

**AKADEMIA MEDYCZNA W GDAŃSKU**

**Dominik Rachoń**

**WPLYW EQUOLU NA WYBRANE NARZĄDY  
DOCELOWEGO DZIAŁANIA ESTROGENÓW  
NA SZCZURZYM MODELU MENOPAUZY  
WYWOŁANEJ OBUSTRONNĄ OWARIEKTOMIĄ.  
CZY STOSOWANIE EQUOLU MOŻE ZASTĄPIĆ  
SUBSTYTUCYJNE LECZENIE ESTROGENAMI  
Kobiet po menopauzie?**

**Rozprawa habilitacyjna**

Gdańsk 2007

Wydano za zgodą  
Senackiej Komisji Wydawnictw Akademii Medycznej w Gdańsku

© Copyright by Medical University of Gdańsk

Wydawca: *Akademia Medyczna w Gdańsku*  
Druk: *Dział Wydawnictw AMG*  
*ul. Marii Skłodowskiej-Curie 3a,*  
*Zlecenie KW/337/07*

# SPIS TREŚCI

<b>SPIS PUBLIKACJI.....</b>	<b>5</b>
<b>WPROWADZENIE .....</b>	<b>7</b>
MENOPAUAZA I LECZENIE SUBSTYTUCYJNE ESTROGENAMI.....	7
EQUOL – METABOLIT IZOFLAWONÓW WYKAZUJĄCY DZIAŁANIE ESTROGENNE.....	8
<b>CEL PRACY.....</b>	<b>11</b>
<b>WYNIKI.....</b>	<b>12</b>
1. WPLYW PODAWANIA EQUOLU NA PRZYSADKĘ OVX SAMIC SZCZURÓW .....	12
2. WPLYW PODAWANIA EQUOLU NA MACICĘ OVX SAMIC SZCZURÓW .....	12
3. WPLYW PODAWANIA EQUOLU NA WZROST MASY CIAŁA, AKUMULACJĘ ŚRÓDBRZUSZNEJ TKANKI TŁUSZCZOWEJ, POZIOMY LIPIDÓW ORAZ TOLERANCJĘ GLUKOZY U OVX SAMIC SZCZURÓW .....	13
4. WPLYW PODAWANIA EQUOLU NA UTRATĘ GĘSTOŚCI MASY KOSTNEJ U OVX SAMIC SZCZURÓW .....	14
5. WPLYW PODAWANIA EQUOLU NA TKANKĘ GRUCZOŁU PIERSIOWEGO U OVX SAMIC SZCZURÓW .....	14
<b>PODSUMOWANIE .....</b>	<b>16</b>
<b>WNIOSKI .....</b>	<b>17</b>
<b>LITERATURA .....</b>	<b>18</b>

## Lista skrótów stosowanych w pracy

- BMD – (*bone mass density*) gęstość masy kostnej
- C3 – składowa C3 dopełniacza
- ChNS – choroba niedokrwienna serca
- E2 – 17 $\beta$ -estradiol
- E2B – benzoestan estradiolu
- ER $\alpha$  – receptor estrogenowy alfa
- ER $\beta$  – receptor estrogenowy beta
- IGF-1 – (*insulin like growth factor-1*) insulinopodobny czynnik wzrostu-1
- LH – hormon luteinizujący
- mRNA – (*messenger ribonucleic acid*) matrycowe RNA
- OVX – obustronna owariektomia
- PCNA – (*proliferating cell nuclear antigen*) antygen jądrowy komórek proliferujących
- PR – receptor progesteronowy
- PRL – prolaktyna
- TERP-1 – (*truncated oestrogen receptor product-1*) skrócony produkt genu receptora estrogenowego-1

## SPIS PUBLIKACJI

Podstawę niniejszej rozprawy habilitacyjnej stanowi pięć niżej wymienionych publikacji, prezentujących wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań dotyczących oceny wpływu podawania equolu na wybrane narządy docelowego działania estrogenów na szczurzym modelu menopauzy wywołanej owariektomią (OVX).

1. Dominik Rachoń, Tina Vortherms, Dana Seidlová-Wuttke, Wolfgang Wuttke. Effects of dietary equol on the pituitary of the ovariectomized rats. *Hormone and Metabolic Research* 2007; 39: 256-61. **IF 2006: 1.997**
2. Dominik Rachoń, Tina Vortherms, Dana Seidlová-Wuttke, Anne Menche, Wolfgang Wuttke. Uterotropic effects of long term dietary equol administration in ovariectomized Sprague-Dawley rats. *Climacteric* 2007; 10: 416-26. **IF 2006: 2.163**
3. Dominik Rachoń, Tina Vortherms, Dana Seidlová-Wuttke, Wolfgang Wuttke. Effects of dietary equol on body weight gain, intraabdominal fat accumulation, plasma lipids and glucose tolerance in ovariectomized Sprague-Dawley rats. *Menopause* 2007; 14: 925-32. **IF 2006: 3.170**
4. Dominik Rachoń, Dana Seidlová-Wuttke, Tina Vortherms, Wolfgang Wuttke. Effects of dietary equol on ovariectomy induced bone loss in Sprague-Dawley rats. *Maturitas* 2007; 58: 308-15. **IF 2006: 1.947**
5. Dominik Rachoń, Anne Menche, Tina Vortherms, Dana Seidlová-Wuttke, Wolfgang Wuttke. Effects of dietary equol administration on the mammary gland of ovariectomized Sprague-Dawley rats. *Menopause* 2008; 15: 1-6. **IF 2006: 3.170**

**Suma IF 2006: 12.447**



## WPROWADZENIE

### *Menopauza i leczenie substytucyjne estrogenami*

Menopauza to ostatnie w życiu kobiety, fizjologiczne krwawienie miesięczkowe spowodowane wygaśnięciem czynności gonady żeńskiej (Greendale et al. 1999). Obecnie dzięki ogromnemu postępowi, jaki dokonał się w farmakologii i opiece zdrowotnej, jedna trzecia życia kobiet w krajach uprzemysłowionych przypada po menopauzie (Rozenberg et al. 2000). Niestety wraz z utratą płodności, u kobiet po menopauzie dochodzi także do znacznej hipoestrogenemii, co w konsekwencji prowadzi do szeregu zaburzeń, które negatywnie wpływają na zdrowie i jakość życia.

Obecnie wiadomo, iż estrogeny oddziałują nie tylko na kobiecy układ rozrodczy, ale także na szereg innych tkanek i narządów. Dlatego też niedobór estrogenów po menopauzie nie tylko odpowiedzialny jest za zaniki w obrębie układu moczowo-płciowego i spadek libido (Dennerstein et al. 2003), lecz także za wystąpienie objawów naczyniowo-ruchowych („uderzenia gorąca”, „wary”), bezsenność, zmienność nastrojów oraz depresję (Ratka 2005; Utian 2005). Przedłużająca się hipoestrogenemia prowadzi do utraty masy kostnej (Seeman 2003) oraz szeregu zaburzeń metabolicznych sprzyjających rozwojowi choroby niedokrwiennej serca (ChNS) (Spencer et al. 1997), która obecnie jest główną przyczyną zgonów wśród kobiet po menopauzie (Alexander et al. 2006). W celu łagodzenia wczesnych objawów menopauzy, już w latach czterdziestych zeszłego stulecia rozpoczęto leczenie preparatami zawierającymi estrogeny. Poza ustępowaniem objawów naczyniowo-ruchowych, wśród kobiet stosujących estrogeny obserwowano także zmniejszenie utraty masy kostnej oraz częstości zachorowania na ChNS (Palacios 1999). W połowie lat dziewięćdziesiątych w Stanach Zjednoczonych już 37% kobiet w wieku pomenopauzalnym stosowało preparaty zawierające estrogeny (Keating et al. 1999). Wyniki badań przeprowadzonych w 2002 roku wykazały, że odsetek ten w Polsce wynosił zaledwie 16% (Rachoń et al. 2004).

Po roku 2002 częstość stosowania substytucyjnej terapii estrogenami u kobiet dramatycznie zmniejszyła się wraz z opublikowaniem wyników pierwszego wielkiego randomizowanego badania prospektywnego (Women's Health Initiative – WHI) dotyczącego wpływu stosowania estrogenów na zdrowie kobiet po menopauzie. Wstępne rezultaty tego badania podważyły konkluzje wcześniejszych badań obserwacyjnych, wskazujących na ochronne działanie estrogenów na układ sercowo-naczyniowy. Podtrzymały one natomiast wcześniejsze doniesienia o wyższym ryzyku występowania powikłań zatorowo-zakrzepowych oraz raka sutka u

kobiet stosujących estrogeny w połączeniu z progestagenem (Rossouw et al. 2002). Obawa przed stosowaniem estrogenów została dodatkowo spotęgowana opublikowaniem wyników badania „One Million Women Study”, które także wskazało na zwiększone ryzyko zachorowalności na raka sutka wśród kobiet stosujących estrogeny (Beral 2003). Oba badania odbiły się szerokim echem w mediach, co spowodowało znaczny spadek zaufania do leczenia estrogenami, zarówno ze strony pacjentek jak i ich lekarzy. Po opublikowaniu wyników badania WHI w 2002 roku, w Stanach Zjednoczonych roczna ilość recept na preparaty zawierające estrogeny spadła z 91 milionów w roku 2001 do 57 milionów w roku 2003 (Hersh et al. 2004).

W kolejnych dekadach, w wyniku stałego wydłużania się długości życia, ilość kobiet po menopauzie dramatycznie się zwiększy. Dlatego też, poszukiwanie metod terapii alternatywnych do leczenia estrogenami, łagodzących objawy i następstwa hypoestrogenemii pomenopauzalnej jest głównym problemem zdrowia kobiet oraz wielkim wyzwaniem współczesnej medycyny.

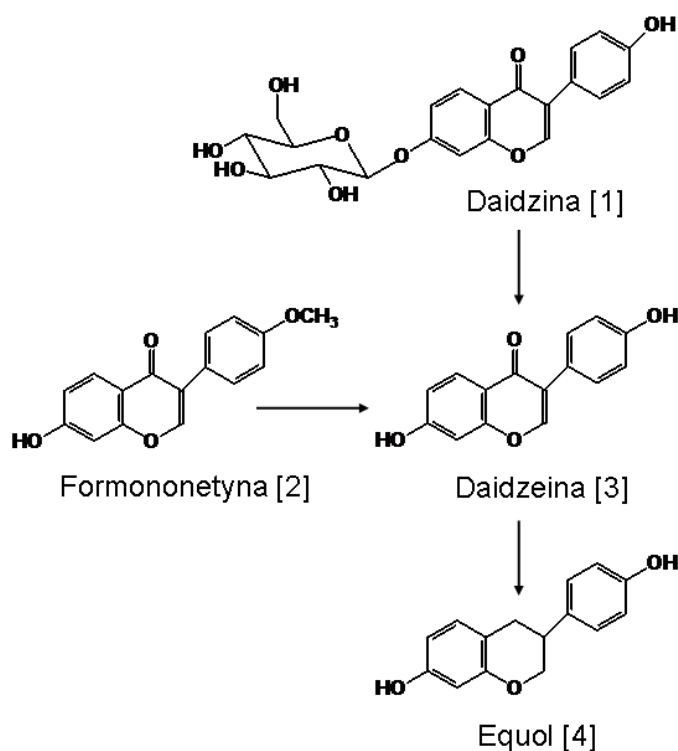
### ***Equol – metabolit izoflawonów wykazujący działanie estrogenne***

Od niedawna obserwuje się znaczny wzrost zainteresowania rolą fitoestrogenów w prewencji wczesnych i późnych następstw menopauzy oraz jako alternatywy dla substytucyjnego leczenia estrogenami kobiet po menopauzie (Phipps et al. 2002; Rachoń 2005a; Rachoń 2005b; Wuttke et al. 2002). Fitoestrogenami nazywamy liczną grupę polifenolowych, niesteroidowych substancji pochodzenia roślinnego, strukturalnie przypominających  $17\beta$ -estradiol (E2). Dzięki temu strukturalnemu podobieństwu, substancje te mają zdolność wchodzenia w interakcję z receptorami estrogenowymi ( $ER\alpha$  oraz  $ER\beta$ ) i wywierania działania agonistycznego bądź antagonistycznego w stosunku do tych receptorów poprzez ER-zależne szlaki sygnalizacyjne (Kuiper et al. 1998; Miksicek 1994).

Equol [7-hydroksy-3-(4'-hydroksyfenyl)-chroman] został po raz pierwszy odkryty w 1932 roku jako heterocykliczny fenol obecny w moczu ciężarnych klaczy (Marrian et al. 1932). Później okazało się, iż equol jest metabolitem formononetyny oraz biochaniny A – izoflawonów obecnych w czerwonej koniczynie (*Trifolium pratense*) oraz daidzeiny obecnej w ziarnach soi (*Glycine max*). Ze względu na fakt odkrycia go po raz pierwszy w moczu koni zdecydowano się na pozostawienie nazwy equol (*equus* – łac. koń). Wkrótce okazało się także, iż to właśnie equol odpowiedzialny jest za występowanie niepłodności wśród owiec wypasanych na polach koniczyny *Trifolium* („clover disease”) w zachodniej Australii (Bennetts et al. 1946).



U ludzi, głównym źródłem equolu są produkty sojowe oraz preparaty zawierające wyciągi z koniczyny, obecnie bardzo popularne jako suplementy dla kobiet po menopauzie, które zawierają odpowiednio jego prekursory: daidzinę oraz formononetynę (Setchell et al. 2001). Suplementy zawierające ekstrakty z korzenia kudzu (*Radix puerariae*) także stanowią bogate źródło daidziny oraz jego metoksyłowanego analogu puerararyny (Rong et al. 1998; Setchell et al. 2001). Equol zatem nie jest fitoestrogenem, ponieważ nie występuje jako naturalny składnik roślin (Setchell et al. 2002). Daidzina [1] po spożyciu, przy udziale  $\beta$ -glukozydaz bakteryjnych i jelitowych ulega hydrolizie do daidzeiny [3], która następnie metabolizowana jest do equolu [4] przez florę bakteryjną obecną w jelicie grubym (Day et al. 1998). Formononetyna [2] obecna w suplementach stosowanych przez kobiety po menopauzie celem łagodzenia objawów wypadowych, ulega najpierw demetylacji do daidzeiny [3] a następnie przemianie do equolu [4] (ryc. 1).



Ryc. 1 Szlaki syntezy equolu z daidziny obecnej w soi (*Glycine max*) oraz formononetyny obecnej w czerwonej koniczynie (*Trifolium pratense*).

Equol zdaje się nie podlegać dalszym przemianom metabolicznym w organizmie (Axelson et al. 1984). Okazuje się jednak, iż około 30-50% dorosłych nie posiada odpowiedniej flory jelitowej wytwarzającej equol z jego prekursorów („*equol non-producers*”) (Rowland et al. 2000; Setchell et al. 2002). Dopiero niedawno udało się wyizolować z próbki kału ludzkiego bakterie zdolne do przemiany daidzeiny w equol. Zidentyfikowano je jako *Enterococcus faecium* szczep EPI1, *Lactobacillus mucosae* szczep EPI2 oraz *Finegoldia magna* szczep EPI3 (Decroos et al. 2005). W przeciwieństwie do swoich prekursorów, z powodu braku podwójnego wiązania w obrębie pierścienia heterocyklicznego, equol jest cząsteczką chiralną. U ludzi produkowany jest S-equol, który zdaje się mieć większe powinowactwo do receptora ER $\beta$  w porównaniu do enancjomeru R (ER $\beta$ /ER $\alpha$ =13). Nie zaobserwowano jednak istotnej różnicy w zdolności aktywowania transkrypcji pomiędzy dwoma podtypami receptorów (ER $\beta$ /ER $\alpha$ =1.3) (Muthyala et al. 2004). Jako polifenol, equol może także być donorem atomu wodoru jak również donorem pojedynczego elektronu i dzięki tym właściwościom należy do tzw. zmiataaczy rodników. (Arora et al. 1998; Mitchell et al. 1998).

Kliniczna efektywność suplementów zawierających soję, bądź wyciąg z koniczyny, obecnie szeroko reklamowanych jako leczenie alternatywne dla estrogenoterapii u kobiet po menopauzie, zależy od zdolności przemiany w nich zawartych fitoestrogenów do aktywnego metabolitu - equolu, którego działanie estrogenne zdaje się być znacznie silniejsze od jego prekursorów (Morito et al. 2001; Setchell et al. 2002). Pojawiają się więc dwa istotne pytania: Dlaczego nie stosować suplementów zawierających czysty equol? Czy stosowanie equolu rzeczywiście mogłoby chronić przed następstwami menopauzy i być jednocześnie pozbawione działań niepożądanych przypisywanych estrogenom?

Celem odpowiedzi na powyższe pytania, w niniejszej pracy dokonałem oceny wpływu podawania equolu na wybrane narządy docelowego działania estrogenów, na szczurzym modelu menopauzy, wywołanej zabiegiem obustronnej owariektomii (OVX).

## **CEL PRACY**

Celem pracy było zbadanie czy stosowanie equolu mogłoby zastąpić substytucyjne leczenie estrogenami kobiet po menopauzie. Przedmiotem moich badań stały się więc następujące zagadnienia:

1. Jakie działanie wywiera podawanie equolu na przysadkę OVX samic szczurów?
2. Czy podawanie equolu wywiera działanie uterotropowe u OVX samic szczurów?
3. Jaki jest wpływ podawania equolu na wybrane cechy zespołu metabolicznego, które predysponują do rozwoju ChNS? Przeprowadzenie oceny działania equolu na przyrost masy ciała, akumulację śródbrzuszej tkanki tłuszczowej, osoczowe poziomy lipidów i tolerancję glukozy u OVX samic szczurów.
4. Czy podawanie equolu chroni przed utratą masy kostnej wywołanej obustronną OVX u samic szczurów?
5. Czy podawanie equolu wywiera działanie mammotropowe u OVX samic szczurów?

## WYNIKI

### **1. Wpływ podawania equolu na przysadkę OVX samic szczurów**

(Rachoń D et al., *Hormone and Metabolic Research* 2007; 39: 256-61.)

Przysadka jest jednym z ważnych narządów docelowego działania estrogenów. Estrogeny, poprzez oddziaływanie na komórki laktotropowe i gonadotropowe przysadki pobudzają odpowiednio: produkcję prolaktyny (PRL) oraz regulują wydzielanie gonadotropin przysadkowych. Wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań dowodzą, iż OVX samice szczurów rasy Sprague-Dawley, które przez trzy miesiące otrzymywały karmę z dodatkiem equolu w dawce 400 mg/kg miały znamienne wyższe surowicze poziomy PRL w porównaniu do grupy kontrolnej. Niespodziewanie, także surowicze poziomy hormonu luteinizującego (LH) w tej grupie zwierząt były znamienne wyższe w porównaniu do kontroli. W grupie zwierząt otrzymującej benzoesan estradiolu (E2B), surowicze poziomy PRL były także wyższe w porównaniu do zwierząt kontrolnych, natomiast surowicze poziomy LH znamienne niższe. Podawanie equolu nie miało żadnego wpływu na przysadkową ekspresję genów kodujących receptory estrogenowe (ER $\alpha$  oraz ER $\beta$ ). U zwierząt otrzymujących E2B, przysadkowe poziomy mRNA dla ER $\alpha$  były znamienne wyższe od kontroli, a dla ER $\beta$  znamienne niższe. Podawanie E2B także znamienne zwiększyło przysadkową ekspresję genu kodującego skrócony produkt genu receptora estrogenowego-1 (TERP-1). Efekt ten obserwowany był także w grupie otrzymującej equol ale w znacznie mniejszym stopniu. Podsumowując, podawanie equolu w dużych dawkach OVX samicom szczura zdaje się wywierać działanie estrogenopodobne w stosunku do komórek laktotropowych oraz anti-estrogenne w stosunku do komórek gonadotropowych.

### **2. Wpływ podawania equolu na macicę OVX samic szczurów**

(Rachoń D et al., *Climacteric* 2007; 10: 416-26.)

Macica jest jednym z głównych narządów docelowego działania estrogenów i podawanie equolu OVX samicom szczurów wywiera wyraźne działanie uterotropowe. Wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań dowodzą, iż macice OVX samic szczurów otrzymujących equol w dawce 400 mg/kg karmy w porównaniu do zwierząt z grupy kontrolnej, mają znamienne większą masę i histologiczne cechy stymulacji estrogenowej. Barwienie preparatów histologicznych na obecność antygenu jądrowego komórek proliferujących (*proliferating cell nuclear antigen* – PCNA) wykazało także większy odsetek PCNA-dodatnich komórek zrębu macicy wśród zwierząt otrzymujących equol w dużej dawce. Odsetek komórek PCNA-

dotadnich w komórkach nabłonkowych macicy był natomiast w tej grupie mniejszy w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Podawanie equolu w dużych dawkach także znamienne zwiększa maciczną ekspresję genu kodującego insulinopodobny czynnik wzrostu-1 (IGF-1), receptor progesteronowy (PR) oraz składową C3 dopełniacza, które są molekularnymi markerami stymulacji estrogenowej w obrębie tkanek macicy. Jakkolwiek znamienne statystycznie, wszystkie obserwowane powyżej działania były znacznie mniej nasilone w porównaniu do działań obserwowanych u zwierząt otrzymujących E2B. Podsumowując, długotrwałe podawanie equolu w dużych dawkach OVX samicom szczurów ma wyraźne działanie uterotropowe zarówno na poziomie komórkowym jak i molekularnym.

### ***3. Wpływ podawania equolu na wzrost masy ciała, akumulację śródbrzuszej tkanki tłuszczowej, poziomy lipidów oraz tolerancję glukozy u OVX samic szczurów***

(Rachoń D et al., *Menopause* 2007; 14: 925-32.)

Wygaśnięcie czynności hormonalnej jajników u kobiet po menopauzie prowadzi do wzrostu masy ciała wraz ze zwiększonym odkładaniem się tkanki tłuszczowej w okolicy okołotrzewnowej, co w konsekwencji prowadzi do szeregu zaburzeń metabolicznych określanych mianem zespołu metabolicznego, którego obecność predysponuje do zachorowania na ChNS. Substytucyjna terapia estrogenami u kobiet po menopauzie zdaje się natomiast zapobiegać wystąpieniu tych zaburzeń. W przeprowadzonych przeze mnie badaniach na szczurzym modelu menopauzy, stosowanie equolu, podobnie do E2B, zmniejszało wzrost masy ciała oraz odkładanie się śródbrzuszej tkanki tłuszczowej. Efektowi temu towarzyszyło także obniżenie się osoczowych poziomów leptyny. Zwierzęta otrzymujące karmę z dodatkiem equolu charakteryzowały się również mniejszymi poziomami całkowitego cholesterolu oraz trójglicerydów w osoczu w porównaniu do grupy kontrolnej. Podawanie E2B także zmniejszało osoczowe poziomy cholesterolu całkowitego ale również lipoprotein o wysokiej i niskiej gęstości (HDL- oraz LDL-cholesterolu). W porównaniu do zwierząt kontrolnych, zwierzęta otrzymujące E2B lub equol miały także mniejsze pole pod krzywą w teście tolerancji glukozy. Podsumowując, podawanie equolu OVX samicom szczurów zapobiega wzrostowi masy ciała i gromadzeniu się śródbrzuszej tkanki tłuszczowej oraz wykazuje korzystne działania metaboliczne.

#### **4. Wpływ podawania equolu na utratę gęstości masy kostnej u OVX samic szczurów**

(Rachoń D et al., *Maturitas* 2007; 58: 308-15)

Estrogeny silnie oddziałują na metabolizm tkanki kostnej i ich niedobór po menopauzie powoduje utratę masy kostnej, co w konsekwencji prowadzi do zwiększonej jej podatności na złamanie (osteoporozy). W przeprowadzonych przeze mnie badaniach podawanie equolu OVX samicom szczurów przez okres sześciu tygodni nie hamowało utraty masy kostnej w proksymalnym odcinku kości piszczelowej. Działanie takie obserwowano natomiast wśród zwierząt otrzymujących E2B. W obrębie kręgów lędźwiowych kręgosłupa zaobserwowano natomiast wzrost beleczkowej masy kostnej zarówno wśród zwierząt otrzymujących equol jak i E2B. Osoczowe poziomy osteokalcyny i produktów degradacji kolagenu typu I (markerów metabolizmu kostnego) nie różniły się w porównaniu do grupy kontrolnej, podczas gdy w grupie zwierząt otrzymujących E2B były one znamienne niższe. Podsumowując, podawanie equolu samicom szczurów ma słabe i ograniczone działanie chroniące przed utratą masy kostnej wywołanej OVX.

#### **5. Wpływ podawania equolu na tkankę gruczołu piersiowego u OVX samic szczurów**

(Rachoń D et al., *Menopause* 2008; 15: 1-6)

Gruczoł piersiowy jest jednym z głównych narządów docelowego działania estrogenów. Dlatego też, jeśli stosowanie equolu miałyby zastąpić substytucyjne leczenie estrogenami, nieodzowna jest ocena wpływu tej substancji na gruczoł piersiowy. Wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań wskazują, iż stosowanie equolu u OVX samic szczurów przez trzy miesiące wywiera wyraźne działanie mammotropowe. Analiza histologiczna gruczołów piersiowych pobranych od zwierząt otrzymujących equol wykazała znamienne większą ilość struktur tworzących tkankę gruczołu (przewodników końcowych oraz płacików typu II) w porównaniu do grupy kontrolnej. U zwierząt otrzymujących E2B, oprócz większej liczby przewodników końcowych oraz płacików typu II, znamienne większa była także liczba płacików typu I. Immunohistochemiczna analiza preparatów na obecność markera proliferacji PCNA wykazała także, iż w porównaniu do zwierząt kontrolnych, samice szczurów otrzymujące equol w dużych dawkach miały większy odsetek PCNA-dodatnich komórek w obrębie przewodników końcowych i płacików typu II. Immunohistochemiczna analiza preparatów na obecność receptora progesteronowego (PR) wykazała znamienne większy odsetek komórek PR-dodatnich jedynie w obrębie płacików typu II. Wśród zwierząt otrzymujących E2B w małej

i dużej dawce, odsetek komórek PCNA lub PR dodatnich był znamienne wyższy we wszystkich strukturach sutka. Ponadto, u zwierząt otrzymujących equol w dużych dawkach (400mg/kg karmy), surowicze poziomy PRL były znamienne większe w porównaniu do kontroli. Podsumowując, podawanie equolu OVX samicom szczurów wywiera wyraźne działanie mammotropowe.

## PODSUMOWANIE

Wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań wskazują, iż equol podawany w stosunkowo dużych dawkach OVX samicom szczurów, w zależności od rodzaju tkanki docelowej, wywiera mniejsze lub większe działanie estrogenne. Jednakże w przeciwieństwie do E2, equol nie hamuje zwiększonego w przebiegu hypoestrogenemii wydzielania LH oraz ma ograniczone działanie ochronne w stosunku do tkanki kostnej. Ocena zdolności hamowania nadmiernej sekrecji LH przez daną substancję na szczurzym modelu menopauzy wywołanej OVX stosowana jest jako pośrednia ocena zdolności danej substancji do łagodzenia objawów wypadowych u kobiet po menopauzie (Rachoń et al. 2007; Seidlová-Wuttke et al. 2003). W związku z tym można przypuszczać, iż stosowanie equolu u kobiet z objawami wypadowymi nie przyniesie pożądanych efektów terapeutycznych. Equol podobnie do E2 wywiera korzystne działanie metaboliczne lecz nie pozbawiony jest działania uterotropowego i mammotropowego.

Podsumowując, stosowanie equolu zdaje się nie być odpowiednią terapią alternatywną dla substytucyjnego leczenia estrogenami kobiet po menopauzie. Dodatkowo, ze względu na fakt, iż equol wywiera wyraźne działanie uterotropowe i mammotropowe, bezpieczeństwo nieograniczonego i niekontrolowanego stosowania suplementów zawierających daidzeinę i formononetynę przez kobiety po menopauzie stoi pod dużym znakiem zapytania.



## WNIOSKI

Na podstawie wyników uzyskanych z przeprowadzonych przeze mnie badań, jest mało prawdopodobne aby stosowanie equolu stało się terapią alternatywną dla substytucyjnego leczenia estrogenami kobiet po menopauzie z powodu następujących faktów:

1. Podawanie equolu OVX samicom szczurów, wywiera estrogenopodobne działanie w stosunku do komórek laktotropowych oraz anty-estrogenne w stosunku do komórek gonadotropowych przysadki.
2. Podawanie equolu OVX samicom szczurów wywiera wyraźne działanie uterotropowe zarówno na poziomie komórkowym jak i molekularnym.
3. Podawanie equolu OVX samicom szczurów, hamuje wzrost masy ciała, akumulację śródbrzuszej tkanki tłuszczowej, oraz wywiera korzystne działanie na poziom lipidów oraz tolerancję glukozy. Działanie to nie wykazuje jednak wyraźnej przewagi w stosunku do  $17\beta$ -estradiolu.
4. Podawanie equolu samicom szczurów ma słabe i ograniczone działanie chroniące przed utratą masy kostnej wywołanej OVX.
5. Podawanie equolu OVX samicom szczurów wywiera wyraźne działanie mammotropowe.

## LITERATURA

- Alexander J, Clearfield M. Cardiovascular disease after menopause: a growing epidemic. *Minerva Ginecol* 2006; 58 (1):35-40.
- Arora A, Nair MG, Strasburg GM. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radic Biol Med* 1998; 24 (9):1355-63.
- Axelsson M, Sjøvall J, Gustafsson BE, Setchell KD. Soya--a dietary source of the non-steroidal oestrogen equol in man and animals. *J Endocrinol* 1984; 102 (1):49-56.
- Bennetts HW, Underwood EJ, Shier FL. A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. *Aust J Agric Res* 1946; 22:131-8.
- Beral V. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 2003; 362 (9382):419-27.
- Day AJ, DuPont MS, Ridley S, Rhodes M, Rhodes MJ, Morgan MR, Williamson G. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FEBS Lett* 1998; 436 (1):71-5.
- Decroos K, Vanhemmens S, Cattoir S, Boon N, Verstraete W. Isolation and characterisation of an equol-producing mixed microbial culture from a human faecal sample and its activity under gastrointestinal conditions. *Arch Microbiol* 2005; 183 (1):45-55.
- Dennerstein L, Alexander JL, Kotz K. The menopause and sexual functioning: a review of the population-based studies. *Annu Rev Sex Res* 2003; 14:64-82.
- Greendale GA, Lee NP, Arriola ER. The menopause. *Lancet* 1999; 353 (9152):571-80.
- Hersh AL, Stefanick ML, Stafford RS. National use of postmenopausal hormone therapy: annual trends and response to recent evidence. *JAMA* 2004; 291 (1):47-53.
- Keating NL, Cleary PD, Rossi AS, Zaslavsky AM, Ayanian JZ. Use of hormone replacement therapy by postmenopausal women in the United States. *Ann Intern Med* 1999; 130 (7):545-53.

- Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 1998; 139 (10):4252-63.
- Marrian GF, Haslewood GA. Equol, a new inactive phenol isolated from the ketohydroxyoestrin fraction of mares' urine. *Biochem J* 1932; 26 (4):1227-32.
- Miksicek RJ. Interaction of naturally occurring nonsteroidal estrogens with expressed recombinant human estrogen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1994; 49 (2-3):153-60.
- Mitchell JH, Gardner PT, McPhail DB, Morrice PC, Collins AR, Duthie GG. Antioxidant efficacy of phytoestrogens in chemical and biological model systems. *Arch Biochem Biophys* 1998; 360 (1):142-8.
- Morito K, Hirose T, Kinjo J, Hirakawa T, Okawa M, Nohara T, Ogawa S, Inoue S, Muramatsu M, Masamune Y. Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta. *Biol Pharm Bull* 2001; 24 (4):351-6.
- Muthyala RS, Ju YH, Sheng S, Williams LD, Doerge DR, Katzenellenbogen BS, Helferich WG, Katzenellenbogen JA. 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 alpha and beta. *Bioorg Med Chem* 2004; 12 (6):1559-67.
- Palacios S. Current perspectives on the benefits of HRT in menopausal women. *Maturitas* 1999; 33 Suppl 1:S1-13.
- Phipps WR, Duncan AM, Kurzer MS. Isoflavones and postmenopausal women: a critical review. *Treat Endocrinol* 2002; 1 (5):293-311.
- Rachoń D, Zdrojewski T, Suchecka-Rachoń K, Szpakowski P, Bandosz P, Manikowski A, Wyrzykowski B. Knowledge and use of hormone replacement therapy among Polish women: estimates from a nationally representative study--HORTPOL 2002. *Maturitas* 2004; 47 (1):31-7.
- Rachoń D. Rola fitoterapii u kobiet w okresie okołomenopauzalnym - cz. I. *Świat Medycyny i Farmacji* 2005a; 3 (63):57-9.

- Rachoń D. Rola fitoterapii u kobiet w okresie okołomenopauzalnym - cz. II. *Świat Medycyny i Farmacji* 2005b; 4/5 (64):47-9.
- Rachoń D, Vortherms T, Seidlová-Wuttke D, Wuttke W. Dietary daidzein and puerarin do not affect pituitary LH expression but exert uterotropic effects in ovariectomized rats. *Maturitas* 2007.
- Ratka A. Menopausal hot flashes and development of cognitive impairment. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1052:11-26.
- Rong H, De Keukeleire D, De Cooman L, Baeyens WR, Van der Weken G. Narrow-bore HPLC analysis of isoflavonoid aglycones and their O- and C-glycosides from *Pueraria lobata*. *Biomed Chromatogr* 1998; 12 (3):170-1.
- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2002; 288 (3):321-33.
- Rowland IR, Wiseman H, Sanders TA, Adlercreutz H, Bowey EA. Interindividual variation in metabolism of soy isoflavones and lignans: influence of habitual diet on equol production by the gut microflora. *Nutr Cancer* 2000; 36 (1):27-32.
- Rozenberg S, Felleman C, Kroll M, Vandromme J. The menopause in Europe. *Int J Fertil Womens Med* 2000; 45 (2):182-9.
- Seeman E. Invited Review: Pathogenesis of osteoporosis. *J Appl Physiol* 2003; 95 (5):2142-51.
- Seidlová-Wuttke D, Hesse O, Jarry H, Christoffel V, Spengler B, Becker T, Wuttke W. Evidence for selective estrogen receptor modulator activity in a black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) extract: comparison with estradiol-17beta. *Eur J Endocrinol* 2003; 149 (4):351-62.
- Setchell KD, Brown NM, Desai P, Zimmer-Nechemias L, Wolfe BE, Brashear WT, Kirschner AS, Cassidy A, Heubi JE. Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *J Nutr* 2001; 131 (4 Suppl): 1362S-75S.

Setchell KD, Brown NM, Lydeking-Olsen E. The clinical importance of the metabolite equol - a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *J Nutr* 2002; 132 (12):3577-84.

Spencer CP, Godsland IF, Stevenson JC. Is there a menopausal metabolic syndrome? *Gynecol Endocrinol* 1997; 11 (5):341-55.

Utian WH. Psychosocial and socioeconomic burden of vasomotor symptoms in menopause: a comprehensive review. *Health Qual Life Outcomes* 2005; 3:47.

Wuttke W, Jarry H, Westphalen S, Christoffel V, Seidlová-Wuttke D. Phytoestrogens for hormone replacement therapy? *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002; 83 (1-5):133-47.

(35 pozycji literatury)