

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**METABOLISMUS ISOFLAVONOIDŮ V LIDSKÉM
ORGANISMU**

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Jana Karlíčková, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2016

Bc. Pavlína Šramarová

Poděkování

Touto cestou bych ráda vyjádřila poděkování PharmDr. Janě Karlíčkové, Ph.D., za její rady a trpělivost při vedení této diplomové práce, za vstřícnost a pomoc při získání potřebných informací a podkladů.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové

.....

1. OBSAH

1. Obsah.....	4
2. Úvod	7
3. Cíl práce.....	8
4. Teoretická část	9
4.1 Obecný náhled do metabolismu a působení isoflavonoidů.....	9
4.1.1 Flavonoidy a isoflavonoidy - klasifikace	10
4.2 Daidzein, genistein, glycitein.....	12
4.2.1 Absorpce, distribuce, metabolismus a exkrece isoflavonoidů po podání sóji	12
4.2.2 Glykosylace a následná malonylace isoflavonoidů u kmene <i>E. coli</i> : Vývoj, produkce a nahlédnutí do budoucích metabolických perspektiv	15
4.2.3 Vztah mezi strukturou a antibakteriální aktivitou vybraných isoflavonů a jejich metabolitů <i>in vitro</i> se zvláštním zaměřením na účinek demethyltexasinu proti stafylokokům.....	15
4.2.4 Farmakokinetika v plazmě a vylučování isoflavonů močí po požití sójových výrobků s různými poměry aglykonu/glukosidu u jihokorejských žen	22
4.2.5 Isoflavonoidy a hormony štítné žlázy.....	23
4.2.6 Metabolismus isoflavonů a lignanů střevní mikroflórou: studie u bezmikrobních potkanů a potkanů spojených s lidskou flórou	24
4.2.7 Fytoestrogeny ve stravě a zdraví.....	27
4.2.8 Metabolismus sójových isoflavonoidů daidzeinu, genisteinu a glyciteinu u lidí. Identifikace nových metabolitů, které mají nedotčenou isoflavonoidovou kostru.....	28
4.2.9 Nová radioimunoesej pro daidzein	30
4.2.10 Biotransformace isoflavonoidů biochaninu A, formononetinu a glyciteinu pomocí <i>Eubacterium limosum</i>	32
4.3 Biochanin A, formononetin	33
4.3.1 Metabolismus biochaninu A a formononetinu <i>in vitro</i> pomocí lidských jaterních mikrosomů	33
4.4 Calycosin.....	33
4.4.1 Vstřebávání a metabolismus odvaru z <i>Astragali radix</i> : <i>in silico</i> , <i>in vitro</i> a případová studie <i>in vivo</i>	33

4.4.2	Vstřebávání a transport calycosinu v <i>Astragali radix</i> použitím jednovrstvého modelu Caco-2	35
4.4.3	Regioselektivní glukuronidace calycosinu pomocí lidských jaterních mikrosomů a rekombinantní lidské UDP-glukuronosyltransferázy	35
4.5	Prunetin, puerarin, genistin	37
4.5.1	Dispozice flavonoidů pomocí střevní recyklace: enzymová stabilita ovlivňuje charakteristiku glukuronidace prunetinu u všech druhů, orgánů a UGT isoform.....	37
4.5.2	Předléčba puerarinem ovlivňuje u pokusných potkanů farmakokinetiku warfarinu, ale ne klopidogrelu.....	37
4.5.3	Absorpce a metabolismus genistinu v tenkém střevě izolovaném z potkana	38
4.6	Cladrin	38
4.6.1	Pozitivní skeletální účinky cladrinu - přirozeně se vyskytujícího dimethoxydaidzeinu - na kosterní soustavu u osteopenických potkanů, které přetrvávaly i po vysazení léčby	38
4.6.2	Metoda LC-MS/MS pro simultánní analýzu cladrinu a equolu v plazmě potkanů a její aplikace ve farmakokinetické studii cladrinu	39
4.7	Tectorigenin, kakkalid	40
4.7.1	Cytoprotektivní účinek tectorigeninu, metabolitu vznikajícího transformací tectoridinu činností střevní mikroflóry, na oxidační stres indukovaný peroxidem vodíku.	40
4.7.2	Identifikace metabolitů tectoridinu <i>in vivo</i> a <i>in vitro</i> kapalinovou chromatografií s tandemovou hmotnostní spektrometrií.....	40
4.7.3	Ochranné účinky kakkalidu z <i>Flos Puerariae</i> při ethanolem indukované úmrtnosti a při poškození jater, jsou závislé na jeho biotransformaci lidskou střevní mikroflórou	41
4.7.4	Metabolismus a vylučování kakkalidu a jeho metabolitů v moči, žluči a výkalů potkanů, stanovené pomocí HPLC/UV a LC/MS/MS.....	41
5.	Diskuse	43
6.	Závěr.....	45
7.	Abstrakt	46
8.	Abstract	47
9.	Použité zkratky	48
10.	Seznam tabulek	50
10.1	Zdroje:	50

11. Seznam obrázků	51
11.1 Zdroje:	51
12. Použitá literatura.....	52

2. Úvod

V práci, kterou jsem si vybrala, bych ráda přiblížila tematiku isoflavonoidů a jejich metabolitů, jakožto látek, které jsou sice známé, ale některé jejich účinky a metabolismus nebyly v některých případech dosud blíže objasněny, nebo nejsou mezi širší veřejností známy. Téma bylo jakýmsi prohloubením mé bakalářské práce, která se zabývala především flavonoidy a jejich působením.

Nádorová onemocnění, osteoporóza, kardiovaskulární onemocnění, diabetes mellitus 2. typu, ateroskleróza, to vše jsou rozšířená onemocnění, na kterých se podílí řada faktorů. Některé z těchto faktorů můžeme ovlivnit životním stylem, tedy i stravou.

Isoflavonoidy patří mezi fytoestrogenní látky, které se běžně vyskytují v přírodě, především v čeledi bobovitých, zejména v sóje (*Glycine max*) a mohou mít blahodárný vliv na naše zdraví. V posledních letech byl proto zaznamenán zvýšený zájem o isoflavonoidy. Jelikož spektrum rostlin je široké, budu se v práci zabývat především isoflavonoidy, pocházejícími právě ze sóji, ale i z dalších rostlin jako jsou například *Pueraria lobata*, *Astragalus membranaceus*. Isoflavonoidy nacházíme i v jiných čeledích, např. Rosaceae nebo Iridaceae (Raabová K., Bakalářská práce, 2015).

První část diplomové práce poskytuje přehled o metabolismu isoflavonoidů, jejich absorpci, distribuci i exkreci. Další část práce se věnuje úloze mikroorganismů a střevní flóry, *in vitro* a *in vivo* podmínkách jak u lidí, tak u laboratorních zvířat, v rámci přeměny isoflavonoidů na jejich metabolity a účinky těchto metabolitů. V mé diplomové práci jsou uvedeny především nejznámější isoflavonoidy jako je daidzein a genistein, ale i méně známé, ale přesto diskutované isoflavonoidy jako jsou biochanin A, formononetin, calycosin, prunetin, puerarin, cladrin, tectorigenin a kakkalid a také jejich metabolity jako jsou například equol, *O*-desmethylangolensin aj.

Příjem potravin obsahujících isoflavonoidy přináší pozitivní účinky pro lidský organismus. Jedná se především o estrogenní účinky, prevenci před nádorovými onemocněními, ochranu před poškozením DNA a v neposlední řadě i antibakteriální účinky. V některých případech může mít nadměrný příjem sóji i negativní účinky.

Klinických studií s isoflavonoidy bylo doposud provedeno velice málo, proto neznáme přímé působení těchto látek v lidském organismu. Většina výzkumů těchto látek se prozatím uskutečnila na laboratorních zvířatech.

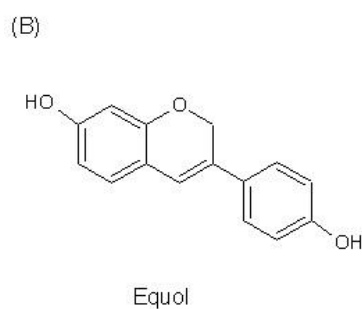
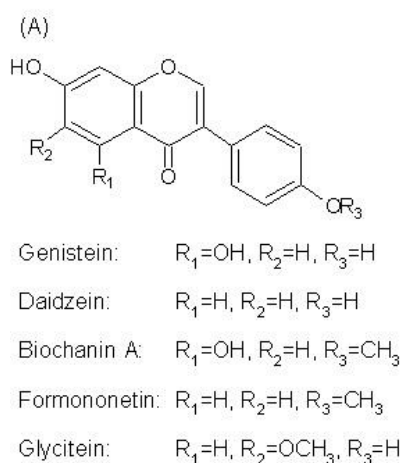
3. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo shromáždit poznatky a výsledky studií současné odborné literatury o metabolismu a působení isoflavonoidů v lidském organismu.

4. TEORETICKÁ ČÁST

4.1 *Obecný náhled do metabolismu a působení isoflavonoidů*

Tato část práce se bude věnovat shrnutí účinků a metabolismu isoflavonoidů, budou zde zmiňovány běžně se vyskytující a nejčastěji citované isoflavonoidy a jejich metabolity, jako jsou genistein, daidzein a další isoflavonoidy a jejich metabolity. Většina prováděných studií se totiž zabývala více isoflavonoidy najednou, je proto těžké zaměřit se vždy na jeden určitý isoflavonoid. Zde je uvedena jejich chemická struktura.



Obrázek 1: Strukturní vzorce isoflavonoidů genisteinu, daidzeinu, biochaninu A, formononetinu a glyciteinu (A). Equol (B) a O-desmethylangolensin (C) jsou běžnými metabolity isoflavonoidů. Isoflavonoidy jsou rozsáhlou podtřídou flavonoidů s patnáctiuhlíkovou (C6-C3-C6) kostrou uspořádanou jako struktura 1,2-difenypropanu.

4.1.1 Flavonoidy a isoflavonoidy - klasifikace

Flavonoidy představují jednu z nejširších a nejvíce studovaných skupin metabolitů, odvozených z fenylpropanových struktur pocházejících z rostlin. Odhaduje se, že existuje až 10 000 různých typů flavonoidů zástupců. Strukturálně se dělí na dvě hlavní skupiny, na 2-fenylchromany (flavonoidy zahrnující flavanony, flavony, flavonoly, flavan-3-oly a anthokyanidiny) a na 3-fenylchromany (isoflavonoidy zahrnující isoflavony, isoflavany a pterokarpany).

Flavonoidy působí jako atraktanty pro opylovače a symbionty, jako ochrana před slunečním zářením – chrání před UV zářením, slouží jako allelochemikálie, což jsou látky sloužící k mezidruhové komunikaci, dále působí antimikrobně a poskytují rostlině ochranu před býložravci.

Flavonoidy mají pozitivní vliv na lidské zdraví a jsou předmětem výzkumu při léčbě různých onemocnění a chemoprevence. (1)

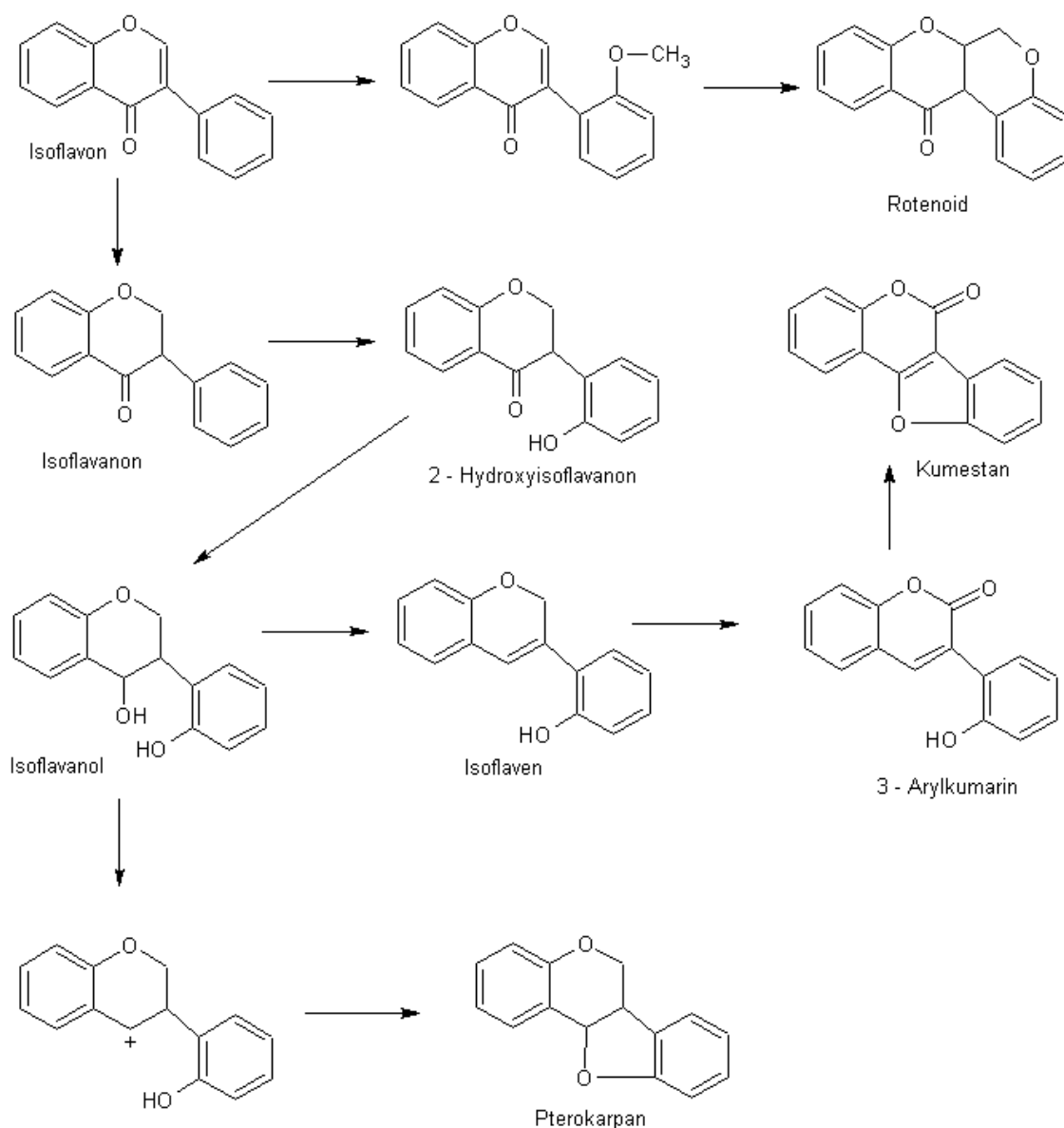
Isoflavonoidy jsou podskupinou flavonoidů a byly izolovány z celé řady rostlin (z čeledi bobovitých i mimo ni). Isoflavonoidy jsou charakterizovány tím, že B-kruh je připojen na uhlíku C-3 místo na uhlíku C-2 a prochází různými modifikacemi. Tyto modifikace vedou k tvorbě jednoduchých isoflavonoidů, jako isoflavanonů, isoflavanů a isoflavanolů, ale i k tvorbě složitějších struktur včetně rotenoidů, pterokarpanů a kumestanů. Isoflavonoidy jsou přítomny v bobulích, ve víně, obilí, oříškách a dále v sóje, cizrně, arašídech a jiných zástupcích z čeledi bobovitých.

Isoflavonoidy, jsou odvozené z fenylpropanové dráhy, která je prostudována jak enzymaticky, tak geneticky. Existuje mnoho pozitivních biologických účinků na lidský organismus, které jsou spojené s isoflavonoidy, patří mezi ně snížení osteoporózy, kardiovaskulárních onemocnění, prevence rakoviny a léčba příznaků menopauzy.

Nedávné údaje ukazují, že ochranný účinek isoflavonoidů může přesahovat jejich antioxidační aktivitu na molekulární a buněčné úrovni a modulovat aktivitu mnoha dalších enzymů. V současné době jsou isoflavonoidy předmětem výzkumu s velkým potenciálem pro blahodárné účinky na lidské zdraví. (2)

Úzké botanické rozdělení nebrání strukturální rozmanitosti isoflavonoidů: 870 isoflavonoidů bylo známo v roce 1990 (o 240 více než v roce 1985), mohou být zařazeny do několika strukturálních typů, rozlišených podle stupně oxidace a existencí přidaných heterocyklů. U všech typů si můžeme všimnout vysoké frekvence isoprenylovaných derivátů, a tudíž i furanového, dihydrofuranového a pyranového kruhu.

Nejběžnější sloučeninou jsou isoflavony, které se vyskytují ve volném stavu, nebo méně běžně jako glykosidy (O-glykosidy, nebo C-glykosidy). Podobné struktury jsou méně početné a zahrnují isoflavanony, isoflaveny a isoflavany. Poměrně často mají isoflavonoidy další kruh, který obecně vyplývá z cyklizace 2'-hydroxylovaného derivátu, jako je tomu v případě pterokarpanů a jejich derivátů a také z chromonů. Jiné flavonoidy mají kumarinovou strukturu vyplývající z oxidace isoflav-3-enu. Poslední skupina sloučenin se naopak vyznačuje ztrátou atomu uhlíku – benzofurany, které biosynteticky nejsou ani neolignany, ani cyklizační produkty stilbenu, ale spíše isoflavonoidy vytvořené nejspíše ztrátou C-6 z kumestanu. Stejně jako flavonoidy, isoflavonoidy mohou tvořit dimery a oligomery, stejně jako adukty se skořicovou kyselinou (isoflavano - lignany).



Obrázek 2: Hlavní typy isoflavonoidů a interkonverzí

4.1.1.1 Biosyntéza

Mechanismus vysvětlující vznik isoflavonoidů probíhá ve dvou krocích a vede ke vzniku 2-hydroxyflavanonu.

Mechanismem je zapojení radikálu s hydroxylací probíhající ve stejnou dobu jako migrace arylu. Mechanismus, který byl původně předpokládán – jmenovitě: tvorba epoxidu, následovaná jeho protonací a otevřením za vzniku meziprojektu spirodienonu na cestě k isoflavonu - je nyní považován za nepravděpodobný, protože byl izolován derivát hydroxylovaný na C-2.

Vzájemné přeměny v rámci řady jsou poměrně dobře známy na základě pokusů, nebo izolaci příslušných enzymů. Isoprenylace je častá a probíhá vždy po vytvoření základní kostry.

4.1.1.2 Biologická aktivita

U rostlin tvoří značnou část isoflavonoidních struktur fytoalexiny, tedy látky produkované rostlinou v reakci na infekci patogenním agens, v přírodě nejčastěji houbami. Mohou být považovány za přirozeně obranné produkty organismů, které je produkují.

Farmakologické vlastnosti isoflavonoidů jsou zřídka známy. Jedním z uplatnění je insekticidní účinek rotenoidů. Rovněž jsou známy estrogenní vlastnosti isoflavonoidů: způsobující neplodnost u ovcí, které zkonsumují masivní množství rostlin, krávy jsou méně citlivé, možná díky odlišnému metabolismu. (3)

4.2 Daidzein, genistein, glycitein

4.2.1 Absorpce, distribuce, metabolismus a exkrece isoflavonoidů po podání sóji

Glycine max (L.) Merr. – sója luštinatá

čeleď: Fabaceae – bobovité

původ: jihovýchodní Asie

charakteristika: bylina (4)

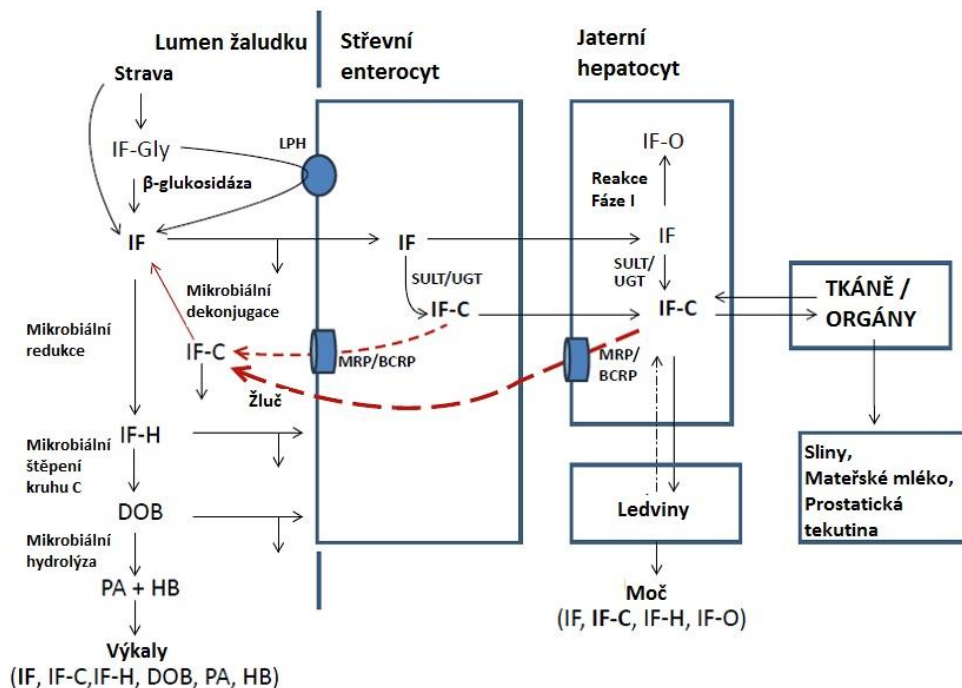
Sója je hlavním zdrojem isoflavonoidů (IFLs) v potravě. Hromadí se důkazy o tom, že sója a IFLs mohou hrát roli v ochraně proti mnoha chronickým onemocněním, včetně rakoviny. Po požití sóji byl objeven vzorek IFL dvoufázového charakteru v plazmě, stejně jako v moči, domnívá se, že se zde objevil kvůli absorpci IFL v tenkém střevě (cca 10 %), v průběhu prvních

dvou hodin po příjmu a vstřebávání IFL v tlustém střevě (asi 90 %), 4-6 hodin po podání. Zatímco každý IFL vymizí z oběhu v různých časech, byla zjištěna korelace mezi hodnotami močového a oběhového IFL a byl stanoven algoritmus pro převod močových hodnot na cirkulující. Při použití údajů k popisu působení IFL byl doporučen pojem "zdánlivá biologická dostupnost". Bylo zjištěno, že biologická dostupnost IFL může být ovlivněna střevními bakteriemi, léčbou perorálními antibiotiky, věkem a zdravotním stavem jedince. Zatímco daidzein (DE) a genistein (GE) se začaly absorbovat minuty po požití, equol (EQ) se vyskytl v plazmě minimálně po 8 hodinách po příjmu sóji vzhledem k požadované transportní době daidzeinu do tlustého střeva, kde dochází k přeměně daidzeinu na equol prostřednictvím střevní mikroflóry. Také bylo prokázáno, že „zdánlivá biologická dostupnost“ IFL je vyšší u dětí než u dospělých, vyšší u zdravých oproti nezdravým jedincům a naopak je během léčby perorálními antibiotiky u dětí snížena a u dospělých zvýšená. A konečně, bylo navrženo použít močový poměr EQ/DE 0,018 s prahem DE k identifikaci producentů EQ. S touto minimální stanovenou hranicí bylo pozorováno, že produkce EQ je proměnlivá v průběhu času v rozmezí 5-30 % jak u premenopauzálních, tak i postmenopauzálních žen.

Isoflavonoidy (IFLs) jsou navrhovány k ochraně proti mnoha chronickým chorobám (včetně koronárních onemocnění srdce, subklinické aterosklerózy, diabetes mellitus 2. typu), dále ke snížení rizika určitých typů rakoviny, jako je rakovina prsu a prostaty a ke zlepšení zdraví kostí. K působení IFL dochází především v důsledku dietárního příjmu sójových výrobků, které obvykle obsahují 0,01 až 0,3 % celkových isoflavonoidů a jsou složeny hlavně z glykosidů genisteinu (GE), daidzeinu (DE) a glyciteinu (GLYE). Equol (EQ) je metabolit tvořený střevními bakteriemi v průběhu trávení prostřednictvím chemické redukce z DE a hraje hlavní roli ve zdravotních výhodách sóji a IFLs. Příjem sóji má ochranný účinek před rakovinou prsu v dospělosti, a to zejména když je sója konzumována v raném věku. Za farmakologický účinek příjmu sóji je považována strukturální podobnost IFLs se steroidními estrogény a silná vazba GE na β receptoru estrogenu. Zjistilo se, že děti mají vyšší biologickou dostupnost IFL ve srovnání s dospělými, a že kardioprotektivní účinky IFLs jsou nezávislé na lipidovém profilu; tato zjištění posílila hypotézu, že IFLs hrají důležitou roli v biologických účincích sóji. Pochopení základu zdravotní výhody vyplývající z IFLs vyžaduje podrobné znalosti o absorpci, distribuci, metabolismu a vylučování (ADME) a o biologické dostupnosti těchto fytoestrogenů.

Zájem o sóju a IFLs přetrvává v důsledku jejich preventivních účinků před rakovinou a dalšími onemocněními. To platí, zejména pokud dochází k expozici IFLs v mladém věku. Studií IFLs bylo zjištěno: 1) použití molárních absorpčních koeficientů při stanovení standardních koncentrací slouží jako přesná a účinná metoda pro externí kalibrace analytických nástrojů; 2) dvoufázová absorpce vzorku IFLs nastává díky absorpci v tenkém střevě (1-2 h po

příjmu IFL), kde probíhá hydrolýza glykosidů IFLs na biologicky dostupné aglykony přes laktáza-phloridzin hydrolázu a v tlustém střevě (4-6 h po příjmu), kde hydrolýza IFL glykosidů probíhá díky střevním bakteriím. 3) Hodnoty IFS v plazmě a močových cestách jsou úzce spojené a mohou být převedeny pomocí vyvinutých algoritmů; 4) postavení EQ klasifikace je odpovídající, pokud se moč používá jako matrice a když je jako mezní poměr zvolen EQ/DE 0,018 s prahem 2 nmol/mg ; 5) za použití této minimální hodnoty, je produkce EQ variabilní asi u 10-30 % pre- a postmenopauzálních žen; 6) biologická dostupnost IFL je vyšší u dětí než u dospělých. (5)



Obrázek 3: Osud isoflavonoidů z potravy v lidském těle. V každé části jsou nejvíce převažující složky uvedeny tučně. Střevní a enterohepatální recyklace jsou znázorněny přerušovanými šipkami.
 Zkratky: glykosid isoflavonoidu (**IF-Gly**), aglykon isoflavonoidu (**IF**), isoflavonoidový konjugát (**IF-C**), redukovaný isoflavonoid (**IF-H**), oxidovaný isoflavonoid (**IF-O**), deoxybenzoin (**DOB**), deriváty kyseliny propionové (**PA**), deriváty hydroxybenzenu (**HB**), laktáza-phlorizin hydroláza (**LPH**), sulfotransferáza (**SULT**), UDP-glukuronyltransferáza (**UGT**), protein pro lékovou rezistenci (**MRP**) a proteiny proti rakovině prsu (**BCRP**)

4.2.2 Glykosylace a následná malonylace isoflavonoidů u kmene *E. coli*: Vývoj, produkce a nahlédnutí do budoucích metabolických perspektiv

Genistin a daidzein izolované z *Glycine max* vykazují ochranný účinek před poškozením DNA a inhibují proliferaci buněk. Glykosylace a malonylace sloučenin zvyšují rozpustnost ve vodě a jejich stabilitu. Pro transformaci *E. Coli* a biokonverzi genisteinu a daidazeinu byly použity konstrukce plasmidů pET15b-GmIF7GT a pET28a-GmIF7MAT. Ke zvýšení dostupnosti malonyl-CoA byly zavedeny: rozhodující prekurzor GmIF7MAT, geny pro α a β podjednotky acyl-CoA karboxylázy, biotin ligáza a acetyl-CoA syntetáza z bakterie *Nocardia farcinica*. Isoflavonoidy byly glykosylovány v poloze 7 pomocí 7-O-glukosyltransferázy a dále malonylovány u glukózy v poloze 6'' pomocí malonyl-CoA, výsledný enzym isoflavon 7-O-glukosid-6'-O-malonyltransferáza. Sestavená *E.Coli* vyprodukovala 175,7 μ M (75,90 mg/L) genistinu a 14,2 μ M (7,37 mg/L) genistin 6''-O-malonátu. Za podobných podmínek bylo vyrobeno 162,2 μ M (67,65 mg/L) daidzinu a 12,4 μ M (6,23 mg/L) daidzin 6''-O-malonátu při doplnění 200 μ M každého substrátu v kultuře. Na základě zjištění se spekuluje, že isoflavonoidy a jejich glykosidy mohou být užitečné jako protinádorová léčiva s další výhodou zvýšené rozpustnosti, stability a dostupnosti. (6)

4.2.3 Vztah mezi strukturou a antibakteriální aktivitou vybraných isoflavonů a jejich metabolitů *in vitro* se zvláštním zaměřením na účinek demethyltexasinu proti stafylokokům

V této studii bylo testováno 15 přirozeně se vyskytujících isoflavonů a jejich metabolitů pro jejich možné antibakteriální účinky proti devíti grampozitivním a gramnegativním bakteriím. Antibakteriální aktivita *in vitro* byla stanovena za použití mikrodiluční metody a výsledky byly vyjádřeny jako minimální inhibiční koncentrace (MIC). 6,7,4'-trihydroxyisoflavon (demethyltexasin), 7,3',4'-trihydroxyisoflavon (hydroxydaidzein), 5,7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavon (biochanin A), 7,8,4'-trihydroxyisoflavone (demethylretusin) a 5,7,4'-trihydroxyisoflavon (genistein) prokázaly významný antibakteriální účinek (MIC \geq 16 μ g.ml⁻¹). Nejúčinnější sloučenina, demethyltexasin, byl následně testován pro

svůj inhibiční účinek proti *Staphylococcus aureus* a vykazoval významné protistafylokokové účinky proti různým standardním kmenům a klinickým izolátům, a to včetně methicilinu a tetracyklinu odolným, s MIC v rozsahu od 16 do 128 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Výsledkem analýzy vztahu mezi strukturou a biologickou aktivitou (SAR) byly identifikovány *ortho*-dihydroxyisoflavony, jako třída antibakteriálně účinných sloučenin. Byl kladen důraz na hydroxylové skupiny na C-5, 6 a 7 pozicích, jakožto na klíčový předpoklad pro antibakteriální účinek rostlinných isoflavonů a jejich metabolitů. Demethyltexasin, metabolit isoflavonů přítomný v lidském těle prostřednictvím enterohepatální recyklace sójových isoflavonů (daidzeinu, genisteinu), ukázal silnou antibakteriální účinnost, zejména proti různým kmenům *Staphylococcus aureus* (včetně MDR a MRSA). Významem této studie bylo prohloubení znalostí o isoflavonech, SAR a identifikace protistafylokokových účinků demethyltexasinu, které naznačují, že metabolity isoflavonů mohou být ještě silnějšími antibakteriálními látkami, než jejich prekurzory.

V posledních letech se počet multirezistentních kmenů bakterií dramaticky zvýšil. Například, nozokomiální infekce způsobené methicilin-rezistentní bakterií *Staphylococcus aureus* (MRSA) představují závažný celosvětový problém, jelikož je hlavním důvodem mortality u hospitalizovaných pacientů. Z různých přístupů používaných pro nalezení účinné látky pro překonávání bakteriální rezistence, se zdají jako nejvhodnější přirozeně se vyskytující protiinfekční rostlinné produkty. Isoflavony jsou podtřídou isoflavonoidů, přirozeně se vyskytující v lidské stravě a patří mezi několik možných kandidátů antimikrobiálních sloučenin, syntetizovaných rostlinami jako prostředek na ochranu proti patogenním mikroorganismům. Jejich antibakteriální účinek proti některým kmenům lidských, potenciálně patogenních bakterií, byl v předešlých studiích také prokázán.

Stejně tak, jako jiné sekundární metabolity rostlin, chemické struktury isoflavonů se u lidí či zvířat po natrávení v gastrointestinálním traktu přemění na jiné látky s podobnou strukturou, které mohou vykazovat biologické aktivity, podstatně se lišící od jejich prekurzorů. Existuje několik studií, které se zabývají protizánětlivými, protinádorovými a antioxidačními účinky metabolitů isoflavonů a prokazují tak, že jsou tyto sloučeniny více biologicky aktivní než jejich prekurzory. Přes obrovský biologický potenciál metabolitů isoflavonů nebyla doposud zveřejněna žádná zpráva, poukazující na jejich antibakteriální účinek. Kromě toho, předchozí studie ukázaly, že hydroxylové skupiny isoflavonů a jejich methylace v určitých polohách se často vyskytují během trávení. To výrazně ovlivňuje jejich biologické vlastnosti a hraje klíčovou roli v jejich antibakteriálním potenciálu. Na základě předpokladu, že aktivita metabolitů by měla být silnější, než jsou isoflavony samotné a měla by být také ovlivněna přítomností funkčních skupin v určitých polohách, byla hodnocena antibakteriální aktivita několika

methoxy- a hydroxylových struktur, souvisejících s isoflavony a jejich metabolity, včetně jejich potenciálu pro anti-MRSA činnosti.

4.2.3.1 Antibakteriální aktivita vybraných isoflavonů a jejich metabolitů

V rámci patnácti sloučenin isoflavonů testovaných v této studii, vykazalo pět z nich *in vitro* antimikrobiální aktivitu proti alespoň jedné z devíti bakterií testovaných kmenů. Hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC) stanovené pro tyto antibakteriálně účinné látky ukázaly, že metabolit isoflavonů č. 6 (6,7,4'-trihydroxyisoflavone, syn.: dymethyltexasin) vykázal nejsilnější efekt inhibice růstu s hodnotami MIC $\geq 16 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, následoval isoflavon č. 9 (5,7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavon, tedy biochanin A) a dále č. 14 (5,7,4'-trihydroxyisoflavone, syn.: genistein) s hodnotami MIC ≥ 32 a $\geq 64 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (v tomto pořadí) a konečně metabolit č. 7 (7,3', 4'-trihydroxyisoflavone, hydroxydaidzein) a metabolit č. 10 (7,8,4'-trihydroxyisoflavone, demethylretusin), s hodnotami MIC $\geq 128 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Na rozdíl od dříve popsaného antibakteriálního účinku sloučeniny 9 proti některým kmenům *Clostridia*, *Chlamydia*, *Mycobacterium* a *S. aureus*, stejně jako u sloučeniny 14 proti *Mycobacterium* a *S. aureus*, neexistují ale žádné zprávy o antibakteriálním účinku čísel 6, 7 a 10. Jelikož tyto tři sloučeniny patří do *ortho*-dihydroxyisoflavonů, třídy sloučenin známých jako silně protizánětlivá, protialergická a antioxidační činidla, přispívají ke snížení hladiny cholesterolu, ke kardiovaskulární ochraně a prevenci nádorů, mohou být isoflavony z této skupiny považovány za perspektivní struktury pro vývoj nových antimikrobiálních léčiv. Zejména aktivita sloučeniny 6, která v experimentech prováděných v této studii ukázala nejsilnější antibakteriální aktivitu a která se nachází ve vysokých hladinách v některých druzích fermentovaných potravin vyrobených ze sóji, by měla být zkoumána podrobněji. Kromě toho, sloučeniny 6, 7 a 10, které představují tři hlavní metabolity jaterního metabolismu daidzeinu (č. 13) jsou více aktivní než jejich prekurzor, který neukázal žádnou, nebo pouze zanedbatelnou antibakteriální aktivitu. Toto pozorování je ve shodě s dříve publikovanými zprávami popisujícími silnější biologickou aktivitu metabolitů isoflavonů než jejich prekurzorů. Například, equol, jeden z nejvíce biologicky aktivních metabolitů daidzeinu, vykazuje protinádorový účinek, díky inhibici buněčné transformace, zatímco jeho prekurzor je neaktivní. Dalším příkladem tohoto jevu je 7, jako hlavní metabolit 13, který účinně inhibuje UVB světlem vyvolanou expresi cyklooxygenázy 2 (COX-2), zatímco 13 nemá žádný vliv na hladiny exprese COX-2. Žádná z testovaných sloučenin neměla vliv na růst testovaných gramnegativních bakteriálních kmenů (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*), což se shoduje s předchozími studii, které popisovaly nízký antibakteriální účinek isoflavonů proti gramnegativním bakteriím.

Všechny výsledky ukázaly, že s výjimkou jednoho dihydroxymethoxyisoflavonu (9), byly antibakteriálně aktivní jen trihydroxyisoflavony. Pozice hydroxylové skupiny na kruhovém systému pyranu je velmi důležitá pro antibakteriální aktivitu flavonoidů, vzhledem k tomu jsou hydroxylové skupiny v poloze C-7 a/nebo C-5 považovány za rozhodující. Kromě toho, přítomnost C-4'-hydroxylace má zvýšit účinnost isoflavonoidové struktury. V případě sloučeniny 14 jsou výsledky odpovídající těmto zjištěním. Na druhou stranu, nejaktivnější struktura (6) má hydroxylové skupiny na C-6, -7 a -4', což naznačuje, že hydroxyl na C-6, hraje důležitou roli v antibakteriálním účinku isoflavonů. Naopak, sloučeniny, obsahující alespoň jednu methoxy skupinu na kruhu A (1-5, 8, 11 a 12), nebo methoxy skupinu v poloze C-4' a zároveň pouze jednu hydroxylovou skupinou v kruhu A (15) selhaly v inhibici bakteriálního růstu při hodnotách MIC 128 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Tento klesající účinek antibakteriální aktivity v důsledku přítomnosti methoxy skupin ve struktuře isoflavonů byl navržen už dříve. Inhibice syntézy nukleových kyselin, tedy mechanismus antibakteriálního působení dříve navržený pro genistein, není typickou reakcí, jak získal *Staph. aureus* rezistenci. Je možné předpokládat, že rezistence na jiné isoflavony, včetně demethyltexasinu (6), se může vytvořit jen v omezené míře.

Číslo testované sloučeniny	Název isoflavonu
1	6,4'-dimethoxy-7-hydroxyisoflavon
2	6,7,4'-trimethoxyisoflavon
3	7,4'-dimethoxyisoflavon
4	5,7,4'-trimethoxyisoflavon
5	7-hydroxy-6-methoxyisoflavon
6	6,7,4'-trihydroxyisoflavon
7	7,3',4'-trihydroxyisoflavon
8	7,4'-dimethoxy-5-hydroxyisoflavon
9	5,7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavon
10	7,8,4'-trihydroxyisoflavon
11	5,4'-dihydroxy-7-methoxyisoflavon
12	7,4'-dihydroxy-6-methoxyisoflavon
13	7,4'-dihydroxyisoflavon
14	5,7,4'-trihydroxyisoflavon
15	7-hydroxy-4'-methoxyisoflavon

Tabulka 1: Přehled testovaných látek

4.2.3.2 Antibakteriální účinek demethyltexasinu proti rezistentním kmenům *Staphylococcus aureus*

Při počátečním screeningu antibakteriální aktivity vybraných isoflavonů ukázal významný inhibiční efekt proti růstu *S. aureus* demethyltexasin (látka č. 6), tato sloučenina byla následně testována proti devíti klinickým izolátům a čtyřem ATCC (americká kolekce typových kultur) kmenům citlivých stafylokoků a rezistentních stafylokoků. Všechny kmeny *S. aureus* byly inhibovány demethyltexasinem (č. 6), v rozmezí MIC 16-128 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Ze všech testovaných kmenů *S. aureus* byly nejvíce citlivé (MIC 16 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$): MRSA (CCM 7112), MRSA (MR 12004), TRSA (TR 12001) a MSSA (MS 12001). Všechny kmeny MSSA byly potlačeny všemi antibiotiky testovanými při nižších koncentracích než 6. Kromě toho, látka 6 vykazovala významnou antibakteriální aktivitu vůči TR (12001 a 12002) a multirezistentním (MDR) MRSA klinickým izolátům (CCM 7112 a CCM 7115) s hodnotami MIC v rozmezí od 16 do 64 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Jak lze vidět z výsledků, tato studie ukazuje, že sloučenina 6 je účinná proti různým kmenům *S. aureus*, které jsou rezistentní vůči jiným antimikrobiálním látkám, jako jsou erythromycin, oxacilin, tetracyklin a vankomycin.

Jedná se o první zprávu o protistafylokokové aktivitě isoflavonového metabolitu demethyltexasinu, i přes řadu studií o antibakteriální aktivitě rostlinných isoflavonoidů proti MRSA.

Pokud je možné použít sloučeninu 6 jako antimikrobiální činidlo, měly by být detailně prozkoumány jeho technologické a toxikologické vlastnosti. Toxicita flavonoidů je velmi nízká, například LD50 pro potkany je rozmezí od 2 do 10 g na zvíře, dosáhnout podobných dávek u lidí je velmi nereálné. Kromě toho, potraviny obsahující isoflavony, včetně potravinových doplňků, jsou doporučovány při léčbě nemocí závislých na hormonech. Demethyltexasin, sloučenina pravidelně konzumována v produktech na bázi fermentované soji, jako je doenjang a tempeh, se vylučuje močí po metabolizaci v játrech a předpokládá se, že je pro lidi netoxická. Kromě toho, Lee et al. popsal významnou inhibici proliferace rakovinných buněk v lidském tlustém střevě u demethyltexasinu a nebyla pozorována žádná cytotoxicita na lidské buněčné linii. Hydrofobnost isoflavonů obecně v lidském těle poskytuje delší retenční časy: proto lze očekávat dlouhodobou účinnost také pro 6. Sloučeniny jsou obvykle rozpustné v polárních rozpouštědlech běžně používaných v antimikrobiální farmakoterapii. Problém jejich hydrofobnosti by mohl být překonán použitím různých technik, jako například popsal Hanski et al. (2012) - popsal sublingvální formu filmu, která ukázala velmi zlepšenou rychlost rozpouštění a rozpustnost v porovnání s práškem. Možnou cestou pro absorpci této sloučeniny do krevního oběhu z gastrointestinálního traktu je i přes enterohepatální cirkulaci. Na základě výše

uvedených skutečností, je tato sloučenina navrhována jako vedoucí struktura pro další rozvoj protistafylokokových farmaceutických přípravků. Až do nynějška neexistovala žádná studie zaměřená na přítomnost **6** v séru, ale existuje několik studií prokazujících přítomnost daidzeinu a genisteinu v krevní plazmě u C_{max} 1,1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ po požití sójového mléka a výskyt formononetinu v potkaním séru s C_{max} 5,4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ po orálním příjmu extraktu z rostlin rodu *Dalbergia*, což je ve shodě s hodnotami C_{max} běžně používaných antibiotik proti stafylokokům. Výsledky této studie ukazují, že vybrané isoflavony a jejich metabolity vykazují *in vitro* antimikrobiální aktivitu, zatímco skupina *ortho*-dihydroxyisoflavony vykazuje nejsilnější růstově - inhibiční účinek. Sloučenina **6**, která je metabolitem přirozeně se vyskytujících isoflavonů **13** a **14**, ukázala v experimentech nejsilnější antibakteriální aktivitu, zejména proti různým kmenům *S. aureus*. Podle dosavadních znalostí, je toto první zpráva o antibakteriální aktivitě isoflavonového metabolitu i přes již známou antibakteriální aktivitu rostlinných isoflavonoidů. Kromě toho, výsledky analýzy vztahu mezi strukturou a aktivitou naznačují významnou roli polohy a počtu hydroxylových a methoxy skupin ve struktuře isoflavonů a značí, že hydroxylové skupiny v polohách C-5, C-6 a C-7 jsou rozhodujícím předpokladem pro antibakteriální účinek. Na základě těchto výsledků, jsou sloučeniny **6** navrženy jako možné struktury pro další vývoj protistafylokokových farmaceutických přípravků. Nicméně, podrobnější toxikologické, farmakodynamické/farmakokinetické a mikrobiologické studie (např. četnost mutací) by měly být stanoveny před tím, než bude zvažován k terapeutickému použití.

Testované kmeny	Sloučenina/MIC ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)				
	6	ERY	OXA	TET	VAN
MSSA (ATCC 25923)	128	0,25	0,25	0,25	2
MSSA (MS 12001)	16	0,25	0,25	0,25	1
MRSA (CCM 7112)	16	>512	512	32	1
MRSA (CCM 7115)	64	>512	512	64	2
MRSA (MR 12001)	32	>512	128	0,25	1
MRSA (MR 12004)	16	>512	32	0,5	2
MRSA (ATCC 43300)	128	>512	16	0,13	2
MRSA (ATCC BAA-976)	128	>512	8	0,25	2
MRSA (ATCC 33591)	128	>512	256	64	2
TRSA (TR 12001)	16	0,5	0,5	16	2
TRSA (TR 12002)	32	0,25	0,25	16	1

ERSA (ER 12001)	32	>512	0,25	0,25	2
EMRSA (EMR 15)	32	>512	16	0,25	1

Tabulka 2: In vitro protistafylokokový účinek demethyltexasinu (6). MIC: minimální inhibiční koncentrace, **6** - 6,7,4'-trihydroxyisoflavon, **ERY** – erythromycin, **OXA** –oxacilin, **TET** – tetracyklin, **VAN** – vankomycin, MRSA: methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (SA), MSSA: methicilin-senzitivní SA, TRSA: tetracyklin-rezistentní SA, ERSA: erythromycin – rezistentní SA, EMRSA: epidemický MRSA, CCM: Česká kolekce mikroorganismů

4.2.3.3 Materiály a metody

Chemikálie - bylo testováno 15 komerčně získaných sloučenin a byly vybrány tak, aby se jednalo o strukturně podobně isoflavony a jejich metabolity. Zásobní roztoky byly připraveny rozpuštěním isoflavonů v dimethylsulfoxidu v koncentraci 12800 µg.ml⁻¹ a pak skladovány při -20°C. Ciprofloxacin, erythromycin, oxacilin, tetracyklin a vankomycin, byly před testováním rozpuštěny ve vhodné koncentraci v deionizované vodě nebo ethanolu.

Bakteriální kmeny a růstová média - Antimikrobiální aktivita byla hodnocena u devíti bakteriálních kmenů z kolekce amerických typových kultur (ATCC), byli vybráni zástupci z obou tříd bakterií - grampozitivní (*Bacillus cereus* ATCC 11778, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staph. aureus* ATCC 29213, *Staph. epidermidis* ATCC 12228, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615) a gramnegativní (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076). Standardní ATCC kmeny, včetně těch testovaných na protistafylokokovou aktivitu 6 (*Staph. aureus* ATCC 25923, ATCC 43300, ATCC BAA-976 a ATCC 33591), byly zakoupeny od Oxoid (Basingstoke, UK). Devět lidských klinických izolátů stafylokokových kmenů - methicilin-rezistentních (MR 12001, MR 12004, CCM 7112, CCM 7115), methicilin senzitivní kmen (MS 12001), tetracyklin-rezistentních (TR 12001, TR 12002), erythromycin-rezistentní (ER 12001) a epidemický MRSA (EMR 15), byly získány z Fakultní nemocnice Motol (Praha, ČR). S výjimkou *Strep. pyogenes*, který byl pěstován v infuzi mozku a srdce, byly všechny bakterie testovány v Mueller-Hinton bujónu. Pro *Ent. faecalis*, byl Mueller-Hinton bujón obohacen o 1 % glukózy. Citlivost standardních kmenů na ciprofloxacin a náchylnost klinických izolátů na oxacilin, erythromycin, tetracyklin a vankomycin byla zkontrolována.

4.2.3.4 Antimikrobiální test

Antimikrobiální aktivita *in vitro* byla stanovena mikrodiluční metodou za použití 96ti jamkové mikrotitrační destičky. Vzorky byly dvojkově zředěny v Mueller-Hinton bujónu

(100 μ l), v rozsahu od 4 do 128 μ g.ml⁻¹. Bakteriální kultury byly zředěny tak, aby obsahovaly 2,5-3 $\times 10^4$ CFU ml⁻¹ v mikrotitrační destičce, každá jamka byla následně inokulována suspenzí a mikrodestičky byly inkubovány při 37°C po dobu 24 hodin. Růst mikroorganismů byl hodnocen vizuálně jako zákal a přesněji určen měřením optické hustoty na fotometru při 405 nm. MIC byly vypočteny na základě hustoty růstové kontroly a byly vyjádřeny jako nejnižší koncentrace, které vykazovaly alespoň 80 % snížení růstu mikroorganismů, ve srovnání s kontrolou růstu neobsahující sloučeniny. Všechny vzorky byly testovány ve třech nezávislých experimentech, z nichž každý byl proveden třikrát, výsledky jsou uvedeny jako průměr z MIC získaných z těchto experimentů. (7)

4.2.4 Farmakokinetika v plazmě a vylučování isoflavonů močí po požití sójových výrobků s různými poměry aglykonu/glukosidu u jihokorejských žen

Asijské populace jsou známé pro svůj značný příjem tradiční potravy, bohaté na sóju, která má významný zdravotní přínos, a to díky vysokému obsahu isoflavonů. Nicméně ale dostupné epidemiologické údaje potvrzují tuto hypotézu pouze nepřesvědčivě. Tato studie byla provedena s cílem vyhodnotit farmakokinetiku isoflavonů u jihokorejských žen, po požití potravin na bázi sóji. Dvacet šest zdravých dobrovolníků (ženy ve věku 20-30 let) spotřebovalo tři různé sójové produkty (tj. isogen, sójové mléko a fermentované sójové boby) s různými poměry aglykonu/glukosidu. Koncentrace isoflavonů v plazmě a moči byly měřeny pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC) po požití jednoho ze sójových produktů. Farmakokinetické parametry byly stanoveny s použitím programu WinNonlin. Plocha pod křivkou (AUC) pro hladiny daidzeinu v plazmě u skupiny se sójovým mlékem (2,101 \pm 352 ng.h/ml) byla značně menší než u skupiny požívající isogen (2,628 \pm 573 ng.h/ml) a než u skupiny s fermentovanými sójovými boby (2,593 \pm 465 ng.h/ml). Maximální koncentrace daidzeinu v plazmě pro skupinu sójového mléka (231 \pm 44 ng/ml) byla značně vyšší než pro skupinu s isogenem (160 \pm 32 ng/ml) a fermentovanými sójovými boby (195 \pm 35 ng/ml). Poločasy daidzeinu a genisteinu u skupiny se sojovým mlékem (5,9 a 5,6 h v daném pořadí) byly výrazně kratší, než u osob, které měly isogen (9,6 a 8,5 h v daném pořadí) nebo fermentovanou sóju (9,5 a 8,2 h, v daném pořadí). Výtěžnosti daidzeinu a genisteinu z moči byly 42 % a 17 % pro skupinu isogen, 46 % a 23 % pro skupinu fermentovaných sójových bobů

a 33 % a 22 % pro skupinu sojového mléka. Závěrem lze říci, že data získané v této studii ukázala, že sójové výrobky, které obsahují vysokou hladinu aglykonů isoflavonů jsou účinnější pro udržení koncentrace isoflavonů v plazmě. Dodatečná odpověď na dávku a dále zdlouhavé, dlouhodobé a intervenční studie jsou nutné k vyhodnocení schopnosti potravin na bázi sóji zvyšovat biologickou dostupnost isoflavonů, které pozitivně ovlivňují lidské zdraví. (8)

4.2.5 Isoflavonoidy a hormony štítné žlázy

Existují obavy, že vystavení flavonoidům může vést k endokrinnímu narušení hypotalamo – hypofyzárně – thyroideální osy (mezi hormony). Kromě toho také existuje důkaz, že sekundární rostlinné metabolity, obsažené v naší každodenní stravě, nebo používané k substituční hormonální terapii, působí jako hormony samy, podobně jako známé účinky isoflavonoidů na síť steroidních hormonů. Tyto látky přírodního původu ovlivňují zpětnou vazbu hormonu štítné žlázy interferencí s různými složkami tohoto homeostaticky regulovaného systému: biosyntéza, sekrece a metabolismus, transport, distribuce a působení hormonů štítné žlázy včetně mechanismu zpětné vazby. Genistein a daidzein, hlavní složky sóji, ovlivňují syntézu hormonů štítné žlázy pomocí inhibice jodid oxidujícího enzymu thyreoperoxidázy, interferují s transportními proteiny hormonů štítné žlázy a mají vliv na činnost 5'-deiodinázy typu I v periferních tkáních, což vede ke změnám působení hormonů štítné žlázy na buněčné úrovni. Syntetické flavonoidy, jako je například F21388, strukturně podobné tyroxinu, prochází placentou a dostávají se také k mozku plodu zvířecích modelů.

Cílem tohoto příspěvku byl přehled o účincích různých isoflavonů a extraktů rostlinného původu na hypotalamo – hypofyzárně – thyroideální ose. Dále byla představena nová experimentální data získaná z odebraných vaječníků potkanů pomocí ovariectomie. Testované látky byly rostlinné extrakty z *Agnus castus*, *Belamcanda chinensis*, *Silybum marianum*, *Cimicifuga racemosa* a komerčně dostupného sójového produktu.

Provedeným pokusem se došlo k poznatkům, že u potkanů po ovariectomii extrakt ve dvou dávkách neukázal žádný vliv na cirkulující hladiny TSH a hormonů štítné žlázy v séru po 3 měsících léčby.

Síť hormonů štítné žlázy má značnou kapacitu pro kompenzaci poruchy zpětné vazby tohoto systému, což je nezbytné pro různé metabolické a katabolické reakce a vývoj. S ohledem na stále nedostatečný příjem jodu v potravě téměř u jedné třetiny světové populace, je potřeba zkoumat podrobněji možné nepříznivé účinky flavonoidů na ose hormonů štítné žlázy. (9)

4.2.6 Metabolismus isoflavonů a lignanů střevní mikroflórou: studie u bezmikrobních potkanů a potkanů spojených s lidskou flórou

V této studii byly zřejmé interindividuální rozdíly v metabolismu isoflavonů uváděné několika autory, pouze jeden z pěti subjektů vylučoval podstatné množství daidzeinového metabolitu - equolu - v moči. Je pozoruhodné, že snížené vylučování equolu u lidských subjektů nebylo způsobeno nízkým příjmem isoflavonů. Celkové vylučování isoflavonoidu v moči bylo ve skutečnosti nejvyšší u subjektu 2, což byl potkan se sníženým vylučováním equolu. I když se z omezeného počtu subjektů této studie zdá, že *O*-desmethylangolensin (*O*-DMA) je produkován na úkor equolu, v rozsáhlejší studii neexistuje žádný převrácený vztah mezi těmito dvěma metabolity.

Výsledky této studie ukazují, že přítomnost střevní mikroflóry je zásadní pro tvorbu equolu a pro další metabolity fytoestrogenů, a to konkrétně *O*-DMA a enterolaktonu, protože bezmikrobní potkani krmení sójou vylučovali pouze daidzein a genistein. Domnělé bakteriální metabolity daidzeinu, equol a *O*-DMA, nebyly u bezmikrobních potkanů v moči detekovány, a tak tomu nebylo ani u metabolitu lignanu - enterolaktonu. Přítomnost dihydroderivátů genisteinu a daidzeinu u bezmikrobních potkanů ukazuje, že jsou hlavně důsledkem procesů savců, pravděpodobně cytochromem P450 zprostředkovaných reakcí a nikoliv metabolismem střevních bakterií. Bylo však zřejmé, že množství dihydroderivátů a jejich poměr k původním sloučeninám byl vyšší u potkanů HFA (human flora associated), což naznačuje, že mikroflóra může hrát roli při jejich vzniku, případně při modulaci aktivity jaterních enzymů. Bohužel toto nebylo v rámci studie testováno.

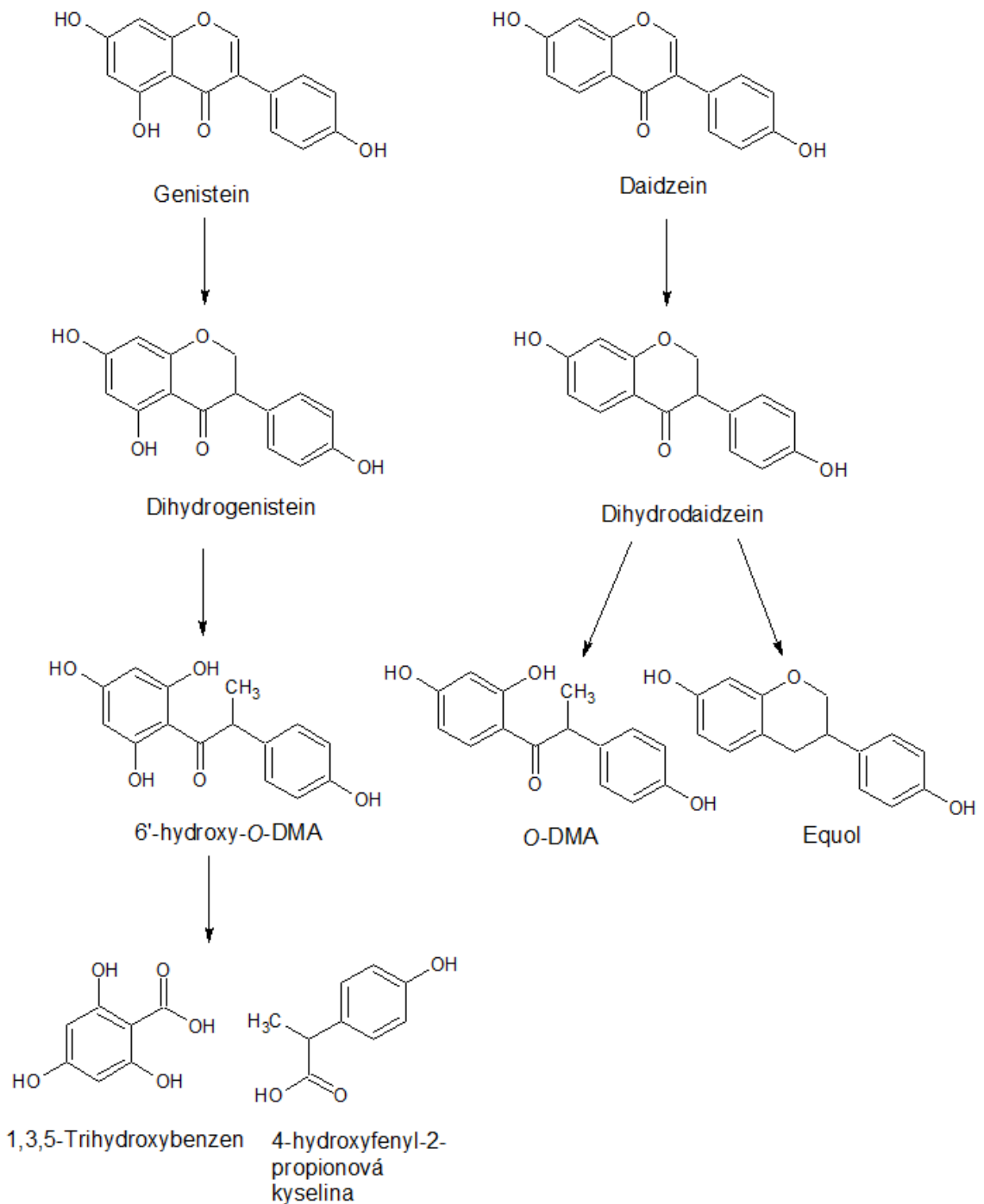
Kolonizace bezmikrobních potkanů flórou ze stolice lidského subjektu, s kapacitou pro přeměnu daidzeinu na equol, vedla u potkanů k vylučování značného množství metabolitu (8 % celkových isoflavonoidů v moči). Na rozdíl od toho, nebyl equol detekovatelný v moči HFA potkanů, spojených s flórou ze stolice z lidského subjektu ze subjektu produkujícího nízké množství equolu. Je zajímavé, že vystavení mikroflóry těchto potkanů isoflavonům na 1 měsíc, nevedlo ke zvýšené produkci equolu, což naznačuje, že na rozdíl od některých jiných cizorodých látek, jako je například cyklamát, nedošlo k metabolickému přizpůsobení mikroflóry na daidzein. Výsledky spíše ukazují, že neschopnost některých subjektů produkovat equol, je důsledkem nedostatku specifických bakterií ve střevní mikroflóře. Zajímavé je, že *O*-DMA, byl zjištěn pouze u jedné skupiny HFA potkanů, přestože oba lidské subjekty použité jako zdroj fekálního inokula byly vylučovatelé *O*-DMA. Zdá se tedy, že bakterie pro produkci *O*-DMA z daidzeinu se u potkanů neprokázaly, vzhledem k flóře vysoce produkující equol.

Je pozoruhodné, že poměr daidzeinu a genisteinu v moči bezmikrobních potkanů byl přibližně 1:1, zatímco u potkanů HFA, bylo vyloučeno podstatně více daidzeinu než genisteinu (přibližně 2:1). To značí, že dochází ke značnému bakteriálnímu metabolismu genisteinu, i když to nebylo možné potvrdit, protože metoda není pro analýzu *p*-ethylfenolu, nebo 4-hydroxyfenyl-2-propionové kyseliny, považované za hlavní střevní bakteriální metabolity genisteinu k dispozici.

Pozorování, že podstatná část nemetabolizovaných isoflavonů byla vylučována močí u bezmikrobních potkanů, ukazuje, že střevní flóra nehraje významnou úlohu při absorpci sloučenin. Isoflavony v sójové bílkovině jsou do značné míry přítomny jako glykosidy a existuje mnoho důkazů, že nejsou v této podobě absorbovány. Bylo prokázáno, že aktivita bakteriální *b*-glykosidázy chybí ve střevním obsahu a výkalech bezmikrobních potkanů. Výsledky tedy naznačují, že střevní bakteriální *b*-glykosidázové enzymy nejsou odpovědné za přeměnu daidzeinu a genisteinu na jejich aglykony, vstřebatelné formy. Zdá se proto, že aktivita savčí glykosidázy, spojená se sliznicí tenkého střeva, se podílí na hydrolýze glykosidů před absorpcí.

Z této studie je jasné, že přítomnost střevní mikroflóry má velký vliv na biologickou dostupnost isoflavonů. Celkové vylučování isoflavonů u potkanů HFA bylo podstatně menší, než u zvířat bez mikroflóry. Exkrece genisteinu byla obzvláště nízká u potkanů HFA, což naznačuje, že dochází k degradaci sloučenin nedetekovaných pomocí metod používaných v této studii. To je v souladu se studiemi Coldham a Sauer (2000), kteří uvedli rozsáhlou degradaci ¹⁴C značeného genisteinu u potkanů a detekovali 4-hydroxyfenyl-2-propionovou kyselinu jako hlavní rozkladný produkt, který ukázal, že je vytvořen z genisteinu, inkubací se střevním obsahem potkanů *in vitro* (Coldham et al., 1999). Nízký podíl genisteinu v moči a stolici je popsán u lidských a zvířecích studií často. Bylo zřejmé, že vylučování genisteinu a jeho hlavního metabolitu dihydrogenisteinu močí, bylo mnohem vyšší (v některých případech více než dvojnásobně) u samic než u samců potkanů, ať už bezmikrobních (GF), nebo ve spojení s lidskou střevní mikroflórou. Lze spekulovat, že to může odrážet rozdíly v úrovni endogenních estrogenů nebo estrogenových receptorů; nicméně, takové pohlavní rozdíly ve vylučování genisteinu nebyly pozorovány v předchozích studiích na potkanech, jako je tomu u Coldham a Sauer (2000), ani u lidí (Setchell et al, 1984; Zhang et al., 1999).

Ve studii bylo ukázáno, že schopnost produkce equolu může být přenesena z lidí do bezmikrobních potkanů. Tento experiment rovněž prokázal, že střevní mikroflóra člověka je nezbytná pro produkci daidzeinu a metabolitů lignanu (equol, *O*-DMA a enterolakton, v tomto pořadí), ale ne pro hydrolýzu a absorpci isoflavonových glykosidů. (10)



Obrázek 4: Metabolismus genisteinu a daidzeinu střevní mikroflórou

4.2.7 Phytoestrogeny ve stravě a zdraví

Flavonoidy jsou, jak již bylo několikrát zmíněno velkou třídou chemických látek, které jsou tvořeny přes fenylpropanoid-acetátovou dráhu, přes chalkon syntázu a kondenzační reakci s malonyl-CoA. Tyto isoflavonoidy jsou podtřídou flavonoidů, kdy se ovšem jeden fenolový kruh přemístil z C-3 na C-2. Isoflavonoidy z luštěnin, včetně genisteinu a daidzeinu, jsou nejvíce studované phytoestrogeny. Mohou existovat jako glukosidy nebo jako aglykony, glukosidy snadno hydrolyzují ve střevě na své aglykony. Tyto aglykony jsou snadno přenášeny přes buňky střevního epitelu. Genistein má jednu třetinu účinnosti estradiolu, když interaguje s estrogenovými receptory ER β a jednu tisícinu účinnosti estradiolu, když se vzájemně ovlivňuje s ER α , což je stanoveno pomocí exprese specializovaného luciferázového reportérového genu v ledvinových buňkách, které byly transfektovány ER α a ER β . Genistein může vyvolat podobné odpovědi v prsu, vaječnících, endometriu, prostatě, cévní a kostní tkáni a u buněčných linií, jako estradiol.

Genistein může působit v některých tkáních jako antagonist estrogenu. Expozice estradiolu u novorozeneých prepubertálních potkanů druhu Sprague - Dawley zvýšila počet vysoce proliferativních struktur nacházejících se na koncích mléčných kanálků v prsní tkáni. Nicméně, vystavení genisteinu snižuje počet těchto struktur. U modelu myší a potkanů, genistein inhibuje vývoj a růst chemicky indukovaných nádorů v prsu a prostatě. Genistein a další isoflavonoidy mohou uplatnit tento účinek indukcí signální transdukce vedoucí k apoptóze.

Genistein prokázal účinky, které nejsou obvykle spojeny s estrogenovými receptory, včetně schopnosti inhibovat tyrosinkinázy a DNA topoizomerázy. Inhibice těchto enzymů se nemění ani v přítomnosti antiestrogenu. Negenomické účinky by mohly hrát roli v rozdílech mezi genisteinem a estradiolem. Ne všechny isoflavonoidy však prokázaly tyto nongenomické účinky. Blízce související isoflavonoid, daidzein, neměl žádný účinek na tyrosinkinázy nebo DNA topoizomerázy. Jiné účinky, nežli související s ER, mohou mít souvislost s konkrétním genem phytoestrogenů, nedávno objeveným v buňkách MCF-7. Tento gen je stimulován genisteinem a nereaguje na estradiol. Biologický význam tohoto genu je neznámý.

Genistein má rozdílné účinky na progresi buněčného cyklu nádorových (MCF-7) a nenádorových (MCF-10F) mateřských buňek. Zvýšil cyklin B1 expresi a fosforylaci p34cdc2 u nenádorové buněčné linie a neměl žádný účinek na nádorové buněčné linie. Genistein inhibuje buněčnou proliferaci a blokuje buněčný cyklus ve fázi G2 u nenádorové buněčné linie při fyziologické koncentraci 15mM. Neoplastická buněčná linie není tak citlivá na přítomnost genisteinu, k blokaci buněčného cyklu došlo pouze při koncentraci 60 mM a vyšší. Schopnost

genisteinu blokovat buněčnou proliferaci normálních prsních buněk může přispět k preventivním účinkům rizika vzniku rakoviny prsu.

Hlavním zdrojem isoflavonoidů v potravě jsou potraviny na bázi sóji. V Asii může být příjem sóji až 30-50 g denně a plazmatické koncentrace genisteinu byly naměřeny od 0,1-10 mM. I když fermentace sóji může snížit množství přítomných isoflavonoidů, je jejich biologická dostupnost ve fermentovaných výrobcích vyšší, takže hodnoty močové exkrece jsou podobné jako u lidí, kteří konzumují fermentované a nezkašené produkty. I přesto, že genistein má v porovnání s estradiolem poměrně nízkou účinnost, tak mohou být vysoké koncentrace v plazmě dostatečné na to, aby působily řadu fyziologických účinků.

Blízko příbuzná sloučenina isoflavonoidům je 8-prenyl naringenin, což je flavanon, nalezený v přísadě piva - ve chmelu (*Humulus lupulus*). Před identifikací této složky byl diskutován estrogenní potenciál chmele. *In vivo* účinnost této sloučeniny je slabá, koncentrace 100 µg/ml 8-prenyl naringeninu podávaná v pitné vodě (což odpovídá 15 mg/kg/den), je nejnižší dávka způsobující estrogenní účinky u ovariektomizovaných myší. To je 500 krát větší než koncentrace 8-prenyl naringeninu v pivu. (11)

4.2.8 Metabolismus sójových isoflavonoidů daidzeinu, genisteinu a glyciteinu u lidí. Identifikace nových metabolitů, které mají nedotčenou isoflavonoidovou kostru.

Epidemiologické studie spojují vysoký příjem sóji se snížením rizika některých onemocnění závislých na hormonech. V této studii byl zkoumán metabolismus sójových isoflavonoidů daidzeinu, genisteinu a glyciteinu u lidí. Cílem bylo nalézt a identifikovat metabolity isoflavonoidů fáze I, které mají intaktní isoflavonoidovou strukturu, a které by mohly mít nějakou biologickou aktivitu. Šest dobrovolníků zahrnulo do své normální západní stravy tři sójové tyčinky denně po dobu 2 týdnů. Denní vzorky moči byly odebrány před a po období suplementace. Vzorky moči byly hydrolyzovány *Helix pomatia* (hlemýžď zahradní), extrahovány diethyletherem, přečištěny Sephadex LH-20 chromatografií a analyzovány jako deriváty trimethylsilyl metodou plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS). Struktury metabolitů isoflavonoidů byly identifikovány za použití autentických referenčních sloučenin. Metabolity, pro které autentické referenční sloučeniny nebyly k dispozici, byly identifikovány podle interpretace hmotnostních spekter. Bylo identifikováno několik nových metabolitů isoflavonoidů a byla potvrzena přítomnost dříve hlášených metabolitů.

Metabolické dráhy daidzeinu, genisteinu a glyciteinu byly prezentovány na základě identifikace metabolitů v lidské moči po suplementaci sójou.

Studie se zaměřila na dva hlavní sójové isoflavonoidy, daidzein a genistein, které byly testovány jako aglykony, nebo jako konjugáty glukosidů v řadě buněčných linií a na zvířecích modelech. Velmi malá pozornost byla věnována metabolismu isoflavonů a možným biologickým účinkům samotných metabolitů. Byla demonstrována estrogenní aktivita equolu, metabolitu daidzeinu a metabolity sojových isoflavonoidů se jeví jako účinné antioxidanty. Také metabolity fáze II, konjugáty síranu a kyseliny glukuronové u isoflavonoidů, byly předmětem zkoumání a byly pozorovány některé biologické aktivity.

V této studii, byl metabolismus isoflavonů fáze I studován stanovením metabolitů isoflavonů v lidské moči, získané po konzumaci sóji. Několik nových metabolitů isoflavonů bylo identifikováno za použití autentických referenčních sloučenin, nebo interpretací hmotnostních spekter. Byla potvrzena přítomnost dříve uváděných redukováných metabolitů daidzeinu a genisteinu, dihydrodaidzeinu, equolu, *O*-DMA a *cis*-4-OH-equolu, dihydrogenisteinu a 6'-OH-*O*-DMA. Poprvé došlo k popisu identifikace redukováných metabolitů glyciteinu, třetího sójového isoflavonu, metabolitu, který nebyl předem u lidí stanoven. Hladiny metabolitů glyciteinu, dihydroglyciteinu, 5'-OMe-*O*-DMA a 6-OMe-equolu, ve vzorcích moči byly nízké, ale identifikace těchto metabolitů v lidské moči značí, že stejně jako daidzein a genistein i glycitein je střevní mikroflórou přeměněn na redukované metabolity.

Tvorba hydroxylovaných metabolitů daidzeinu, genisteinu a glyciteinu byla prokázána Kullingem a kol., a byla také uvedena celá řada hydroxylovaných metabolitů v lidské moči po konzumaci sóji. V této studii bylo možné identifikovat tři hydroxylované metabolity daidzeinu, 3',4',7- ; 4',6,7- a 4',7,8-trihydroxyisoflavony a jeden metabolit genisteinu, 3',4',5,7-tetrahydroxyisoflavon. Předpokládá se, že tyto čtyři sloučeniny mohou být považovány za hlavní oxidované metabolity daidzeinu a genisteinu, protože hladiny jiných, dříve uváděných hydroxylovaných metabolitů identifikovaných ve vzorcích moči rovněž v této studii, jsou výrazně nižší. Zda je individuální rozdíl v produkci těchto oxidovaných metabolitů, musí být ještě prostudováno. Je ale třeba poznamenat, že alternativní cesta pro tvorbu 4',6,7-trihydroxyisoflavonu je demethylace glyciteinu. To bylo vidět při analýze vzorků moči sebrané po konzumaci jetele. Hladiny 4',6,7-trihydroxyisoflavonu a dalších metabolitů, které mají stejný substituční vzor, jsou výrazně nižší než ve vzorcích moči odebraných po konzumaci sóji, což lze vysvětlit nižší úrovní glyciteinu v *Trifolium pratense* (jeteli lučním) v porovnání se sójou.

Výsledky naznačují, že oxidativní metabolické cesty existují i pro metabolity isoflavonů tvořených střevní mikroflórou. Navíc, ale pravděpodobně v menší míře, metabolity v játrech,

kteřé podstoupí enterohepatální cirkulaci, se mohou podrobit redukčním reakcím střevní mikroflóry. Několik nových metabolitů majících isoflavanonovou, isoflavanovou α -methyldeoxybenzoinovou strukturu spolu s dalšími hydroxylovými skupinami na pozicích 3'-, 6- nebo 8-, bylo v této studii identifikováno. Hladiny těchto metabolitů byly v moči nízké. Tři ze šesti účastníků byly tzv. equol producenty a equol, stejně jako i další metabolity, které mají strukturu isoflavanů, byl detekován pouze v moči těchto osob.

Metabolismus isoflavanoidů u lidí je tedy různý. Bylo nalezeno mnoho produktů metabolismu po konzumaci isoflavanů. Metabolické dráhy daidzeinu, genisteinu a glyciteinu byly navrženy na základě identifikace metabolitů v lidské moči po suplementaci sójou. I když v této studii nebyla provedena žádná kvantitativní analýza isoflavanoidů, některé orientační informace o množství metabolitů mohou být získány srovnáním výšek pík v celkovém iontovém chromatogramu. Za hlavní metabolickou reakci fáze I aglykonů sójových isoflavanů se zdá být redukce. Metabolity vytvořené jinými reakcemi se vyskytují v menší míře. Hydroxylované metabolity představují například pouze menší procento celkových metabolitů isoflavanů. K některým demethylacím glyciteinu ani nedochází. Rozsah demethylace se zdá být závislý na poloze methoxy skupiny, protože biochanin A a formononetin, které mají methoxy skupiny v kruhu B, jsou téměř kompletně demethylovány na genistein a daidzein. Kulling a kol. prokázal, že methylace oxidovaných metabolitů isoflavanů se vyskytuje *in vitro* a *in vivo* v menší míře. Identifikace 4',7-dihydroxy-3'-methoxyisoflavonu, 3'-OMe-equolu, v lidské moči po konzumaci sóji naznačuje, že, stejně jako isoflavony, také jejich metabolity, které mají lokální hydroxylové skupiny, mohou být methylovány katechol-O-methyltransferázou (COMT). Analýzu produktů látkové výměny, vytvořené štěpením C-kruhu, nebo konjugací se sulfonovou nebo glukuronovou kyselinou, nebylo možné prezentovat pomocí metody GC-MS. Jsou tedy potřeba další studie ke zjištění, jaké jsou skutečné konečné produkty metabolismu isoflavanů, stejně jako skutečné množství a druhy cirkulujících konjugátů isoflavanů. (12)

4.2.9 Nová radioimunoesej pro daidzein

Daidzein je přírodní látka, která se hojně vyskytuje v některých potravinách. Možný prospěšný vliv tohoto isoflavanoidu se zdá být založen ne pouze na základě jeho slabých estrogenních a/nebo antiestrogenních vlastnostech, ale i na jeho obecně antimitotických účincích.

Analytické metody pro studium biologické dostupnosti a metabolismu isoflavanoidů v potravě jsou založeny na GC-MS nebo HPLC. Metody GC-MS vyžadují poměrně pracné

předzpracování vzorků a HPLC metody potřebují předčištění. Obě techniky vyžadují nákladné vybavení. Tyto skutečnosti činí obě metody méně vhodnými pro epidemiologické studie. Dobrou alternativou k těmto metodám by mohla být imunoesej, a to díky jednoduchosti, relativně nízké ceně a dostupnosti pro sériové práce a automatizaci. Ačkoli by pro rutinní práci měly být upřednostňovány neradioisotopové metody, je obvyklé, že radioisotopové metody byly dříve vyvinuty pro přípravu dalších - výhodnějších metod. Předkládané dvě metody pro daidzein jsou citlivější než kterákoli z metod používaných v minulosti pro kvantifikaci fytoestrogenů v biologických tekutinách.

RIA nerozlišuje mezi daidzeinem a formononetinem, jež je methoxyderivátem daidzeinu, methoxylovaný v poloze (4'-), jehož prostřednictvím je haptén připojen na nosný protein v imunogenu. To ale není problém, protože formononetin v potravinách je ve střevech prakticky kvantitativně převeden na daidzein a jiné metabolity. Pouze v jednom případě byla tato sloučenina detekována ve vzorku moči vegetariána. Nicméně, jiné 4'-O deriváty daidzeinu mohou také vyvolat signál stejného řádu jako daidzein. V důsledku toho hodnota přímé RIA pravděpodobně odráží součet volného daidzeinu a jeho 4'-glukuronidů a sulfátů. Poslední dva jmenované metabolity nejsou extrahovány éterem. Chromatografie extraktu diethyletheru z moči vykazovala pouze jeden imunoreaktivní pík odpovídající pozici standardu daidzeinu (data nejsou uvedena). Relativně nízký koeficient korelace (0,71 po odstranění jedné odlehle hodnoty), při porovnání přímé RIA s výsledky GCMS lze vysvětlit tím, že přímá RIA detekuje nejen volný daidzein, ale i jeho 4'-O metabolity, ale nedetekuje konjugáty, stejně jako metody, stejně jako metody GC-MS. Extrakční metoda nevykazovala žádnou korelaci s výsledky GC-MS. Tato metoda detekuje pouze volný daidzein a křížově reagující 4'-methyl derivát formononetin. Volné koncentrace mohou do značné míry v plazmě kolísat nezávisle na hladině konjugátů. Kromě toho je třeba připomenout, že v ranních vzorcích může být volná hladina mnohem nižší ve srovnání s konjugáty brzy po příjmu isoflavonoidů. Výsledky pro přímou RIA ukázaly pozitivní zkreslení pro hodnoty nižší než 20 nmol/l, a je možné, že pro extrakční metody existují podobná zkreslení. To by mohlo být v obou případech připsáno efektům matric. Nepodařilo se však toto hodnotit pro metody extrakce, protože citlivost metody GC-MS je nedostatečná pro malé úrovně volného daidzeinu. Na druhou stranu, údaje o vymizení plazmatického daidzeinu a o jeho vylučování po příjmu sóji jsou ve shodě s předchozími GC-MS a HPLC studii. Ve studii byla dobrá korelace mezi volným daidzeinem a celkovou daidzein 4'-imunoreaktivitou v séru dobrovolníků po požití sojového šrotu, ale bez daidzeinu činil pouze 8,3 % celkového imunoreaktivity, což je v souladu s předchozími studii, které ukazují, že většina daidzeinu se vyskytuje v plazmě jako glukuronid. Zdá se, že daidzein se velmi rychle mění na více hydrofilní konjugáty (glukuronidy nebo sulfáty), které jsou pak velmi rychle vyloučeny močí. Nelze

posoudit, jaká část z koncentrace celkového daidzeinu se v přímé RIA odráží, protože standardy 4'-sulfátu a 4'-glukuronidu nejsou v tomto okamžiku k dispozici. Konjugáty v poloze 7 kruhu A nejsou s největší pravděpodobností měřeny přímou RIA. Pro přesné vyhodnocení celkového obsahu daidzeinu, by měl RIA předcházet ještě jeden krok v podobě hydrolýzy.

Na druhou stranu, dokonce i nejjednodušší verze přímé RIA se zdá být vhodná pro screening a pro studium kinetiky, protože získaný signál je úměrný volnému analytu po zatížení sójou. Nicméně při nízké úrovni, je vztah mezi volným a celkovým daidzeinem méně uspokojivý, pravděpodobně kvůli některým interferujícím sloučeninám nebo účinkům matrice. Je třeba také připomenout, že základní hladiny byly naměřeny v plazmě ranních vzorků, a to lze částečně vysvětlit tím, že volné hodnoty daidzeinu nekorelují s hodnotami získanými s přímým RIA z důvodu rozsáhlého metabolismu daidzeinu a účasti metabolitů v enterohepatálním oběhu. Původ imunoreaktivity daidzeinu v séru jedinců nekonzumujících sóju zůstává otázkou. Podle literatury se tento isoflavon vyskytuje převážně u luštěnin, ale nízké koncentrace se nacházejí také v obilovinách, kávě a mléku. Malé množství sójové bílkoviny, která obsahuje isoflavonoidy je často přidáváno do takových potravin, jako jsou chléb a klobásy. Dostupnost citlivější a levnější imunoeseje umožní zjistit, zda existují nějaké "neklasické" zdroje daidzeinu v lidské či zvířecí stravě. Druhá otázka, která by mohla být přehodnocena, je zda opravdu nedochází k hromadění daidzeinu v těle. Kromě toho, tyto citlivé testy umožní, aby bylo možné měřit daidzein v buňkách a tkáních. Zvýšení znalostí pohybu a metabolismu tohoto dietního faktoru by mohlo být důležité s ohledem na možné využití daidzeinu a/nebo příbuzných sloučenin v prevenci onemocnění, u kterých mají tyto sloučeniny prospěšný účinek. Došlo se k závěru, že vývoj první imunoeseje pro fytoestrogen v lidských biologických tekutinách povede k rychlému rozvoji dalších podobných metod pro genistein, equol, enterolakton a jiné další fytoestrogeny a umožní provádět větší epidemiologické studie. (13)

4.2.10 Biotransformace isoflavonoidů biochaninu A, formononetinu a glyciteinu pomocí *Eubacterium limosum*

Eubacterium limosum, striktně anaerobní bakterie z lidského střevního traktu, je schopna O-demethylace několika sloučenin, byla v této studii testována pro schopnost metabolizovat tři methoxylované isoflavonoidy – biochanin A, formononetin a glycitein. Eluční profily vysokoúčinné kapalinové chromatografie u metabolitů biochaninu A, formononetinu a glyciteinu ukázaly píky, které měly retenční časy shodné jako identický genistein, daidzein a 6,7,4'-trihydroxyisoflavon. Metabolity byly identifikovány pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. *Eubacterium limosum* vyprodukovala 61,4 μM genisteinu

a 13,2 μM daidzeinu ze 100 μM biochaninu A a formononetinu, po 26 dnech inkubace. *O*-demethylázová aktivita je spojena s buňkami a nebyla detekována v extracelulární frakci bakteriální kultury. Jednalo se o první studii, ve které byla prokázána přeměna biochaninu A a formononetinu na silnější fytoestrogeny pomocí bakterie. (14)

4.3 *Biochanin A, formononetin*

4.3.1 Metabolismus biochaninu A a formononetinu *in vitro* pomocí lidských jaterních mikrosomů

Biochanin A a formononetin se hojně vyskytují v luštěninách. Tyto proestrogenní isoflavony je možné převést 4'-*O*-demethylací na silnější fytoestrogeny genistein a daidzein. Inkubace biochaninu A nebo formononetin s lidskými jaterními mikrosomy ústí v 4'-*O*-demethylaci a produkci dalších metabolitů. Byly izolovány a charakterizovány tři nové hydroxylované deriváty formononetinu, 6,7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavon, 7,8-dihydroxy-4'-methoxyisoflavon, a 7,3'-dihydroxy-4'-methoxyisoflavon. Tolleson a kolektiv zkoumali *O*-demethylázovou schopnost isoform cytochromu P450 nacházející se v lidských játrech.

Isoformy lidského cytochromu P450 1A2, 2E1, 2C9*1, 2C19, a 2D6*1 katalyzovaly spotřebu biochaninu A a výrobu genisteinu. Isoformy 1A2, 2C9*1, 2A6, 2D6*1, a 2C19 katalyzovaly spotřebu formononetinu a produkci daidzeinu. Tyto isoformy také vytváří další hydroxylované metabolity.

Přestože *O*-demethylace isoflavonů je přisuzována metabolismu střevní mikroflóry, tato studie ukazuje, že lidské jaterní mikrosomální enzymy mohou provádět stejné transformace a mohou hrát klíčovou roli v přeměně 4'-*O*-methylovaných isoflavonů na silnější fytoestrogeny. (15)

4.4 *Calycosin*

4.4.1 Vstřebávání a metabolismus odvaru z *Astragali radix*: *in silico*, *in vitro* a případová studie *in vivo*

Astragalus membranaceus Bunge – kozinec blanitý

čeleď: Fabaceae – bobovité

původ: Asie – Čína

charakteristika: bylina (16)

Chceme – li stanovit profil absorpce odvaru z *Astragali radix* a identifikovat jeho per os vstřebatelné složky a jejich metabolity, použijeme doplňkové metody a to *in silico*, *in vitro*, metody *in vivo*, tj. metoda predikce pomocí výpočetní chemie, dále experiment s modelem Caco-2 buněčné monovrstvy, pokus s modelem potkaního střeva a experiment se zdravými dobrovolníky. Podle *in silico* výpočetního výsledku může být 26 sloučenin *Astragali radix* považováno za orálně dostupné sloučeniny, včetně 12 flavonoidů. Při *in vitro* a *in vivo* experimentech bylo předběžně identifikováno 21 sloučenin a to pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detekcí diodového pole-ionizací elektrosprejem s iontovou pastí a hmotnostní spektrometrií (HPLC-DAD-ESI-MS). Data zahrnovala calycosin, formononetin, (6aR,11aR)-3-hydroxy-9,10-dimethoxypterokarpan, 7,2'-dihydroxy-3',4'-dimethoxyisoflavan, calycosin-7-O-β-D-glukosid, formononetin-7-O-β-D-glukosid, 7,2'-dihydroxy-3',4'-dimethoxyisoflavan-7-O-β-D-glukosid-6''-O-malonát, (6aR,11aR)-3-hydroxy-9,10-dimethoxypterokarpan-3-O-β-D-glukosid a metabolity fáze II: calycosin-7-O-β-D-glukuronid, formononetin-7-O-β-D-glukuronid, (6aR,11aR)-3-hydroxy-9,10-dimethoxypterokarpan-3-O-β-D-glukuronid, 7,2'-dihydroxy-3',4'-dimethoxyisoflavan-7-O-β-D-glukuronid a calycosin sulfát. U calycosinu a formononetinu byla prokázána vstřebatelnost čtyřmi metodami, u (6aR,11aR)-3-hydroxy-9,10-dimethoxypterokarpanu a 7,2' dihydroxy-3',4'-dimethoxyisoflavanu byla prokázána absorpce třemi metodami; u formononetin-7-O-β-D-glukosidu a (6aR,11aR)-3-hydroxy-9,10-dimethoxypterokarpan-3-O-β-D-glukosidu byla absorpce prokázána dvěma metodami. Přítomnost calycosin-7-O-β-D-glukuronidu, formononetin-7-O-β-D-glukuronidu, (6aR,11aR)-3-hydroxy-9,10-dimethoxypterokarpan-3-O-β-D-glukuronidu, 7,2'-dihydroxy-3',4'-dimethoxyisoflavan-7-O-β-D-glukuronidu a calycosin sulfátu byla prokázána dvěma nebo třemi metodami (*in vitro* pokus s „obráceným střevem“ u potkanů, *in vitro* pokus s modelem s Caco-2 buněčnou monovrstvou a *in vivo* pokus s lidmi). Zjistilo se, že isoflavony, pterokarpany a isoflavany by mohly být rovněž metabolizovány ve střevě během absorpce a hlavními metabolity by byly glukuronidy. Závěrem tedy tato studie prokázala, že flavonoidy obsažené v odvaru z *Astragali radix*, včetně isoflavonů, pterokarpanů, a isoflavanů, by mohly být absorbovány a metabolizovány střevem. Tyto vstřebatelné sloučeniny, mají různou bioaktivitu související s léčebnými účinky odvaru *Astragali radix*, což by mohlo být považováno za důležitou součást účinných složek této rostliny. (17)

4.4.2 Vstřebávání a transport calycosinu v Astragali radix použitím jednovrstvého modelu Caco-2

Caco-2 buněčná linie je kontinuální buněčná linie heterogenních lidských epiteliálních buněk kolorektálního adenokarcinomu, vyvinutý Sloan-Kettering Institutem pro výzkum rakoviny prostřednictvím výzkumu prováděného Dr. Jorgen Foghem.

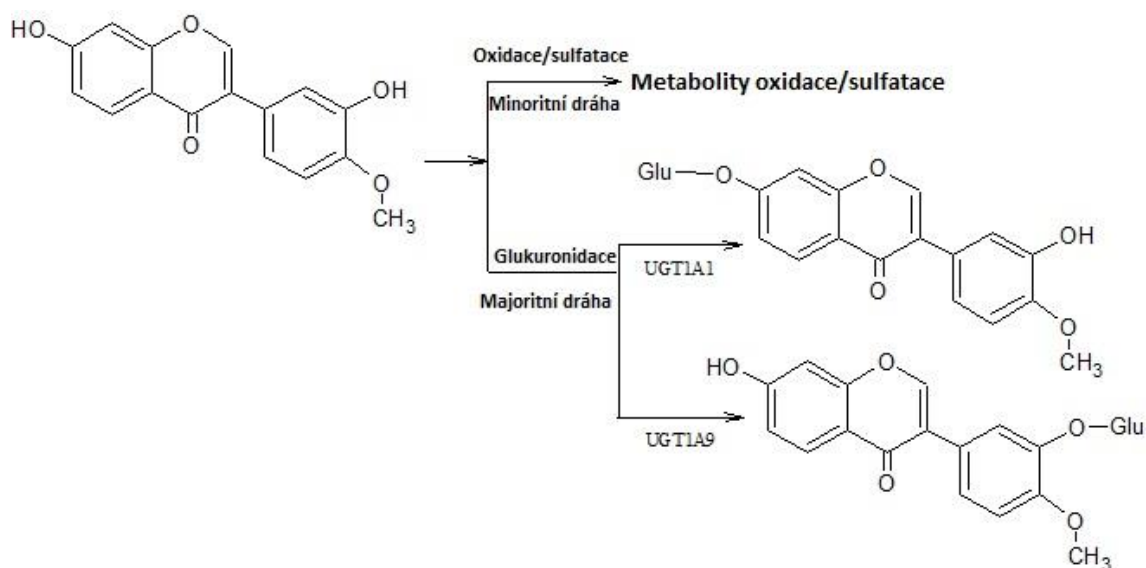
Flavonoidy jsou třídou důležitých účinných složek v tradiční čínské medicíně, farmakologické aktivitě a *in vivo* procesu, staly se cílem výzkumu posledních let. Calycosin je hlavní účinnou složkou flavonoidů v Astragali radix, nedávné studie ukazují, že má mnoho druhů farmakologických aktivit, ale absorpce a charakteristika transportu *in vivo* je stále nejasná. Pokusem s použitím modelu Caco-2 buněk, při použití apigeninu jako vnitřního standardu látky, za použití metody pro stanovení koncentrace léčiva pomocí HPLC, byly studovány za různých koncentrací a absorpčních transportních charakteristik inhibitorů, přidáním různých typů proteinů – inhibitorů. Data byla analyzována pomocí Q testu, výsledky ukazují, že nízká, střední, vysoká koncentrace $P(\text{app})(\text{BL-AP})/P(\text{app})(\text{AP-BL}) = 1,38 < 1,5$, v daném pořadí byly přidávány různé typy proteinových inhibitorů, ve srovnání s kontrolní skupinou $P(\text{app})(\text{BL-AP})/P(\text{app})(\text{AP-BL})$, nebyly zaznamenány žádné významné rozdíly. Absorpce calycosinu může probíhat hlavně pasivním transportem, ale rovněž se zde podílí aktivní transportní mechanismus, transport nemůže být ovlivněn P-proteinem, MRP2 bílkovinou a SGLT bílkovinou. (18)

4.4.3 Regioselektivní glukuronidace calycosinu pomocí lidských jaterních mikrosomů a rekombinantní lidské UDP-glukuronosyltransferázy

Konjugace v játrech hraje důležitou roli v systémové expozici a v lékové interakci flavonoidů. V této studii byl charakterizován metabolismus calycosinu v játrech, hlavního isoflavonu z Astragali radix, a byla vymezena regioselektivita při glukuronidaci v lidských jaterních mikrosomech a v panelu rekombinantní UDP-glukuronosyltransferázy (UGT). Calycosin podstoupil především glukuronidaci a minoritně oxidaci a sulfataci v lidských jaterních subcelulárních frakcích. Hlavní glukuronid (G2) z calycosinu byl izolován a NMR analýzou identifikován jako calycosin 3'-glukuronid, minoritní glukuronid (G1) byl pokusně

určen jako calycosin 7-glukuronid. Formace obou glukuronidů zapadají v lidských mikrosomech do typické kinetiky dle Michaelise a Mentenové.

Mikrosomy vykazovaly vyšší afinitu (K_m , G2 $12.37 \pm 1.20 \mu\text{M}$ vs G1 $40.90 \pm 5.51 \mu\text{M}$) a rychlost (V_{max} , G2 $5.39 \pm 0.13 \text{ nmol/min/mg}$ proteinu vs G1 $2.80 \pm 0.13 \text{ nmol/min/mg}$ proteinu) u tvorby G2, což vedlo ke clearance calycosinu přes 3'-glukuronidaci šetkrát častěji, než u 7-glukuronidace. UGT1A1, 1A3 a 1A10 ukázaly aktivity v případě obou typů glukuronidací 3'-OH a 7-OH, zatímco UGT1A7, 1A8, 1A9 a 2B7 byly schopné katalyzovat jen 3'-OH glukuronidaci calycosinu. Z nich UGT1A9 vykazovala nejvyšší aktivitu po dobu tvorby 3'-glukuronidu, další nejvyšší aktivitu vykazovala UGT1A7. UGT1A1 vykazovala nejvyšší aktivitu při 7-OH glukuronidaci, která byla srovnatelná s jeho činností při 3'-OH glukuronidaci. Propofol (UGT1A9 inhibitor) provádí kompletní inhibici formace 3'-glukuronidu, doprovázenou zvýšením 7-glukuronidu v jaterních mikrosomech, bilirubin (UGT1A1 inhibitor) inhibuje 7-OH glukuronidaci pouze částečně (~60 %). Tyto nálezy prokázaly regioselektivní glukuronidaci na úrovni 3' -OH na isoflavonu calycosin v lidských jaterních mikrosomech a vrhají světlo na potenciální lékové interakce calycosinu s jinými substráty UGT1A9. (19)



Obrázek 5: Glukuronidace calycosinu

4.5 *Prunetin, puerarin, genistin*

4.5.1 Dispozice flavonoidů pomocí střevní recyklace: enzymová stabilita ovlivňuje charakteristiku glukuronidace prunetinu u všech druhů, orgánů a UGT isoformem

V této studii byla charakterizována *in vitro* glukuronidace prunetinu, proléčiva genisteinu, který má vysoce aktivní protirakovinové účinky. Metabolické studie byly provedeny za použití exprimovaných lidských isoformem UGT a mikrosomů/frakcí S9, připravených ze střeva a jater hlodavců a lidí. Výsledky ukázaly, že lidské střevní mikrosomy byly při glukuronidaci prunetinu účinnější, než jaterní mikrosomy, ale rychlosti metabolismu byly závislé na době inkubace při teplotě 37 °C. Lidské jaterní a střevní mikrosomy převážně vyráběly metabolit 1 (prunetin-5-*O*-glukuronid) a metabolit 2 (prunetin-4'-*O*-glukuronid), v daném pořadí. Za použití 12 lidských isoformem UGT se došlo k tomu, že UGT1A7, UGT1A8 a UGT1A9 jsou zodpovědné hlavně za tvorbu metabolitu 1, zatímco UGT1A1, UGT1A8, a UGT1A10 byly hlavně zodpovědné za tvorbu metabolitu 2. Tento isoformově-specifický metabolismus byl v souladu s dřívějšími výsledky získanými za použití lidských jaterních a střevních mikrosomů, první zmíněná (játra) jsou bohatá na UGT1A9, zatímco druhá jsou bohatá na UGT1A10. S překvapením bylo zjištěno, že termostabilita mikrosomů byla závislá na isoformě a na orgánu. Například, aktivity lidské jaterní mikrosomální UGT byly mnohem více tepelně stabilní (37 °C) než aktivity střevní mikrosomální UGT, rovněž se zjištěním, že lidský UGT1A9 je mnohem více termostabilní, než lidský UGT1A10 a UGT1A8. Orgánově specifické profily tepelné stability byly také evidentní u potkaních mikrosomů a u myších S9 frakcí, i když se glukuronidace prunetinu ve střevech lidí významně liší od střevní glukuronidace hlodavců. Závěrem lze říci, že glukuronidace prunetinu je závislá druhově, orgánově a na UGT-isoformě, z nichž všechny mohou být ovlivněny tepelnou stabilitou specifických isoformem UGT podílejících se na metabolismu. (20)

4.5.2 Předléčba puerarinem ovlivňuje u pokusných potkanů farmakokinetiku warfarinu, ale ne klopidogrelu

Tato studie byla navržena ke stanovení účinků předléčby puerarinem na farmakokinetiku orálního antikoagulačního přípravku warfarinu a protidestičkového léku klopidogrelu u potkanů. V léčebné skupině bylo potkanům, kteří prošli opakovanou léčbou

puerarinem v intraperitoneálních dávkách 20, 60 nebo 200 mg.kg⁻¹ po dobu sedmi dní, podávány gaváží (což je aplikace přímo do žaludku, či injekční aplikace) warfarin nebo klopidogrel, zatímco potkanům v kontrolní skupině byly podávány pouze stejné dávky warfarinu, nebo klopidogrelu. Vzorky plazmy byly získány v předepsaných časech a analyzovány pomocí kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS). Výsledky ukázaly, že u potkanů léčených puerarinem ve všech testovaných dávkách 20, 60 a 200 mg.kg⁻¹, bude puerarin ovlivňovat farmakokinetiku warfarinu, ale ne klopidogrelu, což naznačuje potenciální interakci „rostlina – droga“ mezi puerarinem a warfarinem.(21)

4.5.3 Absorpce a metabolismus genistinu v tenkém střevě izolovaném z potkana

V této studii byl sledován příjem a střevní metabolismus fyziologicky aktivního genistinu v *ex vivo* perfuzi modelu střeva; lumenálně aplikované koncentrace byly 5,9; 12,0; a 23,8 μmol/l. Střevní absorpce genistinu byla 14,9 % (± 2,3; *n* = 9), a to bez ohledu na použité množství. Většina ze vstřebaného genistinu se vyskytovala jako genistein glukuronid (11,6 %), také byl získán jako hlavní metabolit na lumenální straně (19,5%). Menší množství genistinu (1,3 %) a genisteinu (1,9 %) bylo nalezeno na cévní straně, zatímco 15,4 % z aplikovaného genistinu se lumenálně štěpilo, čímž byl získán genistein. Nebyly pozorovány sulfátové deriváty genisteinu nebo genistinu. (22)

4.6 Cladrin

4.6.1 Pozitivní skeletální účinky cladrinu - přirozeně se vyskytujícího dimethoxydaidzeinu - na kosterní soustavu u osteopenických potkanů, které přetrvávaly i po vysazení léčby

Při studii bylo zjištěno, že standardizovaný extrakt z *Butea monosperma* zachoval trabekulární kostní hmotu u potkaních samic s odebranými vaječníky (OVx). Cladrin, nejvíce zastoupená bioaktivní látka extraktu, podporoval nárůst a zvýšení kostní hmoty u dospívajících potkanů stimulací růstu osteoblastů.

Byly studovány účinky léčby cladrinem a účinky po ukončení léčby u osteopenických kostí. Dospělým samicím potkanů Sprague - Dawley byly odebrány vaječníky a byly ponechány 12 týdnů bez léčby, aby došlo ke ztrátě kostní hmoty, v důsledku nedostatku estrogenů, následujících 12 týdnů jim byl orálně podáván cladrin (1 a 10 mg/kg/den). Polovina potkanů byla zabita na konci léčby a druhá polovina 4 týdny po vysazení léčby. Fiktivně operovaní potkani a OVx potkani léčení PTH nebo 17 β -estradiolem, sloužili jako kontroly. Účinnost byla hodnocena na základě mikrostruktury kosti, pomocí mikropočítačové tomografické analýzy a fluorescenčním značením kosti. Pomocí qPCR a western blottu byly měřeny hladiny mRNA a bílkovin v kosti a děloze. Specifická metoda ELISA byla použita pro měření hladiny PINP (N-terminální peptid prokolagenu I) a močového CTx (C-terminální oktapeptid kolagenu typu I) v séru.

U potkanů s osteopenií léčebná dávka cladrinu zlepšila trámčitou mikrostrukturu kosti, zvýšila pevnost tlaku bederních obratlů, rychlost tvorby kostní hmoty, kortikální tloušťku, sérové hladiny PINP a expresi osteogenních genů v kostech; naopak snížila expresi genů osteoklastogenních kostí a močové koncentrace CTx. Cladrin nemá žádné estrogení účinky na dělohu. Cladrin v dávce 10 mg/kg udržoval kosterní nárůst ještě 4 týdny po vysazení.

Cladrin měl tedy pozitivní účinky při léčbě osteopenie u potkanů a ty přetrvávaly rovněž i po vysazení léčby. (23)

4.6.2 Metoda LC-MS/MS pro simultánní analýzu cladrinu a equolu v plazmě potkanů a její aplikace ve farmakokinetické studii cladrinu

Při studii byla vyvinuta a validována rychlá a selektivní metoda LC-MS/MS pro simultánní analýzu cladrinu a equolu v plazmě samic potkanů. Chromatografická separace byla provedena na koloně RP18 a MS/MS analýza byla provedena v trojitým kvadrupólovém hmotnostním spektrometru s ionizací elektrosprejem. Metoda byla lineární v rozmezí koncentrace od 7,8 do 1000 ng/ml pro cladrin a 3,9 až 1000 ng/ml pro equol. Správnost a přesnost metody během dne a mezi dny byly v přijatelných mezích. Validovaná metoda LC-MS/MS byla úspěšně použita pro studium farmakokinetiky cladrinu v dávce 10 mg/kg u samic potkanů *Sprague-Dawley*. Cladrin není spojen s žádným estrogením účinkem, který indikuje, že methoxylované isoflavony mohou mít lepší terapeutický potenciál jako selektivně působící osteogenní činidla. (24)

4.7 *Tectorigenin, kakkalid*

4.7.1 Cytoprotektivní účinek tectorigeninu, metabolitu vznikajícího transformací tectoridinu činností střevní mikroflóry, na oxidační stres indukovaný peroxidem vodíku

V této studii byly zkoumány antioxidační vlastnosti tectorigeninu, metabolitu tvořeného transformací tectoridinu střevní mikroflórou. Bylo zjištěno, že tectorigenin vychytává intracelulární formy reaktivních kyslíků a 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazylový (DPPH) radikál, čímž zabraňuje peroxidaci lipidů. Tato „vychytávací“ aktivita tectorigeninu chránila životaschopnost fibroblastů plic z čínského křečka (V79-4), vystavených peroxidu vodíku (H_2O_2), aktivací dráhy proteinkinázy regulované extracelulárním signálem (ERK). Kromě toho, tectorigenin snižuje tvorbu apoptických buněk a snižuje zástavu buněčného cyklu ve fázi G2/M fázi indukovanou peroxidem vodíku. Tectorigenin zvyšuje činnost buněčných antioxidačních enzymů, jako jsou superoxid dismutáza, kataláza, glutathion peroxidáza, a také zvyšuje jejich hladinu proteinu. Dohromady tyto výsledky naznačují, že tectorigenin chrání V79-4 buňky před poškozením H_2O_2 , zvýšením antioxidační aktivity a aktivováním dráhy ERK. (25)

4.7.2 Identifikace metabolitů tectoridinu *in vivo* a *in vitro* kapalinovou chromatografií s tandemovou hmotnostní spektrometrií

V této práci byla k *in vitro* a *in vivo* zkoumání metabolismu tectoridinu použita kapalinová chromatografie s ionizací elektrospřejem a tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MSⁿ). Po perorálním podání jedné dávky tectoridinu ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) zdravým potkanům, byly po dobu 0-48 h odebírány výkaly a 0-24 h vzorky moči. Tectoridin byl také inkubován se střevní mikroflórou potkanů a s jejich jaterními mikrosomy. Vzorky z *in vivo* a *in vitro* studie metabolismu byly purifikovány s použitím kolony C(18) pro extrakci na pevnou fázi, následně odděleny za použití kolony s reverzní fází C(18) a se směsí methanol/voda jako mobilní fází, a detekováno pomocí on-line MSⁿ systému. Struktura metabolitů byla objasněna porovnáním jejich molekulové hmotnosti, retenčních časů a skenováním hmotnostního spektra s původním lékem. Výsledky ukázaly šest metabolitů tectoridinu v moči (tectorigenin, hydrogenovaný tectorigenin, monohydroxylovaný tectorigenin, dihydroxylovaný tectorigenin, konjugovaná forma glukuronidu tectorigeninu, konjugovaná forma sulfátu tectorigeninu); tři ve stolici (tectorigenin, dihydroxylovaný tectorigenin a tectorigenin konjugovaný síranem); dále jeden

metabolit v inkubační směsi se střevní mikroflórou (tectorigenin) a čtyři ve směsi s jaterními mikrosomy (tectorigenin, hydrogenovaný tectorigenin, monohydroxylovaný tectorigenin a dihydroxylovaný tectorigenin). S výjimkou tectorigeninu, byly všechny ostatní metabolity tectoridinu uvedeny poprvé. (26)

4.7.3 Ochranné účinky kakkalidu z Flos Puerariae při ethanolom indukované úmrtnosti a při poškození jater, jsou závislé na jeho biotransformaci lidskou střevní mikroflórou

Pueraria lobata (Willd.) Ohwi – Puerarie laločnatá, známá pod názvem Kudzu

čeleď: Fabaceae – bobovité (27)

původ: převážně východní Asie, Čína

charakteristika: popínavá bylina (28)

Kakkalid, který byl izolován z Flos Puerariae, tedy květu puerarie laločnaté, byl inkubován s mikroflórou z lidské stolice a metabolizován na irisolidon přes kakkalidon. Když byl kakkalid (250 mg/kg) podáván orálně potkanům, byl v krvi následně detekován irisolidon, ne však kakkalid. Úmrtnost spojená s ethanolovou léčbou se mírně snížila, když byli potkani intraperitoneálně léčeni kakkalidem. Intraperitoneálně podávaný kakkalid a kakkalidon nesnížily toxicitu alkoholu. Nicméně, orálně podávaný kakkalid a intraperitoneálně podávaný irisolidon významně snížily mortalitu, výrazně snížily aktivity sérové alaninaminotransferázy a aspartátaminotransferázy u ethanolom intoxikovaných myší a dále významně snížily hladinu ethanolu v krvi. Výsledky ukazují, že kakkalid je prekurzorem irisolidonu v oblasti ochrany proti ethanolom indukované letalitě a poškození jater. (29)

4.7.4 Metabolismus a vylučování kakkalidu a jeho metabolitů v moči, žluči a výkalů potkanů, stanovené pomocí HPLC/UV a LC/MS/MS

Tato studie zkoumala metabolismus kakkalidu (irisolidon-7-xylosylglukosid), hlavního isoflavonu nalezeného v extraktu z *Pueraria lobata*, v potkaní moči, žluči a stolici. Za použití metody HPLC/UV nebo LC/MS/MS bylo po orálním podání kakkalidu identifikováno sedm metabolitů v moči potkanů - tectorigenin-7-*O*-glukuronid, tectorigenin-7-*O*-sulfát, tectorigenin-4'-*O*-sulfát, 6-OH biochanin A-glukuronid, irisolidon-7-*O*-glukuronid, tectorigenin a irisolidon. Kromě toho, irisolidon-7-*O*-glukuronid byl nalezen ve žluči a irisolidon a kakkalid byly nalezeny ve výkalech. Byla vyvinuta HPLC/UV metoda pro simultánní kvantifikaci všech metabolitů

a kakkalidu v moči, žluči, a stolici pomocí daidzeinu nebo apigeninu jako vnitřních standardů. Za 72 h bylo vyloučeno $13,2 \pm 2,8$ % kakkalidu jakožto sedm metabolitů v moči. Ve stejném časovém období, vylučování irisolidon-7-*O*-glukuronidu žlučí představovalo $3,8 \pm 1,1$ % dávky, zatímco kakkalid a irisolidon vylučované ve výkalech představovaly $2,1 \pm 0,7$ % a $0,7 \pm 0,1$ % dávky. Výsledky ukazují, že moč je primární cestou vylučování kakkalidu *in vivo* a že rozsáhlý metabolismus může být jedním z důvodů nízké biologické dostupnosti kakkalidu.(30)

5. DISKUSE

Ze získané literatury, obsahující široké spektrum poznatků o isoflavonoidech, můžeme dospět k závěru, že tyto přírodní látky jsou prospěšné pro lidský organismus. Jedná se o fytoestrogenní látky, vyskytující se v rostlinné říši. Mají estrogenní a antibakteriální účinky, nacházejí využití při prevenci nádorových a kardiovaskulárních onemocnění, při léčbě osteoporózy, při zmírnění menopauzálních symptomů, mohou mít pozitivní účinky při léčbě diabetu mellitu 2. typu a rovněž chrání buňky před poškozením DNA, podle dalších provedených studií mají isoflavonoidy i další schopnost, a to redukovat měď a železo. Několik studií ukázalo, že antiproliferativní účinky isoflavonoidů byly podporovány volnými kovy nebo jejich komplexy s kovy a byla za ně zejména zodpovědná redukce mědi. To by mohlo potvrzovat výskyt vyššího množství mědi u nádorových buněk. Normální buňky na tom byly zcela opačně a méně citlivé nebo necitlivé na antiproliferativní účinek isoflavonoidů. Obecně platí, že nízká perorální biologická dostupnost nemetabolizovaných isoflavonoidů představuje hlavní nevýhodu možného využití flavonoidů pro mnohé léčebné účely, ale není to omezením při terapii rakoviny.

Další klinicky zajímavý aspekt může představovat vliv isoflavonoidů na vstřebávání mědi a železa z gastrointestinálního traktu. Údaje o této záležitosti týkající se isoflavonoidů v současné době nejsou k dispozici. Za předpokladu, že měď je přítomna v Cu^{2+} formě při fyziologickém pH a za přítomnosti kyslíku a mědi je transportována v redukované formě, například prostřednictvím hCTR1, musí být měď před absorpcí redukována ve střevě. Mohly by za to být zodpovědné potravinové komponenty nebo účinky metaloreduktáz. Kromě toho bylo prokázáno, že vitamin C zlepšoval vstřebávání mědi. Možný mechanismus může být spojen s redukcí mědi. Ale je známo, že vitamin C redukuje stejně i železo. Proto může být několik isoflavonoidů, které jsou schopny redukovat měď bez významného vlivu na železo, považováno za užitečné nástroje při experimentech zaměřených na porozumění absorpci mědi. Tento problém vyžaduje složité *in vitro* / *ex vivo* a *in vivo* postupy ke skutečnému potvrzení nebo vyvrácení a budou analyzovány v dalším studiu (31). Vyskytují se především v čeledi Fabaceae, dále ale i Rosaceae nebo Iridaceae. V literatuře použité v této práci byly isoflavonoidy nejčastěji spojovány se sójou luštinatou (*Glycine max* (L.) Merr). Příjem sóji se zdá být perspektivním řešením různých onemocnění, pro její pozitivní účinky na zdraví. Mimo výše uvedených vlastností se sója podílí i na snižování krevního tlaku. V pokusu prováděném u žen v menopauze došlo po podání sóji k výraznému poklesu systolického i diastolického tlaku u žen jak s vysokým, tak s normálním krevním tlakem (32). Podařilo se získat informace o již známých isoflavonoidech jako je daidzein a genistein, biochanin A, formononetin, calycosin, ale i o těch

méně známých, jako je např. prunetin, puerarin, cladrin, tectorigenin a kakkalid. Rovněž se podařilo získat určité informace o jejich metabolitech, kterými jsou equol a O-desmethylangolensin.

U každého z těchto jmenovaných isoflavonoidů jsem se pokusila získat informace o jejich metabolismu a účincích těchto látek v organismu. Bohužel některé z isoflavonoidů stále ještě nejsou blíže prozkoumány, ve smyslu klinických studií. U mnoha z nich došlo k testování pouze na laboratorních potkanech, či myších, ale bližší zkoumání – tedy i na lidech, jsou do budoucna ještě jistě zapotřebí.

Isoflavonoidy mají strukturu podobnou estradiolu. Díky tomu se mohou vázat na estrogenové receptory a snižovat tím riziko výskytu rakoviny dělohy, či prsu u žen. Ve studii (Shu et al. 2001; Wu et al. 2002) bylo zjištěno, že pokud ženy v dětství, pubertě a mladé dospělosti konzumují sóju, velmi pravděpodobně tím sníží riziko vzniku rakoviny. U dětí může docházet k intoleranci lidského či kravského mléka, v době kojení. I zde se nahrazení sójovým mlékem zdá být optimální a nutričně kompletní.

Příjem sóji může ale rovněž způsobit nežádoucí účinky. Sója je sice běžnou potravinou, za určitých okolností může způsobit alergické reakce, projevující se například svěděním, kopřivkou, vyrážkou, průjmem, dušností, pocením a zřídka i anafylaxí (32). V práci jsem se ale zmínila i o dalších rostlinách, jako je například *Pueraria lobata*, která obsahuje kakkalid, uplatňující se při ochraně hepatocytů před poškozením ethanolem, dále například látku puerarin, která se používá při ischemické mrtvici s intravenózním podáním (33), či *Astragalus membranaceus*, obsahující například významné isoflavonoidy jako calycosin a formononetin. *A. membranaceus* se používá při běžném nachlazení, infekcích horních cest dýchacích, alergických rýmách, prasečí chřipce, na posílení a regulaci imunitního systému, fibromyalgii, anémii a HIV/AIDS. Orálně se také používá při chronickém únavovém syndromu (CFS), chronické nefritidě, diabetu, jako antibakteriální, antivirové tonikum, při ochraně jater, má protizánětlivé účinky, uplatňuje se jako antioxidant, jako diuretikum, vazodilatační a jako hypotenzivní činidlo. Aktuálně se *A. membranaceus* používá jako vazodilatans a k urychlení hojení (33).

Podařilo se tedy naplnit cíl a získat přehled o metabolismu vybraných isoflavonoidů, o mechanismu některých účinků a o jejich celkovém vlivu na organismus.

6. ZÁVĚR

Hlavním cílem mé práce bylo shromáždit poznatky a výsledky dosud provedených výzkumů současné odborné literatury o metabolismu a působení isoflavonoidů v lidském organismu. V tomto směru pokládám výsledek své práce za víceméně úspěšný. Není možné shromáždit veškeré dostupné informace o isoflavonoidech a jejich působení jednak z časových důvodů a jednak proto, že klinických studií, kde byly účinky a metabolismus isoflavonoidů pozorované přímo v lidském organismu, bylo provedeno dosud jen málo. Převážná většina studií a experimentů byla prováděna v *in vitro* podmínkách a *in vivo* pouze na laboratorních zvířatech – a to především potkanech a myších.

Jelikož jsou isoflavonoidy zdraví prospěšné látky, stávají se stále diskutovanějším tématem. Lidé mohou některá civilizační onemocnění (např. diabetes mellitus 2. typu, ateroskleróza a jiná kardiovaskulární onemocnění), či faktory podílející se na těchto onemocněních, ovlivnit i stravou - isoflavonoidy jsou dostupné například v luštěninách a dalších rostlinách z čeledi Fabaceae, ze kterých je nutno vyzdvihnout především sóju (*Glycine max*). Isoflavonoidy se tedy staly předmětem velkého počtu výzkumů, a proto nebylo možné všechny experimenty zabývající se touto problematikou zachytit.

Isoflavonoidy vykazují především estrogenní účinky, dále pak antibakteriální, antikancerogenní, hrají významnou roli v léčbě osteoporózy a při léčbě příznaků menopauzy.

Podařilo se tedy vybrat do diplomové práce nejvýznamnější zástupce isoflavonoidů patřící zároveň k nejznámějším a jejich metabolity. U těchto látek jsem také shrnula jejich nejvýznamnější účinky.

Jak jsem zmínila, bylo klinických studií provedeno jen málo, a proto je důležité provést další studie a experimenty, především v lidském organismu, aby bylo možné lépe a více využít potenciální příznivý vliv látek, jako jsou isoflavonoidy.

7. ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Kandidát: Bc. Pavlína Šramarová

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Jana Karlíčková, Ph.D.

Název práce 2015/2016: Metabolismus isoflavonoidů v lidském organismu, s. 54

Isoflavonoidy jsou podskupinou flavonoidů, patřící mezi fytoestrogenní látky, které se vyskytují především v čeledi bobovitých, zejména v sóje luštinaté (*Glycine max* (L.) Merr). Mají pozitivní vliv na lidské zdraví především pro své estrogenní účinky, díky kterým se uplatňují v boji proti osteoporóze, kardiovaskulárním onemocněním, ateroskleróze i při zmírnění příznaků menopauzy. Dále vykazují antibakteriální účinky a chrání buňky před poškozením DNA. Tato diplomová práce se zabývá jejich metabolismem a působením v lidském a zvířecím organismu, vlivem střevní mikroflóry na přeměnu těchto isoflavonoidů na metabolity a rovněž i účinky těchto metabolitů. V práci jsou zmíněny tyto isoflavonoidy: daidzein, genistein, biochanin A, formononetin, calycosin, prunetin, puerarin, cladrin, tectorigenin a kakkalid.

Klíčová slova: isoflavonoidy, metabolismus, lidský organismus

8. ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany and Ecology

Candidate: Bc. Pavlína Šramarová

Diploma thesis supervisor: PharmDr. Jana Karlíčková, Ph.D.

Title of thesis 2015/2016: Metabolism of isoflavonoids in human organism, pp. 54

Isoflavonoids are subgroup of flavonoids, belonging to the phytoestrogenic compounds. These compounds occur especially in leguminous, mainly in soya (*Glycine max* (L.) Merr). They have a positive impact on human health, especially for its estrogenic effects, due to which are applied in the fight against osteoporosis, cardiovascular diseases, atherosclerosis and for moderation of menopausal symptoms. Furthermore they exhibit antibacterial activity and protect cells against damage of DNA. This thesis deals with their metabolism and action in human and animal organism, also with the influence of intestinal microflora to transform these isoflavonoids into metabolites, as well as the effects of these metabolites. There are also mentioned these isoflavonoids: daidzein, genistein, biochanin A, formononetin, calycosin, prunetin, puerarin, cladrin, tectorigenin and kakkalid.

Key words: isoflavonoids, metabolism, human organism

9. POUŽITÉ ZKRATKY

Zkratka	anglický význam	český význam
ADME	absorption, distribution metabolism, excretion	absorpce, distribuce, metabolismus, exkrece
ATTC	American type culture collection	Americká kolekce typových kultur
AUC	area under the curve	plocha pod křivkou
BCRP	breast cancer resistance protein	protein proti rakovině prsu
CCM	Czech collection of microorganisms	Česká sbírka mikroorganismů
CFS	chronic fatigue syndrome	chronický únavový syndrom
CoA	coenzyme A	koenzym A
COMT	catechol- <i>O</i> -methyltransferase	katechol- <i>O</i> -methyltransferáza
COX-2	cyclooxygenase-2	cyklooxygenáza-2
CTx	C-terminal telopeptide	C-terminální telopeptid kolagenu typu I
DE	daidzein	daidzein
DOB	deoxybenzoin	deoxybenzoin
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl	1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl
EMRSA	epidemic MRSA	epidemický MRSA
EQ	equol	equol
ERK	extracellular signal-regulated kinases	proteinkináza regulovaná extracelulárním signálem
ERSA	erythromycin – resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	erythromycin – rezistentní SA
ERY	erythromycin	erythromycin
ER α	estrogen receptor α	estrogenový receptor α
ER β	estrogen receptor β	estrogenový receptor β
GC	gas chromatography	plynová chromatografie
GC-MS	gas chromatography–mass spectrometry	plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
GE	genistein	genistein
GF	germ-free	bezmikrobní
GLYE	glycitein	glycitein
HB	hydroxyl benzene	hydroxybenzen
hCTR1	human copper transporter 1	lidský transportér mědi 1
HFA	human flora associated	kolonizovaný lidskou flórou
HPLC	high-performance liquid chromatography	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IF	isoflavone aglycone	aglykon isoflavonoidu
IF - C	isoflavone conjugate	isoflavonoidový konjugát
IF - Gly	isoflavone glycoside	glykosid isoflavonoidu
IF - H	reduced isoflavone	redukovaný isoflavonoid

IF - O	oxidized isoflavone	oxidovaný isoflavonoid
IFLs	isoflavonoids	isoflavonoidy
LC	liquid chromatography	kapalinová chromatografie
LC-MS	Liquid chromatography– mass spectrometry	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
LPH	lactase phlorizin hydrolase	laktáza-phlorizin hydroláza
MDR	multidrug resistant	mnohočetná léková rezistence
MIC	minimal inhibitory concentration	minimální inhibiční koncentrace
MRP	multidrug resistance protein	protein pro lékovou rezistenci
MRSA	methicillin - resistant SA	methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	mass spectrometry	hmotnostní spektrometrie
MSSA	methicillin – sensitive SA	methicilin-senzitivní SA
O-DMA	<i>O</i> -desmethylangolensin	<i>O</i> -desmethylangolensin
OVx	ovariectomized	ovariektomizované
OXA	oxacillin	oxacilin
PA	propionic acid	kyselina propionová
PINP	procollagen type I N-terminal propeptide	N-terminální peptid prokolagenu I
PTH	parathormon	parathormon
RIA	radioimmunoassay	radioimunoanalýza
SAR	structure - activity relationship	vztah mezi strukturou a aktivitou
SGLT	sodium-glucose co- transporter	sodíko-glukózový kotransportér
SULT	sulfotransferase	sulfotransferáza
TET	tetracycline	tetracyklin
TRSA	tetracyclin-resistant SA	tetracyklin-rezistentní SA
TSH	thyroid-stimulating hormone	thyreotropní hormon
UGT	UDP-glucuronosyltransferase	UDP-glukuronyltransferáza
VAN	vancomycin	vankomycin

10. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Přehled testovaných látek	18
Tabulka 2: <i>In vitro</i> protistafylokokový účinek demethyltexasinu	21

10.1 Zdroje:

Tabulka 1: HUMMELOVA, J., RONDEVALDOVA J., BALASTIKOVA A., LAPCIK O., KOKOSKA L. The relationship between structure and in vitro antibacterial activity of selected isoflavones and their metabolites with special focus on antistaphylococcal effect of demethyltexasin. *Letters in Applied Microbiology*. 2015, 60(3): 243.

Tabulka 2: HUMMELOVA, J., RONDEVALDOVA J., BALASTIKOVA A., LAPCIK O., KOKOSKA L. The relationship between structure and in vitro antibacterial activity of selected isoflavones and their metabolites with special focus on antistaphylococcal effect of demethyltexasin. *Letters in Applied Microbiology*. 2015, 60(3): 245.

11. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Strukturní vzorce isoflavonoidů.....	9
Obrázek 2: Hlavní typy isoflavonoidů a interkonverzí	11
Obrázek 3: Osud isoflavonoidů z potravy v lidském těle.	14
Obrázek 4: Metabolismus genisteinu a daidzeinu střevní mikroflórou	26
Obrázek 5: Glukuronidace calycosinu	36

11.1 Zdroje:

Obrázek 1: WANG, C., PRASAIN J. K., BARNES S.. Review of the methods used in the determination of phytoestrogens. *Journal of Chromatography*. 2002; 777: 7.

REYNAUD, J., GUILLET D., TERREUX R., LUSSIGNOL M., WALCHSHOFER N. Isoflavonoids in non-leguminous families: an update. *Natural Product Reports*. 2005; 22: 505.

Obrázek 2: BRUNETON, J. *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal plants*. 2nd Ed., 1999. Paris: Lavoisier Publishing Ing.; Hampshire, England: Intercept Ltd. ISBN 2-7430-0316-2. 348.

Obrázek 3: CHANDRASEKHARAN, A. A. Pharmacokinetics of Dietary Isoflavones. *Steroids & Hormon Science*. 2013; 12: 5.

Obrázek 4: CHANDRASEKHARAN, A. A. Pharmacokinetics of Dietary Isoflavones. *Steroids & Hormon Science*. 2013; 12: 3.

Obrázek 5: RUAN, J.; YAN R. Regioselective glucuronidation of the isoflavone calycosin by human liver microsomes and recombinant human UDP-glucuronosyltransferases. *Chemico-Biological Interactions*. 2014; 220: 240.

Pozn.: Obrázky 1, 2, 4, a 5 byly nakresleny za pomoci programu ACD/ChemSketch dle uvedených zdrojů.

12. POUŽITÁ LITERATURA

- (1) DIXON, R. A., PASINETTI G. M. Flavonoids and Isoflavonoids: From Plant Biology to Agriculture and Neuroscience. *Plant Physiology*. 2010; 154(2): 453-457.
- (2) SHARMA, V., RAMAWAT K. G. Isoflavonoids. *Natural Products*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013; 1849-1865.
- (3) BRUNETON, J. *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal plants*. 2. vydání, 1999. Paris: Lavoisier Publishing Ing.; Hampshire, England: Intercept Ltd. ISBN 2-7430-0316-2, 347 – 349.
- (4) JAHODÁŘ, L. *Farmakobotanika: semenné rostliny*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2006. ISBN 80-246-1225-9, 258.
- (5) FRANKE, A. A., LAI J. F., HALM B. M. Absorption, distribution, metabolism, and excretion of isoflavonoids after soy intake. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2014; 559: 24-28.
- (6) KOIRALA, N., PANDEY R. M., VAN THANG D., JUNG H. J., SOHNG J. K. Glycosylation and subsequent malonylation of isoflavonoids in E. coli: strain development, production and insights into future metabolic perspectives. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2014; 41(11): 1647-1658.
- (7) HUMMELOVA, J., RONDEVALDOVA J., BALASTIKOVA A., LAPCIK O., KOKOSKA L. The relationship between structure and in vitro antibacterial activity of selected isoflavones and their metabolites with special focus on antistaphylococcal effect of demethyltexasin. *Letters in Applied Microbiology*. 2015; 60(3): 242-247.
- (8) CHANG, Y., CHOUE R. Plasma pharmacokinetics and urinary excretion of isoflavones after ingestion of soy products with different aglycone/glucoside ratios in South Korean women. *Nutrition Research and Practice*. 2013; 7(5): 393-399.
- (9) HAMANN, I., SEIDLOVA-WUTTKE D., WUTTKE W., KÖHRLE J. Effects of isoflavonoids and other plant-derived compounds on the hypothalamus–pituitary–thyroid hormone axis. *Maturitas*. 2006; 55S: 14-25.
- (10) BOWEY, E., ADLERCREUTZ H., ROWLAND H. Metabolism of isoflavones and lignans by the gut microflora: a study in germ-free and human flora associated rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2003; 41.
- (11) CORNWELL, T., COHICK W., RASKIN I. Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry*. 2004; 65: 997-998.

- (12) HEINONEN, S-M., HOIKKALA A., WÄHÄLÄ K., ADLERCREUTZ H.. Metabolism of the soy isoflavones daidzein, genistein and glycitein in human subjects. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2003; 87(4-5): 285-299.
- (13) LAPČÍK, O., HAMPL R., AL-MAHARIK N., SALAKKA A., WÄHÄLÄ K., ADLERCREUTZ H. A novel radioimmunoassay for daidzein. *Steroids*. 1997; 62(3): 315-320.
- (14) HUR, H-G., FATEMEH R. Biotransformation of the isoflavonoids biochanin A, formononetin, and glycitein by *Eubacterium limosum*. *FEMS Microbiology Letters*. 2000; 192(1): 21-25.
- (15) TOLLESON, W. H., DOERGE D. R., CHURCHWELL M. I., MARQUES M. M., ROBERTS D. W. Metabolism of Biochanin A and Formononetin by Human Liver Microsomes in Vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002; 50(17): 4783-4790.
- (16) Český Lékopis 2009, Doplněk 2011, Grada Publishing a.s., ISBN 978-80-247-3785-0, 5813.
- (17) XU, F., ZHANG Y., XIAO S., LU X., YANG D., YANG X., LI C., SHANG M., TU P. Absorption and metabolism of Astragali Radix decoction: in silico, in vitro and a case study in vivo. *Drug Metabolism and Disposition*. 2006; 34(6): 913-924.
- (18) LE, Z., ZHAO XL., DI L. 2014. Absorption and transportation of calycosin in Astragali Radix by using Caco-2 monolayer model. *China Journal of Chinese Materia Medica*. 39(9): 1709.
- (19) RUAN, J-Q., YAN R. Regioselective glucuronidation of the isoflavone calycosin by human liver microsomes and recombinant human UDP-glucuronosyltransferases. *Chemico-Biological Interactions*. 2014; 220: 231-240.
- (20) JOSEPH, T. B., WANG W. J. S., LIU X., KULKARNI K. H., WANG J., XU H., HU M. Disposition of Flavonoids via Enteric Recycling: Enzyme Stability Affects Characterization of Prunetin Glucuronidation across Species, Organs, and UGT Isoforms. *Molecular Pharmaceutics*. 2007; 4(6): 883-894.
- (21) LIU, A., ZHAO L., LOU H. Pre-treatment with puerarin affects pharmacokinetics of warfarin, but not clopidogrel, in experimental rats. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 2015; 13(4): 257-263.
- (22) ANDLAUER, W., KOLB J., FÜRST P. Absorption and metabolism of genistin in the isolated rat small intestine. *FEBS Letters*. 2000; 475: 127-130.
- (23) KHAN, K., SHARAN K., SWARNKAR G., et al. Positive skeletal effects of cladrin, a naturally occurring dimethoxydaidzein, in osteopenic rats that were maintained after treatment discontinuation. *Osteoporosis International*. 2013; 24(4): 1455-1470.

- (24) MANICKAVASAGAM, L., GUPTA S., MISHRA S., MAURYA R., CHATTOPADHYAY N., JAIN G. K. LC-MS/MS method for simultaneous analysis of cladrin and equol in rat plasma and its application in pharmacokinetics study of cladrin. *Medicinal Chemistry Research*. 2011; 20: 1566–1572.
- (25) KANG, K. A., LEE K. H., CHAE S., et al. Cytoprotective effect of tectorigenin, a metabolite formed by transformation of tectoridin by intestinal microflora, on oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *European Journal of Pharmacology*. 2005; 519: 16-23.
- (26) CHEN, Y., SONG W., PENG Z. H., GE B. Y., HAN F. M. Identification of metabolites of tectoridin in-vivo and in-vitro by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2008; 60(6): 709-716.
- (27) Český Lékopis 2009, Doplněk 2012, Grada Publishing a.s., ISBN 978-80-247-4242-7: 7329.
- (28) DELIN, W., TULIN M. Pueraria. In: *Flora of China* [online]. [cit. 2016-04-06]. Dostupné z: http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=127620
- (29) HAN, Y-O., HAN M. J., PARK S., KIM D. Protective Effects of Kakkalide From Flos Puerariae on Ethanol-Induced Lethality and Hepatic Injury Are Dependent on Its Biotransformation by Human Intestinal Microflora. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2003; 93(3): 331-336.
- (30) WANG, H., BAI X., SUN J., KANO Y., MAKINO T., YUAN D. Metabolism and Excretion of Kakkalide and Its Metabolites in Rat Urine, Bile, and Feces as Determined by HPLC/UV and LC/MS/MS. *Planta Medica*. 2013; 79(16): 1552-1557.
- (31) KARLÍČKOVÁ, J., MACÁKOVÁ K., ŘÍHA M., PINHEIRO L. M. T., FILIPSKÝ T., HORŇASOVÁ V., HRDINA R., MLADĚNKA P. Isoflavones Reduce Copper with Minimal Impact on Iron In Vitro. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015; 2015: 1-11.
- (32) PREEDY, V. R., WATSON, E. R., PATEL V. B. *Nuts & Seed in Health and Disease Prevention*. 1st ed. Burlington, MA: Academic Press, 2011. ISBN 01-237-5688-X, 1068-1070.
- (33) *Natural Medicines Comprehensive Database: Unbiased, Scientific Clinical Information on Complementary, Alternative, and Integrative Therapies* [online]. [cit. 2016-04-7]. Dostupné z: <http://naturaldatabase.therapeuticresearch.com/>