

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality a bezpečnosti potravin



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

Vliv daidzeinu na metabolom stolice

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Kristína Hrubá

Obor studia: Výživa a potravin

Vedoucí práce: Ing. Veronika Jarošová, Ph.D.

Konzultant: Ing. Kateřina Tomisová

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv daidzeinu na metabolismus stolice" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14.04.2022

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí diplomové práce Ing. Veronice Jarošové, Ph.D. a konzultantce Ing. Kateřině Tomisové za odborné vedení mé práce, podnětné rady, podporu, velkou trpělivost a ochotu při všech poskytnutých konzultacích. Zároveň bych tímto chtěla vyjádřit poděkování všem respondentům, za jejich přínos pro výzkumnou část této práce.

Vliv daidzeinu na metabolom stolice

Souhrn

Daidzein je přírodní izoflavon s fytoestrogenním účinkem, vyskytující se zejména v sóje, sójových výrobcích, fazolích či hrachu. Na obsahu daidzeinu v přijímané potravě má tedy značný vliv stravovací kultura. Zatímco asijská a vegetariánská strava může poskytovat až 100 mg izoflavonů denně, západní styl stravování dodává konzumentovi pouze 0,2–1,5 mg izoflavonů. Mezi látky s nejsilnějším fytoestrogenním účinkem se řadí metabolit daidzeinu – equol. Equol je v západní populaci schopno produkovat pouze 20–30 % obyvatel, zatímco v Asii je to až 60 %. Tito jedinci jsou označováni jako producenti equolu. Mají specifickou střevní mikrobiotu, která je schopna tento fytoestrogen metabolizovat. Četnost producentů equolu je u vegetariánů oproti běžným konzumentům opět významně vyšší, z čehož lze usoudit, že složky stravy jako je vláknina a rostlinné bílkoviny mohou syntézu equolu podporovat. Mnohé studie již potvrdily pozitivní účinek daidzeinu a equolu na kardiovaskulární onemocnění, diabetes, osteoporózu, stárnutí pokožky, či některé typy rakoviny. Rovněž jsou tyto fytoestrogeny významným přírodním antioxidantem a vykazují protizánětlivou a neuroprotektivní aktivitu.

Cílem této diplomové práce bylo zpracovat literární rešerši na téma daidzein a jeho osud v trávicím traktu člověka, přičemž praktická část práce si kladla za úkol stanovit hlavní katabolity daidzeinu v modelu tlustého střeva a popsat jejich vliv na metabolom stolice dárců. Vzorky stolice byly získány celkem od 20 osob, které se dělily do dvou skupin. Skupina A sestávala z 10 dárců do 45 let věku a skupinu B tvořilo rovněž 10 dárců nad 70 let. Tyto vzorky byly jako fekální inokulum ošetřeny daidzeinem, fermentovány pomocí fermentačního systému *in vitro* a následně byly po 0, 2, 4, 8 a 24 hodinách odebrány a podrobeny NMR analýze. U skupiny A se daidzein nevyskytoval v žádném čase, avšak u skupiny B dosahoval koncentrací téměř 3 mg/ dl. Metabolit daidzeinu equol nebyl detekován u žádného z dárců. Tato skutečnost mohla poukazovat na velice rychlý metabolismus dárců ze skupiny A a na fakt, že nikdo z dárců nebyl producentem equolu. Druhou možností mohla být nedostatečná citlivost NMR analýzy. Vzhledem k tomu by bylo vhodné provést experiment v budoucnu znovu za použití kapalinové chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (LC/MS), která vykazuje lepší citlivost v profilování metabolitů. Dále byl zkoumán vliv daidzeinu na metabolismus dalších významných látek. Daidzein ve vzorcích snižoval celkovou hladinu SCFA, a to zejména u dárců ze skupiny B. Dále zvyšoval koncentrace glukózy a etanolu. Tyto rozdíly koncentrací pravděpodobně souvisely se změnou střevní mikrobioty ovlivněnou daidzeinem, což vedlo ke změnám v metabolismu některých látek. Daidzein a equol, jakožto jedny z nejvýznamnějších fytoestrogenů s potenciálním léčebným účinkem, by měli být s ohledem na věkové skupiny předmětem dalšího zkoumání.

Klíčová slova: Daidzein, metabolismus, mikrobiota, tlusté střevo, trávení

Effect of daidzein on the stool metabolome

Summary

Daidzein is a natural isoflavone with a phytoestrogenic effect. It is mainly found in soy, soy products, beans or peas. Dietary culture therefore has a significant influence on the daidzein content of the food intake. While Asian and vegetarian diets can provide up to 100 mg of isoflavones per day, the Western dietary style provides only 0.2–1.5 mg of isoflavones to the consumer. Among the substances with the strongest phytoestrogenic effect is the daidzein metabolite equol. Only 20–30 % of the Western population is able to produce equol, whereas in Asia it reaches as high as 60 %. These individuals are referred to as equol producers. They have a specific intestinal microbiota that are able to metabolize this phytoestrogen. As mentioned above, the frequency of equol producers is significantly higher in vegetarians compared to omnivores, suggesting that dietary components such as dietary fiber and plant proteins may promote equol synthesis. Many studies have already confirmed the beneficial effect of daidzein and equol on cardiovascular diseases, diabetes, osteoporosis, skin ageing and different types of cancer. These phytoestrogens are also important natural antioxidants and have both anti-inflammatory and neuroprotective activity.

The aim of this thesis was to conduct a literature research on daidzein and its metabolic pathway in the human digestive tract, while the practical part of the work aimed to determine the main catabolites of daidzein in the colon model and to describe their influence on the donor stool metabolome. Stool samples were obtained from a total of 20 individuals, divided into two groups. Group A consisted of 10 donors under 45 years of age and group B also consisted of 10 donors over 70 years of age. These samples were treated with daidzein as faecal inoculum, fermented by in vitro fermentation system and then collected after 0, 2, 4, 8 and 24 hours and subjected to NMR analysis. In group A, daidzein was not present at any time point, whereas in group B it reached concentrations of almost 3 mg/ dL, and the daidzein metabolite equol was not detected in any of the donors. This fact could point to a rapid metabolism of the donors from group A and the fact that none of the donors were equol producers. A second possibility could be the lack of sensitivity of the NMR analysis. In view of this, it would be advisable to perform the experiment again in the future using liquid chromatography combined with mass spectrometry (LC/MS), which shows better sensitivity in metabolite profiling. Furthermore, the effect of daidzein on the metabolism of other important substances was investigated. Daidzein decreased the total SCFA level in the samples, especially in the donor group B. It also increased glucose and ethanol concentrations. These changes in concentrations are probably related to the change in gut microbiota affected by daidzein, which led to changes in the metabolism of some substances. Daidzein and equol, as some of the most important phytoestrogens with potential therapeutic effects, should be further investigated with regard to age groups.

Keywords: Daidzein, metabolism, microbiota, colon, digestion

Obsah

1 Úvod	8
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	9
3 Literární přehled.....	10
3.1 Izoflavony.....	10
3.2 Daidzein.....	10
3.3 Osud daidzeinu v těle člověka	12
3.3.1 Metabolizmus daidzeinu	12
3.3.2 Equol.....	13
3.3.3 <i>O</i> -desmethylangolensin	16
3.4 Význam daidzeinu pro lidský organismus	18
3.4.1 Hormonální účinek fytoestrogenů	18
3.4.2 Antioxidační aktivita	19
3.4.3 Rakovina	21
3.4.4 Kardiovaskulární onemocnění	22
3.4.5 Osteoporóza	24
3.4.6 Diabetes	25
3.4.7 Stárnutí pokožky	26
3.4.8 Protizánětlivá aktivita	27
3.4.9 Neuroprotektivní aktivita.....	28
3.5 Fermentační modely	29
3.6 Luminální modely střeva.....	30
3.6.1 Dávkové modely fermentace	30
3.6.2 Modely kontinuální fermentace	30
3.6.3 Umělé trávicí systémy	31
4 Metodika	32
4.1 Chemikálie	32
4.2 Fermentační médium	32
4.3 Redukční činidlo.....	32
4.4 Zásobní a pracovní roztok daidzeinu	32
4.5 Fekální inokulum	32
4.6 Příprava 96-jamkových deep-well destiček	33
4.7 Inkubace <i>in vitro</i>	33
4.8 Příprava vzorků pro NMR analýzu	34
4.9 NMR analýza	34
4.10 Statistické analýzy	34

5	Výsledky	35
6	Diskuze	38
7	Závěr.....	42
8	Literatura.....	43

1 Úvod

Moderní způsob života ve 21. století s sebou přináší celou řadu výhod. Avšak daní za toto pohodlí je neustálý spěch, stres, honba za úspěchem, znečištěné životní prostředí či konzumace nekvalitních potravin. Všechny tyto faktory mohou mít společný důsledek, kterým je civilizační onemocnění. Tato neinfekční onemocnění úzce souvisí se životním stylem, zejména s nedostatkem pohybové aktivity, nezdravým stravováním, konzumací alkoholu či s kouřením. Mezi nemoce, jejichž incidence se zvyšuje s tím, jak se země stávají vyspělejšími a jejich obyvatelé se dožívají delšího věku, patří například Alzheimerova choroba, ateroskleróza, diabetes mellitus 2. typu, hypertenze, jaterní cirhóza, srdečně cévní onemocnění či nádorová onemocnění (Kopp, 2019; Carrera-Bastos *et al.*, 2011). Vzhledem ke stále zvyšujícímu se výskytu těchto onemocnění se dostává v posledních letech do popředí trend zdravé životosprávy a zejména tedy zdravého stravování. Jelikož značnou část prevence proti výše zmíněným civilizačním onemocněním sehraje právě zdravá a vyvážená strava, rozmohla se na trhu propagace tzv. funkčních potravin a superpotravin. Výraz superpotravina se stal aktuálně často používaným moderním slovem, které vyjadřuje vzhled mezi potravinou a zdravím. Superpotraviny jsou charakterizovány jako potraviny bohaté na vitamíny, minerály, vlákninu, antioxidanty či enzymy, ke kterým se řadí celá řada potravin od exotického ovoce až po luštěniny typu fazole, čočka či sója (Wolfe, 2009). V České republice ani v Evropské unii však pojem „superpotravina“ není nijak legislativně definován a je proto důležité rozlišit skutečnost od reklamních triků. Obdobně jsou na tom funkční potraviny, s nimiž ale už souvisí řada předpisů. Funkční potraviny se konzumují jako součást běžné stravy a mají vědecky podložený příznivý účinek na lidské zdraví. Potravina s přívlastkem funkční musí také splňovat základní podmínky, mezi které se řadí posilování imunity, prevence proti nemocem, příznivé ovlivnění fyzického a duševního stavu či zpomalení procesu stárnutí (Kubcová Beránková, 2009). Mezi hlavní složky funkčních potravin patří především probiotika, prebiotika, vitamíny a antioxidanty. Tyto složky obsahuje opět celá řada potravin, jimiž jsou například zakysané mléčné výrobky, výrobky s přídavkem vlákniny nebo fermentované sójové výrobky. Zdravý jídelníček by měl zachovávat příznivý poměr tuků, sacharidů, bílkovin, vlákniny a dalších živin. Dodržováním doporučeného množství a složení stravy může populace zásadním způsobem přispět ke zlepšení svého zdravotního stavu a snížit tak riziko manifestace některých závažných chorob. Doporučení odborných společností jsou velmi dobře dostupná nejen na internetu, ve specializovaných centrech, ale i v ordinacích praktických lékařů. Je však také jisté, že česká společnost nefarmakologickému ovlivnění chorobných stavů a jejich prevenci stále nevěnuje dostatečnou pozornost (Adámková, 2011).

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem teoretické části diplomové práce bylo zpracování literární rešerše zaměřené na daidzein a osud fenolových sloučenin v trávicím traktu člověka. Cílem praktické části bylo stanovit hlavní katabolity daidzeinu v modelu tlustého střeva s využitím stolice dárců ze dvou věkových skupin (do 45 let a 70 let a více).

Hypotézy:

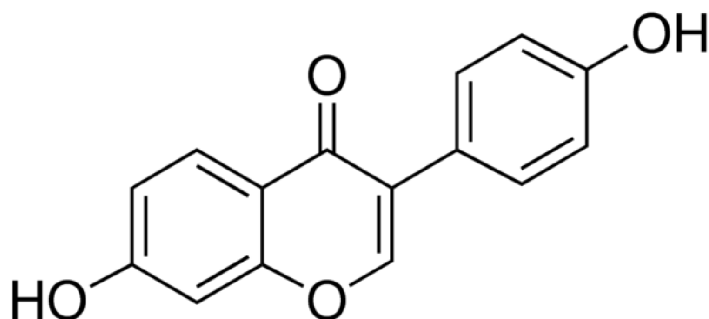
- 1) Daidzein je mikrobiálně transformován mikrobiotou tlustého střeva.
- 2) Katabolity daidzeinu se mezi dvěma sledovanými věkovými skupinami liší.

3 Literární přehled

3.1 Izoflavony

Izoflavony jsou rostlinné metabolity s polyfenolickou strukturou a antioxidačními vlastnostmi. Nacházejí se většinou v rostlinách patřících do čeledi *Fabeceae*. Hlavním přírodním zdrojem je sója (*Glycine max*), dále jetel červený (*Trifolium pratense*), vojtěška (*Medicago sativa*) a druhy rodu *Genista*, přičemž všechny tyto rostliny mají fototerapeutický a nutraceutický význam (Popa and Rusu, 2017). Obsah izoflavonů v rostlinách se může u stejné odrůdy značně lišit, a to až trojnásobně. Rozdíly v podílu izoflavonů jsou různé dle růstových podmínek, zeměpisných oblastí, stáří rostliny, biotických stresových faktorů (např. škůdci) a abiotických stresových faktorů, jako je teplota, zvlaha nebo stav výživy (Cederroth and Nef, 2009). Izoflavony jsou nejpočetnější skupinou fytoestrogenů, polyfenolických nesteroidních sekundárních rostlinných metabolitů, které mají estrogení vlastnosti. Svou chemickou strukturou jsou podobné lidskému estrogeneru. (Křížová *et al.*, 2019).

Základní strukturní jednotkou izoflavonů jsou dva benzenové kruhy spojené přes heterocyklický pyronový kruh (Rimbach *et al.*, 2008). Jedná se také o žluté pigmenty odvozené od 3-fenylbenzopyronu. V rostlinách se většinou vyskytují jako biologicky neaktivní glykosidy. U sójových izoflavonů jde o genistin, glycitin a daidzin, které jsou následně po požití hydrolyzovány na odpovídající biologicky aktivní aglykony: genistein, glycitein a daidzein (Popa and Rusu, 2017). Přičemž právě daidzein (viz obrázek 1), včetně jeho hlavního metabolitu equolu, se řadí mezi izoflavony s neaktivnějším fytoestrogením účinkem (Kudou *et al.*, 1991).



Obrázek 1 Chemická struktura daidzeinu (7,4-dihydroxyizoflavonu)

Obsah izoflavonů v rostlinách se může u stejné odrůdy značně lišit, a to až trojnásobně. Rozdíly v podílu izoflavonů jsou různé dle růstových podmínek, zeměpisných oblastí, stáří rostliny, biotických stresových faktorů (např. škůdci) a abiotických stresových faktorů, jako je teplota, zvlaha nebo stav výživy (Cederroth and Nef, 2009).

3.2 Daidzein

Daidzein spolu s ostatními izoflavony lze nalézt v luštěninách, ořechích, či některém ovoci, zejména v rybízu a rozinkách. Dále je jeho výskyt možný v kávě a obilovinách, ale nejdůležitějším potravinovým zdrojem daidzeinu jsou sójové boby společně s vedlejšími sójovými výrobky. Sóju lze konzumovat jako sójový texturovaný protein, sójové mléko, sójový

nápoj, či v podobě fermentovaných sójových výrobů. Může být také přidávána do mnoha obohacených potravin od energetických tyčinek, přes cereálie, až po kojeneckou výživu (Bhagwat and Haytowitz, 2015). Isoflavony včetně daidzeinu obsahuje také spousta výživových doplňků, které mohou kompenzovat jejich příjem běžnou stravou (Liggins *et al.*, 2002). Průměrné zastoupení daidzeinu ve vybraných rostlinách a sójových potravinách je znázorněno v Tabulce 1 a 2.

Tabulka 1 Průměrný obsah daidzeinu ve vybraných rostlinách, převzato a upraveno dle (Bhagwat and Haytowitz, 2015).

Rostlina	Obsah daidzeinu mg/100g
Sójové boby (<i>Glycine max</i>) – zralá semena, syrová	61,70
Sójové boby (<i>Glycine max</i>) – zralá semena, vařená	30,76
Fazol obecný (<i>Phaseolus vulgaris</i>) – zralá semena, syrová (za syrova jedovaté)	0,29
Fazole adzuki (<i>Vigna angularis</i>) – zralá semena, syrová	0,36
Fazole černé (<i>Phaseolus vulgaris</i>) – konzervované	5,96
Cizrna (<i>Cicer arietinum</i>) – zralá semena, syrová	0,21
Hrách setý (<i>Pisum sativum</i>) – zralá semena, syrový	0,32

Tabulka 2 Průměrný obsah daidzeinu ve vybraných potravinách, převzato a upraveno dle (Bhagwat and Haytowitz, 2015)

Potravina	Obsah didzeinu mg/100 g
Miso (fermentovaná sójová pasta pocházející z Japonska)	16,43
Natto (fermentované sójové boby pocházející z Japonska)	33,22
Tempeh (fermentovaný sójový dort pocházející z Indonésie)	22,66
Tofu- syrové, připravené se sýranem vápenatým	8,56
Sójový sýr	5,79
Sójová mouka	67,69
Sójový proteinový nápoj	27,98
Sójový jogurt	13,77

Na obsahu daidzeinu v potravě má obzvláště velký vliv stravovací kultura. Asijská a vegetariánská strava poskytuje 20–50 mg izoflavonů denně, ojediněle až 100 mg denně, zatímco styl západního stravování dodává denně konzumentovi pouze přibližně 0,2-1,5 mg isoflavonů (Popa and Rusu, 2017). Rozdíly mezi typem stravy se vztahují k množství isoflavonů v potravinách a také k druhu konzumovaných potravin. V západní stravě dominují pevné zpracované sójové produkty, jako například tofu a také sójové mléko, které obsahuje jak glykosidy (daidzin a genistin, které jsou během zpracování stabilní), tak aglykony. Naopak v asijské stravě se většina sójových produktů získává fermentací. Tyto výrobky obsahují větší množství aglykonů, což zvyšuje jejich biologickou dostupnost (Setchell *et al.*, 2002). Během

fermentačních procesů se v těchto potravinách také tvoří zdravý prospěšná probiotika, jež napomáhají správnému trávení (Kiss *et al.*, 2010).

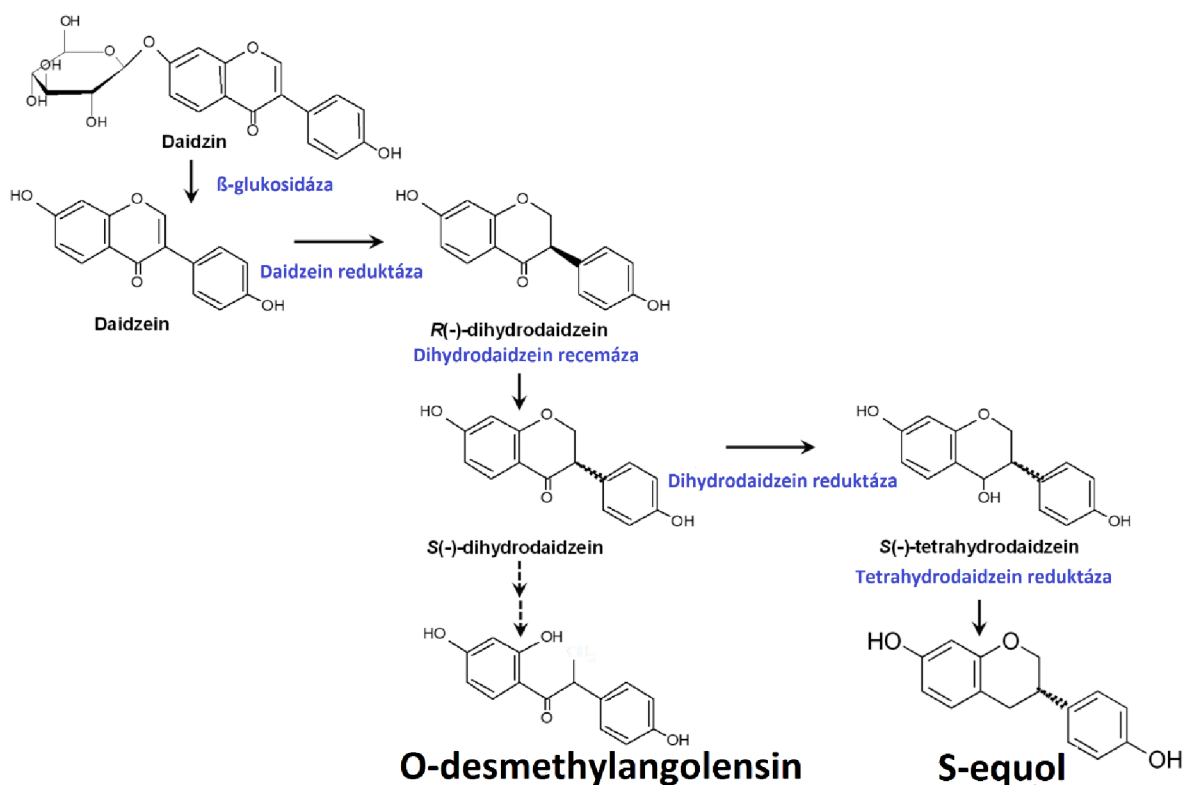
Daidzein a všeobecně i ostatní izoflavony jsou v rostlinách biosyntetizovány prostřednictvím fenylypropanoidové dráhy. Ta začíná z aminokyseliny fenylalaninu, která reaguje s malonylem koenzymem A. Následně vzniká meziprodukt této reakce-nargineninový chalkon, jenž se pomocí tří specifických enzymů převádí až na daidzein. Do doby než rostlina izoflavony použije, dochází k jejich skladování ve vakuolách (Barnes, 2010). Daidzein vykazuje v rostlinách nejvyšší antioxidační aktivitu ze všech fytoestrogenů, čímž je může například chránit před škodlivými účinky slunečního záření. Izoflavony jsou též zodpovědné za nahořklou chuť sójových výrobků (Velíšek, 2009).

3.3 Osud daidzeinu v těle člověka

3.3.1 Metabolismus daidzeinu

Téměř všechny dietní isoflavony jsou v rostlinách přítomny ve formě glykosidů. Daidzin je 7-*O*-glukosid daidzeinu. Glykosidy vykazují vzhledem ke své vyšší hydrofilite a molekulární hmotnosti zhoršenou biologickou dostupnost. Mají také nízkou estogenní aktivitu, jelikož jsou k hydroxylovým skupinám, potřebným k navázání na estrogenový receptor (ER), napojeny sacharidové zbytky. Aby se stal daidzin biologicky aktivním a dostupným, je nutná jeho přeměna na aglykon daidzein (Sosvorová *et al.*, 2011; Yuan *et al.*, 2007). Po požití je daidzin hydrolyzován v tenkém střevu, nejčastěji v jejunu, pomocí glukosidáz produkovaných střevním kartáčovým lemlem a bakteriálních β -glukosidáz (Rafii, 2015). Tímto procesem dojde k uvolnění daidzeinu, který je následně absorbován epitelem trávicího traktu a přechází do krevního oběhu (Sosvorová *et al.*, 2011). Poté co je daidzein vstřebán, může dojít pomocí krevní cirkulace k jeho transportu do jater, kde je konjugován s jaterními enzymy za vzniku sulfátových, glykosilových a glukuronidových forem (Gu *et al.*, 2006). Tyto metabolity jsou následně spolu se žlučí vylučovány zpět do tenkého střeva, což umožňuje jejich opětovnou dekonjugaci a vzniká tak enterohepatální oběh (Rafii, 2015).

Značná část glykosidů však není ani hydrolyzována, ani vstřebávána a postupuje spolu s produkty jaterního oběhu do tlustého střeva, kde jsou glykosylované, sulfátové a glukuronidové formy daidzeinu opět dekonjugovány bakteriálními enzymy a poté absorbovány nebo podrobeny dalšímu metabolismu střevní mikroflórou. Ta redukuje aglykony daidzeinu na *O*-desmethylangolensin (*O*-DMA) a equol (viz obrázek 2). Mimo to vznikají také dyhydrodaidzein, tetrahydrodaidzein, 3'-hydroxy-daidzein, 6-hydroxy-daidzein, 8-hydroxy-daidzein, 3-(4-hydroxyfenyl)-benzopyran-4,7-diol a 2-dehydro-*O*-DMA, jež se rovněž považují za metabolity daidzeinu (Yuan *et al.*, 2007).



Obrázek 2 Metabolismus daidzeinu lidskou střevní mikrobiotou, převzato a upraveno dle Mayo *et al.* (2019)

Pokud je daidzin v tenkém střevě hydrolizován na aglykon, jenž dokáže být sliznicí vstřebán, dochází k nárůstu koncentrace daidzeinu v plazmě poměrně rychle, a to v rozmezí 30 až 120 minut (Zubik and Meydani, 2003). Tato rychlost závisí na mnoha faktorech, jimiž jsou stravovací návyky, potravinová matrice, rozsah střevní bakteriální fermentace, doba průchodu tráveniny střevem či věk (Setchell, 1998). Dle studie Zubik and Meydani (2003) dochází následně k druhému koncentračnímu nárůstu, který nastává přibližně po 4 až 8 hodinách od podání substrátu, což odráží enterohepatální cirkulaci. Mezi 12 a 24 hodinami je zřejmý pokles koncentrace daidzeinu v tělním oběhu a po 42 hodinách není detekován již vůbec. Setchell *et al.* (2001) také popsali biologickou dostupnost izoflavonů. Zaměřil se však na rozdíly při příjmu aglykonových a glukosidových forem daidzeinu. Průměrný čas pro dosažení maximálních koncentrací v plazmě byl po příjmu daidzeinu již ve formě aglykonu stanoven na 6,6 hodin, zatímco u jeho glykosidové podoby byl tento čas prodloužen na 9 hodin. Toto zdržení se ukázalo jako doba potřebná pro štěpení daidzinu na jeho biologicky aktivní verzi. Dle výsledků Murot *et al.* (2018) se izoflavony včetně daidzeinu a jeho metabolitů vyskytují v lidské plazmě převážně ve formě glukuronidů (75 %), z 24 % ve formě síranů a méně než 1 % tvoří příslušné aglykony.

3.3.2 Equol

Jedním z nejvíce studovaných metabolitů daidzeinu je (3S)-3-(4-hydroxyfenyl)-7-chromanol, triviálním názvem equol (Mayo *et al.*, 2019; Setchell and Clerici, 2010). Díky své vysoké estrogenní aktivitě je v dnešní době považován za nejsilnější fytoestrogen (Setchell *et al.*, 2005). Struktura equolu má dva fenolové kruhy s reaktivními hydroxylovými skupinami

a centrální furanový kruh s inertním kyslíkem. Jedná se o látku nerozpustnou ve vodě a málo odolnou vůči kyselinám. Vyskytuje se ve dvou enantiomerních formách, jako R-equol a S-equol, které jsou biologicky aktivní, přičemž v lidském těle vzniká pouze S-enantiomer (Setchell and Clerici, 2010). V roce 2006 publikovali Rüfer *et al.* svou studii, dle které však equol není konečným metabolickým produktem daidzeinu a může být pomocí mikrozomů lidských jater konvertován na hydroxylové metabolity. Navíc se také ukázalo, že je substrátem skupiny enzymů cytochromu P450.

Existují značné rozdíly mezi lidským a zvířecím metabolismem izoflavonů, a proto nejsou výsledky *in vivo* pro člověka zcela relevantní. U zvířat jsou koncentrace equolu v moči ve srovnání s lidmi výrazně vyšší. Zejména u hlodavců představuje equol 70–90 % ze sérových izoflavonů, přičemž lidé mohou metabolizovat na equol přibližně pouze 30 % absorbovaného daidzeinu (Setchell and Clerici, 2010). Přeměna a případně rychlost přeměny daidzeinu na S-equol je ovlivňována stravovacími návyky, potravinovou matricí, složením střevní mikrobioty, rozsahem intestinální bakteriální fermentace, dobou průchodu trávení střevem a hladinou redoxního potenciálu v tlustém střevě (J.-P. Yuan, Wang and Liu, 2007). Zejména střevní mikrobioty, která se může u každého jedince značně lišit, je zodpovědná za nerovnoměrné zastoupení osob napříč všemi kontinenty, jež jsou schopny metabolizovat equol (Sosvorová *et al.*, 2011). V západním světě dokáže produkovat equol 20–30 % populace, avšak v asijských zemích je schopno tento významný isoflavon syntetizovat až 50–60 % obyvatelstva (Rafii, 2015). Jako producenti equolu jsou bráni jedinci, jejichž plazmatické koncentrace celkového equolu přesahují 83 nmol/l (J. P. Yuan, Wang and Liu, 2007). Opakované testování populací ukázalo, že produkce equolu je poměrně stabilní jev a tito jedinci jsou jeho producenty po celý život (Setchell *et al.*, 2002). Strava může definovat dominantní bakteriální kmeny v zažívacím traktu a určité dietní změny mohou ovlivnit bakteriální profil střeva. Setchell a Cole (2006) prokázali, že četnost producentů equolu je u vegetariánů významně vyšší než u lidí konzumujících běžnou stravu (59 % ku 25 %). Tento fakt může naznačovat, že složky stravy jako jsou vláknina a rostlinné bílkoviny mohou syntézu equolu podporovat. Magee (2011) i Mayo *et al.*, (2019) ve svých studiích zjistili, že u osob s vyšším podílem sacharidů a nižším podílem tuků na celkovém energetickém denním příjmu vzrůstá schopnost produkovat equol. Jeho tvorbu také pozitivně ovlivňuje příjem masa, polynenasycených mastných kyselin (PUFA) a alkoholu. Tyto závěry však platí pouze u jedinců schopných přeměňovat tento metabolit.

U jedinců neschopných produkovat equol, nedošlo k jeho vzniku ani po déle trvající konzumaci sójových izoflavonů (Védrine *et al.*, 2006). Spekuluje se o možném vysvětlení rozdílu ve frekvenci producentů equolu, které může souviset s typem konzumovaných sójových potravin. Jak již bylo zmíněno v kapitole „Daidzein“, existují rozdíly ve složení ajiských a západních sójových potravin. Jelikož Asiaté konzumují na rozdíl od západní populace velké množství sójových fermentovaných produktů, dostává se jim s nimi také značné množství aglykonů (Setchell *et al.*, 2002). Odhaduje se, že z celkového množství přijímaných izoflavonů, představují 10–30 mg denně aglykony, které jsou u většiny dospělých absorbovány rychleji než glykosidy a také je lze snadněji převézt na equol (Setchell and Clerici, 2010). Tuto teorii potvrzuje studie Clerici *et al.* (2007), kteří zkoumali nižující se hladinu cholesterolu po konzumaci těstovin obohacených o sójové klíčky, které obsahovaly převážně izoflavony ve formě aglykonů. Bylo zjištěno, že 69 % pacientů bylo producenty equolu, což je znatelně vyšší frekvence než byla u obyvatel Západu očekávána. Ačkoliv druh konzumovaných sójových

potravin může ovlivnit produkci equolu, převažující faktory pro jeho vznik zůstávají stále stejné. Zásadní je přítomnost specifických střevních bakterií produkujících equol a přítomnost substrátu, tedy daidzinu či daidzeinu (Peeters *et al.*, 2007). U osob s absencí střevních bakterií produkujících equol je zřejmé, že tento významný fytoestrogen nejsou schopny metabolizovat, avšak může dojít i k situaci, kdy jsou specifické bakterie přítomny, ale nejsou aktivní (Setchell and Clerici, 2010).

Znalosti ohledně všech mikroorganismů zúčastněných v procesu přeměny daidzeinu na equol jsou stále značně omezené (Mayo *et al.*, 2019). Ještě před rokem 1995 nebylo zcela jasné, zda je přeměna daidzeinu na equol prováděna pouze jednou bakterií, nebo zda existuje více druhů, jež se na tomto procesu podílejí. Důkaz o různorodosti těchto mikroorganismů přinesl až fakt, že u producentů equolu se v moči vyskytovala velká variabilita hladin jak tohoto silného fytoestrogenu, tak dihydrodaidzeinu (Joannou *et al.*, 1995). Toto tvrzení rovněž podporuje studie Frankenfeld *et al.* (2004), která zjistila, že některá antibiotika jsou schopna selektivně inhibovat tvorbu equolu, ale nikoliv dihydrodaidzeinu. Seznam střevních bakterií schopných produkovat equol u lidí se může vzhledem k novým studiím stále zvětšovat (Mayo *et al.*, 2019). Bakteriální biosyntéza equolu z daidzeinu probíhá prostřednictvím řady po sobě následujících redukčních reakcí, které zahrnují produkci meziproductů dihydrodaidzeinu a tetrahydrodaidzeinu (Setchell a Clerici, 2010). Setchell a Clerici (2010) také popsali řadu kmenů, které provádí pouze konverzi daidzeinu na dihydrodaidzein, zatímco jiné se zdají být schopny převést daidzein až na equol (viz tabulka 3). Většina dosud izolovaných mikroorganismů produkujících equol patří do čeledi *Coriobacteriaceae* (Clavel *et al.*, 2014). Patří sem zejména bakterie podílející se na katabolismu sloučenin odvozených od cholesterolu, jako jsou žlučové kyseliny či kortikoidní hormony, což naznačuje jejich funkční specializaci ve střevě (Ridlon *et al.*, 2006). Čeleď *Coriobacteriaceae* zahrnuje podle dosavadních informací druhy produkující equol, jimiž jsou *Adlercreutzia equolifaciens*, *Asaccharobacter celatus*, *Enterorhabdus mucosicola*, *Slackia isoflavoniconvertens* a *Slackia equolifaciens* (Clavel *et al.*, 2014). Není ale stále jasné, zda je produkce equolu u *Coriobacteriaceae* specifickou dovedností celé čeledi, či jen konkrétních rodů nebo druhů (Clavel and Mapesa, 2013). Mayo *et al.*, (2019) popsali i několik kmenů jiných taxonů, které dokáží produkovat equol. Jedná se zejména o *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus intestinalis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus sakei*, *Pediococcus pentosaceus*, *Proteus mirabilis* a *Lactococcus garvieae*. *Lactococcus garvieae*, nacházející se v italských sýrech Toma Piemontese, byl izolován z lidských výkalů a prokázal schopnost účinně přeměňovat daidzein na equol (Uchiyama *et al.*, 2007). Následně byl použit pro výrobu prvního přírodního nutraceutika obsahujícího equol, což výrazně přispělo k možnosti testovat účinky tohoto metabolitu u zvířat i u lidí (Murota *et al.*, 2018; Setchell and Clerici, 2010).

Tabulka 3 Výběr střevních bakterií metabolizujících daidzin/daidzein na equol nebo jeho meziprodukty (Setchell and Clerici, 2010; Mayo et al., 2019; Murota et al., 2018; Yuan et al., 2007).

Bakteriální druh	Reakce
<i>Adlercreutzia equolifaciens</i>	Daidzein → Equol
<i>Bifidobacterium breve</i>	Daidzein → Equol
<i>Bacteroides ovatus</i>	Daidzein → Equol
<i>Bifidobacterium longum</i>	Daidzein → Equol
<i>Clostridium sp.</i>	Daidzein → Dihydrodaidzein
Bakterie podobná <i>Clostridium</i>	Daidzein → Dihydrodaidzein
<i>Eggerthella sp.</i> (kmen YY7981)	Daidzein → Equol
<i>Eggerthella sp.</i> (kmen 732)	Dihydrodaidzein → Equol
<i>Enterococcus faecium</i>	Daidzein → Equol
<i>Escherichia coli</i> (aktivita β-glukosidázy)	Daidzin → Daidzein
<i>Finegoldia magna</i>	Daidzein → Equol
<i>Lactobacillus</i> sliznice	Daidzein → Equol
<i>Lactococcus garvieae</i>	Daidzein → Equol
<i>Ruminococcus productus</i>	Daidzein → Equol
<i>Slackia equolifaciens</i>	Daidzein → Equol
<i>Slackia isoflavoniconvertens</i>	Daidzein → Equol
<i>Streptococcus intermedius</i>	Daidzein → Equol
<i>Veillonella sp.</i>	Daidzein → Equol

Equol je stabilnější, snadněji se vstřebává epitelem tlustého střeva ale rychlost jeho vylučování z plazmy je oproti daidzeinu nižší. (Setchell et al., 2009). Má silnější afinitu k estrogenovým receptorům než jeho prekurzor, a dokáže tak ještě lépe napodobovat estrogeni aktivitu (Markiewicz et al., 1993). Vzhledem k ostatním izoflavonům vykazuje nejsilnější antioxidační aktivitu (Magee, 2011; Choi a Kim, 2014). Navíc existují studie, které naznačují, že schopnost metabolizovat equol je u jeho producentů spojena se sníženým rizikem vzniku rakoviny prsu (Duncan et al., 2000), prostaty (Akaza et al., 2004) a kardiovaskulárního onemocnění (Sekikawa et al., 2018). Současně může docházet ke zlepšení stavu kostí (Lin et al., 2016), a tlumení příznaků menopauzy (Aso et al., 2012).

3.3.3 O-desmethylangolensin

Druhým popsaným metabolitem daidzeinu je O-desmethylangolensin (O-DMA). Zatímco daidzein a equol jsou sloučeniny strukturálně podobné ženskému hormonu estradiolu (Frankenfeld, 2011), O-DMA vzniká štěpením prostředního pyronového kruhu daidzeinu a stává se tedy svou strukturou podobnější jiným látkám, jako například phloretinu, jenž je ve vysokém množství obsažen v jablkách (Lee et al., 2003). Metabolismus O-DMA probíhá podobně jako u equolu. Nejprve dochází k přeměně aglykonů, následně může ve střevní sliznici či játrech dojít ke konjugaci za vzniku O-DMA glukuronidů či O-DMA sulfátů a nakonec je v tlustém střevě daidzein metabolizován na dihydrodaidzein, jenž je prekurzorem O-DMA

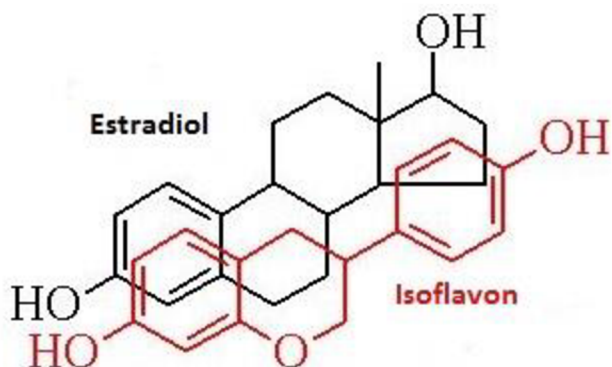
(Frankenfeld, 2011). Více než 95 % *O*-DMA cirkulujícího v tělním oběhu se vyskytuje v glukukoronidové formě, která je rozpustná ve vodě a může být vylučována ledvinami (Adlercreutz et al., 1993). K přeměně dihydrodaidzeinu na *O*-DMA dochází pomocí střevních bakterií, které se však od těch produkujících equol liší. Bylo potvrzeno, že bakterie štěpící daidzein na *O*-DMA, zahrnují *Eubacterium ramulus* (Schoefer et al., 2002) a *Clostridium* sp. z kmene HGH 136 (Hur et al., 2002). Studie Simmering et al., (1999) zaměřená na kvantifikaci bakterií degradujících flavonoidy testovala koncentrace *E. ramulus* v trávicím traktu ze vzorku stolice 20 osob. Ve výsledku zjistili, že *E. ramulus* osídlovala tlusté střevo dárců v rozmezí 0,01 až 0,36 % z celkového počtu bakteriálních buněk, což naznačuje, že se její zastoupení v gastrointestinálním traktu různých jedinců může značně lišit. Vzhledem k tomuto faktu se stejně jako u equolu v populaci vyskytují producenti *O*-DMA a rovněž i jedinci, kteří tuto schopnost nemají. Pozorovací studie Frankenfeld et al. (2004) nazančila, že fenotypy producenta *O*-DMA a producenta equolu jsou na sobě nezávislé a schopnost přechovávat v trávicím traktu bakterie metabolizujícími *O*-DMA nemá souvislost s přítomností bakterií produkujících equol. Metoda klasifikace výrobců a nevýrobců *O*-DMA není standardizována. Hodnotí se většinou jeho absolutní vylučování nebo vylučování v poměru k daidzeinu (Frankenfeld, 2011). Producentů *O*-DMA je mnohem více než u equolu, odhaduje se, že tento metabolit je schopno syntetizovat 80 až 90 % světové populace (Atkinson et al., 2005).

Byly zkoumány biologické účinky *O*-DMA vzhledem k inhibici růstu rakovinných buněk (Magee, McGlynn and Rowland, 2004), tvorbě osteoklastů (Ohtomo et al., 2008), modulaci imunologických markerů (Gredel et al., 2008), antioxidační aktivitě (Liang et al., 2010) či inhibiční aktivitě sekrece leptinu (Niwa et al., 2010). Výsledky těchto studií naznačují, že *O*-DMA vykazuje obecně slabší fytoestrogenní účinky a tedy i menší léčebný potenciál, nežli daidzein či equol. Hedlund et al. (2006) ve své studii zkoumající vliv fytoestrogenů a jejich metabolitů na rakovinné buňky prostaty linie LNCaP poznamenali, že u testovaných mužů produkovalo *O*-DMA až 98 % z nich. Pouze však 4 z 36 účastníků měli cirkulující koncentrace *O*-DMA větší nebo rovny 1 μmol/l, což byla dávka stanovená autory k dosažení minimálních antiproliferačních účinků. Toto pozorování zdůrazňuje, že ani přítomnost bakterií produkujících *O*-DMA v kombinaci s dostatečnou konzumací sóji, nevede u všech jedinců k vysokým koncentracím *O*-DMA v krevním řečišti (Frankenfeld, 2011). *O*-DMA se u svých producentů ve srovnání s equolem a svým prekurzorem daidzeinem jeví jako minoritní metabolit s velmi nízkými koncentracemi v plazmě (Heinonen et al., 1999). Jeho terapeutické účinky proto nemusí být vždy relevantní (Frankenfeld, 2011). Bylo však zjištěno, že střevní bakterie *Eubacterium ramulus*, vyskytující se v trávicím traktu producentů *O*-DMA, byla schopna metabolizovat *in vitro* další polyfenolové sloučeniny na fenolové kyseliny. Jednalo se například o kvercetin (Blaut et al., 2003) obsažený v jablkách či cibuli, phloretin (Schneider and Blaut, 2000) v jablkách a rajčatech nebo luteolin (Braune et al., 2001) nacházející se v mrkvi a paprice. Dle těchto informací by producenti *O*-DMA mohli profitovat z terapeutických účinků i dalších fotochemikálií (Frankenfeld, 2011).

3.4 Význam daidzeinu pro lidský organismus

3.4.1 Hormonální účinek fytoestrogenů

Role estrogenů je velice důležitá v řadě fyziologických dějů. Nejzásadnější je jejich vliv na reprodukční systém a sexulální chování, avšak je znám i vztah estrogenů ke kardiovaskulárnímu systému, či například k remodelizaci kostí. Biologicky účinnou látkou v těchto procesech je 17- β estradiol, který je svou strukturou podobný fytoestrogenům (viz obrázek 3) (Slíva, 2010).



Obrázek 3 Porovnání chemické struktury izoflavonů a lidského estrogenu – estradiolu, převzato a upraveno dle Matthai *et al.* (2003).

Sójové izoflavony včetně daidzeinu vykazují vlastnosti blízké estrogenům, ale jsou méně aktivní než lidský hormon 17- β estradiol (Mayo *et al.*, 2019). Účinky jak estrogenů tak fytoestrogenů jsou zprostředkovány především estrogenovými receptory (ER) (Slíva, 2010). Většina ER je lokalizována v jádře buňky a po navázání na estrogen či fytoestrogen tvoří dimery. Tyto dimery v jádře interagují s estrogen responsivní jednotkou (ERE), což je specifická oblast DNA, která reguluje transkripci genů reagujících na estrogen, případně fytoestrogen. Existuje také malé procento ER (2–3 %), které se nachází na buněčných membránách a při jejichž navázání nedochází ke genomickým účinkům. U lidí známe dva typy ER, jedná se o ER α a ER β . Ačkoliv tyto ER mohou být lokalizovány ve stejné buňce, v rámci organismu jsou specificky rozmístěny v různých tkáních. Oba ER se nacházejí například ve vaječnících, kde ovlivňují vývoj folikulů, dále v buňkách vaskulárního endotelu, buňkách myokardu a prsní tkáni. U žen se v kostech nachází ER α i ER β , které se podílejí na zrání a údržbě kostí, avšak v mužských kostech se vyskytují pouze ER β . Další rozdíly můžeme najít v mozku, kde je ER α důležitý při udržování správné hladiny luteinizačního a folikuly stimulujícího hormonu v krvi a ER β je zase zapojen do schopnosti učení se a paměti (Cornwell *et al.*, 2004).

Fytoestrogeny mohou vykazovat agonistický nebo antagonistický účinek vzhledem k hormonům a díky své rozdílné afinitě k oběma skupinám receptorů se o nich také mluví jako o selektivních regulátorech receptorů estrogenů. Antagonistické účinky mohou nastat, pokud je fytoestrogenní sloučenina schopna se navázat na ER, ale nedojde ke vzniku dimeru,

či správné konfiguraci a následné interakci s ERE. Agonistické selektivní regulátory receptorů estrogenu vyvolávají hormonální odezvu (např. působení na vaječníky) a antagonistické regulátory hormonální odezvu brzdí (např. působení na dělohu). Pokud fytoestrogeny receptory blokují, estradiol nemůže působit (Becket *et al.*, 2005; Cornwell *et al.*, 2004).

Daidzein, jakožto jeden z hlavních zástupců fytoestrogenů, nesteroidních estrogenů, je významným předmětem zkoumání při prevenci a léčbě různých zdravotních obtíží. Jedná se zejména o onemocnění spojená s regulací estrogenové aktivity, jako je rakovina prsu (Liu *et al.*, 2012), osteoporóza (Setchell *et al.*, 2002), cukrovka (Ae Park *et al.*, 2006), či choroby kardiovaskulárního systému (Rostagno *et al.*, 2010). Mimo to nelze také opomenout jeho antioxidační účinky (Choi, 2006).

3.4.2 Antioxidační aktivita

Antioxidanty se vyskytují volně v přírodě a stejně tak mohou být vyráběny i synteticky. Dokáží v těle různými mechanismy snížit aktivitu volných radikálů, což jsou v organismu přirozeně se vyskytující vedlejší produkty metabolismu. Volné radikály vykazují agresivní oxidační působení na buňky a mají za následek jejich předčasné stárnutí. Mohou také působit jako spouštěcí mechanismy mnoha zdravotních problémů včetně kardiovaskulárních onemocnění (KVO) a některých druhů rakoviny. Antioxidanty jsou schopny převádět volné radikály na jejich méně reaktivní a nereaktivní formy (Paulová *et al.*, 2004). Volné radikály mohou být neutralizovány enzymatickými antioxidačními systémy, stejně jako neenzymatickými antioxidanty, včetně vitamínů, glutathionu a flavonoidů (Choi, 2006).

Daidzein je přírodním antioxidantem a jeho antioxidační aktivitu zprostředkovávají dva mechanismy. První z nich probíhá v lipozomální membráně, kde je daidzein schopen inhibovat oxidaci lipidů přímým odstraňováním volných radikálů. Dokáže také zabránit migraci volných radikálů pomocí vazby na membránu, čímž může změnit tuhost/tekutost této lipidové dvojvrstvy (Liang *et al.*, 2008)

Endogenní ochranou proti oxidačnímu poškození jsou antioxidační enzymy. Druhým nepřímým antioxidačním mechanismem daidzeinu je zvýšení aktivity těchto enzymů. Daidzein dokáže indukovat enzym superoxidodismutázu, která přeměňuje superoxidový radikál na méně toxický peroxid vodíku. Ten je dále rozkládán pomocí enzymů katalázy či glutathionperoxidázy, k jejichž zvýšené aktivaci dochází rovněž pomocí daidzeinu (Kampkötter *et al.*, 2008). Kataláza a glutathionperoxidáza fungují jako katalyzátory peroxidu vodíku na vodu a kyslík (Chelikani *et al.*, 2004). Studie Röhrdanz *et al.* (2002) na buňkách krysího hepatomu došla k závěru, že léčba daidzeinem dramaticky zvýšila expresi mRNA katalázy, což bylo způsobno transkripční aktivací promotoru katalázy. Ovšem o transkripční aktivaci genu katalázy je dosud známo pouze málo informací. Post-transkripční procesy jsou pro regulaci tohoto genu velmi důležité. K určení, zda zvýšená exprese katalázy u krysích hepatomů chrání buňky před oxidačním poškozením, byly hepatocyty předem ošetřeny daidzeinem a následně vystaveny peroxidu vodíku. Výsledky této studie byly však překvapující, protože ačkoliv daidzein významně ovlivnil produkci katalázy, oxidační stres nebyl tímto mechanismem ovlivněn. Daidzein tak nevykazoval antioxidační potenciál a zdálo se, že je naopak prooxidační (Röhrdanz *et al.*, 2002). Těmto výsledkům oponuje novější studie Choi a Kim (2014b), v níž

byl zkoumán účinek daidzeinu na hepatocelulární buňky lidského karcinomu. Léčba daidzeinem a jeho metabolity vykazovala významné antioxidační vlastnosti. Expres katalázy byla nejvíce vyvolávána daidzeinem a následně equolem. Ten byl naopak v největší míře schopen exprimovat superoxidodismutázu. Příznivý antioxidační účinek vyvolával daidzein také například při léčbě diabetických potkanů ve studii Roghani *et al.* (2013), kde redukoval zvýšené množství malonylaldehydu, což je marker peroxidace lipidů a zvýšil aktivitu superoxidodismutázy v aortální tkáni potkanů. To naznačuje, že daidzein se svou antioxidační aktivitou může podílet na zlepšení endoteliální dysfunkce. Vzhledem k těmto protichůdným závěrům je nutno zamyslet se nad otázkou, zda daidzein působí pouze jako antioxidant, nebo opravdu za jistých podmínek dokáže vykazovat i prooxidační vlastnosti. Tato hypotéza by se dala částečně vysvětlit pomocí studie na potkanech, kterou se zabýval Choi (2006). Jedné skupině byl z potravy odebrán vitamin E a druhá skupina potkanů, která byla normálně krmená, sloužila jako kontrola. Experiment s odebráním vitaminu E byl učiněn z toho důvodu, že již dříve některé *in vitro* studie naznačily schopnost flavanoidů regenerovat, či převzít roli významného antioxidantu získávaného z potravin prostřednictvím vitaminu E- α -tokoferolu (van Acker *et al.*, 2000; Hwang *et al.*, 2000). Bazální koncentrace v séru a orgánech potkanů zbavených vitaminu E byla výrazně nižší než u potkanů krmených normálně. Je zajímavé, že koncentrace α -tokoferolu v séru a mozku u potkanů zbavených vitaminu E byly po léčbě daidzeinem zvýšeny, ačkoliv hladiny α -tokoferolu v kontrolní skupině daidzein neovlivňoval. Přesný mechanismus tohoto působení však není jasný (Choi, 2006). V této studii Choi (2006) došlo po podání daidzeinutaké k významnému snížení obsahu malonylaldehydu v orgánech potkanů u obou skupin. Skutečnost, že daidzein snížil peroxidaci lipidů a zároveň zvýšil koncentrace α -tokoferolu, může být považována za důkaz jeho antioxidační aktivity. Inhibiční účinek daidzeinu na peroxidaci lipidů byl výraznější v mozku. Ten má v porovnání s ostatními orgány zvýšené riziko tvorby a následné detoxikace volných kyslíkových radikálů. Mozek však vykazuje nízkou až střední aktivitu superoxidodismutázy, katalázy a glutathionperoxidázy ve srovnání s játry, či ledvinami a to i přesto, že mozkové buňky spotřebovávají až 20 % kyslíku spotřebovaného tělem. Hladiny významného antioxidantu glutathionu v játrech nebyly v této studii po podání daidzeinu potkanům nijak změny. Naproti tomu koncentrace glutathionu v mozku poklesla u všech potkanů, kterým byl podáván daidzein v koncentracích 20 mg/den (Choi, 2006). Je však známo, že dysfunkce metabolismu glutathionu způsobuje oxidační poškození (Comporti *et al.*, 1991). Tato dysfunkce byla také zaznamenána u neurodegenerativních onemocnění, jako je například Huntingtonova choroba (Cruz-Aguado *et al.*, 2000), Alzheimerova choroba (Adams *et al.*, 1991) či Parkinsonova choroba (Bharath *et al.*, 2002). Daidzein mohl tedy v mozku vykazovat prooxidační aktivitu, avšak přesné mechanismy snižující hladinu glutathionu jsou stále nejasné (Choi, 2006).

Celkově lze říci, že daidzein může kromě antioxidačních účinků vykazovat v určitých případech také mírné prooxidační působení (Choi, 2006). Daidzein má významný potenciál pro léčbu mnoha onemocnění, avšak jeho dlouhodobé nadměrné užívání může vyvolat i negativní efekt na lidské zdraví (Sun *et al.*, 2016; Choi, 2006).

3.4.3 Rakovina

Nádorová onemocnění jsou nepochybně jedním z nejzávažnějších zdravotních problémů 21. století. Tento problém je velmi akutní jak celosvětově, tak i v České republice, kde se projeví jeden z mnoha typů maligního (zhoubného) nádorového onemocnění v průběhu života u každého třetího občana a každý čtvrtý člověk této zákeřné nemoci podlehne (Prausová, 2010).

Karcinom prsu je nejčastější ženskou malignitou a dle posledních dostupných dat z roku 2018 trpí tímto karcinomem 133 ze 100 tisíc žen (SVOD, 2010). Je nádorem hormon dependentním. Ženské pohlavní hormony – estrogeny mají na jeho vzniku a růstu nejvýznamnější vliv. Také indukují expresi onkogenů a růstových faktorů, jejichž produkty podněcují proliferaci buněk (Prausová, 2010). Dlouhodobá vyšší aktivita estrogenu naruší rovnováhu mezi působení proliferčních a antiproliferčních faktorů ve prospěch proliferace. Delší expozice estrogenům nastává při časném nástupu menstruace, pozdní menopauze, či při pozdní první graviditě (Koukolis, 2006). Riziko vzniku rakoviny prsu taktéž roste s věkem nepochybně hrají podstatnou roli i dietní činitelé, a to zejména konzumace alkoholu, či vysoký příjem tuků (Prausová, 2010). V epidemiologických studiích (Stanford *et al.*, 1995; Tominaga and Kuroishi, 1995; Adlercreutz, 2002) již bylo zjištěno, že výskyt rakoviny prsu u asijských žen je podstatně nižší, než u žen západního světa. Tato skutečnost je přisuzována vyšší spotřebě sóji a sójových produktů a tedy zvýšenému příjmu fytoestrogenů. Byla také prokázána antiproliferační schopnost daidzeinu, přičemž dochází k zastavení buněčného cyklu ve fázích G1, G2 či M, což následně indukuje apoptózu, neboli buněčnou smrt nádorových buněk (Choi and Kim, 2008). Tento jev zkoumali Liu *et al.* (2012) na potkanech, kteří nesli tumory mléčné žlázy indukované 7,12-dimethylbenzen(a)anthracenem, což je silný laboratorní karcinogen a imunosupresivum. Potkani byli rozděleni do tří skupin, přičemž první byla léčena daidzeinem, druhá tamoxifenem, což je komerčně užívaný lék proti některým typům rakoviny prsu a třetí sloužila jako kontrola. Nádory u kontrolní skupiny potkanů rychle rostly a po 3 týdnech se zvětšily až 8,1 krát. Mírná inhibice růstu nádorů v průběhu prvních 15 dní byla pozorována u skupiny, již byl podáván tamoxifen, ale následně došlo opět k jejich zvětšování. Naopak u potkanů léčených daidzeinem byl růst nádorů výrazně inhibován v průběhu celé medikace a velikost tumorů se během 3 týdnů zvýšila pouze 2,9 krát. Výsledky tohoto pozorování tedy ukázaly, že protinádorový potenciál daidzenu byl výrazně silnější než potenciál tamoxienu. Buněčný cyklus a stádia apoptózy u tumorů indukovaných DMBA mléčné žlázy potkanů byly analyzovány průtokovou cytometrií (Liu *et al.*, 2012). Jedná se o metodu, která umožňuje měření a analýzu fyzikálně chemických vlastností buňky nebo jiných biologických částic během jejich průchodu laserovým paprskem (Langhansová, 2011). Vysoká úroveň apoptózy (25%) byla naměřena při třítydenní léčbě daidzeinem, naproti tomu míra apoptózy u kontrolní skupiny byla výrazně nižší (1,1%). Při podání stejné dávky equolu byly také zaznamenány významné hladiny apoptózy (17,6%), naopak buněčná smrt indukovaná TAM byla nižší (6,2%). Daidzein a equol tedy opět vykazovali lepší vlastnosti pro zastavení růstu nádoru. Dle těchto zjištěných informací by mohly být daidzein a equol použity jako základní struktury pro vznik nových, antiestrogenických léků a současně lze říci, že konzumace potravin s obsahem daidzeinu může sloužit jako prevence před vznikem ženského karcinomu prsu (Liu *et al.*, 2012).

Jedním z hlavních zdravotních problémů, kterým čelí mužská populace, je karcinom prostaty. Celosvětově si tuto diagnózu vyslechne až 13 milionů mužů ročně, z čehož

2,6 milionů případů se týká Evropanů. Rakovina prostaty má 11% zastoupení ve všech nádorových onemocněních v Evropě a představuje na našem kontinentu 9 % mužských úmrtí (Heidenreich *et al.*, 2007). Růst a vývoj prostaty je regulován mužským pohlavním hormonem – testosteronem. I přesto, že testosteron se řadí do skupiny androgenních hormonů, byla již v mnoha studích sledována role fytoestrogenů v karcinogenezi prostaty. Jedním z důvodů je, že i v mužském těle vzniká estrogen, avšak v porovnání s testosteronem ve velmi malé míře. Hraje však nezanedbatelnou hormonální roli ve vývoji prostaty a může se tedy také podílet na vývoji nádoru prostaty, či ochraně před jeho vznikem. Ve studii Adjakly *et al.* (2015) namyších bylo prokázáno, že při kombinaci estrogenu s dyhydrotestosteronem, tedy vlastní účinnou formou testosteronu, docházelo k abnormálnímu růstu rakovinných buněk. Fytoestrogeny daidzein a geinstein mají schopnost vázat se na ER β v buňkách prostaty, a dokáží tak napodobovat působení estrogenů, aniž by docházelo k rakovinnému bujení. Další studie (Rabiau *et al.*, 2010) také naznačila, že stejně jako u rakoviny prsu má daidzein schopnost zastavit buněčný cyklus, a to ve fázi G0/G1. V neposlední řadě je nutno zmínit účinek daidzenu na expresi androgenem indukovaného transkriptu prostaty 1 (PART-1), což je androgenem regulovaný gen exprimovaný zejména v tkáni prostaty. PART-1 se vyskytuje ve větší míře v maligních (zhoubných) než benigních (normálních, nezhoubných) tkáních, což naznačuje, že jeho exprese se během rakoviny mění (Yu *et al.*, 2003). Exprese genu PART-1 byla regulována androgeny v buňkách rakoviny prostaty citlivých na androgen, ale nikoliv v buňkách na androgen nezávislých. Daidzein inhiboval expresi PART-1 indukovanou dyhydrotestosteronem, což znamená, že daidzein může mít antiandrogenní aktivitu. Tyto zjištění naznačují, že PART-1 může sloužit jako biomarker pro hodnocení účinnosti daidzeinu při prevenci rakoviny prostaty (Yuet *et al.*, 2003). Roli daidzeinu v léčbě a prevenci karcinomu prostaty potvrzuje také fakt, že dle epidemiologických údajů je prevalence rakoviny prostaty v asijských zemích mnohonásobně nižší, než v Evropě a Severní Americe. Riziko vzniku onemocnění může rovněž stoupat u Asiatů, kteří přijali východní styl stravování (Rabiau *et al.*, 2010),

Studie Guo *et al.* (2004) ukázala spojitost daidzeinu se sníženým rizikem vzniku rakoviny tlustého střeva. Byly zkoumány lidské buněčné linie rakoviny tlustého střeva LoVo, které byly ošetřeny daidzeinem v 6 různých koncentracích od 0,1 μ M až do 100 μ M. V nejnižších koncentracích 0,1 μ M a 1 μ M docházelo ke stimulaci buněčného růstu, naproti tomu při ošetření v koncentracích od 5 do 100 μ M byl buněčný růst inhibován v závislosti na dávce. Při vyšších koncentracích byly buňky zastaveny v G0/G1 fázi buněčného cyklu a podstoupily apoptózu. Dle těchto výsledků má daidzein terapeutický potenciál proti karcinomu tlustého střeva

Byl dokázán i možný léčebný účinek daidzeinu na rakovinu jater. Ve studii Park *et al.* (2013) byly zkoumány lidské buňky hepatocelulárního karcinomu (SK-HEP-1) a výsledky prokázaly, že daidzein inhiboval buněčný růstu SK-HEP-1 a indukoval buněčnou smrt. Tyto SK-HEP-1 buňky ošetřené daidzeinem vykazovaly morfologické rysy apoptózy, jako je smršťování membrány, či kondenzace chromozomů.

3.4.4 Kardiovasulární onemocnění

Kardiovaskulární onemocnění (KVO) je v České republice, stejně jako v ostatních ekonomicky vyspělých zemích hlavní příčinou morbidity a také mortality. KVO se řadí mezi

tzv. chronická neinfekční onemocnění, ke kterým patří také obezita, osteoporóza, diabetes či chronické nemoci dýchací soustavy. V ČR je výskyt KVO vyšší než ve většině západoevropských zemí. Úmrtnost u žen na tyto choroby činí 50 % a u mužů 42 %. Věkově standardizovaná míra úmrtnosti na KVO je o 60 % vyšší než je průměr ve státech EU (OECD/European Observatory on Health System and Policies, 2017). Více než polovina všech úmrtí v naší zemi je způsobena KVO a ročně podle této diagnózy přibližně 40 tisíc osob (Český statistický úřad, 2019).

Na značně snížený výskyt KVO v asijských zemích ve srovnání se západem poukazuje hned několik studií (Tham *et al.*, 1998; Moriguchi *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2017). To naznačuje, že zvýšený příjem izoflavonů u Asiatů může souviset s prevencí tohoto onemocnění (Rostagno *et al.*, 2010). Zmíněnou hypotézu zkoumala v roce 2013 randomizovaná, dvojitě zaslepená a placebem kontrolovaná studie Qin *et al.* (2014). Studie se zúčastnilo dvěstě deset pacientů (108 mužů a 102 žen), kteří se po dobu trvání výzkumu, tedy 6 měsíců, vyhýbali příjmu sóji a sójových produktů a zároveň udržovali svůj obvyklý životní styl. Účastníci byli náhodně rozřazeni do tří skupin, kterým bylo podáváno 0, 40 a 80 mg daidzeinu denně. Výsledky ukázaly, že po podání daidzeinu došlo k výraznému snížení koncentrace triglyceridů v séru, ale nikoli v závislosti na dávce. Právě vysoké koncentrace triglyceridů spolu s LDL cholesterolem a nízkými koncentracemi HDL cholesterolu jsou rizikovými faktory ve vzniku KVO. Suplementace daidzeinem výrazně snížila i koncentraci kyseliny močové. Mechanismy spojující zvýšené hladiny kyseliny močové (hyperurikemie) s KVO dosud nejsou plně objasněny. Cibičková a Žurek (2020) však uvádějí, že má vliv na vznik zánětu, oxidačního stresu a endoteliální dysfunkce, což vede k rozvoji KVO. Hyperurikemie tedy představuje nezávislý faktor kardiovaskulární morbidity a mortality.

Hypertenze, jakožto další z rizikových faktorů spojených s KVO může být také ovlivněna příjmem sójových potravin. Isoflavony mohou ovlivňovat regulaci krevního tlaku, jelikož se dokáží chovat jako inhibitoři tyrosinkinázy, což je enzym podílející se mimo jiné i na kontrole vaskulárního tonusu (Rostagno *et al.*, 2010). Daidzein dokáže snížit hladinu LDL, inhibovat prozánětlivé cytokiny, vyvolat produkci oxidu dusného a zlepšit vaskulární reaktivitu (Gao *et al.*, 2008). Oxid dusný je zásadní vazodilatátor, který zabraňuje intravazální koagulaci, agregaci krevních destiček, adhezi leukocytů a imigraci zánětlivých buněk do stěn cév. Snížená tvorba oxidu dusného tedy vede k endotelové dysfunkci, která může mít za následek rozvoj aterosklerózy (Rostagno *et al.*, 2010).

Vzhledem k špatné orální absorpci a biologické dostupnosti daidzeinu, zkoumali Gao *et al.* (2008) stéricky stabilizované lipidové nanočástice obsahující daidzein, které by mohli zefektivnit jeho terapeutické účinky. Tyto nanočástice dokáží mnohonásobně prodloužit dobu cirkulace daidzeinu v krevním oběhu na rozdíl od orálně podávané suspenze, či intravenózního roztoku. Stéricky stabilizované lipidové nanočástice ve srovnání s orální a intravenózní dávkou prokázaly při testech na psech lepší účinek na kardiovaskulární systém, čehož dosáhly snížením spotřeby kyslíku v myokardu a koronární rezistencí. Rovněž se dostavil velmi pozitivní účinek na cerebrovaskulární systém. Došlo ke zvýšení průtoku krve mozky a snížení cerebrovaskulární rezistence. Tento pevný lipid s obsahem daidzinu má do budoucna značný potenciál pro léčbu KVO, a to jak pro svou dobrou biologickou dostupnost, tak pro nízké náklady.

3.4.5 Osteoporóza

Osteoporóza je progredující systémové onemocnění skeletu charakterizované úbytkem kostní hmoty. Může být nazvána jako tzv. tichá epidemie. Většina případů probíhá naprosto bez příznaků a projeví se až náhlými komplikacemi, kterými jsou fraktury vzniklé bez většího násilí. Ačkoliv jsou čísla nepřesná, právě pro tichý průběh choroby, udává se, že prevalence tohoto onemocnění stále stoupá a v civilizovaných zemích se udává kolem 7–10 %. Osteoporóza postihuje zejména starší obyvatelstvo a především ženy v postmenopauzálním věku. Tato skutečnost je dána poklesem ženských hormonů. U žen nad 50 let je postižena přibližně třetina populace a u žen nad 70 let dokonce až polovina populace. Typickými frakturami jsou zlomeniny obratlů, dolního předloktí a krčku stehenní kosti. Mortalita se u zlomeniny krčku udává do 1 roku po úrazu na 10–15 % (Hrčková and Šarapatková, 2004).

Kostní tkáň tvoří dva typy buněk: osteoklasty a osteoblasty, přičemž i remodelace kostí sestává ze dvou fází. První je kostní resorpce osteoklasty, které při své aktivitě rozvolňují kostní matrix a druhou je nová tvorba kostí pomocí osteoblastů. Tyto buňky mají tedy opačnou funkci a jejich specifické schopnosti odbourávat či syntetizovat kostní tkáň probíhají kontinuálně a současně na více místech v kostře (de Wilde *et al.*, 2004). Úbytek kostní hmoty ve stáří a po menopauze je dán nedostatkem estrogenu. Nedostatečné množství estrogenu v těle vyvolává zvýšenou tvorbu a aktivitu osteoklastů, čímž se snižuje síla kostí a jak již bylo výše zmíněno, znásobuje se riziko zlomenin (Hughes *et al.*, 1996). Léčba osteoporózy pomocí estrogenu se nabízí jako efektivní varianta, avšak nelze přehlížet její negativní účinky spojené se zvýšeným nebezpečím vzniku rakoviny prsu, či endometria a s vyšším krátkodobým rizikem tromboembolických příhod u žen s KVO (Rassi *et al.*, 2002). Daidzein jakožto fytoestrogen vykazuje účinky podobné lidskému estrogenu, přičemž jeho metabolit equolprokázal mnohonásobně větší estrogení aktivitu oproti jiným izoflavonům. Následující skutečnost by mohla vézt k zjištění, že daidzein má pravděpodobně významný potenciál v léčbě osteoporózy (Setchell *et al.*, 2002). Tato hypotéza byla zkoumána ve studii de Wilde *et al.* (2004) na metatarzálních a metakarpálních kostech mladých selat, jelikož prase je pro analyzování účinků nutričních faktorů na remodelizaci kostry či kostí vhodnějším kandidátem než hlodavci. Bylo zjištěno, že nízká koncentrace daidzeinu (1 nM) stimuluje diferenciaci osteoblastů prostřednictvím ER β , zvyšuje mineralizaci kostí, sekreci osteokalcinu a aktivitu alkalické fosfatázy. Alkalická fosfatáza se uplatňuje v metabolismu kostní tkáně, konkrétně v procesu osteogeneze a je citlivým markerem kostní novotvorby. Daidzein přitom vykazoval v těchto parametrech silnější účinky než ekvivalentní množství 17- β estradiolu (de Wilde *et al.*, 2004). Daidzein je navíc schopen stejně jako 17- β estradiol inhibovat diferenciaci a aktivitu osteoklastů (Rassi *et al.*, 2002).

Dalším důležitým faktorem podílejícím se na správné stavbě kostí je hormon produkováný C–buněkami štítné žlázy, kalcitonin. Ukázalo se, že u potkanů orchidektomií (model pro osteoporózu), kteří byli léčeni daidzeinem, došlo k stimulaci C–buněk a zvýšení trabekulární (spongiózní/houbovitě) kostní hmoty. Daidzein může tedy přes C–buněk i nepřímo stimulovat kalcitonin, který působí jako inhibitor kostní resorpce (Filipović *et al.*, 2010).

Studie Wong (2009) poukázala na schopnost daidzeinu lokálně zvyšovat tvorbu nové kosti. Jedná se o výzkum prováděný na novozélandských bílých králících s kostními defekty

v temenní kosti. Ve skupině léčené kolagenovou maticí obohacenou o daidzein docházelo k 602% nárůstu kostní tkáně oproti kontrolní skupině.

3.4.6 Diabetes

Diabetes mellitus (DM) je závažné metabolické onemocnění, jehož hlavním projevem je hyperglykémie vzniklá z částečného či úplného nedostatku inzulínu (Češka *et al.*, 2020). V posledních letech se z důvodu zvýšení životní úrovně a současnému životnímu stylu stal diabetes celosvětovým epidemiologickým onemocněním. Mezinárodní federace pro diabetes (IDF) uvádí tvalý nárůst diabetiků a předpokládá, že v roce 2030 bude tímto autoimunitním chronickým onemocněním trpět až 439 milionů lidí na celém světě. Až 90 % diagnostikovaných pacientů bude pravděpodobně postiženo diabtem 2. typu (DM2) (Gętek *et al.*, 2014). V České republice je v současnosti evidováno 9 % osob s diabetem a předpokládá se, že alespoň dalších 5 % populace s tímto onemocněním zůstává nediodagnostikováno. V 93 % případů všech chorých se jedná o DM2. Diabetes mellitus prvního typu (DM1) tvoří přibližně pouze 5 % a zbylé 2 % tvoří pacienti se vzácnými specifickými typy DM (Češka *et al.*, 2020).

Inzulínová rezistence v kosterních svalech je hlavním faktorem podílejícím se na rozvoji DM2, jež se vyznačuje sníženou schopností inzulínu regulovat hladiny glukózy v krvi. Je prokázáno, že adenosinmonofosfátem aktivovaná protein kináza (AMPK) je hlavním regulátorem buněčné a celotělní homeostázy energie. Tento enzym působí jako jakýsi senzor energetických změn v buňce. Reaguje na stresové podmínky, jako je nízká hladina glukózy v krvi, hypoxie, či tepelný šok, přičemž dochází k poklesu zásob buněčného adenosintrifosfátu. Aktivovaná AMPK se podílí na řadě příznivých účinků od udržování energetické homeostázy až po modulaci citlivosti buněk na inzulín. Z těchto důvodů je AMPK považována za novou potenciální terapeutickou látku v léčbě DM2 (Towler and Hardie, 2007).

Vliv daidzeinu na tyto mechanismy byly zkoumány ve studii Cheong *et al.* (2014) v *in vitro* modelu svalových diabetických buněk myši, myotubech L6. Výsledky ukázaly, že daidzein stimuloval absorpci glukózy v myotubech L6. K tomu došlo zvýšením translokace glukózového transportéru 4. typu (inzulínem regulovaný transportér glukózy) na plazmatické membráně prostřednictvím aktivace AMPK, což vedlo ke glukózové homeostáze nezávisle na inzulínu. Cheong *et al.* (2014) následně provedli další experiment *in vivo*. U diabetických myši bylo zjištěno, že suplementace daidzeinem výrazně snížila hladinu glukózy v krvi, aniž by snížila hladinu inzulínu či C-peptidu. Ten se odštěpuje z proinzulinu před sekrecí inzulínu a jeho koncentrace v séru odpovídá hladině inzulínu. Tato zjištění dohromady podporují antihyperglykemický účinek daidzeinu *in vivo* i *in vitro*. Studie Ae Park *et al.* (2006) ukázala, že daidzein zlepšuje koncentraci glukózy v krvi stimulací aktivity glukagonu a inhibicí aktivity glukózy-6-fosfatázy v játrech myši s hyperglykemií. Podáním daidzeinu byl ve srovnání s kontrolní skupinou snížen poměr glukózy-6-fosfatázy/glukagonu až o 52 %, což výrazně přispívá ke stálé hladině krevního cukru. V této studii bylo také zjištěno, že akumulace lipidů v játrech byla spojena s vývojem jaterní inzulínové rezistence. Až 50 % inzulínové rezistence u obézních pacientů s DM2 tvoří zvýšené plazmatické hladiny volných mastných kyselin (VMK). U myši suplementovaných daidzeinem byla koncentrace VMK výrazně nižší ve srovnání s kontrolou, což by mohlo naznačovat, že daidzein může být účinným antidiabetikem i v tomto směru. Reesterifikace VMK v adipocytech, buňkách tukové tkáně, je u obézních

diabetiků značně snížena. To má za následek zvýšenou cirkulaci VMK a také jejich zvýšenou dodávku do jater (Boden, 2002). Zvýšené hladiny VMK u obézních pacientů s DM vedou k nadměrné β -oxidaci mastných kyselin (MK), která způsobuje narušení využití glukózy v játrech (Katsanos, 2004). Potenciálním řešením jak snížit hladinu glukózy v krvi u těchto pacientů je snížení přílišné β -oxidace (Vickers, 2009). Toho lze dosáhnout nižší dostupností MK a krokem k omezení rychlosti regulace MK s dlouhým řetězcem je transport VMK do mitochondrií pomocí enzymu karnitinpalmitoyltransferázy 1 (KPT1) (McGarry *et al.*, 1978). Ae Park *et al.* (2006) ve své studii na diabetických myších došli k závěru, že po léčbě daidzeinem došlo ke snížení jaterní KPT1 i β -oxidační aktivity ve srovnání s kontrolou. Současně bylo dosaženo inhibice glukózy-6-fosfázy a aktivace glukagonu, což naznačuje, že daidzein je významnou antihyperglykemickou složkou sóji a že je do jeho působení proti diabetu z významné části zapojena i jaterní tkáň. Daidzein navíc také snížil postprandiální hladinu glukózy v krvi a to inhibicí aktivity trávicích enzymů sacharidů, konkrétně α -glukosidázy a α -amylázy.

Suplementace daidzeinem může hrát příznivou roli při regulaci krevní glukózy na lačno u DM1, který je známý jako DM závislý na inzulínu, neboli inzulín dependentní diabetes mellitus. Právě nedostatek inzulínu produkovaného β -buňkami Langerhansových ostrůvků je hlavním patogenetickým mechanismem odpovědným za vznik DM1. Neobézním diabetickým myším, jež jsou modelem lidského DM1, byl podáván daidzein, což indukovalo přežití β -buněk pankreatu a sekreci inzulínu, aniž by docházelo k jakémukoliv účinku na glukagon (Choi *et al.*, 2008).

3.4.7 Stárnutí pokožky

Kůže je největším orgánem těla a stejně jako všechny ostatní tkáně počas stárnutí prochází degenerativními procesy (Ma *et al.*, 2020). Na pokožku mají významný vliv estrogeny, které mohou modulovat fyziologii kůže. Nedostatek estrogenu po menopauze má za následek atrofické změny kůže a zrychlení stárnutí pokožky. Tloušťka kůže bývá snížena o 1,13 % a obsah kolagenu o 2 %, přičemž tyto změny proběhnou již během prvního roku po menopauze (Brincat *et al.*, 2005). Estrogenová nedostatečnost také snižuje obranu proti oxidačnímu stresu. Pokles kolagenu způsobí ztenčení kůže, snížení elasticity, prohloubení a zvětšení počtu vrásek, zvýšenou suchost a snížení prokrvení pokožky (Thornton, 2002). Faktorem podílejícím se na tzv. „vnějším“ stárnutím pokožky je ultrafialové (UV) záření. Tomuto jevu se říká také fotoaging. Vyznačuje se obdobnými negativními důsledky stejně jako tomu je u absence dostatečného množství estrogenu a navíc může způsobovat i pigmentové skvrny (Choi *et al.*, 2007).

V lidském těle se vyskytuje celá řada různých typů kolagenů, přičemž stárnutí pokožky primárně souvisí s jeho redukcí. Nejhonějším strukturním proteinem v pojivové tkáni kůže je kolagen 1. typu, který ji dodává sílu a odolnost. Kolagen 1. typu je syntetizován fybroblasty. Jedná se o buňky, které jsou kromě něj zodpovědné i za tvorbu extracelulární matrix. Kolegen 1. typu je syntetizován jako rozpustný prekurzor prokolagenu 1. typu, jenž je vylučován z fybroblastů a následně proteolyticky zpracováván za vzniku nerozpustných kolagenových vláken. Fragmentace a disperze kolagenových svazků jsou hlavními znaky poškození kůže slunečním zářením (Quan *et al.*, 2004). V této souvislosti bylo prokázáno, že UV záření

narušuje dráhu transformačního růstového faktoru β , který je hlavním regulátorem syntézy prokolagenu 1. typu (Choi *et al.*, 2007). Výsledky *in vitro* a *in vivo* studie Zhao *et al.* (2015) ukázaly, že exprese prokolagenu 1. typu byla v kožních fibroblastech po ošetření daidzeiem výrazně zvýšena. Léčba daidzeinem stimulovala novou produkci kolagenu a současně v kožních fibroblastech inhibovala jeho degradaci, což v kůži vedlo ke kolagenové akumulaci.

Stárnutí pokožky indukují zejména UVB záření, jež je na rozdíl od UVA paprsků silnější a vytváří opálení, či spálení pokožky. Při pokusu na modelu vepřové kůže, který je svými vlastnostmi podobný lidské kůži, UVB záření indukovalo v pokožce produkci volných radikálů kyslíku, což proces stárnutí pokožky urychlilo (Lin *et al.*, 2008). Dle Huang *et al.* (2008) vykazuje daidzein ochranu před UV poškozením kůže pouze svou antioxidační aktivitou. Studie z roku 2011 však zjistila, že primární mechanismus ochrany souvisí s ER β . Equol je schopen aktivovat ER β , což následně zvyšuje expresi antioxidačních enzymů a kolagenu 1. typu. Estrogen je díky své afinitě k ER samozřejmě také velmi účinný v boji proti stárnutí pokožky, avšak kvůli možným zdravotním rizikům spojeným s hormonální terapií se zdá být equol, či daidzein jednoznačně vhodnější variantou (Jackson *et al.*, 2011).

Stárnutí pokožky je také spojeno se ztrátou její vlhkosti a tím i elasticity. Klíčovou sloučeninou podílející se na její hydrataci je kyselina hyaluronová. Je jednou z hlavních složek extracelulární matrix, kde vykazuje významnou afinitu k vodě (Papakonstantinou *et al.*, 2012). Koncentra kyseliny hyaluronové stejně jako tomu je u kolagenu věkem v těle klesá. Studie *in vitro* a *in vivo* na myši kůži zjistila, že daidzein dokáže stimulovat produkci kožní kyseliny hyaluronové a redukovat tak stárnutí pokožky (Miyazaki *et al.*, 2002). O rok později odhalili Miyazaki *et al.* (2003) při *in vitro* a *in vivo* zkoumání pozitivní účinky extraktů z fermentovaného sójového mléka na kultury lidských kožních fibroblastů a na kůži bezsrstých myši. Na rozdíl od nefermentovaného sójového mléčného extraktu vykazoval ten fermentovaný výrazně zvýšené hladiny produkce kyseliny hyaluronové v pokožce. Tento potenciál je dán hlavně díky daidzeinu uvolněnému z jeho glykosidu během procesu fermentace.

3.4.8 Protizánětlivá aktivita

Zánět jde všeobecně charakterizovat jako odpověď organismu na poškození tkáně. Fyziologicky zastává obranou funkci, ale při rozvoji chronického zánětu se může stát poškozující reakcí organismu (Libby, 2008). Zánět může být vyvolán chemickými či fyzikálními vlivy, infekčními mikroorganismy nebo ischemií tkáně. Prvotní reakce organismu na zánět je odpověď lokální, při níž dochází k aktivaci koagulačního, či fibrinolytického systému a poté následuje odezva systémová, charakterizována horečkou, tachykardií nebo leukocytózou. Cílem zánětlivých procesů je ohraničit poškozenou tkáň, eliminovat šíření patogenů, stimulovat imunitní odpověď organismu a navodit ztracenou homeostázu (Hořejší *et al.*, 2017).

Proces, při kterém jsou apoptické buňky odstraňovány buňkami fagocytujícími se nazývá eferocytóza. Lze ji chápat jako jakési „pohřbívání mrtvých buněk“. Bylo prokázáno, že eferocytóza spouští uvolňování molekul, které se podílejí na regulaci imunitního systému a jsou brány za protizánětlivé mediátory (Yen *et al.*, 2014). Jedná se zejména o transformační růstový faktor β , interleukin-10 a prostaglandin E2 (Savill *et al.*, 2002; Michlewska *et al.*, 2007; Ravichandran, 2011). Eferocytózu lze považovat za jeden z mechanismů rozvoje

autoimunitních a chronických zánětlivých onemocnění. Správně fungující eferocytóza je nezbytná pro udržení tělní homeostázy. Selhání tohoto významného procesu může vést k onemocnění tím, že se organismus nebude moci vypořádat se zánětem a sníží se jeho schopnost udržování integrity tkání. Zvýšení eferocytózy může mít tedy terapeutický potenciál u chorob, při nichž je tento proces narušen (Boada-Romero *et al.*, 2020). Možné léčebné účinky daidzeinu na eferocytózu byly zkoumány Yen *et al.* (2014) na makrofázích myši. Právě makrofágy jsou jedny z buněk, které jsou schopny fagocytovat buňky apoptické. Výsledky experimentu nakonec skutečně ukázaly, že daidzein může zvyšovat aktivitu eferocytózy, a to prostřednictvím zvýšené regulace transglutaminázy 2. typu v makrofázích. Právě transglutamináza 2. typu je nezbytným enzymem pro účinnou fagocytózu buněk.

Ve studii Choi *et al.* (2012) ukázal daidzein svůj účinný farmakologický potenciál při léčbě periodontálního zánětu, který byl vyvolán lipopolysacharidem z patogenu *Prevotella intermedia*. I přesto, že je periodontální onemocnění lokální poruchou, chronické záněty ozubice mohou mít vliv i na některé ostatní orgány. O tom existují důkazy, které označují periodontální chorobu jako rizikový faktor různých systémových onemocnění. Jedná se zejména o KVO, diabetes, či mrtvici (Seymour *et al.*, 2007). Daidzein při léčbě periodontálního zánětu výrazně inhiboval vylučování prozánětlivých faktorů prostřednictvím signálních drah transkripčních faktorů STAT1 a NF- κ B (Choi *et al.*, 2012).

Sakamoto *et al.* (2014) ve své studii zjistil, že zánětlivá aktivita makrofágů, kteří jsou schopni infiltrace do bílé tukové tkáně, hraje hlavní roli v inzulínové rezistenci vyvolané obezitou. Obezita je spojena se změnou aktivačního stavu buněk tukové tkáně směrem k prozánětlivějšímu fenotypu, který produkuje cytokiny, způsobující inzulínovou rezistenci. Daidzein je schopen snižovat zánět v bílé tukové tkáni prostřednictvím zvýšené regulace γ receptoru aktivovaného peroxizomovým proliferátorem (PPAR γ). Tento receptor reguluje expresi genů podílejících se na metabolismu glukózy a navíc se ukázal jako klíčový regulátor zánětu spojeného s obezitou. Zmíněný výzkum opět potvrdil protizánětlivý potenciál daidzeinu a navíc pomocí dalšího mechanismu osvětlil jeho léčebný účinek na inzulínovou rezistenci u obézních pacientů

3.4.9 Neuroprotektivní aktivita

Mozková mrtvice patří mezi jedno z nejběžnějších neurologických onemocnění. Je způsobena přerušением krevního zásobování některé části mozku a často vytváří trvalé poškození motorických, sensorických a kognitivních funkcí. Tyto deficity mohou jak samostatně, tak ve své kombinaci výrazně snížit kvalitu života. V současnosti neexistuje žádná schálená léčba, která by po ischemické mrtvici napomáhala k účinnější obnově mozkových funkcí (Cheatwood *et al.*, 2008). Ačkoliv již byly identifikovány rizikové faktory pro vznik tohoto onemocnění, je cévní mozková příhoda stále náhlou událostí a preventivní léčba, jako je dietní intervence, není vždy možná. Z toho důvodu má velký význam objev sloučenin, jež budou během nebo po mozkové mrtvici vykazovat neuroprotektivní a regenerační účinky (Stout *et al.*, 2013). Již dříve bylo zjištěno, že estrogen vykazuje neuromodulační a neuroprotektivní roli v neuronech, avšak hormonální substituční léčba není vzhledem k možným kontraindikacím vhodným řešením (Choi *et al.*, 2013b). V této souvislosti byl zkoumán potenciální léčebný efekt daidzeinu. Ve studii Stout *et al.* (2013) podstoupili potkani trvalou

jednostrannou operaci okluze střední mozkové tepny, čímž došlo k vyvolání mozkové mrtvice v levé hemisféře. U těchto potkanů byly zkoumány změny chování a motorické dovednosti při lezení po žebříku. Potkani, kterým byl subkutánně podáván daidzein po dobu dvou týdnů od mrtvice, vykazovali při pokusech výrazně lepší zotavení oproti kontrolní skupině. Tento fakt naznačuje, že daidzein pravděpodobně skutečně působí jako zprostředkovatel neuroprotektce a funkční obnovy po mrtvici. Ačkoliv přesné mechanismy obnovy mozkových funkcí nejsou stále přímoujištěny, existuje několik možných hypotéz. První z nich polemizuje o neuroprotektivních účincích daidzeinu vazbou na ER v mozku. Při vazbě na mozkový ER β a specifický receptor spojený s G-proteiny vykazoval daidzein na myších primárních kulturách nervových buněk antiapoptické a neuroprotektivní účinky (Kajta *et al.*, 2013). Druhá varianta působení je spojena s arginázou. Argináza je enzym, který převádí L-arginin na močovinu a ornithin. Souvisí však také s axonální plasticitou a neuroprotekcí. Bylo prokázáno, že daidzein indukuje expresi tohoto enzymu, který již u několika *in vitro* a *in vivo* modelů dokázal své příznivé účinky na plasticitu neuronů (Ma *et al.*, 2010). Třetí mechanismus neuroprotektce může být výsledkem vazby daidzeinu na PPAR γ . Antidiabetické léčivo rosiglitazon, což je ligand specifický pro PPAR γ , poskytoval neuroprotektci po cévní mozkové příhodě u potkanů (Fong *et al.*, 2010). Zvýšení exprese PPAR γ vede mimo jiné ke zvýšené regulaci superoxiddismutázy a katalázy, které snižují zánět a buněčnou smrt zprostředkovanou apoptózou (Cho *et al.*, 2010). Tyto tři mechanismy působení se vzájemně nevylučují a některé nebo všechny tyto dráhy by mohly hrát roli při neuroprotekcí, či regeneraci buněk při nervových onemocněních (Stout *et al.*, 2013).

Studie Kim *et al.* (2010) prokázala pozitivní účinky daidzeinu na paměť myši. Poškození paměti bylo vyvoláno skopolaminem, což je rostlinný alkaloid z blínu černého vyvolávající paměťové poruchy. Myši byly následně testovány v Morrisově vodním bludišti. Výsledky naznačily výrazné zmírňující účinky narušení paměti, která je spojena cholinergním systémem, jenž ovlivňuje paměťový výkon. Akutní léčba daidzeinu působila na ER v mozku a zapříčinila zlepšení poruchy paměti vyvolané cholinergní dysfunkcí. Dle dostupných informací by daidzein mohl také inhibovat škodlivé procesy v mozku probíhající při Alzheimerově chorobě. Lze říci, že daidzein by mohl do budoucna představovat potenciální léčivo pro neurodegenerativní onemocnění spojené s mentální dysfunkcí (Wei *et al.*, 2019; Choi *et al.*, 2013).

3.5 Fermentační modely

Již v roce 1992 byla střevní mikrobiota charakterizována jako jakýsi „virtuální orgán“ (Bocci, 1992). Střevní mikrobiota je komplexní ekosystém obsahující více než 1000 druhů mikroorganismů zahrnující všechny oblasti života: archaea, bakterie a eukarya (Kastl *et al.*, 2020). Mikrobiota má široký vliv na metabolismus hostitele a jeho imunitní systém (Tremaroli and Bäckhed, 2012), což se může odrážet na celkovém zdravotním stavu a psychické pohodě (Round and Mazmanian, 2009). Hodnocení střevního složení a jeho dopadu na trávení potravy se *ex vivo* často omezují pouze na vzorky stolice, které však nemohou poskytnout informace o dynamických mikrobiálních procesech v konkrétní části střeva. Proto se nabízejí simulace *in vitro*. Ačkoliv velkým mínusem těchto modelů je nepřítomnost fyziologického prostředí hostitele, mohou ale napodobovat mikrobiální složení a aktivitu v různých oblastech trávicího

traktu. *In vitro* zkoumání tedy nabízí možnost mechanistických studií a vypracování vědeckých hypotéz, které je třeba následně testovat v klinických studiích na zvířecích modelech či na lidech (Venema and Van Den Abbeele, 2013).

Při *in vitro* studiích je důležité vytvořit podmínky, které se co nejvíce podobají situaci *in vivo*. Čím více dokáže systém simulovat skutečnou situaci, tím vyšší je fyziologická významnost získaných informací (Guerra *et al.*, 2012).

3.6 Luminální modely střeva

Výběr vhodného *in vitro* modelu je velmi důležitým parametrem pro dosažení cílů konkrétní studie. Jednotlivé typy systémů vykazují specifické výhody i různá omezení (Payne *et al.*, 2012).

3.6.1 Dávkové modely fermentace

Dávková fermentace popisuje růst čisté nebo smíšené bakteriální suspenze ve vybraném médiu bez dalšího přidávání živin. Tyto modely se nejčastěji objevují jako uzavřené systémy využívající uzavřené zkumavky nebo nádoby reaktoru obsahující suspenze fekálního materiálu, který musí být udržován v anaerobních podmínkách (Payne *et al.*, 2012). Tyto systémy nejsou fyziologicky přesné. V situaci kdy dojde k akumulaci mikrobiálních metabolitů, které inhibují další mikrobiální aktivitu, dochází obvykle k prodloužení inkubace až na 24 a více hodin. Ze složitějších systémů je ale zřejmé, že většina těchto sloučenin je fermentována mnohem rychleji, což naznačuje omezení těchto dávkových inkubací (Venema and Van Den Abbeele, 2013). Ve skutečnosti tyto modely kvůli změnám pH, redoxního potenciálu a struktuře mikrobiální komunity nepřinesou přesné výsledky (Gibson and Fuller, 2000). Avšak individuální variace složení mikrobioty z nich činí významné systémy pro počáteční screeningové testy (Venema and Van Den Abbeele, 2013).

3.6.2 Modely kontinuální fermentace

Kontinuální kultivační fermentační modely se vyskytují jako jednostupňové nebo vícestupňové systémy. Jsou nezbytné pro provádění dlouhodobých studií, jelikož je v nich usnadněno doplňování substrátu a odstraňování toxických produktů (Payne *et al.*, 2012). Jednostupňové modely kontinuální fermentace jsou často využívány k objasnění funkce proximální části tlustého střeva a jeho metabolické aktivity (Macfarlane and Macfarlane, 2007). Lidské tlusté střevo se však skládá ze vzestupné, příčné a sestupné části, přičemž v každé této oblasti byla prokázána jiná metabolická aktivita a rozdílné zastoupení mikroorganismů (Macfarlane *et al.*, 1992). Rozvoj vícestupňových fermentačních modelů byl proto významným pokrokem v *in vitro* zkoumání tlustého střeva. Tyto systémy umožňují simulaci procesů v jeho dílčích částech díky kombinaci tří chemostatů zapojených do série, jež replikují proximální, příčnou a distální část tlustého střeva (Macfarlane *et al.*, 1998). Jedním z hlavních rozlišujících faktorů mezi různými systémy kontinuální fermentace *in vitro* je technika používaná pro fekální inokulaci. Většina *in vitro* systémů užívá jako inokulum kapalnou fekální suspenzi (Cinquin *et al.*, 2004). U modelů s tekutým fekálním inokulem dochází k rychlému vymývání méně kompetitivních bakterií, přičemž je jejich provozní doba omezená na maximálně 4 týdny

(Macfarlane *et al.*, 1998; De Boever *et al.*, 2001). Cinquin *et al.* (2006) popsal ve své studii řešení problému spojeného s vymýváním inokula, a to prostřednictvím imobilizace fekální mikrobioty. Ta způsobuje suspenzi fekální mikrobioty v porézní polysacharidové matici, což vede ke vzniku fekálních kuliček, které jsou přeneseny do růstového média v proximální části více stupňového modelu kontinuální fermentace. Tyto kuličky se vyznačují velmi dobrou stabilitou a vysokou buněčnou hustotou. Následně z nich dochází k postupnému uvolňování buněk, které jsou transportovány do příčné a distální oblasti střeva. To vede k samostatnému modelu kontinuální fermentace s velmi vysokou hustotou buněk a značnou mikrobiální populací, jež je blízká té v gastrointestinálním traktu člověka.

3.6.3 Umělé trávicí systémy

Kombinace zažívacích pochodů hostitele *in vitro* ve spojení s víceúrovňovým modelem kontinuální fermentace představuje dosud nejpokročilejší systém, který simuluje vzájemně závislé fyziologické funkce v tenkém i tlustém střevě (Blanquet-Diot *et al.*, 2009). V roce 1993 byl Molly *et al.* vyvinut multikomponentní dynamický simulátor lidského střeva (SHIME). Tento systém zahrnuje sérii pěti fermentačních nádob za sebou, provozovaných v sekvenčním dávkovacím režimu. První dva chemické reaktory simulují procesy trávení v duodenu/jejunu a ileu a zbylé reaktory představují tříúrovňový model tlustého střeva. Pomocí systému SHIME byla například stanovena úloha mikrobiálního metabolismu při zvyšování biologické dostupnosti toxických sloučenin, jako jsou polycyklické aromatické uhlovodíky (Van de Wiele *et al.*, 2003) nebo arsen (Laird *et al.*, 2007). Výsledky získané fermentací pomocí modelu SHIME však nejsou 100%, jelikož stále chybí imunomodulační a neuroendokrinní odpovědi (Payne *et al.*, 2012).

4 Metodika

4.1 Chemikálie

K analýze byl použit NH_4HCO_3 , NaHCO_3 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, trypton, glukóza, maltóza, kvasnicový extrakt, resazurin, hydrochlorid cysteinu, 1M NaOH, $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, OFN plyn, 6M HCl, vitamin K1 a hemin. Dále byl využit 1.5 M fosfátový pufr, azid sodný a 5 mM TSP \cdot D₂O.

4.2 Fermentační médium

Pro přípravu fermentačního média bylo použito 2,25 g tryptonu, 2,25 g glukózy, 1,125 g maltózy, 2,25 g kvasnicového extraktu, 50,7 μl vitamínu K1 (0,5 mg/l) a 5,07 mg heminu (5 mg/l) rozpuštěných ve 450 ml destilované vody. Následně bylo přidáno 112,5 μl mikromolekulárního roztoku (CaCl_2 , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, FeCl_2), 225 ml pufru CO_3 (hydrogenuhličitán amonný, hydrogenuhličitán sodný), 225 ml makromolekulárního roztoku (Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , MgSO_4) a 1,125 ml 0,1% roztoku resazurinu. Všechny chemikálie pro výrobu fermentačního média byly zakoupeny ve společnosti Merck (Darmstadt, Germany).

4.3 Redukční činidlo

Redukční činidlo bylo připraveno směsí 312,5 mg cystein hydrochloridu, 2 ml 1M NaOH a 101,5 mg Na_2S , k nimž byla přidána destilovaná voda do požadovaného objemu 50 ml.

4.4 Zásobní a pracovní roztok daidzeinu

Pro přípravu zásobního roztoku byl daidzein rozpuštěn v dymethylsulfoxidu (DMSO) v koncentraci 10 mg/ml (finální koncentrace DMSO modelu byla 0,5 %) a takto byl skladován při teplotě 4 °C. V den experimentu byl připraven pracovní roztok daidzeinu o koncentrace 2 mg/ml, jenž se skládal z 500 μg zásobního roztoku a 2000 μl fermentačního média.

4.5 Fekální inokulum

K experimentu byla využita čerstvá stolice 20 dárců. Jednalo se o dobrovolníky, kteří byli rozděleni do dvou skupin. Skupinu A tvořili jedinci do 45 let a skupina B sestávala z osob starších 70 let, přičemž bližší informace o dárcích jsou zaznamenány v tabulce 4 a 5. Každý z dárců poskytl před zahájením studie souhlas se zařazením se do studie, která byla taktéž schválena Etickou komisí České zemědělské univerzity v Praze. Vzorek stolice od jednotlivých dárců byl odebrán do jednorázových sad, uzavřen do sáčku s anaerogenem a maximálně do 2 hodin byl vzorek zpracován. Z každého vzorku bylo naváženo 24 g a zhomogenizováno se 75 ml sodno-fosfátového pufru (KH_2PO_4 a Na_2PO_4). Následně byl vzorek přefiltrován přes nylonový filtr za vzniku 24% roztoku fekálního inokula.

Tabulka 4 Bližší specifikace dárců z věkové skupiny A

Dárce	Věk (roky)	Váha (kg)	Výška (cm)	BMI	Pohlaví
A1	12	36	149	16,22	Muž
A2	42	87	193	25,98	Muž
A3	45	63	171	21,55	Muž
A4	41	57	165	20,94	Žena
A5	28	56	163	24,46	Žena
A6	26	81	186	23,41	Žena
A7	30	60	162	22,86	Žena
A8	25	105	185	30,68	Žena
A9	32	78	165	28,65	Žena
A10	24	80	177	25,24	Žena

Tabulka 5 Bližší specifikace dárců z věkové skupiny B

Dárce	Věk (roky)	Váha (kg)	Výška (cm)	BMI	Pohlaví
B1	80	69	167	24,74	Žena
B2	75	74	173	24,73	Žena
B3	76	66	160	25,78	Žena
B4	76	91	185	26,59	Muž
B5	75	67	167	24,02	Žena
B6	75	93	173	31,07	Muž
B7	70	72	160	28,13	Žena
B8	72	76	170	26,30	Muž
B9	74	74	163	27,85	Žena
B10	71	80	170	24,69	Muž

4.6 Příprava 96-jamkových deep-well destiček

Fermentační médium bylo převařeno po dobu 7 minut a poté bylo zchlazeno na teplotu 37 °C, za stálého přísunu plynného dusíku. Pomocí 6M HCl bylo pH upraveno na hodnotu 7. Každá jamka z 96-jamkové deep-well destičky byla naplněna 835 µl fermentačního média a 40 µl redukčního činidla. Poté byly destičky spolu s anaerogenem zataveny do vakuových sáčků a skladovány při teplotě 4 °C. Následující den byly fermentační destičky zahřáty na 37 °C, do jamek bylo napipetováno 100 µl fekálního inokula a 25 µl pracovního roztoku daidzeinu (konečná koncentrace 50 µg/ml). Do jamek představujících kontrolu byl přidán pufr fosforečnanu sedného.

4.7 Inkubace *in vitro*

Připravené deep-well destičky s anaerogenem byly vloženy do inkubátoru (37 °C, 100 ot/min), který měl simulovat podmínky v lidském střevě. V časových bodech 0, 2, 4, 8 a

24 hodin byly odebrány vzorky (950 μ l), do nichž bylo přidáno 50 μ l azidu sodného (3 mg/ml) k zastavení metabolických reakcí. Vzorky byly až do samotné analýzy hluboce zmrazeny na teplotu -80 °C.

4.8 Příprava vzorků pro NMR analýzu

Vzorky byly rozmrazeny při pokojové teplotě, zhomogenizovány pomocí vortexu a zcentrifugovány (10 minut, 15 000 rpm, 4 °C). Odebraný supernatant o objemu 600 μ l byl smísen spolu s 66,6 μ l NMR pufru (1.5 M fosfátový pufr, pH 7,4 0,2% azid sodný a 5 mM TSP v D₂O) a znovu zcentrifugován (5 minut, 15 000 rpm, 4 °C). Do NMR kyvet bylo přepipetováno 600 μ l supernatantu a ihned změřeno pomocí NMR.

4.9 NMR analýza

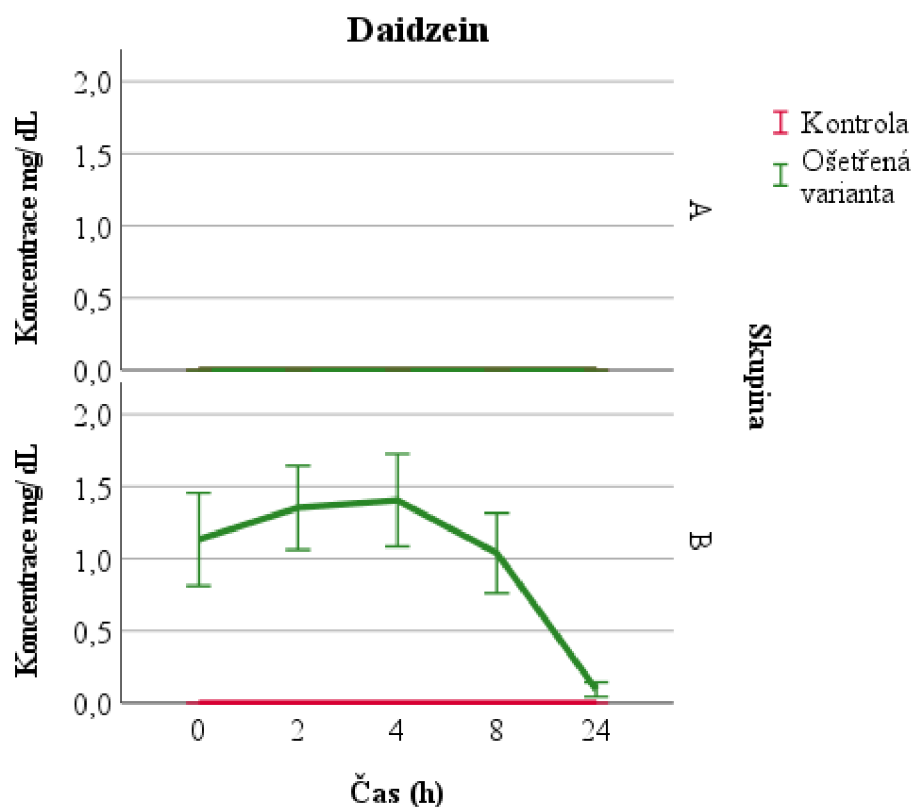
Spektra byla změřena na spektrometru Bruker Avance III vybaveném broadband observation sondou (BBFO) SmartProbe s gradienty v ose Z (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Německo) pracující při protonové frekvenci 500,23 MHz. Teplota měření byla 298 K (25 °C). ¹H NMR spektra byla získána a zpracována za stejných podmínek. Pro potlačení signálu vody byla použita pulzní sekvence noesypr1d při 4,704 ppm. Pro každý vzorek byl použit jednodimenzionální ¹H experiment s následujícími parametry: počet skenů NS 128, počet datových bodů 32k při šířce spektra 16 ppm, relaxační prodleva 1 s, akviziční čas 4 s, směšovací čas 0,1 s. Ladění přístroje, kalibrace 90° pulzu a šimování byly optimalizovány automaticky pomocí standardních automatických rutin (atma, lock, rga, pulsecal a topshim). Signál volné precese (FID) byl před Fourierovou transformací zpracován zero filling, line broadening 0,3 Hz a exponenciální multiplikací. Spektra byla manuálně fázována a referencována na TSP 0.00 ppm v programu Topspin. Alignment a export spekter byl proveden v programu Mestrenova, anotace látek a kvantifikace v programu Chenomx 8.5.

4.10 Statistické analýzy

Výsledky byly vyhodnoceny pomocí programu Statistica a SPSS (IBM corp.) verze 27. Byl proveden párový t-test pro jednotlivé časy odběrů mezi vzorky kontrol a ošetřených daidzeinem. Dále byl proveden dvouvýběrový t-test pro jednotlivé časy odběrů mezi skupinou A a skupinou B, odděleně pro ošetřenou a neošetřenou variantu daidzeinem.

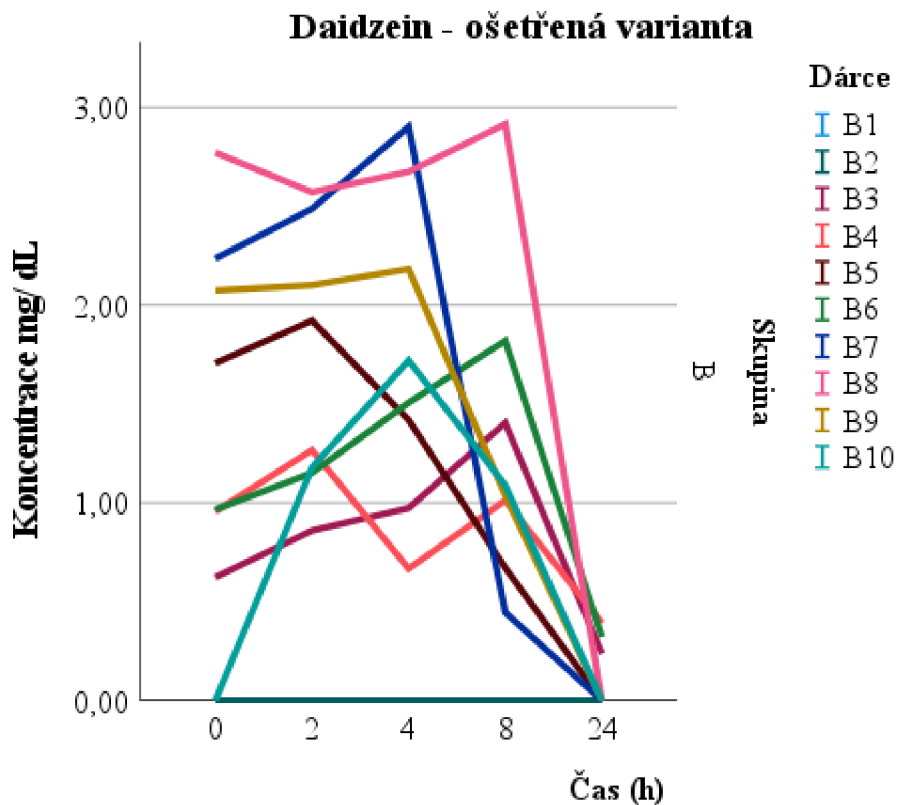
5 Výsledky

Pomocí NMR analýzy bylo zjištěno, že u dárců ze skupiny A nebyl v žádném čase detekován přídavek daidzeinu a stejně tak se nevyskytoval ani u kontrolních vzorků. Naopak jak je vidět v Grafu 1, ve skupině B byly naměřeny statisticky významné rozdíly mezi ošetřenými vzorky a naošetřenou variantou v časech 0, 2, 4 a 8 hodin. Daidzein se u kontrolního měření nevyskytoval ani v jednom z případů.



Graf 1 Průměrná koncentrace daidzeinu (\pm směrodatná odchylka) v závislosti na čase u ošetřené varianty po přidavku daidzeinu ($n = 20$) a u kontroly bez daidzeinu ($n = 20$) ve věkové skupině A (mladší 45 let) a B (starší 75 let).

Koncentrace daidzeinu v ošetřené variantě se značně lišily i u konkrétních dárců ze skupiny B. U dvou z nich byly naměřeny nulové hodnoty a u zbylých osmi dárců se koncentrace daidzeinu v různých časech pohybovaly od 0 do 2,92 mg/dl, přičemž nejvyšších koncentrací bylo ve většině případů dosahováno mezi časy 4 a 8 hodin. Rozdíl v koncentracích daidzeinu u jednotlivých dárců je znázorněn v Grafu 2. Kromě věku (70 +) nebyla mezi dárci s nejvýše dosaženými koncentracemi daidzeinu prokázána bližší spojitost. Metabolit daidzeinu, equol nebyl detekován u žádného z dárců.



Graf 2 Koncentrace daidzeinu v jednotlivých časech u dárců z věkové skupiny B (starší 75 let).

Kromě analýzy metabolismu daidzeinu a jeho metabolitů byl sledován také vliv daidzeinu na metabolom. Statisticky významné ovlivnění koncentrací jednotlivých látek po přidavku daidzeinu oproti kontrole je blíže znázorněno v Tabulce 6.

Tabulka 6 Souhrn sledovaných látek a výsledků ze statistických analýz, * $p < 0,05$;
 $N(B) = 10$, $N(A) = 10$; B: starší 75 let; A: mladší 45 let; ↓↑ šipky znázorňují sníženou nebo
zvýšenou průměrnou koncentraci sledované látky, DAI: vzorky ošetřené daidzeinem; KON:
vzorky bez daidzeinu

Sledovaná látká	DAI vs KON					B vs A KON										B vs A DAI									
	ošetřená var.					B					A					B					A				
Time point	0	2	4	8	24	0	2	4	8	24	0	2	4	8	24	0	2	4	8	24	0	2	4	8	24
Acetát	↑	↓	↓	↓	↓											↓	↓	↓*	↓*	↓*	↑	↑	↑*	↑*	↑*
Alanin																									
Betain						↑	↑	↓	↑	↑*	↓	↓	↑	↓	↓*	↑*	↑	↑	↑	↑*	↓*	↓	↓	↓	↓*
Butyrát	↓	↓	↓*	↓	↓											↓	↓	↓	↓*	↓	↑	↑	↑	↑*	↑
Daidzein	↑*	↑*	↑*	↑*	↑*											↑*	↑*	↑*	↑*	↑*	↓*	↓*	↓*	↓*	↓*
Equol																									
Etanol																									
Glukóza	↑	↑	↑*	↑	↑	↑*	↑	↑	↓	↓	↓*	↓	↓	↓	↑	↑*	↑	↑*	↑	↑	↓*	↓	↓*	↓	↓
Glutamát																									
Izobutyřát																									
Izovalerát																									
Laktát																									
Metanol	↑	↑*	↓	↑	↓																				
Methionin																									
Propionát	↓*	↓*	↓	↓	↓																				
Pyroglutamát						↓	↑	↑	↑*	↑	↓	↓	↓	↓*											
Sukcinát	↓	↓	↓	↑*	↑																				
Valerát	↓*	↓*	↓*	↓	↓																				

6 Diskuze

Získaná data ukazují, že se daidzein svou stabilitou v prostředí tlustého střeva u dvou sledovaných věkových skupin lišil. Zatímco u věkové skupiny A byl daidzein ihned intenzivně metabolizován, u 80 % dárců ze skupiny B došlo k jeho přeměně až po 24 hodinách. Toto zjištění může poukazovat na o mnoho rychlejší metabolismus skupiny dárců A, jež sestávala pouze z osob do 45 let věku. Významný metabolit daidzeinu equol však nebyl detekován u žádného dárce v ani jedné věkové skupině. Tato skutečnost může být dána faktem, že nikdo z dárců není producentem equolu, silného fytoestrogenu, který dokáže v západní populaci produkovat pouze 20–30 % obyvatelstva (Rafii, 2015). Jak už je zmíněno výše v kapitole Equol tyto rozdíly jsou dány složením střevní mikrobioty, přičemž významnou roli sehrává taktéž strava (Sosvorová *et al.*, 2011). Jak již Setchell a Cole (2006) uvedli ve své studii, strava může definovat bakteriální profil střeva a současně i složky stravy jako je vláknina a rostlinné bílkoviny mohou syntézu equolu podporovat. Všechny látky v naší studii byly analyzovány pomocí NMR, což je metoda vhodná k tzv. „fingerpritingu“ metabolomu. Mezi výhody NMR se řadí zejména nedestruktivní technika, minimální příprava vzorků před analýzou, snadná identifikace neznámých sloučenin. Naopak nevýhodou této metody je nízká citlivost měření, která by taktéž mohla souviset s nedetekovanými koncentracemi equolu v naší studii. Nami provedenou analýzou byly naměřeny nízké koncentrace daidzeinu, v řádech jednotek mg/dl, a proto nemusel být jeho metabolit equol vůbec detekován. K bližšímu zkoumání by bylo vhodné v budoucnu použít metodu kapalinové chromatografie s kombinací hmotnostní spektrometrie (LC/MS), která je charakterizována vysokou citlivostí, zejména pak v profilování primárních i sekundárních metabolitů (Musilová a Glazt, 2011).

Na základě analýzy metabolismu daidzeinu a dalších sledovaných látek došlo po ošetření vzorků daidzeinem k potlačení produkce mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCFA). Mezi hlavní zástupce SCFA se řadí acetát, propionát, butyrát a dále kyselina valerová a kyselina koproová. SCFA jsou těkavé mastné kyseliny produkované specifickými anaerobními bakteriemi v tlustém střevě. Jedná se o fermentační produkty potravinových složek, kterými jsou zejména nestravitelné sacharidy (Ríos-Covián *et al.*, 2016). Tyto polysacharidy se nazývají fermentovatelné polysacharidy a jsou dále klasifikovány jako neškrobové polysacharidy, dietní vláknina a rezistentní škrob. Vláknina se dále dělí na rozpustnou a nerozpustnou. Mezi nerozpustnou vlákninu je řazena celulóza a lignin a naopak pektinové látky a gummy tvořící gel ve vodě patří mezi vlákninu rozpustnou. Zatímco nerozpustná vláknina je charakterizována nízkou fermentovatelností, přičemž slouží zejména ke zvýšení objemu stolice a jeho rychlejším průchodem tlustým střevem, nerozpustná vláknina je vysoce fermentovatelná, a proto generuje větší množství SCFA. Jako substráty pro SCFA jsou považovány také oligosacharidy – galaktooligosacharidy, fruktooligosacharidy, mannanoligosacharidy či chitooligosacharidy. V neposlední řadě jsou některé SCFA, konkrétně izobutyryát a izovalerát, produkovány během katabolismu aminokyselin s rozvětveným řetězcem valinu, leucinu nebo isoleucinu a současně může být na SCFA metabolizován také laktát či ethanol (Tan *et al.*, 2014). SCFA jsou následně absorbovány kolonocyty, epitelovými buňkami tlustého střeva, pro které jsou hlavním energetickým zdrojem. Kolonocyty zmetabolizují 70 – 90 % butyrátu, a ten se tak stává pro jejich látkovou přeměnu nejdůležitější SCFA (Cook and Sellin, 1998). Acetát a propionát jsou kolonocyty

méně intenzivně metabolizovány a následně se dostávají do jater, kde mohou být substrátem pro jaterní glukoneogenezi a biosyntézu lipidů (Tan *et al.*, 2014; Ríos-Covián *et al.*, 2016). Kromě energetického zdroje kolonocytů je SCFA připisována řada pozitivních účinků na lidské zdraví. Jedním z nich je schopnost SCFA snížit lumenální pH, což samo o sobě inhibuje patogenní organismy a zvyšuje absorpci některých živin (Macfarlane *et al.*, 1998). Dále bylo pozorováno, že SCFA, zejména butyrát, chrání před rozvojem kolorektálního karcinomu (Canani *et al.*, 2011; Keku *et al.*, 2015), či před zánětlivým onemocněním střev (Donohoe *et al.*, 2014). Míra produkce SCFA opět značně závisí na dietních faktorech. Jak již zmínil Wanders *et al.* (2012) ve své studii, tak strava může změnit složení střevní mikrobioty již během jednoho dne a dokonce i nepatrná obměna dietních zvyklostí, jako je přidavek vlákniny, by mohla formovat mikrobiální komunitu (Donohoe *et al.*, 2011). Opět se dostáváme k ne příliš vhodnému složení západní stravy, které je typické vysokým obsahem tuku a stravitelných sacharidů, jež jsou absorbovány v duodenu a zanechávají tak málo substrátu pro bakterie tlustého střeva. Tyto dietní chyby mají za následek dysbiózu, zhoršené složení střevní mikrobioty a vedou k náchylnosti k výše uvedeným onemocněním (Tan *et al.*, 2014). Z těchto poznatků vyplývá, že příjem daidzeinu měl u všech dárců negativní vliv na produkci SCFA, s níž může souviset řada již popsaných zdravotních dopadů. U skupiny B byl tento jev navíc pozorován intenzivněji než u skupiny mladších dárců. Z naší provedené statistické analýzy bylo také zjištěno, že daidzein zvyšoval hladiny glukózy u všech sledovaných dárců, přičemž u skupiny B docházelo ke statisticky významnějšímu vzrůstu oproti skupině skupině A. Tato skutečnost by mohla taktéž souviset se sníženými hladinami SCFA. Pokusaeva *et al.*, (2011) ve své studii zaměřené na metabolismus sacharidů u bifidobakterií totiž uvádí, že jako substrát pro SCFA mohou fungovat i monosacharidy nacházející se v tlustém střevě. Ze zmíněného zjištění by tedy šlo usuzovat, že daidzein mohl inhibovat produkci SCFA z monosacharidů, čímž došlo v konečném důsledku ke zvýšení koncentrace glukózy a snížení koncentrací SCFA oproti kontrolním vzorkům.

Daidzein ve stolici zvyšoval u obou sledovaných skupin produkci sukcinátu. Tato dikarboxylová kyselina je aniont kyseliny jantarové a hraje klíčovou roli při tvorbě adenosin trifosfátu v mitochondriích (Mills and O'Neill, 2014). Sukcinát vzniká v těle jako intermediární metabolit cyklu trikarboxylové kyseliny nebo krebsova cyklu, což je centrální cesta v buněčném dýchání, která probíhá v mitochondriální matrixi (Tretter *et al.*, 2016). Sukcinát je dále syntetizován také ve střevě jako vedlejší produkt anaerobní fermentace, jehož hlavním producentem jsou bakterie kmene Bacteroidetes. V tlustém střevě je sukcinát typicky detekován v relativně nízkých koncentracích, jelikož se velmi rychle přeměňuje jako meziprodukt při produkci propionátu. Poruchy metabolismu střevní mikrobioty, které narušují normální fermentaci, mohou tedy způsobovat akumulaci sukcinátu ve střevě (Connors *et al.*, 2018). Daidzein pravděpodobně inhiboval přeměnu sukcinátu na propionát, což také opět koreluje se sníženými hladinami SCFA v naší sledovaných vzorcích. Tuto teorii podpořil i Connors *et al.* (2018) ve své studii, kde uvádí, že akumulace sukcinátu v lumen střeva souvisí se změnami hladiny SCFA. Dále popisuje schopnost zvýšené hladiny sukcinátu měnit metabolismus střevní mikrobioty, což potenciálně ovlivňuje expanzi patobiontů, kteří využívají sukcinát jako zdroj živin.

Přidavek daidzeinu rovněž zvýšil u skupiny starších dárců hladiny aminokyseliny betainu a aminokyselinový derivát pyroglutamát vykazoval oproti mladší skupině vyšší koncentrace už

v kontrolních vzorcích. Betain neboli trimethylgicin je přijmán potravou, ke které se řadí například pšeničné otruby a klíčky, řepa či špenát. V lidském těle může být syntetizován také z cholinu (Zhao *et al.*, 2018). Betain je životně důležitým donorem methylové skupiny při transmethylaci, což je reakce katalyzující homocystein za vzniku methiotinu, který je základní enesciální aminokyselinou v lidském těle (Hoffmann *et al.*, 2013). Zároveň funguje jako důležitý osmoprotektant, především v lednivách, játrech a mozku, čímž chrání buňky, proteiny a enzymy při osmotickém stresu (Kempson *et al.*, 2013). Zhao *et al.* (2018) ve své studii mechanistických aspektů a aplikací betainu shrnul, že v důsledku výše zmíněných funkcí má tato aminokyselina příznivé účinky u několika lidských onemocnění, jako je obezita, cukrovka, rakovina a Alzheimerova choroba. Jelikož se jedná o onemocnění, jejichž prevalence se zvyšuje s věkem, lze usuzovat, že daidzein může u starších osob příznivě ovlivňovat jejich zdravotní stav v souvislosti s těmito chorobami. Pyroglutamát neboli také 5-oxoprolin je cyklický laktam kyseliny glutamové. Vzniká jako meziprodukt degradace glutathionu nebo při spontánní cyklizaci aktivovaného glutamátu. Pyroglutamát je brán jako důležitý determinant funkčnosti mnoha neuropeptidů, které působí na uvolňující hormon thyrotropin, gastrin či neurotensin. Je také nezbytný pro funkci thyrotropinu a jakákoliv změna nebo substituce v laktamovém kruhu pyroglutamátu významně snižuje účinnost hormonu (Kumar and Bachhawat K., 2012). Pyroglutamát byl také sledován u Alzheimerovi choroby, kde glutamátem modifikované amyloid- β peptidy získávají značnou pozornost jako potenciální klíčoví účastníci patologie tohoto onemocnění, kvůli jejich hojnosti v mozku u osob postižených Alzheimerovou chorobou, vysoké náchylnosti k agregaci, stabilitě a buněčné toxicitě (Jawhar, Wirths and Bayer, 2011). Funkce pyroglutamátu jako volné kyseliny jsou však méně jasné, jelikož je analogem glutamátu a jeho potencionálním prekurzorem a rezervou, čímž je silně spojen se všemi procesy zahrnujícími tuto aminokyselinu (Kumar and Bachhawat K., 2012). Ponnusamy *et al.* (2011) ve své studii metabolomu střevní mikrobioty u pacientů postižených syndromem dráždivého tračníku kromě několika dalších metabolitů detekoval vysoké hladiny kyseliny pyroglutamové, které korelovaly se zvýšenou přítomností laktobacilů a klostridií. Zda mohlo zvýšení pyroglutamátu v našem případě taktéž souviset se zvýšenou přítomností těchto bakterií je nejasné a mělo by být předmětem dalšího zkoumání.

V našem experimentu byl analyzován také metanol, který je nejjednodušším jednosytným alkoholem. U lidí je považován za jed, jelikož se v těle metabolizuje především na toxický formaldehyd (Cederbaum, 2012). Metanol vzniká jako nežádoucí produkt při výrobě ovocných a zeleninových šťáv, a to hydrolýzou metylesterových skupin v pektinech působením enzymu pektinesterázy. Vyskytuje se proto přirozeně v nízké koncentraci v čerstvých ovocných a zeleninových šťávách a ve většině alkoholických nápojů (Dorokhov *et al.*, 2015). Z tohoto důvodu jsou stanoveny bezpečnostní limity metanolu, které mají zamezit rizikosti výrobků pro sportřebitele. V EU je tento limit stanoven na 10 g methanolu v 1 litru etanolu (Commission Directive 2010/59/EU, 2010). V naší analýze došlo po ošetření daidzeinem ke zvýšení hladin metanolu oproti kontrolním vzorcím, a to v průměru o 0,1 mg/dl. Tato skutečnost je pravděpodobně způsobena endogenním zdrojem metanolu, jímž je střevní mikrobiota. Dorokhov *et al.* (2015) ve své studii molekulárních drah a fyziologických rolí metanolu uvádí, že mezi nejhojnější bakterie, které ve vzorcích stolice nesly geny kódující enzymy produkující metanol, se řadí *Eubacterium rectale*, *Escherichia coli* či *Bacteroides vulgatus*. Tyto účastníci střevní mikrobioty jsou tedy nejdůležitějším kandidátem na produkci

endogenního metanolu, po níž následuje jeho oxidace na formaldehyd, kyselinu mravenčí a oxid uhličitý. Koncentrace metanolu u námi sledovaných vzorků se pohybovala v průměru okolo 3,77 mg/dl, což jsou běžné hodnoty odpovídající normě (Dorokhov *et al.*, 2015). Katabolismus těchto hladin metanolu a formaldehydu je v těle komplexní, vícevrstvý a vysoce účinný proces. Narušení kontroly metabolismu formaldehydu však může být kauzální faktor u neurodegenerativních onemocnění, jako je Alzheimerova choroba či demence (Tong *et al.*, 2011; Tong *et al.*, 2013).

7 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo potvrdit či vyvrátit dvě stanovené hypotézy. První hypotéza uvádí, že bude daidzein transformován střevní mikrobiotou a druhá říká, že zjistíme rozdíly mezi katabolity daidzeinu ve dvou sledovaných věkových skupinách. Z námi provedeného experimentu bylo zjištěno, že koncentrace daidzeinu v jednotlivých časech se mezi skupinami značně lišily a hlavní analyzovaný metabolit daidzeinu equol, nebyl detekován ani v jedné věkové skupině. Koncentrace daidzeinu u věkové skupiny A sestávající z osob do 45 let věku byly ve všech časech nulové a naopak u skupiny B nad 70 let dosahovaly až přibližně 3 mg/dl. Tento jev mohl být způsoben velice rychlým metabolismem mladých dárců, přesnou odpověď by však mohlo přinést další zkoumání. Absence nejdůležitějšího metabolitu daidzeinu – equolu u všech dárců mohla poukazovat na fakt, že nikdo z těchto osob neměl přizpůsobenou střevní mikrobiotu k tomu, aby mohl být producentem equolu. Druhou možností byly nepřesné výsledky vycházející z NMR analýzy, která je méně citlivá a nemusí tak velmi nízké hladiny equolu vůbec detekovat. Z tohoto důvodu by bylo vhodné provést analýzu daidzeinu a jeho katabolitů ještě jednou, ale tentokrát za pomoci kapalinové chromatografie v kombinaci s hmotností spektrometrií (LC/MS), která vykazuje lepší citlivost v profilování metabolitů. Dále bylo v našem experimentu analyzováno dalších 16 látek a možný vliv daidzeinu na tyto látky. Z tohoto zkoumání bylo zjištěno, že daidzein působí na SCFA a snižuje jejich koncentraci, přičemž byl tento jev pozorován intenzivněji u starší skupiny dárců. U glukózy daidzein naopak napomáhal zvyšovat její koncentraci a to opět intenzivněji u skupiny B (>70 let). Současně byly po ošetření vrozků daidzeinem zjištěny vyšší průměrné koncentrace etanolu. Mezi těmito skutečnostmi byly nalezeny možné souvislosti, které pravděpodobně pramení z ovlivnění střevní mikrobioty daidzeinem, což vede k následným změnám v metabolismu některých látek. Rozdíl mezi metabolismem daidzeinu a jeho vlivem na další důležité látky v těle evropanů mezi různými věkovými skupinami je stále nepříliš objasněné téma. Daidzein a equol jakožto jedny z nejvýznamnější fytoestrogenů s potenciálním léčebným účinkem by měli být s ohledem na věkové skupiny obyvatel předmětem dalšího zkoumání.

8 Literatura

- Adams, J.D. et al. (1991) 'Alzheimer's and Parkinson's disease - Brain levels of glutathione, glutathione disulfide, and vitamin E', *Molecular and Chemical Neuropathology*, 14(3), pp. 213–226. doi:10.1007/BF03159937.
- Adámková, V (2011) „Realita dodržování stravovacích doporučení v praxi - strava jako prevence civilizačních chorob“, *Interní medicína pro praxi*, 13(11), s. 427-430.
- Adlercreutz, H. (2002) 'Phyto-oestrogens and cancer', *Lancet Oncology*. Lancet Publishing Group, pp. 364–373. doi:10.1016/S1470-2045(02)00777-5.
- Adlercreutz, H., Markkanen, H. and Watanabe, S. (1993) 'Plasma concentrations of phyto-oestrogens in Japanese men', *The Lancet*, 342(8881), pp. 1209–1210. doi:10.1016/0140-6736(93)92188-Y.
- Ae Park, S. et al. (2006) 'Genistein and daidzein modulate hepatic glucose and lipid regulating enzyme activities in C57BL/KsJ-db/db mice', *Life Sciences*, 79(12), pp. 1207–1213. doi:10.1016/j.lfs.2006.03.022.
- Akaza, H. et al. (2004) 'Comparisons of percent equol producers between prostate cancer patients and controls: Case-controlled studies of isoflavones in Japanese, Korean and American residents', *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 34(2), pp. 86–89. doi:10.1093/jjco/hyh015.
- Aso, T. et al. (2012) 'A natural S-equol supplement alleviates hot flushes and other menopausal symptoms in equol nonproducing postmenopausal Japanese women', *Journal of Women's Health*, 21(1), pp. 92–100. doi:10.1089/jwh.2011.2753.
- Atkinson, C., Frankenfeld, C.L. and Lampe, J.W. (2005) 'Gut Bacterial Metabolism of the Soy Isoflavone Daidzein: Exploring the Relevance to Human Health', *Experimental Biology and Medicine*, 230(3), pp. 155–170. doi:10.1177/153537020523000302.
- Barnes, S. (2010) 'The biochemistry, chemistry and physiology of the isoflavones in soybeans and their food products', *Lymphatic Research and Biology*, pp. 89–98. doi:10.1089/lrb.2009.0030.
- Beaglehole, R. (1990) 'International trends in coronary heart disease mortality, morbidity, and risk factors', *Epidemiologic Reviews*, 12(1), pp. 1–15. doi:10.1093/oxfordjournals.epirev.a036048.
- Beck, V., Rohr, U. and Jungbauer, A. (2005) 'Phytoestrogens derived from red clover: An alternative to estrogen replacement therapy?', *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 94(5), pp. 499–518. doi:10.1016/j.jsbmb.2004.12.038.
- Bhagwat, S. and Haytowitz, D.B. (2015) *USDA Database for the Isoflavone Content of Selected Foods Release 2.1*.
- Bharath, S. et al. (2002) 'Glutathione, iron and Parkinson's disease', *Biochemical Pharmacology*, 64(5–6), pp. 1037–1048. doi:10.1016/S0006-2952(02)01174-7.
- Blanquet-Diot, S. et al. (2009) 'Digestive stability of xanthophylls exceeds that of carotenes as studied in a dynamic in vitro gastrointestinal system', *Journal of Nutrition*, 139(5), pp. 876-883. doi:10.3945/jn.108.103655.
- Blaut, M., Schoefer, L. and Braune, A. (2003) 'Transformation of flavonoids by intestinal microorganisms', in *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. Hogrefe and Huber Publishers, pp. 79–87. doi:10.1024/0300-9831.73.2.79.
- Boada-Romero, E. et al. (2020) 'The clearance of dead cells by efferocytosis', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Research, pp. 398–414. doi:10.1038/s41580-020-0232-1.

- Bocci, V. (1992) 'The neglected organ: Bacterial flora has a crucial immunostimulatory role', *Perspectives in Biology and Medicine*. *Perspect Biol Med*, pp. 251–260. doi:10.1353/pbm.1992.0004.
- Boden, G. (2002) 'Interaction between free fatty acids and glucose metabolism', *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, pp. 545–549. doi:10.1097/00075197-200209000-00014.
- De Boever, P. et al. (2001) 'Development of a Six-Stage Culture System for Simulating the Gastrointestinal Microbiota of Weaned Infants', *Microbial Ecology in Health and Disease*, 13(2), pp. 111–123. doi:10.1080/08910600118539.
- Braune, A. et al. (2001) 'Degradation of Quercetin and Luteolin by *Eubacterium ramulus*', *Applied and Environmental Microbiology*, 67(12), pp. 5558–5567. doi:10.1128/AEM.67.12.5558-5567.2001.
- Brincat, M.P., Baron, Y.M. and Galea, R. (2005) 'Estrogens and the skin', *Climacteric*. *Climacteric*, pp. 110–123. doi:10.1080/13697130500118100.
- Canani, R.B. et al. (2011) 'Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases', *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 17(12), p. 1519. doi:10.3748/WJG.V17.I12.1519.
- Carrera-Bastos, P. et al. (2011) „The western diet and lifestyle and diseases of civilization”, *Research Reports in Clinical Cardiology*, 2, s. 15-35. DOI: 10.2147/RRCC.S16919.
- Cederbaum, A.I. (2012) 'Alcohol Metabolism', *Clinics in Liver Disease*, 16(4), pp. 667–685. doi:10.1016/J.CLD.2012.08.002.
- Cederroth, C.R. and Nef, S. (2009) 'Soy, phytoestrogens and metabolism: A review', *Molecular and Cellular Endocrinology*. *Mol Cell Endocrinol*, pp. 30–42. doi:10.1016/j.mce.2009.02.027.
- Český statistický úřad (2019) Téměř třetina Čechů umírá na nemoci srdce | ČSÚ. Available at: <https://www.czso.cz/csu/czso/temer-tretina-cechu-umira-na-nemoci-srdce> (Accessed: 7 March 2021).
- Cheatwood, J.L., Emerick, A.J. and Kartje, G.L. (2008) 'Neuronal plasticity and functional recovery after ischemic stroke', *Topics in Stroke Rehabilitation*. Taylor & Francis, pp. 42–50. doi:10.1310/tsr1501-42.
- Chelikani, P., Fita, I. and Loewen, P.C. (2004) 'Diversity of structures and properties among catalases', *Cellular and Molecular Life Sciences*. Springer, pp. 192–208. doi:10.1007/s00018-003-3206-5.
- Cheong, S.H. et al. (2014) 'Daidzein promotes glucose uptake through glucose transporter 4 translocation to plasma membrane in L6 myocytes and improves glucose homeostasis in Type 2 diabetic model mice', *Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(2), pp. 136–143. doi:10.1016/j.jnutbio.2013.09.012.
- Cho, K.W. et al. (2010) 'Daidzein and the daidzein metabolite, equol, enhance adipocyte differentiation and PPAR γ transcriptional activity', *Journal of Nutritional Biochemistry*, 21(9), pp. 841–847. doi:10.1016/j.jnutbio.2009.06.012.
- Choi, E.-Y. et al. (2012) 'Anti-inflammatory effects and the underlying mechanisms of action of daidzein in murine macrophages stimulated with *Prevotella intermedia* lipopolysaccharide', *Journal of Periodontal Research*, 47(2), pp. 204–211. doi:10.1111/j.1600-0765.2011.01422.x.

- Choi, E.J. (2006) 'The prooxidant, rather than antioxidant, acts of daidzein in vivo and in vitro: Daidzein suppresses glutathione metabolism', *European Journal of Pharmacology*, 542(1–3), pp. 162–169. doi:10.1016/j.ejphar.2006.05.020.
- Choi, E.J. and Kim, G.H. (2008) 'Daidzein causes cell cycle arrest at the G1 and G2/M phases in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-453 cells', *Phytomedicine*, 15(9), pp. 683–690. doi:10.1016/j.phymed.2008.04.006.
- Choi, E.J. and Kim, G.H. (2014a) 'The antioxidant activity of daidzein metabolites, O-desmethylangolensin and equol, in HepG2 cells', *Molecular Medicine Reports*, 9(1), pp. 328–332. doi:10.3892/mmr.2013.1752.
- Choi, E.J. and Kim, G.H. (2014b) 'The antioxidant activity of daidzein metabolites, O-desmethylangolensin and equol, in HepG2 cells', *Molecular Medicine Reports*, 9(1), pp. 328–332. doi:10.3892/mmr.2013.1752.
- Choi, M.S. et al. (2007) 'Increase of collagen synthesis by obovatol through stimulation of the TGF- β signaling and inhibition of matrix metalloproteinase in UVB-irradiated human fibroblast', *Journal of Dermatological Science*, 46(2), pp. 127–137. doi:10.1016/j.jdermsci.2007.02.001.
- Choi, M.S. et al. (2008) 'Genistein and daidzein prevent diabetes onset by elevating insulin level and altering hepatic gluconeogenic and lipogenic enzyme activities in non-obese diabetic (NOD) mice', *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 24(1), pp. 74–81. doi:10.1002/dmrr.780.
- Choi, R.C.Y. et al. (2013) 'Synergistic action of flavonoids, baicalein, and daidzein in estrogenic and neuroprotective effects: A development of potential health products and therapeutic drugs against alzheimer's disease', *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2013. doi:10.1155/2013/635694.
- Cibičková, L. and Žurek, M. (2020) 'Kyselina močová a význam snižování její hladiny z hlediska prevence aterosklerózy a kardiovaskulárních onemocnění', *AtheroReview*, 5(1), pp. 27–30. Available at: <https://www.prolekare.cz/casopisy/athero-review/2020-1-6/kyselina-mocova-a-vyznam-snizovani-jeji-hladiny-z-hlediska-prevence-aterosklerozy-a-kardiovaskularnich-onemocneni-121296/download?hl=cs> (Accessed: 7 March 2021).
- Cinquin, C. et al. (2004) 'Immobilization of infant fecal microbiota and utilization in an in vitro colonic fermentation model', *Microbial Ecology*, 48(1), pp. 128–138. doi:10.1007/s00248-003-2022-7.
- Cinquin, C. et al. (2006) 'New three-stage in vitro model for infant colonic fermentation with immobilized fecal microbiota', *FEMS Microbiology Ecology*, 57(2), pp. 324–336. doi:10.1111/j.1574-6941.2006.00117.x.
- Clavel, T., Lepage, P. and Charrier, C. (2014) 'The family Coriobacteriaceae', in *The Prokaryotes: Actinobacteria*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 201–238. doi:10.1007/978-3-642-30138-4_343.
- Clavel, T. and Mapesa, J. (2013) 'Food Biofunctionality View project Impact of microbiome on allergy development View project'. doi:10.1007/978-3-642-22144-6_94.
- Clerici, C. et al. (2007) 'Pasta naturally enriched with isoflavone aglycons from soy germ reduces serum lipids and improves markers of cardiovascular risk', *Journal of Nutrition*, 137(10), pp. 2270–2278. doi:10.1093/jn/137.10.2270.

- Commission directive 2010/59/EU (2010) Commission directive 2010/59/EU of 26 August 2010 amending Directive 2009/32/EC of the European Parliament and of the Council on the approximation of the laws of the Member States on extraction solvents used in the production of foodstuffs and food ingredients, Official Journal of the European Union. Brussel. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2010/59/oj> (Accessed: 6 April 2022).
- Comporti, M. et al. (1991) 'Glutathione depletion: Its effects on other antioxidant systems and hepatocellular damage', *Xenobiotica*, 21(8), pp. 1067–1076. doi:10.3109/00498259109039546.
- Connors, J., Dawe, N. and Van Limbergen, J. (2018) 'The Role of Succinate in the Regulation of Intestinal Inflammation', *Nutrients* 2019, Vol. 11, Page 25, 11(1), p. 25. doi:10.3390/NU11010025.
- Cook, S.I. and Sellin, J.H. (1998) 'Review article: short chain fatty acids in health and disease', *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 12(6), pp. 499–507. doi:10.1046/J.1365-2036.1998.00337.X.
- Cornwell, T., Cohick, W. and Raskin, I. (2004) 'Dietary Phytoestrogens and Health Article in Phytochemistry'. doi:10.1016/j.phytochem.2004.03.005.
- Cruz-Aguado, R. et al. (2000) 'Nerve growth factor and striatal glutathione metabolism in a rat model of Huntington's disease', *Restorative Neurology and Neuroscience*, 17(4), pp. 217–221.
- Donohoe, D.R. et al. (2011) 'The Microbiome and Butyrate Regulate Energy Metabolism and Autophagy in the Mammalian Colon', *Cell Metabolism*, 13(5), pp. 517–526. doi:10.1016/J.CMET.2011.02.018.
- Donohoe, D.R. et al. (2014) 'A gnotobiotic mouse model demonstrates that dietary fiber protects against colorectal tumorigenesis in a microbiota- and butyrate-dependent manner', *Cancer Discovery*, 4(12), pp. 1387–1397. doi:10.1158/2159-8290.CD-14-0501/42418/AM/A-GNOTOBIOTIC-MOUSE-MODEL-DEMONSTRATES-THAT.
- Dorokhov, Y.L. et al. (2015) 'Metabolic methanol: Molecular pathways and physiological roles', *Physiological Reviews*, 95(2), pp. 603–644. doi:10.1152/PHYSREV.00034.2014/ASSET/IMAGES/LARGE/Z9J0021527230007.JPEG.
- Duncan, A.M. et al. (2000) 'Premenopausal equol excretors show plasma hormone profiles associated with lowered risk of breast cancer - PubMed', *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 9(6), pp. 581–586. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10868692/> (Accessed: 8 March 2021).
- Filipović, B. et al. (2010) 'Daidzein administration positively affects thyroid C cells and bone structure in orchidectomized middle-aged rats', *Osteoporosis International*, 21(9), pp. 1609–1616. doi:10.1007/s00198-009-1092-x.
- Fong, W.H. et al. (2010) 'Anti-apoptotic actions of ppar- γ against ischemic stroke', in *Molecular Neurobiology*. Humana Press, pp. 180–186. doi:10.1007/s12035-010-8103-y.
- Frankenfeld, C.L. et al. (2004) 'Familial Correlations, Segregation Analysis, and Nongenetic Correlates of Soy Isoflavone–Metabolizing Phenotypes', *Experimental Biology and Medicine*, 229(9), pp. 902–913. doi:10.1177/153537020422900906.
- Frankenfeld, C.L. (2011) 'O-Desmethylangolensin: The Importance of Equol's Lesser Known Cousin to Human Health', *Advances in Nutrition*, 2(4), pp. 317–324. doi:10.3945/an.111.000539.

- Gao, Y. et al. (2008) 'The role of daidzein-loaded sterically stabilized solid lipid nanoparticles in therapy for cardio-cerebrovascular diseases', *Biomaterials*, 29(30), pp. 4129–4136. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.07.008.
- Geçtek, M. et al. (2014) 'The active role of leguminous plant components in type 2 diabetes', *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. Oxford University Press. doi:10.1155/2014/293961.
- Gibson, G.R. and Fuller, R. (2000) 'Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use', in *Journal of Nutrition*. American Institute of Nutrition. doi:10.1093/jn/130.2.391s.
- Gredel, S. et al. (2008) 'Phytoestrogens and phytoestrogen metabolites differentially modulate immune parameters in human leukocytes', *Food and Chemical Toxicology*, 46(12), pp. 3691–3696. doi:10.1016/j.fct.2008.09.047.
- Gu, L. et al. (2006) 'Metabolic phenotype of isoflavones differ among female rats, pigs, monkeys, and women', *Journal of Nutrition*, 136(5), pp. 1215–1221. doi:10.1093/jn/136.5.1215.
- Guerra, A. et al. (2012) 'Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion', *Trends in Biotechnology*. Trends Biotechnol, pp. 591–600. doi:10.1016/j.tibtech.2012.08.001.
- Guo, J.M. et al. (2004) 'Biphasic effect of daidzein on cell growth of human colon cancer cells', *Food and Chemical Toxicology*, 42(10), pp. 1641–1646. doi:10.1016/j.fct.2004.06.001.
- Hedlund, T.E. et al. (2006) 'Prostatic fluid concentrations of isoflavonoids in soy consumers are sufficient to inhibit growth of benign and malignant prostatic epithelial cells in vitro', *The Prostate*, 66(5), pp. 557–566. doi:10.1002/pros.20380.
- Heidenreich, A. et al. (2007) 'EAU Guidelines on Prostate Cancer', *European Urology*, 53, pp. 68–80. doi:10.1016/j.eururo.2007.09.002.
- Heinonen, S., Wähälä, K. and Adlercreutz, H. (1999) 'Identification of isoflavone metabolites dihydrodaidzein, dihydrogenistein, 6'-OH-O-dma, and cis-4-OH-equol in human urine by gas chromatography-mass spectroscopy using authentic reference compounds', *Analytical Biochemistry*, 274(2), pp. 211–219. doi:10.1006/abio.1999.4279.
- Hoffmann, L. et al. (2013) 'Osmotic regulation of hepatic betaine metabolism', *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 304(9). doi:10.1152/AJPGI.00332.2012.
- Hořejší, V. et al. (2017) *Základy imunologie*. Triton. Available at: <https://www.kosmas.cz/knihy/230607/zaklady-imunologie/> (Accessed: 7 March 2021).
- Hrčková, M.Y. and Šarpatková, M.H. (2004) *OSTEOPORÓZA*. Available at: www.internimedicina.cz (Accessed: 16 February 2021).
- Huang, Z.R. et al. (2008) 'In vitro and in vivo evaluation of topical delivery and potential dermal use of soy isoflavones genistein and daidzein', *International Journal of Pharmaceutics*, 364(1), pp. 36–44. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.08.002.
- Hughes, D.E. et al. (1996) 'Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-', *Nature Medicine*, 2(10), pp. 1132–1135. doi:10.1038/nm1096-1132.
- Hur, H.G. et al. (2002) 'Isolation of an anaerobic intestinal bacterium capable of cleaving the C-ring of the isoflavonoid daidzein', *Archives of Microbiology*, 178(1), pp. 8–12. doi:10.1007/s00203-002-0414-6.

- Jackson, R.L., Greiwe, J.S. and Schwen, R.J. (2011) 'Ageing skin: oestrogen receptor β agonists offer an approach to change the outcome', *Experimental Dermatology*, 20(11), pp. 879–882. doi:10.1111/j.1600-0625.2011.01362.x.
- Jawhar, S., Wirths, O. and Bayer, T.A. (2011) 'Pyroglutamate Amyloid- β (A β): A Hatchet Man in Alzheimer Disease *', *Journal of Biological Chemistry*, 286(45), pp. 38825–38832. doi:10.1074/JBC.R111.288308.
- Joannou, G.E. et al. (1995) 'A urinary profile study of dietary phytoestrogens. The identification and mode of metabolism of new isoflavonoids', *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 54(3–4), pp. 167–184. doi:10.1016/0960-0760(95)00131-I.
- Kajta, M. et al. (2013) 'The key involvement of estrogen receptor β and G-protein-coupled receptor 30 in the neuroprotective action of daidzein', *Neuroscience*, 238, pp. 345–360. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.02.005.
- Kampkötter, A. et al. (2008) 'Isoflavone daidzein possesses no antioxidant activities in cell-free assays but induces the antioxidant enzyme catalase', *Nutrition Research*, 28(9), pp. 620–628. doi:10.1016/j.nutres.2008.06.002.
- Kastl, A.J. et al. (2020) 'The Structure and Function of the Human Small Intestinal Microbiota: Current Understanding and Future Directions', *CMGH*. Elsevier Inc, pp. 33–45. doi:10.1016/j.jcmgh.2019.07.006.
- Katsanos, C.S. (2004) 'Lipid-induced insulin resistance in the liver: Role of exercise', *Sports Medicine*. Springer, pp. 955–965. doi:10.2165/00007256-200434140-00002.
- Keku, T.O. et al. (2015) 'The gastrointestinal microbiota and colorectal cancer', *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 308(5), pp. G351–G363. doi:10.1152/AJPGI.00360.2012/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH30051568460002.JPEG.
- Kempson, S.A., Vovor-Dassu, K. and Day, C. (2013) 'Betaine transport in kidney and liver: use of betaine in liver injury', *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 32(7), pp. 32–40. doi:10.1159/000356622.
- Kim, D.H. et al. (2010) 'The effects of daidzin and its aglycon, daidzein, on the scopolamine-induced memory impairment in male mice', *Archives of Pharmacal Research*, 33(10), pp. 1685–1690. doi:10.1007/s12272-010-1019-2.
- Kiss, B. et al. (2010) Ultra-performance liquid chromatography method for the quantification of some phytoestrogens in plant material, *Rev. Roum. Chim.* Available at: <http://web.icf.ro/rch/> (Accessed: 20 February 2021).
- Koukolis, G.N. (2006) 'Hormone Replacement Therapy and Breast Cancer Risk', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 900(1), pp. 422–428. doi:10.1111/j.1749-6632.2000.tb06256.x.
- Kopp, W. (2019) „How Western Diet And Lifestyle Drive The Pandemic Of Obesity And Civilization Diseases", *Diabetes, Metabolic Syndrome nad Obesity: Targets and Therapy*, 12, s. 2221-2236. doi: 10.2147/DMSO.S216791.
- Křížová, L. et al. (2019) 'Isoflavones', *Molecules*. MDPI AG, p. 1076. doi:10.3390/molecules24061076.

- Kubcová Beránková, J. (2009) Internetový portál bezpečnosti potravin - Funkční potraviny a legislativa. *Internetový portál bezpečnosti potravin*. Dostupné z: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/funkcni-potraviny-a-legislativa.aspx> (Viděno: 17. březen 2022).
- Kudou, S. et al. (1991) 'Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* MERRILL)', *Agricultural and Biological Chemistry*, 55(9), pp. 2227–2233. doi:10.1080/00021369.1991.10870966.
- Kumar, A. and Bachhawat K., A. (2012) Pyroglutamic acid : throwing light on a lightly studied metabolite | Semantic Scholar, *Current Science*. Available at: <https://www.semanticscholar.org/paper/Pyroglutamic-acid-%3A-throwing-light-on-a-lightly-Kumar-Bachhawat/c50e3ad15345b8901709d52d89f38c1c0fb6080c> (Accessed: 5 April 2022).
- Laird, B.D. et al. (2007) 'Gastrointestinal microbes increase arsenic bioaccessibility of ingested mine tailings using the simulator of the human intestinal microbial ecosystem', *Environmental Science and Technology*, 41(15), pp. 5542–5547. doi:10.1021/es062410e.
- Langhansová, H. (2011) Využití prtokove cytometrie v imunologii.
- Lee, K.W. et al. (2003) 'Major Phenolics in Apple and Their Contribution to the Total Antioxidant Capacity', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(22), pp. 6516–6520. doi:10.1021/jf034475w.
- Liang, J. et al. (2008) 'Daidzein as an antioxidant of lipid: Effects of the microenvironment in relation to chemical structure', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(21), pp. 10376–10383. doi:10.1021/jf801907m.
- Liang, X.L. et al. (2010) 'Improved in vitro assays of superoxide anion and 1,1-diphenyl- 2-picrylhydrazyl (dpph) radical-scavenging activity of isoflavones and isoflavone metabolites', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(22), pp. 11548–11552. doi:10.1021/jf102372t.
- Libby, P. (2008) 'Inflammatory Mechanisms: The Molecular Basis of Inflammation and Disease', *Nutrition Reviews*, 65(SUPPL.3), pp. S140–S146. doi:10.1111/j.1753-4887.2007.tb00352.x.
- Liggins, J. et al. (2002) 'Daidzein and genistein content of cereals', *European Journal of Clinical Nutrition*, 56(10), pp. 961–966. doi:10.1038/sj.ejcn.1601419.
- Lin, I.C. et al. (2016) 'Equol suppresses inflammatory response and bone erosion due to rheumatoid arthritis in mice', *Journal of Nutritional Biochemistry*, 32, pp. 101–106. doi:10.1016/j.jnutbio.2016.02.012.
- Lin, J.-Y. et al. (2008) 'Topical isoflavones provide effective photoprotection to skin', *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 24(2), pp. 61–66. doi:10.1111/j.1600-0781.2008.00329.x.
- Liu, X. et al. (2012) 'Anti-breast cancer potential of daidzein in rodents', *Life Sciences*, 91(11–12), pp. 415–419. doi:10.1016/j.lfs.2012.08.022.
- Ma, J. et al. (2020) 'Quantitative proteomics analysis of young and elderly skin with DIA mass spectrometry reveals new skin aging-related proteins', *Aging*, 12(13), pp. 13529–13554. doi:10.18632/aging.103461.
- Ma, T.C. et al. (2010) 'A large-scale chemical screen for regulators of the arginase 1 promoter identifies the soy isoflavone daidzein as a clinically approved small molecule that can promote neuronal protection or regeneration via a cAMP-independent pathway', *Journal of Neuroscience*, 30(2), pp. 739–748. doi:10.1523/JNEUROSCI.5266-09.2010.

- Macfarlane, G.T., Gibson, G.R. and Cummings, J.H. (1992) 'Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon', *Journal of Applied Bacteriology*, 72(1), pp. 57–64. doi:10.1111/j.1365-2672.1992.tb04882.x.
- Macfarlane, G.T. and Macfarlane, S. (2007) 'Models for intestinal fermentation: association between food components, delivery systems, bioavailability and functional interactions in the gut', *Current Opinion in Biotechnology*. *Curr Opin Biotechnol*, pp. 156–162. doi:10.1016/j.copbio.2007.01.011.
- Macfarlane, G.T., Macfarlane, S. and Gibson, G.R. (1998) 'Validation of a three-stage compound continuous culture system for investigating the effect of retention time on the ecology and metabolism of bacteria in the human colon', *Microbial Ecology*, 35(2), pp. 180–187. doi:10.1007/s002489900072.
- Magee, P.J. (2011) 'Is equol production beneficial to health?', in *Proceedings of the Nutrition Society*. Cambridge University Press, pp. 10–18. doi:10.1017/S0029665110003940.
- Magee, P.J., McGlynn, H. and Rowland, I.R. (2004) 'Differential effects of isoflavones and lignans on invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells in vitro', *Cancer Letters*, 208(1), pp. 35–41. doi:10.1016/j.canlet.2003.11.012.
- Markiewicz, L. et al. (1993) 'In vitro bioassays of non-steroidal phytoestrogens', *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 45(5), pp. 399–405. doi:10.1016/0960-0760(93)90009-L.
- Matthai, C. et al. (no date) Účinnost soji, červeného jetele a ploštičníku při potlačování symptomů spojených s menopauzou.
- Mayo, B., Vázquez, L. and Belén Flórez, A. (2019) 'Equol: A Bacterial Metabolite from The Daidzein Isoflavone and Its Presumed Beneficial Health Effects'. doi:10.3390/nu11092231.
- Mayo, B., Vázquez, L. and Flórez, A.B. (2019) 'Equol: A bacterial metabolite from the Daidzein isoflavone and its presumed beneficial health effects', *Nutrients*. MDPI AG, p. 2231. doi:10.3390/nu11092231.
- Mcgarry, J., Leatherman, G. and Foster, D. (1978) 'Carnitine palmitoyltransferase. I. The site of inhibition of hepatic fatty acid oxidation by malonyl-coa.', 253(12), pp. 4128–4136.
- Michlewska, S. et al. (2007) 'Clearance of dying cells and autoimmunity', *Autoimmunity*. Taylor & Francis, pp. 267–273. doi:10.1080/08916930701357208.
- Mills, E. and O'Neill, L.A.J. (2014) 'Succinate: a metabolic signal in inflammation', *Trends in Cell Biology*, 24(5), pp. 313–320. doi:10.1016/J.TCB.2013.11.008.
- Miyazaki, K. et al. (2002) 'Genistein and daidzein stimulate hyaluronic acid production in transformed human keratinocyte culture and hairless mouse skin', *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, 15(3), pp. 175–183. doi:10.1159/000063546.
- Miyazaki, K. et al. (2003) 'Bifidobacterium-fermented soy milk extract stimulates hyaluronic acid production in human skin cells and hairless mouse skin', *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, 16(2), pp. 108–116. doi:10.1159/000069031.
- Molly, K., Woestyne, V.M. and Verstraete, W. (1993) 'Development of a 5-step multi-chamber reactor as a simulation of the human intestinal microbial ecosystem', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39(2), pp. 254–258. doi:10.1007/BF00228615.

- Moriguchi, E.H., Moriguchi, Y. and Yamori, Y. (2004) 'Impact of diet on the cardiovascular risk profile of Japanese immigrants living in Brazil: Contributions of world health organization cardiac AND monalisa studies', *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 31(SUPPL.2). doi:10.1111/j.1440-1681.2004.04119.x.
- Murota, K., Nakamura, Y. and Uehara, M. (2018a) 'Flavonoid metabolism: The interaction of metabolites and gut microbiota', *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. Japan Society for Bioscience Biotechnology and Agrochemistry, pp. 600–610. doi:10.1080/09168451.2018.1444467.
- Murota, K., Nakamura, Y. and Uehara, M. (2018b) 'Flavonoid metabolism: The interaction of metabolites and gut microbiota', *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. Japan Society for Bioscience Biotechnology and Agrochemistry, pp. 600–610. doi:10.1080/09168451.2018.1444467.
- Musilová, J. and Glazt, Z. (2011) 'Metabolomika-základní pojmy, strategie a metodologie', *Chemické Listy*, 105, pp. 745–751.
- Niwa, T. et al. (2010) 'Reduction of leptin secretion by soy isoflavonoids in murine adipocytes in vitro', *Phytochemistry Letters*, 3(3), pp. 122–125. doi:10.1016/j.phytol.2010.04.001.
- OECD/European Observatory on Health System and Policies (2017) Česká republika: zdravotní profil země 2017. Available at: https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/state/docs/chp_cs_czech.pdf (Accessed: 7 March 2021).
- Ohtomo, Takuya et al. (2008) 'Comparative activities of daidzein metabolites, equol and O-desmethylangolensin, on bone mineral density and lipid metabolism in ovariectomized mice and in osteoclast cell cultures', *Eur J Nutr*, 47, pp. 273–279. doi:10.1007/s00394-008-0723-x.
- Papakonstantinou, E., Roth, M. and Karakiulakis, G. (2012) 'Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging', *Dermato-Endocrinology*. Landes Bioscience. doi:10.4161/derm.21923.
- Park, H.J. et al. (2013) 'Daidzein causes cytochrome c-mediated apoptosis via the Bcl-2 family in human hepatic cancer cells', *Food and Chemical Toxicology*, 60, pp. 542–549. doi:10.1016/j.fct.2013.08.022.
- Paulová, H., Bochořáková, H. and Táborská, E. (2004) 'Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro', *Chemické listy*, 98, pp. 174–179.
- Payne, A.N. et al. (2012) 'Advances and perspectives in in vitro human gut fermentation modeling', *Trends in Biotechnology*, pp. 17–25. doi:10.1016/j.tibtech.2011.06.011.
- Peeters, P.H.M. et al. (2007) 'Variations in plasma phytoestrogen concentrations in European adults', *Journal of Nutrition*, 137(5), pp. 1294–1300. doi:10.1093/jn/137.5.1294.
- Pokusaeva, K., Fitzgerald, G.F. and Van Sinderen, D. (2011) 'Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria', *Genes and Nutrition*, 6(3), pp. 285–306. doi:10.1007/S12263-010-0206-6/TABLES/7.
- Ponnusamy, K. et al. (2011) 'Microbial community and metabolomic comparison of irritable bowel syndrome faeces', *Journal of medical microbiology*, 60(Pt 6), pp. 817–827. doi:10.1099/JMM.0.028126-0.
- Popa, D.-S. and Rusu, M.E. (2017) 'Isoflavones: Vegetable Sources, Biological Activity, and Analytical Methods for Their Assessment', in *Superfood and Functional Food - The Development of Superfoods and Their Roles as Medicine*. InTech. doi:10.5772/66531.

- Prausová, J. (2010) 'Karcinom prsu-problém i v 21.století', *Interní medicína pro praxi*, 12(1), pp. 26–32. Available at: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2010/01/05.pdf> (Accessed: 22 February 2021).
- Quan, T.E. et al. (2004) 'Circulating fibrocytes: Collagen-secreting cells of the peripheral blood', *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. Pergamon, pp. 598–606. doi:10.1016/j.biocel.2003.10.005.
- Rabiau, N. et al. (2010) 'Genistein and daidzein act on a panel of genes implicated in cell cycle and angiogenesis by Polymerase Chain Reaction arrays in human prostate cancer cell lines', *Cancer Epidemiology*, 34(2), pp. 200–206. doi:10.1016/j.canep.2009.12.018.
- Rafii, F. (2015) 'The Role of Colonic Bacteria in the Metabolism of the Natural Isoflavone Daidzin to Equol', *Metabolites*, 5(1), pp. 56–73. doi:10.3390/metabo5010056.
- Rassi, C.M. et al. (2002) 'Down-Regulation of Osteoclast Differentiation by Daidzein via Caspase 3', *Journal of Bone and Mineral Research*, 17(4), pp. 630–638. doi:10.1359/jbmr.2002.17.4.630.
- Ravichandran, K.S. (2011) 'Beginnings of a Good Apoptotic Meal: The Find-Me and Eat-Me Signaling Pathways', *Immunity*. Cell Press, pp. 445–455. doi:10.1016/j.immuni.2011.09.004.
- Ridlon, J.M., Kang, D.J. and Hylemon, P.B. (2006) 'Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria', *Journal of Lipid Research*. Elsevier, pp. 241–259. doi:10.1194/jlr.R500013-JLR200.
- Rimbach, G. et al. (2008) 'Dietary isoflavones in the prevention of cardiovascular disease - A molecular perspective', *Food and Chemical Toxicology*, 46(4), pp. 1308–1319. doi:10.1016/j.fct.2007.06.029.
- Ríos-Covián, D. et al. (2016) 'Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health', *Frontiers in Microbiology*, 7(FEB), p. 185. doi:10.3389/FMICB.2016.00185/BIBTEX.
- Roghani, M. et al. (2013) 'Chronic Administration of Daidzein, a Soybean Isoflavone, Improves Endothelial Dysfunction and Attenuates Oxidative Stress in Streptozotocin-induced Diabetic Rats', *Phytotherapy Research*, 27(1), pp. 112–117. doi:10.1002/ptr.4699.
- Röhrdanz, E. et al. (2002) 'The phytoestrogen daidzein affects the antioxidant enzyme system of rat hepatoma H4IIE cells', *Journal of Nutrition*, 132(3), pp. 370–375. doi:10.1093/jn/132.3.370.
- Rostagno, M.A. et al. (2010) 'Prevention of Cardiovascular Diseases by Soy Protein and Isoflavones', p. 315 p. Available at: <https://hal.inrae.fr/hal-02821033> (Accessed: 20 February 2021).
- Round, J.L. and Mazmanian, S.K. (2009) 'The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease', *Nature Reviews Immunology*. Nat Rev Immunol, pp. 313–323. doi:10.1038/nri2515.
- Rüfer, C.E., Glatt, H. and Kulling, S.E. (2006) 'Structural elucidation of hydroxylated metabolites of the isoflavan equol by gas chromatography-mass spectrometry and high-performance liquid chromatography-mass spectrometry', *Drug Metabolism and Disposition*, 34(1), pp. 51–60. doi:10.1124/dmd.105.004929.
- Sakamoto, Y. et al. (2014) 'Daidzein regulates proinflammatory adipokines thereby improving obesity-related inflammation through PPAR γ ', *Molecular Nutrition and Food Research*, 58(4), pp. 718–726. doi:10.1002/mnfr.201300482.
- Savill, J. et al. (2002) 'A blast from the past: Clearance of apoptotic cells regulates immune responses', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, pp. 965–975. doi:10.1038/nri957.

- Schneider, H. and Blaut, M. (2000) 'Anaerobic degradation of flavonoids by *Eubacterium ramulus*', *Archives of Microbiology*, 173(1), pp. 71–75. doi:10.1007/s002030050010.
- Schoefer, L. et al. (2002) 'Anaerobic C-ring cleavage of genistein and daidzein by *Eubacterium ramulus*', *FEMS Microbiology Letters*, 208(2), pp. 197–202. doi:10.1111/j.1574-6968.2002.tb11081.x.
- Sekikawa, A. et al. (2018) 'Effect of S-equol and Soy Isoflavones on Heart and Brain', *Current Cardiology Reviews*, 15(2), pp. 114–135. doi:10.2174/1573403x15666181205104717.
- Setchell, K.D.R. (1998) 'Phytoestrogens: The biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones', in *American Journal of Clinical Nutrition*. American Society for Nutrition, pp. 1333S–1346S. doi:10.1093/ajcn/68.6.1333S.
- Setchell, K.D.R. et al. (2001) 'Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements', in *Journal of Nutrition*. American Institute of Nutrition, pp. 1362S–75S. doi:10.1093/jn/131.4.1362s.
- Setchell, K.D.R. et al. (2002) 'Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability', *American Journal of Clinical Nutrition*, 76(2), pp. 447–453. doi:10.1093/ajcn/76.2.447.
- Setchell, K.D.R. et al. (2005) 'S-equol, a potent ligand for estrogen receptor β , is the exclusive enantiomeric form of the soy isoflavone metabolite produced by human intestinal bacterial flora', in *American Journal of Clinical Nutrition*. American Society for Nutrition, pp. 1072–1079. doi:10.1093/ajcn/81.5.1072.
- Setchell, K.D.R. et al. (2009) 'The Pharmacokinetics of S-(-)Equol Administered as SE5-OH Tablets to Healthy Postmenopausal Women', *The Journal of Nutrition*, 139(11), pp. 2037–2043. doi:10.3945/jn.109.110874.
- Setchell, K.D.R., Brown, N.M. and Lydeking-Olsen, E. (2002) 'The clinical importance of the metabolite equol - A clue to the effectiveness of soy and its isoflavones', *Journal of Nutrition*. American Institute of Nutrition, pp. 3577–3584. doi:10.1093/jn/132.12.3577.
- Setchell, K.D.R. and Clerici, C. (2010) 'Equol: History, chemistry, and formation', *Journal of Nutrition*. American Society for Nutrition, p. 1355S. doi:10.3945/jn.109.119776.
- Setchell, K.D.R. and Cole, S.J. (2006) 'Method of defining equol-producer status and its frequency among vegetarians', *Journal of Nutrition*, 136(8), pp. 2188–2193. doi:10.1093/jn/136.8.2188.
- Seymour, G.J. et al. (2007) 'Relationship between periodontal infections and systemic disease', *Clinical Microbiology and Infection*, 13(SUPPL. 2), pp. 3–10. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01798.x.
- Simmering, R., Kleessen, B. and Blaut, M. (1999) 'Quantification of the flavonoid-degrading bacterium *Eubacterium ramulus* in human fecal samples with a species-specific oligonucleotide hybridization probe', *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8), pp. 3705–3709. doi:10.1128/aem.65.8.3705-3709.1999.
- Slíva, M.J. (2010) Receptory pro estrogen a strukturně obdobné molekuly.
- Sosvorová, L., Bičíková, M. and Lapčík, O. (2011) '(1) (PDF) Efficacy and safety of phytoestrogen products', *Dietologie Metabolismus Endokronologie Výživa*, 14(3), pp. 141–144. Available at: https://www.researchgate.net/publication/268388270_EFFICACY_AND_SAFETY_OF_PHYTOESTROGEN_PRODUCTS (Accessed: 7 March 2021).

- Stanford, J. et al. (1995) 'Breast cancer incidence in Asian migrants to the United States and their descendants', JSTOR [Preprint]. Available at: <https://www.jstor.org/stable/3702322> (Accessed: 7 March 2021).
- Stout, J.M. et al. (2013) 'Subcutaneous daidzein administration enhances recovery of skilled ladder rung walking performance following stroke in rats', *Behavioural Brain Research*, 256, pp. 428–431. doi:10.1016/j.bbr.2013.08.027.
- Sun, M.Y. et al. (2016) 'Daidzein: A review of pharmacological effects', *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. African Ethnomedicines Network, pp. 117–132. doi:10.4314/ajtcam.v13i3.15.
- SVOD (no date) Epidemiologické analýzy nádoru prsu. Available at: <https://www.svod.cz/> (Accessed: 22 February 2021).
- Tan, J. et al. (2014) 'The Role of Short-Chain Fatty Acids in Health and Disease', *Advances in Immunology*, 121, pp. 91–119. doi:10.1016/B978-0-12-800100-4.00003-9.
- Tham, D.M., Gardner, C.D. and Haskell, W.L. (1998) 'Potential Health Benefits of Dietary Phytoestrogens: A Review of the Clinical, Epidemiological, and Mechanistic Evidence 1', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83(7), pp. 2223–2235. doi:10.1210/jcem.83.7.4752.
- Thornton, M.J. (2002) 'The biological actions of estrogens on skin', *Experimental Dermatology*, 11(6), pp. 487–502. doi:10.1034/j.1600-0625.2002.110601.x.
- Tominaga, S. and Kuroishi, T. (1995) 'Epidemiology of breast cancer in Japan', *Breast Cancer*. Springer, pp. 1–7. doi:10.1007/BF02966890.
- Tong, Z. et al. (2011) 'Urine formaldehyde level is inversely correlated to mini mental state examination scores in senile dementia', *Neurobiology of aging*, 32(1), pp. 31–41. doi:10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2009.07.013.
- Tong, Z. et al. (2013) 'Aging-associated excess formaldehyde leads to spatial memory deficits', *Scientific reports*, 3. doi:10.1038/SREP01807.
- Towler, M.C. and Hardie, D.G. (2007) 'AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling', *Circulation Research*. *Circ Res*, pp. 328–341. doi:10.1161/01.RES.0000256090.42690.05.
- Tremaroli, V. and Bäckhed, F. (2012) 'Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism', *Nature*. *Nature*, pp. 242–249. doi:10.1038/nature11552.
- Tretter, L., Patocs, A. and Chinopoulos, C. (2016) 'Succinate, an intermediate in metabolism, signal transduction, ROS, hypoxia, and tumorigenesis', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1857(8), pp. 1086–1101. doi:10.1016/J.BBABIO.2016.03.012.
- Uchiyama, S., Ueno, T. and Suzuki, T. (2007) 'Identification of a Newly Isolated Equol-Producing Lactic Acid Bacterium from the Human Feces', *Journal of Intestinal Microbiology*, 21(3), pp. 217–220. doi:10.11209/jim.21.217.
- Védrine, N. et al. (2006) 'One-month exposure to soy isoflavones did not induce the ability to produce equol in postmenopausal women', *European Journal of Clinical Nutrition*, 60(9), pp. 1039–1045. doi:10.1038/sj.ejcn.1602415.
- Velíšek, J. (2009) *Chemie potravin*. OSSIS. Available at: <https://www.databazeknih.cz/knihy/chemie-potravin-i-39133> (Accessed: 7 March 2021).

- Venema, K. and Van Den Abbeele, P. (2013) 'Experimental models of the gut microbiome', *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*. Bailliere Tindall Ltd, pp. 115–126. doi:10.1016/j.bpg.2013.03.002.
- Vickers, A.E.M. (2009) 'Characterization of hepatic mitochondrial injury induced by fatty acid oxidation inhibitors', *Toxicologic Pathology*, 37(1), pp. 78–88. doi:10.1177/0192623308329285.
- Wanders, D., Graff, E.C. and Judd, R.L. (2012) 'Effects of high fat diet on GPR109A and GPR81 gene expression', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 425(2), pp. 278–283. doi:10.1016/J.BBRC.2012.07.082.
- Wei, J. et al. (2019) 'Protective effect of daidzein against streptozotocin-induced Alzheimer's disease via improving cognitive dysfunction and oxidative stress in rat model', *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 33(6), p. e22319. doi:10.1002/jbt.22319.
- Van de Wiele, T. et al. (2003) 'Oral exposure to PAH: bioactivation processes in the human gut | Request PDF', *Communication in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 68(3), pp. 3–6. Available at: https://www.researchgate.net/publication/8936377_Oral_exposure_to_PAH_bioactivation_processes_in_the_human_gut (Accessed: 9 March 2021).
- de Wilde, A. et al. (2004) 'A low dose of daidzein acts as an ER α -selective agonist in trabecular osteoblasts of young female piglets', *Journal of Cellular Physiology*, 200(2), pp. 253–262. doi:10.1002/jcp.20008.
- Wong, R.W.K. (2009) 'Effect of daidzein on bone formation', *Frontiers in Bioscience*, Volume (14), p. 3673. doi:10.2741/3479.
- Wolfe, D. (2009). *Superfoods : the food and medicine of the future*. North Atlantic Books, Berkeley, California.
- Yan, Z. et al. (2017) 'Association between consumption of soy and risk of cardiovascular disease: A meta-analysis of observational studies', *European Journal of Preventive Cardiology*, 24(7), pp. 735–747. doi:10.1177/2047487316686441.
- Yen, J.H. et al. (2014) 'Daidzein enhances efferocytosis via transglutaminase 2 and augmentation of Rac1 activity', *Molecular Immunology*, 60(2), pp. 135–142. doi:10.1016/j.molimm.2014.04.006.
- Yu, L., Blackburn, G.L. and Zhou, J.-R. (2003) Nutrient-Gene Interactions-Research Communication Genistein and Daidzein Downregulate Prostate Androgen-Regulated Transcript-1 (PART-1) Gene Expression Induced by Dihydrotestosterone in Human Prostate LNCaP Cancer Cells 1, *J. Nutr. Oxford Academic*. doi:10.1093/JN/133.2.389.
- Yuan, J.-P., Wang, J.-H. and Liu, X. (2007) 'Metabolism of dietary soy isoflavones to equol by human intestinal microflora – implications for health', *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(7), pp. 765–781. doi:10.1002/mnfr.200600262.
- Yuan, J.P., Wang, J.H. and Liu, X. (2007) 'Metabolism of dietary soy isoflavones to equol by human intestinal microflora - Implications for health', *Molecular Nutrition and Food Research*, pp. 765–781. doi:10.1002/mnfr.200600262.
- Zhao, D. et al. (2015) 'Daidzein stimulates collagen synthesis by activating the TGF- β /smad signal pathway', *Australasian Journal of Dermatology*, 56(1), pp. e7–e14. doi:10.1111/ajd.12126.
- Zhao, G. et al. (2018) 'Betaine in inflammation: Mechanistic aspects and applications', *Frontiers in Immunology*, 9(MAY), p. 1070. doi:10.3389/FIMMU.2018.01070/BIBTEX.

Zubik, L. and Meydani, M. (2003) 'Bioavailability of soybean isoflavones from aglycone and glucoside forms in American women', *American Journal of Clinical Nutrition*, 77(6), pp. 1459–1465. doi:10.1093/ajcn/77.6.1459.