



MASARYKOVA UNIVERZITA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
ÚSTAV BIOCHEMIE



FYTOALEXINY A FYTOESTROGENY

Habilitační práce

Tomáš Kašparovský

Brno 2016

Obsah

1. Úloha nízkomolekulárních látek v obranné reakci rostlin	
1.1. Úvod	4
1.2. Obrana rostlin proti patogenům	4
1.3. Rozpoznání patogenu	5
1.4. Signální dráhy obranné reakce	7
1.5. Regulace obranné reakce	9
1.6. Oxidační stres	11
1.7. Phytoalexiny	15
1.8. Ergosterol	22
1.9. Cryptogein	25
1.10. Cíle práce a dosažené výsledky	26
1.11. Seznam publikovaných prací	28
1.12. Seznam použité literatury	29
2. Phytoestrogeny	
2.1. Úvod	35
2.2. Struktura isoflavonů	35
2.3. Funkce u rostlin	37
2.4. Zdroje isoflavonů pro člověka a zvířata	37
2.5. Metabolismu isoflavonů u člověka	37
2.6. Metabolismus isoflavonů u zvířat	40
2.7. Biologické účinky isoflavonů u člověka	42
2.8. Biologické účinky isoflavonů u zvířat	46
2.9. Využití isoflavonů pro produkci tzv. funkčních potravin	48
2.10. Možná rizika pro člověka a životní prostředí související s isoflavony	49
2.11. Cíle práce a dosažené výsledky	52
2.12. Seznam publikovaných prací	53
2.13. Seznam použité literatury	54
3. Přílohy (plné znění publikovaných prací)	64

1. Úloha nízkomolekulárních látek v obranné reakci rostlin

1.1. Úvod

Rostliny jsou v průběhu svého života vystaveny působení proměnlivého vnějšího prostředí a musí tak čelit mnoha stresovým faktorům, které ovlivňují jejich růst, vývoj a reprodukci. Rostliny nemohou uniknout před nepříznivými podmínkami okolního prostředí. Musí se bránit útokům patogenů a herbivorů a současně reagovat na abiotický stres, který zahrnuje fyzikální nebo chemické změny vnějšího prostředí jako je mechanické poškození rostlinného pletiva, nedostatek vody, nízké/vysoké teploty, nedostatek minerálních látek a další. Obranná reakce navíc musí být dobře regulována, protože reakce vedoucí k rezistenci proti patogenům nebo k aklimatizaci na abiotický stres představují nezanedbatelnou zátěž ve formě investice substrátů a energie a často jdou na úkor růstu.

Stresové faktory spouští u rostlin širokou škálu reakcí od aktivace exprese obranných genů přes změnu primárního a sekundárního metabolismu až po pozměněný růst a vývoj. Resistence nebo citlivost rostliny vůči stresu závisí na druhu stresového faktoru a na druhu a stáří samotné rostliny. Vzhledem k tomu, že ne vždy rostliny uspějí, působí nejrůznější typy biotického i abiotického stresu každoročně velké škody na zemědělských plodinách a brzdí rozvoj zemědělství v chudých oblastech.

Přežití rostlin a potažmo zemědělské výnosy tudíž závisí na rychlém rozpoznání patogenu a adekvátní reakci a na aklimatizaci rostlin na měnící se podmínky vnějšího prostředí. Studium interakce mezi rostlinami a patogeny pomáhá vysvětlit signální mechanismy, pomocí nichž se rostlinné buňky vyrovnávají s biotickým stresem, a také odhaluje, jak organismy z různých říší mezi sebou navzájem komunikují. Detailní studium těchto interakcí by mohlo vést k nalezení vhodných praktických řešení pro kontrolu vzniku a šíření chorob u zemědělsky výnosných plodin, a to především ovlivněním přirozené reakce rostliny na stres, aniž by docházelo k současnému vnášení cizorodých látek do okolního prostředí [1, 2].

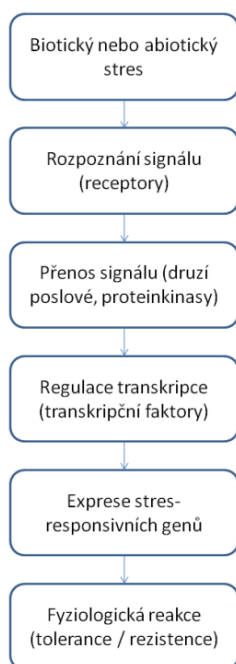
1.2. Obrana rostlin proti patogenům

Patogeneze je proces infekce, kolonizace a reprodukce patogenu v hostitelském organismu. Rostliny mohou být infikovány několika mechanismy - některé patogeny k průniku do rostlin využívají mechanického tlaku nebo rozrušují jejich povrch enzymově, jiné procházejí skrz přirozené rostlinné otvory (průduchy) a další pronikají pouze do již poškozených pletiv. Jakmile se patogen dostane do rostliny, aktivuje mechanismus vedoucí k získávání energie z organických látek z buněk hostitele.

Přesto pouze malé procento patogenů, které působí na rostlinu během jejího života, opravdu vyvolá vážné onemocnění. Interakce mezi patogenem a rostlinou je tedy převážně **nekompatibilní**, kdy buď daný druh rostliny není pro atakující patogen hostitelský, nebo rostlina konstitutivně vlastní strukturní bariéry (kutin, vosky), nebo produkuje toxické sloučeniny, které brání úspěšnému vniknutí patogenu do rostliny. V neposlední řadě mohou rostliny invazivní patogen rozpoznat a aktivovat obranný mechanismus vedoucí k omezení šíření patogenu rostlinou. Oproti tomu ke **kompatibilní** interakci, která je charakteristická úspěšnou infekcí patogenu, dochází tehdy, kdy rostlina patogen nerozpozná nebo indukuje nedostatečnou obrannou reakci. Patogenní kmeny způsobující onemocnění

rostliny se označují jako virulentní, kdežto kmeny, které téměř nezpůsobují onemocnění, ačkoliv daný druh patogenní je, se nazývají avirulentní [2].

Biotický stres u rostlin představuje napadení patogeny (víry, bakteriemi, houbovými organismy) a herbivorním hmyzem. Rozpoznání patogenu rostlinným receptorem vede mj. ke zvýšené produkci cyklických nukleotidů, které aktivují specifické iontové kanály. Zvýšení cytosolové koncentrace vápenatých iontů následně reguluje syntézu dalších signálních molekul, které jsou nezbytné pro spuštění hypersenzitivní reakce a indukci obranných genů viz obrázek 1 [1].



Obrázek 1. Obecné schéma rostlinné reakce na stres. Extracelulární signál je rozpoznán pomocí receptorů a následně je aktivována komplexní signální dráha, která vede k expresi nejrůznějších stres-responsivních genů [1].

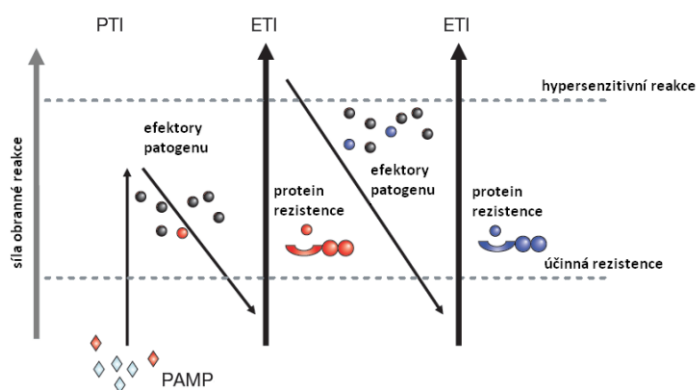
1.3. Rozpoznání patogenu

Látky, které u rostlin vyvolávají obrannou reakci, jsou tradičně označovány jako elicitory [3]. Preciznější definice rozlišuje elicitory, které nejsou rostlině vlastní, a elicitory, které jsou sice modifikované působením patogenu, ale pochází z rostlinné tkáně. Strukturní motivy molekul vylučovaných patogenními mikroorganismy jsou označovány jako PAMPs (z anglického pathogen-associated molecular patterns) [4] nebo obecněji MAMPs (microbe-associated molecular patterns) [5]. Pokud jde o strukturní motivy molekul indukovaných mikroorganismy nebo spojených s poškozením rostliny, používá se název MIMPs (microbe-induced molecular patterns) nebo DAMPs (damage-associated molecular patterns) [6]. Identifikace PAMPs pomocí rostlinných receptorů rozpoznávajících strukturní motivy patogenu (PRR, pattern-recognition receptor) spustí základní imunitní reakci (PTI, PAMP-triggered immunity) [7, 8].

Některé patogeny potlačují tuto imunitu pomocí tzv. efektorů virulence, které mohou být produkovány jak patogenem, tak mohou pocházet i z rostlinných buněk, kde vznikají v rámci infekce

patogenem. Rostliny však mohou obsahovat specifické geny rezistence, které produkují proteiny rezistence schopné tyto efektoři rozpoznat a spustit tak druhou fázi imunitní reakce označovanou jako efektořem-indukovaná imunitní reakce (ETI, effector-triggered immunity). Fáze ETI rostlinné imunity je vysoce specifická, její průběh je intenzivnější ve srovnání s PTI a také je často spojena s indukcí hypersenzitivní reakce (HR) v místě infekce viz obrázek 2.

Proteiny rezistence se buď přímo účastní detekce elicitoru, nebo jsou součástí komplexu, který detekuje signál a aktivuje obrannou reakci. Signál může představovat nejen elicitor, ale i rostlinný protein, tzv. cílový protein, který se v rámci procesu infekce buďto změnil nebo se na něj navázal protein pocházející z patogenu (efektor). Tento případ se označuje jako tzv. guard model [9, 10]. Proteiny rezistence jsou většinou intracelulární proteiny bohaté na leucin, schopné vázat nukleotidy (NB-LRR, nucleotide binding, leucin rich repeat) [11, 12] a méně často receptorové kinázy typu LRR-RLK (leucin rich repeat – receptor-like kinase) a proteiny LRR-RLP (leucin rich repeat – receptor-like protein) ukotvené v membráně [13]. NB-LRR se účastní rozpoznávání různých ligandů v cytosolu, zatímco LRR-RLK a LRR-RLP rozpoznávají extracytosolové ligandy. Bezprostřední přenos signálu detekovaného proteiny rezistence není zatím příliš podrobně prozkoumán, nicméně v některých případech je pravděpodobně zprostředkovan G proteiny [14].



Obrázek 2: Schéma ilustrující vývoj rezistence rostliny vůči konkrétnímu patogenu v průběhu evoluce. ETI, imunita vyvolaná efektořem; PAMP, strukturní motiv spojený s patogeny; PTI, imunita vyvolaná PAMP [7].

Ačkoli zmíněné dvě složky imunitního systému u rostlin zapojují odlišné receptory, aktivují řadu společných obranných mechanismů, jako je změna v tocích iontů přes plasmatickou membránu, aktivace proteinkináz a mitogenem-aktivovaných proteinkináz (MAPK), produkce reaktivních forem kyslíku a dusíku (ROS a RNS), syntéza rostlinných hormonů, změna genové exprese nebo zesílení buněčné stěny [15, 16]

Strukturní složky houbových buněčných membrán a stěn bývají často rostlinami využívány jako MAMPs a vyvolávají zpravidla stejné typy bazální přirozené imunity jako jiné dobře známé elicitory, jako jsou například lipopolysacharidy a flagellin [17, 18]. Mezi plísňové MAMPs patří ergosterol, beta-glukany, chitin / chitosan a proteiny jako xylanza a cerato-platanin (BcSpL1) z *Botrytis cinerea*. Na druhé straně existují i sekretované proteiny (elicitiny) jako je například cryptogein z oomycety *Phytophthora cryptogea* [15, 19-21].

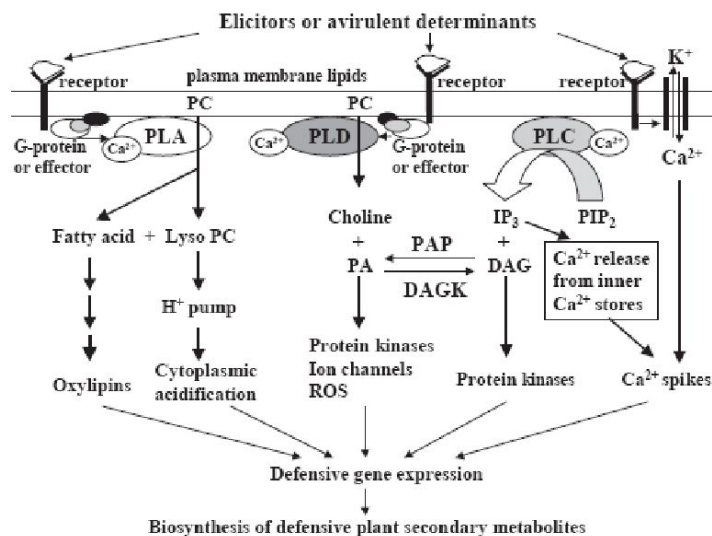
1.4. Signální dráhy obranné reakce

Jednou z prvních fází signální dráhy obranné reakce je modifikace propustnosti plasmatické membrány. Jsou stimulovány toky Ca^{2+} a H^+ dovnitř buňky a toky K^+ a Cl^- ven. [22-24]. Zvýšení cytosolové koncentrace vápenatých iontů je obecnou součástí reakce na jakýkoli biotický i abiotický stres [25]. V závislosti na síle a typu stresu se liší intenzita, lokalizace v rámci buňky, doba a případně frekvence nárůstu koncentrace těchto iontů. Ca^{2+} proniká do cytosolu skrze specifické iontové kanály z extracelulárního prostoru i z vnitřních organel [26, 27]. Zvýšená koncentrace Ca^{2+} v cytosolu poté vede k aktivaci proteinkináz závislých na vápníku, CDPK (calcium-dependent protein kinase) a kalmodulinových domén signálních proteinů.

Významným dějem v rámci obranné reakce je Ca^{2+} zprostředkovaná aktivace NADPH oxidázy, která je hlavním zdrojem reaktivních forem kyslíku (ROS - reactive oxygen species) [28, 29]. NADPH-oxidáza je lokalizovaná v plasmatické membráně, kde katalyzuje redukci O_2 na O_2^- , následně dochází k přeměně na další ROS mezi nimiž hraje významnou roli peroxid vodíku. [30]. Na produkci ROS v apoplastu se dále podílí peroxidázy lokalizované v buněčné stěně [31, 32]. ROS následně pronikají dovnitř buňky, kde způsobí změnu redoxního stavu, která vede k tvorbě oxidačních produktů (oxidovaných lipidů a proteinů), které se taktéž mohou podílet na přenosu signálu [33]. Produkce ROS navíc vykazuje dvě fáze, přičemž na druhé (pomalejší) se kromě NADPH-oxidázy pravděpodobně podílí i fotosystém II v chloroplastech a respirační řetězec v mitochondriích [34, 35].

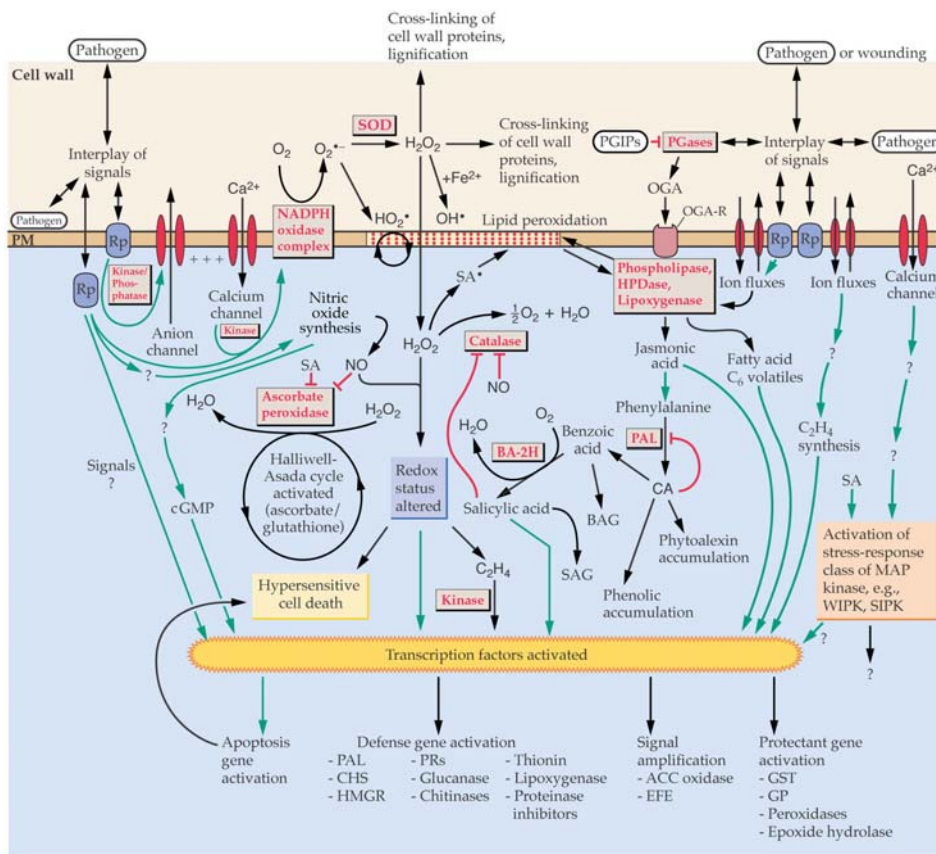
Zvýšená koncentrace Ca^{2+} a aktivace kalmodulinu jsou také nutnými prerekvizitami pro aktivaci NOS-like (NO synthase-like) enzymů a akumulaci oxidu dusnatého, na který v přenosu signálu pravděpodobně navazují cGMP a cADPR a další zvýšení koncentrace cytosolového Ca^{2+} aktivací Ca^{2+} kanálů [27, 36]. NO dále aktivuje signální dráhu MAP kináz (proteinkináz aktivovaných mitogenem) a pomocí nitrosylace mění aktivitu specifických proteinkináz [37, 38]. NO na druhou stranu ve vyšší koncentraci představuje i negativní zpětnou vazbu vzhledem k tomu, že nitrosylace inhibuje NADPH-oxidázu [39]. Předpokládá se, že NO také aktivuje antioxidační systém, který eliminuje ROS [40].

Důležitou roli při přenosu signálu v obranné reakci hrají také mastné kyseliny a další látky odvozené z fosfolipidů [41]. Po rozpoznání patogenu jsou pomocí fosfolipáz C a D syntetizovány molekuly s funkcí druhých posílů jako např. kyselina fosfatidová (PA) [42]. PA ovlivňuje plasticitu membrán, aktivuje kaskády MAPK a interaguje se specifickými protein kinázami, protein fosfatázami i NADPH-oxidázou, přičemž může měnit jejich lokalizaci i aktivitu [43]. PA je také prekurzorem pro syntézu dalších lipidů - za účasti fosfolipáz a lipoxygenáz jsou syntetizovány oxidované deriváty mastných kyselin oxylipiny, které jsou další součástí signální dráhy [44-46].



Obrázek 3. Raná signalizace po rozpoznání elicitoru. Fosfatidylcholin (PC), fosfolipáza A (PLA, fosfolipáza C (PLC), fosfolipáza D (PLD), kyselina fosfatidová (PA), fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP₂), inositoltrifosfát (IP₃), 1,2-diacylglycerol (DAG), lysofosfatidylcholin (Lyso PC), fosfatáza kyseliny fosfatidové (PAP), diacylglycerolkináza (DAGK) [47].

Na signální dráze se dále podílí fosforylace i jiné posttranslační modifikace a pravděpodobně také degradace proteinů [13]. Přenos signálu většinou pozitivně regulují proteinkinázy, zatímco negativní regulaci zprostředkovávají proteinfosfatázy [48]. Např. kaskády MAPK, které jsou aktivované působením patogenu, poraněním a ROS [10], fosforylují transkripční faktory, které odpovídají za přenos signálu na úroveň změn v expresi genů [9] viz obrázek 3. Působením interakce transkripčních faktorů s promotorovými oblastmi jsou indukovány obranné geny, které kódují PR (patogenezi vyvolané) proteiny nebo enzymy odpovědné za produkci fytoalexinů [22, 24, 36]. Důležitou třídou transkripčních faktorů, které se účastní obrany i jiných fyziologických procesů, jsou transkripční faktory WRKY, které se vyznačují vysoce konzervovanou doménou složenou z aminokyselin W,R,K a Y. Tato doména se váže na DNA, konkrétně na W-box, což je běžný element obsažený v promotorech různých genů souvisejících se systémovou rezistencí. Transkripční faktory WRKY jsou fosforylovány kinázami CDPK a tak reagují na změny cytosolové koncentrace Ca²⁺ [49]. Souhrnné schéma signalizace a regulace obranné reakce je znázorněno na obrázku 4.

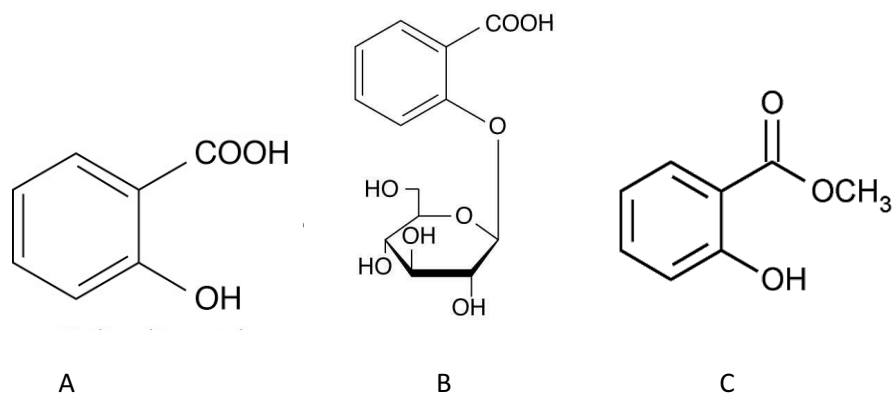


Obrázek 4. Obecné schéma signalizace a regulace obranné reakce u rostlin [50].

1.5. Regulace obranné reakce

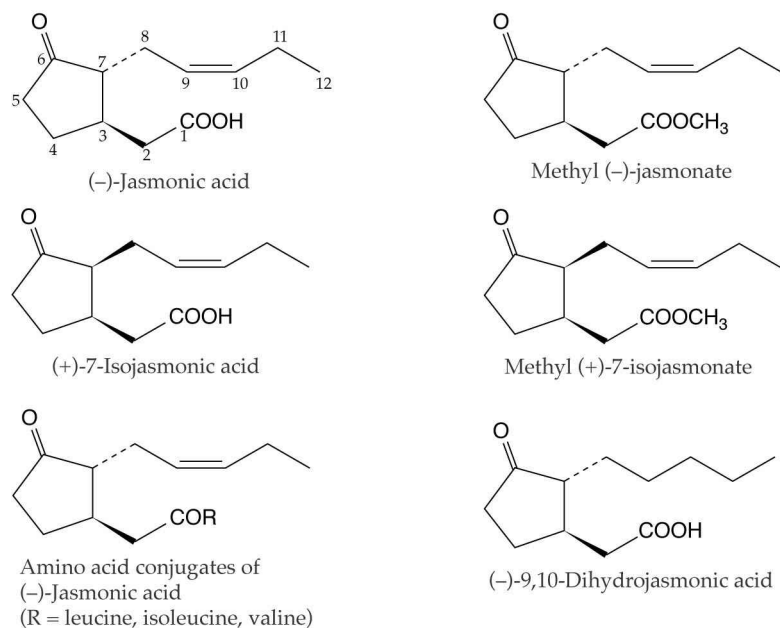
Signální dráhy obranné reakce jsou regulovány pomocí hormonů, nejčastěji jsou to kyseliny salicylová (SA) a jasmonová (JA) a ethylen (ET). Dále se při regulaci obranné reakce u rostlin uplatňují kyseliny abscisová (ABA) a gibereliny (GA), případně brassinosteroidy a polyaminy [10, 51]. Signální dráhy těchto hormonů se kříží a ovlivňují v některých případech pozitivně, jindy negativně. JA typicky zprostředkovává reakci na nekrotrofní patogeny, herbivorii a mechanické poranění, zatímco SA se většinou podílí na vzniku rezistence vyvolané napadením biotrofními patogeny. ET působí synergisticky s JA během napadení nekrotrofy.

SA se vyskytuje v rostlinách v různých formách (obrázek 5), přičemž glykosid SA je inaktivní forma a methylsalicylát je těkavá forma SA. Součástí SA dependentní signální dráhy je pozitivní regulátor NPR1 (nonexpressor of PR gene 1). Protein NPR1 je regulován jak na transkripční úrovni, tak i na proteinové úrovni pomocí redoxních systémů [52]. Neaktivní NPR1 má v cytosolu formu oligomerů spojených disulfidickými můstky. Jako odpověď na indukci kyselinou salicylovou je NPR1 redukován na aktivní monomery, které se přesouvají do jádra, kde interagují s transkripčními faktory (jde především o transkripční faktory třídy TGA [53]) a zvyšují transkripci obranných genů. NPR1 zároveň funguje jako negativní regulátor JA signální dráhy [54].



Obrázek 5. Vzorce: kyselina salicylová (A), glykosid kyseliny salicylové (B) a methylsalicylát (C).

JA patří mezi oxylipiny, je syntetizovaná z kyseliny linolenové za účasti lipoxygenázy a dalších enzymů [55] a v rostlinné buňce se vyskytuje ve formě nejrůznějších derivátů (obrázek 6). Za nejvýznamnější bioaktivní formu je považován konjugát jasmonyl-isoleucin [56, 57]. Klíčovými regulačními proteiny JA dráhy jsou COI1 (coronatine insensitive 1) a represor JA signální dráhy JAZ1 (JA ZIM-domain 1). V přítomnosti jasmonyl-isoleucinu protein COI1 vyvolá degradaci JAZ proteinů, čímž uvolní transkripční faktory (především transkripční faktory MYC) regulující expresi JA-responsivních genů. JA zprostředkovává transkripční regulaci biosyntézy některých sekundárních metabolitů, např. nikotinu [58]. JA signální dráha obvykle vede ke zpomalení růstu a je negativně regulovaná pomocí GA [59].



Obrázek 6. Metabolické deriváty kyseliny jasmínové.

Ethylenové receptory (ETR) většinou představují negativní regulátory ethylenové dráhy, které jsou v přítomnosti ET degradovány [60]. Pozitivní regulaci zprostředkovává protein EIN2 (z anglického ethylene insensitive 2), který je v přítomnosti ethylenu proteolyticky rozštěpen a jeho C-konec se přesouvá do jádra, kde stabilizuje transkripční faktor ethylenové signální dráhy EIN3 (ethylene insensitive 3) [61, 62]. EIN3 se také podílí na interakci signálních drah jednotlivých hormonů. Jednak se váže na JAZ proteiny, čímž stimuluje JA dráhu, a jednak funguje jako represor genu kódujícího

isochorismát syntázu, což je enzym biosyntézy SA. Kromě regulace obranné reakce se ethylen účastní i regulace růstu a vývoje, kde působí synergisticky s auxinem.

ABA se strukturou řadí mezi isoprenoidy a je syntetizována z isopentenylidifosfátu. Kromě posledního kroku probíhá biosyntéza ABA v plastidech [63]. Receptory pro ABA zřejmě inaktivují negativní regulátor PP2C (protein phosphatase 2Cs), což umožní aktivaci proteinkináz SnRK (SNF1-related protein kinase), které interagují s iontovými kanály [64, 65] a transkripčními faktory [66, 67]. Některé SnRK kinázy také fosforylují NADPH oxidázu a aktivují produkci ROS [68]. ABA-responsivní transkripční faktory mohou být fosforylovány i pomocí CDPK, které tak zprostředkovávají pozitivní regulaci. ABA je mezi buňkami transportována pomocí ATP-binding cassette (ABC) transportérů [69].

GA jsou skupina tetracyklických diterpenoidních fytohormonů. Jejich syntéza z geranylgeranyl difosfátu probíhá v plastidech a je regulována enzymy dioxygenázami [70]. Vazba GA na receptor *GID1* (*gibberellin insensitive dwarf 1*) vede k degradaci transkripčních regulátorů *DELLA* [71, 72]. Pokud jsou *DELLA* proteiny aktivní, omezují produkci ROS [73], zpomalují růst stonku i kořenů [74, 75] a klíčení semen, potlačují vývoj květů [71, 76] a tím, že se váží na *JAZ* proteiny, stimulují *JA* signální dráhu [77]. Naopak *JAZ* proteiny tím, že se váží na *DELLA* proteiny, stimulují *GA* dráhu.

1.6. Oxidační stres

Peroxidace lipidů (LP) je proces oxidačního poškození mastných kyselin lipidů biologických membrán, ke kterému dochází při oxidačním stresu. LP vede k narušení membránové struktury a tím i její funkce, způsobuje změnu fluidity membrán, zvyšuje se propustnost pro ionty, mění se membránový potenciál a dochází k lyzi buněk. Primárními produkty LP jsou hydroperoxydy mastných kyselin, z nichž následně vzniká rozsáhlé množství sekundárních metabolitů. Tyto sloučeniny bývají často velice reaktivní a narušují strukturu dalších biomolekul, napomáhají k dalšímu oxidačnímu poškození membrán vedoucí k buněčné smrti [78]. Jelikož k LP dochází v pozdní fázi obranné reakce a to za současného výskytu nekrotických symptomů, bývá proto považována za marker hypersenzitivní buněčné smrti [79, 80].

LP může být iniciovaná neenzymově činností ROS nebo enzymově pomocí tzv. lipooxygenáz (LOX), popř. α -dioxygenáz [81]. Hlavním substrátem těchto iniciátorů LP jsou především nenasycené mastné kyseliny (PUFA), jejichž vodíkové atomy vázané na atomy uhlíku v sousedství nenasycených dvojných vazeb jsou vysoce citlivé na oxidační působení. Lipidy membrán u rostlin obsahují převážně kyselinu palmitovou (C16), linolovou (LA, C18:2^{9,12}) a linolenovou (α -LeA, C18:3^{9,12,15}). U nenasycených mastných kyselin podléhají LP přednostně mastné kyseliny s vyšším stupněm nenasycenosti. U rostlin tedy LP podstupuje především α -LeA, která je zároveň nejrozšířenější mastnou kyselinou rostlinných membrán, a vedle ní také LA.

Neenzymová peroxidace lipidů

ROS působí jak na volné mastné kyseliny, tak i na esterifikované v membránových lipidech. Bylo zjištěno, že neenzymové působení volnými radikály může být hlavním mechanismem indukujícím LP při stárnutí rostlin [82].

Stále nebylo přesně stanoveno, které ROS jsou zodpovědné za neenzymovou LP. Na jednu stranu bývá neenzymová LP považovaná za následek masivní produkce hydroperoxidů PUFA a jejich metabolitů produkovaných během enzymové LP [79], na druhou stranu bývá této LP připisovaná spojitost s ROS vznikajícími při oxidativním vzplanutí v rané fázi obranné reakce [83]. Druhá hypotéza je podporována zjištěním, že u tabáku ovlivněného cryptogeinem za různých světelných podmínek není hladina LP vyvolaná činností ROS a 9-LOX ovlivněna stejně. LP zprostředkovaná činností 9-LOX je ovlivněna více než LP vyvolaná neenzymově, tzn., že 9(S)-hydroperoxy PUFA vznikající působením 9-LOX (tzn. dominantní dráhou vedoucí k LP, která je indukovaná cryptogeinem) nejsou pravděpodobně zcela zodpovědné za neenzymovou LP [83].

Enzymová peroxidace lipidů - lipoxygenasy

LOX (linoleate:oxygen oxidoreductase, EC 1.13.11.12) patří mezi enzymy běžně se vyskytující u rostlin, které jsou zapojeny v regulaci celé řady vývojových procesů (klíčení, stárnutí). Při napadnutí rostliny patogenem dochází nejen k aktivaci v buňce již konstitutivně přítomných LOX, ale také k indukci exprese příslušných genů a tedy k syntéze nových LOX [84]. Dráhy katalyzované pomocí LOX jsou aktivním procesem zapojeným v hypersenzitivní buněčné smrti u rostlin; inhibice/aktivace LOX drah vede k inhibici/aktivaci buněčné smrti, což ukazuje, že LOX-dependentní LP je znakem HR-PCD (PCD - programmed cell death). Spojení mezi LP a PCD podporují i další experimenty, které ukazují, že nekrotické symptomy jsou indukovány i nepřímou produkcí hydroperoxidů *in planta*, tj. přímou infiltrací fyziologického množství hydroperoxidů odvozených od α -LeA a LA do listů tabáku nebo infiltrací volných PUFA do listů, v nichž byla předtím indukována aktivita LOX pomocí MeJA [79].

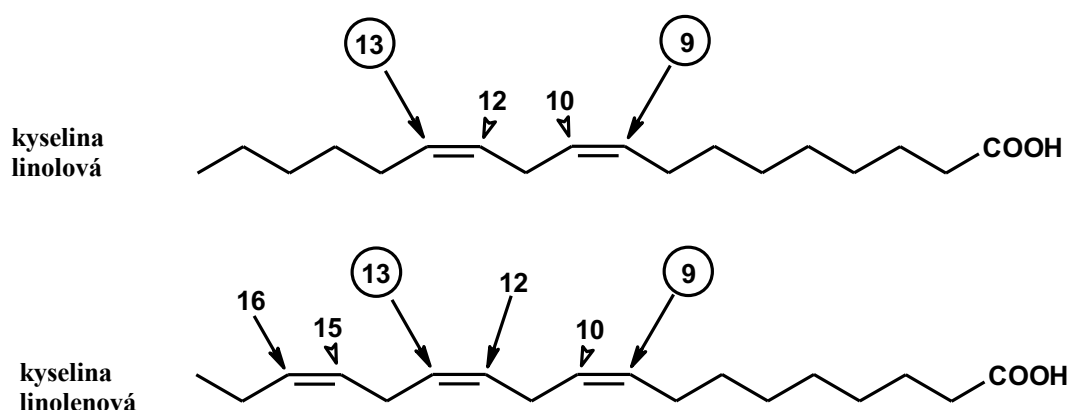
V rostlinách se nachází několik izoenzymů LOX, které se liší podle jejich pl, pH optima, molekulové hmotnosti a substrátové a polohové specifity. Většina LOX jsou rozpustné enzymy lokalizované převážně v cytosolu, ale některé se nacházejí také v chloroplastech, mitochondriích, vakuolách, jádře nebo přímo vázané v membránách [46]. Výskyt LOX je také orgánově specifický [85] a indukce exprese jejich genů bývá závislá na přítomnosti hormonů jako je JA, MeJA nebo SA [86]. Substrátem LOX jsou převážně volné PUFA, které jsou uvolňovány z membránových lipidů činností lipáz (např. fosfolipáza A2 [87-89] nebo galaktolipáza [83] nebo lipid acyl hydroláz (LAH). Mnoho LAH patří do třídy patatin-like proteinů, jejichž exprese bývá rovněž orgánově specifická a které katalyzují deacylaci glykolipidů a fosfolipidů nebo výhradně glykolipidů [83]. Součástí signální dráhy vedoucí k LP je tedy vedle aktivace LOX taky předchozí aktivace/exprese příslušných lipáz, které zajišťují dostatek substrátů pro činnost LOX. Navíc existují i LOX, které přednostně působí na esterifikované PUFA membránových lipidů [90, 91]; jedná se převážně o LOX lokalizované přímo mezi lipidy membrán. Vznikající hydroperoxydové mastných kyselin pak bývají následně z lipidů uvolňovány pomocí lipáz preferujících esterifikované produkty LP.

Mechanismus oxygenace PUFA pomocí LOX je podobný mechanismu jako u LP vyvolané ROS avšak s tím rozdílem, že LOX produkuje hydroperoxydové PUFA stereospecifickým odstraněním vodíkového atomu z methylenové skupiny (odstranění (S)-protonu). Po následném radikálovém přeskupení a přesunu dvojných vazeb z pozice *cis* do *trans* (vznik konjugovaných dvojných vazeb) a reakcí s molekulou kyslíku dochází ke vzniku pouze (S)-enantiomerů hydroperoxydových PUFA, a to na atomu uhlíku v pozici 9 nebo 13. Celý proces probíhá v rámci komplexu enzym-PUFA, nedochází tak k tvorbě volných radikálů mastných kyselin, které by se uvolňovaly do cytoplasmy [46]. LP iniciovaná působením LOX je inhibovaná při nízké dostupnosti O₂. Za takových podmínek může být aktivita LOX sice

indukovaná, ale nedostatek tohoto kosubstrátu PUFA při reakci katalyzované LOX vede k inhibici nejen LP ale i následné buněčné smrti [79].

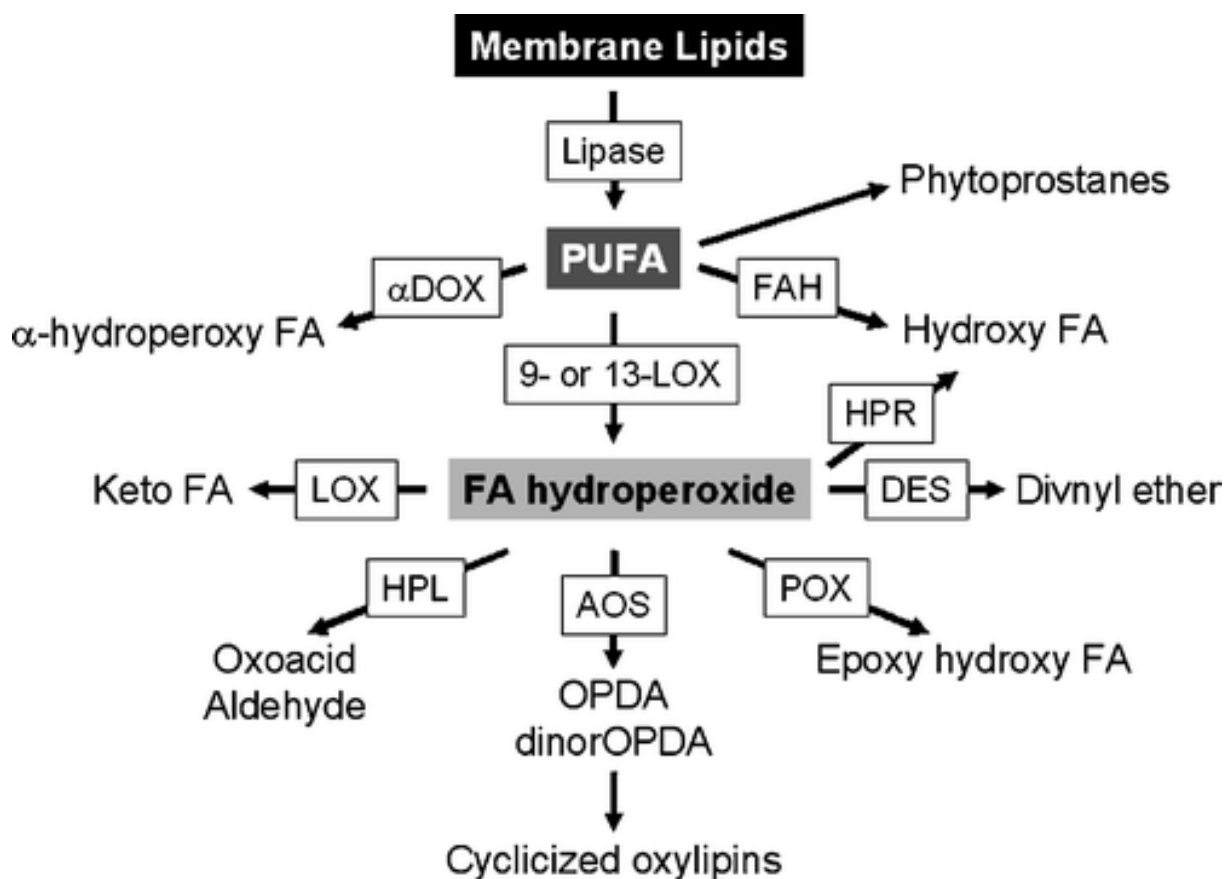
Produkty peroxidace lipidů

Při LP může docházet ke vzniku všech isomerů hydroperoxidů PUFA znázorněných na obrázku 7. Jelikož ROS nepůsobí regiospecificky, mohou tedy vyvolat peroxidaci ve všech pozicích označených na obrázku 5 šipkami, a protože nepůsobí ani stereospecificky, vedou ke vzniku racemické směsi isomerů. Pozice označené na obrázku 7 pomocí hrotů šipek jsou považovány za specifické pro činnost 1O_2 . Na rozdíl od ROS působí LOX regiospecificky i stereospecificky, jejich činností tedy vznikají pouze (S)-enantiomery 9- a 13-hydroperoxidů PUFA (obrázek 7 - označeno kroužkem).



Obrázek 7. Pozice v LA a α -LeA náchylné na vznik -OOH skupiny činností ROS a LOX; šipky znázorňují pozice atakovatelné ROS, hroty šipek představují afinitu k 1O_2 , aktivita LOX je označena kroužkem.

Primární produkty LP, které jsou velice reaktivními sloučeninami, bývají dále metabolizovány rozsáhlou řadou neenzymových i enzymových reakcí. Mezi enzymy podílející se na metabolizaci hydroperoxidů PUFA patří například AOS (allenoxid syntáza), DES (divinylether syntáza), HPL (hydroperoxid lyáza), POX (peroxygenáza) a další (obrázek 8) [46, 92]. Tyto reakce vedou ke vzniku velkého množství rozličných sekundárních produktů LP, derivátů mastných kyselin, které bývají souhrnně označovány jako oxylipiny. Jde o termín označující všechny produkty LP bez ohledu na délku jejich řetězce a jiné strukturální vlastnosti (př. jasmonáty, epoxidy, hydroxy-kyseliny, C6-/C9-aldehydy, ketoly, divinylethery a další). Mnoho z těchto molekul je biologicky aktivních, vykonávají různé funkce (antimikrobiální, antifungální, signální, aktivace exprese obranných genů, produkce fytoalexinů) v regulaci vývojových nebo obranných procesů probíhajících v rostlinách. Samotné hydroperoxydy PUFA mohou vykazovat silnou antimikrobiální nebo antifungální aktivitu a spouští také fragmentaci DNA, která je charakteristickým znakem programované buněčné smrti [78, 87, 93-95]. Patří také mezi signální molekuly, které v sousedních neinfikovaných buňkách indukují syntézu fytoalexinů. Redukcí hydroperoxidů mastných kyselin vznikají dále hydroxymastné kyseliny (HFA), které představují substráty pro biosyntézu kutinu, čímž napomáhají k zesílení pletiva a tím zpomalují šíření patogenu rostlinou [96]. I mnoho dalších oxylipinů může přecházet z místa své produkce do ostatních částí rostliny a šířit tak signální a obranné reakce [97].



Obrázek 8: Příklad biosyntézy různých druhů oxylipinů. Biosyntéza oxylipinů začíná přeměnou PUFA na příslušné hydroperoxydy mastných kyselin způsobenou aktivitou LOX nebo 2-dioxygenáz (α -DOX). Reaktivní hydroperoxydy mastných kyselin jsou dále využívány jako substráty dalšími různými drahami. Allenoxid syntáza (AOS), divinylether syntáza (DES), hydroperoxid lyáza (HPL), peroxygenáza (POX), fatty acyl hydroxylasa (FAH), Hydroperoxide reduktáza (HPR), Oxo-phytodienoic acid (OPDA). Upraveno dle [98].

Aktivace jednotlivých typů LOX při obranné reakci se liší v závislosti na druhu rostliny. Některé rostliny aktivují 9-LOX, jiné 13-LOX. Příkladem rostlin aktivujících 9-LOX jsou např. tabák [79, 80], rajče [99], brambor [85, 100] nebo bavlník [84, 86, 101], zatímco zvýšená aktivita 13-LOX byla pozorována u rýže [78, 87, 102], sóji, fazolu [95] případně u *Arabidopsis thaliana* [80, 103]. Expres genů kódujících 9-LOX nebo 13-LOX může být navíc ovlivněna i vývojovým stádiem rostliny, u semen mandlovníku infikovaných houbou *Aspergillus carbonarius* bylo zjištěno, že 9-LOX-metabolismus je silně aktivovaný u nezralých semen, zatímco u zralých semen dochází především k neenzymové produkci hydroperoxidů PUFA nebo činností 13-LOX a celková exprese genů pro LOX je rapidně redukována [104]. Intenzita LP a typ iniciátoru LP se u elicitem indukované obranné reakce liší také v závislosti na druhu rostliny i příslušného elicitoru, popř. na typu interakce - kompatibilní vs. Nekompatibilní [105, 106]. U listů tabáku bylo zjištěno, že jak infiltrace 13-hydroperoxidů, tak i *in planta* produkce 9-hydroperoxidů linolenové kyseliny mohou obě indukovat nekrózu rostlinného pletiva. Tato data naznačují, že v závislosti na druhu rostliny mohou být jak 13- tak i 9-hydroperoxydy PUFA produkovány jako účinné efektoxy HR buněčné smrti, a to spolu se svými metabolity a degradačními produkty.

Neenzymové a enzymové procesy vedoucí k LP se mohou navíc vzájemně ovlivňovat; narušení jedné dráhy, která za patologických podmínek normálně indukuje LP, může být kompenzováno aktivací

ostatních dvou drah. Například u rostlin lilku brambor bylo zjištěno, že potlačení 9-LOX dráhy je zcela nahrazeno zvýšenou aktivitou neenzymové i 13-LOX dráhy, a to navíc za současného vzniku nekrózy v porovnatelném rozsahu jako po působení 9-LOX [107]. Podobná kompenzace byla pozorovaná i u tabáku. Podíl neenzymové a enzymové LP se navíc může měnit i v závislosti na světelných podmínkách [108].

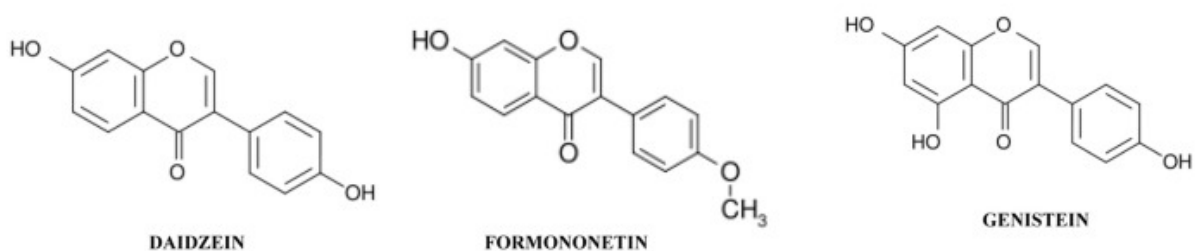
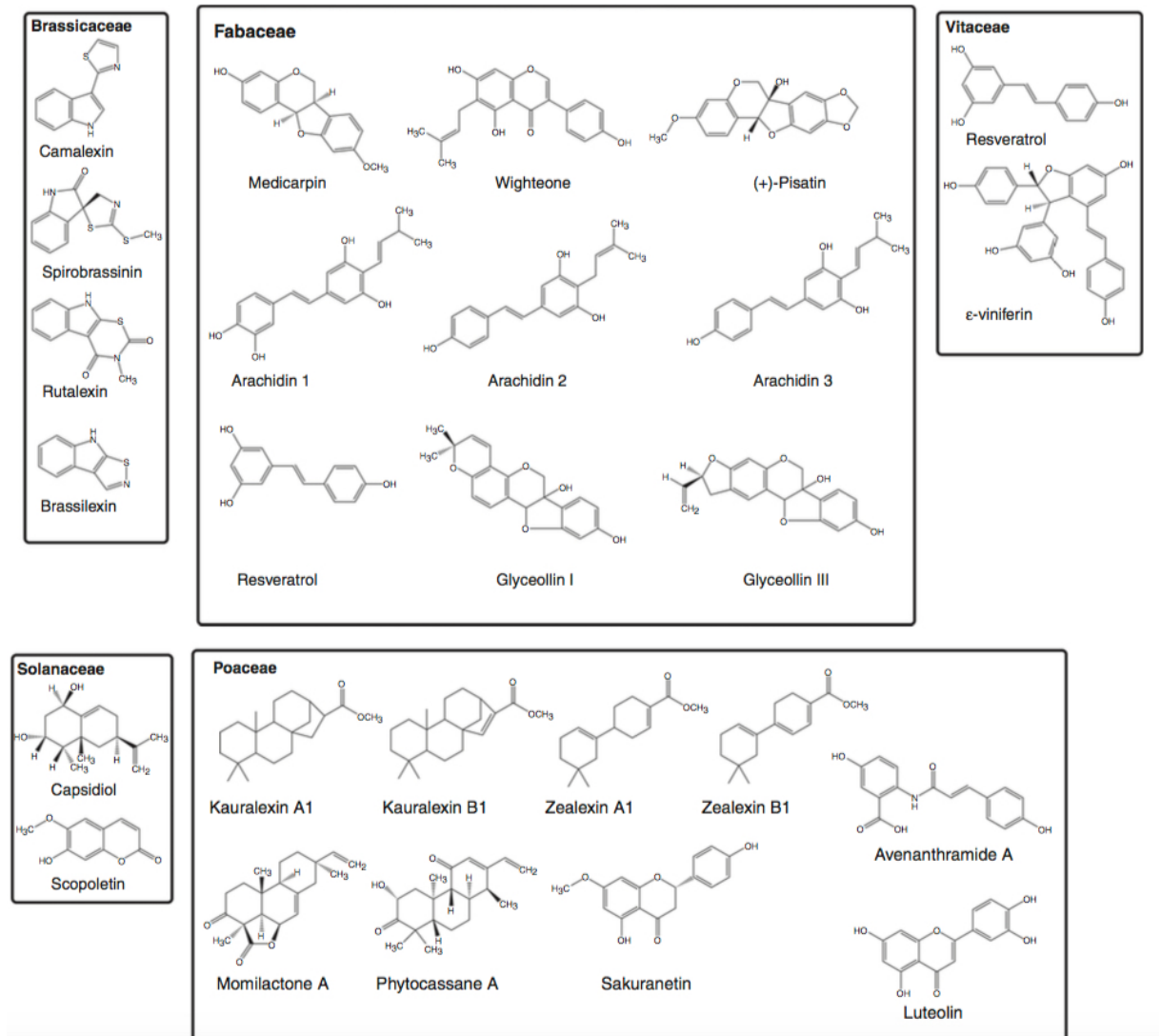
1.7. Fytoalexiny

Obranná reakce rostlin stresovaných nebo napadených patogenem či herbivorem vede k syntéze fytoalexinů, díky tomu jsou fytoalexiny často využívány jako markery obranné reakce rostlin. Tyto nízkomolekulární antimikrobiální sekundární metabolity mají značně rozlišné struktury, které se liší mezi jednotlivými druhy rostlin (obrázek 9). Svou chemickou strukturou mohou být řazeny mezi terpenoidy, saponiny, fenoly a fenylpropanoidy, pterokarpany, stilbeny, alkaloidy nebo glukosinoláty. Nejen struktura fytoalexinů, ale i metabolické dráhy a mechanismy regulace jejich syntézy jsou značně heterogenní.

Koncept fytoalexinů, jakožto látek schopných aktivně působit proti patogenu, byl zaveden před více než 70 roky [109]. Od té doby se výzkum v této oblasti dosti rozvinul a to nejen s ohledem na roli fytoalexinů v obraně proti patogenům a škůdcům, ale také s ohledem na jejich účinky pro lidské zdraví [110-115]. Například indolové fytoalexiny obsažené v brukvovité zelenině vykazují antioxidační a anti-kancerogenní aktivitu a napomáhají k ochraně kardiovaskulárního systému [110, 115]. Fytoalexiny pocházející z podzemnice olejné (*Arachis hypogea*) mají protirakovinné a vasodilatační účinky [114]. Biologická aktivita sójového (*Glycine max*) fytoalexinu glyceollinu zahrnuje anti-proliferaci a protinádorové účinky [113]. Čirokový (*Sorghum bicolor*) fytoalexin 3-deoxyanthocyanins by mohl pomoci při snižování výskytu rakoviny zažívacího traktu [116]. Fytoalexin resveratrol z révy vinné (*Vitis vinifera*), působí proti stárnutí, má anti-kancerogenní, protizánětlivé a antioxidační vlastnosti, které by mohly chránit člověka proti chronickým onemocněním a/nebo napomáhat k dlouhověkosti [113]. Nicméně biosyntéza většiny fytoalexinů stejně tak jako regulace podílející se na jejich indukcii biotickým a abiotickým stresem a molekulární mechanismy, které jsou odpovědné za cytotoxicitu pro patogeny, jsou do značné míry stále neznámé.

Fytoalexiny jako součást obranné reakce rostlin proti fytopatogenním mikroorganismům vykazují antibakteriální, antimykotické a antivirové vlastnosti, avšak často mají i fytotoxické účinky. Rovněž bylo zjištěno, že toxicita fytoalexinů působí napříč celým biologickým spektrem a že jejich aktivita není v žádném případě omezena jen na fytopatogenní houby, i když značná pozornost odborníků je věnována především interakci rostlin s houbami [117]. Bylo provedeno srovnání toxických účinků isoflavonoidních fytoalexinů s fungicidy benomyl a mankozeb a ukázalo se, že fytoalexiny jsou podstatně méně toxické než syntetické fungicidy [118]. Přestože existují rozdíly v účinku mezi jednotlivými fytoalexiny, efektivní dávky fytoalexinů obecně spadají řádově do 10^{-5} až 10^{-4} M [119-121]. Vedle fungistatických účinků mohou fytoalexiny působit i fungitoxicky a u buněk hub vyvolat cytologické změny. Například resveratrol a pterostilben, dva z fytoalexinů vinné révy, vyvolávají u konidií *Botrytis cinerea* narušení plazmatické membrány a rozpad mitochondrií, což vede k zastavení růstu zárodečných buněk [119-121]. Fytoalexiny taktéž mohou působit jako rozpojovače transportu elektronů a oxidační fotofosforylace v rámci dýchacího řetězce, což vede k rychlému a úplnému

zastavení respirace u konidií *Botrytis cinerea* [119]. Navíc bylo zjištěno, že fytoalexiny jsou schopny vyvolat u hub i programovanou buněčnou smrt [122].

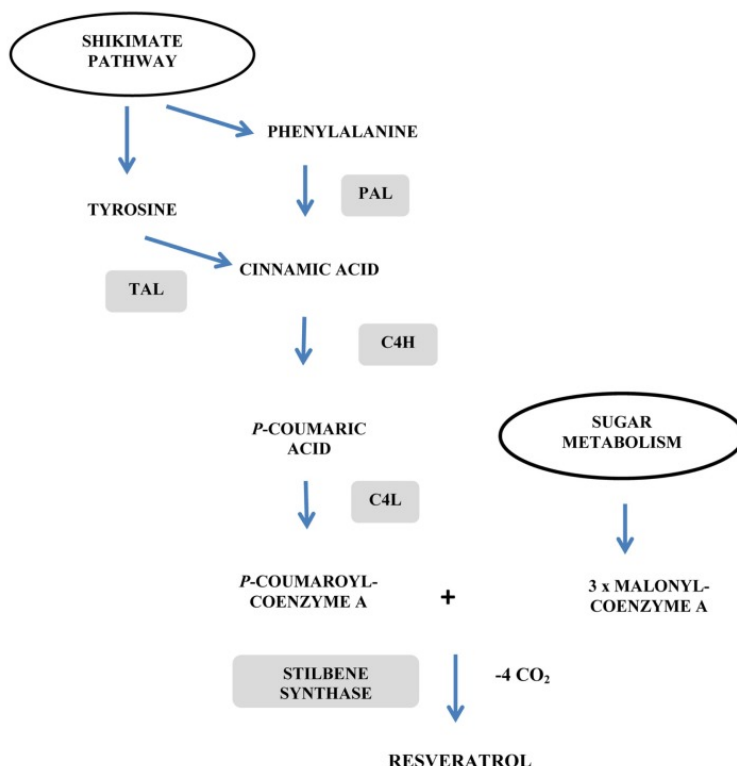


Obrázek 9. Struktury vybraných fytoalexinů [123]

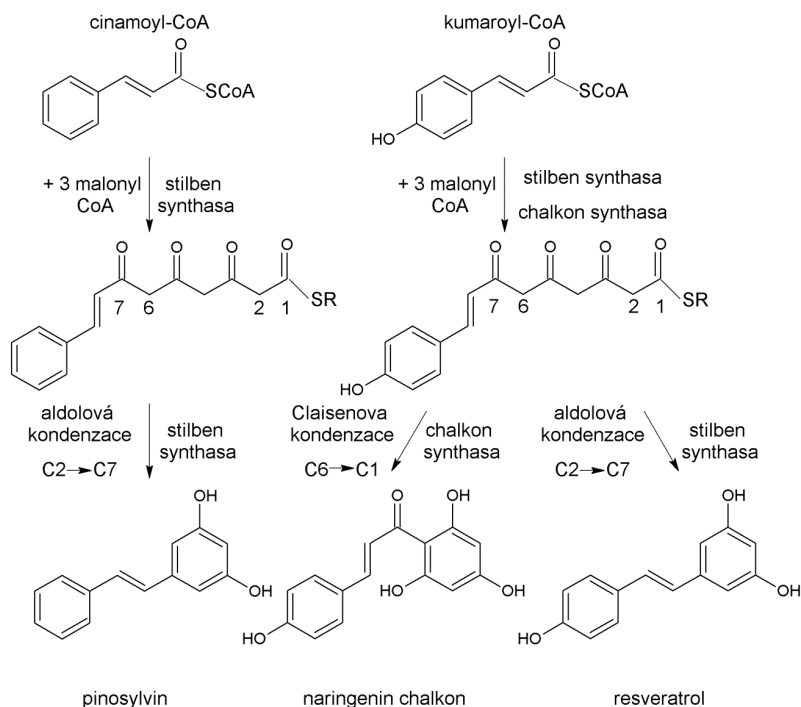
Mezi nejvíce studované fytoalexiny patří látky odvozené od stilbenů. Rostlinné buňky je produkují v rámci odpovědi na infekci houbovými patogeny [124-126], po aplikaci elicitorů [127-131], po vystavení UV-C záření a po dalších typech abiotického stresu [132-134]. Stilbenové fytoalexiny jsou rostlinami syntetizovány také po vnější aplikaci rostlinných hormonů kyseliny salicylové, jasmonové, nebo ethephonu, což je látka vyvolávající uvolnění dalšího rostlinného hormonu ethylenu [134-136].

Stilbeny jsou přirozeně produkovány např. rostlinami patřícími mezi *Vitaceae*, *Pinaceae*, *Fabaceae*, *Poaceae*, *Gnetaceae*, *Polygonaceae*, *Liliaceae*, *Moraceae* a *Cyperaceae* [137-139]. Tyto rostliny disponují enzymem stilben-syntázou (STS) a stresem se u nich stimulují signální dráhy, které vedou ke zvýšené produkci stilbenů prostřednictvím uvedeného enzymu. Nicméně vzhledem k tomu, že geny kódující stilben-syntázu mohou být indukovány i po přenesení do heterologního rostlinného systému, zdá se, že tyto signální dráhy jsou součástí obecné reakce na stres společné různým rostlinným druhům [140]. Vzhledem ke svým antifungálním vlastnostem jsou stilbeny potenciálně využitelné pro ochranu rostlin proti patogenům metodou zvyšování přirozené rezistence rostlin stimulací produkce stilbenů.

Stilbeny jsou spolu s lignany a flavonoidy řazeny mezi fenylypropanoidy. Fenylypropanoidy vznikají oxidativní deaminací fenylyalaninu fenylyalaninamoniaklyázou (EC 4.3.1.5). Následují reakce katalyzované cinamát-4-hydroxylázou (EC 1.14.13.11) a 4-kumarát-CoA-ligázou (EC 6.2.1.12) viz obrázek 10. Transkripce genů kódujících všechny výše zmíněné enzymy je indukovaná během obranné reakce [22, 141]. Nicméně klíčovým enzymem, který řídí biosyntézu stilbenů, je stilben-syntáza (STS, EC 2.3.1.95), poslední enzym biosyntetické dráhy [140]. STS se řadí do superrodiny polyketidových syntáz typu III, které se také říká CHS-like (chalcon synthase-like) polyketidové syntázy [142]. CHS a STS syntetizují ze substrátů stejný lineární tetraketidový meziprodukt. Tyto enzymy se ale liší v následných cyklizačních mechanismech. Cyklizace katalyzovaná STS probíhá aldolovou kondenzací a je doprovázena ztrátou C1 uhlíku ve formě CO₂, zatímco CHS katalyzuje Claisenovu kondenzaci (obrázek 11). Aktivní místa STS a CHS jsou překvapivě tvořena shodnými aminokyselinami. Rozdíl spočívá v rozdílné síti vodíkových vazeb mezi postranními řetězci těchto aminokyselin [143].

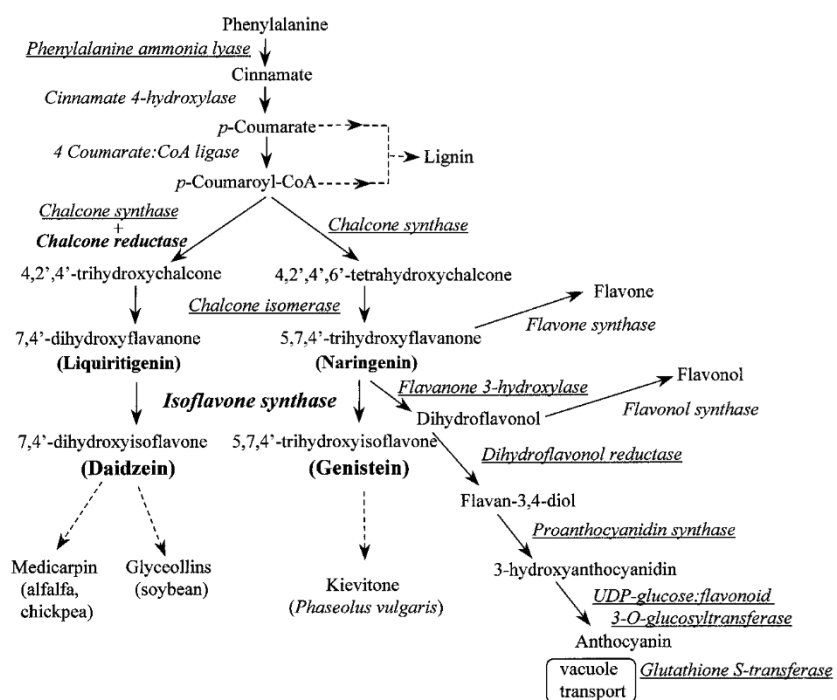


Obrázek 10. Biosyntéza resveratrolu z fenylyalaninu nebo tyrosinu fenylypropanoidní/polymalonatovou dráhou. PAL/TAL: fenylyalaninu /tyrosinu amoniak lyáza; C4H: cinamát-4-hydroxyláza; C4L: kumarát:koenzym A ligáza; STS: stilben-syntáza [144].



Obrázek 11: Reakce katalyzované enzymy chalkon-syntázou a stilben-syntázou

CHS a STS soutěžící o shodný substrát představují místo, kde jsou uhlíkové skelety rozdělovány mezi sekundární metabolismus (CHS) nebo stilbenové obranné metabolity (STS) [145]. Ve tkáních s vysokou expresí STS je hladina exprese CHS nízká a naopak. Kromě toho je během dočasného zvýšení transkripce STS vlivem UV-C záření nebo houbové infekce potlačena transkripce CHS. Tudíž se zdá, že u révy vinné a možná i u dalších rostlinných druhů syntetizujících stilbeny existuje antagonistický vztah mezi biosyntézou flavonoidů a stilbenů.



Obrázek 12: Biosyntéza flavonoidů [146].

Nejdůležitějším enzymem v biosyntéze flavonoidů je chalkon-syntáza, která je jedním z prvních enzymů této biosyntetické dráhy a zajišťuje postupné spojování tří molekul malonyl-CoA a molekuly 4-kumaryl-CoA [147]. Výsledkem této reakce je vznik molekul chalkonů, ze kterých vznikají pomocí enzymu chalkon-isomerázy naringenin a liquiritigenin, z nich poté působením enzymu isoflavon-syntázy vznikají daidzein a genistein. Ostatní skupiny flavonoidů jsou produkovány z naringenu pomocí enzymů flavon-syntázy a flavonol-syntázy (obrázek 12).

Primární produkty těchto biosyntetických drah (resveratrol, pinosylvin, genistein, daidzein atd.) jsou v rostlině dále metabolizovány. Nejčastějšími modifikacemi jsou: isomerizace, glykosylace, methoxylace a oligomerizace. V případě stilbenů (resveratrol a pinosylvin) je cis-isomer obvykle méně stabilní než trans-isomer kvůli vzájemnému postavení aromatických kruhů [138]. Některé stilbeny se nicméně vyskytují převážně jako cis-isomery. Významnou část stilbenů jsou rostliny schopny akumulovat ve formě glukosidů (např. piceid) [148]. Glykosylace je běžně se vyskytující modifikace rostlinných sekundárních metabolitů, která může ovlivňovat jejich hydrofilitu, stabilitu, vnitrobuněčnou lokalizaci i aktivitu. Glukosylované formy stilbenů mohou být rostlinou využívané pro skladování nebo pro transport z cytoplasmy do apoplastu a také jako ochrana před degradací [128]. Skladování stilbenů ve vakuole v glukosylované formě pravděpodobně chrání rostlinu před toxickými efekty stilbenů [148]. Methoxylaci resveratrolu na pterostilben a pinosylvinu na pinosylvinmonomethylether katalyzují enzymy methyltransferázy. Řada stilbenů vzniká oligomerizací resveratrolu nebo jeho derivátů. Oxidativní oligomerizace resveratrolu na viniferiny je pravděpodobně katalyzovaná peroxidázovými isoenzymy lokalizovanými v buněčné stěně a ve vakuole [149, 150]. Expres methyltransferáz i peroxidáz se mění v závislosti na vlivech prostředí, jako je biotický i abiotický stres, což vede ke zvýšení účinnosti stilbenových fytoalexinů [151]. K oligomerizaci resveratrolu také dochází enzymatickou oxidací *in vitro* pomocí křemenné peroxidázy nebo laccasových oxidáz z *B. cinerea*.

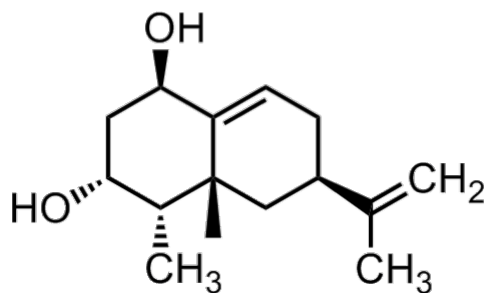
Primární funkcí stilbenů je obrana proti patogenům [120, 152]. Díky svým antifungálním, antimikrobiálním a repelentním vlastnostem chrání rostlinu před napadením houbami, bakteriemi, nematodami i herbivory. Některé rostlinné druhy jako např. *Fallopia japonica* a borovice akumulují značná množství stilbenů konstitutivně. Kořeny *F. japonica* obsahují až 16 mg/g suché hmotnosti piceidu a 1,8 mg/g suché hmotnosti resveratrolu. Různě substituované stilbeny jsou ale akumulovány také jako fytoalexiny v průběhu napadení patogenem. Tyto stilbeny jsou zřejmě zodpovědné za rezistenci některých rostlinných druhů vůči houbovým patogenům [139].

Mechanismem účinku stilbenových fytoalexinů je pravděpodobně interakce s tubuliny houbových buněk a tím způsobené změny v morfogenezi. Methylované stilbeny navíc způsobují modifikace endocelulárních membránových systémů, konkrétně rozpad endoplasmatického retikula, jaderných i mitochondriálních membrán. Toxicita jednotlivých stilbenů se liší: koncentrace, která omezí klíčení konidií *Botrytis cinerea* o 50 %, je pro resveratrol 400 μ M [121], pro ϵ -viniferin 80 μ M [153] a pro pterostilben 70 μ M [121]. Produkované množství stilbenů se pro různé druhy rostlin i pro různé kultivary jednoho druhu značně liší. Např. ve slupkách bobulí révy vinné a v infikovaných listech révy vinné dosahuje koncentrace t-resveratrolu v závislosti na odrůdě 20-2000 μ M [154, 155]. Pro zvýšení rezistence rostliny je zřejmě podstatná akumulace velkých množství resveratrolu během prvních 48 hodin po infekci [140] a rychlá konverze resveratrolu na toxičtější metabolity. Některé houby naproti tomu umí stilbeny aktivně vylučovat pomocí ABC transportérů [156] nebo metabolizovat. Některé kmeny *B. cinerea* oxidují jednoduché stilbeny pomocí laccasové stilben-oxidázy. Z málo rozpustného

resveratrolu a pterostilbenu tak vznikají prakticky nerozpustné dimery [157], pravděpodobně následně transportované do vakuol konidií [158].

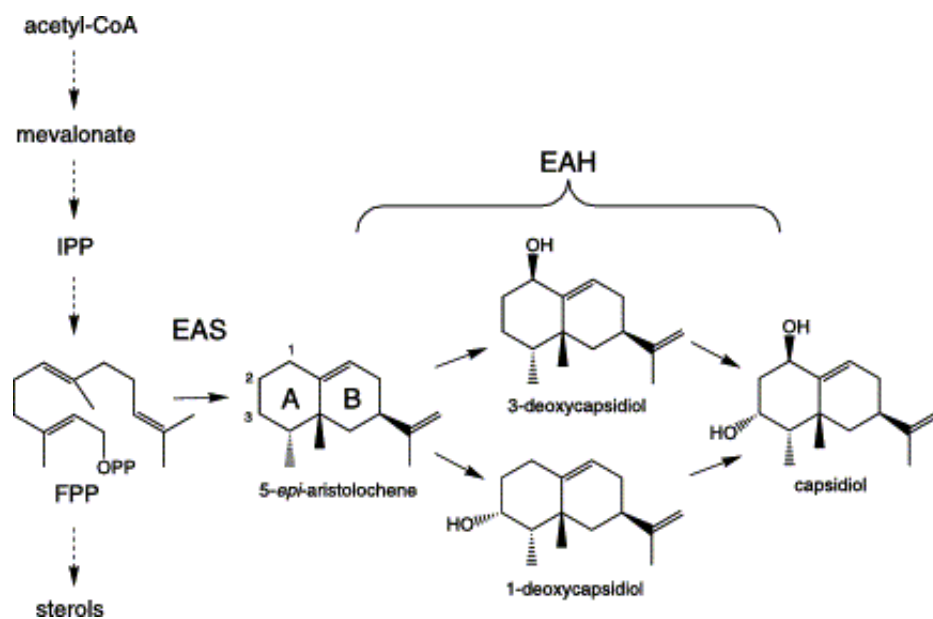
Některé stilbeny vykazují také antimikrobiální aktivitu vůči kvasinkám a některým bakteriím [159], nebo toxicitu vůči hmyzu, nematodám a jiným organismům a mají protipožerové vlastnosti [160]. Rostliny také pravděpodobně využívají antioxidační účinky stilbenů. Hydroxylové skupiny totiž fungují jako donory protonů a udílejí stilbenům redukční vlastnosti. Antioxidační vlastnosti jsou ještě výraznější, pokud stilbeny obsahují fenantrenovou strukturu. Tyto stilbeny vznikají vlivem UV záření, proto se předpokládá, že některé rostliny využívají UV záření k produkci silnějších antioxidantů a tím k potlačení oxidativního stresu, který je tímto zářením způsobený [161].

Mezi méně studované fytoalexiny patří látky odvozené od seskviterpenů, mezi něž patří například capsidiol. Tento fytoalexin byl prvně nalezen v rostlinách papriky a to jak v listech tak ve stonku (*Capsicum annuum*) po inokulaci sporami hub [162]. Capsidiol, jehož strukturní vzorec je na obrázku 13, je produkován řadou rostlin čeledi lilkovité jako odpověď na různorodé podněty vnějšího prostředí. Dále bylo prokázáno, že capsidiol je schopen bránit růstu řadě druhů hub [163, 164].



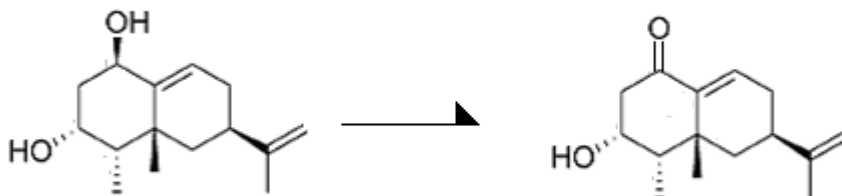
Obrázek 13. Strukturní vzorec capsidiolu.

Capsidiol je důležitou antimikrobiální sloučeninou produkovanou rostlinami tabáku (*Nicotiana tabacum*) v reakci na houbové elicitory. Jeho biosyntéza jde izoprenoidní cestou přes 5-epi-aristolochen. Oxidace 5-epi-aristolochenu na capsidiol probíhá ve dvou krocích, přičemž jeden z kroků hydroxylace je konstitutivní a druhý je zprostředkován elicitem indukovanou cytochromem P450 hydroxylázou [165]. Klíčovým krokem syntézy capsidiolu je cyklizace farnesyldifosfátu, který bývá využíván především pro syntézu sterolů. Pro syntézu capsidiolu je tedy zapotřebí aktivovat EAS (epi-aristolochen-syntázu) a inhibovat skvalen syntázu, což se děje během elicítace tabákových buněk [166, 167]. Dále během této reakce na aplikaci elicitorů také dochází k prudkému nárůstu aktivity HMG-CoA reduktázy (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase) a dalších seskviterpenových cykláz [168]. Aktivita seskviterpenocykláz je u nestimulovaných buněk tabáku nízká, nicméně po aktivaci obranné reakce dojde k prudkému zvýšení jejich aktivity během 8-12 hod po vystavení působení elicitoru. Současně dojde k aktivaci transkripce příslušného genu a zvýšení exprese EAS [169]. Dalším enzymem zapojeným do produkce capsidiolu je epi-aristolochen-hydroxyláza (EAH), která katalyzuje hydroxylaci na uhlíku C1, případně C3 (obrázek 14)[170]. Další známou možností je hydroxylace na uhlíku C3 pomocí indukibilní P450 hydroxylázy, po které následuje hydroxylace na uhlíku C1 za pomoci konstitutivní P450 hydroxylázy. Obě tyto hydroxylační reakce vyžadují přítomnost O₂ a NADPH [171]. Hydroxylace 5-epi-aristolochenu je důležitým regulačním krokem při syntéze capsidiolu [170, 172].



Obrázek 14. Schéma elicitem vyvolané biosyntetické drány capsidiolu u *Nicotiana tabacum* [172].

V rámci studia interakce rostlin papriky a patogenů *Botrytis cinerea* a *Fusarium oxysporum* bylo zjištěno, že dochází k akumulaci capsenonu (obrázek 15). Tato látka vzniká oxidací capsidiolu na keton čímž dojde k snížení antifungálních vlastností a snížení toxicity capsidiolu [164]. Pravděpodobně se takto patogenní houby brání toxickým účinkům capsidiolu [163].

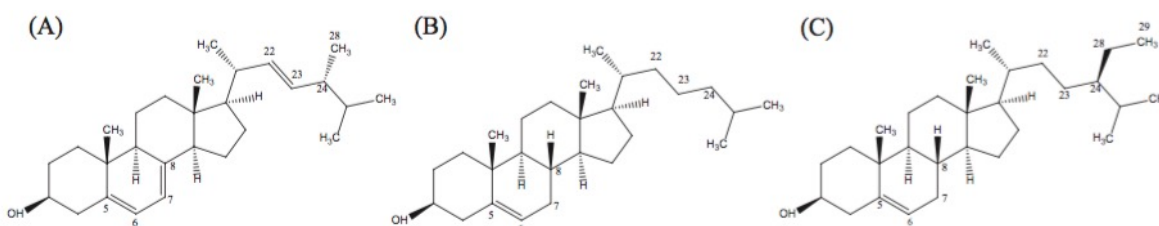


Obrázek 15. Detoxifikace capsidiolu na capsenon [164].

1.8. Ergosterol

Ergosterol je nejrozšířenější membránový sterol u hub [173, 174]. Vzhledem k tomu, že rostliny nejsou schopny syntetizovat ergosterol, je rozpoznáván rostlinnými buňkami jako cizorodý, spadá tak do skupiny lipidických biotických elicitorů [175-177]. Z hlediska obranné reakce rostlin patří ergosterol mezi MAMP, neboť je schopen vyvolat určité fáze této reakce. Stanovení koncentrace ergosterolu v rostlinných pletivech je také využíváno k určení úrovně houbové infekce [173], a ergosterol je jako "houbový marker" využíván v kulturách obilovin, například u ječmene a kukuřice [178]. Nicméně v dnešní době není ergosterolu jako MAMP věnováno tolik pozornosti, jak by se dalo očekávat.

Steroly, mezi něž ergosterol patří, jsou součástí rozsáhlé rodiny izoprenoidních sloučenin, které mají pozoruhodnou strukturní a funkční rozmanitost v živých organismech [179]. Steroly, které jsou přítomny v plazmatických membránách eukaryotických buněk, jsou nezbytné pro organizaci a funkci těchto membrán. Ergosterol je hlavní složkou membrán u nižších eukaryot, zatímco cholesterol se nachází jako hlavní sterolová složka membrán u živočišných buněk [180, 181]. Sitosterol je zase nejhojnější z fytosterolů [182]. Ve srovnání s cholesterolem má ergosterol navíc nenasycenou vazbu v poloze C7 - C8 a další methylovou skupinu (C28) na pozici C24. Oproti sitosterolu má ergosterol rovněž navíc nenasycenou vazbu v poloze C7 - C8 a v pozici C24 je namísto ethylové skupiny (C28 - C29) skupina methylová (C28) (viz obrázek 16). Tyto strukturální rozdíly pravděpodobně umožňují rostlinným buňkám rozpoznat ergosterol jako cizorodou MAMP [183]. Zajímavé je, že v rámci biosyntézy ergosterolu se tyto z funkčního hlediska důležité složky struktury tvoří relativně pozdě [179, 184].



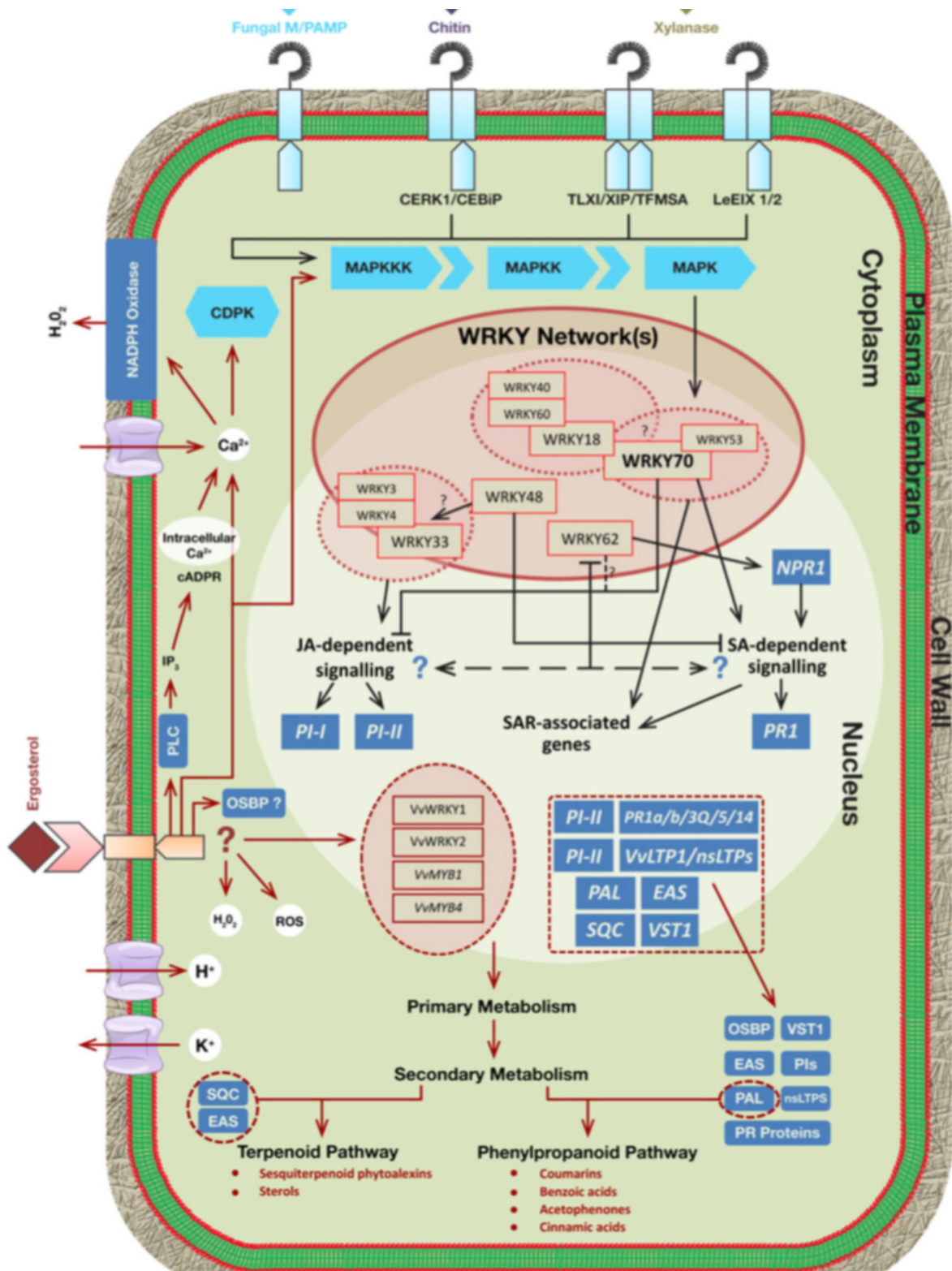
Obrázek 16: Chemické struktury ergosterolu (A) , cholesterolu (B) a sitosterolu (C) .

Mechanismus rozpoznávání ergosterolu rostlinnými buňkami není zatím detailně popsán. Nicméně se předpokládá, že rostliny buď mají receptor pro ergosterol nebo využívají alternativní MAMP receptor. Další možností účinku ergosterolu na rostlinné buňky je ovlivnění tzv. lipidických raftů v rostlinných membránách a to díky schopnosti tohoto sterolu tvořit velmi stabilní mikrodomény [181, 185].

Po rozpoznání ergosterolu rostlinnou buňkou dochází přenosu signálu, který vyvolá ranou fázi obranné reakce rostliny. Tyto procesy jsou provázeny změnami potenciálu v plazmatické membráně [185, 186], změnami v tocích H^+ iontů v důsledku kterého dochází k rychlé přechodné alkalizaci růstového média [176, 183, 185, 187]. Dále pak dochází k mobilizaci vnitřních zásob vápenatých iontů, aktivaci z oxidativního vzplanutí a produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) [183]. Signální dráha aktivovaná ergosterolem dále zahrnuje proteinkinázu C (PKC) a fosfolipázu A2 (PLA2) [44].

Schéma na obrázku 17, převzato z [188] naznačuje známé souvislosti mezi ergosterolem vyvolanými signálními procesy a intracelulárními mechanismy, které jsou aktivované rozpoznáním

chitinu a xylanázy. Procesy zobrazené na obrázku 17, včetně proteinů a dalších metabolitů, jsou výsledkem studií na tabáku a vinné révě. Ergosterol po rozpoznání rostlinnou buňkou spouští jak vtok Ca^{2+} do buňky tak uvolňování intracelulárních rezerv Ca^{2+} . Ergosterol je pravděpodobně rozpoznán pomocí membránového receptoru stejným způsobem jako ostatní M / PAMP (označen hnědou barvou na levé straně schématu). Dále byla prokázána existence intracelulárního oxysterol-vázacího proteinu (OSBP), který by taktéž mohl sloužit k identifikaci ergosterolu. Hnědými šipkami jsou znázorněny známé metabolické dráhy a jejich výsledné metabolity, které jsou zapojeny do obranné reakce vyvolané ergosterolem. Navíc ergosterol spouští signalizaci na bázi MAPK, která následně aktivuje interakce mezi některými WRKY transkripčními faktory což vytváří složitou WRKY síť. Přerušované čáry označují domnělé reakce a otazníky představují neznámé mechanismy interakce. Dále jsou ergosterolem aktivované tři důležité metabolické enzymy, které přispívají k produkci specifických metabolitů a to seskviterpen-cykláza (SQC), epi-aristolochen-syntáza (EAS) a fenylalanin amoniaklyáza (PAL), označeny jsou čerchovaným kruhem v dolní části obrázku 17.



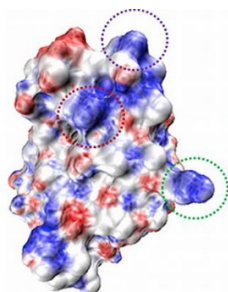
Obrázek 17. Souhrn všech známých i domnělých mechanismů a „hráčů“ důležitých pro vnímání případně ovlivnění obranné reakce rostlinné buňky pomocí ergosterolu. cADPR (cyklická ADP-ribóza), CDPK (kalcium-dependentní protein kináza), CeBiP (chitin-elicitor vázající protein), CERK1(chitin-elicitor receptor kináza), EAS (epi-aristolochen syntáza), IP3 (inositol 3-fosfát) JA (kyselina jasmínová), LeEIX (Lycopersicon esculentum ethylen-indukované xylanáza), MAPK, (MAP kináza), MAPKK (MAP kináza kináza), MAPKKK (MAP kináza kináza kináza), NPR1 (Nonexpressor of pathogenesis-related gene 1), nsLTP (nespecifický lipid přenášející protein), MYB, myeloblastóza; OSBP (oxysterol vázající protein), PAL (fenylalanin amoniak lyáza), PLC (fosfolipáza C), PI (inhibitor proteáz), PR (Proteiny souvisejících s patogenezí), ROS (reaktivní formy kyslíku), SA (kyselina salicylová), SAR (systémově získaná rezistence), SQC, (sesquiterpen cykláza), TFs, (transkripční faktory), TFMSA (kyselina trifluormethylsulfonová), TLXI (thaumatinu podobný inhibitor xylanázy), VST1 (*Vitis stilben syntáza 1*); Vv (*Vitis vinifera*), XIP (xylanázu inhibující protein) [188].

1.9. Cryptogein

Cryptogein je malý protein produkovaný oomycetou *Phytophthora cryptogea* patřící do skupiny tzv. lipid přenášejících proteinů. Zástupci rodu *Phytophthora* patří mezi hemibiotrofní organizmy, které si sami neumí syntetizovat steroly, avšak je nezbytně potřebují pro svoji reprodukci, a proto jsou odkázané na jejich získávání z membrán hostitelských rostlin. K tomuto účelu produkují specifické extracelulární proteiny, které se souhrnně označují jako elicitory, neboť jsou tyto proteiny schopné vyvolat u hostitelských rostlin obrannou reakci. Tyto elicitory slouží k přenosu mastných kyseliny a sterolů mezi membránami hostitele a patogenu, přičemž u těchto proteinů nebyla objevena žádná enzymová aktivita. Elicitin cryptogein je tedy fyziologicky využíván pro získávání fytosterolů z hostitelských rostlinných membrán a jejich přenesení směrem k patogenu, u něhož následně spouští aktivní fázi reprodukce, nebo funguje jako zásobárna sterolů [189].

Elicitory se podle jejich izoelektrického bodu obecně dělí na kyselé α -elicitory ($pI < 5$) a bazické β -elicitory ($pI > 7.5$). Počet negativně nabitých aminokyselin (Asp, Glu) je u obou skupin téměř konstantní a pohybuje se v rozmezí od 3-5. Velice se však liší počtem pozitivně nabitých aminokyselin. Kyselé elicitory ve své struktuře obsahují 2-4 lysiny, zatímco bazické elicitory mají lysinů 6. Strukturální rozdíly mezi oběma skupinami elicitinů se odráží v jejich rozdílných schopnostech aktivovat obrannou reakci u rostlin. Obecně mají kyselé elicitory nižší schopnost vyvolat obrannou reakci u hostitelských rostlin než bazické elicitory, které jsou rostlinami detekované již v nanomolárních koncentracích [190].

Z hlediska struktury je cryptogein (obrázek 18) malý hydrofilní globulární protein o velikosti 10 kDa, který obsahuje 98 aminokyselin a jeho terciární struktura je tvořena pěti α -šroubovicemi, jedním antiparalelním β -skládaným listem a flexibilní ω -smyčkou. Tyto struktury jsou spojeny třemi disulfidickými můstky (Cys3-Cys71, Cys27-Cys56, Cys51-Cys95) a vodíkovými vazbami a vytváří velkou hydrofobní dutinu uvnitř cryptogeinu. Vstup do dutiny je tvořený β -skládaným listem a ω -smyčkou, kterou tvoří aminokyseliny v pozicích 33 až 42 spojující $\alpha 2$ - a $\alpha 3$ -helix [191, 192]. Právě do této kavity, která obsahuje striktně konzervovaná hydrofobní residua, se mohou vázat steroly a mastné kyseliny [193-195]. Předchozí studie naznačily, že pravděpodobně existuje určitý vztah mezi vazbou sterolů a aktivací obranné reakce u buněk tabáku [196-198]. Předpokládalo se, že navázání sterolu do hydrofobní kavity je zřejmě nutným krokem pro vazbu cryptogeinu na vysokoafinitní místo rostlinné membrány a pro aktivaci signální kaskády vedoucí k rané fázi obranné reakce. Jelikož navázání sterolu způsobuje konformační změnu ω -smyčky, bylo navrženo, že právě tato změna by mohla být tím krokem, který určuje intenzitu vyvolané obranné reakce [199].



Obrázek 18: 3-D struktura cryptogeinu. Kroužkem jsou označeny oblasti pravděpodobně důležité pro správné rozpoznání cryptogeinu rostlinnou buňkou.

1.10. Cíle práce a dosažené výsledky

V předkládané práci týkající se úlohy nízkomolekulárních látek při obranné reakci rostlin byl věnován zřetel signálním molekulám zapojeným do signalizace a regulaci obranné reakce vyvolané ergosterolem. Dalšími aspekty byly úloha reaktivních forem kyslíku (ROS) a dusíku, peroxidace lipidů a tvorba fytoalexinů v rámci obranné reakce rostlin vyvolané různými druhy elicitorů. Pro tyto účely byly zavedeny nové metody stanovení fytoalexinu capsidiolu a produktů peroxidace lipidů pomocí HPLC a MS metod (publikace 2 a 6).

V rámci studia regulace obranné reakce vyvolané ergosterolem u buněk a rostlin tabáku (publikace 5) bylo zjištěno, že jako klíčové rostlinné hormony působí kyselina salicylová (SA) a spermin a to především při aktivaci exprese obranných genů zahrnujících PAL, PR1a, PR5 a tPOX1. Dále pak byla zjištěna zvýšená aktivita PAL vedoucí k produkci SA, která aktivuje expresi PR1a. Naproti tomu byla indukována exprese PR5 a tPOX1 v rámci regulace sperminem, jehož zvýšená hladina byla rovněž detekována po aplikaci ergosterolu na rostliny tabáku. Ačkoliv byla po aplikaci ergosterolu na tabákové rostliny zjištěna zvýšená kumulace transkriptu LOX a NaLOX3, nebyla pozorována zvýšená produkce kyseliny jasmonové. Tento rostlinný hormon tedy pravděpodobně nehraje v rámci regulace této obranné reakce roli. Důležitou roli v signalizaci obranné reakce tabáku po aplikaci ergosterolu hrají vápenaté ionty a to především na aktivitu a expresi PAL a na tvorbu transkriptu PR1a. Na druhé straně jen minimálně je ovlivněna pomocí vápenatých iontů tvorba transkriptu PR5a a tPOX1. Dále bylo zjištěno, že v rámci této obranné reakce je produkován NO, který je při signalizaci klíčovou molekulou ovlivňující a transkripci PAL PR1a, PR5, tPOX a aktivitu PAL.

V rámci studia úlohy ROS, peroxidace lipidů a tvorby fytoalexinu capsidiolu bylo využito modifikovaných forem elicitoru cryptogeinu, které byly aplikovány na buňky a rostliny tabáku. Modifikace v rámci molekuly cryptogeinu směřovaly jednak do oblasti odpovědné za vazbu sterolů a mastných kyselin (publikace 1, 4 a 6) a jednak na povrch molekuly (publikace 3 a 6). Při sledování produkce ROS bylo nejprve zjištěno, že omezení vazby sterolů a mastných kyselin do kavity cryptogeinu výrazně omezuje až zastavuje produkci ROS, nicméně buněčná smrt zůstává zachována na původní úrovni své intenzity (publikace 1). V dalších experimentech zaměřených na dopad vazby sterolu do kavity cryptogeinu na povrch molekuly (publikace 4) bylo ovšem zjištěno, že samotná vazba těchto sterolů není tím klíčovým faktorem pro zastavení produkce ROS. Jako klíčové se naopak ukázaly změny na povrchu cryptogeinu (publikace 3), kdy mutace omezující nasedání na plazmatickou membránu tabákových buněk výrazně snížila schopnost cryptogeinu vázat steroly a následně tak snížila produkci ROS a s ní související produkci capsidiolu. Pro další experimenty byly proto připraveny modifikované formy cryptogeinu se sníženou schopností vázat steroly bez vlivu na povrch molekuly cryptogeinu, které byly srovnávány s modifikací ovlivňující i povrch molekuly cryptogeinu (publikace 4). Výsledky těchto experimentů jasně ukázaly, že pro produkci ROS a capsidiolu není nezbytná vazba sterolu do kavitu cryptogeinu a ani související posun ve struktuře cryptogeinu v ω -smyčce. Naopak modifikace cryptogeinu směřující mimo ω -smyčku, ale ovlivňující posun aminokyselinových zbytků potřebných k vazbě na membránu, výrazně ovlivnily produkci ROS a capsidiolu. Jako důležité se v této reakci ukázaly lyzinové zbytky

na povrchu cryptogeinu ovlivňující orientaci a nasedání cryptogeinu na plazmatickou membránu buněk tabáku.

Produkce ROS v rámci obranné reakce rostlin je pouze jednou částí procesu vedoucí k peroxidaci lipidů, která je následně zodpovědná za buněčnou smrt. Pro detailnější pochopení procesů spojených s rozpoznáváním cryptogeinu s dopadem na buněčnou smrt, případně další s peroxidací spojenou regulací obranné reakce byla provedena další studie (publikace 6). V rámci těchto experimentů byl sledován vliv modifikace vazebného místa pro steroly a povrchu cryptogeinu na průběh peroxidace lipidů u rostlin a buněk tabáku. Tyto experimenty ukázaly, že blokáce vazby sterolu do kavity cryptogeinu nemá žádný vliv na celkovou peroxidaci lipidů spojenou s obrannou reakcí. Naopak modifikace určitých částí povrchu cryptogeinu vedla k výraznému poklesu celkové peroxidace lipidů a ke změně jednotlivých složek tohoto procesu.

Lze tedy konstatovat, že účinek cryptogeinu nezávisí ani tak na změně konformace ω -smyčky, ke které dochází po vazbě sterolu, jako spíše na celkovém povrchovém náboji proteinu. Především na pl proteinu, správném rozložení náboje na povrchu proteinu a na přítomnosti specifických aminokyselin ve struktuře proteinu. Jedná se především o lysiny umístěné na povrchu proteinu jako je např. K13, ale také o aminokyseliny nacházející se v blízkosti ω -smyčky, mezi které patří např. leucin v poloze 41, neboť cryptogein obsahující mutaci L41 vykazuje signifikantně sníženou schopnost vazby na plazmatickou membránu rostlinných buněk. Výsledky tedy sice nepotvrzují význam změny konformace ω -smyčky pro indukci obranných dějů, ale podporují její důležitost pro správnou interakci proteinu s vysokoafinitním vazebným místem plazmatické membrány. Specifické aminokyseliny v ω -smyčce včetně pozitivně nabitých lyzinových residuí na povrchu proteinu jsou tedy důležité z hlediska správné orientace proteinu při nasednutí na membránu a schopnosti proteinu získávat steroly z rostlinných membrán. Schopnost cryptogeinu vytrhávat steroly z biologických membrán významně napomáhá rozvoji nekrózy rostlinného pletiva a jde tedy o velice aktivní proces usnadňující průnik patogenu do infikované rostliny. Dále se ukázalo, že u modifikovaného cryptogeinu se změnami cílenými na povrch proteinu do blízkosti ω -smyčky neovlivnila účinek cryptogeinu tak významně, jako změna povrchového náboje tohoto proteinu.

1.11. Seznam publikovaných prací (Plné znění prací se nalézá v příloze)

- 1) LOCHMAN, Jan, **Tomáš KAŠPAROVSKÝ**, Jiří DAMBORSKÝ, Hanan OSMAN, Michel PONCHET, Vladimír MIKEŠ a Radka CHALOUPKOVÁ. Construction of Cryptogein Mutants, a Proteinaceous Elicitor from Phytophthora, with Altered Abilities To Induce a Defense Reaction in Tobacco Cells. *Biochemistry, USA*, 2005, roč. 44, č. 17, s. 6565-6577. ISSN 0006-2960.
Podíl autora TK: Měření a vyhodnocení produkce reaktivních forem kyslíku, pH, buněčné smrti a interakce lipidů s cryptogeinem, podíl na přípravě rukopisu.
- 2) LITERÁKOVÁ, Petra, Jan LOCHMAN, Zbyněk ZDRÁHAL, Zbyněk PROKOP, Vladimír MIKEŠ a **Tomáš KAŠPAROVSKÝ**. Determination of capsidiol in tobacco cells culture by HPLC. *Journal of Chromatographic Science*, 2010, roč. 48, č. 6, s. 436-440. ISSN 0021-9665
Podíl autora TK: Návrhy experimentů a vyhodnocení naměřených dat extrakce a HPLC stanovení, podíl na přípravě relevantních částí rukopisu a diskuze výsledků, odborný dohled nad celou prací.
- 3) PLEŠKOVÁ, Veronika, **Tomáš KAŠPAROVSKÝ**, Michal OBOŘIL, Nikola PTÁČKOVÁ, Radka CHALOUPKOVÁ, Ladislav DOKLÁDAL, Jiří DAMBORSKÝ a Jan LOCHMAN. Elicitine-membrane interaction is driven by a positive charge on the protein surface: Role of Lys13 residue in lipids loading and resistance induction. *Plant Physiology and Biochemistry, Elsevier*, 2011, roč. 49, č. 3, s. 321-328. ISSN 0981-9428.
Podíl autora TK: Návrhy experimentů pro produkci capsidiolu, podíl na přípravě relevantních částí rukopisu a diskuze výsledků.
- 4) DOKLÁDAL, Ladislav, Michal OBOŘIL, Karel STEJSKAL, Zbyněk ZDRÁHAL, Nikola PTÁČKOVÁ, Radka CHALOUPKOVÁ, Jiří DAMBORSKÝ, **Tomáš KAŠPAROVSKÝ**, Jeandroz SYLVAIN, Markéta ŽDÁRSKÁ a Jan LOCHMAN. Physiological and proteomic approaches to evaluate the role of sterol binding in elicitor-induced resistance. *Journal of Experimental Botany, Oxford: OXFORD UNIV PRESS*, 2012, roč. 63, č. 5, s. 2203-2215. ISSN 0022-0957.
Podíl autora TK: Návrhy experimentů pro produkci reaktivních forem kyslíku a capsidiolu, podíl na přípravě relevantních částí rukopisu a diskuze výsledků.
- 5) DADÁKOVÁ, Kateřina, Jitka KLEMPOVÁ, Tereza JENDRIŠÁKOVÁ, Jan LOCHMAN a **Tomáš KAŠPAROVSKÝ**. Elucidation of signaling molecules involved in ergosterol perception in tobacco. *Plant Physiol Biochem, Elsevier Science*, 2013, roč. 73, december, s. 121-127. ISSN 0981-9428.
Podíl autora TK: Návrhy experimentů a vyhodnocení naměřených dat pro produkci aktivních forem kyslíku a kyseliny salicylové, podíl na přípravě relevantních částí rukopisu a diskuze výsledků, odborný dohled nad celou prací.
- 6) PTÁČKOVÁ, Nikola, Jitka KLEMPOVÁ, Michal OBOŘIL, Sylvie NEDĚLOVÁ, Jan LOCHMAN a **Tomáš KAŠPAROVSKÝ**. The effect of cryptogein with changed abilities to transfer sterols and altered charge distribution on extracellular alkalization, ROS and NO generation, lipid peroxidation and LOX gene transcription in *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiology and Biochemistry, Paris: Elsevier*, 2015, roč. 97, december, s. 82-95. ISSN 0981-9428.
Podíl autora TK: Návrhy experimentů a interpretace naměřených dat peroxidace lipidů, podíl na přípravě relevantních částí rukopisu a diskuze výsledků, odborný dohled nad celou prací.

1.12. Seznam použité literatury

1. Dadáková, K., *Molekulární markery obranné reakce u rostlin*. 2015.
2. Ptáčková, N., *Peroxidace lipidů spojená s obrannou reakcí rostlin*. 2015.
3. Ebel, J. and E.G. Cosio, *ELICITORS OF PLANT DEFENSE RESPONSES*. International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology, Vol 148, 1994. **148**: p. 1-36.
4. Nurnberger, T. and F. Brunner, *Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns*. Current Opinion in Plant Biology, 2002. **5**(4): p. 318-324.
5. Mackey, D. and A.J. McFall, *MAMPs and MIMPs: proposed classifications for inducers of innate immunity*. Molecular Microbiology, 2006. **61**(6): p. 1365-1371.
6. Krol, E., et al., *Perception of the Arabidopsis Danger Signal Peptide 1 Involves the Pattern Recognition Receptor AtPEPR1 and Its Close Homologue AtPEPR2*. Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**(18): p. 13471-13479.
7. Jones, J.D.G. and J.L. Dangl, *The plant immune system*. Nature, 2006. **444**(7117): p. 323-329.
8. Lacombe, S., et al., *Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance*. Nature Biotechnology, 2010. **28**(4): p. 365-U94.
9. de Wit, P., *Visions & reflections (minireview) - How plants recognize pathogens and defend themselves*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2007. **64**(21): p. 2726-2732.
10. Nurnberger, T. and D. Scheel, *Signal transmission in the plant immune response*. Trends in Plant Science, 2001. **6**(8): p. 372-379.
11. Dangl, J.L. and J.D.G. Jones, *Plant pathogens and integrated defense responses to infection*. Nature, 2001. **411**(6839): p. 826-833.
12. Meyers, B.C., et al., *Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in Arabidopsis*. Plant Cell, 2003. **15**(4): p. 809-834.
13. Jones, D.A. and D. Takemoto, *Plant innate immunity - direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules*. Current Opinion in Immunology, 2004. **16**(1): p. 48-62.
14. Liu, J., et al., *Heterotrimeric G Proteins Serve as a Converging Point in Plant Defense Signaling Activated by Multiple Receptor-Like Kinases*. Plant Physiology, 2013. **161**(4): p. 2146-2158.
15. Zipfel, C., *Early molecular events in PAMP-triggered immunity*. Current Opinion in Plant Biology, 2009. **12**(4): p. 414-420.
16. Dodds, P.N. and J.P. Rathjen, *Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions*. Nature Reviews Genetics, 2010. **11**(8): p. 539-548.
17. Iriti, M. and F. Faoro, *Review of innate and specific immunity in plants and animals*. Mycopathologia, 2007. **164**(2): p. 57-64.
18. Zipfel, C., et al., *Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception*. Nature, 2004. **428**(6984): p. 764-767.
19. Amorabe, B.E., et al., *Early events induced by chitosan on plant cells*. Journal of Experimental Botany, 2008. **59**(9): p. 2317-2324.
20. Frias, M., N. Brito, and C. Gonzalez, *The Botrytis cinerea cerato-platanin BcSpl1 is a potent inducer of systemic acquired resistance (SAR) in tobacco and generates a wave of salicylic acid expanding from the site of application*. Molecular Plant Pathology, 2013. **14**(2): p. 191-196.
21. Shimizu, T., et al., *Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice*. Plant Journal, 2010. **64**(2): p. 204-214.
22. Aziz, A., et al., *Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against Botrytis cinerea and Plasmopara viticola*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2003. **16**(12): p. 1118-1128.
23. Aziz, A., et al., *Elicitor and resistance-inducing activities of beta-1,4 cellobextrins in grapevine, comparison with beta-1,3 glucans and alpha-1,4 oligogalacturonides*. Journal of Experimental Botany, 2007. **58**(6): p. 1463-1472.
24. Poinssot, B., et al., *The endopolygalacturonase 1 from Botrytis cinerea activates grapevine defense reactions unrelated to its enzymatic activity*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2003. **16**(6): p. 553-564.
25. McAinsh, M.R. and J.K. Pittman, *Shaping the calcium signature*. New Phytologist, 2009. **181**(2): p. 275-294.
26. Vatsa, P., et al., *Involvement of putative glutamate receptors in plant defence signaling and NO production*. Biochimie, 2011. **93**(12): p. 2095-2101.
27. Lecourieux, D., R. Raneva, and A. Pugin, *Calcium in plant defence-signalling pathways*. New Phytologist, 2006. **171**(2): p. 249-269.
28. Torres, M.A., J.L. Dangl, and J.D.G. Jones, *Arabidopsis gp91(phox) homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(1): p. 517-522.
29. Oda, T., et al., *Structure of the N-terminal Regulatory Domain of a Plant NADPH Oxidase and Its Functional Implications*. Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**(2): p. 1435-1445.
30. Torres, M.A. and J.L. Dangl, *Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development*. Current Opinion in Plant Biology, 2005. **8**(4): p. 397-403.
31. Bindschedler, L.V., et al., *Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in Arabidopsis required for pathogen resistance*. Plant Journal, 2006. **47**(6): p. 851-863.
32. Daudi, A., et al., *The Apoplastic Oxidative Burst Peroxidase in Arabidopsis Is a Major Component of Pattern-Triggered Immunity*. Plant Cell, 2012. **24**(1): p. 275-287.
33. Xiao, Y., J. Wang, and K. Dehesh, *Review of stress specific organelles-to-nucleus metabolic signal molecules in plants*. Plant Science, 2013. **212**: p. 102-107.
34. Kangasjarvi, S., et al., *Photosynthesis, photorespiration, and light signalling in defence responses*. Journal of Experimental Botany, 2012. **63**(4): p. 1619-1636.
35. Zurbriggen, M.D., et al., *Chloroplast-generated reactive oxygen species play a major role in localized cell death during the non-host interaction between tobacco and Xanthomonas campestris pv. vesicatoria*. Plant Journal, 2009. **60**(6): p. 962-973.
36. Vandelle, E., et al., *Integrated signaling network involving calcium, nitric oxide, and active oxygen species but not mitogen-activated protein kin in BcPG1-elicited grapevine defenses*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2006. **19**(4): p. 429-440.
37. Wilson, I.D., S.J. Neill, and J.T. Hancock, *Nitric oxide synthesis and signalling in plants*. Plant Cell and Environment, 2008. **31**(5): p. 622-631.
38. Wendehenne, D., J. Durner, and D.F. Klessig, *Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses*. Current Opinion in Plant Biology, 2004. **7**(4): p. 449-455.
39. Yun, B.-W., et al., *S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity*. Nature, 2011. **478**(7368): p. 264-U161.
40. Neill, S.J., R. Desikan, and J.T. Hancock, *Nitric oxide signalling in plants*. New Phytologist, 2003. **159**(1): p. 11-35.

41. Savchenko, T., et al., *Arachidonic Acid: An Evolutionarily Conserved Signaling Molecule Modulates Plant Stress Signaling Networks*. *Plant Cell*, 2010. **22**(10): p. 3193-3205.
42. Munnik, T. and C. Testerink, *Plant phospholipid signaling: "in a nutshell"*. *Journal of Lipid Research*, 2009. **50**: p. S260-S265.
43. Anthony, R.G., et al., *A protein kinase target of a PDK1 signalling pathway is involved in root hair growth in Arabidopsis*. *Embo Journal*, 2004. **23**(3): p. 572-581.
44. Kasparovsky, T., J.P. Blein, and V. Mikes, *Ergosterol elicits oxidative burst in tobacco cells via phospholipase A(2) and protein kinase C signal pathway*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2004. **42**(5): p. 429-435.
45. Blee, E., *Impact of phyto-oxylipins in plant defense*. *Trends in Plant Science*, 2002. **7**(7): p. 315-321.
46. Feussner, I. and C. Wasternack, *The lipoxygenase pathway*. *Annual Review of Plant Biology*, 2002. **53**: p. 275-297.
47. Zhao, J., L.C. Davis, and R. Verpoorte, *Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites*. *Biotechnology Advances*, 2005. **23**(4): p. 283-333.
48. Lecourieux-Ouaked, F., A. Pugin, and A. Lebrun-Garcia, *Phosphoproteins involved in the signal transduction of cryptogein, an elicitor of defense reactions in tobacco*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2000. **13**(8): p. 821-829.
49. Schulz, P., M. Herde, and T. Romeis, *Calcium-Dependent Protein Kinases: Hubs in Plant Stress Signaling and Development*. *Plant Physiology*, 2013. **163**(2): p. 523-530.
50. Buchanan, B., *Biochemistry & Molecular Biology of Plants* 2002.
51. Bouchereau, A., et al., *Improved analytical methods for determination of nitrogenous stress metabolites occurring in Limonium species*. *Journal of Chromatography A*, 1999. **836**(2): p. 209-221.
52. Tada, Y., et al., *Plant immunity requires conformational charges of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins*. *Science*, 2008. **321**(5891): p. 952-956.
53. Durrant, W.E. and X. Dong, *Systemic acquired resistance*. *Annual Review of Phytopathology*, 2004. **42**: p. 185-209.
54. Spoel, S.H., et al., *NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol*. *Plant Cell*, 2003. **15**(3): p. 760-770.
55. Wasternack, C. and B. Hause, *Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in Annals of Botany*. *Annals of Botany*, 2013. **111**(6): p. 1021-1058.
56. Fonseca, S., J.M. Chico, and R. Solano, *The jasmonate pathway: the ligand, the receptor and the core signalling module*. *Current Opinion in Plant Biology*, 2009. **12**(5): p. 539-547.
57. Katsir, L., et al., *COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008. **105**(19): p. 7100-7105.
58. Shoji, T., T. Ogawa, and T. Hashimoto, *Jasmonate-induced nicotine formation in tobacco is mediated by tobacco COI1 and JAZ genes*. *Plant and Cell Physiology*, 2008. **49**(7): p. 1003-1012.
59. Hou, X., L. Ding, and H. Yu, *Crosstalk between GA and JA signaling mediates plant growth and defense*. *Plant Cell Reports*, 2013. **32**(7): p. 1067-1074.
60. Hua, J. and E.M. Meyerowitz, *Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in Arabidopsis thaliana*. *Cell*, 1998. **94**(2): p. 261-271.
61. Solano, R., et al., *Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1*. *Genes & Development*, 1998. **12**(23): p. 3703-3714.
62. Ju, C., et al., *CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling from the ER membrane to the nucleus in Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012. **109**(47): p. 19486-19491.
63. Seo, M. and T. Koshiba, *Complex regulation of ABA biosynthesis in plants*. *Trends in Plant Science*, 2002. **7**(1): p. 41-48.
64. Fujii, H. and J.-K. Zhu, *Arabidopsis mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009. **106**(20): p. 8380-8385.
65. Santiago, J., et al., *Modulation of drought resistance by the abscisic acid receptor PYL5 through inhibition of clade A PP2Cs*. *Plant Journal*, 2009. **60**(4): p. 575-588.
66. Sheard, L.B. and N. Zheng, *PLANT BIOLOGY Signal advance for abscisic acid*. *Nature*, 2009. **462**(7273): p. 575-576.
67. Soon, F.-F., et al., *Molecular Mimicry Regulates ABA Signaling by SnRK2 Kinases and PP2C Phosphatases*. *Science*, 2012. **335**(6064): p. 85-88.
68. Sirichandra, C., et al., *Phosphorylation of the Arabidopsis AtrbohF NADPH oxidase by OST1 protein kinase*. *Febs Letters*, 2009. **583**(18): p. 2982-2986.
69. Kurumori, T., et al., *ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010. **107**(5): p. 2361-2366.
70. Kasahara, H., et al., *Contribution of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways to the biosynthesis of gibberellins in Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. **277**(47): p. 45188-45194.
71. Achard, P., et al., *Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals*. *Science*, 2006. **311**(5757): p. 91-94.
72. Achard, P., et al., *The cold-inducible CBF1 factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism*. *Plant Cell*, 2008. **20**(8): p. 2117-2129.
73. Achard, P., et al., *Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species*. *Current Biology*, 2008. **18**(9): p. 656-660.
74. Dill, A. and T.P. Sun, *Synergistic derepression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI function in Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 2001. **159**(2): p. 777-785.
75. Fu, X.D. and N.P. Harberd, *Auxin promotes Arabidopsis root growth by modulating gibberellin response*. *Nature*, 2003. **421**(6924): p. 740-743.
76. Hou, X., et al., *Global identification of DELLA target genes during Arabidopsis flower development*. *Plant Physiology*, 2008. **147**(3): p. 1126-1142.
77. Wild, M., et al., *The Arabidopsis DELLA RGA-LIKE3 Is a Direct Target of MYC2 and Modulates Jasmonate Signaling Responses*. *Plant Cell*, 2012. **24**(8): p. 3307-3319.
78. Knight, V.I., et al., *Hydroperoxides of fatty acids induce programmed cell death in tomato protoplasts*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2001. **59**(6): p. 277-286.

79. Rusterucci, C., et al., *Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogein on tobacco leaves*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(51): p. 36446-36455.
80. Montillet, J.L., et al., *Lipoxygenase-mediated production of fatty acid hydroperoxides is a specific signature of the hypersensitive reaction in plants*. Plant Physiology and Biochemistry, 2002. **40**(6-8): p. 633-639.
81. Hamberg, M., A. Sanz, and C. Castresana, *alpha-dioxygenase, a new enzyme in fatty acid metabolism*. Oxygen and Life: Oxygenases, Oxidase and Lipid Mediators, 2002. **1233**: p. 307-317.
82. Berger, S., et al., *Enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation in leaf development*. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2001. **1533**(3): p. 266-276.
83. Cacas, J.L., et al., *The combined action of 9 lipoxygenase and galactolipase is sufficient to bring about programmed cell death during tobacco hypersensitive response*. Plant Cell and Environment, 2005. **28**(11): p. 1367-1378.
84. Jalloul, A., et al., *Lipid peroxidation in cotton: Xanthomonas interactions and the role of lipoxygenases during the hypersensitive reaction*. Plant Journal, 2002. **32**(1): p. 1-12.
85. Royo, J., et al., *Characterization of three potato lipoxygenases with distinct enzymatic activities and different organ-specific and wound-regulated expression patterns*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(35): p. 21012-21019.
86. Marmey, P., et al., *The 9-lipoxygenase GhLOX1 gene is associated with the hypersensitive reaction of cotton Gossypium hirsutum to Xanthomonas campestris pv malvacearum*. Plant Physiology and Biochemistry, 2007. **45**(8): p. 596-606.
87. Li, W.X., O. Kodama, and T. Akatsuka, *ROLE OF OXYGENATED FATTY-ACIDS IN RICE PHYTOALEXIN PRODUCTION*. Agricultural and Biological Chemistry, 1991. **55**(4): p. 1041-1047.
88. Roy, S., et al., *PHOSPHOLIPASE-ACTIVITY AND PHOSPHOLIPID PATTERNS IN TOBACCO CELLS TREATED WITH FUNGAL ELICITOR*. Plant Science, 1995. **107**(1): p. 17-25.
89. Lee, S.S., et al., *STIMULATION OF PHOSPHOLIPASE-A2 ACTIVITY IN STRAWBERRY CELLS TREATED WITH AF-TOXIN-I PRODUCED BY ALTERNARIA-ALTERNATA STRAWBERRY PATHOTYPE*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1992. **41**(4): p. 283-294.
90. Feussner, I., H. Kuhn, and C. Wasternack, *Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids*. Trends in Plant Science, 2001. **6**(6): p. 268-273.
91. Matsui, K., et al., *Cucumber root lipoxygenase can act on acyl groups in phosphatidylcholine*. Biochimica Et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism, 1998. **1390**(1): p. 8-20.
92. Mosblech, A., I. Feussner, and I. Heilmann, *Oxylipins: Structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation*. Plant Physiology and Biochemistry, 2009. **47**(6): p. 511-517.
93. Farmer, E.E. and C.A. Ryan, *OCTADECANOID PRECURSORS OF JASMONIC ACID ACTIVATE THE SYNTHESIS OF WOUND-INDUCIBLE PROTEINASE-INHIBITORS*. Plant Cell, 1992. **4**(2): p. 129-134.
94. Siedow, J.N., *PLANT LIPOXYGENASE - STRUCTURE AND FUNCTION*. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1991. **42**: p. 145-188.
95. Croft, K.P.C., F. Juttner, and A.J. Slusarenko, *VOLATILE PRODUCTS OF THE LIPOXYGENASE PATHWAY EVOLVED FROM PHASEOLUS-VULGARIS (L) LEAVES INOCULATED WITH PSEUDOMONAS-SYRINGAE PV-PHASEOLICOLA*. Plant Physiology, 1993. **101**(1): p. 13-24.
96. Blee, E. and J. Joyard, *Envelope membranes from spinach chloroplasts are a site of metabolism of fatty acid hydroperoxides*. Plant Physiology, 1996. **110**(2): p. 445-454.
97. Farmer, E.E. and C.A. Ryan, *INTERPLANT COMMUNICATION - AIRBORNE METHYL JASMONATE INDUCES SYNTHESIS OF PROTEINASE-INHIBITORS IN PLANT-LEAVES*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990. **87**(19): p. 7713-7716.
98. Shah, J., *Lipids, lipases, and lipid-modifying enzymes in plant disease resistance*. Annual Review of Phytopathology, 2005. **43**: p. 229-260.
99. Jorge Leon-Morcillo, R., et al., *Late activation of the 9-oxylipin pathway during arbuscular mycorrhiza formation in tomato and its regulation by jasmonate signalling*. Journal of Experimental Botany, 2012. **63**(10): p. 3545-3558.
100. Gobel, C., et al., *Oxylipin profiling reveals the preferential stimulation of the 9-lipoxygenase pathway in elicitor-treated potato cells*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(9): p. 6267-6273.
101. Sanier, C., et al., *A 13-lipoxygenase is Expressed Early in the Hypersensitive Reaction of Cotton Plants to Xanthomonas campestris pv. malvacearum*. Journal of Phytopathology, 2012. **160**(6): p. 286-293.
102. Porta, H., R.E. Figueroa-Balderas, and M. Rocha-Sosa, *Wounding and pathogen infection induce a chloroplast-targeted lipoxygenase in the common bean (Phaseolus vulgaris L.)*. Planta, 2008. **227**(2): p. 363-373.
103. Creelman, R.A., M.L. Tierney, and J.E. Mullet, *JASMONIC ACID METHYL JASMONATE ACCUMULATE IN WOUNDED SOYBEAN HYPOCOTYLS AND MODULATE WOUND GENE-EXPRESSION*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992. **89**(11): p. 4938-4941.
104. Mita, G., et al., *9-Lipoxygenase metabolism is involved in the almond/Aspergillus carbonarius interaction*. Journal of Experimental Botany, 2007. **58**(7): p. 1803-1811.
105. Saubeau, G., et al., *Differential induction of oxylipin pathway in potato and tobacco cells by bacterial and oomycete elicitors*. Plant Cell Reports, 2013. **32**(5): p. 579-589.
106. Gobel, C., et al., *Oxylipin profiling in pathogen-infected potato leaves*. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2002. **1584**(1): p. 55-64.
107. Gobel, C., I. Feussner, and S. Rosahl, *Lipid peroxidation during the hypersensitive response in potato in the absence of 9-lipoxygenases*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(52): p. 52834-52840.
108. Montillet, J.L., et al., *Fatty acid hydroperoxides and H2O2 in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves*. Plant Physiology, 2005. **138**(3): p. 1516-1526.
109. Muller, K.O.a.B., H., *Experimentelle Untersuchungen u'ber die Phythophthora-Resistenz der Kartoffel. Zugleich ein Beitrag zum Problem der 'erworbenen Resistenz' im Pflanzenreich. . Arbeiten der Biologischen Reichsanstalt fu' r Land- und Forstwirtschaft 1940. 23: p. 189-231.*
110. Pedras, M.S.C., E.E. Yaya, and E. Glawischnig, *The phytoalexins from cultivated and wild crucifers: Chemistry and biology*. Natural Product Reports, 2011. **28**(8): p. 1381-1405.
111. Boue, S.M., et al., *Phytoalexin-Enriched Functional Foods*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**(7): p. 2614-2622.
112. Tzi, B.N., et al., *Glyceollin, a soybean phytoalexin with medicinal properties*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011. **90**(1): p. 59-68.

113. Smoliga, J.M., J.A. Baur, and H.A. Hausenblas, *Resveratrol and health - A comprehensive review of human clinical trials*. Molecular Nutrition & Food Research, 2011. **55**(8): p. 1129-1141.
114. Holland, K.W.a.O.K., S.F., *Recent applications of reanut phytoalexins*. Recent Pat.Food Nutr. Agric. , 2010. **2**: p. 221-223.
115. Jahangir, M., et al., *Health-Affecting Compounds in Brassicaceae*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2009. **8**(2): p. 31-43.
116. Yang, L.Y., J.D. Browning, and J.M. Awika, *Sorghum 3-Deoxyanthocyanins Possess Strong Phase II Enzyme Inducer Activity and Cancer Cell Growth Inhibition Properties*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**(5): p. 1797-1804.
117. Smith, D.A., *Toxicity of Phytoalexins, in Phytoalexins*, J.A.a.M. Bailey, J.W., Editor. 1982, Blackie: Glasgow and London. p. 218-252.
118. Rathmell, W.G. and D.A. Smith, *Lack of Activity of Selected Isoflavonoid Phytoalexins as Protectant Fungicides*. Pesticide Science, 1980. **11**(6): p. 568-572.
119. Pezet, R. and V. Pont, *Ultrastructural Observations of Pterostilbene Fungitoxicity in Dormant Conidia of Botrytis-Cinerea Pers*. Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift, 1990. **129**(1): p. 19-30.
120. Adrian, M. and P. Jeandet, *Effects of resveratrol on the ultrastructure of Botrytis cinerea conidia and biological significance in plant/pathogen interactions*. Fitoterapia, 2012. **83**(8): p. 1345-1350.
121. Adrian, M., et al., *Biological activity of resveratrol, a stilbenic compound from grapevines, against Botrytis cinerea, the causal agent for gray mold*. Journal of Chemical Ecology, 1997. **23**(7): p. 1689-1702.
122. Shlezinger, N., et al., *Anti-Apoptotic Machinery Protects the Necrotrophic Fungus Botrytis cinerea from Host-Induced Apoptotic-Like Cell Death during Plant Infection*. Plos Pathogens, 2011. **7**(8).
123. Ahuja, I., R. Kissen, and A.M. Bones, *Phytoalexins in defense against pathogens*. Trends in Plant Science, 2012. **17**(2): p. 73-90.
124. Jeandet, P., et al., *PRODUCTION OF THE PHYTOALEXIN RESVERATROL BY GRAPES AS A RESPONSE TO BOTRYTIS ATTACK UNDER NATURAL CONDITIONS*. Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift, 1995. **143**(3): p. 135-139.
125. Schnee, S., O. Viret, and K. Gindro, *Role of stilbenes in the resistance of grapevine to powdery mildew*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2008. **72**(4-6): p. 128-133.
126. Ingham, J.L., *3,5,4'-TRIHYDROXYSTILBENE AS A PHYTOALEXIN FROM GROUNDNUTS (ARACHIS-HYPOGAEA)*. Phytochemistry, 1976. **15**(11): p. 1791-1793.
127. Zamboni, A., et al., *Grapevine cell early activation of specific responses to DIMEB, a resveratrol elicitor*. Bmc Genomics, 2009. **10**: p. 13.
128. Morales, M., et al., *Effect of dimethyl-beta-cyclodextrins on resveratrol metabolism in Gamay grapevine cell cultures before and after inoculation with Xylophilus ampelinus*. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1998. **53**(3): p. 179-187.
129. Calderon, A.A., et al., *RESVERATROL PRODUCTION AS A PART OF THE HYPERSENSITIVE-LIKE RESPONSE OF GRAPEVINE CELLS TO AN ELICITOR FROM TRICHODERMA-VIRIDE*. New Phytologist, 1993. **124**(3): p. 455-463.
130. Laquitaine, L., et al., *Molecular basis of ergosterol-induced protection of grape against Botrytis cinerea: Induction of type I LTP promoter activity, WRKY, and stilbene synthase gene expression*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2006. **19**(10): p. 1103-1112.
131. Yang, M.-H., et al., *Investigation of Microbial Elicitation of trans-Resveratrol and trans-Piceatannol in Peanut Callus Led to the Application of Chitin as a Potential Elicitor*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**(17): p. 9537-9541.
132. Douillet-Breuil, A.C., et al., *Changes in the phytoalexin content of various Vitis spp. in response to ultraviolet C elicitation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999. **47**(10): p. 4456-4461.
133. Schubert, R., et al., *An ozone-responsive region of the grapevine resveratrol synthase promoter differs from the basal pathogen-responsive sequence*. Plant Molecular Biology, 1997. **34**(3): p. 417-426.
134. Chung, I.M., et al., *Resveratrol accumulation and resveratrol synthase gene expression in response to abiotic stresses and hormones in peanut plants*. Plant Science, 2003. **164**(1): p. 103-109.
135. Belhadj, A., et al., *Ethephon elicits protection against Erysiphe necator in grapevine*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. **56**(14): p. 5781-5787.
136. Laura, R., et al. *Resveratrol production in Vitis vinifera cell suspensions treated with several elicitors*. in Annual Meeting of the Italian-Botanical-Society. 2006. Alessandria, ITALY: Univ Florence Botany Inst.
137. Lee, J.P., et al., *Stilbenes from the roots of Pleuropteris ciliinervis and their antioxidant activities*. Phytochemistry, 2003. **64**(3): p. 759-763.
138. Chong, J.L., A. Poutaraud, and P. Huguency, *Metabolism and roles of stilbenes in plants*. Plant Science, 2009. **177**(3): p. 143-155.
139. Aslam, S.N., et al., *Antibacterial and antifungal activity of cicerfuran and related 2-arylbenzofurans and stilbenes*. Microbiological Research, 2009. **164**(2): p. 191-195.
140. Hain, R., et al., *DISEASE RESISTANCE RESULTS FROM FOREIGN PHYTOALEXIN EXPRESSION IN A NOVEL PLANT*. Nature, 1993. **361**(6408): p. 153-156.
141. Wang, L., et al., *Individual and Combined Effects of CaCl2 and UV-C on the Biosynthesis of Resveratrols in Grape Leaves and Berry Skins*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013. **61**(29): p. 7135-7141.
142. Austin, M.B. and A.J.P. Noel, *The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases*. Natural Product Reports, 2003. **20**(1): p. 79-110.
143. Austin, M.B., et al., *An aldol switch discovered in stilbene synthases mediates cyclization specificity of type III polyketide synthases*. Chemistry & Biology, 2004. **11**(9): p. 1179-1194.
144. Jeandet, P., et al., *Modulation of Phytoalexin Biosynthesis in Engineered Plants for Disease Resistance*. International Journal of Molecular Sciences, 2013. **14**(7): p. 14136-14170.
145. Vannozi, A., et al., *Genome-wide analysis of the grapevine stilbene synthase multigenic family: genomic organization and expression profiles upon biotic and abiotic stresses*. Bmc Plant Biology, 2012. **12**.
146. Yu, O., et al., *Production of the isoflavones genistein and daidzein in non-legume dicot and monocot tissues*. Plant Physiology, 2000. **124**(2): p. 781-793.
147. Winkel-Shirley, B., *Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology*. Plant Physiology, 2001. **126**(2): p. 485-493.
148. Gatto, P., et al., *Ripening and Genotype Control Stilbene Accumulation in Healthy Grapes*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. **56**(24): p. 11773-11785.
149. Barcelo, A.R., et al., *Peroxidase: a multifunctional enzyme in grapevines*. Functional Plant Biology, 2003. **30**(6): p. 577-591.

150. Sako, M., et al., *Regioselective oxidative coupling of 4-hydroxystilbenes: Synthesis of resveratrol and epsilon-viniferin (E)-dehydrodimers*. Journal of Organic Chemistry, 2004. **69**(7): p. 2598-2600.
151. Gamm, M., et al., *Identification of reference genes suitable for qRT-PCR in grapevine and application for the study of the expression of genes involved in pterostilbene synthesis*. Molecular Genetics and Genomics, 2011. **285**(4): p. 273-285.
152. Schultz, T.P., et al., *ROLE OF STILBENES IN THE NATURAL DURABILITY OF WOOD - FUNGICIDAL STRUCTURE-ACTIVITY-RELATIONSHIPS*. Phytochemistry, 1990. **29**(5): p. 1501-1507.
153. Jeandet, P., et al., *Biosynthesis, metabolism, molecular engineering and biological functions of stilbene phytoalexins in plants*. Biofactors, 2010. **36**(5): p. 331-341.
154. Adrian, M., et al., *Stilbene content of mature Vitis vinifera berries in response to UV-C elicitation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. **48**(12): p. 6103-6105.
155. Coutos-Thevenot, P., et al., *In vitro tolerance to Botrytis cinerea of grapevine 41B rootstock in transgenic plants expressing the stilbene synthase Vst1 gene under the control of a pathogen-inducible PR 10 promoter*. Journal of Experimental Botany, 2001. **52**(358): p. 901-910.
156. Schoonbeek, H., G. Del Sorbo, and M.A. De Waard, *The ABC transporter BcatrB affects the sensitivity of Botrytis cinerea to the phytoalexin resveratrol and the fungicide fenpiclonil*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2001. **14**(4): p. 562-571.
157. Breuil, A.C., et al., *Characterization of a pterostilbene dehydrodimer produced by laccase of Botrytis cinerea*. Phytopathology, 1999. **89**(4): p. 298-302.
158. Adrian, M., et al., *Resveratrol oxidation in Botrytis cinerea conidia*. Phytopathology, 1998. **88**(5): p. 472-476.
159. Pastorkova, E., et al., *Growth inhibitory effect of grape phenolics against wine spoilage yeasts and acetic acid bacteria*. International Journal of Food Microbiology, 2013. **161**(3): p. 209-213.
160. Torres, P., et al., *Antioxidant and insect growth regulatory activities of stilbenes and extracts from Yucca periculosa*. Phytochemistry, 2003. **64**(2): p. 463-473.
161. He, S., et al., *Stilbene oligomers from Parthenocissus laetevirens: Isolation, biomimetic synthesis, absolute configuration, and implication of antioxidative defense system in the plant*. Journal of Organic Chemistry, 2008. **73**(14): p. 5233-5241.
162. Egea, C., M.D.G. Perez, and M.E. Candela, *Capsidiol accumulation in Capsicum annuum stems during the hypersensitive reaction to Phytophthora capsici*. Journal of Plant Physiology, 1996. **149**(6): p. 762-764.
163. Ward, E.W.B. and A. Stoessl, *Postinfectious Inhibitors from Plants .3. Detoxification of Capsidiol, an Antifungal Compound from Peppers*. Phytopathology, 1972. **62**(10): p. 1186-1187.
164. Pedras, M.S.C. and P.W.K. Ahiahonu, *Metabolism and detoxification of phytoalexins and analogs by phytopathogenic fungi*. Phytochemistry, 2005. **66**(4): p. 391-411.
165. Takahashi, S., et al., *Kinetic and molecular analysis of 5-epiaristolochene 1,3-dihydroxylase, a cytochrome P450 enzyme catalyzing successive hydroxylations of sesquiterpenes*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(5): p. 3686-3696.
166. CanoCamacho, H., E. LopezRomero, and E. LozoyaGloria, *Partial purification and characterization of an elicitor stimulated sesquiterpene cyclase from chili pepper (Capsicum annuum L) fruits*. Plant Science, 1997. **124**(1): p. 23-31.
167. Chappell, J., C. Vonlanken, and U. Vogeli, *Elicitor-Inducible 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme-a Reductase-Activity Is Required for Sesquiterpene Accumulation in Tobacco Cell-Suspension Cultures*. Plant Physiology, 1991. **97**(2): p. 693-698.
168. Mccarvey, D.J. and R. Croteau, *Terpenoid Metabolism*. Plant Cell, 1995. **7**(7): p. 1015-1026.
169. Yin, S.H., et al., *Regulation of sesquiterpene cyclase gene expression - Characterization of an elicitor- and pathogen-inducible promoter*. Plant Physiology, 1997. **115**(2): p. 437-451.
170. Ralston, L., et al., *Cloning, heterologous expression, and functional characterization of 5-epi-aristolochene-1,3-dihydroxylase from tobacco (Nicotiana tabacum)*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2001. **393**(2): p. 222-235.
171. Hoshino, T., et al., *5-Epi-Aristolochene 3-Hydroxylase from Green-Pepper*. Phytochemistry, 1995. **38**(3): p. 609-613.
172. Greenhagen, B.T., et al., *Probing sesquiterpene hydroxylase activities in a coupled assay with terpene synthases*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2003. **409**(2): p. 385-394.
173. As'wad, A.W.M., et al., *Ergosterol analyses of oil palm seedlings and plants infected with Ganoderma*. Crop Protection, 2011. **30**(11): p. 1438-1442.
174. Zhao, X.R., Q. Lin, and P.C. Brookes, *Does soil ergosterol concentration provide a reliable estimate of soil fungal biomass?* Soil Biology & Biochemistry, 2005. **37**(2): p. 311-317.
175. Angelova, Z., Georgiev, S. and Roos, W., *Elicitation of plants*. Biotechnol. Biotechnol. Equip., 2006. **20**: p. 72-83.
176. Granado, J., G. Felix, and T. Boller, *Perception of Fungal Sterols in Plants - Subnanomolar Concentrations of Ergosterol Elicit Extracellular Alkalinization in Tomato Cells*. Plant Physiology, 1995. **107**(2): p. 485-490.
177. Sanabria, N.M., Huang, J.-C. and Dubery, I.A., *Self/nonself perception in plants in innate immunity and defence*. Self/Nonself Immun. Recog., 2010. **1**: p. 40-54.
178. Dohnal, V., et al., *Fluctuation in the ergosterol and deoxynivalenol content in barley and malt during malting process*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010. **397**(1): p. 109-114.
179. Liu, J.L. and W.D. Nes, *Steroid Triterpenes: Design of Substrate-Based Inhibitors of Ergosterol and Sitosterol Synthesis*. Molecules, 2009. **14**(11): p. 4690-4706.
180. Hsueh, Y.W., et al., *The effect of ergosterol on dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers: A deuterium NMR and calorimetric study*. Biophysical Journal, 2005. **88**(3): p. 1799-1808.
181. Xu, X.L., et al., *Effect of the structure of natural sterols and sphingolipids on the formation of ordered sphingolipid/sterol domains (rafts)*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(36): p. 33540-33546.
182. Roche, Y., et al., *Depletion of phytosterols from the plant plasma membrane provides evidence for disruption of lipid rafts*. FASEB Journal, 2008. **22**(11): p. 3980-3991.
183. Kasparovsky, T., et al., *Elicitation of tobacco cells with ergosterol activates a signal pathway including mobilization of internal calcium*. Plant Physiology and Biochemistry, 2003. **41**(5): p. 495-501.
184. Naumowicz, M., A.D. Petelska, and Z.A. Figaszewski, *Chronopotentiometric studies of phosphatidylcholine bilayers modified by ergosterol*. Steroids, 2011. **76**(10-11): p. 967-973.
185. Amborabe, B.E., et al., *Specific perception of ergosterol by plant cells*. Comptes Rendus Biologies, 2003. **326**(4): p. 363-370.
186. Rossard, S., et al., *Early changes in membrane permeability, production of oxidative burst and modification of PAL activity induced by ergosterol in cotyledons of Mimosa pudica*. Journal of Experimental Botany, 2006. **57**(6): p. 1245-1252.

187. Rossard, S., G. Roblin, and R. Atanassova, *Ergosterol triggers characteristic elicitation steps in Beta vulgaris leaf tissues*. Journal of Experimental Botany, 2010. **61**(6): p. 1807-1816.
188. Klemptner, R.L., et al., *Ergosterol, an orphan fungal microbe-associated molecular pattern (MAMP)*. Molecular Plant Pathology, 2014. **15**(7): p. 747-761.
189. Ponchet, M., et al., *Are elicitors cryptograms in plant-Oomycete communications?* Cellular and Molecular Life Sciences, 1999. **56**(11-12): p. 1020-1047.
190. Moricova, P., et al., *Elicitins: Key Molecules in Plant - Pathogen Interactions*. Chemicke Listy, 2014. **108**(12): p. 1133-1139.
191. Boissy, G., et al., *Crystal structure of a fungal elicitor secreted by Phytophthora cryptogea, a member of a novel class of plant necrotic proteins*. Structure, 1996. **4**(12): p. 1429-1439.
192. Ricci, P., et al., *Structure and Activity of Proteins from Pathogenic Fungi Phytophthora Eliciting Necrosis and Acquired-Resistance in Tobacco*. European Journal of Biochemistry, 1989. **183**(3): p. 555-563.
193. Dobes, P., et al., *Binding of fatty acids to beta-cryptogein: Quantitative structure-activity relationships and design of selective protein mutants*. Journal of Chemical Information and Computer Sciences, 2004. **44**(6): p. 2126-2132.
194. Mikes, V., et al., *The fungal elicitor cryptogein is a sterol carrier protein*. Febs Letters, 1997. **416**(2): p. 190-192.
195. Vauthrin, S., et al., *Elicitins trap and transfer sterols from micelles, liposomes and plant plasma membranes*. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, 1999. **1419**(2): p. 335-342.
196. Osman, H., et al., *Fatty acids bind to the fungal elicitor cryptogein and compete with sterols*. Febs Letters, 2001. **489**(1): p. 55-58.
197. Osman, H., et al., *Mediation of elicitor activity on tobacco is assumed by elicitor-sterol complexes*. Molecular Biology of the Cell, 2001. **12**(9): p. 2825-2834.
198. Hirasawa, K., T. Amano, and Y. Shioi, *Lipid-binding form is a key conformation to induce a programmed cell death initiated in tobacco BY-2 cells by a proteinaceous elicitor of cryptogein*. Physiologia Plantarum, 2004. **121**(2): p. 196-203.
199. Lochman, J., et al., *Construction of cryptogein mutants, a proteinaceous elicitor from Phytophthora, with altered abilities to induce a defense reaction in tobacco cells*. Biochemistry, 2005. **44**(17): p. 6565-6572.

2. Fytoestrogeny

2.1. Úvod

Slovo „fytoestrogen“ pochází z řeckého phyto = rostliny a estrogen = hormon, který působí na plodnost samic savců. Tímto termínem jsou souhrnně označovány látky rostlinného původu, které se svojí strukturou a velikostí molekuly podobají estrogenním hormonům, konkrétně estradiolu (17- β -estradiol, E2), a které mají schopnost vyvolat estrogenní a/nebo antiestrogenní účinky [1]. Jejich výskyt byl popsán poprvé ve 40. letech minulého století v souvislosti s tzv. jetelovou nemocí (clover disease, [2]), která se vyskytla v Austrálii u ovcí pasoucích se na porostech jetele podzemního (*Trifolium subterraneum*). Tato „nemoc“ se projevovala různými reprodukčními poruchami. Mladá nedospělá zvířata vykazovala příznaky říje, ovce nebyly schopné zabřeznout, byl zaznamenán zvýšený výskyt děložních abnormalit a endometrióz [2]. Rovněž může dojít k abnormálnímu vývoji mléčné žlázy nebo abnormálnímu průběhu laktace, výhřezům dělohy nebo děložním dystokiím v důsledku neúplné dilatace děložního krčku [3]. U beranů byl popsán snížený počet i motilita spermií [4]. Co se týká jetelové nemoci, tak jako hlavní rostlinná složka odpovědná za její vznik byl označen formononetin [5]. Později bylo zjištěno, že po intraruminálním podání formononetinu je v moči ovcí vylučován equol [6, 7]. Vysoké hladiny cirkulujícího equolu pak byly zjištěny i u ovcí trpících jetelovou nemocí po spásání porostů několika původních druhů jetelů, které obsahovaly vysoké hladiny formononetinu [7]. Equol byl dokonce zjištěn i v močových kamenech u skotu a ovcí [8].

Equol, jako takový byl poprvé izolován z moči březích klisen již v roce 1932 a od původu zdrojového materiálu (equine urine) byl také odvozen jeho název [9]. Záhy bylo zjištěno, že se equol ve značném množství nachází rovněž v moči hřebců a jalových klisen. Tím byla vyvrácena původní hypotéza o souvislosti equolu s vysokými hladinami estrogenů v organismu během březosti. Následně byla zjištěna sezónnost výskytu equolu v moči koní, kdy na podzim hladiny equolu v moči klesaly a v zimě nebyl equol v moči detekován vůbec [10]. Propojením tehdy dostupných informací a vědomostí byl odhalen dietární původ equolu a byla mu přidělena hlavní role ve vztahu k poruchám estrogení rovnováhy u ovcí [11, 12]. Od té doby byl výskyt equolu v moči nebo krevní plazmě popsán u mnoha druhů zvířat včetně prasat [13], skotu [14], drůbeže [15, 16], primátů [17, 18], laboratorních hlodavců [19] nebo psů [20]. O 50 let později byl equol identifikován i v lidské moči, a to jako metabolit sójových isoflavonů daidzinu a daidzeinu [21].

2.2. Struktura isoflavonů

Fytoestrogeny jsou nesteroidní přirozeně se vyskytující rostlinné fenolické složky, které mohou být rozděleny do dvou hlavních skupin [22]:

1) flavonoidy, kam patří :

isoflavony – do této skupiny se řadí genistein, daidzein, glycitein, biochanin A a formononetin. Někdy se sem řadí i equol, metabolit vznikající z daidzeinu [22], ačkoli je equol nesteroidní estrogen skupiny isoflavonů, není fytoestrogen, protože není přirozenou součástí rostlin, ale je výlučně metabolickým produktem střevního bakteriálního metabolismu [23]. Hlavním dietárním zdrojem isoflavonů jsou

především luštěniny z čeledi bobovitých (*Fabaceae*, [24]) jako např. sója luštinatá (*Glycine max*) nebo jetel luční (*Trifolium pratense*). Isoflavony patří mezi látky s nejméně výrazným estrogenním účinkem.

kumestany – do této skupiny patří zejména kumestrol a methoxykumestrol, protože z velkého množství kumestanů právě tyto dva zástupci predominantně vykazují estrogenní aktivitu [25, 26]. Hlavním dietárním zdrojem kumestrolu jsou luštěniny, např. hrách setý (*Pisum sativum*), fazol obecný (*Phaseolus vulgaris*) a cizrna beraní (*Cicer arietinum*), přičemž nejvyšší výskyt kumestrolu byl zjištěn v jetelových a sójových klíčcích [27].

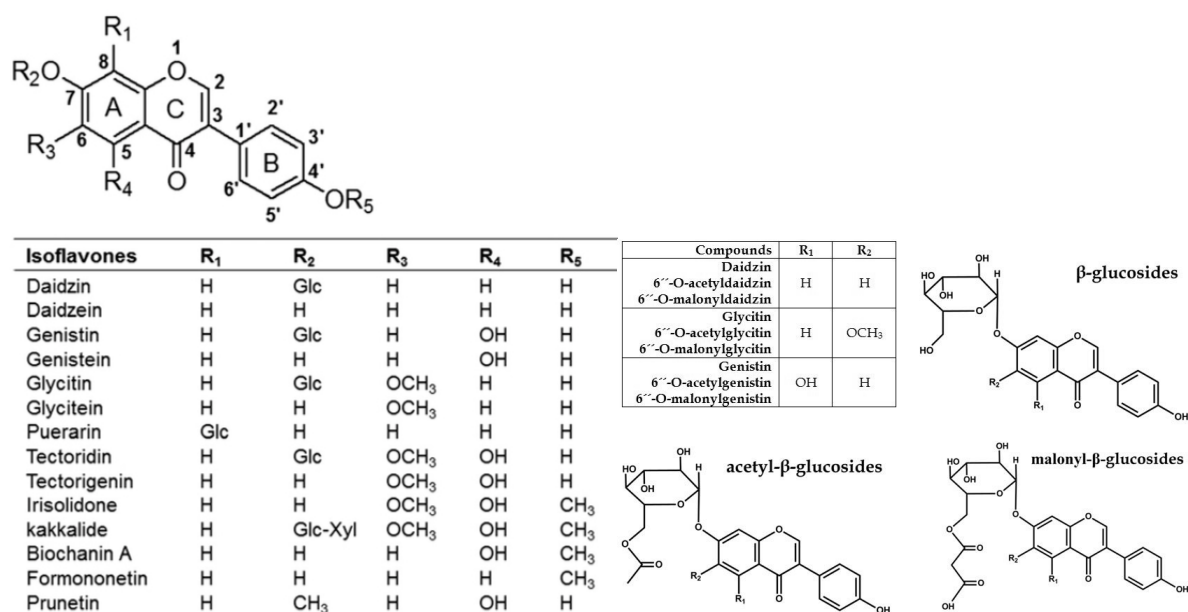
prenyl-flavonoidy (chalkony a flavanony) – patří sem zejména 8-prenylnaringenin, 6-prenylnaringenin, xanthohumol a isoxanthohumol, nacházející se v šišticích chmele otáčivého (*Humulus lupulus*).

2) ne-flavonoidy, kam patří:

lignany – sem se řadí lariciresinol, isolariciresinol, matairesinol, secoisolariciresinol a jejich střevní metabolity enterodiol a enterolakton [22], u kterých rovněž platí, že nejsou pravými fytoestrogeny stejně jako equol. Hlavním dietárním zdrojem těchto látek jsou semena lnu setého (*Linum usitatissimum*), ovoce, zelenina a některé nápoje jako je káva, čaj nebo víno. Proto jsou ve značném množství zastoupeny v západní stravě [26, 28, 29]

Rostlinné metabolity Isoflavonů

Prekurzorem daidzeinu, formononetinu a glyciteinu je flavanon liquiritigenin (7,4'-dihydroxyflavanon), prekurzorem genisteinu a biochaninu A je naringerin (5,7,4'-dihydroxy-flavanon) [30]. Isoflavony se mohou vyskytovat jako aglykony nebo glykosidy a to ve formě β -D-glykosidů, 6''-O-malonyl-glykosidů a 6''-O-acetyl-glykosidů [31]. V přírodě se primárně vyskytují jako 7- β -D-glykosidy [32]. Malonyl- a acetyl- glykosidy se vyskytují v menší míře, protože jsou termolabilní a rychle se přeměňují na stabilnější β -glykosidy [33]. Rovněž bylo zjištěno, že malonyl-glykosidy mají nižší biologickou dostupnost než β -D-glykosidy [34]. Strukturní obrázky jednotlivých forem isoflavonu jsou na obrázku 19.



Obrázek 19 Struktura isoflavonů a jejich glykosidů [35, 36]

2.3. Funkce u rostlin

U rostlin neplní fytoestrogeny roli hormonů, ale jsou svou povahou fytoalexiny, tj. nízkomolekulární látky, jež jsou syntetizovány a akumulovány v rostlinách při stresu a po napadení mikroorganismy a slouží rostlinám jako aktivní obranné látky, které vykazují fungistatické, antibakteriální, antivirové a antioxidační účinky [37]. Rovněž brání angiogenezi (tj. tvorba nových cév), což je důležité v boji se zhoubnými nádory [38]. Množství fytoestrogenů, které rostlina vytvoří, je závislé především na podmínkách pěstování. Koncentrace fytoestrogenů značně roste v období stresu (např. snížená vlhkost) a je do značné míry ovlivněna environmentálními a klimatickými podmínkami daného prostředí (teplota, množství srážek, období sklizně, úrodnost půdy aj.). Mezi další faktory ovlivňující jejich koncentraci patří také typ kultivaru, ataky škůdců a choroby rostlin, které se mohou během pěstování rostlin vyskytnout. Výsledný obsah isoflavonů je rovněž ovlivněn i termínem sklizně, počtem sečí, posklizňovou úpravou a technologickým zpracováním [např. 36, 39 - 44].

2.4. Zdroje isoflavonů pro člověka a zvířata

Isoflavony se primárně vyskytují především v luštěninách [31]. Ve vztahu k výživě člověka se ve fyziologicky relevantním množství vyskytují pouze v sóji luštinaté (*Glycine max*), kde se celkový obsah isoflavonů (a to především daidzeinu a genisteinu a jejich konjugátů) může pohybovat v rozmezí 1,2 – 4,2 mg/g sušiny [např. 1, 45].

Pro výživu hospodářských zvířat je, kromě sóji, důležitým zdrojem isoflavonů i jetel luční (*Trifolium pratense*), popř. jetel plazivý (*Trifolium repens*). Celkový obsah fytoestrogenů je u jetele lučního 10 – 25 mg/g sušiny, zatímco jetel plazivý má jen 0,5 – 0,6 mg/g sušiny [46]. Většinu z těchto fytoestrogenů tvoří isoflavony především formononetin, a to v množství 0,8 – 11 mg/g sušiny [47] v závislosti na části rostliny, stádiu růstu, kultivaru a podmínkách pěstování a také na způsobu konzervace [např. 36, 42, 43, 48, 49].

Produkty z jetele lučního se coby zdroj isoflavonů využívají i v humánní oblasti především pro výrobu potravinových doplňků pro zmírnění menopauzálních symptomů u žen [32, 50]. Kromě toho bylo prokázáno, že u západní, především americké populace, se na celkovém příjmu isoflavonů rovněž podílí konzumace kravského mléka a mléčných výrobků [51].

2.5. Metabolismu isoflavonů u člověka

Hlavním dietárním zdrojem isoflavonů, zejména daidzeinu a genisteinu u člověka je sója a sójové výrobky [31]. Fytoestrogenové doplňky stravy vyrobené z extraktů jetele lučního, stále více populární jako alternativní terapie pro léčbu menopauzálních symptomů, nepřímou poskytují zdroj daidzeinu, protože methoxylovaný isoflavon formononetin nacházející se v jeteli lučním je účinně biotransformován v lidském zažívacím traktu na daidzein [52].

Metabolismus sójových isoflavonů u člověka je v literatuře poměrně dobře popsán [např. 53 - 55]. Isoflavony jsou v ve většině sójových produktů konjugované na cukry. Na rozdíl od aglykonů, které jsou absorbovány v proximální části tenkého střeva pasivní difúzí a v krvi dosahují maximální hladiny během

1 hodiny po jejich příjmu [56], β -glykosidy nemohou být absorbovány kvůli vyšší hydrofilnosti a molekulární hmotnosti [57] a pro biologickou dostupnost a následný metabolismus vyžadují hydrolýzu [23]. Isoflavony jsou částečně hydrolyzovány v tenkém střevě [58], k hydrolýze dochází v celé délce intestinálního traktu, především ale v lačníku [59] a to součinností membrány kartáčového lemu a bakteriálních β -glukosidáz [60], které jsou aktivní od relativně časného života. Jejich působením dojde k uvolnění aglykonů, které jsou následně absorbovány přes střevní epitel [61] a dále metabolizovány.

Po absorpci jsou genistein a daidzein metabolizovány na β -glukuronidy pomocí UDP-glukuronyltransferázy v buňkách střevní sliznice a v menší míře na sulfátové estery katalyzované sulfotransferázami na jedné nebo dvou (4 nebo 7) pozicích isoflavonového kruhu [53, 62, 63]. Ke glukuronidaci a sulfataci dochází také v játrech. Tyto metabolity jsou vylučovány ve žluči a jsou dekonjugovány v distální části střeva, což jim umožňuje být znovu vstřebávány. Tím se vytváří enterohepatální oběh [64].

Část isoflavonů, která není hydrolyzována ani absorbována v tenkém střevě, spolu s isoflavony, které jsou vylučovány do tenkého střeva z enterohepatálního oběhu, prochází do tlustého střeva. V tlustém střevě jsou glykosylované, sulfátové a glukuronidované formy daidzeinu dekonjugovány bakteriálními enzymy, a pak absorbovány nebo dále metabolizovány intestinální mikroflórou [59, 61, 65]. Daidzein je metabolizován na dihydrodaidzein, který je dále konvertován na equol a O-desmethylangolensin (O-DMA). Genistein je převeden na dihydrogenistein a pak je metabolizován na p-ethyl-fenol a 6-hydroxy-O-DMA. Glycitin, 6-methoxy analog daidzinu, je metabolicky stabilní; jeho glykosid se snadno hydrolyzuje na glycitein, ale bezprostřední blízkost 6-methoxy a 7-hydroxylyu prostorově brání jeho demethylaci. Z tohoto důvodu glycitein není konvertován na daidzein a proto není prekurzorem equolu [66, 67].

I když se equol vyskytuje ve dvou formách, S- a R-equol, humánní intestinální bakterie syntetizují výhradně S-equol [67, 68]. V rámci studie buněčného metabolismu isoflavonů v různých typech buněk bylo zjištěno, že endoteliální buňky přijímají genistein a daidzein a metabolizují je na methoxy-genistein-glukuronidy, methoxy-genistein-sulfáty a methoxy-daidzein-glukuronidy [69]. Equol je těmito buňkami rovněž přijímán, ale není metabolizován. Naproti tomu v jaterních buňkách a v buňkách střevního epitelu docházelo nejen k tvorbě glukuronidových a sulfátových konjugátů genisteinu a daidzeinu, ale i k tvorbě síranových konjugátů equolu.

Equol se vstřebává přes stěnu tlustého střeva lépe než daidzein [61], což je zřejmé z rozdílu jejich koncentrací v plazmě [59]. Po orálním podání isoflavonů je během prvních 4 hodin koncentrace equolu v plazmě zanedbatelná, následně dosahuje maxima 24 hodin a poté se během 48 h po podání postupně snižuje [59]. Dále bylo zjištěno, že hlavním metabolitem S-equolu, který byl detekován v krevní plazmě krys byl konjugovaný 4-O-glukuronid, s menším množstvím nekonjugovaného S-equolu, konjugovaný 7-sulfát, a dikonjugovaný 4-O-glukuronid-7-sulfát [70]. U opic také probíhal intenzivní metabolismus a v plazmě byl nalezen primárně 4-O-glukuronid a dikonjugát 4-O-glukuronid 7-sulfát, moč (u opic i u krys) obsahovala především 4-O-glukuronid. V krevní plazmě se rovněž nacházejí konjugované metabolity genisteinu a daidzeinu a to především jako mono- a diglukuronidy, mono- a disulfáty a sulfo-glukuronidy [71]. Stopová množství mono- a dimethoxylovaných konjugátů se nacházejí i v moči [72].

Vylučování těchto metabolitů v moči je variabilní. U většiny zdravých lidí, kteří nekonzumují sóju, není equol normálně přítomný v moči. Jeho tvorba je výhradně závislá na střevní mikroflóře.

Bezmikrobní zvířata nevyklučují equol [73], stejně jako není zjištěn v plazmě kojenců krmených dětskou kojeneckou výživou [74, 75]. Po konzumaci isoflavonů jejich metabolity vylučuje pouze cca 30 – 40 % jedinců. Asi 30 až 50 % dospělé populace nevyklučuje equol v moči i když denně konzumovali sójové výrobky a ani po podání čistých isoflavonů, aby byl vyloučen vliv potravinové matrice [52, 66, 76, 77] a důvody nejsou známy. Proto byly definovány termíny „producent equolu“ a „neproducent equolu“, aby bylo možné tyto dvě skupiny v populaci rozlišit. Hraniční hodnoty byly stanoveny empiricky a za neproducenty equolu jsou označováni jedinci, u nichž je za jasně definovaných podmínek [viz 52] koncentrace equolu v plazmě nižší než 40 nmol/l (10 µg/l) a za producenty equolu jednotlivci, u nichž je koncentrace equolu v plazmě vyšší než 83 nmol/l (20 µg/l). Toto rozlišení lze rovněž odvodit z hladin equolu v moči, kdy producenti equolu vylučují více než 1000 nmol equolu/l [76, 77]. Nicméně u některých jedinců byla zjištěna schopnost měnit status producenta equolu v čase, tato skupina lidí byla označena jako nekonzistentní producenti equolu (inconsistent equol producers). V současnosti se vedou rovněž diskuse, zda schopnost metabolizovat daidzein na equol je dlouhodobě stabilní. Na schopnost produkovat equol bylo pohlíženo jako na relativně stabilní vlastnost, protože mnohé práce naznačovaly, že jednotlivci nejsou schopni status producenta equolu změnit [např. 66, 78], nicméně v nedávných studiích bylo zjištěno, že schopnost produkovat equol je stabilní po dobu 1 roku [79, 80], 1 – 3 let [81] nebo u 85 % jedinců po dobu 1– 5 let [82]. Studie s 350 postmenopauzálními ženami pozorovali, že až 35 % žen změnilo status producenta equolu během období 2,5 let [83]. Rozdíly zjištěné mezi studii, by mohly být způsobeny použitou metodou definující producenty equolu (rozdílné limitní hladiny equolu v jednotlivých pracích (např. studie [85] a [86]), i použitou matricí (plazma vs. moč) [84]. Ukazuje se, že pro klasifikaci equolového statusu u jednotlivců je vhodnější použít jako matici moč, protože lépe zachytí změny v čase a je tak přesnější pro vyhodnocení vlivu celkové expozice isoflavony oproti krvi, kde dochází k poměrně rychlé eliminaci equolu [83, 84]. K podstatnému zpřesnění klasifikace equolového statusu jednotlivců dochází při použití poměru mezi hladinami equolu a daidzeinu [87]. Lze tedy očekávat, že bude dále docházet ke zpřesňování a standardizaci metod klasifikujících status (ne)producenta equolu, který se bude promítat do interpretací výsledků stávajících i budoucích studií.

S použitím in vitro metod [65 a 88] případně s využitím in vivo metod [89] bylo prokázáno, že úroveň konverze daidzeinu na equol může být ovlivněna např. zvýšením obsahu neškrobových polysacharidů v potravě, které stimulují bakteriální fermentaci a zvyšují úroveň konverze daidzeinu na equol, naproti tomu za podmínek simulujících nízký příjem sacharidů se equol netvořil [89]. To naznačuje, že i ostatní složky potravy, jako např. tuk [77], vláknina nebo vyšší podíl rostlinných proteinů [76, 90] mohou ovlivnit průběh metabolismu isoflavonů. Významný vliv na metabolismus isoflavonů má i profil a diverzita intestinální mikroflóry [91].

Doposud není přesně známo, jaké bakterie se podílejí na metabolismu isoflavonů a tato problematika se intenzivně řeší. Bylo zjištěno, že *Bifidobacteria sp.* (*B. breve* a *B. longum*) byly schopné přeměňovat daidzein na equol [94]. Dále bylo zjištěno, že na konverzi daidzeinu na equol se podílel *Lactococcus* kmen 20-92, přičemž konverze probíhala přes dihydro- a tetrahydrodaidzein [95]. Schopnost konvertovat dihydrodaidzein až na equol byla popsána u kmene Julong 732 (*Eggerthella sp.*) [96]. Ze vzorků lidských výkalů byly izolovány bakterie patřící do *Lactococcus sp.* (označené MRG-IFC-1 a MRG-IFC-3) a *Enterococcus sp.* (označené MRG-IFC-2) schopné hydrolyzovat C-glykosidickou vazbu u puerarinu (daidzein-8-C-glykosid) [97]. Z dalších bakterií účastnících se metabolismu isoflavonů je možné uvést např. *Escherichia coli* HGH21 a *Clostridium sp.* HGH136 [57, 98], klostridiím podobnou bakterii [99], *Eubacterium ramulus* [100] a *Lactobacillus sp.* Niu-O16 [101] nebo např. směsné kultury

Bacteroides ovatus, *Streptococcus intermedius* a *Ruminococcus productus* [92] a *Lactobacillus mucosae* EPI2, *Enterococcus faecium* EPI1, *Fingoldia magna* EPI3 a *Veillonella* sp. strain EP [61].

2.6. Metabolismus isoflavonů u zvířat

Na rozdíl od člověka bylo v mnoha studiích prokázáno, že zvířata mají výhradní schopnost produkovat equol [např. 13, 17 – 20, 102, 103]. Metabolismus fytoestrogenů byl popsán u různých druhů zvířat včetně ovcí [např. 13], skotu [14], koz [104] nebo drůbeže [15]. Velká pozornost je věnována zejména přežvýkavcům, ovcím a dojnícím, protože krmiva s vysokým obsahem isoflavonů jako je sója a jetel luční jsou pro výživu těchto hospodářských zvířat běžně využívána a jejich zastoupení v krmné dávce je relativně vysoké. Proto se výzkum zaměřuje především na možný dopad dietárních isoflavonů na reprodukční výkonnost zvířat a také na možnost produkce tzv. funkčních potravin.

Jak již bylo zmíněno výše, isoflavony jsou přítomny v krmných surovinách jako glykosidy, které nevykazují estrogenní aktivitu [105]. K hlavní metabolické přeměně isoflavonů u přežvýkavců dochází v bacheru, a to prostřednictvím bacherových mikroorganismů, které hydrolyzují glykosidy na aglykony [106, 107].

Isoflavony, ať již ze sóji (daidzein, genistein a glycitein) nebo z jetele lučního (formononetin, biochanin A, daidzein, genistein) jsou v bacheru metabolizovány bacherovou mikroflórou až na equol, metabolicky neaktivní *p*-ethyl-fenol [55, 108] a v malé míře i na *O*-desmethylangolensin, jehož biologická aktivita není přesně známa [17, 54, 109].

Biochanin A se demethyluje na genistein a dále je metabolizován přes rozštěpení kruhu na *p*-ethyl-fenol a organické kyseliny bez estrogenního účinku [6, 12, 106, 110]. Formononetin se demethyluje především na daidzein [106] a dále na equol pomocí hydrogenace a rozštěpení kruhu [6, 11, 106]. Studie *in vitro* s inkubací formononetinu a biochaninu A v bacherové tekutině skotu ukázaly, že poločas přeměny byl 4,3 h pro formononetin, 9,3 h pro daidzein, 3,9 h pro biochanin A, a 5,5 h pro genistein [107].

Největší podíl metabolické transformace isoflavonů se odehrává v bacheru. V pokusech na dojnících bylo zjištěno, že z přijatého množství isoflavonů bylo v knize nalezeno pouze 0 až 9 % z denního příjmu biochaninu A a genisteinu a 7 až 16 % denního příjmu formononetinu a daidzeinu [111]. Podobné výsledky byly popsány u ovcí, kdy ve slezu nebyl zjištěn žádný biochanin A nebo genistein, ale 12 % formononetinu a daidzeinu z celkového denního příjmu [12]. Dále bylo zjištěno, že se zvyšujícím se příjmem isoflavonů klesal jejich podíl v knize [111]. To je způsobeno adaptací mikroorganismů, která trvá 6 – 10 dní a během níž dochází k zefektivnění metabolické přeměny. Naopak pomalejší metabolismus se snižujícím se příjmem může být způsobený nižším stupněm adaptace.

Equol byl dominantním isoflavonem nacházejícím se v trávenině jak u skotu [111] tak i u ovcí [12], nicméně v prvně uvedené studii byl v trávenině procházející do knihy detekován rovněž formononetin. Zatímco equol se u ovcí nacházel v tekuté frakci tráveniny [12], v jiné studii u skotu se nacházel v pevné frakci tráveniny, což by mohlo být způsobeno tím, že velká část equolu v tekuté frakci byla již v bacheru absorbována a pouze malá část equolu, která postoupila do knihy, se nacházela uvnitř nebo v blízkosti bacherových mikroorganismů adherovaných na částice krmiva [111]. Protože u formononetinu dochází během 24 hod k téměř úplné demethylaci na daidzein a k rychlé přeměně daidzeinu na equol

[107] (studie in vitro), může být průběh metabolismu isoflavonů v bachoru ovlivněn také rychlostí pasáže tráveniny z bachoru. Vliv by mohla mít i omezená demethylace formononetinu na daidzein [111].

Isoflavony jsou absorbovány především jako aglykony nejen v bachoru [111], ale také ve střevě [112]. Průběh metabolismu isoflavonů ve střevě přežvýkavců doposud nebyl uspokojivě popsán, ale lze předpokládat, že metabolické procesy budou obdobné jako u člověka (glukuronidace, sulfatace, enterohepatální oběh). Bylo zjištěna mnohem nižší konjugační kapacita v epiteliální tkáni gastrointestinálního traktu krav ve srovnání s ovci, což může vysvětlovat, proč je méně equolu absorbováno z bachoru skotu než z bachoru ovcí a proto více equolu prochází trávicím traktem skotu než trávicím traktem ovcí [112].

Isoflavony, zejména equol a daidzein mohou být distribuovány do různých tkání těl přežvýkavců, ale jejich distribuce je nerovnoměrná [113]. Zatímco hladiny isoflavonů v ledvinách nebo játrech byly vysoké, prostup isoflavonů do mozkové tkáně byl minimální. Reprodukční orgány obsahovaly vyšší hladiny isoflavonů než srdce, svaly nebo plíce. Isoflavony byly do tkání distribuovány ve formě glukuronidů, s výjimkou ledvin pravděpodobně nedochází k jejich akumulaci v tkáních [113].

Kvantitativní stránka vylučování isoflavonů a jejich metabolitů v moči a výkalech není doposud přesně popsána. Zatímco ve starších pracích bylo zjištěno, že v moči ovcí krmených jetelem lučním je vylučováno 16krát více equolu než ve výkalech [12], Na základě výsledků pokusů na jalovicích a dojnicích lze usuzovat, že hlavní cestou exkrece equolu jsou výkaly [111 a 114]. Tyto výsledky naznačují, že existují podstatné rozdíly v metabolismu isoflavonů u ovcí a skotu.

Poměrně velké množství isoflavonů je pak vylučováno v mléce, přičemž převažujícím isoflavonem je equol [např. 47, 115, 116]. Nejlépe je popsán prostup isoflavonů pocházejících z jetele lučního do mléka. Při zkrmování jetele lučního, ať už v čerstvém nebo konzervovaném stavu (siláž), se mohou hladiny equolu v mléce pohybovat v rozmezí od 15 až do 650 µg/l [42, 47, 115, 117 – 121], některé zdroje však uvádějí i hladiny dosahující 1000 – 1500 µg/l [122, 123] nebo dokonce i vyšší (1700 µg/l) [124]. Při zkrmování jetele plazivého je obsah equolu v mléce přibližně 4x nižší ve srovnání s jetelem lučním [47]. Vyšší hladiny equolu v mléce jsou zjišťovány u mléka produkovaného v ekologických chovech nežli v chovech konvenčních [42, 118, 120]. Při zkrmování sójových komponent jsou dosahovány mnohem nižší hladiny equolu v mléce a to v rozmezí 14 až 186 µg/l [116, 125 – 128]. Tyto hladiny jsou však úměrné podílu sójových komponent v krmné dávce dojnic.

Doposud nebyla uspokojivě popsána kvantitativní stránka prostupu isoflavonů z krmiva do mléka dojnic. Dostupné údaje jsou především u isoflavonů pocházejících z jetelů. Bylo zjištěna vysoká závislost mezi příjmem formononetinu a koncentrací equolu v plazmě a naopak mírnou závislost mezi příjmem formononetinu a obsahem equolu v mléce [115]. Úroveň prostupu (carry-over) dietárních isoflavonů do mléka byla u formononetinu a daidzeinu 0,92 – 1,2 u jetele plazivého, 0,21 – 0,24 u jetele lučního [47] a 1,23 u jetelotravní siláže [129]. V případě isoflavonů pocházejících ze sóji se míra prostupu u daidzeinu pohybovala od 0,50 [128] do 1,3 [116]. Byla zaznamenána i vyšší hodnota (2,0) kdy bylo rovněž zjištěno, že transfer celkových isoflavonů se snižoval se zvyšujícím se příjmem isoflavonů v krmné dávce [125]. Toto zjištění je v souladu se studiemi [47,115,111,123 a 129], které uvádějí, že při nižším příjmu isoflavonů byla úroveň transferu těchto látek do mléka vyšší. Jako možné vysvětlení je, že konjugace v gastrointestinálním traktu a rekonjugace v játrech před transportem a sekrecí do mléčné žlázy může být limitovaná [47]. Dále bylo zjištěno, že epiteliální buňky mléčné žlázy

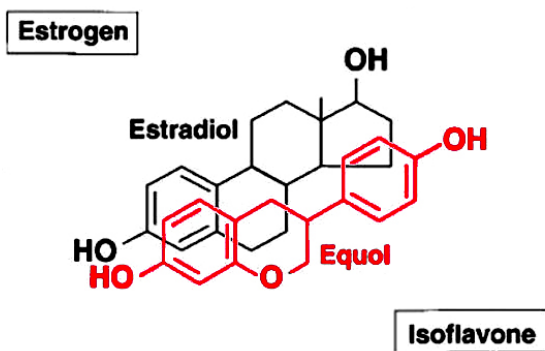
mohou být jen mírně permeabilní pro estrogenní látky [130]. Rovněž bylo zjištěno, že limitujícími faktory jsou rekonjugace a absorpce přes stěnu bachoru a střevní stěny, protože tyto reakce (konjugace) kopírují saturační kinetiku Michaelis-Mentenové a aktivní transport substrátů z krve do tkáně mléčné žlázy obvykle probíhá podle stejné kinetiky [111 a 131].

2.7. Biologické a zdravotní účinky isoflavonů u člověka

Isoflavony jsou považovány za chemopreventivní látky [132], které mohou být využity jako alternativní terapie pro celou řadu hormonálně závislých onemocnění, včetně několika druhů rakoviny, zejména rakoviny prsu a prostaty [133 – 136], kardiovaskulárních chorob [137 – 139], osteoporózy [140, 141] nebo menopauzálních symptomů [142, 143].

Zájem se v poslední době soustředí především na equol, zvláště poté, co bylo publikováno, že klinická účinnost sójových isoflavonů může být funkcí schopnosti biotransformovat sójové isoflavony na účinnější estrogenní metabolit jako je equol [23]. Ve studiích in vitro bylo prokázáno, že equol je více bioaktivní než jeho zdrojová forma daidzein, má vyšší estrogenicitu [např. 68], je účinnější antioxidant [např. 144] a vykazuje antiandrogenní vlastnosti [145]. Kromě toho equol má vyšší hladiny volné efektivní frakce cirkulující v humánním séru [146] a pomalejší odbourávání v plazmě ve srovnání s daidzeinem [23].

Na druhou stranu isoflavony mohou být také považovány za endokrinní disruptory, s možným negativním dopadem na zdravotní stav určité části populace [84, 147 – 149] nebo na životní prostředí [49, 114, 150].



Obrázek 20: Porovnání struktury estradiolu a equolu

Chemická struktura isoflavonů je sice odlišná od endogenních estrogenů, nicméně jejich společným znakem je fenolové jádro v molekule, které umožňuje jejich vazbu na estrogenové receptory (ER) v organismu, které jsou tímto aktivovány [32, 151]. Srovnání struktury estradiolu a equolu je na obrázku 20. V jádře buněk cílových tkání se isoflavony váží na ER, regulují expresi genů, nicméně jejich doba retence v jádře buněk je krátká. ER má dvě izoformy, α a β . Afinita isoflavonů k β -ER je asi 5 \times vyšší než afinita k α -ER [152], zatímco estradiol (E2) se váže na oba receptory s přibližně stejnou afinitou [134]. β -ER jsou převážně v kostech, plicích, prostatě, močovém měchýři, kůži, mozku, zatímco α -ER se nacházejí převážně v mléčné žláze, varlatech, děloze, ledvinách nebo v hypofýze [153, 154].

Na základě in vitro a in vivo studií zaměřených na stanovení estrogenní aktivity byly fytoestrogeny seřazeny do následujícího pořadí estradiol > kumestrol > genistein a equol > glycitein > daidzein > formononetin, biochanin A [22]. Podobně jako estrogény se fytoestrogeny chovají jako agonisté, nicméně při vysokých dávkách mohou působit i jako antagonisté blokující vazbu endogenních estrogenů na ER [38]. V porovnání s estradiolem sice fytoestrogeny vykazují nižší estrogenní aktivitu, ale vzhledem k množství, v jakém mohou být konzumovány, může být jejich hladina v séru i několiknásobně vyšší než hladina endogenních estrogenů, čímž je kompenzována jejich slabší afinita k estrogenovým receptorům [155 a 156].

Menopauzální symptomy a estrogenní aktivita

Znepokojení nad možnými nepříznivými vlivy hormonální substituční terapie při léčbě menopauzálních symptomů vedlo ke zvýšení zájmu o využití doplňků stravy s obsahem fytoestrogenů ke zmírnění obtíží spojených s menopauzou [142 a 143]. I když existuje mnoho studií, které ukazují, že potravinové doplňky obsahující genistein snižují příznaky menopauzy [142], výsledky nejsou jednoznačné [157]. Obecně lze říct, že když při užívání doplňků stravy s obsahem isoflavonů dochází k mírnému snížení frekvence návalů horka (10 – 20 %), přičemž ženy s vyšší frekvencí návalů zaznamenávaly výraznější účinky isoflavonů [158]. Dále bylo zjištěno, že pouze ženy, které produkují equol (detekován v moči), zaznamenaly zlepšení menopauzálních symptomů po užívání doplňku sójových isoflavonů [159].

I když se zdá fytoestrogeny mají pozitivní vliv na ženy po menopauze, jejich účinek může být škodlivý u žen v reprodukčním věku. Isoflavony u těchto žen mohou vyvolat poruchy v menstruačním cyklu (dysmenorea), endometriózu a sekundární neplodnost [160, 161]. Tyto potíže se zmírňují nebo úplně odezní po vyloučení sóji a sójových produktů ze stravy. Expozice isoflavony může ovlivnit i funkci vaječnicků. Pro správnou funkci je třeba, aby hladina cirkulujícího estrogenu oscilovala během cyklu. Nízká hladina estrogenů stimuluje uvolnění FSH (folikul stimulující hormon) a vede k růstu folikulu, přičemž přítomnost isoflavonů může tyto hladiny anulovat. To může vést k nepravidelnostem v cyklu a reprodukčním poruchám, rovněž byla popsána snížená hladina LH (luteinizační hormon) a FSH během periovulační fáze [162].

Kardiovaskulární nemoci

I když existuje mnoho rizikových faktorů pro vznik kardiovaskulárních onemocnění, hlavními faktory jsou lipidové abnormality [163]. Lipoproteiny o nízké hustotě (LDL) pronikají do stěny cév, kde jsou oxidovány volnými radikály a hromadí se v podobě kašovitě hmoty, která ucpává cévy a způsobuje trombózu [164]. Nicméně v populaci konzumující velké množství sójových výrobků byl zjištěn nižší výskyt srdečních onemocnění [137]. Jako důležitý faktor tohoto účinku bylo následně zjištěno, že docházelo ke snížení hladiny LDL a tendenci zvyšovat hladiny HDL. Přičemž jako hlavní účinná složka byly identifikovány isoflavony a to jak ve směsi se sójovým proteinem nebo samostatně [165, 166 a 167].

V prevenci kardiovaskulárních onemocnění hraje důležitou úlohu zachování normálních arteriálních funkcí. U lidí s vysokým rizikem kardiovaskulárních chorob je snížena schopnost cév dilatovat v reakci na oxid dusnatý tvořený endotelovými buňkami, které lemují vnitřní povrch cév [168]. Bylo prokázáno, že cévní endotel je bohatý na β -ER schopné vázat isoflavony [169]. Výsledky doposud provedených studií však nejsou jednoznačné. U postmenopauzálních žen užívajících až 80 mg sójových

isoflavonů/den [170] nebo až 60 g sójového proteinu/den [171] nedošlo k výraznému zlepšení vazodilatačních schopností cév. Naproti tomu studie provedená na postmenopauzálních ženách s denním příjmem 80 mg extraktu sójových isoflavonů/den po dobu pět týdnů významně snížila arteriální tuhost stejně jako denní užívání 40 g sójového proteinu, tj. 118 mg isoflavonů u mužů a postmenopauzálních žen po dobu 3 měsíců [138]. Nicméně, nedávné sledování u hypertenzních jedinců se stejným denním množstvím isoflavonů po dobu 6 měsíců neprokázalo zlepšení arteriálních funkcí [172]. Dále bylo zjištěno, že konzumace 65 – 153 mg sójových isoflavonů denně současně se sójovým proteinem po dobu 1 – 12 měsíců měla pozitivní vliv na snížení krevního tlaku u hypertenzní populace. Tento efekt se ale neprojevil u populace s normálním krevním tlakem [173].

Zdraví kostí

Osteoporóza je charakterizována snížením kostní hmoty a poškozením konstrukce kostní tkáně vyskytující se u žen a primárně souvisí se stárnutím a nedostatkem hormonů [174]. Praktické studie s genisteinem ukázaly pozitivní vliv na osteoporotické kosti tak, že snižují osteoklastické faktory (např. kolagen C-telopeptid) a zvyšují osteoblastické faktory (např. kostní alkalické fosfatázy). Genistein také selektivně antagonizuje katabolické účinky parathormonu v osteoblastech [175]. Mechanismus účinku isoflavonů na osteoklasty je pravděpodobně nezávislý na estrogenních mechanismech, protože v jádrech osteoklastů se nenacházejí žádné estrogenové receptory [176].

Výsledky krátkodobých klinických studií (6 měsíců nebo méně) posuzujících vliv zvýšeného příjmu sóji na biochemické markery tvorby kostí a jejich resorpce nejsou jednoznačné. Zatímco v některých studiích bylo u postmenopauzálních žen zjištěno, že zvyšující se příjem sójových produktů, sójového proteinu nebo sójových isoflavonů zlepšuje markery kostní resorpce a tvorby nebo zmírňuje ztráty kostní hmoty [141], v jiných studiích nebyl pozitivní vliv zvýšeného příjmu sóji prokázán [177]. Podobně i v případě dvou klinických studií bylo zjištěno, že ztráty kostní hmoty po dobu více než 6 měsíců byly podstatně nižší u žen po menopauze s přidavkem sójové bílkoviny obsahujících isoflavony, než u žen s doplňkem odpovídajícího množství mléčného proteinu [178], nicméně u dvou dlouhodobějších studií se stejnými potravními doplňky (sójový protein obsahující isoflavony a mléčný protein) se ztráta kostní hmoty u postmenopauzálních žen významně nelišila mezi skupinami [179]. Podobné rozpory ve výsledcích byli zjištěny i v nedávných studiích u tchajwanských a evropských postmenopauzálních žen [např. 180 a 181]. Možným vysvětlením těchto rozdílů mohou být časové rozdíly v expozici isoflavony (u asijské populace může výsledky ovlivnit celoživotní příjem isoflavonů) nebo výše hladiny isoflavonů v potravě (může existovat kritická hladina pro dosažení efektu). Rovněž mohou existovat rozdíly v biologické dostupnosti isoflavonů mezi různými doplňky, potravinami a čistými sloučeninami. Byla vyslovena hypotéza, že účinek sójových isoflavonů na zdraví kostí může být závislý na tom, zda jedinec je nebo není producent equolu, protože doplněk S-equolu působil preventivně na snížení hustoty kostní hmoty u postmenopauzálních žen [79,182,183 a 184]. Navíc bylo zjištěno, že daidzein nebo equol zvýšil hustotu kostní hmoty u rostoucích samic krys tím, že stimulovaly tvorbu kostí bez podstatného vlivu na hmotnost reprodukčních orgánů, přičemž equol byl účinnější než daidzein [185]. Tyto látky rovněž potlačily ztráty kostní hmoty u ovariectomizovaných myší [186].

Rakovina prsu

Rakovina prsu je jedním z nejčastějších smrtelných onemocnění u žen [187]. Výskyt rakoviny prsu v Asii, kde průměrný denní příjem isoflavonů dosahuje 25 – 50 mg je nižší než v západních zemích, kde je denní příjem isoflavonů nižší než 2 mg [188, 189]. Zvýšený příjem sóji byl spojený s minimalizací

rizika vzniku rakoviny prsu ve dvou ze čtyř epidemiologických studií, které sledovaly široký sortiment výživových složek v souvislosti s rizikem rakoviny prsu [190, 191].

Několik studií naznačuje, že vyšší příjem isoflavonů během dětství a/nebo dospívání může snížit riziko vzniku rakoviny prsu v pozdějších letech [135]. Bylo prokázáno, že konzumace potravin bohatých na sójové isoflavony u žen, které překonaly rakovinu prsu, snížila riziko úmrtí o 29 % a riziko opakování rakoviny o 32 % [136]. U některých typů rakoviny prsu je poměr α -ER / β -ER výrazně vyšší ve srovnání se zdravou tkání [192, 193], zejména v důsledku snížení počtu β -ER [194]. Bylo prokázáno, že aktivace α -ER stimuluje buněčnou proliferaci v prsní tkáni, zatímco β -ER se podílí na inhibici proliferace a stimulaci apoptózy [193, 195], přičemž jak bylo uvedeno výše, isoflavony mají vyšší afinitu k β -ER [195]. Podle další studie účinnost isoflavonů pro potlačení nebo vyvolání proliferace buněk závisí na konkrétním poměru mezi α -ER a β -ER přítomných v buňkách a příjem isoflavonů v dětství nebo během dospívání přispívá k diferenciaci prsní tkáně, což vede ke snížení anatomických struktur, které vedou ke vzniku rakovinných buněk [196].

Rakovina dělohy

V případě rakoviny dělohy se vychází z předpokladu, že k jejímu vzniku významně přispívá dlouhodobý nepoměr mezi estrogeny a progesteronem a proto by vysoké dávky isoflavonů s antiestrogenní aktivitou mohly působit preventivně proti endometriálním karcinomům [197]. Výsledky dostupných studií nejsou jednoznačné. Zatímco v jedné studii zjistili, že nižší příjem isoflavonů u žen trpících tímto druhem rakoviny oproti skupině zdravých žen [198], v jiné studii se uvádí, že u žen po menopauze dodání isoflavonů v denní dávce 120 mg po dobu 6 měsíců nezabránilo hyperplazii endometria, která byla vyvolaná podáváním exogenního estradiolu [199].

Rakovina prostaty

Úmrtnost na rakovinu prostaty je mnohem vyšší v USA než v asijských zemích, jako je Japonsko a Čína [200]. Nicméně, epidemiologické studie neposkytují jednoznačné důkazy, že vysoký příjem sójových produktů je spojený se sníženým rizikem vzniku rakoviny prostaty. Výsledky pokusů na buněčných kulturách a studií na zvířatech naznačují potenciální roli sójových isoflavonů v omezení progresu rakoviny prostaty [201, 202]. Ačkoli podávání doplňku sójových isoflavonů po dobu až 1 roku významně nesnížilo koncentraci prostatického specifického antigenu (PSA) v krevním séru u mužů, u nichž doposud nebyla potvrzena rakovina prostaty [203], zdá se, že doplněk sójových isoflavonů zpomalil stoupající koncentrace PSA v krevním séru spojenou s růstem nádoru prostaty u pacientů s rakovinou prostaty [204]. Navíc bylo zjištěno, že doplněk isoflavonů u pacientů s rakovinou prostaty příznivě ovlivnil koncentraci PSA ve čtyřech z osm studií [152]. Dále pak studie s využitím meta-analýzy dat zjistila, že konzumace isoflavonů byla spojena se snížením rizika vzniku rakoviny prostaty [205].

Funkce štítné žlázy

V pokusech prováděných na buněčných kulturách a na zvířatech bylo zjištěno, že sójové isoflavony inhibují aktivitu peroxidázy štítné žlázy, která je enzymem potřebným pro syntézu hormonů štítné žlázy [206]. Nicméně, se zdá, že ani vysoký příjem sójových isoflavonů nezvyšuje riziko hypotyreózy, pokud je zároveň zajištěn adekvátní příjem jodu [207], což dokládá fakt, že od zařazení doplňku jodu do dětské kojenecké výživy na bázi sóji v 60. letech minulého století již nebyly popsány

žádné další případy hypotyreózy u dětí krmených touto umělou výživou [208]. Podobná zjištění byla popsána rovněž ve studiích na pre- a postmenopauzálních ženách s dostatečným příjmem jódu, u nichž nebyl zjištěn negativní vliv zvýšené konzumace sójových isoflavonů na změny v hladinách cirkulujících hormonů štítné žlázy [209].

Genistein a v menší míře i daidzein jsou silnými konkurenty tyroxinu pro vazbu na transthyretin (studie in vitro) [210], který je hlavní nosič hormonů štítné žlázy [211, 212]. Vytěsněním tyroxinu z transthyretinu může dojít ke zvýšení hladiny volného tyroxinu s následnou změnou homeostázy hormonů štítné žlázy [213]. Nicméně, tyto negativní vlivy se neprojeví, pokud byl zároveň poskytnut jod v dostatečném množství [206, 214, 215].

Využití isoflavonů jako prevence proti ozáření

V nedávných pokusech in vitro (buněčné kultury) a in vivo (myši) [216, 217] bylo prokázáno, že podávání sóji před, během a po radioterapii může zvýšit účinnost působení radioterapie na cílový nádor a zároveň snížit toxicitu použité dávky radioterapie na okolní plicní tkáň. Nicméně výzkum v této oblasti je teprve na začátku.

Antioxidační aktivita

Isoflavony vykazují kromě estrogenní aktivity také poměrně značnou antioxidační aktivitu, která je nezávislá na jejich estrogenních vlastnostech [218]. Antioxidační aktivita vyžaduje přítomnost dvou hydroxylových skupin (na C-7 a C-4) jako má daidzein, který je proto nejaktivnějším antioxidantem. Aktivita aglykonů je vyšší než aktivita glykosidů [30]. Antioxidační aktivita isoflavonů byla prokázána in vitro [219] i in vivo. Například byla popsána zvýšená kapacita antioxidačních enzymů v kůži a tenkém střevě u myši po podání genisteinu [220] a v různých orgánech krys po podávání isoflavonů [221]. Pozitivní vliv isoflavonů na antioxidační schopnosti organismu byly popsány i v humánních in vivo studiích, ale výsledky nejsou jednoznačné. Například bylo zjištěno, že hladina F2-isoprostanů a dalších markerů peroxidace lipidů po dvou týdnech užívání sójového proteinu obsahujícího 56 mg isoflavonů byla nižší než při užívání sójového proteinu obsahujícího pouze 2 mg isoflavonů [222]. Naproti tomu bylo zjištěno, že denní dávka 50 až 100 mg izolovaných sójových isoflavonů neměla průkazný vliv na hladinu F2-isoprostanu v krevní plazmě nebo v moči [223].

2.8. Biologické a zdravotní účinky isoflavonů u zvířat

Estrogenní aktivita

Kromě již výše zmíněné jetelové nemoci popsané u ovcí [2], která vedla k objevu fytoestrogenů, prokázala mnohá pozorování u různých druhů zvířat také negativní vliv sójových isoflavonů na reprodukční schopnosti samic. Bylo např. potvrzeno, že samice některých druhů divokých zvířat chovaných v zajetí, jejichž krmná dávka obsahovala sóju nebo sójové produkty, nemohou zabřeznout.

Ovce

Jak již bylo zmíněno výše, formononetin a daidzein obsažený v jetelových porostech využívaných pro pastvu ovcí je v bachoru ovcí metabolizován na equol [13], který byl označen za hlavní příčinu poruch plodnosti ovcí [11, 12]. Patofyziologický vliv isoflavonů na reprodukci ovcí se projevil,

když se plazmatické koncentrace equolu blížily k 20 $\mu\text{mol/l}$ [11, 14]. Estrogenicita pastevního porostu závisí na procentuálním zastoupení jetelů. Uvádí se, že porosty, které v sušině obsahují 0,3 % formononetinu nebo méně nevyvolávají u ovcí poruchy plodnosti, zatímco spásání porostů s obsahem formononetinu vyšším než 0,8 % v sušině může vést k problémům s plodností [224, 225]. Nižší příjem isoflavonů způsobuje dočasnou neplodnost, dlouhodobá expozice může způsobit neplodnost trvalou [225, 226].

Výzkumy prováděné v oblasti vlivu isoflavonů na reprodukci ovcí v poslední době nejsou jednoznačné. Například se uvádí, že vysoké koncentrace formononetinu zvýšily u bahnic počet potratů a počet mrtvě narozených jehňat [227]. Proto při chovu ovcí nedoporučují zkrmování krmných dávek bohatých na isoflavony během připouštěcí sezóny a na začátku březosti [149, 227]. Taktéž byl sledován vliv zkrmování siláže z jetele lučního po dobu 5 měsíců na reprodukční ukazatele ovcí. Autoři sice nezjistili pokles plodnosti, ale zjistili, že celková hmotnost dělohy u březích zvířat včetně obsahu byla vyšší u ovcí krmených jetelovou siláží a to zejména kvůli vyššímu množství plodových vod, které může zvýšit riziko výhřezu pochvy před porodem [3]. Koncentrace progesteronu v krevním séru byla nižší zvířat krmených jetelovou siláží během celého období pokusu než u kontrolní skupiny. Nicméně plodnost jako taková nebyla snižena (stejný počet jehňat ve vrhu).

Skot

V nedávné době bylo provedeno několik in vitro i in vivo studií zabývajících se vlivem sójových isoflavonů na reprodukční orgány, říjový cyklus a hormonální profil skotu [např. 228 – 233].

Bylo zjištěno, že isoflavony působí antagonisticky nebo agonisticky k endogenním estrogenům [1]. Endogenní estrogeny regulují estrogení cyklus krav prostřednictvím ovlivnění syntézy prostaglandinů [234]. Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$) má luteolytické účinky, zatímco prostaglandin E2 (PGE_2) působí luteoprotektivně [235]. PGE_2 a $\text{PGF}_{2\alpha}$, resp. jejich vzájemný poměr mají zásadní význam pro správný vývoj, funkci a zachování žlutého tělíska (corpus luteum, CL), rozpoznání březosti, připravenost děložní sliznice pro nidaci oplozeného vajíčka, vlastní nidaci i vývoj embrya [236, 237]. Ačkoli bylo prokázáno, že sójové isoflavony ovlivňují syntézu jak $\text{PGF}_{2\alpha}$, tak i PGE_2 [229], bylo zjištěno, že sójové isoflavony a jejich metabolity přednostně stimulují tvorbu $\text{PGF}_{2\alpha}$ během luteální fáze estrálního cyklu [156]. Stimulací produkce $\text{PGF}_{2\alpha}$ ve srovnání s produkcí PGE_2 dochází k narušení optimálního poměru mezi těmito prostaglandiny, což může být jedním z důvodů rané embryonální mortality nebo pozdějších abortů u březích zvířat [229, 237, 238]. Pokud zvířata nejsou březí, může mít stimulace $\text{PGF}_{2\alpha}$ v průběhu estrálního cyklu (zvláště během pozdní luteální a folikulární fáze cyklu) pozitivní vliv na mechanismy odpovědné za luteolýzu a nástup estrálního cyklu a ovulace [156]. Tyto negativní vlivy se projevily především u jalovic a dojníc na první laktaci [228]. U starších dojníc, jejichž krmná dávka obsahovala obdobné množství sóji, byla pozorována pouze tendence k vyšším hladinám $\text{PGF}_{2\alpha}$ [233]. Koncentrace progesteronu v krevní plazmě ani délka říjového cyklu nebyla při daném příjmu isoflavonů, tj. do 3 g/d ovlivněna [41, 229, 233].

Vysoké koncentrace aktivních metabolitů isoflavonů po zkrmování sóji byly nalezeny i v tkáni CL jalovic [232], zároveň byly zjištěny nižší koncentrace progesteronu ve srovnání kontrolní skupinou. Lze předpokládat, že přítomnost isoflavonů v CL přímo narušuje jeho funkci tím, že inhibuje sekreci progesteronu, což může vyvolat různé poruchy během rané březosti včetně raného úmrtí embrya [239]. Nicméně produkce progesteronu je stimulována i dalšími mechanismy jako je LH, a luteální a / nebo ovariální PGE_2 [232].

Byla provedena řada pokusů in vitro lokálních účinků isoflavonů na sekreční funkci endometria skotu. Zjistili, že metabolity isoflavonů jsou mnohem účinnějšími disruptory než zdrojové formy isoflavonů, protože mají vyšší afinitu k estrogenovým receptorům [156, 228 – 230].

Dále bylo zjištěno, že v plazmě jalovic na začátku a konci březosti byly nižší koncentrace daidzeinu a genisteinu ve srovnání s kontrolou uprostřed luteální fáze říjového cyklu [231]. Dále v plazmě jalovic na začátku březosti zjistili pokles v koncentraci isoflavonů, který začal 3 hod. po nakrmení. Autoři se domnívají, že toto urychlení metabolismu vedoucí ke zvýšení koncentrací equolu a p-ethyl fenolu bylo způsobeno aktivací β -glukuronidázy, ke které dochází nejen na začátku březosti, ale i během mobilizace imunitního systému [240]. U vysokobřezích jalovic tento průběh nebyl zjištěn. Existuje tedy pravděpodobně hormonální mechanismus, který zpomaluje metabolismus isoflavonů a snižuje jejich absorpci [149].

Vliv isoflavonů na produkci a zdraví hospodářských zvířat

Mladé porosty rostlin s vysokou fytoestrogenní aktivitou mají galaktogenní účinky [241]. To potvrzují i další studie např. [242, 243 a 244], které zjistili u dojnic krmených siláží z jetele lučního vyšší příjem sušiny i vyšší produkci mléka s příznivějším profilem mastných kyselin v mléčném tuku (vyšší podíl polynenasycených mastných kyselin) ve srovnání s dojnicemi krmenými travní siláží. Navíc byla zjištěna vyšší produkce mléka s vyšším obsahem tuku i bílkovin u dojnic v pozdní laktaci po podávání daidzeinu [245].

Dále bylo zjištěno, že jehňata pasoucí se na porostech jetele lučního s vysokými koncentracemi formononetinu dosahovala vyšších přírůstků hmotnosti než jehňata pasoucí se na pastvinách jetele lučního s nižším obsahem formononetinu nebo na porostech jílku vytrvalého (při stejném denním příjmu sušiny) [246]. Obdobné výsledky uvádí i další studie [247].

Po zařazení daidzeinu do krmné dávky nosnic došlo ke zlepšení v předovulačním vývoji folikulů [248, 249], ke zvýšení hmotnosti vajec a snůšky [250], ke zvýšení síly a pevnosti skořápky a ke zvýšení koncentrace Ca ve skořápce [251].

Po přidavku 300 a 400 mg daidzeinu do krmné dávky laktujících dojnic vystavených tepelnému stresu byly u těchto dojnic zaznamenány vyšší hladiny imunoglobulinu G, interferonu α a interleukinu-2 v krevním séru, zatímco hladiny celkového proteinu a albuminu byly beze změn, což reflektuje zvýšení imunitních funkcí dojnic a vyšší odolnost vůči tepelnému stresu [245]. Doplněk daidzeinu do krmné dávky nosnic měl pozitivní vliv na diverzitu mikrobioty ilea [250].

2.9. Využití isoflavonů pro produkci tzv. funkčních potravin

Jak již bylo zmíněno výše, equol je mikrobiální metabolit daidzeinu a formononetinu s mnoha pozitivními účinky na lidské zdraví a je produkován specifickými bakteriemi, které jsou přítomny v trávicím systému zvířat a lidí [109, 252]. Díky nepřítomnosti specifické mikrobiální populace v trávicím traktu určité části lidské populace [109] je využívání zdravotních benefitů equolu omezené.

Využití probiotik nebo prebiotik, tedy jakási „inokulace“ střevní stěny bakteriemi přeměňujícími daidzein na equol s cílem vyvolat produkci equolu ve střevě u dospělých lidí, nebyla dosud úspěšná.

Jako vhodná alternativa se zdá být orální podávání equolu, které již bylo v některých studiích ověřeno [23, 253]. Pro tyto účely je možné využít equol produkovaný z daidzeinu bakteriálním kmenem *Lactococcus garvieae*, který byl použit k výrobě potravního doplňku SE5-OH bohatého na S-equol [254 – 256], který u nás není doposud komerčně dostupný. Další možností je využít isoflavony obohacené potraviny. Z celé škály potravin, které člověk běžně konzumuje, je kravské mléko pravděpodobně jedinou potravinou, která může za určitých podmínek obsahovat equol v relevantním množství [47, 49, 115, 121, 123, 129, 257].

Zdrojem equolu, resp. isoflavonů v humánní výživě mohou být i některé mléčné výrobky. Např. ve studii [258] během monitoringu zjistili nízké hladiny equolu v mnoha komerčně dostupných mléčných výrobcích, kromě másla. Z nedávných výzkumů vyplývá, že koncentrace isoflavonů v mléčných výrobcích může být ovlivněna technologickým zpracováním mléka. Zatímco tepelné ošetření mléka (až do teploty 140 °C po dobu 20 s) nemělo vliv na obsah isoflavonů [117, 126, 259], během výroby sýrů byla část isoflavonů uvolněna do syrovátky a byl zaznamenán úbytek isoflavonů během procesu zrání sýrů [127]. Ke snížení obsahu isoflavonů rovněž došlo během procesu výroby (fermentace) a zrání jogurtů [126, Kašparovská et al., dosud nepublikováno]. Tyto ztráty by mohly být způsobeny konjugací isoflavonů s proteiny nebo jinými látkami přirozeně se vyskytujícími v mléčných výrobcích, díky které nebyly analyticky zachyceny [Kašparovská et al., dosud nepublikováno].

2.10. Možná rizika pro člověka a životní prostředí související s isoflavony

Rizika pro děti

Prenatální a časný postnatální vývoj je jedním z nejcitlivějších období lidského života [260]. Za normálních podmínek je expozice organismu sójovými isoflavony značně omezená, protože výskyt genisteinu a daidzeinu v mateřském mléce je velmi nízký (5 – 15 ng/ml) [261]. Prenatální expozice může nastat díky životnímu stylu matek (například vegetariánská strava, využívání potravinových doplňků, konzumace sójového mléka) [17, 74], kdy isoflavony přecházejí přes placentární bariéru a dostávají se do fetální cirkulace [262].

Pokud kojící matka konzumuje potraviny vyrobené ze sóji, může koncentrace isoflavonů v mateřském mléce vzrůst až 10násobně [261], nicméně v tomto případě je denní příjem isoflavonů z mateřského mléka u kojenců pouze 0,005 – 0,01 mg [74]. Postnatální expozice isoflavony proto souvisí především s používáním dětské kojenecké výživy na bázi sóji, konzumací sójového mléka nebo potravinových doplňků určených pro děti obsahujících sóju [75, 263]. Děti přitom mohou být vystaveny vyšší úrovni sójových isoflavonů než dospělí, kdy bylo zjištěno, že děti konzumující kojeneckou a dětskou výživu na bázi sóji denně přijmou 6 – 9 mg isoflavonů na kg tělesné hmotnosti, zatímco dospělí, kteří konzumují přiměřené množství sójových produktů, denně přijmou pouze 1 mg isoflavonů na kg tělesné hmotnosti [74]. Rovněž bylo zjištěno, že zdánlivá biologická dostupnost isoflavonů byla vyšší u dětí různého věku než u dospělých [84, 264]. Dále bylo zjištěno, že kojenci ve věku 2 – 16 týdnů, kteří byli krmení dětskou výživou vyrobenou ze sóji vylučují v moči měřitelná množství daidzeinu a genisteinu, takže jsou schopni absorbovat a vylučovat isoflavony z dětské výživy a to v míře podobné dospělým lidem [265 a 266].

Vzhledem k nízkým hladinám estrogenu a nedokončenému vývoji osy hypothalamus-hypofýza-vaječníky, jsou děti citlivější vůči exogenním estrogenním sloučeninám než dospělí [267]. Proto je možné, že sójové isoflavony mohou představovat významné potenciální nebezpečí pro zdravý vývoj reprodukčního systému. Studie na modelových zvířatech [např. 268 – 270] prokázaly, že nitroděložní expozice isoflavony může mít vliv na funkci reprodukčního systému v dospělosti [147, 271]. A na rozdíl od expozice v dospělosti, expozice v pre- nebo perinatální životě může vést k nevratným změnám v reprodukčním systému [147, 148].

Expozice isoflavony během nitroděložního vývoje může ovlivnit vývoj reprodukčního systému u plodů mužského i ženského pohlaví. Toto je demonstrováno především na modelových zvířatech, kdy byla zaznamenána snížená citlivost mléčné žlázy k estrogenům [272] a změny v poměru estrogenových receptorů, čímž dochází k ovlivnění fyziologického působení estrogenů a změnám ve vývoji dělohy a vaječníků [273]. Podávání genisteinu během fetálního období dokonce zvýšilo riziko vzniku rakoviny dělohy [274]. Expozice isoflavony během prenatálního a postnatálního vývoje vyvolaly změny v morfologii epitelu varlat u krys, pozorovány byly rovněž vyšší hladiny estradiolu a nižší hladiny testosteronu v krevní plazmě [275].

Provádění studií na kojencích během postnatálního vývoje není dost dobře možné z etických důvodů, proto se vychází z výsledků studií prováděných na laboratorních zvířatech. Např. nedávná studie ukázala, že nízké dávky sójových isoflavonů podávané od odstavu do dosažení pohlavní dospělosti ovlivnily vývoj folikulů ve vaječnicích krys tak, že došlo ke zvýšení atrezie folikulů a i počtu žlutých tělísek a byla zjištěna snížená hladina estradiolu v krevním séru [276]. Urychlení atrezie folikulů se považuje za hlavní příčinu předčasného selhání funkce vaječníků [277]. Díky metabolické analýze byly zjištěny i změny v hladinách celkem 24 metabolitů, včetně pohlavních hormonů, aminokyselin, mastných kyselin a metabolitů účastnících se energetického metabolismu ve folikulární tekutině [276]. Narušení energetického metabolismu pak v důsledku může vést k poškození struktury a funkce mitochondrií, které je signálem pro spuštění apoptózy [278]. Navíc nedávné studie ukázaly, že daidzein a genistein může inhibovat růst rakovinných buněk vyvoláním apoptózy [279, 280]. Dále bylo zjištěno, že expozice isoflavony od odstavu do dosažení pohlavní dospělosti může ovlivnit vývoj folikulů tím, že vyvolá apoptózu aktivací apoptotických signálních drah [281]. Naproti tomu nebyly zjištěny žádné nežádoucí účinky isoflavonů u žen, které přijímaly v kojeneckém věku dětskou výživu na bázi sóji ve srovnání s výživou vyrobenou z kravského mléka [282]. Podobně i mnohé další studie, které porovnávaly dětskou kojeneckou výživu vyrobenou z kravského mléka a ze sóji nezaznamenaly žádné rozdíly v růstu a vývoji kojenců [283], v tělesné hmotnosti, v délce a obvodu hlavy [284, 285] nebo velikosti orgánů citlivých na hladinu pohlavních hormonů [286].

Estrogenní aktivita odpadů z živočišné výroby

Ačkoli z pohledu lidské výživy se jeví produkce kravského mléka obohacená o equol jako žádoucí, nelze pominout estrogenní charakter equolu, který je kromě mléka ve velké míře vylučován i močí a výkaly dojnic. Urinální a fekální equol by se tak mohl stát potencionálním zdrojem estrogenní kontaminace životního prostředí. V dosavadních studiích zabývajících se rezidui steroidních estrogenních látek přirozeně se vyskytujícími v odpadech pocházejících z živočišné výroby [150, 287 – 290] nebyl podíl equolu, resp. obecně dietárních fytoestrogenů na estrogenní aktivitě sledován, i když je považován za možný potenciální zdroj estrogenní kontaminace [49, 150, 291, 292]. Z dostupných údajů lze uvést studii, podle níž jsou švýcarské řeky ve vnitrozemí zatíženy isoflavony a equolem v řádu

několika kg ročně, a to hlavně v létě, přičemž nejčastěji detekovanými isoflavony byly formononetin a equol, a to v množstvích dosahujících až 217 resp. 524 ng/l [293 a 294]. Rovněž bylo zjištěno, že vody v oblasti Rio de Janeiro (Brazílie) obsahovaly až 366 ng/l fytoestrogenů [295]. Určení podílu dietárních isoflavonů na estrogenní kontaminaci životního prostředí vyžaduje další studie.

2.11. Cíle práce a dosažené výsledky

V rámci práce týkající se studia metabolismu sójových isoflavonů u skotu byla nejprve zavedena nová metoda stanovení různých forem těchto látek pomocí LC-MS-(TOF), která umožnila přesné stanovení i v nízkých koncentracích a to v ruminální tekutině a mléku (publikace 7).

Následně byla provedena studie prostupnosti sójových isoflavonů (daidzein, genistein a glycitein) u skotu z krmiva přes ruminální tekutinu do mléka při současném sledování složení mikrobiomu v rámci ruminální tekutiny (publikace 8). Navíc byla studována i přeměna daidzeinu na equol v ruminální tekutině a jeho následná prostupnost do mléka. Tyto experimenty ukázaly, že přidavek sójových isoflavonů do krmiva dojnic vede k adekvátnímu nárůstu koncentrace isoflavonů v ruminální tekutině a následnému kvantitativnímu prostupu do mléka. V ruminální tekutině docházelo také k přeměně daidzeinu na equol a to až z 96 %, přičemž equol vykazoval nižší prostupnost do mléka než ostatní isoflavony. Přídavek isoflavonů do krmiva dojnic ovlivnil i zastoupení jednotlivých kmenů bakterií v rámci mikrobiomu v rumenu, kdy bylo zjištěno jiné zastoupení u kmenů *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Firmicutes* a *Planctomyces* v ruminální tekutině mezi kontrolními a isoflavony krměnými dojnicemi. Navíc byla zjištěna signifikantní pozitivní korelace mezi přídavkem isoflavonů do krmiva a výskytem řádu *Burkholderiales* a třídy *Betaproteobacteria* v ruminální tekutině.

Pro možnost detailnějšího sledování metabolismu isoflavonů v ruminální tekutině bylo provedeno přenesení experimentů do in-vitro uspořádání v bioreaktoru (publikace 9). Ruminální tekutina byla v bioreaktoru udržována za definovaných podmínek (pH, redoxní potenciál a teplota), při pravidelném přidávání krmiva a pufry (umělých slin) pro kompenzaci vznikajících kyselin. Jako indikátor probíhajícího správného metabolismu v ruminální tekutině byla sledována produkce těkavým mastných kyselin. Sledováním dynamiky mikrobiomu v ruminální tekutině v bioreaktoru bylo zjištěno, že dochází ke změně zastoupení jednotlivých kmenů. Kmeny *Bacteroidetes* a *Firmicutes* poklesly zatímco *Proteobacteria* a *Actinobacteria* narostly. Příčinou této změny v zastoupení jednotlivých kmenů by mohl být nižší redoxní potenciál než je in-vivo a rozklad krmiva, které není odváděno, na jednodušší cukry. Pro další experimenty bude tedy optimalizován redoxní potenciál a odvod rozloženého krmiva.

2.12. Seznam publikovaných prací (Plné znění prací se nalézá v příloze)

- 7) KAŠPAROVSKÁ, Jitka, Ludmila KŘÍŽOVÁ, Jan LOCHMAN, Kateřina DADÁKOVÁ a **Tomáš KAŠPAROVSKÝ**. Soybean-Derived Isoflavone Determination in Rumen Fluid and Milk by LC–MS–(TOF). Journal of Chromatographic Science, Oxford University Press, 2016, roč. 54, č. 6, s. 997-1003. ISSN 1211-9555.
Podíl autora TK: Návrhy experimentů a vyhodnocení naměřených dat z LC-MS stanovení, podíl na přípravě relevantních částí rukopisu a diskuze výsledků, odborný dohled nad celou prací.
- 8) KAŠPAROVSKÁ, Jitka, Martina ZAPLETALOVÁ, Kateřina DADÁKOVÁ, Ludmila KŘÍŽOVÁ, Sylvie HADROVÁ, Matej LEXA, Jan LOCHMAN a **Tomáš KAŠPAROVSKÝ**. Effects of Isoflavone-Enriched Feed on the Rumen Microbiota in Dairy Cows. Plos one, San Francisco: Public Library of Science, 2016, roč. 11, č. 4, s. 1-17. ISSN 1932-6203
Podíl autora TK: Návrhy experimentů extrakce a LC-MS stanovení, podíl na přípravě relevantních částí rukopisu a diskuze výsledků, odborný dohled nad celou prací.
- 9) ZAPLETALOVÁ, Martina, Jitka KAŠPAROVSKÁ, Ludmila KŘÍŽOVÁ, **Tomáš KAŠPAROVSKÝ**, Omar ŠERÝ a Jan LOCHMAN. Bacterial community dynamics in a rumen fluid bioreactor during in-vitro cultivation. Journal of Biotechnology, Elsevier, 2016, in press. ISSN 0168-1656.
Podíl autora TK: Návrhy experimentů v bioreaktoru, podíl na přípravě relevantních částí rukopisu a diskuze výsledků.

2.13. Seznam použité literatury

- [1] Kurzer, M.S., Xu, X. (1997) Dietary phytoestrogens. *Annual Review of Nutrition*. 17, 353-381.
- [2] Bennetts, H.W., Underwood, E.J., McKeown, N.R. (1946) A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. *Australian Veterinary Journal*. 22, 2-12.
- [3] Mustonen, E., Taponen, S., Andersson, M., Sukura, A., Katila, T., Taponen, J. (2014) Fertility and growth of nulliparous ewes after feeding red clover silage with high phyto-oestrogen concentrations. *Animal*. 8, 1699-1705.
- [4] Lightfoot, R.J., Croker, K.P., Neil, H.G. (1968) Failure of sperm transport in relation to ewe infertility following prolonged grazing on oestrogenic pastures. *Australian Journal of Agricultural Research*. 18, 755-765.
- [5] Rossiter, R.C., Beck, A. B. (1966) Physiological and ecological studies on the estrogenic isoflavones in subterranean clover (*Trifolium subterraneum*) I. Effects of temperature. *Australian Journal of Agricultural Research*. 17, 29-37.
- [6] Batterham, T.J., Shutt D.A., Braden, A.W., Tweeddale, H.J. (1971) Metabolism of intraruminally administered [4-14C] formononetin and [4-14C] biochanin A in sheep. *Australian Journal of Agricultural Research*. 22, 131-138.
- [7] Braden, A., Hart, N., Lamberton, J. (1967) The estrogenic activity and metabolism of certain isoflavones in sheep. *Australian Journal of Agricultural Research*. 18, 335-348.
- [8] Nottle, M.C. (1976) Composition of some urinary calculi of ruminants in Western Australia. *Research in Veterinary Science*. 21, 309-317.
- [9] Marrian, G.F., Haslewood, G.A. (1932) Equol, a new inactive phenol isolated from the ketohydroxyoestrin fraction of mares' urine. *Biochemical Journal*. 26, 1227-1232.
- [10] Marrian, G.F., Beall, D. (1935) The constitution of equol. *Biochemical Journal*. 29, 1586-1589.
- [11] Shutt, D.A., Braden, A.W. (1968) The significance of equol in the relation to the oestrogenic responses in sheep ingesting clover with a high formononetin content. *Australian Journal of Agricultural Research*. 19, 545-553.
- [12] Shutt, D.A., Weston, R.H., Hogan, J.P. (1970) Quantitative aspects of phytoestrogen metabolism in sheep fed on subterranean clover (*Trifolium subterraneum*, cultivar Clare) or red clover (*Trifolium pratense*). *Australian Journal of Agricultural Research*. 21, 714-722.
- [13] Lundh, T. (1995) Metabolism of estrogenic isoflavones in domestic animals. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 208, 33-39.
- [14] Klyne, W., Wright, A.A. (1959) Steroids and other lipids of pregnant cow's urine. *Journal of Endocrinology*. 18, 32-45.
- [15] Chang, H.H., Robinson, A.R., Common, R.H. (1975) Excretion of radioactive daidzein and equol as monosulfates and disulfates in the urine of the laying hen. *Canadian Journal of Biochemistry*. 53, 223-230.
- [16] Saitoh, S., Sato, T., Harada, H., Matsuda, T. (2004) Biotransformation of soy isoflavone-glycosides in laying hens: intestinal absorption and preferential accumulation into egg yolk of equol, a more estrogenic metabolite of daidzein. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1674, 122-130.
- [17] Adlercreutz, H., Fotsis, T., Bannwart, C., Wähälä, K., Mäkelä, T., Brunow, G., Hase, T. (1986) Determination of urinary lignans and phytoestrogen metabolites, potential antiestrogens and anticarcinogens, in urine of women on various habitual diets. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 25, 791-797.
- [18] Blair, R.M., Appt, S.E., Franke, A.A., Clarkson, T.B. (2003) Treatment with antibiotics reduces plasma equol concentration in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Journal of Nutrition*. 133, 2262-2267.
- [19] Brown, N.M., Setchell, K.D.R. (2001) Animal models impacted by phytoestrogens in commercial chow: implications for pathways influenced by hormones. *Laboratory Investigation*. 81, 735-747.
- [20] J uniewicz, P.E., Pallante, M.S., Moser, A., Ewing, L.L. (1988) Identification of phytoestrogens in the urine of male dogs. *Journal of Steroid Biochemistry*. 31, 987-994.
- [21] Axelson, M., Kirk, D.N., Farrant, R.D., Cooley, G., Lawson, A.M., Setchell, K.D.R. (1982) The identification of the weak oestrogen equol [7-hydroxy-3-(49-hydroxyphenyl)chroman] in human urine. *Biochemical Journal*. 201, 353-357.
- [22] COT (Committee on toxicity of chemicals in food, consumer products and the environment) (2003) COT-Report. Phytoestrogens and Health. Food Standards Agency.
- [23] Setchell, K.D.R., Brown, N.M., Lydeking-Olsen, E. (2002) The clinical importance of the metabolite equol—a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *Journal of Nutrition*. 132, 3577-3584.
- [24] Dixon, R., Summer, L.W. (2003) Legume natural products: Understanding and manipulating complex pathways for human and animal health. *Plant Physiology*. 131, 878-885.
- [25] Ndebele, K., Graham, B., Tchounwou, P.B. (2010) Estrogenic activity of coumestrol, DDT, and TCDD in human cervical cancer cells. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 7, 2045-2056.
- [26] Landete, J.M., Arqués, J., Medina, M., Gaya, P., De La Rivas, B., Muñoz R. (2016) Bioactivation of phytoestrogens: Intestinal bacteria and health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56, 1826-1843.
- [27] Franke, A.A., Custer, L.J., Cerna, C.M., Narala, K.K. (1994) Quantitation of phytoestrogens in legumes by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42, 1905-1913.
- [28] Milder, I.E., Arts, I.C., Putte, B., Venema, D.P., Hollman, P.C. (2005) Lignan contents of Dutch plant foods: a database including laricresinol, pinoresinol, secoisolaricresinol and matairesinol. *British Journal of Nutrition*. 93, 393-402.
- [29] Thompson, L.U., Boucher, B.A., Liu, Z., Cotterchio, M., Kreiger, N. (2006) Phytoestrogen content of foods consumed in Canada, including isoflavones, lignans and coumestans. *Nutrition and Cancer*. 54, 184-201.
- [30] Velíšek, J., Hajišlová, J. (2009) *Chemie potravin II*. Osis, Tábor. 644 s.
- [31] Coward, L., Barnes, N.C., Setchell, K.D.R., Barnes, S. (1993) Genistein, daidzein, and their β -glycoside conjugates: Antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 41, 1961-1967.
- [32] Miadoková, E. (2009) Isoflavonoids - an overview of their biological activities and potential health benefits. *Interdisciplinary Toxicology*. 2, 211-218.
- [33] Barnes, S., Kirk, M., Coward, L. (1994) Isoflavones and their conjugates in soy foods: extraction conditions and analysis by HPLC-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42, 2466-2474.

- [34] Yerramsetty, V., Gallaher, D., Ismail B. (2014) Malonylglucoside conjugates of isoflavones are much less bioavailable compared with unconjugated β -glucosidic forms in rats. *Journal of Nutrition*. 144, 631-637.
- [35] Bingham, S.A., Atkinson, C., Liggins, J., Bluck, L., Coward, A. (1998) Review article: Phyto-oestrogens: Where are we now? *British Journal of Nutrition*. 79, 393-406.
- [36] Daems, F., Romnee, J.M., Heuskin, S., Froidmont, É., Lognay, G. (2016) Analytical methods used to quantify isoflavones in cow's milk: a review. *Dairy Science & Technology*. 96, 261-283.
- [37] Dakora, F.D., Phillips, D.A. (1996) Diverse functions of isoflavonoids in legumes transcend anti- microbial definitions of phytoalexins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 49, 1-20.
- [38] Vrzáňová, M., Heresová, J. (2004) Fytoestrogeny. *Interní medicína pro praktické lékaře*. 1, 19-21.
- [39] Wang, H.J., Murphy, P.A. (1994) Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: effects of variety, crop year, and location. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42, 1674-1677.
- [40] Hasanah, Y., Nisa, T. Ch., Armidin, H., Hanum, H. (2015) Isoflavone content of soybean [*Glycine max* (L). Merr.] cultivars with different nitrogen sources and growing season under dry land conditions. *Journal of Agriculture and Environment for International Development*. 109, 5-17.
- [41] Cools, S., Van den Broeck, W., Vanhaecke, L., Heyerick, A., Bossaert, P., Hostens, M., Opsomer, G. (2014) Feeding soybean meal increases the blood level of isoflavones and reduces the steroidogenic capacity in bovine corpora lutea, without affecting peripheral progesterone concentrations. *Animal Reproduction Science*. 144, 79-89.
- [42] Adler, S.A., Purup, S., Hansen-Møller, J., Thuen, E., Steinshamn, H. (2015) Phytoestrogens and their metabolites in bulk-tank milk: effects of farm management and season. *PLoS One*. 10, e0127187.
- [43] Lemežiene, N., Padaruskas, A., Butkute, B., Cesevičiene, J., Taujenis, L., Norkevičiene, E. Mikaliūniene, J. (2015) The concentration of isoflavones in red clover (*Trifolium pratense* L.) at flowering stage. *Zemdirbyste-Agriculture*. 102, 443-448.
- [44] Ciabotti, S., Silva, A.C.B.B., Juhasz, A.C.P., Mendonca, C.D., Tavano, O.L., Mandarino, J.M.G., Goncalves, C.A.A. (2016) Chemical composition, protein profile, and isoflavones content in soybean genotypes with different seed coat colours. *International Food Research Journal*. 23, 621-629.
- [45] Kim, E.H., Lee, O.K., Kim, J.K., Kim, S.L., Lee, J., Kim, S.H., Chung, I.M. (2014) Isoflavones and anthocyanins analysis in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) from three different planting locations in Korea. *Field Crops Research*. 156, 76-83.
- [46] Saloniemi, H., Wähälä, K., Nykanenkurki, P., Kallela, K., Saastamoinen, I. (1995) Phytoestrogen content and estrogenic effect of legume fodder. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 208, 13-17.
- [47] Steinshamn, H., Purup, S., Thuen, E., Hansen-Møller, J. (2008) Effects of clover-grass silages and concentrate supplementation on the content of phytoestrogens in dairy cow milk. *Journal of Dairy Science*. 91, 2715-2725.
- [48] Sivesind, E., Seguin, P. (2005) Effects of the environment, cultivar, maturity, and preservation method on red clover isoflavone concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 6397-6402.
- [49] Kalač, P. (2013) Fresh and ensiled forages as a source of estrogenic equol in bovine milk: a review. *Czech Journal of Animal Science*. 58, 296-303.
- [50] Andres, S., Hansen, U., Niemann, B., Palavinskas, R., Lampen, A. (2015) Determination of the isoflavone composition and estrogenic activity of commercial dietary supplements based on soy or red clover. *Food & Function*. 6, 2017-2025.
- [51] Frankenfeld, C.L. (2011) Dairy consumption is a significant correlate of urinary equol concentration in a representative sample of US adults. *American Journal of Clinical Nutrition*. 93, 1109-1116.
- [52] Setchell, K.D.R., Brown, N.M., Desai, P., Zimmet-Nechemais, L., Wolfe, B.E., Brashear, W.T., Kirschner, A.S., Cassidy, A., Heubi, J.E. (2001) Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *Journal of Nutrition*. 131, 1362S-1375S.
- [53] Axelson, M., Sjoval, J., Gustafsson, B. E., Setchell, K.D.R. (1984) Soya - a dietary source of the non-steroidal oestrogen equol in man and animals. *Journal of Endocrinology*. 102, 49-56.
- [54] Bannwart, C., Adlercreutz, H., Fotsis, T., Wähälä, K., Hase, T., Brunow, G. (1984) Identification of O-desmethylangolensin, a metabolite of daidzein, and of matairesinol, one likely plant precursor of the animal lignan enterolactone, in human urine. *Finnish Chemical Letters*. 4-5, 120-125.
- [55] Heinonen, S., Wähälä, K., Adlercreutz, H. (1999) Identification of isoflavone metabolites dihydrodaidzein, dihydrogenistein, 6'-OH-O-DMA and cis-4-OH-equol in human urine by gas chromatography-mass spectroscopy using authentic reference compounds. *Analytical Biochemistry*. 274, 211-217.
- [56] Sfakianos, J., Coward, L., Kirk, M., Barnes, S. (1997) Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats. *Journal of Nutrition*. 127, 1260-1268.
- [57] Hur, H.G., Lay Jr., J.O., Beger, R.D., Freeman, J.P., Raffi, F. (2000) Isolation of human intestinal bacteria metabolizing the natural isoflavone glycosides daidzin and genistin. *Archives of Microbiology*. 174, 422-428.
- [58] Richelle, M., Priclmore-Merten, S., Bodenstab, S., Enslin, M., Offord, E. A. (2002) Hydrolysis of isoflavone glycosides to aglycones by β -glucosidase does not alter plasma and urine isoflavone pharmacokinetics in postmenopausal women. *Journal of Nutrition*. 132, 2587-2592.
- [59] Zubik, L., Meydani, M. (2003) Bioavailability of soybean isoflavones from aglycone and glucoside forms in American women. *American Journal of Clinical Nutrition*. 77, 1459-1465.
- [60] Németh, K., Plumb, G.W., Berrin, J.G., Juge, N., Jacob, R., Naim, H.I., Williamson, G., Swallow, D.L., Kroon, P.A. (2003) Deglycosylation by small intestinal epithelial cell β -glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *European Journal of Nutrition*. 42, 29-42.
- [61] Decroos, K., Vanhemmens, S., Cattoir, S., Boon, N., Verstraete, W. (2005) Isolation and characterization of an equol producing mixed microbial culture from a human faecal sample and its activity under gastrointestinal conditions. *Archives of Microbiology*. 183, 45-55.
- [62] Doerge, D.R., Chang, H.C., Churchwell, M.I., Holder, C.L. (2000) Analysis of soy isoflavone conjugation in vitro and in human blood using liquid chromatography-mass spectrometry. *Drug Metabolism and Disposition*. 28, 298-307.
- [63] Ronis, M.J., Little, J.M., Barone, G.W., Chen, G., Radomska-Pandya, A., Badger, T.M. (2006) Sulfation of the isoflavones genistein and daidzein in human and rat liver and gastrointestinal tract. *Journal of Medicinal Food*. 9, 348-355.
- [64] Barnes, S. (2010) The biochemistry, chemistry and physiology of the isoflavones in soybeans and their food products. *Lymphatic Research and Biology*, 8, 89-98.

- [65] Setchell, K.D.R., Cassidy, A. (1999) Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *Journal of Nutrition*. 129, 758S-767S.
- [66] Setchell, K.D.R., Faughnan, M.S., Avades, T., Zimmer-Nechemias, L., Brown, N.B., Wolfe, B., Brashear, W.T., Desai, P., Oldfield, M.F., Botting, N.P., Cassidy, A. (2003) Comparing the pharmacokinetics of daidzein and genistein using ¹³C-labeled tracers in premenopausal women. *American Journal of Clinical Nutrition*. 77, 411-419.
- [67] Setchell, K.D.R. (2004) Equol - Origins, actions, and clinical relevance of this specific soy isoflavone metabolite. *Journal of Nutrition*. 134, 1235S-1236S.
- [68] Muthyala, R.S., Ju, J.-H., Sheng, S., Williams, L.D., Doerge, D.R., Katzenellenbogen, B.S., Helferich, W.G., Katzenellenbogen, J.A. (2004) Equol, a natural estrogenic metabolite from soy isoflavones: convenient preparation and resolution of R- and S-equols and their differing binding and biological activity through estrogen receptors α and β . *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 12, 1559-1567.
- [69] Toro-Funes, N., Morales-Gutiérrez, F.J., Veciana-Nogués, M.T., Vidal-Carou, M.C., Spencer, J.P.E., Rodríguez-Mateos, A. (2015) The intracellular metabolism of isoflavones in endothelial cells. *Food & Function*. 6, 98-108.
- [70] Schwen, R.J., Nguyen, L., Plomley, J.B., Jackson, R.L. (2012) Toxicokinetics and lack of uterotrophic effect of orally administered S-equol. *Food and Chemical Toxicology*. 50, 1741-1748.
- [71] Hosoda, K., Furuta, T., Yokokawa, A., Ishii, K. (2010) Identification and quantification of daidzein-7-glucuronide-4'-sulfate, genistein-7-glucuronide-4'-sulfate and genistein-4',7-diglucuronide as major metabolites in human plasma after administration of kinako. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 397, 1563-1572.
- [72] Heinonen, S.M., Hoikkala, A., Wähälä, K., Adlercreutz, H. (2003) Metabolism of the soy isoflavones daidzein, genistein and glycitein in human subjects. Identification of new metabolites having an intact isoflavonoid skeleton. *Journal of Steroid Biochemistry*. 87, 285-299.
- [73] Axelson, M., Setchell, K.D.R. (1981) The excretion of lignans in rats - evidence for an intestinal bacterial source for this new group of compounds. *FEBS Letters*. 123, 337-342.
- [74] Setchell, K.D.R., Zimmer-Nechemias, L., Cai, J., Heubi, J.E. (1997) Exposure of infants to phyto-oestrogens from soy-based infant formula. *Lancet*. 350, 23-27.
- [75] Setchell, K.D.R., Zimmer-Nechemias, L., Cai, J., Heubi, J.E. (1998) Isoflavone content of infant formulas and the metabolic fate of these phytoestrogens in early life. *American Journal of Clinical Nutrition*. 68, 1453S-1461S.
- [76] Lampe, J., Karr, S., Hutchins, A., Slavin, J.L. (1998) Urinary equol excretion with a soy challenge: Influence of habitual diet. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 217, 335-339.
- [77] Rowland, I.R., Wiseman, H., Sanders, T.A., Adlercreutz, H., Bowey, E.A. (2000) Interindividual variation in metabolism of soy isoflavones and lignans: influence of habitual diet on equol production by the gut microflora. *Nutrition and Cancer*. 36, 27-32.
- [78] Lampe, J. W., Skor, H. E., Li, S., Wähälä, K., Howald, W. N., Chen, C. (2001) Wheat bran and soy protein feeding do not alter urinary excretion of the isoflavone equol in premenopausal women. *Journal of Nutrition*. 131, 740-744.
- [79] Wu, J., Oka, J., Ezaki, J., Ohtomo, T., Ueno, T., Uchiyama, S., Toda, T., Uehara, M., Ishimi, Y. (2007) Possible role of equol status in the effects of isoflavone on bone and fat mass in postmenopausal Japanese women: a double-blind, randomized, controlled trial. *Menopause*. 14, 866-874.
- [80] Nagata, C., Ueno, T., Uchiyama, S., Nagao, Y., Yamamoto, S., Shibuya, C., Kashiki, Y., Shimizu, H. (2008) Dietary and lifestyle correlates of urinary excretion status of equol in Japanese women. *Nutrition and Cancer*. 60, 49-54.
- [81] Frankenfeld, C.L., Atkinson, C., Thomas, W.K., Gonzalez, A., Jokela, T., Wähälä, K., Schwartz, S.M., Li, S.S., Lampe, J.W. (2005) High concordance of daidzein-metabolizing phenotypes in individuals measured 1 to 3 years apart. *British Journal of Nutrition*. 94, 873-876.
- [82] Akaza, H., Miyayama, N., Takashima, N., Naito, S., Hirao, Y., Tsukamoto, T., Fujioka, T., Mori, M., Kim, W.-J., Song, J.M., Pantuck, A.J. (2004) Comparisons of percent equol producers between prostate cancer patients and controls: Case-controlled studies of isoflavones in Japanese, Korean and American residents. *Japanese Journal of Clinical Oncology*. 34, 86-89.
- [83] Franke, A.A., Lai, J.F., Halm, B.M., Pagano, I., Kono, N., Mack, W.J., Hodis, H.N. (2012) Equol production changes over time in postmenopausal women. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 23, 573-579.
- [84] Franke, A.A., Lai, J.F., Halm, B.M. (2014) Absorption, distribution, metabolism, and excretion of isoflavonoids after soy intake. *Review Archives of Biochemistry and Biophysics*. 559, 24-28.
- [85] Frankenfeld, C.L., McTiernan, A., Tworoger, S.S., Atkinson, C., Thomas, W.K., Stanczyk, F.Z., Marcovina, S.M., Weigle, D.S., Weiss, N.S., Holt, V.L., Schwartz, S.M., Lampe, J.W. (2004) Serum steroid hormones, sex hormone-binding globulin concentrations, and urinary hydroxylated estrogen metabolites in post-menopausal women in relation to daidzein-metabolizing phenotypes. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 88, 399-408.
- [86] Liu, B., Qin, L., Liu, A., Uchiyama, S., Ueno, T., Li, X., Wang, P.J. (2010) Prevalence of the equol-producer phenotype and its relationship with dietary isoflavone and serum lipids in healthy Chinese adults. *Epidemiology*. 20, 377-384.
- [87] Setchell, K.D.R., Cole, S.J. (2006) Method of defining equol-producer status and its frequency among vegetarians. *Journal of Nutrition*. 136, 2188-2193.
- [88] Cassidy, A. (1991) Plant oestrogens and their relation to hormonal status in women. Doctoral thesis. Cambridge University, Cambridge, UK.
- [89] Lipovac, M., Pfitscher, A., Hobiger, S., Laschitz, T., Imhof, M., Chedraui, P., Jungbauer, A. (2015) Red clover isoflavone metabolite bioavailability is decreased after fructooligosaccharide supplementation. *Fitoterapia*. 105, 93-101.
- [90] Nielsen, I.L.F., Williamson, G. (2007) Review of the factors affecting bioavailability of soy isoflavones in humans. *Nutrition and Cancer*. 57, 1-10.
- [91] Cohen, L.A., Crespin, J.S., Wolper, C., Zang, E.A., Pittman, B., Zhao, Z., Holt, P.R. (2007) Soy isoflavone intake and estrogen excretion patterns in young women: Effect of probiotic administration. *In Vivo*. 21, 507-512.
- [92] Ueno, T., Uchiyama, S. (2001) Identification of the specific intestinal bacteria capable of metabolising soy isoflavone to equol. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 45, 114 (Abs.).
- [93] Schröder, C., Matthies, A., Engst, W., Blaut, M., Braune, A. (2013) Identification and expression of genes involved in the conversion of daidzein and genistein by the equol-forming bacterium *Slackia isoflavoniconvertens*. *Applied and Environmental Microbiology*. 79, 3494-3502.
- [94] Elghali, S., Mustafa, S., Amid, M., Manap, M.Y.A.B.D., Ismail, A., Abas, F. (2012) Bioconversion of daidzein to equol by *Bifidobacterium breve* 15700 and *Bifidobacterium longum* BB536. *Journal of Functional Foods*. 4, 736-745.

- [95] Shimada, Y., Yasuda, S., Takahashi, M., Hayashi, T., Morihiro, M., Sato, I., Abiru, Y., Uchiyama, S., Hishigaki, H. (2010) Cloning and expression of a novel NADP(H)-dependent daidzein reductase, an enzyme involved in the metabolism of daidzein, from equol-producing *Lactococcus* strain 20-92. *Applied and Environmental Microbiology*. 76, 5892-5901.
- [96] Kim, M., Kim, S.I., Han, J., Wang, X.L., Song, D.G., Kim, S.U. (2009) Stereospecific biotransformation of dihydrodaidzein into (3S)-equol by the human intestinal bacterium *Eggerthella* strain Julong 732. *Applied and Environmental Microbiology*. 75, 3062-3068.
- [97] Kim, M., Lee, J., Han, J. (2015) Deglycosylation of isoflavone C-glycosides by newly isolated human intestinal bacteria. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 95, 1925-1931.
- [98] Hur, H.G., Beger, R.D., Heinze, T.M., Lay Jr., J.O., Freeman, J.P., Dore, J., Rafii, F. (2002) Isolation of an anaerobic intestinal bacterium capable of clearing the C-ring of the isoflavonoid daidzein. *Archives of Microbiology*. 178, 8-12.
- [99] Tamura, M., Tsushida, T., Shinohara, K. (2007) Isolation of an isoflavonemetabolizing Clostridium-like bacterium, strain TM-40, from human feces. *Anaerobe*. 13, 32-35.
- [100] Schoefer, L., Mohan, R., Braune, A., Birringer, M., Blaut, M. (2002) Anaerobic C-ring cleavage of genistein and daidzein by *Eubacterium ramulus*. *FEMS Microbiology Letters*. 208, 197-202.
- [101] Wang, X.L., Kim, H.J., Kang, S.I., Kim, S.I., Hur, H.G. (2007) Production of phytoestrogen S-equol from daidzein in mixed culture of two anaerobic bacteria. *Archives of Microbiology*. 187, 155-160.
- [102] Ohta, A., Uehara, M., Sakai, K., Takasaki, M., Adlercreutz, H., Morohashi, T., Ishimi, Y. (2002) A combination of dietary fructooligosaccharides and isoflavone conjugates increases femoral bone mineral density and equol production in ovariectomized mice. *Journal of Nutrition*. 132, 2048-2054.
- [103] Lamartiniere, C.A., Wang, J., Smith-Johnson, M., Eltoum, I.E. (2002) Daidzein: bioavailability, potential for reproductive toxicity, and breast cancer chemoprevention in female rats. *Toxicological Sciences*. 65, 228-238.
- [104] Klyne, W., Wright, A. (1957) Steroids and other lipids of pregnant goat's urine. *Biochemical Journal*. 66, 92-101.
- [105] Mikšiček, R.J. (1995) Estrogenic flavonoids: structural requirements for biological activity. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 208, 44-50.
- [106] Nilsson, A., Hill, J.L., Davies, H.L. (1967) An in vitro study of formononetin and biochanin A in rumen fluid from sheep. *Biochimica et Biophysica Acta*. 148, 92-98.
- [107] Dickinson, J.M., Smith, G.R., Randel, R.D., Pemberton, I.J. (1988) In vitro metabolism of formononetin and biochanin A in bovine rumen fluid. *Journal of Animal Science*. 66, 1969-1973.
- [108] Steer, T.E., Johnson, I.T., Gee, J.M., Gibson, G.R. (2003) Metabolism of the soyabean isoflavone glycoside genistin in vitro by human gut bacteria and the effects of prebiotics. *British Journal of Nutrition*. 90, 635-642.
- [109] Setchell, K.D.R., Clerici, C. (2010) Equol: History, Chemistry, and Formation. *Journal of Nutrition*. 140, 1355S-1362S.
- [110] Seested, S., Norgaard, P., Ranvig, H. (2000) Factors affecting the phytoestrogen content of clover and alfalfa and its influence on the female fertility in ruminants. *Dansk Veterinartidsskrift*. 83, 6-12.
- [111] Njåstad, K.M., Adler, S.A., Hanse-Møller, J., Thuen, E., Gustavsson, A.-M., Steinshamn, H. (2014) Gastrointestinal metabolism of phytoestrogens in lactating dairy cows fed silages with different botanical composition. *Journal of Dairy Science*. 97, 7735-7750.
- [112] Lundh, T.J.O., Pettersson, H., Marinsson, K.A. (1990) Comparative levels of free and conjugated plant estrogens in blood plasma and cattle fed estrogenic silage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 38, 1530-1534.
- [113] UrpiSarda, M., Morand, C., Besson, C., Kraft, G., Viala, D., Scalbert, A., Besle, J.M., Manach, C. (2008) Tissue distribution of isoflavones in ewes after consumption of red clover silage. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 476, 205-210.
- [114] Tucker, H.A., Knowlton, K.F., Meyer, M.T., Khunjar, W.O., Love, N.G. (2010) Effect of diet on fecal and urinary estrogenic activity. *Journal of Dairy Science*. 93, 2088-2094.
- [115] Mustonen, E.A., Tuori, M., Saastamoinen, I., Taponen, J., Wähälä, K., Saloniemi, H., Vanhatalo, A. (2009) Equol in milk of dairy cows is derived from forage legumes such as red clover. *British Journal of Nutrition*. 102, 1552-1556.
- [116] Třináctý, J., Křížová, L., Schulzová, V., Hajšlová, J., Hanuš, O. (2009) The effect of feeding soybean-derived phytoestrogens on their concentration in plasma and milk of lactating dairy cows. *Archives of Animal Nutrition*. 63, 1-11.
- [117] King, R.A., Mano, M.M., Head, R.J. (1998) Assessment of isoflavonoid concentrations in Australian bovine milk samples. *Journal of Dairy Research*. 65, 479-489.
- [118] Antignac, J.P., Cariou, R., Le Bizec, B., Andre, F. (2004) New data regarding phytoestrogens content in bovine milk. *Food Chemistry*. 87, 275-281.
- [119] Purup, S., Hansen-Møller, J., Sejrsen, K., Christensen, L.P., Lykkesfeldt, A.E., Leffers, H., Skakkebæk, N.E. (2005) Increased phytoestrogen content in organic milk and the biological importance. *Newsletter from Danish Research Centre for Organic Farming*. June 2005, No 2. <http://www.darcof.dk/enews/jun05/milk.html>
- [120] Hoikkala, A., Mustonen, E., Saastamoinen, I., Jokela, T., Teponen, J., Saloniemi, H., Wähälä, K. (2007) High levels of equol in skimmed Finnish cow milk. *Molecular Nutrition & Food Research*. 51, 782-786.
- [121] Adler, S.A., Purup, S., Hansen-Møller, J., Thuen, E., Gustavson, A.M., Steinshamn, H. (2014) Phyto-oestrogens and their metabolites in milk produced on two pastures with different botanical compositions. *Livestock Science*. 163, 62-68.
- [122] Nielsen, T.S., Norgaard, J.V., Purup, S., Frette, X.C., Bonefeld-Jorgensen, E.C. (2009) Estrogenic activity of bovine milk high or low in equol using immature mouse uterotrophic responses and an estrogen receptor transactivation assay. *Cancer Epidemiology*. 1, 61-68.
- [123] Höjer, A., Adler, S., Purup, S., Hansen-Møller, J., Martinsson, K., Steinshamn, H., Gustavsson, A.M. (2012) Effects of feeding dairy cows different legume-grass silages on milk phytoestrogen concentration. *Journal of Dairy Science*. 95, 4526-4540.
- [124] Sakakibara, H., Viala, D., Doreau, M., Besle, J.M. (2004b) Clover isoflavones move to cows' milk. *Proceedings of the 1st International Conference on Polyphenols and Health*. Vichy, France, November 18-21, 2004. 296.
- [125] Flachowsky, G., Hünerberg, M., Meyer, U., Kammerer, D.R., Carle, R., Goerke, M., Eklund, M. (2011) Isoflavone concentration of soybean meal from various origins and transfer of isoflavones into milk of dairy cows. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*. 6, 449-456.
- [126] Křížová, L., Třináctý, J., Hajšlová, J., Havlíková, Š. (2011a) The effect of technological processing on the content of isoflavones in bovine milk and dairy products. *In: Soybean - Applications and Technology* (Ed. Tzi-Bun Ng). InTech - Open Access Publisher. 95-109.
- [127] Křížová, L., Veselý, A., Třináctý, J., Schulzová, V., Hurajová, A., Hajšlová, J., Kvasničková, E., Havlíková, Š. (2011b) Changes in isoflavone concentrations in cheese during processing and ripening. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. 59, 153-162.

- [128] Kašparovská, J., Pečínková, M., Dadáková, K., Křížová, L., Hadrová, S., Lexa, M., Lochman, J., Kašparovský, T. (2016) Effects of isoflavone-enriched feed on the rumen microbiota in dairy cows. *PLoS ONE*. 11, e0154642.
- [129] Andersen, C., Weisbjerg, M.R., Hansen-Møller, J., Sejrsen, K. (2009) Effect of forage on the content of phyto-oestrogens in bovine milk. *Animal*. 3, 617-622.
- [130] Turner, C.W. (1958) Estrogen content of colostrum and milk of dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 41, 630-640.
- [131] Shennan, D.B., Peaker, M. (2000) Transport of milk constituents by the mammary gland. *Physiological Reviews*. 80, 925-951.
- [132] Baber, R.J. (2013) Phytoestrogens in health: the role of isoflavones. In: V.R. Preedy (ed.) *Isoflavones: Chemistry, Analysis, Function and Effects*, UK, Chapter 1, 1-13.
- [133] Messina, M., Barnes, S. (1991) The role of soybean products in reducing the cancer risks. *Journal of National Cancer Institute*. 83, 541-546.
- [134] Messina, M., Kucuk, O., Lampe, J.W. (2006b) An overview of the health effects of isoflavones and emphasis on prostate cancer risk and prostate-specific antigen levels. *Journal of AOAC International*. 89, 1121-1134.
- [135] Messina, M., Hilakivi-Clarke, L. (2009) Early intake appears to be the key to the proposed protective effects of soy intake against breast cancer. *Nutrition and Cancer*. 61, 792-798.
- [136] Shu, X.O., Zheng, Y., Cai, H., Gu, K., Chen, Z., Zheng, W., Lu, W. (2009) Soy food intake and breast cancer survival. *Journal of the American Medical Association*. 302, 2437-2443.
- [137] Carroll, K.K. (1991) Review of clinical studies on cholesterol-lowering response to soy protein. *Journal of the American Dietetic Association*. 91, 820-827.
- [138] Teede, H.J., Dalais, F.S., Kotsopoulos, D., Liang, Y.L., Davis, S., McGrath, B.P. (2001) Dietary soy has both beneficial and potentially adverse cardiovascular effects: a placebo-controlled study in men and postmenopausal women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 86, 3053-3060.
- [139] Hoie, L.H., Guldstrand, M., Sjöholm, A., Graubaum, H.J., Gruenwald, J., Zunft, H.J., Lueder, W. (2007) Cholesterol-lowering effects of a new isolated soy protein with high levels of non-denatured protein in hypercholesterolemic patients. *Advances in Therapy*. 24, 439-447.
- [140] Messina, M., Gugger, E.T., Alekel, D.L. (2001) Soy protein, soybean isoflavones, and bone health: a review of the animal and human data. In: *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods* (Wildman, R., ed.), CRC Press, Boca Raton, FL. 77-98.
- [141] Ye, Y.B., Tang, X.Y., Verbruggen, M.A., Su, Y.X. (2006) Soy isoflavones attenuate bone loss in early postmenopausal Chinese women: a single-blind randomized, placebo-controlled trial. *European Journal of Nutrition*. 45, 327-334.
- [142] Lethaby, A.E., Brown, J., Marjoribanks, J., Kronenberg, F., Roberts, H., Eden, J. (2007) Phytoestrogens for vasomotor menopausal symptoms. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 4, CD001395.
- [143] Farquhar, C., Marjoribanks, J., Lethaby, A., Suckli, J.A., Lamberts, Q. (2009) Long term hormone therapy for perimenopausal and postmenopausal women. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2, CD 004143.
- [144] Turner, R., Baron, T., Wolfram, S., Minihane, A.M., Cassidy, A., Rimbach, G., Weinberg, P.D. (2004) Effect of circulating forms of soy isoflavones on the oxidation of low density lipoprotein. *Free Radical Research*. 38, 209-216.
- [145] Lund, T.D., Munson, D.J., Haldy, M.E., Setchell, K.D.R., Lephart, E.D., Handa, R.J. (2004) Equol is a novel anti-androgen that inhibits prostate growth and hormone feedback. *Biology of Reproduction*. 70, 1188-1195.
- [146] Nagel, S.C., vom Saal, F.S., Welshons, W.V. (1999) Developmental effects of estrogenic chemicals are predicted by an in vitro assay incorporating modification of cell uptake by serum. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 69, 343-357.
- [147] Klein, S.L., Wisniewski, A.B., Marson, A.L., Glass, G.E., Gearhart, J.P. (2002) Early exposure to genistein exerts long-lasting effects on the endocrine and immune systems in rats. *Molecular Medicine*. 8, 742-749.
- [148] Hilakivi-Clarke, L., de Assis S. (2006) Fetal origins of breast cancer. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 17, 340-348.
- [149] Wocławek-Potocka, I., Mannelli, C., Boruszewska, D., Kowalczyk-Zieba, I., Waśniewski, T., Skarżyński, D.J. (2013) Diverse effects of phytoestrogens on the reproductive performance: cow as a model. *International Journal of Endocrinology*. 2013, 650984.
- [150] Gadd, J.B., Tremblay, L.A., Northcott, G.L. (2010) Steroid estrogens, conjugated estrogens and estrogenic activity in farm dairy shed effluents. *Environmental Pollution*. 158, 730-736.
- [151] Wang, Y., Gho, W.M., Chan, F.L., Chen, S., Leung, L.K. (2008) The red clover (*Trifolium pratense*) isoflavone biochanin A inhibits aromatase activity and expression. *British Journal of Nutrition*. 99, 303-310.
- [152] Vitale, D.C., Piazza, C., Melilli, B., Drago, F., Salomone, S. (2013) Isoflavones: estrogenic activity, biological effect and bioavailability. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 38, 15-25.
- [153] Pfaffl, M.W., Lange, I.G., Daxenberger, A., Meyer, H.H. (2001) Tissue-specific expression pattern of estrogen receptors (ER): quantification of ER alpha and ER beta mRNA with real-time RT-PCR. *Apmis*. 109, 345-355.
- [154] Evers, N.M., van de Klundert, T.M., van Aesch, Y.M., Wang, S., de Roos, W.K., Romano, A., de Haan, L.H., Murk, A.J., Ederveen, A.G., Rietjens, I.M.C.M., Groten, J.P. (2013) Human T47D breast cancer cells with tetracycline-dependent ERβ expression reflect ERα/ERβ ratios in rat and human breast tissue. *Toxicology In Vitro*. 27, 1753-1761.
- [155] Müller, S.O., Simon, S., Chae, K., Metzler, M., Korach, K.S. (2004) Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor α (ERα) and ERβ in human cells. *Toxicological Sciences*. 80, 14-25.
- [156] Wocławek-Potocka, I., Okuda, K., Acosta, T.J., Korzekwa, A., Pilawski, W., Skarżyński D.J. (2005c) Phytoestrogen metabolites are much more active than phytoestrogens themselves in increasing prostaglandin F2α synthesis via prostaglandin F2α synthase-like 2 stimulation in bovine endometrium. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*. 78, 202-217.
- [157] Krebs, E.E., Ensrud, K.E., McDonald, R., Wilt, T.J. (2004) Phytoestrogens for treatment of menopausal symptoms: a systematic review. *Obstetrics and Gynecology*. 104, 824-836.
- [158] Howes, L.G., Howes, J.B., Knight, D.C. (2006) Isoflavone therapy for menopausal flushes: a systematic review and meta-analysis. *Maturitas*. 55, 203-211.
- [159] Jou, H.J., Wu, S.C., Chang, F.W., Ling, P.Y., Chu, K.S., Wu, W.H. (2008) Effect of intestinal production of equol on menopausal symptoms in women treated with soy isoflavones. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 102, 44-49.
- [160] Chandrareddy, A., Muneyirci-Delale, O., McFarlane, S.I., Murad, O.M. (2008) Adverse effects of phytoestrogens on reproductive health: a report of three cases. *Complementary Therapies in Clinical Practice*. 14, 132-135.
- [161] Cohain, J.S. (2010) Daily intake of isoflavones of >0.07 g associated with endometrial bleeding. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 117, 500.
- [162] Jakes, R.W., Alexander, L., Duffy, S.W., Leong, J., Chen L.H., Lee W.H. (2001) Dietary intake of soybean protein and menstrual cycle length in pre-menopausal Singapore Chinese women. *Public Health Nutrition*. 4, 191-196.

- [163] Anthony, M.S., Clarkson, T.B., Hughes Jr., C.L., Morgan, T.M., Burke, G.L. (1996) Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. *Journal of Nutrition*. 126, 43-50.
- [164] Kang, M.J., Kim, J.I., Yoon, S.Y., Kim, J.C., Cha, I.J. (2006) Pinitol from soybeans reduces postprandial blood glucose in patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Medicinal Food*. 9, 182-186.
- [165] Zhan, S., Ho, S.C. (2005) Meta-analysis of the effects of soy protein containing isoflavones on the lipid profile. *American Journal of Clinical Nutrition*. 81, 397-408.
- [166] Sacks, F.M., Lichtenstein, A., Van Horn, L., Harris, W., Kris-Etherton, P., Winston, M. (2006) Soy protein, isoflavones, and cardiovascular health: an American Heart Association Science Advisory for professionals from the Nutrition Committee. *Circulation*. 113, 1034-1044.
- [167] Reynolds, K., Chin, A., Lees, K.A., Nguyen, A., Bujnowski, D., He, J. (2006) A meta-analysis of the effect of soy protein supplementation on serum lipids. *American Journal of Cardiology*. 98, 633-640.
- [168] Landmesser, U., Hornig, B., Drexler, H. (2004) Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis. *Circulation*. 109, 1127-1133
- [169] Mäkelä, S., Savolainen, H., Aavik, E., Myllarniemi, M., Strauss, L., Taskinen, E., Gustafsson, J., Hayry, P. (1999) Differentiation between vasculoprotective and uterotrophic effects of ligands with different binding affinities to estrogen receptors α and β . *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 96, 7077-7082.
- [170] Katz, D.L., Evans, M.A., Njike, V.Y., Yanchou, V., Hoxley, M.L., Nawaz, H., Comerford, B.P., Sarrel, P.M. (2007) Raloxifene, soy phytoestrogens and endothelial function in postmenopausal women. *Climacteric*. 10, 500-507.
- [171] Evans, M., Njike, V.Y., Hoxley, M., Pearson, M., Katz, D.L. (2007) Effect of soy isoflavone protein and soy lecithin on endothelial function in healthy postmenopausal women. *Menopause*. 14, 141-149.
- [172] Teede, H.J., Giannopoulos, D., Dalais, F.S., Hodgson, J., McGrath, B.P. (2006) Randomised, controlled, cross-over trial of soy protein with isoflavones on blood pressure and arterial function in hypertensive subjects. *Journal of the American College of Nutrition*, 25, 533-540.
- [173] Liu, X.X., Li, S.H., Chen, J.Z., Sun, K., Wang, X.J., Wang, X.G., Hui, R.T. (2012) Effect of soy isoflavones on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 22, 463-470.
- [174] Levine, J.P. (2007) Effective strategies to identify postmenopausal women at risk for osteoporosis. *Geriatrics*. 62, 22-30.
- [175] Onoe, Y., Miyaura, C., Ohta, H., Nozawa, S., Suda, T. (1997) Expression of estrogen receptor beta in rat bone. *Endocrinology*. 138, 4509-4512.
- [176] Canalis, E., Giustina, A., Bilezikian, J.P. (2007) Mechanisms of anabolic therapies for osteoporosis. *New England Journal of Medicine*. 357, 905-916.
- [177] Cheong, J.M., Martin, B.R., Jackson, G.S., Elmore, D., McCabe, G.P., Nolan, J.R., Barnes, S., Peacock, M., Weaver, C.M. (2007) Soy isoflavones do not affect bone resorption in postmenopausal women: a dose-response study using a novel approach with ^{45}Ca . *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 92, 577-582.
- [178] Alekel, D.L., St Germain, A., Peterson, C.T., Hanson, K.B., Stewart, J.W., Toda, T. (2000) Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women. *American Journal of Clinical Nutrition*. 72, 844-852.
- [179] Arjmandi, B.H., Lucas, E.A., Khalil, D.A., Devareddy, L., Smith, B.J., McDonald, J., Arquitt, A.B., Payton, M.E., Mason, C. (2005) One year soy protein supplementation has positive effects on bone formation markers but not bone density in postmenopausal women. *Nutrition Journal*. 4:8.
- [180] Chen, Y.M., Ho, S.C., Lam, S.S., Ho, S.S., Woo, J.L. (2004) Beneficial effect of soy isoflavones on bone mineral content was modified by years since menopause, body weight, and calcium intake: a double-blind, randomized, controlled trial. *Menopause*. 11, 246-254.
- [181] Huang, H.Y., Yang, H.P., Yang, H.T., Yang, T.C., Shieh, M.J., Huang, S.Y. (2006) One-year soy isoflavone supplementation prevents early postmenopausal bone loss but without a dose-dependent effect. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 17, 509-517.
- [182] Ishimi, Y. (2010) Dietary equol and bone metabolism in postmenopausal Japanese women and osteoporotic mice. *Journal of Nutrition*. 140, 1373S-1376S.
- [183] Taku, K., Melby, M.K., Nishi, N., Omori, T., Kurzer, M.S. (2011) Soy isoflavones for osteoporosis: an evidence-based approach. *Maturitas*. 70, 333-338.
- [184] Tousen, Y., Ezaki, J., Fujii, Y., Ueno, T., Nishimuta, M., Ishimi, Y. 2011. Natural S-equol decreases bone resorption in postmenopausal, non-equol-producing Japanese women: a pilot randomized, placebo-controlled trial. *Menopause*. 18, 563-574.
- [185] Tousen, Y., Ishiwata, H., Ishimi, Y., Ikegami, S. (2015) Equol, a metabolite of daidzein, is more efficient than daidzein for bone formation in growing female rats. *Phytotherapy Research*. 29, 1349-1354.
- [186] Fujioka, M., Uehara, M., Wu, J., Adlercreutz, H., Suzuki, K., Kanazawa, K., Takeda, K., Yamada, K., Ishimi, Y. (2004) Equol, a metabolite of daidzein, inhibits bone loss in ovariectomized mice. *Journal of Nutrition*. 134, 2623-2627.
- [187] Youlden, D.R., Cramb, S.M., Dunn, N.A., Muller, J.M., Pyke, C.M., Baade, P.D. (2012) The descriptive epidemiology of female breast cancer: an international comparison of screening, incidence, survival and mortality. *Cancer Epidemiology*. 36, 237-248.
- [188] Van Erp-Baart, M.A., Brants, H.A., Kiely, M., Mulligan, A., Turrini, A., Sermoneta, C., Kilkinen, A., Valsta, L.M. (2003) Isoflavone intake in four different European countries: the VENUS approach. *British Journal of Nutrition*. 89(Suppl. 1), S25-S30.
- [189] Messina, M., Nagata, C., Wu, A.H. (2006a) Estimated Asian adult soy protein and isoflavone intakes. *Nutrition and Cancer*. 55, 1-12.
- [190] Messina, M.J., Wood, C.E. (2008) Soy isoflavones, estrogen therapy, and breast cancer risk: analysis and commentary. *Nutrition Journal*. 7, 17.
- [191] Shin, H.R., Joubert, C., Boniol, M., Hery, C., Ahn, S.H., Won, Y.J., Nishino, Y., Sobue, T., Chen, C.J., You, S.L., Mirasol-Lumague, M.R., Law, S.C., Mang, O., Xiang, Y.B., Chia, K.S., Rattamongkolgul, S., Chen, J.G., Curado, M.P., Autier, P. (2010) Recent trends and patterns in breast cancer incidence among Eastern and Southeastern Asian women. *Cancer Causes Control*. 21, 1777-1785.
- [192] Leygue, E., Dotzlaw, H., Watson, P.H., Murphy, L.C. (1998) Altered estrogen receptor alpha and beta messenger RNA expression during human breast tumorigenesis. *Cancer Research*. 58, 3197-3201.
- [193] Bardin, A., Boulle, N., Lazennec, G., Vignon, F., Pujol, P. (2004) Loss of ERbeta expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. *Endocrine-Related Cancer*. 11, 537-551.
- [194] Lazennec, G., Bresson, D., Lucas, A., Chauveau, C., Vignon, F., (2001) ER beta inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells. *Endocrinology*. 142, 4120-4130.

- [195] Sotoca, A.M.C., van den Berg, H., Vervoort, J., van der Saag, P., Ström, A, Gustafsson, J.A., Rietjens, I., Murk, A.J. (2008) Influence of cellular ERalpha/ERbeta ratio on the ERalpha-agonist induced proliferation of human T47D breast cancer cells. *Toxicological Sciences*. 105, 303-311.
- [196] Islam, M.A., Bekele, R., Vanden Berg, J.H., Kuswanti, Y., Thapa, O., Soltani, S., van Leeuwen, F.X., Rietjens, I.M., Murk, A.J. (2015) Deconjugation of soy isoflavone glucuronides needed for estrogenic activity. *Toxicology in Vitro*. 29, 706-715.
- [197] Horn-Ross, P.L., John, E.M., Canchola, A.J., Stewart, S.L., Lee, M.M. (2003) Phytoestrogen intake and endometrial cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*. 95, 1158-1164.
- [198] Xu, W.H., Zheng, W., Xiang, Y.B., Ruan, Z.X., Cheng, J.R., Dai, Q., Gao, Y.T., Shu, X.O. (2004) Soya food intake and risk of endometrial cancer among Chinese women in Shanghai: population based case-control study. *BMJ*. 328, 1285.
- [199] Murray, M.J., Meyer, W.R., Lessey, B.A., Oi, R.H., DeWire, R.E., Fritz, M.A. (2003) Soy protein isolate with isoflavones does not prevent estradiol-induced endometrial hyperplasia in postmenopausal women: a pilot trial. *Menopause*. 10, 456-464.
- [200] Messina, M.J. (2003) Emerging evidence on the role of soy in reducing prostate cancer risk. *Nutrition Reviews*. 61, 117-131.
- [201] Pollard, M., Suckow, M.A. (2006) Dietary prevention of hormone refractory prostate cancer in Lobund-Wistar rats: a review of studies in a relevant animal model. *Comparative Medicine*. 56, 461-467.
- [202] Lund, T.D., Blake, C., Biu, L., Hamaker, A.N., Lephart E.D. (2011) Equol an isoflavonoid: potential for improved prostate health, in vitro and in vivo evidence. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 9, 4.
- [203] Adams, K.F., Chen, C., Newton, K.M., Potter, J.D., Lampe, J.W. (2004) Soy isoflavones do not modulate prostate-specific antigen concentrations in older men in a randomized controlled trial. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 13, 644-648.
- [204] Fischer, L., Mahoney, C., Jeffcoat, A.R., Koch, M.A., Thomas, B.E., Valentine, J.L., Stinchcombe, T.B.J., Crowell, J.A., Zeisel, S.H. (2004) Clinical characteristics and pharmacokinetics of purified soy isoflavones: multiple-dose administration to men with prostate neoplasia. *Nutrition and Cancer*. 48, 160-170.
- [205] Yan, L., Spitznagel, E.L. (2009) Soy consumption and prostate cancer risk in men: a revisit of a meta-analysis. *American Journal of Clinical Nutrition*. 89, 1155-1163.
- [206] Chang, H.C., Doerge, D.R. (2000) Dietary genistein inactivates rat thyroid peroxidase in vivo without an apparent hypothyroid effect. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 168, 244-252.
- [207] Messina, M., Redmond, G. (2006) Effects of soy protein and soybean isoflavones on thyroid function in healthy adults and hypothyroid patients: a review of the relevant literature. *Thyroid*. 16, 249-258.
- [208] Chorazy, P.A., Himelhoch, S., Hopwood, N.J., Greger, N.G., Postellon, D.C. (1995) Persistent hypothyroidism in an infant receiving a soy formula: case report and review of the literature. *Pediatrics*. 96, 148-150.
- [209] Dillingham, B.L., McVeigh, B.L., Lampe, J.W., Duncan, A.M. (2007) Soy protein isolates of varied isoflavone content do not influence serum thyroid hormones in healthy young men. *Thyroid*. 17, 131-137.
- [210] Radović, B., Mentrup, B., Köhrle, J. (2006) Genistein and other soya isoflavones are potent ligands for transthyretin in serum and cerebrospinal fluid. *British Journal of Nutrition*. 95, 1171-1176.
- [211] Davis, P.J., Spaulding, S.W., Gregerman, R.I. (1970) The three thyroxine-binding proteins in rat serum: binding capacities and effects of binding inhibitors. *Endocrinology*. 87, 978-986.
- [212] Hagen, G.A., Solberg Jr., L.A. (1974) Brain and cerebrospinal fluid permeability to intravenous thyroid hormones. *Endocrinology*. 95, 1398-1410.
- [213] Köhrle, J., Fang, S.L., Yang, Y., Irmscher, K., Hesch, R.D., Pino, S., Alex, S., Braverman, L.E. (1989) Rapid effects of the flavonoid EMD 21388 on serum thyroid hormone binding and thyrotropin regulation in the rat. *Endocrinology*. 125, 532-537.
- [214] Schmutzler, C., Hamann, I., Hofmann, P.J., Kovacs, G., Stemmler, L., Mentrup, B., Schomburg, L., Ambrugger, P., Grüters, A., Seidlova-Wuttke, D. (2004) Endocrine active compounds affect thyrotropin and thyroid hormone levels in serum as well as endpoints of thyroid hormone action in liver, heart and kidney. *Toxicology*. 205, 95-102.
- [215] Šošić-Jurjević, B., Filipović, B., Wirth, E.K., Živanović, J., Radulović, N., Janković, S., Milošević, V., Köhrle, J. (2014) Soy isoflavones interfere with thyroid hormone homeostasis in orchidectomized middle-aged rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 278, 124-134.
- [216] Hilman, G.G., Singh-Gupta, V., Lonardo, F., Hoogstra, D.J., Abernathy, L.M., Yunker, C.K., Rothstein, S.E., Rakowski, J., Sarkar, F.H., Gadgeel, S., Kanski, A.A., Joiner, M.C., (2013a) Radioprotection of lung tissue by soy isoflavones. *Journal of Thoracic Oncology*. 8, 1356-1364.
- [217] Hillman, G.G., Singh-Gupta, V., Hoogstra, D.J., Abernathy, L., Rakowski, J., Yunker, C.K., Rothstein, S.E., Sarkar, F.H., Gadgeel, S., Kanski, A.A., Lonardo, F., Joiner, M.C. (2013b) Differential effect of soy isoflavones in enhancing high intensity radiotherapy and protecting lung tissue in a pre-clinical model of lung carcinoma. *Radiotherapy and Oncology*. 109, 117-125.
- [218] Moosmann, B., Behl, C. (1999) The antioxidant neuroprotective effects of estrogens and phenolic compounds are independent from their estrogenic properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96, 8867-8872.
- [219] Ruiz-Larrea, M.B., Mohan, A.R., Paganga, G., Miller, N.J., Bolwell, G.P., Rice-Evans, C.A. (1997) Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones. *Free Radical Research*. 26, 63-70.
- [220] Amigo-Benavent, M., Silván, J.M., Moreno, F.J., Villamiel, M., Del Castillo, M.D. (2008) Protein quality, antigenicity, and antioxidant activity of soy-based foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56, 6498-6505.
- [221] Fritz, K.L., Seppanen, C.M., Kurzer, M.S., Saari, A.C. (2003) The in vivo antioxidant activity of soybean isoflavones in human subjects. *Nutrition Research*. 23, 479-487.
- [222] Wiseman, H., O'Reilly, J.D., Adlercreutz, H., Mallet, A.I., Bowey, E.A., Rowland, I.R., Sanders, T.A. (2000) Isoflavone phytoestrogens consumed in soy decrease F(2)-isoprostane concentrations and increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*. 72, 395-400.
- [223] Djuric, Z., Chen G., Doerge D.R., Heilbrun, L.K., Kucuk O. (2001) Effect of soy isoflavone supplementation on markers of oxidative stress in men and women. *Cancer Letters*. 172, 1-6.
- [224] Little, D.L. (1996) Reducing the effect of clover disease by strategic grazing of pastures. *Australian Veterinary Journal*. 73, 192-193.
- [225] Marshall, T. (1973) Clover disease - what we know and what we can do. *Journal of Agriculture, Western Australia* 14, 198-206.
- [226] Adams, N.R. (1995) Detection of the effects of phytoestrogens on sheep and cattle. *Journal of Animal Science*. 73, 1509-1515.
- [227] Sakakibara, H., Viala, D., Ollier, A., Combeau, A., Besle, J.M. (2004a) Isoflavones in several clover species and milk from goats fed clovers. *Biofactors*. 22, 237-239.

- [228] Woclawek-Potocka, I., Acosta, T.J., Korzekwa, A., Bah, M.M., Shibaya, M., Okuda, K., Skarzynski, D.J. (2005a) Phytoestrogens modulate prostaglandin production in bovine endometrium: Cell type specificity and intracellular mechanisms. *Experimental Biology and Medicine*. 230, 326-333.
- [229] Woclawek-Potocka I., Bah, M.M., Korzekwa, A., Piskula, M.K., Wiczkowski, W., Depta, A., Skarzynski, D.J. (2005b) Soybean derived phytoestrogens regulate prostaglandin secretion in endometrium during the oestrous cycle and early pregnancy in cattle. *Experimental Biology and Medicine* 230, 189-199.
- [230] Woclawek-Potocka, I., Borkowski, K., Korzekwa, A., Okuda, K., Skarzynski, D.J. (2006a) Phyto- and endogenous estrogens differently activate intracellular calcium ion mobilization in bovine endometrial cells. *Journal of Reproduction and Development*. 52, 731-740.
- [231] Woclawek-Potocka, I., Piskula, M.K., Bah, M.M., Siemieniuch, M.J., Korzekwa, A., Brzezicka, E., Skarzynski, D.J. (2008) Concentration of isoflavones and their metabolites in the blood of pregnant and non-pregnant heifers fed soy bean. *Journal of Reproduction and Development*. 54, 358-363.
- [232] Piotrowska, K., Woclawek-Potocka, I., Bah, M.M., Piskula, M., Pilawski, W., Bober, A., Skarzynski, D.J. (2006) Phytoestrogens and their metabolites inhibit the sensitivity of the bovine corpus luteum on luteotropic factors. *Journal of Reproduction and Development*. 52, 33-41.
- [233] Watzková, J., Křížová, L., Pavlík, A., Schulzová, V., Hajšlová, J., Lojza, J. (2010) The effect of soybean-derived phytoestrogens on concentrations of plasma isoflavones, 15-keto-13,14-dihydroprostaglandin F2 α and progesterone in dairy cows. *Acta Veterinaria Brno*. 79, 525-532.
- [234] Goff, A.K. (2004) Steroid hormone modulation of prostaglandin secretion in the ruminant endometrium during the oestrous cycle. *Biology of Reproduction*. 71, 11-16.
- [235] Asselin, E., Goff, A.K., Bergeron, H., Fortier, M.A. (1996) Influence of sex steroids on the production of prostaglandins F2 α and E2 and response to oxytocin in cultured epithelial and stromal cells of the bovine endometrium. *Biology of Reproduction*. 54, 371-379.
- [236] McCracken, J.A., Custer, E.E., Lamsa, J.C. (1999) Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event, *Physiological Reviews*. 79, 263-323.
- [237] Okuda, K., Skarzynski, D.J., Miyamoto, Y. (2002) Regulation of endometrial prostaglandin F2 α synthesis during luteolysis and early pregnancy in cattle. *Domestic Animal Endocrinology*. 23, 255-264.
- [238] Woclawek-Potocka, I., Bober, A., Korzekwa, A., Okuda, K., Skarzynski, D.J. (2006b) Equol and para-ethyl-phenol stimulate prostaglandin F2 α secretion in bovine corpus luteum: intracellular mechanisms of action. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*. 79, 287-297.
- [239] Shore, L.S., Rios, C., Marcus, S., Bernstein, M., Shemesh, M. (1998) Relationship between peripheral estrogen concentrations at insemination and subsequent fetal loss in cattle. *Theriogenology*. 50, 101-107.
- [240] Kowalczyk-Zieba, I., Woclawek-Potocka, I., Piskula, M.K., Piotrowska-Tomala, K.K., Boruszewska, D., Bah, M.M., Siemieniuch, M.J., Skarzynski, D.J. (2011) Experimentally induced mastitis and metritis modulate soy bean derived isoflavone biotransformation in dairy cows. *Theriogenology*. 76, 1744-1755.
- [241] Opletal, L., Šimerda, B. (2006) Toxické látky přírodního původu (sekundární metabolity rostlin a hub) v surovinách pro výrobu krmiv a možnost jejich stanovení. *Vědecký výbor výživy zvířat*. Praha, červen 2006.
- [242] Dewhurst, R.J., Fisher, W.J., Tweed, J.K.S., Wilkins, R.J. (2003) Comparison of grass and legume silages for milk production. 1. Production responses with different levels of concentrate. *Journal of Dairy Science*. 86, 2598-2611.
- [243] Vanhatalo, A., Gäddnäs, T., Heikkilä, T. (2006) Microbial protein synthesis, digestion and lactation responses of cows to grass or grass-red clover silage diet supplemented with barley or oats. *Agricultural and Food Science*. 15, 252-267.
- [244] Vanhatalo, A., Kuoppala, K., Toivonen, V., Shingfield, K.J. (2007) Effects of forage species and stage of maturity on bovine milk fatty acid composition. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 109, 856-867.
- [245] Liu, D.Y., He, S.J., Jin, E.H., Tang, Y.G., Li, S.H., Zhong, L.T. (2013) Effect of daidzein on production performance and serum antioxidative function in late lactation cows under heat stress. *Livestock Science*. 152, 16-20.
- [246] Moorby, J.M., Fraser, M.D., Theobald, V.J., Wood, J.D., Haresign, W. (2004) The effect of red clover formononetin on live-weight gain, carcass characteristics and muscle equol content of finishing lambs. *Animal Science*. 79, 303-313.
- [247] Speijers, M.H.M., Fraser, M.D., Theobald, V.J., Haresign, W. (2005) Effects of ensiled forage legumes on performance of store finishing lambs. *Animal Feed Science and Technology*. 120, 203-216.
- [248] Liu, H.Y., Zhang, C.Q. (2008) Effects of daidzein on messenger ribonucleic acid expression of gonadotropin receptors in chicken ovarian follicles. *Poultry Science*. 87, 541-545.
- [249] Liu, Z., Jiang, Z., Zhou, K., Li, P., Liu, G., Zhang, B. (2007) Screening of bifidobacteria with acquired tolerance to human gastrointestinal tract. *Anaerobe*. 13, 215-219.
- [250] Guo-zhen, J., Li, W. (2014) Effect of daidzein on ileum microflora biodiversity in Hy-Line variety brown layers. *Journal of Northeast Agricultural University (English Edition)*. 21, 31-36.
- [251] Etxeberria, U., Fernández-Quintela, A., Milagro, F.I., Aguirre, L., Martínez, J.A., Portillo, M.P. (2013) Impact of polyphenols and polyphenol-rich dietary sources on gut microbiota composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61, 9517-9533.
- [252] Jackson, R.L., Greiwe, J.S., Schwen, R.J. (2011) Emerging evidence of the health benefits of S-equol, an estrogen receptor agonist. *Nutrition Reviews*. 69, 432-448.
- [253] Walsh, K.R., Failla, M.L. (2009) Transport and metabolism of equol by Caco-2 human intestinal cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57, 8297-8302.
- [254] Yee, S., Burdock, G.A., Kurata, Y., Enomoto, Y., Narumi, K., Hamada, S., Itoh, T., Shimomura, Y., Ueno, T. (2008) Acute and subchronic toxicity and genotoxicity of SE5-OH, an equol-rich product produced by *Lactococcus garvieae*. *Food and Chemical Toxicology*. 46, 2713-2720.
- [255] Setchell, K.D.R., Zhao, X., Shoaf, S.E., Ragland, K. (2009) The pharmacokinetics of S(-) equol administered as SE5-OH tablets to healthy postmenopausal women. *Journal of Nutrition*. 139, 2037-2043.
- [256] Onoda, A., Ueno, T., Uchiyama, S., Hayashi, S.I., Kato, K., Wake, N. (2011) Effects of S-equol and natural S-equol supplement (SE5-OH) on the growth of MCF-7 in vitro and as tumors implanted into ovariectomized athymic mice. *Food and Chemical Toxicology*. 49, 2279-2284.
- [257] Tsen, S.Y., Siew, J., Lau, E.K.L., Roslee, F.A.B., Chan, H.M., Loke, W.M. (2014) Cow's milk as a dietary source of equol and phenolic antioxidants: differential distribution in the milk aqueous and lipid fractions. *Dairy Science and Technology*. 94, 625-632.

- [258] Kuhnle, G.G.C., Delcaqualla, C., Aspinall, S.M., Runswick, S.A., Mulligan, A.A., Bingham, S.A. (2008) Phytoestrogen content of foods of animal origin: dairy products, eggs, meat, fish, and seafood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56, 10099-10104.
- [259] Uzzan, M., Nechrebeki, J., Labuza, T.P. (2007) Thermal and storage stability of nutraceuticals in a milk beverage dietary supplement. *Journal of Food Science*. 72, E109-E114.
- [260] Atanassova, N., McKinnell, C., Fisher, J., Sharpe, R.M. (2005) Neonatal treatment of rats with diethylstilbestrol (DES) induces stromal-epithelial abnormalities of the vas deferens and cauda epididymis in adulthood following delayed basal cell development. *Reproduction*. 129, 589-601.
- [261] Franke, A.A., Custer, L.J. (1996) Daidzein and genistein concentrations in human milk after soy consumption. *Clinical Chemistry*. 42, 955-964.
- [262] Balakrishnan, B., Thorstensen, E.B., Ponnampalam, A.P., Mitchell, M.D. (2010) Transplacental transfer and biotransformation of genistein in human placenta. *Placenta*. 31, 506-511.
- [263] Franke, A.A., Custer, L.J., Wang, W., Shi, C.Y. (1998) HPLC analysis of isoflavonoids and other phenolic agents from foods and from human fluids. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 217, 263-273.
- [264] Maskarinec, G., Morimoto, Y., Novotny, R., Nordt, F.J., Stanczyk, F.Z., Franke, A.A. (2005) Urinary sex steroid excretion levels during a soy intervention among young girls: a pilot study. *Nutrition and Cancer*. 52, 22-28.
- [265] Irvine, C.H., Shand, N., Fitzpatrick, M.G., Alexander, S.L. (1998) Daily intake and urinary excretion of genistein and daidzein by infants fed soy- or dairy-based infant formulas. *American Journal of Clinical Nutrition*. 68, 1462S-1465S.
- [266] Lu, L.J., Grady, J.J., Marshall, M.V., Ramanujam, V.M., Anderson, K.E. (1995) Altered time course of urinary daidzein and genistein excretion during chronic soya diet in healthy male subjects. *Nutrition and Cancer*. 24, 311-323.
- [267] Olea, N., Olea-Serrano, F., Lardelli-Claret, P., Rivas, A., Barba-Navarro, A. (1999) Inadvertent exposure to xenoestrogens in children. *Toxicology & Industrial Health*. 15, 151-158.
- [268] Degen, G., Janning, P., Diel, P., Michna, H., Bolt, H. (2002) Transplacental transfer of the phytoestrogen daidzein in DA/Han rats. *Archives of Toxicology*. 76, 123-29.
- [269] Dinsdale E.C., Chen, J., Ward, W.E. (2011) Early life exposure to isoflavones adversely affects reproductive health in first but not second generation female CD-1 mice. *Journal of Nutrition*. 141, 1996-2002.
- [270] Ball, E.R., Caniglia M.K., Wilcox, J.L., Overton, K.A., Burr, M.J., Wolfe, B.D., Sanders, B.J., Wisniewski, A.B., Wrenn, C.C. (2010) Effects of genistein in the maternal diet on reproductive development and spatial learning in male rats. *Hormones and Behavior*. 57, 313-322.
- [271] Jefferson, W.N., Patisaul, H.B., Williams, C.J. (2012) Reproductive consequences of developmental phytoestrogen exposure. *Reproduction*. 143, 247-260.
- [272] Molzberger, A.F., Vollmer, G., Hertrampf, T., Möller, F.J., Kulling, S., Diel, P. (2012) In utero and postnatal exposure to isoflavones results in a reduced responsivity of the mammary gland towards estradiol. *Molecular Nutrition & Food Research*. 56, 399-409.
- [273] Kaludjerovic J., Chen, J., Ward, W.E. (2012) Early life exposure to genistein and daidzein disrupts structural development of reproductive organs in female mice. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*. 75, 649-660.
- [274] Greathouse, K.L., Bredfeldt, T., Everitt, J.I., Lin, K., Berry, T., Kannan, K., Mittelstadt, M.L., Ho, S.M., Walker, C.L. (2012) Environmental estrogens differentially engage the histone methyltransferase EZH2 to increase risk of uterine tumorigenesis. *Molecular Cancer Research*. 10, 546-557.
- [275] Piotrowska, K., Baranowska-Bosiacka, I., Marchlewicz, M., Gutowska, I., Nociń, I., Zawiaślak, M., Chlubek, D., Wiszniewska, B. (2011) Changes in male reproductive system and mineral metabolism induced by soy isoflavones administered to rats from prenatal life until sexual maturity. *Nutrition*. 27, 372-379.
- [276] Wang, W., Zhang, W., Liu, J., Sun, Y., Li, Y., Li, H., Xiao, S., Shen, X. (2013) Metabolomic changes in follicular fluid induced by soy isoflavones administered to rats from weaning until sexual maturity. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 269, 280-289.
- [277] Fukaya, T., Funayama, Y., Muakami, T., Sugawara, J., Yajima, A. (1997) Does apoptosis contribute follicular atresia and luteal regression in human ovary? *Hormone Research*. 48 (Suppl. 3), 20-26.
- [278] Verdin, E., Hirschey, M.D., Finley, L.W., Haigis, M.C. (2010) Sirtuin regulation of mitochondria: energy production, apoptosis, and signaling. *Trends in Biochemical Sciences*. 35, 669-675.
- [279] Rajah, T.T., Peine, K.J., Du, N., Serret, C.A., Drews, N.R. (2012) Physiological concentrations of genistein and 17beta-estradiol inhibit MDA-MB-231 breast cancer cell growth by increasing BAX/BCL-2 and reducing pERK1/2. *Anticancer Research*. 32, 1181-1191.
- [280] Tang, S., Hu, J., Meng, Q., Dong, X., Wang, K., Qi, Y., Chu, C., Zhang, X., Hou, L. (2013) Daidzein induced apoptosis via down-regulation of Bcl-2/Bax and triggering of the mitochondrial pathway in BGC-823 cells. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 65, 197-202.
- [281] Wang, J., Xu, J., Wang, B., Shu, F.R., Chen, K., Mi, M.T. (2014) Equol promotes rat osteoblast proliferation and differentiation through activating estrogen receptor. *Genetics and Molecular Research*. 13, 5055-5063.
- [282] Strom, B.L., Schinnar, R., Ziegler, E.E., Barnhart, K.T., Sammel, M.D., Macones, G.A., Stallings, V.A., Drulis, J.M., Nelson, S.E., Hanson, S.A. (2001) Exposure to soy-based formula in infancy and endocrinological and reproductive outcomes in young adulthood. *Journal of the American Medical Association*. 286, 807-814.
- [283] Churella, H.R., Borschel, M.W., Thomas, M.R., Breen, M., Jacobs, J. (1994) Growth and protein status of term infants fed soy protein formulas differing in protein content. *Journal of the American College of Nutrition*. 13, 262-267.
- [284] Steichen, J.J., Tsang, R.C. (1987) Bone mineralization and growth in term infants fed soy-based or cow milk-based formula. *Journal of Pediatrics*. 110, 687-692.
- [285] Lasekan, J.B., Ostrom, K.M., Jacobs, J.R., Blatter, M.M., Ndife, L.I., Gooch 3rd, W.M., Cho, S. (1999) Growth of newborn, term infants fed soy formulas for 1 year. *Clinical pediatrics*. 38, 563-571.
- [286] Gilchrist, J.M., Moore, M.B., Andres, A., Estroff, J.A., Badger, T.M. (2010) Ultrasonographic patterns of reproductive organs in infants fed soy formula: comparisons to infants fed breast milk and milk formula. *Journal of Pediatrics*. 156, 215-220.
- [287] Raman, D.R., Williams, E.L., Layton, A.C., Burns, R.T., Easter, J.P., Daugherty, A.S., Mullen, M.D., Sayler, G.S. (2004) Estrogen content of dairy and swine wastes. *Environmental Science & Technology*. 38, 3567-3573.
- [288] Hanselman, T.A., Graetz, D.A., Wilkie, A.C., Szabo, N.J., Diaz, C.S. (2006) Determination of steroidal estrogens in flushed dairy manure wastewater by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Environmental Quality*. 35, 695-700.
- [289] Hutchins, S.R., White, M.V., Hudson, F.M., Fine, D.D. (2007) Analysis of lagoon samples from different concentrated animal feeding operations for estrogens and estrogen conjugates. *Environmental Science & Technology*. 41, 738-744.

- [290] Sarmah, A., Northcott, G., Leusch, F., Tremblay, L. (2006) A survey of endocrine disrupting chemicals (EDCs) in municipal sewage and animal waste effluents in the Waikato region of New Zealand. *Science of the Total Environment*. 355, 135-144.
- [291] Burnison, B.K., Hartmann, A., Lister, A., Servos, M.R., Ternes, T., Van Der Kraak, G. (2003) A toxicity identification evaluation approach to studying estrogenic substances in hog manure and agricultural runoff. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 22, 2243- 2250.
- [292] Dragomirescu, A., Andoni, M., Craina, M. (2015) Endocrine disrupting compounds in environment - A review. *Journal of Food, Agriculture and Environment*. 13, 117-119.
- [293] Hoerger, C.C., Wettstein, F.E., Bachmann, H.J., Hungerbuhler, K., Bucheli, T.D. (2011) Occurrence and mass balance of isoflavones on an experimental grassland field. *Environmental Science and Technology*. 45, 6752-6760.
- [294] Hoerger, C.C., Wettstein, F.E., Hungerbuhler, K., Bucheli, T.D. (2009) Occurrence and origin of estrogenic isoflavones in Swiss river waters. *Environmental Science and Technology*. 43, 6151-6157.
- [295] Kuster, M., Azevedo, D.A., López de Alda, M.J., Aquino Neto, F.R., Barceló, D. (2009) Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental waters from Rio de Janeiro (Brazil). *Environment International*. 35, 997-1003.

3. Přílohy (plné znění publikovaných prací)