

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav biologie rostlin



**Agronomická
fakulta**

**Mendelova
univerzita
v Brně**



Fytoestrogeny v potravinářství
Bakalářská práce

Vedoucí práce:
MVDr. Ing. Václav Trojan, Ph.D.

Vypracovala:
Markéta Došková

Brno 2015

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci *Fytoestrogeny v potravinářství* vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědom/a, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....

Za podporu, trpělivost a vedení při psaní této práce bych chtěla poděkovat MVDr. Ing. Václavu Trojanovi, Ph.D., který mi zároveň pomohl uskutečnit praktickou stáž v Laboratoři růstových regulátorů, kde jsem se dozvěděla spoustu užitečných informací a zdokonalila se v laboratorních technikách pod vedením Dr. Tarkowské, které tímto také děkuji. V neposlední řadě patří mé srdečné díky rodině a přátelům

ABSTRAKT

Fytoestrogeny jsou biologicky aktivní látky, které jsou přirozeně obsaženy v rostlinných materiálech. Tvoří je skupina převážně polyfenolických látek, které se vyznačují strukturální podobností s ženským hormonem 17- β -estradiolem. Rostliny fytoestrogeny produkují jako své sekundární metabolity, především v důsledku reakce na různé stresové faktory. Látky s estrogením účinkem obsažené v potravinách přinášejí na jedné straně velmi pozitivní vliv na naše zdraví. Naproti tomu některé estrogení látky v závislosti na koncentraci a komplexním stavu konzumenta zdraví škodí, stejně tak jako mykoestrogeny, xenoestrogeny a antiestrogeny. I z tohoto důvodu je nezbytné umět je detekovat a kvantifikovat ve vzorku potravy. Hlavním problémem, s kterým se setkáváme při studiu jejich efektu, je velké množství dalších rozmanitých látek v biologickém materiálu, a tak i vzhledem k jejich složité struktuře bylo třeba stanovit spolehlivou metodu, která byla použita také v rámci praktické části této práce. Jedná se o metodu UPLC-MS/MS, tedy kombinaci vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostního spektrometru, kterému předchází náročnější příprava vzorku včetně přečištění přes SPE kolonky (“solid phase extraction”), čili extrakce pevným sorbentem.

Klíčová slova: fytoestrogeny, isoflavony, stilbeny, equol, estrogení receptory, brassinosteroidy, ekdysteroidy, UPLC-MS/MS, SPE

ABSTRACT

Phytoestrogens are biologically active compounds naturally occurring in plant materials. This group consists mainly of polyphenols characterized by structural similarities with female hormone 17- β -estradiol. Plants produce phytoestrogens as their secondary metabolites, primarily due to the reaction as a response to various stress. Agents with estrogen effect contained in foodstuffs bring very positive impact on our health. On the other hand, some of the estrogen compounds may be harmful to the health depending on the concentration and the complex state of the consumer, as well as mycoestrogens, xenoestrogens and antiestrogens. Also for this reason is necessary to detect and quantify them in the sample of food. The major problem encountered in the studies of their effect is large amount of a variety of other substances in biological material, and according to their complicated structure was important to establish a reliable method, that was used also in the practical part of my experiment. It is an UPLC-MS/MS – combination of Ultra High Performance Liquid Chromatography and Tandem Mass Spectrometry preceded by complex sample preparation which involves also SPE purification (“solid phase extraction”).

Key words: phytoestrogens, isoflavones, stilbenes, equol, estrogen receptors, brassinosteroids, ecdysteroids, UPLC-MS/MS, SPE

OBSAH

1 ÚVOD.....	8
2 CÍL PRÁCE	9
3 DEFINICE A HISTORIE OBJEVENÍ.....	10
4 SROVNÁNÍ S ŽIVOČIŠNÝMI POHLAVNÍMI HORMONY.....	13
5 ZÁSTUPCI FYTOESTROGENŮ, VÝSKYT	17
5.1 Fytoestrogeny.....	17
5.1.1 Isoflavony	18
5.1.2 Prenylflavonoidy.....	20
5.1.3 Lignany	21
5.1.4 Pterokarpany	22
5.1.5 Kumestany	24
5.1.6 Stilbeny	24
5.2 Fytoestrogeny v potravinách.....	25
5.2.1 Sója a sójové produkty.....	26
5.2.1.1 Rozdílné koncentrace.....	29
5.2.2 Jetel červený a vojtěška	29
5.2.3 Sezamová semínka.....	30
5.2.4 Chmel.....	30
5.2.5 Obiloviny	31
5.2.6 Fytoestrogeny v potravinách živočišného původu.....	31
5.3 Mykoestrogeny	31
5.4 Expozice xenoestrogenům	32
5.5 Alkaloidy s estrogenním účinkem.....	34
5.6 Antiestrogeny	34
6 VZNIK A METABOLICKÉ CESTY.....	36
7 VLIV NA LIDSKÝ ORGANISMUS	39
7.1 Menopauza.....	40

7.2 Vliv na vývoj.....	42
7.3 Proliferace	42
7.4 Role v ochraně proti rakovině.....	43
7.5 Vliv na kůži.....	44
7.6 Kardiovaskulární onemocnění	44
7.7 Mechanismus účinku isoflavonů	45
7.8 Vybrané přípravky s obsahem isoflavonů na našem trhu.....	46
8 METODY STANOVENÍ STEROIDNÍCH HORMONŮ ROSTLIN.....	48
8.1 Brassinosteroidy.....	48
8.1.2 Chemická struktura brassinosteroidů.....	49
8.2 Ecdysteroidy	50
8.3 Techniky stanovení	50
8.3.1 Extrakce pevným sorbentem (SPE – "solid phase extraction").....	51
8.3.2 Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie	52
8.3.2.1 Kvadrupólový hmotnostní analyzátor.....	53
9 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	55
9.1 Rostlinný material a příprava vzorku.....	55
9.2 Identifikace a kvantifikace.....	56
10 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	57
10.1 Správnost metody	61
10.2 Srovnání novosti postupů.....	61
11 ZÁVĚR	62
12 LITERÁRNÍ PŘEHLED	63
13 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK.....	72
14 SEZNAM ZKRATEK.....	73

1 ÚVOD

Obohacování funkčních potravin bioaktivními fyto-chemickými látkami se neustále objevuje v oblasti zájmů spousty vědců. Nedávné studie podkládají návrh pro skupinu funkčních potravin známých jako “potraviny obohacené fytoalexiny” Fytoalexiny, kam zařazujeme i fytoestrogeny, jsou nízkomolekulární látky produkované rostlinami jako odpověď na rozličné formy abiotického a biotického stresu, stejně tak jako mikrobiální infekci a ultrafialové záření. Tyto fytochemikálie, nejčastěji polyfenoly ale i terpenoidy a alkaloidy, mají důležitou funkci v ochraně poškozených nebo infikovaných rostlinných buněk. Objevují se stále názory, že vlastnosti fytoalexinů/fytoestrogenů mohou být využity na rozvoj a podporu zdravotních přínosů uznávaných funkčních potravin nebo pro produkci nových a zdraví prospěšných potravin. Některé potraviny rostlinného původu obsahují fytoalexiny ze sójových bobů, hroznů, hrášku, fazolí, vaječnice nebo plody brukvovitých (Udenigwe, Aluko; 2012).

Počátek rozšiřování podvědomí konzumentů o funkčních potravinách před dvěma desítkami let přidalo novou dimenzi v přístupu a krocích používaných pro zvládnutí a léčbu lidských onemocnění, především kardiovaskulárních a neurodegenerativních, obezité, diabetu a rakoviny. Funkční potraviny také začaly částečně přitahovat zájem pro svoji schopnost v prevenci proti chorobám a udržování zdravého životního stylu. Většina z farmakologických vlastností připisovaných funkčním potravinám jsou právě díky fytochemikáliím. Tyto látky, které se nepřímo podílejí na primárním metabolismu rostlin, hrají obranou roli proti napadajícím organismům a dalším environmentálním faktorům. Fytochemikálie jsou produkovány z jednoduchých prekurzorů, jako acetátu, šikimátu, mevalonátu a deoxyxylulose, fytoinducibilní látky jsou produkovány jako odpověď na environmentální stres nebo infekci. Inducibilní fytochemikálie jsou právě fytoalexiny.

Používání extrinálních faktorů indukující tvorbu fytoalexinů je dnes běžně využíváno a pak díky tomu dochází k obohacování potravin bioaktivními komponenty, navíc s výhodou snadné metody a nepozměněnému přírodnímu složení celého rostlinného zdroje. Bylo popsáno mnoho rostlinných zdrojů, které produkují fytoalexiny ve využitelném množství, zejména luštěniny, sója a hrozny jsou uznávány pro zdravotní přínosy lidskému zdraví (Renard et al., 2002; Udenigwe, Aluko; 2012).

2 CÍL PRÁCE

Cílem práce je podrobný literární přehled o nejvýznamnějších typech fytoestrogenů, mechanismu účinku, podobnosti se savčími estrogenními hormony a vlivu na člověka. Rešerše bude doplněna stručnými informacemi o historii objevení těchto látek a přehledem potravin a výrobků vyznačující se vyšším obsahem fytoestrogenů. Teoretická část je pak uzavřena popisem metody používané ke stanovení steroidních fytohormonů v rostlinných matricích. V experimentální části bude popsán postup při vlastním stanovení a nakonec předloženy výsledky měření a diskuze

3 DEFINICE A HISTORIE OBJEVENÍ

Fytoestrogeny jsou rostlinami produkované chemické látky, které svojí strukturou a velikostí molekuly připomínají savčí estrogenní hormony. Termín fytoestrogeny je odvozen z názvu pro ženské pohlavní hormony, tedy estrogenu. Dělíme je do několika skupin, z nichž jsou ty nejrozšířenější isoflavony, lignany, kumestany a stilbeny. Jedná se o velmi různorodou skupinu přirozeně se vyskytujících nesteroidních sloučenin. Po chemické stránce jde o vícesytné fenoly (Yildiz, 2006).

Někteří vědci tvrdí, že fytoestrogeny produkují rostliny na svoji obranu, aby zabránili nebo omezili predaci býložravci, a tak namísto vytvoření trnů, bodláků nebo špatné chuti produkují tyto chemikálie, které ovlivní plodnost predátora. Přestože toto vysvětlení se může zdát jako přehnané, dává smysl z evolučního hlediska i proto, že existuje mnoho reálných příkladů o tom, jak živočichové a rostliny podstupují změny společně a jak se společně vyvíjí v průběhu času. Vysvětlení se opírá o teorii, že rostliny produkují tyto specifické látky omezující reprodukci býložravců. Tak se populace predátora snižuje a rostliny mohou více prosperovat (Hudges, 1988).

Na základě této charakteristiky se můžeme domnívat, že i v rostlině budou mít isoflavony funkci hormonální, ale není tomu tak. Podporují přežití rostliny tím, že mají např. antifungální, antimikrobiální a antioxidantní vlastnosti. Z toho je zřejmé, že koncentrace isoflavonů se výrazně zvyšuje, pokud je rostlina vystavena stresu, např. při nedostatku vláhy a je ovlivněna podmínkami, při nichž je pěstována (Dakora, Phillips 1996; Eldridge, Kwolek 1983; Wang, Murphy 1994).

Je známo, že fytoestrogeny jsou schopny širokého spektra biologických aktivit; v zažívacím traktu se mění na látky s estrogenními účinky, nebo také, v závislosti na věku, přijímané dávce a pohlaví, s antiestrogenními účinky. Váží se na estrogenové receptory v mnoha tkáních ale pravděpodobně nejsou schopny stimulovat úplnou estrogenní odezvu. V porovnání s estrogenem produkovaným běžně v našem organismu mají mírnější efekt účinku (Ransley et al., 2001).

Vzhledem k mnoha podloženým studiím se u fytoestrogenů předpokládají pozitivní účinky na kardiovaskulární systém, vazomotorické symptomy a snížení rizika rakoviny prsu. Více než dvě desítky let jsou fytoestrogeny považovány za mírný prostředek k tlumení symptomů menopauzy. Proto se uvažuje o možnosti fytoestrogeny nahradit estradiol při hormonální regulaci některých procesů v (nejen) ženském

organismu. Jejich příjem v potravě je považován za určitých okolností jako vhodnější alternativa oproti podávání estradiolu. Léčba estradiolem (používá se kromě léčby problémů spojených s pohlavními obtížemi i jako prevence proti osteoporóze) je totiž podezřívána z určitých negativních účinků, konkrétně ze zvyšování pravděpodobnosti vzniku rakoviny prsu, rakoviny děložní sliznice, infarktu a mozkové mrtvice.

První zprávy o výskytu hormonů v extraktech z rostlin se stejným účinkem, jako mají savčí pohlavní hormony, se objevily ve člancích v letech 1926 a 1933 napsané Dohrnem a Skarzynksim. Bonner a Axtman informovali v roce 1937 o studii stimulaci růstu embrya hrachu *in vitro* pomocí estronu. Estron byl později izolován ze semen palmy datlové (*Phoenix dactylifera L*) a progesteron byl identifikován v jádérkách z jablek Gawienowskim a Gibbsem v roce 1968 (Simerský et al., 2009).

Estrogenní účinky isoflavonů byly ale ve větším měřítku poprvé objeveny ve 40. letech minulého století v Austrálii u ovcí pasoucích se na jetelových pastvinách. Poruchy plodnosti, které se u těchto ovcí objevily, byly označeny jako "jetelová nemoc" a byly spojovány s příjmem fytoestrogenů, konkrétně formononetinu v jeteli, který je bachorovou mikroflórou odbouráván přes daidzein na equol. Následně byl mnohými pozorováními u různých druhů zvířat prokázán také negativní vliv sójových fytoestrogenů na reprodukční schopnosti samic zvířat. Bylo např. potvrzeno, že samice některých druhů zvířat chovaných v zajetí a krmené sójou nemohou zabřeznout. Tyto závěry vedly k úvaze, že vysoký obsah fytoestrogenů v jeteli červeném nebo v sóji působí u vyšších živočichů jako endogenní estrogény, které regulují estrogenní cyklus krav ovlivněním syntézy prostaglandinů (Woclawek-Potocka et al., 2005).

Nejrozšířenější a nejlépe popsanou skupinou jsou isoflavony, první izoflavonoid byl izolován v roce 1893 z kosatce florentského (*Iris florentina*) a dostal jméno iridin. Chemická struktura izoflavonoidů byla vyřešena v roce 1925.

Až do sedmdesátých let zajímaly fytoestrogeny hlavně veterináře a zemědělce. Studie byly vedeny snahou zmapovat jejich zdroje, zjistit, jaká jsou zdravotní rizika fytoestrogenů pro jednotlivé živočišné druhy a za jakých podmínek jsou fytoestrogeny bezpečné. Postupně přibývalo jak fytoestrogenů, tak rostlin, v nichž byly nalezeny. Od začátku vedla čeleď bobovitých (*Fabaceae*), zastoupená řadou ekonomicky významných druhů, jako jsou například jetel (rod *Trifolium*), tolíce (rod *Medicago*), a hlavně sója (*Glycine max*).

Tyto zajímavé látky se našly v komoditách, které jsou velmi snadno dostupné i u nás doma, jako jsou celozrnné pečivo, brusinky a jiné chutné bobule, pivo a víno. Přehled potravin bude blíže uveden v následujících kapitolách. Jsou obsaženy ve více než 300 rostlinách, kde se nacházejí převážně ve formě konjugovaných glykosidů, ovšem ve fermentované potravě ve formě aglykonů. Už v roce 1954 bylo zaznamenáno R. Bradburym třiapadesát estrogenně aktivních rostlin, o dvacet let později jich bylo známo přes tři sta, dnes by bylo těžké se o jejich výčet vůbec pokusit.

Kromě potravy není zanedbatelná ani expozice environmentálním estrogenům, již zmíněným nežádoucím xenoestrogenům. V této souvislosti je významné zjištění, že strava bohatá na fytoestrogeny může výrazně snižovat vazby slabších xenoestrogenů s estrogenními receptory - ER (Holoubek, Čadová; 2001; Lapčík, Stárka; 2004).

4 SROVNÁNÍ S ŽIVOČIŠNÝMI POHLAVNÍMI HORMONY

Podobnosti estrogenů a fytoestrogenů na molekulární úrovni jim umožňují mírně napodobovat estrogen a někdy působí i jako jeho antagonisté. Po počátečním zájmu aplikovat záměrně fytoestrogeny na zvířata, se proto přešlo na zkoumání vlivu na člověka, kde bylo už tehdy předpokládáno, že fytoestrogeny mohou také vysvětlit (při nejmenším alespoň částečně) proč je strava obsahující velké množství rostlinné potravy spojována s nízkou úmrtností mortality a morbidit v dospělosti (Thorogood et al., 1994).

Jak bylo poznamenáno v úvodu, fytoestrogenům se připisuje určitá ekologická úloha v regulaci počtu býložravců spásajících porosty s estrogenními rostlinami. Jelikož je chutnost píce obsahující glykosidy isoflavonů nižší, fytoestrogeny působí na snížení příjmu píce na pastvě. Účinky na reprodukci se mohou projevit inhibicí sekrecí živočišných estrogenů; tím je narušena ovulace, pohyb vajíček ve vejcovodu, vzniká nepravá říje (nepravá březost) a objevují se degenerativní změny pohavního ústrojí. Dostávají se nepravidelné intervaly mezi říjemi, dlouhodobá říje (nymfomanie), nadměrná sekrece hlenu, překrvení děložní sliznice, na vaječnicích se objevují cystické znetvoření folikulu (Opletal, Skřivanová; 2010).

Vlastní estrogeny jsou steroidy, které ve své struktuře obsahují benzenové jádro. Nejdůležitější je 17- β -estradiol. Tvoří se u obou pohlaví v pohlavních žlázách – ve vaječnicích ovšem mnohem více než ve varlatech. Menší, avšak významné množství estrogenů vzniká v orgánech, které obvykle ani nejsou považovány za žlázy s vnitřní sekrecí, například v prsních žlázách, kostech, cévách, mozku, a zejména v tukové tkáni (Lapčík, Stárka; 2004).

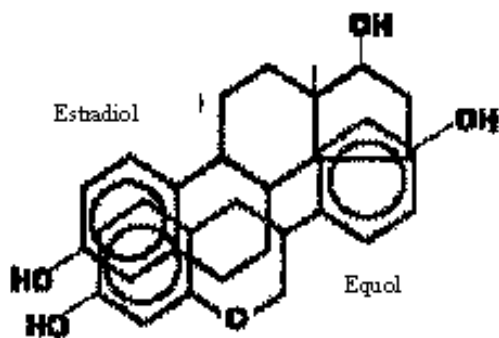
Na přelomu let dvacátých a třicátých si několik chemiků vysloužilo slávu, když vyřešili struktury hlavních skupin steroidních hormonů. Jedním z nich byl Adolf F. J. Butenandt, jenž v roce 1929 připravil čistý estron (Nobelovu cenu za práci o pohlavních hormonech dostal r. 1939). Tento metabolit se jen nepatrně liší od vlastního estrogenu, jímž je 17-beta-estradiol. V šedesátých letech dvacátého století byly objeveny vazebné proteiny specifické pro estrogeny. Úplná struktura prvního ER je známa od r. 1987, od r. 1996 víme, že je jich více. V průběhu devadesátých let byl objasněn mechanismus, jímž jaderné receptory řídí expresi genů. Využívají k tomu úseky, které nazýváme estrogenresponzivní elementy.

Před nedávnou dobou, v roce 2001, byl lokalizován a izolován protein fungující jako receptor pro estrogeny v různých orgánech rostliny *Solanum glaucophyllum Desf* (Milanesi et al., 2001). Membránový protein (Membrane Steroid Binding Protein 1 (MSBP1)), který se podílí na regulaci růstu a má velkou afinitu k progesteronu, byl identifikován a charakterizován v *Arabidopsis thaliana (L.) Heynh* v roce 2005 (Simerský et al., 2011).

Slovo estrogen odkazuje na schopnost dané látky vyvolat říji (estrus) u pokusného zvířete, navíc jedny z prvních biologických testů byly opravdu na takovém experimentu založeny. Estrogeny ale zasahují do mnoha dalších fyziologických jevů a ovlivňují orgány, které s rozmnožováním zas tak úzce nesouvisí (zmíněné kosti, cévy, kůže.). Pro posouzení estrogenní aktivity byla vyvinuta řada testů, které sledují třeba vazbu na receptory, schopnost stimulovat růst buněčných kultur atd (Anderson et al., 1999).

Cizorodé látky s estrogenní aktivitou (*exo*-estrogeny) označujeme podle původu předponami; –*fyto*estrogeny jsou z rostlin, *myko*estrogeny jsou produkty plísní a *xeno*estrogeny jsou uměle připravené. Až na vzácné výjimky to nejsou steroidy. Jde o různé typy látek, které mají určité společné strukturní rysy. Vždy jsou to fenoly, jejich molekula je téměř plochá a obsahuje dvojici hydroxylových skupin ve vzdálenosti, jež se příliš neliší od vzdálenosti hydroxylů v estradiolu (Lapčík, Stárka; 2004).

Nejznámějším fytoestrogenem je genistein, který se nachází především v sóji a výrobcích z ní. Equol je hormonu podobná sloučenina, která se tvoří, když bakterie nalézající se v trávicím ústrojí metabolizují jiný fytoestrogen. Nicméně, asi pouze třetina lidí má nezbytné bakterie k produkci equolu. Studie ukazuje, že jak genistein, tak equol mají za následek časné narušení estrálního cyklu u zvířat a genistein také způsobil předčasný nástup puberty. U člověka by to mohlo být spojeno i s předčasným nástupem menopauzy. Narušení estrálního cyklu by mohlo vznikat v důsledku problémů s mozkem nebo vaječníky, a tak se výzkumníci rozhodli ke stanovení možného účinku nejenom na vývoj mozku a jeho funkce, ale v současnosti probíhá také hodnocení účinků těchto látek přímo na samotné vaječníky (Anderson et al., 1999).



Obr. 1 Srovnání molekuly estradiolu a equolu

Zdroj: (Marcinková, 2008)

Existuje několik společných strukturálních prvků pro sloučeniny s estrogení aktivitou obecně. Většina sloučenin jsou fenoly, jiné nefenolické aromatické sloučeniny přecházejí na fenoly biotransformací. Některé látky však nejsou ani aromatické (i když to je dosti neobvyklé), ale ty vykazují pouze velmi slabou estrogení aktivitu. Tedy nejzákladnější společný strukturální prvek je fenol, často s neobsazenou ortho polohou, ale obsahující poměrně objemné hydrofobní struktury v polohách *meta* a *para*. I když se ukázalo, že ani fenolický kruh není nutným požadavkem pro afinitu k estrogenímu receptoru. Proto se neustále provádějí různé vazebné studie, například se sleduje vliv a role hydroxy-skupiny, důležitost rozpustnosti a molekulární hydrofobní vlastnosti (Holoubek, Čadová 2001).

4.1 Vztah struktury a estrogení aktivity

Značné množství chemických látek, jak přírodních, tak antropogenních, o různé chemické struktury vykazují estrogení aktivitu. Pouze na základě struktury nelze odhadnout, zda bude daná látka vykazovat estrogení účinky. Ale v zásadě většina estrogeních látek má společné strukturální rysy, a to přítomnost fenolu nebo jeho funkčního ekvivalentu, lipofilitu, odolnost vůči metabolismu, schopnost bioakumulace.

Mezi přírodní fytoestrogeny patří kromě flavonoidů i různé mykotoxiny. Rostlinné bioflavonoidy zahrnují spoustu látek rozdílné chemické struktury (flavony, flavonony, flavonoly, isoflavony a příbuzné kondenzované produkty – kumestrol.) Množství rostlinných potravin dále obsahuje jiné zástupce přírodních estrogenů - 17 β -estradiol a estron. Estrogeny přírodního původu dále zahrnují vaječné steroidní hormony, značné množství přírodních produktů je produkováno rostlinami,

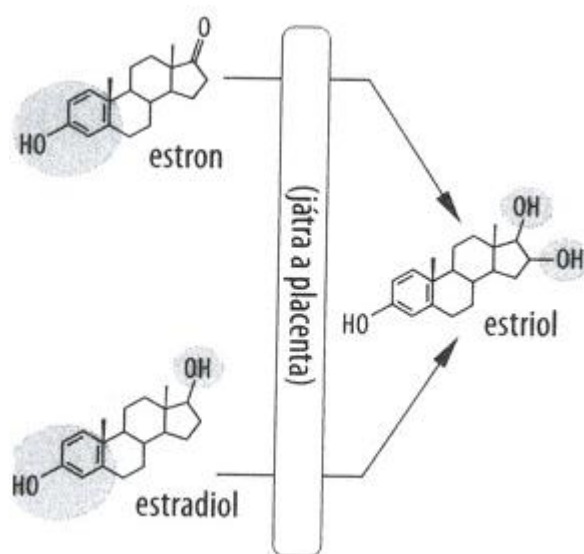
stejně tak mikroby. Ke kontaminaci dochází často potravou a jejich účinek může být ovlivněn působením střevních bakterií.

Dihydroxystilben a jeho deriváty jsou zástupci syntetických estrogenních látek. Navíc, některé průmyslové a environmentální chemické kontaminanty vykazují také estrogenní aktivitu a jsou to organochlorované pesticidy (o,p'-DDT), methoxychlor a další. K syntetickým estrogenům dále náleží kromě napodobenin neestrogenních hormonů i různé fenolické sloučeniny vznikající při různých průmyslových procesech (výroba fenolických plastů, neionogenních deetergentů atd.), dále značné množství průmyslových látek, zemědělských pesticidů a jejich metabolitů, případně chlorovaných derivátů vykazuje estrogenní aktivitu.

Jak tedy může tak velké množství tak strukturálně rozdílných látek vykazovat estrogenní aktivitu, se dá pochopit po poznání detailní struktury estrogenového receptoru a jeho interakcí s ligandy (Holoubek, Čadová; 2011).

5 ZÁSTUPCI FYTOESTROGENŮ, VÝSKYT

Význam fytoestrogenů spočívá v jejich schopnosti vyvolat stejnou (i když méně silnou) odpověď v organismu jako savčí estrogenní hormony, díky podobnosti ve struktuře. Estrogenní látky patří mezi fenolové sloučeniny a jsou dvojího typu: vlastní endogenní estrogény a látky s estrogenním účinkem. Estrogény jsou ženské (samičí) pohlavní hormony. Základní estrogenní skelet vychází z cyklického uhlovodíku 5 β -estranu. Z této sloučeniny je odvozen nejaktivnější estrogen; 3,17 β -estradiol, který se v organismu mění na estron a estriol.



Obr. 2 Syntéza estriolu

Zdroj: (Kučera, Fait; 2011)

5.1 Fytoestrogeny

Jako první rostlinný fytoestrogen byl prokázán v malém množství estron. Je obsažen v rostlinných tucích (palmový a palmojádrový olej) původem z palmy olejné (*Elaeis guineensis*) a také v semenech granátových jablek (*Punica granatum*). S palmovým a palmojádrovým tukem se může český spotřebitel setkat například v mražených krémech a zmrzlinách s rostlinným tukem. Granátová jablka se konzumují v čerstvém stavu nebo formou nápojů (grenadina, sirupy, ovocné víno). Příjem látek s estrogenním účinkem z těchto zdrojů je zanedbatelný pro nízké hladiny uvedených látek a velmi nevýrazný příjem těchto potravin.

Do skupiny fytoestrogenů zařazujeme isoflavonoidy, pterokarpany a lignany (Velíšek, 2011).

5.1.1. Isoflavony

Isoflavonoidy jsou přírodní látky ze skupiny flavonoidů. Vykazují různé biologické účinky. Výskyt isoflavonoidů, kterých je známo asi přes 200, se prakticky omezuje jen na luštěniny (čeleď bobovitých, *Fabaceae*), kam patří sója luštinatá (*Glycine max*). V menším množství se isoflavonoidy vyskytují také v některých dalších rostlinných čeledích, např. laskavcovitých (*Amaranthaceae*), kosatcovitých (*Iridaceae*), morušníkovitých (*Moraceae*) a růžovitých (*Rosaceae*). Hlavními představiteli isoflavonoidních látek jsou isoflavony (sloučeniny isomerní s flavony).

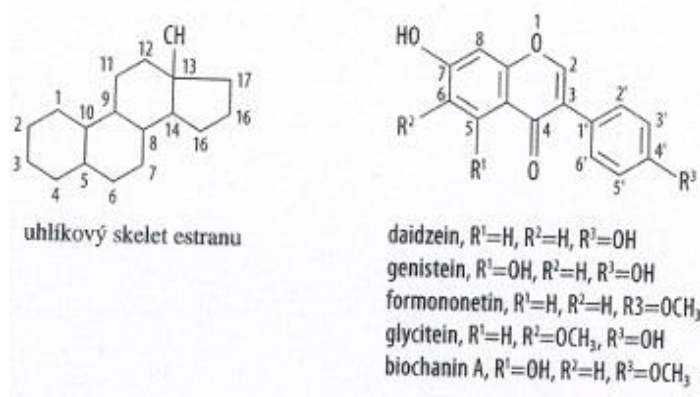
I některé deriváty isoflavonů se řadí mezi toxické látky, neboť vykazují estrogení účinky, jiné isoflavony zase vykazují také antimikrobní a další biologické účinky (Velíšek, Hajšlová 2009).

Flavonoidy tvoří rozsáhlá skupina fenolových látek, které obsahují ve své molekule dvě benzenová jádra spojená tříuhlíkovým řetězcem. Z pohledu estrogeních látek jsou zajímavé z isoflavonoidů především isoflavony a z nich biogenezi odvozené isoflavanoly a pterokarpany. Jejich výskyt je prakticky omezen na luštěniny, především sóju (Velíšek 2011). Nejznámější z isoflavonů jsou genistein, daidzein a glycitein. Jsou formovány, když tělo konvertuje isoflavonovou formu přesunutím glukózy na postranní řetězec a vytvoří tak formu aglykonu (genistein, daidzein a glyciteinu) před absorpcí nebo další metabolizací tělem. Míra v jaké se odehrává další metabolismus se zdá být značně odlišná mezi jedinci a je ovlivňována zbytkem stravy. Například pokud jedinec přijímá stravu bohatou na karbohydráty, vyvolá to zvýšení intestinální fermentace bakteriemi ve střevě a více fytoestrogenů se tak může transformovat. Během tohoto procesu je daidzein přeměňován na equol, produkt, který má mnohonásobně vyšší účinek než jeho prekurzor (Ransley et al., 2001).

Isoflavony jsou nejvíce prozkoumanou skupinou mezi fytoestrogeny. Mají výrazný antioxidační účinek. Tyto látky mají silnou afinitu k ER β . Afinita k ER α je mnohem slabší. Zdá se, že silná afinita k ER β může mít protektivní účinek před působením jiných látek na tento receptor (xenoestrogeny). Navíc isoflavony z červeného jetele mají schopnost inhibovat aromatázu (vznik estrogenů v těle) (Kučera, Fait 2011).

Isoflavony jsou tedy třída sloučenin příbuzných s isoflavonoidy. Některé jsou označeny jako antioxidanty, díky schopnosti vychytávat volné radikály. Mnoho studií potvrzuje, že při dietě bohaté na isoflavony se snižuje riziko rakoviny prsu a ostatních nádorových onemocnění, díky jejich roli ovlivňující metabolismus pohlavních hormonů a jejich biologické aktivitě napříč intracelulárními enzymy, syntézou proteinů, zhoubné buněčné proliferace, diferenciaci a angiogeneze (Kučera, Fait; 2011).

Isoflavony se nejčastěji vyskytují v sójových bobech, a to ve čtyřech různých formách: jako glykosid, malonylester glykosidů, acetylester glykosidů a jako necukerná složka glykosidů, tedy aglykon. Posledně jmenovanou složku představují isoflavony daidzein (7,4'-dihydroxyisoflavon), genistein (5,7,4'-trihydroxyisoflavon), glycitein (7,4-dihydroxy-6-methoxyisoflavon), v menší míře je to pak formononetin (7-hydroxy-4'-methoxyisoflavon) a biochanin A (5,7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavon) (Velíšek, 2011).



Obr. 3 Aglykony isoflavonů

Zdroj: (Kučera, Fait; 2011)

Mezi isoflavony patří také formononetin, který sám o sobě nejeví estrogenní aktivitu, ovšem v zažívacím traktu přechází působením bakteriální mikroflóry na aglykon a přes daidzein na estrogenní produkt equol (Velíšek 2011). Isoflavony, které jsou pro nás zajímavé z hlediska výskytu v potravinách, jsou běžně substituované deriváty isoflavonu, kde došlo k nahrazení dvou nebo tří atomů vodíku hydroxylovými skupinami. Isoflavon se liší od flavonu (2-phenyl-4H-1-benzopyr-4-one) polohou fenylové skupiny.

Lze říci, že jsou rozšířeny v přírodě jen úzce, a to v rostlinách vikvovitých (*Viciaceae*). Jejich nejbohatším zdrojem je sója luštinatá, zejména pak daidzeinu

a genisteinu, jejich obsah v některých odrůdách dosahuje až několika gramů na kilogram. Přesto je to osvědčená a bezpečná plodina. Dále se vyskytují v červeném jeteli (*Trifolium pratense*) a v některých léčivých rostlinách, jako je kručinka barvířská (*Genista tinctoria*) a janovec metlatý (*Sarothamnus scoparius*). V malém množství jsou zastoupeny i v žitě a výrobcích z něho, objevují se i v pivu a bourbonu. Nově byly nalezeny i v rybízu a dalším drobném ovoci (Holoubek, Čadová; 2011).

Ve výrazně menším měřítku se isoflavony vyskytují také v podzemnici olejné (1,30 mg/kg), ve slunečnicových semenech (0,22 mg/kg) a v máku (0,25 mg/kg), převážně ve formě daidzeinu a genisteinu (Velíšek, 2011).

Formononetin a biochanin jsou hlavními isoflavony červeného jetele ale o těchto dvou rostlinách bude pojednáno blíže v další kapitole. Ten je sice sám o sobě neúčinný, ale působením střevní mikroflóry se postupně mění na daidzein, dihydrodaidzein a equol. Účinným estrogenem je teprve poslední jmenovaná látka, která se ovšem v jeteli nevyskytuje.

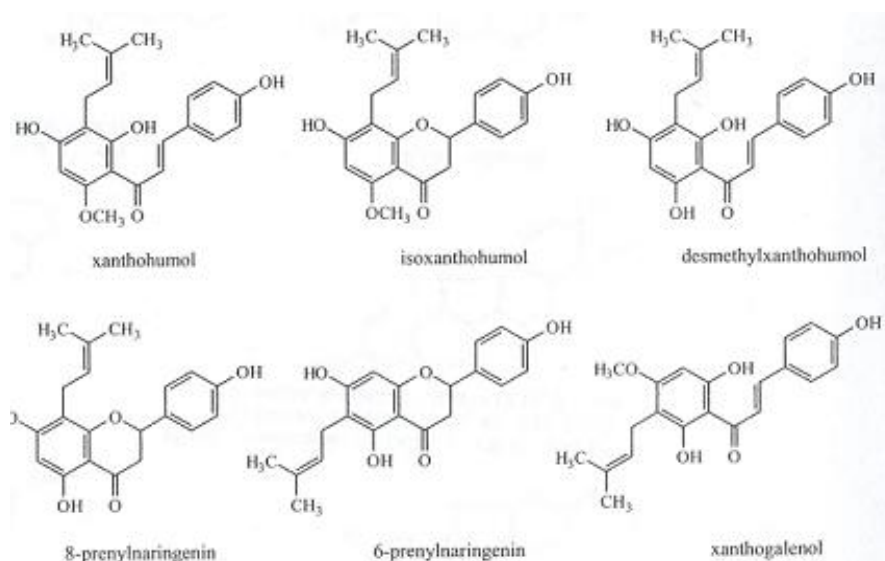
Daidzein a formononetin jsou významnými prekurzory pro pterokarpany – skupinu modifikovaných isoflavonoidů vyskytujících se v malém množství v bobovitých rostlinách i dalších čeledí. Typicky se zde uplatňují proti patogenům (Moravcová, 2008).

5.1.2 Prenylflavonoidy

Velice účinnými látkami v obraně rostlin proti mnoha škůdcům jsou v bobovitých rostlinách mnoho prenylovaných isoflavonů, vzniklých právě prenylací isoflavonových prekurzorů dimethylallyl-disfosfátem.

S prenylovanými isoflavony jsou příbuzné prenylované flavonoidy (chalkony a flavanony neboli dihydroflavony) nacházející se ve zralých samičích květenstvích (šišticích) chmele otáčivého (*Humulus lupulus*, konopovité, *Cannabaceae*). Jejich množství závisí na klimatických podmínkách a odrůdě chmele. V poslední době se studují jejich estrogenní a antikarcinogenní účinky. Nejdůležitější sloučeninou je chalkon xanthohumol, který nevykazuje estrogenní aktivitu. Jeho obsah v chmelových šišticích bývá do 1%. Doprovází jej flavanon isoxanthohumol, který z něj vzniká konverzí v kyselém prostředí při záhřevu. Isoxanthohumol je proto hlavním prenylovaným flavonoidem piva. Hlavním estrogenem je odpovídající flavanon 8-prenylnaringenin doprovázený flavanolem 6-prenylnaringeninem. 8-prenylnaringenin

vzniká také z isoxanthohumolu působením bakterií tlustého střeva nebo v játrech (Velíšek, Hajšlová 2009).



Obr. 4 Prenylované flavonoidy chmele

Zdroj: (Velíšek, Hajšlová; 2009)

5.1.3 Lignany

Lignany jsou široce rozšířeny v rostlinách jako lignin, který uděluje pevnost stěně rostlinných buněk. Rostlinné lignany existují jako diglukosidy které jsou konvertovány střevní mikroflórou na živočišné lignany, difenoly: enterodiol a enterolakton, právě ty jsou strukturně podobné estradiolu. Díky tomu, že jsou přítomny v buněčných stěnách rostlin, jsou tedy obecně nalézány v rostlinné potravě (Ransley et al., 2001).

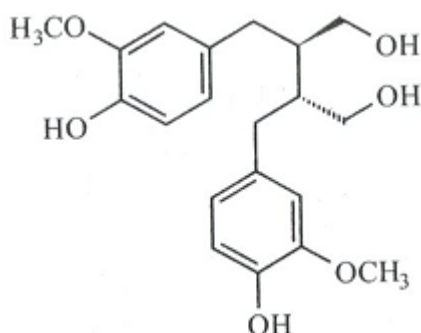
Narozdíl od ostatních skupin fytoestrogenů, lignany nejsou strukturně odvozené od flavonoidů, jsou tedy skupinou fenolových sloučenin, řazených mezi fenylypropanoidy, složky rostlin odvozené od koniferylalkoholu a dalších skořicových alkoholů. Lignany jsou dimery vzniklé spojením dvou fenylypropanových jednotek.

Známo je několik stovek lignanů. Podle stupně oxidace skeletu se rozeznává několik skupin sloučenin, z nichž mají potravinářský význam čtyři typy lineárních lignanů;

- lignany (deriváty butanu nazývané také diarylbutanoidy)
- lignanolidy (deriváty butanolidu)
- monoepoxylygnany (deriváty tetrahydrofuranu)
- bisepoxylygnany (furofuranové lignany)

Nejdéle známým lignanem typu diarylbutanoidů je nordihydroguajaretová kyselina (NDGA).

Lignany se nacházejí jako hlavní složky u celozrnných výrobků z obilovin, jsou v nejrůznějších semenech, celých zrnech, luscích zeleniny a v ovoci, ale při technologickém zpracování využívajícím moderní techniky mletí je obvykle frakce lignanů oddělena společně se slupkami a vlákninou, dále v rýži, luštěninách, ořeších (Velíšek, Hajšlová; 2009). Lidská strava na lignany není příliš bohatá. Nejdůležitějším zdrojem lignanů jsou rostlinné oleje, zejména lněný olej, který obsahuje v sušině sekoisolariciresinol (SECO)



Obr. 5 Sekoisolariciresinol

Zdroj: (Velíšek, Hajšlová; 2009)

Dalším zdrojem lignanů je celozrnné žitné pečivo nebo různé typy vlákniny a byly nalezeny i v drobném ovoci. Dříve se předpokládalo, že lignany jsou metabolity pouze vyšších rostlin, ale nyní se ukazuje, že existují přirozené savčí lignany, enterodiol a enterolakton, které byly dokázány v biologických tekutinách lidí i zvířat.

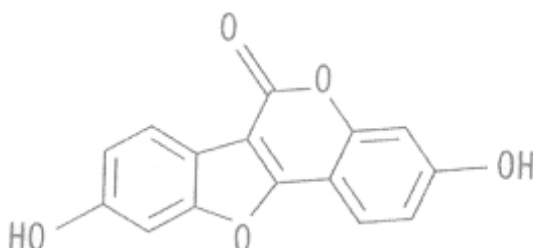
Dalším známým zástupcem je v menší míře matairesinol (MR). Hlavními zdroji jsou semena lnu, která obsahují 3700 mg/kg SECO a 10,9 mg/kg MR. U ostatních zdrojů (pšenice, mrkev, brokolice a mák) je obsah těchto látek o 2-4 řády nižší.

5.1.4 Pterokarpany

Pterokarpany jsou skupinou modifikovaných isoflavonoidů vyskytující se v malém množství v bobovitých rostlinách (*Fabaceae*) i v rostlinách několika dalších čeledí. Typicky se zde jako fytoalexiny uplatňují při ochraně proti patogenům. Na rozdíl od většiny isoflavonoidů jsou syntetizovány jako reakce na biotický a abiotický stres.

Důležitými prekurzory pro pterokarpany jsou isoflavony daidzein a formononetin (Velíšek, Hajšlová; 2009).

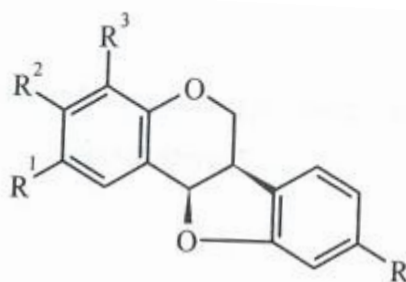
Ze skupiny pterokarpanů je hlavní estroaktivní látkou kumestrol jeho estrogenní aktivita je až 40x vyšší než u isoflavonů.



Obr. 6 Kumestrol

Zdroj: (Kučera, Fait; 2011)

Koncentrace kumestrolu se při klíčení může navýšit až 140x. Jeho obsah v sójových bobech se pohybuje v mezích 0,05-0,20 mg/kg (Kučera, Fait; 2011). Nejvyšší množství kumestrolu je obsaženo ve slupkách sójových bobů. V menším množství bývají přítomny další příbuzné sloučeniny, jako je medikarpin, lucernol, sativol a další (Velíšek, Hajšlová; 2009).



(-)-medikarpin, R = OCH₃, R¹ = H, R² = OH, R³ = H
(-)-lucernol, R = OH, R¹ = OH, R² = OH, R³ = H
(-)-sativol, R = OH, R¹ = H, R² = OCH₃, R³ = OH

Obr. 7 Medikarpin, lucernol, sativol

Zdroj: (Velíšek, Hajšlová; 2009)

5.1.5 Kumestany

Ačkoliv byla z rostlin izolována řada kumestanů, z hlediska estrogenní aktivity a obsahu v rostlinném materiálu je nejdůležitější kumestrol, který je základním fytoestrogenem vojtěšky (*Medicago sativa*). Pro člověka je opět zdrojem kumestanů potrava, respektive vhodné dietetické doplňky, a to hlavně z vojtěšky s obsahem kumestrolu v sušině 5,6 mg/g.

Kumestrol je estrogenem i ostatních pícnin, nachází se například v cizrně beraní (*Cicer arietinum*). Kumestrol má přibližně stejnou vazebnou afinitu pro ER- β receptor estrogenu jako 17 β -estradiolu, ale mnohem nižší afinitu než 17 α -estradiol, i když účinnost kumestrolu na obou receptorech, je mnohem menší než u 17 β -estradiolu. Vzhledem k estrogenní aktivitě některých kumestanů, různé syntézy byly vyvinuty, které umožňují přípravu coumestanu tak, aby jejich farmakologické účinky mohou být prozkoumány. Mezi potravinové zdroje s vysokým kumestanů patří hrách, fazole, a zejména vojtěška a jetel kapusty (Tuskaev, 2013).

5.1.6 Stilbeny

Stilben existuje ve dvou možných isomerech. První z nich je trans-1,2-difenylethylen, nazývaný (*E*)-stilben nebo trans-stilben. Druhým je cis-1,2-difenylethylen, nazývaný (*Z*) nebo cis-stilben. Především (*E*)-stilbeny mají estrogenní aktivitu a proto se používají na výrobu syntetických estrogenů (Diethylstilbestrol, Fosfestrol, Dienestrol).

Hydroxylované deriváty stilbenu (zajímavější z hlediska estrogenního účinku) jsou stilbenoidy. Z biochemického hlediska patří do skupiny fenylopropanoidů, sdílejí s nimi i většinu z jejich biosyntézy s chalkony. i stilbenoidy mohou působit jako fytoalexiny, výskyt těchto látek se však neomezuje pouze na rostliny - bakteriální stilbenoid existuje v symbiontech rodu *Photorhabdus* z kmene hlístic (Joyce et al., 2008).

Z derivátů stilbenu je nejdůležitější resveratrol, který je nejvíce obsažen ve slupkách červené révy vinné (*Vitis vinifera*). Jeho koncentrace ve víně z červeného hrozna je obvykle od 6,3 do 15,3 mg/l, zatímco pro bílé odrůdy se hodnota pohybuje od 0,2 do 0,5 mg/l. Ojediněle je mu přisuzována i estrogenní aktivita (Moravcová, 2008). Dále se nachází i v burských oříšcích (*Arachis hypogaea*). Ostatní zdroje zahrnují borůvky, brusinky, kurkumu, chmel a moruše. V menším množství je obsažen v brusnici borůvce nebo bezinkách. Pochopitelně se vyslytuje i v komerčních produktech z těchto plodů, částečně pak ve víně, které obsahuje přes 1,5 mg resveratrolu na 100 ml v závislosti na typu vína, metodě výroby a kvantifikaci. Ve větším množství se tvoří

ve slupce bobulí modrých odrůd a uvolňuje se do vína během fermentace (Udenigwe, Aluko; 2012). V rostlinné potravě se polyfenoly vyskytují nejčastěji ve formě glykosidů, částečně také jako estery. Jsou antioxidantivně aktivní, jejich aktivita závisí na počtu a poloze OH-skupin a na pH (Belitz et al., 2009).

5.2 Fytoestrogeny v potravinách

Již v roce 1975 bylo popsáno 94 rostlin s látkami, které vyvolávaly estrogenovou aktivitu (Farnsworth et al. 1975) a bylo označeno také 29 specifických látek s estrogení aktivitou. Poznatky o rostlinných zdrojích látek s estrogenovou aktivitou se postupně rozšiřovaly.

Zde je podrobnější seznam potravin běžně dostupných v naší zemi, o kterých je známo, že obsahují látky s estrogení aktivitou:

- sója a sójové produkty
- lněná a sezamová semínka
- pískavice řecké seno (obsahuje diosgenin, ale také se používala na výrobu Testofenu, produktu užívajícím muži na podporu vzrůstu hladiny testosteronu)
- oves, ječmen
- fazole, čočka
- sladké brambory
- rýže
- vojtěška
- fazole mungo
- jablka, mrkve, granátová jablka
- pšeničné klíčky
- růžičková kapusta, špenát
- česnek
- rýžové otruby
- lupin
- kudzu (čeleď Fabaceae)
- kořen lékořice, káva
- máta, ženšen
- chmel
- bourbon, pivo

- fenykl a anýz
- červený jetel (někdy bývá složkou zeleného hnojení)

5.2.1 Sója a sójové produkty

Jako hlavní zdroj fytoestrogenů byla uznána sója, k té se také většinou přiřazují hodnoty obsahů fytoestrogenů v potravinách. Podle Renleyho a Blocka (1996) byly tyto uvedené údaje mezními hodnotami či hodnotami průměrnými ze sérií stanovení s převahou použití vysokoúčinné plynové chromatografie (HPLC). Obsah látek s estrogenovou aktivitou v produktech ze sóji demonstruje následující tabulka;

Sójový produkt	Daidzein (µg/g)	Genistein (µg/g)
Sójové boby	22-1800	69-1897
Pražené sójové oříšky	563	869
Sójová mouka	90-742	183-939
Sójová mouka odtučněná	575-2100	600-1000
Sójový bílkovinný konc.	83-568	568-707
Sójový bílkovinný izolát	77-271	265-557
Sójový nápoj tekutý	7-74	11-103
Sójové klíčky	75-211	112-330
Sójová omáčka	8-14	5-9
Tofu	29-253	40-306
Tempeh	137-273	235-398
Miso	71-366	177-574

Tabulka 1 Obsah látek s estrogenovou aktivitou v produktech ze sóji

Zdroj: (Kučera, Fait; 2011)

Data ukazují na značnou rozmanitost výsledků získaných na hlavním potravinovém zdroji nutrientů s estrogení aktivitou, a to přesto, že byla jako zdroj estrogenních látek zvolena jediná plodina, byť v různých odrůdách. Dostupnost látek s estrogení aktivitou přítomných v sóje, je vyšší u fermentovaných produktů (Velíšek 2002).

Sójový produkt	Obsah isoflavonů
Sójové boby	0,13-0,42 %
Sójová mouka	0,20%
Sójový izolát	0,06-0,10 %
Sójový koncentrát	0,07%

Tabulka 2 Obsah isoflavonů v sójových produktech

Zdroj: (Kučera, Fait; 2011)

Obsah fytoestrogenů se tedy liší podle druhu potravy a mohou se i výrazně lišit v rámci jedné skupiny potravin (sójové nápoje, tofu, jak je vidět na uvedených tabulkách) v závislosti na technologickém zpracování a typu použitých sójových bobů (Mebrahtu et al., 2004).

Protein extrahovaný ze sóji se používá nejen prakticky po celé Evropě jako přídatná látka primárně při zpracování potravin a tento trend nárůstá rok od roku. To dělá ze sóji pronikající složku do lidské stravy v industrializované společnosti. Rozpustný extrahovaný koncentrát se dnes běžně také přidává jako aditivum do krmiva hospodářských zvířat (Renald et al., 2002). Sójové proteinové koncentráty (65% sójového proteinu) v závislosti na způsobu zpracování buď obsahují nutričně významné množství isoflavonů, nebo je neobsahují prakticky vůbec. Obecně je ale hladina isoflavonů v nejběžnějších sójových koncentrátech poměrně nízká. Syrové, sušené sójové boby mohou obsahovat obvykle 2 až 4 mg isoflavonů na gram. Většina tradičních sójových výrobků, jako tofu, sójové mléko, tempeh a miso jsou bohatým zdroji isoflavonů, kterých dodávají v jedné porci 30 až 40 mg. Pouze dva sójové výrobky isoflavony neobsahují, a to sójová omáčka a sójový olej

Bohaté na isoflavony jsou naopak texturovaný sójový protein a sójová mouka. Sójové proteinové izoláty (90 % sójového proteinu) obsahují isoflavonů méně než posledně jmenované výrobky, obsažené množství je ale stále ještě velmi významné. Skupina sójových výrobků, často označovaná jako "výrobky druhé generace" (sójová zmrzlina, hot dogs...) má mnohem nižší obsah isoflavonů vzhledem k tomu, že obsahují značné množství nesójových ingrediencí.

Nejen fermentační procesy ovlivňují změny obsahů isoflavonů; při vaření se sice daidzein a genistein nerozkládají, ale pražení fazolí vyvolává ztráty okolo 21% pro genistein a 15% pro daidzein. Zmrazené sójové fazole obsahovali o 20-30% méně genisteinu a daidzeinu ve srovnání s čerstvými a rovněž skladování syrových fazolí způsobilo pokles obsahu fytoestrogenů až o 75%. Výroba tofu neovlivňuje obsah isoflavonu.

Obsah a složení isoflavonoidů v sójových bobech závisí také na odrůdě a lokalitě, na způsobu úpravy a na přísadách. U misa a sójové omáčky se obsah aglykonu zvyšuje (dále pak přechází v trávicím traktu na daidzein a equol) (Nakamura et al., 2000).

Jak již bylo uvedeno, obsah estrogenně aktivních látek je odvislý v menší míře i od způsobu zpracování; při mlýnském zpracování sójových bobů na sójovou mouku

se obsah isoflavonů v podstatě nemění ale při zpracování sóji na bílkovinné izoláty (extrakce v alkalickém prostředí) dochází zhruba k 40% ztrátám isoflavonů. Při použití kyselé hydrolyzy jsou ve výsledném produktu zachovány pouze isoflavonové aglykony. Kulinární úprava vede zhruba k 11% ztrátám vyluhováním a cca 50% ztrátám vařením. Při studiu fermentace a použitých fermentačních médií na obsah isoflavonů v sójových bobech se ukázalo, že nejvyšší obsah isoflavonů (v mg na 100 g) byl ve fermentovaných bobech s použitím kultury *Bacillus nato* (139,5), pak ve fermentovaných bobech s použitím kultury *Aspergillus oryzae* (130,7); v nefermentovaných bobech byl obsah isoflavonů 81,8 mg na 100g. Na druhou stranu původní obsah 12 forem isoflavonů v syrových sójových bobech byl zjištěn na úrovni 2867 mg/kg; po 45hodinové fermentaci u sójové pasty se obsah isoflavonových glukosidů snížil o 40%, množství aglykonů se snížilo 2,9-54x. (Woo-Youl Chung et al., 2008).

Když byly analyzovány průmyslově připravené potraviny i pokrmy obsahující sóju upravené jen v domácnostech a následně stanoveny všechny formy isoflavonů, celkový obsah činil v průměru 4 mg/kg. Následně byl vypracován návrh jedenáctidenního menu s vysokým obsahem (100mg) a nízkým obsahem (0,5 mg) příjmem isoflavonů denně. Přitom denní příjem isoflavonoidů ze sóji a výrobků ze sóji byl odhadnut u japonské populace na 27,80 mg, z toho daidzeinu 12,02 mg, glyciteinu 2,30 mg a genisteinu 13,48 mg (Nakamura et al., 2000; Wiseman et al., 2002).

Jak již bylo uvedeno v úvodu, potraviny a produkty s estrogením účinkem se používají v asijských zemích po staletí. V současné době je denní příjem látek s estrogením účinkem nejvyšší v asijských zemích a činí kolem 20-50 mg isoflavonů na průměrného spotřebitele. V USA byla spotřeba isoflavonů odhadnuta na 1-3 mg denně, v Evropě je to ještě o řád méně (Moravcová, 2008).

V klíčcích sójových bobů a dalších luštěninách je obsažen i isoflavon kumestrol v množství 0,05-0,2 mg.kg⁻¹. Největší množství kumestrolu je obsaženo ve slupkách bobů. Jeho estrogení aktivita je až 30-40 krát větší než aktivita isoflavonu. Stopy kumestrolu byly stanoveny v mražených hrachových luscích (*Pisum sativum var. sacharatum*), růžičkové kapustě, špenátu, estrogení aktivita se také připisuje cibuli, česneku, bramborám, okurkám, zelí a kávě, ale také pivu a kukuřičné whisky (bourbonu). Problém porovnání estrogeních aktivit jednotlivých složek potravin také komplikuje skutečnost, že se k jejich stanovení používá řada různých analytických metod. Existuje také genetická rozmanitost jednotlivých odrůd a odchylky

v pěstitelských stanovištích a geografických odlišnostech. Svůj vliv má i stupeň zralosti (Kučera, Fait; 2011).

5.2.1.1 Rozdílné koncentrace

Většina autorů se přiklání k názoru, že hlavním důvodem rozdílné koncentrace fytoestrogenů v podobných potravinách je původ vstupní suroviny, neboť například sójové fazole z Japonska a USA mají zhruba stejný obsah daidzeinu, ale liší se asi o 27% v obsahu genisteinu. Dalším faktorem může být doba skladování potravin v obchodech, klimatické a pěstební podmínky a vegetační zralost rostlinné suroviny.

Na základě dostupných dat je více než patrné, že o množství přijímaných fytoestrogenů ve stravě se z velké části podílí náš původ – tedy v první řadě tradice a národní zvyky. Byla zjištěno, že většina asijské populace zkonsumuje okolo 20-80 mg genisteinu za den, přitom příjem fytoestrogenů genisteinu ve Spojených státech činí pouze 1-3 mg denně. Dalším nezanedbatelným vlivem je skladba potravy v různých dietách. Ti lidé, kteří upřednostňují makrobiotickou stravu vylučují močí 40krát více fytoestrogenů než laktovegetariáni, a ti zase asi 20 krát více než konzumenti jak živočišné, tak i rostlinné stravy (Manach et al., 2004).

5.2.2 Jetel červený a vojtěška

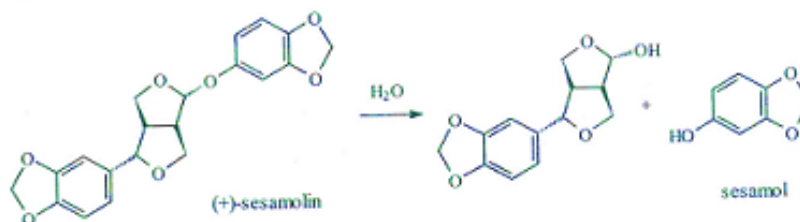
Z celé škály potravin, které člověk běžně konzumuje, je kravské mléko pravděpodobně jedinou potravinou, která může za určitých podmínek obsahovat equol v relevantním množství. V sortimentu krmiv, běžně využívaných ve výživě laktujících dojníc, jsou I dva významné zdroje isoflavonů a tedy i equolu v mléce, a to sójové boby a jetel, především červený (Mustonen et al. 2009). Jetel červený obsahuje formononetin, biochanin A, daidzein a genistein. Isoflavony, ať už ze sóji nebo z jetele červeného, jsou v batoru metabolizovány ruminální mikroflórou až na equol, metabolicky neaktivní p-ethylfenol a v malé míře i na O-desmetylanglensin, které jsou vylučovány z těla dojníc především močí a mlékem a v malé míře i výkaly (Křížová et al., 2011). Doposud je nejlépe zdokumentován prostup isoflavonů pocházející z jetele červeného do mléka. Z jetelovin je jetel červený nejbohatším zdrojem fytoestrogenů, kterých obsahuje 1-2,5% v sušině, zatímco jetel bílý jen 0,02-0,06 % v sušině, většinu z těchto fytoestrogenů tvoří isoflavony, především pak formononetin, a to v množství 0,8-11 mg/g sušiny, v závislosti na části rostliny, stádiu růstu, kultivaru a podmínkách pěstování a konzervace. Při zkrmování jetele červeného se mohou hladiny equolu v mléce pohybovat v rozmezí od 200 – 600 µg/l, byly však zaznamenány i hladiny

dosahující 1000 µg/l a dokonce i 1700 µg/l (Mustonen et al. 2009; Steishamn et al. 2008).

Hlavním estrogenem většiny píceň je ale opět kumestrol, např. vojtěšky (tolice setá, *Medicago sativa*), kde jej doprovází medikarpin, maackiain se nachází v cizrně beraní (*Cicer arietinum*), pisatin v hrachu setém (*Pisum sativum*), faseolin ve fazolu obecném (*Phaseolum vulgaris*) a glyceolliny v sóji luštinaté (*Glycine max*) (Velíšek, Hajšlová 2009).

5.2.3 Sezamová semínka

V sezamovém oleji, získávaném ze semen sezamu indického (*Sesamum indicum*, *Pedaliaceae*), se ve větších množstvích nachází sesamin, rozšířen častěji ve vyšších rostlinách, a navíc odolnější vůči autooxidaci. Kromě sesaminu jsou hlavními složkami semen sesamolin, v menším množství je přítomen pipritol, sesamolinol a další. Sesamin má pro rostlinu mimo jiné insekticidní účinky. Za vlastní antioxidant se považuje sesamol, který je v malém množství přítomen již v semenech. Ve větším množství však vzniká až hydrolyzou sesaminu při rafinaci oleje a při termických operacích (Velíšek, 2011).



Obr. 8 Vznik sesamolu ze sesaminu

Zdroj: (Velíšek, 2011)

5.2.4 Chmel

S fenylovými isoflavony jsou příbuzné fenylové flavonoidy nacházející se ve zralých samičích květenstvích chmele otáčivého (*Humulus lupulus*). Rostlina biosyntetizuje a sekretuje prenylflavonoidy spolu s chmelovými pryskyřicemi a silicemi do lupulinových žlázek. Více než 80 až 90 % z nich tvoří xanthohumol (XN) v množstvích 0,2 až 1,1 hm.% v sušině chmele, který přechází do piva v izomerizované formě jako isoxanthohumol (IX). Dále je v chmelu zastoupen desmethylxanthohumol

(2- 5%) a xanthohumol C. Ostatní prenylflavonoidy se v chmelu vyskytují pouze ve stopovém množství (Basařová, 2010).

5.2.5 Obiloviny

V obilovinách se jako β -D.glukopyranosidy vyskytují komplexní hydroxamáty, které při klíčení semen přecházejí intramolekulární cyklizací na deriváty oxazolinu (Hauptman, 1988). V mladých rostlinkách pšenice, kukuřice, rýže i jiných dalších obilovin se vyskytují sloučeniny jako například 3H-benzoxazol-2-on či 7-methoxy-3H-benzoxazol-2-on a jim podobné, které sice nepůsobí jako estrogény, ale stimulují sekreci estradiolu z folikul vaječníků, což vyvolává známky estrogenního účinku (Que et al., 2005).

5.2.6 Fytoestrogeny v potravinách živočišného původu

V několika státech byla již provedena studie na prostup látek s estrogenním účinkem do mléka dojníc, například ve Francii provedli studii, ve které vyšetřovali výskyt hlavních fytoestrogenů (isoflavonů, lignanů, kumestanů) v různých komerčních vzorcích kravského mléka. Mléko bylo zvoleno proto, že představuje hlavní potravinu pro citlivou skupinu populace, tj. děti. Celkem se analyzovalo 26 různých komerčních vzorků mléka, přičemž se bral do úvahy vliv obsahu mléčného tuku (plnotučné nebo odstředěné mléko) i typ výkrmu krav (z konvenčního a ekologického zemědělství). Výsledky ukázaly, že se isoflavony v mléku vyskytují ve stopových množstvích (v rozsahu 0,1–5,0 $\mu\text{g/l}$). Ve všech analyzovaných vzorcích však byla vysoká koncentrace látek s estrogenním účinkem, a to: equolu (produkuje se ve střevech jako metabolit např. sóji a sójových potravin) a enterolaktonu (lignanu). Jejich obsah se pohyboval v rozmezí 14,1–293 (equol) a 14,3–94,4 $\mu\text{g/l}$ (enterolakton) Důsledky potenciálního estrogenního účinku potravin na citlivé skupiny populace, kam zařazujeme především děti, je proto zapotřebí dále prověřovat (Antignac, 2004; Steinshamn et al., 2008).

5.3 Mykoestrogeny

Plísně rodu *Fusarium* produkují mykoestrogeny, z nichž je nejnebezpečnější zearalenon, nejvíce estrogenně aktivní, někdy označovaný i jako F-2 toxin. Plíseň široce infikuje krmivářské a potravinářské obilí a je schopna produkovat až 1900 $\mu\text{g/kg}$ toxinu v suché hmotnosti obilí. U krmených zvířat se obvykle do týdne po konzumaci kontaminované potravy objeví známky hyperestrogenismu. Riziko také představuje

kontaminac kravského mléka používaného následně v potravinářství (Kučera, Fait;2011).

5.4 Expozice xenoestrogenům

V životním prostředí přijdeme velice snadno s přírodními i člověkem vyrobenými chemickými látkami s estrogení aktivitou. Jedním typem jsou i tzv. environmentální estrogény, které mají vliv na vývoj i fyziologii organismu velice shodný s estrogení kontrolou reprodukce organismů. Mohou být jak rostlinného původu, tak mohou pocházet i z antropogenních zdrojů, produkovány jako pesticidy nebo odpadní produkty výrobních procesů (o,p'-DDT, polychlorované bifenyly, atd.). Kontaminace organismu je dána převážně potravou (Holoubek, Čadová; 2001).

Xenoestrogeny připravené chemickou syntézou jsou především deriváty stilbenu, dříve používané jako stimulatory růstu při výkrmu skotu. Diethylstilbestrol je o cca 1,5 řádu více účinnější než estron a má o několik řádů vyšší účinnost než aglykony isoflavonů. Je silně karcinogenní, a proto byl vyloučen ze spotřeby ve veterinární oblasti. Podobný estrogení účinek mají některé halogenderiváty pesticidů, ftaláty (změkčovačla plastů), polychlorované bifenyly a některá veterinární léčiva (Kučera, Fait; 2011).

Xenohormony se z průmyslové výroby nejen potravinářských závodů dostanou odpadními vodami, spláchnutím z polí, zahrad, silnic, uvolněním do potravin z plastů či vyloučením lidskou močí, případně močí hospodářských zvířat, snadno do prostředí a především pak do pitné vody, která se dále používá při zpracování zemědělských produktů a potravinářských surovin. Můžeme je sníst spolu s masem, mlékem i jinými potravinami. Mohou se nahromadit i v organismech, které jsou potom pozřeny svými konzumenty nebo predátory, a tak putují potravním řetězcem a působí na všech úrovních.

O jejich působení platí to, co bude uvedeno v dalších kapitolách – váží se na receptory buněk. Ovšem každá látka považovaná za xenohormon působí trochu jinak, na jiné receptory a v jiných koncentracích. Liší se také silou, kterou se vážou na dané receptory. Nejsledovanější estrogení xenohormony jsou látky podobné opět samičím hormonům, případně přímo ženské hormony z antikoncepčních pilulek. Estrogenita – míra jejich účinku se stanovuje v testech, při nichž se látka v různých koncentracích aplikuje na izolované živočišné buňky geneticky upravené tak, že mají na estrogení receptor navázanou nějakou měřitelnou reakci (například fluorescenci).

Buňky pak fluoreskují tak silně, jak silná je vazba na receptory. Estrogenita se vztahuje na 17 β -estradiolu – jemu byla přisouzena estrogenita o hodnotě 1 (jde o běžný lidský hormon), hodnota 1 je nejsilnější estrogenní aktivita, protože receptory v organismech jsou konstruovány přesně pro tento hormon. Čili 17 β -estradiol je ten nejlepší klíč, ten pravý pro zámek – receptor na buňce (Jánišová, 2013).

Environmentální estrogény iniciují svůj účinek v organismu jako endoestrogény interakcí s jaderným receptorovým systémem (Hoivik, Safe 1998). Výsledný estrogen-receptorový komplex interaguje s nukleotidovou sekvencí známou jako "estrogen response elements" (EREs), a tím zahájí transkripci DNA. Tedy všechny estrogény působí přes receptor tak, že ho z neaktivní formy převedou na aktivní (DeRosa et al., 1998).

Toxicita environmentálních estrogénů může zahrnovat celou řadu faktorů a může se projevit několika příbuznými, ale rozdílnými mechanismy. Nejběžnější typ toxicity je dán vazbou environmentálních estrogénů na estrogenový receptor a následnou zvýšenou estrogenní odpovědí. Toxicita se v tomto případě projeví hyperestrogenismem, nadměrnými fyziologickými efekty estrogenních hormonů (Safe, Gaido; 1998).

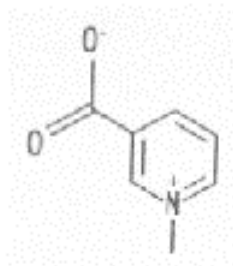
Pohlavní xenohormony mohou způsobit neplodnost dospělých živočichů a rakovinu, poškozovat vajíčka a plod nebo měnit některé prvky chování a vzhledu související s pohlavním životem. V případě ostatních xenohormonů byly zaznamenány deformace těla vyvíjejících se organismů, měknutí skořápek vajíček, poruchy růstu a další, v přírodě i v testech na modelových organismech. Je důležité upozornit, že dospělce už žádný xenohormon na opačné pohlaví nepředělá, ovšem dospělý jedinec je ohrožen ztrátou plodnosti – a to samci i samice.

Také u lidí je v posledních desetiletích zaznamenáván úbytek spermií, zvýšená neplodnost a výskyt rakoviny související s hormonálními poruchami. Prokázat kauzalitu s konkrétními chemickými látkami je však velmi komplikované. Většina studií, které se o to pokusily, byla později kritizována pro zavádějící nebo nedostatečně spolehlivé postupy. Mimo jiné, je zcestné předpokládat, že u lidí s velmi rozličnými životními návyky pochází jejich problémy ze stejného zdroje – v případě úbytku spermií může být na vině rovněž stres, špatné stravování, nezdravý životní styl, těsné kalhoty, umělé plenky, kouření a další faktory. Každopádně výskyt estrogénů byl, byť v nízké koncentraci, naměřen i v pitné vodě v Evropě, a to jak v kohoutkové, tak v baleen (Jánišová, 2013).

Většina estrogenů je hydrofobní. To je možná důvod, proč mají sloučeniny jako pesticidy, bifenyly (o,p'-DDT, DDE, PCBs), methoxychlor, ap.estrogenní aktivitu. Vzhledem k jejich lipofilitě jsou tyto látky akumulovány v lipidických tkáních a membránách, z kterých se pozvolna uvolňují a vyskytují se tak v určité stálé koncentraci v krvi; takováto kontinuální dávka pak může být více efektivní v stimulaci estrogenních odpovědí (Holoubek, Čadová; 2001).

5.5 Alkaloidy s estrogenním účinkem

Mezi látky s estrogenním účinkem můžeme zařadit i trigonellin. Je to alkaloid vznikající metabolickou přeměnou vitamínu niacinu (kyseliny nikotinové), obsažen v řadě léčivých rostlin; nejznámější z nich je třeba pískavice řecké seno (*Trigonella třeboenum graecum*). Podle botanického názvu svého zdroje získal svůj triviální název trigonellin.



Obr. 9 Trigonellin

Zdroj:(Kučera, Fait; 2011)

Jak můžeme vidět na obrázku, strukturou se steroidním látkám nepodobá. Chemicky je to 1-methylpyridinium-3-karboxylát. Proto překvapilo, když Clinton Allred objevil u této látky estrogenní účinky. Skutečný účinek není zatím znám. Chová se v různém prostředí různě, může být stejně tak rizikovým (stimuloval růst nádorových buněk v koncentraci 100 pmol/l), jako i prospěšným činitelem. V Indii se dnes používá jako součást přírodních preparátů tlumících účinky menopauzy (Petr, 2009).

5.6 Antiestrogeny

Bylo popsáno, že řada environmentálních chemikálií a látek v potravinách vykazuje tzv.antiestrogenní aktivitu, to znamená, že jsou potenciálními inhibitory estrogenem indukovaných efektů. Mnoho slabých estrogenů, např.bioflavonoidy, mohou v některých koncentracích působit i jako antiestrogeny.

Antiestrogeny jsou podle definice látky zeslabující normální působení endoestrogenů. Inhibují působení estrogenů tím, že soutěží s 17β -estradiolem o estrogení receptor. Mnoho halogenovaných aromatických sloučenin a dioxinů, jako TCDD, vykazují antiestrogení vlastnosti, ale jejich působení je mediováno více skrze neestrogen-receptorovým mechanismem, stejně tak jako antiestrogení působení hormone vyskytujících se v potravinách (Safe, Gaido; 1998).

Antiestrogení aktivita může být škodlivá, jestliže blokuje působení estrogenů během sexuální diferenciaci nebo v pubertě. Ale jinak se natiestrogení aktivita využívá především při léčbě rakoviny způsobené nesprávným působením estrogenů. Mezi používané antiestrogeny patří třeba tamoxifen, efektivní ve všech stádiích rakoviny prsu a v současné době se testuje, zda-li jej nelze využít i k prevenci vzniku nádoru. Patří do velké skupiny syntetických nesteroidních antiestrogenů, které působí jako částečný agonista estrogení aktivity. Naproti tomu tzv. čisté antiestrogeny kompletně blokují estrogení aktivitu, proto mohou být efektivnější při léčbě rakoviny prsu. (Holoubek, Čadová 2001).

6 VZNIK A METABOLICKÉ CESTY

Největší množství fytoestrogenů lze v našich podmínkách nejsnadněji zkonsumovat v sóji a výrobců z ní, vedle lipidů, sacharidů a proteinů jsou boby bohaté právě na isoflavony, fytáty, saponiny, fytosteroly, vitaminy a minerály. Je zajímavý i příznivý vliv β -conglycininu (protein), podobně jako fytosterolů, nikoliv však glycininu, na zlepšení lipidogramu (Moriyana et al., 2004; Kohno et al., 2006). Přibližně 90% celkového množství isoflavonů je přítomno v kotyledonu a zbylé množství v hypokotylu. Zatímco množství isoflavonů obsažených v kotyledonech kolísá závisle na teplotě v době sběru (klesá úměrně se zvyšující teplotě), koncentrace v hypokotylu zůstávají prakticky neměnné při různých teplotách. Celkový obsah isoflavonů může též velmi kolísat, a to v rozmezí 1160-3090 $\mu\text{g/g}$, či ve vztahu k odlišné pěstitelské lokalitě 460-1950 $\mu\text{g/g}$ (Mebrathu et al., 2004). Vliv má také teplota, přísun vody a živin, přítomnost škůdců a třeba i doba slunečního svitu.

Genistein a daidzein jsou přítomny v neaktivní formě β -D-glykosidů označovaných jako genistin a daidzin. Po perorálním užití jsou glykosidy hydrolyzovány bakteriálními β -glukosidázami v tenkém střevě na biologicky účinné aglykony, jež podléhají absorpci. Nicméně daidzein může být dále v trávicím traktu metabolizován na equol a O-demethylangolesin (O-DMA) a genistein na p-ethylfenol a 4-hydroxyfenyl-2-propionovou kyselinu. Všechny tyto látky, s výjimkou poslední zmíněné, je pak možné detegovat jak v krvi, tak i v moči. Schopnost přeměny daidzeinu na equol je druhově specifická a zároveň odráží složení střevní flóry (napomoci hydrolyze mohou i některé probiotické bakterie včetně např. rodu *Bifidobacterium* (Raimondi et al., 2009).

Zatímco například všichni hlodavci jsou producenty equolu, v lidské populaci se jedná o pouhých 30-50% (Atkinson et al., 2005). Aglykonické formy se však mohou vstřebávat již v žaludku, duodenu či proximálním jejunu (Yuan et al., 2007).

U osob nekonsumujících sóju se plasmatická koncentrace isoflavonů obvykle pohybuje v řádu nanogramů na litr, avšak při užití stravy bohaté na isoflavony se jejich koncentrace výrazně zvyšuje, a to až o tři řády. U zdravých jedinců se isoflavony vstřebávají velmi rychle s dosažením vysokých hodnot biologické dostupnosti. Maximálních plasmatických koncentrací tak bývá dosaženo v průběhu 4-7 hodin v případě aglykonů (detegovat v krvi je možné je již po 0,5-2 h); hovoříme-li o jejich

glykosidické formě, pak se jedná o 8-11 hodin. Klíčovým krokem pro jejich vstřebávání je tedy iniciační hydrolýza glykosidu. Větší aktivitu β -glukosidáz přitom mají osoby s chronicky zvýšenou konzumací sóji. (Wiseman et al., 2004). Absorpci však může významně ovlivňovat též složení střevní flóry, složení stravy, příjem stravy či např. střevní pasáž. Isoflavony, které jsou posléze vylučovány žlučí do střeva, podléhají enterohepatální cirkulaci. Biologický poločas daidzeinu je 9,3 a genisteinu 7,1 hodin (Yuan et al. 2007).

Jak je uvedeno výše, equol není rostlinného původu, ale vzniká z daidzeinu výhradně působením střevní mikroflóry. Právě na tuto látku se v poslední době soustředí zájem vědců, neboť byla prezentována hypotéza, že schopnost jedince přeměňovat daidzein na equol může být klíčovým faktorem pro klinickou účinnost sójových isoflavonů, která je vyšší u tzv. producentů equolu. V posledních studiích bylo zjištěno, že equol je *in vitro* více bioaktivnější než jeho prekurzor daidzein a má vyšší estrogenicitu, je účinnější antioxidant a vykazuje antiandrogenní vlastnosti (Setchell et al., 2009).

Na základě uvedených informací je celkem pochopitelné, že východní (asijská) část populace, u níž sója tvoří po několik staletí přirozenou součást jejich jídelníčku, dokáže přeměňovat daidzein na equol a tak je schopna využívat benefity, které příjem isoflavonů přináší, a že západní část populace tuto schopnost běžně nemá. Bylo tedy prokázáno, že v populaci existují podstatné inter-individuální rozdíly v úrovni bakteriálního metabolismu isoflavonů ve střevě (Rowland et al., 2000).

Equol se díky přítomnosti chirálního uhlíku ve své molekule může vyskytovat ve dvou biologicky účinných formách, a to jako S-(-) equol a R-(+) equol. S-(-) equol má vysokou afinitu k estrogenovým receptorům ER-beta; oba diastereoizomery modulují účinky androgenů (antagonizace působení dihydrotestosteronu); analogicky působí i samotný genistein (Basak et al., 2008). Oba enantiomery se rychle vstřebávají lépe se ale absorbuje R forma, ve střevě vzniká především S forma (Setchell et al., 2005). V případě, že jsou oba izomery podány per os ve formě racemátu, absorpce je pomalejší a dosažené plasmatické koncentrace jsou nižší (Setchell et al., 2009).

Schopnost některých osob vytvářet equol tak může být determinující nejenom z hlediska terapeutické účinnosti isoflavonů, ale do určité míry by mohla korelovat i s rizikem nežádoucích účinků. Ukázalo se, že vyšší procento producentek equolu je

mezi Hispánkami či u žen s vyšším sklonem k zácpě; překvapivě byla pozorována i korelace s vyšším vzděláním (Atkinson et al., 2008).

Za equol producenta je považován jedinec, jehož plasmatické koncentrace equolu dosahují hodnot >83 nmol/l; za jasného non-producenta pak osoba s koncentrací <40 nmol/l (analogické zhodnocení je možné provést rovněž na základě vyšetření moči, kde v případě equol-producenta je množství equolu vyšší než 1000 nmol/l) (Yuan et al., 2007).

Mechanismus účinku isoflavonů vzhledem k jejich strukturální podobnosti s 17β -estradiolem spočívá v jejich selektivní vazbě na estrogenové receptory, které modulují. Zatímco genistein, daidzein a equol mají relativně silnou afinitu k estrogenovým receptorům (ER), O-DMA má tuto afinitu velice nízkou, bez schopnosti působit estrogeně. Podobně i p-ethylfenol je hormonálně zcela neaktivní. Finální účinek záleží na mnoha faktorech, kromě tedy konkrétního typu isoflavonu hrají významnou roli i složení střevní mikroflóry (Nešporová, 2012).

7 VLIV NA LIDSKÝ ORGANISMUS

Od doby, kdy vědci detekovali v lidské moči a krevních vzorcích fytoestrogeny, víme, že tyto sloučeniny mohou být metabolizovány a absorbovány v našich tělech. Ve skutečnosti mohou fytoestrogeny po pozření podstoupit v našem těle několik možných cest; mohou být vyloučeny, absorbovány nebo se mohou degradovat do dalších metabolitů, které jsou také potencionálními fytoestrogeny (Lapčík, Stárka; 2004).

O estrogenech je známo, že mají velmi důležitou roli v řadě fyziologických dějů, přičemž nejzásadnější je jejich vliv na reprodukční systém a sexuální chování; přesto je však znám i jejich vztah k remodelaci kostí nebo např. ke kardiovaskulárnímu systému apod. (Kučera, Fait; 2011).

Je těžké odhadnout, třeba pouze na základě struktury, jak se látky budou chovat, jednou jako by to estrogény byly, jindy zase ne. V jádře i na povrchu buněk existuje více typů receptorů. Zatímco o povrchových receptorech pro estrogény toho dosud moc nevíme, jaderné jsou prostudovány docela dobře. Strukturu prvního estrogenního receptoru, označovaného ER- α , známe od roku 1986, v roce 1996 byl objeven ER- β (Lapčík, Stárka; 2004).

Oba receptory mají téměř totožnou část, která odpovídá za vazbu na DNA, a podle všech dosavadních pozorování opravdu ovlivňují stejné geny. Zato vazebná místa pro hormon se výrazně liší. Estradiol má vůči oběma receptorům téměř stejnou afinitu a oba je aktivuje. Naproti tomu ostatní látky jsou často vybíravé a vážou se výrazně lépe do receptorů jednoho typu. (Pro fytoestrogeny je to až na vzácné výjimky ER- β .) Vazba sama ale nerozhoduje o tom, jaká odpověď bude. Některé estrogeně účinné látky aktivují jenom jeden z receptorů, na druhý se vážou tak, že jej inaktivují (Weil, 2012).

Podle Terrance Grahama, Ph.Dr., ze státní university v Ohiu, bylo na vědeckém metodickém sympoziu o fytoestrogenech v září 1997 v Tusconu, Arizona, podáno vysvětlení, že vedle hormonální regulace buněk, isoflavony fungují také jako rostlinné ATB s antiplísňovým účinkem. Genistein a daidzein jsou isoflavonové molekuly obsahující cukr. V průběhu zažívání střevní bakterie buď rozštěpí nebo useknou molekulu cukru vytvářející stále více genisteinu a daidzeinu (Challem, 1998).

V posledních letech se zvýšená pozornost vědeckého výzkumu zaměřuje i na látky, které narušují endokrinní systém, EDCs (endocrine disruptor chemicals), do kterých se řadí právě i fytoestrogeny. Dosud se výzkum zaměřoval především na jejich sledování v různých druzích rostlinných zdrojů, byly vypracovány metody jejich stanovení v humánní moči, plazmě, “sójovém” a mateřském mléku. Stále je však málo informací o výskytu fytoestrogenů v potravinách, zvláště pak v potravinách živočišného původu a chybí údaje o odhadu expozice těmto sloučeninám u citlivé populace, např. u dětí. Velký zájem je proto o odhad výskytu fytoestrogenů v kravském mléku, neboť se při výkrmu zvířat zvyšuje používání mouky z různých rostlinných zdrojů, které obsahují velká množství isoflavonů.

Isoflavony přímo či nepřímo snižují hladinu cholesterolu, inhibují ztrátu kostní hmoty, zmírňují menopauzální symptomy u žen a vykazují i určitou protirakovinovou aktivitu. K prokázání klinického efektu je postačující i pouhá jedna porce sójových potravin (šálek sójového mléka, nebo 1/2 šálku tofu) (Kopáčková, 2011).

7.1 Menopauza

V ženském těle se přirozeně tvoří estron (E1) estradiol (E2) a estriol (E3), přičemž nejsilnější účinek z těchto tří estrogenů vykazuje estradiol (E2). Zatímco estradiol je nejčastěji se vyskytujícím estrogenem v těle negravidní ženy, vyšší koncentrace estronu (E1) jsou zjišťovány během menopauzy a estriolu (E3) naopak během těhotenství. Všem je společný jejich prapůvod z mužských pohlavních hormonů, a sice z testosteronu (17 β -estradiolu). 17 β -estradiolu jsou podobné strukturou právě fytoestrogeny. (Kučera, Fait; 2011). Produkce estrogenů v době přechodu prudce klesá. To má dopad na řadu tkání; dojde k úbytku kostní hmoty (osteoporóza), ztenčí se kůže i sliznice, změní se kvalita cév; nepříznivé změny se týkají i mozku, zejména kognitivních funkcí. U třetiny žen jde o změny, které vedou k častým zlomeninám, cévním komplikacím a infarktům. Důsledkům úbytku estrogenů je možné předcházet tím, že se chybějící hormony těla dodají jako léky. Hormonální náhradní terapie (HRT, *Hormone Replacement Therapy*) byla zavedena už před půl stoletím a postupně se rozšířila na značnou část populace žen v příslušném věku. Stárnutí ale přináší také riziko častějšího výskytu karcinomu prsu a dělohy. Pro tyto nádory jsou estrogены růstovým faktorem podobně jako pro tkáň, od nichž jsou odvozeny. Statistiky, které hodnotí zdravotní přínos hormonální náhradní terapie jinak vesměs kladně, ukazují, že výskyt nádorů prsu a dělohy se při ní poněkud zvyšuje (Kučera, Fait; 2011).

Isoflavonů se s úspěchem využívá při léčbě menopauzálních symptomů u žen, a to z důvodu jejich estrogenní aktivity, pomáhají snižovat úbytek kostní hmoty při osteoporóze a dále například snižují hladinu celkového cholesterolu v krvi. Kromě již zmiňovaných vlastností se isoflavonům připisuje protektivní účinek spočívající v ochraně před některým typem rakoviny např. rakoviny prsu u žen, rakoviny prostaty u mužů a rakoviny tlustého střeva, účinnost isoflavonů byla zaznamenána i v případě redukce metastáz (Adlercreutz, Mazur; 1997). Přestože většina studií zaznamenala protektivní účinky isoflavonů, v některých výzkumech se poukazuje na spojitost mezi vysokou hladinou estrogenů a rizikem vzniku rakoviny prsu u žen. Několikaprocentní zvýšení (obecně nepříliš vysokého) rizika karcinomu prsu a dělohy se jeví jako přijatelná cena za zmírnění téměř jisté osteoporózy a dalších vysoce pravděpodobných komplikací. Někdy je ale toto riziko dost velké samo o sobě – kvůli rodové dispozici nebo předchozím (Kučera, Fait; 2011).

Řešením mohou být estrogeny působící jen na určité cílové tkáně. Přírodními selektivními modulátory receptorů estrogenu (SERM, *Selective Estrogen Receptor Modulators*) jsou i fytoestrogeny. Jako částečná alternativa k hormonální náhradní terapii připadají v úvahu hlavně izoflavony ze sóji a dalších bobovitých, buď jako pravidelná složka jídelníčku, nebo jako potravní doplněk ve formě koncentrátů. Dosavadní výzkumy jsou optimistické.

V Asii se sója konzumuje snad již posledních 5.000 let. Podle všeho sója zmenšuje riziko rakoviny prsu a riziko rakoviny pohlavních orgánů a nemá nechtěné vedlejší účinky jako léky (Lapčík, Stárka; 2004).

V současnosti se epidemiologové zaměřili na konzumaci sójových potravin jako na největší rozdíl mezi asiaty a američany. Asijské ženy, které konzumují tradiční jídlo s vysokým obsahem sóji mají relativně velmi nízký výskyt rizika rakoviny prsu, ale jejich riziko se zvýší, jestliže se adaptují způsobu stravování v USA. Podobně asiati – muži, kteří konzumují jídlo s vysokým obsahem sóji mají velmi malé procento rizika rakoviny prostaty.

U skupiny žen v postmenopauze a zdravých mužů ve věku 20-40 let bylo zjištěno, že vylučování isoflavonu v moči byla vysoká, pokud byl podáván tempoh (vyroben fermentačně) - fermentace tedy pravděpodobně zvyšuje biologickou dostupnost isoflavonu v sóji. Navíc bylo prokázáno, že kdyby ženy přijímaly isoflavony jen krátkodobě, nebyl by účinek tak vysoký, neboť při krátkodobé expozici byl daidzein

a genistein vylučován o 1/3 více, než při delším užívání. Potvrdilo se, že výlučnost daidzeinu a genisteinu po čtyřech týdnech každodenní konzumace sóji poklesne u žen o 31 až 42 % a zároveň se zkrátí poločas absorpce a vylučování. Naproti tomu výlučnost equolu významně vzrostla. Zdá se, že chronická expozice isoflavony způsobí u žen rychlejší metabolickou degradaci za vzniku neisoflavonových metabolitů (equol) (Setchell et al., 2009).

7.2 Vliv na vývoj

Vznik rakoviny, je dán změnami v genotypu, které se projevují transformací normální buňky na maligní. Ukázalo se, že steroidní hormony jsou zodpovědné za vznik chromozomových abnormalit v tkáňových kulturách. Navíc, u diethylstilbestrolu (DES) a estradiolu byly prokázány genové mutace a inhibice mitosy v in vitro buněčných kulturách. Další studie potvrdily, že estrogen může indukovat dva typy genetických změn, numerické chromozomové změny (aneuploidy), které nepředstavují poškození DNA, a strukturální chromozomové aberace, které představují potenciální riziko. Estrogenní látky mohou procházet placentou nebo mohou přecházet z mateřského mléka do novorozence a být tak potenciální rizikem vzniku různých abnormalit v estrogen-cílových tkáních u potomků obou pohlaví. Tyto abnormality zahrnují rakovinu prsu, endometriózu, adenokarcinom dělohy u samičího pohlaví, dále změny v pohlavní diferenciaci, a u samčího pohlaví snížení počtu spermií, benigní hyperplazii prostaty, rakovinu prostaty a varlat a s tím spojené reprodukční problémy. Biologická aktivita přirozených estrogenů je dána ovlivněním jaderného receptorového proteinu, neboli jsou to ligand-faktory indukující transkripci genu stimulací genové regulace v příslušných buňkách. Analýzou receptor-vazebné aktivity se zjistilo, že environmentální estrogény působí stejným mechanismem (Holoubek, Čadová; 2001).

7.3 Proliferace

Estrogény jsou látky schopné vyvolat mitotickou stimulaci tkání ženského genitálního ústrojí. Proto sledování buněčné proliferace je důležitým klíčem při určování a odhadu estrogenity. Máme-li určit, zda-li je určitá látka estrogenní, musí být sledována její schopnost indukce proliferace buněk cílových tkání estrogenní odpovědi. Screening estrogenů pomocí samčích tkání není možný, jelikož byla popsána indukce mitotického dělení pouze u samičích sekundárních pohlavních orgánů. U samic a u mužů se předpokládá ovlivnění plodnosti na základě působení estrogenů. Plodnost je pak

ovlivněna negativní zpětnou vazbou inhibicí gonadotropinů (Holoubek, Čadová; 2001, Rižner, Winterhager; 2009).

7.4 Role v ochraně proti rakovině

Některé difenolické fytoestrogeny s hormonální aktivitou mají antikarcinogenní účinky, jsou to především isoflavonoidy a lignany. Kromě mnohokrát zmíněné sóji a ostatních potravin s isoflavony, lze celkem dobře konzumovat v našich oblastech lignane v mnoha ořeších. Rostlinné lignanové a isoflavonoidové glykosidy jsou střevními bakteriemi převáděny na sloučeniny se slabou hormonální estrogenní aktivitou, ale také s antioxidační aktivitou; mají tedy nejenom vliv na metabolismus pohlavních hormonů jejich biologickou aktivitu, ale ovlivňují také intracelulární enzymy, syntézu proteinů, působení růstového faktoru, proliferaci maligních buněk, diferenciaci. Epidemilogické studie toto zjištění potvrdily, jelikož nejvyšší hladiny těchto sloučenin jsou přítomny v potravě v těch zemích či regionech s nejnižším výskytem rakoviny. Za zmínku stojí, že antibiotika snižují vznik estrogenních a antikarcinogenních látek z rostlinných prekurzorů ve střevech (Kao et al., 1998; Holoubek, Čadová 2001).

Rakovina prsu a prostaty mnohem méně převažuje v zemích Dálného východu, kde je nadbytek sójových fytoestrogenů ve stravě, v porovnání se zeměmi západních civilizací. Emigrací lidí z okrajových oblastí Pacifiku do Spojených států prokazuje zvýšení rizika rakoviny prsu a prostaty. Nárůst počtu rakovin prostaty se děje v rámci stejné generace, zatímco rakovina prsu u žen je pozorována v následující generaci (Andersen et al., 2006).

Isoflavonoidové fytoestrogeny se váží na estrogenový receptor a vykazují slabé estrogenní účinky. Některé isoflavonoidy a lignany soutěží o vazebné místo receptoru s estrogenem. Mnoho rostlinných lignanů má antikarcinogenní, antivirální, baktericidní a fungistatické účinky. Většina lignanů a flavonoidů jsou pouze slabými inhibitory rakovinotvorných procesů, ale díky značně velkému obsahu v rostlinné stravě je zajištěna jejich dostatečná koncentrace v organismu, aby se snížilo riziko vzniku estrogen-dependentní rakoviny. Zdá se, že lignany a isoflavonoidy mají protektivní roli vůči několika typům rakoviny (rakoviny prsu, prostaty, tlustého střeva). Také se zdá, že působí jako prevence kardiovaskulárních chorob a osteoporózy, díky svým estrogenním a antioxidačním efektům. (Holoubek, Čadová; 2001; Reinli, Block; 1996)

7.5 Vliv na kůži

Z výsledků některých dosud provedených studií vyplývá příznivý vliv perorálně podávaných sójových isoflavonů ve formě aglykonů (40 mg/den) na proces stárnutí kůže u žen středního věku (Izumi et al., 2007). Třebaže podobných výsledků bylo dosaženo rovněž při užívání isoflavonů jetele lučního, teprve nedávno byla publikována pilotní studie hodnotící účinky sójových isoflavonů v tomto kontextu u postmenopauzálních žen. Tebaže studie proběhla na 30 ženách s dávkami 100 mg/den po dobu šesti měsíců, ukázalo se, že isoflavony vedly k signifikantnímu zesílení tloušťky epidermis (hodnoceno v gluteální oblasti), a to za snížení papilárního indexu. U většiny žen došlo rovněž k navýšení počtu elastických vláken i množství kolagenu v dermis, ve které byla současně pozorována zvýšená tvorba kapilár (Accorsi Neto et al., 2009).

7.6 Kardiovaskulární onemocnění

V porovnání dostupných a spolehlivých dat vyšlo už dříve najevo, že pravděpodobnost výskytu nádoru v asijských zemích je 20 krát nižší, neboť se jedná o geografické oblasti s kuchyní bohatou na luštěniny a sóju především, a podobný zájem vyvolal I resveratrol, ovšem ne v souvislosti se snižováním počtu nádorových onemocnění, ale v souvislosti s tzv. francouzským paradoxem, tj. Nižší úmrtnost na koronární a srdeční nemoci a určité druhy rakoviny ve Francii (Moravcová, 2008).

Fytoestrogeny mohou mít pozitivní vliv na srdeční onemocnění prostřednictvím snižování koncentrace lipidů a lipoproteinů v plazmě. Snižování hladiny cholesterolu u zvířat sójovými proteiny je známé už delší dobu, ale u člověka byl tento vliv popsán nedávno. Nejvyšší účinek byl zaznamenán u těch dobrovolníků, kteří měli na začátku pokusu nejvyšší hladinu cholesterolu. To může být důvod, proč jiné studie vliv fytoestrogenů na snižování cholesterolu nenalezly. Ani pozitivní výsledky dalších pokusů nepřinesly jednoznačnou odpověď, neboť v několika případech byly připsány špatnému výběru a velikosti sledované skupiny osob, případně jiným složkám podávaného přípravku než isoflavonům.

V mladých obilninách se vyskytují látky, které při klíčení přecházejí na deriváty oxazolinu; tyto látky nevykazují sice aktivitu estrogenů, ale podporují sekreci estradiolu z vaječnicků, což vyvolává dojem estrogení aktivity. Za zaznamenání stojí vývoj a schválení tradiční potraviny, chleba obohaceného sójou. V USA byl schválen speciální

druh chleba s přídavkem sóji jako funkční potraviny a povoleno zdravotní tvrzení "konzumace tohoto chleba snižuje riziko srdečních onemocnění". Příznivé zdravotní účinky se údajně projeví při spotřebě 25 g sójových bílkovin denně, chleba poskytuje 6,25 g sójových bílkovin v jedné porci. Obsah isoflavonů dává chlebu potenciální účinky proti rakovině (Kučera, Fait; 2011)

Isoflavony sóji mohou stabilizovat LDL lipoproteiny proti oxidaci, u níž se předpokládá, že probíhá v artériích a je považována za jednu z možných příčin vzniku aterosklerózy. Kumestrol je účinnější inhibitor oxidace než 17 β -estradiol, zatímco isoflavony byly účinné méně. Vezmeme-li v úvahu, že isoflavony zlepšují vasodilataci u žen v postmenopauze, jsou jasnými kandidáty pro účinnou prevenci aterosklerózy. (Kučera, Fait 2011).

7.7 Mechanismus účinku isoflavonů

Isoflavony jsou považovány za nesteroidní estrogény. Jsou neuvěřitelně podobné v chemické struktuře estrogenu, který produkuje ženské tělo, ale liší se na druhou stranu natolik, že nejsou plně jako steroidní hormony. V relativní absenci pravého estrogenu se snaží isoflavony mít efekt jako estrogen.

Vědci dokazují, že aktivita sójových isoflavonů působí čtyřmi způsoby :

- jako estrogen a antiestrogen
- jako pohlcovač rakovinových enzymů
- jako antioxidant
- jako zvyšovač imunity

Isoflavony tedy také pracují jako antiestrogeny, takže jsou v opozici k estrogenu a mnoho vědců věří, že to je důvod, proč se snižuje riziko rakoviny prsu a endometriální rakoviny. Genistein, který má pouze jednu tisícinu hormonální aktivity z estrogenu, zachycuje do prsních buněk estrogenové receptory a tím zabraňuje uchycení více potentních ženských hormonů. Všeobecně řečeno, jestliže má žena malou produkci estrogenu (po hysterektomii nebo v postmenopauze) isoflavony se mohou připojit do otevřené strany estrogenové sběrné buňky a produkovat velmi slabý estrogenový efekt. Když je mnoho estrogenu (např. v průběhu PMS – menstruace) mohou isoflavony soutěžit s přírodním estrogenem o stěny receptorů a jelikož jejich efekt je ve srovnání velmi slabý, výrazně zmenší efekt estrogenu. Enzymatické zpomalovače rakoviny.

Isoflavony také snižují riziko rakoviny tím, že pohlcují aktivitu enzymu tyrosin kinázy, který podporuje růst rakovinových buněk. Někteří vědci, včetně Davida T. Zavy z Public Health Foundation, California, Berkeley věří, že pohlcení tyrosin kinázy je základní antirakovinovou funkcí isoflavonů. Ostatní vědci ukázali, že genistein je antiangiogenetický. Jako antiangiogenetická substance blokuje růst krevních cév, kde se nádor chce rozrůst.

Isoflavony mohou stejně jako ostatní antioxidanty dlouhodobě snižovat riziko rakoviny, preventivním působením proti volným radikálům, které poškozují deoxyribonukleovou kyselinu (DNA). V souvislosti s výzkumem p.Catheriny Rice-Evans, můžeme konstatovat, že genistein je nejsilnější antioxidant mezi isoflavony, dále následuje daidzein. Genistein může také v organismu ovlivnit vyšší produkci superoxiddismutázy (SOD), silného antioxidantu, který potlačí superoxidové radikály.

Genistein, jak se zdá, také pracuje jako napodobenina SOD (superoxiddismutázy) vzhledem k výsledkům studie o buňkové kultuře v Mount Sinai škole medicíny, New York. Dvě současné studie provedené týmem amerických a čínských vědců zjistily, že daidzein může snížit riziko rakoviny aktivováním buněk imunity. V experimentu s laboratorními krysami vědci zjistili, že daidzein zvyšuje aktivitu lymfocytů (T buněk) a makrofágů (Phytoestrogen, 2009).

7.8 Vybrané přípravky s obsahem isoflavonů na našem trhu

Isoflavony sóji i jetele mají v naší zemi v řadách nejen gynekologů nepochybně své zastánce, ale stejně tak i odpůrce. Třebaže výsledky výše zmiňovaných studií si v některých případech do určité míry protiřečí, z farmakologického hlediska jsou jejich účinky jen obtížně zpochybnitelné. Prozatím je lze vnímat alespoň jako určitou alternativu ke standardní hormonální léčbě zejména tehdy, jestliže pacientka tuto léčbu nemůže nebo odmítá užívat, ovšem vždy se zvážením očekávaného poměru rizika a potenciálních nežádoucích účinků (Fait, Slíva; 2011).

Na našem trhu je k dostání uspokojující výběr přípravků s výtažky z rostlin s estrogenními účinky, např.; přípravek Mabelle s extraktem lnu setého a jetele lučního, Menoflavon s výtažky z *Trifolium pratense*, MenoMax s obsahem nejméně 40 mg isoflavonů a 40 mg sójových saponinů, Minapent, Phyto Soya, Sarapis Soja (lyofilizovaná včelí kašička s fermentovaným pylem a extrakty ze sójových bobů a červeného jetele) a další (Fait, Slíva; 2011).

Ze sóji se v současné době vyrábí směs proteinů, která však obsahuje další látky ze sóji (minerální látky, polysacharidy, tuky) a pak látky primárního a sekundárního metabolismu – tedy i isoflavony, především daidzein, daidzin a další látky. Koncentrát je běžně k dostání v naší zemi a uvádí se, protein se může také příznivě uplatnit u rakoviny prsu, diabetes mellitus, menopauzálních symptomech a osteoporóze. Jako kontraindikace je však uváděna přecitlivělost na tuto surovinu hlavně v těhotenství a kojení a z důvodu přítomnosti isoflavonů nemá být podávána dětem. U aktivních nebo prodělaných estrogen-dependentních novotvarů se používání tohoto proteinového koncentráту nedoporučuje. Dále je v interakcích upozorňováno na fakt, že může nastat kompetitivní inhibice s estrogeny (Opletal, 2011).

8 METODY STANOVENÍ STEROIDNÍCH HORMONŮ ROSTLIN

Dle názorů odborníků příznivý vliv fytoestrogenů převažuje nad možnými riziky. Přesto však rizika spojená s příjmem fytoestrogenních látek není možné přehlížet, obzvláště v případě mláďat nebo dětí. Z tohoto důvodu je třeba zavést metodu, která by sloužila jak pro rychlý monitoring přítomnosti fytoestrogenů v rostlinných materiálech, tak pro přesné a citlivé stanovení výskytu těchto biologicky aktivních látek. Instrumentální technika ultra-účinná kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní detekcí (UPLC-MS/MS), umožňuje citlivé stanovení širokého spektra látek v rámci jedné analýzy během relativně krátkého času, což bude využito pro stanovení biologicky aktivních látek ve vzorcích (Hajšlová 2014). Tato metoda byla zdokonalena na detekci, separaci a kvantifikaci steroidních hormonů v rostlinném materiálu. Mezi steroidní látky s povahou hormonů, které byly v rostlinách nalezeny, patří brassinosteroidy a ekdysteroidy. Jejich základní strukturu tvoří – podobně jako je tomu u živočišných hormonů – steranový skelet. V rostlinách se vyskytují buď volné, nebo vázané. Zatímco volnou formu představují všemožné steroly (steroidy s 3 β -hydroxylovou skupinou a 17 β -alifatickým postranním řetězcem) a oxysteroly (steroly, jež mají atomem kyslíku modifikován A- či B-kruh steranového skeletu, příp. I postranní řetězec), vázaná forma je zastoupena různými typy konjugátů, zvláště estery sterolů s nasycenými i nenasycenými kyselinami, méně často pak glykosid (Kamlar et al., 2010). Jedná se tedy o vhodná metodu zcela aplikovatelnou pro stanovení fytoestrogenů ve vzorcích potravin.

8.1 Brassinosteroidy

Brassinosteroidy (Brs) jsou třída rostlinných polyhydroxysteroidů, které byly ustanoveny jako nový druh fytohormonů hrající důležitou roli ve vývoji rostliny. Brassinosteroidy se vyskytují ve velmi nízké koncentraci napříč celou rostlinnou říší. Byly detekovány ve všech rostlinných orgánech (v pylu, prašnicích, semenech, listech, stoncích kořenech, květech a semenech). Molekulární mechanismus účinku je stále nejasný, nicméně jeden možný argument zvažuje, vzhledem ke struktuře, neboť právě strukturou jsou příbuzné zvířecím a hmyzím steroidním hormonům, a tak lze předpokládat, že v rostlinách reagují po navázání na sterol binding protein (SBP), který se doplňuje s receptorem v membráně, ale není vyloučena ani přímá vazba Brst na membránový receptor samotného.

Dosud identifikovaných 69 brassinosteroidů mají společný 5-alfa-cholestan v kostře, a jejich strukturální variace se liší podle druhu a orientace kyslíků v kruzích A a B. Co se týče oxidace B-kruhu, BRS jsou podle něj rozděleny do 7-hexalakton, 6-keeton a 6- deoxo (non-oxidovaný) kruh. Tyto steroidy mohou být klasifikovány jako C27, C 28 nebo C29 BRS v závislosti na alkyl-substituci na C-24 v postranním řetězci.

Brassinosteroidy jsou pro rostliny specifické steroidní hormony se silnými vlastnostmi podporujícími zahájení růstu. Od doby, kdy byl objevený první, nejvíce aktivní brassinosteroid, nazývaný brassinolid (BL), více než 50 BL analogů byly identifikovány napříč rostlinnou říší

BRs působí na více procesů v průběhu celého životního cyklu rostliny, včetně klíčení, prodloužení kořene a stonku, cévní diferenciac, plodnost, načasování stárnutí a kvetení a odolnost vůči biotickým a abiotickým stresům.

Brassinosteroidy jsou strukturálně příbuzné zvířecím a hmyzím steroidním hormonům, intenzivní výzkum se zaměřením na brassinosteroidy odhalil, že vyvolávají široké spektrum fyziologických a morfologických reakcí v rostlinách, včetně prodloužení kmene, listů ohýbání a epinastie, indukce biosyntézy ethylenu a aktivace protonové pumpy, syntézu nukleové kyseliny a proteinů, regulace asimilace karbohydrátů, alokaci a aktivaci fotosyntézy. Navíc se ukázalo, že BRS mohou ochránit rostliny před mnohými biotickými a abiotickými stresy, jako třeba ty, které jsou způsobené koncentrací soli, vysokou teplotou a těžkých kovů.

Brassinosteroidy jsou také přítomny v hmyzu a plísňích rostlin rodu *Agrobacterium*, např. *Castanea crenata*, *Distylium racemosum*, *Catharanthus roseus*. Tyto rostliny mají větší koncentraci brassinosteroidů, než ostatní. Také bylo pozorováno, že mladé rostoucí tkáně obsahují vyšší koncentrace brassinosteroidů než vyzrálé tkáně. Pylová a nezralá semena jsou nejbohatším zdrojem brassinosteroidů srozpětím od 1- 100 µg/kg čerstvé váhy, zatímco stonky a listy mají obvykle nižší množství od 0,01 – 0,1 µg/kg.

8.1.2 Chemická struktura brassinosteroidů

Do výše zmíněných skupin mohou být klasifikovány na základě substituentu v postranním řetězci. Tento postranní řetěz ve struktuře molekuly je společným znakem rostlinných sterolů. Vzhledem k bočnímu řetězu cholestanů, brassinosteroidy jsou

rozděleny do 11 typů s odlišnými substituenty na C-23, C-24 a C-25 (Shamsul and Ahmad; 2011).

8.2 Ecdysteroidy

Ecdysteroidy jsou látky, které byly nalezeny v nahosemenných, krytosemenných, houbách, řasách a určitých mořských organismech, navíc dále v členovcích a dalších bezobratlých organismech.

Jsou určitým způsobem příbuzní s brassinosteroidy, např. pokud jde o působení těchto steroidních hormonů na růst rostliny, dále v jejich chemické struktuře, ačkoliv je očividné, že tato podobnost není tak silná, pokud zvážíme 3D-uspořádání molekul.

Od časných 90.let je zde rapidní nárůst zájmu ohledně potenciačního dopadu narušujícího endokrinní systém lidí (Smagghe, 2009).

8.3 Techniky stanovení

Pro studium flavonoidních látek bylo ovšem základem mít prostředky pro jejich separaci a izolaci. V dřívější době byly hlavními technikami tenkovrstvá chromatografie (TLC), polyamidová chromatografie a papírová elektroforéza. Z těchto metod se dnes používá jako jediná už jen tenkovrstvá chromatografie. Nicméně většina nedávno publikovaných prací odkazuje stále více na kvalitativní a kvantitativní aplikaci vysoceúčinné kapalinové chromatografie HPLC. Flavonoidy mohou být odděleny, kvantifikovány a identifikovány pomocí operace spojené s HPLC, jako je UV detektor, hmotnostní detektor nebo i za použití detektoru nukleární magnetické resonance (NMR) a celkem nedávno si získala pozornost technika kapilární elektroforéza (Andersen et al., 2006).

Flavonoidní látky mohou být degradovány činností enzymů, je-li materiál čerstvý nebo nesusšený. Je proto vhodné používat sušené, lyofilizované nebo zmrazené vzorky. Pokud je použit čerstvý materiál, je obvykle rozemlet na prášek. Pro extrakci se volí rozpouštědlo v závislosti na typu požadovaného flavonoidu. Je velmi důležité zvážit polaritu. Méně polární flavonoidy (isoflavony, flavanony, methylované flavony a flavonoly) jsou extrahovány chloroformem, dichlormethanem, diethyl éterem nebo ethyl acetátem, zatímco flavonoidní glykosidy a více polární aglykony jsou extrahovány alkoholem nebo směsí alkoholu a vody. Glykosidy mají zvýšenou rozpustnost ve vodě a proto se více hodí vodné roztoky alkoholů. Převážná část extrakcí flavonoidů z materiálu se stále provádí jednoduchou přímou extrakcí rozpouštědlem.

Rozemletý rostlinný materiál může být rovněž extrahován pomocí Soxhletovy aparatury, nejdříve hexanem pro odstranění lipidů a následně ethyl acetátem nebo ethanolem pro získání polyfenolů. Tento postup však není vhodný pro látky citlivější na teplotu.

Pohodlnější a běžně používanou procedurou je sekvenční extrakce rozpouštědlem. V prvním kroce s dichloromethanem, kdy dojde k extrakci flavonoidních aglykonů a méně polárního materiálu. V následujícím kroce je použit alkohol, kterým se extrahují flavonoidní glykosidy a polární složky. Anthokyany jsou extrahovány methanolem s kyselinou, nejčastěji octovou nebo trifluoroctovou (TFA).

Extrakce se typicky provádí magnetickým míchadlem nebo třepačkou ale i ostatní metody byly nedávno zavedeny pro zvýšení efektivity a rychlosti extrakční procedury (např. tlakovou extrakcí, superkritickou fluidní extrakcí atd). Asi jednou z nejběžnějších je metoda s ultrazvukovou lázní, velice rychlá technika, která může být použita se směsí nesmisitelných rozpouštědel (hexan s methanolem). Hexanová fáze zkoncentruje méně polární seskviterpenové laktony a uhlovodíky, zatímco vodná fáze alkoholu zkoncentruje flavonoidy a více polární seskviterpenové laktony.

Jedním z největších problémů s přípravou vzorků flavonoidů je jejich malá rozpustnost v rozpouštědlech pro chromatografii. Navíc se stávají ještě méně rozpustnými díky purifikačnímu procesu. Nízká rozpustnost v mobilní fázi může vyvolat precipitaci v čele kolony vedoucí k neuspokojivému rozlišení, snížení průtoku rozpouštědla nebo dokonce zablokování kolony.

Není tedy zde žádná jednotná strategie pro separaci fa jistě jeden a více kroků jsou nutností pro jejich izolaci. Volba metody závisí na polaritě látek a množství vzorku, který je k dispozici (Andersen et al., 2006).

8.3.1 Extrakce pevným sorbentem (SPE – "solid phase extraction")

Jedná se o koncentrační techniku odběru vodných vzorků, která byla použita i v rámci méj experimentální části. Jde o účinnou sorpci analytu z vodného vzorku do pevného sorbentu; ostatní komponenty vzorku by se měly sorbovat v míře co nejmenší. Zachycený analyt se pak uvolní ze sorbentu zahřátím a/nebo elucí vhodným rozpouštědlem.

Je třeba zdůraznit, že jde o extrakci stopových množství (koncentrací) analytů. V současné době se už běžně používají komerční kolonky (cartridges) na jedno použití a průtok vzorku je uskutečňován injekční stříkačkou. Kolonky obsahují řádově miligramy až gramy vhodného sorbentu. Analyt je v kolonce zadržen a voda vycházející

z kolonky analyt neobsahuje. Po projití určitého objemu vzorku vody však dochází k tzv. průniku a voda vytékající z kolonky analyt obsahuje. Ideálním stavem z hlediska maximálního obohacovacího efektu techniky SPE je 100% záchyt. Pro záchyt veškerého množství analytu ze vzorku nesmí tedy objem vzorku převyšovat tento průnikový objem.

Technika SPE aplikovaná bezprostředně po úpravě vzorku snižuje nebezpečí biochemické degradace analytu, kontaminace materiálem nádobek, nebezpečí sedimentace atd. V některých případech lze odstranit ze vzorku přítomné interferující látky, typické je odstranění rušivých iontů na ionexech. Také zvyšování koncentrace nepolárních či málo polárních analytů na hydrofobním sorbentu není výjimkou. Desorpce zachyceného analytu se obvykle děje buď rozpouštědlem nebo teplem s proudem plynu (Riddellová, 2012).

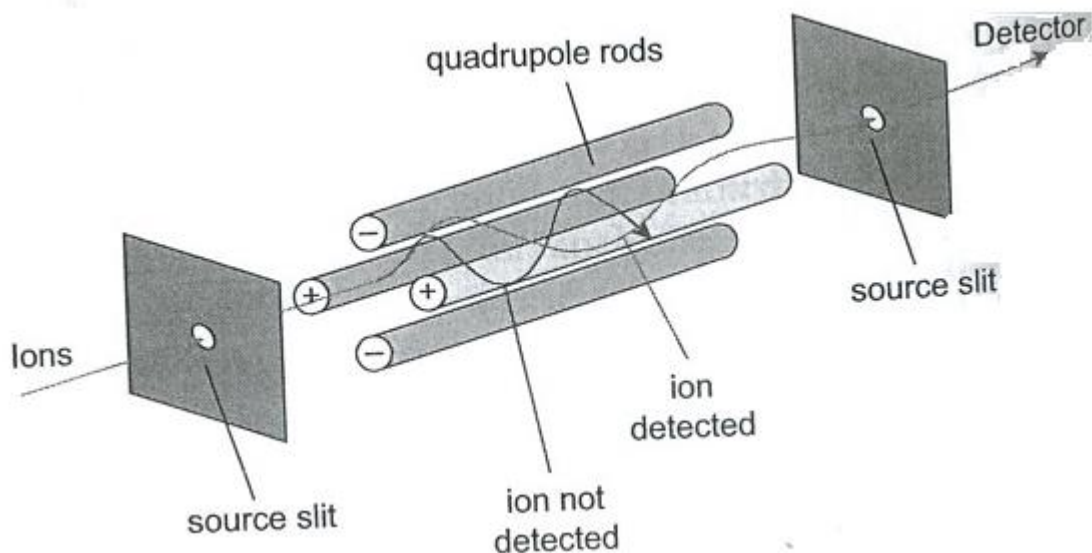
8.3.2 Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie

Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie představuje atraktivní a velmi účinnou analytickou techniku, která snad nejlépe uspokojuje požadavky kladené na analýzu směsi složitých organických látek. Dnes je již zřejmé, že cesta k dokonalému technickému vyřešení univerzálního zařízení umožňujícího přímé spojení kapalinového chromatografu a hmotnostního spektrometru bude představovat náročnější úkol, než si vyžádalo řešení spojení GC-MS (Andersen et al., 2006).

Hmotnostní spektrometry jsou nástroje, které separují ionizované atomy nebo molekuly vzhledem k jejich odlišnostem v poměru hmotnosti ku charge. Hmotnostní spektrometry jsou proto užívány pro kvantifikaci atomů nebo molekul a pro poskytování strukturních informací pro identifikaci komponentů, protože molekuly mají rozlišovací fragmentační vzory. Klasický spektrometr se sestává z iontového zdroje, hmotnostně-selektivního analyzátoru, iontového detektoru a protože mnohé operace vyžadují nízký tlak, instrument obsahuje ještě čerpací system (Picó, 2012). Ráda bych se v dalším popisu zaměřila na kvadrupólový hmotnostní analyzátor, s kterým jsem přišla do styku při praktické analýze.

8.3.2.1 Kvadrupólový hmotnostní analyzátor

Jedná se o nejvíce používaný hmotnostní analyzátor a může být snadno využit v různých systémech přístrojů. Analyzátor se skládá ze čtyř kovových tyčí, které jsou uspořádány naproti sobě a přesně zarovnané.



Obr. 10 Kvadrupól

Zdroj: (Picó, 2012)

Každá dvojice protilehlých tyčí je propojena elektricky a vysokofrekvenční napětí spolu se stejnosměrným se aplikuje na oba páry tyčí, čímž se vytvoří elektrické pole, které přenáší pouze vybrané hodnoty m/z . To znamená, že pouze ionty určitého poměru m/z dosáhnou detektoru. Zbytek iontů je nestabilní a koliduje s tyčemi. Tak ztrácí svůj náboj a jsou odstraněny ze systému. Kvadrupól se tak chová jako hmotnostní filtr (Picó, 2012).

Výhody hmotnostního spektrometru oproti ostatním detektorům používaných dnes v kapalinové chromatografii jsou neskonalé a jsou dány jak jeho citlivostí, selektivitou a univerzálností, tak množstvím o struktuře analyzované látky využitelné pro její spolehlivou identifikaci. Výhodou sloupcové kapalinové chromatografie je především možnost spojení izolačního, přečišťovacího a vlastního analytického stupně v jednom chromatografickém běhu (Churáček, 1993).

Data z hmotnostního spektrometru poskytují informace o struktuře a jsou používána pro zjištění molekulové hmotnosti a k určení rozložení substituentů mezi A-

a B- kruhy. Pečlivá studie fragmentace vzorku může být také cenná zejména při stanovení charakteru a místa navázání sacharidů v *O*- a *C-glykosidech*. Proto se dnes používá hojně termospreje, což vede ve spojení s LC-MS s analýzou k jemnější ionizaci poskytující lépe “čitelné” ionty (Andersen et al., 2006).

Identifikace a kvantifikace jednotlivých analytů se tedy provádí pomocí ultra-účinné kapalinové chromatografie (UPLC) ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem (MS/MS). Analyty jsou identifikovány na základě sledování iontů (m/z) jednotlivých analytů a specifických přechodů prekurzorových iontů na produktové a také porovnáním retenčních časů s příslušnými standardy analytů. K separaci bývá využívána analytická kolona s reverzní fází. Jako mobilní fáze je obvykle použita 0,1% kyselina octová ve vodě a metanol, gradientová eluce.

9 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Pro pochopení stanovení estrogenních hormonů v rostlinných matricích posloužila ověřená metoda detekce a kvantifikace hormonů steroidní povahy (brassinosteroidů a ekdysteroidů), na jejímž rozvoji se podílela Dr. Dana Tarkowská v Laboratoři růstových regulátorů při PšF UPOL v Olomouci.

9.1 Rostlinný material a příprava vzorku

Jako rostlinný material posloužily listy špenátu běžně dostupné na našem trhu, dále pak kořen *Leuzea carthamoides* (Parcha saflorová, známá též jako Maralí kořen) a nakonec obilky pšenice novozélandské odrůdy Konini s purpurovým zrnem, dosud neregistrované (v ČR), která byla sklizena v r. 2013 na pokusných plochách MENDELU.

Příprava vzorku byla asi nejdelší částí stanovení steroidních hormonů. Vzorek se vždy musí pečlivě připravit tak, aby se z něho dostaly všechny ostatní látky, které by mohly narušit výsledek měření.

Problémy spojené s analýzou rostlinných hormonů vyplývají z jejich velmi nízké koncentrace v rostlinných tkáních, obvykle v pmol nebo fmol/g.

Rostlinný materiál byl homogenizován v třecí misce a rozvážen na jednotlivé vzorky po 50-100 mg FW do 2ml eppendorf mikrozkušavek, 3 replikáty na vzorek. Poté byl přidán 1,5 ml 80% MeOH vychlazeného na -20°C a byl extrahován přes noc při 4°C s mícháním a otáčkách 12rpm.

Následně byla provedena centrifugace při 20 000 rpm po dobu 10 min při 4°C. Supernatant byl převeden do čisté skleněné zkumavky a pelet reextrahován s 1,5 ml 80% MeOH, pro rozrušení nečistot byl ponořen na 5 minut do sonifikační lázně a opět centrifugován při 20 000 rpm 10 minut v teplotě 4°C.

Supernatant se odebral a byl spojen s prvním podílem, nepotřebný pelet byl vyhozen. Spojený hrubý extrakt po centrifugaci (tedy 2krát 1,5 ml) byl přečištěn přes první SPE kolonku. Na sorbentu SPE kolonky byly zachyceny rostlinné interferující pigmenty, fenolické látky, flavonoidy, atd.

Aktivace byla zahájena 1 ml 100 % MeOH. Mikropipetou se naněsl supernatant (hrubý extrakt) o objemu 3 ml. Byla sebrána jednorázová frakce "flow through"

do jednorázové skledněné zkumavky (12x75 mm), která se odpaří do sucha ve vakuovém rotačním koncentrátoru při 37 °C.

Odparek se následně musel rekonstruovat v 50 µl 100 % MeOH za použití vortexu při maximálních otáčkách, opět sonifikovat po dobu pěti minut a přepipetovat do HPLC vialky s kónickým insertem (Supelco, SU860066) a nastříknout 2 µl na UPLC-MS/MS do gradientu pro ECs při délce trvání 8 minut. Vzorek může být podle potřeby před samotnou UHPLC-MS/MS analýzou filtrován přes mikrofiltr o porozitě 0,2 µm a až poté převeden do vialky.

Pokud není vzorek/ odparek analyzován ihned, je potřeba jej nerekonstruovaný v MeOH uskladnit při -20°C do doby analýzy.

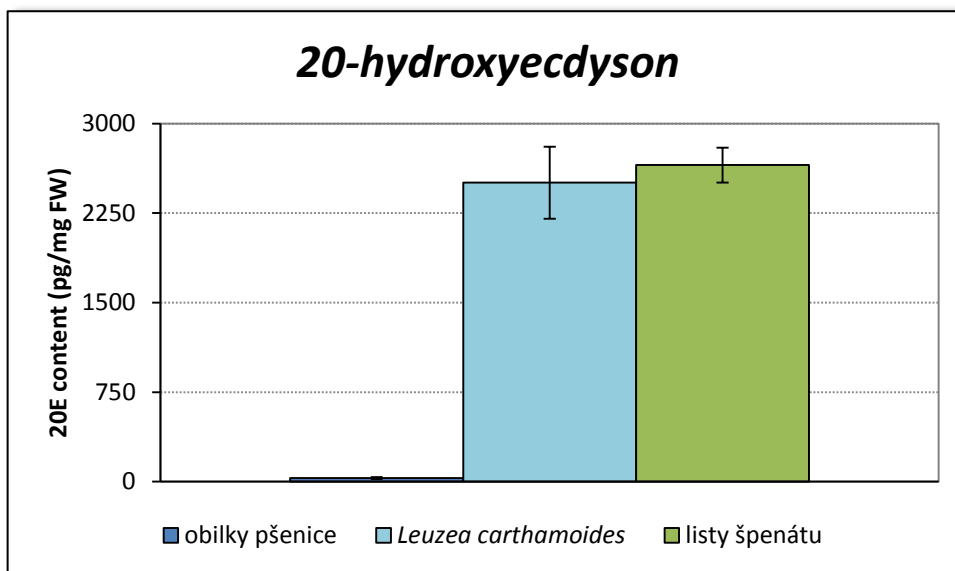
9.2 Identifikace a kvantifikace

Identifikace a kvantifikace jednotlivých analytů byla provedena pomocí ultra-účinné kapalinové chromatografie (UPLC) ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem (MS/MS) s kvadrupólovým analyzátozem. Analyty jsou identifikovány na základě sledování iontů (m/z) jednotlivých analytů a specifických přechodů prekurzorových iontů na produktové – kvantifikační a konfirmační a také porovnáním retenčních časů s příslušnými standardy analytů. Kvantitativní vyhodnocení bylo založeno na metodě kalibrační křivky, která byla vytvořena jako závislost poměru koncentrace standardu a koncentrace vnitřního standardu.

Před vlastní analýzou vzorků je třeba promýt kolonu a vyčkat na dosažení požadovaných parametrů (teplota, tlak, průtok, složení mobilní fáze) systému, cca 30 min. První nástřik ze sekvence vzorků je pouze orientační a používá se k verifikaci systému, zejména k ověření stability a retenčních časů sledovaných analytů (Hajšlová, 2014).

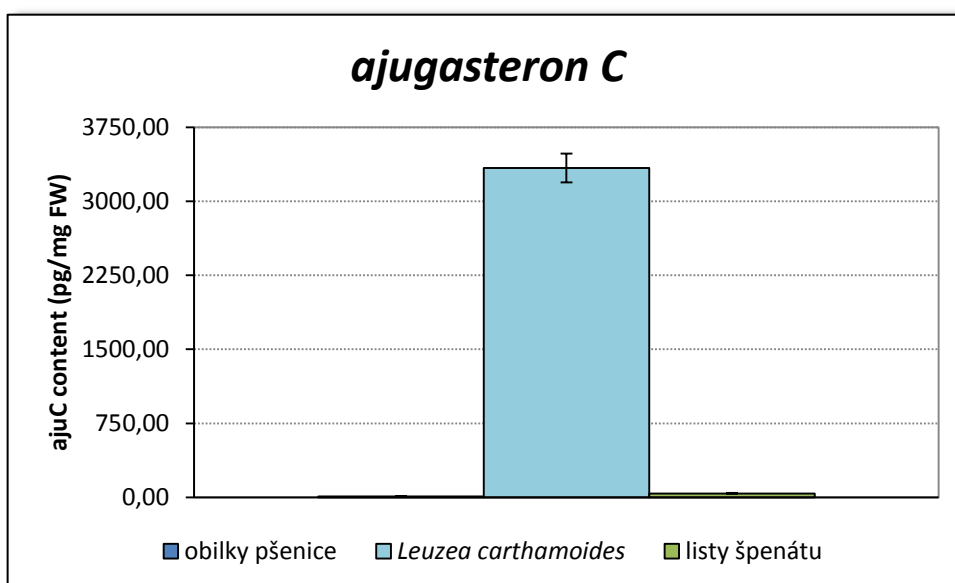
10 VÝSLEDKY A DISKUZE

Výsledky měření z praktické části byly vyhodnoceny metodou kalibračních křivek a zpracovány do následujících grafů podle jednotlivých hormonů, kterých bylo ve vzorcích nejvíce a vyskytly se nejčastěji.



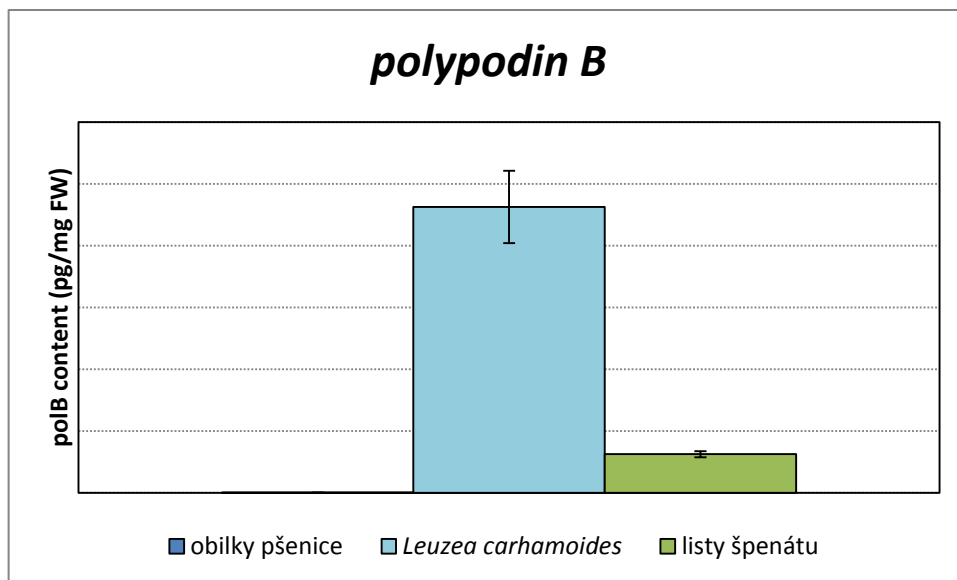
Graf č.1 20-hydroxyecdysone

V obilkách pšenice bylo hormonu 20-hydroxyecdysone vůbec nejméně, a to pg/mg FW, v kořeni *Leuzea carthamoides* 2504,51 pg/mg FW a ve špenátu 2652,18 pg/mg FW.



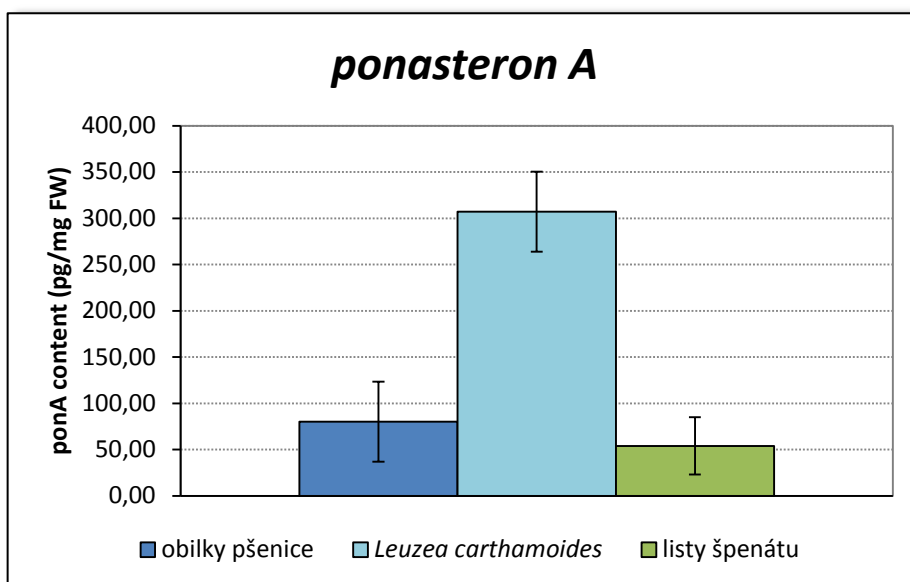
Graf č.2 Ajugasteron C

Koncentrace polypodinu B v obilkách pšenice byla velmi nízká, pouhých 8,68 pg/mg FW, nejvíce ho bylo v kořeni *Leuzea carthamoides* 3337,93 pg/mg FW a v listech špenátu 39,61 pg/mg FW.



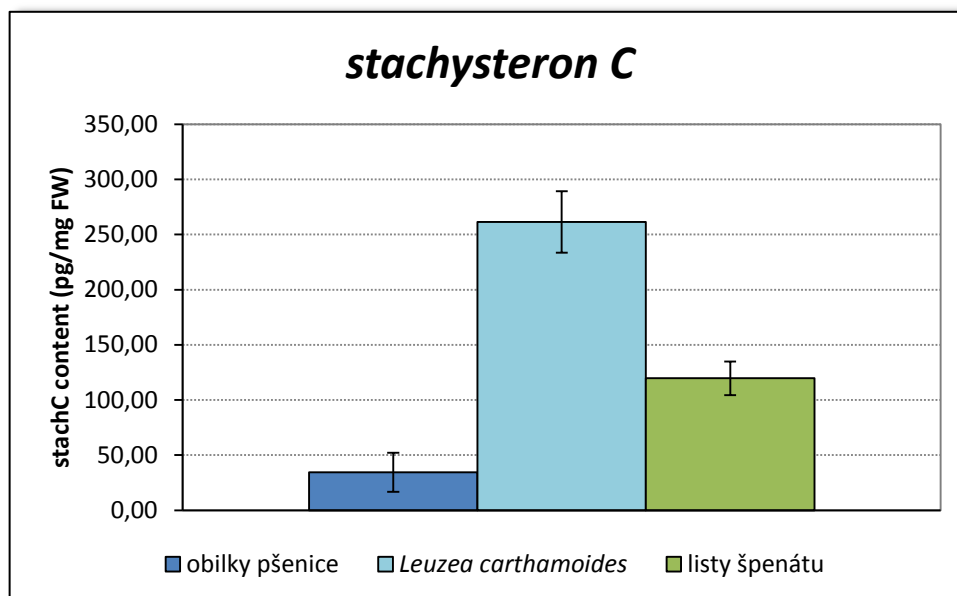
Graf č. 3 Polypodin B

2,59 pg/mg FW polypodinu B bylo nalezeno v obilkách pšenice, v *Leuzea carthamoides* 4625,85 pg/mg FW a 624,62 pg/mg FW v listech špenátu.



Graf č.4 Ponasteron A

Hormon ponasteron A už byl ve větší míře kvatifikován i v obilkách pšenice, a to 80,35 pg/mg FW, v *Leuzea carthamoides* 307 pg/mg FW, nejméně ho bylo ve špenátu – 54,05 pg/mg FW.

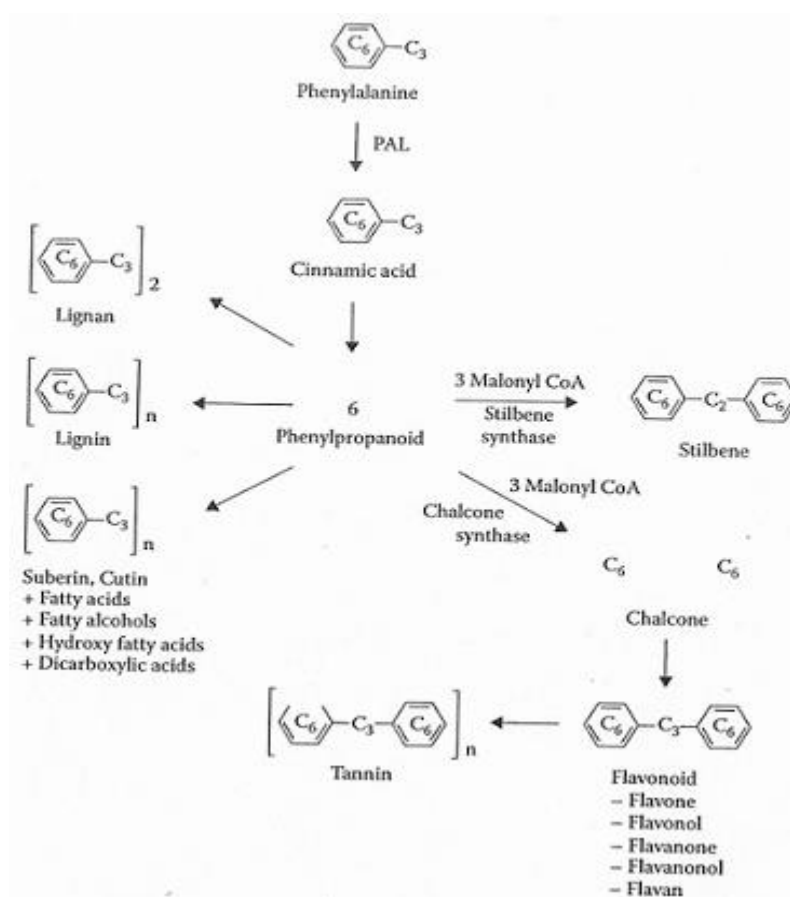


Graf č.5 Stachysteron C

V obilkách pšenice bylo 34,35 pg/mg FW stachysteronu C, 261,46 pg/mg FW stachysteronu C ve vzorku z *Leuzea carthamoides* a 119,67 pg/mg FW stachysteronu C v listech špenátu.

Vzhledem k naměřeným hodnotám ve výše uvedených grafech je vidět, že v pšenici byly nalezeny ve větším množství dva hormony, a to ponasteron A a stachysteron. V dřívějších studiích byly v pšenici nalezeny hlavně lignany s estrogení účinkem, přesněji řečeno v otrubách. Za hlavní lignan byl považován secoisolariciresinol diglykosid (SDG) (Qu et al., 2005), který jsem zmínila v teoretické části práce. Dle Smeds et al., 2007 by to měl být ale 7-hydroxymatairesinol. Qu et al., (2005) a jejich studie poukázaly na informace o tom, že protinádorové aktivity pšeničných otrub z různých druhů se značně liší. Odrůda Konini získala své modré zbarvení díky přítomnosti anthokyanů. Anthokyaniny jsou řazeny mezi fenolické látky. Tyto látky vytvářené v rostlinách vznikají po většinou fenylypropanoidovou a fenylypropanoidacetátovou cestou. Dochází ke konverzi fenylalaninu na kyselinu skořicovou a p-kumarovou (Klejdus, 2004), což jsou i prekurzory pro fytoestrogeny. Na regulaci biochemické dráhy syntézy anthokyanů se navíc podílí velké množství

enzymů, především chalkonsyntáza a chalkonizomeráza. Lze se tak domnívat, že intenzita zbarvení obilek anthokyany může korelovat s větším výskytem fytohormonů s estrogením účinkem. Podle níže přiloženého obrázku vidíme zapojení chalkonsyntázy a skořicové kyseliny v syntéze vzniku flavonoidních látek i stilbenu. Tyto naměřené hodnoty však nelze porovnat s žádným předešlým měřením, neboť se detekcí/kvantifikací steroidních hormonů v barevných pšenících ještě nikdo nezabýval.



Obr. 11 Produkce fenylpropanoidů, flavonoidů a dalších fenolických sloučenin

Zdroj: (Shahiki, Naczki; 2012)

Vzorky kořene z *Leuzea carthamoides* byly podrobeny mnohým analýzám už dříve, takže při měření byly potvrzeny stejné hormony, a například 20-hydroxyecdyson je v současnosti předmětem zájmů rozličných výzkumů, kde se zkoumá jeho vazba na jaderné receptory a následná odpověď imunitního systému (Peschel et al., 2011).

Ecdyson je produkován několika rostlinami, včetně špenátu (*Spinacia oleracea*). Bylo prokázáno, že jeho účinkem dochází k nárůstu svalové hmoty. V pozdějších

výzkumech vyšlo najevo, že snižuje tělesný tuk, sekreci prozánětlivých cytokinů a zmírňuje oxidační stres (Wutke, Seidlova-Wutke; 2012).

10.1 Správnost metody

V současné době nejsou komerčně dostupné certifikované referenční materiály, obsahující stanovované látky. Správnost metody by tedy měla být pravidelně ověřována a kontrolována analýzou reálného materiálu s umělým přídavkem analytů do matrice. Správnost metody pro stanovení celkového obsahu fytoestrogenů v rostlinné matrici není možno ověřit, jelikož přirozené hladiny některých sledovaných analytů v rostlinné matrici jsou poměrně vysoké a k dispozici je pouze malé množství analytických standardů.

10.2 Srovnání novosti postupů

Sledování obsahu fytoestrogenů je dosud nejčastěji prováděno v potravinách sójového původu. Jedná se hlavně o sójové boby samotné, sójové boby naklíčené, sójovou mouku a výrobky z ní jako je sýr tofu, sójové mléko aj. Jsou popsány metody stanovení i pro další komodity a to například ovoce a zeleninu, ořechy či alkoholické nápoje.

Co se týče stanovení isoflavonů v rostlinném či biologickém materiálu předchozí studie zařazovali ve většině případů přečištění vzorků pomocí extrakce na tuhou fázi, pomocí SPE kolonek, jak to bylo provedeno i při analýze rostlinného materiálu v Olomouci.

Za poslední desetiletí se metody užívané k separaci a detekci fytoestrogenů značně změnilo. Zpočátku se metody odvozovaly od tradičních steroidních analýz. Použita byla plynová chromatografie s hmotnostním detektorem (GC-MS), které však předcházelo přečištění vzorku a derivatizace na trimethylsilylery. Tento přístup je poměrně složitý, zdlouhavý a ne zcela přesný. Přednost byla dána metodám, které nevyžadují derivatizaci fytoestrogenů. Pro měření obsahu fytoestrogenů je dnes velmi často využíváno vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s UV detektorem. Používá se také elektrochemický detektor, který není obecně specifický a je užíván spíše pro jednodušší aplikace (Hajšlová, 2014).

11 ZÁVĚR

Na základě všech uvedených informací je tedy patrné, že se s fytoestrogeny můžeme dostat do kontaktu velice snadno, ať už konzumací potravin rostlinného původu s fytoestrogeny přirozeně obsaženými, případně s potravinami živočišného původu obsahující metabolity těchto látek a jistě je velmi podstatné i zjištění týkající se environmentální expozice těmto látkám. V literární části bylo pojednáno o nejběžnějších typech fytoestrogenů a látek s estrogením účinkem a byly uvedeny i zajímavé souvislosti o mechanismu jejich působení a podobnosti se savčími hormony na molekulární úrovni, což mi přijde stále jako ta nejpoutavější část. Stručně byla charakterizována i metoda pro stanovení těchto komponent v rostlinné matrici. V praktické části došlo na měření steroidních hormonů ve vzorku obilky pšenice s purpurovým zrnem odrůdy Konini, listu špenátu a kořene rostliny *Leuzea carthamoides*. Ve všech byly přítomny steroidní hormony, což je jen podpoření toho, že se tyto hormony nachází ve všech částech rostlin - jak v listu, tak v kořeni nebo i plodu. Zjištěné množství hormonů v purpurově zbarvené obilce navíc může poukazovat na pozitivní korelaci s obsahem anthokyanů a příbuzných barviv v plodu, neboť je zřejmé, že obě skupiny látek sdílí některé z prekurzorů a mají část biosyntetické dráhy společnou, jak lze poznat z jejich biochemické dráhy (Schomburg, Michal; 2012). Takovou teorii by jistě bylo vhodné a zajímavé prověřit a ráda bych se na toto téma zaměřila v rámci své budoucí diplomové práce.

12 LITERÁRNÍ PŘEHLED

ADLERCREUTZ, Herman a W. MAZUR. Phyto-oestrogens and Western Diseases. *Annals of Medicine*. 1997, vol. 29, issue 2, s. 95-120. DOI: 10.3109/07853899709113696.

ANDERSEN, Øyvind M a Kenneth R MARKHAM. *Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications*. Boca Raton, FL: CRC, Taylor, 2006, 1237 p. ISBN 08-493-2021-6.

ANDERSON, John J. B, Mary ANTHONY, Mark MESSINA a Sanford C GARNE. Effects of phyto-oestrogens on tissues. *Nutrition Research Reviews*. 1999, vol. 12, issue 01. DOI: 10.1079/095442299108728875.

ANTIGNAC, J. New data regarding phytoestrogens content in bovine milk. *Food Chemistry*. 2004, vol. 87, issue 2, s. 275-281.

ATKINSON, Charlotte, Cara L. FRANKENFELD a Johanna W. LAMPE. Gut bacterial metabolism of the soy isoflavone daidzein: exploring the relevance to human health. *Experimental biology and medicine*. Maywood, NJ: The Society, 2005, 230:155-70, s. 155-170.

ATKINSON, Charlotte, Katherine M. NEWTON, Erin J. ARIELLO BOWLES, Mellisa YONG a Johanna W. LAMPE. Demographic, anthropometric and lifestyle factors and dietary intakes in relation to daidzein-metabolizing phenotypes among premenopausal women in the United States. *The American journal of clinical nutrition: AJCN*. New York, N.Y.: Journal of Clinical Nutrition, 2008, 87:679-87.

BASAK, S., D. POOKOT, E. J. NOONAN, R. DAHIYA, Cheng-Ming CHIANG a Len NECKERS. Genistein down-regulates androgen receptor by modulating HDAC6-Hsp90 chaperone function. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2008, vol. 7, issue 10, s. 3195-3202. DOI: 10.3410/f.1026152.324913.

BASAŘOVÁ, Gabriela. Pivovarství: teorie a praxe výroby piva. Vyd. 1. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010, 863 s. ISBN 978-80-7080-734-7.

BELITZ, H, W GROSCH a Peter SCHIEBERLE. *Food chemistry*. 4th rev. and extended ed. Berlin: Springer, c2009, s. 807-861. ISBN 9783540699347-.

CHUNG, Woo-Youl, Sung-Kee KIM a Jong-Youn SON. Isoflavones Contents and Physiological Activities of Soybeans Fermented with *Aspergillus oryzae* or *Bacillus*

natto. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition* [online]. 2008-02-29, vol. 37, issue 2, s. 141-147 [cit. 2015-03-27]. DOI: 10.3746/jkfn.2008.37.2.141.

CHURÁČEK, Jaroslav. *Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod*. 1. vyd. Praha: Academia, 1993, 387 s. ISBN 80-200-0010-0.

DAKORA, F.D. a D.A. PHILLIPS. Diverse functions of isoflavonoids in legumes transcend anti-microbial definitions of phytoalexins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 1996, vol. 49, issue 1, s. 1-20. DOI: 10.1006/pmpp.1996.0035.

DEROSA, Christopher, Patricia RICHTER, Hana POHL a Dennis E. JONES. Environmental exposures that affect the endocrine system: Public health implications. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*. 1998, vol. 1, issue 1, s. 3-26. DOI: 10.1080/10937409809524541.

ELDRIDGE, Arthur C. a William F. KWOLEK. Soybean isoflavones: effect of environment and variety on composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1983, vol. 31, issue 2, s. 394-396. DOI: 10.1021/jf00116a052.

FAIT, Tomáš a Jiří SLÍVA. *Volně prodejné přípravky v gynekologii: [podrobný průvodce pro lékaře a farmaceuty]*. Praha: Maxdorf, c2011, s. 12-27. Jessenius. ISBN 9788073452506.

FARNSWORTH, Norman R., Audrey S. BINGEL, Geoffrey A. CORDELL, Frank A. CRANE a Harry H. S. FONG. Potential value of plants as sources of new antifertility agents II. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1975, vol. 64, issue 5, s. 717-754. DOI: 10.1002/jps.2600640504. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jps.2600640504>

HAJŠLOVÁ, Jana. *Uplatněná certifikovaná metodika: číslo 2014/96506 : stanovení fytoestrogenních látek v rostlinných matricích*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2014, 25 s. ISBN 978-80-7080-874-0.

HAUPTMANN, Siegfried. *Organische Chemie*. 2., durchges. Aufl. Leipzig: Dt. Verl. für Grundstoffindustrie, 1988. ISBN 33-420-0280-8

HOIVIK, D.J. a S.H. SAFE. Effects of Xenobiotics on Hormone Receptors. *Toxicant-receptor interactions: modulation of signal transduction and gene expression*. Washington, DC: Taylor, c1998, s. 53-68.

HOLOUBEK, I. a L. ČADOVÁ Estrogeny v životním prostředí. *Onkologická rizika: Prevence nádorových onemocnění ve 21. století; Národní program zdraví*. 1. vyd. Brno: GAD STUDIO, 2001, s. 79-90. ISBN 8023876201.

HUGHES, Claude L. Phytochemical Mimicry of Reproductive Hormones and Modulation of Herbivore Fertility by Phytoestrogens. *Environmental Health Perspectives*. 1988, vol. 78, č. 07. DOI: 10.2307/3430517.

IZUMI, Toru, Makoto SAITO, Akio OBATA, Masayuki ARII, Hideyo YAMAGUCHI a Asahi MATSUYAMA. Oral Intake of Soy Isoflavone Aglycone Improves the Aged Skin of Adult Women. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 2007, vol. 53, issue 1, s. 57-62. DOI: 10.3177/jnsv.53.57.

JÁNIŠOVÁ, Martina. *Hormonální látky ve vodách*. 1. vyd. Brno: Lipka - školské zařízení pro environmentální vzdělávání, 2013, 23 s. Metodický materiál pro učitele. ISBN 978-808-7604-595.

JOYCE, Susan A., Alexander O. BRACHMANN, Itamar GLAZER, Lea LANGO, Gertrud SCHWÄR, David J. CLARKE a Helge B. BODE. Bacterial Biosynthesis of a Multipotent Stilbene. *Angewandte Chemie International Edition*. 2008-02-22, vol. 47, issue 10, s. 1942-1945. DOI: 10.1002/anie.200705148.

KAMLAR, Marek, Ondřej UHLÍK, Ladislav KOHOUT, Juraj HARMATHA a Tomáš MACEK. Steroidní fytohormony: funkce, mechanismus účinku a význam. *Chemické listy*. 2010, č. 104, s. 93-99.

KAO, Y C, C ZHOU, M SHERMAN, C A LAUGHTON a S CHEN. Molecular basis of the inhibition of human aromatase (estrogen synthetase) by flavone and isoflavone phytoestrogens: A site-directed mutagenesis study. *Environmental Health Perspectives*. 1998, vol. 106, issue 2, s. 85-92. DOI: 10.1289/ehp.9810685.

KLEJDUS B., 2004: Separace a identifikace isoflavonů v rostlinném materiálu. Habilitační práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, 51 s.

KOHNO, Mitsutaka, Motohiko HIROTSUKA, Makoto KITO a Yuji MATSUZAWA. Decreases in Serum Triacylglycerol and Visceral Fat Mediated by Dietary Soybean .BETA.-conglycinin. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. 2006, vol. 13, issue 5, s. 247-255. DOI: 10.5551/jat.13.247.

KRISHNASWAMY, N.R. *Chemistry of Natural Products*. second edition. Himayatnagar: Universities Press (India) Private Limited, 2010. ISBN 9781439849561.

KŘÍŽOVÁ, Ludmila, Sylvie HADROVÁ, Věra SCHULZOVÁ, Jana HAJŠLOVÁ, Aleš VESELÝ a Stanislav PAVLOK. *Sójové isoflavony v krmné dávce laktujících dojníc a jejich prostup do mléka: metodická příručka*. Rapotín: Agrovýzkum Rapotín, 2011, 22 s. ISBN 978-80-87592-03-8.

KUČERA, Eduard a Tomáš FAIT. *Hyperestrogenní stavy v gynekologii*. Praha: Maxdorf, c2011, 236 s. Jessenius. ISBN 978-807-3452-353.

KOPÁČKOVÁ, Olga. Sója opět v centru pozornosti. II.: Nutriční obsah sójových bobů. *Agro navigátor*. 2001, č. 1369.

LAPČÍK, Oldřich a Luboslav STÁRKA. Rostlinné estrogény a menopauza: Od „jetelové nemoci“ k lékům proti osteoporóze. *Vesmír*. 2004/9, 83, 531.

MANACH, Claudine, Augustin SCALBERT, Christine MORAND, RÉMÉSY a Liliana JIMÉNEZ. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition: AJCN*. New York, N.Y.: Journal of Clinical Nutrition, 2004, č. 79, s. 727-747.

MEBRAHTU, T., A. MOHAMED, C.Y. WANG a T. ANDEBRHAN. Analysis of Isoflavone Contents in Vegetable Soybeans. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2004, vol. 59, issue 2, s. 55-61. DOI: 10.1007/s11130-004-0023-4.

MILANESI, Lorena, Paula MONJE a Ricardo BOLAND. Presence of Estrogens and Estrogen Receptor-like Proteins in *Solanum glaucophyllum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2001, vol. 289, issue 5, s. 1175-1179. DOI: 10.1006/bbrc.2001.6079.

MORAVCOVÁ, Jitka. Vliv fytoestrogenů na symptomy menopauzy a rakoviny prsu. In: *Interní medicína pro praxi*. Konice: Solen, 2008, s. 517-519. 11(10). ISSN 1212-7299.

MORIYAMA, Tatsuya, Keiko KISHIMOTO, Kiyoko NAGAI, Reiko URADE, Tadashi OGAWA, Shigeru UTSUMI, Nobuyuki MARUYAMA a Motohiro MAEBUCHI. Soybean β -Conglycinin Diet Suppresses Serum Triglyceride Levels in Normal and Genetically Obese Mice by Induction of β -Oxidation, Downregulation of Fatty Acid

Synthase, and Inhibition of Triglyceride Absorption. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 2004, vol. 68, issue 2, s. 352-359. DOI: 10.1271/bbb.68.352.

MUSTONEN, Eeva A., Mikko TUORI, Ilkka SAASTAMOINEN, Juhani TAPONEN, Kristiina WÄHÄLÄ, Hannu SALONIEMI a Aila VANHATALO. Equol in milk of dairy cows is derived from forage legumes such as red clover. *British Journal of Nutrition*. 2009, vol. 102, issue 11, s. 1552

NEŠPOROVÁ, Monika. *Stanovení fytoestrogenů equolu v bacherové tekutině*. Brno, 2012. Bakalářská. Masarykova univerzita.

OPLETAL, Lubomír a Věra SKŘIVANOVÁ. *Přírodní látky a jejich biologická aktivita*. Vyd. 1. Editor Lubomír Opletal, Věra Skřivanová. Praha: Karolinum, 2010, 653 s. ISBN 978-802-4618-012.

OPLETAL, Lubomír. *Přírodní látky a jejich biologická aktivita: Nutraceutika: primární metabolity a látky obsažené ve strukturovaných biologických systémech*. Vyd. 1. Praha: Karolinum, 2011, 378 s. ISBN 978-802-4618-845.

PESCHEL, Wieland, Alfred KUMP a José Maria PRIETO. Effects of 20-hydroxyecdysone, *Leuzea carthamoides* extracts, dexamethasone and their combinations on the NF- κ B activation in HeLa cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2011, vol. 63, issue 11, s. 1483-1495.

PICÓ, Yolanda. *Chemical analysis of food: techniques and applications*. 1st ed. Waltham, MA: Academic Press, 2012, xiv, 798 p. ISBN 978-012-3848-628.

QU, Hongyan, R.L. MADL, D.J. TAKEMOTO, R.C. BAYBUTT a W. WANG. Lignans Are Involved in the Antitumor Activity of Wheat Bran in Colon Cancer SW480 Cells. *The Journal of nutrition*. Springfield, Ill.: Charles C. Thomas, Publisher, 2005, č. 135, s. 598-602.

RAIMONDI, Stefano, Lucia RONCAGLIA, Marzia De LUCIA, Alberto AMARETTI, Alan LEONARDI, Ugo Maria PAGNONI a Maddalena ROSSI. Bioconversion of soy isoflavones daidzin and daidzein by *Bifidobacterium* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008, vol. 81, issue 5, s. 943-950. DOI: 10.1007/s00253-008-1719-4.

RANSLEY, J, J DONNELLY a N READ. *Food and nutritional supplements: their role in health and disease*. New York: Springer, c2001, xvi, 197 p. ISBN 35-404-1737-0.

REINLI, Kathrin a Gladys BLOCK. Phytoestrogen content of foods—a compendium of literature values. *Nutrition and Cancer*. 1996, vol. 26, issue 2, s. 123-148.

RENARD, D, G DELLA VALLE a Y POPINEAU. *Plant biopolymer science: food and non-food applications*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, c2002, xi, 304 p. Special publication (Royal Society of Chemistry (Great Britain)), no. 276. ISBN 08-540-4856-1.

RIZNER, Tea Lanišnik a Elke WINTERHAGER. Estrogen metabolism and action in endometriosis: Estrogen and Endometriosis. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2009, vol. 307, 1-2, s. 140-144.

ROWLAND, Ian R., Helen WISEMAN, Tom A. B. SANDERS, Herman ADLERCREUTZ a Elizabeth A. BOWEY. Interindividual Variation in Metabolism of Soy Isoflavones and Lignans: Influence of Habitual Diet on Equol Production by the Gut Microflora. *Nutrition and Cancer*. 2000, vol. 36, issue 1, s. 27-32.

SAFE, Stephen H. a Kevin GAIDO. Phytoestrogens and anthropogenic estrogenic compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 1998, vol. 17, issue 1, s. 119-126.

SCHOMBURG, D a Gerhard MICHAL. *Biochemical pathways: an atlas of biochemistry and molecular biology*. 2nd ed. Hoboken, N.J.: John Wiley, c2012, xi, 398 p. ISBN 978-047-0146-842.

SETCHELL, K. D. R., X. ZHAO, S. E. SHOAF a K. RAGLAND. The Pharmacokinetics of S(-)Equol Administered as SE5-OH Tablets to Healthy Postmenopausal Women. *Journal of Nutrition*. 2009-10-20, vol. 139, issue 11, s. 2037-2043.

SETCHELL, K. D., X. ZHAO, P. JHA, J. E HEUBI a N. M BROWN. The pharmacokinetic behavior of the soy isoflavone metabolite S(-)equol and its diastereoisomer R(-)equol in healthy adults determined by using stable-isotope-labeled tracers. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2009, vol. 90, issue 4, s. 1029-1037. DOI: 10.3945/ajcn.2009.27981.

SETCHELL, K.D., C. CLERICI, E.D. LEPHART, S.J. COLE, C. HEENAN, D. CASTELLANI, B.E. WOLFE, L. NECHEMIAS-ZIMMER, N.M. BROWN, T.D. LUND, R.J. HANDA a J.E. HEUBI. S-equol, a potent ligand for estrogen receptor beta,

is the exclusive enantiometric form of the soy isoflavone metabolite produced by human intestinal bacterial flora. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2005, 81(5):1072-9.

SHAHIDI, Fereidoon a Marian NACZK. Analysis of polyphenols in Foods. ÖTLEŞ, Semih. *Methods of analysis of food components and additives*. 2nd ed. Boca Raton: Taylor, 2012, s. 253-307. ISBN 9781439815526.

SHAMSUL HAYAT, Aqil Ahmad. *Brassinosteroids: a class of plant hormone*. 1. ed. Dordrecht: Springer, 2011. ISBN 978-940-0701-885.

SIMERSKÝ, Radim, Ondřej NOVÁK, David A. MORRIS, Vladimír POUZAR a Miroslav STRNAD. Identification and Quantification of Several Mammalian Steroid Hormones in Plants by UPLC-MS/MS. *Journal of Plant Growth Regulation*. 2009, vol. 28, issue 2, s. 125-136.

SMAGGHE, Guy. *Ecdysone: structures and functions*. New York: Springer, c2009, xlii, 583 p. ISBN 14-020-9111-7.

SMEDS, ANNIKA I. , et al. Quantification of a Broad Spectrum of Lignans in Cereals, Oilseeds, and Nuts. *J. Agric. Food Chem.*. 2007, č. 55, s. 1337-1346.

STEINSHAMN, H., S. PURUP, E. THUEN a J. HANSEN-MØLLER. Effects of Clover-Grass Silages and Concentrate Supplementation on the Content of Phytoestrogens in Dairy Cow Milk. *Journal of Dairy Science*. 2008, vol. 91, issue 7, s. 2715-2725.

THOROGOOD, M, J MANN, P APPLEBY a K MCPHERSON. Risk of death from cancer and ischaemic heart disease in meat and non-meat eaters. *BMJ*. 1994, vol. 308, issue 6945, s. 1667-1670. DOI: 10.1136/bmj.308.6945.1667.

TUSKAEV, V. A. Synthesis and biological activity of coumestan derivatives (Review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2013, vol. 47, issue 1, s. 1-11

UDENIGWE, Chibuiké C. a Rotimi E. ALUKO Chemistry and bioactivity of food phytoalexins. URUAKPA, Florence Ojiugo. *Bioactive molecules in plant foods: Agriculture Issues and Policies*. Hauppauge, N.Y.: Nova Science Publishers, c2012, s. 111-130. ISBN 9781620815151.

VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin 2*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Václav Šedivý. Tábor: OSSIS, 2009, xx, 623 s. ISBN 978-80-86659-17-6.

VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin* 3. 2. upr. vyd. Tábor: OSSIS, 2002, 331 s. ISBN 80-866-5903-8.

WANG, H. a Patricia A. MURPHY. Isoflavone Composition of American and Japanese Soybeans in Iowa: Effects of Variety, Crop Year, and Location. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1994, vol. 42, issue 8, s. 1674-1677. DOI: 10.1021/jf00044a017.

WEIL, P. Anthony. Rozmanitost endokrinního systému. MURRAY, Robert K, David A. BENDER, Kathleen M. BOTHAM, Peter J. KENNELLY, Victor W. RODWELL a P. Anthony WEIL. *Harperova ilustrovaná biochemie*. 5. české vyd., 1. v nakl. Galén. Praha: Galén, c2012, s. 463-483. ISBN 9788072629077.

WISEMAN, H., K. CASEY, E.A. BOWEY, R. DUFFY, M. DAVIES, I.R. ROWLAND, A.S. LLOYD, A. MURRAY, R. THOMPSON a D.B. CLARKE. Influence of 10 wk of soy consumption on plasma concentrations and excretion of isoflavonoids and on gut microflora metabolism in healthy adults. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2004, 80(3):692-9.

WISEMAN, Helen, Karen CASEY, Don B. CLARKE, Karen A. BARNES, Elizabeth BOWEY, E. C. BAKER, J. J. RACKIS, Eugene SANDER, Ron BENNETT a Fred AUSTIN. Isoflavone Aglycon and Glucoconjugate Content of High- and Low-Soy U.K. Foods Used in Nutritional Studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, vol. 50, issue 6, s. 251-263.

WOCLAWEK-POTOCKA, I., K. OKUDA, T.J. ACOSTA, A. KORZEKWA, W. PILAWSKI a D.J. SKARZYNSKI. Phytoestrogen metabolites are much more active than phytoestrogens themselves in increasing prostaglandin F₂ α synthesis via prostaglanin F₂ α synthase-like 2 stimulation in bovine endometrium. *Experimental Biology and Medicine*. 2005, vol. 78, 1-4, s. 202-217.

YILDIZ, Fatih. *Phytoestrogens in functional foods*. Boca Raton: CRC Press, 2006, 320 p. ISBN 978-157-4445-084.

YUAN, Jian-Ping, Jiang-Hai WANG a Xin LIU. Metabolism of dietary soy isoflavones to equol by human intestinal microflora – implications for health. *Molecular Nutrition*. 2007, vol. 51, issue 7, s. 765-781.

INTERNETOVÉ ZDROJE

ACCORSI-NETTO, A., M. HAIDAR, R. SIMOES, J.R. SOARES a E. BARACAT.

Effects of isoflavones on the skin of postmenopausal women. *Clinics (Sao Paolo)*.

2009, 64(6):505-10. Dostupné z:

https://www.researchgate.net/publication/26648562_Effects_of_isoflavones_on_the_skin_of_postmenopausal_women_a_pilot_study

CHALLEM, Jack. *Soy Isoflavones for Women's Health: Is Soy a Viable Alternative to Traditional Estrogen Hormone Replacement?* [online]. 1998 [cit. 2015-04-23].

Dostupné

z:http://www.chiro.org/nutrition/FULL/Soy_Isoflavones_for_Womens_Health.shtml

NAKAMURA, Y., S. TSUJI a Y. TONOGAI. Determination of the levels of isoflavonoids in soybeans and soy-derived food and estimation of isoflavonoids in the Japanese daily intake. *JAOAC International*. 2000, 83(3). Dostupné

z:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10868587>

MARCINKOVÁ, Anna. Fytoestrogeny ovlivňují reprodukci, ale i mozek. *Osel: Objective Source E-Learning* [online]. 2008, - [cit. 2015-04-09]. Dostupné z:

<http://osel.cz/index.php?obsah=6&clanek=3850>

PETR, Jaroslav. "Přírodní" nerovná se "zdraví prospěšné". *Medical Tribune: Tribuna lékařů a zdravotníků* [online]. 2009 [cit. 2015-03-27]. Dostupné

z: <http://www.tribune.cz/clanek/16034-prirodni-nerovna-se-zdravi-prospesne>

Phytoestrogen: Foods High in Phytoestrogens and Health Benefits. *DietaryFiberFood.com* [online]. 2014 [cit. 2015-04-09]. Dostupné z:

<http://www.dietaryfiberfood.com/phytoestrogen-hormones/phytoestrogen-food-sources.php>

RIDDELLOVÁ, Kateřina. Izolační a separační metody: Extrakce (SPE). *VŠCHT*. 2012, -. Dostupné z:http://web.vscht.cz/~poustkaj/ISM_SPE_2012.pdf

WUTTKE, W. a D. SEIDLOVA-WUTTKE. 62 PLANT DERIVED ALTERNATIVES FOR HORMONE REPLACEMENT THERAPY (HRT). *Maturitas*. 2012, vol. 71, S14-.

DOI: 10.1016/S0378-5122(12)70066-X.

Dostupné

z:<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037851221270066X>

13 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obr. 1 Srovnání molekuly estradiolu a equolu	15
Obr. 2 Syntéza estriolu	17
Obr. 3 Aglykony isoflavonů	19
Obr. 4 Prenylované flavonoidy chmele	21
Obr. 5 Sekoisolariciresinol	22
Obr. 6 Kumestrol	23
Obr. 7 Medikarpin, lucernol, sativol	23
Obr. 8 Vznik sesamolu ze sesamolinu	30
Obr.9 Trigonellin	34
Obr.10 Kvadrupól	53
Obr.11 Produkce fenylypropanoidů, flavonoidů a dalších fenolických sloučenin	60
Grafč.1 20-hydroxyecdyson	57
Grafč.2 Ajugasteron C	57
Grafč.3 Polypodin B	58
Graf č.4 Ponasteron A	58
Graf č.5 Stachysteron C	59
Tabulka 1 Obsah látek s estrogenovou aktivitou v produktech ze sóji	26
Tabulka 2 Obsah isoflavonů v sójových produktech	26

14 SEZNAM ZKRATEK

BRs = brassinosteroidy

EC = ecdysone

ER = estrogenní receptory

FW = formula weight

GC-MS = Gas chromatography–mass spectrometry

HPLC = high performance liquid chromatography

m/z = poměr hmotnosti a náboje

MeOH = methanol

NDGA = kyselina nordihydroguajaretová

SECO = sekoisolariciresinol

SOD = superoxiddismutáza

SPE = Solid Phase Extraction

TCDD = 2,3,7,8 – tetrachloro-dibenzo (1,4) dioxin

UPLC-MS/MS = Ultra-high Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry