

Ulrike Knust  
Dr. sc. hum.

## **Einfluss eines erhöhten Verzehrs pflanzlicher Lignane auf den Enterolignan- und Östrogenmetabolismus von prä- und perimenopausalen Frauen und Etablierung geeigneter Analysemethoden**

Geboren am 06/06/1976 in Münster (Westf.)  
Diplom der Fachrichtung Ernährungswissenschaften am 19/04/2001 an der Justus-Liebig-Universität Giessen

Promotionsfach: Frauenheilkunde  
Doktorvater: Prof. Dr. med. T. Strowitzki

Auf Grund der vielfältigen biologischen Aktivitäten von (Entero-)Lignanen, hat die Aufklärung ihrer Bedeutung in der Prävention und Therapie von chronisch-degenerativen Erkrankungen sowie die Aufklärung ihrer Funktionsweise in den vergangenen Jahren zunehmend an wissenschaftlichem Interesse gewonnen. Insbesondere hinsichtlich ihrer östrogenartigen Eigenschaften wird den (Entero-) Lignanen eine potentiell chemopräventive Wirkung in Bezug auf hormonassoziierte Tumore, wie dem Mammakarzinom zugeschrieben. Die Rolle der (Entero-)Lignane in der Ätiologie des Mammakarzinoms konnte bislang jedoch nicht vollständig geklärt werden. Hauptlignanquelle in der westlichen Ernährung sind Leinsamen.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war es, die Effekte einer achtwöchigen Supplementation mit Leinsamen (20 g pro Tag) bzw. des hierüber aufgenommenen Secoisolariciresinols sowie eines erhöhten Gemüse- und Obstverzehrs auf Enterolignankonzentrationen in Urin und Serum und den endogenen Östrogenmetabolismus in einer randomisierten, kontrollierten Studie mit 40 prä- und perimenopausalen Frauen mit familiärer Brustkrebsvorgeschichte zu untersuchen (HEILEI-Studie). Außerdem wurden die Auswirkungen der gewohnten Ernährung auf die Enterolignankonzentrationen in Urin und Serum der Probandinnen überprüft. Voraussetzung für diese Untersuchungen war die Etablierung geeigneter Analyseverfahren.

Es wurde ein hochselektives Verfahren zur empfindlichen Messung von Enterolignanen entwickelt, dessen Analyseprinzip auf der direkten Kopplung einer analytischen Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) zur Trennung der Enterolignanderivate und einem Massenspektrometer (MS) zur empfindlichen Detektion der getrennten Analyte beruht. Das in dieser Arbeit etablierte Verfahren, die Enterolignanquantifizierungs-HPLC-ESI-MS, ermöglicht erstmals die Detektion aller physiologisch vorliegenden Enterolignanderivate direkt, d.h. ohne vorherige Hydrolyse der Enterolignankonjugate und simultan. Die hohe Selektivität der MS-Detektion erlaubt die störungsfreie Bestimmung von Enterolignanmustern in unterschiedlichen Matrices, ohne dass es spezieller Verfahren zur Aufreinigung der Proben bedarf. Der geringe Arbeits- und Zeitaufwand ermöglicht einen hohen Probandendurchsatz und erlaubt den Einsatz der Methode in groß angelegten Interventions- und / oder Fall-Kontroll-Studien zur weiterführenden Überprüfung eines Zusammenhangs zwischen Enterolignanen und dem Brustkrebs(-risiko).

Zur empfindlichen Messung von endogenen Östrogenen in humanem Urin wurde basierend auf einer Methode von Fotsis und Adlercreutz ein hochselektives gaschromatographisches Verfahren, ebenfalls mit massenspektrometrischer Detektion (GC-MS) etabliert und bezüglich der Robustheit und der Sensitivität optimiert. Die vorgenommenen Modifikationen resultieren in einer deutlichen Vereinfachung der Probenaufarbeitung. Arbeits-, Zeit- und

Materialaufwand konnten hierdurch ebenso wie Analytenverluste reduziert werden. Beide Verfahren wurden für die zu untersuchenden Matrices validiert und erwiesen sich im Rahmen ihres Einsatzes in der HEILEI-Studie als tauglich und für die geplanten Quantifizierungen bestens geeignet.

Als Substanzen mit chiraler Molekülstruktur können Lignane in unterschiedlichen stereoisomeren Formen vorliegen, die möglicherweise unterschiedlichen biologischen Eigenschaften und unterschiedlichen physiologischen Wirkungen aufweisen. Über hochpräzise  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Kernresonanz-Spektroskopie (NMR) konnte (-)-Secoisolariciresinol-Diglucosid ((-)-SDG) als Hauptlignan in den eingesetzten Leinsamen identifiziert werden, welches durch Fermentation mit humanen Intestinalbakterien zu den humanen Metaboliten (+)-Enterodiol und (+)-Enterolactone konvertiert wird. Die achtwöchige tägliche Leinsamen-Supplementation, über die etwa 183 mg (-)-SDG pro Tag aufgenommen wurden, führte zu einem signifikanten Anstieg sowohl der Serum- als auch der Urin-Enterolignankonzentrationen. Die Erhöhung des täglichen Gemüseverzehrs resultierte in einem moderaten Anstieg der Enterolignankonzentrationen. Dabei wurden Enterolignane im Blut und Urin der Studienteilnehmerinnen ausschließlich in Form ihrer Monoglucuronide nachgewiesen. Die Konzentrationen der monoglucuronierten Enterolignane in beiden Probenmaterialien zeigten eine positive Korrelation.

Eine signifikante Beeinflussung des endogenen Östrogenmetabolismus durch eine kurzzeitige Supplementation der Nahrung mit pflanzlichen Lignanen (Leinsamen) konnte im untersuchten HEILEI-Kollektiv nicht nachgewiesen werden. Die mittels GC-MS quantifizierten Östrogenkonzentrationen sowie die Verhältnisse antikanzero gener zu kanzerogenen Östrogenmetaboliten (2OHE/16 $\alpha$ OHE; 2OHE/4OHE) zeigten sich nach Interventionsperiode unverändert.

Eine positive Assoziation konnte zwischen den Verzehrsmengen an Steinobstfrüchten und den Serum-Enterolignankonzentrationen gezeigt werden. Hohe Enterolignangehalte nach Steinobstverzehr sind wahrscheinlich auf die Konvertierung von Lariciresinol und Pinoresinol in humane Enterolignane zurückzuführen.