

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOLOGIE A TOXIKOLOGIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Kardiovaskulární účinky izoflavonoidů

Cardiovascular effects of isoflavonoids

Bc. Lenka Jančíková

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

HRADEC KRÁLOVÉ, 2018

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

V Hradci Králové 3.5.2018

Lenka Jančíková

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat své školitelce PharmDr. Janě Pourové, Ph.D. za její odbornou pomoc, podnětné návrhy, cenné rady a připomínky, ale také za vstřícnost, inspiraci a motivaci během sepisování této diplomové práce.

Ráda bych také poděkovala všem pracovníkům Hematologické laboratoře IV. interní kliniky Oddělení klinické hematologie FN Hradec Králové za jejich vstřícnost, trpělivost a pomoc během mého magisterského studia.

Dále také děkuji svému manželovi a přátelům za velkou podporu a pomoc během celého studia.

Obsah

1.	SEZNAM ZKRATEK	7
2.	ÚVOD A CÍL PRÁCE	10
3.	TEORETICKÁ ČÁST	12
3.1	Izoflavonoidy	12
3.1.1.	Klasifikace	12
3.1.2.	Biosyntéza a struktura izoflavonoidů	14
3.1.3.	Zdroje izoflavonoidů.....	15
3.1.4.	Metabolismus izoflavonoidů	18
3.1.5.	Účinky izoflavonoidů	23
3.1.5.1.	Estrogenní vlastnosti hormonů	23
3.1.5.2.	Antineoplastické a antiproliferační vlastnosti izoflavonoidů	24
3.1.5.3.	Účinky na kostní tkáň	25
3.1.5.4.	Antioxidační účinky izoflavonoidů	26
3.1.5.5.	Účinky izoflavonoidů na klimakterický syndrom	30
3.2	Kardiovaskulární účinky izoflavonoidů.....	31
3.2.1.	Ateroskleróza.....	31
3.2.2.	Izoflavonoidy a ateroskleróza.....	33
3.2.3.	Působení izoflavonoidů na krevní tlak, na obezitu.....	37
3.2.4.	Působení izoflavonoidů na vaskulární záněty.....	39
3.2.5.	Působení izoflavonoidů na cévní endotel	40
3.2.6.	Vliv izoflavonoidů na peroxidaci lipidů včetně LDL	45
3.2.7.	Působení izoflavonoidů na buňky hladké svaloviny.....	47
3.2.8.	Působení izoflavonoidů na agregaci trombocytů.....	51
4.	DISKUSE	57
5.	ZÁVĚR.....	60
6.	POUŽITÁ LITERATURA.....	61
7.	SEZNAM OBRÁZKŮ	70

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Bc. Lenka Jančíková

Školitel: PharmDr. Jana Pourová, Ph.D.

Název diplomové práce: Kardiovaskulární účinky izoflavonoidů

Cíl:

Cílem této diplomové práce je shrnutí dosavadních poznatků o přírodních rostlinných látkách označovaných jako fytoestrogeny-izoflavonoidech a zmapování výsledků nejnovějších studií se zaměřením na kardiovaskulární účinky izoflavonoidů.

Hlavní poznatky:

Z dostupných údajů lze usoudit, že izoflavonoidy a jejich metabolity mají na lidský organizmus pozitivní účinky, mezi které řadíme účinky antiaterosklerotické, antimenopauzální, antikancerogenní účinky a pozitivní efekt na osteoporózu. Pozitivní působení na kardiovaskulární systém zahrnuje antihypertenzní, antiinflamatorní, antiangiogenní, antiproliferační a antiagregační účinky. Na druhou stranu se objevují i studie, které upozorňují na případná rizika spojená se zejména dlouhodobým užíváním izoflavonoidů. Nicméně i když závěry ze studií kardiovaskulárních účinků nejsou vždy shodné, většina potvrzuje pozitivní působení izoflavonoidů na kardiovaskulární systém.

Závěr:

Izoflavonoidy a jejich metabolity jsou velmi zajímavou skupinou látek přírodního původu s potenciálem pro případný vývoj nových léčiv. Zaslouží si proto další výzkum jak svých terapeutických a preventivních účinků, tak případných rizik.

Klíčová slova: izoflavonoidy, kardiovaskulární účinky, estrogen, ateroskleróza, menopauza

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Bc. Lenka Jančíková

Supervisor: PharmDr. Jana Pourová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Cardiovascular effects of isoflavonoids

Background:

The aim of this thesis is to summarize existing findings about natural vegetable substances known as phytoestrogens-isoflavones and to map the results of latest studies focused on cardiovascular effects of isoflavones.

Main findings:

Available data suggest that isoflavones and their metabolites have positive effect on human organism. These include antiatherosclerotic, antimenopausal and anticarcinogenic effects and a positive effect on osteoporosis. Positive effect on cardiovascular system includes antihypertensive, anti-inflammatory, anti-angiogenic, antiproliferative and antiaggregating effects. On the other hand, there are studies that point out possible risks related to mainly long-term use of isoflavones. Nevertheless, even though the findings of cardiovascular effects are not always consistent, most of them confirm positive effects of isoflavones on cardiovascular system.

Conclusion:

Isoflavones and their metabolites are a very interesting group of substances with natural origin and carry a potential for possible development of new drugs. Therefore, they deserve further research of both their therapeutic and preventive effects as well as their risks.

Key words: Isoflavones, cardiovascular effects, oestrogen, atherosclerosis, menopause

1. SEZNAM ZKRATEK

AC	adenylátcykláza
ADP	adenosindifosfát
Akt	proteinkináza
ASA	kyselina acetylsalicylová
ATP	adenosintrifosfát
BMI	body mass index
Ca ²⁺	vápenaté ionty
CAM	buněčné adhezní molekuly
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CD	Cluster of differentiation, povrchová molekula
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
cIMT	měření tloušťky intima media krčních tepen pomocí ultrazvuku
COX, COX-1	cyklooxygenáza
DAG	diacylglycerol
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EC	endotelová buňka
ECM	extracelulární matrix
EDHF	endotelový hyperpolarizační faktor
eNOS	endotelová syntetáza oxidu dusnatého
8- <i>epi</i> -PGF _{2α}	8- <i>epi</i> -prostaglandin F _{2α}
ER (ER- α , ER- β)	estrogenní receptor (α , β)
ERe	endoplazmatické retikulum
ET-1	endotelin
FBG	fibrinogen

FMD	měření dilatace tepny zprostředkované průtokem
GC	guanylátcykláza
GP	glykoprotein
GPÉR	receptor svázaný s G proteinem
GTP	guanosintrifosfát
HbA1c	glykosylovaný hemoglobin A1C
HDL	lipoprotein o vysoké hustotě
HL 60	leukemická buněčná linie
3HPPA	3-(3-hydroxyfenyl)propionová kyselina
HP	hydroperoxidáza
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-PDA	vysokoúčinná kapalinová chromatografie, detektor diodového pole
HUVEC	endoteliální buňky lidské umbilikální žíly
ICAM-1	intercelulární adhezní molekula-1
ICHS	ischemická choroba srdeční
IP3	1,4,5-trifosfát
K ⁺	draslíkové ionty
LC-ESI-MS	spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií, ionizace elektrosprejem
LDL	lipoprotein o nízké hustotě
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza
MLC	lehký řetězec myozinu
MLCK	kináza lehkého řetězce myozinu
NO	oxid dusnatý
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát redukovaná forma

O-DMA	O-desmethyl-angolensin
ox-LDL	oxidačně modifikovaných LDL částic
P	fosfát
PAF	faktor aktivující trombocyty
PGI ₂	prostacyklin
PGG ₂	prostaglandin G ₂
PGH ₂	prostaglandin H ₂
PI3-K	fosfatidylinositol 3-kináza
PIP2	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PIP3	fosfatidylinositol -3,4,5-trifosfát
PKA	proteinkináza závislá na cAMP
PKC	proteinkináza C
PKG	proteinkináza závislá na cGMP
PL	fosfolipidy
PLA2	fosfolipáza A ₂
PLC	fosfolipáza C
P- sel.	P-selektinu
QTL	Quantitative Trait Loci lokusy kvantitativních znaků
Rho-K	Rho kináza
ROS	reaktivní formy kyslíku
SHBG	globulin vážající pohlavní hormony
SR	sarkoplazmatické retikulum
TX	tromboxan syntáza
TXA ₂	tromboxan A ₂
VCAM-1	vaskulární buněčná adhezní molekula
VSM	vaskulární hladká svalovina
vWF	von Willebrandův faktor

2. ÚVOD A CÍL PRÁCE

Izoflavonoidy jsou přírodní rostlinné látky označované jako fytoestrogeny. Problematika fytohormonů a fytoestrogenů představuje rozsáhlou kapitolu farmakologie, která je dosud z velké části neprozkoumaná a nabízí spoustu otázek a zatím jen málo jednoznačných odpovědí. Tvoří součást alternativní medicíny tj. fytomedicíny a v poslední době se těší stále většímu zájmu jak odborné tak i laické společnosti. Téma fytohormonů a fytoestrogenů již pravidelně patří do programů odborných vědeckých kongresů a samozřejmě i do odborných a uznávaných časopisů. V současnosti přibývá studií na toto téma.

V posledních letech epidemiologické studie prokázaly, že asijská populace obyvatelstva prokazuje nižší výskyt kardiovaskulárních příhod, a to vedlo k zamyšlení, že některý environmentální faktor spojený s životními podmínkami ve východních zemích bude mít ochrannou funkci. Na základě této úvahy vzrostl velký zájem o prozkoumání potenciální role izoflavonoidů, polyfenolických rostlinných látek, v prevenci kardiovaskulárních onemocnění.

Kardiovaskulární choroby jsou hlavní příčinou morbidity a mortality u žen po menopauze v západních zemích. Významně zvyšující se riziko kardiovaskulárního onemocnění a progresse aterosklerózy u žen po menopauze je způsobeno pravděpodobně v důsledku poklesu hladiny endogenního estrogenu. Nicméně používání hormonální substituční terapie jako prevence kardiovaskulárních onemocnění u starších žen po menopauze nespĺnilo očekávání.

Z klinických studií lze usoudit, že fytoestrogeny poskytují antiaterosklerotické, antimenopauzální a antikancerogenní účinky a mají pozitivní efekt na osteoporózu. Fytoestrogeny mají také méně vedlejších účinků než užívání hormonální substituční terapie, nicméně je to různorodá skupina sloučenin s různými biologickými mechanismy působení *in vivo*.

Cílem této diplomové práce je shrnutí dosavadních poznatků o přírodních rostlinných látkách označovaných jako fytoestrogeny-izoflavonoidech a zmapování výsledků nejnovějších studií se zaměřením na kardiovaskulární účinky izoflavonoidů.

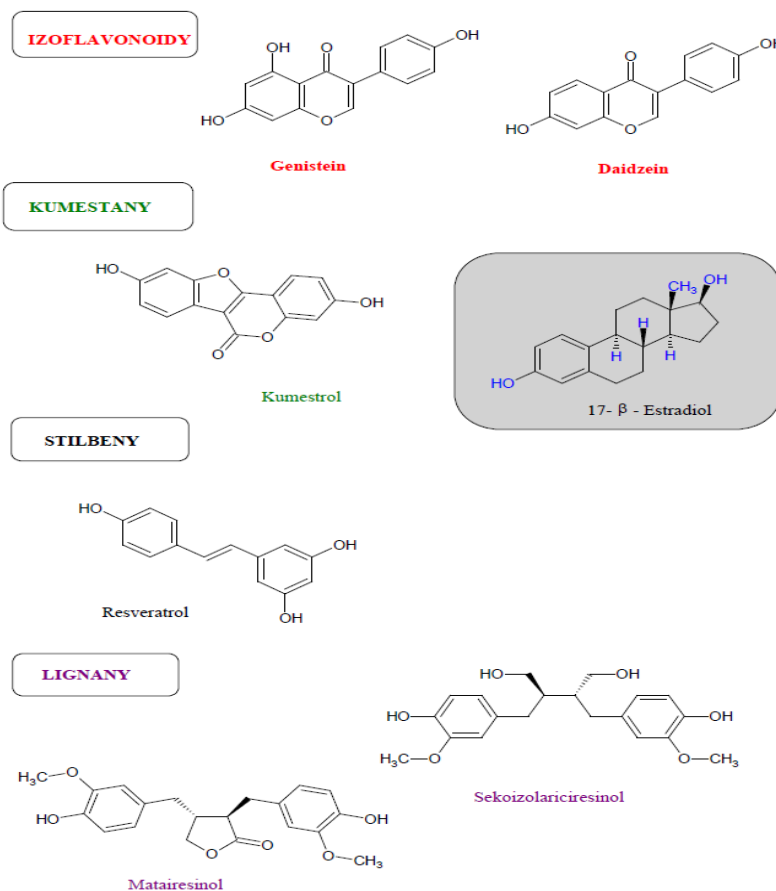
3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Izoflavonoidy

3.1.1. Klasifikace

Izoflavonoidy jsou přírodní rostlinné látky označované jako fyto-estrogeny. Jejich struktura je podobná 17- β -estradiolu, mohou se vázat na estrogenové receptory a vykazují tak slabé estrogení účinky. Hlavními představiteli fytoestrogenů jsou kromě zmiňovaných izoflavonoidů dále i kumestany, lignany a stilbeny.[1] (Obr. 1)

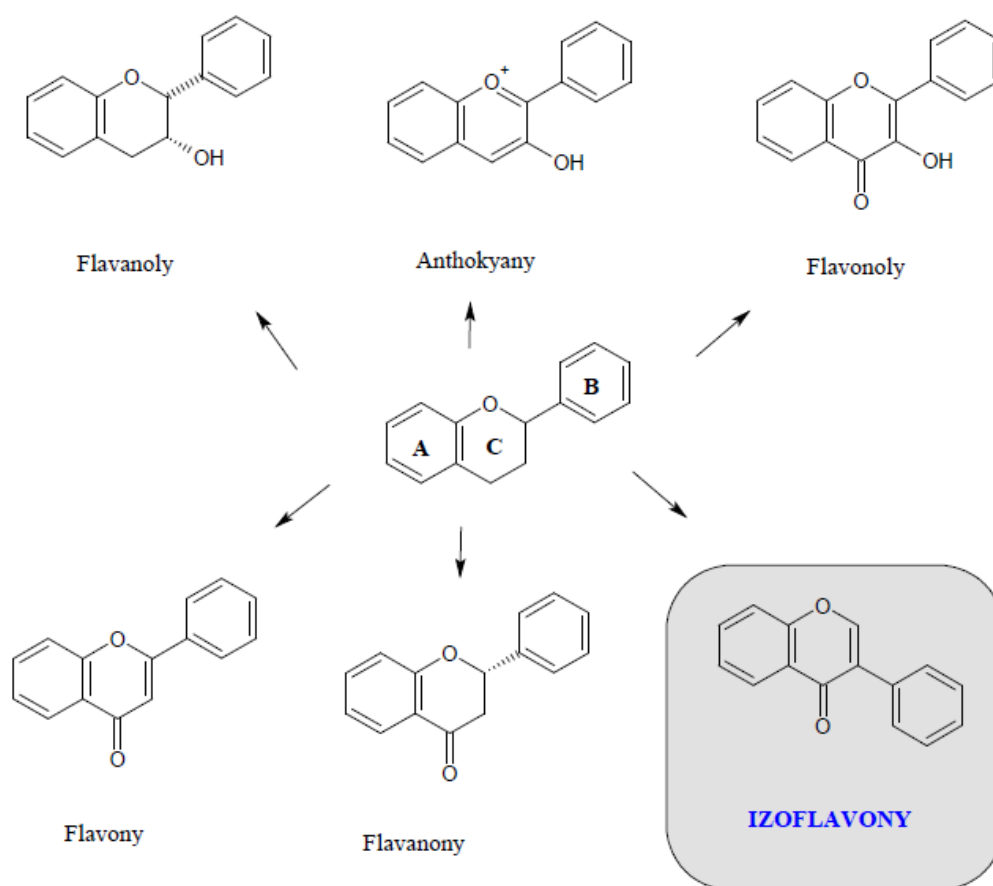
Obr. 1 : Zástupci fytoestrogenů



Zdroj: Dostupné z https://www.researchgate.net/figure/260440945_fig1_Fig-1-Different-classes-of-phytoestrogens-Isoflavones-lignans-coumestans-and [cit-2017-02-24]. Upraveno v programu ACD/ChemSketch.

Izoflavonoidy jsou z chemického pohledu polyfenolické sloučeniny odvozené z biosyntézy flavonoidů. Flavonoidy zahrnují několik podtříd jako např. anthokyany, flavony, flavonoly, flavanoly, flavanony a izoflavony a právě tyto podtřídy mají dietní význam. (Obr. 2)

Obr. 2 : Přehled podtříd flavonoidů



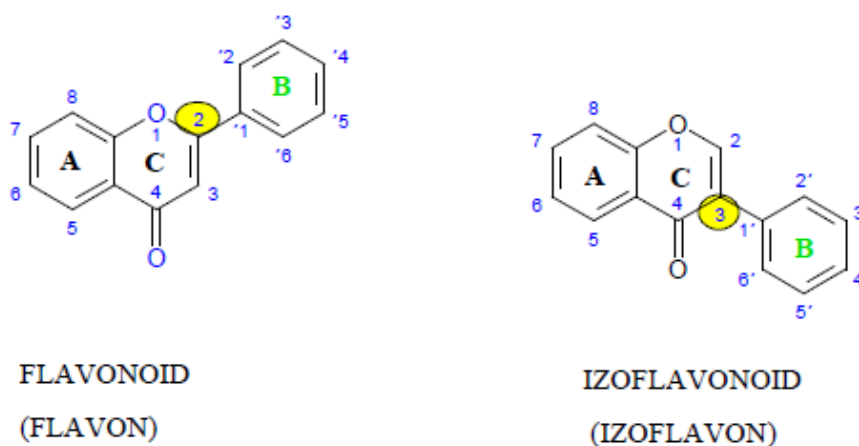
Zdroj: Dostupné z <http://lpi.oregonstate.edu/sites/lpi.oregonstate.edu/files/flavonoids-figure1-v4-700px.png> [cit-2017-02-24]. Upraveno v programu ACD/ChemSketch.

3.1.2. Biosyntéza a struktura izoflavonoidů

Flavonoidy i izoflavonoidy jsou odvozeny ze společného prekurzoru fenylalaninu. Jejich biosyntéza je součástí fenylpropanoidové dráhy přes prekurzory liquiritigenin nebo naringenin (oba patří mezi flavanony). [2,3]

Během syntézy izoflavonoidů dojde ke změně na patnácti-uhlíkovém skeletu flavonoidu a přemístění arylové skupiny (aromatického kruhu B) z polohy C-2 do polohy C-3 za účasti enzymu izoflavonsyntázy. Flavonoidy mají tedy strukturu odvozenou od 2-fenylchromenu a izoflavonoidy od 3-fenylchromenu. (Obr. 3) [2, 15]

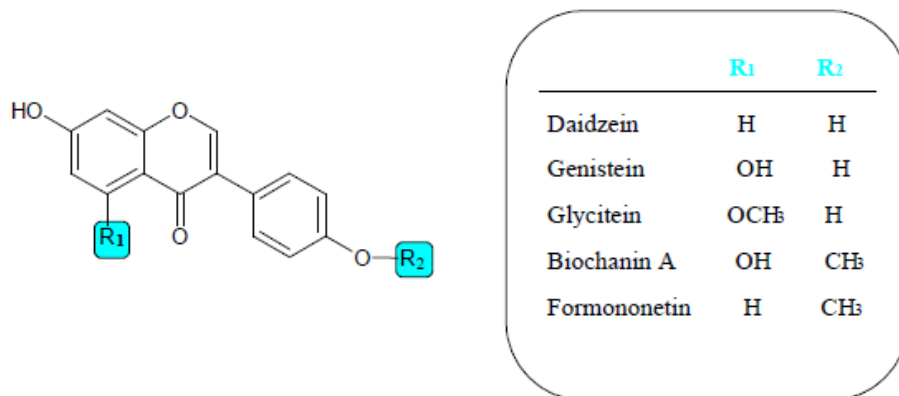
Obr. 3 : Struktura flavonoidu a izoflavonoidu



Zdroj: Upraveno dle [7] Upraveno v programu ACD/ChemSketch.

Mezi nejznámější izoflavonoidy, bioaktivní aglykony, patří genistein, daidzein, glycitein, formononetin a biochanin A. (Obr. 4) [4]

Obr. 4: Chemická struktura izoflavonoidů



Zdroj: Dostupné z <http://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/flavonoids#figure-8> [cit-2017-07-02]. Upraveno v programu ACD/ChemSketch.

3.1.3. Zdroje izoflavonoidů

Izoflavonoidy představují skupinu sekundárních metabolitů rostlin. Je známo více než 300 zdrojů, zejména se jedná o kořeny či semena. Nejvýznamnější zástupci jsou z čeledi *Fabaceae* (bobovité), ale známe i zástupce z rodu *Podocarpus sp.* (nohoplod), *Juniperus sp.* (jalovec), *Iris sp.* (kosatec) a dalších. Dosud bylo popsáno více než 800 látek.

Nejvýznamnějším zdrojem izoflavonoidů jsou semena a klíčky sóji luštinaté – *Glycine max* (L) MERR, (*Fabaceae*). (Obr. 5)

Rostlina *Glycine max* je kultivar a nenajdeme ho ve volné přírodě. Díky šlechtění je sója *Glycine max* místo popínavé, plazivé rostliny vzpřímená, keřovitá rostlina, dorůstající výšky 30-90 cm. Je známo asi 10 druhů rostliny rodu *Glycine* a jejím domovem je jihovýchodní Asie.

Dnes se pěstuje po celém světě a má velký ekonomický význam jako zdroj pokrmového tuku a vysoce proteinové stravy.

Obr. 5 : *Glycine max* (L) MERR, (*Fabaceae*). – sója luštinatá



Zdroj: Dostupné z <https://pxhere.com/es/photo/1226447> [cit-2018-03-05]

Semena (sójové boby) a produkty z nich připravené (Obr. 6), např. sójový olej či sójový protein (izolát), jsou nejbohatším zdrojem izoflavonoidů především genisteinu a daidzeinu. Jejich koncentrace jsou rozdílné vzhledem k různým druhům sójových bobů. Izoflavonoidy izolované ze sóji se ve formě standardizovaných extraktů různého složení používají při tlumení příznaků provázející úbytek estrogenu v organismu žen v menopauze. [2,4,13]

Obr. 6 : *Glycine max* (L) MERR, (*Fabaceae*). – semena sóji luštinaté



Zdroj: Dostupné z <https://pixabay.com/cs/photos/soybeans> [cit-2018-04-06]

Dalším zdrojem izoflavonoidů jsou květy jetele lučního, *Trifolium pratense* L.(*Fabaceae*) (Obr. 7), obsahující především formononetin a biochanin A.

Obr. 7 : *Trifolium pratense* L.(*Fabaceae*) - jetele luční, preparát připravený z jetele červeného



Zdroj: Dostupné z

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Trifolium_pratense0522.jpg

[cit-2018-03-14]; preparát připravený z jetele červeného- vlastní foto

Experiment PharmDr. Marie Kašparové, Ph.D. a PharmDr. Tomáše Siatky, CSc. (Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovi v Hradci Králové) zkoumal vliv kyseliny jasmonové a její účinek v kombinaci s vápníkem a verapamilem (blokátor kalciových kanálů) na produkci flavonoidů a izoflavonoidů v suspenzních kulturách *Trifolium pratense*. Kyselina jasmonová a jasmonáty jsou hlavními hormonálními regulátory rostlin. Účastní se v biosyntéze sekundárních metabolitů a mohou zvyšovat jejich produkci. Exogenně aplikovaná kyselina jasmonová a jasmonáty indukují de novo transkripci genu klíčového enzymu fenylpropanoidové dráhy. Výsledky ukázaly, že nejvyšší produkce flavonoidů a izoflavonoidů byla po 24 hodinové aplikaci kyseliny

jasmonové o koncentraci 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. a po ošetření buněk vysokým obsahem vápníku (10 mmol.l^{-1}). Po přidání všech koncentrací verapamilu (blokátoru kalciových kanálů) k suspenzním kulturám se snížila produkce flavonoidů a izoflavonoidů ve srovnání s kontrolní kulturou. Z toho je možné usoudit, že ionty vápníku hrají roli při kontrole tvorby sekundárních metabolitů. [25]

Podobně jako sójové izoflavonoidy se i preparáty z červeného jetele používají ve formě standardizovaných extraktů proti projevům doprovázejícím menopauzu.

Dalšími zdroji jsou *Genistae herba* – kručinková nať obsahující především izoflavonoidy genistin a genistein, dále *Puerariae lobatae radix* – kořen puerarie laločnaté, kořen kudzu, obsahující izoflavonoidy puerarin, daidzein, prenylované izoflavonoidy, kumestany, saponiny. [2,4,13]

Stále jsou izolovány další nové izoflavonoidy a určován jejich význam. Např. millewanin- F a furowanin-A z listů *Millettia taiwaniana* Hayata, u kterých byly zkoumány jejich účinky na růst buněk leukémie HL-60. Bylo zjištěno, že indukují apoptózu v těchto leukemických buňkách, a to prostřednictvím aktivace dráhy kaspáz. [21]

Další tři nové izoflavonoidy, millewanin- G a millewanin-H a furowanin-B, byly izolovány z listů *Millettia pachycarpa*. [22]

Z kmene kůry *Erythrina caffra* byly izolovány tři nové izoflavonoidy erykaffra A, erykaffra B a erykaffra C. [23]

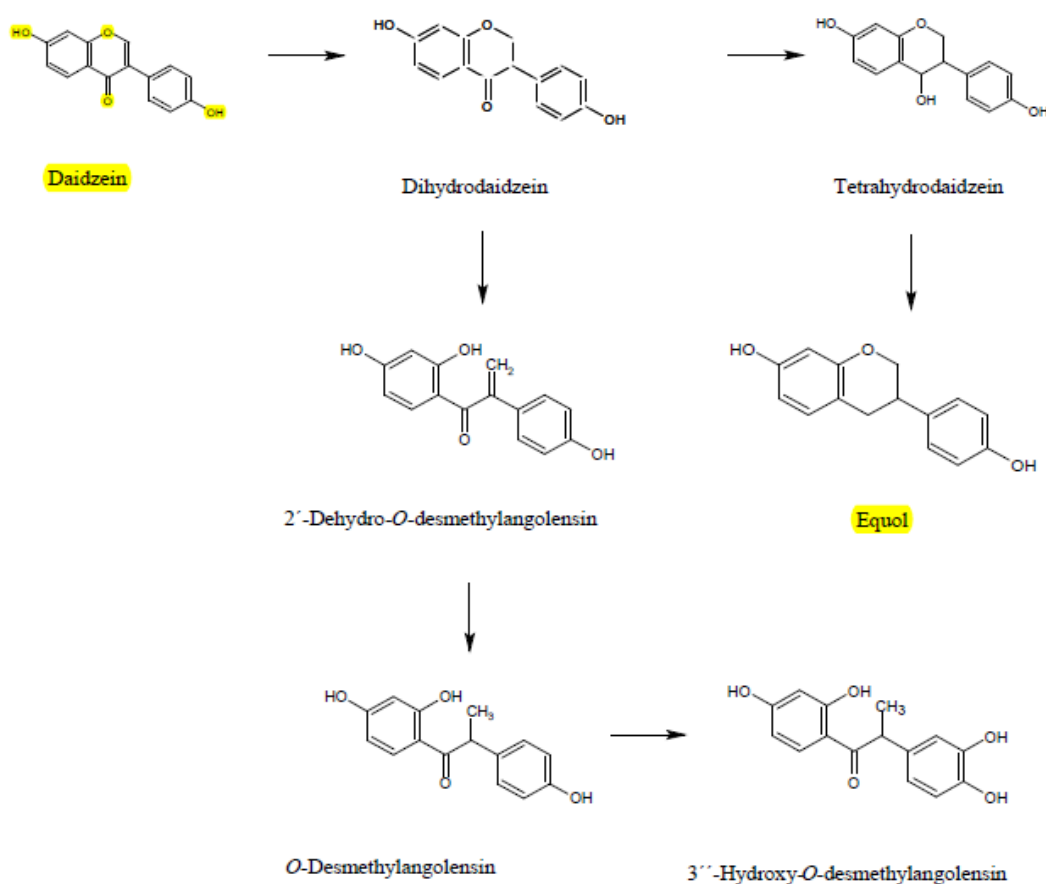
3.1.4. Metabolismus izoflavonoidů

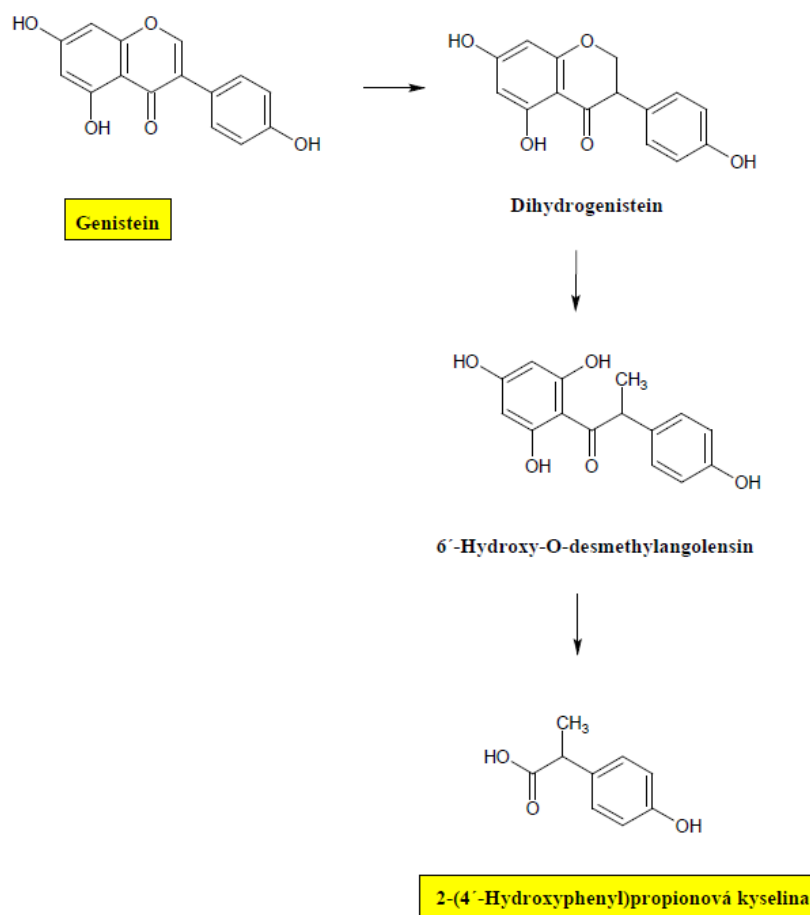
Metabolismus izoflavonoidů je poměrně složitý. V rostlinách se nachází izoflavonoidy v konjugované formě glykosidů (daidzin, genistin). Po konzumaci potravy obsahující izoflavonoidy dochází v tenkém střevě za účasti mikrobů k rozštěpení a k dalšímu metabolismu. Konjugované izoflavonoidy jsou hydrolyzovány na bioaktivní aglykony daidzein a genistein. Konkrétně daidzein je metabolizován

na equol nebo O-desmethyl-angolensin (O-DMA), zatímco genistein je metabolizován na p-ethyl phenol. (Obr. 8) [1,2,5]

Ovšem v plazmě jsou přítomny především konjugované formy, zatímco bioaktivní aglykony jsou přítomny buď pouze v nízké koncentraci nebo zcela chybí. I v tlustém střevě za účasti střevní mikroflóry může docházet k metabolizmu izoflavonoidů, a to na malé fenolické kyseliny, které se snadno vstřebávají a mají farmakologické účinky např.: mohou snížit krevní tlak. Z výsledků studie provedené Mgr. Najmanovou a kol. z Farmaceutické fakulty v Hradci Králové vyplývá, že velmi efektivní fenolickou sloučeninou na snížení krevního tlaku se jeví flavonoidní metabolit 3-(3-hydroxyfenyl)propionová kyselina (3HPPA). Toto bylo potvrzeno v *in vivo* experimentu u zdravých a hypertenzních potkanů. Mechanismem účinku byla zjištěna endotelem a NO (oxid dusnatý) indukovaná vaskulární relaxace.[37]

Obr. 8: Metabolismus daidzeinu a genisteinu





Zdroj: J. P. E. Spencer, A. Crozier, *Flavonoids and Related Compounds: Bioavailability and Function*, CRC Press Taylor & Francis Group, 2012 e-book, dostupné z <https://books.google.cz/books?id=30DNBQAAQBAJ&pg=PA212&lpg=PA212&dq=coldham+et+al.+xenobiotica+2002&source=bl&ots=KDA1RcrT-E55LzF4&hl=cs&sa=X&ved=0ahUKEwiEmaaZztjZAhVL2aQKHWfqBh4Q6AEILjA#v=onepage&q=coldham%20et%20al.%20xenobiotica%202002&f=false> ; str. 211-212; [cit-2018-03-26]; Upraveno v programu ACD/ChemSketch.

Všechny tyto prekurzory a metabolity vykazují estrogenní aktivitu. Po absorpci ze střeva aglykony vstupují do krevního oběhu, kde se mohou účastnit dalších reakcí, např.: metylace, demethylace, hydroxylace, nitrace, chlorace nebo jodace. Tyto metabolity jsou dále krví transportovány do jater, kde dochází ke konjugaci s kyselinou glukuronovou nebo v menší míře k sulfataci. Cestou žluče se dostávají zpět do střeva

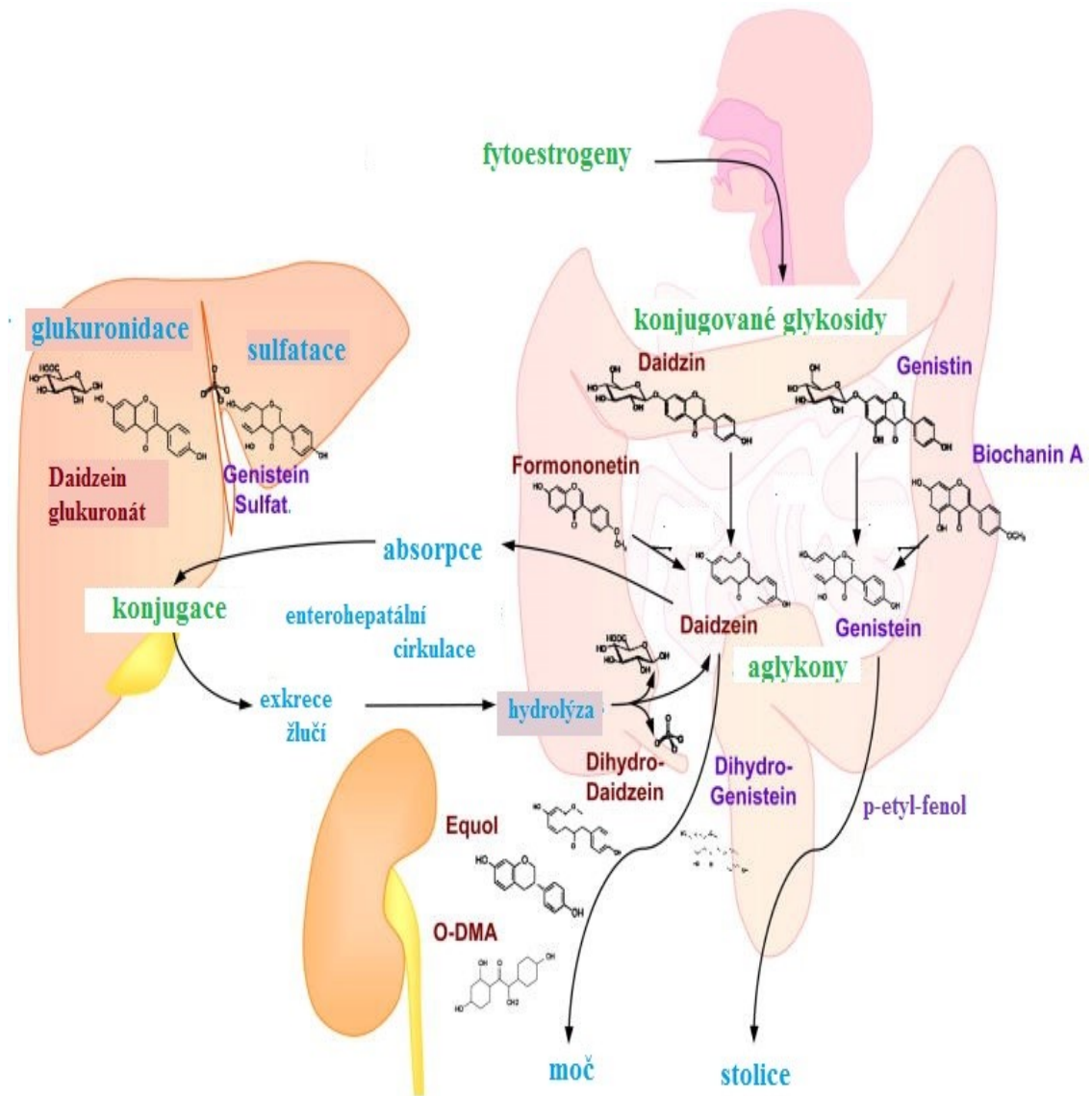
a vylučovány jsou stejně jako endogenní estrogény především ledvinami. (Obr. 9) [1,2,5,13]

Plazmatická koncentrace izoflavonoidů závisí na příjmu těchto látek ve stravě. Z mnoha studií je známo, že vyšší spotřeba sóji a dalších sójových produktů a tedy i vyšší příjem izoflavonoidů je u asijské populace vyšší než u populace západní Evropy a Ameriky. V této souvislosti je obecně přijímáno tvrzení, že vyšší příjem izoflavonoidů ve stravě souvisí s nižším výskytem kardiovaskulárních onemocnění, s nižším výskytem akutních příznaků klimakterického syndromu, osteoporózy, rakoviny prsu, endometria a tlustého střeva u asijské populace. [5,11,13]

Jak již bylo zmíněno, izoflavonoidy se nacházejí ve dvou chemických formách jako aglykony nebo konjugované ve formě glykosidů. Bylo prokázáno, že aglykony se u člověka absorbují rychleji a ve větším množství než jejich glykosidy. Produkty bohaté na izoflavon-aglykony mohou být účinnější při prevenci chronických onemocnění než produkty bohaté na glykosidy. [34,38]

Mezi další faktory ovlivňující metabolismus fytoestrogenů patří pohlaví, střevní tranzitní čas, střevní mikroflóra a individuální schopnost štěpit na equol. [1] Pouze jeden člověk ze tří je schopen produkovat equol, což je hlavní metabolit v krevním oběhu. V důsledku této skutečnosti, lze vysvětlit různé fyziologické vlastnosti těchto látek u různých lidí. [2,13]

Obr. 9 : Absorpce, metabolismus a vylučování izoflavonoidů



Zdroj: Upraveno dle [1]

3.1.5. Účinky izoflavonoidů

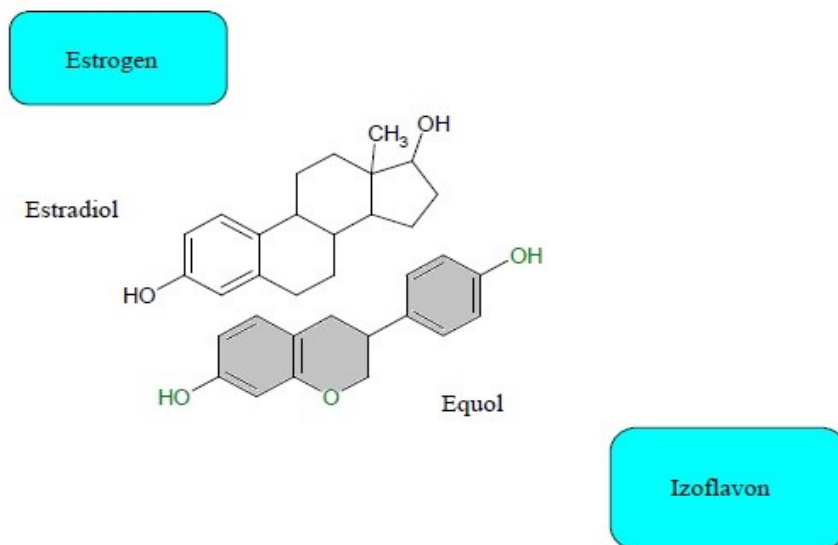
3.1.5.1. Estrogenní vlastnosti hormonů

Izoflavonoidy jsou nesteroidní sloučeniny s estrogenními i anti-estrogenními účinky. Jsou strukturně i funkčně podobné endogenním estrogenům především 17 β -estradiolu. (Obr. 10) Schopnost vazby na estrogenní receptor (ER) savčích buněk je známa více než 40 let. Estrogenní aktivita závisí na afinitě vazby izoflavonoidů na estrogenové receptory, a ta je určena chemickou strukturou. Afinita izoflavonoidů na estrogenní receptory je v porovnání s 17 β -estradiolem přibližně 100 krát menší, nicméně množství konzumovaných izoflavonoidů docílí biologických účinků. Izoflavonoidy a 17 β -estradiol jsou při vazbě na ER ve vztahu kompetice. V savčích buňkách existují dva typy estrogenních receptorů, a to ER- α a ER- β . Receptory se nacházejí v plazmatické membráně (tzv. membránové ER) a v buněčném jádře (tzv. nukleární ER) v širokém spektru tkání. V některých orgánech mohou být přítomny oba receptory v podobném množství, v jiných převažuje jeden či druhý receptor ve vyšší koncentraci. Tyto dva podtypy estrogenního receptoru se liší ve své C-koncové ligand vázající doméně a v N-terminální transaktivační doméně. Exprese ER- α je popsána ve většině cílových tkání jako jsou prsa, vaječníky, děloha, varlata a hypothalamus/hypofýza a játra. Exprese ER- β je popsána převážně u prostaty, ledvin, močového měchýře, kostí, plic, střev a u oběhového systému včetně srdce, endotelových buněk a krvinek. [5,9,11,19]

Novým estrogenním membránovým receptorem je receptor svázaný s G proteinem (GPER). GPER je široce distribuován v mozku, periferních tkáních a v cévním systému. GPER je lokalizován v endoplazmatickém retikulu a v plazmatické membráně a tato lokalizace se liší podle typu buňky. [1]

Estrogenní nebo anti-estrogenními účinky izoflavonoidů se projeví v závislosti na hladině estradiolu v krvi. Premenopauzální ženy mají vysoké hladiny estradiolu a u nich mohou izoflavonoidy působit jako antiestrogeny. U postmenopauzálních žen s nízkou hladinou estradiolu v krvi mohou mít izoflavonoidy estrogenní vlastnosti.

Obr. 10: Porovnání chemické struktury estradiolu a izoflavonu



Zdroj: Upraveno dle [20] Upraveno v programu ACD/ChemSketch.

Estrogenní (hormonální) aktivitu izoflavonoidů je možné využít při nedostatku endogenních estrogenů, zejména v období menopauzy. Ženy je mohou užívat při mírných obtížích spojených s klimakteriem a při osteoporóze. Studovány jsou také jejich účinky bránit v rozvoji hormonálně podmíněných nádorů prsu a prostaty. [4] Rutinní užívání hormonální substituční léčby u postmenopauzálních žen může být spojeno se zvýšeným výskytem rakoviny. Naopak užívání fytoestrogenů nezvyšuje riziko rakoviny prsu a dělohy a naopak mohou mít antineoplastické účinky, které souvisejí s potlačením angiogeneze, inhibicí aktivity tyrosinkinázy nebo s částečným antagonizmem estrogenových receptorů. [11]

3.1.5.2. Antineoplastické a antiproliferační vlastnosti izoflavonoidů

Epidemiologické studie, hodnotící vztah mezi příjmem izoflavonoidů ve stravě a výskytem rakoviny prsu, naznačují, že strava významně ovlivňuje výskyt rakoviny prsu. Asijské ženy mají vyšší příjem sóji a tudíž snížené riziko rakoviny prsu oproti

ženám v USA a v Evropě. I když tyto studie mají své limity, je obecně uznáváno, že vysoký příjem sóji je spojen s nižším rizikem rakoviny prsu u asijských žen. Další epidemiologické studie ukazují na nižší výskyt nejen malignit prsu, ale i endometria, prostaty, tlustého střeva, plic a žaludku v souvislosti s vyšší konzumací sóji. Látky obsažené v sóji, izoflavonoidy, jsou totiž schopny modulovat karcinogenezi a vykazovat antineoplastické účinky, které souvisí s potlačením angiogeneze. [5,10,11,13,16] Například genistein, který funguje mimo jiné jako inhibitor protein-tyrozin kinázy, inhibuje karcinogenezi v několika krocích. Inhibice růstu lidských rakovinových buněk je zprostředkována prostřednictvím modulace genů, které souvisejí s kontrolou buněčného cyklu a apoptózy. Dále má genistein antioxidační vlastnosti a je silným inhibitorem angiogeneze a metastáz. Angiogeneze je regulovaný komplexní proces. Nekontrolovatelná angiogeneze je považována za klíčový krok v oblasti rakovinového růstu, invazi a vzniku metastáz. Genistein hraje také důležitou roli v inhibici angiogeneze a vykazuje silné antiangiogenní vlastnosti. Ovšem je zapotřebí více studií k objasnění mechanismu antiangiogenního působení a další klinické studie k ověření užitečnosti v klinické praxi. Experimentální údaje zatím ukazují, že genistein by mohl být slibnou látkou v chemoprevenci nádorových onemocnění a také by mohl díky svým účinkům být využit jako doplněk k léčbě rakoviny. [10,15,16]

3.1.5.3. Účinky na kostní tkáň

Přestavba kostní tkáně probíhá v každém okamžiku a přesnost této přestavby je řízena hormony, především estrogenem, testosteronem a vitamínem D. Tyto hormony stimulují osteoblasty a inhibují osteoklasty. Závažný pokles estrogenu u postmenopauzálních žen vede ke zvýšení osteoklastové aktivity, ztrátám kostní hmoty, nárůstu pravděpodobnosti zlomenin a rozvoji osteoporózy. Osteoporóza je metabolická kostní choroba, která se projevuje jako redukce normálně mineralizované kostní hmoty s postižením mikroarchitektury kostní tkáně, která způsobuje zvýšení kostní fragility a zvýšenou pohotovost ke zlomeninám. Sójové izoflavonoidy mohou být prospěšné při prevenci a léčbě osteoporózy díky jejich podobnosti ve struktuře s estradiolem a mohou tedy sloužit jako potencionální náhrada za nedostatek estrogenů. Kvůli mnoha vedlejším nežádoucím důsledkům hormonální substituční léčby v menopauze, jako je

zvýšení rizika srdečních onemocnění, rakovina endometria, vaječníků a prsu či žilní trombóza, volí mnoho žen izoflavonoidy jako přírodní nutriční alternativu pro zmírnění menopauzálních symptomů a pro prevenci osteoporózy. Izoflavonoidy působí na kostní tkáň přes vazbu na ER- β . *In vitro* studie a studie na zvířatech naznačují pozitivní vliv izoflavonoidů na osteoblasty i osteoklasty, a to stimulací osteoblastů k tvorbě kosti a inhibicí osteoklastů k resorbci kostní hmoty. Jiné studie podporují příznivé účinky sójových izoflavonoidů na zvyšování kostní minerální hustoty, mechanickou pevnost kostí a inhibice přeměny kostí u žen po menopauze. Další studie neprokazují žádný významný vliv. Možným vysvětlením pro tuto nekonzistenci by mohla být již zmíněná individuální schopnost převedení daidzeinu na equol, různá biologická dostupnost mezi různými doplňky a potravinami a také různá i celoživotní expozice u různých skupin obyvatelstva např. u Asiatů je celoživotní příjem sójových izoflavonoidů vyšší. V důsledku těchto rozdílů zůstává nejasná bezpečnost dlouhodobého užívání a účinnost sójových izoflavonoidů bude třeba ještě potvrdit. [6,14]

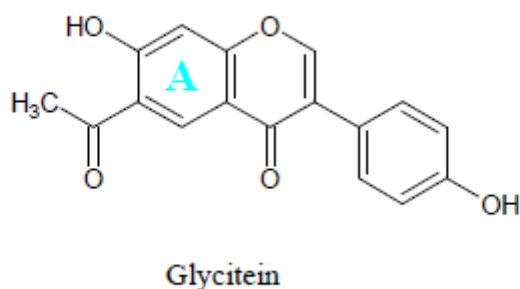
3.1.5.4. Antioxidační účinky izoflavonoidů

Izoflavonoidy se mohou chovat jako antioxidanty a chránit tak organismus před oxidačním stresem a s ním spojeným rozvojem chronických onemocnění. Buněčné poškození v důsledku oxidačního stresu přispívá k rozvoji kardiovaskulárních onemocnění prostřednictvím oxidace lipoproteinů o nízké hustotě (LDL, low-density lipoproteinů). Antioxidační vlastnosti izoflavonoidů nabízejí důležitý mechanismus, jehož prostřednictvím chrání organismus proti chronickým onemocněním a hrají také důležitou roli v požadavcích na složení potravin a potravinových a protinádorových přípravků. [6] Například výsledky analýzy antioxidační aktivity izoflavonoidů puerarinu a daidzeinu izolovaných z *Pueraria lobata* ukázaly stejnou antioxidační aktivitu jako vitamín E (α -tokoferol). [12]

Oxidativní stres může vést k produkci volných radikálů, které mohou poškodit lipidové membrány, proteiny či DNA báze. Jejich narušení vede k poškození DNA (deoxyribonukleová kyselina) a ke genomové nestabilitě. Mohou vyvolat jak

jednovláknové tak dvouvláknové zlomy DNA a spustit karcinogenezi. Glycitein vykazuje nízkou schopnost vychytávání volných radikálů ve srovnání s genisteinem a daidzeinem. Jako antioxidační schopnost glyciteinu je předpokládáno vychytávání volných radikálů mechanismem metylace hydroxylové skupiny na kruhu A. (Obr. 11)

Obr. 11: Chemická struktura izoflavonoidu glyciteinu.



Zdroj: Upraveno dle [20] Upraveno v programu ACD/ChemSketch.

Také genistein má antioxidační vlastnosti. Chrání buňky před reaktivními radikály kyslíku, které vychytává. Genistein také snižuje expresi genů, které souvisejí se stresem. Ovlivňuje genovou expresi enzymů, které reagují s antioxidy, např. kataláza, superoxidodismutáza a glutathionperoxidáza. Genistein je aktivnější antioxidant než daidzein, ale ještě lepší chelatační schopnost mají jednotlivé metabolity izoflavonoidů. Izoflavonoidy mohou snížit oxidaci lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL) a peroxidaci lipidů reakcí s lipidovými radikály [5]

Equol, jakožto hlavní aktivní metabolit izoflavonoidu daidzeinu, vykazuje antioxidační aktivitu a značnou vazodilatační aktivitu změřenou na izolované mozkové bazilární tepně *in vivo* u potkanů. Antioxidační aktivita byla hodnocena jako snížení hladiny superoxidu indukovaného NADPH (redukovanou formou nikotinamidadeninukleotidfosfátu). Aktivita equolu je podobná aktivitě daidzeinu,

u kterého ovšem není třeba střevní konverze na equol. Nicméně i tak by equol mohl představovat další terapeutickou látku při léčbě kardiovaskulárních chorob. [17]

Antioxidační aktivita izoflavonoidů se může zvýšit jejich nitrací nebo chlorací. Chlorované nebo nitrátované metabolity zvyšují svoji inhibiční aktivitu vůči oxidaci LDL nad genisteinem a daidzeinem. [2]

Mechanismus akumulace fenolických látek v semenech sóji není zcela znám a cílem je ho studovat. A právě analýzou semen sóji se ve své studii zabývali Man-Wah Li a kolektiv (2016). [18]

Studie zahrnovala analýzu 14-ti „divokých“ a 16-ti kultivovaných druhů sójových semen a ukázalo se, že semena z kultivovaných druhů mají nižší obsah antioxidantů, celkových fenolických látek i celkových flavonoidů. Tento rozdíl by pravděpodobně mohl být nezamýšleným důsledkem šlechtění a lidského výběru. Při těchto procesech mohlo dojít ke ztrátě užitečné genetické informace v porovnání s původní sekvencí genomu divoké sóji. V poslední době se zjišťuje, že šlechtění má své limity.[18] Koncem 19. století se o sóju začal zajímat americký zemědělský průmysl a společně s kanadskými vědci zahájil v roce 1930 program vedoucí ke šlechtění sóji pomocí selektivního křížení. Vznikly tak kultivary odlišné od původní asijské rostliny. Měly vyšší výnosy, vyšší obsah tuku a vylepšenou skladbu proteinů. USA se s novými odrůdami stalo vedoucím producentem sóji ve světě. Nové odrůdy sóji se rozšířily do mnoha zemí Asie, Afriky a Latinské Ameriky. [13]

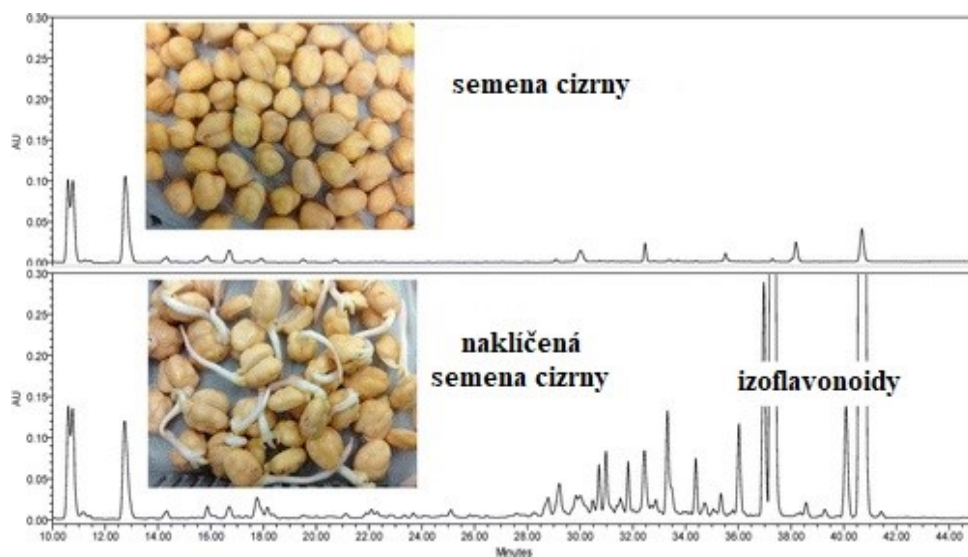
Na obsah izoflavonoidů v semenech a posléze v potravinách má vliv i mnoho dalších faktorů včetně odrůdy rostlin, podmínek růstu a prostředí, způsobu zpracování a skladování a v neposlední řadě i způsob analýzy.

Dále byly na chromozomech sóji zkoumány lokusy QTL (Quantitative Trait Loci; lokusy kvantitativních znaků), u kterých se předpokládá, že obsahují polymorfizmy mající příčinný vztah k vývoji kvantitativních znaků, v tomto případě k obsahu antioxidačních látek. Byl identifikován QTL na chromozomu 19, který upravuje obsah antioxidačních látek v semenech sóji. Řešitelé studie zjistili překrývající se genomové oblasti obsahující QTLs, které regulují obsah antioxidantů, fenolických

látek a flavonoidů v semenech sóji. Podrobnější analýza polymorfizmů a jejich rolí bude předmětem dalších výzkumů. [26]

S ohledem na antioxidační kapacitu a celkový obsah fenolických látek v semenech luštěnin byl zkoumán také vliv klíčení a bylo zjištěno, že klíčení zvýšilo, jak celkový obsah fenolických látek, tak i antioxidační kapacitu u většiny zkoumaných semen. Až 100násobně se zvýšil obsah izoflavonoidů konkrétně formononetinu a biochaninu A u semen cizrny. V porovnání s klíčícími semeny sóji byl celkový obsah izoflavonoidů u semen klíčící cizrny 5krát vyšší. Z výsledků této studie vyplývá, že klíčící semena cizrny mohou sloužit jako funkční potravina bohatá na izoflavonoidy. (Obr. 12) [35]

Obr. 12: Porovnání obsahu izoflavonoidů u semen a klíčících semen cizrny.



Zdroj: Upraveno dle [35] (použité metody: HPLC-PDA a LC-ESI-MS)

3.1.5.5. Účinky izoflavonoidů na klimakterický syndrom

U většiny klimakterických žen se často vyskytují vazomotorické příznaky, a to noční pocení, návaly horka a s tím související poruchy spánku, bušení srdce a pocitý úzkosti. Tyto klimakterické potíže jsou v návaznosti na estrogenní deficit, který nastane u žen po menopauze.

Pozitivní efekt na klimakterický syndrom u žen po menopauze se jeví po suplementaci izoflavonoidy. Touto tematikou se zabývali autoři Bolaños R., Del Castillo A. , Francia J. a publikovali souhrnnou studii s cílem posoudit, jestli mají izoflavonoidy, tj. sója a extrakty nebo koncentráty ze sóji připravené, ve srovnání s placebem účinky na snížení výskytu návalů horka u klimakterických žen. Autoři vybrali a analyzovali 19 randomizovaných, placebem kontrolovaných studií, kterých se účastnily postmenopauzální ženy mající klimakterické vazomotorické příznaky. Podle typu užívaných sójových izoflavonoidů byly rozděleny do podskupin na ženy užívající „sójový výživový doplněk“, „sójový extrakt“ nebo „izoflavonoidový koncentrát“ (genistein nebo daidzein). Celkové výsledky i výsledky podle jednotlivých podskupin dle typu použitého doplňku ukázaly významnou tendenci ve prospěch sóji. I přes to je podle autorů obtížné stanovit jednoznačné stanovisko vzhledem k vysoké heterogenitě zjištěné v jednotlivých studiích. [24]

K léčbě menopauzálních poruch jsou vhodné kromě sójových preparátů i extrakty z červeného jetele. I ty mohou snižovat klimakterické potíže, kterými jsou návaly horka, pocení, poruchy spánku, zlepšovat vaginální vlhkosti a i snížit riziko rakoviny prsu. [13]

3.2 Kardiovaskulární účinky izoflavonoidů

V posledních letech epidemiologické studie prokázaly, že asijská populace obyvatelstva prokazuje nižší výskyt kardiovaskulárních příhod a to vedlo k zamyšlení, že některý environmentální faktor spojený s životními podmínkami ve východních zemích bude mít ochrannou funkci. Na základě této úvahy vzrostl velký zájem o prozkoumání potenciální role izoflavonoidů, polyfenolických rostlinných látek, v prevenci kardiovaskulárních onemocnění. [32]

3.2.1. Ateroskleróza

Příčinou aterosklerózy neboli kornatění tepen je ukládání tukových látek, především oxidačně modifikovaných LDL lipoproteinů, do cévní stěny a to vede ke vzniku tzv. aterosklerotických plátů (ateromů).

Vratným předstupněm aterosklerózy je dysfunkce endotelu. Při poruše cévního endotelu dochází k průniku oxidačně modifikovaných LDL částic (ox-LDL) z krve do intimy cévní stěny a jejich hromadění. Oxidační modifikace částic LDL je považována za nezbytnou podmínku pro pohlcení LDL částic makrofágy v arteriální stěně. Přírodní lipofilní antioxidanty mohou teoreticky chránit LDL před oxidací. LDL částice jsou za normálních podmínek vychytávány receptory v játrech, ale pokud dojde k jejich oxidačnímu poškození, jsou vychytávány makrofágy a ve formě pěnových buněk ukládány do cévní stěny. Dochází také k aktivaci monocytů, jejich přechodu z krve do intimy cévní stěny a přeměně právě na makrofágy, které se dále mění v pěnové buňky vychytáváním ox-LDL přes scavengerové receptory. Postupné hromadění pěnových buněk, následná kalcifikace, proliferace buněk hladkého svalstva a fibrotizace vede ke vzniku fibroateromu. V důsledku tohoto procesu dochází k postupnému zúžení cévy, snížení její pružnosti až k ruptuře a rozvoji trombózy, omezení průtoku krve až k úplnému uzávěru cévy. To vše vede ke klinickým projevům a onemocněním např. infarkt myokardu, cévní mozkové příhodě, ischemické chorobě srdeční nebo ischemické chorobě dolních končetin.

Existuje mnoho rizikových faktorů, které ovlivňují a urychlují aterosklerózu. Můžeme je dělit na neovlivnitelné (věk, pohlaví – u žen protektivní vliv estrogenů, genetika) a ovlivnitelné (hypertenze, zvýšený celkový cholesterol a LDL, obezita, kouření, fyzická inaktivita, dietetické návyky, diabetes mellitus, oxidační stres, zvýšený homocystein, zvýšené zánětlivé markery a další). Tyto faktory jsou ovlivnitelné farmakologicky i nefarmakologicky. A právě izoflavonoidy by mohly mít pozitivní vliv na průběh aterosklerózy a riziko kardiovaskulárních onemocnění.

Progrese aterosklerózy a riziko kardiovaskulárního onemocnění

Kardiovaskulární choroby jsou hlavní příčinou morbidity a mortality u žen po menopauze v západních zemích. Významně zvyšující se riziko kardiovaskulárního onemocnění a progrese aterosklerózy u žen po menopauze je způsobeno pravděpodobně v důsledku poklesu hladiny endogenního estrogenu. Objevují se také další perimenopauzální příznaky jako návaly horka, noční pocení, úbytek kostní hmoty. Odborníci předpokládali, že hormonální substituční terapie zabrání rozvoji aterosklerózy u žen po menopauze. Nicméně používání hormonální substituční terapie jako prevence kardiovaskulárních onemocnění u žen po menopauze nesplnilo očekávání. [1]

Z experimentálních studií vyplývá, že fytoestrogeny mají příznivé účinky na endotelové buňky, hladký sval cév a extracelulární matrix. Dále mohou také ovlivňovat další patofyziologické vaskulární procesy, jako je lipidový profil, angiogeneze, zánět, poškození tkání reaktivními formami kyslíku, markery oxidačního stresu. Tyto příznivé účinky fytoestrogenů by mohly zpomalit progresi aterosklerózy. [28]

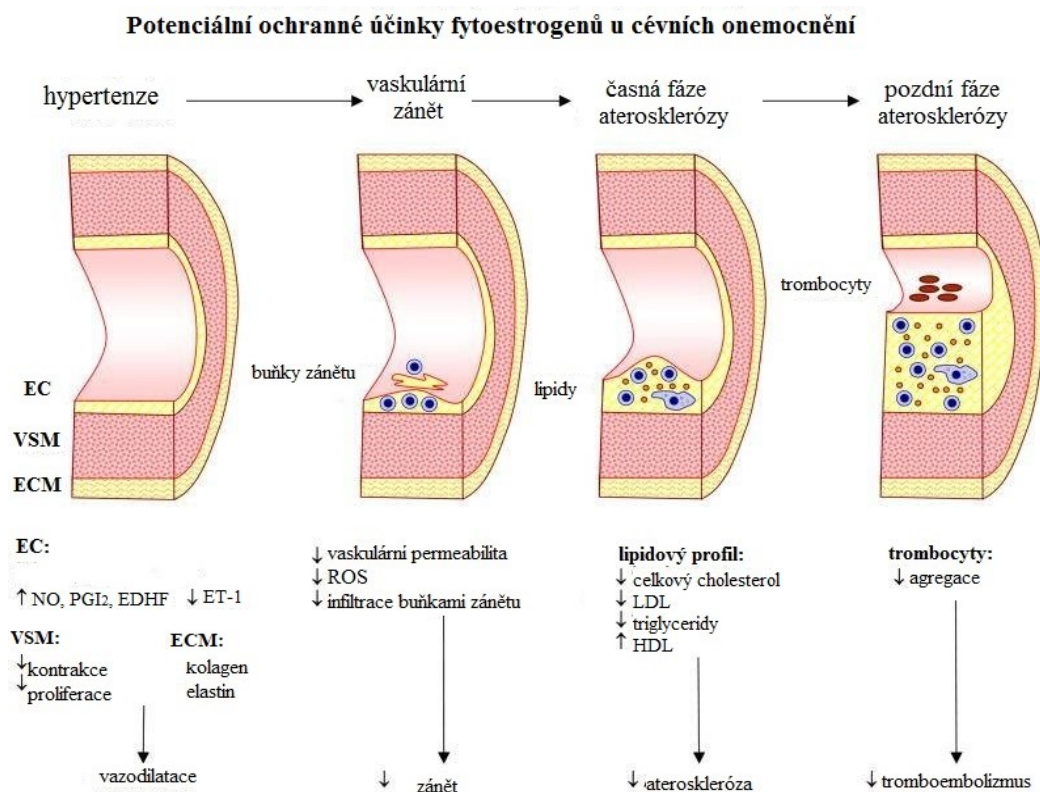
Jako experimentální modely mohou být použity endotelové buňky, buňky hladké svaloviny cév, izolované tepny nebo živá zvířata včetně opic. V klinických studiích je kladen důraz na lipidový profil a oxidaci lipidů, na inzulinovou rezistenci, na zástavu krvácení, na změny zánětlivých faktorů a na ukazatele endoteliálních funkcí včetně metabolitů oxidu dusnatého a prostacyklinu. [36] Studie ukazují, že izoflavo-

noidy mají svoji roli při aktivaci endoteliální syntetázy oxidu dusnatého (eNOS), inhibici proliferace buněk, zvyšování prostacyklinu a při relaxaci cév.

3.2.2. Izoflavonoidy a ateroskleróza

Ateroskleróza je vaskulární multifaktoriální onemocnění. Předstupněm aterosklerózy je dysfunkce cévního endotelu, na kterém dochází k zánětlivým reakcím. Dále dochází k ukládání ox-LDL, proliferaci buněk hladké svaloviny a kolagenu, aktivaci a agregaci trombocytů a vzniku fibroateromu. [1] (Obr. 13)

Obr. 13: Potenciální ochranné účinky fytoestrogenů u cévních onemocnění



PGI₂ – prostacyklin, ET-1 – endotelin, EC - endotelová buňka, NO - oxid dusnatý, ROS – reaktivní formy kyslíku, EDHF- endotelový hyperpolarizační faktor, ECM – extracelulární matrix, VSM – vaskulární hladká svalovina, LDL- lipoprotein o nízké hustotě, HDL- lipoprotein o vysoké hustotě

Zdroj: Upraveno dle [1]. Zvýšení vaskulárního tonu vede k hypertenzi. Hypertenze vede k poškození cév a rozvoji zánětu. Následuje infiltrace zánětlivých buněk, ukládání lipidů a rozvoj aterosklerózy. Postupně dochází k zúžení lumenu cévy a agregaci trombocytů. Fytoestrogeny navozují vazodilataci a zlepšují hypertenzi. Také snižují vaskulární permeabilitu, vychytávají reaktivní formy kyslíku (ROS) a snižují infiltraci zánětlivých buněk. Také zlepšují lipidový profil a snižují agregaci trombocytů. Celkově tím zpomalují progresi aterosklerózy.

Estrogeny mají protektivní vliv na rozvoj aterosklerózy. Vazbou na estrogení receptory na endotelových buňkách inhibují proliferaci cévní hladké svaloviny, indukují vazodilataci, zmírňují vaskulární zánět snížením exprese buněčné adhezní molekuly (CAM) a tím dochází ke snížení adheze monocytů a makrofágů. Avšak tyto anti-aterogenní účinky závisí na věku pacienta a stupni aterosklerózy. Svoji roli hraje i pohlaví pacienta. U postmenopauzálních žen dochází k přirozenému poklesu estrogenů a nárůstu rizika aterosklerózy. [1]

Možností zabránění nárůstu rizika rozvoje aterosklerózy u žen po menopauze se zabývala klinická studie zaměřená na potencionální příznivé účinky rostlinných látek, které by mohly představovat slibné léky pro anti-aterosklerotickou léčbu.

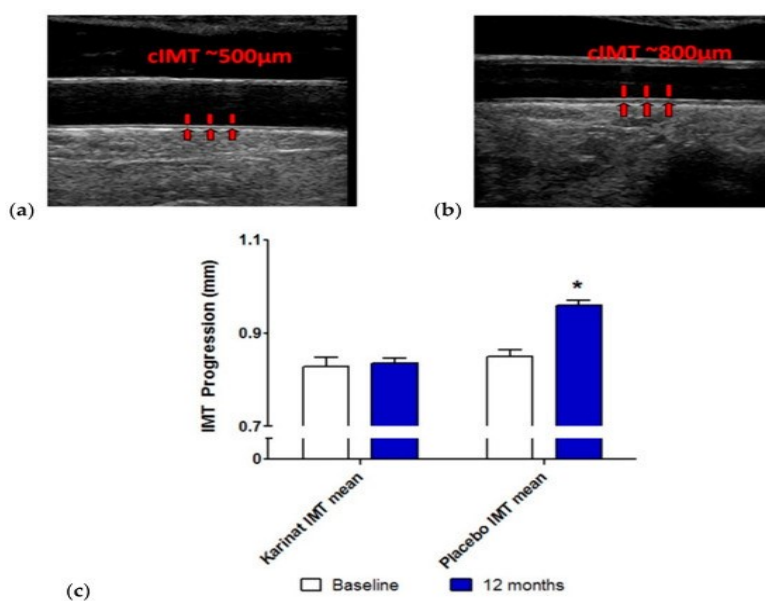
Cílem této dvojitě slepé, placebem kontrolované klinické studie bylo zjistit vliv bylinného přípravku bohatého na izoflavonoidy na progresi aterosklerózy u žen po menopauze. Studie se zúčastnilo 157 zdravých asymptomatických žen po menopauze (věk 65 ± 6) a studii dokončilo 131 z nich. Byly rozděleny do dvou skupin, 77 resp. 57 ve skupině užívající rostlinný přípravek bohatý na izoflavonoidy (Karinat) a 80 resp. 74 ve skupině užívající placebo. Rostlinný přípravek obsahoval izoflavonoidy z hroznových semínek, lístky zeleného čaje, prášek z šišek chmele a česnekový prášek. [27] Už předchozí studie kolektivu Nikitina et al. prokázala, že fytoestrogeny z hroznových semínek mohou přispívat ke snížení výskytu chronických onemocnění, kardiovaskulárních onemocnění, neurodegenerativních onemocnění a i rakoviny. [39]

Fytoestrogeny z hroznových semínek mohou být považovány za potenciální komponentu pro rozvoj přírodních preparátů pro prevenci aterosklerózy u žen po menopauze. [40,41]

Obě skupiny se nelišily věkem, body mass indexem (BMI), kouřením, rodinnou anamnézou onemocnění koronárních tepen, hladinou triglyceridů a lipoproteinů o vysoké hustotě (HDL). Výrazně vyšší byly hladiny systolického a diastolického krevního tlaku ve skupině užívající placebo. Ve skupině příjemců rostlinného přípravku byly vyšší hladiny lipoproteinů o nízké hustotě (LDL). Jako marker subklinické aterosklerózy byla měřena tloušťka intima media krčních tepen (cIMT) pomocí ultrazvuku. cIMT je významný a nezávislý prediktor kardiovaskulárních nemocí. Umožňuje neinvazivní hodnocení progresse časné aterosklerózy u asymptomatických pacientů.

Po 12ti-měsíčním sledování bylo zjištěno, že průměrná cIMT progresse byla pomalejší u skupiny žen užívajících rostlinný přípravek bohatý na izoflavonoidy než u skupiny žen užívajících placebo. U žen užívajících přípravek bohatý na izoflavonoidy nebyl pozorován významný nárůst průměrné cIMT ani růst aterosklerotického plátu. Ve skupině žen užívajících placebo byla progresse aterosklerózy i růst aterosklerotického plátu vyšší. Významný rozdíl cIMT byl zaznamenán mezi skupinou žen užívajících Karinat a skupinou žen užívajících placebo po 12 měsících. (Obr. 14)

Obr. 14: Obrazy ultrazvuků a hodnoty cIMT na začátku a po 12 měsících sledování.



(a) Normal cIMT asymptomatických žen po menopauze;

(b) Abnormálně zvýšená cIMT asymptomatických žen po menopauze;

(c) Dynamika cIMT, u žen užívajících na izoflavonoidy bohatý bylinný přípravek Karinat a u žen užívajících placebo; otevřené sloupce – výchozí hodnota (baseline); vyplněné sloupce - po 12-ti měsících sledování. Údaje jsou uvedeny jako průměr. * představuje významný rozdíl mezi výchozím stavem a navazujících hodnot cIMT; $p < 0,05$.

Zdroj: Upraveno dle [27]

Také došlo ke snížení celkového cholesterolu a LDL u skupiny žen užívajících rostlinný přípravek bohatý na izoflavonoidy. Výsledky této studie naznačují, že užívání rostlinného přípravku bohatého na izoflavonoidy u žen po menopauze může pozitivně ovlivnit tvorbu nových aterosklerotických plátů a snížit progresi již vytvořených, tj. přípravek vykazuje antiaterosklerotické účinky. Ze studie tedy vyplývá, že pro tento bylinný přípravek existuje potenciál pro prevenci aterosklerózy u žen po menopauze. Limitem této studie je, že přípravek je kombinace různých izoflavonoidů s různými účinky, které je třeba dalšími studiemi ověřit. Studie má svá omezení, která se týkají velikosti sledovaného souboru a také doby trvání. [27]

Fytoestrogeny mohou ovlivňovat každý jednotlivý děj, který přispívá k rozvoji aterosklerózy: nástup hypertenze, rozvoj vaskulární zánětlivé reakce, poškození endotelu, oxidaci LDL, proliferaci buněk hladké svaloviny a kolagenu a aktivaci a agregaci trombocytů.

3.2.3. Působení izoflavonoidů na krevní tlak, na obezitu.

Chronický vysoký krevní tlak nebo hypertenze jsou rizikovým faktorem pro kardiovaskulární systém. Ženy s hypertenzí mají čtyřnásobně vyšší riziko ve srovnání s normotenzními ženami. Vztah mezi krevním tlakem a rizikem kardiovaskulárního onemocnění je lineární, to znamená, že dojde-li k zvýšení krevního tlaku, dojde s vyšší pravděpodobností k infarktu myokardu nebo srdečnímu selhání, mrtvici či ledvinnému selhání. Pokud je zjištěn tlak krve nad stanovené hranice, je nejdříve doporučena 6-ti měsíční změna stravy i životního stylu ještě před nasazením antihypertenzní léčby. Incidence koronárního srdečního onemocnění a hormonálně závislých nádorů (nádory prsa a prostaty) je nižší v Asii než v západních zemích a předpoklad je, že je tu souvislost s konzumací sóji. Cílem mnoha studií je zjistit, jestli přírůstek sójového proteinu by mohl být benefitem pro zdraví včetně kardioprotektivního účinku a z dlouhodobého hlediska by jeho užívání bylo bezpečné.

Tento cíl si kladla studie provedená pracovní skupinou Bloedona et al. [42], jejíž cílem bylo provést bezpečnostní a farmakokinetickou studii purifikovaných nekonjugovaných izoflavonoidových přípravků (genisteinu, daidzeinu, glycinu) extrahovaných ze sóji u postmenopauzálních žen. Studie se zúčastnilo 24 zdravých žen po menopauze ve věku 46-68 let. Byly provedeny kinetické studie během prvních 24 hodin a studie toxicity po 24 hodinách a 3, 6, 14 a 30 dnech po podání izoflavonoidových přípravků. Jednotlivé dávky purifikovaných nekonjugovaných izoflavonoidových přípravků byly v množství, které přesahují normální dávku izoflavonů ve stravě. Jejich podání vykazovalo minimální klinickou toxicitu. Farmakokinetické údaje ukazují, že příjem dávek izoflavonoidů, které jsou 2 nebo 3 násobkem běžného denního příjmu ve stravě by nemělo vést k hromadění těchto izoflavonoidů. [42]

V epidemiologické studii Welty et al. byl posuzován efekt sójových izoflavonoidů obsažených ve stravě na krevní tlak. Mnoho dalších epidemiologických studií naznačuje, že osoby, které často konzumují sóju, mají nízkou incidenci kardiovaskulárních onemocnění. Zvýšení krevního tlaku u jedinců ve věku 40-70 let

zvyšuje riziko kardiovaskulárních chorob. Těto randomizované kontrolované studie se účastnilo 60 vybraných zdravých postmenopauzálních žen. Byly zařazeny do projektu Therapeutic Lifestyle Changes a rozděleny do dvou skupin. Obě skupiny žen dodržovaly po dobu 8 týdnů přesně stanovenou dietu. Jedna skupina měla dietu obohacenou o 25 g sójových proteinů a 101 mg aglykonových izoflavonoidů, druhá skupina o 25 g non-sójových proteinů (genistein, daidzein, glycitein). Podle hodnot systolického a diastolického tlaku byly ženy rozděleny do dvou skupin: skupina normotenzních žen a skupina hypertenzních žen. Kromě tlaku byly dále měřeny celkové lipidy, LDL, HDL, triglyceridy a apolipoprotein.

Výsledky této studie naznačují, že dieta obohacená o sójový protein u obou skupin žen zlepšuje systolický i diastolický tlak a u skupiny hypertenzních žen navíc snižuje i hladinu LDL cholesterolu. Z výsledků studie tedy lze usuzovat na kardioprotektivní účinek sóji. [43]

K podobným výsledkům dospěla i další studie. [44] V této 6ti-měsíční, dvojité zaslepené, randomizované, placebem kontrolované studii byl zkoumán účinek equolu na krevní tlak a vaskulární funkci u postmenopauzálních žen s prehypertenzí nebo časnou neléčenou hypertenzí, které nejsou producenti equolu. Equol je účinnější metabolit daidzeinu, ale ne každý jedinec dokáže daidzein štěpit. Tedy schopnost přeměny daidzeinu na equol intestinálním traktem je individuální pro každého jedince a tudíž je to i limitem pro klinické studie. Klinické studie používající sójové proteiny obsahující mimo jiné daidzein vedly k nekonzistentním výsledkům. Předpokládá se, že rozdíly ve výsledcích mohou být způsobeny právě individuální schopností jedinců tvořit equol. Equol se vyskytuje jako dvě enantiomerní formy, S-equol a R-equol. In vivo se vyskytuje pouze S-equol a má lepší biologickou dostupnost než daidzein. Equol má natriuretické a vazorelaxační vlastnosti tím, že zvyšuje transkripci eNOS, vede ke zvýšení renálního průtoku krve, vylučování sodíku a útlumu hypertenze. Equol představuje potencionální farmaceutický nebo nutraceutický produkt jako prevence hypertenze a kardiovaskulárních onemocnění. [44]

Na regulaci kardiovaskulárních funkcí včetně ovlivnění krevního tlaku se podílí také hormon leptin. Hormon leptin má v organismu četné funkce. Je sekretován adipocyty a jeho hlavním úkolem je regulace energetického metabolismu a regulace

chuti k jídlu. Bylo prokázáno, že zvýšená hladina cirkulujícího leptinu je spojena s obezitou a obezita je silným rizikovým faktorem rozvoje kardiovaskulárních onemocnění. Leptin se váže na leptinové receptory, které jsou exprimovány na buňkách hladkého svalstva a také na aterosklerotickém plátě a podporuje tak aterogenní procesy včetně endoteliální dysfunkce, proliferace a migrace buněk hladkého svalstva, zánětu a agregace trombocytů. Proto inhibice aterogenních účinků leptinu může představovat terapeutický zásah do vývoje aterosklerózy při obezitě. Bylo zjištěno, že genistein byl schopen potlačit aterogenní účinky vyvolané leptinem *in vitro* i *in vivo*, a proto je to slibný kandidát na klinické použití. [45]

3.2.4. Působení izoflavonoidů na vaskulární záněty

Na počátku rozvoje aterogeneze hraje důležitou roli zánětlivá reakce vznikající v cévní stěně. Pod vlivem zánětlivých stimulů migrují do poškozeného místa leukocyty z krevního oběhu. Pro jejich usnadnění průniku do poškozených infikovaných míst je nutné jejich zachycení na povrchu endotelových buněk cév (tzv. rolling a adheze), prostoupení mezi jednotlivými endotelovými buňkami (diapedéza neboli extravazace) a chemotaktický pohyb do místa poškození. Na povrchu endotelových buněk pod vlivem zánětlivých stimulů dochází k exprimaci adhezních molekul ICAM-1 (intercelulární adhezní molekula) a VCAM-1 (vaskulární buněčná adhezní molekula). Patří mezi zástupce imunoglobulinové skupiny, jsou to transmembránové glykoproteiny a podílejí se na ireverzibilní vazbě leukocytů k endotelu. Expres těchto adhezivních molekul se uplatňuje v patogenezi aterosklerózy. ICAM-1 a VCAM-1 jsou sérové aterogenní proteiny, které ovlivňují průnik leukocytů do stěny cév.

Colarcurci et al. publikovali v časopise *Menopause* výsledky účinků sójových izoflavonoidů na endoteliální funkci u zdravých žen po menopauze. Randomizované studie se zúčastnilo 60 žen, které byly rozděleny do dvou skupin, jedna skupina žen užívala tablety s přídatkem izoflavonoidů a druhá placebo po dobu 6 měsíců. Autoři zjistili, že léčba izoflavonoidy oproti placebo byla spojena se signifikantním zlepšením vazodilatace závislé na endotelu a také vykazovala statisticky významné snížení plazmatických koncentrací adhezivních proteinů ICAM-1, VCAM-1 a E-selektinu. Dále

sledovali hladinu rozpustného trombomodulinu, von Willebrandova faktoru, aktivátoru tkáňového plazminogenu, lipidů a jejich hladiny se významně neměnily. Zjištěné výsledky naznačují pozitivní vliv izoflavonoidů na endoteliální funkci u zdravých žen po menopauze. [46]

Fytoestrogeny mohou vyvolávat vaskulární protizánětlivé účinky. Genistein je silný inhibitor sekreční fosfolipázy A₂ (PLA₂). To je klíčový enzym, který uvolňuje kyselinu arachidonovou z membránových fosfolipidů a potencuje syntézu prostanoidů. Genistein tak reguluje zánětlivé reakce. [47]

Adhezivní interakce monocytů a endotelových buněk se podílí na patogenezi aterosklerózy. Takahashi et al. se ve své studii zabývali účinkem interakce monocytů a endotelových buněk na expresi adhezních molekul ICAM-1 a VCAM-1 a zjistili, že vlivem působení zánětlivých stimulů dochází k jejich zvýšené expresi. Dále bylo zjištěno, že genistein tuto expresi adhezních molekul inhibuje. Závěrem lze říci, že fytoestrogeny mohou zasahovat do těchto počátečních procesů a tím chránit před rozvojem aterosklerózy. [48]

3.2.5. Působení izoflavonoidů na cévní endotel

Stejně jako estrogeny mohou mít fytoestrogeny příznivý vliv na kardio-vaskulární systém částečně přes účinky na cévní endotel.[1]

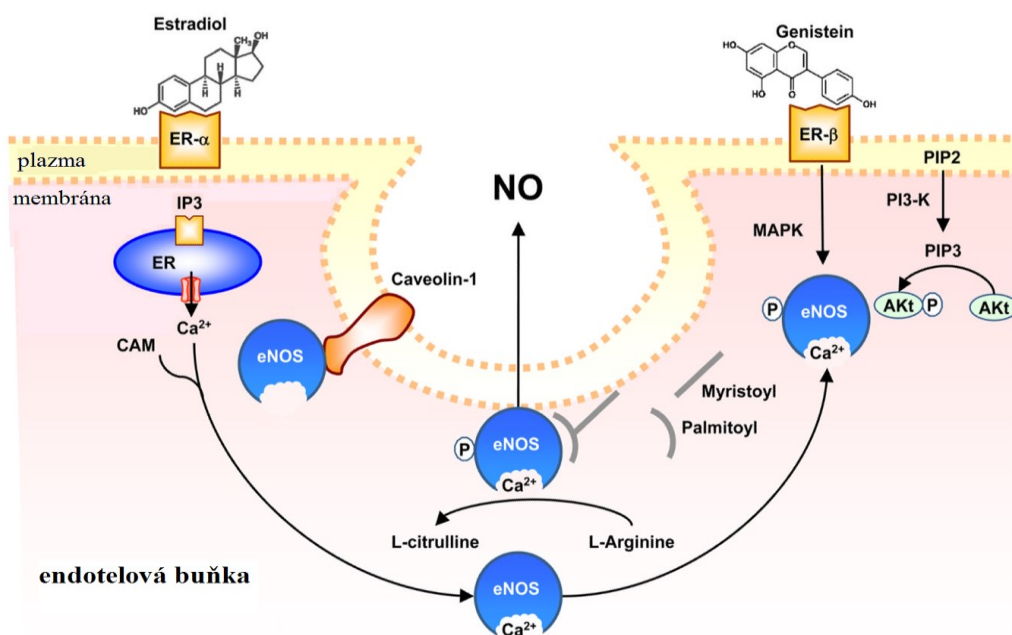
Endotel tvoří funkční a dynamický nesmáčivý (netrombogenní) povrch lumina cév a kapilár. Jeho poškození může být příčinou zánětu, trombózy nebo aterosklerózy. Endotel je velmi metabolicky aktivní orgán a má celou řadu fyziologických funkcí. Podílí se na regulaci průtoku krve, tonu cévní stěny a permeabilitě kapilár, aktivaci krevních destiček (hemostáze), adhezi monocytů k cévní stěně a v neposlední řadě se podílí také na metabolismu lipidů a proliferaci buněk hladkého svalstva. [49] Jeho dysfunkce je rizikovým faktorem při vzniku aterosklerózy a ischemické choroby srdeční (IČHS). Dysfunkce endotelu se projeví především sníženou propustností pro oxid

dusnatý (NO) a poruchou lipidového metabolismu zejména zvýšením LDL cholesterolu. Dojde-li k normalizaci rizikových faktorů, dojde ke zlepšení endotelové funkce, a proto je dysfunkce endotelu vratný proces a je považována za časnou manifestaci aterosklerózy. [34]

Fytoestrogeny regulují proliferaci endotelových buněk, udržují cévní integritu a snižují endoteliální permeabilitu. Je třeba provést další studie, které by definovaly mechanismy a dráhy, které se do děje zapojují. [1]

Cévní tonus je řízen poměrem vazodilatátorů (NO, prostacyklinu (PGI₂), ...) a vazokonstriktorů (angiotensinu II, endotelinu, ...). Klíčovým regulátorem vaskulárního tonu je NO. [1] (Obr. 15)

Obr. 15: Fytoestrogeny indukované uvolňování NO z endotelových buněk



EC - endotelová buňka, ER- α , ER- β - estrogenové receptory, NO - oxid dusnatý, IP3 - inositol 1,4,5-trifosfát, Ca²⁺ - vápníkové ionty, ERe - endoplazmatické retikulum, CAM - kalmodulin, eNOS - endotelová NO-syntetáza, PI3-K - fosfatidylinositol 3-kináza, PIP2

- fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát, PIP3 - fosfatidylinositol 3,4,5-trifosfát, P – fosfát, Akt-proteinkináza, MAPK - mitogenem aktivovaná proteinkináza

Zdroj: Upraveno dle [1]

Stejně jako estrogény (např. estradiol) tak i fytoestrogény (např. genistein) se váží na estrogenové receptory (ER- α , resp. ER- β) na endotelových buňkách. Po vazbě estrogenu na ER- α dojde ke zvýšení tvorby inositol 1,4,5-trifosfátu (IP3), který uvolňuje Ca^{2+} z endoplazmatického retikula (ERe). Ca^{2+} tvoří komplex s kalmodulem (CAM) a aktivuje endotelovou NO-syntetázu (eNOS). V endotelové buňce (EC) se nachází kaveolin-1, což je kotvní protein, který váže eNOS a tím blokuje jeho aktivitu. Ke zvýšení aktivity eNOS je nutná disociace eNOS z kaveolinu a její intracelulární translokace. Disociace eNOS je umožněna právě zvýšením Ca^{2+} ionty vázaných na kalmodulem. Fytoestrogény po vazbě na estrogenový receptor mohou aktivovat fosfatidylinositol 3-kinázu (PI3-K), která způsobí přeměnu fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu (PIP2) na fosfatidylinositol -3,4,5-trifosfát (PIP3), který dále fosforyluje cytosolovou eNOS a dochází k druhé translokaci zpět do buněčné membrány, kde dochází k palmitoylaci a myristoylaci, procesům nezbytným pro plnou aktivaci eNOS. ER-zprostředkovaná aktivace dráhy Akt (proteinkináza) nebo MAPK (mitogenem aktivovaná proteinkináza) způsobuje fosforylaci cytosolové eNOS. Aktivní eNOS podporuje přeměnu L-argininu na L-citrulin a vede k produkci NO, který je uvolněn endotelovou buňkou a způsobuje relaxaci hladkého cévního svalu. Fytoestrogény tedy mohou podporovat vazodilataci zvýšením exprese a aktivity eNOS a zvýšením produkce NO v EC. [1] Např. genistein rychle aktivuje endoteliální syntetázu a produkci NO v endotelových buňkách. Z výsledků provedených studií vyplývá, že genistein by mohl indukovat závislou vazodilataci podobnou 17beta-estradiolu. [29,30] I výsledky další studie ukazují, že izoflavonoidy mají pozitivní účinky na ovlivnění vaskulární reaktivity cestou zprostředkovanou přes eNOS. [31]

V další studii byl zkoumán účinek izoflavonoidů na endoteliální funkci cév u pacientů s prokázaným kardiovaskulárním onemocněním. Byla provedena randomizovaná, dvojitě zaslepená, placebem kontrolovaná studie za účelem stanovení účinků izoflavonoidů v doplňku stravy ve formě kapslí (80 mg/den) ve srovnání

s placebem po dobu 12 týdnů. Skupina pacientů s primární nebo recidivující ischemickou cévní mozkovou příhodou čítala celkem 102 účastníků (s průměrným věkem 66 ± 10) a byla pečlivě vybrána na základě zdravotního stavu. Studii dokončilo 96 z nich. Při každém odběru vzorku byl měřen srdeční tep, systolický a diastolický krevní tlak. Ze vzorků krve odebraných nalačno byl ze séra stanoven kreatinin, lipidový profil, hladina glukózy v krvi, insulin, glykosylovaný hemoglobin A1C (HbA1c), C-reaktivní protein a ukazatelé oxidačního stresu - superoxiddismutáza, 8-isoprostan a malondialdehyd. Na začátku i po 12 týdnech bylo provedeno neinvazivní ultrazvukové vyšetření detekující poruchu vazomotorické endoteliální funkce, tj. měření dilatace tepny zprostředkované průtokem – FMD (Flow Mediated Dilatation) a bylo zjištěno vyšší u pacientů užívajících izoflavonoidy oproti výchozí hodnotě FMD. Toto zjištění naznačuje vazoprotektivní účinek izoflavonoidů u pacientů s endoteliální dysfunkcí a možnost zlepšení této dysfunkce. Kromě toho také došlo ke snížení sérového C-reaktivního proteinu a dá se tedy usuzovat na zmírnění zánětlivé reakce. Na změny ostatních parametrů neměly izoflavonoidy zásadnější vliv. Závěrem tato studie přinesla zjištění, že izoflavonoidy by mohly hrát důležitou roli pro sekundární prevenci u pacientů s kardiovaskulárním onemocněním. [32]

V další studii [33] se řešitelé zabývali otázkou přímého působení fytoestrogenu genisteinu na endotelové buňky. Posuzovali, zda nízké koncentrace genisteinu modulují endoteliální proliferaci, adhezi monocytů a buněčnou apoptózu v přítomnosti či nepřítomnosti zánětlivých látek. V experimentu byly použity pohlavně zralé samice potkanů Wistar (3-5 týdnů). Koncentrace genisteinu použitá v této práci byla v rozsahu 0,1 -100 nM a tato koncentrace genisteinu je srovnatelná s lidskou plazmatickou koncentrací. Z mnoha studií je ovšem známo, že se liší spotřeba sóji a sojových produktů u asijské populace a populace západního světa a tudíž se liší i koncentrace izoflavonoidů v plazmě. [33] Příjem průměrného spotřebitele je 1-2 mg izoflavonoidů za den, a to vedlo k plazmatické koncentraci 20-150 nM. Příjmu 20-40 mg izoflavonoidů za den odpovídala plazmatická koncentrace v rozmezí 200-3000 nM. [2]

V této studii bylo potvrzeno, že genistein má ochranný účinek na cévní endotel, a to díky své regulační funkci na proliferaci, adhezi monocytů a apoptózu. Dále bylo prokázáno, že nízká koncentrace genisteinu stimuluje proliferaci endotelu a vysoké dávky vykazují anti-mitogenní efekt. Genistein působí jak estrogeně tak anti-

estrogenně, v závislosti na jeho koncentraci. Dále byla potvrzena hypotéza, že se v regulaci endotelové proliferace indukované genisteinem uplatňuje NO dráha. [33]

K endotelové dysfunkci a rozvoji aterosklerózy přispívá mimo jiné postmenopauza a hypercholesterolemie. Studie zahrnující 18 postmenopauzálních hypercholesterolemických žen se zaměřila na vyhodnocení účinku izolovaného sójového proteinu ve srovnání s kaseinátem na plazmatickou koncentraci lipoproteinů a na endotelovou funkci. Jednalo se o dvojité zaslepenou, randomizovanou, zkříženou studii trvající po dobu 8 týdnů. Ženám byl na 4 týdny náhodně přidělen buď sójový proteinát (40g) obsahující 80 mg izoflavonů (60% genistein, 30% daidzein, 10% glycitein) nebo odpovídající kaseinát a poté do 8. týdne alternativní léčba. Během studie byly odebírány vzorky krve pro měření hladiny plazmatických lipoproteinů. Endotelová funkce byla hodnocena vaskulární ultrasonografií s vysokým rozlišením v brachiální tepně. Dále byla zaznamenána i tělesná hmotnost, krevní tlak a srdeční frekvence.

Po vyhodnocení výsledků studie nebyly v koncentraci plazmatických lipoproteinů nalezeny žádné významné rozdíly mezi užíváním sójového proteinátu či kaseinátu. Měření FMD (Flow Mediated Dilatation) tj. měření dilatace tepny zprostředkované průtokem se po užívání kaseinátu nezměnila, ale FMD po podání sójových proteinátů byla významně vyšší ve srovnání s hodnotami změřenými na počátku studie i ve srovnání s hodnotami změřenými po užívání kaseinátu. Závěrem tedy lze říci, že výsledky u postmenopauzálních hypercholesterolemických žen naznačují zlepšení endoteliální funkce bez ohledu na změny v hladinách plazmatických lipoproteinů. Užívání sójových proteinů by mohlo být nadějnou alternativou při prevenci kardiovaskulárních onemocnění u pacientů s rizikem aterosklerózy. Je třeba provést další studie s větším počtem pacientů a výsledky této studie potvrdit. [50]

V další studii byl zkoumán vliv sójového proteinátu obsahujícího izoflavonoidy na progresy aterosklerózy u zdravých postmenopauzálních žen. Dvojité zaslepené, placebem kontrolované studie se zúčastnilo 350 zdravých postmenopauzálních žen ve věku 45-92 let. Byly náhodně rozděleny do dvou skupin. Jedna skupina užívala denní dávku 25 g sójového proteinu obsahujícího 91 mg aglykonů izoflavonoidů (resp. celkem 154 mg isoflavonových konjugátů a aglykonů): genistein 52 mg aglykonu (celkem 88 mg), daidzein 36 mg aglykonu (celkem 61 mg) a glyciteinu 3 mg aglykonu (celkem 5

mg). Druhá skupina užívala placebo. Studie probíhala 2,7 roků a bylo provedeno stanovení lipoproteinů, lipidů, izoflavonoidů a ultrazvukové stanovení cIMT jako markeru subklinické aterosklerózy (tj. měření tloušťky intima media krčních tepen pomocí ultrazvuku). Z výsledků cIMT bylo zjištěno, že progresse tloušťky intima media krční tepny byla sice pomalejší u skupiny žen užívající sójový proteinát než u skupiny užívající placebo, ale tento účinek léčby nebyl statisticky významný. Statisticky významný účinek léčby a pomalejší progresse tloušťky intima media krční tepny byl u skupiny žen do 5 let po menopauze, které užívaly sójový proteinát. A zároveň nebyly zaznamenány žádné nežádoucí účinky spojené s užíváním proteinátu obsahujícího izoflavonoidy. V této studii bylo zjištěno, že doplnění izoflavonoidů mělo léčebný efekt pouze u zdravých žen do 5 let po menopauze. Užívání izoflavonoidů významně nezměnilo progresi aterosklerózy u postmenopauzálních žen. Tyto výsledky potřebují další ověření. [51]

3.2.6. Vliv izoflavonoidů na peroxidaci lipidů včetně LDL

Snížení akumulace cholesterolu na buněčné úrovni, by měly vést k inhibici aterosklerotického procesu v arteriální stěně. Inhibice intracelulárního ukládání lipidů s izoflavonoidy byla navržena jako účinný způsob pro prevenci tvorby plaků v arteriální stěně. [27]

Non-hormonální účinek izoflavonoidů nabývá na významu a několik studií ukazuje, že se podílí na snížení rizika kardiovaskulárních chorob, a to různými mechanismy. Například v kontrolované randomizované studii se Wiseman et al. zabývali účinky sójových izoflavonoidů na *in vivo* lipoperoxidaci a odolnost LDL k oxidaci. Celkem se účastnilo 24 dospělých osob (19 žen a 5 mužů) s průměrným věkem 30 let (rozsah: 19-40 roků) a průměrným indexem tělesné hmotnosti (BMI). Účastníci studie byli požádáni, aby nedělali žádné změny ve svém životním stylu, pouze si do jídelníčku zařadili sojový protein s nízkým obsahem izoflavonoidů (obsahoval 0,9 mg (3,5 μ mol) daidzeinu a 1,0 mg (3,7 μ mol) genisteinu) anebo s vysokým obsahem izoflavonoidů (obsahoval 21,2 mg (84 μ mol) daidzeinu a 34,8 mg (129 μ mol) genisteinu). Po proběhnutí léčebného cyklu byly měřeny mimo jiné plazmatické

koncentrace izoflavonoidů (daidzeinu, genisteinu, equolu, O-DMA), malondialdehydu a 8-*epi*-prostaglandinu F_{2α} (8-*epi*-PGF_{2α}). [52]

8-*epi*-prostaglandinu F_{2α} (8-*epi*-PGF_{2α}, isoprostan) je specifický biomarker oxidativního poškození lipidů *in vivo* měřený pomocí hmotnostní spektrometrie. Isoprostany jsou sloučeniny vytvořené *in vivo*. Jsou to metabolity kyseliny arachidonové katalyzované volnými radikály, které odrážejí oxidační stres a peroxidaci lipidů *in vivo*. [53,54]

Plazmatické koncentrace izoflavonoidů po léčbě s vysokým obsahem izoflavonoidů byly v porovnání s příjmem potravy s nižším obsahem izoflavonoidů podstatně vyšší. Plazmatické koncentrace 8-*epi*-PGF_{2α}, jakož to biomarkeru lipoperoxidace, byly podstatně nižší, což naznačuje, že přijaté izoflavonoidy a jejich metabolity účinkují jako *in vivo* antioxidanty. Plazmatická koncentrace malondialdehydu se významně nelišila, i když řešitelé studie připouští, že měření pomocí HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie) se blížilo k detekčnímu limitu a tudíž se tato metoda příliš nehodila. Využití najde např. při hyperlipidémii, kde se objevuje peroxidace lipidů a také zvýšená hladina malondialdehydu. [55]

Výsledky této studie se shodují se studií provedenou Tikkanen et al. [56] Množství podávaných izoflavonoidů v obou studiích bylo téměř totožné. 6 zdravých dobrovolníků (3 muži a 3 ženy, věk 20-30 let) konzumovalo denně 3 sójové tyčinky po dobu 2 týdnů. Každá tyčinka obsahovala genistein (12 mg) a daidzein (7mg). Z odběrů krve byly stanoveny lipidové parametry a izolovány frakce lipoproteinů a ty stanoveny chromatograficky. K izolované frakci LDL byly přidány ionty mědi, které iniciují řetězovou reakce vedoucí k oxidaci LDL *in vitro*. Zabránění této oxidace pomůže přidání antioxidantů a sójový protein je považován za anti-aterogenní. Tento ochranný mechanismus účinku izoflavonoidů na LDL je těžké vysvětlit. Výsledky ukazují na možnou úlohu genisteinu a daidzeinu při podpoře rezistence LDL proti oxidaci. Není jisté, že oxidace způsobená mědí *in vitro* je stejná jako oxidace mědí *in vivo*. Dále bylo prokázáno, že izoflavonoidy snižují hladinu cholesterolu.

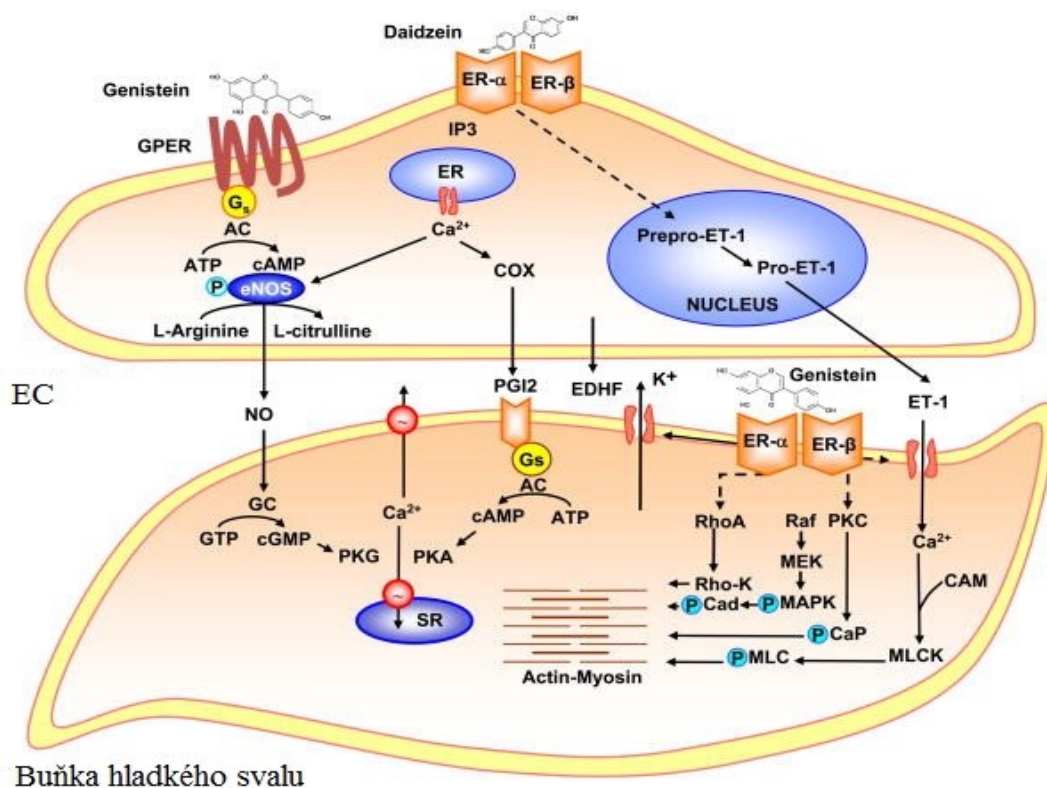
V další studii byla prokázána antioxidační aktivita equolu, sójového izoflavonoidového metabolitu daidzeinu. Equol má větší antioxidační aktivitu než genistein a daidzein. Equol inhibuje oxidaci LDL *in vitro* a antioxidační účinek je zprostředkován inhibicí superoxidového radikálu O_2^- . Má vazodilatační účinek, zvyšuje hladinu NO, který zabraňuje modifikaci LDL. [57]

3.2.7. Působení izoflavonoidů na buňky hladké svaloviny

Hladké svalstvo je tvořeno vrstvami buněk vřetenovitého tvaru. Každá buňka obsahuje jedno protáhlé jádro umístěné centrálně v širší části buňky. Hladké svalstvo se podílí na činnosti mnoha orgánů systémů trávicího, dýchacího, močopohlavního či v cévách, kde přispívá k regulaci krevního oběhu. Dále je roztroušeno v kůži, v duhovce či řasnatém tělese v oku. Je neovladatelné vůlí. Jeho kontrakci ovlivňuje vegetativní nervový systém nebo hormonální stimuly (oxytocin, adrenalin, noradrenalin, serotonin, estrogeny, progesteron). Kontrakce hladké svaloviny je založená na reakci filament aktinu s myozinem, ale průběh stahu je odlišný od kontrakce kosterní či srdeční svaloviny. To je dáno odlišným uložením filament kontraktálního aparátu, který v buňkách kosterní či srdeční svaloviny je příčně pruhovaný. V hladké svalovině se filamenta navzájem kříží a vytváří mřížovitou strukturu. Hladká svalovina obsahuje specifické formy filament. Tenká filamenta jsou tvořena aktinem a tropomyozinem, chybí troponin na rozdíl od příčně pruhovaných svalů, tlustá filamenta jsou tvořena myozinem II. Kontrakce je vyvolána zvýšením intracelulární koncentrace Ca^{2+} . Ca^{2+} proudí do buňky především z extracelulárního prostoru, z menší části pochází z intracelulárních zásobáren. Ca^{2+} se váže na kalmodulin a tvoří s ním komplex. Tento komplex podporuje kontrakci těmito způsoby: 1) aktivuje kinázu lehkého řetězce myozinu (MLCK), která pak fosforyluje lehký řetězec myozinu (MLC) a tím aktivuje hlavu myozinu pro interakci s aktinem a je umožněno vytvoření aktinomyozinového komplexu

2) Ca^{2+} se váže také na kaldesmon, který je fosforylován prostřednictvím proteinkinázy C (PKC) a dojde k vytvoření aktinomyozinového komplexu [1,58]

Obr. 16: Účinky fytoestrogenů na endotelovou buňku a na buňku hladkého svalu



EC - endotelová buňka, ER- α , ER- β - estrogenové receptory, ER ϵ - endoplazmatické retikulum, SR - sarkoplazmatické retikulum, IP3 - inositol-1,4,5-trifosfát, Ca²⁺ - vápníkové ionty, K⁺ - draslíkové ionty, COX - cyklooxygenaza, NO - oxid dusnatý, eNOS - endotelová syntetáza, ATP - adenosin trifosfát, cAMP - cyklický adenosinmonofosfát, AC- adenylátcykláza, PKA - proteinkináza závislá na cAMP, ET - endotelin, CAM - kalmomodulin, MLCK - kináza lehkého řetězce myozinu, MLC - lehký řetězec myozinu, GC - guanylátcykláza, GTP - guanosin trifosfát, cGMP - cyklický guanosinmonofosfát, PKG - proteinkináza závislá na cGMP, PGI₂ - prostacyklin, Rho-K - Rho kináza, MAPK - mitogenem aktivovaná proteinkináza, GPER - receptor svázaný s G proteinem, PKC – proteinkináza C

Zdroj: Upraveno dle [1]

V endotelových buňkách (Obr. 16) se fytoestrogeny jako je genistein nebo daidzein váží na estrogenové receptory a zvyšují intracelulární koncentraci Ca²⁺, která postupně vede až k aktivaci eNOS a produkci NO. Uvolnění NO aktivuje guanylátcyklázu (GC) v buňce hladkého svalu. GC vede ke zvýšení cGMP (cyklický

guanosinmonofosfát) a stimulaci proteinkinázy závislé na cGMP (PKG). Tato proteinkináza snižuje intracelulární koncentraci Ca^{2+} , a to mechanismem vytlačování Ca^{2+} ven z buňky pomocí čerpadla v plazmatické membráně anebo absorpcí Ca^{2+} do sarkoplazmatického retikula (SR). Snížením intracelulární koncentrace Ca^{2+} dojde k snížení citlivosti kontraktilních myofilament a k relaxaci hladké svaloviny. [1]

Fytoestrogeny také aktivují enzym cyklooxygenázu (COX), která přeměňuje kyselinu arachidonovou na další biologicky aktivní sloučeniny s různými účinky. V endotelových buňkách dochází k tvorbě prostacyklinu PGI_2 . Prostacyklin dále aktivuje adenylátcyklázu (AC) v buňce hladkého svalu. AC vede ke zvýšení cAMP (cyklický adenosinmonofosfát) a stimulaci proteinkinázy závislé na cAMP (PKA). Tato proteinkináza PKA má podobné účinky a efekt v buňce hladké svaly jako PKG a opět vede k relaxaci hladké svaloviny. Takže prostacyklin podporuje relaxaci závislou na endotelu. [1,59]

Tato hypotéza byla potvrzena ve studii, ve které podání fytoestrogenů (konkrétně izoflavonoidů ze soji a červeného jetele) postmenopauzálním ženám podpořilo produkci endoteliálních prostacyklinů. Studie se zúčastnilo 25 zdravých žen po menopauze s mírnými klimakterickými příznaky. Ženy užívaly kapsle obsahující izoflavonoidy ze soji a červeného jetele (55 mg/den) po dobu 6 měsíců. Ženám byly provedeny odběry séra před zahájením léčby, po 3 a 6 měsících kontinuální léčby. Získané sérum bylo na 24 hodin přidáno ke kultivovaným endoteliálním buňkám lidské umbilikální žíly (HUVEC). V přítomnosti séra se zvýšila produkce prostacyklinu, která byla měřena v kultivačním médiu. Závěrem této studie je, že sérum získané od postmenopauzálních žen léčených izoflavonoidy stimuluje produkci prostacyklinu v HUVEC kultuře a tedy fytoestrogeny (izoflavonoidy) mohou přispět k příznivému účinku na kardiovaskulární systém. [59]

I pracovní skupina Hermenegildo et al. se zabývala zkoumáním účinků dvou fytoestrogenů (izoflavonoidů genisteinu a daidzeinu) na produkci prostacyklinu kultivovanými endotelovými buňkami lidské umbilikální žíly (HUVEC) a bylo potvrzeno, že tyto izoflavonoidy významně zvyšují uvolňování prostacyklinu mechanismem závislým na estrogenním receptoru a aktivací COX. [60]

Fytoestrogeny mohou také indukovat uvolňování EDHF (endotelový hyperpolarizační faktor) v endotelových buňkách, který otevírá ve svalových buňkách kanály pro K^+ , tím je hyperpolarizuje, snižuje cytosolovou koncentraci Ca^{2+} a vede k relaxaci hladké svaloviny.

Přímo i fytoestrogeny mohou aktivovat K^+ kanály, způsobovat tak hyperpolarizaci membrán, inhibovat vstup Ca^{2+} přes Ca^{2+} kanály a inhibovat fosforylaci MLC a tím inhibovat kontrakci hladké svaloviny. [1,61]. Toto potvrzuje i studie, ve které bylo demonstrováno, že fytoestrogeny indukují relaxaci nezávislou na endotelu v izolovaných králičích koronárních arteriích, a to mechanismem kalciového antagonizmu. Tento mechanismus může přispět k potencionálnímu dlouhodobému kardiovaskulárnímu ochrannému účinku fytoestrogenů a mohl by být vysvětlením pro snížené kardiovaskulární riziko u populace s vysokým příjmem fytoestrogenů ve stravě. Důležitým faktem této studie je to, že koncentrace fytoestrogenů, které vedou k relaxaci koronárních arterií, jsou stejné jako koncentrace fytoestrogenů naměřených v plazmě zdravých dobrovolníků užívajících komerčně dostupný sójový proteinový nápoj (Supro), který obsahuje 60 mg izoflavonoidů, z toho 37 mg genisteinu. Tato studie byla randomizovaná, dvojitě slepá a placebem kontrolovaná. Koncentrace genisteinu, která byla naměřena v plazmě dobrovolníků, a zároveň se ukázalo, že je to koncentrace, která relaxuje koronární arterie a inhibuje Ca^{2+} kanály v izolovaných myocytech je 2 μ M. Údaje zjištěné v této studii a mechanismy účinku fytoestrogenů prokázané in vitro podporují kardiovaskulární účinky u lidí tedy in vivo. [61]

Fytoestrogeny také inhibují uvolňování endotelinu (ET-1), což vede ke snížení kontrakce hladké svaloviny. K inhibici kontrakce hladké svaloviny vede také inhibice PKC, Rho-kináza (Rho-K) a MAPK (mitogenem aktivovaná proteinkináza) dráhy prostřednictvím vazby fytoestrogenů na ER plazmatické membrány.

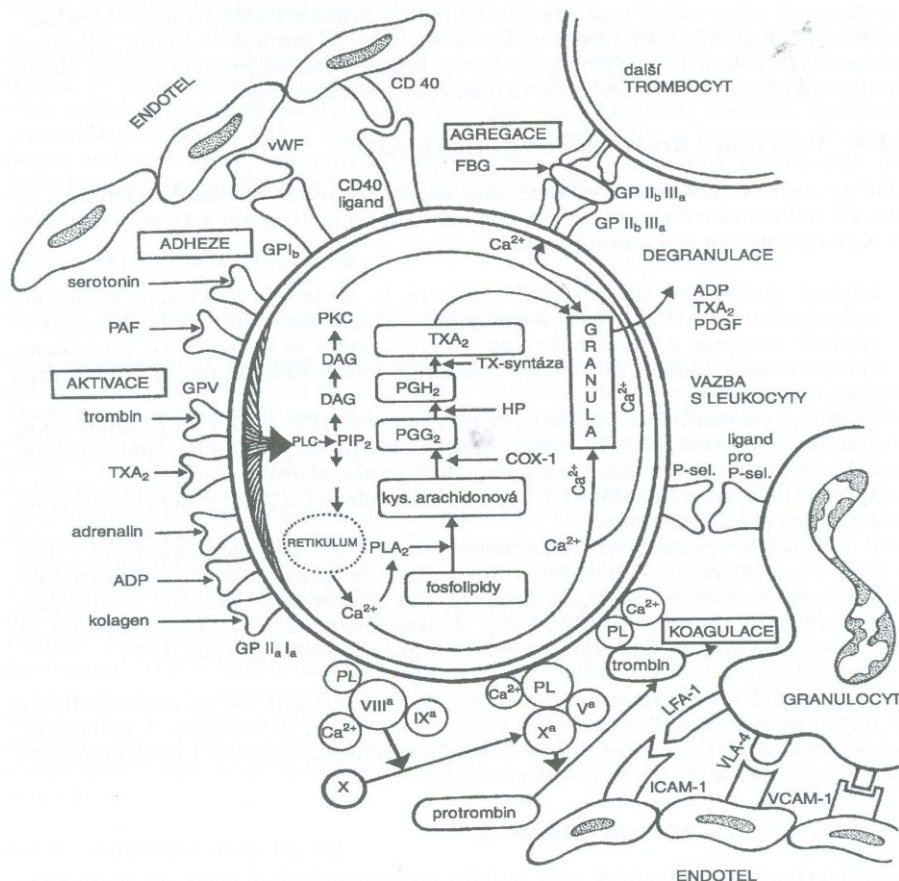
Proliferace hladké svaloviny doprovází mnoho patologických procesů včetně aterosklerózy. A právě fytoestrogeny proliferaci hladké svaloviny inhibují. V určitých koncentracích genistein a daidzein inhibovali proliferaci hladké svaloviny prostřednictvím účinku nezávislého na proteinkinázové aktivitě genisteinu a také nezávisle na endotelu. [62]

Autoři Pan et al. ve své studii prokázali, že izoflavonoidy genistein, daidzein a glycitein mohou inhibovat proliferaci cévní hladké svaloviny a syntézu DNA a přispět tak k prevenci aterosklerózy a kardiovaskulárních onemocnění. [63]

3.2.8. Působení izoflavonoidů na agregaci trombocytů

Agregace trombocytů hraje roli při aterogenezi a tromboembolických příhodách a právě fytoestrogeny mohou inhibovat agregaci trombocytů. Agregace je vzájemné shlukování trombocytů. Může následovat po adhezi trombocytů, ale může být vyvolána přímo působením řady induktorů (ADP, tromboxanem A₂ (TXA₂), kolagenem, adrenalinem, kyselinou arachidonovou aj.). (Obr. 17)

Obr. 17: Expres trombocytárních receptorů a metabolické pochody v trombocytech při hemostáze



vWF - von Willebrandův faktor, *FBG* – fibrinogen, *GP IIb/IIIa* – glykoproteinu IIb/IIIa, *GP Ib* – glykoprotein Ib, *GP V* – glykoprotein V, *PAF* – faktor aktivující trombocyty, *TXA₂* – tromboxan A₂, *ADP* – adenosindifosfát, *Ca²⁺* - vápníkové ionty, *COX* – cyklooxygenaza, *DAG* – diacylglycerol, *PIP2* – fosfatidylinositol bifosfát, *PLC* – fosfolipáza C, *PKC* – proteinkináza C, *PL* – fosfolipidy, *PLA₂* – fosfolipáza A₂, *PGG₂* – prostaglandin G₂, *PGH₂* - prostaglandin H₂, *P- sel.* - P-selektin, *VIII, IX, X, V* – faktory koagulační kaskády, *TX*-syntáza – tromboxan syntáza, (*ICAM-1*, *VCAM-1*, *LFA-1*, *VLA 4*) - adhezní molekuly, *CD 40* – povrchové molekuly, *HP* - hydroperoxidáza

Zdroj: Upraveno dle [64]

Z trombocytů se po jejich aktivaci a adhezi uvolňují různé působky, které urychlují trombogenezi. Tento proces probíhá ve všech případech stejně a nezáleží, jakým způsobem k aktivaci trombocytů došlo. Po aktivaci trombocytárních receptorů trombinem, ADP nebo TXA₂ dochází k přenosu signálu na G-protein a na fosfolipázu C (PLC). To vede k hydrolýze fosfatidylinositol bifosfátu (PIP2) lipidové membrány a vytvoření inositol trifosfátu (IP3), po kterém následuje uvolnění Ca²⁺ z denzního tubulárního systému trombocytárního retikula a uvolnění diacylglycerolu (DAG). Uvolněný Ca²⁺ potencuje aktivitu fosfolipázy A₂ (PLA₂), která uvolňuje kyselinu arachidonovou z membránových fosfolipidů a potencuje syntézu prostanoidů včetně TXA₂, který je trombogenní. Také dochází k fosforylaci myozinu a dalších cytoskeletálních proteinů za účelem uvolnění trombogenních působků z denzních tělísek trombocytů (tj. uvolnění serotoninu, ATP a ADP) a z α-granulí trombocytů (tj. uvolnění fibrinogenu, von Willebrandova faktoru (vWF), fibronektinu, P-selektinu, glykoproteinu GP IIb/IIIa). DAG přitom indukuje proteinkinázu C (PKC), která také způsobuje sekreci z α-granulí a z denzních tělísek. Tuto sekreci popisujeme jako uvolňovací reakci. Trombocyt mění tvar na kulovitý, granula se přesouvají do centra trombocytu a jejich obsah je vypuzován ven z trombocytu. (Obr. 17) [64]

Proces agregace trombocytů musí být důsledně řízen, protože jak snížená tak i zvýšená agregace trombocytů je spojena s patologickými stavy. Hlavní úlohu v řízení agregace trombocytů hraje kyselina arachidonová, její uvolňování z cytoplazmatické membrány trombocytů a její další transformace. (Obr. 17) [64]

Pomocí trombocytárního enzymu cyklooxygenázy (COX-1) se kyselina arachidonová přeměňuje na prostaglandin H₂ (PGH₂) a dále pomocí enzymu

tromboxan-syntázy na tromboxan A₂. Tromboxan A₂ je silný induktor, který stimuluje své vlastní receptory a vede k agregaci trombocytů.

Většina současných klinicky užívaných léků je ireverzibilními inhibitory COX-1 podobně jako je kyselina acetylsalicylová (ASA) anebo antagonisty receptorů pro adenosindifosfát (ADP receptorů) (clopidogrel, prasugrel, ticagrelor). Do budoucna by bylo výhodné použití léků, které blokují tromboxan-syntázu nebo působí jako antagonisté na receptory TxA₂. Tyto léky by cílily specificky na rozdíl od inhibitorů COX-1 a mohly by vykazovat méně nežádoucích účinků.

Jak již bylo zmíněno, izoflavonoidy aktivují eNOS a zvyšují produkci NO. NO má protektivní účinek na kardiovaskulární systém. Dilatuje cévy, snižuje krevní tlak, inhibuje adhezi a agregaci trombocytů a tím hraje důležitou roli v prevenci vzniku trombů. [13]

Ovlivnění koagulace může mít tedy ochranný vliv na progresi aterosklerózy. Bylo dokázáno, že genistein inhibuje tvorbu trombinu a aktivaci trombocytů *in vitro*. [65]

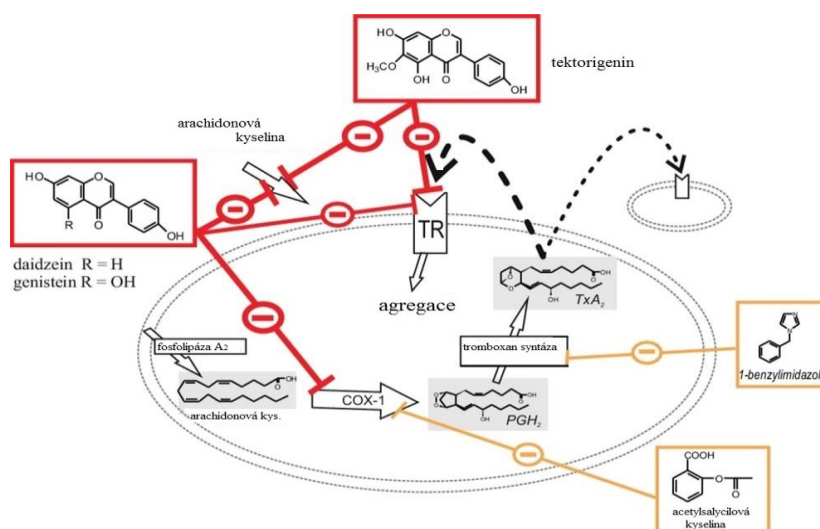
Byl také zkoumán inhibiční účinek genisteinu na okluzi trombotických cév myší femorální arterie a *in vitro* agregace trombocytů. Bylo zjištěno, že genistein může potlačit agregaci trombocytů *in vitro* vyvolanou kolagenem a tím zabránit trombogenezi *in vivo*. Dle těchto výsledků může genistein zabránit progresi trombózy a aterosklerózy. [66]

Mechanismus genisteinem indukované inhibice agregace trombocytů vyvolané kolagenem zahrnuje schopnost konkurovat vazbě na receptory pro tromboxan A₂. TxA₂, derivát kyseliny arachidonové, je tvořen trombocyty. Vyvolává agregaci trombocytů a způsobuje vazokonstrikci. Bylo zjištěno, že genistein vykazuje vyšší afinitu k receptoru TxA₂ a účinně inhibuje agregaci vyvolanou kolagenem. Proto antagonismus tohoto specifického ligandu receptoru TxA₂ může představovat účinný mechanismus ovlivnění funkce trombocytů. Dalšími studii by se mělo ověřit, jestli farmakologická suplementace nebo dietární příjem izoflavonoidů může vyvolat příznivé účinky na prevenci nebo léčbu trombotických příhod. [67]

Z předchozí studie vyplývá, že izoflavonoidy genistein a daidzein mohou ovlivnit agregaci trombocytů jednak cestou zásahu do kaskády kyseliny arachidonové, tedy působí jako inhibitory enzymu cyklooxygenázy (COX-1) a jejich účinek je srovnatelný s účinkem ASA, a jednak jako kompetitivní antagonisté receptorů TxA₂. Oba tyto izoflavonoidy jsou běžnou složkou sójových produktů a mohou mít pozitivní vliv na agregaci trombocytů a tím i na kardiovaskulární nemoci spojené se zvýšenou aktivitou trombocytů.

A proto se řešitelé v další studii zaměřili na antiagregační účinky různých izoflavonoidů a u řady z nich byl proveden screening jejich antiagregačních účinků. Agregace trombocytů byla indukovaná kyselinou arachidonovou a bylo zjištěno, že 13 z 18 testovaných izoflavonoidů mělo významný inhibiční účinek na agregaci trombocytů. Podobný klinický efekt jako ASA měl v tomto pokusu genistein. ASA je derivátem kyseliny salicylové a ireverzibilně blokuje COX-1 a brání tak přeměně kyseliny arachidonové, tvorbě eikosanoidů a má antitrombotické účinky. Bylo prokázáno, že izoflavonoid tektorigenin měl prokazatelně silnější účinek než ASA a jeho účinek nebyl založen na inhibici COX-1, ale na kompetitivním antagonismu na receptorech TxA₂. Závěrem tedy je, že tektorigenin je účinnější látka než ASA a v budoucnu by mohla být zajímavou látkou k dalšímu testování a k případnému klinickému použití. (Obr. 18) [68]

Obr. 18: Působení izoflavonoidů genisteinu a tektorigenu na trombocyt.

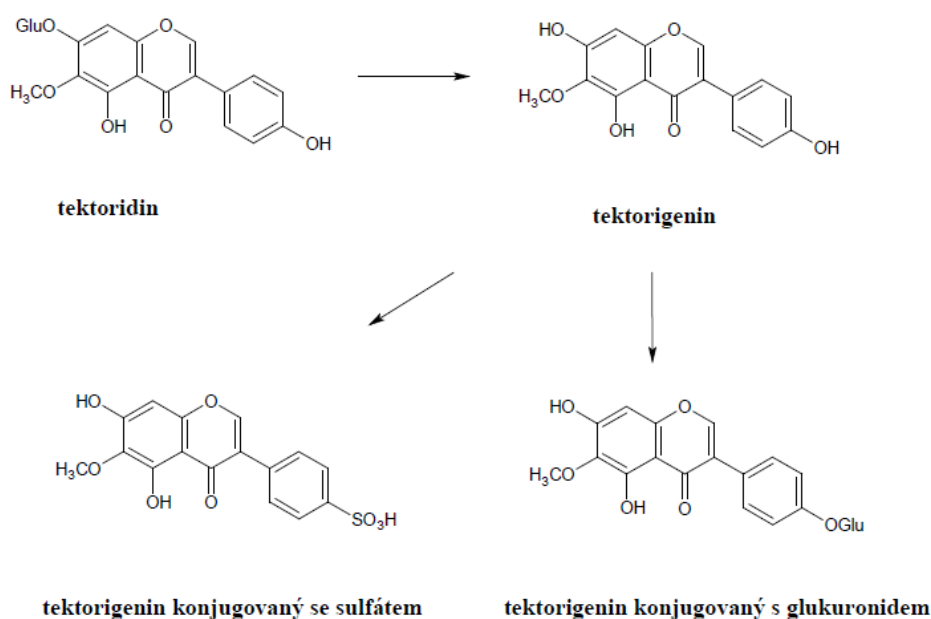


TxA_2 – tromboxan A_2 , PGH_2 - prostaglandin H_2 , $COX-1$ - enzym cyklooxygenáza, TR – receptor pro TxA_2

Zdroj: Upraveno dle [68]

Izoflavonoid tektoridin izolovaný z rodu *Pueraria* (*Fabaceae*) je intestinální mikroflórou metabolizován na účinný tektorigenin a ten na další metabolity. (Obr. 19) [73] Tektorigenin by mohl být v budoucnu zajímavou látkou pro další experimenty.

Obr. 19: Metabolismus tektoridinu.



Zdroj: Upraveno dle [73]

Cílem v další randomizované studii bylo zjistit účinek 12-ti týdenní suplementace sójových izoflavonoidů na hustotu receptorů TxA_2 v trombocytech a na koncentrace lipoproteinů. Studie se zúčastnilo 29 zdravých postmenopauzálních žen, které byly rozděleny do dvou skupin. 15 žen užívalo přípravek obsahující izoflavonoidy v dávce 100 mg/den, 14 žen užívalo placebo. Vzorky krve jim byly

odebrány před prvním podáním a po 12 týdnech užívání. Ze vzorků krve byla analyzována koncentrace izoflavonoidů, celkového cholesterolu, HDL cholesterolu, triacylglyceridů, glukózy, inzulínu, estradiolu, testosteronu, gonadotropinů, globulinu vázajícího pohlavní hormony (SHBG) a hustota trombocytárních receptorů TxA₂. Při každém odběru byl zaznamenán také krevní tlak, index tělesné hmotnosti (BMI) a podkožní tuk. Ve výsledcích mezi oběma skupinami se významně lišila koncentrace trombocytárních receptorů TxA₂. Ve skupině žen užívajících přípravky obsahující izoflavonoidy se koncentrace receptorů TxA₂ výrazně snížila, naopak u skupiny žen užívajících placebo zůstala beze změn. Významné snížení receptorů TxA₂ negativně korelovalo se sérovými koncentracemi izoflavonoidů. Studie tedy prokázala příznivý účinek izoflavonoidů na funkci trombocytů a snížení jednoho z rizikových faktorů kardiovaskulárních onemocnění u žen po menopauze. [69]

4. DISKUSE

Izoflavonoidy jsou přírodní rostlinné látky označované jako fytoestrogeny. Představují skupinu sekundárních metabolitů rostlin. Je známo více než 300 zdrojů, zejména se jedná o kořeny či semena. Nejvýznamnější zástupci jsou z čeledi *Fabaceae* (bobovité).

Z chemického pohledu se jedná o polyfenolické sloučeniny odvozené z biosyntézy flavonoidů. Jejich struktura je podobná 17- β -estradiolu, mohou se vázat na estrogenové receptory a vykazují tak slabé estrogení účinky.

Pro lidskou populaci je hlavním zdrojem příjmu izoflavonoidů strava. Příjem izoflavonoidů ze stravy je ale většinou nedostatečný pro dosažení potřebné hladiny pro biologickou odezvu v organismu. Nicméně jsou k dispozici preparáty především ze dvou hlavních zdrojů, sóji luštinaté (*Glycine max* (L.) Merr.) a jetele lučního (*Trifolium pratense*), ve formě standardizovaných extraktů jako doplňky stravy. Jsou k dostání bez lékařského předpisu a nehradí je zdravotní pojišťovna.

Izoflavonoidy jsou známé jako zdraví prospěšné látky, které jsou stále více populární především u žen po menopauze, kde díky svým estrogením účinkům regulují hormonální rovnováhu. Z mnoha klinických studií lze usoudit, že izoflavonoidy navozují nejen antimenopauzální účinky, ale i antioxidační, antiaterosklerotické a antikancerogenní účinky a mají pozitivní efekt na osteoporózu.

Pokud se týká kardiovaskulárního systému, izoflavonoidy mohou ovlivňovat každý jednotlivý děj, který přispívá k rozvoji aterosklerózy: nástup hypertenze, rozvoj vaskulární zánětlivé reakce, poškození endotelu, oxidaci LDL, proliferaci buněk hladké svaloviny a kolagenu a aktivaci a agregaci trombocytů.

Z mnoha uvedených klinických studií je patrný pozitivní vliv izoflavonoidů na krevní tlak, nicméně existují i studie, kde se signifikantní změny krevního tlaku neprokázaly. Rozdílné výsledky mohou být způsobeny např. odlišným uspořádáním studií (testovány různé izoflavonoidy a různé dávky, někdy byly použity aglykony)

nebo interindividuální variabilitou (např. již zmiňovaná schopnost části jedinců tvořit equol). Jiným důležitým limitem jsou charakteristiky a velikost použitého souboru a také doba uskutečnění studie. Např. účinek podávání izoflavonoidů v jedné déletrvající studii na větším souboru žen nebyl signifikantní, naproti tomu jako statisticky významné se ukázalo obdobné užívání izoflavonoidů, ale do 5 let po menopauze. Tento výsledek možná naznačuje možnosti preventivního užívání izoflavonoidů. [51]

Ne vždy jednoznačné jsou výsledky ohledně mechanismu účinku. Např. bylo zjištěno, že izoflavonoidy jsou schopné tlumit rozvoj vaskulární zánětlivé reakce. Část studií to vysvětluje snížením exprese adhezních molekul ICAM-1 a VCAM-1. V jiných studiích bylo prokázáno zmírnění zánětlivé reakce především snížením množství mediátorů zánětu a počtu zánětlivých buněk, u kterých byla regulována proliferace a adheze na endotelové buňky. [46,48] Je možné, že ve skutečnosti se uplatní všechny pozorované jevy a sledované účinky mají komplexní mechanismus.

Pochybnosti někdy mohou vzbuzovat i použité metody. Byl pozorován pozitivní vliv izoflavonoidů na *in vivo* lipoperoxidaci a odolnost LDL k oxidaci, ale u laboratorních měření biomarkerů lipoperoxidace a v *in vitro* simulaci odolnosti LDL k oxidaci není zatím jasné, jak jsou tyto metody relevantní. [53,54,55]

Nicméně i když závěry ze studií kardiovaskulárních účinků nejsou vždy shodné, většina potvrzuje pozitivní působení izoflavonoidů na kardiovaskulární systém.

V rámci diskuze bych se ráda zmínila i o bezpečnosti izoflavonoidů. Jak již bylo zmíněno, izoflavonoidy tvoří základ řady fytopreparátů. Laickou veřejností bývají fytopreparáty obecně často vnímány pouze pozitivně jako zcela bezpečné doplňky nebo dokonce alternativy klasických léčiv. K jejich oblibě a rozšíření přispívá jak volná dostupnost v lékárně, kdy nejsou vázány na recept, tak i současná móda „návratu k přírodě“. Skutečnost ale může být mnohdy odlišná a ani izoflavonoidy nejsou v tomto ohledu výjimkou. Komplexní působení izoflavonoidů na lidské zdraví a to zejména při dlouhodobém příjmu není dosud zcela jasné. Podobně chybí podrobné informace o mechanismech působení a relativně málo je známo i o jejich farmakokinetice. Farmakokinetické údaje zatím ukazují, že příjem přípravků, které jsou 2 nebo 3

násobkem běžného denního příjmu izoflavonoidů ve stravě, by neměl vést k jejich kumulaci [42], ale bezpečnost dlouhodobého užívání a případná klinická toxicita zůstávají i tak nejasné.

Izoflavonoidy velmi pravděpodobně opravdu mají výše uvedené příznivé účinky na kardiovaskulární systém. Je ale možné, že mohou vyvolat naopak nepříznivé působení jinde. V tomto ohledu již dnes nejsou vnímány jen pozitivně. Objevily se obavy, že izoflavonoidy zvyšují riziko karcinomu prsu, stimulují růst již existujících hormonálně senzitivních nádorů nebo že u těchto pacientů snižují dobu přežití. [74,75] Tyto obavy opět vycházejí z estrogenních vlastností izoflavonoidů. Nicméně žádné věrohodné studie toto tvrzení dosud jasně nepotvrdily. Naopak Wang et al. ve své studii prokázali, že izoflavonoid biochanin A má schopnost inhibovat enzym aromatázu (aromatáza se účastní syntézy estrogenů a např. při karcinomu prsu se léčivý cíleně tlumí). [70]

Jiný negativní účinek izoflavonoidů se objevil v souvislosti s neplodností u ovcí a dobytka, kteří konzumovali krmení bohaté na fytoestrogeny především izoflavonoidy z jetele lučního. Objevila se u nich ovariální dysfunkce a snížená koncepce, která byla do určité míry dočasná (záleželo na délce doby podávání krmiva a příjmu estrogenů). I tyto účinky se opět přisuzují estrogenním vlastnostem izoflavonoidů. [71]

V jiné studii zabývající se účinkem genisteinu na reprodukční systém mláďat myších samic po aplikaci podkožních injekcí genisteinu bylo pozorováno snížení jejich ovariální funkce a v dospělosti poté dopad na jejich fertilitu. Tento nepříznivý dopad účinku genisteinu vyvolává otázku, zda stejný nežádoucí účinek by nemohly mít sójové produkty včetně sójové kojenecké výživy na kojence a jejich vývoj. [72]

Účinky izoflavonoidů včetně fytopreparátů by proto bylo vhodné ověřit komplexně v dlouhodobých studiích.

5. ZÁVĚR

V této práci jsem se snažila o přehledné shrnutí dosavadních poznatků o izoflavonoidech a jejich kardiovaskulárních účincích. Poznatky o kardiovaskulárních účincích izoflavonoidů jsem čerpala hlavně z odborných publikací *in vitro* a *in vivo* experimentů a z klinických epidemiologických studií.

Z dostupných údajů lze usoudit, že izoflavonoidy a jejich metabolity mají na lidský organizmus pozitivní účinky, mezi které řadíme účinky antiaterosklerotické, antimenopauzální, antikancerogenní účinky a pozitivní efekt na osteoporózu. Pozitivní působení na kardiovaskulární systém zahrnuje antihypertenzní, antiinflamatorní, antiangiogenní, antiproliferační, a antiagregační účinky. Na druhou stranu se objevují i studie, které upozorňují na případná rizika spojená se zejména dlouhodobým užíváním izoflavonoidů.

Izoflavonoidy a jejich metabolity jsou velmi zajímavou skupinou látek přírodního původu s potenciálem pro případný vývoj nových léčiv. Zaslouží si proto další výzkum jak svých terapeutických a preventivních účinků, tak případných rizik.

6. POUŽITÁ LITERATURA

[1] Gencel V.B., Benjamin M.M., Bahou S.N., Khalil R.A., Vascular Effects of Phytoestrogens and Alternative Menopausal Hormone Therapy in Cardiovascular Disease. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 2012, 12 (2): 149-174.

[2] Patel R.P., Barnes S., Isoflavones and PPAR Signaling: A Critical Target in Cardiovascular, Metastatic, and Metabolic Disease. *PPAR Research* 2010, 2010: 153252

[3] 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): 753-63.

[4] Spilková J. a kol.: Farmakognozie. Praha: Karolinum, první vydání, 2016. ISBN 978-80-246-3264-3 ,str.119-120

[5] Ko K.P., Isoflavones: chemistry, analysis, functions and effects on health and cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*,2014, 15 (17): 7001-7010

[6] Miadoková E., Isoflavonoids – an overview of their biological activities and potential health benefits. *Interdisciplinary Toxicology*. 2009;2(4):211-218.

[7] Selepe M.A.,Van Heerden F.R. Application of the Suzuki-Miyaura Reaction in the Synthesis of Flavonoids. *Molecules*. 2013;18(4):4739-65.

[8] Barnes S.,The Biochemistry, Chemistry and Physiology of the Isoflavones in Soybeans and their Food Products. *Lymphatic Research and Biology*. 2010;8(1):89-98.

[9] Kuiper G.G., Carlsson B., Grandien K., Enmark E., Häggblad J., Nilsson S., Gustafsson J.A. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*. 1997;138(3):863-70.

- [10] Varinska L., Gal P., Mojzisoava G., Mirossay L., Mojzis J. Soy and Breast Cancer: Focus on Angiogenesis. Srivastava S.K., ed. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(5):11728-11749.
- [11] Lissin L.W., Cooke J.P., Phytoestrogens and Cardiovascular Health *Journal of the American College of Cardiology*. 2000;35:1403–10.
- [12] Cherdshewasart W., Sutjit W. Correlation of antioxidant activity and major isoflavonoid contents of the phytoestrogen-rich *Pueraria mirifica* and *Pueraria lobata* tubers. *Phytomedicine*. 2008;15(1-2):38-43.
- [13] Donát J., *Fytoestrogeny, rostlinné hormony v klimakteriu*. DoMeNa, Praha 2006 110s, ISBN 80-239-8422-5
- [14] Atmaca A., Kleerekoper M., Bayraktar M., Kucuk O. Soy isoflavones in the management of postmenopausal osteoporosis. *Menopause*. 2008; 15(4):748-57.
- [15] Wang X. Structure, function, and engineering of enzymes in isoflavonoid biosynthesis. *Functional and Integrative Genomics*. 2011;11: 13–22.
- [16] Banerjee S., Li Y., Wang Z., Sarkar F.H. Multi-targeted therapy of cancer by genistein. *Cancer Letters*. 2008;269:226–242.
- [17] Jackman K.A., Woodman O.L., Chrissobolis S., Sobey C.G. Vasorelaxant and antioxidant activity of the isoflavone metabolite equol in carotid and cerebral arteries. *Brain Research*. 2007;13;1141:99-107.
- [18] Li M-W, Muñoz N.B., Wong C-F., et al. QTLs Regulating the Contents of Antioxidants, Phenolics, and Flavonoids in Soybean Seeds Share a Common Genomic Region. *Frontiers in Plant Science*. 2016;7:854.
- [19] Dahlman-Wright K., Cavailles V., Fuqua S.A., et al. Estrogen Receptors. International Union of Pharmacology. LXIV. *Pharmacological Reviews*. 2006, 58 (4) 773-781

- [20] Frota K.de M.G., Matias A.C.G., Areas J.A.G. Influence of food components on lipid metabolism: scenarios and perspective on the control and prevention of dyslipidemias. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas*. 2010;30(Supl.1): 7-14
- [21] Ito C., Murata T., Itoigawa M., Nakao K., Kumagai M., Kaneda N., Furukawa H. Induction of apoptosis by isoflavonoids from the leaves of *Millettia Taiwaniana* in human leukemia HL-60 cells. *Planta Medica* 2006; 72(5):424-429.
- [22] Ito C., Itoigawa M., Kumagai M., Okamoto Y., Ueda K., Nishihara T., Kojima N., Furukawa H. Isoflavonoids with antiestrogenic activity from *Millettia Pachycarda*. *Journal of Natural Products*, 2006, 69 (1), 138-141.
- [23] Desta Z.Y., Majinda R.R. Three new isoflavonoids from *Erythrina caffra*. *Natural Product Communications*. 2014 Jun;9(6):817-20.
- [24] Bolaños R., Del Castillo A., Francia J. Soy isoflavones versus placebo in the treatment of climacteric vasomotor symptoms: systematic review and meta-analysis. *Menopause*. 2010;17(3):660-6.
- [25] Kašparová M., Siatka T. Production of flavonoids and isoflavonoids in jasmonic acid-induced red clover suspension cultures. *Česká a slovenská farmacie*. 2014;63(1):17-21
- [26] Qi X., Li M.-W., Xie M., et al. Identification of a novel salt tolerance gene in wild soybean by whole-genome sequencing. *Nature Communications*. 2014;5:4340.
- [27] Myasoedova V.A., Kirichenko T.V., Melnichenko A.A., et al. Anti-Atherosclerotic Effects of a Phytoestrogen-Rich Herbal Preparation in Postmenopausal Women. Mousa S.A., ed. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(8):1318.
- [28] Sobenin I.A., Myasoedova V.A., Orekhov A.N. Phytoestrogen-rich dietary supplements in anti-atherosclerotic therapy in postmenopausal women. *Current Pharmaceutical Design*. 2016; 22,152-163.

- [29] Si H., Liu D. Phytochemical genistein in the regulation of vascular function: new insights. *Current Medicinal Chemistry*. 2007;14(24):2581-9.
- [30] Siriviriyakul P., Khemapech S., Monsiri K., Patumraj S. The vascular effect of genistein: what is its mechanism, nitric oxide or PGI₂? *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 2006; 34(1–2):97-101.
- [31] Räthel T.R., Leikert J.F., Vollmar A.M., Dirsch V.M. The soy isoflavone genistein induces a late but sustained activation of the endothelial nitric oxide-synthase system in vitro. *British Journal of Pharmacology*.2005;144, 394–399
- [32] Chan Y.H., Lau K.K., Yiu K.H., Li S.W., Chan H.T., Fong D.Y., Tam S., Lau C.P., Tse H.F.; Reduction of C-reactive protein with isoflavone supplement reverses endothelial dysfunction in patients with ischaemic stroke. *European Heart Journal* 2008; 29 (22): 2800-2807.
- [33] Sandoval M.J, Cutini P.H., Rauschemberger M.B., Massheimer V.L. The soyabean isoflavone genistein modulates endothelial cell behaviour. *British Journal of Nutrition*. 2010;104(2):171-9.
- [34] Šejda T., DISERTAČNÍ PRÁCE; Endoteliální funkce a dysfunkce, možnosti detekce a vztah k vybraným rizikovým faktorům aterosklerózy, I. interní klinika FTN a IPVZ, Praha Pracoviště pro výzkum aterosklerózy IKEM, Praha 2008
- [35] Ziyun Wu, Lixia Song, Shengbao Feng, Yuancai Liu, Guangyuan He, Yoecelyn Yioe, Shao Quan Liu, and Dejian Huang Germination Dramatically Increases Isoflavonoid Content and Diversity in Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Seeds *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012, 60 (35),8606-8615.
- [36] Cano A., García-Pérez M.A., Tarín J.J. Isoflavones and cardiovascular disease. *Maturitas*. 2010;67(3):219-26.
- [37] 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):981-91

- [38] Izumi T., Piskula M.K., Osawa S., Obata A., Tobe K., Saito M., Kataoka S., Kubota Y., Kikuchi M. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *The Journal of Nutrition*, 2000,130(7):c1695-9c
- [39] Nikitina N.A., Sobenin I.A., Myasoedova V.A., Korennaya V.V., Mel'nichenko A.A., Khalilov E.M., Orekhov A.N. Antiatherogenic effect of grape flavonoids in an ex vivo model. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2006;141:712-715.
- [40] Iriti M., Faoro F. Bioactivity of grape chemicals for human health. *Natural Product Communications* 2009 ;4(5):611-34.
- [41] Vislocky L.M., Fernandez M.L. Biomedical effects of grape products. *Nutrition Reviews* 2010;68(11):656-70.
- [42] Bloedon L.T., Jeffcoat A.R., Lopaczynski W., Schell M.J., Black T.M., Dix K.J., Thomas B.F., Albright C., Busby M.G., Crowell J.A., Zeisel S.H. Safety and pharmacokinetics of purified soy isoflavones: single-dose administration to postmenopausal women. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2002;76(5):1126-37.
- [43] Welty F.K., Lee K.S., Lew N.S., Zhou J.R., Effect of soy nuts on blood pressure and lipid levels in hypertensive, prehypertensive, and normotensive postmenopausal women. *Archives of Internal Medicine* 2007;167(10)
- [44] Liu Z., Ho S.C., Chen Y., Xie Y.J., Huang Z., Ling W. Research protocol: effect of natural S-equol on blood pressure and vascular function- a six-month randomized controlled trial among equol non-producers of postmenopausal women with prehypertension or untreated stage 1 hypertension. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2016;16:89.
- [45] Tsai Y.C., Leu S.Y., Peng Y.J., Lee Y.M., Hsu C.H., Chou S.C., Yen M.H., Cheng P.Y. Genistein suppresses leptin-induced proliferation and migration of vascular smooth muscle cells and neointima formation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2017;21(3):422-431.

- [46] Colacurci N., Chiàntera A., Fornaro F., de Novellis V., Manzella D., Arciello A., Chiàntera V., Improta L., Paolisso G. Effects of soy isoflavones on endothelial function in healthy postmenopausal women. *Menopause*. 2005;12(3):299-307.
- [47] Dharmappa K.K., Mohamed R., Shivaprasad H.V., Vishwanath B.S. Genistein, a potent inhibitor of secretory phospholipase A2: a new insight in down regulation of inflammation. *Inflammopharmacology* 2010 ;18(1):25-31.
- [48] Takahashi M., Ikeda U., Masuyama J., Kitagawa S., Kasahara T., Shimpo M., Kano S., Shimada K. Monocyte-endothelial cell interaction induces expression of adhesion molecules on human umbilical cord endothelial cells. *Cardiovascular Research*. 1996;32(2):422-9.
- [49] Cines D.B., Pollak E.S., Buck C.A., Loscalzo J., Zimmerman G.A., McEver R.P., Pober J.S., Wick T.M., Konkle B.A., Schwartz B.S., Barnathan E.S., McCrae K.R., Hug B.A., Schmidt A.M., Stern D.M. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*. 1998,15;91(10):3527-61.
- [50] Cuevas A.M., Iribarra V.L., Castillo O.A., Yañez M.D., Germain A.M. Isolated soy protein improves endothelial function in postmenopausal hypercholesterolemic women. *European Journal of Clinical Nutrition* (2003) 57, 889–894
- [51] Hodis H.N., Mack W.J., Kono N., et al. Isoflavone Soy Protein Supplementation and Atherosclerosis Progression in Healthy Postmenopausal Women: A Randomized Controlled Trial. *Stroke* 2011; 42(11):3168-3175.
- [52] Wiseman H., O'Reilly J.D., Adlercreutz H., et al. Isoflavone phytoestrogens consumed in soy decrease F(2)-isoprostane concentrations and increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2000;72(2):395-400.
- [53] Praticò D., Tangirala R.K., Rader D.J., Rokach J., FitzGerald G.A. Vitamin E suppresses isoprostane generation in vivo and reduces atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Nature medicine* 1998;4(10):1189-92.
- [54] Roberts L.J., Milne G.L. Isoprostanes. *Journal of Lipid Research*. 2009;50(Suppl):S219-S223.

- [55] Wiseman H., O'Reilly J.D., Adlercreutz H., et al. Isoflavone phytoestrogens consumed in soy decrease F(2)-isoprostane concentrations and increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2000;72(2):395-400.
- [56] Tikkanen M.J, Wähälä K., Ojala S., Vihma V., Adlercreutz H. Effect of soybean phytoestrogen intake on low density lipoprotein oxidation resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(6):3106-3110.
- [57] Hwang J., Wang J., Morazzoni P., Hodis H.N., Sevanian A. The phytoestrogen equol increases nitric oxide availability by inhibiting superoxide production: an antioxidant mechanism for cell-mediated LDL modification. *Free Radical Biology & Medicine*. 2003 15;34(10):1271-82.
- [58] Despopoulos A., Silbernagl S. Atlas fyziologie člověka *Grada Publishing, a.s.*, 2004
- [59] Garcia-Martinez M.C., Hermenegildo C., Tarin J.J., Cano A. Phytoestrogens increase the capacity of serum to stimulate prostacyclin release in human endothelial cells. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 2003; 82(8)
- [60] Hermenegildo C., Oviedo P.J., Garcia-Perez M.A., Tarin J.J., Cano A. Effects of phytoestrogens genistein and daidzein on prostacyclin production by human endothelial cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* , 2005, 315 (2) 722-728.
- [61] Figtree G.A., Griffiths H., Lu Y.Q., Webb C.M., MacLeod K., Collins P. Plant-derived estrogens relax coronary arteries in vitro by a calcium antagonistic mechanism. *Journal of the American College of Cardiology*. 2000;35(7):1977-85.
- [62] Finking G., Wohlfrom M., Lenz C., Wolkenhauer M., Eberle C., Hanke H. The phytoestrogens Genistein and Daidzein, and 17 beta-estradiol inhibit development of neointima in aortas from male and female rabbits in vitro after injury. *Coronary Artery Disease* 1999; 10(8):607–615
- [63] Pan W., Ikeda K., Takebe M., Yamori Y. Genistein, daidzein and glycitein inhibit growth and DNA synthesis of aortic smooth muscle cells from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *The Journal Nutrition*. 2001; 131(4):1154–1158

- [64] Kvasnička J.: Trombofilie a trombotické stavy v klinické praxi. Praha: Grada Publishing, a.s.,2003.ISBN 80-7169-993-4
- [65] Wilcox J.N., Blumenthal B.F. Thrombotic mechanisms in atherosclerosis: potential impact of soy proteins. *The Journal of Nutrition*.1995;125
- [66] Kondo K., Suzuki Y., Ikeda Y., Umemura K. Genistein, an isoflavone included in soy, inhibits thrombotic vessel occlusion in the mouse femoral artery and in vitro platelet aggregation. *European Journal of Pharmacology*.2002 22;455(1)
- [67] Guerrero J.A., Lozano M.L., Castillo J., Benavente-García O., Vicente V., Rivera J. Flavonoids inhibit platelet function through binding to the thromboxane A2 receptor. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2005;3(2):369-76
- [68] Applová L., Karlíčková J., Říha M., Filipský T., Macáková K., Spilková J., Mladěnka P.. The isoflavonoid tectorigenin has better antiplatelet potential than acetylsalicylic acid. *Phytomedicine*. 2017 15;35:11-17.
- [69] Garrido A., De la Maza M.P., Hirsch S., Valladares L. Soy isoflavones affect platelet thromboxane A2 receptor density but not plasma lipids in menopausal women. *Maturitas*. 2006 Jun 20;54(3):270-6.
- [70] Wang Y., Man Gho W., Chan F.L., Chen S., Leung L.K. The red clover (*Trifolium pratense*) isoflavone biochanin A inhibits aromatase activity and expression. *The British journal of nutrition*. 2008;99:303–310
- [71] Adams N.R. Detection of the effects of Phytoestrogens on Sheep and Cattle. *Journal of animal science*. 1995;73(5):1509-15.
- [72] Jefferson W.N., Padilla-Banks E., Newbold R.R. Disruption of the developing female reproductive system by phytoestrogens: genistein as an example.*Molecular nutrition & food research*. 2007;51(7):832-44.
- [73] Chen Y., Song W., Peng Z.H., Ge B.Y., Han F.M. Identification of metabolites of tectoridin in-vivo and in-vitro by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *The journal of pharmacy and pharmacology*. 2008;60(6):709-16.

[74] Messina M.J., Wood C.E. Soy isoflavones, estrogen therapy, and breast cancer risk: analysis and commentary. *Nutrition Journal*. 2008;7(1):17–28.

[75] Messina M., McCaskill-Stevens W., Lampe J.W. Addressing the soy and breast cancer relationship: review, commentary, and workshop proceedings. *Journal of the National Cancer Institute* 2006;98(18):1275–1284.

7. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 : Zástupci fytoestrogenů	12
Obr. 2 : Přehled podtříd flavonoidů	13
Obr. 3 : Struktura flavonoidu a izoflavonoidu	14
Obr. 4: Chemická struktura izoflavonoidů	15
Obr. 5 : <i>Glycine max</i> (L) MERR, (<i>Fabaceae</i>). – sója luštinatá	16
Obr. 6 : <i>Glycine max</i> (L) MERR, (<i>Fabaceae</i>). – semena sóji luštinaté	16
Obr. 7 : <i>Trifolium pratense</i> L. (<i>Fabaceae</i>) - jetel luční, preparát připravený z jetele červeného	17
Obr. 8: <i>Metabolismus daidzeinu a genisteinu</i>	19
Obr. 9 : Absorpce, metabolismus a vylučování izoflavonoidů	22
Obr. 10: Porovnání chemické struktury estradiolu a izoflavonu	24
Obr. 11: Chemická struktura izoflavonoidu glyciteinu.	27
Obr. 12: Porovnání obsahu izoflavonoidů u semen a klíčících semen cizrny.	29
Obr. 13: Potenciální ochranné účinky fytoestrogenů u cévních onemocnění	33
Obr. 14: Obrazy ultrazvuků a hodnoty cIMT na začátku a po 12 měsících sledování. .	35
Obr. 15: Fytoestrogeny indukované uvolňování NO z endotelových buněk	41
Obr. 16: Účinky fytoestrogenů na endotelovou buňku a na buňku hladkého svalu	48
Obr. 17: Exprese trombocytárních receptorů a metabolické pochody v trombocytech při hemostáze	51
Obr. 18: Působení izoflavonoidů genisteinu a tektorigenininu na trombocyt.	54
Obr. 19: Metabolismus tektoridinu	55