

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

**FARMAKOKINETIKA ISOFLAVONOIDŮ**

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2018

Lucie Ungerová

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

V Hradci Králové

---

## **Poděkování**

Tímto bych ráda poděkovala PharmDr. Janě Pourové, Ph.D. za její cenné rady, připomínky, kritiky i slova chvály a odborné vedení při psaní mé diplomové práce.

# Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Lucie Ungerová

Školitelka: PharmDr. Jana Pourová, Ph.D.

Název diplomové práce: Farmakokinetika isoflavonoidů

Cílem této diplomové práce je shromáždit současně dostupné informace o farmakokinetice polyfenolických látek z velké skupiny flavonoidů, isoflavonoidů. Jsou to obsahové látky mnohých druhů rostlin, a to hlavně z čeledi Fabaceae. Jedním z nejznámějších zdrojů jsou sójové boby obsahující hlavně nejznámější isoflavony - genistein a daidzein, jejichž farmakokinetika tvoří jádro celé práce. Vzhledem k tomu, že isoflavonoidy jsou obsaženy hlavně v potravě, nejrelevantnější je jejich perorální podání. Ve svých zdrojích se vyskytují převážně ve formě glykosidů, a proto se po požití musí pomocí  $\beta$ -glykosidáz rozložit na příslušné aglykony, které jsou poté schopné projít přes stěnu střeva do systémové cirkulace a být dostupné pro účinek. Toto se začíná dít již v ústní dutině a ke vstřebání dochází v tenkém střevě. Pro farmakokinetiku je velmi důležité také složení střevní bakteriální mikroflóry, jako příklad lze uvést rozdíly mezi lidmi v tom, zda jsou schopni produkovat equol (metabolit daidzeinu) nebo nikoliv. Isoflavonoidy podléhají zejména fázi II metabolismu - glukuronidaci a sulfataci. V mnohem menší míře se na metabolismu podílí cytochrom P450. Důležitým zjištěním je také to, že v jejich farmakokinetice hraje významnou roli enterohepatální oběh, který prodlužuje plazmatický poločas. Vazba na plazmatické bílkoviny (hlavně lidský sérový albumin) poločas prodlužuje také. Zbytky přijatých isoflavonoidů a jejich metabolity jsou vylučovány hlavně močí, exkrece stolicí tvoří minoritní eliminační cestu.

## **Abstract**

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Lucie Ungerová

Supervisor: PharmDr. Jana Pourová, Ph.D.

Title of diploma thesis: The pharmacokinetics of isoflavonoids

The aim of this diploma thesis is to summarize currently available informations about the pharmacokinetics of the polyphenolic compounds from a large group of flavonoids, isoflavonoids. Isoflavonoids are compounds found in many plant families, but especially in some members of Fabaceae family. One of the main well-known sources are soy beans containing the most famous isoflavones – genistein and daidzein, their pharmacokinetics is the main theme of this diploma thesis. Since isoflavonoids are mainly contained in the diet, their oral administration is very relevant. Isoflavonoids in the human diet occurs predominantly in the form of glycosides and therefore, after ingestion, they have to be deglycosylated by  $\beta$ -glucosidase enzyme family to aglycones. After that they are able to pass through the intestine into the systemic circulation and they are available for action. This is already happening in the oral cavity and the absorption occurs in the small intestine. The intestinal bacterial microflora composition is also very important for pharmacokinetics, for example I can mention the differences between humans whether they are capable of producing equol, the metabolite of daidzein, or not. Phase II conjugative reactions (glucuronidation and sulfatation) are predominant in the metabolism than phase I (cytochrome P450). An important fact is that enterohepatic circulation plays a significant role in the pharmacokinetics of isoflavonoids and prolongs the half-life. Binding to plasma proteins (mainly human serum albumin) also prolongs the serum half-life. Aglycones and their metabolites are excreted mainly in the urine. Excretion by feces is a minor elimination pathway.

# Obsah

Poděkování	3
Abstrakt	4
Abstract	5
Obsah	6
1. Seznam zkratk	7
2. Úvod a cíl práce	8
3. Isoflavonoidy – obecný úvod	9
3.1 Charakteristika isoflavonoidů	9
3.2 Struktura a rozdělení isoflavonoidů	10
3.3 Biosyntéza isoflavonoidů v rostlinách	13
3.3.1 Isoflavonsynthasa	15
3.4 Rozdělení isoflavonoidů	16
3.4.1 Isoflavony	16
3.4.2 Isoflavanony	18
3.4.3 Isoflavany	18
4. Farmakokinetika isoflavonoidů	19
4.1 Absorpce	19
4.1.1 Absorpce z gastrointestinálního traktu	19
4.1.2 Absorpce isoflavonů	21
4.2 Distribuce	29
4.2.1 Isoflavony	29
4.3 Metabolismus	34
4.3.1 Metabolismus genisteinu, daidzeinu a produkce equolu	37
4.3.2 Metabolismus glyciteinu	44
4.4 Exkrece	45
5. Diskuze	52
7. Závěr	55
8. Seznam obrázků	56
9. Seznam tabulek	57
10. Seznam literatury	57

## 1. Seznam zkratek

ADME – absorpce, distribuce, metabolismus, exkrece

ATP – adenosintrifosfát

AUC – plocha pod křivkou (farmakokinetický parametr)

BCRP – breast cancer resistance protein

$c_{\max}$  – maximální plazmatická koncentrace

Cl – plazmatická clearance

CHS – chalkonsyntháza

CHI – chalkonisomeráza

CYP450 – cytochrom P450

DHD – dihydrodaidzein

DMA – desmethylangolensin

DOB – deoxybenzoin

HIS – hydroxyisoflavanonsyntáza

HSA – human serum albumin (lidský sérový albumin)

IFR – isoflavonreduktáza

IFS – isoflavonsyntáza

IOMT – isoflavon-O-methyltransferasa

MRP – mutidrug resistance protein

SULT – sulfottransferáza

$t_{\max}$  – čas dosažení maximální plazmatické koncentrace

$T_{1/2}$  – eliminační poločas

UGT (UDPGT) – UDP-glukuronyltransferáza

$V_d$  – distribuční objem

## 2. Úvod a cíl práce

Isoflavonoidy patří mezi polyfenolické sloučeniny vyskytující se v mnohých čeledích rostlin, nejvíce pak v bobovitých rostlinách. Z těch je důležité zmínit hlavně hospodářsky významné rostliny jako sója, hrách, cizrna nebo vojtěška (alfalfa). V současné době jsou isoflavonoidy předmětem intenzivního výzkumného zájmu, a to zejména isoflavony obsažené v sóji. Důvodem je jejich role při prevenci několika chronických onemocnění a také užití jako doplňky jejich léčby. Řada epidemiologických studií spojuje příjem potravy s vysokým obsahem isoflavonoidů se snížením rizika rakoviny prsu, prostaty či tlustého střeva, osteoporózy a kardiovaskulárních chorob. Jejich působení proti rakovině, antiangiogenní, estrogenní a antiestrogenní účinky prokazují i mnohé laboratorní experimenty [21, 70].

Důležitou součástí pochopení účinků kterékoliv látky je poznání její farmakokinetiky, to znamená absorpce, distribuce, metabolismu a exkrece. Cílem této práce je shromáždit aktuální informace o isoflavonoidech se zaměřením na jejich farmakokinetiku. Nejvíce dostupných informačních zdrojů studuje farmakokinetiku nejvýznamnější podskupiny těchto látek, isoflavonů, což jsou významné obsahové látky např. v sóji, či jeteli. Proto je hlavním pilířem této práce farmakokinetika nejdůležitějších isoflavonů – genisteinu, daidzeinu, glyciteinu, biochaninu A, formononetinu a puerarinu.

V první části diplomové práce jsou shrnuty obecné informace o isoflavonoidech, jakým způsobem v rostlinách vznikají a jejich rozdělení. Druhá část se věnuje stěžejnímu tématu a tím je právě farmakokinetika těchto látek.

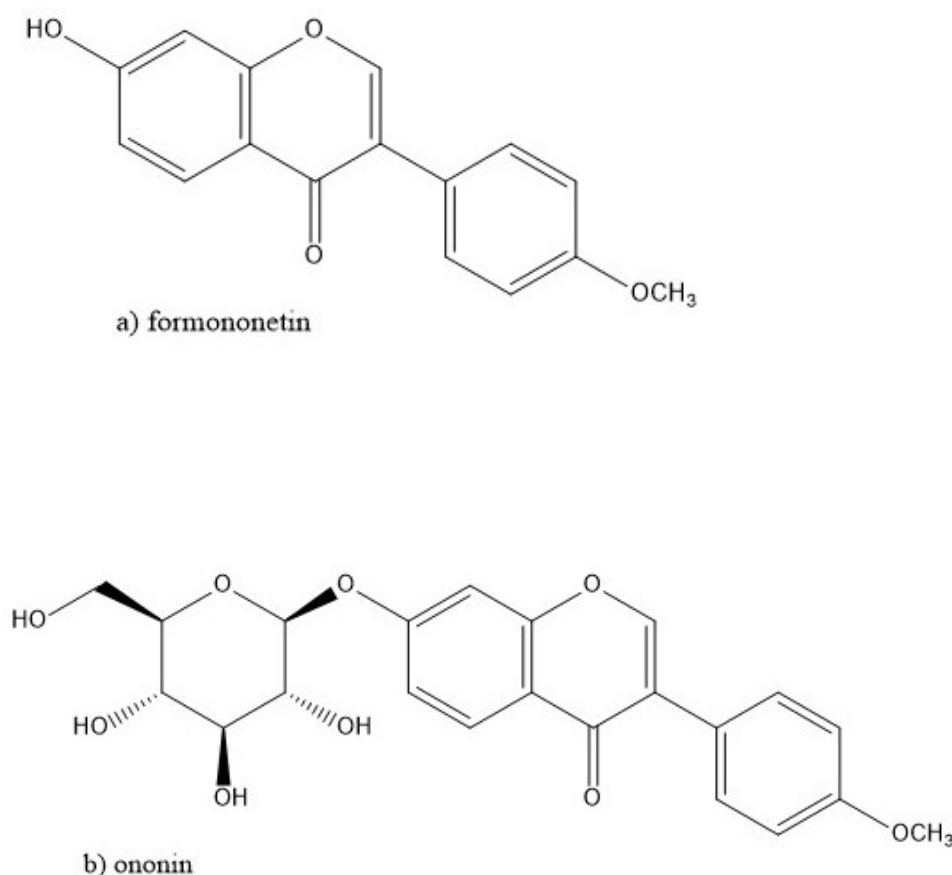


### 3. Isoflavonoidy – obecný úvod

#### 3.1 Charakteristika isoflavonoidů

Isoflavonoidy jsou podskupinou jedné z největších skupin rostlinných obsahových látek - flavonoidů. Byly izolovány jak ze širokého spektra luštěnin z čeledi Fabaceae, tak z dalších rostlin, které mezi bobovité nepatří, jako jsou například Rosaceae, Iridaceae, Moraceae, Asteraceae, Poaceae a další [1, 6].

První informace o isoflavonoidech jako přírodních produktech tvořených některými čeleděmi rostlin pochází z poloviny 19. století, kdy pánové Reinsch a Hlasiwetz izolovali látku ononin z kořene rostliny *Ononis spinosa* L. Celá struktura této látky byla odhalena asi o osmdesát let později, kdy se zjistilo, že jde o 7-*O*-glykosid isoflavonu formononetinu (7-hydroxy-4-methoxyisoflavon) [3,4].



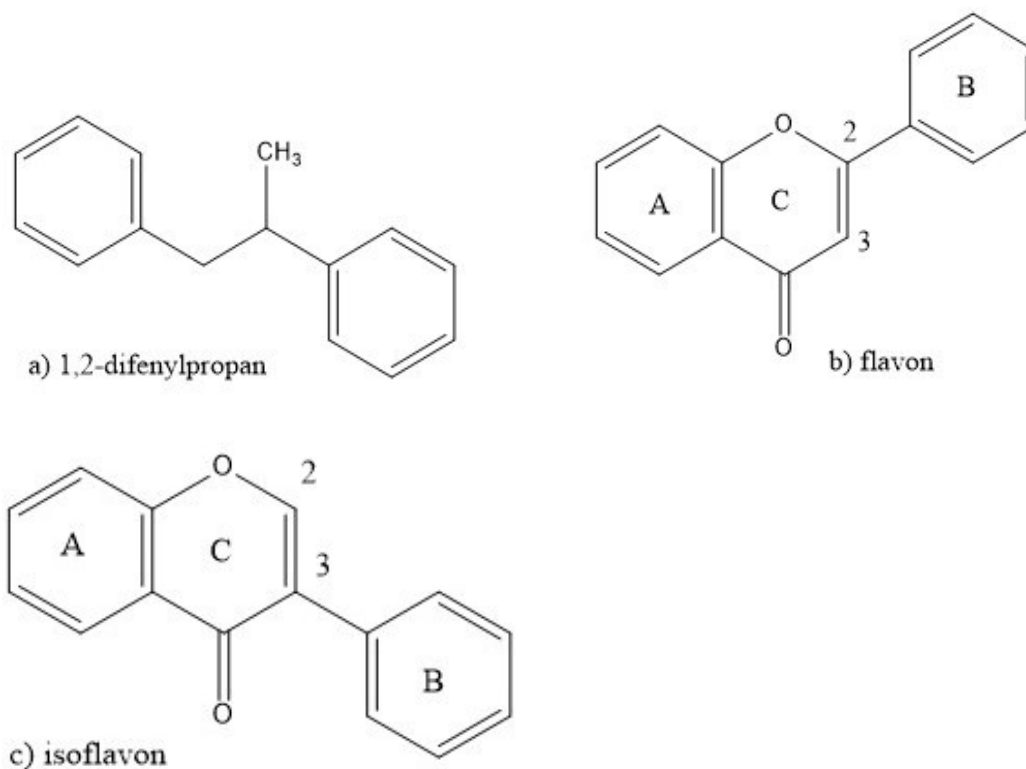
Obrázek 1 - Struktury formononetinu (a) a ononinu (b) (Nakresleno v programu ChemDraw Professional podle Lapčik et al., 2005)

Veitch 2007 a Lapčik et. al 2007 uvádí, že v dnešní době je známo již přes 1600 isoflavonoidů, které jsou syntetizovány až šedesáti čeledmi rostlin. Naprostá většina z nich byla izolována z Leguminosae (Fabaceae), což je třetí největší a pravděpodobně i jedna z ekonomicky nejvýznamnějších čeledí kvetoucích rostlin [3]. Koncem 19. století se však objevily důkazy, že isoflavonoidy se omezeně vyskytují i v dalších čeledích. V té době totiž De Laire a Tiemann zkoumali iridin v oddencích *Iris sp.* (Iridaceae) a začátkem století dvacátého Finmore podal důkazy o výskytu prunetinu v kůře *Prunus sp.* (Rosaceae) [3]. Podle literárního průzkumu Reynauda et al. z roku 2005 byly isoflavonoidy objeveny u 164 druhů z 31 čeledí kvetoucích rostlin. V roce 2006 Macková et al. upozornili na dalších 17 čeledí a 49 isoflavonoidů vyskytujících se v nebobovitých rostlinách, které nebyly citovány v žádných předchozích review. Počet druhů, které nepatří do čeledi bobovitých rostlin, může být ale ještě mnohem více [4].

V oblasti farmacie a medicíny patří isoflavonoidy v současnosti mezi důležité látky ve výzkumu. Ukázalo se, že několik těchto látek má významné a zajímavé farmakologické vlastnosti, mezi které patří například endokrinní, protibakteriální, protivirové, protizánětlivé a další. Mezi nejzkoumanější skupinu isoflavonoidů patří estrogeně aktivní isoflavony genistein, daidzein a několik dalších. Tyto látky patří do skupiny fytoestrogenů s nesteroidní strukturou, váží se na estrogení receptory a mají vliv na denzitu kostní tkáně, kardiovaskulární systém, kognitivní funkce a mnohé studie se zabývají jejich vlivem na vznik a léčbu nádorových onemocnění prsu, prostaty nebo tlustého střeva [6, 8].

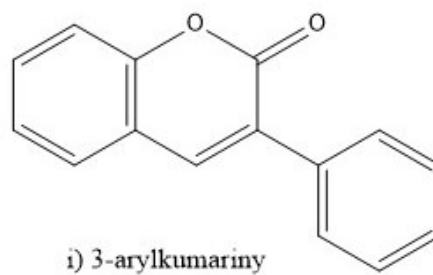
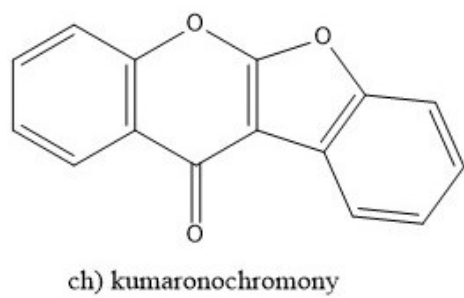
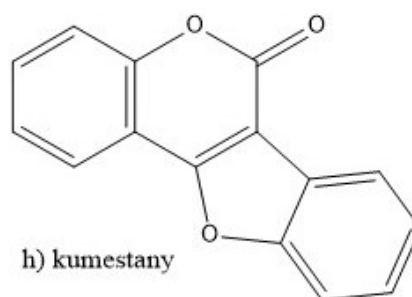
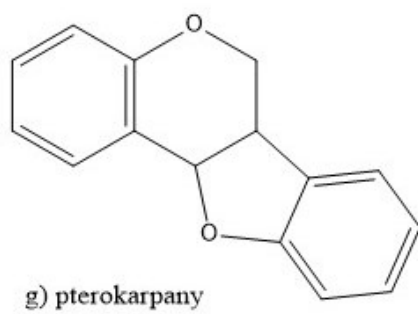
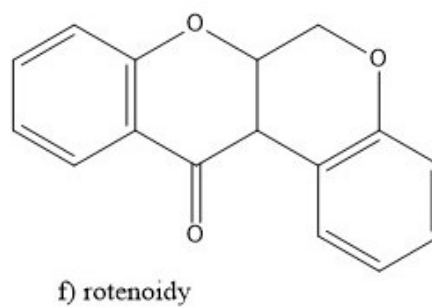
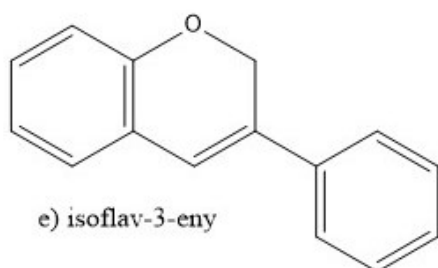
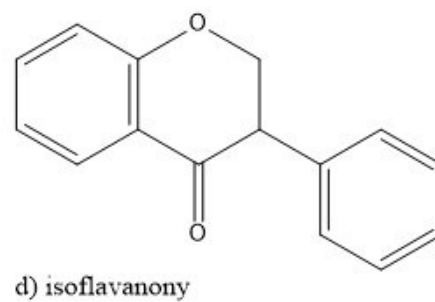
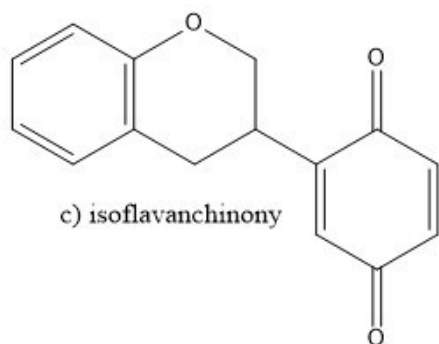
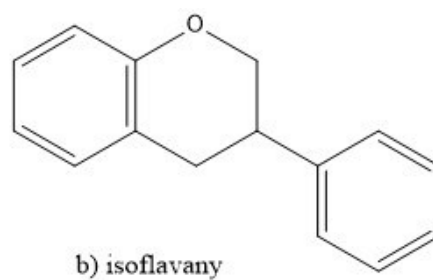
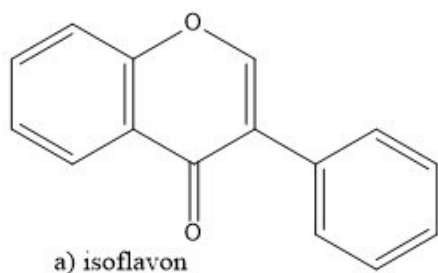
### **3.2 Struktura a rozdělení isoflavonoidů**

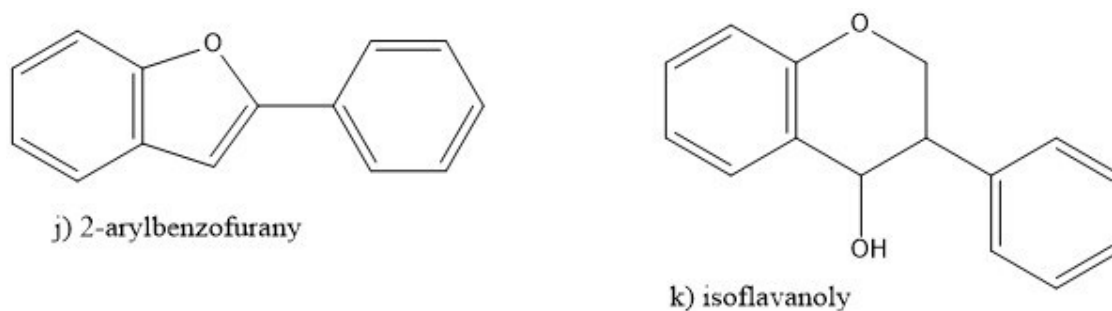
Isoflavonoidy jsou velkou podskupinou flavonoidů, podle Reynauda et al. 2005 je známo až 1000 struktur tvořených patnáctiuhlíkatým skeletem (C6-C3-C6) odvozeným od 1,2-difenylypropanu [5].



Obrázek 2 - Základní skelet 1,2-difenylypropanu (a), flavonu (b) a isoflavonu (c)  
 (Nakresleno v programu ChemDraw Professional podle Raynaud et al., 2005)

Co se týče struktury isoflavonoidy jsou charakteristické tím, že B-kruh je na rozdíl od ostatních skupin flavonoidů připojen na uhlíku C3 namísto C2 základního chromanového skeletu. B-kruh podléhá několika modifikacím, na jejichž základě se isoflavonoidy dělí na další skupiny látek. Nejznámější, nejpočetnější a nejprozkoumanější z nich jsou isoflavony a pterokarpany, dále sem patří isoflavanony, isoflavany, isoflavanoly, rotenoidy, isoflav-3-eny, 3-arylkumariny, kumestany, kumaronochromony, 2-arylbenzofurany a dimery, heterodimery a konjugáty isoflavonoidů [1, 3, 6].





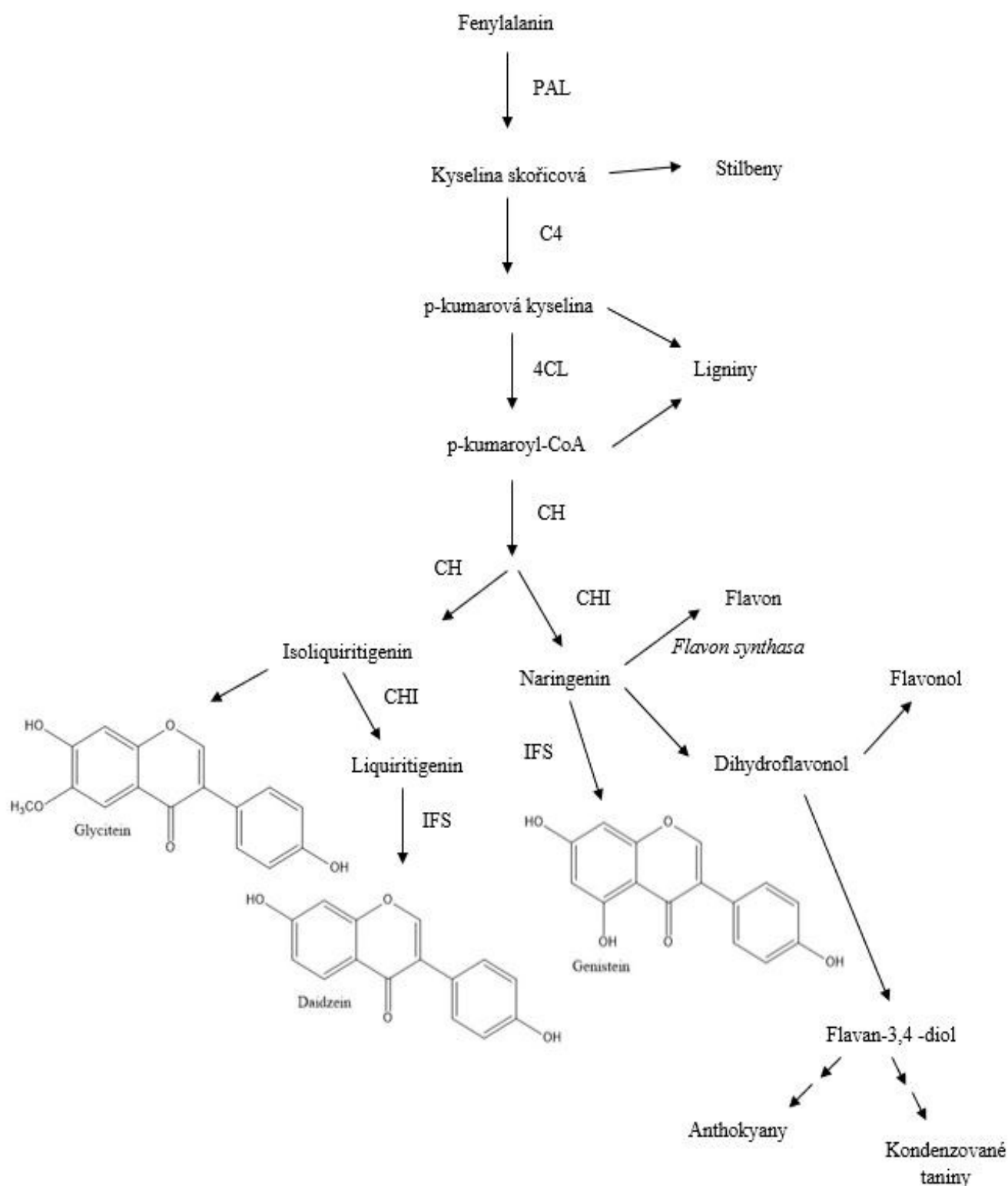
Obrázek 3 - Základní skupiny isoflavonoidů (Nakresleno v programu ChemDraw Professional podle Veitch, 2007)

V rostlinách se isoflavonoidy vyskytují častěji ve formě aglykonů než glykosidů. U glykosidických derivátů cukernou složku tvoří nejčastěji glukóza, rhamnóza nebo apióza [5].

### 3.3 Biosyntéza isoflavonoidů v rostlinách

Počátek biosyntézy isoflavonoidů a mnoha dalších látek je základní fenylypropanoidová dráha. Kromě isoflavonoidů touto cestou vznikají také chalkony, aurony, flavony, flavonoly, flavandioly, anthokyany, kondenzované taniny a flobafenové pigmenty (viz Obr. 4) [8].

Na začátku celé biosyntetické cesty vedoucí k isoflavonoidům stojí kyselina šikimová, která dává vzniku aminokyselině fenylyalanin. Ten je přes několik kroků konvertován na 4-kumaroyl-CoA a malonyl-CoA, ty jsou substrátem pro enzym chalkonsynthasa (CHS) a vzniká chalkon. Ten je v dalším kroku působením chalkonizomerázy (CHI) přeměněn na flavanony, které jsou velmi důležité pro vznik isoflavonoidů, naringenin a liquiritigenin. Na vzniku konkrétních skupin isoflavonoidů se podílí další enzymy jako isoflavonreduktasa (IFR), isoflavon-O-methyltransferasa (IOMT) nebo isoflavonsynthasa (IFS) [8].

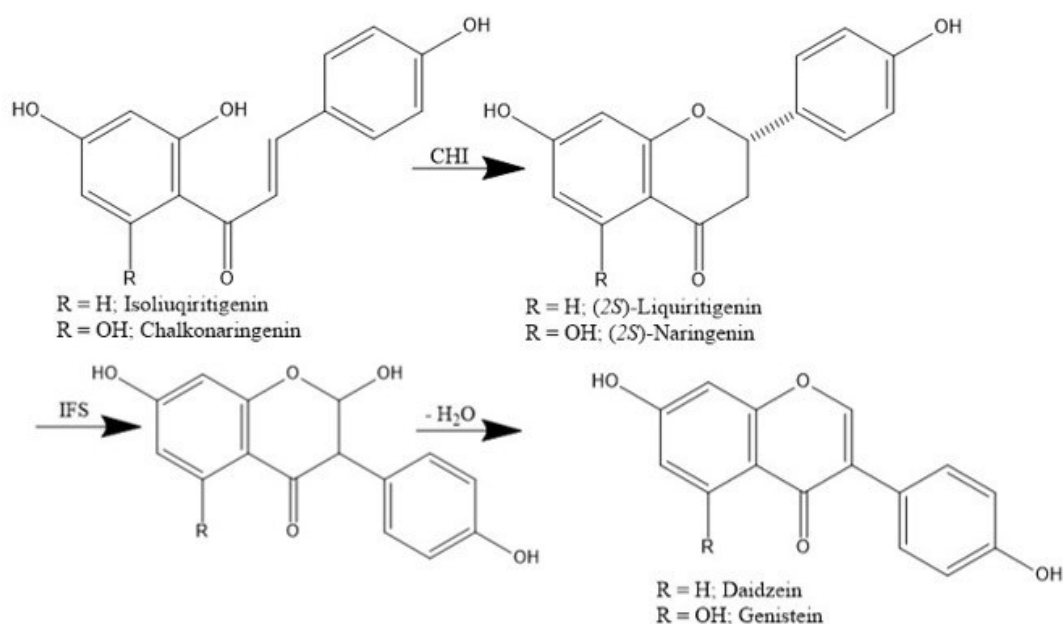


Obrázek 4 – Schéma biosyntéry isoflavonoidů v rostlinách. Vytvořeno podle [8, 12]. Popis v textu. Vysvětlivky: PAL – fenylalanin ammoniumlyáza; C4 – 4-hydroxyláza kyseliny skořicové; 4CL – 4-kumarát koenzym A ligáza; CHS – chalkonsyntáza; CHI - chalkonisomeráza; IFS – isoflavonsyntáza.

### 3.3.1 Isoflavonsynthasa

Isoflavonsynthasa (IFS) je enzym cytochromu P450 (izoforma CYP 93C), který hraje klíčovou roli v syntéze prvních isoflavonoidů - isoflavonů daidzeinu a genisteinu. IFS se méně často v literatuře označuje jako 2-hydroxyisoflavanonsynthasa (2-HIS) [3, 4].

Tento enzym katalyzuje hydroxylaci flavanonového prekurzoru a zároveň migraci fenolového kruhu z polohy C2 do polohy C3 základního chromenového skeletu flavanonů liquiritigeninu a naringenin [4, 9].



Obrázek 5 - Reakce vedoucí ke vzniku isoflavonoidů za účasti isoflavonsynthasy. Zkratky enzymů: CHI – chalkonisomerasa; IFS – isoflavonsynthasa (Nakresleno v programu ChemDraw Professional podle Veitch, 2007)

Geny kódující IFS byly objeveny u mnoha druhů bobovitých rostlin (sója, lékořice, cizrna, čočka a další) a v cukrové řepě (čeleď Chenopodiaceae) [10, 11].

### 3.4 Rozdělení isoflavonoidů

V této kapitole bych chtěla stručně popsat některé skupiny isoflavonoidů. Ty se dělí podle substituce na B-kruhu. Jelikož se tato diplomová práce věnuje zejména farmakokinetice isoflavonů, ostatní skupiny jsou popsány pouze okrajově.

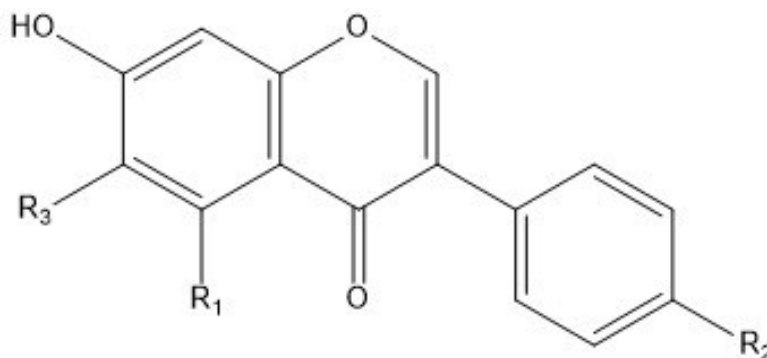
#### 3.4.1 Isoflavony

Isoflavony jsou nejznámější a nejprozkoumanější podskupinou isoflavonoidů. Co se týče struktury, patří mezi deriváty 3-fenylchromonu. V posledních letech jim byla věnována velká pozornost, a to hlavně díky jejich účinkům na lidský organismus a zdraví [13].

Tato skupina látek se v největší míře vyskytuje v čeledi Fabaceae, ale isoflavony byly pozorovány v přibližně dvaceti dalších čeledích jako Rosaceae, Iridaceae, Asteraceae a dalších [14].

Z hlediska struktury můžeme isoflavony rozdělit do tří skupin - O-substituované deriváty (např. hydroxy, methoxy a methyendioxy), prenylované isoflavony a glykosilované deriváty [3]. Syntéza isoflavonů byla popsána v podkapitole 4.3.





1.  $R_1 = \text{OH}$ ,  $R_2 = \text{OH}$ ,  $R_3 = \text{H}$  - Genistein
2.  $R_1 = \text{H}$ ,  $R_2 = \text{OH}$ ,  $R_3 = \text{H}$  - Daidzein
3.  $R_1 = \text{OH}$ ,  $R_2 = \text{OMe}$ ,  $R_3 = \text{H}$  - Biochanin A
4.  $R_1 = \text{H}$ ,  $R_2 = \text{OH}$ ,  $R_3 = \text{OMe}$  - Glycitein
5.  $R_1 = \text{H}$ ,  $R_2 = \text{OMe}$ ,  $R_3 = \text{H}$  - Formononetin

Obrázek 6 - Stuktury základních zástupců isoflavonů (Nakresleno v programu ChemDraw Professional podle Dixon and Ferreira, 2002 a Lapčík et al., 2005)

Isoflavony se řadí do skupiny fytoestrogenů společně s dalšími skupinami látek jako stilbeny, kumestany a lignany. Největším zdrojem isoflavonů je sója a nejvíce zkoumanými isoflavony potažmo fytoestrogeny jsou daidzein a genistein. Patří sem dále zástupci jako biochanin A, glycitein a formononetin [6, 18].

#### 3.4.1.1 Genistein a daidzein

Genistein a daidzein jsou nejjednoduššími isoflavony, které se nachází hlavně v čeledi Fabaceae a jejich největším zdrojem je sója a další jako fazole nebo cizrna. V rostlinách se vykytují buď ve formě glykosidu, nebo aglykonu, glykosidy jsou poté v lidském organismu působením střevní mikroflóry rozloženy na účinné aglykony, které jsou pak snadno transportovány přes střevní epitel [15].

Jak je již zmíněno výše, tyto isoflavony mají významnou estrogenní aktivitu. Jejich nesteroidní struktura je podobná struktuře estrogenu a proto mají možnost vázat se na jeho receptory  $\text{ER}\alpha$  a  $\text{ER}\beta$  a podle konkrétní tkáně se chovají buď jako agonisté nebo

antagonisté [6]. Podle několika zdrojů vyvolává genistein účinky estradiolu v tkáních jako prs, vaječníky, prostata, endometrium, cévy a kostní tkáň [16, 17, 18].

### 3.4.2 Isoflavanony

Isoflavanony se oproti isoflavonům nevyskytují tak často. Patří sem méně známé látky než v předchozí skupině. Z nich lze jmenovat například sigmoidin z *Erythrina sigmoidea*, eryotrichin z *Erythrina eriotricha*, glyasperin z *Gycyrrhiza* sp. nebo prostratol ze *Sophora prostrata* [19].

Isoflavanony jsou látky vznikající v rostlinách z isoflavonů za katalýzy dvou enzymů. V prvním kroku dochází k 2'-hydroxylaci B-kruhu pomocí isoflavon-2'-hydroxylázy. Druhý enzym isoflavonreduktáza způsobuje následující konverzi na isoflavanon [3].

### 3.4.3 Isoflavany

Isoflavany vznikají redukcí isoflavanonů. V přírodě se vyskytují levotočivé, pravotočivé formy i racemáty. Insekticidní a pesticidní účinky má flavanon millinol B z druhu *Millettia racemosa* [3].

## 4. Farmakokinetika isoflavonoidů

Tato kapitola se bude věnovat hlavnímu tématu diplomové práce, a to farmakokinetice isoflavonoidů. Zde se pokusím shrnout informace o absorpci, distribuci, metabolismu a exkreci některých látek ze skupiny isoflavonoidů.

### 4.1 Absorpce

Absorpce je část farmakokinetiky, kdy látka přestupuje z místa podání do systémové cirkulace. Ta je ovlivněna různými faktory jako formulace, v níž je látka do organismu podávána, fyzikálně-chemické vlastnosti látky nebo také fyziologické parametry místa aplikace [20].

#### 4.1.1 Absorpce z gastrointestinálního traktu

Studie prokázaly, že isoflavonoidy se z gastrointestinálního traktu vstřebávají pouze v podobě aglykonů. Glykosidy jsou totiž příliš hydrofilní a mají velkou molekulovou hmotnost [33]. To znamená, že glykosylované deriváty nejdříve musí podstoupit deglykosylaci [22, 23, 24]. Například puerarin ale nejspíš nepodléhá výrazné deglykosylaci, ale absorbován je pomocí střevního glukosového transportéru [21]. Simons et al. [38]. ve studii z roku 2005 zjistili, že puerarin jako *C*-glykosid je rezistentní vůči  $\beta$ -glykosidáze a tudíž hydrolyze nepodléhá, na rozdíl od daidzinu (*O*-glykosid), který je rychle hydrolyzován na aglykon daidzein (viz Obr. 18). Je tedy možné, že pozice a typ glykosidické vazby rozhoduje o tom, zda k hydrolyze ve střevech u flavonoidů obecně dojde nebo ne [38].

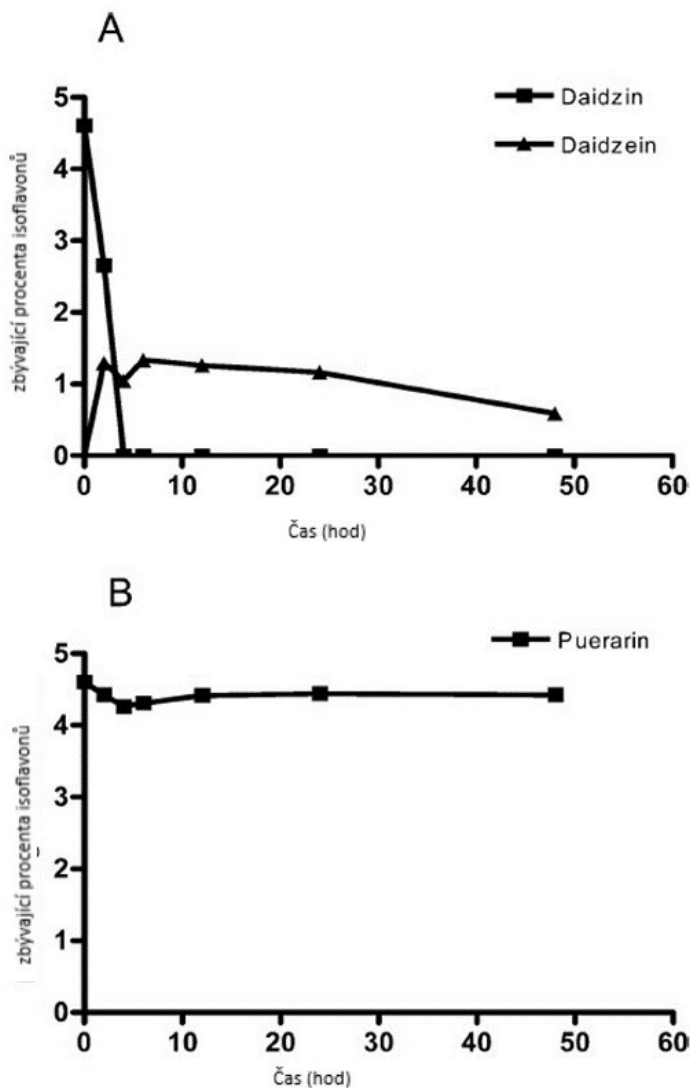
Deglykosylace začíná již v dutině ústní, kde bakterie ústní mikroflóry ve spolupráci s epitelem vykazují  $\beta$ -glukosidasovou aktivitu. Poté pokračuje v proximální části tenkého střeva pomocí enzymu laktáza, který je součástí střevní membrány. Nachází se na lumenální straně membrány a hydrolyzuje glykosidické vazby v molekulách isoflavonoidů za vzniku jejich aglykonů. V podobě aglykonů mohou tyto látky procházet difuzí do enterocytů [23, 24, 26].

Co se týče enzymu laktáza ve střevě, existuje značná interindividuální variabilita v aktivitě. Může nastat situace, kdy je aktivita laktázy snižena nebo úplně chybí. V tom případě se glykosidy dostanou až do tlustého střeva, kde je část rozložena enzymy střevní

mikroflóry za vzniku aglykonu. V tomto případě ale dochází k tomu, že do systémové cirkulace se dostane nižší množství isoflavonoidů než v případě funkční laktázy, naproti tomu se ale zvýší vstřebávání jejich metabolitů, které vzniknou působením střevní mikroflóry [26, 30].

Kromě laktázy jsou glykosidy v tenkém střevě rozkládány pomocí  $\beta$ -glykosidasy produkované enterocyty a střevními bakteriemi [24, 26].

Anaerobní prostředí tlustého střeva je vhodné pro redukční reakce [25, 26]. Isoflavonoidy jsou tak redukovány působením bakteriální mikroflóry. Například genistein je redukován na dihydrogenistein, a poté na 5-hydroxyequol a daidzein se mění na dihydrodaidzein a equol [27]. Kruh C struktury isoflavonoidů je dále štěpen bakteriální mikroflórou na metabolity deoxybenzoinu (DOBs), které jsou poté absorbovány pasivní difuzí a jsou biologicky aktivní, vykazují aktivitu podobnou isoflavonoidům [28, 29].



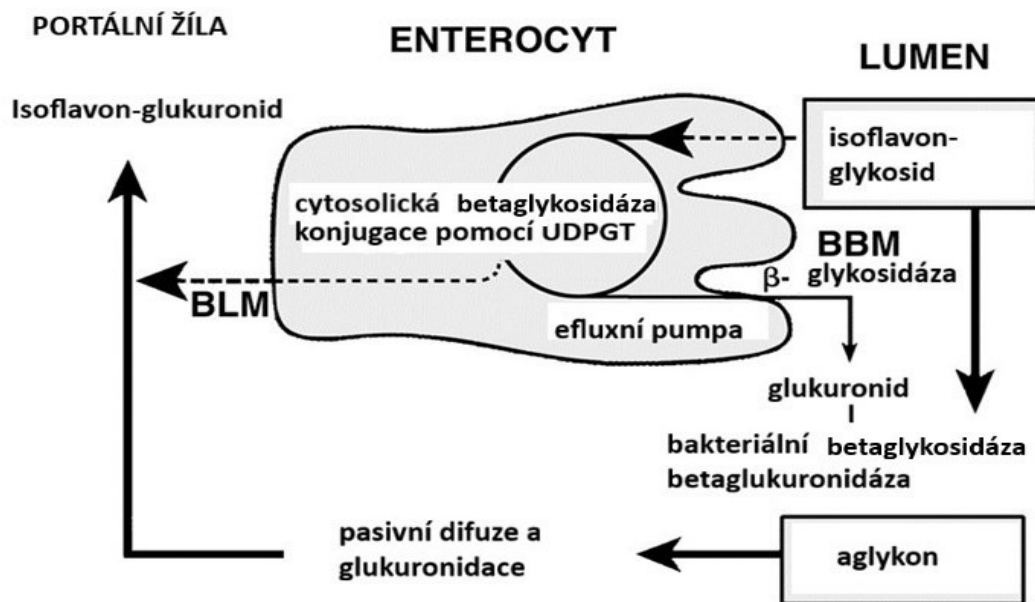
Obrázek 7 - Rozklad isoflavonů střevní bakteriální mikroflórou. A - zmizení daidzinu a zvýšení množství aglykonu daidzeinu; B – stabilita puerarinu

#### 4.1.2 Absorpce isoflavonů

V této podkapitole se budu věnovat absorpci dvou neznámějších isoflavonoidů, o kterých existuje nejvíce dostupných studií. Jak jsem již zmínila výše, patří do nejrozšířenější skupiny těchto látek – isoflavonů.

Již dlouho je známo, že daidzein a genistein jsou absorbovány v tenkém střevě [31]. Z potravy jsou tyto isoflavonoidy přijímány ve formě glykosidů – daidzinu a genistinu. Aby se ale z tenkého střeva vstřebaly, musí být hydrolyzovány pomocí

střevních  $\beta$ -glukosidáz do formy aglykonů, což potvrzují jak studie provedené na zvířatech, tak i ty na lidech [31, 32]. Na následujícím obrázku je jednoduše znázorněn mechanismus absorpce daidzeinu a genisteinu. Na stejném principu funguje i absorpce dalších isoflavonů.



Obrázek 8 - Schéma instestinální absorpce a metabolismu glykosylovaných derivátů isoflavonů genisteinu a daidzeinu [32]

Největší podíl aglykonů je absorbován nejspíš z jejunu, kde je aktivita  $\beta$ -glykosidáz nejvyšší. Střevní  $\beta$ -glykosidázy vykazují vyšší afinitu k isoflavonům, a to hlavně k těm, které mají zbytky glukózy ve své struktuře navázány v pozici číslo 7, což je v podstatě většina těch, které jsou přijímány potravou [31, 32].

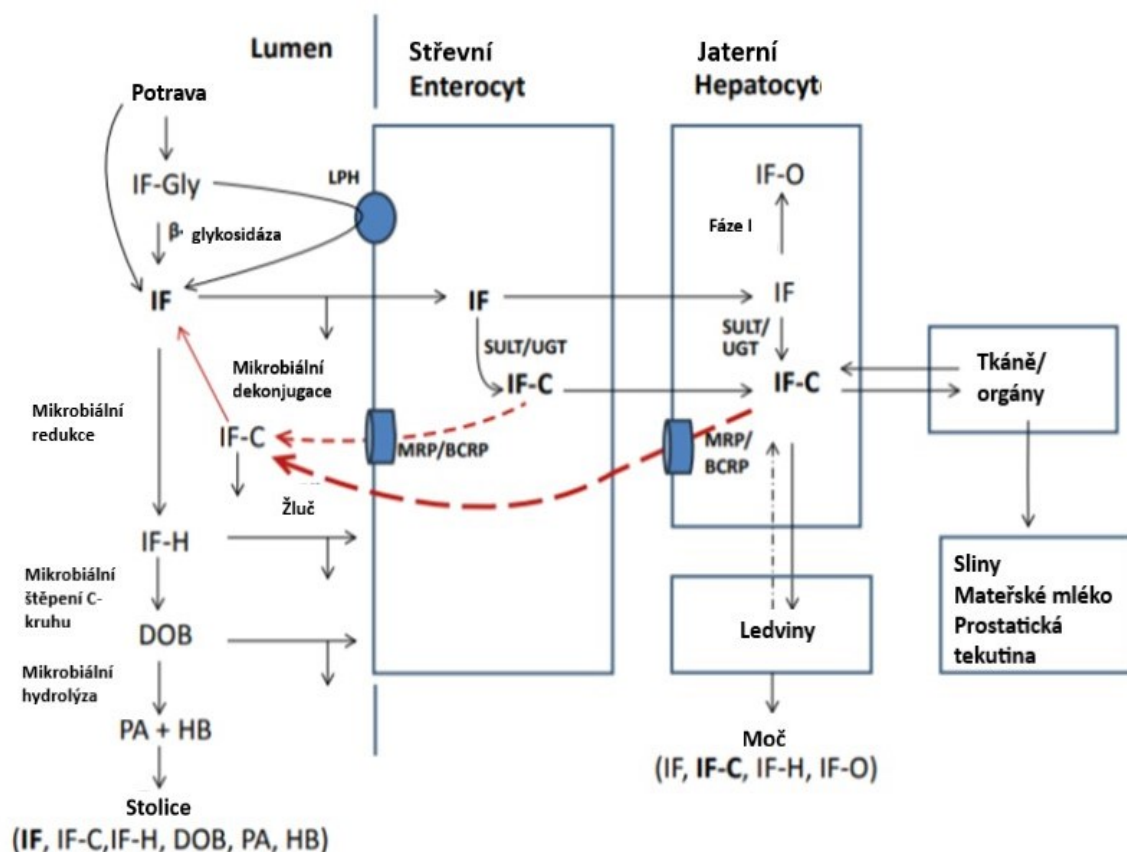
Aglykony isoflavonů jsou fenolické povahy, jejich  $pK_a$  je tedy vhodné k tomu, aby v jejunu prošly membránou pasivní difuzí. V prostředí jejunu se tedy nacházejí v neionizované formě, která je u látek nezbytná k tomu, aby membránou pasivně prošly. To nasvědčuje tomu, že právě pasivní difuze je nejpravděpodobnějším mechanismem absorpce isoflavonů [32].

Jak už je zmíněno výše, v lidském tenkém střevě se nachází enzymy  $\beta$ -glykosidázy, které se ve velké míře podílejí na hydrolyze glykosidických vazeb v molekulách isoflavonů. Zjistilo se, že tyto střevní  $\beta$ -glykosidázy vykazují vysokou afinitu k isoflavonům, a to hlavně k těm, které mají cukerný zbytek navázaný na uhlíku číslo 7 jako genistein-7-glykosid nebo daidzein-7-glykosid [24, 33].

Po tom, co jsou isoflavony v tenkém střevě deglykosylovány  $\beta$ -glykosidázou, rapidně se zvýší koncentrace aglykonů v plasmě. Zdroje se shodují na tom, že poté, co koncentrace isoflavonů v plazmě prudce stoupne, asi po jedné až dvou hodinách na malou chvíli trochu poklesne, a poté lze znovu pozorovat nárůst. První rychlý nárůst koncentrace by mohl být vysvětlen vstřebáváním isoflavonů v podobě aglykonů již v prostředí žaludku, duodena a proximálního jejunu. U genisteinu a daidzeinu dochází asi po jedné až dvou hodinách po perorálním podání potravy obsahující isoflavony k prvnímu vzestupu koncentrace v plasmě, poté nastává krátká fáze plató a po čtyřech až osmi hodinách se objevuje pík druhý, který odráží enterohepatální cirkulaci. Za 12 až 24 hodin už koncentrace isoflavonů v plazmě klesají a po 48 hodinách už je tam nemůžeme detekovat [33, 34, 35].

Studie popisující farmakokinetiku isoflavonů jsou nejčastěji založeny na podávání sóji nebo produktů z ní vyrobených určité skupině lidí. Často se zkoumá rozdíl mezi muži a ženami, rozdíl mezi lidmi s onemocněním nebo bez něj nebo rozdíl v ADME u žen před menopauzou a po ní.

Sójové boby obsahují z největší části isoflavony daidzein a genistein v podobě svých  $\beta$ -glykosidů, v podobě aglykonů se vyskytují pouze do 2,5 % všech isoflavonů v bobech. V malé míře jsou zastoupeny kromě již zmíněných  $\beta$ -glykosidů také malonyl- a acetyl-glykosidy, avšak jejich koncentrace je tak nízká, že není možná další kvantifikace. Součástí isoflavonů v sóji je také glycitein, respektive jeho glykosid glycitin, který tvoří 2,4 % isoflavonů [56].



Obrázek 9 – Schéma absorpce, distribuce, metabolismu a exkrece isoflavonů. Vysvětlivky: IF - aglykon isoflavonu; IF-Gly – glykosid isoflavonu; IF-C – konjugát isoflavonu; IF-H - redukováný isoflanov; IF-O – oxidovaný isoflavon; DOB - deoxybenzoin; PA – deriváty kyseliny propionové; HB – hydroxylované benzenové deriváty; LPH – laktáza phlorizin hydroláza; SULT – sulfotransferáza; UGT – UDP-glukuronyltransferáza; MRP – multidrug rezistence protein; BCRP – breast cancer resistance protein. Převzato a upraveno podle [21].

Co se týče biodostupnosti isoflavonů genisteinu a daidzeinu, velmi zajímavá je studie Setchella et al. z roku 2003, kde ke zjištění farmakokinetických parametrů byly použity radioaktivně značené isoflavony. Tato studie byla prvním detailním výzkumem farmakokinetiky stabilních izotopů genisteinu a daidzeinu provedeným na zdravých lidských jedincích. Probíhala za použití [<sup>13</sup>C] značeného genisteinu a daidzeinu, které jsou metabolicky stabilní. V tomto výzkumu proběhly za pomoci izotopů klasické farmakokinetické studie založené na jednorázovém perorálním podání ve čtyřech různých



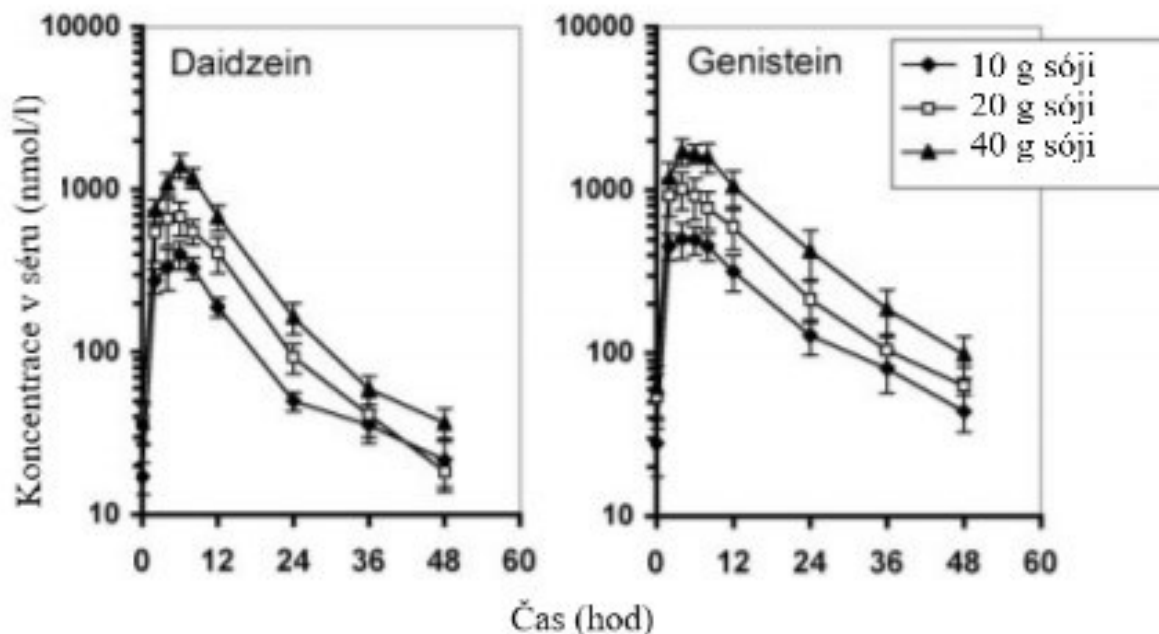
režimech. Tři z nich spadaly do nízkodávkového režimu (0,4/kg tělesné hmotnosti) – nízká dávka, opakovaná nízká dávka a nízká dávka po jídle a u čtvrté byla tato dávka zdvojnásobena. Tento přístup potvrdil reprodukovatelnost ve farmakokinetice isoflavonů mezi jednotlivci v závislosti na čase a také prokázal, že pravidelná konzumace isoflavonů (tzn. 50mg denně alespoň 7 po sobě následujících dnů) z potravin bohatých na sóju žádným způsobem neovlivňuje farmakokinetiku ani biodostupnost isoflavonů [48].

Výsledky této studie ukázaly, že [<sup>13</sup>C] daidzein a [<sup>13</sup>C] genistein se po perorálním podání velice rychle objevily v séru a svého maxima dosáhly během 2 až 8 hodin po požití. Izotopy byly pomalu odbourávány kinetikou prvního řádu. Poločasy daidzeinu a genisteinu v této studii dosahovaly průměrných hodnot  $7,75 \pm 0,36$  hodin a  $7,72 \pm 0,25$  hodin [48].

Setchell se svými spolupracovníky se farmakokinetikou isoflavonů zabývá ve spoustě dalších studií. V této z roku 2003 [48] i dalších, do kterých jsem měla možnost nahlédnout, jsou výsledky podobné. Izotop genisteinu dosahoval vyšší koncentrace v séru než izotop daidzeinu při stejné dávce [48]. Setchellova studie z roku 2001 [34] stejný výsledek uvádí i u přirozeně se vyskytujících látek daidzeinu a genisteinu. Celková biologická dostupnost genisteinu jako AUC (plocha pod křivkou) je vyšší (AUC = 4,54  $\mu\text{g/ml.h}$ ) než je tomu u daidzeinu (AUC = 2,94  $\mu\text{g/ml.h}$ ) [34].

Tyto údaje jsou relevantní pro zdravé jedince. U těch s renálním onemocněním jsou výsledky odlišné, což je jakýmsi důkazem toho, že na eliminaci těchto látek z organismu se z velké části podílejí právě ledviny [48]. Exkrece stolicí oproti tomu tvoří pouze minoritní cestu eliminace isoflavonů [21, 48]. Více informací o exkreci těchto látek je uvedeno v kapitole 4.4.

Studie provedené za pomoci přirozeně se vyskytujících isoflavonů uvádí velmi podobné hodnoty času dosažení maximálních koncentrací daidzeinu a genisteinu, které se pohybují kolem  $6,9 \pm 0,7$  hod pro daidzein a  $6,5 \pm 1,0$  hod pro genistein po požití těchto látek. Podle toho vědci usuzují, že absorpce isoflavonů se odehrává po celé délce tenkého střeva a také ve střevě tlustém, v daleko menší míře se absorbují ze žaludku. U testovaných subjektů docházelo k nepatrnému poklesu koncentrace, po kterém následoval opětovný nárůst, což pravděpodobně značí enterohepatální cirkulaci [34, 56].



Obrázek 10 – Závislost koncentrace daidzeinu a genisteinu v séru na čase, převzato a přeloženo z [56].

Dá se říct, že se v různých studiích objevují velmi podobné výsledky a hodnoty farmakokinetických parametrů. Následující odstavce se věnují jejich shrnutí podle Setchella et al., která byla prováděna na ženách před menopauzou, z nichž všechny byly starší 18 let [34].

Po jednorázovém perorálním podání 50 mg daidzeinu v podobě aglykonu rychle vzrostla jeho koncentrace v plazmě, která se asi po dvou hodinách nepatrně snížila a následoval druhý vzrůst až hladina daidzeinu dosáhla maximální plazmatické koncentrace ( $c_{max}$ ) v čase ( $t_{max}$ )  $6,6 \pm 1,36$  hod. Maximální plazmatická koncentrace v tomto čase dosáhla  $194 \pm 30,6$  ng/ml ( $0,76 \pm 0,12$   $\mu$ mol/l). Eliminační poločas se pohyboval kolem hodnot  $9,34 \pm 1,3$  hod,  $AUC = 2,94$   $\mu$ g/ml.h a průměrná plazmatická clearance  $17,5 \pm 1,4$  l/hod. Daidzein se v plazmě vyskytoval převážně v konjugované podobě a na to, že byl podán v podobě aglykonu, podíl formy nekonjugované byl relativně nízký [34].

U genisteinu je průběh velmi podobný. Byl také podán jednorázově v dávce 50 mg. Prvním rozdílem je méně patrný pokles v absorpční fázi, než tomu bylo u daidzeinu. Maximální koncentrace dosáhl průměrně v čase  $9,33 \pm 1,33$  hod a dosáhl vyšší  $c_{max}$ , než daidzein –  $341 \pm 74$  ng/ml ( $1,26 \pm 0,27$   $\mu$ mol/l). AUC, jak je již zmíněno výše, je tím

pádem také vyšší. Eliminační poločas se pohybuje v průměrně kolem  $6,78 \pm 0,84$  hod a clearance  $18,3 \pm 5,7$  l/hod. Jak již bylo zmíněno u daidzeinu, podíl nekonjugované frakce v plazmě byl také nízký oproti většinové formě konjugované [34].

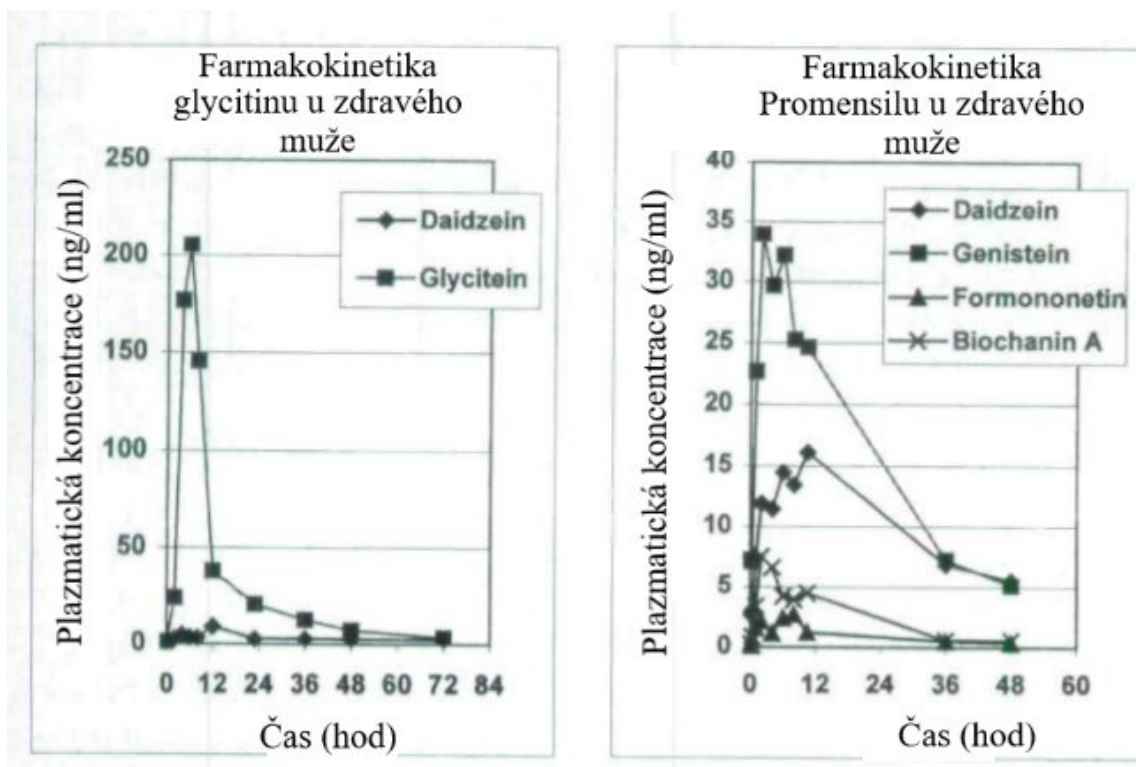
Tato studie také studovala farmakokinetiku isoflavonů v podobě glykosidů – daidzinu a genistinu, které byly rovněž perorálně podávány. U daidzinu byl průběh po podání velmi podobný jako u aglykonu, ale čas potřebný pro dosažení maximální koncentrace byl o několik hodin delší – kolem 9,0 hodin. U genistinu byl čas potřebný pro dosažení maximální koncentrace stejný jako aglykonu, a to 9,3 hodin. U daidzinu byla maximální dosažená koncentrace vyšší než u aglykonu, dosáhla průměrně 394 ng/ml a u genistinu 341 ng/ml, což je hodnota totožná s aglykonem. Poločasy eliminace byly u obou glykosidů delší, než u aglykonů [34].

Velmi důležitým metabolitem daidzeinu je equol, který vzniká působením střevních bakterií. U testovaných subjektů, kterým byl podán genistein nebo genistin logicky nebyly koncentrace equolu detekovány v signifikantních množstvích. Mezi podáním daidzeinu a okamžikem, kdy se objeví equol v plazmě je zpoždění asi 6 až 8 hodin. Toto zjištění koresponduje s faktem, že equol vzniká působením bakterií v distálních částech trávicího traktu.

Dalšími isoflavony jsou glycitin, biochanin A a formononetin. Farmakokinetika glycitinu (7,4"-dihydroxy-6-methoxyisoflavon-7-D-glykosid) byla rovněž popsána ve stejné studii. Glycitein se objevil v plazmě velmi rychle po podání 25 mg jeho  $\beta$ -glykosidu. Maximální koncentrace byla dosažena po 4 hodinách po perorálním podání. Následoval pokles koncentrace a zjištěný eliminační poločas  $t_{1/2}$  dosáhl 8,9 hodin a clearance  $Cl = 32,1$  L/h a  $AUC = 0,7$   $\mu\text{g}/(\text{ml}\cdot\text{hod})$ . Distribuční objem ( $V_d$ ) dosáhl relativně vysoké hodnoty 415 L. Po podání glycitinu došlo k velmi mírnému nárůstu koncentrace daidzeinu v plazmě. Z plazmatického profilu bylo ale patrné, že demethoxylace glyciteinu na daidzein je pouze minoritní biotransformační cestou. Hlavní přeměnou zůstává deglykosylace glycitinu na glycitein [34].

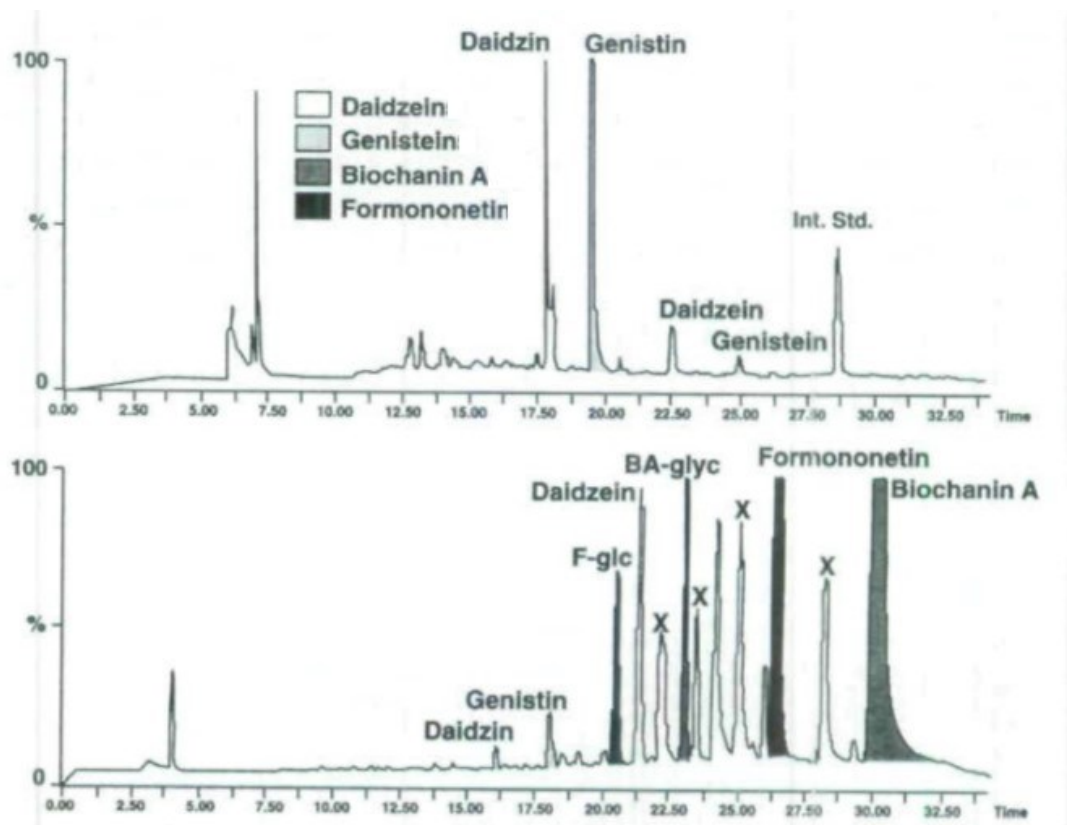
Významným zdrojem isoflavonů formononetinu a biochaninu A je jetel. Setchell se svými spolupracovníky podal stejnému subjektu, kterému byl předtím podán glycitin, doplněk stravy Promensil. Promensil byl podroben vysokoúčinné kapalinové chromatografii, pomocí které bylo zjištěno, že formononetin a biochanin A se v něm

vyskytují převážně ve formě aglykonů, menší část tvoří glykosidy těchto methoxylovaných isoflavonů a také daidzein a genistein. Podání jedné tablety Promensilu vedlo k rychlému nárůstu plazmatické koncentrace daidzeinu a genisteinu a staly se majoritními isoflavony vyskytujícími se v plazmě a tvořily více než 95 % naměřeného celkového množství isoflavonů v plazmě. Koncentrace formononetinu a biochaninu A se také mírně zvýšila, ale je zřejmé, že pouze malá část těchto methoxylovaných isoflavonů přežije demethylaci ve střevěch [34].



Obrázek 11 – Plazmatické koncentrace v závislosti na čase pro látky genistein, daidzein, glycitein, formononetin a biochanin A po jednorázovém podání 25 mg glycitolu (vlevo) a 40 mg Promensilu (vpravo) stejnému dospělému zdravému muži. Převzato a upraveno podle [34].

Ve studiích nebyly zjištěny žádné signifikantní rozdíly v biodostupnosti genisteinu a daidzeinu mezi muži a ženami, ani věk nehrál významnou roli a roli nehraje ani to, zda je žena před nebo po menopauze [56, 57].



Obrázek 12 – HPLC chromatogram popisující složení dvou odlišných doplňků stravy obsahující isoflavony – jeden ze sóji (nahore) a druhý z jetele (dole). Převzato a upraveno podle [34].

## 4.2 Distribuce

Když se látky absorbují z místa podání do centrálního oběhu, musí se dostat na místo svého účinku. To se děje při fázi farmakokinetiky, kterou je distribuce [20].

Isoflavonoidy jsou po absorpci rychle distribuovány do tkání po celém těle. Studie potvrzují, že pronikají jak placentou, tak hematoencefalickou bariérou a dostávají se i do mateřského mléka [21].

### 4.2.1 Isoflavony

Distribuční objem ( $V_d$ ) daidzeinu je o něco vyšší než je tomu u genisteinu. Již výše zmíněná studie Setchella et al. z roku 2003 se věnovala biodostupnosti radioaktivně značených isoflavonů genisteinu a daidzeinu. Z této studie vyplývá, že  $V_d$  [ $^{13}\text{C}$ ] daidzeinu byl 336,25 l, clearance 30,09 l/hod a eliminační poločas 7,75 hod. Co se [ $^{13}\text{C}$ ] genisteinu

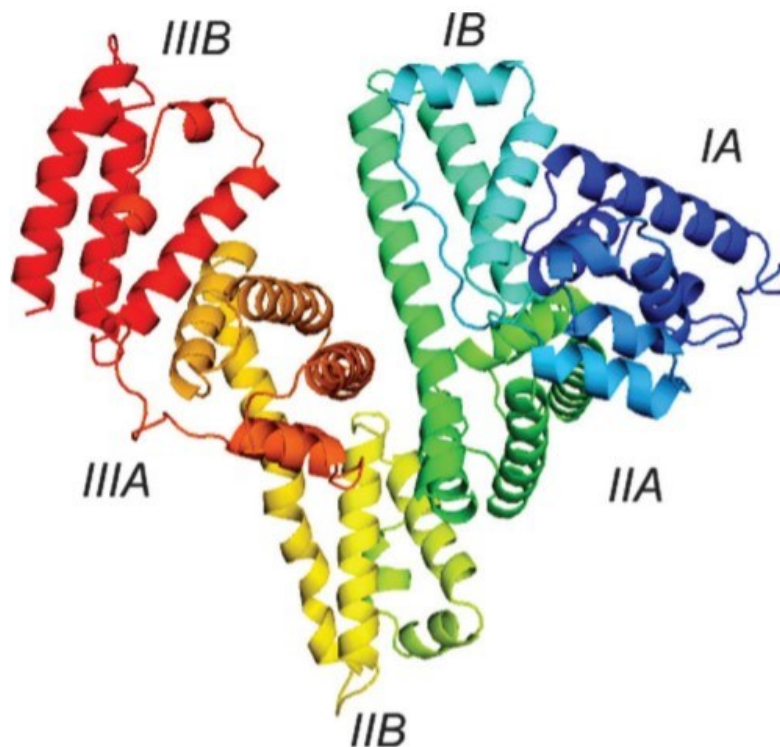
týče, hodnoty byly  $V_d = 258,76$  l, clearance = 21,85 l/hod a  $T_{1/2} = 7,77$  hod [47,48]. U nativních isoflavonů distribuční objem u daidzeinu dosahoval hodnot kolem  $236,4 \pm 35,9$  l a u genisteinu byl opět o něco nižší  $161,1 \pm 44,1$  l [34]. Ostatní farmakokinetické parametry nativních isoflavonů jsou uvedeny v kapitole 4.2 o absorpci.

Co se týče distribuce, nelze vynechat vazbu na plazmatické bílkoviny. Tato vazba představuje depo, které snižuje intenzitu, zpomaluje eliminaci a prodlužuje účinek léčiv a dalších látek podávaných do lidského organismu. Nejvýznamnější plazmatickou bílkovinou je lidský sérový albumin. Vazba léčiv na bílkoviny je rychlá a reverzibilní.

Lidský sérový albumin (HSA – human serum albumin) je nejhojněji se vyskytující protein v plasmě. V krvi dosahuje koncentrace  $7 \times 10^{-4}$  M. Tvoří depo a přenašeč pro mnohé látky jak endogenního, tak exogenního původu a ovlivňuje farmakokinetiku řady léčiv. Mimo to také vykazuje antioxidační aktivitu a také aktivitu (pseudo)enzymatickou. Stejně jako ostatní proteiny je syntetizován v játrech rychlostí skoro 0,7 mg/h na gram jater, což je asi 10 až 15 g za den. Je to jediný neglykosylovaný globulární protein v plazmě, který se skládá z 585 aminokyselin. Má tři homologní domény označené I, II a III a každá doména se skládá ze svou odlišných subdomén označených A a B. Subdomény mají helikální strukturu a jsou značně propojeny pomocí 17 disulfidových můstků (viz Obrázek 13) [59, 60, 61].

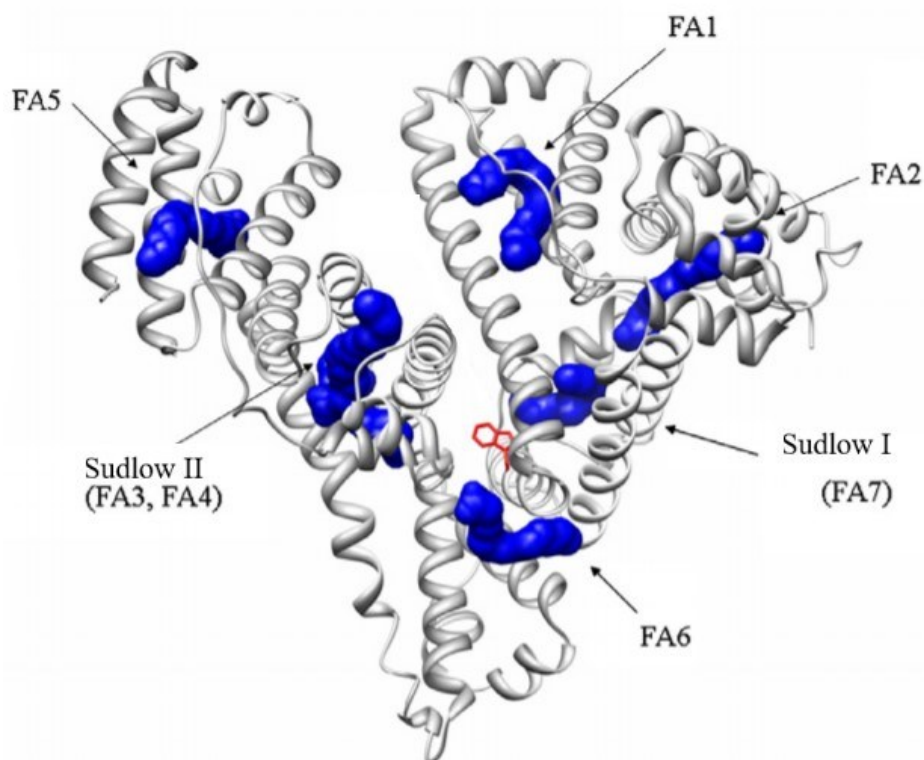
Struktura HSA umožňuje několik různých možností, jak se na něj ligand může vázat. Má 7 vazebných míst pro chemicky různorodé látky včetně mastných kyselin, proto jsou tato místa pojmenována FA1 – FA7 (z anglického fatty acids). Hlavně FA3 a FA4 tvoří takzvané místo Sudlow II umístěné v subdoméně IIIA, které rozpoznává hlavně aromatické karboxyláty. FA7 pak představuje místo Sudlow I, které váže zejména heterocyklické anionty (viz Obrázek 14) [59].

Důležitým poznatkem, co se týče vazby sloučenin na HSA je ten, že se zvyšující se afinitou a pevností vazby HSA-ligand se zvyšuje také poločas a stabilita daného ligandu. Například po podání 50 mg polyfenolických sloučenin v podobě jejich aglykonů je eliminační poločas katechinů a flavanonů je 2-3 hodiny, u isoflavonů je to kolem 5-8 hodin a u flavonolů 18-20 hodin. Zajímavé je, že toto zjištění jde ruku v ruce s rostoucí afinitou k HSA [60, 61].

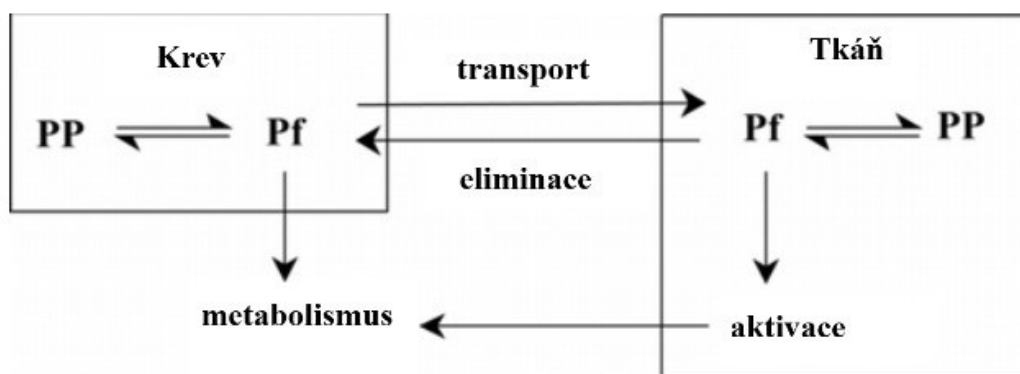


Obrázek 13 – Molekulový model lidského sérového albuminu [60].

Polyfenolické sloučeniny obecně mají několik vlastností které velmi ovlivňují jejich vazbu na plazmatické bílkoviny, a těm se bude věnovat tento odstavec. Jedna nebo více hydroxylových skupin v kruhu B v molekule flavonoidů zvyšuje afinitu molekul k proteinům plasmy. Naproti tomu hydroxylová skupina navázaná na kruhu C afinitu snižuje. Nenasycená vazba mezi uhlíky číslo 2 a 3 v konjugaci s karbonylovou skupinou na uhlíku 4, která je charakteristická pro flavonoly, zvyšuje afinitu k proteinům. Glykosylace flavonoidů může afinitu snižovat o 1 až 3 řády, a to v závislosti na místě připojení a povaze cukerné složky. Methylace hydroxylových skupin flavonoidů zvyšuje afinitu k proteinům přibližně 2 až 16krát. Katechiny, na něž je navázaná kyselina gallová mají afinitu vyšší než ty bez ní [62].



Obrázek 14 – Molekulový model HSA s vyznačenými vazebnými místy pro ligandy FA1 – FA7 (označeny modře). Uproveno podle [59].



Obrázek 15 – Schéma vazby polyfenolů na plazmatické bílkoviny. Přes membrány mohou prostupovat a k účinku jsou dostupné pouze volné polyfenoly (Pf), PP – polyfenol navázaný na plazmatickou bílkovinu. Převzaté a upravené podle [62].

V dnešní době není dostatečné množství informací o tom, jakým způsobem je HSA rozpoznán flavonoidy a jejich metabolity. Vazba isoflavonoidů na HSA byla



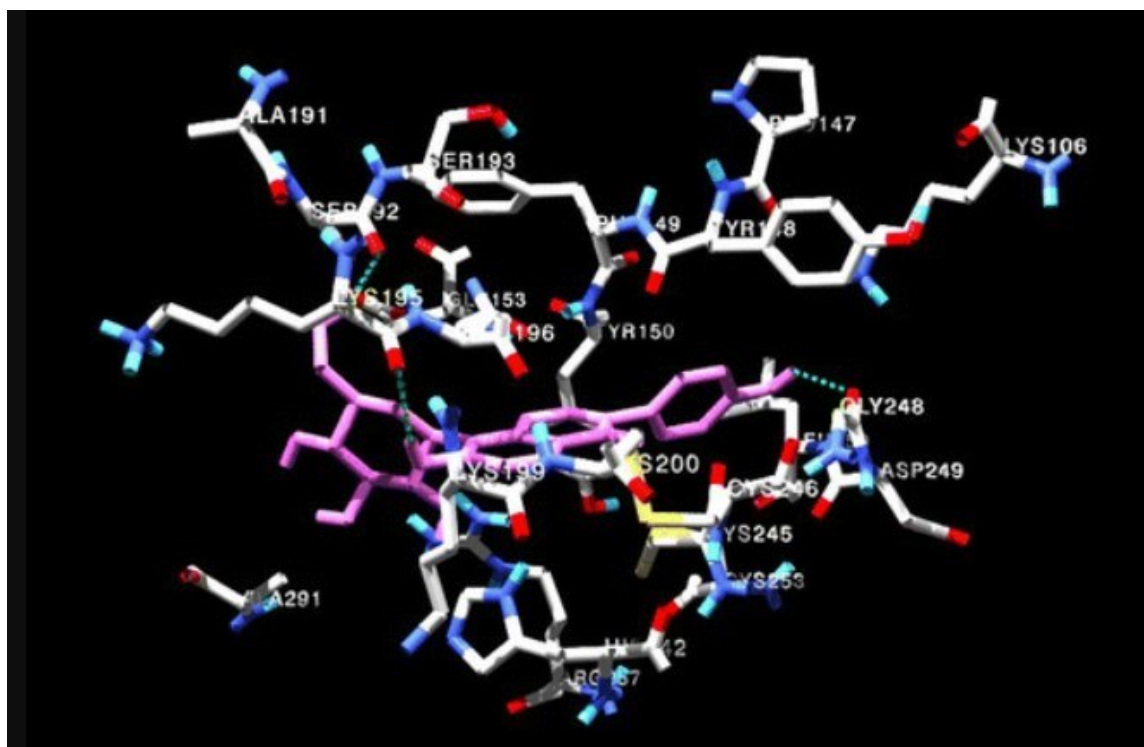
zkoumána pomocí automatizovaného molekulového dokování a rovnovážné konstanty vazby isoflavonoidů na místo Sudlow II (FA7) byly stanoveny za a bez přítomnosti oleátu. Oleát totiž allostericky inhibuje vazbu flavonoidů na HSA, což znamená, že přítomnost mastných kyselin může hrát významnou roli při vazbě ligandů na lidský sérový albumin [59].

Výsledky studie Mahesha et. al z roku 2006, která se zabývá vazbou isoflavonů na lidský sérový albumin, ukazují, že rovnovážné konstanty vazby genisteinu a daidzeinu na HSA jsou  $1,5 \pm 0,2 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$  respektive  $1,4 \pm 0,2 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ . Vazba všech isoflavonů na HSA má podobný charakter. Substituent v poloze 5 aromatického kruhu A v molekule isoflavonů nejspíš nehraje ve vazbě na HSA významnou roli. Kruh B je však bohatší na elektrony, a proto je citlivější k ionizaci při fyziologickém pH [63].

Li et al. (2008) popsali vazbu isoflavonu puerarinu k HSA pomocí fluorescenčních studií. Po přidání puerarinu k lidskému sérovému albuminu došlo k potlačení intenzity fluorescence HSA. Po navázání puerarinu na HSA byly pozorovány malé konformační změny v molekule albuminu. Termodynamické parametry prokazují, že ve vazbě puerarinu na HSA hrají roli jak vodíkové vazby, tak i hydrofobní interakce [65].

Metodou molekulového dokování bylo zjištěno, že puerarin i ostatní isoflavony se na HSA váží na vazebné místo Sudlow I, které se nachází v subdoméně IIA. Na Obrázku 16 je pomocí programu AutoDock 3.05 zobrazena možná vazba puerarinu na HSA. Molekula puerarinu je navázána v kavitě tvořené lysinem (Lys) 106, Tyr 150, Lys 195, His 242 a argininem (Arg) 257. Kruh B je lokalizován ve vysoce hydrofobní štěrbině tvořené Tyr 150, Tyr 148, Tyr 149, z čehož vyplývá, že mezi těmito fenylovými kruhy jsou přítomny hydrofobní interakce. Kruhy A a C se připojily do méně hydrofobních dutin a glykosyl k ústí vazebného místa. Hydroxylové skupiny v polohách 4' a 7 vytvořily vodíkové vazby s karbonylovým kyslíkem glycinu 248 a Lys 195. Další vodíková vazba vznikla mezi hydroxylem glykosylu a karbonylovým kyslíkem serinu 192. K vytvoření dalších vodíkových vazeb pravděpodobně přispívají také přítomné molekuly vody. V blízkosti puerarinu se též nahromadilo množství bazických zbytků jako například Lys 106, Lys 199, Lys 195, Arg 257 and His 242, což naznačuje fakt, že na vazbě se podílí také elektrostatické síly. Termodynamickou analýzou se zjistilo, že vazebný proces je poháněn spíše vodíkovými vazbami a

elektrostatickými silami než hydrofobními interakcemi. To může být vysvětleno tím, že glykosyl zvyšuje celkovou hydrofilitu molekuly puerarinu a oslabuje hydrofobní interakce. Jak je již zmíněno výše, glykosyl snižuje afinitu a pevnost vazby flavonoidů k HSA. To potvrdily i studie porovnávající vazbu daidzeinu a puerarinu na albumin. Daidzein má k HSA vyšší vazebnou afinitu než puerarin a rozdíl mezi těmito molekulami je v přítomnosti glykosylu v pozici 8 puerarinu [66].



Obrázek 16 – Model vazby puerarinu na lidský sérový albumin. Popis v textu. Převzato z [66].

Dalším významným isoflavonem je formononetin, který má na rozdíl od daidzeinu v pozici 4' na kruhu B methoxylovou skupinu místo hydroxylové. Na HSA se váže s vysokou afinitou, což naznačuje, že methoxylová skupina nebrání stericky této vazbě [64].

### 4.3 Metabolismus

Metabolismus je další částí farmakokinetiky, kdy dochází chemické přeměně molekuly podané látky. V průběhu metabolismu se léčivo obvykle stává polárnějším, aby mohlo být následně vyloučeno z organismu ve fázi exkrece. Metabolismus má dvě fáze, v první fázi dochází k zavedení polárních skupin do molekuly, a to například hydroxylací,

oxidací, redukcí nebo dealkylací. Fáze druhá je konjugační, kdy obecně dochází ke glukuronidaci, sulfataci, N-acetylaci, metylaci, konjugaci s glutathionem nebo aminokyselinami [20].

Jak už je zmíněno v obecné části, isoflavonoidy jsou látky podobné endogenním estrogenům. Jejich metabolismus je proto podobný metabolismu těchto hormonů. Přebíhá u nich tak jako u estrogenních hormonů druhá fáze metabolismu (konjugace) nad fází první [21].

Isoflavonoidy jsou v podobě aglykonů absorbovány z trávicího traktu, rychle podléhají buď sulfataci nebo konjugaci s kyselinou glukuronovou. Pouze 1-3 % isoflavonoidů v podobě aglykonů se dostane do systémové cirkulace [21, 49].

Hlavními enzymy, které se podílejí na metabolismu těchto aglykonů, jsou UDP-glukuronyltransferáza (UGT) a sulfotransferáza (SULT). Asi 70-90 % isoflavonů je metabolizováno pomocí těchto enzymů za vzniku glukuronidů a sulfátů [69]. Tyto reakce se odehrávají hlavně ve střevních mikrozomech, kdy dochází ke kompetici s absorpcí. Podle některých studií se ale zapojují také jaterní isoformy těchto enzymů. Z tohoto vyplývá, že first-pass efekt je vysoký, a to hlavně u isoflavonů jako jsou genistein a daidzein, které jsou nejvíce prozkoumány. Studie uvádějí, že až 90 % přijaté dávky se neabsorbují do systémové cirkulace, podlehne first-pass efektu a dojde k exkreci [50, 51, 52].

Podíl UGT na metabolismu isoflavonoidů je podle všeho vyšší. Koncentrace konjugátů s kyselinou glukuronovou jsou vyšší, než je tomu u sulfatovaných konjugátů. Existuje několik isoform UGT, které jsou rozmístěny po organismu. Nacházejí se hlavně ve střevech, játrech a ledvinách. Isoforma UGT1A1 se nachází ve všech těchto orgánech, ale její exprese v játrech je nejspíš mnohem větší, než je tomu u ostatních. UGT1A9 je přítomna pouze v játrech, kdežto UGT1A8 a UGT1A10 hlavně v tenkém střevě [21]. U isoflavonoidů dochází ke glukuronidaci a sulfataci hlavně v polohách 4 a 7' za vzniku buď monokonjugátů (např. genistein-7-glukuronid, genistein-4'-glukuronid, genistein-7-sulfát, genistein-4'-sulfát) nebo dikonjugátů (např. genistein-7-glukuronid-4'-glukuronid, genistein-7-sulfát-4'-sulfát, genistein-7-glukuronid-4'-sulfát, genistein-7-sulfát-4'-glukuronid) [21, 69].

U genisteinu a daidzeinu dochází ke glukuronidaci v polohách číslo 4 a 7', tuto reakci katalyzuje právě výše zmíněný enzym UDP-glukuronyltransferáza. Zjistilo se, že hlavně isoformy UGT 1A1, 1A8, 1A9 a 1A10 jsou zodpovědné za glukuronidaci látek jako jsou daidzein, genistein, glycitein, biochanin A, prunetin a formononetin [21, 50, 51, 52].

K sulfataci isoflavonoidů dochází za katalýzy enzymem sulfotransferáza (SULT). Tento enzym se stejně jako UGT vyskytuje v několika isoformách a je přítomen ve střevě a játrech. Nejdůležitějšími isoformami enzymu sulfotransferáza jsou SULT 1A1\*2, 1E a 2A1. Zdá se, že isoformy SULT1A1 a SULT1E1 jsou důležitými při regioselektivních mono- a disulfatačních reakcích isoflavonů [21, 50].

Isoflavonoidy podléhají také první fázi metabolismu, ale ve výrazně menší míře, než je tomu u konjugačních reakcí. Hlavními reakcemi jsou ty hydroxylační, které probíhají v játrech [21, 53]. I. fáze metabolismu tudíž není primární cestou metabolismu těchto látek. Oxidační metabolity z první fáze isoflavonů byly pozorovány v moči zdravých dobrovolníků u genisteinu, daidzeinu i formononetinu. Pomocí lidských jaterních mikrosomů bylo zjištěno, že za oxidaci isoflavonů jsou zodpovědné enzymy cytochromu P450. Další pozorovanou reakcí hlavně u biochaninu A a formononetinu je demethylace, kdy *in vitro* inkubace těchto látek s mikrosomálními enzymy vedla ke vzniku genisteinu a daidzeinu [69].

Isoflavonoidy, které podlehnou glukuronidaci v játrech, jsou vylučovány do žluči. V horní části tenkého střeva jsou tyto konjugáty rozloženy bakteriální mikroflórou produkující mikrobiální  $\beta$ -glukuronidázy a znovu vstřebány. Tento děj se nazývá enterohepatální cirkulace a výrazně prodlužuje poločas látek, které mu podléhají. Enterohepatální cirkulaci podléhají také endogenní estrogeny [54, 55].

Důležité je zmínit se také o roli efluxních transportérů jako jsou MRPs (multidrug resistance proteins) a BCRPs (breast cancer resistance proteins), které patří do rodiny ABC transportérů (z anglického ATP-binding cassette). Tyto transportní proteiny hrají svou roli při enterohepatální cirkulaci isoflavonoidů a mohou být předmětem genových polymorfismů. Studie z roku 2012, která byla provedena na myších, ukázala, že myši, které postrádají BCRP vykazují významně nižší vylučování konjugátů isoflavonoidů, než je tomu u myši konvenčních s BCRP [68]. A podobná studie, ve které byly testovány

subjekty myši s deficiencí MRP-2, prokázala vyšší plazmatické koncentrace genisteinu a daidzeinu po perorálním podání, a to díky snížené biliární exkreci [67]. Z provedených studií vyplývá, že interindividuální rozdíly v přítomnosti efluxních transportérů mohou významně ovlivnit farmakokinetiku isoflavonoidů přijímaných ve stravě [21, 67, 68].

#### 4.3.1 Metabolismus genisteinu, daidzeinu a produkce equolu

V této podkapitole bych se chtěla opět zaměřit na genistein a daidzein, tentokrát půjde o jejich metabolismus.

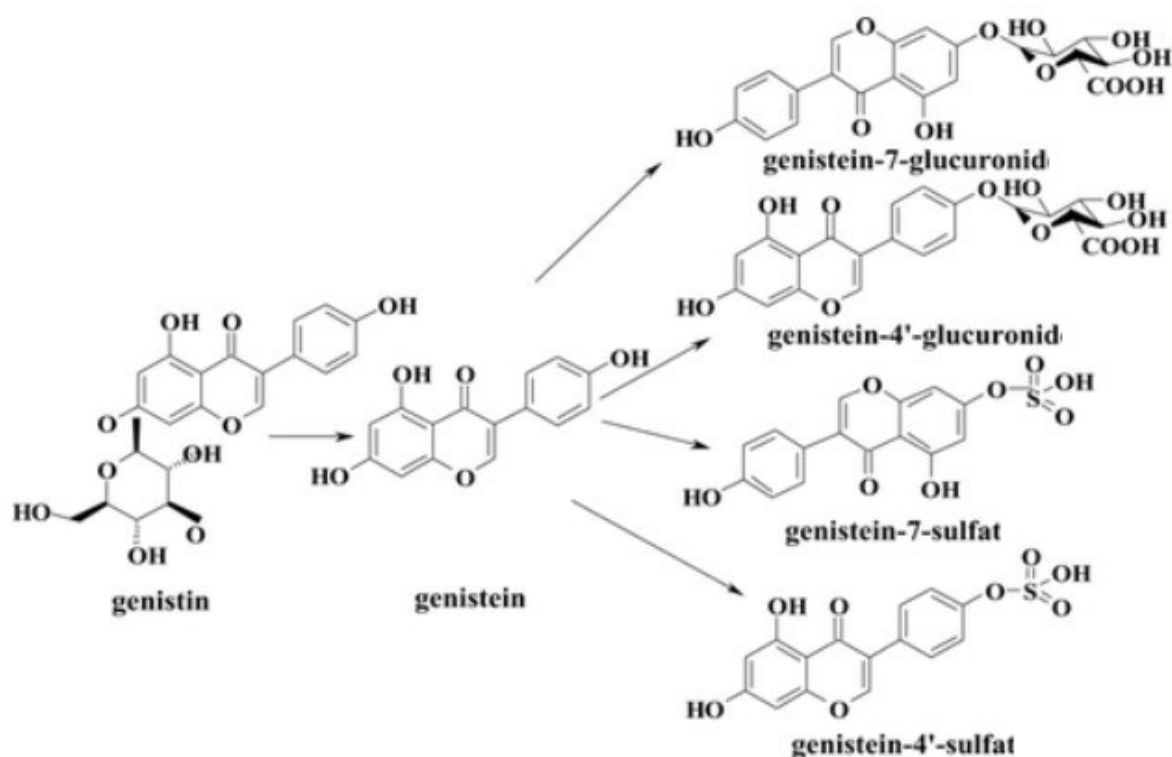
Po tom, co glykosidy daidzin a genistin podlehnou hydrolytické reakci za vzniku aglykonu, dojde k jejich vstřebání ve střevě nebo podléhají další přeměně pomocí střevní mikroflóry [35].

Co se týče genisteinu, ten podléhá činností bakteriální mikroflóry přeměně na *p*-ethylfenol a 4-hydroxyfenyl-2-propionovou kyselinu. Oproti tomu u daidzeinu dochází k redukční reakci za vzniku *o*-desmethylangolensinu (*O*-DMA) a equolu (viz Obr. 17, 18) a ty jsou následně absorbovány prostřednictvím pasivní difuze do centrálního oběhu. Byly objeveny ale také další metabolity daidzeinu jako jsou například tetrahydrodaidzein, 3-(4-hydroxyfenyl)-benzopyran-4,7-diol a 2-dihydro-*O*-DMA [21, 33]. Co se týče informací o jednotlivých metabolitech, tak studie se věnují hlavně equolu, a to hlavně kvůli jeho biologické aktivitě podobné estrogenním hormonům, ten je předmětem následující podkapitoly 4.3.1.1. Jelikož u *O*-DMA zatím biologická aktivita nebyla prokázána, nevěnuje se mu tolik pozornosti.

V posledních letech se vědci ve studiích zabývali bakteriemi, které jsou zodpovědné za metabolismus daidzeinu a genisteinu ve střevech. V roce 2000 našel Hur *et al.* [44] při pozorování fekálních bakterií zdravého jedince kmen *E. Coli* – HGH21 a gram pozitivní bakteriální kmen - HGH6, které se podílejí na přeměně genistinu a daidzinu na aglykony genistein a daidzein. Obě tyto bakterie mají totiž betaglykosidázovou aktivitu. Za anaerobních podmínek kmen HGH6 také redukuje tyto dva isoflavony na dihydrodaidzein a dihydrogenistein. Také se zjistilo, že tato redukce vazby mezi uhlíky C2 a C3 v molekule daidzeinu a genisteinu je nejspíš selektivní pro isoflavony. Kmen HGH6 totiž tuto vazbu neredukuje u flavonoidů apigeninu a chrysinu [44]. Ve stejné studii se zjistilo, že i přesto, že dihydrodaidzein je prekurzorem equolu, tak při inkubaci kultur s touto látkou ať už přírodního nebo syntetického původu,

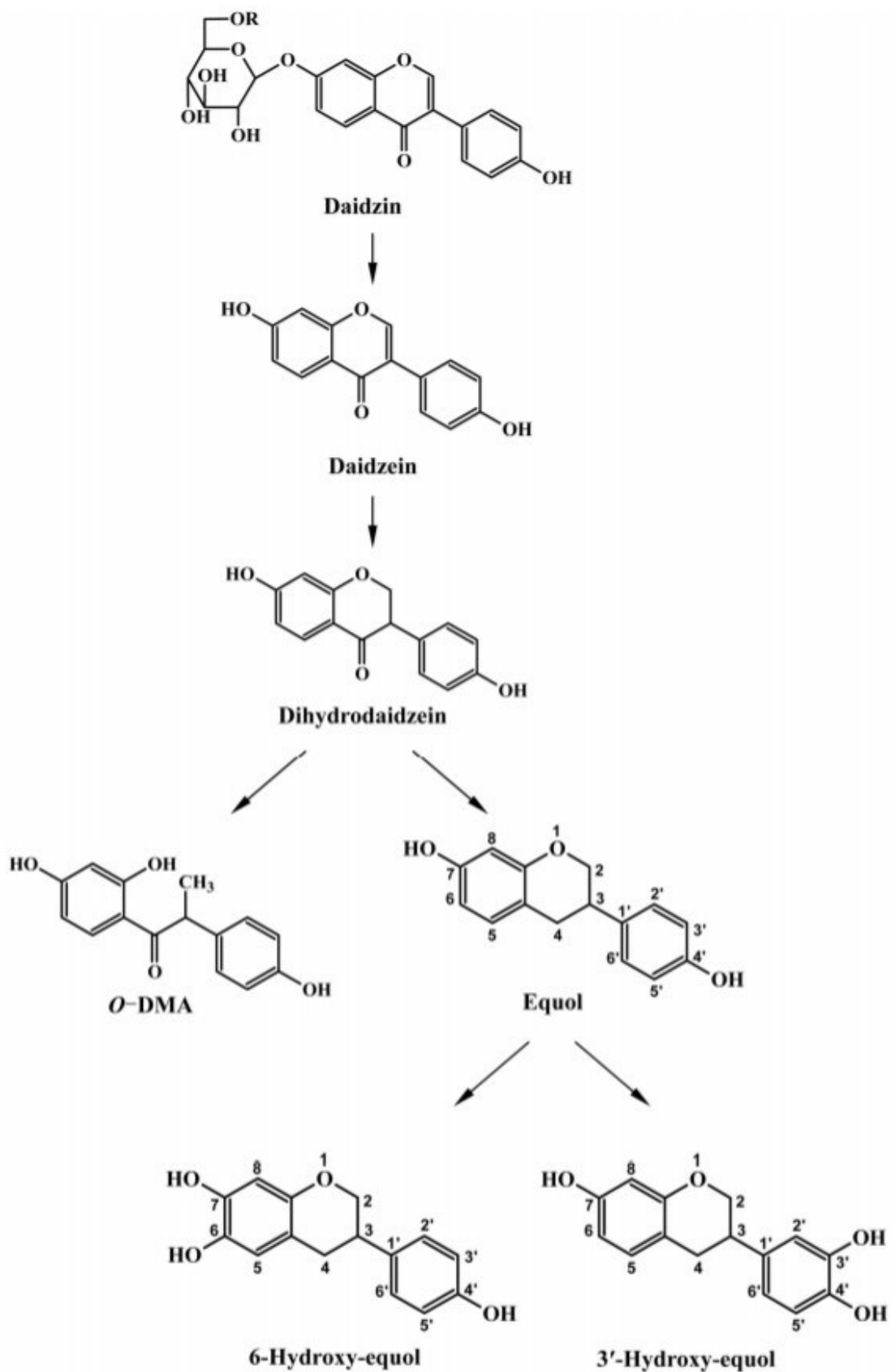
nevznikají žádné další metabolity. To ukazuje na fakt, že k produkci equolu jsou zapotřebí odlišné bakterie a enzymy [44].

Hur *et al.* [45] se tomuto tématu ale věnoval i dále a podařilo se mu při pozorování fekálních bakterií, které jsou zodpovědné za metabolizaci daidzeinu, izolovat anaerobní grampozitivní bakterii – HGH136. Tato bakterie štěpí v anaerobním prostředí kruh C daidzeinu za vzniku *O*-DMA. *O*-DMA kromě toho vzniká také při inkubaci synteticky získaného dihydrodaidzeinu s HGH136. Při inkubaci této bakterie s daidzeinem a dihydrodaidzeinem nebyla zjištěna přítomnost žádných jiných metabolitů: Tudíž ani tato bakterie nejspíš není zodpovědná za vznik equolu [44, 45]. Další informace o equolu a jeho produkci v lidském organismu jsou uvedeny dále v podkapitole 4.3.1.1.

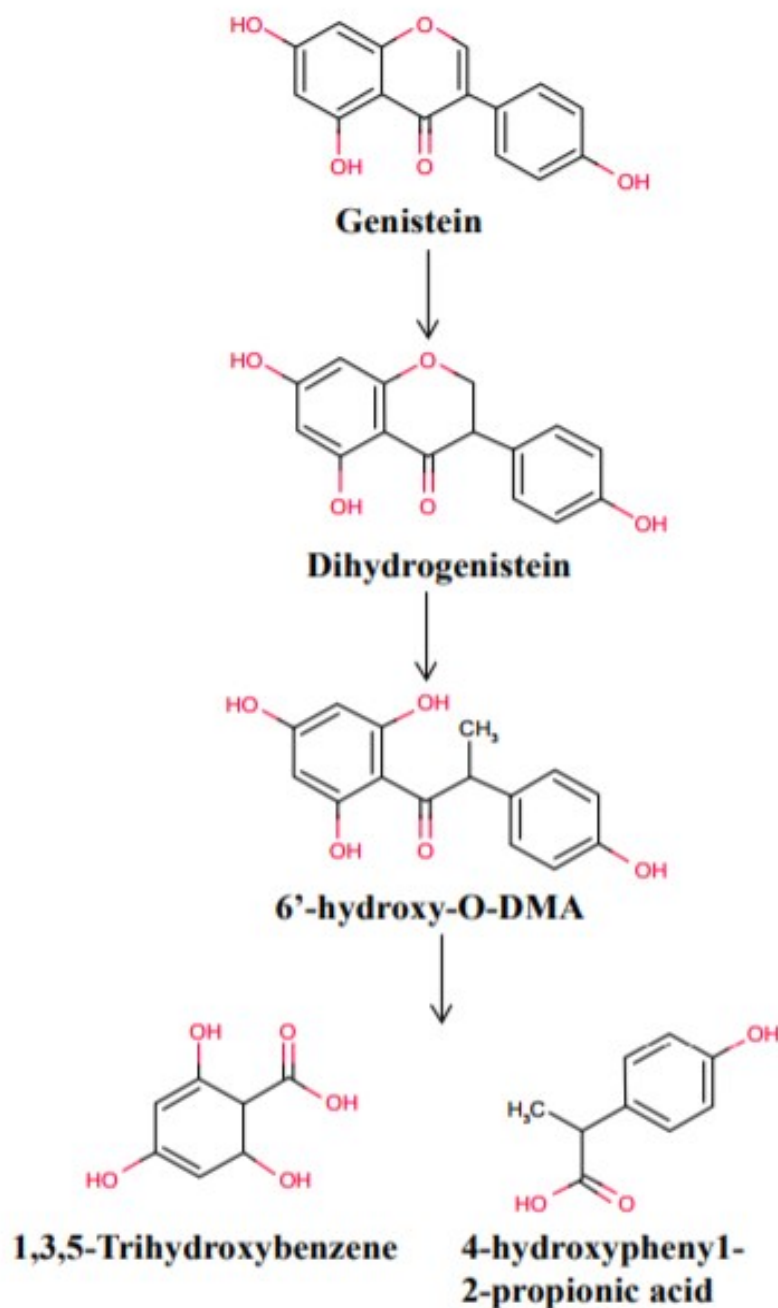


Obrázek 17 – Schéma konjugačních reakcí genisteinu – glukuronidace a sulfatace.

Převzato z [62] a upraveno.



Obrázek 18 – Schéma metabolismu daidzeinu. Převzato z [33].



Obrázek 19 – Schéma metabolismu genisteinu. Převzato z [21].

#### 4.3.1.1 Equol

Equol, chemicky [7-hydroxy-3-(4'-hydroxyphenyl)-chroman], je produktem metabolismu isoflavonu daidzeinu a jedná se o nesteroidní fytoestrogen, který se váže na estrogenní receptory. Poprvé byl izolován z moči koní v roce 1932 a o 50 let později i identifikován. Na jeho produkci se velmi významně podílí bakterie ve střevech určité skupiny lidí (tzv. producenti equolu) po podání potravy obsahující sóju. Právě sója je totiž největším zdrojem isoflavonů [36, 37].



Podle studií je absorpce equolu přes střevní stěnu efektivnější, než je tomu u daidzeinu. V plasmě se objevuje po přijetí potravy s obsahem daidzeinu jako enantiomer (S)-equol a zůstává v ní o něco delší dobu než daidzein a genistein. Koncentrace equolu v plasmě je v průběhu prvních 4 hodin po požití isoflavonů zanedbatelná a své maximum dosahuje asi po 24 hodinách. Po tomto časovém úseku se koncentrace equolu pomalu snižuje. Ještě 48 hodin po perorálním podání isoflavonů se ale koncentrace equolu v plasmě pohybuje nad bazálními hodnotami [33].

Několikanásobně vyšší koncentrace equolu byly pozorovány u lidí, kteří přijali isoflavony ve formě glykosidu než aglykonu [33]. To je nejspíš způsobeno tím, že daidzein jako aglykon je v této podobě vstřebán z tenkého střeva. Na rozdíl od aglykonu se glykosid nedostane přes stěnu tenkého střeva do enterocytů a pokračuje tak do distálních částí tenkého střeva a do střeva tlustého. Glykosid tudíž zůstává ve střevě delší dobu a tím pádem může podléhat jak přeměně prostřednictvím střevních bakterií, tak rozkladu pomocí intestinálních  $\beta$ -glukosidáz [33, 34, 35].

Několik studií prokázalo, že na tvorbě equolu mají obrovský podíl bakterie střevní mikroflóry. Studie potvrzují, že u zvířat bez bakteriální mikroflóry se po přijetí potravy obsahující sóju jako zdroj isoflavonu daidzeinu neobjevuje jeho metabolit equol v moči, rovněž ani u dětí, které ještě nemají vyvinutou střevní mikroflóru [37]. Další studie potvrzují také snížení produkce equolu při užívání některých antibiotik, která velmi zasahují do složení střevní mikroflóry [39, 40]. Produkce equolu střevními bakteriemi je stereoselektivní, kdy vzniká (S)-equol, nikoliv R-forma [41, 42].

Zjistilo se, že pouze 30 % západní populace má ve střevech přítomny bakterie, které metabolizují daidzein na equol. Z tohoto hlediska rozlišujeme lidi na producenty equolu a ty, kteří ho nevytváří. Mezi producenty se řadí hlavně asijská populace, jejichž potravu z velké části tvoří sója a produkty z ní vyrobené. Asi 50-60 % Asiátů patří mezi jedince schopné equol produkovat. Producenti equolu mohou ze sóji těžit více, jelikož se prokázalo, že equol má větší estrogení účinek než daidzein samotný. Navíc u jedinců, kteří equol neprodukují, je daidzein přeměněn na O-DMA a ten, jak už bylo zmíněno výše, tento účinek nemá [36, 37, 41, 42, 43].

Setchel et. al [33] uvádí, že jedince, u kterých je po podání potravy bohaté na sóju koncentrace equolu v plasmě pod 40 nmol/L (10  $\mu$ g/L) se označují jako „neproducenti“

equolu. Naopak ty, u kterých je tato koncentrace vyšší než 83 nmol/L (20 µg/L) můžeme považovat za jeho producenty. To, zda jedinec equol produkuje nebo nikoli můžeme zjistit i z jeho koncentrace v moči, kdy u producentů se pohybuje nad 1000 nmol/L. A ačkoliv je koncentrace v moči mezi lidmi velmi variabilní, lze pozorovat velký rozdíl mezi jedinci a rozdělit je tak na producenty a „neproducenty“. Mezi jedinci dosud nebyly pozorovány žádné rozdíly podle pohlaví [36, 43].

Jak je uvedeno výše, vědci objevili kmeny bakterií, které jsou zodpovědné pouze za přeměnu daidzeinu na dihydrodaidzein, zatímco další studie odhalují druhy bakterií, které metabolizují daidzein až na equol. Těchto druhů je spousta, přehledně viz Tabulka č. 1 [37]. Jedním z druhů bakterií, která se účastní přeměny daidzeinu na equol je *Lactococcus garvieae*, která se nachází v některých italských sýrech [46]. Isolována byla z lidské stolice, a právě díky ní byl vyroben úplně první doplněk stravy s obsahem (S)-equolu [37]. Zajímavé je, že v dnešní době se equol získává právě jako doplněk stravy určený pro ty jedince, kteří ho neumí sami syntetizovat, a to hlavně kvůli jeho silným biologickým účinkům a také tím, že je selektivní k β-estrogenním receptorům, čehož by se pravděpodobně dalo využít při léčbě hormon-dependentních onemocnění [58].

Co se týče dalšího metabolismu equolu, zdá se, že nepodléhá žádné další biotransformaci kromě fáze II. Dominantní cestou této druhé fáze je glukuronidace, ostatně jako je tomu i u genisteinu a daidzeinu, v menší míře potom sulfatace. Ke konjugaci nejspíš dochází již po první absorpci equolu přes enterocyty, což bylo zjištěno ve studii na potkanech z vysokých hladin equolu v portální krvi v roce 1981. Specifický enzym katalyzující glukuronidaci equolu není dosud znám, potvrzeno ale je, že nejde o UDP-glykuronyltransferázu 1A10, která katalyzuje tuto reakci u genisteinu [36].

Jak je zmíněno v předchozích odstavcích, jsou rozdíly v produkci equolu mezi jedinci v závislosti na složení intestinální mikroflóry. Tudíž jsou odlišné i koncentrace equolu v moči [36].

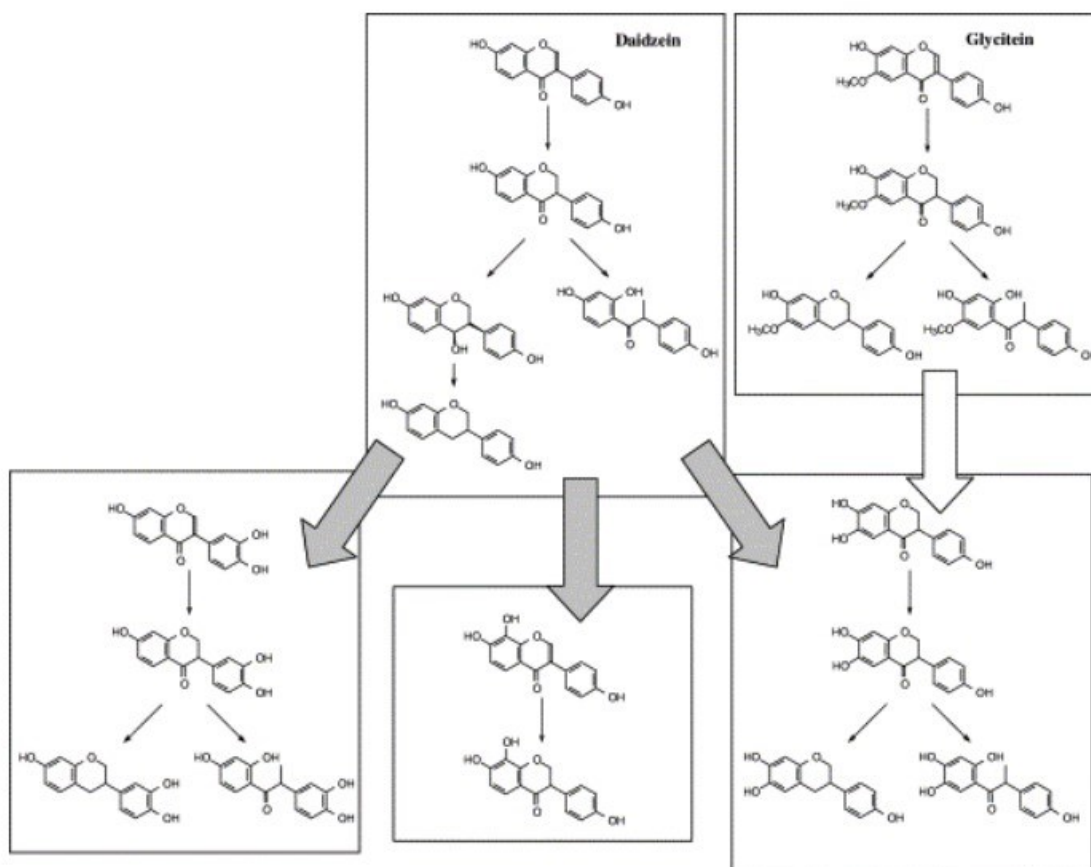
Bakteriální kmen	Zdroj	Reakce
<i>Adlercreutzia equolifaciens</i>	člověk	Daidzein → Equol
<i>Bacteroides ovatus</i>	člověk	Daidzein → Equol
<i>Bifidobacterium</i>	člověk	Daidzein → Equol
<i>Bifidobacterium animalis</i>	čistá	Daidzein → Equol
<i>Bifidobacterium</i> sp (22 kmenů)	člověk	Daidzin → Daidzein
<i>Clostridium</i> sp HGH6	skot	Daidzin → Dihydrodaidzein
<i>Clostridium-like bacterium</i>	člověk	Daidzin → Dihydrodaidzein
<i>Coriobacteriaceae</i> sp MT1B9	myš	Daidzein → Equol
<i>Coriobacteriaceae</i> sp MT1B9	myš	Genistein → 5-hydroxyequol
<i>Eggerthella</i> sp Julong 732	člověk	Dihydrodaidzein → Equol
<i>Eggerthella</i> sp Julong 732	člověk	Dihydrodaidzein → Equol
<i>Eggerthella</i> sp YY7918	člověk	Daidzein → Equol
<i>Enterococcus faecium</i>	člověk	Daidzein → Equol
<i>Escherichia coli</i> (HGH21 a HGH6)	člověk	Daidzin → Daidzein
<i>Eubacterium</i> sp D1 and D2	prase	Daidzein → Equol
<i>Fingoldia magna</i>	člověk	Daidzein → Equol
<i>Lactobacillus mucosae</i>	člověk	Daidzein → Equol
<i>Lactobacillus</i> sp Niu-O16	člověk	Daidzein → Equol
<i>Lactococcus garvieae</i> (Lc 20-92)	člověk	Daidzein → Equol
<i>Ruminococcus productus</i>	člověk	Daidzein → Equol
<i>Slackia</i> sp HE8	člověk	Daidzein → Equol
<i>Slackia</i> sp HE9	člověk	Genistein → 5-hydroxyequol
<i>Slackia equolifaciens</i> (Strain DZE)	člověk	Daidzein → Equol
Strain PUE	člověk	Puerarin → Daidzein

Tabulka 1 – Přehled bakterií střevní mikroflóry, jejich zdrojů a metabolických reakcí, za které jsou zodpovědné. Vytvořeno podle Setchell and Clerici (2010).

## 4.3.2 Metabolismus glyciteinu

Glycitein je dalším důležitým isoflavonem, který se nachází v sóji, a to zejména v sójových klíčcích, kde tvoří až 40 % isoflavonů. Studií o jeho farmakokinetice je k dispozici mnohem méně, než je tomu u známých látek daidzeinu a genisteinu [70].

Heinonena et al. roku 2003 [70] popsali předpokládané metabolity glyciteinu vzniklé působením bakteriální mikroflóry. Jsou jimi pravděpodobně dihydroglycitein, 6-methoxyequol, 5'-methoxy-*O*-desmethylangolensin (*O*-DMA), 6-hydroxydaidzein, 6-hydroxydihydrodaidzein (DHD), 6-hydroxyequol a 5'-hydroxy-*O*-DMA. Tyto metabolity mohou být ale rovněž produkovány z daidzeinu a to hydroxylací, redukcí a methylací.



Obrázek 20 – Předpokládané metabolické cesty daidzeinu a glyciteinu. Převzato z [70].

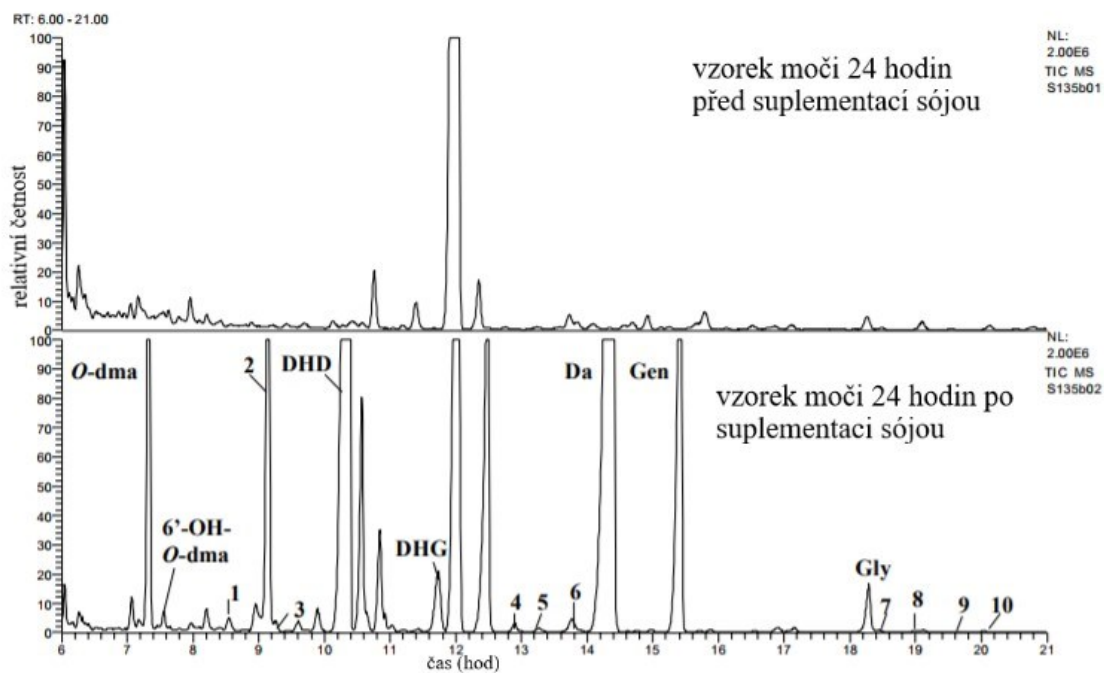
## 4.4 Exkrece

Poslední fází farmakokinetiky je exkrece látek z organismu. Exkrece může být renální, biliární nebo k ní dochází plícemi. Existují také její minoritní formy, což jsou exkrece slinami a potem nebo mateřským mlékem [20].

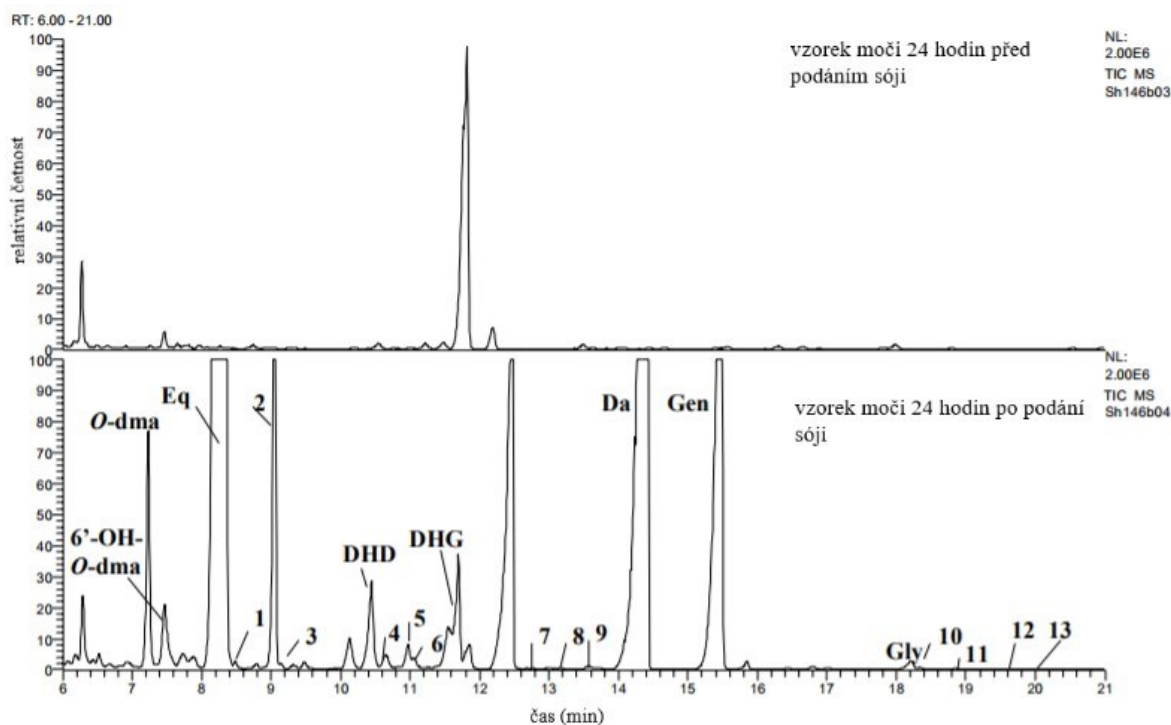
Podle studií je hlavní eliminační cestou isoflavonoidů exkrece renální. Její míra závisí na konkrétním isoflavonoidu. Například daidzein se močí vylučuje ve větší míře než genistein a glycitein. Největší část v moči tvoří konjugáty s kyselinou glukuronovou, méně pak sulfatované deriváty a aglykony [21].

Co se týče exkrece biliární, stolicí se vylučuje pouze malá část isoflavonoidů. Je to asi kolem 1 až 4 % a největší část tvoří isoflavonoidy v podobě aglykonu. Isoflavonoidy se nacházejí také v mateřském mléce, plodové vodě a v prostatě [21].

Isoflavony se v moči objevují již několik minut po perorálním podání. Při studiích se zjistilo, že po podání isoflavonů se u všech testovaných subjektů v moči vyskytují daidzein a genistein. Equol, konečný metabolit daidzeinu, pouze u jedinců, kteří jsou schopni ho produkovat (tzv. producenti equolu) – o produkci equolu z daidzeinu více v podkapitole 4.3.1.1. Nebyly pozorovány žádné signifikantní rozdíly v přítomnosti isoflavonů v moči mezi jedinci až na rozdíl mezi producenty a neproducenty equolu [70].



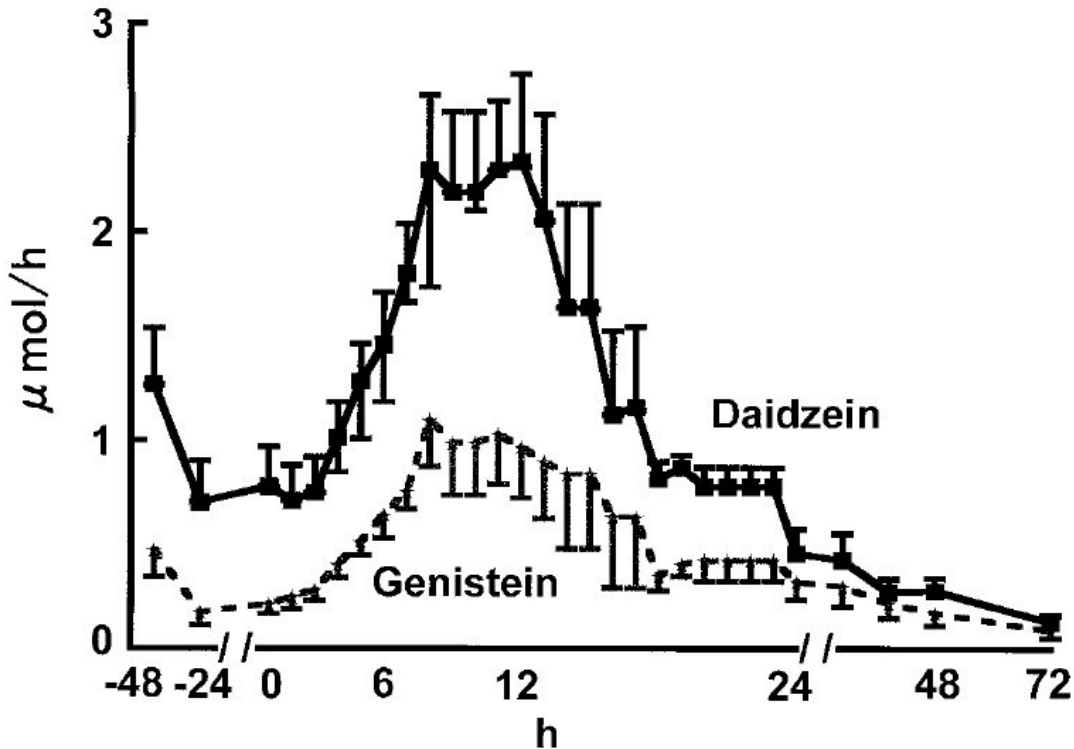
Obrázek 21 – Celkový iontový chromatogram vzorku moči jednoho testovaného subjektu před a po konzumaci sóji. Metabolity identifikované v močovém extraktu jsou: 5-OMe-O-DMA (1); 5-OH-O-DMA (2); 3-OH-O-DMA (3); 3,4,7-trihydroxyisoflavanon (4); 4,7,8-trihydroxyisoflavanon (5); 4,6,7-trihydroxyisoflavanon (6); 3,4,7-trihydroxyisoflavanon (7); 4,7,8-trihydroxyisoflavanon (8); 3,4,5,7-tetrahydroxyisoflavanon (9); and 4,6,7-trihydroxyisoflavanon (10). Převzato, přeloženo a upraveno podle [70].



Obrázek 22 – Celkový iontový chromatogram vzorku moči odebraného testovanému subjektu označovaného jako „producent equolu“ před a po suplementaci sójou. Identifikované metabolity jsou: 5-O-Me-O-DMA (1); 5-OH-O-DMA (2); 3-OH-O-DMA (3); 3-O-Me-equol (4); 6-O-Me-equol (5); 3,4,7-trihydroxyisoflavan (5); 3,4,7-trihydroxyisoflavanon (7); 4,7,8-trihydroxyisoflavanon (8); 4,6,7-trihydroxyisoflavanon (9); 3,4,7-trihydroxyisoflavanon (10); 4',7,8-trihydroxyisoflavone (11); 3',4',5,7-tetrahydroxyisoflavanon (12); 4',6,7-trihydroxyisoflavanon (13). Převzato, přeloženo a upraveno podle [70].

Farmakokinetiku isoflavonů popisuje také studie Watamabe et al. (1998), ve které byly zkoumány hladiny isoflavonů v plazmě, moči a stolici sedmi mužů po konzumaci 60 g pražené sójové mouky (tzv. kinako). Co se týče vzorků moči z této studie, exkrece daidzeinu a genisteinu dosáhla rovnovážné koncentrace v moči po 8 až 12 hodinách od podání kinaka. Vylučování genisteinu močí probíhalo paralelně s exkrecí daidzeinu, ale množství genisteinu v moči bylo přibližně poloviční oproti daidzeinu (viz Obrázek 22). Ten se v moči objevil již krátce po tom, co se zvýšila jeho koncentrace v plazmě. Exkrece daidzeinu dosáhla své střední hodnoty 2,4  $\mu\text{mol/hod}$  7 hodin po příjmu kinaka. Vylučování genisteinu močí bylo nejvyšší 8 hodin po suplementaci a dosáhlo hodnoty 1,2  $\mu\text{mol/hod}$ . V kumulativním vyjádření byla vyloučená dávka daidzeinu  $37,0 \pm 13,9$   $\mu\text{mol}$  a u genisteinu  $19,7 \pm 14,0$   $\mu\text{mol}$ . O-DMA se začalo vylučovat krátce po tom, co vylučování daidzeinu dosáhlo vrcholu a equol se v moči objevil pouze u některých

testovaných subjektů, producentů equolu. Jak je již zmíněno výše, equol se totiž z daidzeinu netvoří u každého jedince. Kumulativní křivky vylučování těchto látek viz Obrázek 23 [71].



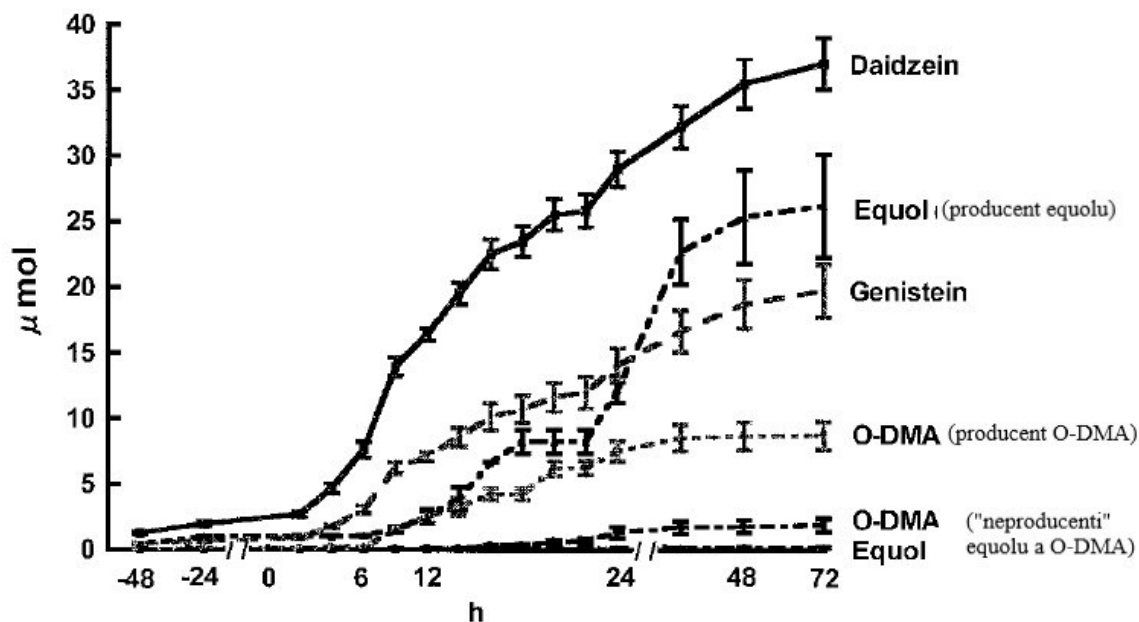
Obrázek 23 – Vylučování daidzeinu a genisteinu. Převzato z [70].

Stejná studie zkoumala také vylučování těchto isoflavonů stolicí. Od testovaných subjektů se odebíraly vzorky stolice každé ráno po suplementaci. Při podání kinaka testované subjekty přijaly také gram indigokarmínového barviva (Sigma), stolice obsahující zbytky požitého zdroje isoflavonů se tak barvila do červena. Nejvíce indikačního barviva ve stolici se objevilo 24 hodin po suplementaci a hlavním metabolitem objevujícím se ve stolici byl O-DMA [71].

60 gramů kinaka, které bylo podáno testovaným subjektům obsahovalo po hydrolýze glykosidu 103 μmol daidzeinu a 112 μmol genisteinu. Co se týče dalších isoflavonů, jejich množství bylo zanedbatelné. Průměrně se v moči nacházelo 35,8 % přijatého daidzeinu, 4 % jeho metabolitu O-DMA a 7 % equolu. Z celkového množství daidzeinu se ve stolici nacházelo průměrně 4,4 % daidzeinu, 1,9 % O-DMA a 1,6 %



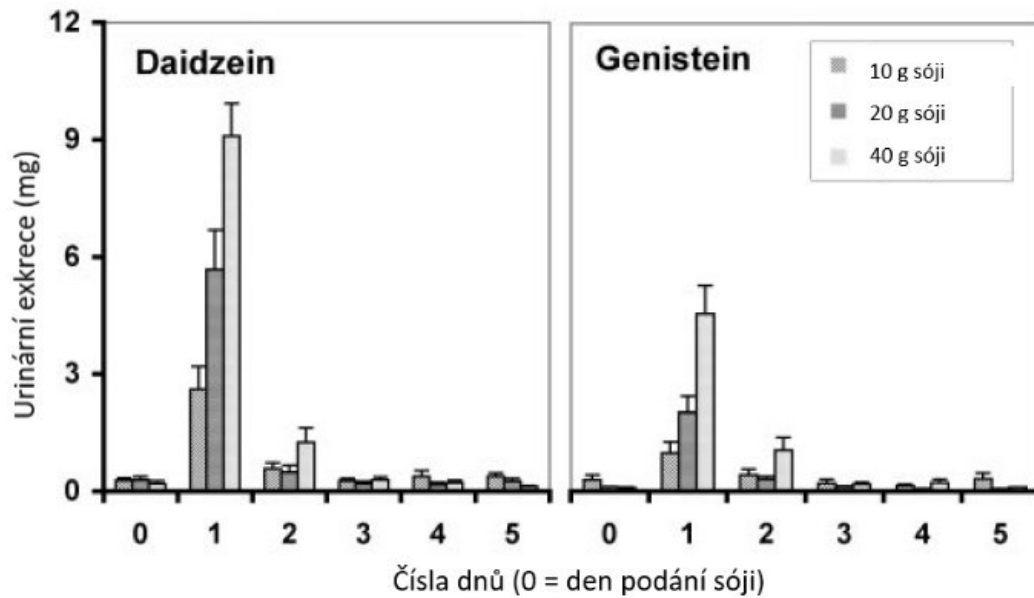
equolu. Údaje pro genistein jsou takové, že z celkového množství genisteinu se do moči dostalo 17,6 % a do stolice 1,6 % [71].



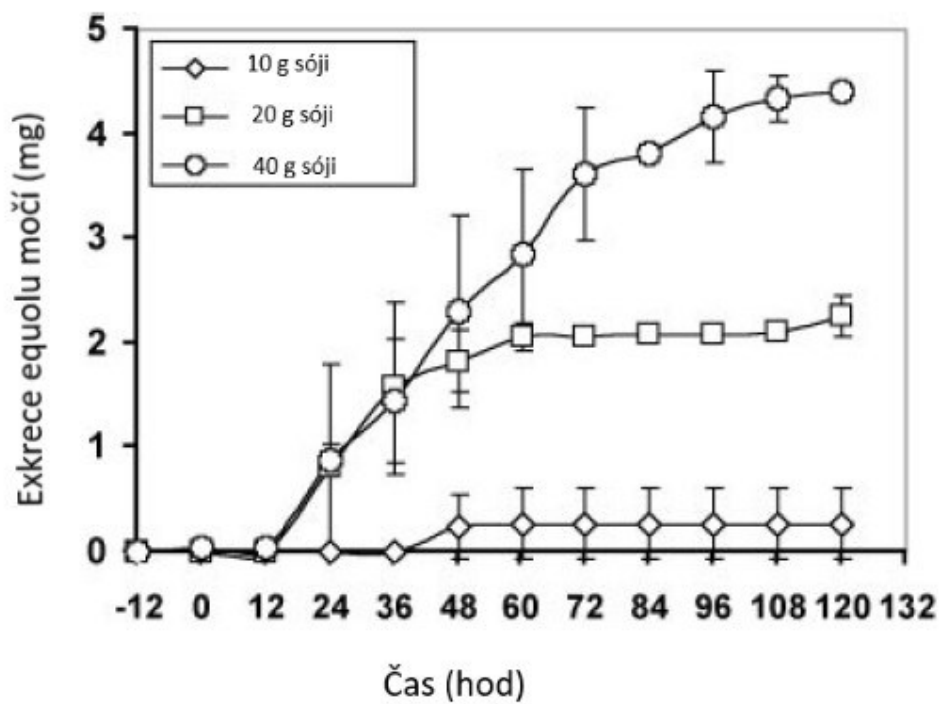
Obrázek 24 – Kumulativní vyjádření exkrece daidzeinu, genisteinu, O-DMA a equolu po suplementaci praženou sójovou moukou (kinako). Vysvětlení v textu. Převzato a upraveno podle [71].

Setchell et al. (2003) ve studii uvádí, že existují značné interindividuální rozdíly v urinární exkreci isoflavonů. Testoval biodostupnost a urinární exkreci isoflavonů obsažených v sóji u deseti zdravých žen po podání 10, 20 a 40 g sóji obsahující konjugované formy daidzeinu (6,6; 13,2 a 26,4 mg) a genisteinu (9,8; 19,6 a 39,2 mg). Největší množství těchto látek v moči se objevovalo první dva dny po perorálním podání sóji (viz Obrázek 24). Obsah daidzeinu v moči vyjádřen jako procento podané dávky byl v této studii průměrně  $63,2 \pm 8,0$ ;  $54,4 \pm 8,1$  a  $44,0 \pm 4,3$ , když bylo podáno 10, 20 a 40 g sójových bobů. Výsledky pro genistein jako v ostatních studiích byly o něco nižší –  $25,2 \pm 5,3$ ;  $13,4 \pm 2,1$  a  $15,8 \pm 2,7$  % přijaté dávky. Tyto zjištěné výsledky by odpovídaly tomu, že farmakokinetika daidzeinu a genisteinu je nelineární. V případě farmakokinetiky lineární je totiž frakce látky vylučovaná močí přímo úměrná k systémově biodostupné frakci, přijatá látka se vylučuje stále stejnou rychlostí. V tomto případě ale došlo u obou isoflavonů k poklesu procenta látky vylučované do moči se zvyšující se přijatou dávkou. Jediným testovaným metabolitem v této studii byla equol, jelikož ostatní se v ní

nacházely v minoritní koncentraci. Znovu se potvrdilo, že lidé se dělí do dvou skupin – ti co jsou schopni ho produkovat a ti, co ne. V tomto konkrétním případě z deseti žen byl equol objeven v moči i krvi u tří žen a všech nějakou dobu trvalo, než se equol v moči objevil. Což potvrzuje jeho vznik působením bakterií v distálnějších částech střeva (viz Obrázek 25) [56].



Obrázek 25 – Urinární exkrece daidzeinu a genisteinu 5 dní od podání sóji. Nejvíce těchto látek se v moči nacházelo první dva dny po podání. Množství genisteinu v moči bylo o téměř polovinu nižší než u daidzeinu. Převzato a upraveno podle [56].



Obrázek 26 – Kumulativní vyjádření urinární exkrece equolu od tří z deseti žen schopných produkovat equol. Převzato a upraveno podle [56].

Co se týče exkrece isoflavonů, studie se téměř shodují v jejím průběhu i v množství vyloučené frakce isoflavonů v moči.

## 5. Diskuze

Už velmi dlouhou dobu je známo, že sójové boby obsahují isoflavony ve vysoké koncentraci. Například genistein byl poprvé izolován ze sójových bobů již v roce 1941. Od té doby byly isoflavonoidy izolovány nejen ze sóji, ale i z dalších rostlin a zabývala se jimi celá řada vědců. Na téma isoflavonoidy vzniklo mnoho studií, a to hlavně těch farmakodynamických. Isoflavonoidy se řadí mezi fytoestrogeny. Vědecké databáze obsahují velké množství publikací, které se snaží potvrdit jejich příznivé účinky při prevenci a doplňkové léčbě zejména hormon-dependentních onemocnění. Prokazatelně bylo zjištěno, že u části populace, která pravidelně konzumuje sójové produkty, je četnost těchto chorob nižší než u osob, které je nekonzumují. Tyto účinky se přičítají právě fytoestrogenům. Isoflavonoidy spolu s dalšími fytoestrogeny tak představují zajímavou skupinu přírodních látek s terapeutickým potenciálem. Informace o nich jsou zatím neúplné, z části pouze empirické. Pro pochopení účinků isoflavonoidů je důležitá nejen znalost jejich farmakodynamiky, ale i farmakokinetiky [56, 72] a ta byla cílem této diplomové práce.

Oproti farmakodynamickým studiím je těch, které se zabývají farmakokinetikou, výrazně méně. Isoflavonoidy sice tvoří velkou skupinu látek vyskytujících se napříč mnohými druhy rostlin, nicméně informace o farmakokinetice řady z nich zatím mnohdy nejsou k dispozici. Tato práce se proto zaměřila na isoflavony, zejména na daidzein a genistein, o jejichž farmakokinetice existuje dostatečné množství věrohodných studií.

Dostatek informací je k dispozici hlavně o absorpci, biodostupnosti a metabolismu, méně potom o distribuci nebo exkreci těchto látek. Zdroje, ze kterých jsem při své práci čerpala, se relativně shodovaly v podávaných informacích anebo se doplňovaly. K sepsání této práce mi nejvíc pomohly studie doktora Kennetha Setchella, který se studiem nejen farmakokinetiky isoflavonů zabývá dlouhodobě a systematicky.

Z dostupných informací je patrné, že farmakokinetika isoflavonoidů je složitá a variabilní. Při hledání informací jsem dala přednost humánním studiím *in vivo*, protože přenos údajů ze zvířecích modelů na člověka je nepřesný, a ne vždy možný. I proto je tato práce zacílena zejména na farmakokinetiku isoflavonů, o nichž je k dispozici nejvíce studií provedených na lidských jedincích.

V potravě se isoflavonoidy nacházejí hlavně v podobě glykosidů. Pro vstřebání ve střevě a pro účinek je nejprve třeba, aby došlo k jejich rozkladu na aglykony. Tento rozklad začíná již v dutině ústní pomocí  $\beta$ -glykosidáz a pokračuje dále až do střeva, kde k rozkladu přispívají také enzym laktáza a bakterie střevní mikroflóry. Ty se mimo jiné podílí i na metabolismu isoflavonů. Po rozkladu glykosidu dochází k pasivní difuzi aglykonu přes stěnu střeva do systémové cirkulace. Tam se aglykony můžou vázat na plazmatické bílkoviny (hlavně lidský sérový albumin), které slouží jako rezervoár, čímž se prodlužuje jejich plazmatický poločas [31-35].

Co se týče metabolismu, isoflavonoidy podléhají hlavně konjugačním reakcím druhé fáze metabolismu, a to pomocí enzymu UDP-glukuronyltransferázy a sulfotransferázy za vzniku glukuronidů a sulfátů. První fáze metabolismu přes cytochrom P450 tvoří minoritní metabolickou cestu, vznikají při ní hlavně oxidační produkty [21, 50-53].

Za zmínku stojí equol, významný metabolit isoflavonu daidzeinu, který u části populace vzniká ve střevech působením bakteriální mikroflóry. Podle toho, zda je člověk schopen tvořit equol, se populace dělí na jeho producenty a „neproducenty“. Zdá se, že equol poté nepodléhá žádné další metabolické přeměně kromě konjugačních reakcí [21, 36, 37].

Exkrece isoflavonoidů probíhá hlavně močí, kde se nachází zejména ve formě konjugátů s kyselinou glukuronovou nebo jako sulfatované deriváty a také ve formě aglykonů. Ze studií vyplývá, že farmakokinetika isoflavonů je nelineární, jelikož se zvyšující se podanou dávkou se snižuje jejich podíl v moči. Daidzein se močí vylučuje ve větší míře než genistein a glycitein, equol se v ní vyskytuje pouze u jedinců, kteří jsou schopni ho tvořit. Exkrece stolicí představuje minoritní cestu vylučování isoflavonoidů a nejvíce isoflavonů ve stolici se objevovalo první dva dny po suplementaci [21, 56, 70, 71].

Farmakokinetika isoflavonoidů není stále dostatečně známa. V budoucnu by se vědci mohli zaměřit na bližší zmapování role BCRP, MRP a ostatních efluxních transportérů v lidském organismu. Tyto transportéry mohou významně ovlivnit pohyb xenobiotik v lidském těle, včetně řady léčiv [21]. Velmi známá je např. jejich role při vzniku rezistence nádorových buněk. Je možné, že efluxní transportéry obdobně

významných způsobem zasahují i do osudu isoflavonoidů a jejich metabolitů. Objasnění tohoto procesu by se následně mohlo uplatnit například při prevenci a pomocné léčbě některých onemocnění, jako jsou karcinom prsu či prostaty.

Budoucí výzkum by se mohl zaměřit také na to, jaký vliv mají na farmakokinetiku isoflavonoidů jedinec a interindividuální variabilita. Součástí toho by mohla být otázka, jakou roli hrají etnické rozdíly. Již dnes je známo, že mezi Asiaty je více producentů equolu než v západní populaci [37]. Je pravděpodobné, že obdobných faktorů je více, a to nejen v závislosti na etniku.

Isoflavonoidy jsou významnou součástí potravy, kde se vyskytují spolu s dalšími látkami. Tím se nabízí další oblast výzkumu, a to v oblasti interakcí jednotlivých složek potravy mezi sebou. Ve farmakokinetických studiích jsou často používány pouze izolované isoflavonoidy. Vědci by se mohli zaměřit jak na vliv podání různých kombinací isoflavonoidů, tak i na vliv stravy na farmakokinetiku těchto látek.

Lidská populace se dožívá stále vyššího věku, s kterým se přibývá i medikace. Bylo by proto důležité zmapovat interakce isoflavonoidů s další farmakoterapií. Součástí by měl být výzkum vlivu na cytochrom P450, přes který se metabolizuje velké množství léčiv. Podobně je stále málo věrohodných informací o enterohepatálním oběhu a first-pass efektu isoflavonoidů. Výzkum v této oblasti by eventuálně mohl být prospěšný při přípravě derivátů isoflavonoidů s delším poločasem.

Další velkou oblastí, která zatím zůstává neznámou, jsou kolonické metabolity. Je třeba objasnit, které konkrétní kolonické metabolity isoflavonoidů vznikají ve střevě působením bakteriální mikroflóry, do jaké míry se absorbují a zda vyvolávají farmakologický účinek na lidský organismus. Jako příklad takové studie lze uvést nedávný výzkum Najmanové et. al (2016), při kterém byla popsána vazodilatační aktivita kolonického metabolitu flavonoidu kvercetinu, 3-(3-hydroxyfenyl)propionové kyseliny. Je první studií popisující fakt, že fenolické kyseliny produkované lidskou bakteriální mikroflórou mohou být přinejmenším částečně zodpovědné za snížení arteriálního krevního tlaku po perorálním podání kvercetinu [73].

## 7. Závěr

Řada látek přírodního původu je významným zdrojem nových léčiv. Isoflavonoidy jsou polyfenolické sloučeniny z rozsáhlé skupiny flavonoidů, které se nachází v mnohých čeledích rostlin. V posledních letech je jim věnována velká vědecká pozornost, a to hlavně kvůli možným farmakodynamickým účinkům. Ty vycházejí z faktu, že struktura isoflavonoidů se velmi podobá estrogenním hormonům, a proto se řadí mezi fytoestrogeny. Pokud by se prokázala jejich klinická prospěšnost, mohly by se v budoucnu významněji uplatnit v terapii nebo prevenci řady onemocnění. Podmínkou toho by mimo jiné byla dobrá znalost farmakokinetiky těchto sloučenin, která je nezbytná pro návržení vhodné lékové formy a určení správného dávkování.

## 8. Seznam obrázků

Obrázek 1 - Struktury formononetinu a ononinu .....	9
Obrázek 2 - Základní skelet 1,2-difenylpropanu, flavonu a isoflavonu.....	11
Obrázek 3 - Základní skupiny isoflavonoidů .....	13
Obrázek 4 – Schéma biosyntéry isoflavonoidů v rostlinách.....	14
Obrázek 5 - Reakce vedoucí ke vzniku isoflavonoidů za účasti isoflavonsynthasy. ....	15
Obrázek 6 - Stuktury základních zástupců isoflavonů .....	17
Obrázek 7 - Rozklad isoflavonů střevní bakteriální mikroflórou - zmizení daidzinu a zvýšení množství aglykonu daidzeinu; stabilita puerarinu .....	21
Obrázek 8 - Schéma instestinální absorpce a metabolismu glykosylovaných derivátů isoflavonů genisteinu a daidzeinu .....	22
Obrázek 9 – Schéma absorpce, distribuce, metabolismu a exkrece isoflavonů.....	24
Obrázek 10 – Závislost koncentrace daidzeinu a genisteinu v séru na čase. ....	26
Obrázek 11 – Plazmatické koncentrace v závislosti na čase pro látky genistein, daidzein, glycitein, formononetin a biochanin A po jednorázovém podání 25 mg glycitinu a 40 mg Promensilu stejnému dospělému zdravému muži. ....	28
Obrázek 12 – HPLC chromatogram popisující složení dvou odlišných doplňků stravy obsahující isoflavony.....	29
Obrázek 13 – Molekulový model lidského sérového albuminu.....	31
Obrázek 14 – Molekulový model HSA s vyznačenými vazebnými místy pro ligandy FA1 – FA7.....	32
Obrázek 15 – Schéma vazby polyfenolů na plazmatické bílkoviny. Přes membrány mohou prostupovat a k účinku jsou dostupné pouze volné polyfenoly (Pf), PP – polyfenol navázaný na plazmatickou bílkovinu.....	32
Obrázek 16 – Model vazby puerarinu na lidský sérový albumin.....	34
Obrázek 17 – Schéma konjugačních reakcí genisteinu – glukuronidace a sulfatace. ....	38
Obrázek 18 – Schéma metabolismu daidzeinu. ....	39
Obrázek 19 – Schéma metabolismu genisteinu. Převzato z [21]. ....	40
Obrázek 20 – Předpokládané metabolické cesty daidzeinu a glyciteinu .....	44
Obrázek 21 – Celkový iontový chromatogram vzorku moči jednoho testovaného subjektu před a po konzumaci sóji .....	46
Obrázek 22 – Celkový iontový chromatogram vzorku moči odebraného testovanému subjektu označovaného jako „producent equolu“ před a po suplementaci sójou. ....	47



Obrázek 23 – Vylučování daidzeinu a genisteinu..	48
Obrázek 24 – Kumulativní vyjádření exkrece daidzeinu, genisteinu, O-DMA a equolu po suplementaci praženou sójovou moukou (kinako).	49
Obrázek 25 – Urinární exkrece daidzeinu a genisteinu 5 dní od podání sóji...	50
Obrázek 26 – Kumulativní vyjádření urinární exkrece equolu od tří z deseti žen schopných produkovat equol.	51

## 9. Seznam tabulek

Tabulka 1 – Přehled bakterií důležitých pro vznik equolu.	43
---	----

## 10. Seznam literatury

1. Sharma, V.; Ramawat, K. G. Isoflavonoids. *Natural Products*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, **2013**; 1849-1865.
2. Lapčík, O.; Klejdus, B.; Davidová, M.; Kokoška, L.; Kubáň, V.; Moravcová J. Isoflavonoids in the *Rutaceae* family: 1. *Fortunella obovata*, *Murraya paniculata* and four *Citrus* species. *Phytochem. Analysis* **2004**, *9*, 293-299.
3. Veitch; N. Isoflavonoids of the Leguminosae. *Nat. Prod.* **2007**, *24*, 417–464.
4. Lapčík, O. Isoflavonoids in non-leguminous taxa: A rarity or rule? *Phytochem.* **2007**, *68*(22-24), 2909-2916.
5. Reynaud, J.; Guilet, D.; Terreux, R.; Lussignol, M.; Walchshofer, N. Isoflavonoids in nonleguminous families: an update. *Nat. Prod.* **2005**, *22*, 504–515.
6. Cornwell, T.; Cohick, W.; Raskin, I. Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry* 2004, *65*, 995–1016.
7. Mackova, Z.; Koblowska, R.; Lapcik, O. Distribution of isoflavonoids in non-leguminous taxa-an update. *Phytochemistry*. **2006**, *67*, 849-855.
8. Winkel-Shirley, B. Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. *Plant physiol.* **2001**, *126*, 485-493.

9. Holscher, D.; Schneiuder, B. The biosynthesis of 8-phenylphenalenones from *Eichhornia crassipes* involves a putative aryl migration step. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 59–64.
10. Akashi, T.; Aoki, T.; Ayabe, S.-I. Cloning and functional expression of a cytochrome P450 cDNA encoding 2-hydroxyisoflavanone synthase involved in biosynthesis of the isoflavonoid skeleton in licorice. *Plant Physiol.* **1999**, *121*, 821–828.
11. Kim, B.G.; Kim, S.Y.; Song, H.S.; Lee, C.; Hur, H.G.; Kim, S.I.; Ahn, J.H. Cloning and expression of the isoflavone synthase gene (IFS-Tp) from *Trifolium pratense*. *Mol. Cells* **2006**, *15*, 301–306.
12. Yu, O.; Shi, J.; Hession, A.O.; Maxwell, C.A.; McGonigle, B.; Odell, J.T. Metabolic engineering to increase isoflavone biosynthesis in soybean seed, *Phytochemistry* **2003**, *63*(7), 753-763.
13. Cos, P.; De Bruyne, T.; Apers, S.; Berghe, D.; Pieters, L.; Vlietinck, A.J. Phytoestrogens: recent developments. *Planta Med.* **2003**, *69*, 589-592.
14. Lapčík, O.; Klejdus, B.; Kokoška, L.; Davidová, M.; Afandi, K.; Kubáň, V.; Hampl, R. Identification of isoflavones in *Acca sellowiana* and two *Psidium* species (Myrtaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* **2005**, *33*(10), 983-992.
18. Zhang, H.Y.; Cui, J.; Zhang, Y.; Wang, Z.L.; Chong, T.; Wang, Z.M. Isoflavones and Prostate Cancer: A Review of Some Critical Issues. *Chin Med J* **2016**, *129*, 341-7.
15. Dixon, R.A.; Ferreira, D. Genistein. *Phytochemistry* **2002**, *60*, 205-211.
16. Liu, J.; Burdette, J.E.; Xu, H.; Gu, C.; van Breemen, R.B.; Bhat, K.P.; Booth, N.; Constantinou, A.I.; Pezzuto, J.M.; Fong, H.H.; Farnsworth, N.R.; Bolton, J.L. Evaluation of estrogenic activity of plant extracts for the potential treatment of menopausal symptoms. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 2472–2479.
17. Davis, J.N.; Kucuk, O.; Sarkar, F.H. Expression of prostate-specific antigen is transcriptionally regulated by genistein in prostate cancer cells. *Mol. Carcinog.* **2002**, *34*, 91–101.

18. Zhou, S.; Turgeman, G.; Harris Stephen, E.; Leitman Dale, C.; Komm Barry, S.; Bodine Peter, V.N.; Gazit, D. Estrogens activate bone morphogenetic protein-2 gene transcription in mouse mesenchymal stem cells. *Mol. Endocrinol.* **2003**, *17*, 56–66.
19. Boland, M.; Donnelly, D.M.X. Isoflavonoids and related compounds. *Nat. Prod. Rep.* **1998**, *15*(3), 241-260.
20. Goodman, L. S.; Brunton, L.L.; Chabner, B.; Knollmann, B.C. *Goodman & Gilman's pharmacological basis of therapeutics*, 12th ed.; New York: McGraw-Hill, 2011.
21. Chandrasekharan, S.; Aglin, A. Pharmacokinetics of Dietary Isoflavones. *J Steroids Hormon Sci.* **2013** S12: 004. doi:10.4172/2157-7536. S12-004.
22. Piskula, M.K.; Yamakoshi, J.; Iwai, Y. Daidzein and genistein but not their glucosides are absorbed from the rat stomach. *FEBS* **1999**, *447*, 287-291.
23. Day, A.J.; Cañada, F.J.; Díaz, J.C.; Kroon, P.A.; Mclauchlan, R. et al. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS* **2000**, *468*, 166-170.
24. Day, A.J.; DuPont, M.S.; Ridley, S.; Rhodes, M.; Rhodes, M.J. et al. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FEBS* **1998**, *436*, 71-75.
25. Barnes S (2010) The biochemistry, chemistry and physiology of the isoflavones in soybeans and their food products. *Lymphat Res Biol* *8*: 89-98.
26. D'Archivio, M.; Filesi, C.; Vari, R.; Scazzocchio, B; Masella, R. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *Int J Mol Sci* **2010**, *11*, 1321-1342.
27. Matthies, A.; Clavel, T.; Gütschow, M.; Engst, W.; Haller, D. et al. Conversion of daidzein and genistein by an anaerobic bacterium newly isolated from the mouse intestine. *Appl Environ Microbiol* **2008**, *74*, 4847-4852.
28. Hur, H.G.; Beger, R.D.; Heinze, T.M.; Lay, J.O. Jr.; Freeman, J.P. et al. Isolation of an anaerobic intestinal bacterium capable of cleaving the C-ring of the isoflavonoid daidzein. *Arch Microbiol* **2002**, *178*, 8-12.

29. Schoefer, L.; Mohan, R.; Braune, A.; Birringer, M.; Blaut, M. Anaerobic C-ring cleavage of genistein and daidzein by *Eubacterium ramulus*. *FEMS Microbiol* **2002**, *208*, 197-202.
30. Bodlaj, G.; Stöcher, M.; Hufnagl, P.; Hubmann, R.; Biesenbach, G. et al. Genotyping of the lactase-phlorizin hydrolase -13910 polymorphism by LightCycler PCR and implications for the diagnosis of lactose intolerance. *Clin Chem* **2006**, *52*, 148-151.
31. Piskula, M.K.; Yamakoshi, J.; Iwai, Y. Daidzein and genistein but not their glucosides are absorbed from the rat stomach. *FEBS* **1999**, *447*, 287-291.
32. Setchell, K.D.; Brown, N.M.; Zimmer-Nechemias, L.; Brashear, W.T.; Wolfe, B.E. et al. Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *Am J Clin Nutr* **2002**, *76*, 447-453.
33. Yuan, J.P.; Wang, J.H.; Liu, X. Metabolism of dietary soy isoflavones to equol by human intestinal microflora--implications for health. *Mol Nutr Food Res* **2007**, *51*, 765-781.
34. Setchell, K. D. R.; Brown, N. M.; Desai, P.; Zimmer-Nechemias, L. et al. Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements, *J. Nutr.* **2001**, *131*, 1362S-1375S.
35. Zubik, L.; Meydani, M. Bioavailability of soybean isoflavones from aglycone and glucoside forms in American women, *Am. J. Clin. Nutr.* **2003**, *77*, 1459–1465.
36. Setchell, K.D.; Brown, N.M.; Lydeking-Olsen, E. The clinical importance of the metabolite equol—a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *J Nutr* **2002**, *132*, 3577-3584.
37. Setchell, K.D.; Clerici, C. Equol: history, chemistry, and formation. *J Nutr* **2010**, *140*, 1355S-62S.

38. Simons, A.L.; Renouf, M.; Hendrich, S.; Murphy, P.A. Human gut microbial degradation of flavonoids: structure-function relationships. *J Agric Food Chem* **2005**, *53*, 4258-4263.
39. Atkinson, C.; Berman, S.; Humbert, O.; Lampe, J.W. In vitro incubation of human feces with daidzein and antibiotics suggests interindividual differences in the bacteria responsible for equol production. *J Nutr.* **2004**, *134*, 596–9.
40. Halm, B.M.; Franke, A.A.; Ashburn, L.A.; Hebshi, S.M.; Wilkens, L.R. Oral antibiotics decrease urinary isoflavonoid excretion in children after soy consumption. *Nutr Cancer.* **2008**, *60*, 14–22.
41. Wang, X.L.; Kim, H.J.; Kang, S.I.; Kim, S.I.; Hur, H.G. Production of phytoestrogen S-equol from daidzein in mixed culture of two anaerobic bacteria. *Arch Microbiol.* **2007**, *187*, 155–60.
42. Setchell, K.D.R.; Clerici, C.; Lephart, E.D.; Cole, S.J.; Heenan, C.; Castellani, D.; Wolfe, B.E.; Nechemias-Zimmer, L.; Brown, N.M. et al. S-equol, a potent ligand for estrogen receptor beta, is the exclusive enantiomeric form of the soy isoflavone metabolite produced by human intestinal bacterial flora. *Am J Clin Nutr.* **2005**, *81*, 1072–9.
43. Rafii, F. The Role of Colonic Bacteria in the Metabolism of the Natural Isoflavone Daidzin to Equol. *Metabolites* **2015**, *5*(1), 56-73.
44. Hur, H.G.; Lay, J.O., Jr.; Beger, R.D.; Freeman, J.P.; Rafii, F. Isolation of human intestinal bacteria metabolizing the natural isoflavone glycosides daidzin and genistin. *Arch. Microbiol.* **2000**, *174*, 422–428.
45. Hur, H.G.; Beger, R.D.; Heinze, T.M.; Lay, J.O., Jr.; Freeman, J.P.; Dore, J.; Rafii, F. Isolation of an anaerobic intestinal bacterium capable of cleaving the C-ring of the isoflavonoid daidzein. *Arch. Microbiol.* **2002**, *178*, 8–12.
46. Fortina, M.G.; Ricci, G.; Foschino, R.; Picozzi, C.; Dolci, P.; Zeppa, G.; Cocolin, L.; Manachini, P.L. Phenotypic typing, technological properties and safety aspects of *Lactococcus garvieae* strains from dairy environments. *J Appl Microbiol.* **2007**, *103*, 445–53.

47. Bloedon, L.T.; Jeffcoat, A.R.; Lopaczynski, W.; Schell, M.J.; Black, T.M. et al. Safety and pharmacokinetics of purified soy isoflavones: single-dose administration to postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* **2002**, *76*, 1126-1137.
48. Setchell, K.D.; Faughnan, M.S.; Avades, T.; Zimmer-Nechemias, L.; Brown, N.M. et al. Comparing the pharmacokinetics of daidzein and genistein with the use of <sup>13</sup>C-labeled tracers in premenopausal women. *Am J Clin Nutr* **2003**, *77*, 411-419.
49. Wahajuddin; Taneja, I.; Arora, S.; Raju, K.S.; Siddiqui, N. Disposition of Pharmacologically Active Dietary Isoflavones in Biological Systems. *Curr Drug Metab.* **2013**, *14*(4), 369-80.
50. Doerge, D.R.; Chang, H.C.; Churchwell, M.I.; Holder, C.L. Analysis of soy isoflavone conjugation in vitro and in human blood using liquid chromatography-mass spectrometry. *Drug Metab Dispos* **2000**, *28*, 298-307.
51. Pritchett, L.E.; Atherton, K.M.; Mutch, E.; Ford, D. Glucuronidation of the soyabean isoflavones genistein and daidzein by human liver is related to levels of UGT1A1 and UGT1A9 activity and alters isoflavone response in the MCF-7 human breast cancer cell line. *J Nutr Biochem* **2008**, *19*, 739-745.
52. Tang, L.; Singh, R.; Liu, Z.; Hu, M. Structure and concentration changes affect characterization of UGT isoform-specific metabolism of isoflavones. *Mol Pharm* **2009**, *6*, 1466-1482.
53. Heinonen, S.M.; Wähälä, K.; Adlercreutz, H. Metabolism of isoflavones in human subjects. *Phytochemistry Reviews* **2002**, *1*, 175-182.
54. Chen, J.; Lin, H.; Hu, M. Metabolism of flavonoids via enteric recycling: role of intestinal disposition. *J Pharmacol Exp Ther* **2003**, *304*, 1228-1235.
55. Wu, B.; Kulkarni, K.; Basu, S.; Zhang, S.; Hu, M. First-pass metabolism via UDP-glucuronosyltransferase: a barrier to oral bioavailability of phenolics. *J Pharm Sci* **2011**, *100*, 3655-3681.

56. Setchell, K.D.; Brown, N.M.; Desai, P.B. et al. Bioavailability, disposition, and dose-response effects of soy isoflavones when consumed by healthy women at physiologically typical dietary intakes. *J Nutr* **2003**, *133*, 1027–35.
57. Cassidy, A.; Brown, J. E.; Hawdon, A.; et al. Factors Affecting the Bioavailability of Soy Isoflavones in Humans after Ingestion of Physiologically Relevant Levels from Different Soy Foods. *J. Am. Coll. Nutr.* **2006**, *136*(1), 45–51.
58. Brown, N.; Galandi, S.; et al. S-(–)equol production is developmentally regulated and related to early diet composition. *Nutr. Res. (N.Y.)* **2014**, *34*(5), 401–409.
59. Bolli, A.; Marino, M.; Rimbach, G.; et al. Flavonoid binding to human serum albumin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2010**, *398*(3), 444–449.
60. Ding, F.; Peng, W. Biological activity of natural flavonoids as impacted by protein flexibility: an example of flavanones. *Mol Biosyst.* **2015**, *11*(4), 1119–33.
61. Khan, M.K.; Rakotomanomana, N.; Dufour, C.; Dangles, O. Binding of citrus flavanones and their glucuronides and chalcones to human serum albumin. *Food Funct.* **2011**, *2*(10), 617–26.
62. Xiao, J.; Kai, G. A review of dietary polyphenol-plasma protein interactions: characterization, influence on the bioactivity, and structure-affinity relationship. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **2012**, *52*(1), 85–101.
63. Mahesha, H. G.; Singh, S. A.; Srinivasan, N.; Rao, A. G. A. A spectroscopic study of the interaction of isoflavones with human serum albumin. *FEBS Journal.* **2006**, *273*, 451–467.
64. Pal, S.; Saha, C. A review on structure–affinity relationship of dietary flavonoids with serum albumins. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics.* **2013**, *32*(7), 1132–1147.
65. Li, J.; Ren, C.; Zhang, Y.; Liu, X.; Yao, X.; Hu, Z. Spectroscopic studies on binding of puerarin to human serum albumin. *Journal of Molecular Structure.* **2008**, *885*, 64–69.

66. He, Y.; Wang, Y.; Tang, L.; Liu, H.; Chen, W.; Zheng, Z.; Zou, G. Binding of Puerarin to Human Serum Albumin: A Spectroscopic Analysis and Molecular Docking. *Journal of Fluorescence*. **2008**, *18*(2), 433-442.
67. Kato, K.; Kusuhara, H.; Kumagai, Y.; et al. Association of multidrug resistance-associated protein 2 single nucleotide polymorphism rs12762549 with the basal plasma levels of phase II metabolites of isoflavonoids in healthy Japanese individuals. *Pharmacogenetics and Genomics*. 2012.
68. Yang, Z.; Zhu, W.; Gao, S.; Yin, T.; Jiang, W.; et al. Breast cancer resistance protein (ABCG2) determines distribution of genistein phase II metabolites: reevaluation of the roles of ABCG2 in the disposition of genistein. *Drug Metab Dispos* **2012**, *40*, 1883-1893.
69. Bircsak, K.M.; Aleksunes, L.M. Interaction of Isoflavones with the BCRP/ABCG2 Drug Transporter. *Current drug metabolism*. **2015**, *16*(2), 124-140.
70. Heinonen, S. M.; Hoikkala, A.; Wahala, K.; Adlercreutz, H. Metabolism of the soy isoflavones daidzein, genistein and glycitein in human subjects. Identification of new metabolites having an intact isoflavonoid skeleton, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2003**, *87*, 285–299.
71. Watanabe S.; Yamaguchi M.; Sobue T.; Takahashi T.; Miura T.; et al. Pharmacokinetics of Soybean Isoflavones in Plasma, Urine and Feces of Men after Ingestion of 60 g Baked Soybean Powder (Kinako), *The Journal of Nutrition*. **1998**, *128*(10), 1710-1715.
72. Setchell, K.D.R.; Borriello, S. P.; Hulme, P.; Kirk, D. N.; Axelson, M. Nonsteroidal estrogens of dietary origin: possible roles in hormonedependent disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **1984**, *40*, 569–578.
73. Najmanová, I.; Pourová, J.; Vopršalová, M.; Pilařová, V.; Semecký, V.; Nováková, L.; Mladěnka, P. Flavonoid metabolite 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid formed by human microflora decreases arterial blood pressure in rats. *Molecular Nutrition & Food Research*. **2016**, *60*(5), 981-991.