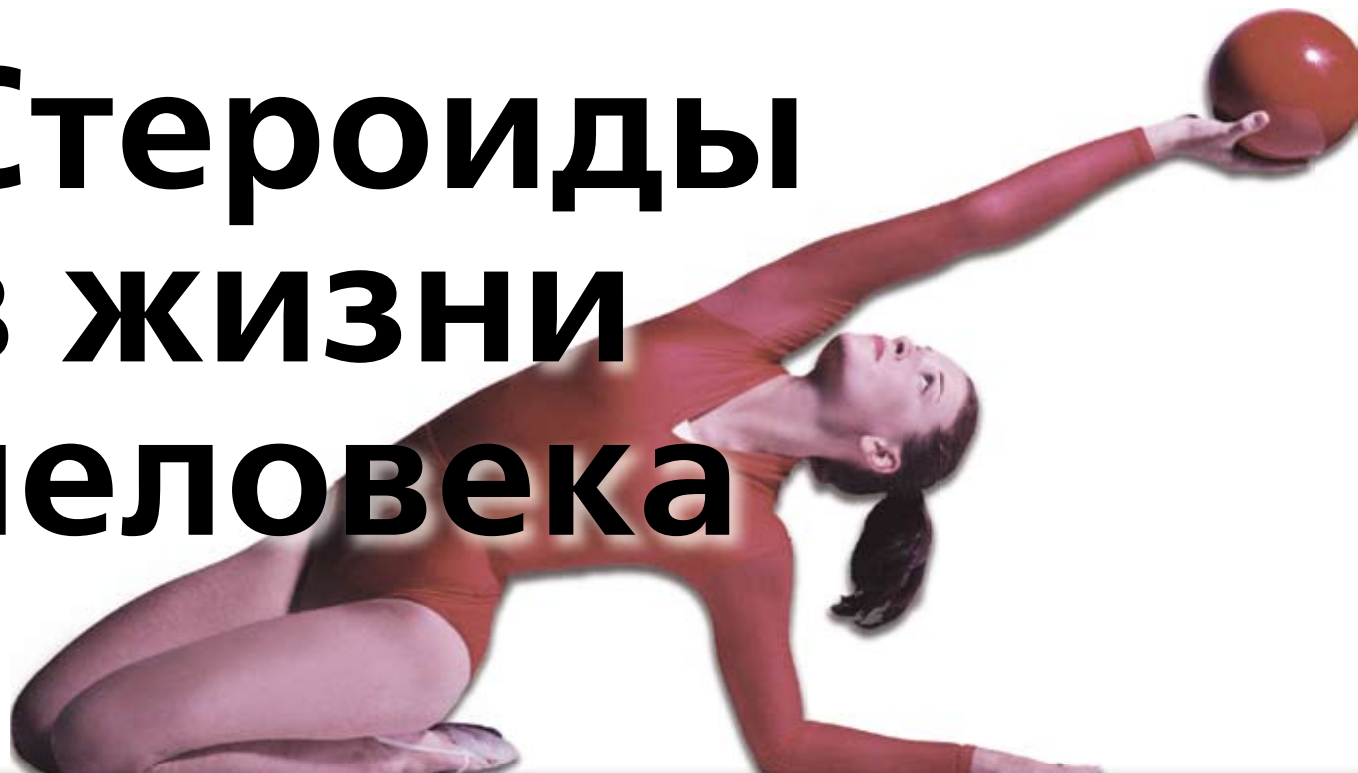


Стероиды в жизни человека



Евгений Антипов, д. х. н., заместитель директора ИНХС РАН

Прогресс в области диагностики многих серьезных заболеваний базируется на развитии новых методологических подходов в химико-аналитической технологии. Так, хорошо известна чрезвычайно важная роль стероидных гормонов в биохимических процессах и патогенезе многих заболеваний (см. рис. 1). Именно поэтому в настоящее время интенсивно разрабатываются различные способы их определения в биоорганических субстанциях.

Диагностика заболеваний, связанных с нарушением синтеза и метаболизма стероидных гормонов в эндокринологии, гинекологии и онкологии, немыслима сегодня без определения содержания гормонов в организме. Постоянно возрастающее число больных бесплодием, которое часто связано с гормональными нарушениями, резко повышает актуальность проблемы, в том числе и в России.

Биологические жидкости

Часто врачи, диагностируя ту или иную патологию, ограничиваются простым измерением уровня гормонов в крови. Причина повышенного внимания именно к крови, как биологической субстанции, связана с созданием в некоторых развитых странах автоматизированных аппаратов, принципиально основанных на использовании высоко специфической реакции «антиген – антитело», позволяющей выполнять анализы в боль-

шом количестве, быстро и качественно. Другие биологические жидкости (БЖ), например моча, реже рассматриваются в качестве объекта исследования. Однако после довольно длительного периода «всеобщего увлечения» определением гормонов в крови сегодня выявлены и серьезные недостатки этого метода, среди них:

- моментальные колебания концентрации гормонов в крови, связанные с секундным эмоциональным состоянием больного, циркадными ритмами или другими возможными физиологическими процессами в организме, приводящими к ложным выводам;
- недостаточная информативность метода, связанная с возможностью определения лишь некоторых гормонов из широкого спектра требуемых;
- значительные вариации нормативных показателей в зависимости от применяемой разновидности иммунологического метода, существенно снижающие достоверность и надежность интерпретации результатов;
- дорогостоящее аппаратное оформление методологии;
- ассортимент доступных (особенно в условиях современной России) наборов реактивов, необходимых для использования с максимальной эффективностью данного метода недостаточно широк, к тому же дорогостоящая и относительно небольшое время хранения таких реактивов накладыва-

ет дополнительные ограничения на их практическое применение;

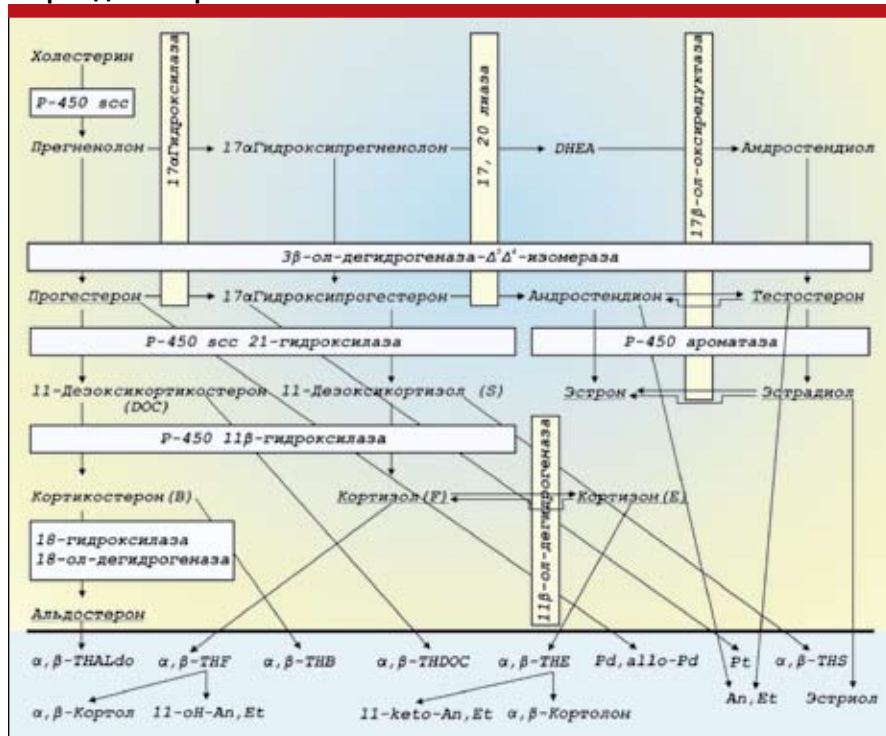
- анализ крови, не являясь неинвазивным методом, всегда создает некоторую вероятность случайного заражения пациента и лаборанта вирусами СПИДа, гепатита В и другими заболеваниями.

Анализ гормонов в моче практически лишен всех вышеперечисленных недостатков. Кроме того, основное преимущество использования данной БЖ в качестве объекта исследования связано, прежде всего с тем, что с мочой экскретируется большее количество стероидов, несущих обширную информацию не только о железах, в которых они синтезируются, но и о состоянии печени, где преимущественно стероиды подвергаются катаболизму. Более того, определение стероидов в суточной моче (усредняющий фактор) позволяет избежать влияния на результаты измерений случайных факторов, которые часто бывают значительными, в частности, циркадных ритмов и т. д.

Разработка ИНХС

С этой целью в ИНХС РАН была создана новая технология по химико-аналитической методологии определения стероидов в БЖ (моче) газохроматографическим методом, которая базируется на законченном экспериментально обоснованном научном исследовании, выполненном на стыке ▶

Рис. 1. Схема основных путей биосинтеза и метаболизма стероидных гормонов



двух дисциплин — органической и аналитической химии. Полученные в ходе выполнения данного исследования положительные результаты явились основой создания нового способа определения профилей стероидных гормонов в БЖ с помощью газовой хроматографии.

Хроматографическая кривая сложной смеси стероидов в БЖ — стероидный профиль (СП), как оказалось, является одним из наиболее ценных и весьма информативных диагностических тестов при целом ряде заболеваний, связанных с нарушением синтеза и метаболизма стероидов, причем важно отметить, что некоторые из них могут быть диагностированы только этим методом. Ранее широкому применению определения СП препятствовали длительность аналитического процесса, его многостадийность, дороговизна необходимых реактивов и оборудования и, как следствие, высокая стоимость анализа в целом.

В разработке ИНХС РАН эти препятствия удалось преодолеть. Успешный поиск новых путей решения проблемы и предложенные оригинальные методологические подходы, позволили быстро и надежно определять стероиды в моче. При этом существенным требованием к новой методике являлась ее относительная дешевизна при внедрении в клиническую практику в России, что позволило бы существенно улучшить выявляемость ряда заболеваний, заметно снизить репродуктивные поте-

ри и осуществить качественный мониторинг за ходом проведения лечения.

Ступени процесса

В ходе проведения исследований были разработаны, модифицированы и оптимизированы все ступени процесса препаративной методологии подготовки образца: предварительное извлечение конъюгатов высаливанием в этилацетат, их комбинированный с экстрак-

цией кислотный гидролиз, двухстадийная очистка, дериватизация, получение производных стероидов и ряд других, а также все стадии определения СП газохроматографическим методом: идентификация стероидов с использованием метиленовых единиц, выбор внутреннего стандарта, определение нормы экскреции с использованием для разделения высокоэффективной капиллярной колонки. Последнее особенно важно, поскольку капиллярная газовая хроматография является одним из наиболее эффективных современных методов анализа стероидов в моче, что обусловлено, прежде всего, его высокой чувствительностью и разрешающей способностью.

Одной из методических «новинок» предлагаемой методологии было сочетание капиллярной газовой хроматографии с использованием доступного и недорогого оборудования. Простейший и «заслуженный» в смысле надежности, серийный хроматограф ЛХМ-80 отечественного производства, снабженный пламенно-ионизационным детектором, оказался вполне пригодным для этой цели. В настоящее время современная компьютеризированная версия такого прибора выпускается в России.

После проведенной модификации прибора, для этой цели специально разработаны капиллярные колонки в лаборатории хроматографии ИНХС РАН, была получена высокая воспроизводимость результатов по сравнению с традиционными способами определения стероидов при относительной простоте новой методики, дешевизне используемых реактивов и более высокой экспрессности метода. Кроме того, показана его высокая надежность в ди-



агностике ряда эндокринных, гинекологических и онкологических заболеваний, продемонстрирована пригодность предлагаемого метода для широкого клинического использования. Принципиальная схема разработанной методологии показана на рис. 2.

Возможности метода

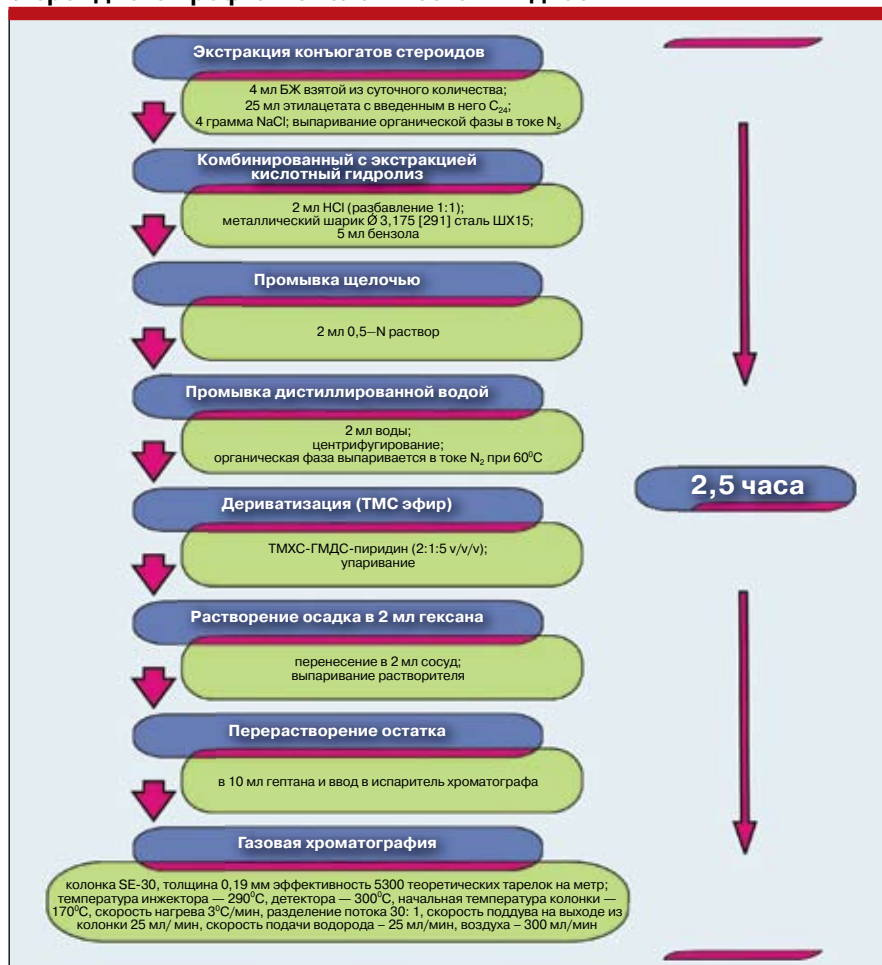
Метод представляет ценность, как тест для суждения об эффективности лечения, подавления или стимуляции стероидогенной функции надпочечников, яичников и гонад, а также для установления оптимальных доз рекомендуемых медикаментов при проведении терапии. В частности, успешная апробация новой методологии прошла для диагностики рака эндометрия у женщин постменопаузального периода; диагностики причин гирсутизма, обеспечив его патогенетически обоснованную терапию; диагностики и лечения, повышенной 5α -редуктазной активности печени у беременных с наличием гирсутизма; диагностики некоторых особенностей метаболизма стероидов при ОПГ-гестозах; для оценки эффективности терапии гормональной недостаточности плаценты; для разработки простых и эффективных тестов, таких как модернизированный метод определения эстриола в моче беременных, определения суммы 17-КС и некоторых других.

Критический анализ всей научной информации, накопленной к настоящему времени по данной проблеме в отечественной и зарубежной печати, позволяет уверенно констатировать: разработанная методология по совокупности характеристик является уникальной и содержит ряд «ноу-хау».

На сегодня определение стероидных гормонов в крови является за рубежом основным, базовым методом соответствующей диагностики, причем стоимость одного определения может достигать в клиниках развитых стран до 500 долларов, а его продолжительность — до нескольких дней. В то же время, создание экспрессной и прецизионной методики газохроматографического определения СП в моче позволило снизить себестоимость подобного анализа до 50 долларов, а его продолжительность — до 2,5 часов.

Такое сочетание низкой стоимости и высокой экспрессности анализа делает данную диагностику заболеваний доступной и актуальной для широкого применения в клинической практике с учетом демографического кризиса в стране, а также роста онкологических заболеваний из-за ухудшения экологической обстановки в городах и последствий техногенных катастроф.

Рис. 2. Оптимизированная схема химико-аналитической методологии, демонстрирующая все стадии процесса получения стероидного профиля биологической жидкости



Дальнейшие перспективы

Разработанная химико-аналитическая методология для ранней диагностики заболеваний человека на основе анализа физиологически активных веществ и их метаболитов в биологических жидкостях человеческого организма может иметь дальнейшее развитие по следующим направлениям:

- расширение круга диагностируемых конкретных заболеваний разного профиля в эндокринологии, гинекологии, онкологии. Ожидается, что высокие результаты также могут быть достигнуты и в других областях медицины — урология, кардиология, неврология и др.;
- изучение возможности использования в качестве объекта исследования других биологических жидкостей (пот, слюна, околоплодные воды, спинномозговая жидкость и т.д.) или других биологических субстанций, например волос и ногтей;
- определение корреляций при анализе биологических субстанций не только человека, но и животного (в

последнем случае предполагается выявить возможности и перспективы использования новых подходов для ветеринарной практики и племенного животноводства);

- апробация метода для использования в области спорта, например, создания простой, экспрессной и надежной методики допинг-контроля спортсменов.

Таким образом, в результате проведения поисковой научно-исследовательской работы в ИНХС РАН впервые была разработана и создана химико-аналитическая методологическая база для скрининговой диагностики целого ряда заболеваний с помощью анализа профилей стероидных гормонов в биологической жидкости организма человека газохроматографическим методом.

В 2007 году данная разработка ИНХС РАН была удостоена премии правительства Российской Федерации в области науки и техники для молодых ученых, а также золотой и бронзовой медали, почетных дипломов на российских выставках. ■