

УДК 579.864+616-095+579.61:615.27

К.В. Типлинська, Л.Б. Орябінська, В.Ю. Горчаков

ВИЗНАЧЕННЯ ВПЛИВУ ПРОБІОТИКІВ НА СТЕРОЇДНИЙ ПРОФІЛЬ ЖІНОК У ПЕРІОД МЕНОПАУЗИ

Women have violation of sexual hormones synthesis in the period of menopause. Key manifestations of insufficient synthesis of androgens are decrease of bones density, memory worsening, diminishing of the muscular mass, violation of the ovaries functions and sexual disfunction. In modern medicine disorders of sexual hormones synthesis are corrected by the hormones therapy which has by-effects. We demonstrate that probiotic can serve as supporting therapy for women with disfunction of androgens. Efficiency of probiotic therapy was determined by the individual sensitivity of patients to medicinal products. We determine that the most drastic influence of probiotics was rendered on the increase of testosterone and dehydroepiandrosteron concentration in the organism, and on the renewal of the normal correlation of these steroids to other hormones. These steroids are influenced by substantial changes with age so the increase of their concentration under the impact of probiotics can positively influence metabolism in organism. The obtained results make it possible to examine probiotics as supporting therapy for women in the menopause period.

Вступ

Відомо, що в жінок у період менопаузи значно порушується синтез статевих гормонів, зокрема андрогенів. Причинами таких порушень можуть бути не лише вікові зміни, а й дисфункція гіпоталамусно-гіпофізарної осі, недостатня функція яєчників, надниркова недостатність, синдром Кушинга, вживання естрогенів [1]. Основними проявами недостатнього синтезу андрогенів є зменшення щільності кісток [2], погіршення самопочуття, погіршення пам'яті та розумової діяльності [1, 3], зменшення м'язової маси, порушення функції яєчників [4], а також сексуальна дисфункція [5].

В сучасній медицині розлади в синтезі статевих гормонів у жінок в період менопаузи та пременопаузи часто коригують за допомогою гормональної терапії. Однак така терапія має ряд небажаних побічних явищ, а іноді навіть значно впливає на погіршення стану хворих. Літературні дані свідчать, що вживання дегідроепіандростерону (DHEA) може призвести до депресивних станів і навіть стимулювати розвиток ракових захворювань [6]. Тестостерон і метилтестостерон мають виражену андрогенність, що проявляється у вигляді гірсутизму, зміни в голосовому апараті та вірилізації. Щодо метилтестостерону, то він взагалі є одним із найбільш токсичних екзогенних стероїдів. До того ж ці гормони можуть впливати на підвищення агресивності [1].

Тому актуальним є розроблення безпечного методу лікування, який можна застосовувати для широкого кола жінок. Таким методом може стати пробіотикотерапія.

У низці праць було показано, що систематичне вживання пробіотиків спричиняє зміну концентрації кортизолу та прогестерону в крові піддослідних тварин, впливає на підвищення рівня пролактину, адренкортикотропного гормону (АКТГ), кортизолу, тиреотропного гормону та на зменшення концентрації тироксину [4, 7]. Оскільки процес синтезу стероїдних гормонів, у т.ч. й андрогенних, у надниркових залозах регулює АКТГ [4], то можна припустити вірогідність появи змін стероїдного дзеркала під впливом вживання пробіотиків. Механізм впливу пробіотиків на стероїдний профіль може бути також пов'язаний з інгібуванням синтезу деяких фекальних ферментів патогенною флорою, зокрема β -глюкуронідази [8]. Оскільки стероїди виводяться з організму переважно у вигляді глюкуронідів, то надлишок синтезу цих ферментів патогенними бактеріями може призвести до порушення виведення гормонів з організму та вплинути на обмін стероїдних гормонів у цілому. Крім того, велика кількість мікроорганізмів, включаючи лактобактерії, мають 17- β редуктазу та здатні безпосередньо метаболізувати стероїди [9]. Здатність пробіотичних штамів впливати на обмін ліпідів і холестерину також може опосередковано свідчити про вплив пробіотиків на обмін стероїдних гормонів, оскільки холестерин (який є попередником гормонів стероїдного ряду) через ряд ферментативних реакцій перетворюється на DHEA [5].

Узагальнюючи сказане вище та беручи до уваги здатність пробіотиків впливати на процеси обміну речовин [7], можна припустити, що цей клас препаратів є перспективним для їх

використання жінками в період менопаузи з метою корекції гормональних порушень.

Постановка задачі

Метою роботи є виявлення впливу індивідуально підібраних пробіотиків на профіль стероїдних гормонів у жінок в період менопаузи.

Матеріали і методи

У дослідженні брали участь 5 добровольців віком від 45 до 50 років. Для всіх жінок було проведено обстеження з використанням аналізу спектрально-динамічних характеристик (СДХ), а також попереднє визначення стероїдного профілю сечі протягом 2 місяців. Запис СДХ препаратів, що досліджувались, був здійснений за допомогою комплексу спектрально-динамічного з використанням електрода "Інта". Обробку спектрів проводили застосовуючи програму "Family Doctor". Запис СДХ для представників експериментальної групи проводився згідно з методичними вказівками [10]. Підбір пробіотиків здійснювали через порівняння СДХ добровольців та препаратів.

Для дослідження відібрали такі пробіотики: "Йогурт" (виробник "Pharmascience Inc.", Montreal, Canada (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bifidus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subspecies bulgaricus*)) і "Лацидофіл" (виробник Institut Rosell Inc., Montreal, Canada (*Lactobacillus rhamnosus* R0011, *Lactobacillus acidophilus* R0052)). Препарати вживали за такою схемою: 2 тижні по 1 капсулі двічі на день, 2 тижні перерви, 2 тижні по 1 капсулі двічі на день.

Аналіз стероїдного профілю здійснювали протягом двох місяців до початку вживання пробіотиків, на другий місяць вживання препаратів і протягом першого місяця після закінчення вживання препаратів. Було досліджено концентрації таких гормонів: андростерон (А), етіохоланолон (Et), дегідроепіандростерон (DHEA), епітестостерон (Е), тестостерон (Т), а також їх співвідношень андростерон/етіохоланолон (А/Et), тестостерон/епітестостерон (Т/Е) і дегідроепіандростерон/епітестостерон (DHEA/Е). Перелік гормонів та їх співвідношень для дослідження було вибрано згідно з рекомендаціями ВАДА стосовно аналізу ендogenous стероїдного профілю та з урахуванням особливостей жіночого стероїдного профілю [11].

Відповідно до наших попередніх досліджень і літературних даних [12] було визначено, що співвідношення стероїдів залежать від фази менструального циклу. Тому відбір проб було проведено у чітко визначені дні. У дослідженні використовували порівняння максимальних і мінімальних значень співвідношень до та після вживання пробіотиків.

Аналіз стероїдного профілю проводили методом газової хроматографії з мас-спектрометричним детектуванням (GC/MS) за допомогою квадрупольного газового хромато-мас-спектрометра FOCUS DSQ II, що оснащений системою автоматичного введення проби. Хроматографічне розділення проводили за допомогою капілярної колонки HP-1 (15 м, 0,2 мм, 0,21 нм) з привитою фазою 100 % метилсилоксан.

Визначення часу виходу метаболітів, а також основних характеристичних іонів здійснювали за допомогою запису хроматограм у режимі full scan (повного іонного току). Подальший аналіз стероїдного профілю здійснювали в режимі SIM (реєстрації вибраного іона). Кількісне визначення проводили по 432-му іону для Т, Е, DHEA та по 434-му іону для А, Et.

Попередня підготовка зразків включала такі стадії: твердофазову екстракцію, гідроліз, рідинно-рідинну екстракцію, дериватизацію. Твердофазову екстракцію проводили за допомогою картриджів C18 (UCT). Для ферментативного гідролізу використовували β-глюкуронідазу з *E. coli* типу K-12 (Roche). Як екстрагент при рідинній екстракції застосовували діетиловий ефір (ACROS ORGANICS). Дериватизацію проводили силілюванням за допомогою суміші MSTFA/DTE/NH₄I (1000:2:4 = v:w:w).

У дослідженні було використано такі стандартні зразки: тестостерон (SIGMA-ALDRICH), епітестостерон (SIGMA-ALDRICH), етіохоланолон (SIGMA-ALDRICH), андростерон (ACROS ORGANICS), дегідроепіандростерон (ACROS ORGANICS), а як внутрішній стандарт – метилтестостерон (ACROS ORGANICS).

Результати і їх обговорення

Для всіх волонтерів було проведено попередню діагностику стану здоров'я методом порівняння СДХ і дослідження стероїдного профілю. Результати дослідження та дані підбору препаратів наведено у табл. 1.

Таблиця 1. Основні відхилення в роботі ендокринної системи у волонтерів

Номер волонтера	Підібраний препарат	Діагностика СДХ	Попередній аналіз стероїдного профілю
1	Йогурт	Дегенеративний процес у яєчниках, клімакс	Пригнічений стероїдний профіль,
2	Йогурт	Дегенеративний процес у яєчниках, клімакс	Мала зміна продукування гормонів протягом циклу
3	Йогурт	Дегенеративний процес у яєчниках, клімакс, надлишковий синтез чоловічих статевих гормонів	Протягом 2-х місяців тестостерон не виявлений у жодній з проб, мала зміна продукування гормонів протягом циклу
4	Лацидофіл	Дегенеративний процес у яєчниках, клімакс	Мала зміна продукування гормонів протягом циклу
5	Лацидофіл	Дегенеративний процес у яєчниках, клімакс	Мала зміна продукування гормонів протягом циклу

Таблиця 2. Концентрації ендogenous стероїдів у сечі волонтерів

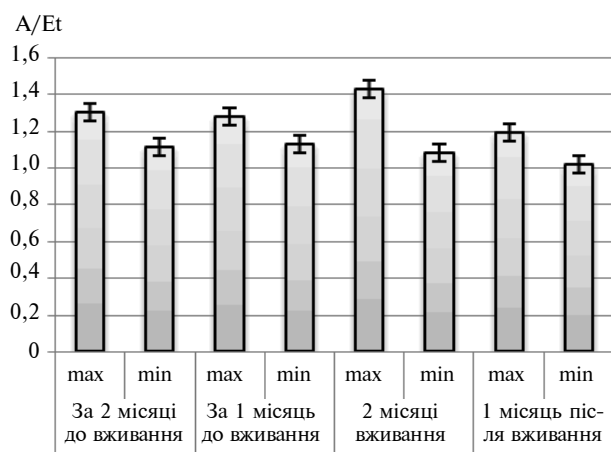
Номер волонтера	1-й місяць до вживання пробіотиків		2-й місяць до вживання пробіотиків		2-й місяць вживання пробіотиків		1-й місяць після вживання пробіотиків	
	max	min	max	min	max	min	max	min
Концентрація андростерону, нг/мл								
1	416,85 ± 70,86	209,46 ± 35,61	417,59 ± 70,99	265,94 ± 45,21	564,91 ± 96,03	379,00 ± 64,43	539,03 ± 91,95	433,82 ± 73,75
2	408,63 ± 59,47	172,14 ± 29,26	395,95 ± 67,31	190,45 ± 32,38	760,83 ± 129,34	379,02 ± 64,43	563,72 ± 95,83	465,29 ± 79,10
3	792,22 ± 134,68	228,98 ± 38,93	521,85 ± 88,71	301,48 ± 51,25	907,13 ± 154,21	634,25 ± 107,82	827,31 ± 140,64	693,12 ± 117,83
4	651,30 ± 110,72	237,86 ± 40,44	600,43 ± 102,07	405,68 ± 68,97	562,75 ± 95,67	170,37 ± 28,96	475,67 ± 80,86	190,43 ± 32,37
5	529,95 ± 90,09	134,72 ± 22,90	500,13 ± 85,02	378,65 ± 64,37	598,27 ± 101,71	451,54 ± 76,76	549,06 ± 93,34	490,67 ± 83,41
Концентрація етіохоланолону, нг/мл								
1	374,09 ± 63,60	161,13 ± 27,39	369,55 ± 62,82	235,35 ± 40,01	452,93 ± 77,00	332,59 ± 56,54	480,38 ± 81,66	397,71 ± 67,61
2	489,03 ± 83,14	160,99 ± 27,37	455,11 ± 77,37	179,67 ± 30,54	849,70 ± 14,45	365,20 ± 62,08	563,61 ± 95,81	527,30 ± 89,64
3	772,16 ± 131,27	264,56 ± 44,98	539,81 ± 91,77	287,12 ± 48,81	765,96 ± 130,21	549,23 ± 93,37	732,13 ± 124,46	592,41 ± 100,71
4	1290,93 ± 219,46	355,53 ± 60,44	888,39 ± 151,03	488,15 ± 82,99	1107,18 ± 188,22	200,44 ± 34,07	849,41 ± 144,40	224,04 ± 38,09
5	684,87 ± 116,43	91,39 ± 15,54	513,99 ± 87,38	341,97 ± 58,13	705,07 ± 119,86	557,87 ± 94,84	703,92 ± 119,67	582,48 ± 99,02
Концентрація тестостерону, нг/мл								
1	< МД*	< МД	< МД	< МД	2,51 ± 0,43	1,95 ± 0,33	3,00 ± 0,51	2,23 ± 0,38
2	4,80 ± 0,82	2,49 ± 0,42	4,40 ± 0,75	2,75 ± 0,47	2,69 ± 0,46	1,82 ± 0,31	3,69 ± 0,63	2,39 ± 0,41
3	< МД	< МД	< МД	< МД	2,67 ± 0,45	1,95 ± 0,33	2,97 ± 0,50	1,41 ± 0,24
4	< МД	< МД	< МД	< МД	3,98 ± 0,68	< МД	2,01 ± 0,34	< МД
5	3,80 ± 0,65	2,93 ± 0,50	9,39 ± 1,6	3,26 ± 0,55	3,50 ± 0,60	1,82 ± 0,31	3,40 ± 0,58	1,53 ± 0,26
Концентрація епітестостерону, нг/мл								
1	5,66 ± 0,96	4,51 ± 0,77	5,47 ± 0,93	4,32 ± 0,73	2,85 ± 0,48	2,28 ± 0,39	3,80 ± 0,65	2,21 ± 0,38
2	9,62 ± 1,64	4,91 ± 0,83	8,62 ± 1,47	5,86 ± 1,00	5,65 ± 0,96	2,61 ± 0,44	8,11 ± 0,38	4,29 ± 0,73
3	14,60 ± 2,48	6,39 ± 1,09	8,67 ± 1,47	5,83 ± 0,99	6,69 ± 1,14	3,70 ± 0,63	5,83 ± 0,99	3,45 ± 0,59
4	10,88 ± 1,85	3,01 ± 0,51	8,85 ± 1,50	3,75 ± 0,64	7,05 ± 1,20	4,74 ± 0,81	6,18 ± 1,05	2,49 ± 0,42
5	7,15 ± 1,22	5,59 ± 0,95	17,40 ± 2,96	5,72 ± 0,97	11,75 ± 2,00	2,21 ± 0,38	10,97 ± 1,86	3,52 ± 0,60
Концентрація дегідроепіандростерону, нг/мл								
1	8,87 ± 1,51	5,04 ± 0,86	8,33 ± 1,42	6,62 ± 1,13	8,36 ± 1,42	3,68 ± 0,63	9,28 ± 1,58	3,62 ± 0,62
2	11,28 ± 1,92	7,17 ± 1,22	13,21 ± 2,25	6,46 ± 1,10	9,34 ± 1,59	3,77 ± 0,64	12,71 ± 2,16	10,09 ± 1,72
3	13,07 ± 2,22	8,24 ± 1,40	11,01 ± 1,87	5,72 ± 0,97	30,86 ± 5,25	5,61 ± 0,95	26,83 ± 4,56	5,41 ± 0,92
4	13,09 ± 2,23	0,97 ± 0,16	10,18 ± 1,73	1,31 ± 0,22	16,93 ± 2,88	2,87 ± 0,49	8,24 ± 1,40	3,90 ± 0,66
5	10,86 ± 1,85	2,32 ± 0,39	11,95 ± 2,03	1,37 ± 0,23	22,40 ± 3,81	16,63 ± 2,83	17,19 ± 2,92	12,01 ± 2,04

* – < МД – концентрація тестостерону нижча межі детектування даної методики (0,2 нг/мл).

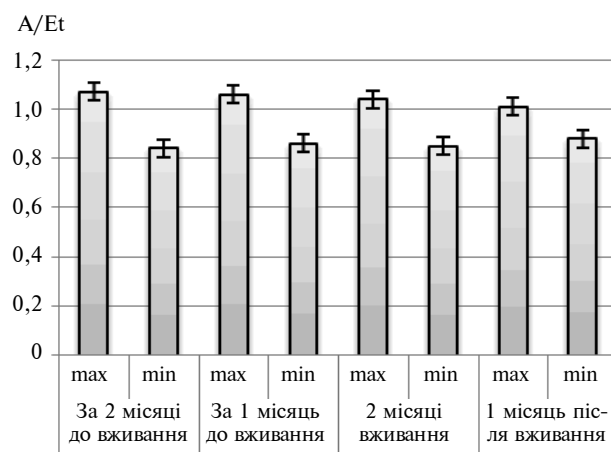
Дані щодо концентрації ендогенних стероїдів у сечі волонтерів у динаміці наведені в табл. 2.

Як свідчать дані табл. 2, мінімальне значення концентрації андростерону для всіх во-

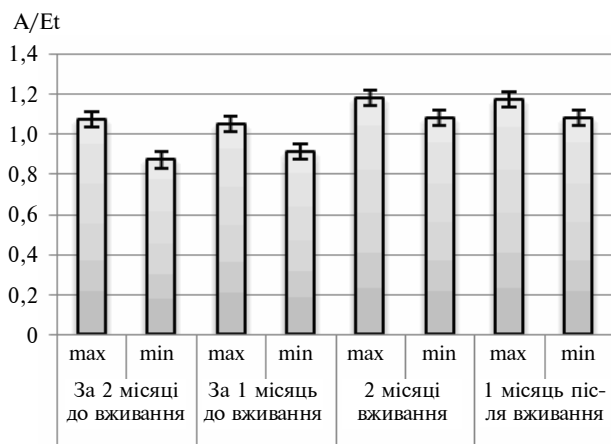
лонтерів до вживання пробіотиків було дещо нижчим за допустиму межу для жінок у період пременопаузи (min 270–max 1144 нг/мл [13]). Зниження концентрації андростерону з віком характерне для жіночого організму, але така змі-



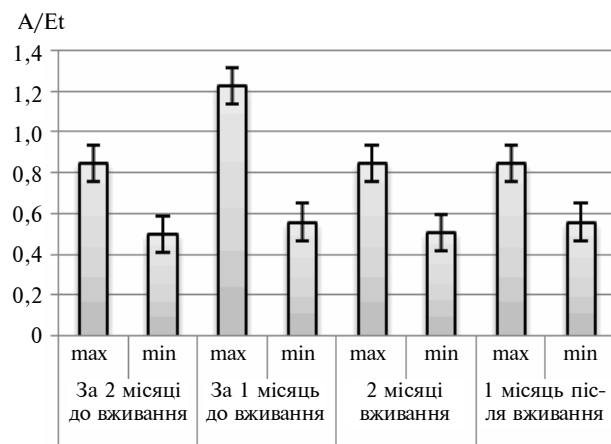
а



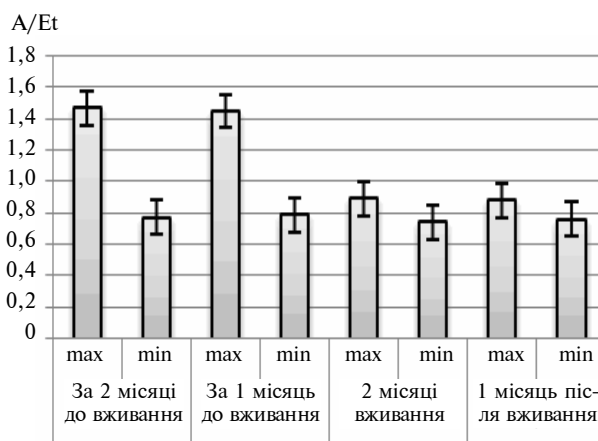
б



в



г



д

Рис. 1. Співвідношення А/Ет до та після вживання пробіотиків: а – волонтер 1, б – волонтер 2, в – волонтер 3, г – волонтер 4, д – волонтер 5

на може призвести до метаболічних порушень і сексуальних дисфункцій. Після проведення курсу пробіотикотерапії концентрація андростерону зросла у всіх волонтерів, крім 4, і зали-

шалась на досить високому рівні навіть через місяць після вживання препаратів: max 539,03–827,31 і min 433,82–693,12 нг/мл. Аналогічна картина спостерігалась і з етіохоланолоном – у

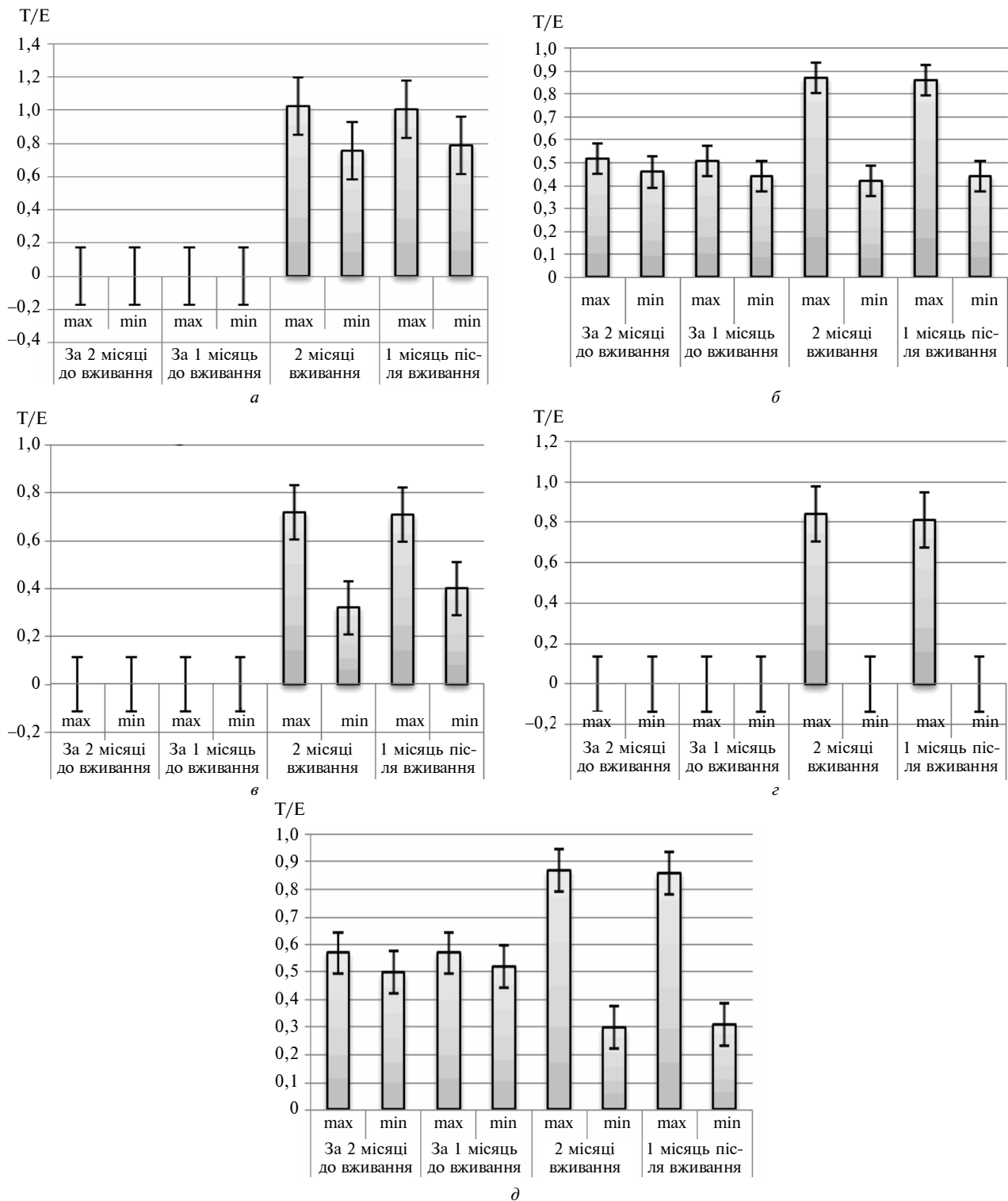


Рис. 2. Співвідношення Т/Е до та після вживання пробіотиків: а – волонтер 1, б – волонтер 2, в – волонтер 3, г – волонтер 4, д – волонтер 5

волонтерів 1, 2 і 4 до пробіотикотерапії спостерігався дещо занижений рівень цього гормону. Після курсу вживання пробіотиків рівень етіохоланолону для усіх волонтерів, крім 4, значно підвищився.

Відомо, що співвідношення андростерону та етіохоланолону є цінним діагностичним критерієм для виявлення дефіциту 5α -редуктази, 11β -гідроксилазного, 17α -гідроксилазного, $17,21$ -десмолазного дефіциту та походження гіперандрогенії (надниркового чи яєчникового типу) [14]. У всіх волонтерів співвідношення А/Ет (рис. 1) були в межах норми (0,52–1,42). Серед усіх волонтерів, крім 5, не було виявлено значних змін у співвідношеннях А/Ет після вживання пробіотиків. Для волонтера 5 спостерігалось значне зменшення співвідношення А/Ет, що на фоні зростання концентрацій обох стероїдів може свідчити про нормалізацію ферментативної активності.

Відомо, що зміни концентрацій тестостерону з віком можуть бути незначними [23]. Однак зменшення концентрацій цього гормону часто спричиняє ламкість кісток та призводить до значного зниження рівня лібідо. У волонтерів 1, 3, 4 протягом 2 місяців до вживання пробіотиків у жодній з проб не було виявлено тестостерону (межа детектування даної методики 0,2 нг/мл). Після пробіотикотерапії було відмічено появу тестостерону в усіх волонтерів. У волонтерів 1 і 3 цей гормон був наявний у всіх пробах, що були відібрані після двох місяців після пробіотикотерапії.

Однак більш цінним критерієм оцінки синтезу тестостерону в організмі є співвідношення тестостерону та епітестостерону. Величина цього показника залежить від фази менструального циклу й значно підвищується під час овуляції [15]. Як свідчать дані рис. 2, співвідношення тестостерону та епітестостерону зросло у всіх волонтерів. Це може опосередковано вказувати на зміну пріоритетів у метаболічних шляхах. До того ж важливим є розмах коливань Т/Е протягом менструального циклу. Згідно з літературними даними, у здорових жінок такий розмах може сягати 75 % [12].

У волонтерів розмах коливань значно підвищився, що відображено на рис. 3. Причому в усіх волонтерів зміни залишалися принаймні ще один місяць після завершення прийому пробіотиків. Це може свідчити про нормалізацію циклічних змін у синтезі стероїдів.

З усіх гормонів, які досліджувались, найвагомішим віковим змінам підлягає дегідроепіандростерон. Досить часто його навіть сприймають як індекс старіння. Крім того, за допомогою співвідношення ДНЕА з іншими стероїдами можна виявити природу гіперандрогенії, патології вагітності та деякі види пухлин. Тому визначення концентрацій ДНЕА є досить важливим діагностичним критерієм.

У волонтерів 1 і 2 концентрації ДНЕА залишилися без змін. У волонтера 4 рівень концентрацій незначно збільшився. А у волонтерів 3 і 5 спостерігалось значне збільшення концентрації ДНЕА.

Важливим критерієм оцінки рівня ДНЕА є його співвідношення з епітестостероном. Це співвідношення зросло після вживання пробіотиків у всіх волонтерів, що відображено на рис. 4. Найбільші зміни спостерігались у волонтерів 3 і 5. Підвищення рівня ДНЕА стимулює синтез всіх гормонів, впливає на активацію клітинної ланки імунітету, зменшує ризик серцево-судинних захворювань, а також сприяє омолодженню шкіри.

Таким чином, проведений курс пробіотикотерапії показав, що даний клас біопрепаратів може широко використовуватися як компонент лікувально-профілактичного комплексу при проблемах, які пов'язані з дисфункцією ендокринних залоз жінок у період менопаузи.

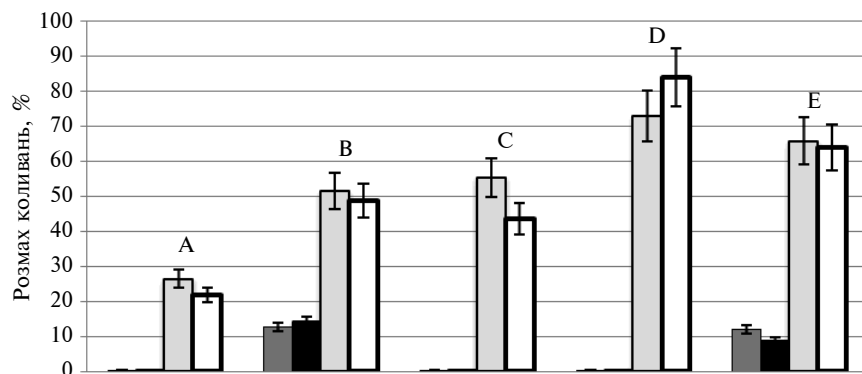


Рис. 3. Зміна розмаху коливань співвідношення Т/Е: А – волонтер 1, В – волонтер 2, С – волонтер 3, D – волонтер 4, Е – волонтер 5; ■ – за 2 місяці до вживання пробіотиків; ■ – за 1 місяць до вживання пробіотиків; □ – 2 місяці вживання пробіотиків; □ – 1 місяць після вживання пробіотиків

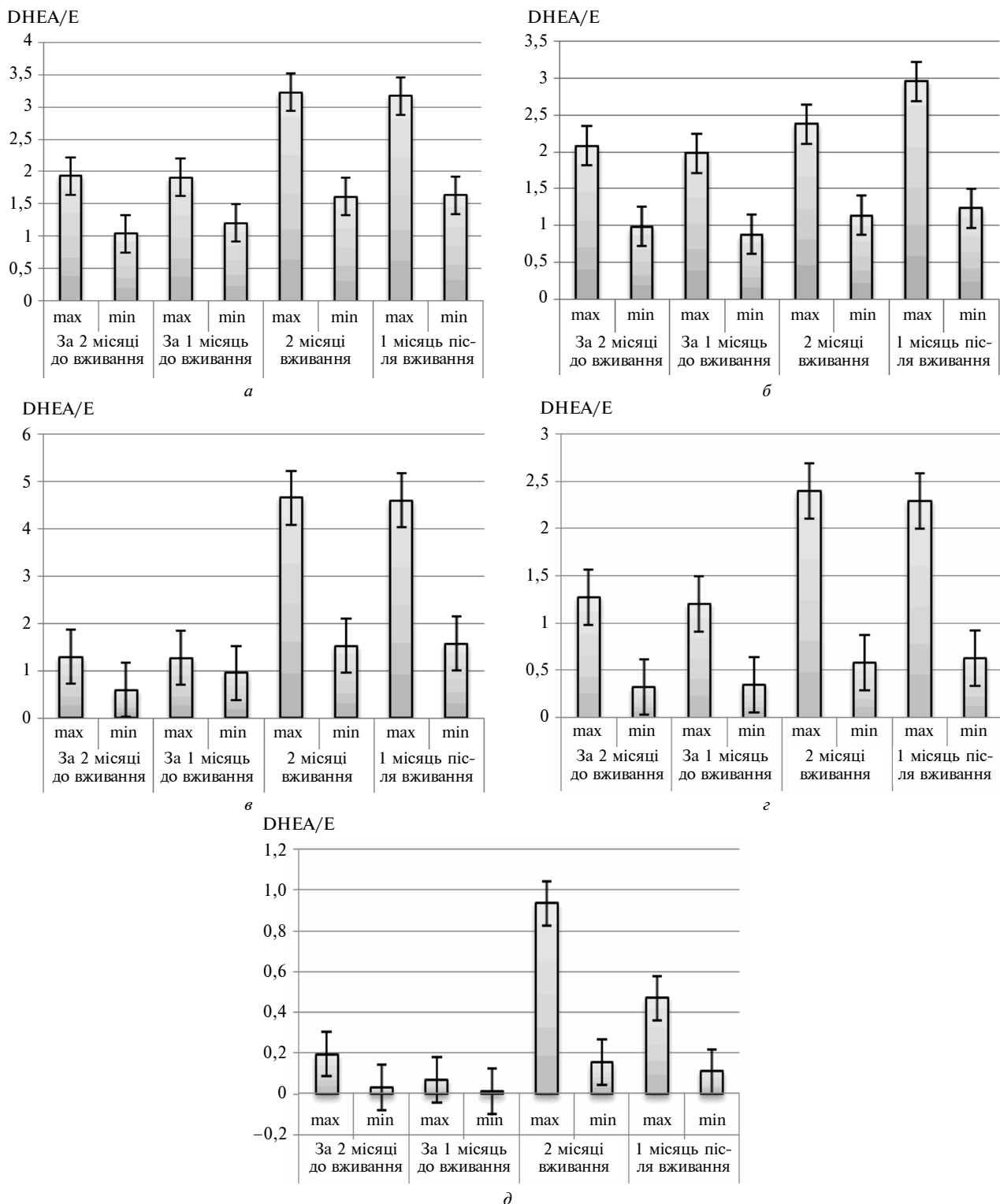


Рис. 4. Співвідношення DHEA/E до та після вживання пробіотиків: а – волонтер 1, б – волонтер 2, в – волонтер 3, г – волонтер 4, д – волонтер 5

Висновки

1. Показано, що пробіотики, які були підібрані індивідуально, впливають на стероїдний профіль жінок у період менопаузи.

2. Найістотніше пробіотики впливали на концентрацію тестостерону, дегідроепіандростерону та на співвідношення цих гормонів з іншими стероїдами. Оскільки саме ці стероїди

підлягають найсуттєвішим змінам з віком, то зростання їх концентрацій позитивно впливає на обмін речовин в організмі.

3. Отримані результати дають змогу розглядати пробіотики як підтримуючу терапію для жінок у період менопаузи.

Дослідження впливу індивідуально підібраних пробіотиків при інших станах людини може привести до зміни концепції використання пробіотиків.

1. *A. Ali et al.*, "Modulation of carbohydrate metabolism and peptide hormones by soybean isoflavones and probiotics in obesity and diabetes", *J. of Nutritional Biochemistry*, no. 16, pp. 693–699, 2005.
2. *Ekrem C. Tok et al.*, "The effect of circulating androgens on bone mineral density in postmenopausal women", *Maturitas*, no. 48, pp. 235–242, 2004.
3. *S.L. Davison and S.R. Davis*, "Androgens in women", *J. of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, no. 85, pp. 363–366, 2003.
4. *C. Enea et al.*, "Biological factors and the determination of androgens in female subjects", *Steroids*, no. 73, pp. 1203–1216, 2008.
5. *L.M. Demers*, "Androgen deficiency in women: role of accurate testosterone measurements", *Maturitas*, no. 67, pp. 39–45, 2010.
6. *M.D. Johnson et al.*, "Uses of DHEA in aging and other disease states", *Ageing research review*, no. 1, pp. 29–41, 2002.
7. *Калмыкова А.И.* Системные эффекты действия пробиотиков: Дис. ... докт. биол. наук: 14.00.16. – Новосибирск, 2006. – 248 с.
8. *S. Gilliland*, "Acidophilus milk: a review of potential health benefits to consumer", *J. of Dairy Science*, vol. 72, pp. 2483–2494, 1990.
9. *M.V. Donova et al.*, "Steroid 17 β -reduction by microorganisms – a review", *Process biochemistry*, no. 40, pp. 2253–2262, 2004.
10. *Ростовцев В.Н., Рубан А.П.* Метод спектрально-динамической диагностики: Инструкция по применению. – Мин. здравоохранения Республики Беларусь. Рег. № 72-0705 от 14.07.2005.
11. *Орлов Е.Н.* Особенности определение стероидов в биологической жидкости газохроматографическим методом: Дис. ... канд. хим. наук: 02.00.02, 02.00.03. – М., 2000. – 201 с.
12. *M. Donike and U. Flenker*, "Stability of Steroid Profiles (5): The Annual Rhythm of Urinary Ratios and Excretion Rates of Endogenous Steroids in Female and its Menstrual Dependency", *Recent advance in doping analysis (3)*. Cologne, 1996, pp. 177–189.
13. *Man Ho Choi et al.*, "Metabolic alteration of urinary steroids in preand post-menopausal women, and men with papillary thyroid carcinoma", *BMC Cancer*, vol. 11, pp. 342, 2011.
14. *Диагностическое значение стероидных профилей мочи / Е.Н. Орлов, Е.Е. Антипов, Н.Н. Николаев и др. // Проблемы эндокринологии. – 1995. – 45, № 2. – С. 35–39.*
15. *K.K. Miller*, "Androgen Deficiency in Women", *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 86, no. 6, pp. 2395–2401.

Рекомендована Радою
факультету біотехнології і біотехніки
НТУУ "КПІ"

Надійшла до редакції
18 травня 2012 року