

знову протягом 10 хв. визначали кількість кисню, засвоюваного твариною. Так десятихвилинне визначення поглинутого кисню чергували з п'ятихвилинним продуванням респіраційних камер кімнатним повітрям. Продування респіраційних камер ми провадили для видалення продуктів, які можуть в якісь мірі впливати на газообмін тварин (аміак тощо), а також для зниження вологості.

Ми звичайно проводили шість десятихвилинних визначення. Різниця в кількості поглинутого кисню в окремих десятихвилинних визначеннях була, як правило, незначною, часто ж ці величини були зовсім однаковими в трьох-чотирьох визначеннях. Іноді тварини протягом короткого відрізу часу (5—10 хв.) починали проявляти значну рухливість. Поглинення кисню в таких випадках завжди збільшувалось. Тому одержані в цей час результати до уваги не брали; враховували тільки дані, одержані при повному спокої тварин, або ж при мінімальній їх рухливості, яка, як показали наші спостереження і висновки інших дослідників (Антошина Е. Д., 1939), на кількості засвоюваного кисню помітно не позначається.

Після досліду обчислювали кількість поглинутого кисню за 1 годину на 100 г ваги тварин. Потім визначали об'єм тієї ж кількості кисню при температурі 0°C і атмосферному тиску 760 мм рт. ст. Обчислення провадили за такою формулою:

$$V_0 = \frac{V \cdot 273(P-f)}{P_0(573+t)}$$

де  $V_0$  — об'єм газу при нормальніх умовах;  $V$  — об'єм газу при температурі, яка була під час досліду;  $P_0$  — нормальний атмосферний тиск (760 мм рт. ст.);  $P$  — атмосферний тиск під час досліду;  $t$  — температура повітря в приміщенні під час досліду;  $f$  — парціальний тиск водяних парів при температурі  $t$ .

Описана модифікація методики дослідження газообміну у дрібних тварин зручна тим, що вона: 1) забезпечує високу точність визначення кількості кисню, засвоюваного тваринами; 2) завдяки частковій автоматизації дозволяє проводити визначення поглинення кисню одночасно у багатьох тварин (ми, наприклад, провадили досліди одночасно на п'яти тваринах в п'яти паралельно змонтованих установках); 3) вся установка складається в основному із стандартного лабораторного обладнання, а електричний барорегулятор може бути виготовлений власними силами в будь-якій слюсарній майстерні. Отже, запропонований нами прилад доступний для кожної фізіологічної лабораторії.

#### ЛІТЕРАТУРА

Антошина Е. Д., Фізiol. журн. ССР, т. 26, в. 1, 1939, с. 3.

Гацанюк М. Д., Фізiol. журн. АН УРСР, т. 1, № 3, 1955, с. 123.

Шевченко А. В., Влияние нарушений функции щитовидной железы на иммунологическую реактивность организма. Дисс., 1957.

Надійшла до редакції  
21. II 1961 р.

### Хроматографічне фракціонування нейтральних 17-кетостероїдів сечі людини

С. П. Зелінський

Відділ психіатрії і патології вищої нервової діяльності Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця Академії наук УРСР, Київ

Корі надніркових залоз надають великого значення в нейро-гуморальній регуляції життєво важливих біологічних функцій. Тому інтерес до дослідження функціонального стану коркового шару надніркових залоз за останній час значно підвищився і вийшов за межі клініки ендокринних захворювань. Проте в клінічних умовах проведення цих досліджень натрапляє на ряд утруднень, зумовлених необхідністю застосування складного спектрофотометричного методу для визначення кортикалінних гормонів і надзвичайно малою їх концентрацією у периферичній крові.

У більшості опублікованих праць оцінка функціонального стану кори надніркових залоз у людини побудована на результатах визначення в сечі 17-кетостероїдів і, в країному випадку, на характері еозинопенічної реакції на введення адренокортикотропного гормона (АКТГ). Разом з тим відомо що сполуки групи 17-кетостероїдів яких тепер налічується більше двадцяти, різні за своїм походженням, біологічною значимістю і кількістю, виділюваною із сечею. Одні з них продукуються корою надніркових залоз, інші є метаболітами кортикалінних і статевих гормонів. Тому дослідження сумарного вмісту 17-кетостероїдів у сечі як самостійний тест для судження про функціональний стан кори надніркових залоз слід визнати недостатнім, оскільки

навіть при нормі тестероїдів іноді

Велике дія дія допомогою дигіт застосована [1]. функціонувані ці [2, 3, 4, 5, дуже складні і на деякі етапи наст даних. Ми [10] модифіковано і не можна застос. Так, триває золу дорівнює ряд прийомів, щ практикою. Но і медичної хімії в клінічній меди

Реакти для креоскопії, сірчанокислій бензил за Брокман 58%-ною сірчан андростерону і

Гідрол 50 мл бензолову в години при 85—90° шують протягом до сечі 15 мл соди проводжають екстракт бензольних екстратію, тричі води. Екстракт кільк при 60—70°

Хромат 5—6 мм, довжину і висушеною переносять у колони з 10 мл бензину та регулюють тиску повітря у

Фракції	№ елюанті
I	1—2
II	3—4
III	5—8
IV	9—13
V	14—17
VI	17—18
VII	19—22

Так десятим пропусканням камер ми газообмін в кількості 100 г з визначенням показниками якості, які дали Є. Д., у турі 0°C і тривалістю 1 годину.

Велике діагностичне значення має поділ 17-кетостероїдів на  $\alpha$ - і  $\beta$ -фракції за допомогою дигітоніну. Проте методика ця порівняно складна і не завжди може бути застосована [1]. Тепер дедалі більший інтерес привертає метод хроматографічного функціонування 17-кетостероїдів, який дозволяє поділити їх на 4—8 і більше фракцій [2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9], проте багато із запропонованих варіантів цього методу дуже складні і не можуть бути використані в клінічній практиці; в інших варіантах деякі етапи настільки спрощені, що створюється можливість одержання наближених даних. Ми [10] застосовуємо хроматографічне фракціонування 17-кетостероїдів за модифікованою методикою Дінгеманза [4]. В оригінальному прописі цю методику не можна застосовувати в клінічних умовах в зв'язку з її складністю і громіздкістю. Так, тривалість одного лише аналізу сечі становить понад десять днів, витрата бензолу дорівнює близько п'яти літрам. Ми прагнули усунути або принаймні зменшити ряд прийомів, що перешкоджають використанню цієї методики, і зробити її більш практичною. Наш варіант, який був викладений на конференції Інституту біологічної медичної хімії АМН СРСР, присвячений біохімії кортикостероїдів і їх застосуванню в клінічній медицині в 1959 р., полягає ось у чому.

**Реактиви:** 1. Соляна кислота, концентрована, хімічно чиста. 2. Бензол для креоскопії, без тіофену, перегнаний. 3. Однонормальний ідкий натрій. 4. Натрій сірчанокислий безводний. 5. Окис алюмінію ( $Al_2O_3$ ) для хроматографії, стандартизований за Брокманом (прожарити і витримати не менше як сім днів в ексикаторі над 58%-ною сірчаною кислотою). 6. Стандартні розчини дегідроепіандростерону або андростерону і реактиви для реакції Ціммермана [11].

Гідроліз і екстракція. 150 мл сечі (кислої реакції) екстрагують 50 мл бензолу в колбі із зворотним холодильником на водяній бані протягом однієї години при 85—90°. Охолоджують, переносять у ділильну лійку на 0,5 л, легко струшують протягом 3 хв., дають відстоятися, після чого бензол відділяють. Додають до сечі 15 мл соляної кислоти + 50 мл бензолу і в тій самій колбі на водяній бані продовжують екстракцію при одночасному гідролізі протягом двох годин. Потім бензол відділяють, а екстракцію продовжують з новою порцією бензолу. Всі три бензольних екстракти об'єднують, тричі промивають по 15 мл розчином ідкого натрію, тричі водою і висушують невеликою кількістю сірчанокислого натрію (3—4 г). Екстракт кількісно переносять у колбу Вюрца і випарюють досуха під вакуумом при 60—70°.

**Хроматографія.** Хроматографічну колонку (скляну трубку діаметром 5—6 мм, довжиною 23 см) в нижній звуженій частині закривають попередньо промитою і висушену ватою. Приготовлену суспензію з 2 г окису алюмінію і 5 мл бензолу переносять у колонку та ущільнюють. Сухий залишок бензольного екстракту розчиняють у 10 мл бензолу, 2 мл якого обережно переносять у колонку. Ущільнення окису алюмінію та регуляція швидкості елюї здійснюються за допомогою вакуума або тиску повітря у камері футбольного м'яча. Стероїди елюються бензолом і етиловим

Фракції	№ елюатів	Назва найголовніших 17-кетостероїдів (за Дінгеманза)	Походження
I	1—2	$\Delta$ 2-андростен $3\text{-Cl}-\Delta^5$ -андростен $\Delta$ 3:5-андроестадіен	Утворюються при гідролізі з інших кетостероїдів в результаті не минучої дегідратації
II	3—4	<i>i</i> -андростен-6-ол	Кора надниркових залоз
III	5—8	Дегідроепіандростерон Епіандростерон	Кора надниркових залоз
IV	9—13	Андростерон	З дегідроепіандростерону, статевих гормонів, 11-дезокси-17-оксикортостероїдів
V	14—16	Етіохоланолон	
VI	17—18	11-гідрокси-(11-кето)-андростерон 11-гідрокси-(11-кето)-етіохоланолон	Метаболіти кортикостероїдів, які мають кисневу функцію в положенні II
VII	19—20	неідентифіковані	

спиртом за такою схемою: бензол — 3 рази по 10 мл; бензол + 0,1 об.% етилового спирту — 10 разів по 10 мл; бензол + 0,5 об.% етилового спирту — 5 разів по 10 мл; спирт етиловий — 2 рази по 10 мл. Одержані 20 елюатів випарюють на водяній бані досуха. З сухими рештками, провадять реакцію Ціммермана з м-динітробензолом [11].

Якщо на осі абсцис позначити номери елюатів, а на ординаті — вміст в них кетостероїдів, то утворюється крива, яка звичайно має сім піків, кожний з яких відповідає певній групі стероїдів, (див. першу таблицю)

О. Кезер і співробітники [12] запропонували деякі з цих фракцій об'єднати і поділити всі 17-кетостероїди на чотири групи, які мають певне діагностичне значення, а саме: А — включає I і VII фракції (артефакти і неідентифіковані), Б — включає II і III фракції (кортикалального походження), В — включає IV—V фракції і Г — VI фракцію. Більш детальні дані про походження і біологічне значення можна знайти в монографіях Н. А. Юдаєва [13, 14] і в ряді інших праць [4, 5, 9, 12].

Чисті препарати дегідроепіандростерону й андростерону, з якими провадили контрольні дослідження, відкривалися на 90—97% і їх вихід повністю відповідав елюатам III і IV фракцій. Нижче наводимо середні дані розподілу 17-кетостероїдів по фракціях у сечі здорових людей.

Автор	Стать	мг на добу	в мг фракції				в % фракції			
			А	Б	В	Г	А	Б	В	Г
Дінгеманз . . . .	жін.	10,86	2,31	1,82	5,28	1,45	21,3	16,8	48,6	13,3
» . . . .	чол.	19,53	1,74	5,15	9,44	2,50	12,5	26,4	48,3	12,8
Шпанар . . . .	»	18,29	2,39	4,65	9,55	1,70	13,1	25,4	52,2	9,3
Наші дослідження	жін.	10,0	1,94	1,86	5,24	0,96	19,4	18,6	52,4	9,6

На закінчення наводимо деякі практичні вказівки.

1. Щоб запобігти підвищенню дегідратації, необхідно гідроліз проводити в умовах максимального щадіння. Для цього потрібно до проведення кислотного гідролізу екстрагувати вільні кетостероїди, а самий гідроліз провадити при одночасному екстрагуванні, чим досягається вилучення звільнюваних стероїдів із сфери впливу кислоти. Останнім часом рекомендують провадити ферментативний гідроліз з β-глюкуронідазою, який має передувати кислотному гідролізу.

2. Всі етапи дослідження треба провадити в строго постійних умовах. Зокрема, велике значення має стандартизація окису алюмінію, що забезпечує постійність виходу фракцій у певних елюатах. Слід також ураховувати адсорбційні можливості окису алюмінію (2 г  $\text{Al}_2\text{O}_3$  можуть адсорбувати до 0,7—0,8 мг кетостероїдів).

3. При налагоджуванні і перевірці методики рекомендуються збирати елюати не по 10, а по 5 мл. Отже, всього буде 40 елюатів, що дає можливість краще уточнити граници окремих фракцій і тільки після одержання відтворювих результатів можна відповідно скоротити кількість елюатів до 20.

#### ЛІТЕРАТУРА

- Уваровская О. М., Клин. медицина, № 3, 1951, с. 57.
- Rond M. H., Lancet, 261, N 6690, 1951, p. 906.
- Zygmontowicz A. S., Wood M., J. Clin. Endocrin., v. 11, 1951.
- Dingemans E., J. Clin. Endocrin., v. 12, N 1, 1952, p. 66.
- Spanar E., Kellen, J. Casopis lek. českych., 92, N 30—31, 1953.
- Johnsen S. G., Acta endocrin., 21, 1956, S. 127.
- Staib W., Schild W., Klin. Wsch., Bd. 36, N 4, 1958, S. 166.
- Zimmermann H., Staib W., Pelzer H., Klin. Wsch., N 20, 1958, S. 982.
- Какушкина Е. А., Орлова В. Г., в кн. «Гормональные исследования в гинекологии», Медгиз, 1960, с. 140.
- Зелинський С. П., Журн. невропатології і психіатрії ім. С. С. Корсакова, № 8, 1956, с. 622.
- Афонігенова С. А., Пробл. эндокринол. и гормонотерап., 5, 1955.
- Käser O., Schweiz med. Wochenschr., N 16, 1959.
- Юдаєв Н. А., Біохімія стероїдних гормонів, Медгиз, 1956.
- Юдаєв Н. А., Хім. методы определения стероидных гормонов в біол. жидкостях, Медгиз, 1961.

Надійшла до редакції  
26. XII 1961 р.

P. O. Fai  
Видання з  
всмоктування, з  
відсутністю моно-  
відношені про-  
Монографії  
заключної часті  
1200 праць вітч  
Спиняючи  
етапах її розро-  
всмоктування.  
i, нарешті, в ос-  
ції всмоктувань  
У розділі  
зумовлюють пер-  
прикладів довед-  
конами, а відбу-  
описана участя

Висвітлюю-  
всмоктуватись у  
а також резуль-  
те, що шлунку  
чували той фас-

Викладаю-  
води в кишечни-  
тування води в  
У цьому  
слизову оболон-  
підкresloється  
яльності шлун-

Далі авто-  
між швидкістю  
залежність. На-  
робітників про-  
фосфору, сполу-

Надзвичай-  
вплив середови-  
солей. Підкres-  
відзначає, що р-  
Це питання по-

З необхід-  
основі власних  
лова, автор пе-  
Слід підкresли-  
у шлунку. Опи-  
вання відбуває-  
що всмоктування  
з автором в то-

всмоктування  
відповідних по-  
мальному ліку

Автор спр

всмоктування