bewertung und Akzeptanz der Lebensmittel
Informationsabend	1 Termin	Abschlussbesprechung, Ergebnispräsentation

EINVERSTÄNDNISERKLÄRUNG

Ich,

Familienname	Vorname	Geb.-Datum
--------------	---------	------------

wohnhaft in

Postleitzahl	Ort	Strasse
--------------	-----	---------

.....

Telefon privat	Telefon dienstlich
----------------	--------------------

nehme als Probandin freiwillig und auf eigene Verantwortung an Untersuchungen zum Forschungsthema:

„ISOHEART- Effekte von Phytoöstrogenen (Isoflavonen) aus Soja auf kardiovaskuläre Risikofaktoren bei postmenopausalen Frauen“

im Deutschen Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke (DIfE) teil.

Ich erkläre mich bereit:

- in einem Zeitraum von 2 x 8 Wochen täglich die vom DIfE zur Verfügung gestellten mit Isoflavonen angereicherten Lebensmittel zu verzehren
- zu insgesamt sechs Blutentnahmen nüchtern zu erscheinen
- vier 24-Stunden-Urin-Sammlungen mit PABA durchzuführen
- an kardiologischen Untersuchungen in der Klinik Havelhöhe teilzunehmen
- anthropometrische Messungen und Blutdruck-Momentaufnahmen vornehmen zu lassen
- viermal ein 3-Tage-Ernährungsprotokoll zu führen
- sowie Fragebögen auszufüllen.

Ich bin darüber aufgeklärt, dass in meinen Blut- und Urinproben biochemische (funktionelle) Parameter sowie Stoffwechselprodukte der aufgenommenen Isoflavone analysiert werden.

Über den Inhalt und den Ablauf der vorgesehenen Untersuchungen bin ich durch das DIfE mündlich und schriftlich unterrichtet worden. Ich habe die Informationen verstanden und meine Fragen sind mir zufriedenstellend beantwortet worden.

Ich verpflichte mich, das Studienteam über mögliche Allergien und Unverträglichkeiten zu informieren.

Meine Angaben und die Untersuchungsergebnisse werden nicht in Verbindung mit meinem Namen, sondern getrennt davon gespeichert. Die Namens- und Adressdatei wird unmittelbar nach Eingabe der letzten Erhebungs- oder Messdaten gelöscht. Die Datenbehandlung und -auswertung erfolgt gemäß den Bestimmungen des Brandenburgischen Datenschutzgesetzes.

Ich bin darüber informiert, dass ich mein Einverständnis zur Teilnahme jederzeit schriftlich oder mündlich ohne Angabe von Gründen widerrufen kann. Bei Widerruf werden mein Name und meine Adresse aus der geschützten Personendatei gelöscht, jedoch nicht die bisher erhobenen Daten. Ich nehme zur Kenntnis, dass mir aus der Verweigerung oder dem Widerruf meines Einverständnisses keinerlei Nachteile entstehen.

Bergholz-Rehbrücke, den 2003

Liste verbotener Lebensmittel

Sojaprodukte meiden? Bitte nur im Rahmen unserer Studie!!

Isoflavone kommen in allen Sojaprodukten vor, die im Handel erhältlich sind. Mit dem Verzehr unserer Lebensmittel nehmen Sie am Tag durchschnittlich 50 mg dieser pflanzlichen Wirkstoffe auf. Für eine korrekte Auswertung der Blut- und Urinparameter sowie der Gefäßfunktionsmessungen ist es notwendig, dass die Konzentration der täglich zugeführten Isoflavone konstant bleibt. Wir bitten Sie deshalb, auf den Verzehr von anderen Soja-haltigen Lebensmitteln mindestens 2 Wochen vor Studienbeginn und während des gesamten Studienzeitraumes, einschließlich der Wash-Out-Phase, zu verzichten.

Unterhalb finden Sie die wichtigsten Isoflavon-haltigen Lebensmittel aufgelistet.

- Sojamehl/-flocken/-schrot
- Sojabohnen/Sojasprossen
- Backwaren aus Sojamehl/Sojakeimlingen
- Sojamilch/-joghurt/-desserts
- Sojaöl, Sojamargarine
- Tofu/Miso/Tempoh
- Sojasoße
- Bratlinge/Wurst/Fleischersatz auf Sojabasis
- Sojateigwaren
- Brotaufstriche/Pasten/Cremes aus Soja oder mit Sojaanteilen
- Vegetarische Bolognese/Fertiggerichte mit Fleischersatz
- Käse (Natto, Sufu)
- Eiweißdrinks auf Sojabasis (z.B. wird häufig in Fitnesscentern angeboten)



Bitte denken Sie daran, dass die meisten Gerichte beim Asiaten bzw. im Chinarestaurant Sojasoße oder Sojasprossen enthalten. Verzichten Sie im Zweifel auf solche Speisen.

Kurzübersicht über Ihre Termine

vorläufige Probandennummer: | _ | _ | _ |

neue Probandennummer: | A | / | _ | _ | _ |

erster Studienzeitraum: 04.05.2003 - 30.06.2003

Datum	Uhrzeit	Untersuchung	Bemerkung
Sonntag, 27.04.2003 bis Dienstag, 29.04.2003 3-Tage-Ernährungsprotokoll führen			
Sonntag, 04.05.2003		Beginn der 24-Stunden-Urinsammlung	<ul style="list-style-type: none"> ✓ PABA-Tabletten einnehmen ✓ keine Vitaminpräparate ✓ kein Paracetamol ✓ fettarmes Abendessen ✓ keinen Alkohol
Montag, 05.05.2003		-Ende der 24-Stunden-Urinsammlung -Blutabnahme -Anthropometrie -Blutdruck	<ul style="list-style-type: none"> ✓ nüchtern erscheinen ✓ 24 Stunden vorher keinen Alkohol, keinen Sport und keine Medikamente ✓ standardisierte Mahlzeit
	Treffpunkt im DiFE um:	Bitte mitbringen: -Ernährungsprotokoll -Urinsammelprotokoll Gefäßfunktionsmessung in der Klinik Havelhöhe	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 3 Stunden vor Beginn der Messung nichts mehr essen
Dienstag, 03.06.2003		-Blutabnahme -Anthropometrie -Blutdruck	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 02.06.03 fettarmes Abendessen ✓ nüchtern erscheinen
Sonntag, 22.06.2003 bis Dienstag, 24.06.2003 3-Tage-Ernährungsprotokoll führen			
Sonntag, 29.06.2003		Beginn der 24-Stunden-Urinsammlung	<ul style="list-style-type: none"> ✓ PABA-Tabletten einnehmen ✓ keine Vitaminpräparate ✓ kein Paracetamol ✓ fettarmes Abendessen ✓ keinen Alkohol
Montag, 30.06.2003		-Ende der 24-Stunden-Urinsammlung -Blutabnahme -Anthropometrie -Blutdruck	<ul style="list-style-type: none"> ✓ nüchtern erscheinen ✓ 24 Stunden vorher keinen Alkohol, keinen Sport und keine Medikamente ✓ standardisierte Mahlzeit
	Treffpunkt im DiFE um:	Bitte mitbringen: -Ernährungsprotokoll -Urinsammelprotokoll Gefäßfunktionsmessung in der Klinik Havelhöhe	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 3 Stunden vor Beginn der Messung nichts mehr essen

Kurzübersicht über Ihre Termine

vorläufige Probandennummer: |_|_|_|_|

neue Probandennummer: |A|/|_|_|_|_|

zweiter Studienzeitraum: 24.08.2003 - 20.10.2003

Datum	Uhrzeit	Untersuchung	Bemerkung
Sonntag, 17.08.2003 bis Dienstag, 19.08.2003 3-Tage-Ernährungsprotokoll führen			
Sonntag, 24.08.2003		Beginn der 24-Stunden-Urinsammlung	<ul style="list-style-type: none"> ✓ PABA-Tabletten einnehmen ✓ keine Vitaminpräparate ✓ kein Paracetamol ✓ fettarmes Abendessen ✓ keinen Alkohol
Montag, 25.08.2003		-Ende der 24-Stunden-Urinsammlung -Blutabnahme -Anthropometrie -Blutdruck Bitte mitbringen: -Ernährungsprotokoll -Urinsammelprotokoll	<ul style="list-style-type: none"> ✓ nüchtern erscheinen ✓ 24 Stunden vorher keinen Alkohol, keinen Sport und keine Medikamente ✓ standardisierte Mahlzeit
	Treffpunkt im DiFE um:	Gefäßfunktionsmessung in der Klinik Havelhöhe	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 3 Stunden vor Beginn der Messung nichts mehr essen
Dienstag, 23.09.2003		-Blutabnahme -Anthropometrie -Blutdruck	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 22.09.03 fettarmes Abendessen ✓ nüchtern erscheinen
Sonntag, 12.10.2003 bis Dienstag, 14.10.2003 3-Tage-Ernährungsprotokoll führen			
Sonntag, 19.10.2003		Beginn der 24-Stunden-Urinsammlung	<ul style="list-style-type: none"> ✓ PABA-Tabletten einnehmen ✓ keine Vitaminpräparate ✓ kein Paracetamol ✓ fettarmes Abendessen ✓ keinen Alkohol
Montag, 20.10.2003		-Ende der 24-Stunden-Urinsammlung -Blutabnahme -Anthropometrie -Blutdruck Bitte mitbringen: -Ernährungsprotokoll -Urinsammelprotokoll	<ul style="list-style-type: none"> ✓ nüchtern erscheinen ✓ 24 Stunden vorher keinen Alkohol, keinen Sport und keine Medikamente ✓ standardisierte Mahlzeit
	Treffpunkt im DiFE um:	Gefäßfunktionsmessung in der Klinik Havelhöhe	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 3 Stunden vor Beginn der Messung nichts mehr essen

Krankengeschichte

Haben Sie eine medizinische oder chirurgische Krankengeschichte?

Ja Nein

Wenn ja, bitte spezifizieren:

Vorgeschichte	Beginn der Krankheit	Genauere Bezeichnung	KS	NP
gastrointestinal	_ _ / _ _ / _ _ _ _ _			
Leber	_ _ / _ _ / _ _ _ _ _			
Nieren	_ _ / _ _ / _ _ _ _ _			
metabolisch	_ _ / _ _ / _ _ _ _ _			
neurologisch	_ _ / _ _ / _ _ _ _ _			
psychiatrisch	_ _ / _ _ / _ _ _ _ _			
Atemwege	_ _ / _ _ / _ _ _ _ _			
Allergien	_ _ / _ _ / _ _ _ _ _			
Endokrine Drüsen	_ _ / _ _ / _ _ _ _ _			
kardiovaskulär	_ _ / _ _ / _ _ _ _ _			
dermatologisch	_ _ / _ _ / _ _ _ _ _			
Blutkrankheit	_ _ / _ _ / _ _ _ _ _			
Hals-Nase-Ohren	_ _ / _ _ / _ _ _ _ _			
Augen	_ _ / _ _ / _ _ _ _ _			
Muskeln/Skelett	_ _ / _ _ / _ _ _ _ _			
Resektion	_ _ / _ _ / _ _ _ _ _			
Krebs	_ _ / _ _ / _ _ _ _ _			
Anderes	_ _ / _ _ / _ _ _ _ _			
	_ _ / _ _ / _ _ _ _ _			

KS = Krankheitsstufe: 1=akut 2=chronisch 3=gelegentlich 4=anderes

NP = Krankheit noch präsent: 1=ja 2=nein

Auszug aus dem Studientagebuch

Studienablauf

Woche 0

Probandennummer: A/□□□

Checkliste	Montag 28.04.03	Dienstag 29.04.03	Mittwoch 30.04.03	Donnerstag 01.05.03	Freitag 02.05.03	Samstag 03.05.03	Sonntag 04.05.03
Lebensmittelverzehr							
Ernährungsprotokoll							
24-Stunden-Urin-Sammlung + Protokoll							
Blut- u. Urin-Abgabe, Blutdruckmessung, Anthropometrie							PABA-Tabletten! Fettarmes Abendessen! siehe Rezepte
Gefäßfunktionsmessung							
Veränderungen/Auffälligkeiten							
· Beschwerden ¹	ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/>						
· Unverträglichkeiten	ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/>						
· Neuerkrankungen	ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/>						
Wenn ja, welche?							
Neumedikation ²	ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/>						
Wenn ja, welche?							

1 z.B. Brustziehen, plötzlich wiederkehrende Blutungen, Magen-Darm-Beschwerden (Verstopfung, Durchfall, Blähungen)

2 kurzfristige Medikamenteneinnahmen, Veränderungen der Dosis, Absetzen von Medikamenten, Neueinnahme von Medikamenten

Studienablauf

Woche 1

Probandennummer: A/□□□

Checkliste	Montag 05.05.03	Dienstag 06.05.03	Mittwoch 07.05.03	Donnerstag 08.05.03	Freitag 09.05.03	Samstag 10.05.03	Sonntag 11.05.03
Lebensmittelverzehr							
Ernährungsprotokoll	Bitte ausgefüllt mitbringen!						
24-Stunden-Urin-Sammlung + Protokoll							
Blut- u. Urin-Abgabe, Blutdruckmessung, Anthropometrie	Termin:						
Gefäßfunktionsmessung							
Termin Mo:							
Veränderungen/Auffälligkeiten							
· Beschwerden ¹	ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/>						
· Unverträglichkeiten	ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/>						
· Neuerkrankungen	ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/>						
Wenn ja, welche?							
· Neumedikation ²	ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/>						
Wenn ja, welche?							

1 z.B. Brustziehen, plötzlich wiederkehrende Blutungen, Magen-Darm-Beschwerden (Verstopfung, Durchfall, Blähungen)

2 kurzfristige Medikamenteneinnahmen, Veränderungen der Dosis, Absetzen von Medikamenten, Neueinnahme von Medikamenten

Studientagebuch: Erläuterung der Symbole (oben), Rückseite für jedes Wochenblatt (unten)

Symbol	Bezeichnung	Was ist zu beachten ?
	Einnahme der zugeteilten Lebensmittel	Bitte verzehren Sie täglich über den Tag <i>verteilt zwei</i> von den angereicherten Riegeln. Notieren sie in den vorgedruckten Kästchen, zu welcher Tageszeit Sie diese verzehrt haben. (F=Frühstück, M=Mittagessen, A=Abendessen, S=Spätmahlzeit, Z=Zwischenmahlzeit)
	Ärztliche Untersuchung Blutabnahme, Blutdruck, Gewicht	<ul style="list-style-type: none"> nüchtern erscheinen, d.h. ab 21 Uhr des Vorabends nichts mehr essen und trinken mit <i>Ausnahme Mineralwasser</i> Alkoholkonsum am Vortag meiden Bitte bereiten Sie am Abend vor der Blutabnahme eine fettarme Mahlzeit nach den vorgegebenen Rezepten zu.
	3-Tage-Schätzprotokoll	Bitte führen Sie über 3 Tage ein Ernährungsprotokoll, wobei der Lebensmittelverzehr an einem Wochenendtag und an zwei Wochentagen zu erfassen ist. Alle von Ihnen verzehrten und getrunkenen Lebensmittel sind so genau wie möglich aufzuschreiben.
	Gefäßfunktionsmessung	<ul style="list-style-type: none"> am Vorabend fettreduzierte Abendmahlzeit (siehe Rezeptvorschläge) standardisierte Mahlzeit (Verzicht auf koffein- und zuckerhaltige Getränke) 24 h vor der <i>Messung</i> keine anstrengenden sportlichen Aktivitäten 24 h vor der Messung keine Blutdruck beeinflussenden Medikamente 24 h vor der Messung Verzicht auf alkoholische Getränke Verzicht auf Vitaminpräparate und mit Vitaminen angereicherte Lebensmittel bzw. Getränke
	24-Stunden-Urin-Sammlung	<ul style="list-style-type: none"> morgens, mittags und abends je eine PABA-Kapsel Verzicht auf Vitaminpräparate oder mit Vitaminen angereicherte Lebensmittel bzw. Getränke <i>während</i> der Sammlung Medikamente mit Paracetamol meiden

Notizen und Bemerkungen

Bitte notieren und erläutern Sie hier eventuell aufgetretene *Beschwerden* und *Unverträglichkeiten* nach Einnahme unseres Lebensmittels, *Neuerkrankungen* jeder Art oder Veränderungen der *Medikamenteneinnahme*. Vermerken Sie ebenfalls alle Abweichungen von Ihren normalen Lebensgewohnheiten (z.B. wenn Sie mehr Sport als sonst getrieben haben, wenn Sie beim Asiatisen essen waren, wenn Sie mehr oder weniger oder anders/andere Lebensmittel als üblich gegessen haben, wenn Sie mehr Alkohol getrunken haben, Zigaretten geraucht...) oder alles, was Ihnen erwähnenswert erscheint.

Datum	Bemerkungen
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Name des Medikaments	Dosierung (z.B. 2 Tabletten a 500 mg täglich)	Wogegen? Symptom oder Diagnose	Beginn und Ende der Anwendung

Hinweise für die 24-Stunden-Urin-Sammlung

1. Allgemeines

Die Untersuchung des 24-Stunden-Urins ermöglicht eine genaue Ermittlung der mengenmäßigen Tageszufuhr an Isoflavonen. Überdies erhalten wir Aufschluss darüber, in welchem Ausmaß und mit welcher Geschwindigkeit die Isoflavone innerhalb von 24 Stunden verstoffwechselt werden und wie groß die individuellen Unterschiede im Stoffwechselverhalten der einzelnen Isoflavone sind. Daher ist es besonders wichtig, dass Sie den gesamten Tagesurin, unter Zuhilfenahme eines von uns bereit gestellten Messbechers sammeln, und dessen Inhalt in einen der zwei dafür vorgesehenen Tagesurinbehälter füllen. Diese Behältnisse werden so vorbereitet, dass eine Geruchsbelästigung unterbunden wird.

2. Tag der Urinsammlung

Wir bitten Sie, während der gesamten Studienphase viermal eine 24-Stunden-Urinsammlung durchzuführen. Der Tag der Urinsammlung ist zeitlich vor die nächste Blutabnahme gelegt und in Ihrer persönlichen Probandenmappe gesondert gekennzeichnet.

3. Einnahme von PABA als Bezugspunkt für unsere Analysen

Analysen von 24-Stunden-Urinproben sind nur dann sinnvoll, wenn tatsächlich der gesamte Tagesurin gesammelt wurde. Um diese Vollständigkeit überprüfen zu können, bitten wir Sie, während des Sammeltages ein vitaminähnliches Präparat (PABA) einzunehmen.

Was ist PABA ?

PABA (genaue Bezeichnung: para-Aminobenzoesäure) ist ein natürlich vorkommender Bestandteil eines Vitamins des B-Komplexes (Folsäure) und daher in geringen Mengen in Hefe, Getreide, Fleisch, Milch und Vitaminpräparaten vorzufinden.

Die Einnahme von PABA erfolgt 3 x täglich, wobei je 1 Tablette zum Frühstück, Mittagessen und Abendessen eingenommen werden soll.

Die insgesamt zugeführte Menge wird dabei innerhalb von 24 Stunden wieder vollständig mit dem Harn ausgeschieden.

4. Durchführung

Im Rahmen der Informationsveranstaltung werden Sie von uns in die Durchführung der Urinsammlung eingewiesen. Alle notwendigen Materialien erhalten Sie bei uns im Studienzentrum.

*Falls Sie Fragen zur Urinsammlung haben oder Probleme auftreten,
so wenden Sie sich bitte an*

Frau Manja Reimann

☎ 033200 / 88-682

Protokollanleitung

24-Stunden-Urin-Sammlung

BEACHTEN SIE BITTE:

- Sammeln Sie bitte am 1. Tag der Urinsammlung nicht den ersten Urin, sondern erst ab dem zweiten Urin!
- Sammeln Sie ab dem zweiten Urin jede weitere Probe zuerst im skalierten Messbecher und bestimmen Sie das Volumen jeder Probe. ✎ Notieren Sie bitte die Milliliter in Ihrem Urinsammelprotokoll. Füllen Sie den Inhalt anschließend in eine der beiden Tagessammelflaschen.
- Nehmen Sie bitte je 1 PABA-Tablette
 - ⌚ zum Frühstück
 - ⌚ zum Mittagessen
 - ⌚ zum Abendessen
- In einigen Vitamintabletten ist PABA oft in großen Mengen enthalten. Deshalb ist es besonders wichtig, dass Sie während der Probensammlung und der übrigen Studienphasen keine Vitamintabletten oder ähnliche Präparate einnehmen. Darüber hinaus sollten Sie auch keine Medikamente einnehmen, die Paracetamol enthalten, wie fiebersenkende und schmerzstillende Präparate, da dadurch unsere Ergebnisse verfälscht bzw. beeinträchtigt werden können. Sollte sich die Einnahme dieser Medikamente nicht vermeiden lassen, so ✎ notieren Sie dies bitte.

☝ WICHTIG:

Falls Sie allergische Reaktionen gegenüber einem Sonnenschutzmittel haben, informieren Sie uns bitte vor der Einnahme von PABA, da diese Substanz in vielen Sonnencremes enthalten ist.

- Der letzte Urin, den Sie in die Tagessammelflasche füllen sollten, ist der erste Urin des nächsten Tages.
- Eine Hilfestellung, um sich an das Sammeln aller Proben zu erinnern, kann eine Sicherheitsnadel sein, die Sie an Ihrer Unterwäsche befestigen.
- Stellen Sie am besten einen der beiden Sammelbehälter zu Hause in Ihr WC , um sich selbst an das Sammeln zu erinnern. Der andere Sammelbehälter kann für unterwegs und/oder auf der Arbeit verwendet werden. Bitte vergessen Sie nicht, den Meßbecher und das Urinsammelprotokoll für Ihre Eintragungen mitzunehmen.

Auszug aus dem 3-Tage-Schätzprotokoll (Blatt 1-3)

Liebe Studienteilnehmerin,

im Rahmen des Isoheart-Projektes ist es notwendig, etwas über Ihre allgemeinen Ernährungsgewohnheiten zu erfahren. Wir bitten Sie deshalb, an 3 aufeinanderfolgenden Tagen ein Ernährungsprotokoll zu führen und dieses ausgefüllt zum nächsten Blutentnahmetermin mitzubringen.

Es ist uns sehr wichtig, dass Sie Ihre Ernährungsgewohnheiten in dieser Zeit nicht ändern und dass Sie vollständig und ehrlich alles aufschreiben, was Sie verzehrt haben. Essen Sie also auch weiterhin die gewohnten Lebensmittel in den gewohnten Mengen.

Bevor Sie jedoch mit der Protokollierung am ersten Tag beginnen, beachten Sie bitte die Hinweise und Hilfestellungen auf den nächsten Seiten.

Sollten Sie noch weitere Fragen haben, stehen wir Ihnen gerne unter folgender Telefonnummer zur Verfügung:

Frau Reimann (03 32 00/88-682)

Bei dringenden Fragen können Sie Frau Reimann auch unter ihrer Handy-Nummer (0160/7365384) außerhalb der normalen Arbeitszeit erreichen.

Wir bedanken uns herzlich für Ihre Teilnahme und Mitarbeit!

Und so wird's gemacht:

- Füllen Sie bitte das Protokoll nach jeder Mahlzeit aus. Notieren Sie alle Lebensmittel und Getränke so genau wie möglich. Vergessen Sie nicht, auch kleine Zwischenmahlzeiten anzugeben.
- Notieren Sie Ihren Verzehr nicht erst am Ende des Tages aus dem Gedächtnis. Führen Sie das Protokoll deshalb bitte immer mit sich – auch wenn Sie bei Freunden eingeladen sind oder im Restaurant essen.
- Bitte schätzen Sie niemals das Gewicht Ihrer Lebensmittel, da Schätzangaben in der Regel sehr ungenau sind. Geben Sie die verzehrten Mengen der Lebensmittel und Getränke in haushaltüblichen Maßen an:
 - Teelöffel (TL), Esslöffel (EL), gehäuft (geh.), gestrichen (gestr.)
 - Tasse (klein 150ml, mittel 200ml, groß 250ml)
 - Glas (klein 150ml, mittel 200ml, groß 250ml)
 - Messerspitze = die Menge Gewürz, Backpulver usw. die auf eine Messerspitze passt, etwa 2-4 Prisen
 - Prise = so viel Salz, Pfeffer usw. wie zwischen Daumen und Zeigefinger passt
 - Scheibe, Stück – jeweils dick oder dünn, groß oder klein angeben
- Wenn die Möglichkeit besteht, können Sie auch Lebensmittel, bei denen die Angabe in haushaltsüblichen Maßen schwerfällt, abwiegen. Das erhöht ausserdem die Genauigkeit Ihrer Angaben.
- Bei Fertigprodukten ist das Gewicht auf der Verpackung vermerkt, z.B. 150 g Joghurt, 33,5 g Müsli Riegel. Geben Sie gegebenenfalls auch die Nährwertangaben auf der Verpackung an.
- Schreiben Sie nur die wirklich verzehrten Mengen auf.

- Wenn Sie Speisen für die Familie zubereiten, notieren Sie bitte die vollständige Zutatenliste des Rezeptes in der dafür vorgesehenen Spalte. Den *tatsächlich* von Ihnen *verzehrt* Anteil vermerken Sie dann unter der entsprechenden Tageszeit (z.B. $\frac{1}{4}$ Rezept Pizza, $1\frac{1}{2}$ Suppenteller Rezept Eintopf, 3 geh. EL Rezept Gemüsecurry, 2 gr. Tassen Rezept bunter Gemüsesalat).
- Vergessen Sie nicht, das zum Backen, Braten, Kochen etc. oder als Aufstrich verwendete Fett aufzuschreiben (einschl. Sorte oder Handelsname).
- Geben Sie bei Bedarf die Speiseart wie folgt an: Fertiggericht oder selbst zubereitet oder ausser Haus verzehrt
- Vermerken Sie bitte in der vorgegebenen Spalte die entsprechende Zahl für den Zustand des verzehrten Lebensmittels:

Zustand des verzehrten Lebensmittels:

1	frisch/roh	8	gekocht
2	tiefgefroren	9	gedünstet
3	getrocknet	10	gedämpft
4	eingeweckt	11	gebraten/frittiert
5	konserviert	12	gegrillt/getoastet
6	aufgetaut	13	gebacken/gebraten (Ofen)
7	erwärmt	14	gegart

Bezeichnen Sie alle Lebensmittel möglichst genau: Beispiele



Milch:

Notieren Sie bitte, welche Milchart Sie verzehrt bzw. verwendet haben: H-Milch, pasteurisierte Milch, Vorzugs-, Rohmilch, Sterilmilch mit ihrem entsprechendem Fettgehalt, z.B. frische Vollmilch 3,5% Fett

Milch im Kaffee:

Verwenden Sie nur kleine Mengen Milch im Kaffee, so drücken Sie die Menge in Esslöffel aus. Geben Sie auch den Fettgehalt der Kondensmilch an.

z.B. 1 kleine Tasse Kaffee mit 1 EL Kondensmilch (4,0 % Fett)



Joghurt:

Wenn Sie einen Becher Joghurt essen, achten Sie bitte darauf, wieviel Gramm dieser Becher enthält (125g, 150g, 175g, 200g). Notieren Sie auch den Fettgehalt und den Namen des Produktes. Verzehren Sie den Joghurt nicht vollständig, so rechnen Sie bitte den verzehrten Inhalt in Esslöffel (EL) um. So entspricht z. B. ein Becher Joghurt von 150g $7\frac{1}{2}$ EL (1 Esslöffel = 20g).

z.B. 125g Fruchtjoghurt (3,5%), 3 EL geh. Joghurt Natur (3,5%) oder $\frac{1}{2}$ 500ml Becher Trinkfruchtjoghurt



Schlagsahne:

Durch das Schlagen der Sahne verdoppelt sich das Volumen der Sahne, d.h. 1 EL geschlagene Sahne entspricht $\frac{1}{2}$ gestrichenen EL flüssiger Sahne.

z. B. 1 kleines Stück Apfelhefekuchen mit 2 EL geschlagener Sahne (30% Fett)



Käse:

Alle Käsesorten, auch Frischkäse, werden in verschiedenen Fettstufen angeboten. Achten Sie bitte auf die Kennzeichnung der Ware auf der Verpackung bzw. an der Käsetheke.

z.B. Gouda 45% Fett i. Tr. oder Frischkäse 17 % Fett absolut



Brot und Backwaren:

Geben Sie genau an, welche Brot- oder Brötchensorte Sie verzehrt haben, z.B. Mischbrot, Weizen- oder Vollkorntoast, Weizenbrötchen, Vollkornbrot, Knäckebrot, Pumpernickel



Getreide-Produkte:

Nudeln (gekocht), Reis parboiled (gedünstet)



Kuchen:

Hefestreuselkuchen mit Obst, Mürbteigplätzchen, Obsttorte mit Biskuitboden, Rührkuchen, Buttercremetorte



Fette und Öle:

Geben Sie bitte die Art, z.B. Olivenöl, Margarine (halbfett), Butter und die Menge [in Teelöffel (TL), Esslöffel (EL)] des verwendeten Fettes/Öls an.



Fleisch- und Wurstwaren:

Rindfleisch mager (geschmort), Schweineschnitzel halbfett paniert (gebraten), Schinken (gekocht oder geräuchert). Charakterisieren Sie gegebenenfalls die Lebensmittel mit: fett, mager und fettreduziert näher.



Obst und Gemüse:

Apfel mit Schale und Gehäuse (groß), Banane ohne Schale (mittel), Mohrrübe roh (klein), Erbsen (Feinfrost) gedünstet, ½ Konserve (325 g) Pfirsiche



Soßen und Suppen:

Bratensoße gebunden, Holländische Soße, Essig- Öl-Salatsoße, Joghurdressing, Klare Suppe, Eintopf, Cremesuppe, Soljanka



Getränke:

Orangensaft, Orangennektar, Orangenfruchtsaftgetränk, Apfelsaftschorle (1:1), Bier (Pils), Hefeweizen, Rotwein (trocken), Pflaumenschnaps 40% Alk., Rum



MUSTERPROTOKOLL			
Datum:		Wochentag:	
Lebensmittel / Zutaten	verzehrte Menge	Zustand	Bemerkungen
1. Frühstück			
Vollkornbrötchen	1 Stück		mittlere Größe
Roggenmischbrot	1 Scheibe		dünn
Butter	2 TL		geh.
Gouda (45% Fett i. Tr.)	2 Scheiben		mittlere Größe
Erdbeermarmelade	2 TL		geh.
Schinken (geräuchert, mit Fettrand)	1 Scheibe		dünn
Kaffee	1 Tasse		kleine Tasse
Kondensmilch für den Kaffee (7,5% Fett)	1 TL		
Orangensaft (100%)	1 Glas		großes Glas
2. Frühstück			
Apfel (geschält)	1	1	mittlere Größe
Mittag			
Rezept „Gulasch mit Gemüse“ davon gegessen:			
Gulasch	1 Tasse	14	mittlere Tasse
Nudeln	150g	8	gekocht gewogen
Apfelsaft (100%)	1 Glas		mittleres Glas
Mineralwasser (Evian)	1 Glas		kleines Glas
Pflaumenkompott	1 Tasse	4	mittlere Tasse
Nachmittagsimbiss			
Kaffee (schwarz)	2 Tassen		kleine Tassen
Apfelkuchen (Hefeteig mit Streussel)	1 Stück		klein
Schlagsahne 30% Fett geschlagen	1 EL		geh.

Information zur endothelabhängigen flussinduzierten Vasodilatation

HINWEISE ZUR GEFÄßFUNKTIONSMESSUNG

1. Allgemeines

Die großen Blutgefäße des menschlichen Körpers sind in der Lage, sich als Antwort auf bestimmte Reize zusammenzuziehen (kontrahieren) oder zu erweitern (erschaffen). Auf diese Art und Weise regulieren Sie den Blutfluss durch den Körper und passen ihn den jeweils herrschenden Bedingungen an. Eine Schädigung der Gefäßschicht kann dazu führen, dass das Gefäß auf einen Reiz nur noch eingeschränkt mit Kontraktion und Erweiterung reagieren. Diese verminderte Reaktionsfähigkeit äußert sich in einer gestörten Regulation des Blutflusses (Durchblutungsstörungen) und gilt als charakteristisches Merkmal verkalkter Gefäßwände.

Die Gefäßfunktionsmessung (FMD, englisch: flow-mediated Dilatation) mittels Ultraschall ist als nicht-invasive Methode (d.h. ohne Eingriff in den Körper) hervorragend geeignet, um den Durchmesser von Blutgefäßen im Ruhezustand und nach einem Reiz zu bestimmen. Aus diesen Daten lassen sich Rückschlüsse auf die Reaktionsfähigkeit des Gefäßes ziehen und Aussagen zum Grad der Gefäßschädigung treffen.

2. Voraussetzungen für die Messungen

Die Gefäßweite und damit auch das Ergebnis der Messung kann durch eine Vielzahl äußerer Faktoren beeinflusst werden. Um störende Einflüsse möglichst gering zu halten und Fehler zu minimieren, möchten wir Sie bitten, am Vorabend der Messung keinen sportlichen Aktivitäten nachzugehen und eine Medikamenteneinnahme, wenn möglich, mindestens 12 Stunden vor der Messung auszusetzen. Da bestimmte Nahrungsinhaltsstoffe ebenfalls eine Kontraktion oder Erschlaffung der Gefäße hervorrufen können, sollten Gefäßfunktionsmessungen idealerweise vormittags am nüchternen Patienten erfolgen. Aus organisatorischen Gründen ist dies leider bei uns nicht möglich, so dass jeder Proband von uns am Tage der Messung eine fettarme, Vitamin C- und E-reduzierte Mahlzeit erhält. Bitte beachten Sie, dass diese mindestens 3 Stunden vor der Messung verzehrt werden muss.

☞ Beachten sie bitte, dass Sie am Tag der Untersuchung weder coffeinhaltige (Cola, Kaffee, schwarzer und grüner Tee, Mate, Guaranatee, Kakao, Fitnessdrinks mit aufputschender Wirkung) noch Vitamin-C-reiche bzw. -angereicherte Getränke (Orangensaft, ACE-Drinks etc). zu sich nehmen dürfen.

3. Tagesablauf

Die Gefäßfunktionsmessung ist auf einen Tag der Blutabnahme gelegt und in Ihrer persönlichen Probandenmappe gesondert gekennzeichnet. Sie werden frühmorgens zur Blutabnahme einbestellt. Bitte vergessen sie nicht, an diesem Tag Ihren 24-Stunden-Urin mitzubringen. Wir werden ausserdem Ihren Blutdruck, Ihr Körpergewicht und den Taille-Hüfte-Umfang bestimmen. Danach erhalten Sie von uns eine Nährstoff-standardisierte Mahlzeit, die Sie möglichst im Studienzentrum einnehmen. Am frühen Nachmittag werden wir Sie zur Klinik Havelhöhe⁷ nach Berlin-Kladow fahren, wo die Gefäßfunktionsmessungen stattfinden. Die Untersuchung wird etwa 1,5 bis 2 Stunden in Anspruch nehmen. Nach Abschluß der Messungen haben Sie die Möglichkeit, in der Kantine des Klinikums kostenfrei zu speisen, bevor Sie wieder zum Ernährungsinstitut zurückgebracht werden.

Da Sie an den Tagen der Gefäßfunktionsmessungen (fast) ganztägig im Studienzentrum sein werden, kann Ihnen vom Klinikum bei Bedarf eine Bescheinigung über eine ärztliche Untersuchung zur Einreichung beim Arbeitgeber ausgestellt werden. Wir stellen Ihnen frei, wie Sie die Zwischenzeit bis zur kardiologischen Untersuchung am Nachmittag nutzen. Für alle diejenigen, die bis zur Abfahrt nach Berlin im Studienzentrum bleiben wollen, wird im Patientenaufenthaltsraum der Villa Liegnitz ein Fernseher mit Videogerät und einer Auswahl an Videofilmen zur Verfügung stehen.

*Sollten Sie Fragen zu der Untersuchung oder zum Tagesablauf haben,
so wenden Sie sich bitte an*

*Frau Manja Reimann
☎ 033200 / 88-682*

⁷ Gemeinschaftskrankenhaus Havelhöhe, Medizinische Klinik Station 5, Kladower Damm 221, 14089 Berlin

Standardisierung der FMD-Messung: technisches Protokoll

Voraussetzungen: standardisierte Mahlzeit
 3 h vor Messung nichts mehr essen
 keine anstrengende körperliche Aktivität 24 h vorher
 Pausieren der Medikamenteneinnahme für 12 h
 Pausieren langwirkender vasoaktiver Medikamente für 24 h
 Nikotinverzicht für 24 h

Durchführung:

1.	ca. 15 min ruhen in liegender Position bequeme Lage des Probanden Anbringen der Blutdruckmanschette am linken Arm 3 konsekutive Blutdruckmessungen
2.	Fixierung des rechten Armes in supinaler Stellung Anbringung der 5 cm Manschette distal am rechten Unterarm ➔Achtung die Manschette darf nicht zwischen Unterarm und Armhalterung liegen, da sonst beim Aufpumpen die Armposition verändert wird
3.	Fixierung der Sonde 5 cm oberhalb der Ellenbeuge (Zuhilfenahme des Farbdopplers) die Sonde soll nur leicht und ohne Druck auf dem Arm aufliegen
4.	Einstellen eines hohen Kontrastes (unterschiedliche Kontraste und Intensitäten führen zu unterschiedlichen Messwerten!!)
☞	Probandin darf während der Messung ihre <i>Position nicht verändern, nicht Sprechen und Lachen</i> , selbst das <i>Kopfanheben</i> führt zu Veränderungen des Bildes
5.	<u>Baseline-Erhebung:</u> A) Erste Aufnahme der A. brachialis B) der Flussgeschwindigkeit des Blutes
6.	Blutdruckmanschette am rechten Arm mit 200 mmHg aufpumpen Okklusion für 4,5 Min. konstant halten währenddessen Positionierung des Cursor für die Flussmessung Druck nach 5 Min schnell ablassen
7.	<u>Zweite Erhebung – nach Okklusion</u> A) Messung der Flussgeschwindigkeit innerhalb von 10-15 s B) Zweite Aufnahme der A. brachialis innerhalb 1 Min nach Deflation
8.	10 Minuten ruhen in liegender Position
9.	<u>Dritte Erhebung – nach 10 Min. Ruhephase (Baseline 2)</u> A) Dritte Aufnahme der A. brachialis B) Messung der Flussgeschwindigkeit des Blutes
10.	400 µg GTN-Administration sublingual 4 Min warten
11.	<u>Vierte Erhebung – nach GTN-Gabe</u> A) vierte Aufnahme der A. brachialis B) Messung der Flussgeschwindigkeit des Blutes
12.	3 konsekutive Blutdruckmessungen

Bildbearbeitung: Enddiastolisch
 0.5 – 1cm langer Abschnitt
 Intima-Intima

Standardisierung der FMD-Messung: Protokollführung

Flow mediated dilation			
Number of measurement			
date			
parameter	unit	data	time
<i>15 min rest</i> <i>blood pressure measurement</i> <i>at rest</i>	mmHg	1.	Start at am
		2.	
		3.	
		mean	
		MAP	
baseline diameter [<i>base-fmd</i>]	mm		
Inflation at 200 mmHg <i>for 4,5 min</i>			Start at am
flow-induced diameter [<i>post-fmd</i>] <i>1 min after occlusion</i>	mm		
flow-mediated dilation	%		
<i>10 min rest</i>			Start at am
baseline diameter at rest [<i>base-gtn</i>]	mm		
<i>400 µg GTN sublingual</i>			Start at am
GTN-induced diameter [<i>post-gtn</i>] after 4 min GTN	mm		
GTN-induced dilation	%		
<i>blood pressure measurement</i> <i>after GTN</i>	mmHg	1.	Start at am
		2.	
		3.	
		mean	
		MAP	
Arterial flow measurement			
baseline flow velocity	cm/s		
flow velocity after cuff deflation = Peak hyperaemic velocity <i>10-15 s after occlusion</i>	cm/s		
hyperaemia	%		
flow velocity at rest	cm/s		
GTN-induced flow velocity	cm/s		
GTN-induced flow velocity	%		

mean arterial pressure(MAP) = $(\Delta_{\text{sys-dias}}/3)+BD_{\text{dias}}$

Datenspeicherung:	„Vorname“	_ _ - _ _ - _	[Probandennummer-Initialien-Erhebung]
	„Zuname“	base-fmd ...	[post-fmd, base-gtn, post-gtn]

Briefe an Probanden

Screening

Frau

<Vorname> <Name>

Strasse

PLZ, ORT

Bergholz-Rehbrücke, den 24.03.2003

Sehr geehrte Frau Name,

ich würde mich freuen, wenn ich Sie im Rahmen unseres Isoheart-Projektes am

<Tag>, den <Datum> um <Uhrzeit> Uhr

zu Ihrem Screening-Termin begrüßen könnte. Die an diesem Tag stattfindenden Untersuchungen umfassen

- eine nüchtern-Blutabnahme (☞ Bitte ab 21 Uhr des Vortages *nichts* mehr *essen* und *trinken* mit Ausnahme von Mineralwasser.)
- die Abgabe einer Urinprobe
- die Bestimmung des Körpergewichtes, der Körpergröße und des Taille-Hüfte-Verhältnisses
- sowie Blutdruckmessungen

und finden im **Haus V** (*Arthur-Scheunert-Allee 155, Eingang Forschungsklinik, Villa Liegnitz*) des Deutschen Instituts für Ernährungsforschung statt. Wie Sie dem beigefügten Lageplan entnehmen können, ist dieses Institutsgebäude ca. 600 m von dem Hauptgebäude Haus E (Arthur-Scheunert-Allee 114 – 116) entfernt.

Ich bitte Sie, zu diesem Termin die von Ihnen ausgefüllte und unterschriebene Einverständniserklärung mitzubringen, ohne die wir keine Untersuchungen an Ihnen vornehmen dürfen.

Sollten sich Probleme mit der Einhaltung des oben genannten Termins ergeben, ersuche ich Sie, zwecks Vereinbarung eines neuen Termins rechtzeitig bei mir anzurufen (☎ 033200 / 88-682). Dies ist sehr wichtig, um einen angenehmen Studienablauf für Sie und auch für uns gewährleisten zu können.

Mit freundlichen Grüßen

Dipl. Ern. wiss. Manja Reimann

Warteliste

Frau

«Vorname» «Zuname»

«Strasse»

«PLZ» «Ort»

Bergholz-Rehbrücke, den 24.03.2003

Betr.: Ergebnisse der Screeninguntersuchung

Sehr geehrte Frau «Zuname»,

wir möchten uns recht herzlich für Ihre Teilnahme an der Screeninguntersuchung bedanken. Die Messwerte finden Sie dem Schreiben beigelegt.

Eine entgeltliche Entscheidung über eine Teilnahme an der Studie kann erst gefällt werden, wenn die Screeningergebnisse aller Interessentinnen vorliegen. Da die Screeninguntersuchungen noch nicht vollständig abgeschlossen sind, bitten wir Sie um ein wenig Geduld. Sobald das Auswahlverfahren beendet ist, werden Sie von uns benachrichtigt.

Mit freundlichen Grüßen

Dipl. Ern. wiss. Manja Reimann

Ausschluss der Studienteilnahme

Frau

«Vorname» «Zuname»

«Strasse»

«PLZ» «Ort»

Bergholz-Rehbrücke, den 17.04.2003

Sehr geehrte Frau «Zuname»,

wir haben uns sehr über Ihre Bereitschaft gefreut, an unserem Isoheart-Projekt teilzunehmen. Die Auswertung aller Vorinformation, die wir von Ihnen erhalten haben, ergab allerdings, dass Sie nicht in das vorher festgelegte Auswahlprofil passen. In Ihrem Falle betrifft das folgende(n) Punkt(e):

- Anwendung einer Hormonersatztherapie oder Beendigung der Einnahme weniger als 6 Monate vor Studienbeginn
- letzte Menstruation liegt weniger als 1 Jahr zurück
- gesundheitliche Gründe
- bestimmte Blut- bzw. Urinparameter liegen nicht im Referenzbereich
- Allergie gegen PABA
- Einnahme bestimmter Medikamente
- Körpergewicht und -größe nicht im geforderten Verhältnis
- vegetarische Ernährung o.a. spezielle Kostformen
- obligatorische Einnahme von Supplementen
- Rauchen
- überdurchschnittlich hohe körperliche Aktivität
- Impfung oder Urlaubsreise während der Interventionsphasen
- Blutdruck außerhalb des Referenzbereichs
-

Wir möchten uns dennoch herzlich für Ihr Interesse bedanken und wünschen Ihnen für die Zukunft alles Gute.

Wie Sie wissen, sind wir verpflichtet, gemäß den Bestimmungen des Brandenburgischen Datenschutzgesetzes unsere Namens- und Adressdatei unmittelbar nach Erhebung aller Daten bzw. - wie in Ihrem Fall - nach Ausschluss der Teilnahme zu löschen.

Falls Sie interessiert sind, dass Ihr Name und Ihre Adresse in unserer Probandendatei für eventuelle neue Studien verbleiben soll, dann bitten wir Sie, den beiliegenden Vordruck auszufüllen und im frankierten Rückumschlag an uns zurückzusenden. Sollten wir Ihre Daten bereits in unsere Probandendatei aufgenommen haben, brauchen Sie uns natürlich nicht mehr zu informieren.

Mit freundlichen Grüßen

Dipl. Ern. wiss. Manja Reimann

Absage der Studienteilnahme/Warteliste

Frau
«Vorname» «Zuname»
«Strasse»

«PLZ» «Ort»

Bergholz-Rehbrücke, den 17.04.2003

Sehr geehrte Frau «Zuname»,

wir haben uns sehr über Ihre Bereitschaft gefreut, an unserem Isoheart-Projekt teilzunehmen.

Überraschenderweise übersteigt die Anzahl der geeigneten Interessentinnen diejenige der von uns benötigten Studienteilnehmerinnen. Aus allen potentiellen Kandidatinnen wurde deshalb per Zufallsprinzip eine Auswahl getroffen. Wir müssen Ihnen bedauerlicherweise mitteilen, dass Sie leider nicht zu den 38 zufällig ausgewählten Frauen unserer Studie gehören. Sollte jedoch vor Beginn der Studie eine der Teilnehmerinnen absagen, würden wir uns vorbehalten, auf Grund Ihrer Eignung wieder an Sie heranzutreten.

Wie Sie wissen, sind wir verpflichtet, gemäß den Bestimmungen des Brandenburgischen Datenschutzgesetzes unsere Namens- und Adressdatei unmittelbar nach Erhebung aller Daten bzw. - wie in Ihrem Fall - nach Ausschluss der Teilnahme zu löschen.

Falls Sie interessiert sind, dass Ihr Name und Ihre Adresse in unserer Probandendatei für eventuelle neue Studien verbleiben soll, dann bitten wir Sie, den beiliegenden Vordruck auszufüllen und im frankierten Rückumschlag an uns zurückzusenden. Sollten wir Ihre Daten bereits in unsere Probandendatei aufgenommen haben, brauchen Sie uns natürlich nicht mehr zu informieren.

Wir wünschen Ihnen und Ihrer Familie ein schönes Osterfest sowie sonnige und erholsame Feiertage.

Mit freundlichen Grüßen

Dipl. Ern. wiss. Manja Reimann

Bestätigung der Studienteilnahme

Frau

«Vorname» «Zuname»

«Strasse»

«PLZ» «Ort»

Bergholz-Rehbrücke, den 07.04.2003

Sehr geehrte Frau «Zuname»,

ich freue mich, Ihnen mitteilen zu können, dass Sie unser Auswahlverfahren, das sogenannte Screening, erfolgreich gemeistert haben. Auf diesem Wege möchte ich Sie als Teilnehmerin unserer Sojastudie Isoheart herzlich willkommen heißen. Unsere Studie wird sich über folgende Zeiträume erstrecken:

<u>Erste</u> Studienphase:	04.05.2003 bis 10.07.2003
Unterbrechung:	11.07.2003 bis 23.08.2003
<u>Zweite</u> Studienphase:	24.08.2003 bis 30.10.2003

In beiden Studienphasen finden an jeweils 3 Terminen morgens Blutabnahmen in unserem Hause statt. Wie ich Ihnen bereits am Tage der Screeninguntersuchung mitgeteilt habe, werden an *vier* dieser insgesamt sechs Blutentnahmetage immer am Nachmittag Messungen der Gefäßfunktion in der Klinik Havelhöhe, Berlin-Kladow erfolgen. Genauere Informationen zu diesen und weiteren Untersuchungen sowie zum geplanten Studienablauf möchte ich Ihnen im Rahmen einer ausführlichen Informationsveranstaltung am

«Infoveranstaltung», um 16.30 Uhr

geben. Ich würde mich freuen, wenn ich Sie an diesem Tag in unserem Hause begrüßen könnte. Die Veranstaltung findet im Fritz-Lipmann-Seminarraum des Hauses E (Hauptgebäude, von Potsdam kommend linkerhand gegenüber dem Standesamt, Bus 611 Haltestelle „Ernährungsinstitut“), Arthur-Scheunert-Allee 114-116 statt. Erkundigen Sie sich bitte beim Pfortner des Hauptgebäudes oder folgen Sie einfach unseren Hinweisschildern.

Unter Berücksichtigung Ihrer Angaben zur zeitlichen Verfügbarkeit habe ich Sie in die Gruppe

„«Gruppe»“

eingeteilt. Die Termine der in dieser Gruppe stattfindenden Untersuchungen entnehmen Sie bitte der beiliegenden Kurzübersicht.

Leider war es mir nicht immer möglich, jede Studienteilnehmerin in eine Gruppe entsprechend ihrer bevorzugten Wochentage einzuordnen. Bitte sehen Sie mir nach, wenn der ein oder andere Termin nicht ganz Ihren Vorstellungen und Wünschen entspricht. Benachrichtigen Sie mich bitte umgehend, wenn die Gruppenzuordnung für Sie so ungünstig sein sollte, dass Ihre Studienteilnahme gefährdet wäre. In diesem Falle würde ich versuchen, Sie in einer anderen Gruppe unterzubringen. Als Teilnehmerin unseres Projektes haben wir Ihnen folgende Probandennummer zugeteilt:

„«ProbNr_neu»“

Bitte ergänzen Sie diese in den vorgedruckten Feldern (*nach dem Schrägstrich*) auf Ihrem Probandenkärtchen. Tragen Sie in das vorderste Kästchen zusätzlich den Buchstaben Ihrer zugehörigen Gruppe ein.

Ich freue mich auf ein Wiedersehen bei der Informationsveranstaltung und wünsche Ihnen und Ihrer Familie ein schönes Osterfest sowie ein paar erholsame, vor allem aber sonnige Tage!

Mit freundlichen Grüßen

Dipl. Ern. wiss. Manja Reimann



Run-in-Phase: Information zur Medikamenteneinnahme (Blatt1-2)

Frau

«Vorname» «Zuname»

«Strasse»

«PLZ» «Ort»

Bergholz-Rehbrücke, 30.05.03

Liebe Studienteilnehmerinnen,

mit Freude kann ich Ihnen mitteilen, dass alle die erste Untersuchung mit Bravour gemeistert haben. Trotz der vielen Entbehrungen (...*der gute Kaffee am Morgen...das Frühstücksmüsli...*), die in Kauf genommen werden mussten, und die Beschwerden (Kopfschmerzen, Migräne etc.), mit denen der ein oder andere zu kämpfen hatte, haben sich alle tapfer geschlagen und ich bin froh, dass doch alles mehr oder minder reibungslos und ohne große Zwischenfälle abgelaufen ist ☺.

Ansonsten hoffe ich, dass sich jeder mit unseren Früchteriegeln so gut es geht arrangiert. Ich habe unterdessen schon von einigen Ihre Eindrücke von den Riegeln geschildert bekommen, von denen die Mehrzahl glücklicherweise recht positiver Natur waren.

Um unseren Studienkriterien Folge zu leisten, habe ich eine Liste verbotener Medikamente erstellt, um deren Einnahme während der gesamten Studiendauer vorzubeugen. Der Grund für die strikte Einhaltung dieses Verbots liegt in der mit einer Einnahme dieser Medikamente verbundenen Veränderung bestimmter von uns zu analysierender Blutparameter (z. B. Entzündungsfaktoren, Gerinnungsfaktoren etc.). Generell bitte ich Sie, vor Einnahme von zweifelhaften Medikamenten Rücksprache mit mir zu halten.

- Antibiotika jeder Art
 - Cholesterin senkende Medikamente
 - Blutdruck senkende Medikamente
 - Betablocker, ACE-Hemmer, Diuretika, Kalzium-Kanalblocker, Alphablocker
 - Schmerzmittel, Analgetika
 - Nicht-opioide Schmerzmittel, die nicht entzündungshemmend wirken
 - Paracetamol (z. B. *Benuron*), Metamizol (z.B. *Novalgin*), Phenazon
 - Nicht-opioide Schmerzmittel, die entzündungshemmend (antiphlogistisch) wirken = nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAR)
 - Acetylsalicylsäure (*Aspirin* z.B. in *ASS*), Ibuprofen (z.B. *Anco*, *Dolgit*, *Imbun*), Diclofenac (z.B. *Voltaren*), Indometacin (z.B. *Amuno*), Piroxicam (z.B. *Felden*), Rofecoxib (z.B. *Vioxx*), Celecoxib (z.B. *Celebrex*), Phenylbutazon (z.B. *Ambene*), Meloxicam (z.B. *Mobec*)
 - opioide Schmerzmittel
 - Tramadol (z.B. *Tramal*), Codein, Nalbuphin, Tilidin mit Naxolon (z.B. *Valoron N*), Morphin, Pethidin, Levomethadon, Piritamid (z.B. *Dipidolor*), Pentazocin
 - Corticosteroide (Cortison)
 - Prednisolon (z.B. *Decortin*, *Decortin H*), Methylprednisolon (z.B. *Urbason*), Fluocortolon (z.B. *Ultralan*), Cloprednol (z.B. *Synthestan*)
- Paracetamol kann bei Bedarf eingenommen werden!**
- Antirheumatika
 - Sulfasalazin (z.B. *Azulfidine*), Methotrexat (z.B. *Lantarel*), Leflunomid (z.B. *Arava*), Cyclophosphamid (z.B. *Endoxan*)
 - Blut verdünnende Medikamente
 - Marcoumar, Sintrom, Heparine, Acetylsalicylsäure

Wie Sie wissen, soll eine Vitamin- und Mineralstoffeinnahme während der Studie ebenfalls vermieden werden. Die Erfahrung hat jedoch gezeigt, dass die biochemische Begriffsbezeichnung der Vitamine in der Bevölkerung weitgehend unbekannt ist. Deshalb habe ich zusätzlich eine Auflistung aller Vitamine mit den entsprechenden Fachbegriffen erstellt, damit Sie im Zweifel nachlesen können.

Vitaminpräparate können enthalten:

Vitamin A= Retinol , Beta-Carotin, Vitamin B1=Thiamin, Vitamin B2=Riboflavin, Vitamin B6=Pyridoxin, Vitamin B12=Cobalamin, Vitamin C=Ascorbinsäure, Vitamin D=Calciferole (Cholecalciferol, Ergocalciferol), Vitamin E=Tocopherol, Vitamin K=Phyllochinon, Biotin, Folsäure (Folat), Niacin, Pantothensäure (umgangssprachlich auch Provitamin B5)

Vitamine sind manchmal auch in nennenswerten Mengen in verschiedenen Medikamenten z.B. ASS mit Vitamin C oder Nahrungsergänzungsmitteln z. B. Lecithin, Kieselerdekapseln enthalten. In Algenpräparaten finden sich übrigens äusserst hohe Mengen an Iod. Bitte lesen Sie sich vor deren Einnahme immer den Beipackzettel bzw. die Tabelle mit den Inhaltsstoffen durch.

In Mineralstoffpräparaten können enthalten sein:

Calcium=Ca, Cobalt=Co, Chrom=Cr, Eisen=Fe, Iod=I, Kalium=K, Kupfer=Cu, Magnesium=Mg, Mangan=Mn, Molybdän=Mo, Natrium=Na, Phosphat=P, Selen=Se (Selenhefetabletten!, Bierhefeflocken etc.), Zink=Zn

Falls Sie Fragen dazu haben, dann rufen Sie mich bitte an.

Ich möchte Sie nochmals daran erinnern, dass beim nächsten Mal nur Blutabnahmen vorgenommen werden. Wir werden Ihnen zu diesem Zeitpunkt das Ernährungsprotokoll, die Urinsammelbehälter, die PABA-Kapseln, sowie den Menopause-Bewertungsbogen für zweite Erhebung (Ende der ersten Intervention) aushändigen.

Bis zum nächsten Wiedersehen in Bergholz-Rehbrücke wünscht Ihnen alles Gute

Dipl. Ern. wiss. Manja Reimann

Run-in-Phase: Terminvergabe

Frau
«Vorname» «Zuname»
«Strasse»

«PLZ» «Ort»

Rehrücke, den 01.05.2003

Liebe Frau «Zuname»,

über ein Wiedersehen mit Ihnen bei unserer Informationsveranstaltung habe ich mich sehr gefreut. Ich hoffe, dass ich Ihnen die wichtigsten Informationen in der Kürze der Zeit einigermaßen verständlich dargelegt habe. Sollten Sie beim Durchlesen Ihres Studientagebuches etwas nicht ganz verstehen oder Fragen zu der ein oder anderen Untersuchung haben, dann können Sie mich (*Büro –033200/88-682, während der Blutabnahmewochen auch -794 oder Mobil 0160-7365384, in Notfällen auch privat 0331-5506908*) oder meine Kollegin Anja Carlsohn (*Büro – 683, während der Blutabnahmewochen auch -779*) selbstverständlich jederzeit anrufen.

In der folgenden Tabelle habe ich Ihnen nochmals die während der Informationsveranstaltung vereinbarten Termine für die Blutentnahmen und kardiologischen Untersuchungen aufgelistet. Vergleichen Sie bitte, ob diese mit denen in Ihren Unterlagen übereinstimmen. Sollten Sie Abweichungen feststellen, dann melden Sie sich bitte telefonisch bei mir, damit wir dies abklären können.

Datum	morgens Blutabnahme	nachmittags kardiologische Untersuchung in Kladow ¹
«Visite1»	«Blutabnahme1» Uhr	Treffpunkt «Uhrzeit_FMD» Uhr beim Pfortner (DifE- Haupteingang)
«Visite_2»	«Blutabnahme2» Uhr	-----
«Visite_3»	«Blutabnahme1» Uhr	Treffpunkt «Uhrzeit_FMD» Uhr beim Pfortner (DifE- Haupteingang)
«Visite_4»	«Blutabnahme1» Uhr	Treffpunkt «Uhrzeit_FMD» Uhr beim Pfortner (DifE- Haupteingang)
«Visite_5»	«Blutabnahme2» Uhr	-----
«Visite_6»	«Blutabnahme1» Uhr	Treffpunkt «Uhrzeit_FMD» Uhr beim Pfortner (DifE- Haupteingang)

¹Es genügt, wenn diejenigen, die mit dem eigenen PKW nach Kladow fahren, erst um 15.00 Uhr erscheinen.

➔ *Terminänderungen vereinbart?: «Terminänd»*

Um Wartezeiten während der kardiologischen Untersuchung zu überbrücken, empfehle ich Ihnen, sich ein Buch oder eine Zeitung zum Lesen mitzunehmen. Zur Information erhalten Sie eine Gesamtterminübersicht aller Gruppen.

Ich freue mich auf eine angenehme Zusammenarbeit mit Ihnen und hoffe, dass nicht nur wir sondern auch Sie ein wenig Spaß an dieser Studie haben werden.

Alles Gute und viel Erfolg wünscht Ihnen

Dipl. Ern. wiss. Manja Reimann



Die Sojabohne „Glycine max“

Erste Intervention: Abschluss

Frau

«Vorname» «Zuname»

«Strasse»

«PLZ» «Ort»

Bergholz-Rehbrücke, 11.06.03

Liebe Studienteilnehmerinnen,

das Ende des ersten Studienzeitraumes nähert sich mit großen Schritten. Bitte bringen Sie zum nächsten Blutabnahmetermin die leeren Tragetaschen für die Lebensmittel mit, damit wir diese für den zweiten Studienzeitraum neu befüllen können. Die Riegel für die zweite Interventionsphase werden wir Ihnen am Tage der 4. Blutabnahme nach der großen Sommerpause aushändigen. Wer seine Riegel lieber schon vorher abholen möchte, kann das im Zeitraum vom 18.08.03 bis 29.08.03 von 8.00-16.30 Uhr gerne tun. Prinzipiell ist dies bereits in der Woche zuvor möglich. Da ich mich zu der Zeit aber im Urlaub befinde, wäre es schön, wenn Sie Ihr Kommen kurz telefonisch bei Frau Carlsohn (033200/88-683) anmelden würden.

Desweiteren möchte ich Sie bitten, sich bei der Zubereitung der fettarmen Abendmahlzeit am *Tag vor jeder Blutabnahme* möglichst an unsere Rezeptvorschläge zu halten. Alle Rezepte sind so berechnet, dass ein maximaler Fettgehalt von 15g/Mahlzeit nicht überschritten wird. Diese sogenannte Standardisierung der Fettzufuhr ist für die spätere Datenauswertung äußerst wichtig, da darüber eine Vergleichbarkeit der Blutwerte gewährleistet wird.

Am Tage der kardiologischen Untersuchung erhalten Sie von uns wie üblich das Fett-, Vitamin E- und Vitamin C-standardisierte Proviantpaket (Fettgehalt max. 10g). Auf Grund der sehr beschränkten Fettzufuhr an diesem Tag dürfen Sie die letzten zwei Riegel der ersten Interventionsphase erst nach dem Abschluß der kardiologischen Messungen (am späten Nachmittag und am Abend) verzehren. Ich bedanke mich für Ihr Verständnis.

Ferner möchte ich die Gelegenheit nutzen, Ihnen mitzuteilen, dass Frau Carlsohn und ich in der Zeit vom 25.07.03 bis 10.08.03 urlaubsbedingt nicht erreichbar sind. Bitte wenden Sie sich in dringenden Fällen an Frau Dr. Koenig (Tel. 033200/88-663).

Alles Gute und ein paar schöne sonnige Tage bis zum nächsten Wiedersehen wünscht Ihnen

Dipl. Ern. wiss. Manja Reimann

Zweite Intervention: Abschluss

Frau
«Vorname» «Zuname»
«Strasse»

«PLZ» «Ort»



Bergholz-Rehbrücke, den 10.10.03

Liebe Studienteilnehmerinnen,

nun haben Sie es bald geschafft, das Ende der Isoheart-Studie rückt in Windeseile näher. Ich meine förmlich Ihre Erleichterung zu spüren. Trotz allem hoffe ich, dass Ihre Lebensqualität während des vergangenen halben Jahres nicht zu sehr gelitten hat und Sie ein wenig Spass am Mitwirken bei unserer Studie hatten. Mich persönlich würde interessieren, in wie weit Sie mit dem Studienablauf und der Organisation zufrieden waren. Über eine kleine „Kritik“ in schriftlicher Form wäre ich erfreut, sollte von Ihnen aber nicht als obligatorisch angesehen werden.

Gleichzeitig möchte ich die Gelegenheit nutzen im Namen unseres gesamten Teams Ihnen unseren Dank für Ihre Teilnahme an der Studie, Ihr großes Engagement und Durchhaltevermögen auszusprechen.

Sicherlich haben Sie sich schon gefragt, wie es jetzt weitergeht und welchen Vorteil sie aus der Studie ziehen. Für Frühjahr des folgenden Jahres haben Dr. Fried vom Gemeinschaftskrankenhaus Havelhöhe und ich eine Veranstaltung geplant, in der wir Sie über den aktuellen Zustand Ihrer Blutgefäße und über Sinn und Zweck der durchgeführten kardiologischen Messungen informieren wollen. Sobald die Auswertungen der Ultraschallbilder erfolgt sind, werden wir Ihnen den Termin für dieses Treffen bekannt geben.

Ihre gesammelten Blut- und Urinproben werden wir im November diesen Jahres zur Analyse der verschiedensten Parameter (unter anderem Blutfettwerte [Cholesterine, Triglyzeride], Faktoren der Blutgerinnung, Entzündungsparameter, Stresshormone [z.B. Adrenalin, Noradrenalin, Cortisol], Faktoren die Aufschluß über den Zustand der Blutgefäße geben, Stoffwechselprodukte der aufgenommenen Isoflavone und viele andere mehr) an unsere Projektpartner versenden. Da es sich insgesamt um mehrere tausend Proben aus allen vier teilnehmenden Ländern handelt, werden erste Ergebnisse nicht vor Herbst des kommenden Jahres erwartet. Die Daten unterliegen dem Datenschutz und werden nur unter Einhaltung größter Diskretion ausgewertet. Daher ist es für mich im Moment noch nicht absehbar, in wie weit ich Sie über die Studienergebnisse unterrichten darf. Ich hoffe jedoch, Ihnen zumindest Informationen über Ihre persönlichen Werte übermitteln zu dürfen.

Zum Schluß möchte ich Sie bitten, zur letzten Blutabnahme alle Studienmaterialien (Messbecher, Tragetaschen, die letzten Seiten des Studentagebuches, Urinsammelbehälter, Ernährungsprotokoll, übrig gebliebene Riegel, sofern noch bei Ihnen vorhanden, wieder mitzubringen. Bis dahin wünsche ich Ihnen alles Gute.

Liebe Grüße

Dipl. Ern. wiss. Manja Reimann

Auswertung der Kontrolluntersuchung

Frau

«Vorname» «Zuname»

«Strasse»

«PLZ» «Ort»

Bergholz-Rehbrücke, 18. November 2003

Sehr geehrte Frau «Zuname»,

hiermit übersende ich Ihnen Ihre Blutwerte der letzten Blutabnahme, die wir zur Kontrolle Ihres Gesundheitszustandes nochmals überprüft haben.

Ich hoffe, dass es Ihnen soweit gut geht und Sie noch keine Entzugserscheinungen von unseren Riegeln haben.

Ich möchte Ihnen bereits jetzt schon einen schönen ersten Advent wünschen. Genießen Sie die kommende Weihnachtszeit. Bis zum neuen Jahr wünscht Ihnen alles Gute

Dipl. Ern. Wiss. Manja Reimann

Auswertung der 3-Tages-Schätzprotokolle

Frau

«Vorname» «Zuname»

«Strasse»

«PLZ» «Ort»

Bergholz-Rehbrücke, 20.01.04

Liebe Teilnehmerinnen der Isoheart-Studie,

Ich freue mich, Ihnen die ersten Ergebnisse von Ihren Ernährungsprotokollen übersenden zu können. Anbei finden Sie ein Informationsblatt, das Ihnen Auskunft über wichtige Nährstoff-, Vitamin- und Mineralstofflieferanten gibt.

Wie sich herausgestellt hat, ist die Auswertung der kardiologischen Untersuchungen sehr aufwendig und wird daher noch einige Zeit in Anspruch nehmen. Da ich in Kürze einen 7-monatigen Auslandsaufenthalt antreten werde, muss ich leider die für dieses Frühjahr geplante Informationsveranstaltung auf Ende des Jahres verschieben. Bitte haben Sie Verständnis, dass ich Ihnen Ihre Gefäßdaten nicht früher übermitteln kann.

Laut der Aussage unserer Projektpartner sollen die Blutanalysen bis September 2004 abgeschlossen sein. Das bedeutet, dass Sie zum Ende des Jahres auch mit Ihren persönlichen Blutwerten rechnen können.

Im Rahmen eines kürzlich ins Leben gerufenen Europäischen Großprojektes PHYTOHEALTH, soll die Rolle pflanzlicher Inhaltsstoffe insbesondere von Phytoöstrogenen (pflanzlichen Hormonen) auf die menschliche Gesundheit untersucht werden. Dazu werden die neuesten Ergebnisse aus verschiedensten Europäischen Studien (auch ISOHEART!) zusammengetragen und ausgewertet. Die Abteilung Interventionsstudien des Deutschen Institutes für Ernährungsforschung hat innerhalb dieses Gemeinschaftsprojektes die Aufgabe übernommen, die durchschnittliche Phytoöstrogenaufnahme in Deutschland bei verschiedenen Personengruppen (unterschieden nach Alter, Geschlecht, Ernährungsformen speziell Nichtvegetarier vs. Vegetarier, Rohköstler etc.) zu bestimmen.

Zu diesem Zweck versenden wir an alle ehemaligen Probanden unserer Abteilung ein vereinfachtes, standardisiertes Ernährungserhebungsinstrument, aus dem wir die tägliche Phytoöstrogenaufnahme schnell und einfach berechnen können. Ich würde mich sehr freuen, wenn Sie Ihre Ernährung noch einmal unter Verwendung dieses vereinfachten (beiliegenden) 4-Tage-Ernährungsprotokolls dokumentieren würden. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, ist es wichtig, dass Sie das Protokoll an den Wochentagen Sonntag bis Mittwoch führen. Eine ausführliche Anleitung zum Ausfüllen finden Sie auf den ersten Seiten des Ernährungsprotokolls. Bitte zögern Sie nicht mich anzurufen, wenn Fragen auftreten sollten. Ich würde mich freuen, wenn Sie das ausgefüllte Ernährungsprotokoll möglichst innerhalb der nächsten 4 Wochen in beiliegendem frankierten Rückumschlag zurücksenden könnten.

Für Ihre Mitarbeit möchte ich mich recht herzlich bedanken.

Ich wünsche Ihnen alles Gute, Gesundheit und Zufriedenheit im neuen Jahr und verbleibe mit lieben Grüßen bis zum Wiedersehen.

Dipl. Ern. Wiss. Manja Reimann

Terminvergabe für die Abschlussbesprechung

Frau

<Vorname> <Zuname>

<Strasse>

<PLZ> <Ort>

Bergholz-Rehbrücke, den 26.10.04

Liebe Studienteilnehmerinnen,

zurückgekehrt von meiner achtmonatigen ‚Expedition‘ auf dem australischen Kontinent widme mich wieder ganz der Isoheart Studie. Ich kann Ihnen mit Freude mitteilen, dass nun fast alle Analysen vollzogen sind und die Ergebnisse zur Veröffentlichung bereitstehen. Um Ihnen einen kleinen Einblick letzterer zu vermitteln, möchte ich Sie ganz herzlich am

Dienstag, den 7. Dezember 2004 um 16 Uhr
hier im Deutschen Institut für Ernährungsforschung, Haus E (Haupthaus)

zu einer Abschlussbesprechung in gemütlicher Runde einladen.

Bitte informieren sich mich, ob Sie teilnehmen können (Frau Vulprecht Tel. 033200-88 669; Email: reimann@mail.dife.de). Anderenfalls würde ich Ihnen Ihre persönlichen Unterlagen per Post zusenden.

Ich hoffe auf zahlreiches Erscheinen und würde mich freuen, sie alle wieder begrüßen zu können.

Liebe Grüße

Dipl. Ern. wiss. Manja Reimann

Versand der Studienergebnisse

Frau
«Vorname» «Zuname»
«Strasse»

«PLZ» «Ort»

Bergholz-Rehbrücke, den 08.12.04

Liebe Frau «Zuname»,

gestern fand die Abschlussbesprechung zur Isoheart-Studie statt. Da Sie leider nicht teilnehmen konnten, sende ich Ihnen - wie vereinbart - Ihre persönlichen Ergebnisse zu. Sollten Sie Fragen dazu haben, können Sie mich jederzeit unter meiner üblichen Telefonnummer (s.o.) anrufen.

Ich möchte mich noch einmal recht herzlich für Ihre Studienteilnahme bedanken. Ihnen ein schönes Weihnachtsfest und ein gesundes neues Jahr.

Liebe Grüße

Dipl. Ern. wiss. Manja Reimann

Probandenauswertungsblätter

Screening: Auswertung Blatt 1

Proband Nr. «Prob_Nr»

Gemessene Blutparameter	Wert	Maßeinheit	Normbereich Frauen
ASAT	«ASAT_UI»	U/l	≤31
ALAT (γ-GT)	«ALAT_UI»	U/l	≤31
GGT	«GGT_UL»	U/l	9 - 37
Kreatinin	«Creatinin_moll»	μmol/l	53,0 - 100
Triglyceride	«TAG_in_mmoll»	mmol/l	0,46 – 1,60 Akzeptanzbereich Isoheart < 3,0
Gesamtcholesterin	«Gesamt_cholesterin_mmoll»	mmol/l	niedriges Risiko < 5,2 erhöhtes Risiko > 6,5 Akzeptanzbereich Isoheart < 8,0
HDL-Cholesterin	«HDL_in_mmoll»	mmol/l	günstig > 1,7
Nüchtern-Glukose	«Glucose_in_mmoll»	mmol/l	3,61 – 6,11 Akzeptanzbereich Isoheart < 6,5
Hämoglobin	«Hb_in_gdl»	g/dl	12 – 16 Akzeptanzbereich Isoheart > 11
Hämatokrit	«Hk_»	%	35 - 45
Leukozyten	«Leuko_Gptl»	Gpt/l	4,0 – 9,0
Thrombozyten	«Thrombo_Gptl»	Gpt/l	140 - 450

Gemessene Urinparameter	Wert
Leukozyten	«Leukos»
Nitrit	«Nitrit»
pH-Wert	«pH»
Protein	«Protein»
Glukose	«Glucose»
Ketone	«Ketone»
Urobilinogen	«Urobilinogen»
Bilirubin	«Bilirubin»
Blut	«Blut_EryHgb»
neg Negativ (Normwert), pos Positiv, n.... Normal (Normwert), 1....geringfügig erhöht, 2.... mäßig erhöht, 3.... stark erhöht	

Screening: Auswertung Blatt 2

Probandin Nr. «Prob_Nr»

Anthropometrie	Wert	Maßeinheit
Körpergröße	«Körpergröße_in_m»	m
Körpergewicht	«Körpergewicht_in_kg»	kg
Taillenumfang	«Taillenumfang_cm»	cm
Hüftumfang	«Hüftumfang_cm»	cm

Blutdruck	Wert	Maßeinheit	Referenzwerte laut WHO
Systole	«Systole_mmHg»	mm Hg	<i>optimaler Bereich: 120 / 80</i>
Diastole	«Diastole_mmHg»	mm Hg	<i>normal: 130 - 139 / 85 - 89</i>
			<i>grenzwertig: 140 - 149 / 90 - 94</i>
			<i>Schweregrad 1: 140 - 159 / 90 - 99</i>
			<i>Schweregrad 2: 160 - 179 / 100 - 109</i>
			<i>Schweregrad 3: 180 / 110 und höher</i>
			<i>Akzeptanzbereich Isoheart: ≤ 160 / 90</i>

Auswertung: Kontrolle der Blutparameter nach Beendigung jeder Interventionsphase

Datum der Blutabnahme: «datum_BA»

Proband Nr. «id»

Gemessene Blutparameter	Wert	Maßeinheit	Normbereich
ASAT	«asat2»	U/L	≤ 31
ALAT (γ-GT)	«alat2»	U/L	≤ 31
GGT	«ggt2»	U/L	9 - 37
Kreatinin	«crea2»	μmol/L	53 - 100
Harnstoff	«urea2»	mmol/L	2,5-7,5
Glukose	«gluc2»	mmol/L	3,61 - 6,11

Auswertung der 3-Tages-Schätzprotokolle

ID «ID»	Ernährungsprotokoll				Zufuhrempfehlung ¹ pro Tag ²
	1.	2.	3.	4.	
Energie [kcal]	«Energy0_kcal»	«Energy8_kcal»	«Energy16_kcal»	«Energy24_kcal»	1800-2300 kcal
Kohlenhydrate [%]	«KH0_»	«KH8_»	«KH16_»	«KH24_»	55-60 % ³
Eiweiß [%]	«EW0_»	«EW8_»	«EW16_»	«EW24_»	10-15 % ³
Fett [%]	«Fat_PCT0»	«Fat_PCT8»	«Fat_PCT16»	«Fat_PCT24»	<30 % ³
Gesättigte Fettsäuren (FS) [%]	«SFA_PCT0»	«SFA_PCT»	«SFA_PCT16»	«SFA_PCT24»	1/3 ⁴
Einfach ungesättigte FS [%]	«MUFA_PCT0»	«MUFA_PCT8»	«MUFA_PCT16»	«MUFA_PCT24»	1/3 ⁴
Mehrfach ungesättigte FS [%]	«PUFA_PCT0»	«PUFA_PCT8»	«PUFA_PCT16»	«PUFA_PCT24»	1/3 ⁴
Cholesterin [mg]	«Cho0_mg»	«Cho8_mg»	«Cho16_mg»	«Cho24_mg»	<300 mg
Ballaststoffe [g]	«BST0_g»	«BST8_g»	«BST16_g»	«BST24_g»	30 g
Wasser [g]	«Was0_g»	«Was8_g»	«Was16_g»	«Was24_g»	2250 g
Alkohol [g]	«Alk0_g»	«Alk8_g»	«Alk16_g»	«Alk24_g»	<10 g

ID «ID»	Ernährungsprotokoll				Zufuhrempfehlung ¹ pro Tag ²
	1.	2.	3.	4.	
Vitamine					
Vitamin A [µg]	«Ret_Ä0_g»	«Ret_Ä8_g»	«Ret_Ä16_g»	«Ret_Ä24_g»	800 µg
Vitamin E [mg]	«Toc_A0_mg»	«Toc_A8_mg»	«Toc_A16_mg»	«Toc_A24_mg»	12 mg
Vitamin D [µg]	«Vit_D_0_g»	«Vit_D_8_g»	«Vit_D_16_g»	«Vit_D_24_g»	5 µg > 65 Jahre 10 µg
Vitamin C [mg]	«Vit_C_0_mg»	«Vit_C_8_mg»	«Vit_C_16_mg»	«Vit_C_24_mg»	100 mg
Folsäure [µg]	«folate0_g»	«folate8_g»	«folate16_g»	«folate24_g»	400 µg
Vitamin B12 [µg]	«B12_0_g»	«B12_8_g»	«B12_16_g»	«B12_24_g»	3 µg
Mineralstoffe					
Kalzium [mg]	«Ca0_mg»	«Ca8_mg»	«Ca16_mg»	«Ca24_mg»	1000 mg
Magnesium [mg]	«Mg0_mg»	«Mg8_mg»	«Mg16_mg»	«Mg24_mg»	300 mg
Eisen [mg]	«Fe0_mg»	«Fe8_mg»	«Fe16_mg»	«Fe24_mg»	10 mg

¹ Deutsche Gesellschaft für Ernährung: Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr, Umschau-Verlag 2000

² Angaben gelten für Frauen ab 51 Jahren

³ bezogen auf die Gesamtenergiezufuhr

⁴ bezogen auf die Gesamtfettzufuhr

Definitionen ausgewählter Parameter für die Studienteilnehmer

Definitionen

BMI: Maß für das Körpergewicht in Bezug auf die Körpergröße. Ist ein besseres Maß für Übergewicht als das Körpergewicht allein.

Taille-Hüfte-Verhältnis: Ist das Verhältnis von Taillen- und Hüftumfang. Ist ein Maß für die Verteilung des Körperfettes. Das Risiko für Herz-Kreislauferkrankungen steigt mit einer höheren Fettverteilung im Taillenbereich (Apfelform).

SBP: systolischer Blutdruck – Blutdruck direkt *nach* dem Blutausschlag vom Herzen in die Aorta.

DBP: diastolischer Blutdruck – Blutdruck direkt *vor* dem nächsten Blutausschlag.

FMD: gibt die prozentuale Veränderung des Gefäßdurchmessers nach Erhöhung des Blutflusses an. Ist ein Maß für die Gefäßfunktion.

SAC: systemische arterielle Compliance – Maß für die Elastizität der Arterien.

HDL: gutes Cholesterin, welches von den Blutgefäßen zur Leber transportiert wird.

LDL: schlechtes Cholesterin, welches von der Leber zu den Blutgefäßen transportiert wird.

Triglyzeride: Blutfette – sind ein Maß für das Risiko von Herz-Kreislauferkrankungen.

Homocystein: Risikofaktor für Herz-Kreislauferkrankungen

Folsäure: ein Vitamin, welches zum Abbau von Homocystein notwendig ist

Individuelle Auswertung der Interventionen

Persönliche Ergebnisse der Isoheart Studie 2003

Prob.Nr. «ID»

- Streng vertraulich -

Erste Intervention

Behandlung «treatment1»	Ausgangswert	Woche 4	Woche 8
BMI	«BMI1»	«BMI2»	«BMI3»
Taille-Hüfte-Verhältnis	«WHR1»	«WHR2»	«WHR3»
SBP/DBP	«SBP1»/«DBP1»	«SBP2»/«DBP2»	«SBP3»/«DBP3»
Gesamtcholesterin [mmol/l]	«TC1»	«TC2»	«TC3»
LDL [mmol/l]	«LDL1»	«LDL2»	«LDL3»
HDL [mmol/l]	«HDL1»	«HDL2»	«HDL3»
Triglyzeride [mmol/l]	«TAG1»	«TAG2»	«TAG3»
Ruhegefäßdurchmesser [mm]	«BDIA1»		
SAC [dyn*s/cm-5]	«SAC1»		«SAC2»
Homocystein [µM/L]	«HCY_1»		«HCY_2»
Folsäure [nmol/L]	«FOL_1»		«FOL_2»

Zweite Intervention

Behandlung «treatment2»	Ausgangswert	Woche 4	Woche 8
BMI	«BMI4»	«BMI5»	«BMI6»
Taille-Hüfte-Verhältnis	«WHR4»	«WHR5»	«WHR6»
SBP/DBP	«SBP4»/«DBP4»	«SBP5»/«DBP5»	«SBP6»/«DBP6»
Gesamtcholesterin [mmol/l]	«TC4»	«TC5»	«TC6»
LDL [mmol/L]	«LDL4»	«LDL5»	«LDL6»
HDL [mmol/L]	«HDL4»	«HDL5»	«HDL6»
Triglyzeride [mmol/L]	«TAG4»	«TAG5»	«TAG6»
Ruhegefäßdurchmesser [mm]	«BDIA3»		
SAC [dyn*s/cm-5]	«SAC3»		«SAC4»
Homocystein [µM/L]	«HCY_3»		«HCY_4»
Folsäure [nmol/L]	«FOL_3»		«FOL_4»

Equolproduzent: «Equol_Producer»

Abschlussbericht für die Teilnehmer der Isoheart-Studie: Blatt 1-2

**Report für die Teilnehmer der Isoheart-Studie 2003
Effekte von Soja-Phytoöstrogenen auf das
Herz-Kreislaufsystem postmenopausaler Frauen:
eine Plazebo-kontrollierte, randomisierte, doppelblinde
Interventionsstudie im Cross-over Design**

Autor: Manja Reimann

Bitte beachten Sie, dass der Inhalt dieses Reports streng vertraulich ist. Die hier zusammengefassten Ergebnisse wurden in einer international renommierten Fachzeitschrift zur Publikation eingereicht und dürfen deshalb vor dessen Veröffentlichung nicht an Personen außerhalb der Studie weitergereicht werden.



Herz-Kreislauferkrankungen sind die häufigste Todesursache bei Frauen und Männern in Deutschland und anderen Ländern mit westlichem Lebensstil. Trotz großer Fortschritte der Forschung in den letzten Jahren besteht weiterhin die Notwendigkeit, die Prozesse, die zum Verschluss von Arterien führen und damit die Blutversorgung von lebenswichtigen Organen wie dem Herzen (Ursache für Herzinfarkt) und dem Gehirn (Ursache für Schlaganfall) beeinträchtigen, vollständig aufzuklären. Risikofaktoren für die koronare Herzerkrankung und den Schlaganfall sind ein hoher, unkontrollierter Blutdruck, hohes Blutcholesterin, Diabetes mellitus (Zuckerkrankheit), Übergewicht, Bewegungsmangel, Rauchen und eine familiäre Belastung. Eine Verbesserung dieser Faktoren senkt das Risiko für Herz-Kreislauferkrankungen deutlich.

Körperliche Aktivität und eine gesunde Ernährung spielen für einen gesunden Lebensstil eine übergeordnete Rolle, denn sie tragen zur Senkung von Blutdruck, Cholesterin, Körpergewicht bei und unterstützen die Kontrolle des Blutzuckerspiegels bei Diabetes mellitus. Seit einigen Jahren wird von der Wissenschaft auf die Bedeutung von Lebensmittelinhaltsstoffen für die Reduktion von Herz-Kreislauferkrankungen verwiesen, obwohl die Forschung in diesem Bereich derzeit noch in den Kinderschuhen steckt.

In den letzten 10 Jahren konnte gezeigt werden, dass Sojaprotein, welches pflanzliches Eiweiß und Phytoöstrogene (Substanzen mit östrogenähnlicher Aktivität) enthält, den Blutdruck und den Cholesterinspiegel senkt und wahrscheinlich positiv die Gefäßfunktion reguliert. Auf der Grundlage vorangegangener Studien wurde von Europäischen Wissenschaftlern die Isoheart-Studie entwickelt mit dem Ziel, den Einfluss isolierter Phytoöstrogene (ohne Eiweiß) auf das Herz-Kreislaufsystem, und hierbei primär auf die Gefäßfunktion, von Frauen nach den Wechseljahren zu untersuchen. Sekundär sollten Risikofaktoren wie u.a. Blutdruck und Blutfette erfasst werden.

Die Ergebnisse basieren auf Durchschnittswerten von 128 Teilnehmern aus 4 europäischen Ländern und wurden zur Veröffentlichung in einer internationalen Fachzeitschrift eingereicht. Nachstehend habe ich diese für Sie zusammengefasst. Zuvor möchte ich mich aber ganz herzlich für ihre Teilnahme bedanken und noch einmal betonen, dass diese Studie nicht ohne ihre Kooperationsbereitschaft, Geduld und Mitarbeit möglich gewesen wäre.

Die mit Soja-Phytoöstrogenen angereicherten Fruchteriegel wurden im allgemeinen gut vertragen. Einige Teilnehmer klagten über leichte Nebenwirkungen (Verstopfung, breiiger Stuhl, Flatulenz, Brustziehen). Die Phytoöstrogene, die schwächer sind als die vom Körper produzierten Östrogene, hatten keinen Einfluss auf die Gefäßfunktion, die Gefäßelastizität und auf die Blutfette einschließlich Cholesterin. Jedoch konnte ein leichter Trend zur Verbesserung der Gefäßelastizität (nicht signifikant) nach Phytoöstrogenverzehr festgestellt werden. Dies weist möglicherweise darauf hin, dass entweder die Dosis an Phytoöstrogenen zu gering oder die Form, in der die Phytoöstrogene verabreicht wurden, nicht effektiv genug war. Die dritte und wahrscheinlichste Möglichkeit ist die, dass die Phytoöstrogene nur in Verbindung mit dem kompletten und unveränderten Sojaprotein wirksam sind. Die Gefäßfunktionsmessung bereitete insofern Probleme, als dass diese von sehr vielen Faktoren abhängig ist. Die Tatsache, dass die Messungen nicht am Morgen in einem vollständig nüchternen Zustand durchgeführt werden konnten, legt die Vermutung nahe, dass Nahrungsbestandteile die Ergebnisse signifikant beeinflusst haben könnten.

Der Blutdruck sank in den ersten 4 Wochen sowohl nach Phytoöstrogen- als auch Placeboverzehr signifikant, stieg jedoch zum Ende der Intervention wieder auf das Ausgangsniveau an. Dies beruht vermutlich auf einem Studieneffekt, d.h. die Probanden nehmen im Bewusstsein der Studienteilnahme allgemein einen gesünderen Lebensstil an, der gerade in den ersten Wochen zum Tragen kommt und sich später relativiert.

Homocystein ist ein neuer Risikofaktor für Herz-Kreislauferkrankungen. Frauen in und nach den Wechseljahren weisen generell höhere Blutwerte auf als jüngere Frauen. Wahrscheinlich ist dies ein Grund, warum das Herz-Kreislaufisiko nach dem Einsetzen der Menopause steigt. In unserer Studie konnte ein signifikantes Ansteigen der Homocysteinwerte nach beiden Interventionsphasen (Placebo und Isoflavone) beobachtet werden. Demnach kann diese Veränderung nicht auf die Zuführung der Sojaisoflavone zurückgeführt werden. Da wir auch eine Reduktion der Vitamin B12 und der Folsäurespiegel, wichtige Vitamine für die Verstoffwechslung von Homocystein, feststellen konnten, gehen wir davon aus, dass der Anstieg der Homocysteinwerte während des Riegelverzehrs den gesunkenen Konsum an Obst und Gemüse reflektiert.

Alles in allem weist unsere Studie nicht auf einen Schutz von Sojaisoflavonen vor Herz-Kreislauferkrankungen hin. Die Vermutung, dass Sojaphytoöstrogene nur in Kombination mit intaktem Sojaprotein wirken, wird dadurch bestärkt

Alternative Therapien zur Reduktion des Herz-Kreislaufisikos einschließlich diätetischer Produkte werden durch die Deutsche Gesetzgebung nicht umfassend genug reguliert. Vor Markteinführung besteht daher keine Notwendigkeit der Sicherheits- und Effektivitätsprüfung. Soja und andere phytoöstrogenhaltige Produkte werden aus Profitstreben aggressiv vermarktet, ohne vorher adequat getestet worden zu sein. Diese Ergebnisse sind sehr wichtig, um sowohl die Öffentlichkeit wie auch die Medizin auf die Bedeutung von Sicherheitskontrollen neuer Gesundheitsstrategien hinzuweisen, und um die Erforschung potentiell wirksamer Therapien weiter voranzutreiben.

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, die in irgendeiner Art und Weise dazu beigetragen haben, dass ich diese Arbeit schreiben und fertig stellen konnte.

Für die unendliche Geduld, die stete Ermutigung und das unerschöpfliche Engagement möchte ich ganz besonders meinen Eltern und meinem Bruder danken, die auf diese Weise aufkommende Selbstzweifel zunichte gemacht und meine Zuversicht gestärkt haben.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Prof. Zunft, der mir die Möglichkeit gab, meine Promotion im Rahmen des phantastischen Europäischen Gemeinschaftsprojektes Isoheart durchzuführen. Für seine gewährte Unterstützung und Beratung bei der Durchführung der Studie möchte ich ihm herzlich danken.

Frau Corinna Köbnick danke ich für die stets umfassende und hilfreiche Betreuung sowie die kritischen und konstruktiven Anregungen bei der gesamten Studienorganisation und statistischen Auswertung, die wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Nachwuchsgruppe Ballaststoffe und Metabolisches Syndrom (ehemals Abteilung Interventionsstudien), die mich bei der Durchführung der Studie tatkräftig unterstützt und meine Arbeit positiv beeinflusst haben. Stellvertretend möchte ich hier Anja Carlsohn, Andrea Franke, Steffi Schultz, Renate Schröder und unseren Krafffahrer Herrn Hirsch nennen, ohne deren zuverlässige und ergiebige Zusammenarbeit die Realisierung der Studie nicht möglich gewesen wäre.

Weiterer Dank gebührt Dr. Dr. Andreas Fried und Christoph Rubens von der Kardiologie des Gemeinschaftskrankenhauses Havelhöhe und allen Kollegen der anderen Studienzentren für die gute Zusammenarbeit.

Last but not least danke ich allen Probandinnen, die aufopferungsvoll und bereitwillig an der Interventionsstudie mitgewirkt haben.

SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt, in gleicher oder ähnlicher Fassung noch nicht in einem anderen Studiengang als Prüfungsleistung vorgelegt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Potsdam, den.....

.....

CURRICULUM VITAE

Persönliche Angaben

Name: Manja Reimann
Anschrift: Kleine Gasse 3, 14467 Potsdam
Geburtsdatum/-ort: 10.04.1975 in Ludwigsfelde
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Schulausbildung

09/1981 - 07/1991 Polytechnische Oberschule Ludwigsfelde

Abitur- und Berufsausbildung

08/1991 - 07/1993 Gymnasium Ludwigsfelde
Abitur: Durchschnittsnote 1,3

02/1994 - 01/1996 Berufsausbildung zur Bankkauffrau, Berliner Bank AG, Berlin
Durchschnittsnote 1,3

Hochschulausbildung

10/1996 – 06/2002 Studium an der Universität Potsdam im Studiengang Ernährungswissenschaft

09/2001 Diplom-Prüfung: Note 1,1

06/2002 Studienabschluss, Gesamturteil: „mit Auszeichnung“
Diplomarbeit am Deutschen Institut für Ernährungsforschung (DIfE),
Potsdam-Rehbrücke: Note 1,1
Thema: Einfluss metabolischer Faktoren auf die Regulation des Urokinase
Plasminogen Aktivator Rezeptors in einer humanen Monozyten-
/Makrophagenzelllinie (U-937)

Beruflicher Werdegang

09/2002-12/2005 Promotion am DIfE, Potsdam-Rehbrücke
Dissertation eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Universität Potsdam (Wissenschaftsdisziplin
Ernährungswissenschaft)

03/2004 – 08/2004 Forschungsaufenthalt als Stipendiatin des Deutschen Akademischen
Austauschdienstes (DAAD) am Department of Vascular Medicine, Monash
University, Melbourne, Australien
Thema: Erhebung des Schweregrades peripherer arterieller Gefäßerkrankung
in Typ 2 Diabetikern mittels nichtinvasiver Techniken

03/2005 Teilnahme als EU-Stipendiatin am European Nutrition Leadership Program
(ENLP), Luxembourg

Sonstige praktische Kenntnisse

03/1996 - 05/1996 European Vocational Training, Belgien

03/1999 Praktikum am Zentralen Institut des Sanitätsdienstes
der Bundeswehr München im Bereich Lebensmittelchemie,
Medizin und Veterinärmedizin

08/1999 – 09/1999 Praktikum am Universitätsklinikum Freiburg in Breisgau in der Sektion
Ernährungsmedizin und Diätetik

07/2000 – 07/2002 studentische Hilfskraft im Ernährungsberatungszentrum des Deutschen
Instituts für Ernährungsforschung

PUBLIKATIONEN

1. Soy isoflavone enriched foods and markers of lipid and glucose metabolism in postmenopausal women: interaction with genotype and equol production
Hall W, Vafeiadou K, Hallund J, Bugel S, Koebnick C, Zunft HJF, Reimann M, Ferrari M, Branca F, Talbot D, Powell J, Minihane AM, Cassidy A, Nilsson M, Dahlmann-Wright K, Gustafsson JA, Williams CM
Am J Clin Nutr in press
2. Evidence for associations between common polymorphisms of estrogen receptor β gene with homocysteine and NOx
Reimann M, Vafeiadou K, Hall W, Dierkes J, Nilson M, Dahlmann-Wright K, Ferrari M, Huebner U, Bugel S, Branca F, Williams C, Koebnick C
Climacteric submitted
3. Soy isoflavone enriched cereal bars affect marker of endothelial function in postmenopausal women
Hallund J, Buegel S, Tholstrup T, Ferrari M, Talbot D, Hall WL, Reimann M, Williams CM, Wijnberg N
Br J Nutr in press
4. Consumption of soy isoflavones does not affect homocysteine levels in postmenopausal women
Reimann M, Dierkes J, Carlsohn A, Talbot D, Ferrari M, Hallund J, Hall W, Huebner U, Branca F, Buegel S, Williams C, Zunft HJF, Koebnick C
J Nutr in press
5. Soy isoflavone enriched foods and inflammatory biomarkers of cardiovascular risk in postmenopausal women: interactions with genotype and equol production
Hall W, Vafeiadou K, Hallund J, Bugel S, Koebnick C, Reimann M, Ferrari M, Branca F, Talbot D, Dadd T, Nilson M, Dahlmann-Wright K, Gustafsson JA, Minihane AM, Williams C
Am J Clin Nutr. 2005 Dec;82(6):1260-1268.
6. The acceptability of isoflavones as a treatment of menopausal symptoms: a European survey among postmenopausal women
Koebnick C, Reimann M, Carlsohn A, Korzen-Bohr S, Buegel S, Hallund J, Rossi L, Branca F, Williams C, Zunft HJF, O'Doherty-Jensen K
Climacteric 2005, 8: 230-242
7. Influence of hormone replacement therapy on proteomic pattern in serum of postmenopausal women
Gericke B, Koebnick C, Reimann M, Forterre S, Zunft HJF, Schweigert FJ
Maturitas 51 (2005) 334-342
8. Specific fatty acids differentially increase the expression of urokinase type plasminogen activator receptor in U-937 monocytes/macrophages
Spranger J, Assmann A, Wegewitz U, Reimann M, Ristow M, Mohlig M, Pfeiffer A
Diabetes 52: A180-A180 Suppl. 1 Jun 2003
9. Loss of the antiangiogenic pigment epithelium-derived factor in patients with angiogenic eye disease
Spranger J, Osterhoff M, Reimann M, Mohlig M, Ristow M, Francis MK, Cristofalo V, Hammes HP, Smith G, Boulton M, Pfeiffer AFH
Diabetes 50 (12): 2641-2645 Dec 2001

ABSTRACTS UND POSTERPRÄSENTATIONEN

1. Isoflavone effect on homocysteine metabolism and asymmetric dimethylarginine
Reimann M, Dierkes J, Hall WL, Vafeiadou K, Ferrari M, Hallund J, Talbot D, Huebner U, Buegel S, Branca F, Williams CM, Zunft HJF, Koebnick C
Poster Presentation, 2nd International Conference on Polyphenols and Health, Davis, California, Oct 4th-7th, 2005
2. Consumption of soy isoflavones does not affect homocysteine levels in postmenopausal women
Reimann M, Dierkes J, Carlsohn A, Talbot D, Ferrari M, Hallund J, Hall W, Huebner U, Branca F, Buegel S, Williams C, Zunft HJF, Koebnick C
Abstract, Phytohealth Meeting, Norwich, UK, Sept 4th-6th, 2005
3. Consumer perspectives in isoflavones for the management of cardiovascular risk factors in postmenopausal women
Reimann M, Koebnick C, Carlsohn A, Zunft HJF, O'Doherty-Jensen K
Poster Presentation at XIV Lipid Meeting Leipzig, Leipzig, Germany, Dec 5th-7th, 2003
4. The role of isoflavones in the management of climacteric symptoms among European postmenopausal women, Preliminary results of a cross-sectional multi-centre survey
Reimann M, Koebnick C, Zunft HJF, O'Doherty-Jensen K
Poster Presentation at 8th Karlsruhe Nutrition Congress, Karlsruhe, Germany, Oct 12th-14th, 2003