

# Kliničko značenje ekvola kao bioaktivnog metabolita daidzeina

---

**Cvjetićanin, Marga**

**Professional thesis / Završni specijalistički**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:629745>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-29**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Marga Cvjetićanin

**KLINIČKO ZNAČENJE EKVOLA KAO BIOAKTIVNOG  
METABOLITA DAIDZEINA**

Specijalistički rad

Zagreb, 2023.

Poslijediplomski specijalistički studij: Fitofarmacija s dijetoterapijom

Mentor rada: prof. dr. sc. Sanda Vladimir-Knežević

Specijalistički rad obranjen je dana 27. rujna 2023. godine na Zavodu za farmakognoziju

Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pred povjerenstvom u sastavu:

1. izv. prof. dr. sc. Biljana Blažeković

Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

2. prof. dr. sc. Sanda Vladimir-Knežević

Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

3. prof. dr. sc. Vladimir Trkulja

Sveučilište u Zagrebu

Medicinski fakultet

Rad sadrži 61 stranicu.

## **Predgovor**

Specijalistički rad na poslijediplomskom specijalističkom studiju „Fitofarmacija s dijetoterapijom“ je prijavljen na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu i izrađen pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Sande Vladimir-Knežević.

*Zahvaljujem svim nastavnicima studija,*

*osobito mentorici prof. dr. sc. Sandi Vladimir – Knežević na stručnom vodstvu*

*te na svesrdnoj pomoći i podršci koju mi je pružila.*

*Hvala mojoj obitelji i prijateljima na podršci.*

## **SAŽETAK**

### **Cilj istraživanja**

Danas se na tržištu Republike Hrvatske nalaze biljni pripravci za ublažavanje menopauzalnih tegoba na bazi soje i crvene djeteline. Nova znanstvena istraživanja upućuju na potrebnu podjelu populacije na proizvođače i neproizvođače ekvola jer se terapijski učinak izoflavona može očekivati u osoba koje mogu stvoriti aktivni metabolit ekvol. Stoga je cilj specijalističkog rada dati sustavni pregled istraživanja o ovoj temi i ukazati na važnost stvaranja ekvola za terapijski učinak biljnih lijekova i dodataka prehrani na bazi soje i crvene djeteline.

### **Materijal i metode**

Istraživanja u okviru ovoga specijalističkog rada teorijskog su karaktera i uključuju pregled dostupne literature o dosadašnjim suvremenim znanstvenim istraživanjima ekvola kao bioaktivnog metabolita daidzeina. U pretraživanju su se koristile dostupne elektronske bibliografske baze podataka kao što su: PubMed, ScienceDirect, Elsevier, Frontiers media, Plos one, Wolter Kluwer i dr. Upotrijebljene su tražilice Google i Google Scholar.

### **Rezultati**

U okviru ovog rada prikazani su rezultati istraživanja učinka ekvola na različita područja ljudskog zdravlja s naglaskom na menopauzalne tegobe, kardiovaskularne bolesti, osteoporozu, demenciju, PMS, karcinom dojke i prostate te starenje kože. U pregled su uključena i istraživanja o strukturi i mehanizmu djelovanja ekvola te istraživanja o crijevnim bakterijama koje su uključene u proces stvaranja ekvola iz daidzeina. Napravljen je osvrt na dodatke prehrane na bazi ekvola i na biotehnološki pristup proizvodnji funkcionalne hrane s ekvolom.

### **Zaključak**

Ekvol je aktivni metabolit izoflavona nastao isključivo djelovanjem crijevnih bakterija u osoba koji su „proizvođači ekvola“. Mehanizam djelovanja ekvola još uvijek nije do kraja razjašnjen iako je dokazano da je selektivni modulator ER $\beta$  pa ga svrstavamo u SERM. Sve je više kliničkih dokaza o djelovanju ekvola, međutim, potrebne su duže, randomizirane kliničke i opservacijske studije biološkog utjecaja S-ekvola u ljudskom organizmu. Razvijen je standardizirani prirodni dodatak prehrani koji sadrži S-(-)ekvol, a dobiva se fermentacijom otopine sojinih klica sojem bakterija Lactococcus 20-92 mliječne kiseline.

## **SUMMARY**

### **Objectives**

On the market of the Republic of Croatia there are herbal products based on soy and red clover used for the relief of menopausal symptoms. New scientific research points to the need to divide the population into equol producers and equol non-producers, since only the individuals who can produce the active metabolite equol can be expected to have the therapeutic effect of isoflavones. Therefore, the aim of this work is to provide a systematic overview of the research on this topic and to highlight the importance of equol formation for the therapeutic effect of herbal drugs and dietary supplements based on soy and red clover.

### **Material and methods**

Research in this paper is a theoretical one and includes a detailed overview of the available literature on current modern scientific research on equol as a bioactive metabolite of daidzein. Available electronic bibliographic databases such as: PubMed, ScienceDirect, Elsevier, Frontiers media, Plos one, Wolter Kluwer, etc. were used in the research. Google and Google Scholar search engines were used for the data collection

### **Results**

This paper presents the research results on the effects of equol on various areas of human health, focusing on menopausal symptoms, cardiovascular disease, osteoporosis, dementia, PMS, breast and prostate cancer and skin aging. The review also includes research on the structure and mechanism of action of equol, as well as on colonic bacteria involved in the process of forming equol from daidzein. An overview of equol-based dietary supplements and the biotechnological approach to the production of equol-containing functional foods is provided.

### **Conclusion**

Equol is an active isoflavone metabolite formed exclusively by the action of intestinal bacteria in humans that are equol producers. The effect of equol is not yet fully understood, but it has been shown to be a selective modulator of ER $\beta$  and is classified as a SERM. Clinical evidence of the effects of equol is growing, but longer randomized clinical trials and observational studies of the biological effects of S-equol in the human body are still needed. A standardized natural dietary supplement containing S-(-)equol has been developed and is obtained by fermenting a solution of soybean sprouts with a strain of *Lactococcus* 20-92 lactic acid bacteria.

# Sadržaj

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA.....	1
1.1. IZOFLAVONI.....	2
1.2. SOJA KAO PRIRODNI IZVOR IZOFLAVONA.....	5
1.3. CRVENA DJETELINA KAO PRIRODNI IZVOR IZOFLAVONA.....	8
1.4. FORMONONETIN .....	9
1.5. DAIDZEIN .....	10
1.6. EKVOL.....	11
1.6.1. Povijest istraživanja ekvola.....	11
1.6.2. Fizikalno-kemijska svojstva ekvola.....	13
1.6.3. Farmakokinetika ekvola .....	14
1.7. CRIJEVNA MIKROBIOTA U PROIZVOĐAČA EKVOLA .....	16
1.7.1. Određivanje fenotipa .....	16
1.7.2. Sinteza ekvola .....	19
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	23
3. MATERIJALI I METODE - SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI .....	24
3.1. Farmakološki učinci S-(-) ekvola .....	25
3.1.1. Antioksidacijsko djelovanje .....	25
3.1.2. Djelovanje na kardiovaskularni sustav.....	26
3.1.3. Učinak na zdravlje kostiju.....	27
3.1.4. Djelovanje na središnji živčani sustav .....	28
3.1.4.1. Demencija.....	28
3.1.4.2. Alzheimerova bolest .....	28
3.1.4.3. Epilepsija .....	29
3.1.5. Djelovanje kod predmenstrualnog sindroma.....	30
3.1.6. Djelovanje na vazomotorne simptome menopauze.....	31
3.1.7. Djelovanje na karcinom dojke .....	33
3.1.8. Djelovanje na karcinom prostate.....	35
3.1.9. Djelovanje na zdravlje kože .....	36
3.1.10. Djelovanje na pretilost .....	38
3.2. DIGITALNA TEHNOLOGIJA U ISTRAŽIVANJU S-(-)EKVOLA .....	39
3.2.1. SwissADME softver i PAMPA metoda .....	39
3.2.2. Fiziološki utemeljen farmakokinetički model (PBPK).....	40
3.2.3. Utjecaj prehrane na proizvodnju S-(-)ekvola pomoću TIM-2 .....	41
3.3. FUNKCIONALNA HRANA I DODATAK PREHRANI .....	42
3.3.1. Korištenje S-(-)ekvola u funkcionalnoj proizvodnji hrane .....	42

3.3.2. S(-)ekvol u dodacima prehrani .....	44
4. RASPRAVA.....	46
5. ZAKLJUČAK .....	49
6. LITERATURA.....	50
7. ŽIVOTOPIS .....	54

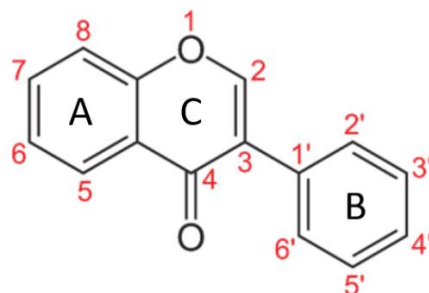


# 1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Izoflavoni su polifenolne biljne sastavnice iz skupine flavonoida. Njihovi glavni izvori su biljne vrste iz porodice Fabaceae, soja - *Glycine max* (L.) Merr. i crvena djetelina - *Trifolium pratense* (L.) (1-4). Soja je najvažnija mahunarka u prehrani s najvišom koncentracijom izoflavonoida koje povezujemo sa zdravstvenim učincima poput ublažavanja menopauzalnih tegoba, smanjenja rizika od nastanka osteoporoze, prevencije kardiovaskularnih bolesti i djelovanja mutagenih tvari (3, 4). Među izoflavonima, daidzein je najviše istražen zbog velike biološke aktivnosti njegovog glavnog metabolita ekvola. Reduktivni put daidzeina počinje stvaranjem dihidrodaidzeina (DHD) koji se metabolizira u o-desmetilangolensin (o-DMA) i visokoaktivni metabolit S-(-)ekvol, nesteroidni estrogen klase izoflavona (4, 6). Godine 1932. Marrian i Haslewood su prvi put izolirali i odredili strukturu ekvola u urinu kobile zbog čega i dobiva takav naziv (*equine* = konjsko) (5). Ekvol nije izazivao veći interes znanstvene zajednice sve do 1981. godine kada je po prvi put identificiran u humanom urinu, što je gotovo 50 godina od njegovog otkrića (5). Ustanovljeno je da ga mogu stvarati crijevne bakterije u 25-65 % odraslih osoba, a udio ovisi o zajednici i prehranbenim navikama njezinih članova (7). To je zapažanje dovelo do naziva „proizvođač ekvola“ kako bi definirali one odrasle osobe koje mogu proizvesti ekvol nakon uzimanja sojinih izoflavona i do hipoteze da bi zdravstvene dobrobiti prehrane na bazi soje mogle imati veći klinički značaj samo kod proizvođača ekvola. Zanimanje za ekvol je značajno poraslo, što dokazuje veliki porast broja znanstvenih publikacija od 1980. godine do danas (5, 7). U razdoblju od 2019. godine objavljeno je oko 200 znanstvenih radova. Nadalje, svake godine održava se međunarodni kongres o utjecaju soje na ljudsko zdravlje, a kongres u Tokiju održan 2008. godine bio je u potpunosti posvećen ekvolu (5).

## 1.1. IZOFLAVONI

Flavonoidi su polifenolne biljne sastavnice čija se struktura sastoji od dva benzenska prstena (A i B) povezana heterocikličkim piron (C) prstenom. Za razliku od ostalih flavonoida kod kojih je benzenski prsten B vezan na poziciji C-2 u prstenu C, u strukturi izoflavonoida benzenski prsten B je na poziciji C-3 (slika 1) (1).

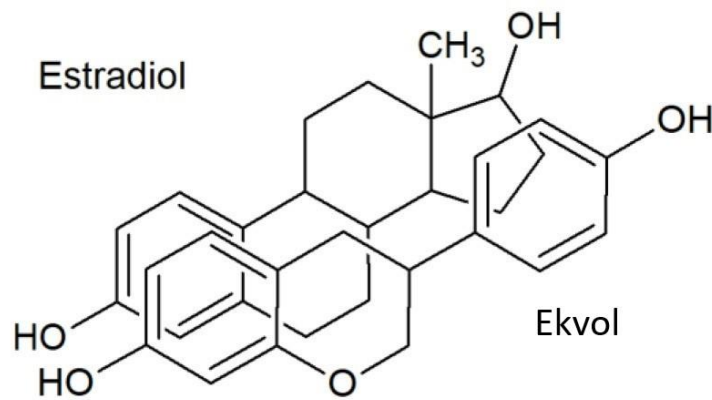


Slika 1. Osnovna struktura izoflavonoida, prilagođeno prema (1)

Izoflavoni u biljkama funkcioniraju kao fitoaleksini, niskomolekularni sekundarni metaboliti koji se nakupljaju tijekom stresa i napada mikroorganizama. Ovi spojevi posjeduju antimikrobna (antibakterijska, antivirusna, antifungalna), antioksidacijska svojstva, a zbog svoje antiangiogene aktivnosti sprječavaju razvoj biljnih tumora (2, 3). Soja je bogat izvor daidzeina, genisteina i glicetina, a crvena djetelina sadrži značajnu količinu formononetina i biokanina-A. U probavnom sustavu se metoksilirani izoflavon formononetin učinkovito transformira u daidzein.

Soja je uvrštena u skupinu funkcionalne hrane, a trenutačno se njezini izoflavoni proučavaju kao mimetici estrogena za hormonsku nadomjesnu terapiju (3-5). Iako se kemijska struktura izoflavona razlikuje od strukture endogenih estrogena, povezuje ih prisutnost fenolne skupine koja omogućuje njihovo vezanje i aktivaciju estrogenskih receptora (slika 2). Strukturno su slični 17- $\beta$ -estradiolu (2). Afinitet izoflavona prema  $\beta$ -receptorima koje nalazimo u kostima, plućima, prostati, mokraćnom mjehuru, koži i mozgu je približno pet puta veći od afiniteta prema  $\alpha$ -receptorima koji se uglavnom nalaze u mliječnoj žlijezdi, testisima,

maternici, bubrezima i hipofizi. Izoflavoni soje se kategoriziraju kao prirodni selektivni modulatori estrogenskih receptora (SERM) (2, 6).

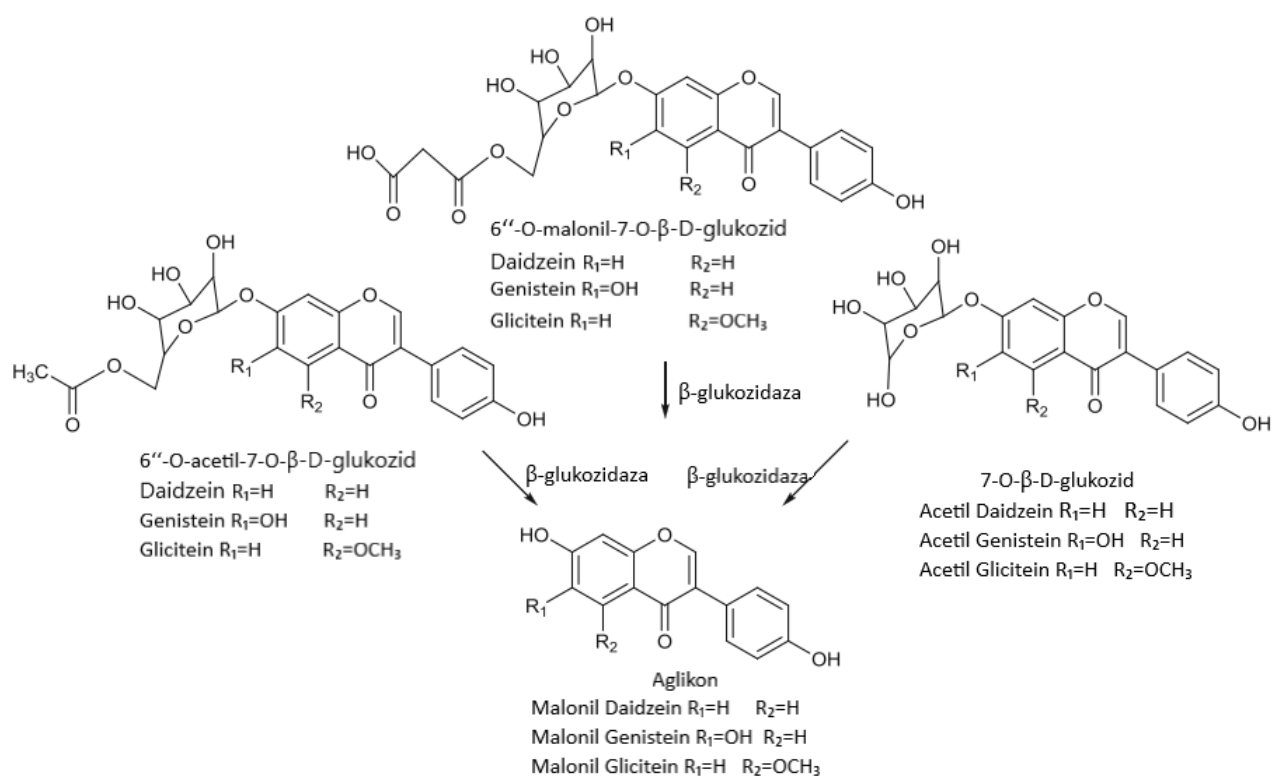


Slika 2. Usporedne kemijske strukture estrogena i ekvola , prilagođeno prema (2)

Ljudsko tijelo sadrži deset puta više mikrobnih nego tjelesnih stanica (1). Bacterije crijevne mikroflore imaju ključnu ulogu u bioraspoloživosti izoflavona jer ih biotransformiraju u oblike veće biološke aktivnosti kao što je S-(-)ekvol. Samo 25-65 % populacije posjeduje mikrofloru sa sposobnošću proizvodnje S-(-)ekvola. Duža konzumacija soje, sojinih proizvoda te dodatka prehrani na bazi soje i crvene djeteline u toj populaciji vezana je uz niži kardiovaskularni rizik, smanjenje učestalosti karcinoma prostate i dojke te većeg olakšanja simptoma povezanih s menopauzom kao što su osteoporoza i valovi vrućine (1, 4).

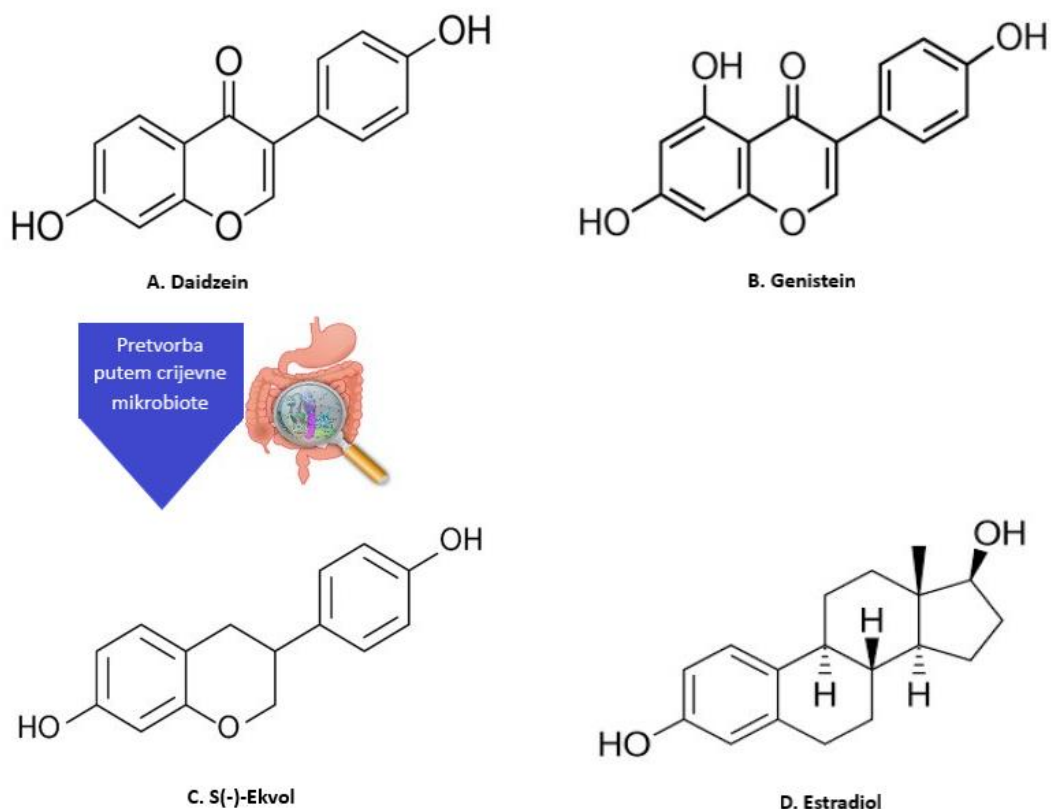
Izoflavoni se u biljkama uglavnom nalaze u neaktivnom obliku glikokonjugata tj. glukozida, genistina, daidzina i glicitina te odgovarajućih derivata acetila i malonila. Hidrofilni su i prevelike molekulske mase da bi se mogli apsorbirati u crijevima.  $\beta$ -Glukozidaze koje su aktivne od relativno ranih životnih faza hidroliziraju, genistin i daidzein do aglikona, genisteina i daidzeina koji se potom apsorbiraju kroz crijevni epitel (enterocite). Proces hidrolize izoflavona se djelomično odvija u tankom crijevu, najvećim dijelom u jejunumu. Aglikonski oblici izoflavona se tada mogu apsorbirati i dalje metabolizirati u jetri (slika 3). Jetreni enzimi

glukuronoziltransferaze i sulfotransferaze mogu formirati glukuronidirane i sulfatirane oblike izoflavona koji se izlučuju u žuč i prolaze u lumen crijeva vraćajući se na taj način u crijevo putem enterohepatičke cirkulacije. Dio izoflavona, koji se nije hidrolizirao ni apsorbirao u tankom crijevu, dopijeva u debelo crijevo zajedno sa izoflavonima koji su enterohepatičkom cirkulacijom izlučeni u tanko crijevo. U debelom crijevu se hidroliziraju bakterijskim enzimima i zatim apsorbiraju ili podvrgavaju daljnjem metabolizmu crijevne mikroflore (1, 2, 4-6).



Slika 3. Strukture izoflavonskih aglikona i njihovih glukozidnih derivata, prilagođeno prema (1)

Glavni izvor ekvola u prehrani je soja kao najveći izvor njegovog prekursora, izoflavona daidzeina. Dodaci prehrani na bazi crvene djeteline su indirektan izvor daidzeina jer se metoksilirani izoflavon formononetin u crvenoj djetelini efikasno biotransformira u daidzein. Oni koji sadrže ekstrakt korijena biljke kudzu (*Pueraria lobata*) također sadrže daidzein i njegov metoksilirani analog puerarin (2, 5).



Slika 4. Kemijske strukture daidzeina, genisteina (dva glavna soja izoflavona), S-ekvola (metabolita daidzeina, transformiranog mikrobiomom crijeva) i estradiola. Daidzein, genistein i S-ekvol su strukturno slični estradiolu, prilagođeno prema (24)

## 1.2. SOJA KAO PRIRODNI IZVOR IZOFLAVONA

Vrsta *Glycine max* (L.) Merr. (soja) je jednogodišnja zeljasta biljka iz porodice mahunarki (Fabaceae). Stabljika joj je uspravna i razgranata te cijelom dužinom prekrivena dlačicama. Može narasti do 2 m visine. Na dugim peteljka prekrivenim dlačicama nalaze se trodijelni listovi eliptičnog oblika koji na bazi imaju listiće. Ima razgranat korijen duljine 150 cm. Cvjetovi su dvospolni i skupljeni po 2 do 8 u grozdove. Čaška je zvonastog oblika s pet zubaca, a vjenčić bijele ili ljubičaste boje. Ima 10 prašnika i tučak s nadraslom plodnicom. Plod

sa žutim ili crnim sjemenkama je mahuna dužine 3-8 cm i širine 1 cm, cijelom dužinom prekrivena dlačicama (8).

Soja je biljka istočne Azije. Njemački botaničar Engelbert Kaempfer ju je prvi opisao (slika 5) i predstavio Europi nakon svog putovanja u Japan 1691. godine (8).



Slika 5. *Glycine max* (L.) Merr. - crtež Engelberta Kaempfera (8)

Soja se značajno razlikuje od ostalih mahunarki sastavom makronutrijenata. U soji prevladavaju masti i proteini, dok ugljikohidrata ima najmanje. Ne ističe se samo ukupnim sadržajem proteina, već i kvalitetom koja je bolja od proteina drugih mahunarki. Soja sadrži nizak udio ugljikohidrata, većinom oligosaharide koji, budući da su slabo probavljivi, putuju u debelo crijevo gdje mogu potaknuti rast bakterija kao što su bifidobakterije, pa se klasificiraju kao prebiotici. Sadržaj masti u zrnu soje čine približno 10-15 % zasićene, 19-41 %

mononezasićene i 46-62 % polinezasićene masne kiseline (PUFA). Soja je jedna od rijetkih namirnica koja je dobar izvor i omega 3 i omega 6 masnih kiselina (8).



Slika 6. Sojin plod (<https://www.plantea.com.hr/>)

Soja je jedinstveno bogat izvor izoflavona koji su klasificirani kao selektivni modulatori estrogenskih receptora (SERM) s preferencijom vezanja na ER $\beta$ . Ne postoji razlog za zabrinutost da bi izoflavoni zbog svojstava sličnih estrogenu mogli imati neželjene učinke na pojedince, osobito na žene u postmenopauzi. Nakon opsežne, višegodišnje procjene literature, Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA) zaključila je da izoflavoni u postmenopauzi ne utječu štetno na tri istražena ženska organa: dojke, štitnjaču i maternicu. Sjevernoameričko društvo za menopauzu također je zaključilo da izoflavoni ne povećavaju rizik od raka dojke ili endometrija. Tri su glavna izoflavona u soji, genistein, glicitein i , za ovaj rad najvažniji, daidzein koji se metabolizmom crijevnih bakterija u 25-65 % populacije

pretvara u S-(-)ekvol, metabolit derivata izoflavona s najvećim estrogenskim i antioksidacijskim djelovanjem (8).

### 1.3. CRVENA DJETELINA KAO PRIRODNI IZVOR IZOFLAVONA

Vrsta *Trifolium pratense* L. (crvena djetelina) je zeljasta višegodišnja biljka iz porodice mahunarki (Fabaceae). Stabljika je uspravna, vrlo razgranata i slabo dlakava. Može narasti do 50 cm visine. Donji listovi su na dugim peteljka i dlakavi, dok su gornji listovi na kratkim peteljka, gotovo sjedeći. Po tri lista zajedno naizmjenično su smješteni na stabljici. Dugi su 2-4 cm i široki 1-1,5 cm. Eliptičnog su oblika, s izraženom bijelom trokutastom mrljom. Pri dnu peteljke nalaze se dva kožasta palistića. Korijen je razgranat, vretenast, s okruglim kvržicama. Na korijenju se stvaraju simbiotske bakterije koje vežu dušik iz zraka te tako gnoje tlo, obogaćuju zemlju i čine je plodnom. Cvjetovi su dvospolni, ružičaste do crvene ili bijele boje (slika 7). Skupljeni su u glavičaste cvatove na 1-7 cm dugoj, dlakavoj dršci. Čaška je zvonasta s pet trokutastih zubaca, obrasla dlačicama. Cvijet ima 10 prašnika, od kojih je 9 sraslo u cijev te tučak sa nadraslom plodnicom. Plodovi su okruglaste mahune koje sadrže 1-2 duguljaste, glatke sjemenke (2, 7).

Latinski naziv roda *Trifolium* potječe od grčke riječi *trifolion* (trolisnat), složenica je od riječi *tria* (tri) i *folium* (list). Ime vrste *pratensis* (livada) ukazuje na stanište biljaka. Crvena djetelina prirodno raste na području Europe i zapadne Azije. Uzgaja se u kopnenim i močvarnim područjima, a koristi se za ispašu, sijeno i silažu za stoku (2, 7).

Crvena djetelina sadrži izoflavone biokanin A i formononetin koji se u gastrointestinalnom traktu ljudi učinkovito transformira u daidzein i dalje do S-(-)ekvola, ako su u crijevima prisutne bakterije koje proizvode ekvol iz daidzeina. Nalazi se u dodacima prehrani za smanjenje tegoba žena u menopauzi (7).



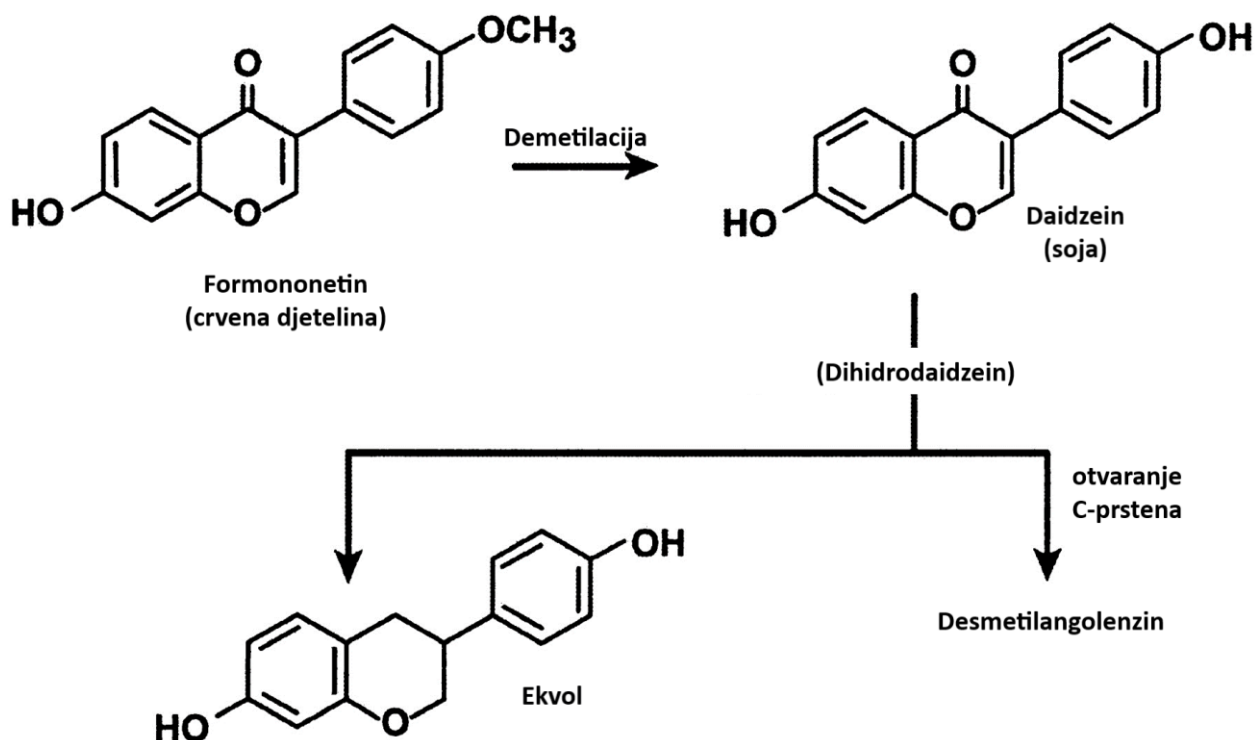


Slika 7. Crvena djetelina (*Trifolium pratense* L.)

Fotografirala: Marga Cvjetićanin

#### **1.4. FORMONONETIN**

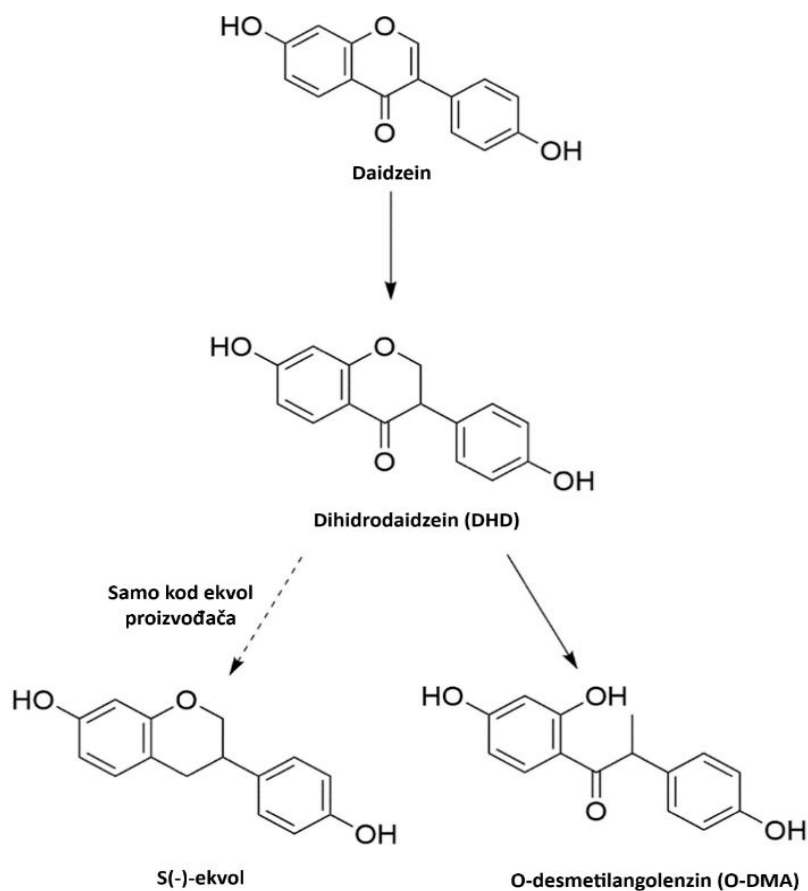
Formononetin (7-hidroksi-4'-metoksi izoflavon) je lipofilni spoj molekulske mase 268,26 g/mol i koeficijenta raspodjele oktanol-voda log P od 2,58. U probavnom sustavu formononetin se demetilira u daidzein (slika 8) (3, 7).



Slika 8. Put stvaranja ekvola nakon hidrolize glikozidnih konjugata daidzeina iz soje i metoksiliranog izoflavona formononetina pronađenog u djetelini, prilagođeno prema (7)

## 1.5. DAIDZEIN

Daidzein (4',7-dihidroksi izoflavon) je najviše istražen izoflavon zbog velike biološke aktivnosti njegovog glavnog metabolita ekvola. Lipofilni je spoj molekulske mase 254,24 g/mol i koeficijenta raspodjele oktanol-voda logP od 2,51. Crijevna mikroflora ima važnu ulogu u metabolizmu daidzeina. Nakon što se daidzein apsorbira, metaboliziraju ga bakterije crijevne mikroflore do dihidrodaidzeina (DHD). DHD dalje može proći kroz dva procesa: reduksijsko cijepanje do O-desmetil-angolenzina koji ne pokazuje biološku aktivnost i deoksigenaciju u dva koraka do S-(-) ekvola, metabolita izrazite kliničke važnosti (slika 9). Potrebno je 12-36 sati za pojavu S-(-) ekvola u plazmi nakon oralne primjene daidzeina u ljudi, što je u skladu s njegovim stvaranjem u debelom crijevu (3, 5, 6).



Slika 9. Metabolizam daidzeina: obične strelice predstavljaju pretvorbu putem crijevne mikrobiote kod proizvođača i ne proizvođača S(-)ekvola, dok isprekidana strelica predstavlja reakciju koja se odvija samo kod proizvođača S(-) ekvola, prilagođeno prema (9)

## 1.6. EKVOL

### 1.6.1. Povijest istraživanja ekvola

Godine 1932. Marrian i Haslewood su prvi put izolirali ekvol iz konjskog urina gravidnih kobila. Nazvali su ga ekvol zbog konjskog podrijetla (*equine* = konjsko). Ekvol je kasnije pronađen u urinu pastuha i kobila koje nisu bile gravidne, što je dovelo do zaključka da nije povezan s stanjem u kojem je visoka koncentracija estrogena. Razine ekvola su opadale tijekom jesenskih mjeseci, a zimi ga je bilo nemoguće izolirati iz urina. Time se potvrdilo da sezonske varijacije utječu na razinu izoflavona u biljkama. Kada su objavljena službena

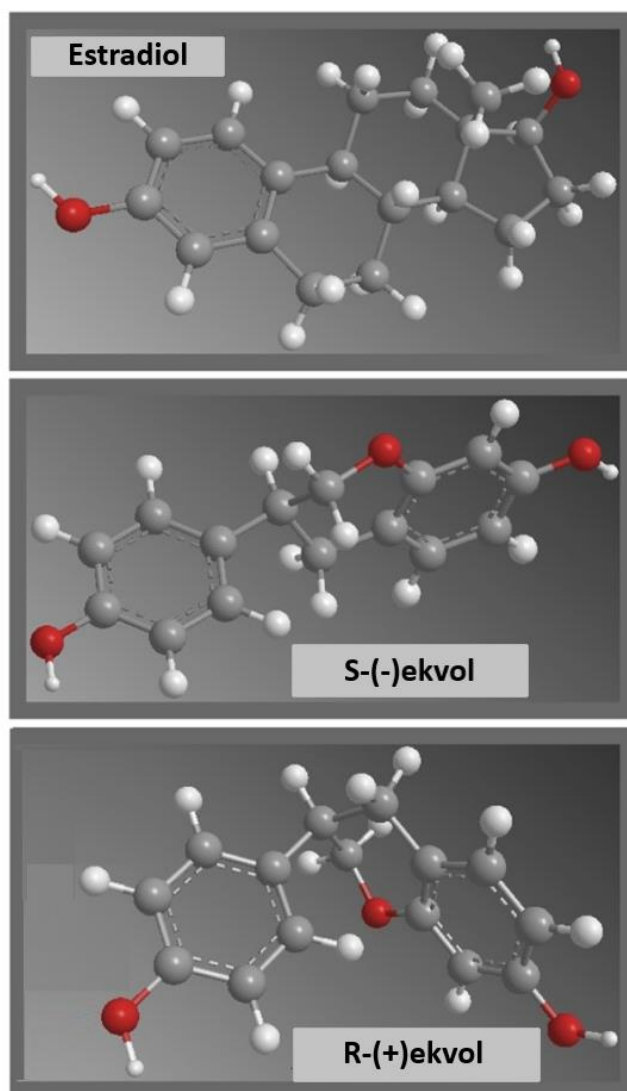
zdravstvena izvješća iz Australije o tzv. "bolesti djeteline" ili Cloverovoj bolesti ovaca koje su pasle djetelinu (*Trifolium subterraneum*) utvrđeno je da je bolest povezana s visokom koncentracijom cirkulirajućeg ekvola. Ustanovljeno je da ga stvaraju bakterije u želucu preživača gutanjem velikih količina metoksiliranog izoflavona formononetina kojeg ima u izobilju u nekoliko vrsta djeteline. Ovce su dnevno unosile 20-100 g izoflavona, što je dovelo do koncentracije od čak 20  $\mu\text{mol/L}$  ekvola u plazmi i negativnih učinaka na reprodukciju. Ekvol je kasnije pronađen u mokraći i/ili plazmi mnogih životinjskih vrsta uključujući krave, kokoši, majmune, čimpanze, miševe, pse, štakore i svinje (5, 7).

Veza između ekvola i soje nastaje tek nakon niza studija na štakorima hranjenim sojinim proteinima. Štakor se sa svojim velikim slijepim crijevom i obiljem mikroflora pokazao kao odličan proizvođač ekvola. Rezultati su pokazali povećano izlučivanje ekvola urinom nakon čega je detektiran daidzein, sojin izoflavon kao prekursor ekvola (5). Ljudi većinom unose 15-50 mg izoflavona dnevno, pri čemu nije moguće postići one koncentracije koje su u ovaca dovele do negativnog učinka. Dokazano je da ekvol u ljudi ima siguran profil pri primjeni visokih oralnih doza. *In vitro* inkubacija fekalne flore pojedinaca koji proizvode ekvol s daidzeinom rezultirala je tvorbom ekvola. Međutim uvođenje sojinih proteina u prehranu je samo u nekim odraslim osoba dovelo do povećanog izlučivanja ekvola. Sve je više dokaza koji ukazuju na važnost klasifikacije ljudi prema "bakterijskom tipu", odnosno po sposobnosti stvaranja ekvola jer je očito da se radi o dvije subpopulacije. Ekvol proizvode crijevne bakterije samo u nekim odraslim osoba. Ovo zapažanje je dovelo do izraza „proizvođač ekvola“ za sve odrasle osobe koje proizvode ekvol kao odgovor na konzumaciju sojinih izoflavona te „neproizvođač ekvola“ za one koji ne proizvode ekvol. Gotovo 20 godina nakon pronalaska ekvola u ljudskom urinu postavljena je tzv. ekvol hipoteza o kliničkoj učinkovitosti prehrane na bazi soje. Zdravstvene dobrobiti prehrane temeljene na soji mogu biti veće u proizvođača ekvola nego u neproizvođača, odnosno da sposobnost stvaranja ekvola definira kliničku učinkovitost soje (4, 5, 7, 10).

### 1.6.2. Fizikalno-kemijska svojstva ekvola

Ekvol [7-hidroksi-3- (4'-hidroksifenil)-kroman] je izoflavan koji pripada skupini spojeva koji se nazivaju nesteroidni estrogene, molekulske formule  $C_{15}H_{14}O_3$  i molekulske mase 242,27 Daltona (1, 3). Heterociklička struktura sadrži dva reaktivna hidroksila i jedan relativno inertan i nereaktivan kisik u središnjem furanskom prstenu. Ekvol je nepolarana molekula slabo topljiva u vodi (1). Izuzetno je osjetljiv na djelovanje kiselina i može se lako razgraditi (> 60 %) u općoj obradi uzoraka, osobito ako se koriste kiseli hidrolitički koraci. Iako posjeduje dva fenolna prstena, slabo apsorbira u UV području, što znači da HPLC s UV detekcijom nije prikladan za mjerenje u većini bioloških tekućina (1).

Kao rezultat kiralnog ugljika na položaju C-3, ekvol postoji u dva enantiomerna oblika R-(+)ekvol i S-(-) ekvol (slika 10). S-(-)ekvol je prirodni diastereoizomer kojeg proizvode crijevne bakterije i koji ima veći afinitet za estrogenski receptor- $\beta$ . R-(+) ekvol ima veći afinitet za estrogenski receptor- $\alpha$  (1, 3, 4, 5). Oba enantiomera su od interesa iz kliničke i farmakološke perspektive. Široki raspon bioloških aktivnosti koje ovi enantiomeri posjeduju opravdava njihovo istraživanje u liječenju brojnih stanja povezanih s hormonima koja uključuju stanja ovisna o estrogenu i stanja povezana s androgenima (10).



Slika 10. Model kemijskih struktura optičkih izomera ekvola u usporedbi s estradiolom, prilagođeno prema (10)

### 1.6.3. Farmakokinetika ekvola

Prve podatke o farmakokinetici ekvola opisali su Setchell i suradnici u studiji iz 2002 godine (7). Zdrava, odrasla ženska osoba primila je u jednoj oralnoj dozi 25 mg ( $\pm$ ) ekvola. Ekvol se brzo apsorbirao i nakon 4-6 sati postigao maksimalnu koncentraciju u plazmi. Zatim se koncentracija smanjivala, s terminalnim poluvremenom eliminacije od 8,8 sati.

Krivulja pojavljivanja/nestajanja ( $\pm$ ) ekvola u plazmi ukazala je na činjenicu da se ekvol farmakokinetički razlikuje od sojinih izoflavona daidzeina i genisteina. Pokazuje veću bioraspoloživost i sporiji klirens u plazmi (6,85 L/sat) u usporedbi s daidzeinom (17,5 L/sat). Sporiji klirens doprinosi održavanju visokih koncentracija ekvola u plazmi. Nevezana frakcija dostupna za zauzimanje receptora za ekvol iznosi 49,7%, što je znatno više od udjela slobodnog daidzeina (18,7 %) ili estradiola (4,6 %). Ekvol se veže na globulin koji veže spolni hormon te kompetitivno inhibira vezanje estradiola i testosterona na način ovisan o dozi (7, 10, 11).

Farmakokinetika enantiomera R-(+)ekvola i S-(-)ekvola u plazmi i urinu određena je u 12 zdravih odraslih osoba (6 žena i 6 muškaraca). Uzeta uz obrok, oba enantiomera su se brzo apsorbirala i postigla vršnu koncentraciju u plazmi nakon 2-3 sata (10). U ispitivanju dodatka prehrani koji sadrži S-(-)ekvol (SE5-OH) na zdravim ženama u postmenopauzi (12 žena) prosječna vršna koncentracija u plazmi je uočena nakon 1-2 h kada se dodatak prehrani uzimao bez obroka (10). Razlike u brzinama apsorpcije S-(-)ekvola u ove dvije studije objašnjava se učinkom obroka koji mijenja vrijeme pražnjenja želuca i usporava početnu stopu apsorpcije. Praćenjem krivulje koncentracija R-(+)ekvola i S-(-)ekvola u plazmi pokazalo je brzu apsorpciju oba enantiomera, njihove visoke koncentracije u cirkulaciji i slično terminalno poluvrijeme eliminacije od 7-8 sati. Sistemska bioraspoloživost i frakcijska apsorpcija R-(+)ekvola je bila veća od S-(-)ekvola i racemata ( $\pm$ ) ekvola. U odnosu na pojedinačne enantiomere, apsorpcija racemata ( $\pm$ ) ekvola bila je sporija, a u plazmi su postignute niže vršne koncentracije te je ustanovljena niža sistemska bioraspoloživost (10).

S-(-)ekvol je metabolički inertan nakon stvaranja, ne podliježe daljnjoj biotransformaciji, osim faze II metabolizma, konjugacije na glukuronsku kiselinu i u manjoj mjeri sumpornu kiselinu. Konjugacija se odvija pri apsorpciji prvog prolaza unutar enterocita i jetre. Uridin difosfat-5'-glukuroniziltransferaza je široko raspoređena po gastro-

intestinalnom traktu i konjugira genistein. Vrlo vjerojatno je da izoforma uridin difosfat-5'-glukuroniltransferaze 1A10 katalizira glukuronidaciju ekvola. Glavni put eliminacije ekvola iz organizma je putem bubrega (10).

## **1.7. CRIJEVNA MIKROBIOTA U PROIZVOĐAČA EKVOLA**

Mikrobiotu čovjeka predstavlja skup mikroorganizama, (bakterije, arheje, niži i viši eukarioti i virusi), koji žive u simbiozi s ljudskim tijelom u definiranom okruženju. Humanu mikrobiotu čini više od 1000 različitih bakterijskih vrsta koje posjeduju metagenom koji sadrži i do sto puta veći broj gena od ljudskog genoma. Sav genetički materijal (svi genomi svakog pojedinog mikroorganizma) čine kompleksni mikrobiom te zajednice. Mikrobiota je jedinstvena za svakog pojedinca poput otiska prsta, a najbrojnija je crijevna mikrobiota (1, 6, 12).

### **1.7.1. Određivanje fenotipa**

Ekvol se ne ubraja u skupinu fitoestrogena jer nije prirodni sastojak biljaka. Definira se kao nesteroidni estrogen iz skupine izoflavona. Isključivo je metabolički produkt metabolizma crijevnih bakterija. Obzirom na posebnost proizvodnje ekvola, Setchell i suradnici su opisali dvije različite subpopulacije postavljajući empirijski dobivene granične vrijednosti. Pojedinci koji imaju koncentraciju ekvola u plazmi < 40 nmol/L (10 µg/L) klasificiraju se kao „neproizvođači ekvola“, dok pojedinci koji imaju koncentraciju ekvola u plazmi > 83 nmol/L (20 µg/L) su „proizvođači ekvola“. Ova se razlika također može ustanoviti i analizom urina, s tim da je proizvođač ekvola pojedinac koji izlučuje > 1000 nmol/L ekvola (1, 2, 7, 11).

Studije novijeg datuma smatraju urin boljom matricom za klasifikaciju statusa proizvođača ekvola jer omogućuje praćenje promjena u vremenskom tijeku te lakšu procjenu izloženosti



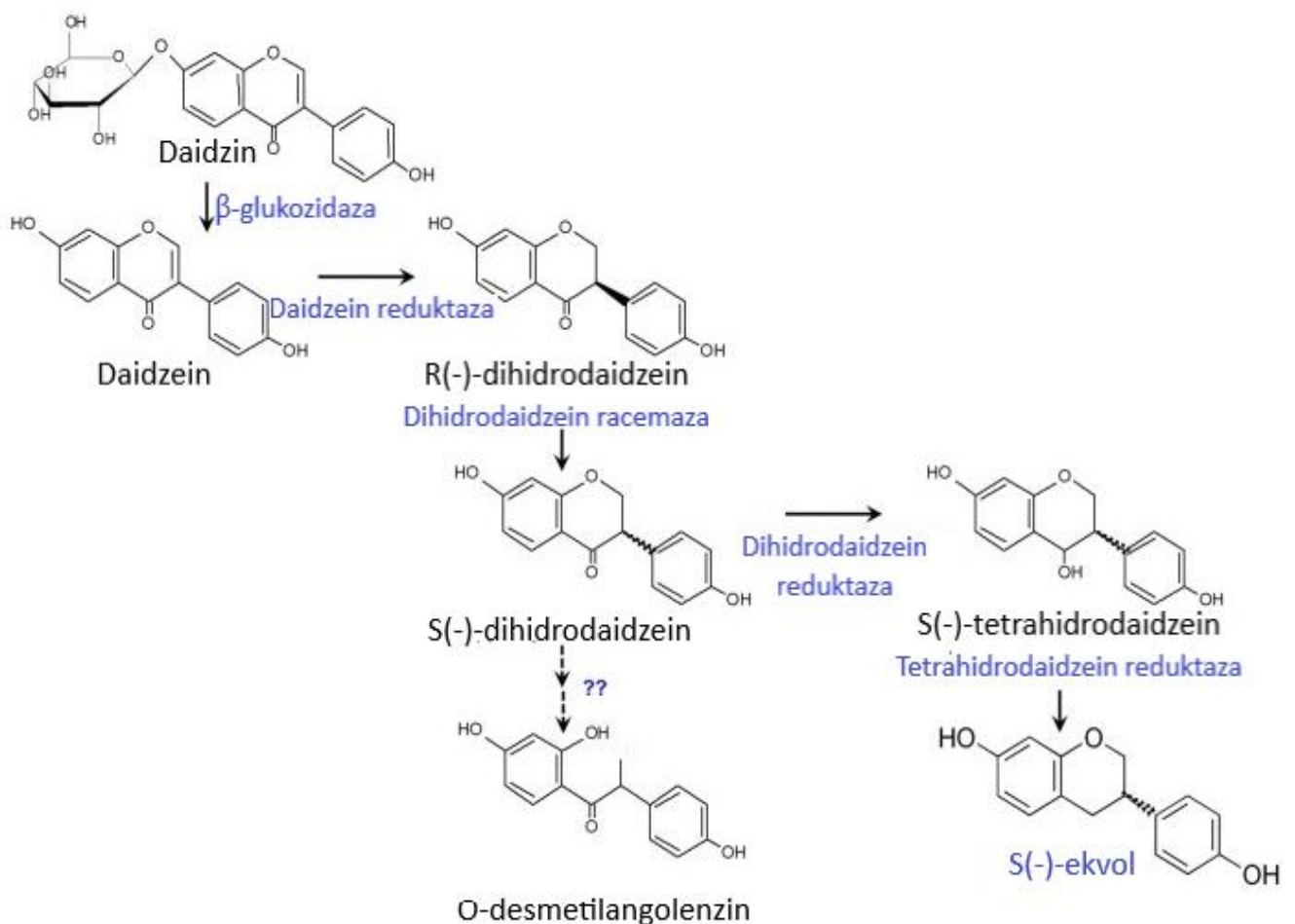
izoflavonima nego u krvi gdje se ekvol eliminira relativno brzo (2). Nemaju svi pojedinci crijevne bakterije potrebne za proizvodnju ekvola i/ili O-DMA iz daidzeina (slika 11). Proizvodi ga samo 25-65 % ukupne populacije, a postotak ovisi o zajednici i prehranbenim navikama njezinih članova. Suprotno tome, većina ljudi (80-90 % populacije) su proizvođači O-DMA, metabolita bez estrogenskog djelovanja (4). Ekvol se ne otkriva u mokraći i plazmi većine dojenčadi mlađe od jedne godine, što ukazuje da se bakterije u crijevima koje proizvode ekvol kasnije razvijaju. Učestalost proizvodnje ekvola među vegetarijancima znatno je veća nego kod nevegetarijanaca, 59 % naspram 25%, sugerirajući da biljne sastavnice, osim one iz soje utječu na stvaranje ekvola. Nekoliko studija ukazuje da kratkotrajna suplementacija izoflavonima kao i promjena prehranbenih navika, primjerice, prelazak na vegetarijansku ili vegansku prehranu, u nekih osoba aktivira crijevu mikrofloru od neproizvođača u proizvođače ekvola. U zapadnim zemljama, u kojima unos sojine hrane nije uobičajen, udio odraslih proizvođača ekvola je 25-30 %, dok u azijskim zemljama s prosječnim dnevnim unosom soje od 6-8g udio ekvola iznosi 50-60 % (1, 6, 11).

Bakterije koje proizvode ekvol razlikuju se od onih koje proizvode O-DMA iz daidzeina. Stoga su fenotipovi koji proizvode ekvol i O-DMA neovisni jedan o drugome, što znači da sposobnost proizvodnje O-DMA ne isključuje sposobnost pojedinca da proizvodi S(-)ekvol (1, 4, 6). Studijom iz 2012 godine na 2165 žena iz Šangaja dokazano je da je izlučivanje ekvola urinom obrnuto proporcionalno indeksu tjelesne mase, odnosno da težina osobe utječe na sastav mikroflora. Omjer proizvođača ekvola u skupinama s prekomjernom tjelesnom masom bio je niži (32 %) (1).

Promjena prehranbenih navika s manjim udjelom izoflavona i povećana primjena antibiotika u mlađoj populaciji u Japanu i Koreji utjecali su na smanjenje udjela proizvođača ekvola. Tako je među koreanskim tinejdžerima postotak bio 45 %, a u skupini od 20 do 30 godina iznosio je 40 %. To je bilo značajno niže u odnosu na osobe u četrdesetima s 80 % i

pedesetima sa 65 % proizvođača ekvola. U Japanu je među tinejdžerima bilo samo 10 % proizvođača ekvola (1, 6).

Određivanje pripadnosti pojedinca određenom fenotipu, ovisno o sposobnosti proizvodnje ekvola, ključno je za provođenje kliničkih studija o učinkovitosti soje. Stoga bi se velika varijabilnost rezultata o djelovanju soje mogla dijelom pripisati ne razlikovanju proizvođača i neproizvođača ekvola među ispitanicima u prethodnim kliničkim studijama (1, 4).



Slika 11. Metabolizam daidzeina pod utjecajem crijevnih bakterija, prilagođeno prema (4)

### 1.7.2. Sinteza ekvola

Crijevna mikrobiota ima važnu ulogu u metabolizmu izoflavona. Razumijevanje uloge soje u modeliranju crijevne mikrobiote, poznavanje vrste i broja mikroorganizama koji sudjeluju u sintezi ekvola prisutnih u mikrobioti različitih jedinki od vitalne je važnosti ako želimo razjasniti mehanizme djelovanja bioaktivnih sastavnica soje. Mikrobna pretvorba daidzeina u S-(-)ekvol obuhvaća nekoliko koraka u kojem sudjeluju tri bitna enzima iz skupine reduktaza i enzim racemaza. Enzimi reduktaze su prvi put otkriveni u soju *Lactococcus garvieae* 20–92. Identificirani su i u sojevima u *Slackia isoflavoniconvertens*, *Eggerthella* sp. YY7918 i *Adlercreutzia equolifaciens* DSM 19450. U prvom koraku daidzein se prevodi u (R)-dihidrodaidzein djelovanjem daidzein ovisne NADP reduktaze (DZNR) za koju kodira *dzr* gen. U slijedećoj reakciji djelovanjem dihidrodaidzein racemaze (DDRC) [R]-dihidrodaidzein se prevodi u [S]-dihidrodaidzein. Slijedi reakcija katalizirana dihidrodaidzein reduktazom (DHDR) kodirana *ddr* genom, koja reducira [S]-dihidrodaidzein u [3S,4R] -trans-tetrahidro-daidzein. Enzim tetrahidro-daidzein reduktaza (THDR) kodirana s genom *tdr*, enteroselektivna za [3S,4R] -trans-tetrahidro-daidzein, dovršava konverziju [3S,4R] -trans-tetrahidro-daidzeina u S-(-)ekvol (4, 6).

Dosadašnja istraživanja pokazuju da većina bakterija koje proizvode ekvol pripada obitelji *Coriobacteriaceae*, uključujući rodove *Adlercreutzia*, *Slackia*, *Eggerthella*, *Paraeggerthella*, *Asaccharobacter* i *Enterorhabdus*. Identificirani su i rodovi koji ne pripadaju obitelji *Coriobacteriaceae*, a koji uključuju određene vrste i sojeve unutar rodova *Lactobacillus*, *Lactococcus* i *Bifidobacterium* (tablica 1) (6)

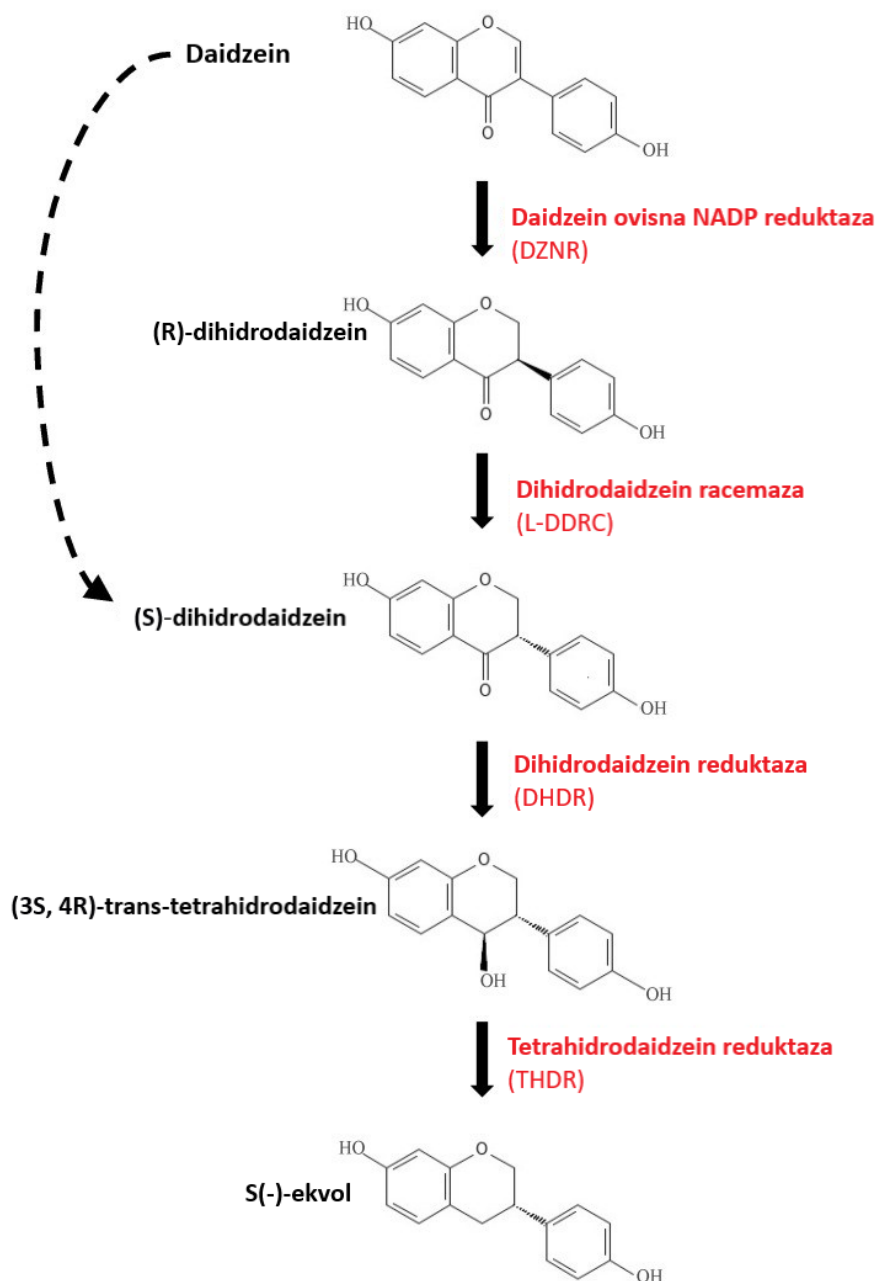
Tablica 1. Djelomičan popis bakterijskih sojeva koji proizvode dihidrodaidzein i/ili ekvol. Drugi stupac označava specifične korake pretvorbe daidzeina u ekvol, prilagođeno prema (6)

Bakterijski soj	Pretvorba
<i>Adlercreutzia equolifaciens</i> soj DSM 19450	Daidzein → Ekvol
<i>Lactobacillus intestinalis</i>	Daidzein → Ekvol
<i>Coriobacteriaceae</i> soj Mt1B8	Daidzein → Ekvol
<i>Eggerthella</i> sp. soj Julong 732	Dihidrodaidzein → Ekvol
<i>Bifidobacterium breve</i> soj 15700	Daidzein → Ekvol
<i>Bifidobacterium longum</i> soj BB536	Daidzein → Ekvol
<i>Lactococcus garvieae</i> soj 20–92	Daidzein → Ekvol
<i>Slackia Isoflavoniconvertens</i> soj DSM 22006	Daidzein → Ekvol
<i>Clostridium</i> sp. soj HGH6	Daidzein → Dihidrodaidzein
<i>Coprobacillus</i> soj TM-40	Daidzein → Dihidrodaidzein
<i>Lactobacillus</i> sp. Niu-O16	Daidzein → Dihidrodaidzein
<i>Eggerthella</i> sp. YY7918	Daidzein → Ekvol
<i>Adlercreutzia equolifaciens</i> soj W18.34a	Nema konverzije daidzeina

Bakterijski sojevi kao što su *Lactococcus garvieae* soj 20–92, *Adlercreutzia equolifaciens* soj DSM 19450, *Slackia Isoflavoniconvertens* soj DSM 22006 posjeduju gene koji kodiraju sva tri enzima reduktaze i gen koji kodira enzim racemazu tako da mogu samostalno izvršiti pretvorbu daidzeina u ekvol. Međutim bakterijski sojevi kojima nedostaje jedan ili dva ključna enzima nisu u mogućnosti sintetizirati ekvol. Osim nedostatka ključnih enzima, potrebna je i prisutnost gena koji kodiraju te enzime, tako da čak i unutar poznate vrste koja proizvodi ekvol mogu postojati jedinstveni sojevi koji nemaju potrebne gene i ne mogu proizvesti ekvol. Unutar mikrobne zajednice mogu biti prisutni članovi koji olakšavaju ili sprječavaju proizvodnju ekvola, što nam ukazuje na kompleksnost svakog crijevnog sustava

pojedince i ukazuje na važnost identifikacije svih korisnih mikrobnih potpisa koji bi mogli pomoći kod maksimiziranja estrogenskog potencijala sojinog izoflavona daidzeina, odnosno njegovog metabolita ekvola, te u konačnici omogućiti razvoj i osmišljavanje personalizirane prehrane kod ciljane skupine pacijenata (6).

Svaki pojedinac koji pripada skupini proizvođača ekvola posjeduje vlastiti jedinstveni crijevni ekosustav koji se može mijenjati tijekom vremena. Mnogi čimbenici negativno utječu na proizvodnju ekvola u crijevima, kao što su visok unos prehrambenih masti, pušenje, upotreba antibiotika, čime se ugrožava aktivnost i količina bakterija koje proizvode ekvol. Veći unos ugljikohidrata i škroba povoljno utječe na proizvodnju ekvola, kao i vrsta izoflavona koja se konzumira. Prisutnost drugih bakterija u crijevima može pomoći ili odmoći u proizvodnji ekvola. Utjecaj svih čimbenika, unutarnjih i vanjskih te složenost sastava ljudskog crijevnog sustava objašnjava problem konzistentnosti studija o zdravstvenim dobrobitima soje (6).



Slika 12. Dijagram koji prikazuje trenutno znanje o bakterijskoj pretvorbi sojinog izoflavona daidzeina u metabolit S(-)-ekvol. Točkasta strelica označava moguću alternativu putu, zaobilazeći upotrebu enzima racemaze prilagođeno prema (6)

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Danas se na tržištu Republike Hrvatske nalaze dodaci prehrani na bazi soje i crvene djeteline za ublažavanje menopauzalnih tegoba. Nova znanstvena istraživanja upućuju na prijeko potrebnu podjelu populacije na proizvođače i neproizvođače ekvola jer se terapijski učinak izoflavona daidzeina može očekivati u osoba koje mogu stvoriti aktivni metabolit ekvol. Stoga je cilj ovog specijalističkog rada dati sustavni pregled istraživanja o ovoj temi i ukazati na važnost stvaranja ekvola za terapijski učinak biljnih lijekova i dodataka prehrani na bazi soje i crvene djeteline.

### **3. MATERIJALI I METODE - SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI**

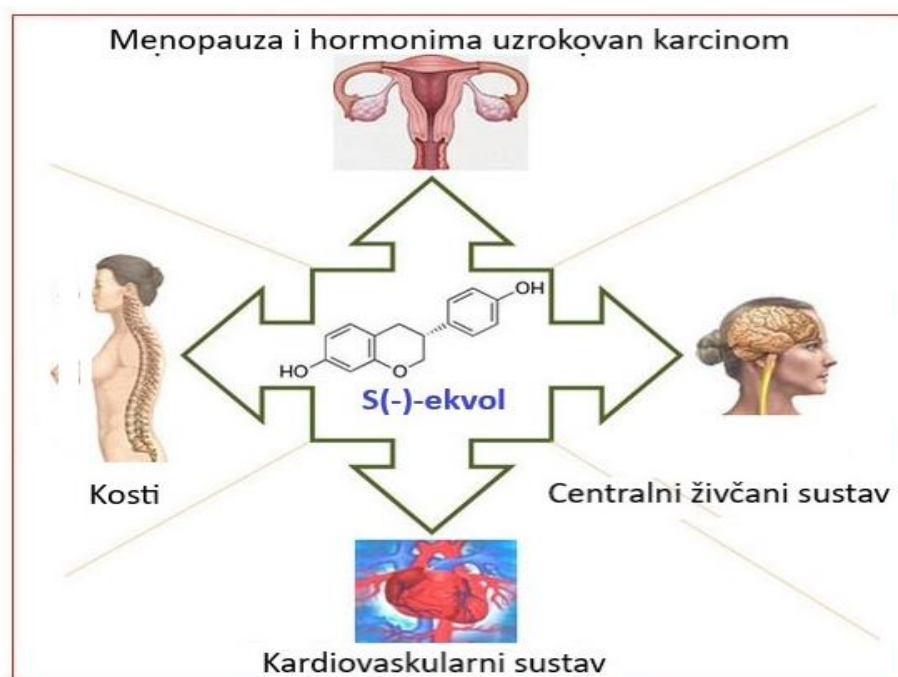
Istraživanja u okviru ovoga specijalističkog rada teorijskog su karaktera i uključuju pregled dostupne literature o dosadašnjim suvremenim znanstvenim istraživanjima ekvola kao bioaktivnog metabolita daidzeina. U pretraživanju su se koristile dostupne elektronske bibliografske baze podataka kao što su: PubMed, ScienceDirect, Elsevier, Frontiers media, Plos one, Wolter Kluwer i dr. Upotrijebljene su tražilice Google i Google Scholar.

Istraživanjem su obuhvaćena dosadašnja klinička istraživanja o učincima ekvola na različita područja ljudskog zdravlja s naglaskom na menopauzalne tegobe, kardiovaskularne bolesti, osteoporozu, demenciju, PMS, karcinom dojke i prostate. U pregled su uključena i istraživanja o strukturi i mehanizmu djelovanja ekvola te istraživanja o crijevnim bakterijama koje su uključene u proces stvaranja ekvola iz daidzeina.



### 3.1. Farmakološki učinci S(-) ekvola

Opisani su brojni farmakološki učinci S(-) ekvola koji su shematski prikazani na slici 13. Detaljan opis pojedinih farmakoloških učinaka opisan je u poglavljima koja slijede.



Slika 13. Shematski prikaz farmakoloških učinaka S(-)ekvola, prilagođeno prema (4)

#### 3.1.1. Antioksidacijsko djelovanje

Oksidacijski stres je uzrokovan neravnotežom između proizvodnje i nakupljanja slobodnih kisikovih radikala u stanicama i tkivima. Mitohondriji tijekom fizioloških i patoloških stanja najviše proizvode slobodne kisikove radikale. Do oksidativnog stresa dolazi kada akumulacija slobodnih kisikovih radikala premaši antioksidacijsku obranu. Izoflavoni su antioksidansi koji su pokazali in vitro snažniji učinak od vitamina C i E (20, 24). S(-)ekvol je

donor vodika/elektrona i stoga može hvatati slobodne radikale. U usporedbi s izoflavonima pokazuje bolja antioksidacijska svojstva. Osim toga S-(-)ekvol i izoflavoni djeluju protuupalno što ukazuje na činjenicu da prehrana bogata izoflavonima može smanjiti oksidacijski stres i upale koje su u podlozi mnogih bolesti (7, 24).

### **3.1.2. Djelovanje na kardiovaskularni sustav**

Dokazano je da S-(-)ekvol povećava ekspresiju gena endotelne sintaze dušikovog oksida, što dovodi do povećanja proizvodnje i dostupnosti dušik(II) oksida (NO) u endotelnim stanicama ljudske aorte s vazodilatacijskim svojstvima. Time se također sprječava modifikacija lipoproteina niske gustoće. NO ima izražena vazoaktivna svojstva i važnu ulogu u općoj modulaciji vaskularne homeostaze, a sintetizira se iz L-arginina uz NO-sintetazu (NOS) (4, 10, 17). U studiji provedenoj u Japanu u koju su bile uključene žene u menopauzi, rezultati su pokazali da je S-(-)ekvol uzrokovao smanjenje arterijske krutosti nakon 12 mjeseci uzimanja suplementa S-(-)ekvola (17). Nadalje, Sekikawa i suradnici su napravili pregled randomiziranih kliničkih studija u kojima je ispitanicima određena sposobnost stvaranja ekvola. Pokazalo se da ekvol proizvođači imaju bolje rezultate pri procjeni čimbenika rizika od kardiovaskularnih bolesti. Time su potvrdili hipotezu da je S-(-)ekvol ključna molekula odgovorna za antiaterogeno djelovanje sojinih izoflavona. Zaključeno je da su potrebne duže kliničke i opservacijske studije utjecaja S-(-)ekvola na aterosklerozu i čvrstoću arterija (17, 20, 23).

### 3.1.3. Učinak na zdravlje kostiju

Poznato je da izoflavoni pomažu u prevenciji osteoporoze, međutim, mehanizam još uvijek nije u potpunosti razriješen. Zbog nedostatka estrogena u menopauzi, prisutan je brži gubitak koštane mase jer dolazi do neravnoteže između resorpcije i stvaranja kostiju. Žene koje proizvode ekvol su pokazale sporije smanjenje gustoće kostiju u usporedbi s onima koje nemaju tu sposobnost (4). Provedena je studija u kojoj su sudjelovale žene u postmenopauzi, koje su dnevno tijekom 12 mjeseci uzimale 10 mg S-(-)ekvola. Rezultati su pokazali da je S-(-)ekvol spriječio smanjenje mineralne gustoće svih kostiju. Izrazito je inhibirao resorpciju kostiju, što se dokazalo smanjenim koncentracijama izlučivanja deokspiridinolina u urinu. Potrebne su duže kliničke i opservacijske studije utjecaja S-(-)ekvola na osteoporozi (17).

Tanaka i suradnici su proveli studiju na ovarijektomiziranim (OVX) miševima o inhibicijskom djelovanju S-(-)ekvola i R-(+)ekvola na krhkost kostiju. Dokazano je da S-(-)ekvol i R-(+)ekvol inhibiraju diferencijaciju osteoklasta u BMC, stanicama koštane srži, (97% i 60%) . S-(-)ekvol pospješuje i apoptozu zrelih osteoklasta induciranjem aktivnosti kaspaze-3/7 i pojačanom diferencijacijom osteoblasta, te pozitivno utječe na BMD, mineralnu gustoću kostiju. Kod miševa tretiranih R-(+)ekvolom nije došlo do poboljšanja. Nadalje, rezultati su pokazali veće koncentracije S-(-)ekvola od R-(+)ekvola u serumu, tibiji, jetri i bubrezima (za 148%, 80%, 22%, odnosno 139%) što znači da je S-(-)ekvol učinkovitiji od R-(+)ekvola u inhibiciji stvaranja osteoklasta i pojačanju apoptoze osteoklasta in vitro, čime se podupire tvrdnja o blagotvornom učinku S-(-)ekvola na smanjenje gubitka koštane mase izazvanog nedostatkom estrogena u OVX miševa (27).

### **3.1.4. Djelovanje na središnji živčani sustav**

#### **3.1.4.1. Demencija**

Dokazano je da S(-)ekvol djeluje antiaterogeno i ublažava krutost arterija te da može pomoći u prevenciji kognitivnih oštećenja/demencije. Sve je više studija koje povezuju kardiovaskularne poremećaje u osoba srednje dobi s demencijom koja je nastupila 20 godina kasnije te dokaza da ateroskleroza i krutost arterija doprinose gubitku kognitivnih sposobnosti (4, 20). Nadalje, epidemiološke studije otkrivaju niže stope demencije u istočnoazijskoj populaciji. Smatra se da dugotrajna primjena soje ili izoliranih izoflavona rezultira boljim učenjem i logičkim razmišljanjem, što je dokazano nedavnom studijom na 152 starije osobe u Japanu u kojoj su ekvol proizvođači imali bolji kognitivni rezultat i manju prevalenciju blagog kognitivnog oštećenja od neproizvođača ekvola. To je pripisano boljem antioksidacijskom djelovanju S(-)ekvola, njegovom većem afinitetu za estrogenske receptore ER $\beta$ , boljoj bioraspoloživosti i sposobnosti povećanja aktivnosti mitohondrija, u usporedbi sa sojinim izoflavonima (20).

#### **3.1.4.2. Alzheimerova bolest**

Alzheimerova bolest je progresivna bolest mozga praćena kognitivnim oštećenjem i demencijom. Povezuje se sa arterijskom krutosti koja uzrokuje razne oblike patologije, uključujući lezije bijele tvari, cerebralna mikrokrvarenja, taloženje amiloida- $\beta$  i fosforiliranog tau proteina u mozgu, te neuroinflamaciju u cerebralnoj spinalnoj tekućini. Njezin nastanak uključuje patološku proizvodnju kolagena i degradaciju elastina u arterijskoj stijenci, endotelnu disfunkciju, oksidativni stres i upalu. Pretkliničkim studijama je dokazano da S(-)ekvol ima izraženo antioksidacijsko i protuupalno djelovanje, da inhibira abnormalnu sintezu kolagena i elastaze, poboljšava funkciju endotela, čime se posljedično smanjuje krutost

arterija, povećava cerebralni protok krvi, smanjuje progresija lezija bijele tvari, kognitivni pad i incidentna demencija (24). Najavljeno je provođenje randomizirane kliničke studije koja će uključiti 400 starijih osoba bez demencije. Ovo ispitivanje bi trebalo dati odgovor hoće li mjesečna suplementacija S(-)ekvolom tijekom dvije godine značajno poboljšati krutost arterija, usporiti progresiju lezija bijele tvari, usporiti napredovanje kognitivnog pada, te ispitat tvrdnju da li status ekvol proizvođača utječe na rezultate suplementacije prirodnog dodatka prehrani S(-)ekvola (24).

### **3.1.4.3. Epilepsija**

Epilepsija je jedan od najčešćih kroničnih neuroloških poremećaja u svijetu. Epileptični napadi su posljedica infekcije središnjeg živčanog sustava, međutim, još uvijek nemamo lijekove koji bi bili učinkoviti u prevenciji takvih napada (19). S(-)ekvol je u slobodnom obliku prisutan u serumu te prolazi krvno-moždanu barijeru. Djeluje neuroprotektivno protiv ekscitotoksičnosti glutamata u uzgojenim neuronima hipokampusa, što ukazuje na potencijalnu ulogu u zaštiti hipokampusa i stanične smrti, koju često susrećemo u animalnim studijama te u pacijenata s epilepsijom (19). Gallucci i suradnici su proveli *ex vivo* studiju utjecaja S(-)ekvola na fiziologiju neurona i na Theilerov virus mišjeg encefalomijelitisa (TMEV). Dokazali su da je crijevna mikrobiota značajno promijenjena u miševa zaraženih TMEV-om. Identificiran je gubitak roda *Adlercreutzia* koji proizvodi S(-)ekvol. Elektrofiziološka snimka je pokazala da egzogeni S(-)ekvol mijenja fiziologiju neurona korteksa tako da poboljšava hiperekscitabilnost neurona entorinalnog korteksa u miševa zaraženih TMEV-om. Ova studija je pružila dokaze o potencijalnoj terapijskoj dobrobiti egzogenog S(-)ekvola tijekom akutne faze napada izazvanih TMEV-om. Budući da postoje dokazi o utjecaju mikrobiote kod kroničnih napada i u glodavaca i u ljudi, S(-)ekvol bi mogao

biti koristan tijekom epileptogeneze i faza kronične epilepsije. Ova studija je ujedno ukazala na moguću novu ulogu S-(-)ekvola kao bakterijskog metabolita koji pozitivno utječe na osovinu “crijeva-mozak” u liječenju epilepsije. No, potrebne su buduće studije koje će razjasniti uključenost S-(-)ekvola i crijevne mikrobiote nakon razdoblja akutnih napada (19).

### **3.1.5. Djelovanje kod predmenstrualnog sindroma**

Predmenstrualni sindrom (PMS) uzrokuje smetnje u svakodnevnim aktivnostima mnogih žena. Provedena je preliminarna studija s ciljem ispitivanja učinka S-ekvola na predmenstrualne simptome i na crijevnu mikrobiotu. Sudionice studije u Japanu oralno su uzimale suplement S-(-)ekvola (SE5-OH) tijekom dva kontinuirana menstrualna ciklusa, dvije tablete od 5mg S-(-)ekvola, dva puta dnevno od petog dana ( $\pm 2$ ) menstrualnog ciklusa do početka sljedećeg ciklusa. Ispitanice su bile neproizvođači ekvola jer je uočeno da one imaju izraženije simptome PMS-a. Smatra se da S-(-)ekvol, koji ima veću biološku aktivnost od sojinih izoflavona, svojim selektivnim vezanjem na ER $\beta$ - receptore u mozgu može smanjiti simptome anksioznosti i depresije kod PMS-a. Iako mehanizam djelovanja nije razjašnjen, prethodna ispitivanja na mišjem modelu pokazala su da i neki sojevi roda *Bifidobacterium* povećavaju koncentraciju serotonina i njegovog prekursora 5-hidroksitriptofana u hipokampusu i tako povoljno djeluju na simptome depresije. To je dovelo do zaključka da neki sojevi roda *Bifidobacterium* mogu djelovati zajedno s učincima S-ekvola putem neurotransmisije i tako smanjiti simptome depresije i anksioznosti kod PMS-a. Ova pilot studija dokazala je da suplement SE5-OH može biti prihvatljiva strategija ublažavanja predmenstrualnih simptoma. U tijeku je randomizirano, dvostruko slijepo, placebo kontrolirano ispitivanje od kojeg se očekuje da će dati konačne rezultate (22).

### 3.1.6. Djelovanje na vazomotorne simptome menopauze

Menopauza je neizbježan gubitak proizvodnje hormona jajnika, estrogena i progesterona. Nastupa u srednjoj dobi oko pedesete godine i traje nekoliko godina. Žene u postmenopauzi imaju znatno veći rizik od pretilosti, dijabetesa tip 2, kardiovaskularnih bolesti, osteoporoze i karcinoma dojke za koje se smatra da su uzrokovani nedostatkom estrogena. Nadomjesna terapija estrogenom može dovesti do neočekivanih srčanih događaja, većeg rizika od karcinoma dojke i akutne bolesti jetre osobito kod žena s poviješću tih bolesti. U istočnoazijskim zemljama simptomi menopauze su manje izraženi nego kod žena na zapadu(6). Vazomotorni simptomi kao što su valovi vrućine i noćno znojenje tipične su i uobičajene tegobe žena u zapadnim društvima; Japanke općenito imaju blaže vazomotorne simptome tijekom menopauze, uglavnom se žale na ukočenost ramena i opći umor, što se svrstava u somatske simptome. Manja prevalencija simptoma i bolesti u azijskom stanovništvu pripisuje se većoj konzumaciji soje (4,6).

Takeshi i suradnici su proveli kliničku studiju učinka S-(-)ekvola, (SE5-OH), na žene u postmenopauzi, koje imaju stabilnije simptome menopauze od žena u perimenopauzi, tijekom dvanaest tjedana. U obzir su uzeti samo neproizvođači ekvola kako bi se izbjegao utjecaj uzimanja izoflavona. Jedna tableta S-(-)ekvola, (SE5-OH), sadrži 5,0 mg S-(-)ekvola proizvedenog fermentacijom sojinih klica pomoću *Lactococcus* 20-92, 1,2mg daidzeina, 1,4mg genisteina i 3,1mg gliciteina (izraženo kao aglikonski ekvivalent), 298mg proteina, 113mg masti, 375mg ugljikohidrata, 56mg pepela i 110mg vlakana. Placebo tablete sadrže laktozu umjesto S-(-)ekvola, a po svemu drugome su bile identične SE5-OH suplementu. Ispitanici su podijeljeni u dvije skupine, placebom skupinu (P) i ekvol skupinu (EQ). Zbog relativno brzog farmakokinetičkog klirensa S-(-)ekvola, dnevna doza od 10mg podijeljena je

na dva dijela, 5mg ujutro i 5mg navečer. Usklađenost s obrascem konzumacije i brojem tableta SE5-OH ekvola, procijenjena je u trećem, šestom, devetom i dvanaestom tjednu. Istraživači su koristili više instrumenata za procjenu simptoma menopauze: modificirani obrazac za procjenu klimakteričnih simptoma kojemu je dodana procjena koitalne boli, vizualnu analognu ljestvicu (VAS) i podljestvice Greeneove klimakterične ljestvice, uključujući vazomotorne, psihološke (anksioznost i depresija) i ljestvice somatskih simptoma. Žene neproizvođači ekvola u EQ skupini koje su dnevno primale 10mg S-(-)ekvola tijekom 12 tjedana, izvijestile su o smanjenju učestalosti navale vrućine u usporedbi s placeboom P skupinom, te smanjenje ukočenosti mišića vrata i ramena, što je uobičajena tegoba japanskih žena u postmenopauzi. Iako je poznato da se S-(-)ekvol veže i aktivira ER, mehanizam smanjenja učestalosti navala vrućine još nije objašnjen. Vezano za ukočenost mišića, pretpostavlja se da je izazvana oštećenjem lokalnog protoka krvi, stoga se smatra da utjecaj S-(-)ekvola na endotelnu sintazu dušikovog oksida (NOS) u sustavu mitogenom aktivirane protein kinaze, koja nije posredovana preko ER-a, mogući mehanizam kojim ekvol može smanjiti ukočenost mišića. Simptomi su procijenjeni i šest tjedana nakon završetka intervencije, kada je konzumirani S-(-)ekvol uklonjen iz tijela. Učestalosti i ozbiljnosti simptoma se povećala u EQ, ali ne i u P skupini što daje značajnu vjerodostojnost rezultatima. Provedena je subanaliza koja je pokazala da se smanjenje simptoma menopauze dogodilo isključivo u skupini žena čija je prosječna učestalost navale vrućine bila 4,9 dnevno, što dovodi do zaključka da bi interventni proizvod bio koristan kod žena s češćim valovima vrućine. Ovo istraživanje je prvo izvješće o randomizirano, dvostruko slijepom, placeboom kontroliranom ispitivanju koje pokazuje djelotvornost S-(-)ekvola u obliku SE5-OH, u ublažavanju valova vrućine i ukočenosti mišića vrata ili ramena u žena neproizvođača ekvola u postmenopauzi, što može poslužiti kao obećavajuća alternativa konvencionalnoj hormonskoj terapiji.



Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se procijenila učinkovitost S(-)-ekvola u žena koje nisu Japanke i s vrlo teškim simptomima menopauze, te temeljna istraživanja koja dodatno razjašnjavaju biološko djelovanje S(-)-ekvola (15).

Daily i suradnici su iz sustavnog pregleda i meta-analize randomiziranih kliničkih studija procijenili učinkovitost sojinih izoflavona i ekvola na ublažavanje simptoma menopauze, osobito vazomotornih simptoma, u žena proizvođača i neproizvođača ekvola. Došli su do zaključka da konzumacija sojinih izoflavona ima utjecaj samo na neke žene u menopauzi i da sposobnost proizvodnje ekvola može biti glavna odrednica učinkovitosti. U istraživanje su uključili dvanaest znanstvenih i medicinskih baza podataka na engleskom, korejskom i kineskom jeziku. Šest je studija (ukupno 779 ispitanika) ispunilo sve kriterije za sustavni pregled, od kojih je 5 moglo biti uključeno u meta-analizu (ukupno 728 ispitanika). Nakon provedenog detaljnog istraživanja Daily i suradnici podupiru upotrebu 10mg dnevno S(-)-ekvola u žena u postmenopauzi koje ne proizvode ekvol, te procjenjuju da će žene koje proizvode ekvol, ako jedu hranu bogatu izoflavonima, imati malo dodatne koristi od dodanog ekvola. U studijama nisu primijećeni štetni učinci pa se upotreba ekvola u smanjenju valova vrućine smatra sigurnom (31).

### **3.1.7. Djelovanje na karcinom dojke**

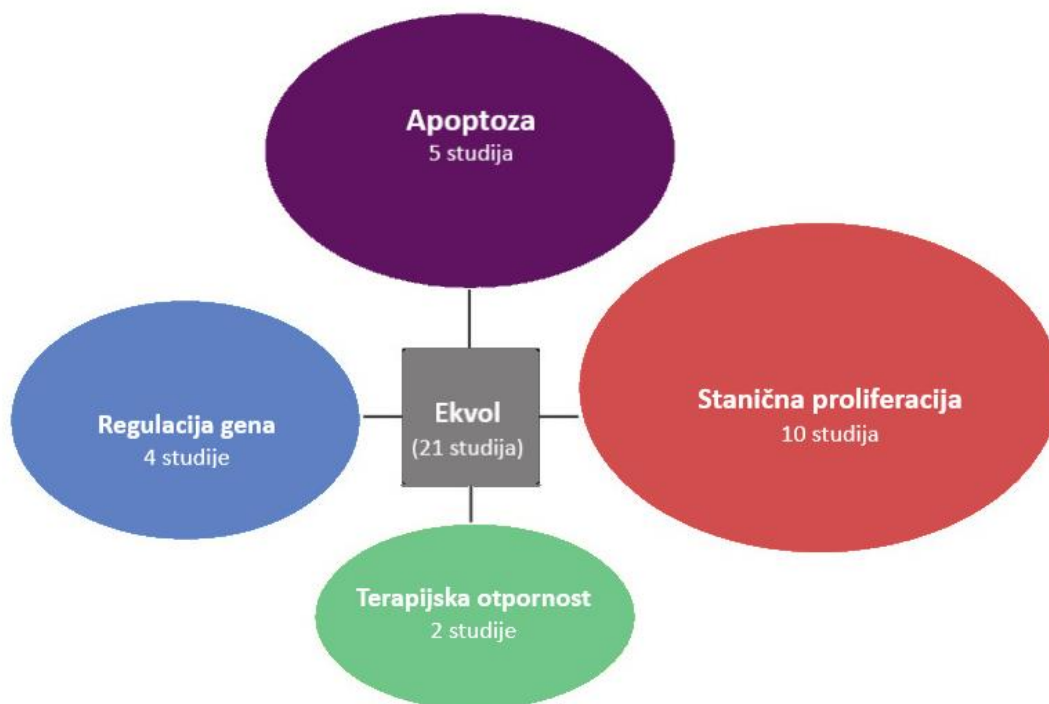
Karcinom dojke je najčešći oblik karcinoma u žena s dobno standardiziranom stopom od 29,1 na 100,000 stanovnika. Kombinacija operacije, radioterapije i kemoterapije i dalje je standard liječenja, iako terapije ometa sistemska toksičnost, neselektivno djelovanje i pojava klonova tumorskih stanica otpornih na lijekove. Preživljavanje pacijenata s metastatskim

karcinomom dojke nije se značajno poboljšalo unatoč razvoju rane dijagnoze i liječenja, a otpornost na više lijekova ostaje glavna prepreka u njegovom liječenju (11).

Opservacijske studije pokazuju da je među azijskim ženama veća konzumacija soje povezana s približno 30 % manjim rizikom od razvoja karcinoma dojke, a posljednji dokazi ukazuju i na smanjeni rizik razvoja karcinoma ako je soja konzumirana kroz djetinjstvo i/ili adolescentsko razdoblje života (4). Unatoč velikom zanimanju za ulogu soje u smanjenju rizika od karcinoma dojke postoji i zabrinutost da hrana od soje, budući da sadrži izoflavone, može povećati vjerojatnost u žena s visokim rizikom da razviju karcinom dojke te pogoršati prognozu oboljelih. No, klinička ispitivanja dosljedno pokazuju da unos izoflavona ne djeluju na monografsku gustoću i proliferaciju stanica ukazujući da se ne povećava rizik od karcinoma dojke (16). Nadalje, epidemiološke studije koje su uključile preko 11,000 žena iz SAD-a i Kine su dokazale da unos soje nakon dijagnoze statistički značajno smanjuje recidiv i pozitivno utječe na preživljenje (16).

Hod i suradnici su 2021 godine objavili sustavni pregled istraživanja o učinku ekvola na karcinom dojke. Svi radovi su objavljeni između 1987. i 2020. godine. Od pregledanih 1113 članaka, 23 članka su zadovoljila kriterije za uključivanje, a obuhvatili su osamnaest *in vitro*, dva *in vivo* i tri *in vitro/in vivo* istraživanja. Četiri studije su ustvrdile da ekvol ne djeluje antikancerogeno, dok je ostalih 13 studija zaključilo da ekvol ima antikancerogena svojstva. Rezultati istraživanja R-(+)ekvola i S-(-)ekvola su pokazali da djeluju na regulaciju gena, staničnu proliferaciju i terapijsku rezistenciju (slika 14). To dokazuje da je sintetski R-(+)ekvol jednako snažan kao i prirodni S-(-)ekvol. Koncentracija R-(+)ekvola se kretala od 0-50  $\mu\text{M}$ , koncentracija S-(-)ekvola u rasponu od 0 do 2063  $\mu\text{M}$ , dok su koncentracije s nespecifičnim enantiomerom ekvola bile u rasponu od 0 do 100  $\mu\text{M}$ . Deset provedenih studija bilo je

usredotočeno na staničnu proliferaciju, od kojih je pet navelo da je ekvol onkogen, a jedna da posjeduje antikancerogena svojstva. No, više je dokaza koji podupiru veće antikancerogeno nego onkogeno djelovanje ekvola, međutim, nejasno je pri kojoj koncentraciji se ostvaruju navedeni učinci. Buduće studije bi trebale to utvrditi kao i razjasniti mehanizme djelovanja u različitim vrstama karcinoma dojke (11).



Slika 14. Putevi djelovanja ekvola, prilagođeno prema (11)

### 3.1.8. Djelovanje na karcinom prostate

Urinarni i spolni organi rezervoari su nekoliko bakterijskih, virusnih i gljivičnih zajednica koje tvore mikrobiom urogenitalnog trakta. Sve više dokaza upućuje na povezanost mikrobioma crijeva i urogenitalnog trakta u urogenitalnim benignim i malignim bolestima. Incidencija karcinoma prostate je niža u istočnoazijskim zemljama nego na zapadu,

a primijećeno je da azijski useljenici u zapadne zemlje koji promjene prehrambene navike češće obolijevaju od karcinoma, što ukazuje da bi izoflavoni soje mogli biti povezani sa smanjenjem rizika od razvoja karcinoma (4, 21). S-(-)ekvol posjeduje snažna antiandrogena svojstva vezanjem na dihidrotestosteron (DHT) koja mogu biti povezana s inhibicijom karcinoma prostate (21). Miyake i suradnici su u preglednoj studiji iznijeli dokaze o povezanosti mikrobioma s kroničnim prostatitisom, benignom hiperplazijom prostate, karcinomom prostate te unosom izoflavona soje (21). Provedena je studija na 28 zdravih japanskih dobrovoljaca koji su proizvođači ekvola. Tijekom tri mjeseca uzimali su dodatke izoflavona soje. U rezultatima nisu primijećene promjene u serumskim razinama estradiola i ukupnog testosterona, međutim, došlo je do značajnog porasta serumskog ekvola i serumskih razina globulina koji veže spolne hormone, te do značajnog pada serumskih razina slobodnog testosterona i DHT-a, što je dovelo do mogućeg smanjenja rizika od karcinoma prostate. Daljnja istraživanja bi trebala pokazati sveobuhvatno razumijevanje korelacije između urogenitalnog mikrobioma i kronične upale prostate, radi razvoja novih strategija za prevenciju karcinoma prostate (21).

### **3.1.9. Djelovanje na zdravlje kože**

Smatra se da su krajnji produkti napredne glikacije (AGE) jedan od čimbenika koji pridonose bolestima i starenju povezanim s načinom života. Budući da je za proizvodnju AGE-a potreban estrogen, razina estrogena u postmenopauzi može utjecati na njegovu koncentraciju. AGE uzrokuje krutost i gubitak elastičnosti kroz umrežavanje tkivnih proteina kao što su kolagen i elastin u krvnim žilama i stanicama kože, stoga se razina AGE-a u koži može odrediti neinvazivno, korištenjem AGE čitača i mjerenjem autofluorescencije kože. Zabilježeni su pozitivni učinci izoflavona na AGE, posebice na inhibiciju njegovog stvaranja, a

uključeno je nekoliko mehanizama: sprječavanje Maillardove reakcije tj. stvaranja spojeva šećera(UH) i proteina, inhibicija oksidacije šećera, masti i aminokiselina (čime se sprječava stvaranje karbonilnih skupina) te sprječavanje pretvorbe Schiffovih baza u karbonilne skupine. Provedena je studija učinka suplementacije ekvola na AGE u kojoj je sudjelovalo dvadeset sedam žena koje su uzimale 10 mg S-(-)ekvola dnevno. Prije intervencije su prikupljeni ranojutarnji uzorci urina u kojima je ekvol određen pomoću imunokromatografske trake (Soy Check, Healthcare Systems Co., Ltd). Ispitanice su se smatrale proizvođačima ekvola ako im je razina ekvola u urinu bila viša od 1,0  $\mu$ M. Od ranije je poznato da estradiol i izoflavoni inhibiraju proizvodnju AGE-a, a studija je pokazala da suplementacija ekvolom ima veliki utjecaj na proizvodnju AGE u određenih žena u postmenopauzi te da se prednosti suplementacije S-(-)ekvolom mogu povećati u žena s inherentnom sposobnošću proizvodnje ekvola (28).

Pad razine estrogena u menopauzi izaziva gubitak kolagena, elastina, funkcije fibroblasta, vaskularizacije, povećava enzimsku aktivnost metaloproteinaze matriksa, što rezultira staničnom i izvanstaničnom degradacijom koja dovodi do suhoće, bora, atrofije, oslabljenog zacjeljivanje rana, smanjenog antioksidacijskog kapaciteta te pojačane percepcije starenja (29). Lephart i suradnici su proveli studiju sa S-(-)ekvolom koji je sastojak nekih pripravaka za kožu. Dokazali su da je S-(-)ekvol selektivni modulator estrogenskih receptora (SERM) te da vezanjem na ER $\beta$  u keratinocitima inhibira starenje kože. ER $\beta$  su šire raspoređeni u koži u usporedbi s ER $\alpha$ , osobito u ljudskom vlasištu. Aktivacija ER $\beta$  potiče zacjeljivanje rana, neovisno o protuupalnim svojstvima estrogena, što znači da SERM-ovi djeluju pozitivno na stanje kože (29). Provedena je i dvostruko slijepa studija u kojoj su žene u postmenopauzi u Japanu tijekom dvanaest tjedana uzimale S-(-)ekvol. Rezultati su pokazali značajno smanjenje bora u usporedbi s placebom grupom (33). Naknadno su rađene studije

primjene ekvola na koži, koji je nakon osam tjedana primjene poboljšao strukturne parametre kože (hrapavost, teksturu, glatkoću, čvrstoću, elastičnost) te smanjio molekularne parametre kože (metilaciju i duljinu telomera u stanicama kože) (33).

Oba izomera ekvola, R-(+)ekvol i S-(-)ekvol pokazuju antioksidacijsko, protuupalno, zaštitno djelovanje na kožu, te specifično antiandrogensko hormonsko djelovanje vezanjem slobodnog 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona (5 $\alpha$ -DHT) kao selektivnog modulatora androgena (SAM) i blokiranjem 5 $\alpha$ -enzim reduktaza tipa I u dermalnim stanicama za zaštitu vitalnosti fibroblasta (30). Iz nedavnih studija analize gena humane kože, učinkovitost ekvola bila je veća od astaksantina za antioksidanse, integritet i razgradnju izvanstaničnog matriksa, faktore rasta i upalne biomarkere, uključujući značajnu stimulaciju faktora protiv starenja, SIRT 1. Stoga se ističu dobra svojstva ekvola za kožu u topikalnoj i oralnoj primjeni (34). No, potrebne su duže, randomizirane kliničke i opservacijske studije utjecaja ekvola na zdravlje kože (29).

### **3.1.10. Djelovanje na pretilost**

Tijekom prelaza u menopauzu žene dobivaju 2-2,5 kg tjelesne mase, uz nepovoljnu redistribuciju masti, što dovodi do visceralne masnoće. Takahashi i suradnici su proveli studiju utjecaja S-(-)ekvola na pretilost žena u menopauzi u Japanu s BMI  $\geq 25$  kg /m<sup>2</sup> i opsegom struka  $\geq 90$  cm. Sudionicama s 1,0  $\mu$ M ili više ekvola u urinu određen je status proizvođača ekvola. Uočeno je da je manji postotak žena s prekomjernom težinom i visceralnom masnoćom u skupini proizvođača ekvola, što je potvrdila i multivarijatna regresijska analiza (30).

Yoshikata i suradnici su proveli studiju u kojoj se ispitivao utjecaj suplementa S-(-) ekvola na visceralnu masnoću. Rezultati su pokazali da je barem jedna vrsta izloženosti ekvolu, bilo kroz proces proizvodnje ekvola ili putem njegove suplementacije, pomogla u sprječavanju

pogoršanja razine visceralne masnoće u žena u postmenopauzi. Pokazalo se da proizvođač ekvola koji konzumira suplement ekvola, posjeduje najučinkovitiji mehanizam za održavanje razine visceralne masti. No, potrebne su duže, randomizirane kliničke i opservacijske studije utjecaja S-(-)ekvola na pretilost, osobito na visceralnu masnoću u menopauzi (28).

## **3.2. DIGITALNA TEHNOLOGIJA U ISTRAŽIVANJU S-(-)EKVOLA**

Kliničke studije novijeg datuma koriste digitalnu tehnologiju u istraživanju S-(-) ekvola kao dio novih metodoloških pristupa. U prošloj 2022. godini objavljene su dvije takve studije. U prvoj je korišten SwissADME računalni prediktivni softver i visokoučinkoviti test propusnosti umjetne membrane (PAMPA) (24). Druga je studija bila *in vitro-in silico* metoda izvedena računalnom simulacijom (9). U studiji iz 2020. godine korišten je validiran, računalno kontroliran TIM-2 *in vitro* model ljudskog debelog crijeva koji se koristi za procjenu učinaka i interakcija mnogih komponenti hrane u crijevima (26).

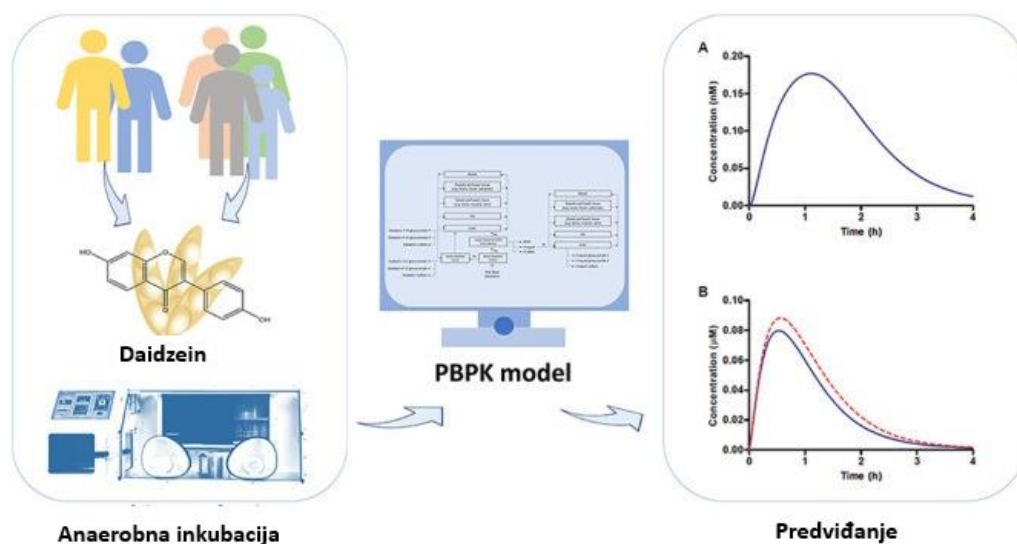
### **3.2.1. SwissADME softver i PAMPA metoda**

Budući da je ranije dokazan blagotvoran učinak S-(-)ekvola i izoflavona soje na središnji živčani i kardiovaskularni sustav, Johnson i suradnici su proveli ispitivanje sposobnosti prolaska izoflavona soje i ekvola kroz barijeru gastrointestinalnog (GI) trakta i krvno-moždanu barijeru (KMB), uz primjenu SwissADME softvera i visokoučinkovitog testa propusnosti umjetne membrane (PAMPA). SwissADME je računalni prediktivni softver koji izračunava ključne fizikalno-kemijske, farmakokinetičke i srodne parametre za jednu ili više molekula, a PAMPA je robusna, svestrana metoda za predviđanje pasivne propusnosti spojeva kroz GI trakt i KMB. PAMPA koristi kombinaciju fosfolipida specifičnih za testiranu membranu i filter

od mikrovlakana za simulaciju biološke membrane. Rezultati dobiveni SwissADME softwerom pokazali su da S-(-)ekvol, genistein i daidzein imaju visoku crijevnu apsorpciju te da S-(-)ekvol i daidzein, ali ne i genistein, prolaze KMB. Primjenom metode PAMPA dokazano je da se S-(-)ekvol brže apsorpira u GI traktu i brže prolazi kroz KMB od daidzeina ili genisteina. Provedena studija je dokazala da S-(-)ekvol lagano prolazi krvno moždanu barijeru i crijevnu barijeru (24).

### 3.2.2. Fiziološki utemeljen farmakokinetički model (PBPK)

Izrađen je fiziološki utemeljen farmakokinetički model (PBPK), kao dio razvoja novog metodološkog pristupa, kojim se predvidio *in vivo* metabolizam daidzeina u čovjeka, prethodno ispitan na štakorima. PBPK model metabolizma crijevne mikrobiote (slika 15) predstavlja jedinstveni alat za predviđanje koncentracija daidzeina i S-(-)ekvola u plazmi, odnosno za predviđanje rezultata bakterijske konverzije daidzeina u S-(-)ekvol (9).

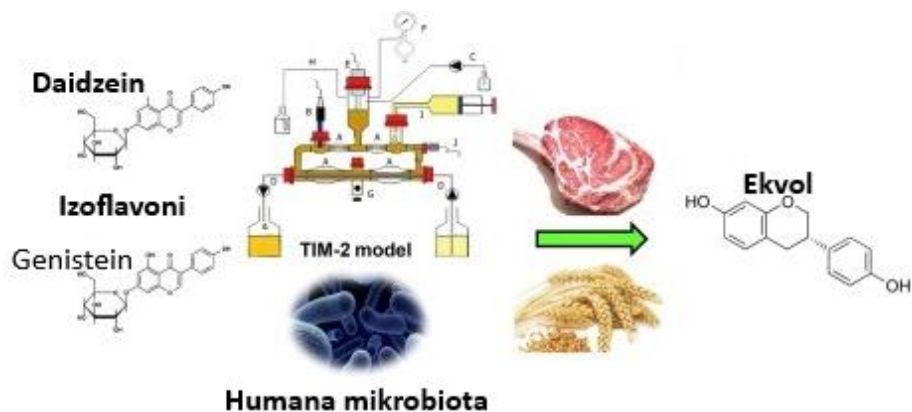


Slika 15. Fiziološki utemeljen farmakokinetički model za predviđanje mikrobne konverzije daidzeina u S-(-)ekvol, prilagođeno prema (9)



### 3.2.3. Utjecaj prehrane na proizvodnju S-(-)ekvola pomoću TIM-2

Provedena je studija u kojoj je korišten skupni fekalni homogenat triju žena koje proizvode ekvol za inokulaciju TIM-2, umjetnog modela ljudskog proksimalnog debelog crijeva s ciljem pronalaska načina prehrane koji pogoduje endogenoj biosintezi ekvola. Model je potaknut kontrolnim dijetama bez suplemenata (C) ili s izoflavonima (C-ISO) te s dvije dijetе suplementirane izoflavonima, a bogate ugljikohidratima (CH-ISO) ili proteinima (PR-ISO). U usporedbi s C-ISO kontrolom, CH-ISO dijeta je udvostručila proizvodnju S-(-)ekvola i povećala koncentraciju maslačne kiseline, dok je s PR-ISO dijetom proizvodnja S-(-)ekvola u kulturama naglo smanjena. Broj većine analiziranih bakterijskih populacija se nije značajno promijenio tijekom uzgoja ni sa jednom od dijeta, međutim, došlo je do smanjenja koncentracije gena *tdr* uključenog u proizvodnju ekvola u svim kulturama te posljedično broja bakterija koje proizvode S-(-)ekvol. Rezultati su pokazali da prehrana bogata ugljikohidratima može pogodovati zdravlju crijeva promicanjem proizvodnje S-(-)ekvola kada su izoflavoni dostupni ili povećanjem koncentracije maslačne kiseline. Rezultate ove *in vitro* studije *trebalo bi potvrditi u uvjetima in vivo jer* na proizvodnju S-(-)ekvola može utjecati izražena individualna heterogenost crijevne mikrobiote u ljudi. Daljnja istraživanja bi trebala otkriti povezanost populacija crijevnih bakterija i prehrane bogate ugljikohidratima s proizvodnjom S-(-)ekvola (26).



Slika 16. Modulacija proizvodnje ekvola putem različitih režima prehrane u umjetnom modelu ljudskog debelog crijeva, prilagođeno prema (26)

### 3.3 FUNKCIONALNA HRANA I DODATAK PREHRANI

#### 3.3.1. Korištenje S-(-)ekvola u funkcionalnoj proizvodnji hrane

S-(-)ekvol je endogeni metabolit daidzeina i formononetina. Zbog nepostojanja specifične crijevne populacije u gastrointestinalnom traktu određenog dijela ljudske populacije, ograničeno je iskorištavanje zdravstvenih dobrobiti ekvola. Inokulacija crijevne stijenke bakterijama koje proizvode S-(-)ekvol iz daidzeina pomoću prebiotika i probiotika do sada nije bila uspješna. Jedna od preostalih mogućnosti su namirnice obogaćene S-(-)ekvolom. Jedna od namirnica koje ljudi konzumiraju, a može sadržavati relevantne količine S-(-)ekvola je kravlje mlijeko. U provedenim studijama najviše koncentracije S-(-)ekvola su bile u mlijeku gdje je izvor izoflavona bila crvena djetelina (4).

Nedavnim istraživanjima došlo se do spoznaje da postupak prerade mlijeka može utjecati na koncentraciju izoflavona. Toplinska obrada mlijeka na 140 °C tijekom 20 minuta nije utjecala na sadržaj izoflavona ali su smanjene koncentracije izoflavona uočene tijekom zrenja sira. Promjene u sadržaju izoflavona su zabilježene tijekom proizvodnje jogurta dok se

koncentracija S-(-) ekvola nije značajno promijenila. Razlog promjenama koncentracije je vjerojatno konjugacija izoflavona s proteinima ili drugim spojevima koji su prirodno prisutni u sastavu mliječnih proizvoda (2).

Iako postoji interes u proizvodnji hrane obogaćene S-(-)ekvolom, tek nekolicina biotehnološki značajnih bakterija proizvode S-(-)ekvol, a koje se mogu primijeniti u hrani. Bakterije koje su općenito priznate kao sigurne (GRAS), poput bakterija mliječne kiseline (BMK) koje se koriste kao starter kulture u fermentaciji hrane ili kao probiotici, ne proizvode S-(-) ekvol iz daidzeina. Provode se genetičke manipulacije BMK heterolognom ekspresijom gena daidzein reduktaze (*dzr*), dihidrodaidzein reduktaze (*ddr*), tetrahidrodaidzein reduktaze (*tdr*) i dihidrodaidzein racemaze (*ifcA*) iz *Slackia isoflavoniconvertens* DSM22006, kloniranjem u plazmid pNZ:TuR, pod jakim konstitutivnim promotorom (TuR). Kombinacijom sojeva *Lactobacillus fermentum*, koji ekspimiraju enzime *S. isoflavoniconvertens* DZNR, DDRC, DHDR i THDR, provedena je uspješna transformacija daidzeina u S-(-)ekvol, kako u hranjivom mediju kulture tako i u kravljem mlijeku (13).

Kako se unutar inicijativa održivosti, sve više na globalnoj razini ulažu napor u ekološko prihvatljivu proizvodnju hrane u svijetu, tako je i analogno zbrinjavanje sirutke kao nusproizvoda proizvodnje soje, koja je bogat izvor daidzeina. Sojina sirutka je glavni tekući nusprodukt industrije prerade sojinih proizvoda, koji je u velikim volumenima potrebno zbrinuti i u industrijskog proizvodnji je otpad koji uzrokuje veliko zagađenje okoliša. Wang i suradnici su uspješno konstruirali rekombinantni soj *Escherichia coli* koja uspješno sintetizira S-(-)ekvol iz sojine sirutke, čime se postiže osim ekološki prihvatljive proizvodnje i sinteza

funkcionalne molekule koja ima obećavajuću perspektivu primjene kao dodatak prehrani, ali moguće i kao inovativna terapijska molekula (14).

### 3.3.2. S-(-)ekvol u dodacima prehrani

S-(-)ekvol ima selektivni afinitet za estrogenski receptor ER $\beta$ , smanjuje razinu 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona i djelovanje androgenog hormona. Stoga je poraslo zanimanje za razvojem potencijalno novog terapijskog sredstva za stanja ovisna o hormonima (33). Donedavno nije bilo moguće klinički intervenirati sa S-(-)ekvolom zbog nedostatka odgovarajućeg proizvoda koji sadrži odgovarajuću količinu S-(-)ekvola. U međuvremenu je bakterija mliječne kiseline, *Lactococcus garvieae* (soj *Lactococcus* 20-92), sa sposobnošću proizvodnje S-(-)ekvola identificirana i izolirana iz ljudskog izmeta(15, 32). Zahvaljujući istraživačkom timu Otsuka Pharmaceutical razvijen je standardizirani prirodni dodatak prehrani koji sadrži S-(-)ekvol (SE5-OH). Razvijen je fermentacijom otopine sojinih klica sa sojem bakterija mliječne kiseline *Lactococcus* 20-92. Sigurnost dodatka SE5-OH je potvrđena u testovima genotoksičnosti, akutne i subkronične toksičnosti te reproduktivne i razvojne toksičnosti (15, 18).



Slika 17. Equelle proizvod na japanskom (A) i američkom tržištu (B)  
(<https://www.otsuka.co.jp/>; <https://www.pharmavite.com/>)

Otsuka Pharmaceutical je započela svoje istraživanje 1996 godine, a šest godina kasnije istraživački tim identificira *Lactococcus 20-92*, bakteriju mliječne kiseline koja proizvodi S-(-) ekvol fermentacijom sojinih klica izravno iz daidzeina u anaerobnim uvjetima. Suradnjom s tvrtkama u SAD-u provedena su mnoga istraživanja koja su 2014. godine rezultirala proizvodom Equelle na japanskom i američkom tržištu (slika 17), dodatkom prehrani koji sadrži S-(-)ekvol (SE5-OH). Ovaj proizvod se koristi za podršku ženama s popratnim fizičkim i mentalnim promjenama tijekom i nakon prijelaznog razdoblja srednje dobi (15, 32).

## 4. RASPRAVA

Ekvol je nesteroidni estrogen molekularnog sastava  $C_{15}H_{14}O_3$ . Postoji u dva enantiomerna oblika R-(+)ekvol i S-(-)ekvol. Oba enantiomera su klinički i farmakološki zanimljive molekule (1, 5). S-(-)ekvol je prirodna molekula koja nastaje pod utjecajem specifičnih bakterija crijevne mikrobiote, u određenih zdravih odraslih osoba, dok je R-(+)ekvol sintetska molekula (5). Subpopulaciju ljudi koja proizvodi S-(-)ekvol, kao odgovor na konzumaciju sojinih izoflavona, nazivamo „proizvođači ekvola“ i u suprotnom „neproizvođači ekvola“ (4, 5, 7, 10). Smatra se da sposobnost stvaranja ekvola definira kliničku učinkovitost soje koja ima važnu ulogu u promjeni sastava crijevne mikrobiote. Stoga je potrebna identifikacija svih korisnih specifičnih sudionika crijevne mikrobiote koji sudjeluju u sintezi ekvola, te precizno razjašnjeni mehanizmi njihovog djelovanja. Time bi se maksimalno iskoristio estrogenski potencijal sojinog izoflavona daidzeina, odnosno njegovog metabolita ekvola, te u konačnici omogućio razvoj i osmišljavanje personalizirane prehrane kod ciljane skupine pacijenata (6, 7). Do danas su opisane različite bakterijske vrste koje proizvode ekvol, a najbrojniji su rodovi unutar porodice *Coriobacteriaceae*. Sinteza ekvola iz daidzeina se odvija procesom višestrukih biokemijskih reakcija kataliziranih enzimima reduktaze i enzimom racemaze. Od iznimne je važnosti da bakterijski sojevi koji sadrže potrebne enzime, koji sudjeluju u pretvorbi daidzeina u ekvol, posjeduju i gene koji kodiraju za tri enzima reduktaze, te gen koji kodira za enzim racemazu. Bakterijski sojevi koji posjeduju potrebne enzime i gene za kodiranje istih su *Lactococcus garvieae* soj 20–92, *Adlercreutzia equalifaciens* soj DSM 19450 i *Slackia Isoflavoniconvertens* soj DSM 22006 (6).

U zemljama istočne Azije, vazomotorni simptomi tijekom menopauze su manje izraženi u usporedbi sa ženama na području Europe i Amerike, a učestalost osteoporoze,

kardiovaskularnih bolesti, demencije i određenih vrsta karcinoma je oko dva do četiri puta manja u usporedbi s zemljama zapada. Uzrok smanjenog oboljenja od navedenih bolesti povezan je s hranom bogatom izoflavonima koji su važna komponenta azijske prehrane (1, 4).

U okviru ovog rada odabrane su kliničke studije koje su prvenstveno uključile parametar određivanja fenotipa pojedinca obzirom na sposobnost proizvodnje ekvola. Rezultati studija su obećavajući. Dokazano je da je S-(-)ekvol snažan antioksidans; smanjuje antioksidacijski stres i upalne procese povezane s pojavom niza bolesti (7, 19, 24). Ključni je čimbenik antiaterogenog utjecaja sojinih izoflavona jer smanjuje krutost arterija i povećava protok krvi, čime se objašnjava njegov pozitivan učinak na kardiovaskularne bolesti, prevalenciju blagog kognitivnog oštećenja i demenciju (17, 20, 23, 24). S-(-)ekvol inhibira resorpciju kostiju, što se dokazalo smanjenim koncentracijama izlučivanja deoksipiridinolina u urinu, a na animalnom modelu pokazuje veliki potencijal u liječenju epilepsije (17, 19). Dokazano je da se S-(-)ekvol, kao suplement SE5-OH, može koristiti u ublažavanju predmenstrualnih simptoma kao što su anksioznost i depresija, te da može biti obećavajuća alternativa konvencionalnoj hormonskoj terapiji u menopauzi za ublažavanje valova vrućine, nakupljanja visceralne masnoće i smanjenje ukočenosti mišića glave i ramena (15, 22, 28). Provedene su studije utjecaja S-(-)ekvola na karcinom dojke i prostate u kojima S-(-)ekvol iskazuje veća antikancerogena nego antiaterogena svojstva. Koncentracije i put kojim najbolje iskazuje antikancerogeni učinak još uvijek se istražuju (11, 21). Ekvol se može smatrati aktivnim sastojkom u topikalnoj i oralnoj kozmetičkoj primjeni jer inhibira stvaranje krajnjeg produkta napredne glikacije (AGE) koji je odgovoran za gubitak elastičnosti u stanicama kože(29). Vezanjem na ER $\beta$  u keratinocitima inhibira proces starenja kože (29, 30).

Ovim radom su obuhvaćene i nedavne kliničke studije koje su uspješno pristupile istraživanju ekvola korištenjem moderne digitalne tehnologije. Korišten je SwissADME

računalni prediktivni softver i visokoučinkoviti test propusnosti umjetne membrane (PAMPA) gdje je dokazano da S-(-) ekvol lagano prolazi krvno moždanu barijeru i crijevnu barijeru GIT-a (24). Kompjuterska računalna simulacija *in vitro*–*in silico* je predvidjela rezultate bakterijske konverzije daidzeina u ekvol (9). Uspješno je izrađen TIM-2, računalno kontroliran, dinamički *in vitro* model ljudskog proksimalnog debelog crijeva kojim se istražuje utjecaj prehrane na sintezu ekvola (26).

U hranjivom mediju uzgojene kulture i u kravljem mlijeku učinkovito je transformiran daidzein u ekvol združenom primjenom sojeva *L. fermentum* i enzima *S. isoflavoniconvertens* DZNR, DDRC, DHDR i THDR čime se otvara mogućnost razvoja fermentirane hrane obogaćene ekvolom (13). Uspješno je konstruiran i rekombinantni soj *Echerichia coli* koja sintetizira S-(-) ekvol iz sojine sirutke, nusproizvoda proizvodnje soje (14).

Izolirana je i identificirana bakterija mliječne kiseline *Lactococcus garvieae* (soj *Lactococcus* 20-92), sa sposobnošću proizvodnje S-(-)ekvola. Fermentacijom otopine sojinih klica upravo sojem bakterije *Lactococcus* 20-92, razvijen je standardizirani prirodni dodatak prehrani (SE5-OH) koji sadrži S-(-)ekvol. U tijeku su brojne studije utjecaja SE5-OH na ljudsko zdravlje (15, 18).

Istraživanja u uvjetima *in vitro* i animalne studije mogu predvidjeti utjecaj izoflavona na ljudsko zdravlje, međutim, za primjenu u praksi relevantne su kliničke studije. Brojne kliničke studije s izoflavonima imaju ograničenja uslijed male veličine uzorka, odnosno broja ispitanika, kratkog trajanja ispitivanja, nepostojanja odgovarajućih kontrola, upotrebe izoflavona iz različitih izvora, dodataka s različitim sadržajem aglikona, izostanka definiranja fenotipa ispitanika obzirom na sposobnosti proizvodnje ekvola te drugih metodoloških nedostataka. Sve je to dovelo do nedosljednih rezultata o zdravstvenim dobrobitima soje, pa je potrebno provesti duže, randomizirane kliničke i opservacijske studije (4).



## 5. ZAKLJUČAK

Istraživanja su pokazala da S-(-)ekvol nastaje isključivo metabolizmom crijevnih bakterija, ali samo u jednom dijelu ljudske populacije. Puno je još nepoznanica o specifičnim mikroorganizmima mikroflore koji metaboličkom aktivnošću proizvode S-(-)ekvol, a najbrojniji proizvođači pripadaju rodovima porodice *Coriobacteriaceae*. Mikrobna pretvorba daidzeina u S-(-)ekvol je proces u više biokemijskih reakcija u kojem sudjeluju tri enzima reduktaze i enzim racemaza. Pokazalo se da je od iznimne važnosti, prije provođenja kliničkih studija, definirati skupine ispitanika prema sposobnosti njihove crijevne mikroflore da stvara metabolit S-(-)ekvol jer će pripravci na bazi soje i crvene djeteline biti učinkoviti samo u „proizvođača ekvola“.

Iako mehanizam djelovanja S-(-)ekvola još nije u potpunosti razjašnjen, dosadašnje znanstvene spoznaje ukazuju da je on selektivni modulator beta estrogenskih receptora (SERM). Nadalje, dokazano je da S-(-)ekvol ima antioksidacijska svojstva i antiaterogeni potencijal, što doprinosi pozitivnim učincima na kardiovaskularne bolesti, prevalenciju blagog kognitivnog oštećenja i demenciju. Dokazan mu je i pozitivan učinak na starenje kože u nedostatku estrogena. Nadalje, istraživanja su pokazala da inhibira resorpciju kostiju i rast određenih tumorskih stanica. Primjenom animalnih modela, opisani su i funkcionalni učinci S-(-)ekvola na osovini crijeva-mozak. Sve navedeno ukazuje na veliki potencijal S-(-)ekvola kao inovativnog sredstva za profilaksu i liječenje brojnih oboljenja. No, potrebno je provesti opsežnije, randomizirane kliničke te opservacijske studije da bi se dobila dostatna razina dokaza o djelovanju ekvola u ljudskom organizmu.

## 6. LITERATURA

1. Sánchez-Calvo JM, Rodríguez-Iglesias MA, Molinillo JMG, Macías FA. Soy isoflavones and their relationship with microflora: beneficial effects on human health in equol producers. *Phytochem Rev* 2013;12:979–1000.
2. Křížová L, Dadáková K, Kašparovská J, Kašparovský T. Isoflavones. *Molecules* 2019; 19:24(6):1076.
3. Silva H. The vascular effects of isolated isoflavones-A focus on the determinants of blood pressure regulation. *Biology (Basel)* 2021;10(1):49.
4. Mayo B, Vázquez L, Flórez AB. Equol: A Bacterial metabolite from the daidzein isoflavone and its presumed beneficial health effects. *Nutrients* 2019;11(9):2231.
5. Setchell KD, Clerici C. Equol: history, chemistry, and formation. *J Nutr* 2010;140(7):1355S-62S.
6. Leonard LM, Choi MS, Cross TL. Maximizing the estrogenic potential of soy isoflavones through the gut microbiome: Implication for cardiometabolic health in postmenopausal women. *Nutrients* 2022;14(3):553.
7. 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.
8. Messina M. Soy and Health Update: Evaluation of the Clinical and Epidemiologic Literature. *Nutrients* 2016;8(12):754.
9. Wang Q, Spenkelink B, Boonpawa R, Rietjens IMCM. Use of physiologically based pharmacokinetic modeling to predict human gut microbial conversion of daidzein to S-Equol. *J Agric Food Chem* 2022;70(1):343-352.
10. Setchell KD, Clerici C. Equol: pharmacokinetics and biological actions. *J Nutr* 2010;140(7):1363S-8S.
11. Hod R, Maniam S, Mohd Nor NH. A systematic review of the effects of equol (soy metabolite) on breast cancer. *Molecules* 2021;26(4):1105.

12. Marchesi JR, Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome* 2015;3:31.
13. Ruiz de la Bastida A, Peirotn Á, Langa S, Arqués JL, Landete JM. Heterologous production of equol by lactic acid bacteria strains in culture medium and food. *Int J Food Microbiol* 2021;360:109328.
14. Wang Z, Li X, Azi F. i sur. Biosynthesis of (S)-Equol from soy whey by metabolically engineered *Escherichia coli*. *J Agric Food Chem* 2023;71(15):6110–6119
15. Aso T, Uchiyama S, Matsumura Y. i sur. A natural S-equol supplement alleviates hot flushes and other menopausal symptoms in equol nonproducing postmenopausal Japanese women. *J Womens Health (Larchmt)* 2012;21(1):92-100.
16. Messina M. Impact of soy foods on the development of breast cancer and the prognosis of breast cancer patients. *Forsch Komplementmed* 2016;23(2):75-80.
17. Yoshikata R, Myint KZY, Ohta H. Effects of Equol supplement on bone and cardiovascular parameters in middle-aged Japanese women: A prospective observational study. *J Altern Complement Med* 2018;24(7):701-708.
18. Aso T. Equol improves menopausal symptoms in Japanese women. *J Nutr* 2010;140(7):1386S-9S.
19. Gallucci A, Patel DC, Thai K, Trinh J. i sur. Gut metabolite S-equol ameliorates hyperexcitability in entorhinal cortex neurons following Theiler murine encephalomyelitis virus-induced acute seizures. *Epilepsia* 2021;62(8):1829-1841.
20. Sekikawa A, Ihara M, Lopez O. i sur. Effect of S-equol and soy isoflavones on heart and brain. *Curr Cardiol Rev* 2019;15(2):114-135.
21. Miyake M, Tatsumi Y, Ohnishi K. i sur. Prostate diseases and microbiome in the prostate, gut, and urine. *Prostate Int* 2022;10(2):96-107.
22. Takeda T, Chiba Y. Evaluation of a natural S-equol supplement in treating premenstrual symptoms and the effect of the gut microbiota: An open-label pilot study. *Neuropsychopharmacol Rep*. 2022;42(2):127-134.

23. Setchell KDR. The history and basic science development of soy isoflavones. *Menopause* 2017;24(12):1338-1350.
24. Sekikawa A, Wharton W, Butts B. i sur. Potential protective mechanisms of S-equol, a metabolite of soy isoflavone by the gut microbiome, on cognitive decline and dementia. *Int J Mol Sci* 2022;7;23(19):11921.
25. Peñalvo J, Nurmi T, Adlercreutz H. Simplified HPLC method for total isoflavones in soy products. *Food Chemistry* 2004;87.297-305.
26. Vázquez LF, Verbruggen A, Sanne Redruello B, Verhoeven J, Venema K, Mayo B. Modulation of equol production via different dietary regimens in an artificial model of the human colon. *J Funct Foods* 2020;66.103819.
27. Tanaka M, Fujii S, Inoue H, Takahashi N, Ishimi Y, Uehara M. (S)-Equol is more effective than (r)-equol in inhibiting osteoclast formation and enhancing osteoclast apoptosis, and reduces estrogen deficiency-induced bone loss in mice. *J Nutr* 2022;152(8):1831-1842.
28. Yoshikata R, Myint KZY, Ohta H, Ishigaki Y. Effects of an equol-containing supplement on advanced glycation end products, visceral fat and climacteric symptoms in postmenopausal women: A randomized controlled trial. *PLoS One* 2021;10;16(9):e0257332.
29. Lephart ED, Naftolin F. Menopause and the skin: Old favorites and new innovations in cosmeceuticals for estrogen-deficient skin. *Dermatol Ther (Heidelb)* 2021;11(1):53-69.
30. Takahashi A, Anzai Y, Tanji N. i sur. Association of equol with obesity in postmenopausal women. *Menopause* 2021;28(7):807-810.
31. Daily JW, Ko BS, Ryuk J, Liu M, Zhang W, Park S. Equol decreases hot flashes in postmenopausal women: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *J Med Food* 2019;22(2):127-139.
32. Setchell KD, Zhao X, Shoaf SE, Ragland K. The pharmacokinetics of S-(-)equol administered as SE5-OH tablets to healthy postmenopausal women. *J Nutr* 2009;139(11):2037-43.

33. Oyama A, Ueno T, Uchiyama S. *in vitro*. The effects of natural s-equol supplementation on skin aging in postmenopausal women: a pilot randomized placebo-controlled trial. *Menopause J N Am Soc* 2012;19:202–210.
34. Lephart ED. Equol's efficacy is greater than astaxanthin for antioxidants, extracellular matrix integrity and breakdown, growth factors and inflammatory biomarkers via human skin gene expression analysis. *J Funct Foods* 2019;59:380–393.