

6. *Pregl-Roth*: Mikroanalyse 1935, 144.
7. *Kraus* Z. anal. Ch. 1939, 117, 243.
8. *Asloth*: Chem. Ztg. 1895, 19, II, 2040.
9. *Emerson*: Am. Soc. 1930, 52, 1291.
10. *Feigl, Schorrová*: Z. anal. Ch. 1923, 63, 17.
11. *Liebig, Du Ménil*: Arch. Pharm. 1835, 52, 67.
12. *Ter Meulen-Heslinga*: Neue Methoden der organisch chem. Analyse: 1927, 29.
13. *Zimmermann*: Mikrochemie 1943, 31, 15.
14. *Bürger* Angew. Chem. 1941, 54, 479.
- Jureček*: Organická Analýsa 1950, 169.

## Biologické hodnotenie mužského a ženského sexuálneho hormónu

FRANTIŠEK SELECKÝ

Hneď na začiatku zdôrazňujem, že nie je cieľom a ani účelom biologických metodík, aby sa považovali za akýsi druh bežných rutinných analytických meraní. Nie, biologické metodiky vyhodnocovacie sú v podstate metodikami čiste výskumnými a experimentálnymi, kde nám ide o stanovenie a zhodnotenie určitého špecifického účinku fyziologického toho alebo oného orgánu, alebo jeho sekrečného produktu. Ide o to, stanoviť, aké zmeny nastanú v biologickom materiáli pod vplyvom najrôznejších látok. Sú to biologické metodiky, ktoré nám umožňujú stanoviť, či tá-ktorá látka je schopná nahradit' funkciu určitého metabolitu — v našom prípade hormónu. Pomocou nich bolo možné objaviť a definovať veľa účinných látok a dnes už tak nevyhnutných liekov. Kontrolná biologická metodika rutinná sa používa iba v tých prípadoch, kde nieto ešte bezpečného kritéria chemickej analýzy, keď stanovením určitých chemických vlastností nemáme zaručenú tú istú biologickú hodnotu liečiva, ktorá sa koniec-koncov musí potom zračit' vo svojom terapeutickom efekte. Je tomu tak najmä pri látkach, ktoré sú chemickeky vôbec ešte nedefinované, alebo aj pri látkach, získaných z biologického materiálu, i keď je tento už v pomerne čistej forme, ale celá súhra konečného biologického efektu nie je zaručená chemickými konštantami. Pravdaže, konečnou snahou je vždy dospieť k chemickej analýze, ktorá je vo veľkej väčšine prípadov menej pracná a rýchlejšia, čo už je zrejme z toho, že pri biologických metodikách sa pracuje so živým materiálom, kde sa musí čakať na priebeh životných biologických reakcií oveľa dlhšie, ako na priebeh reakcie v skle. Toto sa vo veľkom počte prípadov aj podarilo. Podarilo sa to vďaka teamovej spolupráci a myslím, že nikde sa tak táto teamová spolupráca neosvedčila, ako práve v doméne výskumu liečiv. Myslím, že by mi nikto nevedel vymenovať novší objav terapeutický, ktorý by sa nebol realizoval za súčinnosti chemika-organika, syntetika, analytika, fyziologa, farmakologa, klinika,

biologa. Preto zdôrazňujem túto tak nevyhnutnú spoluprácu, ktorú môže korunovať najkrajší úspech — záchrana ľudských životov.

Chciet započat históriou biologickej titrácie, znamená zájsť do najstarších análov ľudstva — veď už Egyptania polievali močom obilie a stanovovali tehotnosť a pohlavie, a ak hyacint po poliatí močom vykvitol, mudrci hrdo oznámili príchod dediča. Mnoho prekonávala biologická metodika a pomerne dlho to trvalo, kým sa stala čoraz špecifickejšou a dokonca i presnou. Veď koniec-koncov i spôsoby, ktoré sú teraz považované za najexaktnejšie, boli relatívne a nepresné, keď si spomenieme na miery, ako bola stopa, lakeť, piad', hrst'. Zakladaly sa aj na biologických charakteristikách a nestaly sa exaktnými a presnými, kým sa neuložil kus kovu o určitej dĺžke do pivnice a nepovedalo sa, že toto je meter; kov o určitej váhe, o ktorom sa povedalo, že to je váha 1 kg. V biologických titráciách to trvalo pomerne dlho, kým sa vymanily z podobných kritérií. Nebolo možné dosiahnuť jednotné výsledky, keď každý experimentátor používal iný druh zvierat a substanciu, ktorá diferovovala ako svojou účinnosťou, tak čistotou a trvalo to veru dlho, kým farmakologovia uznali, že tento stav je práve taký relatívny a pomínutelný, ako bol lakeť kráľa, ktorý sa považoval za jednotku miery. Podstatná zmena v biologických titráciách nastala po stanovení medzinárodných štandardov, len čo sa účinná látka získala v dostatočne čistej miere s presne vyhraneným fyziologickým účinkom. Preto v krátkosti uvediem históriu medzinárodného štandardu follikulárneho, oestrogenného, ženského hormónu.

### História medzinárodného štandardu.

Štandardizačná komisia Spoločnosti národov stanovila za medzinárodnú jednotku gestronu 0,1 gamma účinnej látky. Roku 1932 na jednej z medzinárodných komisií, stanovili prijať ketohydroxyd hormónu, ktorý sa obyčajne získava z moču tehotných, za medzinárodný štandard hormónu, vyvolávajúceho oestrus. Pripravili jednotnú smes prípravku a zvolili laboratóriá National Institut for medical Research za centrálné laboratórium, ktoré malo prevziať úschovu štandardného preparátu i jeho distribúciu v príslušných množstvách ostatným štátom.

Tieto prípravky, s b. t. 254—258° C, boly dokonale zhomogenizované a celkové množstvo sa rozdelilo do 7 ampúl, ktoré uložili v exsikátore s fosfor pentoxydom za tlaku 3 mm. Po 10 týždňoch sa do exsikátora pustil suchý dusík, ampulky zatavili a uschovali pri 0° C. Z prvého množstva sa zaslalo cca po 20 mg každému členovi konferencie. Štandardný preparát rozdelili zas za príslušných kautel do malých skúmaviek s obsahom 19—22 mg. Celkove bolo k dispozícii určité malé množstvo.

Po vyčerpaní tohto štandardu pripravili ďalší.

Od toho času nastal pochopiteľný obrat vo výsledkoch a prestaly sa zjavovať diferencie, keď jeden autor vytitroval o 10.000 myších alebo potkaních jednotiek viac alebo menej. Tento medzinárodný štandard dali k dispozícii aj nám. Je pochopiteľné, že po voľbe medzinárodného štandardu sa presne stanovila aj metodika titračná, v ktorej sa zvlášť kladie dôraz na zachovanie potrebných kautiel. Prísne, ťažké a nákladné sú podmienky chovu zvierat za účelom, aby sme mali k dispozícii stále ten istý hodnotný a štandardný biologický materiál, a že sa nám naša snaha, mať akési quasi zvieratá pro analysi, darí, je to vďaka pochopeniu socialistického systému pre vedu.

Pri serióznom sledovaní výskumu štúdia hormónov treba prejsť nasledujúcimi etapami:

Charakterizovanie fyziologického účinku a dôkaz, že ide o endokrinnú, teda vnútornosekretorickú činnosť.

Extrahovanie účinnej látky nasledovným zahusťovaním frakcií zo živočíšneho materiálu. Na zaručenie úspechu treba veľmi starostlivo vybrať biologický materiál, aby bolo možné sledovať účelnosť a neškodnosť prevádzaných chemických manipulácií.

Ďalšou etapou je získanie čistej látky a štúdium jej konštitúcie, aby sa mohlo začať syntézou účinnej látky. Dôležitosť tohto si uvedomíme, ak si pripomenieme rôzne ťažkosti, na ktoré sa naráža pri získavaní účinného princípu z prirodzeného materiálu biologického. Sú to niekedy až neuveriteľné množstvá potrebného východzieho biologického materiálu. Bolo treba viac ton vajec (testes) za cieľom získania mužského hormónu. Zo 100 kg sa dostane cca 10 mg testosterónu. Treba niekoľko tisíc litrov moču, ktorý treba až miliónnásobne zahustiť, aby sa získal hormón follikulárny. Vo viacerých prípadoch syntetici tento problém zdolali úspešne. Je však ešte veľa hormonálnych látok, ktoré sa vôbec nedajú pripraviť pre ich prípadný komplexný proteidný charakter, alebo čistá syntetická látka nemá súhrnný celkový biologický účinok ako látka, získaná z materiálu prirodzeného.

Ako posledná etapa dôkazu vospelosti vedy je chcieť získať látku s jednoduchšou chemickou konštitúciou, aby syntéza bola ešte jednoduchšia. Látka musí mať, prirodzene, ten istý účinok fyziologický.

A práve v prípade vývoja štúdia oestrogenne účinných látok možno jasne demonštrovať úspech teamovej spolupráce chemika, syntetika, analytika, biochemika, fyzikálneho chemika, fyziologa, biologa a klinika, lebo keď za 20 rokov po demonštrovaní biologického oestrogenného účinku follikulárnej tekutiny nielen že sa získaly čisté kryštalické látky a tieto potom získaly synteticky, ale dokonca sa získaly syntézou látky jednoduchších chemických konštitúcií s tými istými fyziologickými vlastnosťami.

Pri štúdiu takýchto nových látok sa neobídeme bez ich biologického hodnotenia a najmä nie, ak chceme sledovať funkčnú koreláciu a antagonizmus biologicky účinných substancií. Toto je terapeuticky nesmierne dôležité.

Iba po získaní čistého ovariálneho follikulárneho hormónu a hormónu žltého telieska bolo možné započat štúdium korelačných vzťahov týchto dvoch, pre existenciu plodu bezpodmienečne dôležitých hormónov. Synergistický vzťah môžeme demonštrovať nasledovným pokusom: Vezmeme dve kastrované zajačice. Jednej dajme 2,5 mikrogramov (gamma) oestradiolu denne po 5 dní. Druhej sa ani nedotkne. Na šiesty deň injikujeme obom 0,3 mg progesterónu. Pri biologickom hodnotení uteru zistíme, že u prvej, kde bol aplikovaný oestrón a progesterón, nachádzame bohatú stromkovitú rozvetvenosť tubárnej sliznice, ako je charakteristické pre stav tehotenstva. U druhej samice, i keď sa jej dal progesterón (hormón žltého telieska), nenachádzame vôbec nijaké zmeny. Ak by sme však pomocou progesterónu chceli predsa získať túto premenu, museli by sme z neho denne aplikovať aspoň 10 mg a efekt by sa ešte nevyrovnal onému fyziologickému efektu, vyvolanému funkčným synergizmom týchto dvoch pohlavných hormónov.

Tento synergizmus je veľmi dôležitý a dokonca vládne pri udržaní tehotenstva. Máme tehotnú zajačicu. Extirpujeme corpus luteum a nasleduje potrat: stratí mladé, alebo sa jej tieto v dutine brušnej resorbujú. Ak však aplikujeme denne 5 mg progesterónu, podarí sa nám aj pri vybraných žltých telieskach udržať tehotenstvo. 0,75 mg progesterónu už bezpečne nestačí na udržanie plodu, keď však pridáme 0,001 mg oestradiolu, podarí sa nám tehotenstvo udržať aj pri nedostatočnom množstve aplikovaného hormónu žltého telieska. Tento synergistický vzťah sa však nevzťahuje iba na maternicu, ale aj na iné funkčné orgány, ako na prsník, lonovú kosť a pod. Tieto dva spomenuté hormóny sa voči sebe chovajú aj ako antagonisti, teda každý z nich môže oponovať, prípadne aj zrušiť biologickú účinnosť druhého. Vyjadrené v experimente: Kastrujeme samicu 24 hod., po tom, čo bola pripustená k samcovi. Tejto injikujeme 1,5 mg progesterónu po 5 dní a v siesty deň prevedieme histologickú kontrolu. Zistíme, že transformovanie sliznice túb nastalo normálne, ako keď nastáva tehotenstvo. Tejto preмене sliznice môžeme zabrániť, ak pridáme dostatočné množstvo follikulárneho hormónu. Zaujímavý a pekný je aj nasledujúci pokus na morčati. U neho, ak vo fáze účinnosti žltého telieska prevlečieme cez roh maternice niť, vytvorí sa nám tzv. traumatické deciduoma okolo tejto nite. Namiesto nite môžeme vložiť do maternice aj malý úlomok skla. Týmto experimentom vlastne oklameme sliznicu maternice a táto sa nám začne transformovať a reagovať podobne, ako keby sa bolo do jej sliznice zahniezdilo oplodnené vajíčko a nastával vlastne stav tehotenstva, keď sa sliznica začína pripravovať na svoju funkciu výživy a udržania budúceho plodu. Ak však pri tomto experimente podáme zase dostatočné množstvo follikulárneho hormónu, môžeme tvorbu tohto traumatického decidua zabrániť. Hormón žltého telieska môže zas opačne stl-

miť kinetický účinok follikulárneho hormónu na svalstvo maternice. Follikulárny hormón môže totiž vyvolať kontrakcie tohto svalstva a potom je tu, prirodzene, nebezpečenstvo potratu. Progesterón tomuto účinku follikulárneho hormónu za fyziologických podmienok oponuje, a ak sa tento vzájomný vzťah naruší, nastáva potrat a neschopnosť donosenia plodu. Tento pokus sa dá previesť a demonštrovať nielen in vivo, teda na živom zvierati, ale aj in vitro, t. j. na svalstve, ktoré sa z organizmu vyňalo.

Problematika týchto antagonizmov a synergizmov je v biológii veľmi častá a neobmedzuje sa iba na steroidné hormóny. Sú to kapitoly veľmi komplikované, spletité, ale eminentne dôležité, jedine biologickými pokusmi demonštrovateľné a reprodukovateľné. Sú vlastne onou základnou složkou harmonického biologického diania.

Toto uvádzam ad demonstrandum biologického experimentu a pri načrtnutí biologického hodnotenia sexuálnych hormónov obmedzím sa iba na mužský a ženský hormón.

### Androgenné hormóny.

Veľmi jednoduchou a jasnou sa zdala byť epocha hormonologie, keď hormóny boli rozdelené na dve základné skupiny: hormóny mužské a ženské. Aké však bolo prekvapenie, keď sa po presných výskumoch biologických i chemických zistilo, že je viac ženských oestrogených hormónov v moči žrebca než v moči kobyly, že je oveľa viac mužských androgenných hormónov v moči ženy než v moči býka, a že kastrát mužského i ženského pohlavia vylučuje androgenné hormóny v takom množstve ako normálne. Objavy posledných rokov prinútily preto podstatne revidovať poznatky v tomto odbore. Nemožno však prebrať všetky podrobné a komplikované pochody metabolizmov, keďže by som veľmi odbočil z témy tejto rozpravy.

Z vyššie uvedeného teda vyplýva, že i keď bolo všetko zdanlivo také jasné a jednoduché, nakoniec sa narazilo na problém, ako teda definovať androgenný-mužský hormón. Za vyhovujúcu možno považovať nasledovnú definíciu: androgenný-mužský hormón je substancia, ktorej biologický účinok sa približuje účinku testosterónu, hormónu extrahovaného z vajec. Fyziologické účinky takejto substancie spočívajú teda v nahradení hormónu testikulárneho, ak boli odňaté vajcia mužskému individuu. Zasa nemožno zabíhať tuná do podrobností, ale pri týchto účinkoch môže ísť v hlavných črtách o účinky so schopnosťami preventívnymi, profylaktickými, liečebnými čiže kuratívnyimi, alebo s účinkami reštaurujúcimi kastráciu. Čo sa týka samých metód biologického testovania a zhodnocovania androgenných hormónov, uvádzam z mnohých iba tie, ktoré sú schopné slúžiť za test androgenného účinku. K tomuto účinku možno použiť ryby, žaby, vtákov i savce. Z rýb možno použiť viacero druhov a sleduje sa u nich tzv. „sobášne sfarbenie“. U kastrovaných rýb za rybiacu jednotku sa považuje najmenšia dávka, ktorá, keď sa injikuje intraperitoneálne do brušnej dutiny, vyvolá zja-

venie sa tohto pretransformovania za 10 minút. Toto musí trvať aspoň 3—4 hodiny. Bohužiaľ, mnoho rýb zahynie pri kastrácii a čo je ešte nevýhodnejšie, mnoho nespecifických vasodilatačných látok je schopné tento špecifický fenomén vyvolať. Tento test možno prevádzať aj na nekastrovaných rybách oveľa jednoduchšie, ale za cenu podstatného sníženia špecifčnosti. Taktiež možno usudzovať o účinnosti androgenného hormónu, ak ním kŕmime ryby a graficky zaregistrováme ich pohyby.

U žiab sa využíva mnohým azda známy fenomén objatia. I tento fenomén bol navrhnutý za test a za žabiu jednotku sa považuje tá dávkavka, ktorá, keď sa nastriekne do lymfatického vaku, je schopná vyvolať tento reflex. Využíva sa i tá skutočnosť, že po kastrovaní zmizne hlavný mužský znak — ostroha, ktorá sa znovu zjaví po aplikovaní androgenného hormónu.

Z vtákov za test biologického hodnotenia sa berie hrebeň kohúta. Tento test spočíva na vývoji prídavných znakov na hlave kohúta pod vplyvom androgenných hormónov. Keďže tento test je quasi najužívanejším, popíšem ho po celkovom prehľade podrobnejšie. I hrebeň malých kurčiat môže slúžiť za test. U hydiny rasy Sebright kohút má charakteristické sfarbenie a sformovanie peria. Po kastrácii sa perie zmení a stáva sa typu slepačieho. Svoju charakteristiku znovu nadobudne vplyvom účinku androgenov. Zobák rasy Moineau po kastrácii dostáva slonovinové sfarbenie a po aplikácii mužského hormónu sa znovu sfarbí do čiernej.

U saccov existuje celá paleta možností testov androgenných hormónov. U zajaca za test, ale nie príliš špecifický, môže sa považovať zreštaurovanie pohlavných orgánov.

U potkanov a myši uvádzam nasledovné testy: test svalovej aktivity kastrovaného zvierata sa zvyšuje po injekcii mužských hormónov. Ide však o efekt nepravidelný, subjektívnej interpretácie. Za cieľom výskumným sa používa efekt a účinok androgenných látok na pohlavný trakt a prídavné žľazy kastrovaných zvierat. Patrí sem váhový test, kde sa vážia vesikuly seminálne (semenovody), prostata (žľaza predstojná), alebo existuje i modifikácia, kde sa vážia spolu ako celok so žľazami Cowperovými. Po kastrácii nastávajú v trakte genitálnom atrofické zmeny, ktoré možno reparovať aplikovaním mužského hormónu. Tu sa potom cytologickými metódami sleduje histologicky reparačná schopnosť hormónu buď už vyjadrená v tom, že sa zmení výška vrstevnatosti buniek, alebo že sa znovu zjavia sekrečné granulácie, alebo že sa znnoží množstvo mytóz. Tento test je rýchlejší než predtým uvedený a môže sa prevádzať na vesikuloch seminálnych i na prostate, na žľazách Cowperových a na vas deferens.

Tieto metodiky sú jemnejšie a presnejšie než test kapúnieho hrebeňa, ale môžu sa prevádzať iba vo veľmi odborných laboratóriách. K testu mužského hormónu sa využíva aj skutočnosť, že poklesnutý respiračný kvocient (metabolizmus glucidov) sa vracia ad normam po injikovani mužského hormónu. Skúška sa prevádza 30 minút po aplikácii. Test nie je špecifický.

Normálny cyklus 100—200 g potkana trvá 6—7 dní. Injikovaním mužského hormónu možno tento cyklus posunúť. Tento test je veľmi jednoduchý, ale tiež nie špecifický.

Jeden z veľmi špecifických, presných, ale, bohužiaľ, i z najťažších testov je potlačenie tzv. kastročných buniek v hypofýze u kastrovaného zvierata. Tieto kastročné bunky sa zjavia v prednom laloku hypofýzy dva-tri týždne po kastrácii. Výhodou tohto testu je, že vystačíme až s 50-krát menšími dávkami hormónov, ako u testov ostatných. Ale, ako som povedal, tento test nielen že si vyžaduje najvyspelejšiu techniku operačnú, ale aj histologickú, diagnostickú rutinu.

U morčiat možno taktiež vyvolať reštaurovanie pohlavných orgánov u kastrovaného zvierata aplikáciou mužského hormónu. Ako zhodnocovací test mužského hormónu možno použiť elektrickú ejakuláciu. Prechod elektrického napätia hlavou morčata vyvolá erekciu a ejakuláciu pohlavného orgánu. U normálneho samca exkrečná tekutina rýchle koaguluje. U kastrovaného nenastane koagulácia, ale táto sa znovu zjaví po injikovaní androgenov. Je to málo spoľahlivý test, možno ho reprodukovať aj na myšiach. Ak extirpujeme jedno vajce, vitalita spermatozoidov (semien) sa zachová po 60 dní. Ak sa vyberú obe vajcia, životnosť semien klesá na 23 dní. Po injikovaní mužského hormónu túto životnosť podstatne zvýšime. Tento tzv. motilitný test spermatozoidov je špecifický, ale výsledok zdĺhavý.

Pri výbere biologického testu, keď biolog v spolupráci s chemikmi je zodpovedný za stanovenie účinnosti alebo neúčinnosti určitej novej látky, stojí niekedy pred veľmi ťažkým a zodpovedným problémom, vyhľadať a stanoviť test, ktorý vyhovuje požiadavkám a kritériám citlivosti, špecifičnosti a proporcionality injikovaného množstva a je súčasne rýchly, ľahko realizovateľný a ekonomický.

Ako som bol spomenul, pri štúdiu a kontrole androgenov je všeobecne akceptovaný za najvzritejší test kapúnieho hrebeňa. Je špecifický, proporcionálny injikovanému množstvu, dosť rýchly, iba azda o niečo drahší. Je jedinou metodikou, uznanou za medzinárodný biologický test na štandardizáciu mužských hormónov. Rozvediem preto techniku tohto testu.

Najčastejšie sú používané Leghorny, biele alebo zlatisté, a Bress alebo Bantam kohúty. Chov musí byť štandardný, určitej váhy, štandardnej výživy. U nich erektilným orgánom je vlastne hrebeň a laloky, ktoré po kastrovaní zvierata atrofujú. Vyhodnocuje sa iba hrebeň. Zviera sa kastruje v 6. mesiaci, keď je hrebeň už plne vyvinutý. Kastrácia je pomerne veľmi ťažká a už i sama narkóza činí ťažkosti, keďže kohúty zle znášajú bežné narkotiká. Chlóroform neznášajú temer vôbec. Narkóza musí byť úplná už pred operáciou, keďže otvárame súčasne hrudnú i brušnú dutinu. Androgennú látku, ktorá je obyčajne skoncentrovaná v nejakom organickom rozpustidle, prenesieme do oleja a injikujeme do prsného svalstva. Po kastrácii zakrpatený hrebeň, ak je látka účinná, začína nadobúdať svoje štandardné pôvodné rozmery. Je viacero spôsobov, ako vyhodnotiť narastený hrebeň. Veľkosť hrebeňa možno me-

rať priamo, a to tak, že pri koreni hrebeňa nad zobákom máme prevlečený krúžok, ktorý nám slúži za fixný bod, od ktorého meriame 2—3 najďalšie a najvyššie okraje hrebeňa. Iný spôsob je ten, že priamo fotografujeme vzrast hrebeňa, tvar hrebeňa z fotografie vystrihneme a jeho plechu zmeriame buď planimetrom alebo jeho váhu zistíme na torzných váhach. Pravda, kvalita fotografického papiera v tomto prípade musí byť štandardná. Ďalší spôsob je ten, že vrháme svetelný lúč na hrebeň a jeho silueta dopadá na fotobunku, ktorej intenzitu prúdu možno zmerať a z toho sa potom urobí diagram. Veľmi zaujímavý a sľubný je spôsob, ktorý spočíva v zmene elektrickej vodivosti. Zistilo sa totiž, že bioelektrické rezistenčné prúdy kapúnieho hrebeňa sa proporcionálne znižujú podľa aplikovaného množstva androgenných hormónov.

I keď som azda viacej rozviedol tento spôsob biologického testu, nie je mi možné rozviesť množstvo dôležitých podmienok, od ktorých neslobodno upustiť, ak nechceme narušiť presnú reprodukovateľnosť výsledku. Receptivita a senzibilita hrebeňa nesmie variovať. Staré kohúty sú menej citlivé. Viacmesačný odpočinok znižuje citlivosť. Zmeny teplôt taktiež môžu zapríčiniť kolísanie výsledkov a pod. Pokiaľ druhá medzinárodná konferencia pre štandardizáciu hormónov r. 1935 nedefinovala medzinárodnú jednotku, výsledky rôznych experimentátorov sa podstatne od seba líšily. Tento medzinárodný štandard pozostáva z kryštalického androsterónu. Jednotkou je účinnosť prítomná v 100 mikrogramoch prípravku, ináč vyjadrené, jedna jednotka má dať priemerný vzrast 5 mm sumáru dĺžky a výšky hrebeňa v 5 dňoch u 5 zlatistých Leghornov. Hodnotiť však androgenné látky možno rôznymi technikami, tak napr. serií kohútov sa nastriekne postupne 0,5, 1, 2, 3, 4 až 5 jednotiek, nechajúc medzi každým týmto obdobím nastrieknutia zmenšiť sa hrebeň na jeho východziu veľkosť. Sostrojí sa potom pre každé zviera krivka, a to tak, že na ordináte sa nanesú prírastky a dávky sa nanesú na abscisu. A teraz, ak ide o stanovenie preparátu X, stačí zmerať zväčšenie sa hrebeňa a dedukovať tak na množstvo účinnej látky. Je prirodzené, že sa tu musia zase dodržiavať určité podmienky. Nie je napr. možné voliť príliš veľké rozpätie dávok. Inou metodikou je napr. stanovenie účinnosti reakciu prahovej hodnoty, alebo stanovenie relatívnej účinnosti a pod.

Spôsob aplikovania látky môže byť nasledovný: látku môžeme vstrekať subkutánne alebo, ako som bol spomenul, vnútro svalovo, a to buď do prsného svalstva alebo do stehenného svalstva. Aplikácia do prsného svalstva je najbežnejšia a obe tieto aplikáčne miesta sú rovnocenné.

Priama aplikácia prípravku na hrebeň kapúna, tzv. badižonáž, dáva najväčšie vzrasty hrebeňa a je veľmi citlivá. Aplikácia orálna je menej účinná, a to 10—30 násobne, podľa prípravku. Aplikácia vnútrožilná je neúčinná. Dôležitú úlohu hrá, prirodzene, aj rozpustidlo, ktoré musí byť pri prípravku aj pri štandarde rovnocenné. Dôležité je to najmä pri aplikácii lokálnej, kde aktivita klesá nasledovne: alkohol, benzén,



éter, oleum arāšidis, lanolín. Jednorázová aplikácia je menej účinná, ako každodenne opakované injekcie. Bežne sa používa 5 každodenných injekcií o obsahu 0,5 ml.

Z chemických dozáží sa prevádzajú tieto: kolorimetrická, a to či už priamo, ak surový extrakt je dostatočne čistý, alebo sa najprv prečistí buď chromatografiou, alebo kombinovaním ketosteroidov s Girardovým T-reagensom. Separácie frakcie alfa a beta sa prevádzajú tiež buď precipitáciou digitonozidov alebo chromatografiou. Samotných modifikácií týchto kolorimetrických reakcií je viacero. Pri polarografickej metodike 17-ketosteroidy sú stanovované po kombinácii Girardovým T-reagensom. Takto možno získať charakteristický potenciál skupiny CO, pripojenej na saturovaný cyklus 5 uhlíkov. Za týchto istých podmienok nenasýtený ketón dvojnými väzbami alfa a beta na cyklus 6 uhlíkov dáva nižší potenciál než mínus 1 celá 1 voltu namiesto 1 celá 4 voltu. Tieto dve serie ketónov môžu sa stanoviť súčasne na tej istej vzorke moču. V roku 1941 aplikovala sa táto metodika aj na hydroxysteroidy. Pri nefelometrickej dozáži 17-ketosteroidy sa zase separujú T-reagensom a hodnotí sa opacita, daná komplexom pridaného kálium jodomerkurátu. Bohužiaľ, všetky tieto metodiky nedávajú uspokojujúce výsledky a preto bežné rutinné stanovovanie hormonálnych hladín možno prevádzať len na málokterých miestach, ktoré sú s touto problematikou veľmi dobre oboznámené, aby pri hodnotení výsledkov si boli vedomí všetkých prameňov chýb a nedostatkov. Chcieť analyzovať túto skutočnosť, znamenalo by zas zabehnúť do problematiky fyziologie metabolizmu hormónov. A tu si musíme byť vedomí toho, že chcieť sledovať metabolizmus hormónov, na to nestačí určiť a stanoviť 17-ketosteroidy, ale i rôzne iné androgeny, ktorých doteraz bolo stanovených až 14 a, bohužiaľ, práve z ich vzájomných pomerov azda bude možné stanoviť určité pravidelnosti a výkyvy metabolizmu. Je pochopiteľné, že toto nebude ľahkou úlohou.

### Oestrogenné hormóny.

Biologické metodiky vyhodnocovania follikulárnych hormónov možno zadeliť do 2 veľkých skupín:

1. Kvalitatívne vyhodnocovacie metodiky a metodiky, ktoré umožňujú
2. kvantitatívne stanovenie follik. hormónu a látok s oestrogenným účinkom.

Z kvalitatívnych metodík uvediem iba niektoré s ich krátkou charakteristikou.

Reakcia otvorenia sa vagíny: prevádza sa na infantálnych potkanoch cca 3 týždňových. Majú sa použiť zvieratá z jedného vrhu. V tejto metodike sa aplikuje 1 gamma oestrónu — 0,05 gamma oestradiolu. Otvorenie vagíny nastáva v 5.—7. deň. Je snaha túto metodiku použiť ako kvantitatívnu. Individuálne výkyvy tejto reakcie sú však pomerne značné.

Vplyv follikulárneho hormónu na mammu obyčajne sa prevádza na dospelých samičích morčatách, u ktorých sa týždenne merajú mammy. Hormón sa tu obyčajne aplikuje dlhší čas, niektorí autori aplikujú follikulárny hormón v 0,5 ml olivového oleja 2 razy denne, a to po 2—3 týždne. I túto metodiku sa snažili použiť ako kvantitatívnu.

Technika impregnovania mammy: i tuná to isté množstvo oestradiolu účinkuje silnejšie než oestrón.

Juhn a Gustawson na štúdium follikulárneho hormónu použili jeho účinnosť na perie vtáctva. Na pokusy sa najlepšie hodia hnedé Leghorn kapúny. Týmto sa vytrhá prsné perie, ktoré sa nechá cca 2 týždne dorastať (2—5) a potom sa aplikuje skúšaná látka. Reakcia sa hodnotí ako pozitívna, ak sa vytvorí na báze peria hnedosfarbený pás za 48 hodín. Táto reakcia zotráva niekoľko dní a je veľmi citlivá, keďže 6 RE, aplikovaných po niekoľko týždňov na 100 g váhy, stačí vyvolať pozitívnu reakciu, totiž, že perie nadobudne samičí charakter. Na určitú prítomnosť follikulárneho hormónu možno usudzovať aj z rýchlosti vzrastu peria. Pri tomto štúdiu treba však podrobne stanoviť a poznať hodnoty tých alebo oných oblastí operenia. Sú znalci, ktorí bez rozpakov vedia z peria vyčítať, koľko ráz bol ten-ktorý Leghorn sliepkou alebo kohútom.

I paradoxný účinok follikulárneho hormónu použili na jeho štúdium. Prevádza sa obyčajne na kastrovaných, 24—26 dňových potkanoch. Čas aplikácie je tu 3-týždenný, ak sa napr. sleduje účinok na prostatu. Vodnému roztoku oestradiolu chýba tento účinok, olejový roztok však účinkuje zas silnejšie než oestrón a tento zas silnejšie než equilín. Na štúdium epitelmetaplasie samičieho genitálneho traktu sa zas lepšie hodia infantilné kastrované myši. Pokus trvá 3 týždne. Výsledky sa hodnotia zo seriových rezov prostaty, ampully, vas deferens a semenných váčkov.

Aj ryby možno použiť na vyhodnocovanie oestrogenných látok. Vyberú sa napr. 3 rybky (horavky, kaprovitá ryba), dajú sa do 2 litrového akvária s obsahom 1 litra vody a moč sa pridáva v 5 ml čiastkach. Voda sa musí vymieňať, teplota udržiavať pri cca 10—12° C. Na jeden pokus sa spotrebuje cca 20—40 ml moču. Pozitívna pokusu sa usudzuje z dĺžky narasteneho kladielka. S koncentrovanými extraktmi možno pokus skrátiť. Pozitívnu reakciu dá napr. aj citrátová krv tehotnej ženy, cca 50 g práškovaného placentárneho extraktu. Extrakt z 500 ml moču normálnej ženy účinkuje taktiež pozitívne. Rybky možno po 6—8 týždňoch použiť znovu. Americkí autori považujú túto metodiku za pomerne vhodnú pre diferenciálnu diagnózu v gynekológii. Tejto metodike by sa však mohol namietat závažný argument, a to, či je špecifická. Niektorí autori zistili totiž, že napr. čím čistejší je follikulárny hormón kryštalický, tým menej je účinný. Najúčinnější je surový extrakt.

Z ďalších metodík sa zmienim už iba podľa pomenovania; je to:

- a) chromtest metodika podľa Poll Blotevogla,
- b) pozorovanie tukových granúl v epiteliálnom utere,

- c) zmena rytmicity izolovaného uteru,
- d) sledovanie menštruačného cyklu u opíc.

### Metodiky kvantitatívne.

#### I. Metodika zakladajúca sa na vážení uterov.

II. Allen-Doisyho metodika, ktorá je azda bežnejšia a aj známejšia. Allen a Doisy využili poznatky Stockarda a Repanicolau na morčati a potkanovi a aplikovali ich na myši. Nerozvediem problematiku týchto dvoch metodík tak ďaleko, aby sme jednu alebo druhú vyhlásili za lepšiu, citlivejšiu, špecifickejšiu a pod. Naše iba 2 $\frac{1}{2}$  ročné skúsenosti nás na to neoprávňujú. Zvrátiť ten alebo onen názor niektorého z obhajcov jednej alebo druhej metodiky je vecou závažnou a zodpovednou. Sú to obyčajne autori veľmi známi, pracujúci v moderných laboratóriách so závideniahodnými fundáciami, odhliadnuc od toho, že sledovali tento problém viac s čistou výskumného stanoviska. U nás musela zas zpočiatku prevládať stránka praktická, umožňujúca rutinné prevádzanie titrácie vo veľkom. Je však prirodzené a bolo pre nás *conditio sine qua non*, že sme si nedovolili nijaký ústupok, ktorý by bol mal za následok čo i najmenšie sníženie presnosti a citlivosti metodiky.

Metodike Allen-Doisyho niektorí autori azda právom vycítajú, že nie je tak špecifická, ako metodika váženia uterov. Táto námietka môže nadobudnúť platnosť pri titrovaní folikulárneho hormónu či už v krvi alebo v moči, kde možno predpokladať, že k súčinnosti vyvolania oestrogenného účinku môžu dopomôcť i ostatné prítomné hormóny, a to najmä gonadotropné, placéntarne, corpus luteárny hormón a pod. Môže tomu tak byť najmä ak sa titrácia prevádza skoro priamo s močom, ktorý sa nepodrobil riadnemu čistiacemu postupu. V našom prípade však ide o vyvolanie špecifického účinku látkou dokonale vyčistenou, prekryštalizovanou, so známymi chemickými a fyzikálnymi vlastnosťami. Spoluúčinnosť ostatných látok hormonálneho charakteru je takto vylúčená. Na kastráciu sa používajú potkany. Potkanom pred myšami dávame prednosť z toho dôvodu, že ich menštruačný cyklus je oveľa stabilnejší. Manipulácia s potkanmi je oveľa ľahšia a v rutínnej práci menej chýlostivá. Myši berieme do pokusu iba v prípadoch, keď ide o materiál s veľmi nízkym obsahom oestrogennej účinnosti — okolo 100 j. V našich rutinných titráciách ide však poväčšine o hormonálne koncentrácie, kde v 1 litri sa predpokladá obsah až 30 miliónov jednotiek. Titrácie na myšiach si teda vyhradzuje iba pre prípady s veľmi nízkym obsahom hormonálnym a budeme ich teraz používať v niektorých výskumných problémoch.

Na kastráciu berieme potkany nad 100 g, teda potkany dospelé a pohlavne vyvinuté. Treba brať do úvahy, že kastrovanie potkana 40 gramového znamená ovplyvniť jeho ďalší vývin na dosiahnutie normy, keďže je známy korelačný vplyv oestrogených hormónov na ostatné endokrinné orgány, ktorých dôležitosť k normálnemu vývinu rozvíestí by znamenalo venovať tomu kapitulu, ktorá by vybočovala z tohto rám-

ca. Techniku kastrovania prevádzame laparatomiou. Tomuto spôsobu pred kastrovaním od chrbta dávame prednosť z toho dôvodu, že získame dokonalý prehľad o umiestení genitálneho aparátu, kde aspekciu môžeme prípadne zistiť rôzne anomálie, prípadne aberantné ovária alebo prípadnú tehotnosť. Extirpovanie ovárií in toto je takticky bezpečnejšie než malým rezom od chrbta. Pri kastrácii od chrbta treba robiť dva razy rez, dva razy sošívať a pinzetou vydvihnúť ovária z tukového tkaniva. Tu sa môže stať, že ak je tuková vrstva silná, neextirpuje sa ovárium in toto či už preto, že niet prehľadu, alebo preto, že ikaň, súc tukovitá, je krehkejšia. Ani touto operačnou technikou sa nezíska na čase, keďže pri laparatomii stačí uzavretie operačného poľa dvoma svorkami. Námietky o možnosti infekcie pri laparotomiách sa neobávame, keďže pri našich kastráciách je mortalita naozaj zriedkavá, číselne vyjadrená nie väčšia ako 0,1% a aj v týchto prípadoch je kastrácia nepriamou príčinou smrti.

Positívna vyhodnocovania nami používanej metodiky začína sa zjavením sa keratinizovaných buniek. V titrácii metodikou váženia uterov sa berie za prejav pozitivity priberanie na váhe uterov, teda tieto sa musia vážiť. Nebudem rozvádzať všetky možnosti chýb, ktoré sa pri tomto postupe môžu vyskytnúť, ale uvediem len niektoré: samotná technika extirpovania uterov závisí od toho alebo oného experimentátora a súčasne závisí na tom, koľko sa už prípadne ubralo z uteru pri kastrácii, metodika konzervovania a dehydrovania uterov, ako i samotné váženie a pod. sú ďalším momentom možnosti úchvliet. Pri teste Allen-Doisyho za jediné kritérium pozitivity reakcie berieme iba 100%-né zjavenie sa keratinizovaných buniek. Stanovenie tohto stavu menej závisí od experimentátora, ako rôzne pochybné medzistádia, z ktorých možno usudzovať na účinnosť prípravku. Toto hodnotenie je už veľmi závislé od rutiny experimentátora. Prevádzanie titrácií a hodnotenie vykonáva však aj u nás tá istá osoba.

Pre nás však z naidôležitejších dôvodov k voľbe modifikovanej metodiky Allen-Doisyho bola skutočnosť, že pri nej sa zvieratá nezabíjajú a že na tých istých zvieratách za dodržanie určitých prísnych opatrení možno titrovať viac ráz. Pre nás to prakticky znamená: pri našom rutinnom titrovaní sme titrovali cca 120 rôznych smesí plus štandardizované, a keď berieme iba 5 zvierat na jedno titrovanie (väčšina autorov kladie za podmienku pracovať s väčším počtom zvierat), znamená to pri prevádzaní vážkovej metódy požiadavku 1.200 zvierat, a to samičiek! Musia to však byť zvieratá do 40 g, a to len samičky, ktoré majú byť z jedného vrhu. Chcieť dodržať tieto podmienky a mať stále k dispozícii dostatočný počet vyhovujúcich zvierat, aby neutrpela kontinuita tak veľkého počtu titrácií a aby sa mohlo čeliť aj prípadným neprogramovaným titráciám, znamenalo by to udržiavať tak rozsiahly chov zvierat, aký za daných podmienok nie je absolútne možný. Okrem toho znamenalo by to bezúčelné zataženie nákladov a toho času aspoň 40% z týchto zvierat by sa nedalo zužitkovať. Ako jeden zo závažných dôvodov sme brali aj skutočnosť, že nátery pri teste Allen-Doisyho nám ostávajú ako nezvratné dôkazy prevedených titrácií. Tieto zostávajú a sú re-

gistrované v archíve a je preto kedykoľvek možné, aby ich zhodnotenie mohol znovu prezrieť a nestrane zhodnotiť iný skúsený experimentátor i po uplynutí niekoľkých rokov. K jednorázovej aplikácii vo forme subkutánnej injekcie sme sa rozhodli z nasledujúcich dôvodov: aplikovanie vo viacerých dávkach má podstatný význam zas najmä pri titráciách, kde ide o nízke hodnoty účinných látok. Znamená to dvoj- až trojnásobnú úsporu techniky. Do úvahy sa musí brať i skutočnosť, že viacnásobné pichanie toho istého pokusného zvierata nielen že znamená jeho ďalšie rušivé ovplyvňovanie, ale i možnosť vnášania ďalších chýb pri dávkovaní titrovanej látky, ako i jej resorbovanie zo subkutánneho väziva zvierata. Je prirodzené, že sa prísne dodržiavajú nasledujúce kautely: používať vždy rozpustidlo tej istej kvality ako pre titrovanú látku, tak i pre štandard. Aplikuje sa vždy v tom istom množstve a za tých istých štandardných podmienok.

### Princíp metodiky.

Kastrované potkany sa po odpočinku vytitrujú medzinárodným štandardom  $0,0001 \text{ mg} = 1 \text{ medzinárodná jednotka (IU)}$ .

Tým sa stanovila ich citlivosť a vieme, ktoré zviera na koľko gamma štandardu odpovedá 100%-ným pozitívnym testom. Po vytitrovaní a pre svedčení sa, že zviera odpovedá stále na to isté známe množstvo oestrogenne účinnej látky 100%-ne pozitívnym testom, zjavením sa keratinizovaných buniek, možno previesť samotnú titráciu. Prakticky zviera dostane vždy v obmene štandard a hľadanú látku, takže citlivosť zvierata sa stále kontroluje a súčasne sa takto vyhovuje požiadavkám krížového testu.

Boli sme zvedaví a chceli sme si overiť reprodukovateľnosť nášho spôsobu titrovania a dali sme preto previesť kontrolnú titráciu v istom parížskom univerzitnom hormonálnom laboratóriu, kde s touto metódou majú viacročné skúsenosti. Dostali k dispozícii surový follikulárny liekár s obsahom 30 g na liter. Tento bol zriedený tým spôsobom, aby 0,5 ml obsahovalo 4 gamma (citlivosť ich zvierat) oestrogennej látky. Výsledok titrovania sa úplne shodoval s našimi výsledkami, takže i samotné parížske laboratórium ich vzalo na vedomie s veľkým zadostučnením ako dôkaz, že biologické titrácie, i keď sa prevádzajú na miestach ďaleko od seba vzdialených, za prísneho dodržiavania štandardných kautel môžu dávať úplne shodné reprodukovateľné výsledky.

Sme si vedomí toho, že je možné previesť titrácie iba s presnosťou niekoľkých 100 jednotiek. Požiadavka vyššej presnosti bola by oprávnená iba v tom prípade, ak by bolo možné u každej pacientky presne stanoviť, koľko jednotiek toho-ktorého hormónu potrebuje. Táto skutočnosť je však ešte ďaleká. Našou titráciou však vieme zaručiť, že v tom alebo onom prípravku uvedené množstvo oestrogenne účinnej látky skutočne je.

Pre nás akousi nestrannou kritikou môže byť i to, že doteraz zo všetkých miest, a to bez výnimky, kde používali náš oestrogenný hormón, hlásili najlepšie liečebné výsledky. Je pre nás prirodzené, že náš prípravok sa vyrovná zahraničným prípravkom, keďže sa titrácia predvádza na ten istý medzinárodný štandard, s ktorým porovnávajú oestrogenné látky aj ostatné veľké seriózne zahraničné firmy.

Pre našu metodiku bolo zadostučinením i to, že z odborných kruhov nás vyzvali, aby sme vyjadrili svoj názor na metodiku, ktorá sa má stať oficiálnou v našom novom liekopise a prípadne uvažovali o možnosti zavedenia našej metodiky do nášho nového liekopisu. Ako príklad celkom stručne uvediem, že po nastrieknutí čistého, prekryštalizovaného follikulárneho hormónu zjavil sa oestrus v treťom nátere druhého dňa a trval 1 deň. Na rozdiel od tohto po nastrieknutí beta-oestradiol-3-monobenzoátu alebo beta-oestradiol-3-17 dipropionátu sa trvanie oestru podstatne predĺžilo a pozitívita je znateľná ešte 7. deň po injekcii. Znamená to, že follikulárny hormón bol chemickými procesmi zmenený na oestrogennú látku s podstatne väčším a proťahovanejším účinkom, a toto je podstatný dôvod používania vyššie uvedených derivátov v terapii a naznačuje spôsob, ako sa postupuje pri hľadaní nových účinnejších liekov. Na ukončenie by som chcel poukázať na podstatný rozdiel farmácie minulej a farmácie znárodneného priemyslu, vďaka jeho vedeniu, v ktorom sa kladie za *conditio sine qua non* bezvadná kontrola lieku za cieľom štandardného účinku liečiva, hoci toto vo väčšine prípadov nie je lacná záležitosť, ale zaručenie oprávnenej dôvery chorého v liek a jeho účinnosť, musí byť pre nás tým najdôležitejším mementom, pred ktorým nás nesmie zastaviť nijaká obeta.

## Straty vitamínu C pri výrobe paradajkového pretlaku

DANICA ZUFFOVA

Vo svojej práci „Vitamín C v rajčinových plodoch“, uverejnenej v Chemických zvestiach roč. III. č. 10, zaoberala som sa sledovaním obsahu vitamínu C za vegetačného obdobia a len na konci — temer ako poznámku — uviedla som vitamínový obsah hotových paradajkových pretlakov.

V tohoročnej kampani som sledovala straty vitamínu C za výroby. Výroba paradajkového pretlaku je vo všeobecnosti táto: Umyté plody sa dopravujú na drvič a rozdrvené sa pasírujú. Pasírovaná šťava, surový pretlak, steká do sbernej nádrže, odkiaľ sa čerpá do predhrievača a z diaľ do kotla — je to vlastne vákuový duplikátor, vyhrievaný parou — kde sa zahusťí, ale len čiastočne, a dotiahne sa nový podiel surového