

ЭНДОКРИНОЛОГИЯ

И. А. ЭСКИН и М. Э. ЧЕБАН

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖЕНСКОГО ПОЛОВОГО ГОРМОНА
(ЭСТРОГЕНА) В КРОВИ**

(Представлено академиком А. Д. Сперанским 10 I 1951)

Сведения о природе циркулирующего в крови женского полового гормона (эстрогена) очень скучны. Известно, что эстроген в крови находится в очень малых концентрациях. Введененный внутривенно эстроген быстро исчезает из кровяного русла⁽¹⁾.

При изучении эстрогена в крови у человека исследователь ограничен необходимостью использовать небольшие количества крови, причем при экстрагировании таких количеств имеют место большие потери. Все это создает значительные трудности для изучения женского полового гормона в крови.

По имеющимся в литературе данным⁽²⁾, в 1 л крови женщины содержится 20—70 м. е. эстрогена. Это означает, что 1 м. е. содержится в 14—50 мл крови. Если учесть, что определение одной концентрации должно быть произведено не менее, чем на трех животных, то для одного определения необходимо 45—150 мл крови. Так как приходится испытывать ряд концентраций, а часто проводить и повторное определение, то количество крови должно быть при этом значительно увеличено. Ясно, что использование таких количеств крови человека для диагностических и иных целей невозможно.

Мы поставили перед собой задачу найти метод определения эстрогена в таких количествах крови, какие обычно используются в клинических лабораториях. Для решения этой задачи нам пришлось прежде всего обратить внимание на биологический метод тестирования эстрогена. Общепринятые методы биологического тестирования позволяют обнаружить 1 м. е. или 1 кр. е. В литературе⁽³⁾ давно отмечено, что при воздействии эстрогеном на эффекторный орган, минуя общее кровяное русло, т. е. при интравагинальном введении, ороговение вагинального эпителия наступает при использовании доз во много раз меньших, чем при подкожном введении. По нашим данным (см. табл. 1), при интравагинальном введении эстрона, растворенного в персиковом масле, реакция вагинального эструса у кастрированных крыс наступает от дозы в 1,0 м. е. вместо 4—5 м. е. (1 кр. е.), необходимых при подкожной инъекции. По другим данным⁽⁴⁾, 0,5 м. е. является эффективной дозой. Однако вследствие чрезвычайно малых концентраций эстрогена в крови такая высокая чувствительность интравагинального метода оказалась все же недостаточной. При замене персикового масла в качестве растворителя эстрогена 50% водным глицерином⁽⁵⁾ можно значительно повысить чувствительность интравагинального метода. В табл. 1 представлены результаты сравнительного испытания кристаллического эстрона, растворенного в 50% водном глицерине и в персиковом масле, при интравагинальном его введении кастрированным крысам.

Таблица 1

Сравнительная оценка биологической активности эстрона растворенного в персиковом масле и в 50% водном глицерине

Доза эстрона в м. е.	Персиковое масло			50% водный глицерин		
	число крыс	из них реагировали	% реагир.	число крыс	из них реагировали	% реагир.
0,0125	—	—	—	10	2	20
0,025	—	—	—	14	8	57,1
0,05	5	—	—	19	16	84,2
0,1	31	—	—	14	9	64,2
0,2	35	1	2,8	5	5	100
0,5	55	8	14,5	—	—	—
0,8	14	6	42,7	—	—	—
1,0	17	9	52,9	—	—	—

Как видно из табл. 1, вагинальный эструс у 50% кастрированных крыс наступает при введении интравагинально 1,0 м. е. эстрона, растворенного в персиковом масле; 0,5 м. е. дают реакцию только у 14,5%. В то же время эстрон, растворенный в 50% водном глицерине, дает реакцию вагинального эструса у 50% кастрированных крыс при интравагинальном введении 0,025 м. е., т. е. дозы в 40 раз меньшей. Эффективность эстрона, растворенного в водном глицерине и введенного интравагинально, в 200 раз больше подкожной инъекции эстрона, растворенного в масле ($1 \text{ кр. е.} = 4-5 \text{ м. е.}$). Исключительно высокая чувствительность слизистой вагины кастрированной крысы к интравагинальному введению эстрогена, растворенного в 50% водном глицерине, была нами использована для определения эстрогена в крови. Предстояло выяснить, в каком виде должна быть использована кровь — в виде ли нативной⁽⁶⁾ или предварительно обработанной с целью извлечения из нее эстрогена. Имеющиеся в литературе указания об использовании для этой цели нативной жидкой или сухой таблетированной крови были нами экспериментально проверены и не подтвердились⁽⁷⁾. Так как эстроген проявляет свою биологическую активность только в свободном состоянии, то возник вопрос, в каком состоянии находится эстроген в крови. Мы подвергли кровь крольчих, а также и женщин в разные фазы цикла обработке 96° спиртом. После осаждения белков крови и отгона спирта часть материала экстрагировалась эфиром для извлечения свободного эстрогена, другая часть подвергалась кислотному гидролизу с последующим экстрагированием эфиром для извлечения связанной формы эстрогена. Эстроген растворялся в 50% водном глицерине и вводился интравагинально кастрированным крысам. Высокая чувствительность слизистой вагины кастрированной крысы к эстрогену, растворенному в 50% водном глицерине, позволяет установить эстрогенную активность экстракта, эквивалентного очень малому объему крови (1,0—0,05 мл), и произвести соответствующий перерасчет на эстрон в условных единицах (0,025 м. е. эстрона = 1 усл. ед.).

В табл. 2 приведены данные о количестве эстрогена в 1 л крови крольчих, находящейся в стадии течки и покоя. Как видно из этой таблицы, у крольчих в стадии течки титр эстрогена в 1 л крови колеблется от 125 до 500 у. е., а в стадии покоя — от 41,5 до 125 у. е. Эти колебания индивидуальны и зависят от фазы цикла. Эстроген в крови крольчих представлен в свободной и связанной форме. При этом количество связанного эстрогена у некоторых крольчих значительно преобладает над свободным, а у других они находятся в отношении 1:1. В крови отдельных животных может быть обнаружена либо свободная, либо связанная форма эстрогена.

Таблица 2

Женский половой гормон (эстроген) в крови крольчих (в пересчете на эстрон в усл. ед.)

Кролики в стадии течки				Кролики в стадии покоя			
№ кролика	общий эстроген	свободный	связанный	№ кролика	общий эстроген	свободный	связанный
8	500	500	—	32	62,5	62,5	—
20	500	250	250	1	62,5	62,5	—
19	250	250	—	50	62,5	62,5	—
7	250	125	125	2	125	125	—
25	250	62,5	187,5	25	62,5	62,5	—
26	250	62,5	187,5	26	125	62,5	62,5
61	125	62,5	62,5	61	125	125	—
27	125	62,5	62,5	27	62,5	41,5	21
48	125	62,5	62,5	22	41,5	—	41,5
б/м	125	125	—	б/м	62,5	62,5	—
				53	62,5	62,5	—

В табл. 3 приведены данные по содержанию эстрогена в крови нормально менструирующих женщин на разных стадиях цикла. Как видно из этой таблицы, содержание эстрогена в крови, выраженное в у. е. эстрона, резко колеблется от 25 до 500 у. е. Эти колебания носят индивидуальный характер и вместе с тем зависят и от фазы цикла. У некоторых женщин эстроген в крови представлен только в связанной форме, у других связанная форма преобладает над свободной. У большинства обследованных женщин на 13—15-й день цикла наблюдается увеличенный выход свободного эстрогена в кровь.

Таблица 3

Женский половой гормон (эстроген) в крови нормально менструирующих женщин (в пересчете на эстрон в усл. ед.)

Начало цикла			Средина цикла			Конец цикла		
общий эстроген в 1 л крови	свободный	связанный	общий эстроген в 1 л крови	свободный	связанный	общий эстроген в 1 л крови	свободный	связанный
500	250	250	500	500	—	500	125	375
500	500	—	500	250	250	125	—	—
500	62,5	437,5	125	125	—	—	—	—
250	62,5	187,5	500	500	—	250	62,5	187,5
—	—	—	—	—	—	250	—	—
125	62,5	62,5	125	125	—	125	125	—
62,5	62,5	—	125	62,5	62,5	62,5	62,5	—
62,5	62,5	—	41,5	41,5	—	62,5	62,5	—
62,5	41,5	21	62,5	62,5	—	—	—	—
62,5	—	62,5	41,5	—	41,5	41,5	—	41,5
41,5	—	41,5	62,5	41,5	21	41,5	—	41,5
41,5	41,5	—	41,5	—	41,5	62,5	62,5	—
41,5	25	16,5	62,5	41,5	21	41,5	—	41,5
25	—	25	41,5	—	41,5	—	—	—
25	25	—	41,5	41,5	—	25	25	—
25	—	25	50	—	50	25	—	25
41,5	41,5	—	25	25	—	25	25	—
25	—	25	41,5	41,5	—	41,5	—	41,5
—	—	—	62,5	62,5	—	—	—	—
41,5	—	41,5	62,5	41,5	21	—	—	—
—	—	—	62,5	—	—	62,5	—	—
25	—	—	25	—	—	25	—	—
25	—	—	25	—	—	25	—	—
—	—	—	62,5	—	—	—	—	—

На основании проведенного нами исследования можно предложить следующую методику определения эстрогена в крови человека. Из локтевой вены берется 10 мл крови (оксалатной). Кровь заливается 5 объемами 96° спирта и взбалтывается в течение часа. Спирт отгоняется, и осадок вновь заливается 3 объемами 96° спирта и взбалтывается в течение часа. Обе порции спирта соединяются. Осадок, полученный после отгона спирта, подвергается гидролизу в течение 40 мин. в 1% растворе соляной кислоты. После гидролиза эстроген экстрагируется эфиром и растворяется в 50% водном глицерине (из расчета экстракт 10 мл крови в 1,5 мл водного глицерина). Для определения свободной формы эстрогена 10 мл крови подвергаются такой же обработке спиртом, как это описано выше. Осадок, полученный после отгона спирта, подвергается экстрагированию эфиром, не подвергаясь предварительно гидролизу.

Крысы весом в 90—100 г подвергаются двухсторонней кастрации. Через 3—4 недели после кастрации крысы проверяются методом вагинальных мазков и получают однократную подкожную инъекцию 50 м. е. эстрогена в масле. Только те животные, которые ответили реакцией эструса, используются в дальнейших опытах. Нереагировавшие крысы исключаются. Через 10 дней крысам, положительно реагировавшим на подкожную инъекцию 50 м. е. эстрогена, вводится микропипеткой интравагинально 0,5 м. е. эстрогена (2 раза по 0,25), растворенного в 0,03 мл 50% водного глицерина (по 0,015 мл в день). Из крыс, давших положительную реакцию вагинального эструса на интравагинальное введение эстрогена, формируется группа подопытных животных, используемых для испытания эстрогена в крови.

Каждый раз за 7 дней перед испытанием экстракта крови на содержание эстрогена подопытным крысам производится разовая подкожная инъекция 1,5 м. е. эстрогена в масле.

Водный глицерин, содержащий эстроген крови, вводится микропипеткой в вагину крысы по 0,015—0,025 мл в день в течение 2 дней. Разрыв доз при введении достигается использованием разных объемов раствора (0,015—0,025 мл), кратностью введения (2-кратное, 4-кратное и 6-кратное) и концентрацией раствора.

Через 24, 36, 48 час. после последнего введения изучаются вагинальные мазки. Каждая доза испытывается на 3—5 крысах. Реакция считается положительной, если она проявляется у 50% подопытных животных. На основании полученных результатов можно установить минимальный объем крови, обладающей эстрогенной активностью, и соответственно произвести пересчет на условные единицы эстрона (0,025 м. е. эстрона дает вагинальный эструс у 50% животных).

Всесоюзный институт
экспериментальной эндокринологии

Поступило
21 XII 1950

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ T. Cantarow, K. Paschkis et al., Endocrinology, 33, 309 (1943).
² J. Markee and B. Berg, Anat. Rec., 82, 431 (1942). ³ П. Вундер, Усп. совр. бiol., 21, 1251 (1945). ⁴ M. Berger, Klin. Wchschr., 14, 1601 (1935).
⁵ O. Mühlbock, Acta brevia Neerlandica, 10, No. 1/2 (1940). ⁶ М. Могилев, Эстрогенный инкрет яичника и гонадотропные гормоны беременных, 1939.
⁷ И. Эскин и М. Чебан, Бюлл. эксп. биол. и мед., 27, 5 (1949).