



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Neue Daten zur Chemie, Pharmakologie, Toxikologie und
Klinik von Rotklee“

verfasst von / submitted by

Jasmin Jandera

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2017 / Vienna, 2017

Studienkennzahl lt. Studienblatt: / A 449
degree programme code as it
appears on
the student record sheet:

Studienrichtung lt. Studienblatt / Diplomstudium Pharmazie
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Betreut von / Supervisor: Ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Liselotte Krenn

Danksagung

Mein Dank gilt zuerst Frau ao. Univ. Prof. Dr. Liselotte Krenn für die interessante Aufgabenstellung und die stets freundliche Betreuung bei meiner Diplomarbeit.

Außerdem möchte ich mich bei meinem Mann und meiner Tochter bedanken, die immer hinter mir stehen, mich unterstützen, und es mir ermöglicht haben, mein Studium zu beenden.

Bei meinen Eltern möchte ich mich bedanken, dass sie mir mein Studium ermöglicht haben.

Mein Dank gilt nicht zuletzt all jenen, die mich bei der Anfertigung der Diplomarbeit mit Rat und Tat unterstützt und mich auf meinem Studienweg begleitet haben.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL UND METHODEN	2
3. CHEMIE VON ROTKLEE	3
3.1 Inhaltsstoffe	3
3.1.1 Isoflavone	3
3.1.1.1 Verteilung der Isoflavone in der Pflanze.....	5
3.1.2 Säuren	5
3.1.3 Polysaccharide	6
3.1.4 Ätherische Öle	6
3.1.5 Weitere Inhaltsstoffe	6
3.2 Isoflavonkonzentrationen in Nahrungsergänzungsmitteln.....	6
4. IN VITRO STUDIEN	8
4.1 In Vitro Studien mit Testsubstraten	8
4.2 In Vitro Studien in Zellsystemen	8
4.2.1 Testung an verschiedenen Tumorzelllinien	8
4.2.2 Testung an Nervenzelllinien	14
4.2.3 Testung der antiinflammatorischen Aktivität.....	17
4.2.4 Testung an Tracheagewebe	18
4.2.5 Testung an Osteoklasten und Osteoblasten	18
4.2.6 Testung an der Prostata	19
4.2.7 Testung auf antimykotische Wirkung	19
4.3 In Vitro Studien zur Rezeptorbindung	19
4.4 In Vitro Studien zur Pharmakokinetik	23

5. IN VIVO STUDIEN	24
5.1 Wirkung auf den Uterus	24
5.2 Wirkung auf das Endometrium	26
5.3 Wirkung auf die Keimdrüsen	27
5.4 Wirkung auf Brustgewebe und Brustdrüsen	27
5.5 Wirkung auf die Leber	28
5.6 Wirkung auf die Prostata	29
5.7 Wirkung auf die Lunge	29
5.8 Wirkung auf den Knochenmetabolismus	30
5.9 Analgetische Wirkung	38
5.10 Wirkung auf die Wundheilung	39
5.11 Wirkung auf die Haut	39
5.12 Wirkung auf Blutglucose- und Fettwerte	40
5.13 Antiinflammatorische und antiangiogene Wirkung	40
5.14 Pharmakokinetische Wirkung	41
5.15 Übergangsraten von Phytoöstrogenen in Milch	43
6. KLINISCHE STUDIEN	44
6.1 Wirkung bei menopausalen Beschwerden	44
6.2 Wirkung auf das Gedächtnis	48
6.3 Wirkung auf Angst und depressive Symptome	49
6.4 Wirkung auf den Knochenstoffwechsel	50
6.5 Wirkung auf die Brust	50
6.6 Wirkung auf Prostata und Leber	50
6.7 Wirkung auf das Lipidprofil	51
6.8 Wirkung auf die Insulinsensitivität	51
6.9 Wirkung auf das IGF – System	52

6.10 Wirkung auf den Homocysteinspiegel	53
6.11 Pharmakokinetische Wirkung	54
6.12 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen	54
7. IN SILICO STUDIE	56
8. ZUSAMMENFASSUNG	57
9. SUMMARY	59
10. LITERATURVERZEICHNIS	61
11. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	71
12. TABELLENVERZEICHNIS	73

Abkürzungsverzeichnis

6S Zellen	Prostatastromazellen
AhR	Arylhydrocarbon Rezeptor
AR	Androgen Rezeptor
AUC	Area under the curve
Bax	BCL2-associated X
Bcl2	B Zell Lymphom 2
BPH	benigne Prostatahyperplasie
C3	humaner Komplementfaktor 3
CEE	konjugiertes equines Östrogen
c-MYC	Transkriptionsfaktor
COX	Cyclooxygenase
COX7RP	Cytochrom c Oxidase Untereinheit 7-verwandtes Protein
CYP	Cytochrom
DAD	Diodenarray-Detektion
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPD	Deoxypyridinolin
E ₂	Östradiol
ER α	Östrogen Rezeptor α
ER β	Östrogen Rezeptor β
ERK1/2	extrazelluläre Signal regulierende Kinase $\frac{1}{2}$
FP	Fäkalpräparate
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
GOT	Oxalacetat Transaminase
GPT	Glutamat Pyruvat Transaminase
Ha-ras	Protoonkogen
HCN 1-A Zellen	humane kortikale Nervenzellen
HDL	high density lipoprotein
HESC Zellen	menschliche Endometrium Stromazellen
HMG-CoA-Reduktase	Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A Reduktase
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie
HPLC-MS	HPLC gekoppelt mit Massenspektrometer
HPLC-UV-MS	HPLC mit UV-Spektroskopie und MS
hTERT	humane Telomerase reverse Transkriptase
HSD	Hydroxysteroid Dehydrogenase
IC ₅₀	halbmaximale hemmende Konzentration
IGF	Insulin-like growth factor
IGFBP	IGF bindende Proteine
IGF-1R	IGF-1 Rezeptor
I κ B α	Inhibitor des Nuklear Faktor Kappa Beta Alpha
IE	internationale Einheiten
IKK	I κ B Kinase

IL	Interleukin
iNOS	induzierte Stickstoffmonoxid Synthase
IRC	bewässerter Rotklee
KG	Körpergewicht
LAPC- 4 Zellen	Prostatakarzinomzellen
LC	Flüssigkeitschromatographie
LDH	Lactatdehydrogenase
LDL	low density lipoprotein
LNCaP Zellen	Prostatakrebs Zelllinie
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kaskade
MCF-7 Zellen	menschliche Brustkrebszelllinie
MMP-16	Matrix Metalloproteinase 16
MPA	Medroxyprogesteronacetat
MS	Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
NF-κB	Nuklear Faktor Kappa Beta
NIRC	Rotklee der Trockenstress ausgesetzt war
NO	Stickstoffmonoxid
ODMA	O-Desmethylangolensin
OVX	Ovariectomie, die Entfernung einer/beider Eierstöcke
p-Akt	Antikörper
PAMPA	parallel artificial membrane permeability assay
PC-3 Zellen	Prostatakrebs Zelllinie
PC-12 Zellen	Phäochromozytom von Ratten
p-IGF-1R	monoklonaler Antikörper
PPARα	Peroxisom Proliferator aktivierender Rezeptor α
PPARγ	Peroxisom Proliferator aktivierender Rezeptor γ
PR	Progesteron Rezeptor
PRE	Progesteron responsive element
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
QR	Chinon Reduktase
Ras	rat sarcoma, Pro Onkogen
Raf	rapidly accelerated fibrosarcoma, Protein
RAW 264.7 Zellen	leukämische monozytische Mausmakrophagen
RP	reverse phase, Umkehrphase
RT-PCR	reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
T47D Zellen	menschliche Brustkrebszelllinie
TGFβ	Transforming growth factor β
TNFα	Tumor Nekrose Faktor α
TRAIL	TNF- related apoptosis including ligand
UDP-GTs	Uridindiphosphat-Glucuronosyltransferasen
UGT	Uridindiphosphat-Glucuronosyltransferase
UHPLC	Ultra-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie

1. Einleitung

Rotklee (*Trifolium pratense* L.), auch Wiesenklee genannt, gehört zur Familie der Fabaceae.

Erstmals wurde 1940 festgestellt, dass Rotklee als Futterpflanze bei Schafen zu Fertilitätsstörungen führte. Daraufhin wurde der Rotklee genauer untersucht und man entdeckte, dass die im Rotklee enthaltenen Isoflavone (Phytoöstrogene) strukturelle Ähnlichkeit mit Östradiol (17β -Östradiol) haben und sowohl zu östrogenen als auch antiöstrogenen Effekten führen können (Moga et al., 2008).

Aufgrund der östrogenen Wirkung des Rotklees und der Nebenwirkungen der klassischen Hormonersatztherapie (kontraindiziert bei thromboembolischen Ereignissen, Mammakarzinomen und Endometriumkarzinomen) wird Rotklee gegenwärtig in einer Vielzahl von Nahrungsergänzungsmitteln gegen menopausale Beschwerden eingesetzt.

Diese Anwendung beruht darauf, dass Studien gezeigt haben, dass eine sojareiche, isoflavon-hältige Ernährung wie die traditionelle asiatische Kost, zu einer Reduktion von hormonabhängigen Erkrankungen führt (Jabos et al., 2009).

Da das Interesse an pflanzlichen Alternativen zur Hormonersatztherapie noch immer sehr hoch ist, beschäftigt sich die vorliegende Diplomarbeit mit der Zusammenfassung der Studien zu Rotklee, die zwischen 2008 und 2013 publiziert wurden.

2. Material und Methoden

2.1 Datenquelle

Eine systematische Literaturrecherche wurde im April 2014 durchgeführt mit der zeitlichen Beschränkung von 2008 bis 2013. Die Datenbank SciFinder (www.scifinder.cas.org) wurde durchsucht, die auf folgende Datenbanken zugreift: CPlus, Registry, CASreact, Chemcats, Chemlist und Medline. Die Suchbegriffe, die verwendet wurden, waren: Trifolium pratense bzw. Red clover. Beschränkt wurden die Suchergebnisse auf folgende Dokumententypen: Clinical trial, Dissertation, Journal, Letter, Preprint und Review. Es wurden nur englischsprachige Suchergebnisse ausgewertet. Falls ein Abstract in englischer Sprache vorhanden war, wurde es miteinbezogen.

2.2 Auswahl der Studien

Nach Durchsuchen der Datenbank SciFinder mit den oben beschriebenen Auswahlkriterien konnten 1088 Studien gefunden werden. Aus diesen wurden für die vorgegebene Themenstellung Studien zur Chemie, Pharmakologie und Toxikologie sowie klinische Studien selektiert, sodass am Ende 117 relevante Arbeiten ausgewertet werden sollten. Davon konnten 95 Studien bearbeitet werden.

3. Chemie von Rotklee

Die Inhaltsstoffe des Rotklees sind aufgrund seiner Verwendung in Nahrungsergänzungsmitteln für die Menopause und als Futterpflanze sehr gut untersucht. Deswegen konnten zwischen 2008 und 2013 nur wenige neue Komponenten isoliert werden.

3.1 Inhaltsstoffe

3.1.1 Isoflavone

Klejdus et al. (2008) entwickelten eine Ultra-Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (UHPLC) -Methode und konnten an unterschiedlichen stationären Phasen (RP-18, Cyanopropyl- bzw. Phenyl-phasen), ausgewählte Isoflavon-Aglyka und Isoflavon-Glykoside (Genistin, Genistein, Daidzin, Daidzein, Glycitin, Glycitein, Ononin, Sissotrin, Formononetin und Biochanin A) innerhalb von 1,5 min trennen. In einem Blattextrakt konnten Daidzein, Genistein, Formononetin und Biochanin A identifiziert werden. Daidzein zeigte die niedrigste Konzentration.

2008 (a) gelang es Drenin et al., erstmals Formononetin-7-O- β -D-galactopyranosid (s. Abb. 1) und Inermin-3-O- β -D-galactopyranosid (s. Abb. 2) aus Wurzeln des Rotklees zu isolieren.

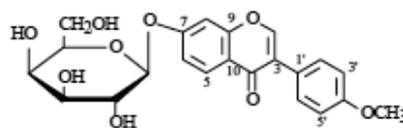


Abb. 1: Formononetin-7-O- β -D-galactopyranosid
(nach Drenin et al., 2008 a)

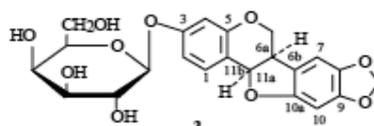


Abb. 2: Inermin-3-O- β -D-galactopyranosid
(nach Drenin et al., 2008 a)

Außerdem wurde Genistein-7-O- β -D-galactopyranosid aus den oberirdischen Pflanzenteilen isoliert (s. Abb. 3) (Drenin et al. 2008, b).

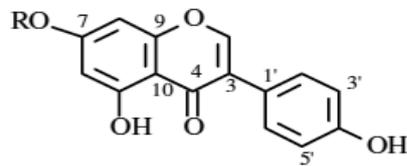


Abb. 3: Genistein-7-O- β -D-galactopyranosid
(nach Drenin et al., 2008 b)

Peng et al. (2008) konnten neben 15 anderen Komponenten erstmals Calycosin-7-O- β -D-glucosid isolieren (s. Abb. 4).

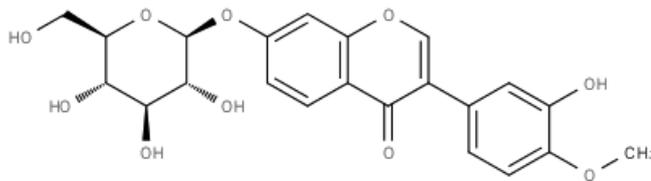


Abb. 4: Calycosin-7-O- β -D-glucosid
(nach <http://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:86512>)

Saviranta et al. (2010) untersuchten Rotkleewurzeln aus dem Freiland und dem Gewächshaus mittels HPLC-Massenspektrometrie (MS) auf ihre phenolischen Bestandteile. Dabei konnten sie 28 Verbindungen detektieren.

Die Wurzeln aus dem Gewächshaus enthielten am meisten Formononetin-Glykosid-Malonate, und die Aglyka Formononetin und Biochanin A, während die Wurzeln aus dem Freiland hohe Konzentrationen an Formononetin-Glykosid-Malonaten, Maa-ckiain-Glykosid-Malonaten und Pseudobaptigenin-Glykosid-Malonaten enthielten.

Im Sommer war die Ausbeute der phenolischen Verbindungen höher als im Herbst. Außerdem stellten sie fest, dass die Konzentrationen der Isoflavonoid-Aglyka der Wurzeln aus dem Gewächshaus um 39 mal höher waren als jene der Wurzeln aus dem Freiland.

Drenin et al. (2010; 2011) isolierten erstmals das Monoglykosid Prunetin-4'-O- α -D-glucopyranosid aus Rotklee.

3.1.1.1 Verteilung der Isoflavone in der Pflanze

Saviranta et al. (2008) untersuchten verschiedene Rotkleeextrakte aus Blatt, Stamm, Wurzel und verschieden gefärbten Blüten, die entweder aus dem Gewächshaus oder dem Freiland stammten, auf die Konzentrationen von Daidzein, Genistein, Formononetin und Biochanin A.

In den Gewächshausproben fanden sich die höchsten Konzentrationen von Daidzein ($0,11 - 0,28 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ Trockengewicht) und Genistein ($0,30 - 0,54 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ Trockengewicht) in den Blattstielen. In den Freilandproben waren die Konzentrationen von Daidzein und Genistein in den Stielen ($0,24$ und $0,55 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ Trockengewicht) im August am höchsten. In den Gewächshausproben waren die Blätter reich an Formononetin ($5,57 - 9,05 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ Trockengewicht) und Biochanin A ($10,94 - 14,59 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ Trockengewicht). Im Gegensatz dazu wurden in den Freilandproben die höchsten Konzentration von Formononetin ($7,47 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ Trockengewicht) und Biochanin A ($9,69 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ Trockengewicht) in jungen Blättern gefunden.

Dass die Wachstumsphasen (Blüten-, vegetatives und Fruchtstadium) von Rotklee eine Auswirkung auf die Isoflavonkonzentrationen haben, zeigten Gikas et al. (2008) mittels HPLC-Diodenarray-Detektions (DAD)-Analysen.

Im vegetativen Stadium waren die Werte am höchsten ($12,8 \text{ mg Isoflavone/g}$ Trockengewicht) und im Fruchtstadium die Konzentration etwas geringer ($12,4 \text{ mg Isoflavone/g}$ Trockengewicht), während im Blütenstadium die geringsten Konzentrationen gefunden wurden ($9,8 \text{ mg Isoflavone/g}$ Trockengewicht).

Darüber hinaus konnten sie feststellen, dass Formononetin in allen Wachstumsphasen in höheren Konzentration vorlag als Biochanin A, beide die höchsten Konzentrationen im vegetativen Stadium erreichten, während die höchste Konzentration von Daidzein und Genistein im Fruchtstadium vorlag.

3.1.2 Säuren

Tsurkan et al. (2008 b) identifizierten mittels HPLC in den Blüten des Rotklee 17 Aminosäuren. Dabei konnten sie eine Gesamtmenge von 3,96% feststellen. Die Hauptkomponenten waren Asparaginsäure mit 1,48% und Prolin mit 1,35%.

Neben 15 anderen Komponenten konnten Peng et al. (2008) erstmals aus Rotklee Salicylsäure isolieren.

Klejdus et al. (2008) konnten aus einem Blätterextrakt Protocatechusäure, p-Hydroxybenzoesäure, Vanillinsäure, Kaffeesäure, Syringasäure sowie p-Cumarinsäure identifizieren.

Mittels HPLC-Ultraviolett-Spektroskopie (UV)-MS untersuchten Olah et al. (2010) Polyphenole in einem nativen und einem hydrolysierten Rotkleeextrakt. Dabei konnten die Phenolcarbonsäuren p-Cumarsäure, Gentisinsäure, Chlorogensäure und Ferulasäure erstmals in *Trifolium pratense* beschrieben werden.

3.1.3 Polysaccharide

Tsurkan et al. (2008 a) quantifizierten in Rotklee 11,46% Polysaccharide.

3.1.4 Ätherisches Öl

In den frischen oberirdischen Teilen von Rotklee wurde mittels Wasserdampfdestillation ein Gesamtgehalt von 0,018% G/G eines blassgelben ätherischen Öls bestimmt. Mittels Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor und Gaschromatographie mit MS konnten über 60 Komponenten identifiziert werden. Als Hauptkomponenten wurden Alkohole (36,1%) identifiziert, neben Ketonen (22,8%), Aldehyden (7,3%), Säuren (6,7%) Terpenen (Monoterpene mit 6,0% und Sesquiterpene mit 1,9%), Estern (1,1%), Phenolen (1,0%) und Kohlenwasserstoffen (0,6%)(Tava et al., 2009).

3.1.5 Weitere Inhaltsstoffe

Wang et al. (2011 a) isolierten erstmals mittels HPLC und RP-HPLC Stigmast-4-en-3-on, Stigmast-4-en-3,6-dion, α -Stigmast-4-en-3,6-dion, 12-en-3-one-methyl-oleanolat und 1-Hydroxy-5,6,7-trimethoxy-xanthon aus einem ethanolischen Rotkleeextrakt.

Das Cyclopolyol Pinitol konnte erstmals in Rotklee nachgewiesen werden (Drenin et al., 2011).

3.2 Isoflavonkonzentrationen in Nahrungsergänzungsmitteln

In einer Studie von Clarke et al. (2008) wurden 35 Nahrungsergänzungsmittel aus UK, Kanada und Italien mittels Flüssigkeitschromatographie (LC)-MS/MS auf ihre Isoflavonkonzentration untersucht.

Die Mehrheit der Produkte enthielt Soja mit den Isoflavonen Genistein, Daidzein, Glycitein und Rotklee mit den Hauptkomponenten Formononetin und Biochanin A. Kudzu, das auch Puerarin enthält, war nur in einigen Produkten enthalten.

Nur 14 der 35 getesteten Proben enthielten mit mehr als 40 mg/d an Isoflavon-Aglyka, eine Dosis, die für einen therapeutischen Effekt verantwortlich gemacht

wird. 11 Proben erfüllten den deklarierten Wert ($\pm 20\%$) nicht und bei bestimmungsgemäßen Gebrauch von 6 Proben wäre die Tagesdosis weniger als 10 mg Isoflavone.

In der Studie von Schwartz et al. (2008) wurden 11 Nahrungsergänzungsmittel (basierend auf Soja und/oder Rotklee) mittels HPLC mit coulometrischer Elektrodenarray Detektion auf ihren Isoflavongehalt und ihren Anteil an freien Aglyka und Glycosiden getestet und mit den Herstellerangaben verglichen.

In sechs von elf Produkten entsprach der Isoflavongehalt den Herstellerangaben oder war geringfügig höher. Im Vergleich der freien Aglyka und Glykosidanteile, stimmten acht von elf Präparaten mit den Herstellerangaben überein.

Der Isoflavongehalt lag zwischen 12,0 – 45,6 mg/Kapsel bzw. Tablette und der Gehalt der freien Aglyka und Glykoside bei 12,2 – 51,6 mg/Kapsel bzw. Tablette.

Mittels RP-HPLC quantifizierten Reiter et al. (2009) Isoflavone aus 19 Nahrungsergänzungsmitteln, die bei menopausalen Beschwerden Anwendung finden.

Nur bei fünf Präparaten stimmten die angegebenen Werte mit der Deklaration überein oder waren etwas höher als deklariert. Die tägliche Isoflavonaufnahme lag basierend auf den bestimmten Gehalten zwischen 5,7% und 186,9% der angegebenen Isoflavonmengen.

4. In Vitro Studien

Bei den folgenden in vitro Studien wurde die Wirkung von Rotkleeextrakten, ihren Isoflavonoiden und deren Metaboliten in verschiedenen Assays auf enzymatischer Basis bzw. an unterschiedlichen Zelllinien getestet.

4.1 In Vitro Studien mit Testsubstraten

Wang et al. (2009) untersuchten die Wirkung eines Rotkleeextraktes (mindestens 40% Flavonoidgehalt) auf das Enzym Matrix Metalloproteinase 16 (MMP-16).

Dabei konnte die MMP-16 Aktivität durch das Extrakt gehemmt werden, Biochanin A, Daidzein und Genistein zeigten keine hemmende Wirkung. Nur Formononetin konnte dosisabhängig die Aktivität schwach hemmen. Von 33 Fraktionen, in die das Extrakt mittels Säulenchromatographie aufgetrennt worden war, konnten nur zwei (eine davon dosisabhängig) die Aktivität hemmen.

Die Auswirkungen der menschlichen Darmflora auf den Abbau der Isoflavone Irilon und Genistein untersuchten Braune et al. (2010).

Nach Inkubation von Irilon oder Genistein mit Fäkalpräparaten (FP) von zehn Freiwilligen zeigten LC-DAD/MS Analysen, dass Irilon sehr beständig gegenüber dem humanem Mikrobiom war. In sehr geringen Konzentrationen wurde Dihydroirilon gebildet.

Dagegen kam es beim Abbau von Genistein durch FP zu stärkeren Unterschieden in der Abbaurate und den metabolischen Mustern.

In einem weiteren Experiment wurde der Abbau von Irilon und Genistein durch das Darmbakterium *Eubacterium ramulus* untersucht. Auch dabei zeigte sich, dass Irilon sehr beständig war und Genistein stark metabolisiert wurde.

Eine 6,7-Methylenedioxybrücke unterscheidet Irilon von Genistein und könnte dafür verantwortlich sein, dass Irilon durch menschliche Darmbakterien kaum abgebaut wird.

4.2 In Vitro Studien in Zellsystemen

4.2.1 Testung an verschiedenen Tumorzelllinien

Mittels Proliferationsassays an elf verschiedenen menschlichen Krebszelllinien (Dickdarm, Prostata, Brust, Zervix, Leber, Pankreas, Magen und Eierstöcke) und einer Fibroblastenlinie untersuchten Reiter et al. (2011) die Effekte von Isoflavonen und Extrakten aus Soja und Rotklee auf die Zellproliferation, Apoptoseinduktion und den Zellzyklusarrest.

Die Proliferation mehrerer Zelllinien konnte durch Isoflavone und Pflanzenextrakte

reduziert werden, wobei am stärksten Biochanin A wirkte.
Genistein induzierte am stärksten Apoptose, Nekrose und Zellzyklusarrest.

Wang et al. (2008 b) untersuchten die Wirkung von Biochanin A auf die Aromatase-Aktivität und die Genregulation in MCF-7aro- (Brustkrebszellen infiziert mit humanen CYP19) und SK-BR-3-Brustkrebszellen.

In MCF-7aro Zellen hemmte Biochanin A die Aktivität der Aromatase mit einem IC_{50} Wert von 8 μ M und reduzierte die Testosteron-induzierte Proliferation.

In beiden Zelllinien hemmte Biochanin A (50 μ M) die Aktivität der Promotoren I.3 und II.

Um mehr als 80% konnte Biochanin A (100 μ M) die Aromatase mRNA und die Proteinexpression in SK-BR-3 Zellen reduzieren. Außerdem verminderten 25 μ M Biochanin A die Aromataseaktivität signifikant.

Genistein hemmte ebenfalls in SK-BR-3 Zellen die CYP19 Transkriptionsaktivität der Promotoren I.3 und II.

Die östrogene Wirksamkeit von verschiedenen Isoflavonen aus Rotklee und Soja testeten Lin et al. (2008). In einem rekombinanten Hefe-Assay mit palindromen Estrogen Response Element und einem ADE2 Reporter System, zeigten Genistein (1 μ M) > Biochanin A, Formononetin (5 μ M) > Daidzein (10 μ M) > Glycitein (> 10 μ M) Wirksamkeit. Als Kontrolle wurde Östradiol (E_2) verwendet.

In MCF-7 Zellen wurden Onkogene (hTERT, c-MYC, Bcl2 und Ha-ras) und Nicht-Onkogene (QR, C3 und COX7RP), die durch Östradiol reguliert werden, als Markergene herangezogen. Die Isoflavonoide beeinflussten die Expressionsmuster der Markergene deutlich, wobei es Unterschiede gab zu den Expressionsmustern durch Östradiol.

Dabei wurde das Expressionslevel für die Onkogene hTERT, c-MYC, Bcl2 und Ha-ras durch E_2 erhöht. Die Isoflavonoide zeigten eine Erniedrigung der hTERT Transkription ($p < 0,05$). Das Expressionslevel von Ha-ras wurde durch Formononetin, Biochanin A und Glycitein erniedrigt. Während Genistein die mRNA von c-MYC erhöhte, konnten die anderen vier Isoflavone den Expressionslevel von Bcl2 erhöhen.

Bei den Nicht-Onkogenen erhöhten alle fünf Isoflavonoide den Expressionslevel von C3, während der QR Wert nur wenig gesenkt werden konnte und es für COX7RP keinen Effekt gab.

Außerdem konnten Biochanin A und Formononetin die Östradiol induzierte Expression der Onkogene hemmen ($p < 0,05$) (s. Abb. 5, S. 10).

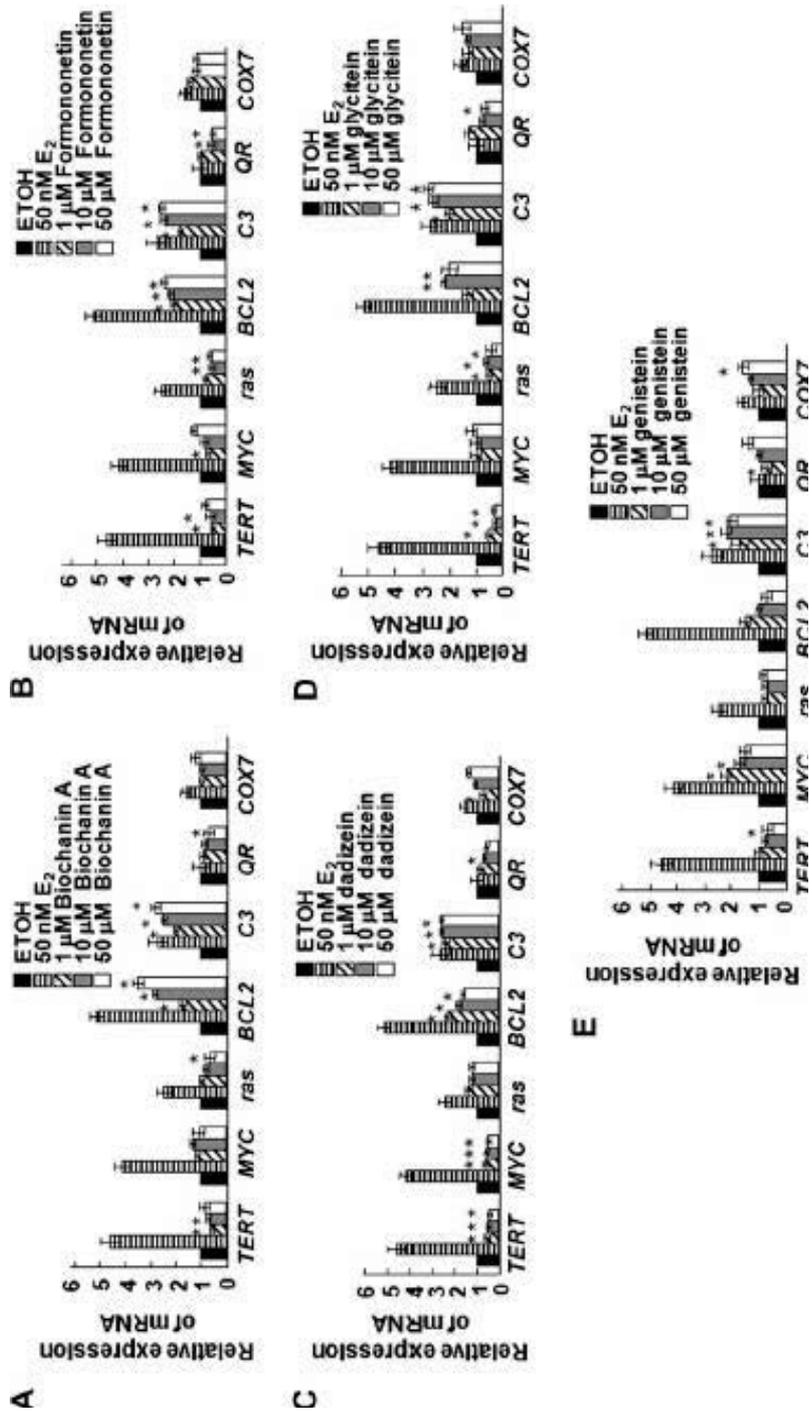


Abb. 5: Dosisabhängiger Effekt der Isoflavonoide auf das Expressionslevel der primär ER-regulierenden Gen Profile in MCF-7 Zellen
 A: Biochanin A, B: Formononetin, C: Daidzein, D: Glycitein und E: Genistein
 (nach Lin et al., 2008)

Die östrogenen und antiöstrogenen Effekte eines Nahrungsergänzungsmittel auf das Zellwachstum von MCF-7 Brustkrebszellen testeten Ju et al. (2008). Dabei konnten sie feststellen, dass die Proliferation durch geringe Konzentrationen (0,1–50 µg/ml Medium) eines Dimethylsulfoxid (DMSO) Extraktes erhöht wurde. Hingegen wurde das Zellwachstum durch höhere Konzentrationen gehemmt.

Chen et al. (2011) stellten für unterschiedliche Formononetinkonzentrationen an MCF-7-Zellen Proliferationshemmung fest.

Formononetin induzierte dosisabhängig den Zellzyklusarrest und reduzierte die Expression von Cyclin D1 mRNA. Ebenfalls dosisabhängig konnte Formononetin die Inaktivierung der Antikörper p-IGF-1R, pAkt und Cyclin D1 induzieren.

An verschiedenen Brustkrebszelllinien zeigten Chen et al. (2012), dass Formononetin die Proliferation von Östrogen-positiven MCF-7 und T47D Zellen hemmte ($p < 0,05$), aber in Östrogen-negativen MDA-MB-435S Zellen keine Hemmung erfolgte.

Formononetin aktivierte dosisabhängig den Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kaskade (MAPK) Signalweg und führte zu einer Erhöhung der Expression von BCL2-associated X (Bax) mRNA und der Proteinexpression von rat sarcoma (Ras), rapidly accelerated fibrosarcoma (Raf) und Bax. Die Proteinexpression von B Zell Lymphom 2 (Bcl2) wurde dagegen reduziert.

In den MCF-7-Zellen konnte Formononetin Apoptose induzieren, die abgeschwächt wurde, wenn die Zellen mit einem p38MAPK Inhibitor vorbehandelt wurden.

Mannella et al. (2012) untersuchten das Eindringen und die Migration von verschiedenen Brustkrebszellen nach der Behandlung mit Rotkleeextrakten.

Zur Untersuchung der Zellwanderung wurde ein horizontales Migrations-Assay mit T47-D Zellen verwendet. Die Zellmigration wurde durch Östradiol verstärkt, durch eine Behandlung mit Genistein oder einer Mischung aus Isoflavonen jedoch wieder reduziert.

Durch die Behandlung der T47-D Zellen mit Östradiol/Genistein oder Östradiol/Isoflavongemisch konnten die durch Östradiol induzierten morphologischen Veränderungen des Zytoskelettes verringert werden und die durch Östradiol induzierte Phosphorylierung von Moesin verhindert werden.

In einer 3-D Matrix wurde die Zellinvasion von T47-D Zellen durch die Behandlung mit Östradiol, Genistein oder dem Isoflavongemisch gefördert. Eine kombinierte Behandlung mit Östradiol und Rotkleeextrakt führte zur Hemmung der Östradiol-induzierten Invasion (s. Abb. 6, S. 12).

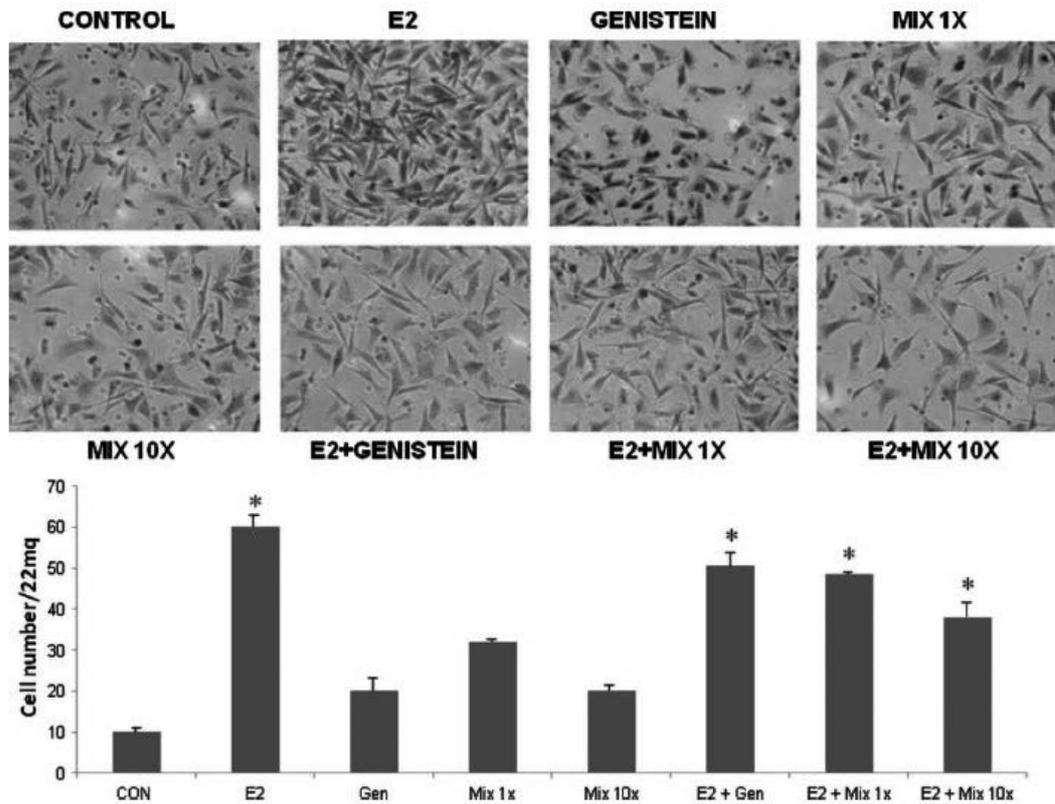


Abb. 6: Effekt der Rotklee Phytoöstrogene auf die Invasion von T47-D Brustkrebszellen (nach Mannella et al., 2012)

Toh et al. (2012) untersuchten acht verschiedene ethanolische Extrakte von Pflanzen, die zur Behandlung menopausaler Beschwerden verwendet werden, auf ihre Fähigkeit, in T47D Zellen mit dem Progesteron Rezeptor (PR) zu interagieren oder die Progesteron responsive element (PRE) Luziferase zu induzieren.

Eine Interaktion mit dem PR zeigten nur vier Extrakte, wobei nur das Rotkleeextrakt (20 µg/ml) die PRE Luziferase induzieren konnte.

In einer Bibliothek mit 26 Komponenten aus Rotklee, die an PR binden und die PRE Luziferase induzieren, konnte Kaempferol als Wirkkomponente in Rotklee identifiziert werden. Naringenin (10 µM) konnte nur am PR binden, die PRE Luziferase aber nicht induzieren.

In T47D Zellen wurde mit 250 µM von Kaempferol oder Naringenin die ZBTB16 mRNA (ein auf Progesteron ansprechendes Gen) induziert und Kaempferol reduzierte die Progesteron induzierte PRE Luziferase.

In HESC Zellen konnten 100 µM von Kaempferol oder Naringenin die Prolactin Expression induzieren und Kaempferol dosisabhängig die PRE Luziferase aktivieren.

Der Metabolismus von Dehydroepiandrosteron (DHEA) wurde in der Kokultur von LAPC4 Prostatakrebszellen mit 6S Prostatastromazellen in Anwesenheit von proinflammatorischen Zytokinen wie TGFβ1 untersucht sowie die Auswirkungen von Rotkleeisoflavonen auf dieses Testsystem.

Die Prostataspezifisches Antigen (PSA) Proteinsekretion wurde um das zwei bis vierfache, die PSA Genexpression auf das 50-fache erhöht und die Produktion von Testosteron wurde ebenfalls verstärkt, wenn die LAPC4/6S Kultur mit einer Kombination von TGFβ1 und DHEA behandelt wurde ($p < 0,01$).

Rotkleeisoflavone hatten dagegen den umgekehrten Effekt. Die PSA Protein- und Genexpression konnte durch eine Behandlung mit 100 nmol/L Rotkleeisoflavonen gesenkt werden und die Testosteronsekretion in mit TGFβ1 und DHEA behandelten LAPC4/6S Kulturen wurde gehemmt.

In 6S Zellen wurde die Expression des Androgen Rezeptors (AR) durch Behandlung mit TGFβ1 und DHEA erhöht, während Rotklee den Effekt umkehrte (Gray et al., 2009).

Ebenfalls in einer Kokultur von LAPC4 Zellen und 6S Zellen, die mit DHEA behandelt wurde, wurden die Auswirkungen von Rotkleeisoflavonen und TGF-β1 auf die Hydroxysteroid-Dehydrogenasen 3β-HSD, HSD-17β1 und HSD-17β5, die bei der Metabolisierung von DHEA zu Testosteron eine Rolle spielen, untersucht.

Die Proteinexpression der HSD Enzyme wurde durch TGF-β1 erhöht und in 6S Zellen war die Expression höher als in den LAPC4 Zellen. Durch Rotklee konnte die durch TGF-β1 erhöhte Proteinexpression von 3β-HSD Aggregaten gehemmt werden, aber nicht die Expression von HSD-17β1 ($p < 0,01$).

TGF-β1 blockierte die Interaktion zwischen dem TGF-β1 Rezeptor und den 3β-HSD und HSD-17β1 Aggregaten ($p < 0,01$). Dagegen wirkte Rotklee hemmend auf diesen Effekt bei 3β-HSD Aggregaten, aber nicht bei HSD-17β1 Aggregaten (Liu et al., 2011).

Mittels 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) Assay und Annexin V/PI doppelfärbender Durchflusszytometrie wurde die Wirkung von Rotkleeisoflavonen auf menschliche benigne Prostatahyperplasie (BPH) Stromazellen getestet. Die Isoflavone hemmten die Proliferation und induzierten Apoptose bei einer Konzentration von 25 µg/ml (Chen et al., 2010 a).

Formononetin hemmte die Proliferation in zwei verschiedenen Prostatakrebs Zelllinien (PC-3 und LNCaP) ($p < 0,05$), wobei der Effekt in den LNCaP-Zellen am stärksten war.

In den LNCaP-Zellen wurde Apoptose induziert, dosisabhängig die Bax mRNA und Protein Expression erhöht und die Proteinexpression von p-ERK1/2 erniedrigt (Ye et al., 2012).

Biochanin A verstärkte die TNF-related apoptosis including ligand (TRAIL)-induzierte Cytotoxizität an den Prostatakrebs Zelllinien LNCaP und DU145.

Biochanin A sensibilisierte die TRAIL-resistenten LNCaP-Zellen, durch eine Erhöhung des mitochondrialen Membranpotentials und der TRAIL-R2 Expression sowie durch die Verringerung der Nuklear Faktor Kappa Beta (NF- κ B) Aktivierung (Szlizka et al., 2013).

Lin et al. (2011) isolierten Biochanin A als die aktive Komponente aus einem Rotkleeextrakt, der hemmende Wirkung auf die Melanogenese von B16 Melanomzellen gezeigt hatte.

Biochanin A und Formononetin führten zu einer signifikanten, dosisabhängigen Hemmung der Melanogenese. Biochanin A führte auch zu einer Abnahme der zellulären Tyrosinaseaktivität.

Vorbehandlung mit Biochanin A (1, 10, 50 und 100 μ M) konnte den zytotoxischen Effekt von L-Glutamat in PC12 Rattenphäochromocytomzellen mildern (1 μ M: 72,9 \pm 2,21%, 10 μ M: 80,1 \pm 0,55%, 50 μ M: 85,9 \pm 1,5% und 100 μ M: 92,7 \pm 1,88%) und führte zu einer Abnahme der LDH Abgabe, der Apoptose und der Caspase 3 Aktivität sowie zu einer Zunahme der Glutathion-Werte (Tan et al., 2013).

4.2.2 Testung an Nervenzelllinien

In einer Untersuchung der neuroprotektiven Wirksamkeit von Isoflavonen an HCN-1-A-Zellen gegenüber der Toxizität von Glutamat konnte eine konzentrationsabhängige Abnahme der Lebensfähigkeit von Neuronen nach Behandlung mit Glutamat festgestellt werden. Durch eine 24-stündige Vorbehandlung der Zelllinie mit angereicherten Isoflavonen (IEF) konnte die Überlebensrate signifikant erhöht werden.

Die durch Glutamat bewirkten morphologischen Schädigungen konnten durch IEF bzw 17- β -Estradiol verhindert werden (s. Abb. 7, S. 15) (Occhiuto et al., 2008).

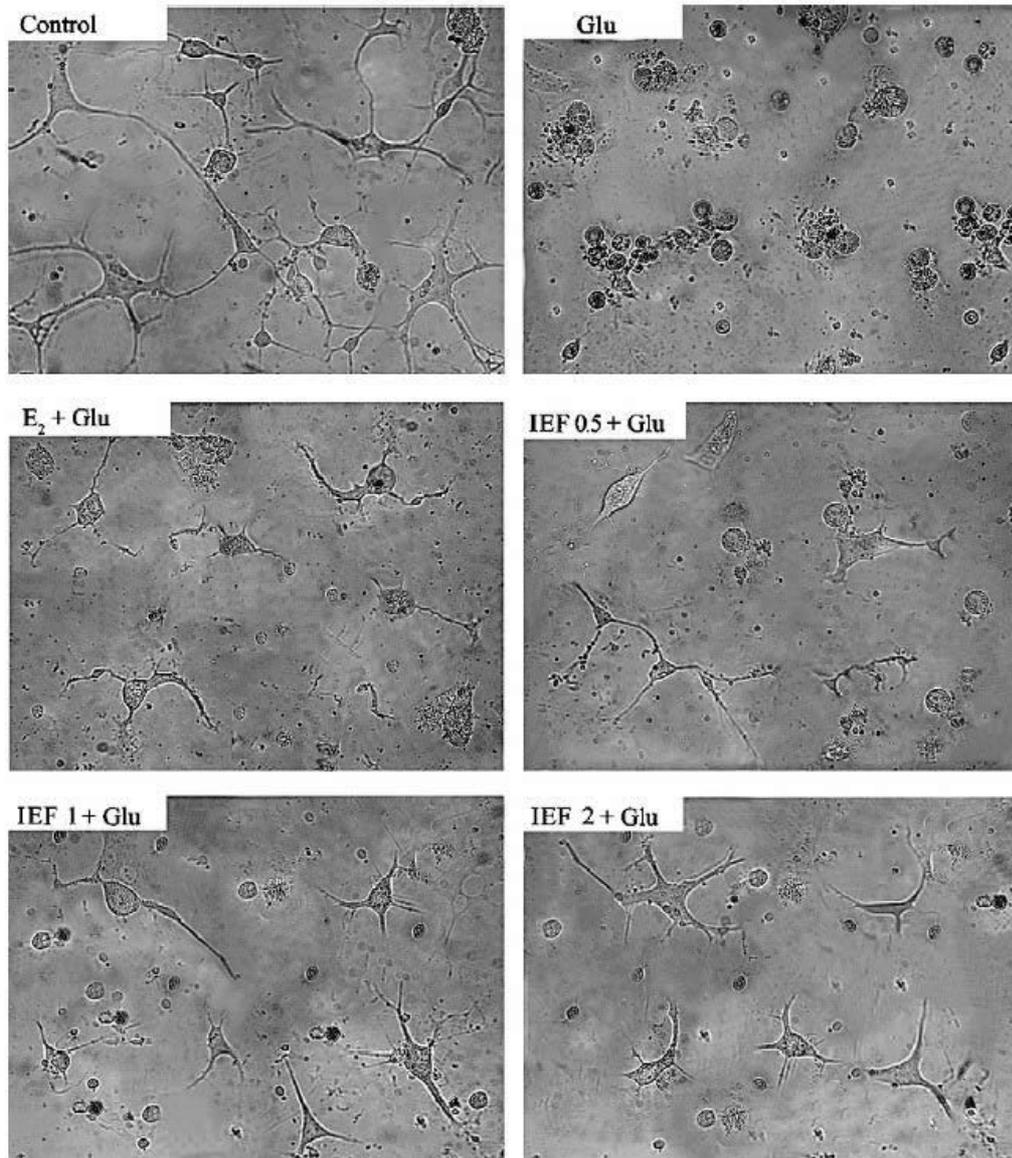


Abb. 7: Mikroskopische Bilder der morphologischen Schäden durch Glutamat in HCN 1-A Zellen (nach Occhiuto et al., 2008)

Die Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte Abnahme der dopaminergen Neuronen und der Dopaminaufnahme in Kulturen mesenzephalischer Gliazellen von Ratten wurde durch die Rotkleeisoflavone (Formononetin, Daidzein, Pratensein, Calycosin und Irlon) reduziert.

Außerdem konnten diese Isoflavone in Gliazellkulturen sowie in Mikroglia-angereicherten Kulturen die LPS-induzierte Mikrogliaaktivierung und somit auch die Abgabe von proinflammatorischen Faktoren (TNF α , NO und Superoxid) hemmen. Die neuroprotektive Wirksamkeit war wie folgend: Pratensein > Daidzein > Calycosin > Formononetin > Irlon (Chen et al., 2008).

Occhiuto et al. (2009) testeten in einem weiteren Experiment die neuroprotektive Wirksamkeit eines Rotkleeextraktes an HCN 1-A Zellen gegenüber Wasserstoffperoxid. In allen Experimenten wurden 100 µg/ml Wasserstoffperoxid als Auslöser von oxidativem Stress verwendet.

Es zeigte sich, dass die Lebensfähigkeit der Zellen durch eine 24-stündige Vorbehandlung mit einem Isoflavonextrakt (0,5; 1 bzw. 2 µg/ml) um 45% ± 5% erhöht werden konnte und dass das Extrakt und Östradiol Neuronen vor oxidativen Stress schützen können.

Die protektive Wirkung konnte auch durch die mikroskopische Untersuchung morphologischer Veränderungen nachgewiesen werden (s. Abb. 8).

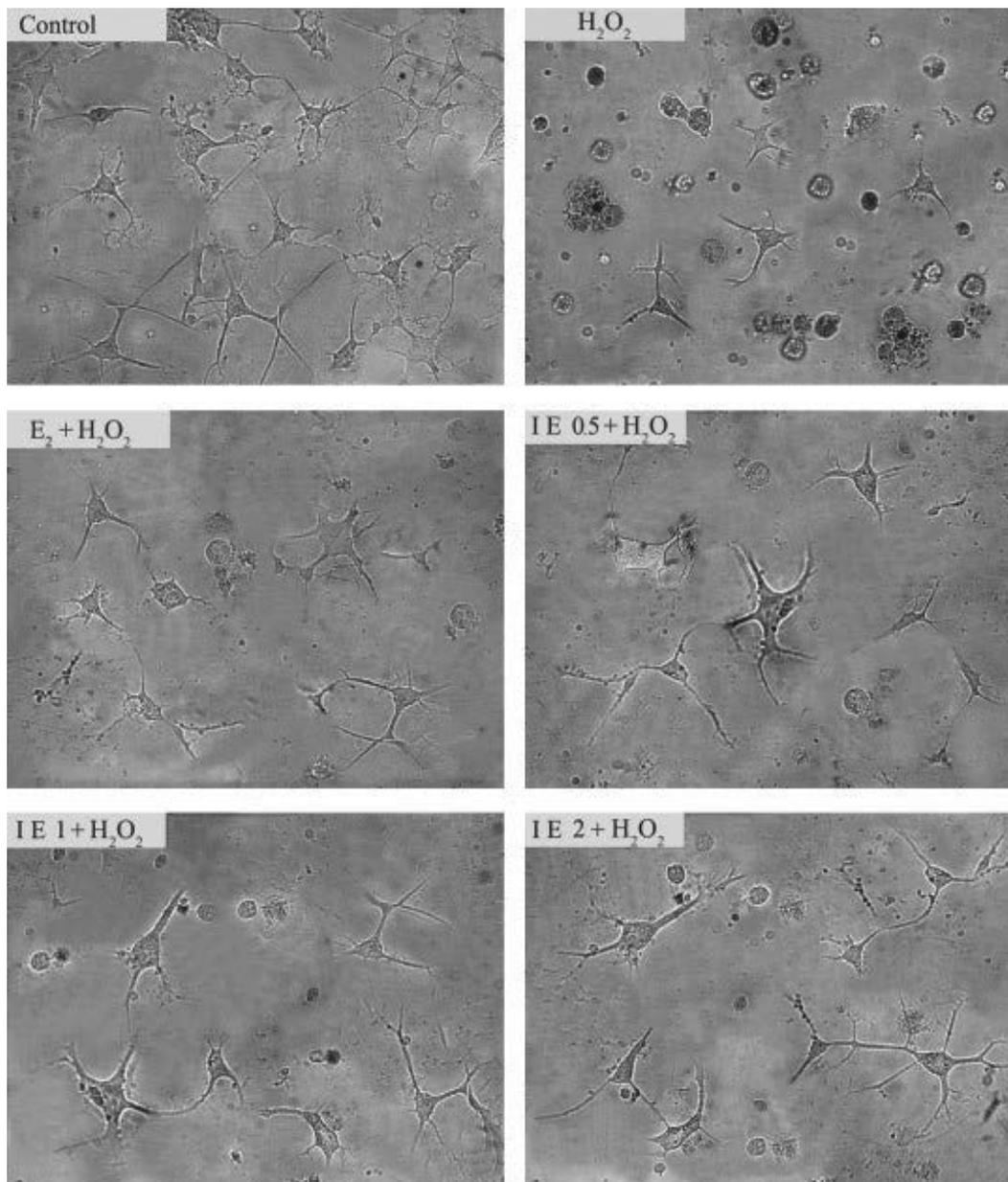


Abb. 8: Mikroskopische Bilder der morphologischen Schäden durch Wasserstoffperoxid in HCN 1-A Zellen (nach Occhiuto et al, 2009)

Die durch die Cytotoxizität von N-methyl-D-Aspartat verursachte Apoptose von kortikalen Neuronen aus embryonalen C57B1/6 Mäusen konnte durch Formononetin vermindert werden ($p > 0,05$), wobei die Zellen in der frühen Phase der Apoptose den stärksten Effekt zeigten ($p < 0,01$).

Die antiapoptotische Wirkung von Formononetin beruhte auf der Hochregulierung von Bcl-2, der Downregulation von Bax sowie der Verringerung der Procaspase 3 Clearance und der Caspase-3 Expression (Tian et al., 2013).

4.2.3 Testung der antiinflammatorischen Aktivität

Ein Extrakt aus Rotklee konnte die Aktivierung und Proliferation von Maus CD3⁺ T-Lymphozyten, als auch die übermäßige Produktion von inflammatorischen Faktoren (CD69, CD25 und CD71) dosisabhängig hemmen. In LPS-stimulierten Mausmakrophagen wurde die NO-Sekretion gehemmt (Yang et al., 2008).

In LPS-induzierten Makrophagen (RAW 264.7 Zellen) wurde die Freisetzung verschiedener inflammatorischer Mediatoren durch Rotkleeextrakte, Isoflavone und Metaboliten untersucht.

Durch den Rotkleeextrakt konnte Interleukin-6 (IL) ($IC_{50} = 65 \mu\text{g/ml}$) und Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) ($IC_{50} = 252 \mu\text{g/ml}$) dosisabhängig gesenkt werden und deren Sekretion durch Daidzein (TNF α : $IC_{50} = 40 \pm 5 \text{ nM}$, IL-6: $IC_{50} = 18 \pm 8 \text{ nM}$), Biochanin A (TNF α : $IC_{50} = 8 \pm 3 \text{ nM}$, IL-6: $IC_{50} = 65,2 \pm 14,25 \text{ nM}$), Genistein (IL-6: $IC_{50} = 41,3 \pm 6,0 \text{ nM}$) und den Metaboliten Equol (IL-6: $IC_{50} = 5,9 \pm 0,4 \text{ nM}$) und O-Desmethylangolensin (ODMA) ebenfalls gehemmt werden.

Die IL-10-Sekretion konnte vom Metaboliten Equol ($IC_{50} = 4,3 \pm 0,2 \text{ nM}$) und von Genistein ($IC_{50} = 33 \pm 8 \text{ nM}$) und Biochanin A gehemmt werden.

Das Extrakt, Biochanin A, Genistein und Daidzein und in geringerem Maße Formononetin, Equol und ODMA reduzierten die Expression von NF- κ B. Während die Expression der induzierten Stickstoffmonoxid Synthase (iNOS) durch Biochanin A und Formononetin reduziert wurde, konnte die Expression von Cyclooxygenase 2 (COX-2) durch das Rotkleeextrakt und Biochanin A vollständig unterdrückt werden und durch Equol reduziert werden (Mueller et al., 2010).

Die entzündungshemmenden und antiproliferativen Wirkungen von Biochanin A aus Rotklee untersuchten Kole et al. (2011) an RAW 264.7 Zellen und peritonealen Mausmakrophagen.

In peritonealen Makrophagen konnte Biochanin A dosisabhängig die LPS-induzierte NO-Produktion und die iNOS-Expression hemmen. In RAW 264.7 Zellen, die mit unterschiedlichen Konzentrationen von Biochanin A behandelt wurden, zeigte sich, dass die durch LPS-induzierte NF- κ B Bindungsaktivität gehemmt werden konnte.

Biochanin A hemmte die LPS-induzierte I κ B α (Inhibitor des Nuklear Faktor Kappa Beta Alpha) Phosphorylierung und I κ B Kinaseaktivität. In RAW 264.7 Zellen und

peritonealen Mausemakrophagen hemmte Biochanin A durch die Blockade der LPS-induzierten Phosphorylierung von I κ B α und p38 MAPK die Produktion der Zytokine IL-6, IL-1 β und TNF α .

Ein Rotkleetrockenextrakt hemmte die Migration von Leukozyten durch alle getesteten Konzentration (5, 10, 25, 50 und 100 μ g/ml, $p < 0,001$) (Ramos et al., 2012).

Manna (2012) zeigte an Jurkat T-Zellen, dass Biochanin A die durch IL-8 induzierte Aktivierung von NF- κ B, Aktivator Protein 1 und I κ B Kinase (IKK) hemmt. Dagegen konnten Formononetin und Genistein die durch IL-8 bedingte IKK Aktivität nur partiell hemmen.

Auch die durch Pervanadat (Tyrosin-Phosphatase Inhibitor), Phorbol-12-myristat-13-acetat, LPS und H₂O₂ induzierte IKK Aktivität bzw. NF- κ B Aktivität konnte durch Biochanin A gehemmt werden.

Die durch IL-8 induzierte Aktivität der Lymphozyten spezifischen Protein Tyrosin Kinase und Spleen Tyrosin Kinase konnte von Biochanin A und Genistein gehemmt werden. Außerdem zeigte sich, dass Biochanin A die Aktivierung von NF- κ B durch TRAF6 komplett, durch TRAF2 nur partiell hemmen konnte.

Durch in silico Versuche wurde gezeigt, dass Biochanin A und in geringerem Maße auch Genistein mit der Serin/Threonin Kinase interagieren.

4.2.4 Testung an Tracheagewebe

An isolierten Luftröhren von Meerschweinchen hemmte Biochanin A die durch Ovalbumin hervorgerufenen Kontraktionen ab einer Konzentration von 10 μ M (Ko et al., 2011).

4.2.5 Testung an Osteoklasten und Osteoblasten

In Osteoblasten von Ratten führte Biochanin A (10⁻⁸ bis 10⁻⁶ M) zu einer signifikanten Preosteoblastenproliferation und einer Differenzierung von Preosteoblasten zu Osteoblasten ($p < 0,05$). Die Osteoblastenmineralisierung wurde erhöht. Außerdem konnte Biochanin A die Proliferation von Preosteoklasten und Osteoklasten hemmen ($p < 0,05$) und die Knochenresorption durch Osteoklasten reduzieren. Die Expression und Aktivität der alkalischen Phosphatase wurde durch Biochanin A erhöht (Su et al., 2013).

4.2.6 Testung an der Prostata

Ein Rotkleeextrakt führte zu einer signifikanten Hemmung von Kontraktionen, die in isolierten Prostatas von Ratten durch Acetylcholin, Noradrenalin und Adenosintriphosphat hervorgerufen wurden (Brandli et al., 2010).

4.2.7 Testung auf antimykotische Wirkung

Saviranta et al. (2008) untersuchten verschiedene Rotkleeextrakte aus Blatt, Stamm, Wurzel und verschieden gefärbten Blüten auf ihre antimykotische Aktivität. Die meisten Extrakte hemmten das Wachstum von *Drechslera teres* und Wurzelextrakte hatten den stärksten Effekt auf *Microdochium nivale*.

4.3 In Vitro Studien zur Rezeptorbindung

Biochanin A und Formononetin wurden auf ihr Potential zur Transaktivierung des Arylhydrocarbon Rezeptor (AhR) an YCM3 Hefezellen getestet.

Beide Isoflavone zeigten starkes AhR Transaktivierungspotential (Biochanin A: $1,3 \times 10^{-7}$ mol/l, Formononetin: $2,5 \times 10^{-7}$ mol/l).

Auch Coumestrol wies agonistisches Potential ($IC_{50} = 1,0 \times 10^{-6}$ mol/l) auf, Daidzein und Genistein hatten keinen agonistischen Effekt am AhR (Medakovic et al., 2008).

Der Peroxisom Proliferator aktivierende Rezeptor γ (PPAR γ) spielt eine wichtige Rolle bei Diabetes Typ 2 und dem metabolischen Syndrom.

Genistein und Biochanin A wurden als starke Liganden (IC_{50} 19,6 μ M bzw. 22,5 μ M) und Aktivatoren (EC_{50} 18,7 μ M bzw. 39,5 μ M) des PPAR γ identifiziert.

Blätter- und Blütenextrakt zeigten ebenfalls signifikante Bindungsaffinitäten (IC_{50} $12,9 \pm 2,3$ μ g/mL bzw. $7,5 \pm 0,9$ μ g/mL) und Transaktivierungsaktivitäten (EC_{50} $28,9 \pm 1,4$ μ g/mL bzw. $23,4 \pm 2,9$ μ g/mL).

Die Transaktivierungsaktivitäten und die Bindungsaffinitäten waren bei einigen Metaboliten höher als bei den genuinen Substanzen. So zeigte z.B. 6-Hydroxydaidzein mit einer IC_{50} von 3,3 μ M die höchste Bindungsaffinität.

6-Hydroxydaidzein und 3'-Hydroxygenistein überschritten mit 117,6% und >137,4% auch die maximale Transaktivierungsaktivität von Rosiglitazon als Positivkontrolle (Mueller et al., 2008).

Pfischer et al. (2008) untersuchten in zwei verschiedenen Hefeassays die Transaktivierungs- und Bindungseigenschaften von Isoflavonen und ihren Metaboliten auf den Östrogen Rezeptor α (ER α) und Östrogen Rezeptor β (ER β), den AR und den PR.

Im Radioligandenassay wiesen Equol und 3'-OH-Genistein die höchste Affinität zu

ER α und ER β auf. Zum AR und PR zeigten alle untersuchten Komponenten (Biochanin A, Formononetin, Genistein, Daidzein, Dihydrobiochanin A, Dihydroformononetin, Dihydrogenistein, Dihydrodaidzein, Equol, Angolensin, Desmethylangolensin, 3'-Hydroxygenistein, 6-Hydroxydaidzein, 6-Hydroxydesmethylangolensin und p-Ethylphenol) nur sehr schwache Bindungsaffinitäten.

Beim Hefetransaktivierungsassay konnte keine der untersuchten Komponenten den PR oder AR aktivieren. Equol und Angolensin zeigten das höchste Transaktivierungspotential für ER α .

Zusammenfassend zeigte sich, dass die Rezeptoraffinität und die Transaktivierungseigenschaften abhängig sind von metabolischen Veränderungen. Partiiell agonistische Eigenschaften wurden durch Reduktion oder Demethylierung, antagonistische Eigenschaften durch Hydroxylierung von Isoflavonen hervorgerufen.

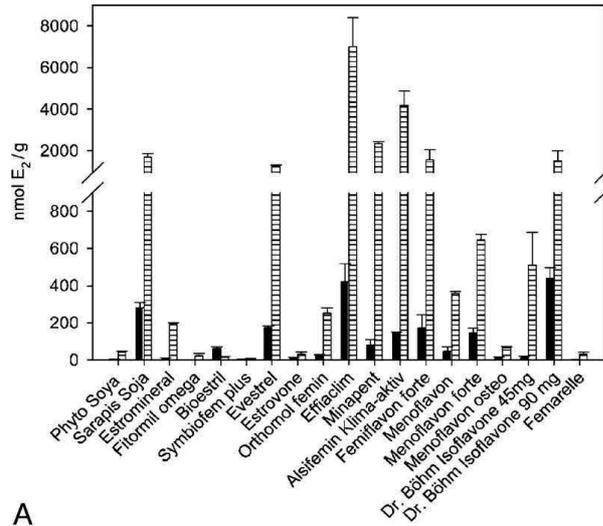
In einem Vergleich von 19 Rotklee- und Sojapräparaten hinsichtlich ihrer Bindungs- und Transaktivierungsaktivitäten gegenüber sechs verschiedenen Rezeptoren (ER α , ER β , AR, PR, PPAR γ und AhR) zeigten die Extrakte Bindungsaktivität zu ER α .

Die Bindungsaktivität zu ER β war höher als zu ER α . Auch an den AR, PR, PPAR γ und ER β Rezeptoren konnte für die meisten Präparate Bindungsaktivität nachgewiesen werden, die am PPAR γ am höchsten war. (s. Abb. 9, S. 21).

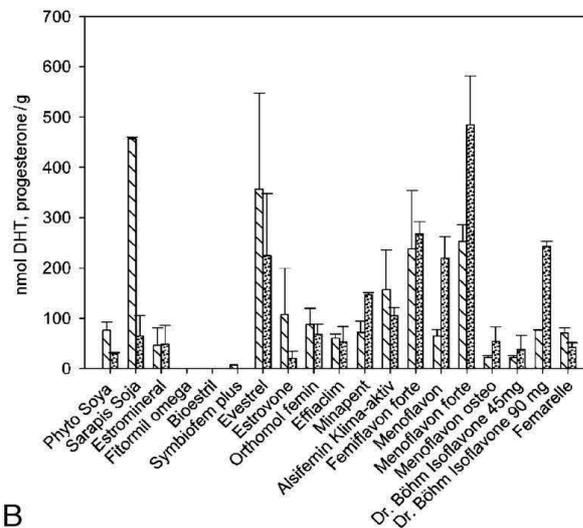
Transaktivierungsaktivität konnte am ER α bei 18 Präparaten, am PPAR γ bei 16 Präparaten und am AhR bei 17 Präparaten festgestellt werden (s. Abb. 10, S. 22) (Reiter et al., 2009).

Mueller et al. (2010) untersuchten die Aktivierung von PPAR α (Peroxisom Proliferator aktivierender Rezeptor α) durch Rotkleeextrakte, deren Komponenten und ihrer Metaboliten in einem Transfektionsassay aus NIH-3T3 Mausfibroblasten mit dem chimären pGAL4-hPPAR α -LBD Expressionsplasmid.

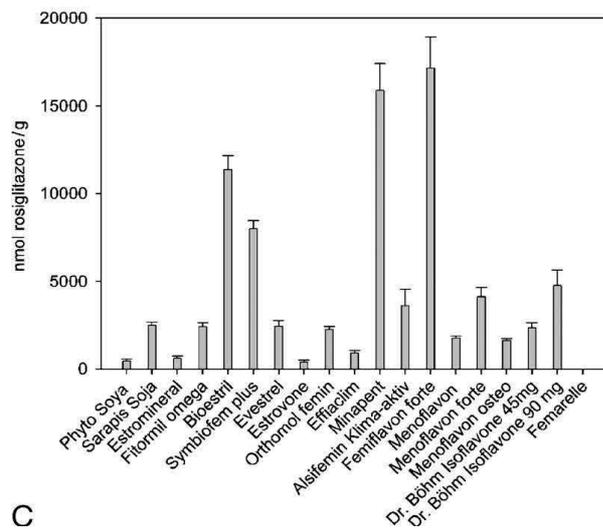
Genistein, Biochanin A aktivierten PPAR α moderat. Durch zwei Rotkleeextrakte kam es zu einer signifikanten Aktivierung, während die Metabolite 6-Hydroxydaidzein und 3'-Hydroxygenistein am stärksten aktivierten.



A

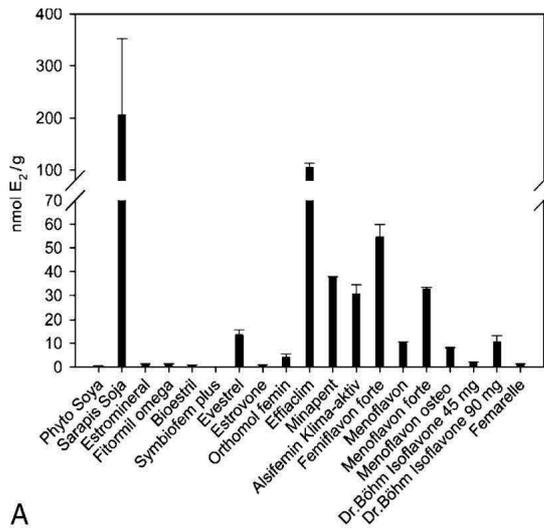


B

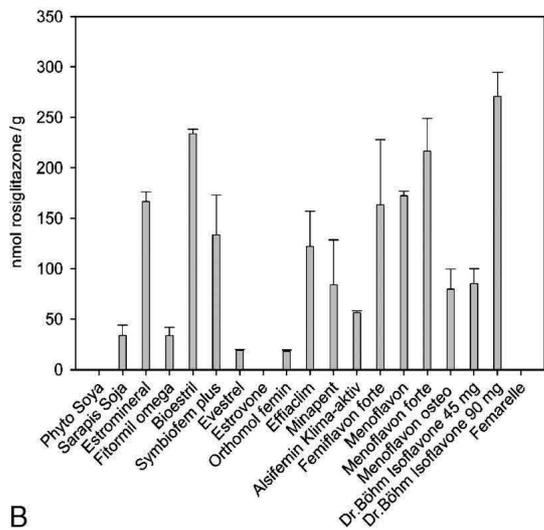


C

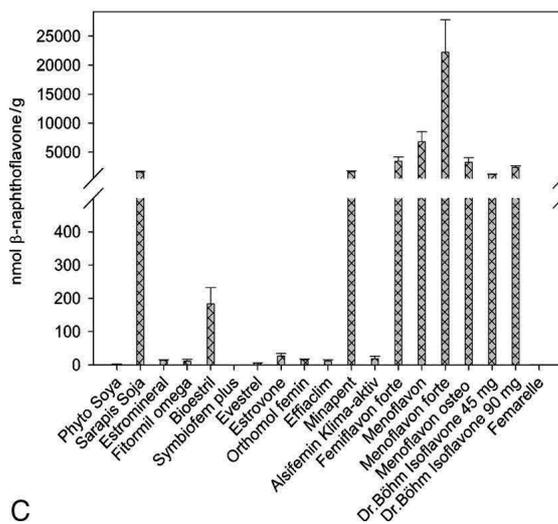
Abb. 9: Bindungsaktivitäten der 19 Rotklee- und Sojapräparate
A: schwarzer Balken: ER α , liniertes Balken: ER β
B: schraffierter Balken: AR, gepunkteter Balken PR
C: PPAR γ (Reiter et al., 2009)



A



B



C

Abb. 10: Transaktivierungsaktivität der 19 Rotklee- und Sojapräparate
A:ER α , **B:** PPAR γ , **C:** AhR (Reiter et al., 2009)

4.4 In Vitro Studien zur Pharmakokinetik

Isoflavone aus 6 Rotkleeprodukten wurden an Caco-2-Zellen getestet. Durch die unterschiedlichen Isoflavonwerte in den Produkten wurde die intestinale Absorptionsrate von Formononetin und Biochanin A beeinflusst. Die Permeabilität von Formononetin und Biochanin A war in allen Proben ähnlich, wurde aber durch die Produktmatrix beeinflusst.

Bei Metabolisierung und Ausscheidung der Isoflavone konnte man feststellen, dass Biochanin A das einzige Isoflavon war, das auf der apikalen als auch auf der basolateralen Seite der Caco-2-Zellschichten deutliche metabolische Peaks zeigte. Das glucuronidierte Biochanin A wurde jeweils über die apikale Seite ausgeschieden ($p < 0,05$).

Die Ausscheidung von glucuronidiertem Biochanin A war in Anwesenheit von Dipyridamol (Inhibitor des Brustkrebs-resistenten Proteins), apikal als auch basolateral um das 7,5 bis 9,4-fache reduziert (Wang et al., 2008 a).

Maul et al. (2011) untersuchten die Glucuronidierung von Irilon durch sechs verschiedene rekombinante Uridindiphosphat-Glucuronosyltransferasen (UDP-GTs bzw. UGT: 1A1, 1A7, 1A8, 1A10 und 2B15) in drei verschiedenen Lebermikrosomen (Mensch, Ratte und Schwein).

Mittels HPLC-MS konnten sie zeigen, dass zwei Monoglucuronide, Irilon-O-4'-monoglucuronid (IRI-C4') von Schweinelebermikrosomen und Irilon-O-5-monoglucuronid (IRI-C5) von menschlichen und Rattenlebermikrosomen gebildet wurden.

Fünf der sechs rekombinanten UDP-GTs konnten Irilon metabolisieren, nur UGT2B15 konnte Irilon nicht glucuronidieren.

Die intrinsische Clearance ergab Werte zwischen 4-100 ml/min*mg, wobei die Umsetzungsraten für UGT1A10 am höchsten und für UGT1A7 am niedrigsten waren.

Singh et al. (2011 b) untersuchten in Plasma und Blut von Ratten die Plasmaproteinbindung und den Verteilungskoeffizienten von Formononetin. Die Plasmaproteinbindung lag bei 93,61% (bei einer Gabe von 50 ng/ml) und 96,14% (bei einer Gabe von 150 ng/ml) und der Verteilungskoeffizient bei $0,94 \pm 0,06$ (50 ng/ml) und $0,93 \pm 0,03$ (150 ng/ml).

Die Permeabilität von Formononetin in einem „parallel artificial membrane permeability assay“ war bei einem pH zwischen 4 und 7 hoch.

5. In Vivo Studien

Die östrogenen Wirkungen von Rotklee wurden in tierexperimentellen Studien an verschiedenen Organen untersucht. Außerdem wurden die Wirkungen von Rotklee auf den Knochenmetabolismus, die Schmerzschwelle, die Wundheilung, die Fließeigenschaften des Blutes und Blutglucose- und Fettwerte untersucht.

5.1 Wirkung auf den Uterus

Da Rotklee in Nahrungsergänzungsmitteln bei menopausalen Beschwerden verwendet wird, untersuchten Overk et al. (2009) den östrogenen Einfluss auf den Uterus. An ovariectomierten Ratten konnten sie herausfinden, dass Rotklee keinen östrogenen Einfluss auf den Uterus hat, da es zu keiner Zunahme des Uterusgewichts kam und die sekundären Parameter (Körpergewicht und Scheidenzellenverhornung) nicht stimuliert wurden.

An weiblichen Kunming Mäusen (n=50) testeten Mu et al. (2009) die östrogenen und antioxidativen Effekte von Formononetin. Die Mäuse wurden in 5 Gruppen eingeteilt, eine scheinoperierte, eine OVX, eine mit Stilbestrol Ersatztherapie (0,20 mg/kg Tag) behandelte, eine, die niedrig dosiertes Formononetin (0,05 g/kg Tag) und eine, die hoch dosiertes Formononetin (0,5 g/kg Tag) erhielt.

Als Maß für östrogene Effekte von Formononetin wurde das Uterusgewicht herangezogen. In der hoch dosierten Formononetin Gruppe war die Zunahme geringer als in der niedrig dosierten.

Antioxidative Effekte wurden, durch die Erhöhung der Superoxiddismutase-, Katalase- und Glutathionperoxidase-Aktivität und einer Erniedrigung der Malonaldehydproduktion in Serum und Organen (Leber, Herz und Niere) nachgewiesen.

Adaikan et al. (2009) verglichen den Einfluss von Östradiol, Daidzein und einem Rotkleeextrakt an ovariectomierten Kaninchen, die täglich peroral entweder Östradiol (100 µg/kg), Daidzein (100 µg/kg) oder Extrakt (6,68 mg/kg) für 12 Wochen erhielten.

Das Extrakt bewirkte keine signifikanten Veränderungen des Uterusgewichts. Nach Stimulierung des Beckennervs stieg der vaginale Blutfluss durch das Rotkleeextrakt um 59,98% und durch Daidzein um 116,74% an. Die Knochenmineraldichte war in Extrakt-Gruppe (0,4012 g/cm²) am höchsten. Strukturelle Veränderungen des Klitoriswellkörpers, die durch Ovariectomie entstehen, konnten durch den Extrakt als auch durch Daidzein und Östradiol verhindert werden (s. Abb. 11, S. 25)

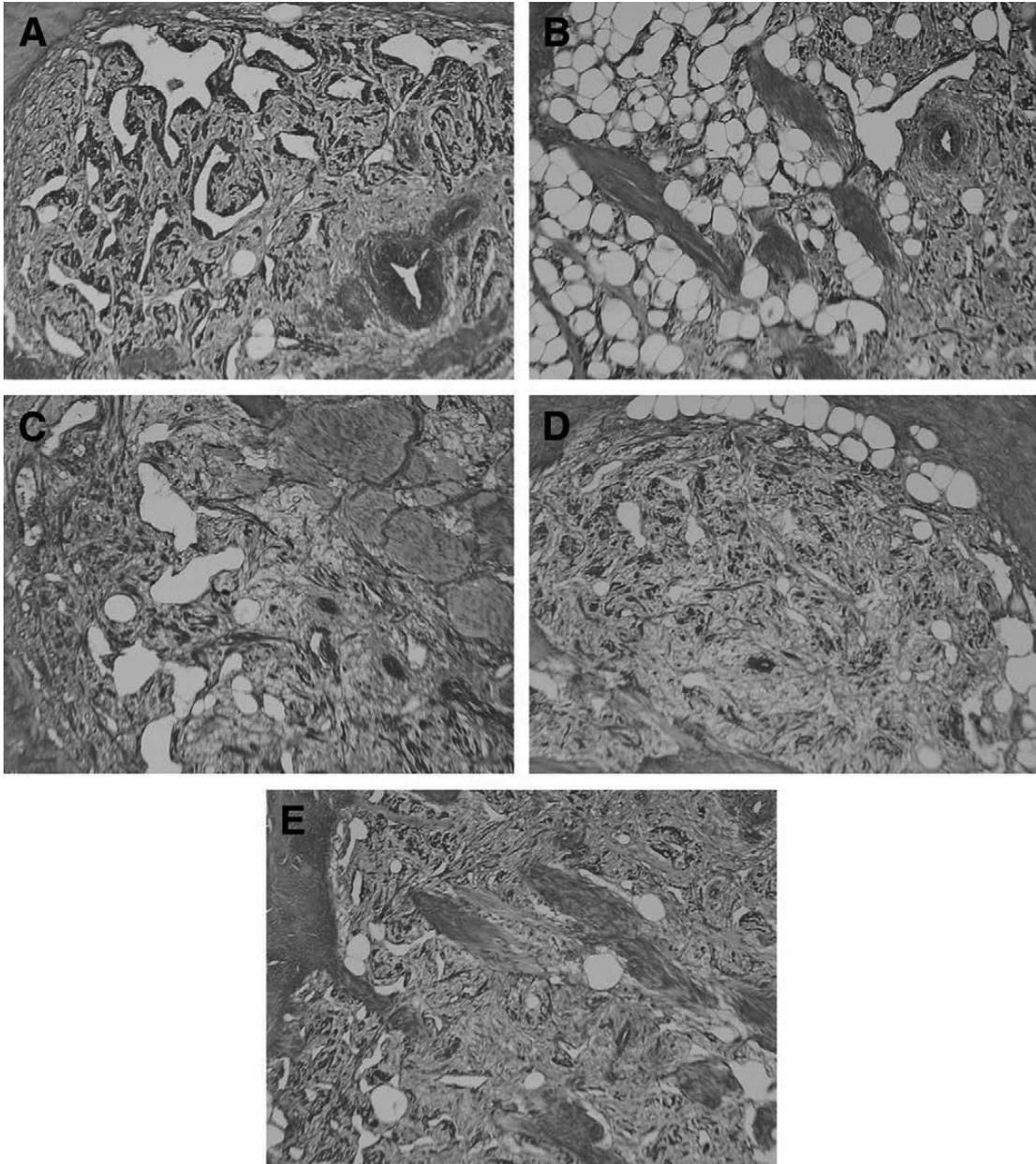


Abb. 11: Strukturelle Veränderungen des Klitorisschwellkörpers
A: Kontrollgruppe, B: OVX Gruppe, C: Östradiol Behandlung, D: Daidzein Behandlung
E: Rotklee Behandlung (Adaikan et al., 2009)

Die östrogenen Effekte von perinataler Rotkleeernährung bzw. Östradiol auf weibliche Jungtiere wurden an trächtigen Ratten untersucht, die entweder normales Futter, Futter mit 7,5% Rotklee oder mit Östradiol (12,5 µg/Ratte/Tag) erhielten. Am 21. Tag nach der Geburt wurden die weiblichen Jungtiere getötet und Gewebeproben entnommen.

Die relativen Uterus- und Eierstockgewichte waren in der Rotklee-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Ebenfalls erhöht war die Zahl der uterinen Drüsen, die luminal Epithelzellgröße und das Volumen des Endometriums. Die Expression von ERα und PR im luminalen und glandulären Epithelium war im Vergleich zur Kontrolle unverändert (s. Tab. 1 und 2) (Yatkin et al., 2011).

	Control	<i>T. pratense</i>	Estradiol
Body weights (g)	23.89 ± 2.41	21.4 ± 1.66	19.87 ± 0.43
Relative ovaria weights	5.98 ± 0.19	6.87 ± 0.2*	5.68 ± 0.27
Relative uterus weights	5.85 ± 0.24	7.23 ± 0.21*	7.14 ± 0.42*

Tab. 1: Körpergewicht, relative Uterus- und Eierstockgewichte (nach Yatkin et al., 2011)

	Control	<i>T. pratense</i>	Estradiol
Number of uterine glands	2.19 ± 0.10 (81)	2.49 ± 0.12* (50)	2.93 ± 0.09* (52)
Luminal epithelial cell height (µm)	11.34 ± 0.11 (189)	11.99 ± 0.07* (228)	12.22 ± 0.08* (184)

Tab. 2: Anzahl der uterinen Drüsen und luminal Epithelzellgröße (nach Yatkin et al., 2011)

5.2 Wirkung auf das Endometrium

Alves et al. (2008) untersuchten die Wirkung von Rotklee auf das Endometrium an kastrierten, weiblichen Wistar-Ratten, die peroral Placebo, Östradiol (0,029 mg/kg) oder Rotklee (1,15 mg/kg) täglich über 28 Tage erhielten.

Das Endometrium blieb unter Rotkleebehandlung atrophisch. Im Vergleich zu der Placebogruppe führte das Rotkleeextrakt zu einer erhöhten Expression von ERα und einer niedrigeren Ki67 Expression.

5.3 Wirkung auf die Keimdrüsen

Japanische Wachtelhühner erhielten 20%, 40% bzw. 60% Rotklee als Futterzusatz, der entweder normal bewässert (IRC) oder Trockenstress ausgesetzt (NIRC) war, um herauszufinden, ob Trockenstress die östrogene Aktivität des Pflanzenmaterials beeinflusst.

Mit einem Luziferase Assay konnte gezeigt werden, dass IRC Extrakte eine höhere östrogene Aktivität hatten als NIRC Extrakte.

Rotkleezusatz führte zu einer signifikant verzögerten Gewichtszunahme, wobei IRC stärker wirkte als NIRC. Das absolute und relative Gewicht der Hoden wurde durch IRC und NIRC herabgesetzt. Während das absolute Eileitergewicht mit steigender Rotklee-Dosis immer mehr abnahm, erhöhte sich das relative Eileitergewicht in der 60% IRC Gruppe. Bei den Eierstockgewichten führte IRC vor allem in höheren Dosen zu einem stärker verminderten Gewicht als NIRC.

Während verminderte Serumproteinwerte in der 40% und 60% IRC Gruppe beobachtet wurden, veränderten sich die Vitellogeninwerte nicht (Rochester et al., 2008).

5.4 Wirkung auf Brustgewebe und Brustdrüsen

An ovariectomierten Mäusen, denen MCF-7 Zellen implantiert wurden, zeigte sich, dass die orale Gabe von 500 ppm eines DMSO-Extraktes aus Rotklee das Wachstum von MCF-7 Tumoren signifikant stimulierte ($p < 0,05$), während bei 1000 ppm Extrakt kein Effekt beobachtet wurde. Außerdem zeigte sich bei Tumoren in der Testgruppe mit 500 ppm Einnahme eine um das 3,1 fache erhöhte pS2 Expression ($p < 0,05$).

Durch Untersuchung des Uterusgewichts in den Testgruppen wurde nachgewiesen, dass das Extrakt keinen uterotrophen Effekt hervorrief (Ju et al, 2008).

Mishra et al. (2009) untersuchten an präpubertären Ratten den Einfluss von Biochanin A auf die Differenzierung und Proliferation von Brustepithelzellen sowie die Expression von ER α in Brustdrüsen. Ratten erhielten 16, 18 und 20 Tage nach der Geburt entweder Biochanin A (500 μ g/g KG), Estradiolbenzoat (EB, 500ng/g KG) oder DMSO (500 μ g/g KG) subcutan.

Nach 21 (PND 21) oder 50 (PND 50) Tagen nach der Geburt wurden die Brustdrüsen entnommen und eine erhöhte Differenzierung der Brustdrüsen durch Biochanin A anhand der größeren Zahl der terminalen Endknospen der terminalen Kanäle und der Lobuli nach 21 Tagen festgestellt. Der Effekt von Biochanin A war mit EB vergleichbar.

In der Biochanin A und der EB Gruppe zeigte sich eine verringerte ER α Expression bei PND 21 ($42,5 \pm 1,4\%$, $p < 0,001$ und $38,8 \pm 0,9\%$, $p < 0,05$ verglichen mit der Kontrollgruppe: $45,9 \pm 0,5\%$) und eine erhöhte ER α Expression bei PND 50 (120% , $p < 0,001$ und 123% , $p < 0,001$ verglichen mit der Kontrollgruppe: $33,9 \pm 0,51\%$). Das Bcl2/Bax Verhältnis war bei PND 50 erhöht ($20,1 \pm 1,35\%$, $p < 0,001$ und $22,5 \pm$

1,46%, $p < 0,001$ verglichen mit der Kontrollgruppe: $16,6 \pm 0,41\%$), nicht aber bei PND 21. Die bei PND 50 erhöhten Caspase-3 Werte wiesen auf verstärkte Apoptose hin.

Chen et al. (2011) testeten die Auswirkungen von Formononetin (15, 30 bzw. 60 mg/kg/d i.p. für 20 Tage) auf das Tumorwachstum von nackten Mäusen mit Xenotransplantaten von MCF-7-Zellen. Dabei konnte Formononetin dosisabhängig das lokale Tumorwachstum hemmen und im Vergleich zur Kontrollgruppe das Tumorgewicht um 39,6% senken.

5.5 Wirkung auf die Leber

An ovariectomierten Ratten wurde ein isoflavonreicher Rotkleeextrakt hinsichtlich Fettmetabolismus und Gen- und Proteinexpression in der Leber untersucht. Die Ratten erhielten 450 mg Rotkleeextrakt/kg für 4 Tage. Danach wurden Blutproben gesammelt und die Leber auf ihre unterschiedliche Genexpression mittels DNA-Microarrays untersucht.

Das Rotkleeextrakt führte zu verminderten Plasma HDL-, LDL- und Cholesterin-Werten ($p < 0,05$), während der Triglycerid-Spiegel stieg (s. Tab. 3). Durch das Extrakt wurde die HMG-CoA-Reduktase, die Farnesyldiphosphat Farnesyltransferase 1, die Lanosterin Synthase und CYP P450 17a signifikant herunterreguliert. Oxidative Gene wie Nicotinamidadeninindinukleotid Dehydrogenase und Peroxiredoxin 6 wurden ebenfalls herunterreguliert. Diese Prozesse könnten für die Beeinflussung der Blutfette verantwortlich sein (Pakalapati et al., 2009).

Treatment group	Uterus weight (mg/100 g body weight)	Cholesterol (mg/dl)	Triglycerides (mg/dl)	HDL (mg/dl)	LDL (mg/dl)
Agar control (n = 5)	17.3 ± 2.3	80.6 ± 13.1	49.8 ± 15.8	60.4 ± 9.2	10.4 ± 2.3
Red clover extract (PSC 0319) (n = 5)	$16.3 \pm 2.5^*$	71.8 ± 9.5	$57.0 \pm 12.5^*$	51.3 ± 9.0	$8.8 \pm 2.5^*$

All values are represented as mean \pm SEM.

* $p < 0.05$.

Tab. 3: Effekt der Rotkleebehandlung auf Uterusgewicht, Plasmacholesterin, Triglycerid, HDL und LDL Konzentrationen (nach Pakalapati et al., 2009)

An weiblichen und männlichen Ratten führte Biochanin A (2, 10 bzw. 50 mg/kg/Tag für eine Woche) in Leber und Darm zur verstärkten Expression der Sulfotransferase 1A1, 2A1 und östrogenen Sulfotransferase, die über den Transkriptionslevel induziert werden (Chen et al., 2010 b).

Dass Biochanin A die chronische Zerstörung der Leber durch CCl₄ schützt, zeigten Breikaa et al. (2013) an ihrem Versuch an männlichen Ratten. Tiere der Gruppe A dienten als Kontrolle, Gruppe B erhielt CCl₄ (1 ml/kg intraperitoneal, 2mal wöchentlich), Gruppe C wurde mit Biochanin A (50 mg/kg intraperitoneal, 3mal wöchentlich) vorbehandelt, an den Biochanin A freien Tagen mit CCl₄ behandelt und Gruppe D erhielt nur Biochanin A, jeweils für sechs Wochen.

Die Behandlung mit CCl₄ führte zu einer Erhöhung der Aspartataminotransferase um das 1,8 fache, der Alaninaminotransferase um das 1,5 fache, des Totalcholesterins und der Triglyceride um das Doppelte, der alkalische Phosphatase um das 1,7 fache und des Totalbilirubins 1,5 fache. Durch die Vorbehandlung mit Biochanin A konnten diese Werte normalisiert und die Erhöhung des Leberindex' signifikant reduziert werden.

Die CCl₄ Behandlung beeinflusste die hepatische Effizienz durch Senkung der Eliminationsrate (um die Hälfte) und der Clearance (um 23%) und durch Erhöhung der Halbwertszeit, der Area under the curve (AUC) und des Verteilungsvolumens (um das 4; 1,4 und 3,2 fache). Vorbehandlung mit Biochanin A führte zu einer 1,5 bzw. 1,2 fachen Erhöhung der Eliminationsrate und der Clearance und einer Senkung von Halbwertszeit, AUC und Verteilungsvolumen (um das 3; 1,3 und 2,7 fache). Der Abbau von Albumin, Totalproteinen und IGF-1 durch CCl₄ konnte durch Vorbehandlung mit Biochanin A verhindert werden. Die CYP2E1 Aktivität und die CYP1A1 Expression erhöhten sich durch CCl₄ und wurden durch Biochanin A Vorbehandlung gesenkt.

Die Marker für oxidativen Stress (Malondialdehyd, Glutathion, Antioxidative Kapazität, Superoxid-Dismutase und Katalase), Entzündung (TNF α , NO, COX2 und iNOS) und Fibrose (TGF- β 1), die durch CCl₄ Behandlung verändert wurden, konnten durch Biochanin A Vorbehandlung wieder normalisiert werden.

Die Vorbehandlung mit Biochanin A hemmte auch die Expression von NF- κ B und verbesserte die Nekrose der Leber, die durch CCl₄ verursacht wurde.

5.6 Wirkung auf die Prostata

Ein kommerzielles Rotkleeextrakt zeigte an Ratten Wirkung auf die Kontraktionen der glatten Muskulatur der Prostata.

Mit einer IC₅₀ von 68,9 μ g/ml reduzierte das Rotkleeextrakt die durch elektrische Feldstimulation hervorgerufene Kontraktion der glatten Muskulatur in der Prostata (p=0,005). Die aus dem Extrakt isolierten Isoflavone Formononetin (0,1 mM) und Biochanin A (0,1 mM) hemmten die Kontraktionen in gleicher Weise wie kommerzielles Formononetin und Biochanin A (Brandli et al., 2010).

5.7 Wirkung auf die Lunge

In Mäusen, die mit Ovalbumin sensibilisiert waren, konnte durch Biochanin A (100 μ mol/kg p.o.) der durch Methacholin erhöhte Atemwegswiderstand und die

verlängerten Pausen reduziert und die dynamische Lungencompliance verbessert werden.

In der bronchoalveoläre Lavage (BALF) der sensibilisierten Mäuse kam es zu einer Reduktion von inflammatorischen, neutrophilen und eosinophilen Zellen sowie einer Hemmung der Zytokine IL-2, IL-4, IL-5 und TNF α . Die Interferon γ -Werte blieben unbeeinflusst. Die Immunglobulin (Ig) G₂-Werte in Serum und BALF wurden durch Biochanin A (100 μ M/kg) verbessert und die Erhöhung der Total- und Ovalbumin-spezifischen IgE Werte unterdrückt.

Das Verhältnis hohe zu niedrige Phosphodiesterase 4 Affinität für Biochanin A lag bei >35 (Ko et al., 2011).

5.8 Wirkung auf den Knochenmetabolismus

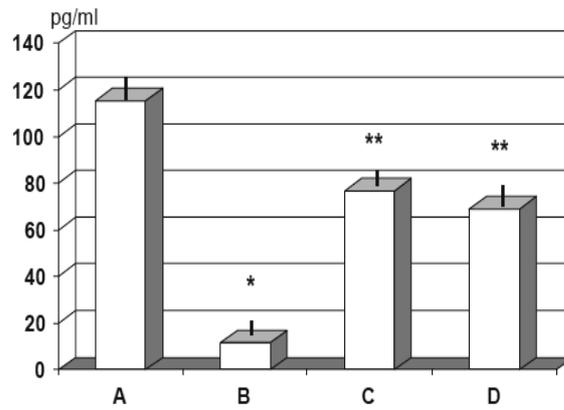
Den Effekt auf den Knochenmetabolismus von weiblichen Ratten durch ein Rotkleeextrakt (mit 40% Isoflavonen) und einem alkalischen Supplement mit Kalzium- und Natriumbicarbonat, Magnesium- und Kaliumcarbonat und Dinatriumphosphat untersuchten Kawakita et al. (2009). OVX Tiere erhielten entweder normales Futter (OVX), Rotkleeextrakt (RCE) oder Rotkleeextrakt kombiniert mit alkalischen Supplement (RCE+BP).

Die Ovariectomie führte zu einer 70% Erniedrigung des Uterusgewichtes ($p < 0,01$), dagegen konnte die Fütterung mit RCE oder RCE+BP den Verlust auf 50% beschränken ($p < 0,05$) (s. Abb. 12, S. 31). In der RCE und der RCE+BP Gruppe waren die Östradiolwerte ($p < 0,05$) (s. Abb. 12, S.31) erhöht und der Oberschenkelhals stabiler, verglichen mit der OVX Gruppe. RCE und RCE+BP Behandlung führte zu einer Normalisierung, der durch OVX erhöhten Osteocalcinwerte (s. Abb. 12, S. 31) und der Ausscheidung von DPD.

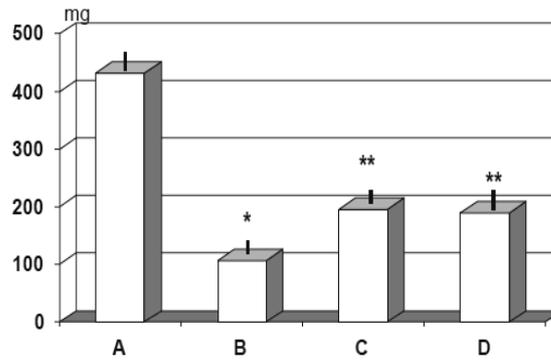
In der OVX Gruppe zeigte sich ein 20% Verlust der Knochenmineraldichte ($p < 0,05$) und eine Verringerung des Verhältnisses Knochenmineralgehalt/Körpermasse ($p < 0,05$). RCE und RCE+BP Behandlung wirkten diesen Veränderungen entgegen ($p < 0,05$ verglichen mit OVX Gruppe) (s. Abb. 13, S. 32). Die RCE und RCE+BP Behandlung konnte auch die 48% Abnahme der trabekulären Knochenmasse des Schenkelhalses verhindern, die in der OVX Gruppe auftrat (s. Abb. 13, S. 32).

Die Ovariectomie führte zu einer 80%-Erhöhung der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase, die durch RCE und RCE+BP Behandlung auf einen Anstieg von 15–35% ($p < 0,01$) verringert werden konnte und der durch die Behandlung mit RCE+BP effektiver entgegengewirkt wurde als durch RCE ($p < 0,05$).

Estradiol level



Uterus weight



Osteocalcin level

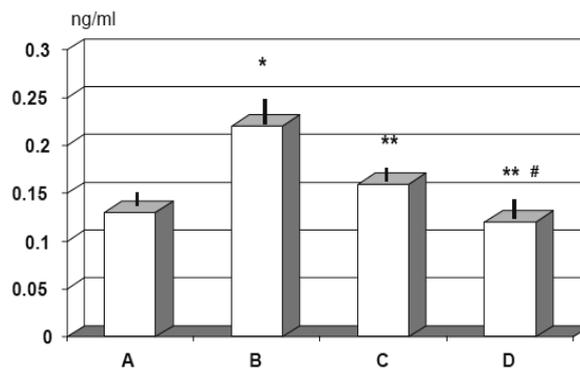
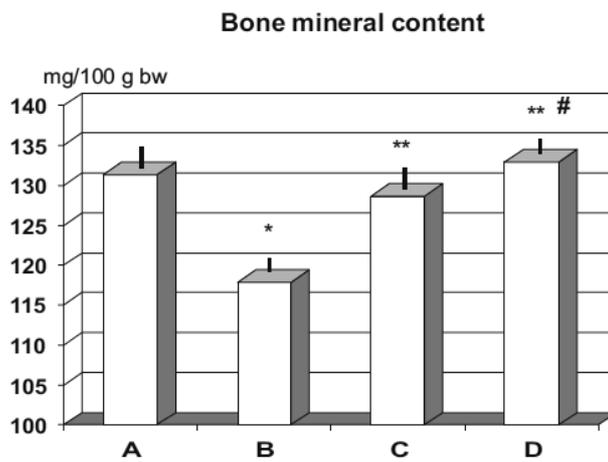
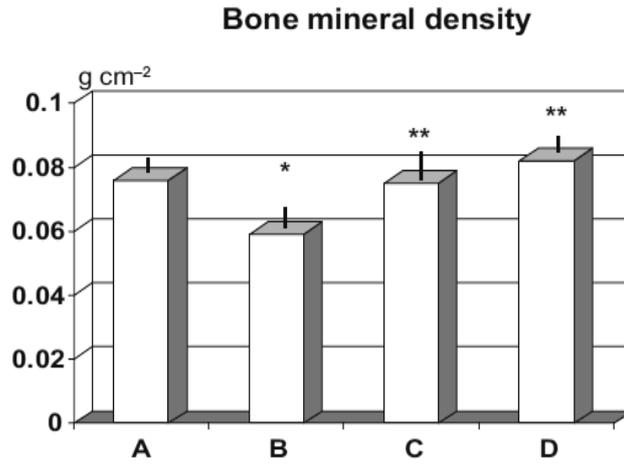


Abb. 12: Östradiolwerte, Uterusgewicht und Osteocalcinwerte der Gruppen A (Scheinoperiert), B (Ovariectomie), C (Ovariectomie und RCE) und D (Ovariectomie mit RCE und BP)

*: $p < 0,01$ gegenüber Gruppe A, **: $p < 0,05$ gegenüber Gruppe B, #: $p < 0,05$ gegenüber Gruppe C (nach Kawakita et al., 2009)



Percentage of cancellous bone mass in the femoral neck

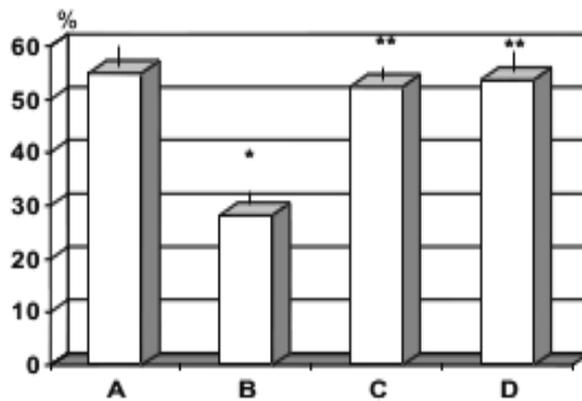


Abb. 13: Knochenmineraldichte und Knochenmineralgehalt/Körpermasse, sowie Prozentsatz der trabekulären Knochenmasse des Schenkelhalses der Gruppen A (Scheinoperiert), B (Ovariectomie), C (Ovariectomie und RCE) und D (Ovariectomie mit RCE und BP)

*: $p < 0,01$ gegenüber Gruppe A, **: $p < 0,05$ gegenüber Gruppe B, #: $p < 0,05$ gegenüber Gruppe C (nach Kawakita et al., 2009)

Die Entwicklung von Osteoporose an ovariectomierten, weiblichen Ratten durch die Behandlung mit einem Rotkleeextrakt wurde an zahlreichen Parametern untersucht. OVX Tiere erhielten peroral entweder Leitungswasser, Rotklee (10 mg bzw. 20 mg/kg) bzw. Östradiol (0,2 mg/kg). Eine schein-operierte Gruppe diente als Kontrolle.

Durch die Ovariectomie sank das Uterusgewicht und Serumöstradiol während Körpergewicht und Thymusmasse erhöht wurden. Die Behandlung mit Rotklee hatte keinen Effekt während die Östradiolbehandlung den Veränderungen des Uterus- und Körpergewichts entgegenwirkte (s. Tab. 4)

Der Rotkleeextrakt in beiden Dosierungen konnte den Kalzium- und Phosphorgehalt in Tibia und L4-Wirbeln erhöhen (s. Tab. 5, S. 34).

Die Festigkeit der tibialen Metaphyse wurde durch Ovariectomie erniedrigt, aber durch die Rotkleeextrakte sowie Östradiol erhöht (s. Tab. 6, S. 34).

Die Rotkleeextrakte erhöhten die mechanische Eigenschaft der femoralen Diaphyse (s. Abb. 14, S. 35 und Tab. 7, S.35), während sie keinen Einfluss auf die Festigkeit des Oberschenkelhalses hatten (s. Abb. 15, S. 36).

Die Breite der trabekulären Epiphyse und Metaphyse konnte durch die Rotkleeextrakte erhöht werden (s. Tab. 8, S. 36)

Die durch die Ovariectomie verursachte Erhöhung der Osteocalcin- und RatLaps Werte (Marker für die Knochenresorption) wurde durch die Rotkleebehandlung nicht beeinflusst, während Östrogen die Werte normalisierte (s. Tab. 9, S. 36) (Cegiela et al., 2012).

Parameters	Sham-operated rats	OVX rats			
		Control	TP10	TP20	Estradiol
Final body mass (g)	234.8 ± 3.6	263.1 ± 4.5***	263.9 ± 3.9***	265.2 ± 4.6***	250.6 ± 5.0*
Body mass gain after 28 days (g)	16.5 ± 2.4	39.0 ± 2.5***	38.3 ± 2.0***	40.7 ± 3.3***	25.6 ± 2.9***
Uterus mass (mg/100 g of body mass)	235.66 ± 27.70	35.09 ± 1.81***	39.39 ± 1.67***	37.19 ± 1.79***	67.31 ± 4.89*****
Thymus mass (mg/100 g of body mass)	130.07 ± 11.12	196.83 ± 9.25**	201.27 ± 13.81**	196.57 ± 11.35*	181.74 ± 15.74**
Estradiol (pg/mL)	20.64 ± 3.05	10.37 ± 0.80*	9.34 ± 0.44**	10.95 ± 1.07*	13.84 ± 1.26

Tab. 4: Uterusgewicht, Serum Östradiol, Körpergewicht und Thymusmasse

TP10: Rotklee 10mg/kg, TP20: Rotklee 20mg/kg

*: p < 0,05; **: p < 0,01; *** p < 0,001 signifikanter Unterschied zur Schein-operierten Gruppe

••: p < 0,01 ; •••: p < 0,001 signifikanter Unterschied zur OVX Kontrollgruppe

(nach Cegiela et al., 2012)

Parameters		Sham-operated rats	OVX rats			
			Control	TP10	TP20	Estradiol
Calcium content (mg/g of mineral mass)	Femur	382.79 ± 4.77	379.61 ± 4.73	394.26 ± 4.06	395.70 ± 6.08	391.82 ± 5.48
	Tibia	397.83 ± 3.93	406.06 ± 9.05	439.05 ± 9.18***	446.67 ± 11.49***	425.57 ± 14.43
	L-4 vertebra	409.72 ± 7.67	409.35 ± 5.82	451.76 ± 9.76****	453.69 ± 12.65****	427.06 ± 12.12
Phosphorus content (mg/g of mineral mass)	Femur	161.50 ± 1.73	160.89 ± 1.60	164.47 ± 1.38	164.41 ± 1.32	162.48 ± 3.25
	Tibia	154.36 ± 2.17	153.32 ± 2.65	168.61 ± 3.99**	168.28 ± 4.36**	153.65 ± 3.31
	L-4 vertebra	165.01 ± 2.07	163.93 ± 2.91	176.66 ± 2.97**	178.18 ± 5.12**	171.48 ± 3.45

Tab. 5: Kalzium- und Phosphorgehalt

TP10: Rotklee 10mg/kg, TP20: Rotklee 20mg/kg

*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ signifikanter Unterschied zur Schein-operierten Gruppe

•: $p < 0,05$; ••: $p < 0,01$ signifikanter Unterschied zur OVX Kontrollgruppe

(nach Cegiela et al., 2012)

Parameters	Sham-operated rats	OVX rats			
		Control	TP10	TP20	Estradiol
Maximum load (N)	120.63 ± 3.95	66.85 ± 3.56***	79.66 ± 2.86****	77.12 ± 2.86****	90.38 ± 3.08*****
Displacement for maximum load (mm)	0.84 ± 0.06	0.90 ± 0.07	0.82 ± 0.03	0.89 ± 0.06	0.82 ± 0.05
Energy for maximum load (mJ)	52.02 ± 4.36	39.20 ± 4.61**	36.58 ± 2.67**	37.77 ± 2.86**	39.93 ± 2.91**
Maximum stress (MPa)	103.82 ± 4.23	54.82 ± 4.38***	60.05 ± 2.69***	59.65 ± 2.77***	73.74 ± 4.07*****
Young's modulus (MPa)	3410.78 ± 237.74	2318.16 ± 182.21**	2149.64 ± 178.89***	2417.34 ± 140.06***	2770.31 ± 286.73

Tab. 6: Festigkeit der tibialen Metaphyse

TP10: Rotklee 10mg/kg, TP20: Rotklee 20mg/kg

** : $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ signifikanter Unterschied zur Schein-operierten Gruppe

• : $p < 0,05$; •• : $p < 0,01$; ••• : $p < 0,001$ signifikanter Unterschied zur OVX Kontrollgruppe

(nach Cegiela et al., 2012)

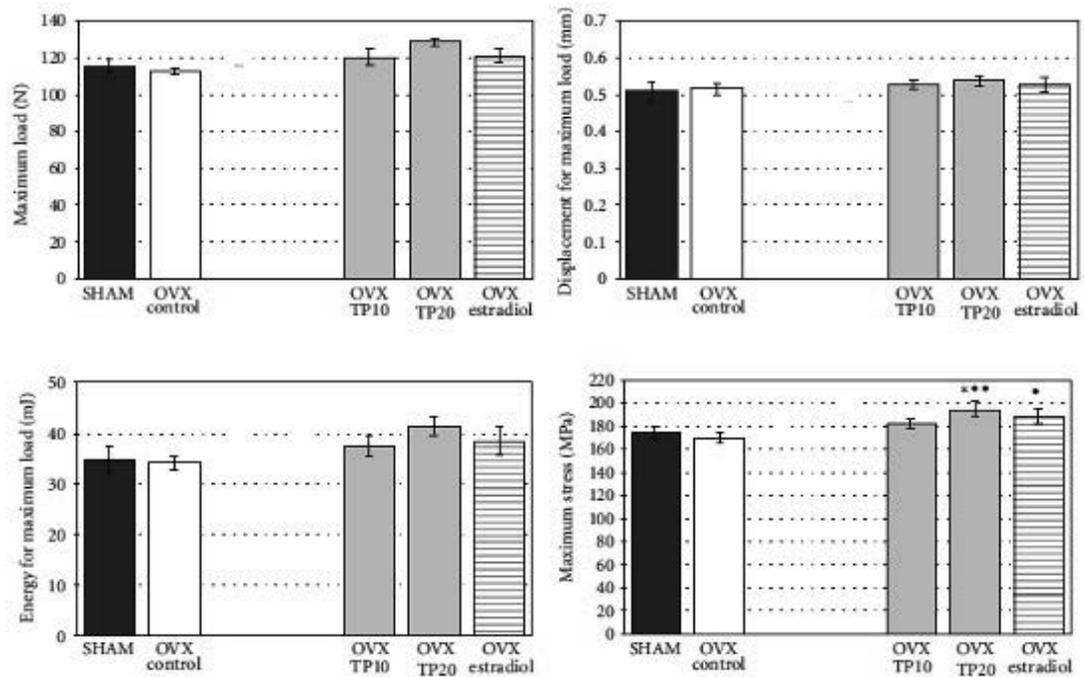


Abb. 14: Mechanische Eigenschaften der femoralen Diaphyse

TP10: Rotklee 10mg/kg, TP20: Rotklee 20mg/kg

*: $p < 0,05$ signifikanter Unterschied zur Schein-operierten Gruppe

•: $p < 0,05$; ••: $p < 0,01$; signifikanter Unterschied zur OVX Kontrollgruppe

(nach Cegiela et al., 2012)

Parameters	Sham-operated rats		OVX rats		
	Control	Control	TP10	TP20	Estradiol
Fracture load (N)	114.56 ± 3.94	111.98 ± 2.33	116.84 ± 4.00	127.66 ± 2.66**	120.15 ± 3.80
Displacement for fracture load (mm)	0.52 ± 0.03	0.52 ± 0.02	0.55 ± 0.02	0.56 ± 0.02	0.54 ± 0.02
Energy for fracture load (mJ)	35.69 ± 2.75	34.71 ± 1.55	40.04 ± 2.89	43.73 ± 2.66	40.56 ± 3.58
Stress for fracture load (MPa)	172.68 ± 5.76	169.16 ± 5.34	178.01 ± 3.63	193.34 ± 6.89**	187.79 ± 7.14*
Young's modulus (MPa)	9368.24 ± 430.74	8679.70 ± 689.37	9356.92 ± 148.39	8759.22 ± 1028.53	9687.52 ± 654.88

Tab. 7: Mechanische Eigenschaften der femoralen Diaphyse

TP10: Rotklee 10mg/kg, TP20: Rotklee 20mg/kg

*: $p < 0,05$ signifikanter Unterschied zur Schein-operierten Gruppe

•: $p < 0,05$; ••: $p < 0,01$ signifikanter Unterschied zur OVX Kontrollgruppe

(nach Cegiela et al., 2012)

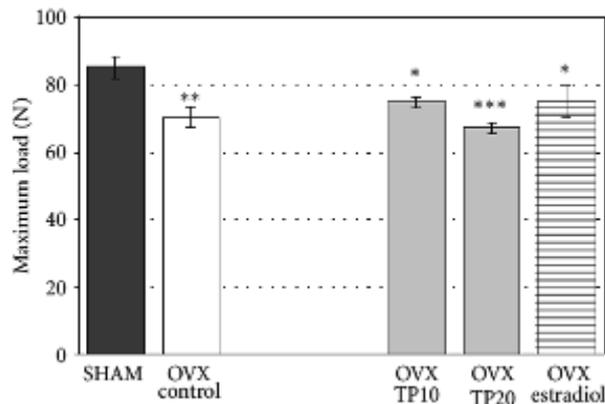


Abb. 15: Festigkeit des Oberschenkelhalses

TP10: Rotklee 10mg/kg, TP20: Rotklee 20mg/kg

*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ signifikanter Unterschied zur Schein-operierten Gruppe (nach Cegiela et al., 2012)

Parameters		Sham-operated rats	OVX rats			
		Control	TP10	TP20	Estradiol	
Width of trabeculae (μm)	Epiphysis	58.76 ± 0.79	53.47 $\pm 1.09^{**}$	57.85 $\pm 1.26^*$	59.42 $\pm 1.35^{**}$	60.53 $\pm 1.49^{**}$
	Metaphysis	36.04 ± 0.59	32.98 $\pm 0.86^{**}$	36.23 $\pm 0.70^*$	37.46 $\pm 1.35^{**}$	38.49 $\pm 1.78^*$

Tab. 8: Breite der trabekulären Epiphyse und Metaphyse

TP10: Rotklee 10mg/kg, TP20: Rotklee 20mg/kg

** : $p < 0,01$ signifikanter Unterschied zur Schein-operierten Gruppe
 • : $p < 0,05$; •• : $p < 0,01$ signifikanter Unterschied zur OVX Kontrollgruppe (nach Cegiela et al., 2012)

Parameters	Sham-operated rats	OVX rats			
	Control	TP10	TP20	Estradiol	
Osteocalcin (ng/mL)	238.30 ± 27.70	325.47 ± 26.72	344.84 ± 38.73	332.50 ± 39.91	254.33 ± 17.13
RatLaps (ng/mL)	20.88 ± 1.82	30.89 $\pm 1.44^{**}$	32.99 $\pm 1.78^{***}$	28.59 $\pm 2.09^*$	23.39 $\pm 2.80^*$

Tab. 9: Osteocalcin und RatLap Werte

TP10: Rotklee 10mg/kg, TP20: Rotklee 20mg/kg

*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ signifikanter Unterschied zur Schein-operierten Gruppe
 • : $p < 0,05$ signifikanter Unterschied zur OVX Kontrollgruppe (nach Cegiela et al., 2012)

Kaczmarczyk-Sedlak et al. (2013) untersuchten ebenfalls an weiblichen OVX Ratten den Effekt von Formononetin (10 mg/kg peroral über 4 Wochen) bzw. Östradiol (0,2 mg/kg peroral) auf die mechanischen Eigenschaften und den chemischen Aufbau des Knochens.

OVX Tiere hatten ein verringertes Uterus- sowie ein erhöhtes Körper- und Thymusgewicht. Formononetin hatte keinen Einfluss auf diese Werte, während Östradiol das Uterusgewicht an hob und Körper- und Thymusgewicht senkte (s. Tab. 10).

Die Ovariectomie und das daraus resultierende Hormondefizit führten zu einer Verringerung des Gewichts, der Festigkeit, des Mineralgehalts und des Kalziumgehaltes von Tibia, Femur und L4-Wirbeln sowie dem Durchmesser von Tibia und Femur. Der Wassergehalt und der organische Substanzgehalt waren für Tibia, Femur und L4-Wirbeln erhöht.

Die Behandlung mit Östradiol führte zu einer weitgehenden Normalisierung dieser Werte. Die mechanischen Parameter der Tibia wurden am geringsten positiv beeinflusst.

Formononetin konnte die mechanischen Eigenschaften des Knochens im geringeren Ausmaß als Östradiol verbessern, sowie das Gewicht von Tibia (um 2,2%), Femur (um 4,4%) und L4-Wirbeln (um 9,8%) und dem Durchmesser von Femur (um 3,5%) und Tibia (um 4,7%) erhöhen.

Die Festigkeit der femoralen Diaphyse und tibialen Metaphyse wurde durch Ovariectomie verschlechtert. Behandlung mit Formononetin verbesserte die Festigkeit beider, aber im geringeren Ausmaß als Östradiol, während der Elastizitätswert durch Formononetin mehr angehoben wurde als durch Östradiol. Auf die Festigkeit des Oberschenkelhalses hatte Formononetin keinen Einfluss (s. Tab. 11, S. 38).

Formononetin konnte den Wassergehalt von Femur, Tibia und L4-Wirbeln (um 15%, 19,8% und 16,1%) verringern und den Gehalt an organischen Substanzen (um 12,2%, 3,6% und 7,7%) erhöhen. Im Femur änderte sich der Mineralgehalt nicht, während er in Tibia und L4-Wirbeln anstieg (um 10,5% und 7,7%). Formononetin zeigte keine signifikanten Änderungen der Kalzium- und Phosphorwerte im Vergleich zur Ovariectomie.

Parameters	SHAM	OVX	OVX + ES	OVX + FRM
Final body mass (g)	263.3 ± 10.5	272.6 ± 3.6	252.9 ± 7.2 ^B	270.0 ± 2.4
Body mass gain after 4 weeks (g)	32.1 ± 2.9	50.6 ± 3.8 ^{AA}	34.1 ± 4.5 ^B	49.8 ± 2.2
Uterus mass (g)	0.39 ± 0.01	0.09 ± 0.01 ^{AAA}	0.18 ± 0.01 ^{BBB}	0.09 ± 0.01
Thymus mass (g)	0.39 ± 0.04	0.68 ± 0.03 ^{AAA}	0.62 ± 0.05	0.72 ± 0.03

Tab. 10: Körper-, Uterus- und Thymusgewicht

ES: Östradiol, FRM: Formononetin

^{AA}: p < 0,01; ^{AAA}: p < 0,001 signifikanter Unterschied zw. OVX und Schein-operierter Gruppe

^B: p < 0,05; ^{BBB}: p < 0,001 signifikanter Unterschied zur OVX Kontrollgruppe

(nach Kaczmarczyk-Sedlak et al., 2013)

Parameter	SHAM	OVX	OVX + ES	OVX + FRM
Femoral diaphysis				
Maximum load (N)	94.0 ± 3.6	88.2 ± 3.5	93.2 ± 5.6	92.1 ± 3.8
Displacement for maximum load (mm)	0.60 ± 0.02	0.65 ± 0.02	0.58 ± 0.01	0.62 ± 0.01
Fracture load (N)	93.9 ± 3.6	84.5 ± 6.0	94.0 ± 8.3	88.0 ± 3.8
Displacement for fracture load (mm)	0.61 ± 0.03	0.72 ± 0.07	0.60 ± 0.09	0.63 ± 0.03
Young's modulus (MPa)	4673.9 ± 474.7	4386.7 ± 384.4	4933.7 ± 333.5	5352.2 ± 463.7
Tibial metaphysis				
Maximum load (N)	114.9 ± 5.1	56.3 ± 7.9 ^{AAA}	75.9 ± 10.0	67.4 ± 5.4
Displacement for maximum load (mm)	0.85 ± 0.07	0.86 ± 0.05	0.90 ± 0.07	0.91 ± 0.06
Fracture load (N)	110.7 ± 3.8	50.4 ± 9.9 ^{AAA}	75.4 ± 9.9 ^B	65.5 ± 4.9
Displacement for fracture load (mm)	1.01 ± 0.07	1.16 ± 0.27	1.06 ± 0.22	1.09 ± 0.02
Young's modulus (MPa)	3318.2 ± 957.6	1628.3 ± 449.3 ^A	1774.3 ± 492.3	1943.3 ± 228.3
Femoral neck				
Maximum load (N)	93.2 ± 3.1	80.9 ± 6.2	90.2 ± 5.3	78.6 ± 4.8

Tab. 11: Mechanische Eigenschaften von femoraler Diaphyse, tibialer Metaphyse und Oberschenkelhals

ES: Östradiol, FRM: Formononetin

^A: p < 0,05; ^{AAA}: p < 0,001 signifikanter Unterschied zw. OVX und Schein-operierter Gruppe

^B: p < 0,05 signifikanter Unterschied zur OVX Kontrollgruppe

(nach Kaczmarczyk-Sedlak et al., 2013)

An ovariectomierten (OVX) Ratten wurde die Wirkung von Biochanin A und Östradiol auf den Knochen untersucht. Bei OVX Ratten ist das Körpergewicht erhöht, die Knochenmineraldichte, das trabekuläre Knochenvolumen und der Knochenmineralgehalt sind erniedrigt. Dieser Effekt konnte durch Behandlung mit Biochanin A (25mg/kg/d p.o. über 14 Wochen) oder Östradiol (23µg/kg an 3 Tagen/Woche i.p. über 14 Wochen) umgekehrt werden. Durch Östradiol wurde das Uterusgewicht erhöht, Biochanin A hatte keine Auswirkungen.

Außerdem kam es durch die Behandlung mit Biochanin A oder Östradiol zu einer Erniedrigung von Deoxyypyridinoline (DPD) im Harn und von TNFα und IL-1β im Serum, die durch die Ovariectomie erhöht waren (p<0,05).

Durch die Ovariectomie waren die Werte von Osterix, Collagen Typ 1, alkalische Phosphatase und Osteocalcin erniedrigt. Die Tartrat-resistente saure Phosphataseexpression und das Verhältnis von Rezeptorenaktivator des NF-κB Liganden zu Osteoprotegrin waren erhöht. Diese Effekte konnten Biochanin A und Östradiol verhindern (Su et al., 2013).

5.9 Analgetische Wirkung

In einer Langzeitstudie an Ratten wurde die analgetische Wirkung eines methanolischen Extraktes aus Rotklee mit 41,1% Isoflavonen an normalen und ovariectomierten Ratten im Tailflick- und Formalintest untersucht. Die Tiere

erhielten 500 mg/kg Extrakt peroral über 90 bzw. 180 Tage.

Der Tailflicktest dient dazu die Schmerzreaktion der Tiere, nach Hitzeeinwirkung, durch ihre Schwanzbewegung, zu ermitteln. Mittels diesem Test konnte gezeigt werden, dass die Schmerzschwelle bei OVX Ratten aufgrund des Östrogenmangels reduziert war (90 Tage: $4,9 \pm 0,57$ s, 180 Tage: $6,45 \pm 0,55$ s, verglichen mit Kontrolle: $13,986 \pm 0,55$ s), während bei den OVX Ratten, die den Extrakt bekamen, die Schmerzschwelle vergleichbar mit der Kontrollgruppe war (90 Tage: $10,985 \pm 0,55$ s, 180 Tage: $13,163 \pm 0,68$ s).

Mittels dem Formalintest wurde ebenfalls die Schmerzreaktion getestet. Den Tieren wurde eine subkutane Dosis Formalin (50 μ L 10%) in die Hinterpfote appliziert und danach das Verhalten (Lecken der Injektionsstelle), das Hinweise auf Schmerzreaktion gibt, in zwei Phasen (Phase 1: 0-5 min und Phase 2: 15-60 min) beobachtet. Durch den Östrogenmangel der OVX Ratten war die Schmerzschwelle reduziert (180d, Phase 1: $175,5 \pm 0,72$ s, Phase 2: $380,5 \pm 0,72$ s, verglichen mit Kontrolle: Phase 1: $45,5 \pm 0,71$ s, Phase 2: $215,16 \pm 0,71$ s). Die Behandlung mit dem Extrakt führte bei ovariectomierten Tieren zur Verkürzung der Phasen (Phase 1: $55,66 \pm 0,28$ s, Phase 2: $170,5 \pm 0,78$ s), während bei nicht ovariectomierten Tieren und Extraktgabe (Phase 1: $38,66 \pm 0,39$ s, Phase 2: $121,83 \pm 0,79$ s) bessere Ergebnisse erzielt werden konnten als in der Kontrollgruppe (Phase 1: $45,5 \pm 0,71$ s, Phase 2: $215,16 \pm 0,71$ s) (Vishali et al., 2011).

5.10 Wirkung auf die Wundheilung

Renda et al. (2013) verglichen die Wirkung von 13 Extrakten aus verschiedenen *Trifolium* Arten auf die Wundheilung von männlichen Sprague-Dawley Ratten und Albinomäusen.

In einem Versuch wurden lineare Schnitte über neun Tage mit einer Salbe mit Rotkleeextrakt bzw. als Kontrolle mit Madecassol oder Basisgrundlage behandelt. Am zehnten Tag wurde mittels Tensiometer die Dehnbarkeit der Wunden gemessen. Weiters wurde die Heilung kreisförmiger Wunden in gleicher Weise untersucht.

Von den 13 Extrakten zeigte jenes von *Trifolium pratense* var. *pratense* signifikante Wundheilungsaktivität im linearen und kreisförmigen Modell (21,3%, $p < 0,05$, Tag 12: 30,21%, $p < 0,05$).

5.11 Wirkung auf die Haut

Eine Behandlung von Zebrafischembryonen mit Biochanin A resultierte in einer reduzierten Melaninproduktion in den Larven und in einer Abnahme der Tyrosinaseaktivität. Bei Mäusen führte eine Creme mit 2% Biochanin A, die zweimal täglich auf die Haut aufgetragen wurde, schon nach einer Behandlungswoche zu einer Erhöhung des Skin-Whitening Index. Nach weiteren zwei Wochen Behandlung stiegen die Werte weiter an (Lin et al., 2011).

5.12 Wirkung auf Blutglucose- und Fettwerte

An Streptozotocin-induzierten diabetischen männlichen Mäusen untersuchten Qiu et al. (2012) den Effekt eines Rotkleeextraktes (50 und 200 mg/kg/Tag), von Formononetin (1mg/kg/Tag) und Biochanin A (1mg/kg/Tag) auf Blutglucose- und Fettwerte.

Die dreiwöchige Behandlung hatte keinen Effekt auf die Blutglucosewerte. Dagegen konnte eine signifikante Verringerung der Serumtriglyceride und LDL durch Extrakt, Formononetin und Biochanin A beobachtet werden. Das Gesamtcholesterin wurde durch alle drei Behandlungen unter den Wert der normalen Kontrolle gesenkt.

Außerdem reduzierten Formononetin und Biochanin A die hepatische Expression von APOC3, einem Zielgen von PPAR α .

Cegiela et al. (2012) konnten an weiblichen Ratten feststellen, dass OVX zu erhöhten Serumcholesterin Werten führte. Eine perorale Behandlung mit Rotklee (10mg bzw. 20mg/kg/Tag) zeigte keinen Effekt, während eine Östradiolbehandlung (0,2 mg/kg/Tag) entgegenwirkte (s. Tab. 12)

Parameters	Sham-operated rats	OVX rats			
		Control	TP10	TP20	Estradiol
Total cholesterol (mg/100 mL)	49.93 ± 2.90	69.11 ± 2.83***	68.23 ± 3.17***	66.13 ± 3.30**	56.19 ± 3.81*

Tab. 12: Totalcholesterin Werte

TP10: Rotklee 10mg/kg, TP20: Rotklee 20mg/kg

** : $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ signifikanter Unterschied zur Schein-operierten Gruppe

• : $p < 0,05$ signifikanter Unterschied zur OVX Kontrollgruppe

(nach Cegiela et al., 2012)

5.13 Antiinflammatorische und antiangiogene Wirkung

Im HET-CAM Assay hemmten ein Rotkleeextrakt, Formononetin, Biochanin A, Daidzein und Genistein die Angiogenese.

Daidzein (SV = score value: 1,2 mit 50 μ g/Pellet), Genistein (SV: 1,0 mit 50 μ g/Pellet) und das Rotkleeextrakt (SV: 1,0 mit 250 μ g/Pellet) führten zu einer stärkeren Hemmung als Biochanin A (SV: 0,7 mit 50 μ g/Pellet) und Formononetin (SV: 0,4 mit 50 μ g/Pellet).

Die Effekte des Extraktes und von Daidzein und Genistein waren besser als die Positivkontrolle Suramin und vergleichbar mit Thalidomid. Bei der Testung auf entzündungshemmende Aktivität im selben Modell zeigten Genistein und Daidzein

(I = Hemmung: 76% mit 50 µg/Pellet) eine stärkere Hemmung als Biochanin A (I: 69% mit 50 µg/Pellet), das Rotkleeextrakt (I: 65% mit 250 µg/Pellet) und Formononetin (I: 47% 50 µg/Pellet) verglichen mit der Positivkontrolle Hydrocortison (I: 85% mit 50 µg/Pellet). Außerdem konnte gezeigt werden, dass keine der getesteten Komponenten toxische Nebenwirkungen oder Membranirritationen auslöste (Krenn et al., 2009).

Ramos et al. (2012) konnten an einem Rattenmodell zeigen, dass ein Rotkleetrockenextrakt auf Carrageen-induzierte Pfotenödeme hemmend wirkte.

5.14 Pharmakokinetische Wirkung

An männlichen Ratten untersuchten Mun et al. (2009) die Aufnahme, Verteilung und Ausscheidung von ¹⁴C radioaktiv markierten Isoflavonen aus Rotklee (einmalig 75 mg/kg KG von ¹⁴C markierten Extrakt = 7,256 Mbq/g, mittels Ultrafiltratsonde).

Nach 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 480, 600, 720 und 1440 min nach der Extraktgabe wurde 200µl Blut gesammelt. Interstitielle Flüssigkeit wurde für 24 h alle 60 min und Harn- und Stuhlproben von 24h gesammelt. 24h nach Extraktgabe wurden verschiedene Organe (Magen, Dünn- und Dickdarm, Gehirn, Herz, Lunge, Leber, Nieren und Hoden) und Knochen (Oberschenkelknochen, Schienbein und Wirbeln) entnommen sowie Blut, Plasma, Magen-, Dünndarm- und Dickdarminhalt gesammelt.

Die Analyse des Serums und der interstitiellen Flüssigkeit zeigte, dass das Extrakt schnell absorbiert und im Gewebe verteilt, sowie schnell metabolisiert und über Harn und Stuhl eliminiert werden konnten. Im Urin fand man 4,4% und im Stuhl 3,59%, im Plasma 0,61% und in der interstitiellen Flüssigkeit 0,55% der verabreichten Rotkleedosis.

Die radioaktiv markierten Substanzen wurden in Femur, Tibia und Wirbelknochen angereichert. In der Leber kumulierte die größte Menge an Radioaktivität (1,54% der verabreichten Rotkleedosis) neben Dünndarm (0,68% der verabreichten Rotkleedosis), Dickdarm- und Dünndarminhalt (0,99% und 0,51%) verglichen mit den anderen Organen und Geweben.

Die Pharmakokinetik und der Metabolismus nach oraler (50 mg/kg) und intravenöser Gabe (10 mg/kg) von Formononetin wurde an weiblichen Ratten untersucht.

Neben einer hohen Clearance (5,13 l/h/kg) und einem großen Verteilungsvolumen (14,16 L/kg) war die orale Bioverfügbarkeit mit 3% sehr niedrig. Die maximale Plasmakonzentration war bei intravenöser Gabe (4548,50 ± 321,73 ng/ml) deutlicher höher als bei oraler Gabe (16,67 ± 6,60 ng/ml) (s. Tab. 13, S. 42). Formononetin wurde schnell zu den Metaboliten Daidzein, Daidzein- und Formononetin-glucuroniden und -sulfaten umgebaut (Singh et al., 2011 b).

Parameter	Unit	Free FMN	
		Oral	I.V.
AUC _{0-t}	hr*ng/mL	251.44 ± 63.67	1949.10 ± 295.09
AUC _{0-∞}	hr*ng/mL	278.27 ± 66.68	1975.88 ± 317.15
C _{max}	ng/mL	16.67 ± 6.60	4548.50 ± 321.73
t _{max}	hr	1.00 ± 0.00	-
t _{1/2}	hr	-	1.95 ± 0.48
Cl _{Total}	L/hr/kg	-	5.13 ± 0.82
Vd	L/kg	-	14.16 ± 1.26

Tab. 13: Pharmakokinetische Parameter von Formononetin nach oraler und i.v. Gabe (nach Singh et al., 2011 b)

Ebenfalls an weiblichen Ratten untersuchten Singh et al. (2011 a) die Pharmakokinetik von Biochanin A nach oraler und intravenöser Gabe.

Es konnten ein großes Verteilungsvolumen (10,56 L/kg) und eine hohe Clearance (15,7 l/h/kg) festgestellt werden, während die orale Bioverfügbarkeit mit 4,6% sehr niedrig war. Die maximale Plasmakonzentration war bei intravenöser Gabe (1109,75 ng/ml) deutlicher höher als bei oraler Gabe (33,47 ng/ml) (s. Tab. 14). Biochanin A wird sehr schnell zu den Metaboliten Genistein, Genistein- und Biochanin A-glucuroniden und -sulfaten umgebaut.

Parameter	Unit	Oral (50 mg/kg)	I. V. (5 mg/kg)
AUC _{0-t}	h*ng/ml	220.29	480.80
C _{max}	ng/ml	33.47	1109.75
T _{max}	h	0.42	-
t _{1/2}	h	13.73	1.00
Cl _{Total}	l/h/kg	-	15.70
Vd	l/kg	-	10.56

Tab. 14: Pharmakokinetische Parameter von Biochanin A nach oraler und i.v. Gabe (nach Singh et al., 2011 a)

5.15 Übergangsraten von Phytoöstrogenen in Milch

In einer Studie von Mustonen et al. (2009) wurden Kühe 21 Tage lang mit vier verschiedenen Rotkleesilagen gefüttert. Da Silagen aus dem 2. Schnitt höhere Isoflavongehalte als jene aus dem 1. Schnitt aufwiesen, wurden dementsprechend höhere Konzentrationen des Metaboliten Equol im Plasma und der Milch dieser Tiere detektiert.

Andersen et al. (2009) untersuchten in Futter und Milch dänischer Holsteinkühe die Konzentration von Phytoöstrogenen. Die Kühe wurden für 14 Tage mit Rotklee bzw. mit anderen Futterpflanzen gefüttert.

Im Vergleich zu den anderen Futterproben enthielt Rotklee eine 45–90 fach höhere Konzentration an Phytoöstrogenen.

Daher war bei den Milchproben die Konzentration an Phytoöstrogenen ebenfalls höher als bei der Fütterung mit den anderen Pflanzen.

In den Milchproben waren die Konzentrationen von Equol um 6,1–11,8 fache, von Daidzein um 2,7–6,6 fache und von Formononetin um 2,7–4 fache höher als bei der Fütterung mit den anderen Pflanzen ($p < 0,001$).

In einer breit angelegten Studie wurden Kühe mit Silagen aus dem 2. (R2) bzw. 3. Schnitt (R3) von Rotklee, die auch unterschiedlich lang siliert worden waren, gefüttert. Während die aufgenommenen Phytoöstrogenmengen bei den Silagen des 2. und 3. Schnittes und der Kurzzeitsilage vergleichbar waren, enthielt die Langzeitsilage signifikant weniger Isoflavone. In der Milch von Kühen, die mit R2 und R3 gefüttert wurden, stimmten die gemessenen Mengen an Formononetin und deren Metaboliten weitgehend überein.

In der Milch von Kühen, die mit Kurz- bzw. Langzeitsilagen gefüttert wurden lag die Konzentration von Equol nur bei der Hälfte bzw. einem 20stel. Auch die Genisteinkonzentration war gering. Hingegen fand man höhere Coumestrol und Lignan-Werte der Milch dieser Kühe (Höjer et al., 2012).

6. Klinische Studien

In erster Linie liegen Studien zur Wirkung von Rotklee bei menopausalen Beschwerden vor. Hier wurden vor allem Hitzewallungen, Gedächtnisleistung, Angst und depressive Symptome sowie der Knochenstoffwechsel untersucht. Einige Studien liegen zu Effekten auf Brust, Prostata, Leber, Haut und Haare vor.

6.1 Wirkung bei menopausalen Beschwerden

Geller et al. (2009) untersuchten die Sicherheit und Wirksamkeit eines standardisierten Rotkleeextraktes auf vasomotorische Symptome in einer randomisierten, doppelblinden, Placebokontrollierten Studie an perimenopausalen und postmenopausalen Frauen (n=89) mit einem Durchschnittsalter von 53 Jahren und mindestens 35 vasomotorischen Symptomen pro Woche. Die Probandinnen erhielten für ein Jahr täglich A: Placebo, B: 0,625 mg konjugiertes equines Östrogen (CEE) + 2,5 mg Medroxyprogesteronacetat (MPA), C: Rotkleeextrakt (standardisiert auf 120 mg Isoflavone).

Die vasomotorischen Symptome im Vergleich zur Placebogruppe sanken nur in der CEE/MPA Gruppe signifikant. Das Rotkleeextrakt zeigt mit 57% Reduktion keinen statistisch signifikanten Unterschied zur Placebogruppe (63%). Nur im Bezug auf den Greene Anxiety Score konnte eine signifikante Reduktion durch das Rotkleeextrakt erzielt werden ($p = 0,04$).

Das Extrakt verursachte keine Unterschiede zur Placebogruppe hinsichtlich der Leberenzyme, Fettwerte, Blutwerte sowie Brust und Endometrium.

In der einjährigen, randomisierten, doppelblinden Placebokontrollierten Studie an 100 postmenopausalen Frauen (45-65 Jahre, Amenorrhoe seit mindestens 12 Monaten) wurde der Effekt von Rotklee (40 mg Isoflavone täglich) gegenüber Placebo auf klimakterische und sexuelle Symptome untersucht.

Vor der Behandlung und nach vier, acht und zwölf Monaten wurden mittels Kupperman Index und Golombok Rust Inventory of Sexual Satisfaction (GRISS) Daten zu menopausalen Beschwerden und sexuellen Symptomen ermittelt.

Sowohl Rotklee als auch Placebo verbesserten die Hitzewallungen (Baseline Rotklee: $8,72 \pm 3,68$, nach 12 Monaten: $3,44 \pm 3,68$, Baseline Placebo: $8,10 \pm 3,88$, nach 12 Monaten: $3,01 \pm 3,96$), während sich die GRISS-Werte nicht veränderten. Der Kuppermann Index veränderte sich im Laufe der Behandlung nicht signifikant zwischen den Gruppen (Baseline Rotklee: $25,34 \pm 10,17$; nach 4 Monaten: $16,96 \pm 9,16$; nach 8 Wochen: $13,16 \pm 9,55$; nach 12 Monaten: $11,12 \pm 8,68$, Baseline Placebo: $25,12 \pm 9,02$; nach 4 Monaten: $17,22 \pm 8,34$; nach 8 Wochen: $13,30 \pm 7,06$; nach 12 Monaten: $12,01 \pm 9,01$) (Del Giorno et al., 2010).

Ma et al. (2011) untersuchten die Daten von Teilnehmerinnen der HEAL (Health, Eating, Activity, Lifestyle) Studie auf Verbindungen zwischen der Einnahme von östrogen wirkenden Nahrungsergänzungsmitteln (EBS) und Müdigkeit, hormonabhängigen Symptomen, Lebensqualität und Gesundheit. Aus der 40-monatigen multizentrischen, multiethnischen, prospektiven Studie wurden Daten von 767 Brustkrebsüberlebenden überprüft.

Zur Verbesserung der Symptome wendeten 39,5% der Frauen nach ihrer Diagnose ein (18,4%) oder zwei bis mehrere (21,1%) EBS an.

Unter diesen Probandinnen kam es bei Frauen, die Rotkleepräparate nahmen, zu weniger Gewichtszunahmen, Nachtschweiß und Konzentrationsschwierigkeiten im Vergleich zu Nicht-EBS Anwenderinnen.

Lipovac et al. (2011) untersuchten in einer prospektiven, randomisierten, doppelblinden, Placebokontrollierten Studie an 109 postmenopausalen Frauen (> 40 Jahre, Amenorrhoe seit mindestens 12 Monaten, moderate bis schwere menopausale Beschwerden, Kupperman Index ≥ 15) die Wirkung von Rotkleeisoflavonen auf Haut, Schleimhaut und Haare.

Die Probandinnen erhielten für 90 Tage entweder täglich 2 Kapseln eines Rotkleepräparates mit 80 mg Isoflavonen oder Placebo. Nach einer siebentägigen Wash-Out-Phase wurden die Gruppen getauscht. Die Wirkungen wurden mittels einer visuellen Analogskala bewertet. Zusätzlich wurden Libido, Müdigkeit, Schlafverhalten, Stimmungsveränderungen, Harnzwang und Inkontinenz bewertet.

Bei beiden Gruppen zeigten sich subjektive Verbesserungen der Qualität des Kopfhaares und der Haut, der Libido, der Gemütsverfassung und von Schlaf und Müdigkeit. Verbesserungen bei Harnzwang, Inkontinenz, Zustand der Nägel, Qualität der Körperbehaarung und Schleimhautstatus zeigten keine statistischen Abweichungen innerhalb und zwischen den Behandlungsgruppen. In beiden Gruppen führte die Rotkleebehandlung zu einer höheren Zufriedenheit als die Placebobehandlung (s. Tab. 15, S. 46).

Studied parameters	Group A		Group B	
	After RCE	After placebo	After placebo	After RCE
Scalp hair (better texture, less fragility, and overall condition)	7.3 ± 16.6 [†] [0, 0]	4.2 ± 13.9 [0, 0]	0.2 ± 0.9 [0, 0]	6.3 ± 13.9* [0, 0]
Body hair (less growth)	6.4 ± 16.5 [0, 0]	2.6 ± 10.9* [0, 0]	1.0 ± 3.4 [0, 0]	2.2 ± 6.2 [0, 0]
Skin condition (better texture, more moisture, and better overall condition)	18.6 ± 20.5 [†] [15, 32]	6.2 ± 16.2* [0, 0]	5.0 ± 11.0 [0, 5]	17.7 ± 21.2* [†] [5, 35.0]
Ocular complaint (dryness and burning)	7.8 ± 18.0 [†] [0, 7]	5.3 ± 15.1 [0, 0]	2.2 ± 9.5 [0, 0]	6.0 ± 13.7 [0, 1.3]
Oral mucosa complaint (dryness and burning)	3.9 ± 14.0 [0, 0]	3.3 ± 13.0 [0, 0]	1.8 ± 5.2 [0, 0]	2.8 ± 9.7 [0, 0]
Nasal mucosa complaint (dryness and fissuring)	4.2 ± 15.3 [0, 0]	2.6 ± 9.1 [0, 0]	1.6 ± 5.3 [0, 0]	6.2 ± 16.1* [0, 1.3]
Nails condition (change in thickness and stability)	5.6 ± 16.2 [0, 0]	6.2 ± 16.7 [0, 0]	3.3 ± 10.0 [0, 1.3]	10.8 ± 19.3* [0, 11.3]
Digestive complaints (diarrhea and constipation)	6.0 ± 16.1 [†] [0, 0]	14.4 ± 19.4* [0, 32.0]	19.5 ± 26.0 [6, 31.3]	11.9 ± 26.4* [0, 10.8]
Libido	18.0 ± 16.7 [†] [17, 30]	4.9 ± 14.3* [0, 0]	5.0 ± 12.4 [0, 1.3]	17.8 ± 20.9* [†] [10, 30]
Urinary complaint (incontinence and dysuria)	5.2 ± 18.1 [0, 0]	5.4 ± 17.3 [0, 0]	3.0 ± 13.7 [0, 0]	4.7 ± 15.0 [0, 0]
Mood complaint	68.5 ± 33.6 [†] [80, 48]	15.0 ± 25.2* [0, 25.3]	7.7 ± 19.2 [0, 0.8]	65.8 ± 37.8* [†] [78.5, 70.5]
Sleeping complaint	73.5 ± 33.4 [†] [90, 45]	16.2 ± 25.7* [0, 25]	9.8 ± 23.0 [0, 7]	70.6 ± 3.5* [†] [81.5, 62.2]
Tiredness	61.7 ± 45.8 [†] [96, 100]	16.1 ± 24.5* [0, 26.3]	8.3 ± 22.7 [0, 0]	56.1 ± 47.7* [†] [92.0, 100]
Overall satisfaction with treatment	87.3 ± 26.6 [†] [100, 12.5]	29.8 ± 31.4* [30, 50]	14.7 ± 26.8 [0, 19]	81.7 ± 26.8* [†] [100, 43.7]

Tab. 15: Parameter der subjektiven Symptome
RCE: Rotkleebehandlung
*: p < 0,05 verglichen mit den Phasen derselben Gruppe
†: p < 0,05 verglichen mit Placebo Phase der gegenteiligen Gruppe
(nach Lipovac et al., 2011)

In einer randomisierten, dreifachblinden, Placebokontrollierten Studie wurde der Effekt von Rotklee auf 55 postmenopausale Frauen (> 45 Jahre, Amenorrhoe seit mindestens 12 Monaten, Kupperman Index ≥ 15) überprüft. Die Patientinnen erhielten entweder einmal täglich 45 mg Rotkleeisoflavone oder Placebo für acht Wochen.

Vor Beginn der Behandlung (Woche zwei) und nach zehn Wochen wurde die Lebensqualität mittels dem MENQOL Fragebogen (zu den vier Gebieten: vasomotorische Symptome, psychosoziale, physische Bereiche und Sexualität) erhoben.

Die Lebensqualität war am Ende der Studie in beiden Gruppen signifikant verbessert (Rotklee und Placebo: p<0,01) im Vergleich zur Woche zwei, jedoch gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen Verum und Placebo bei der Lebensqualität oder einer der Untergruppen des MENQOL Fragebogens (Ehsanpour et al., 2012).

Lipovac et al. (2012) untersuchten den Effekt von Rotklee auf vasomotorische und menopausale Symptome in einer randomisierten, doppelblinden, Placebokontrollierten Studie an 109 postmenopausalen Frauen (> 40 Jahre, Amenorrhoe seit > 12 Monate, Kupperman Index ≥ 15 , mehr als 5 Hitzewallungen/Tag).

Die Behandlung über 90 Tage erfolgte in Gruppe A mit einem Rotkleepräparat (80 mg Isoflavone) oder in Gruppe B mit Placebo. Nach einer siebentägigen Wash-Out-Phase wurden die Behandlungen getauscht und weitere 90 Tage fortgesetzt. Am Beginn der Studie, nach 90, 97 und 187 Tagen wurden der Kupperman Index und die Anzahl der Hitzewallungen (HW) sowie das Auftreten von Nachtschweiß (NS) ermittelt.

In beiden Gruppen zeigte sich eine signifikante Verbesserung des Kupperman Indexes (Gruppe A Baseline: $32,5 \pm 10$; nach 3 Monaten: $8,0 \pm 6,9$, Gruppe B: Baseline: $34,3 \pm 10,4$; nach 3 Monaten: $9,7 \pm 9,4$) durch die Rotklee Einnahme. Eine signifikante Reduktion der Hitzewallungen (73,5%) und von Nachtschweiß (72,2%) verglichen mit der Placebogruppe (8,2 % und 0,9%), wurde im ersten Teil der Studie beobachtet. Im zweiten Teil der Studie kam es in Gruppe A (nach Wash-Out-Phase und Placebobehandlung) zu einer signifikanten Erhöhung von Kupperman Index, Hitzewallungen und Nachtschweiß, während es in Gruppe B zu einer signifikanten Reduktion kam (Baseline HW: $11,0 \pm 5,1$; nach 3 Monaten: $3,3 \pm 4,0$; Baseline NS: $5,0 \pm 2,8$; nach 3 Monaten: $1,7 \pm 1,8$) (s. Abb. 16).

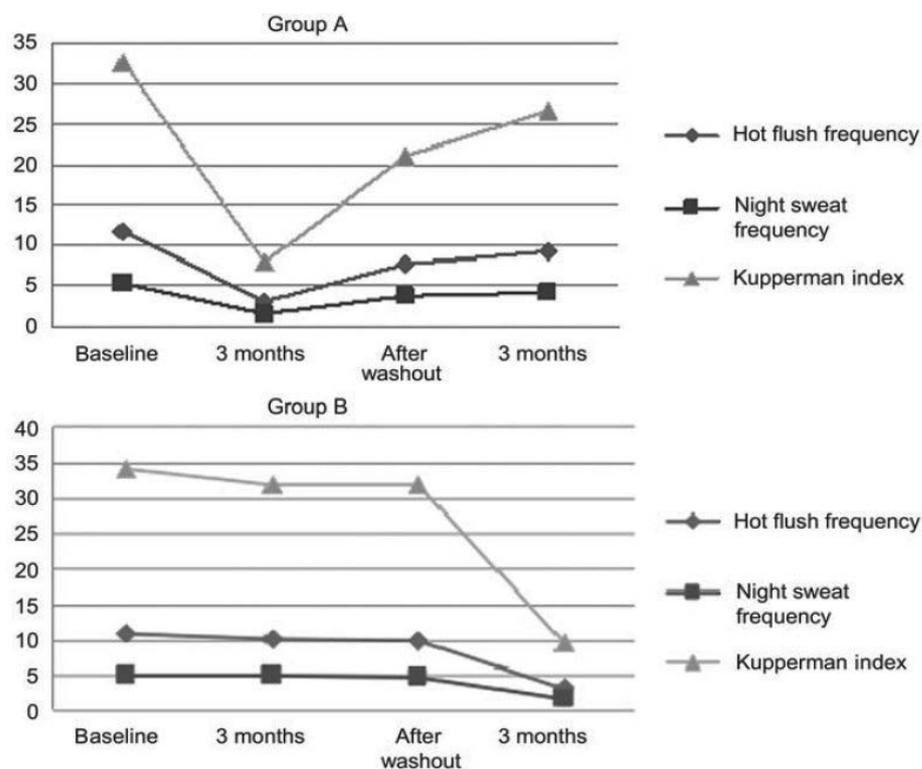


Abb. 16: Effekte des Rotklees auf vasomotorische und menopausale Symptome (nach Lipovac et al., 2012)

6.2 Wirkung auf das Gedächtnis

Die Beeinflussung der kognitiven Funktionen durch Rotklee wurde in einer randomisierten, doppelblinden, Placebokontrollierten Studie an 66 postmenopausalen Frauen (Durchschnittsalter: 53 Jahre, mehr als 35 Hitzewallungen pro Woche, Amenorrhoe seit mindestens 6 Monaten) untersucht. Die Probandinnen erhielten über ein Jahr entweder täglich ein ethanolisches Rotkleeextrakt (120 mg Isoflavone), CEE/MPA (0,625 mg CEE + 2,5 mg MPA) oder Placebo. Zusätzlich zu den verschiedenen kognitiven Tests wurden die Hitzewallungen subjektiv und objektiv bei 19 Frauen mittels 24-Stunden-Scan der Hautleitfähigkeit am Sternum ermittelt.

Das verbale Gedächtnis sowie alle anderen untersuchten kognitiven Funktionen konnten durch das Extrakt nicht verbessert werden. In der CEE/MPA Gruppe war die verbale Gedächtnisleistung und das Zahlengedächtnis geringer als in der Placebo Gruppe, dagegen gab es eine Verbesserung beim Test zur Sprachkompetenz.

Die Hitzewallungen nahmen subjektiv in allen Gruppen ab (s. Abb. 17), bei objektiver Messung jedoch nur in der CEE/MPA Gruppe ($p < 0,001$) (s. Abb. 18, S. 49) (Maki et al., 2009).

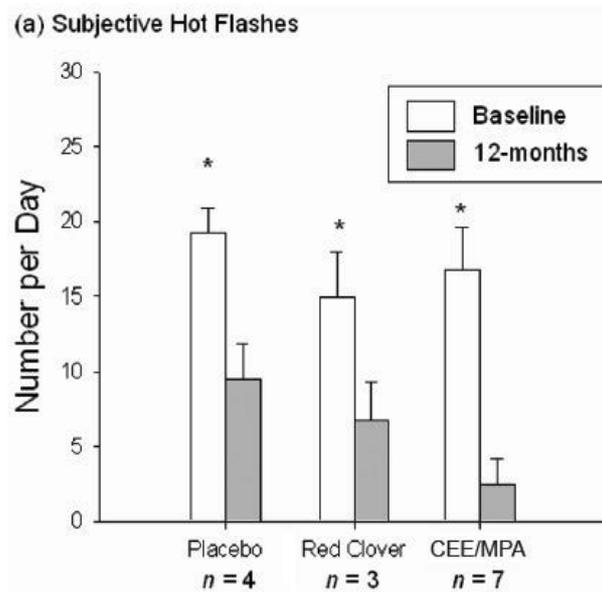


Abb. 17: Anzahl der subjektiven Hitzewallungen (nach Maki et al., 2009)

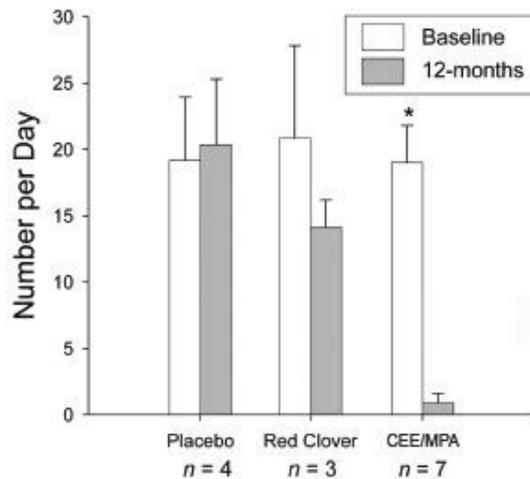


Abb. 18: Anzahl der objektiven Hitzewallungen
(nach Maki et al., 2009)

6.3 Wirkung auf Angst und depressive Symptome

Lipovac et al. (2010) überprüften in einer randomisierten, doppelblinden, Placebokontrollierten Cross-over Studie an 109 postmenopausalen Frauen (über 40 Jahre, Amenorrhoe seit mehr als 12 Monaten) die Wirkung eines Rotkleeextraktes auf Angst und depressive Verstimmung.

Für einen Behandlungszeitraum von 90 Tagen erhielten die Probandinnen zwei mal täglich entweder ein Rotkleeextrakt (40 mg Isoflavone) oder Placebo. Nach einer sieben täglichen Wash-Out-Phase wurden die Gruppen getauscht.

Mittels des Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS) und des Zung's Self Rating Depression Scale (SDS) wurden am Beginn, nach 90 und 187 Tagen Angst und depressive Symptome bemessen.

Das Rotkleepräparat konnte die Scores auf der HADS-Skala insgesamt um 76,9% reduzieren (Angst Baseline: $9,98 \pm 4,68$; Placebo: $8,05 \pm 4,76$; Rotklee: $2,40 \pm 2,53$; Depression Baseline: $6,91 \pm 4,02$; Placebo: $5,23 \pm 3,65$; Rotklee: $1,50 \pm 2,06$). Auf der SDS-Skala kam es zu einer Abnahme um 80,6% (Baseline: $12,24 \pm 7,39$; Placebo: $9,57 \pm 7,01$; Rotklee: $2,37 \pm 3,97$). Die Reduktion durch Placebo lag bei beiden Skalen bei 21,7%.

6.4 Wirkung auf den Knochenstoffwechsel

Durch Bestimmung der ^{41}Ca Ausscheidung im Urin untersuchten Weaver et al. (2009) den antiresorptiven Effekt von kommerziellen Isoflavonpräparaten auf den Knochen in einer randomisierten, Cross-over Studie an elf postmenopausalen Frauen.

Jede Probandin erhielt als Positivkontrolle täglich entweder Östradiol (1 mg) mit Medroxyprogesteron (2,5 mg) oder Risedronat (5 mg) sowie vor und während der Studie zusätzlich zur Isoflavongabe täglich 500mg Kalzium und 500 IE Vitamin D3. Jede Behandlungsperiode dauerte 50 Tage mit einer gleichlangen Behandlungspause, danach wurden die Gruppen getauscht bis jede Frau jede Behandlungsgruppe durchlaufen hatte.

Für die ^{41}Ca Methode erhielten die Testpersonen ^{41}Ca i.v., gefolgt von einer 100tägigen Wash-Out-Phase. Während der Behandlungsperioden und -pausen wurde alle zehn Tage der 24-Stunden Harn gesammelt, um die ^{41}Ca Werte zu ermitteln.

Die Knochenresorption konnte durch Östradiol/Medroxyprogesteron um 24% und durch Risedronat um 22% reduziert werden. Rotklee reduzierte die Knochenresorption nicht signifikant. Während Serumwerte der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase nicht beeinflusst wurden (Baseline: $15,8 \pm 5,0$ ng/ml; Östradiol/Risedronat: $12,6 \pm 5,9$ ng/ml; Rotklee: $12,6 \pm 5,5$ ng/ml), konnte Rotklee die Serumwerte der alkalischen Phosphatase senken (Baseline: $82,4 \pm 23,2$ U/l; Östradiol/Risedronat: $73,1 \pm 22,8$ U/l; Rotklee: $59,1 \pm 31,5$ U/l).

6.5 Wirkung auf die Brust

Boucher et al. (2013) versuchten die Einnahme von verschiedenen isoflavonhaltigen Nahrungsergänzungsmitteln mit vermindertem Brustkrebsrisiko zu korrelieren und untersuchten 3.101 Fälle der Ontario Women's Diet and Health Studie, in der Frauen (Durchschnittsalter 56 Jahre, 67% postmenopausal) mit erstmaliger Brustkrebsdiagnose zwischen Juni 2002 und April 2003 mit 3.471 gesunden Frauen verglichen worden waren.

Nur 2% aller Frauen (n=117) verwendeten Rotkleepräparate, wobei 48 an Brustkrebs litten und 69 aus der Kontrollgruppe waren. Die Einnahme von Rotkleepräparaten über ein Jahr (mit $\geq 0,676$ mg Isoflavonen/Tagesdosis) war mit einem geringeren Brustkrebsrisiko assoziiert.

Bei postmenopausalen Frauen sank das Risiko, wenn mehr als 3 Produkte eingenommen wurden oder bei einer Einnahme von mehr als 5 Jahren.

6.6 Wirkung auf Prostata und Leber

In einer prospektiven einjährigen Studie an 20 Männern (Durchschnittsalter 65 Jahre) mit BHP und erhöhten PSA Werten wurde die Wirkung einer täglichen

Einnahme von 60 mg Isoflavonen aus Rotklee überprüft.

Nach einem Jahr war eine 33,4% Reduktion der PSA Werte ($p=0,019$) sowie eine geringfügige Senkung des Prostata Volumens um 10% ($p=0,097$) zu beobachten. Schon nach 3 Monaten konnte man eine Erhöhung der Lebertransaminasen (GOT, GPT und γ -Glutamyltransferase) feststellen, die allerdings über den gesamten Beobachtungszeitraum im hohen Normalbereich blieb. Sexualhormone (Gesamttestosteron, Luteinisierendes Hormon, Follikel stimulierendes Hormon, Östradiol und Dehydroepiandrosteronsulfat) und Sexualfunktionen wurden nicht beeinflusst. Es wurden keine Nebenwirkungen beobachtet (Engelhardt et al., 2008).

6.7 Wirkung auf das Lipidprofil

Terzic et al. (2009) untersuchten in einer einjährigen offenen, randomisierten, kontrollierten, prospektiven Studie den Einfluss von Rotkleeisoflavonen (40 mg/Tag) auf das Lipidprofil von gesunden postmenopausalen Frauen ($n=40$, Durchschnittsalter: 56 Jahre, Amenorrhoe seit mindestens 12 Monate).

Sowohl im Vergleich zur Baseline als auch zu Placebo wurden die Werte des Gesamtcholesterins ($p=0,028$), von LDL ($p=0,032$) und Triglyceriden ($p=0,099$) signifikant gesenkt sowie der HDL ($p=0,024$) Spiegel signifikant erhöht (s. Tab. 16).

	Triglycerides (mmol/L)			Total cholesterol (mmol/L)			LDL (mmol/L)			HDL (mmol/L)		
	Phytoestrogen group	Control group	P-value†	Phytoestrogen group	Control group	P-value†	Phytoestrogen group	Control group	P-value†	Phytoestrogen group	Control group	P-value†
Start rate	1.75 ± 0.50	1.73 ± 0.37	0.891	5.62 ± 0.45	5.55 ± 0.40	0.005	3.38 ± 0.40	3.11 ± 0.50	0.157	1.47 ± 0.23	1.50 ± 0.40	0.808
4 months	1.69 ± 0.42	1.75 ± 0.50	0.689	4.87 ± 0.40	5.54 ± 0.30	0.003	2.87 ± 0.32	3.14 ± 0.45	0.051	1.78 ± 0.36	1.50 ± 0.36	0.022
8 months	1.60 ± 0.38	1.75 ± 0.35	0.219	4.96 ± 0.45	5.57 ± 0.50	0.045	2.84 ± 0.40	3.12 ± 0.34	0.027	1.76 ± 0.41	1.48 ± 0.30	0.024
12 months	1.55 ± 0.37	1.75 ± 0.36	0.099	4.92 ± 0.30	5.65 ± 0.45	0.028	2.79 ± 0.43	3.10 ± 0.42	0.032	1.75 ± 0.38	1.51 ± 0.20	0.024

†Values of the probability of H₀; ‡mean values ± standard deviation (SD). HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein.

Tab. 16: Triglycerid- und Cholesterinwerte in der Rotklee- und Kontrollgruppe (nach Terzic et al., 2009)

6.8 Wirkung auf die Insulinsensitivität

Die Auswirkungen von transdermal verabreichtem Östrogen gegenüber oral verabreichten Phytoöstrogenen auf die Insulinsensitivität, SHBG Werten (Sex hormone-binding globulin), Totaltestosteron und andere Parameter wurden an 43 gesunden postmenopausalen Frauen (Durchschnittsalter 68 Jahre, keine Hormonersatztherapie) verglichen.

Die Frauen erhielten über 3 Monate pro Tag entweder 0,05 mg transdermales Östrogen (A), 0,1 mg transdermales Östrogen (B), 40 mg orale Rotkleeisoflavone (C) oder 80 mg orale Rotkleeisoflavone (D). Zur Beginn der Studie und monatlich für drei Monate wurden die Insulinsensitivität, Nüchternnglucose, Insulin, SHBG, Östradiol, Estron, gesamtes und freies Testosteron gemessen.

Durch die Behandlung mit oralen Phytoöstrogen wurde die Insulinsensitivität

weniger verbessert als durch die transdermale Östrogenbehandlung ($p=0,01$). Das Rotkleepräparat hatte keine Auswirkungen auf SHBG, Östradiolwerte und Gesamttestosteron. Auch Nüchternblutglucose und -insulin wurden nicht beeinflusst (s. Abb. 19) (Lee et al., 2012).

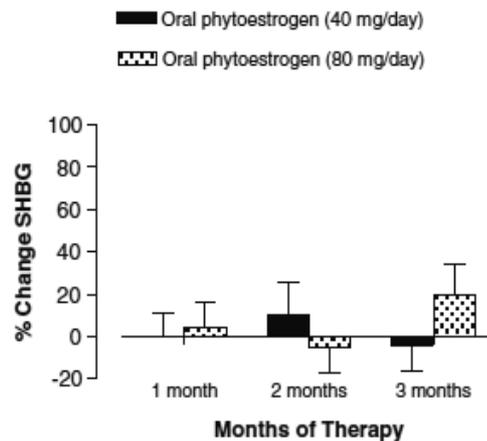


Abb. 19: Prozentuelle Änderung der SHBG-Werte nach oraler Phytoöstrogengabe (nach Lee et al., 2012)

6.9 Wirkung auf das IGF-System

Erhöhte Konzentration von Insulin-like Wachstumsfaktoren (IGF) werden mit erhöhtem Darmkrebsrisiko in Verbindung gebracht. In einer randomisierten, doppelblinden, Placebokontrollierten Cross-over Studie an postmenopausalen Frauen (50-75 Jahre), mit familiär erhöhtem Darmkrebsrisiko erhielten die Probandinnen für 8 Wochen täglich entweder ein Rotkleeextrakt (84 mg Isoflavone) oder Placebo. Nach einer achtwöchigen Wash-Out-Phase wurden die Gruppen getauscht. Jeweils nach dem ersten Behandlungszeitraum wurde eine Biopsie von kolorektalen Gewebe durchgeführt.

Die Rotkleebehandlung hatte keine signifikanten Auswirkungen auf IGF-1 (Rotklee: $121 \pm 45 \mu\text{g/l}$, Placebo: $123 \pm 39 \mu\text{g/l}$), IGF-2 (Rotklee: $546 \pm 92 \mu\text{g/l}$, Placebo: $559 \pm 98 \mu\text{g/l}$), IGFBP-1 (Rotklee: $45 \mu\text{g/l}$, Placebo: $42 \mu\text{g/l}$), IGFBP-2 (Rotklee: $234 \pm 137 \mu\text{g/l}$, Placebo: $223 \pm 108 \mu\text{g/l}$) und IGFBP-3 (Rotklee: $1,96 \pm 0,30 \text{ mg/l}$, Placebo: $2,01 \pm 0,30 \text{ mg/l}$).

Es konnten weder im aufsteigenden Kolon noch im Mastdarm signifikante Unterschiede der mRNA Expression von IGF-1, IGF-2, IGFBP-3 und IGF-1R beobachtet werden (s. Tab. 17, S. 53) (Vrieling et al., 2008).

	Isoflavones (n = 15)			Placebo (n = 19)			P*
	Mean ± SD	Median	Range	Mean ± SD	Median	Range	
Ascending colon							
IGF-I	0.40 ± 0.24	0.35	0.17-1.03	0.32 ± 0.20	0.33	0.09-0.84	0.23
IGF-II	0.14 ± 0.08	0.14	0.03-0.34	0.16 ± 0.11	0.14	0.04-0.45	0.98
IGFBP-3	0.29 ± 0.24	0.18	0.08-1.02	0.29 ± 0.17	0.25	0.04-0.66	0.99
IGF-IR	3.25 ± 2.58	2.71	0.00-10.91	2.58 ± 1.59	2.42	0.00-5.54	0.66
Rectum							
IGF-I	1.04 ± 0.94	0.73	0.17-3.14	0.80 ± 0.46	0.85	0.19-1.90	0.35
IGF-II	0.30 ± 0.24	0.23	0.07-1.09	0.26 ± 0.11	0.25	0.05-0.45	0.56
IGFBP-3	1.25 ± 0.86	1.02	0.35-3.44	1.14 ± 0.57	1.10	0.18-2.28	0.65
IGF-IR	6.07 ± 2.28	6.80	2.98-11.08	7.10 ± 2.25	6.36	4.23-12.78	0.47

*P value based on independent t test of natural log-transformed IGF-I, IGF-II, and IGFBP-3, and Mann-Whitney test for IGF-IR.

Tab. 17: mRNA Expression von IGF-1, IGF-2, IGFBP-3 und IGF-1R in Kolon und Mastdarm nach Isoflavon und Placebo Gabe (nach Vrieling et al., 2008)

6.10 Wirkung auf den Homocysteinspiegel

Für die Dauer von vier Menstruationszyklen erhielten in einer randomisierten, doppelblinden, Placebokontrollierten Parallelstudie, 23 prämenopausale Frauen (18 bis 45 Jahre, reguläre Menstruationsblutung) ein Rotkleepräparat mit 86 mg/d Isoflavonen.

Es konnten keine Unterschiede der Folsäure- und Homocysteinkonzentration zwischen Verum und Placebo sowie in Follikel- und Gelbkörperphase festgestellt werden (s. Tab. 18).

In der Placebogruppe war ein nicht signifikanter Trend des vermehrten Alkoholkonsums auffällig, der eine verminderte Kalorien- und Folsäureaufnahme und somit erhöhte Homocysteinkonzentrationen bedingt (Samman et al., 2009).

	Placebo group			Intervention group		
	Monthly average	Follicular phase	Luteal phase	Monthly average	Follicular phase	Luteal phase
Serum folate (nmol/L)						
Month 1	12.46 ± 4.00	12.28 ± 3.90	12.58 ± 4.28	10.40 ± 2.17	9.78 ± 2.46	10.93 ± 2.23
Month 3	12.27 ± 3.03	11.99 ± 2.97	12.74 ± 3.94	9.84 ± 2.09	9.97 ± 1.81	10.14 ± 2.63
Month 4	12.49 ± 3.58	12.78 ± 3.28	12.51 ± 4.67	9.95 ± 2.33	9.81 ± 2.21	10.01 ± 3.16
Serum Hcy ^c (µmol/L)						
Month 1	8.15 ± 1.78	8.25 ± 1.73	8.06 ± 1.89	8.64 ± 1.98	8.69 ± 2.10	8.47 ± 1.98
Month 3	8.37 ± 1.74	8.36 ± 1.58	8.26 ± 2.07	8.85 ± 1.82	9.07 ± 1.86	8.88 ± 2.03
Month 4	8.16 ± 1.75	8.15 ± 1.72	8.17 ± 1.88	9.02 ± 1.62	9.20 ± 1.60	8.64 ± 1.60

Tab. 18: Folsäure- und Homocysteinkonzentration in Placebo- und Rotklee Gruppe (nach Samman et al., 2009)

6.11 Pharmakokinetische Wirkung

In einer Pilotstudie an vier Männern und drei Frauen (24-30 Jahre) wurde die Absorption der Rotklee-Isoflavone Irilon, Prunetin und Pseudobaptigenin aus einem Nahrungsergänzungsmittels mit 38,8 mg Gesamtisoflavonen untersucht.

Drei Tage vor der Verabreichung des Rotkleepräparates durften die Testpersonen keine isoflavonhaltige Nahrung oder Supplemente zu sich nehmen. 6,5 Stunden nach der Einnahme wurden die Plasmawerte bestimmt.

Formononetin und Biochanin A, die Hauptisoflavone im Rotklee, wurden in großen Mengen demethyliert zu Daidzein und Genistein.

Daidzein zeigte die höchsten Plasmakonzentrationen mit 0,385 µM, gefolgt von Irilon mit 0,351 µM. Es wurden höhere Isoflavonplasmawerte bei den männlichen Probanden gefunden als bei den weiblichen, vor allem bei Irilon (s. Tab. 19).

Biochanin A und Pseudobaptigenin zeigten höhere Konzentration im Plasma als im Nahrungsergänzungsmittel, während Prunetin annähernd gleiche Konzentration erreichte.

Pseudobaptigenin und Prunetin konnten das erste Mal im Plasma nachgewiesen werden, Pseudobaptigenin nur in sehr geringen Konzentrationen (Maul et al., 2010).

Subjects	Body weight (kg)	IF plasma level (nm)									
		FORM		BIOA		DAI		GEN		IRI	
Female 1	75	144		21		347		79		197	
Female 2	72	68		10		385		52		250	
Female 3	64	34		9		158		36		179	
Male 4	73	187		10		493		58		589	
Male 5	63	140		26		592		94		394	
Male 6	78	83		14		444		79		504	
Male 7	108	119		8		271		43		344	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Female		82	56	13	7	297	122	56	22	209	37
Male		132	44	15	8	450	134	68	23	458	110
Group		111	52	14	7	385	144	63	21	351	156

FORM, formononetin; BIOA, biochanin A; DAI, daidzein; GEN, genistein; IRI, irilone.

Tab. 19: Plasmawerte der Isoflavone Formononetin, Biochanin A, Daidzein, Genistein und Irilon (nach Maul et al., 2010)

6.12 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen

An gesunden Frauen (n=401) mit erhöhten Brustkrebsrisiko durch familiäre Vorgeschichte, wurde in einer randomisierten, doppelblinden, Placebokontrollierten Studie die Sicherheit und Verträglichkeit eines standardisierten Nahrungsergänzungsmittels mit 40 mg Isoflavon untersucht.

Für drei Jahre erhielten prä- und postmenopausale Probandinnen (35–70 Jahren)

entweder Verum oder Placebo. Alle sechs Monate wurden klinische Untersuchungen und Blutproben genommen. Einmal pro Jahr wurde bei den postmenopausalen Frauen eine Mammographie, eine Knochendichtemessung und ein transvaginaler Ultraschall gemacht.

Die Studie zeigte keine Unterschiede zwischen der Placebo- und der Verumgruppe hinsichtlich der Dichte des Brustgewebes, der Dicke des Endometriums, der Knochenmineraldichte, des Serumcholesterins und FSH Werte.

Bei postmenopausalen Frauen in der Placebogruppe stieg nach sechs und nach zwölf Monaten die knochenspezifische alkalische Phosphatase (Powles et al., 2008).

Orr et al. (2013) berichteten von einer unerwünschten Wechselwirkung zwischen Rotklee und Methotrexat. Eine 52-jährige Frau erhielt aufgrund ihrer starken Psoriasis schon seit zwei Jahren wöchentlich Methotrexat-Infusionen. Wegen auftretender Hitzewallungen wurden als Alternativtherapie Rotkleekapseln (430 mg) empfohlen. Nach dreitägiger Einnahme traten starkes Erbrechen und Oberbauchschmerzen auf. Diese Symptome sprachen für eine erhöhte Methotrexat-Toxizität, obwohl die Leberwerte im Normalbereich lagen. Deswegen vermutete man, dass das Rotkleepräparat Wechselwirkungen mit Methotrexat zeigte. Nach Absetzen des Rotkleepräparates und einer weiteren Methotrexat Infusion traten keine weiteren unerwünschten Wirkungen auf. Orr et al. vermuteten, dass Rotklee den Abbau von Methotrexat in der Leber beeinflusst und deswegen unerwünschte Nebenwirkungen auftraten.

7. In Silico Studie

Das Ziel einer in silico Studie war, die chemischen Bestandteile von Pflanzen, die als Phytoöstrogene in Verwendung sind (Hopfen, Mönchspfeffer, Rotklee, Traubensilberkerze) hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die Leber zu untersuchen. Basierend auf öffentlich zugänglichen Datenbanken wurden Datensets für jede Pflanze angelegt, die die Komponenten und ihre Strukturen enthielten. Es konnten 94 Bestandteile für Rotklee identifiziert werden. Um die lebertoxischen Endpunkte zu ermitteln, wurden fünf verschiedene Softwareprogramme eingesetzt. Als Positivkontrolle wurden Diclofenac, Benoxaprofen und das Pyrrolizidinalkaloid Monocrotalin, als Negativkontrolle N-acetylcystein und Ranolazin verwendet. 17 der 94 Komponenten aus Rotklee wurden als lebertoxisch vorhergesagt. Mittels der LMA-Software wurden jene Teile der Moleküle identifiziert, die toxisch auf die Leber wirken könnten (s. Tab. 20). Mit Hilfe der Leadscope-Enterprise-Software konnten wichtige Schlüsselstrukturen in den Inhaltsstoffen der Pflanzen vorhergesagt werden, die lebertoxische Effekte haben könnten: Phenole, Flavone, Isoflavone und deren Glykoside sowie 4-Hydroxyacethophenone. Aus drei verschiedenen Datenbanken wurden eine orale Höchstdosis für Rotklee von 4g/Tag ermittelt (Wang et al., 2011 b).

Botanical	Constituents analyzed by LMA
Red clover	3-Methyl-quercetin-7-O-beta-D-glucoside-6-malonate Irilin β-7-beta-D-glucoside-6-O-malonate Texasin-7-O-beta-D-glucoside-6-O-malonate Irilone-4-O-beta-D-glucoside-6-O-malonate 3-Methoxy-quercetin-7-O-beta-D-glucoside Formononetin-7-O-beta-D-glucoside-6-O-acetate Ononin Afromosin-7-O-beta-D-glucoside Biochanin A-7-beta-D-glucoside-6-O-acetate Sissotrin Daphnoretin

Tab. 20: Bestandteile aus Rotklee, die durch die LMA-Software positiv auf Lebertoxizität beurteilt wurden (nach Wang et al., 2011 b)

8. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Fortschritt in der Forschung an Rotklee zwischen 2008 und 2013.

Chemisch war Rotklee bereits vor diesem Zeitraum sehr gut untersucht. Daher wurden in den Jahren zwischen 2008 und 2013 nur einige neue Isoflavon-Glykoside charakterisiert sowie erstmals Salicylsäure aus Rotklee isoliert.

Konzentrationsbestimmungen von Isoflavonen in Nahrungsergänzungsmitteln zeigten fehlerhafte Herstellerangaben und stark variierende Mengen an Isoflavonen pro Tablette/Kapsel. Dies macht Patienten einen Vergleich der Präparate sehr schwierig.

Viele in vitro Studien beschäftigten sich mit der Wirkung von Rotkleeextrakten auf verschiedene Zelllinien. So konnte gezeigt werden, dass hohe Isoflavonkonzentrationen das Wachstum verschiedener Krebszelllinien nicht förderten.

Mehrere Studien beschäftigten sich mit den positiven Wirkungen von Rotklee auf Brustkrebs. So hemmte Formononetin die Proliferation in Östrogen-positiven Brustkrebszelllinien und das Tumorwachstum bei Mäusen. Genistein und Isoflavongemische zeigten protektive Effekte auf die Migration von Brustkrebszellen. Die Sicherheitsbewertung eines Nahrungsergänzungsmittels mit 40 mg Rotkleeisoflavonen zeigte nach dreijähriger Einnahme keine Unterschiede in der Dichte des Brustgewebes zwischen Verum und Placebo. Ein verringertes Brustkrebsrisiko korrelierte mit der Einnahme eines Rotklee-Nahrungsergänzungsmittels über ein Jahr.

Die Isoflavone des Rotklees konnten in Prostatakrebszellen und BHP-Stromazellen die PSA Protein- und Genexpression reduzieren, die Proliferation hemmen und Apoptose induzieren. In einer klinischen Studie resultierte eine tägliche Einnahme von 60 mg Rotkleeisoflavonen bei BHP in einer 33% Reduktion des PSA Wertes.

Eine neuroprotektive Wirkung von Isoflavonen wurde in zwei in vitro Studien nachgewiesen.

In einer in vitro Studie führte Biochanin A zur Differenzierung von Preosteoblasten zu Osteoblasten und erhöhte deren Mineralisierung. In vivo wurde eine verringerte Knochenmineraldichte und reduzierter Knochenmineralgehalt sowohl durch Biochanin A als auch durch einen Rotkleeextrakt erhöht. Auch Formononetin resultierte in vivo in positiven Effekten. Eine klinische Studie an postmenopausalen Frauen zeigte allerdings keine signifikante Senkung der Knochenresorption.

Protektive Effekte von Rotkleeisoflavone auf die Leber umfassten den Schutz vor einer chronischen Schädigung durch CCl₄ durch Biochanin A und die Senkung von LDL- und Cholesterin-Werten durch Rotkleeextrakt. In einer klinischen Studie an postme-

nopausalen Frauen wurden Cholesterin, LDL und Triglycerid-Werte gesenkt und HDL-Werte erhöht. Dagegen postulierte eine *in silico* Studie, dass Daidzein-7-O-beta-D-glucosid-6''-O-acetat zu Leberschädigungen führen könnte und eine Höchstdosis von 4g Rotklee/Tag nicht überschritten werden soll.

Eine Reihe von Studien befassten sich mit der Wirkung von Rotklee auf menopausale Beschwerden, wobei vielfach subjektive Verbesserungen demonstriert werden konnten, allerdings oft keine signifikanten Unterschiede zur Placebogruppe bestanden.

10. Summary

This thesis compiles the progress in the research on red clover during 2008 to 2013.

Chemically, red clover was already well-studied before this period. Therefore only few new isoflavone glucosides have been characterized between 2008 and 2013 as well as salicylic acid was isolated for the first time from red clover.

The quantification of isoflavones in food supplements resulted in the proof of incorrect declarations and significantly differing amounts of isoflavones per tablet/capsule. This makes a comparison of the preparations quite difficult.

Many *in vitro* studies dealt with the effect of red clover extracts on different cell lines. It was shown that high isoflavone concentrations did not promote the growth of different cancer cell lines.

Some studies reported positive effects of red clover on breast cancer. Formononetin inhibited proliferation in estrogen-positive breast cancer cell lines and tumor growth in mice. Genistein and total isoflavones showed protective effects on cell migration of breast cancer cells. The safety assessment of a food supplement containing 40 mg red clover isoflavones did not show any differences in the density of breast tissue between verum and placebo after three years of treatment. A reduced risk of breast cancer correlated with the ingestion of a red clover food supplement over a year.

Red clover isoflavones reduced PSA protein- and gene expression in prostate cancer cells and BHP stroma cells, inhibited proliferation and induced apoptosis. In a clinical study daily intake of 60 mg red clover isoflavones resulted in a 33% reduction of the PSA value in BHP.

A neuroprotective effect of isoflavones was demonstrated in two studies.

In an *in vitro* study biochanin A led to the differentiation of preosteoblasts into osteoblasts and increased their mineralization. *In vivo*, reduced bone mineral density and the reduced bone mineral content were increased by biochanin A and a red clover extract. Formononetin as well resulted in positive *in vivo* effects. A clinical study in postmenopausal women did not show a significant reduction of bone resorption.

Protective effects of red clover isoflavones in the liver comprised the prevention of chronic damage caused by CCl₄ by biochanin and the reduction of LDL- and cholesterol by a red clover extract. In a clinical trial in postmenopausal women, cholesterol, LDL and triglyceride levels decreased, while HDL values increased. In contrast, an *in silico* study postulated that daidzein-7-O-beta-D-glucosid-6"-O-acetate might lead to liver damage and recommended a maximum dose of 4g red clover /day.

A series of studies dealt with the effects of red clover on menopausal complaints and subjective improvement of manifold symptoms was demonstrated, although frequently no significant differences to the placebo group were recorded.

9. Literaturverzeichnis

ADAIKAN P. G., SRILATHA B., WHEAT A. J. (2009): Efficacy of red clover isoflavones in the menopausal rabbit model. *Fertility and Sterility*, 92(6), 2008-2013

ADORJAN A. (2005): ROTKLEE: Chemie, Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Studien. Diplomarbeit, Univ. Wien

ALVES D. L., LIMA S. M. R. R., DA SILVA C. R., LONGO GALVAO M. A., SHANAIDER A., DE ALMEIDA PRADO R. A., AOKI T. (2008): Effects of *Trifolium pratense* and *Cimicifuga racemosa* on the endometrium of Wistar rats. *Maturitas*, 61(4), 364-70

ANDERSEN C., NIELSEN T. S., PURUP S., KRISTENSEN T., ERIKSEN J., SOEEGAARD K., SOERENSEN J., FRETTE X. C. (2009): Phyto-oestrogens in herbage and milk from cows grazing white clover, red clover, lucerne or chicory-rich pastures. *Animal*, 3(8), 1189-1195

ANISHCHENKO A. M. (2013): Hemorheological Effects of Complex Isoflavonoid Preparation in Ovariectomized Rats. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 154(6), 755-757

BOUCHER B. A., COTTERCHIO M., ANDERSON L. N., KREIGER N., KIRSH V. A., THOMPSON L. U. (2013): Use of isoflavone supplements is associated with reduced postmenopausal breast cancer risk. *International Journal of Cancer*, 132(6), 1439-1450

BRANDLI A., SIMPSON J. S., VENTURA S. (2010): Isoflavones isolated from red clover (*Trifolium pratense*) inhibit smooth muscle contraction of the isolated rat prostate gland. *Phytomedicine*, 17(11), 895-901

BRAUNE A., MAUL R., SCHEBB N. H., KULLING S. E., BLAUT M. (2010): The red clover isoflavone irilone is largely resistant to degradation by the human gut microbiota. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(7), 929-938

BREIKAA R. M., ALGANDABY M. M., EL-DEMERDASH E., ABDEL-NAIM A. B. (2013): Multimechanistic antifibrotic effect of Biochanin A in rats: implications of proinflammatory and profibrogenic mediators. *PLoS One*, 8(7), e69276, doi:10.1371/journal.pone.0069276

CEGIELA U., FOLWARCZNA J., PYTLIK M., ZGORKA G. (2012): Effects of Extracts from *Trifolium medium* L. and *Trifolium pratense* L. on Development of Estrogen Deficiency- Induced Osteoporosis in Rats. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2012921684, doi:10.1155/2012/921684

- CHEN H.-Q., WANG X.-J., JIN Z.-Y., XU X.-M., ZHAO J.-W., XIE Z.-J. (2008): Protective effect of isoflavones from *Trifolium pratense* on dopaminergic neurons. *Neuroscience Research (Amsterdam, Netherlands)*, 62(2), 123-130
- CHEN J., SUN L. (2012): Formononetin-induced apoptosis by activation of Ras/p38 mitogen-activated protein kinase in estrogen receptorpositive human breast cancer cells. *Hormone and Metabolic Research*, 44(13), 943-948
- CHEN J., ZENG J., XIN M., HUANG W., CHEN X. (2011): Formononetin induces cell cycle arrest of human breast cancer cells via IGF1/PI3K/Akt pathways in vitro and in vivo. *Hormone and Metabolic Research*, 43(10), 681-686
- CHEN M., YAN S., YIN C., YE L., ZHANG M., YANG J., LIU J. (2010 a): Red clover isoflavones inhibit proliferation and promote apoptosis of benign prostatic hyperplasia stromal cells. *Zhonghua Nankexue Zazhi*, 16(1), 34-39
- CHEN Y., HUANG C., ZHOU T., ZHANG S., CHEN G. (2010 b): Biochanin A induction of sulfotransferases in rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 24(2), 102-114
- CLARKE D. B., BAILEY V., LLOYD A. S. (2008): Determination of phytoestrogens in dietary supplements by LC-MS/MS. *Food Additives & Contaminants, Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 25(5), 534-547
- DEL GIORNO C., DA FONSECA A. M., BAGNOLI V. R., DE ASSIS J. S., SOARES J. M. Jr., BARACAT E. C. (2010): Effects of *Trifolium pratense* on the climacteric and sexual symptoms in postmenopause women. *Revista da Associacao Medica Brasileira*, 56(5), 558-62
- DRENIN A. A., BOTIROV E. Kh., PETRULYAK E. V. (2008 a): Two new isoflavonoid monogalactosides from *Trifolium pratense* roots. *Chemistry of Natural Compounds*, 44(1), 24-27
- DRENIN A. A., BOTIROV E. Kh., PETRULYAK E. V. (2008 b): New genistein monogalactoside from the aerial part of *Trifolium pratense*. *Chemistry of Natural Compounds*, 44(2), 178-181
- DRENIN A. A., BOTIROV E. Kh., TUROV YU P. (2010): Novel isoflavone monoglycoside from *Trifolium pratense* L. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, (2), 53-56
- DRENIN A. A., BOTIROV E. Kh., TUROV YU P. (2011): A new isoflavone glycoside from *Trifolium pratense* L. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 37(7), 862-865
- EHSANPOUR S., SALEHI K., ZOLFAGHARI B., BAKHTIARI S. (2012): The effects of red clover on quality of life in post-menopausal women. *Iranian journal of nursing and*

midwifery research, 17(1), 34-40

ENGELHARDT P. F., RIEDL C. R. (2008): Effects of one-year treatment with isoflavone extract from red clover on prostate, liver function, sexual function, and quality of life in men with elevated PSA levels and negative prostate biopsy findings. *Urology*, 71(2), 185-90

GELLER S. E., SHULMAN L. P., VAN BREEMEN R. B., BANUVAR S., ZHOU Y., EPSTEIN G., HEDAYAT S., NIKOLIC D., KRAUSE E. C., PIERSEN C. E., BOLTON J. L., PAULI G. F., FARNSWORTH N. R. (2009): Safety and efficacy of black cohosh and red clover for the management of vasomotor symptoms: a randomized controlled trial. *Menopause (New York, N.Y.)*, 16(6), 1156-66

GIKAS E., ALESTA A., ECONOMOU G., KARAMANOS A., TSARBOPOULOS A. (2008): Determination of Isoflavones in the Aerial Part of Red Clover by HPLC-Diode Array Detection. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 31(8), 1181-1194

GRAY N. E., LIU X., CHOI R., BLACKMANN M. R., ARNOLD J. T. (2009): Endocrine-immune-paracrine interactions in prostate cells as targeted by phytochemicals. *Cancer Prevention Research*, 2(2), 134-142

HOEJER A., ADLER S., PURUP S., HANSEN-MOELLER J., MARTINSSON K., STEINSHAMN H., GUSTAVSSON A.-M. (2012): Effects of feeding dairy cows different legume-grass silages on milk phytoestrogen concentration. *Journal of Dairy Science*, 95(8), 4526-4540

JACOBS A., WEGEWITZ U., SOMMERFELD C., GROSSKLAUS R., LAMPEN A. (2009): Efficacy of isoflavones in relieving vasomotor menopausal symptoms - A systematic review. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53(9), 1084-1097

JU Y. H., DOERGE D. R., HELFERICH W. G. (2008): A dietary supplement for female sexual dysfunction, Avlimil, stimulates the growth of estrogen-dependent breast tumors (MCF-7) implanted in ovariectomized athymic nude mice. *Food and Chemical Toxicology*, 46(1), 310-320

KACZMARCZYK-SEDLAK I., WOJNAR W., ZYCH M., OZIMINA-KAMINSKA E., TARANOWICZ J., SIWEK A. (2013): Effect of formononetin on mechanical properties and chemical composition of bones in rats with ovariectomy-induced osteoporosis. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2013457052

KAWAKITA S., MAROTTA F., NAITO Y., GUMASTE U., JAIN S., TSUCHIYA J., MINELLI E. (2009): Effect of an isoflavones-containing red clover preparation and alkaline supplementation on bone metabolism in ovariectomized rats. *Clinical Interventions in Aging*, 4, 91-100

KLEJDUS B., VACEK J., LOJKOVA L., BENESOVA L., KUBAN V. (2008): Ultrahigh-pressure liquid chromatography of isoflavones and phenolic acids on different stationary phases. *Journal of Chromatography A*, 1195(1-2), 52-59

KO W.-C., LIN L.-H., SHEN H.-Y., LAI C.-Y., CHEN C.-M., SHIH C.-H. (2011): Biochanin A, a phytoestrogenic isoflavone with selective inhibition of phosphodiesterase 4, suppresses ovalbumin-induced airway hyperresponsiveness. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2011635058

KOLE L., GIRI B., MANNA S. K., PAL B., GHOSH S. (2011): Biochanin-A, an isoflavon, showed anti-proliferative and anti-inflammatory activities through the inhibition of iNOS expression, p38-MAPK and ATF-2 phosphorylation and blocking NFkB nuclear translocation. *European Journal of Pharmacology*, 653(1-3), 8-15

KRENN L., PAPER D. H. (2009): Inhibition of angiogenesis and inflammation by an extract of red clover (*Trifolium pratense* L.). *Phytomedicine*, 16(12), 1083-1088

LEE C. C., BLOEM C. J., KASA-VUBU J. Z., LIANG L. J. (2012): Effect of oral phytoestrogen on androgenicity and insulin sensitivity in postmenopausal women. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 14(4), 315-319

LIN C.-C., TSAI Y.-L., HO C.-T., TENG S.-C. (2008): Determination of the differential estrogenicity of isoflavonoids by E2-ER-ERE-dependent gene expression in recombinant yeast and MCF-7 human breast cancer cells. *Food Chemistry*, 108(2), 719-726

LIN V. C., DING H.-Y., TSAI P.-C., WU J.-Y., LU Y.-H., CHANG T.-S. (2011): In vitro and in vivo melanogenesis inhibition by biochanin A from *Trifolium pratense*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75(5), 914-918

LIPOVAC M., CHEDRAUI P., GRUENHUT C., GOCAN A., KURZ C., NEUBER B., IMHOF M. (2011): Effect of red clover isoflavones over skin, appendages, and mucosal status in postmenopausal women. *Obstetrics and Gynecology International*, 949302, 6 pp

LIPOVAC M., CHEDRAUI P., GRUENHUT C., GOCAN A., KURZ C., NEUBER B., IMHOF M. (2012): The effect of red clover isoflavone supplementation over vasomotor and menopausal symptoms in postmenopausal women. *Gynecological Endocrinology*, 28(3), 203-207

LIPOVAC M., CHEDRAUI P., GRUENHUT C., GOCAN A., STAMMLER M., IMHOF M. (2010): Improvement of postmenopausal depressive and anxiety symptoms after treatment with isoflavones derived from red clover extracts. *Maturitas*, 65(3), 258-261

- LIU X., PIAO Y., ARNOLD J. T. (2011): Transforming growth factor b1 increase of hydroxysteroid dehydrogenase proteins is partly suppressed by red clover isoflavones in human primary prostate cancer-derived stromal cells. *Carcinogenesis*, 32(11), 1648-1654
- MA H., SULLIVAN-HALLEY J., SMITH A. W., NEUHOUSER M. L., ALFANO C. M., MEESKE K., GEORGE S. M., McTIERNAN A., McKEAN-COWDIN R., BAUMGARTNER K. B., BALLARD-BARBASH R., BERNSTEIN L. (2011): Estrogenic botanical supplements, health-related quality of life, fatigue, and hormone-related symptoms in breast cancer survivors: a HEAL study report. *BMC complementary and alternative medicine*, 11:109
- MAKI P. M., RUBIN L. H., FORNELLI D., DROGOS L., BANUVAR S., SHULMAN L. P., GELLER S. E. (2009): Effects of botanicals and combined hormone therapy on cognition in postmenopausal women. *Menopause (New York, N.Y.)*, 16(6), 1167-77
- MANNA S. K. (2012): Double-edged sword effect of biochanin to inhibit nuclear factor kappaB: Suppression of serine/threonine and tyrosine kinases. *Biochemical Pharmacology*, 83(10), 1383-1392
- MANNELLA P., TOSI V., RUSSO E., ZULLINO S., PANCETTI F., GOMPAL S., POLAK K., GENAZZANI A. R., GENAZZANI A. D., SIMONCINI T. (2012): Effects of red clover extracts on breast cancer cell migration and invasion. *Gynecological Endocrinology*, 28(1), 29-33
- MAUL R., KULLING S. E. (2010): Absorption of red clover isoflavones in human subjects: results from a pilot study. *British Journal of Nutrition*, 103(11), 1569-1572
- MAUL R., SIEGL D., KULLING S. E. (2011): Glucuronidation of the red clover isoflavone irilone by liver microsomes from different species and human UDPglucuronosyltransferases. *Drug Metabolism and Disposition*, 39(4), 610-616
- MEDJAKOVIC S., JUNGBAUER A. (2008): Red clover isoflavones biochanin A and formononetin are potent ligands of the human aryl hydrocarbon receptor. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 108(1-2), 171-177
- MISHRA P., KAR A., KALE R. K. (2009): Modulatory influence of prepubertal biochanin A exposure on mammary gland differentiation and expression of estrogen receptor- α and apoptotic proteins. *Phytotherapy Research*, 23(7), 972-979
- MOGA M., PREDA G. H. (2008): Phytoestrogens and the breast. *Journal of Environmental Protection and Ecology*, 9(2), 338-343
- MU H., BAI Y.-H., WANG S.-T., ZHU Z.-M., ZHANG Y.-W. (2009): Research on

antioxidant effects and estrogenic effect of formononetin from *Trifolium pratense* (red clover). *Phytomedicine*, 16(4), 314-319

MUELLER M., JUNGBAUER A. (2008): Red clover extract: a putative source for simultaneous treatment of menopausal disorders and the metabolic syndrome. *Menopause (New York, N.Y.)*, 15(6), 1120-31

MUELLER M., HOBIGER S., JUNGBAUER A. (2010): Red clover extract: a source for substances that activate peroxisome proliferator-activated receptor alpha and ameliorate the cytokine secretion profile of lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Menopause (New York, N.Y.)*, 17(2), 379-87

MUN J. G., GRANNAN M. D., LACHCIK P. J., REPERT A., YOUSEF G. G., ROGERS R. B., JANLE E. M., WEAVER C. M., LILA M. A. (2009): In vivo metabolic tracking of ¹⁴C-radiolabelled isoflavones in kudzu (*Pueraria lobata*) and red clover (*Trifolium pratense*) extracts. *British Journal of Nutrition*, 102(10), 1523-1530

MUSTONEN E. A., TUORI M., SAASTAMOINEN I., TAPONEN J., WAHALA K., SALONIEMI H., VANHATALO A. (2009): Equol in milk of dairy cows is derived from forage legumes such as red clover. *British Journal of Nutrition*, 102(11), 1552-1556

OCCHIUTO F., PALUMBO D. R., SAMPERI S., ZANGLA G., PINO A., DE PASQUALE R., CIRCOSTA C. (2009): The isoflavones mixture from *Trifolium pratense* L. protects HCN 1-A neurons from oxidative stress. *Phytotherapy Research*, 23(2), 192-196

OCCHIUTO F., ZANGLA G., SAMPERI S., PALUMBO D. R., PINO A., DE PASQUALE R., CIRCOSTA C. (2008): The phytoestrogenic isoflavones from *Trifolium pratense* L. (Red clover) protects human cortical neurons from glutamate toxicity. *Phytomedicine*, 15(9), 676-682

OLAH N.- K., HANGANU D., VLASE L., COBZAC C. (2010): The study of polyphenols from *Trifolium pratense* L. And *Medicago sativa* L. hydroalcoholic extracts by HPLC-UV-MS. *Studia Universitatis Babeş-Bolyai, Chimia*, 55(2, Pt. 2), 353-362

ORR A., PARKER R. (2013): Red clover causing symptoms suggestive of methotrexate toxicity in a patient on high-dose methotrexate. *Menopause international*, 19(3), 133-4

OVERK C. R., GUO J., CHADWICK L. R., LANTVIT D. D., MINASSI A., APPENDINO G., CHEN S., LANKIN D. C., FARNSWORTH N. R., PAULI G. F., VAN BREMEN R. B., BOLTON J.L. (2008): In vivo estrogenic comparisons of *Trifolium pratense* (red clover) and *Humulus lupulus* (hops), and the pure compounds isoxanthohumol and 8-prenylnaringenin. *Chemico-Biological Interactions*, 176(1), 30-39

PAKALAPATI G., LI L., GRETZ N., KOCH E., WINK M. (2009): Influence of red clover

(*Trifolium pratense*) isoflavones on gene and protein expression profiles in liver of ovariectomized rats. *Phytomedicine*, 16(9), 845-855

PENG J.-B., YANG W.-J., LI Z.-L., GAO Y.-Y., HUA H.-M. (2008): Chemical constituents from the whole plants of *Trifolium pratense* L. *Shenyang Yaoke Daxue Xuebao*, 25(11), 875-879

PFITSCHER A., REITER E., JUNGBAUER A. (2008): Receptor binding and transactivation activities of red clover isoflavones and their metabolites. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 112(1-3), 87-94

POWLES T. J., HOWELL A., EVANS D. G., McCLOSKEY E. V., ASHLEY S., GREENHALGH R., AFFEN J., FFLOOK L. A., TIDY A. (2008): Red clover isoflavones are safe and well tolerated in women with a family history of breast cancer. *Menopause international*, 14(1), 6-12

QIU L., YE H., CHEN L., HONG Y., ZHONG F., ZHANG T. (2012): Red Clover Extract Ameliorates Dyslipidemia in Streptozotocin-induced Diabetic C57BL/6 Mice by Activating Hepatic PPAR α . *Phytotherapy Research*, 26(6), 860-864

RAMOS G. P., APEL M. A., DE MORAIS C. B., CEOLATA P. C., SCHAPOVAL E. E. S., DALL'AGNOL M., ZUANAZZI J. A. S. (2012): In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of red clover *Trifolium pratense* dry extract. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22(1), 176-180

REITER E., BECK V., MEDJAKOVIC S., MUELLER M., JUNGBAUER A. (2009): Comparison of hormonal activity of isoflavone-containing supplements used to treat menopausal complaints. *Menopause (New York, N.Y.)*, 16(5), 1049-60

REITER E., GERSTER P., JUNGBAUER A. (2011): Red clover and soy isoflavones-an in vitro safety assessment. *Gynecological Endocrinology*, 27(12), 1037-1042

RENDA G., YALCIN F. N., NEMUTLU E., AKKOL E. K., SUNTAR I., KELES H., INA H., CALIS I., ERSOZ T. (2013): Comparative assessment of dermal wound healing potentials of various *Trifolium* L. extracts and determination of their isoflavone contents as potential active ingredients. *Journal of Ethnopharmacology*, 148(2), 423-432

ROCHESTER J. R., KLASING K. C., STEVENSON L., DENISON M. S., BERRY W., MILLAM J. R. (2009): Dietary red clover (*Trifolium pratense*) induces oviduct growth and decreases ovary and testes growth in Japanese quail chicks. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 27(1), 63-71

SAMMAN S., KOH H. S., FLOOD V. M., BLAKESMITH S. J., PETOCZ P., LYONS-WALL P. M. (2009): Red clover (*Trifolium pratense*) isoflavones and serum homocysteine in premenopausal women: a pilot study. *Journal of women's health*, 18(11), 1813-6

SAVIRANTA N.M.M., ANTTONEN M. J., VON WRIGHT A., O KARJALAINEN R. (2008): Red clover (*Trifolium pratense* L.) isoflavones: determination of concentrations by plant stage, flower colour, plant part and cultivar. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(1), 125-132

SAVIRANTA N.M.M., JULKUNEN-TIITTO R., OKSANEN E., O KARJALAINEN R. (2010): Red clover (*Trifolium pratense* L.) isoflavones: root phenolic compounds affected by biotic and abiotic stress factors. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(3), 418-423

SCHWARTZ H., SONTAG G. (2008): Determination of isoflavones in nutritional supplements by HPLC with coulometric electrode array detection. *Monatshefte für Chemie*, 139(8), 865-872

SINGH S. P., WAHAJUDDIN, JAIN G. K. (2011a): Intravenous pharmacokinetics and oral bioavailability of biochanin A in female rats. *Medicinal Chemistry Research*, 20(9), 1627-1631

SINGH S. P., WAHAJUDDIN, TEWARI D., PRADHAN T., JAIN G. K. (2011b): PAMPA permeability, plasma protein binding, blood partition, pharmacokinetics and metabolism of formononetin, a methoxylated isoflavone. *Food and Chemical Toxicology*, 49(5), 1056-1062

SU S.-J., YEY Y.-T., SHYU H.-W. (2013): The preventive effect of biochanin a on bone loss in ovariectomized rats: involvement in regulation of growth and activity of osteoblasts and osteoclasts. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2013594857

SZLISZKA E., CZUBA Z. P., MERTAS A., PARADYSZ A., KROL W. (2013): The dietary isoflavone biochanin-A sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 31(3), 331-342

TAN J. W., THAM C. L., ISRAF D. A., LEE S. H., KIM M. K. (2013): Neuroprotective Effects of Biochanin A Against Glutamate-Induced Cytotoxicity in PC12 Cells Via Apoptosis Inhibition. *Neurochemical Research*, 38(3), 512-518

TAVA A., RAMELLA D., GRECCHI M., ACETO P., PAOLETTI R., PIANO E. (2009): Volatile constituents of *Trifolium pratense* and *T. repens* from N.E. Italian alpine pastures. *Natural Product Communications*, 4(6), 835-838

TERZIC M. M., DOTLIC J., MARICIC S., MIHAILOVIC T., TOSIC-RACE B. (2009): Influence of red clover-derived isoflavones on serum lipid profile in postmenopausal women. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 35(6), 1091-1095

- TIAN Z., LIU S.-B., WANG Y.-C., LI X.-Q., ZHENG L.-H., ZHAO M.-G. (2013): Neuroprotective Effects of Formononetin against NMDA-Induced Apoptosis in Cortical Neurons. *Phytotherapy Research*, 27(12), 1770-1775
- TOH M. F., SOHN J., CHEN S. N., YAO P., BOLTON J. L., BURDETTE J. E. (2012): Biological characterization of non-steroidal progestins from botanicals used for women's health. *Steroids*, 77(7), 765-773
- TSURKAN O. O., KOVALCHUK T. V., BURMAKA O. V. (2008a): Identification and quantitative determination of polysaccharides in flowers of red clover. *Farmatsevtichnii Zhurnal (Kiev, Ukraine)*, (6), 109-112
- TSURKAN O. O., KOVALCHUK T. V., BURMAKA O. V. (2008b): Identification and quantitative determination of amino acids in flowers of red clover. *Farmatsevtichnii Zhurnal (Kiev, Ukraine)*, (5), 114-118
- VISHALI N., KAMAKSHI K., SURESH S., PRAKASH S. (2011): Red clover *Trifolium pratense* (Linn.) isoflavones extract on the pain threshold of normal and ovariectomized rats – a long-term study. *Phytotherapy Research*, 25(1), 53-58
- VRIELING A., ROOKUS M. A., KAMPMAN E., BONFRER J. M. G., BOSMA A., CATS A., VAN DOORN J., KORSE C. M., WITTEMAN B. J. M., VAN LEEUWEN F. E., VAN'T VEER L. J., VOSKUIL D. W. (2008): No Effect of Red Clover-Derived Isoflavone Intervention on the Insulin-Like Growth Factor System in Women at Increased Risk of Colorectal Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 17(10), 2585-2593
- WANG S.-Y., JIANG K., YANG J.-G., PU L.-H., LI C., SHEN Y.-H., FANG X.-X. (2009): Inhibition of *Trifolium pratense* extract to matrix metalloproteinases activity. *Jilin Daxue Xuebao, Lixueban*, 47(1), 150-153
- WANG S., ZENG X., GAO J., SONG F. (2011 a): Studies on the chemical constituents of *Trifolium pratense*. *Huazhong Shifan Daxue Xuebao, Ziran Kexueban*, 45(1), 72-74, 94
- WANG S. W. J., CHEN Y., JOSEPH T., HU M. (2008 a): Variable isoflavone content of red clover products affects intestinal disposition of biochanin A, formononetin, genistein and daidzein. *Journal of alternative and complementary medicine (New York, N.Y.)*, 14(3), 287-97
- WANG Y.-J., DOU J., CROSS K. P., VALERIO L. G. Jr. (2011 b): Computational analysis for hepatic safety signals of constituents present in botanical extracts widely used by women in the United States for treatment of menopausal symptoms. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP*, 59(1), 111-24
- WANG Y., GHO W. M., CHAN F. L., CHEN S., LEUNG L. K. (2008 b): The red clover

(Trifolium pratense) isoflavone biochanin A inhibits aromatase activity and expression. *British Journal of Nutrition*, 99(2), 303-310

p

WEAVER C. M., MARTIN B. R., JACKSON G. S., McCABE G. P., NOLAN J. R., McCABE L. D., BARNES S., REINWALD S., BORIS M. E., PEACOCK M. (2009): Antiresorptive effects of phytoestrogen supplements compared with estradiol or risedronate in postmenopausal women using ⁴¹Ca methodology. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 94(10), 3798-3805

YANG Z., HUANG X.-Y., ZENG Y.-Y. (2008): Effects of red clover extract on the activation and proliferation of mouse T lymphocytes and the NO secretion of mouse macrophages. *Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica*, 43(10), 1019-24

YATKIN E., DAGLIOGLU S. (2011): Evaluation of the estrogenic effects of dietary perinatal Trifolium pratense. *Journal of veterinary science*, 12(2), 121-6

YE Y., HOU R., CHEN J., MO L., ZHANG J., HUANG Y., MO Z. (2012): Formononetin-induced apoptosis of human prostate cancer cells through ERK1/2 mitogen-activated protein kinase inactivation. *Hormone and Metabolic Research*, 44(4), 263-267

11. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Formononetin-7-O-β-D-galactopyranosid.....	3
Abb. 2: Inermin-3-O-β-D-galactopyranosid	3
Abb. 3: Genistein-7-O-β-D-galactopyranosid	4
Abb. 4: Calycosin-7-O-β-D-glucosid	4
Abb. 5: Dosisabhängiger Effekt der Isoflavonoide auf das Expressionslevel der primär ER-regulierenden Gen Profile in MCF-7 Zellen. A: Biochanin A, B: Formononetin, C: Daidzein, D: Glycitein und E: Genistein	10
Abb. 6: Effekt der Rotklee Phytoöstrogene auf die Invasion von T47-D Brustkrebszellen	12
Abb. 7: Mikroskopische Bilder der morphologischen Schäden durch Glutamat in HCN 1-A Zellen	15
Abb. 8: Mikroskopische Bilder der morphologischen Schäden durch Wasserstoffperoxid in HCN 1-A Zellen	16
Abb. 9: Bindungsaktivitäten der 19 Rotklee- und Sojapräparate A: schwarzer Balken: ERα, liniertes Balken: ERβ, B: schraffierter Balken: AR, gepunkteter Balken PR, C: PPARγ	21
Abb. 10: Transaktivierungsaktivität der 19 Rotklee- und Sojapräparate A:ERα, B: PPARγ, C: AhR	22
Abb. 11: Strukturelle Veränderungen des Klitoriswellkörpers A: Kontrollgruppe, B: OVX Gruppe, C: Östradiol Behandlung, D: Daidzein Behandlung, E: Rotklee Behandlung	25
Abb. 12: Östradiolwerte, Uterusgewicht und Osteocalcinwerte der Gruppen A (Scheinoperiert), B (Ovariectomie), C (Ovariectomie und RCE) und D (Ovariectomie mit RCE und BP) *: p<0,01 gegenüber Gruppe A, **: p<0,05 gegenüber Gruppe B, #: p<0,05 gegenüber Gruppe C	31
Abb. 13: Knochenmineraldichte und Knochenmineralgehalt/Körpermasse, sowie Prozentsatz der trabekulären Knochenmasse des Schenkelhalses der Gruppen A (Scheinoperiert), B (Ovariectomie), C (Ovariectomie und RCE) und D (Ovariectomie mit RCE und BP) *: p<0,01 gegenüber Gruppe A, **: p<0,05 gegenüber Gruppe B, #: p<0,05 gegenüber Gruppe C	32

Abb. 14: Mechanische Eigenschaften der femoralen Diaphyse	
TP10: Rotklee 10mg/kg, TP20: Rotklee 20mg/kg	
*: $p < 0,05$ signifikanter Unterschied zur Schein-operierten Gruppe	
•: $p < 0,05$; ••: $p < 0,01$; signifikanter Unterschied zur OVX Kontrollgruppe	35
Abb. 15: Festigkeit des Oberschenkelhalses	
TP10: Rotklee 10mg/kg, TP20: Rotklee 20mg/kg	
*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ signifikanter Unterschied	
zur Schein-operierten Gruppe	36
Abb. 16: Effekte des Rotklees auf vasomotorische und menopausale Symptome	47
Abb. 17: Anzahl der subjektiven Hitzewallungen	48
Abb. 18: Anzahl der objektiven Hitzewallungen	49
Abb. 19: Prozentuelle Änderung der SHBG Werte oraler Phytoöstrogengabe	52

12. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Körpergewicht, relative Uterus- und Eierstockgewichte	26
Tab. 2: Anzahl der uterinen Drüsen und luminaire Epithelzellgröße	26
Tab. 3: Effekt der Rotkleebehandlung auf Uterusgewicht, Plasmacholesterin, Triglycerid, HDL und LDL Konzentrationen	28
Tab. 4: Uterusgewicht, Serum Östradiol, Körpergewicht und Thymusmasse TP10: Rotklee 10mg/kg, TP20: Rotklee 20mg/kg *: p < 0,05; **: p < 0,01; *** p < 0,001 signifikanter Unterschied zur Schein- operierten Gruppe, ••: p < 0,01 ; •••: p < 0,001 signifikanter Unterschied zur OVX Kontrollgruppe	33
Tab. 5: Kalzium- und Phosphorgehalt TP10: Rotklee 10mg/kg, TP20: Rotklee 20mg/kg *: p < 0,05; **: p < 0,01; *** p < 0,001 signifikanter Unterschied zur Schein- operierten Gruppe, •: p < 0,05 ; ••: p < 0,01 signifikanter Unterschied zur OVX Kontrollgruppe	34
Tab. 6: Festigkeit der tibialen Metaphyse TP10: Rotklee 10mg/kg, TP20: Rotklee 20mg/kg ** : p < 0,01; *** p < 0,001 signifikanter Unterschied zur Schein- operierten Gruppe, •: p < 0,05 ; ••: p < 0,01; •••: p < 0,001 signifikanter Unterschied zur OVX Kontrollgruppe	34
Tab. 7: Mechanische Eigenschaften der femoralen Diaphyse TP10: Rotklee 10mg/kg, TP20: Rotklee 20mg/kg *: p < 0,05 signifikanter Unterschied zur Schein-operierten Gruppe •: p < 0,05 ; ••: p < 0,01 signifikanter Unterschied zur OVX Kontrollgruppe	35
Tab. 8: Breite der trabekulären Epiphyse und Metaphyse TP10: Rotklee 10mg/kg, TP20: Rotklee 20mg/kg ** : p < 0,01 signifikanter Unterschied zur Schein-operierten Gruppe •: p < 0,05 ; ••: p < 0,01 signifikanter Unterschied zur OVX Kontrollgruppe	36
Tab. 9: Osteocalcin und RatLap Werte TP10: Rotklee 10mg/kg, TP20: Rotklee 20mg/kg *: p < 0,05; **: p < 0,01; *** p < 0,001 signifikanter Unterschied zur Schein- operierten Gruppe	

•: p < 0,05 signifikanter Unterschied zur OVX Kontrollgruppe	36
Tab. 10: Körper-, Uterus- und Thymusgewicht	
ES: Östradiol, FRM: Formononetin, AA: p < 0,01; AAA: p < 0,001 signifikanter	
Unterschied zw. OVX und Schein-operierter Gruppe, B: p < 0,05; BBB: p < 0,001	
signifikanter Unterschied zur OVX Kontrollgruppe	37
Tab. 11: Mechanische Eigenschaften von femoraler Diaphyse, tibialer Metaphyse	
und Oberschenkelhals, ES: Östradiol, FRM: Formononetin	
A: p < 0,05; AAA: p < 0,001 signifikanter Unterschied zw. OVX und Schein-operierter	
Gruppe, B: p < 0,05 signifikanter Unterschied zur OVX Kontrollgruppe	38
Tab. 12: Totalcholesterin Werte	
TP10: Rotklee 10mg/kg, TP20: Rotklee 20mg/kg	
** : p < 0,01; *** p < 0,001 signifikanter Unterschied zur Schein-operierten Gruppe	
•: p < 0,05 signifikanter Unterschied zur OVX Kontrollgruppe	40
Tab. 13: Pharmakokinetische Parameter von Formononetin nach oraler und i.v. Gabe	42
Tab. 14: Pharmakokinetische Parameter von Biochanin A nach oraler und i.v. Gabe	42
Tab. 15: Parameter der subjektiven Symptome	
RCE: Rotkleebehandlung	
* : p < 0,05 verglichen mit den Phasen derselben Gruppe	
† : p < 0,05 verglichen mit Placebo Phase der gegenteiligen Gruppe	46
Tab. 16: Triglycerid- und Cholesterinwerte in der Rotklee- und Kontrollgruppe	51
Tab. 17: mRNA Expression von IGF-1, IGF-2, IGFBP-3 und IGF-1R in Kolon und Mastdarm	
nach Isoflavon und Placebo Gabe	53
Tab. 18: Folsäure- und Homocysteinkonzentration in Placebo- und Rotklee Gruppe	53
Tab. 19: Plasmawerte der Isoflavone Formononetin, Biochanin A, Daidzein, Genistein	
und Irlon	54
Tab. 20: Bestandteile aus Rotklee, die durch die LMA Software positiv auf	
Lebertoxizität beurteilt wurden	56