

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARKO ŽAVBI

MODIFIKACIJA IN OPTIMIZACIJA POGOJEV
EKSTRAKCIJE STEROIDNIH HORMONOV IZ
HUMANEGA TKIVA

DIPLOMSKO DELO

MODIFICATION AND OPTIMIZATION OF STEROID
HORMONES EXTRACTION CONDITIONS FROM HUMAN
TISSUE

THESIS

Ljubljana, september 2010

Diplomsko delo sem opravljal pod vodstvom dr. Aleša Jerina, dipl. univ. kem., spec. med. biokem., v Laboratoriju za analitiko hormonov in tumorskih markerjev na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo, Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem svojemu mentorju dr. Alešu Jerinu za vso motivacijo, nudeno strokovno pomoč in usmerjanje ter izkazano zaupanje pri samostojnem delu.

Zahvaljujem se tudi doc. dr. Barbari Mlinar ter prof. Vojku Kmetcu za dobrodošlo strokovno usmerjanje.

Posebna zahvala gre tudi Stanki Cankar ter doc.dr. Milanu Skitku, za njuno pomembno vlogo pri mojem razvoju.

Hvala tudi mami, Mateju in Lukatu

Hvala vsem, ki ste verjeli vame.

To delo posvečam omi.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelal pod mentorstvom dr. Aleša Jerina, dipl. univ. kem., spec. med. biokem.

Ljubljana, september 2010

Predsednik komisije: izr. prof. dr. Vojko Kmetec, mag. farm.

Članica diplomske komisije: doc. dr. Barbara Mlinar, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

<i>POVZETEK</i>	vi
<i>ABSTRACT</i>	vii
<i>OKRAJŠAVE</i>	viii

1 Uvod	1
1.1 Definicija, metabolizem in fiziološki pomen steroidnih hormonov.....	1
1.2 Nomenklatura in polarnost strukturnih variacij molekul steroidnih hormonov	7
1.3 Interakcija steroidnih hormonov z biološkimi makromolekulmi	12
1.3.1 Merilo za moč interakcije: afiniteta	12
1.3.2 Interakcija: steroidni hormon - proteini.....	13
1.3.2.1 Polarnost molekule.....	13
1.3.2.2 Temperatura.....	14
1.3.2.3 Lastnosti medija: koncentracija oksonijevih ionov, pH.....	15
1.3.2.4 Lastnosti medija: elektroliti in neelektroliti.....	18
1.3.2.5 Lastnosti medija: organska topila.....	22
1.3.3 Interakcija: steroidni hormon - lipidi.....	23
1.3.4 Interakcija: steroidni hormon - nukleinske kisline.....	24
1.4 Izolacija steroidnih hormonov iz tkiva.....	26
1.4.1 Predpriprava vzorca tkiva za tekočinsko ekstrakcijo.....	26
1.4.2 Teorija tekočinske ekstrakcije (ekstrakcija tekoče-tekoče)	26
1.4.3 Kvantitativnost tekočinske ekstrakcije	27
1.4.4 Tekočinska ekstrakcija steroidnih hormonov iz tkiv.....	29
1.4.5 Pogoji za izbor organskega topila za ekstrakcijo.....	33
1.4.6 Dekonjugacija konjugatov steroidnih hormonov.....	34
1.5 Analiza steroidnih hormonov	36
1.5.1 Princip imunokemijskih analiznih metod	37
1.5.2 Koncentracije steroidnih hormonov v endometriju	38
2 Namen dela in načrt za delo	39
3 Materiali in metode	41
3.1 Materiali	41
3.1.1 Biološki material	41
3.1.2 Reagenzi in topila	41
3.1.3 Topila za ekstrakcijo	42
3.1.4 Raztopine pufrov in reagentov	43
3.1.5 Aparature	43
3.1.6 Laboratorijska oprema	43
3.2 Metode	44
3.2.1 Homogenizacija tkiva	44
3.2.2 Suspenzija tkiva v vodnem mediju	44
3.2.3 Ekstrakcija tkiva	45

4	<i>Rezultati</i>	51
5	<i>Razprava</i>	59
6	<i>Sklep</i>	68
7	<i>Literatura</i>	70

KAZALO SLIK

Slika 1.	Shematska predstavitev klasičnih poti biosinteze steroidnih hormonov	6
Slika 2.	Osnovna razdelitev steranskih ogljikovodikov po alkilni substituciji	9
Slika 3.	Stuartov model P4.....	14

KAZALO GRAFOV

Graf 1.	Primerjava vrednosti konstant za posamezne interakcije, izraženih kot $\log K_a$, v odvisnosti od temperature	15
Graf 2.	Titracijska krivulja odvisnosti afinitete interakcije P4 z $\alpha 1\text{-AgP}$ od pH in dvotočkovna krivulja odvisnosti afinitete enake interakcije od temperature pri pH 7.4	17
Graf 3.	Primerjava odvisnosti K_a interakcije P4 s $\alpha 1\text{-AgP}$ od raztopine NaCl pri različnih temperaturah in pH	20
Graf 4.	Grafični prikaz rezultatov ekstrakcij po shemi A. Vpliv vodnega medija.....	55
Graf 5.	Grafični prikaz rezultatov ekstrakcij po shemi B in C. Vpliv posameznih organskih topil in vodnega medija.....	56
Graf 6.	Grafični prikaz rezultatov po shemi C. Zaporedne ekstrakcije in vpliv denaturanta, uree.	57
Graf 7.	Grafični prikaz rezultaov po shemi C. Vpliv denaturanta, ΔpH	57

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1. Pregled in korelacija nekaterih parametrov povezanih s polarnostjo molekul steranskih derivatov	8
Preglednica 2. Razvrstitev topil s fizikalnimi konstantami po "A" klasifikaciji topil	29
Preglednica 3. Koncentracije steroidnih hormonov (pmol/g tkiva) v endometriju....	38
Preglednica 4. Shema ekstrakcij A.	45
Preglednica 5. Shema ekstrakcij B.....	47
Preglednica 6. Shema ekstrakcij C.....	48
Preglednica 7. Rezultati ekstrakcij po shemi ekstrakcij A.....	51
Preglednica 8. Rezultati ekstrakcij po shemi ekstrakcij B.....	52
Preglednica 9. Rezultati ekstrakcij po shemi ekstrakcij C.	54
Preglednica 10. Rezultati ekstrakcij po shemi ekstrakcij C (nadaljevanje preglednice 9)..	54

POVZETEK

Za študije metabolizma steroidnih hormonov v humanih tkivih, kot tudi za njihovo uporabo v diagnostiki, je pomembno, da izolirane koncentracije steroidnih hormonov iz humanih tkiv, natanko odsevajo dejansko stanje v tkivih. V uvodnem delu opisujemo vrste in glavne metabolne poti steroidnih hormonov ter njihove možne interakcije z tkivnimi makromolekulami, kot so proteini, nukleinske kisline in lipidi. Nadaljujemo z uvodom v tekočinske ekstrakcije steroidnih hormonov iz tkiv, kjer primerjamo in opredeljujemo vrsto različnih pristopov ekstrakcij. Z opredelitvijo pogojev ekstrakcij na katere želimo odgovoriti, izvedemo v praktičnem delu tekočinske ekstrakcije progesterona, androstenediona in estradiola iz humanega endometrija. V osnovi želimo podati odgovore na vpliv pogojev posameznih medijev, kot sta vodni in različnih organskih topil, vpliv denaturantov, homogenizacije tkiva ter števila in časa stopenj tekočinskih ekstrakcij, ki dajejo največji izkoristek. Delo zaključujemo z možno razlago vplivov in opredelitvijo optimalnih pogojev ekstrakcije tkivne suspenzije z največjim izkoristkom progesterona ter androstendiona pri ekstrakciji z dietiletrom ali alternativno z etilacetatom, kjer ekstrahiramo vodno tkivno suspenzijo zaporedno 3-krat po 10 minut. Izbor nepolarnega organskega topila za ekstrakcijo podpremo z ugotovitvami, da z zvišanjem osnovne polarnosti nepolarnega topila z dipolarnimi neprotičnimi ali polarnimi protičnimi topili ne izboljša izkoristka ekstrakcij. Ugotovimo in opredelimo tudi pomembnost vodne suspenzije tkivnega homogenata, ki da 30 % doprinos k izkoristku ekstrakcije progesterona in estradiola z nepolarnimi topili ter z pomembnostjo vpliva dodanih denaturantov, kot sta urea ali ionki denturanti ter najverjetneje tudi zelo nizek *pH*, ki lahko izkoristek izboljšajo tudi do 100 %. Zaključujemo pa s presenetljivo ugotovitvijo, da se pod testiranimi pogoji pri ekstrakciji z dietiletrom vsaj estradiol ne izolira kvantitativno iz humanega endometrija. Iz teh razlogov predvidevamo izboljšanje izkoristka izolacije progesterona, androstendiona ter estradiola iz tkiva z uporabo denaturantov v samem postopku ekstrakcije in podaljšanim časom ekstrakcije z sočasno homogenizacijo tkivnega materiala.

ABSTRACT

For the study of the metabolism of steroid hormones in human tissues, as well as their use in diagnosis, it is important that the isolated concentration of steroid hormones from human tissues precisely reflect the actual situation in the tissues. In the introduction we outline the types and the main metabolic pathways of steroid hormones and also their possible interactions with tissue macromolecules such as proteins, nucleic acids and lipids. We continue with the introduction to liquid-liquid extractions of steroid hormones from tissues where we define and compare variety of approaches of extractions. With the definitions of extraction conditions, on which we want to answer, we carried out the practical work of liquid extractions of progesterone, androstenedione and estradiol from human endometrium. In our work we would like to give answers on the influence and conditions of individual media, such as water and different types of organic solvents, the impact of denaturants, tissue homogenization, and the number and time of liquid extractions, which are giving maximum yield of extracted steroid hormones. We conclude the work with the possible interpretation and definition of optimum conditions of tissue suspension extraction. We found out that maximum yield of extracted progesterone, androstenedione and estradiol was achieved with diethyl ether or alternatively ethyl acetate 3-times for 10 minutes extraction of aqueous suspension. The selection of proper non-polar organic solvent for extraction was supported by findings that by increasing the basic polarity of the non-polar solvents with dipolar aprotic or polar protic solvents, does not improve the yield of extraction. Also we found out the importance of aqueous phase in suspension of tissue homogenate which has 30% contribution to the yield with diethyl ether extracted progesterone and estradiol. Also we found out the importance of the impact of added denaturants such as urea or ionic denturants and probably a very low *pH*, which can also improve the yield for 100%. We conclude the work with the surprising finding that under the tested conditions at least estradiol was not isolated quantitatively from human endometrium. For these reasons, we assume that improvements for higher yield of isolated progesterone, estradiol androstendione from tissues can be achieved with the using of denaturating agens in the process of extraction and with the prolonged time of extraction with simultaneous homogenization of tissue material.

OKRAJŠAVE

α ; ekvatorialni položaj

α_1 AGp; α_1 -kisli glikoprotein

AB; acetatni pufer

A; androsteron

A4dion; androstendion

A5diol; androstendiol

Arg; arginin

β ; aksialni položaj

β LGb; β -laktoglobil

CBG; vezavni protein za kortikosteroid

C; kortikosteron

Col; kortizol

Con; kortizon

CV; koeficient variacije

ΔpH ; sprememba pH

dHeA; dehidroepiandrosteron

ϵ_r ; dilektrična konstanta

E1; estron

E2; estradiol

E3; estriol

E_T^N ; sposobnosti donoriranja vodikove vezi

Et_2O ; dietileter

EtOAc; etilacetat

EtOH; etanol

φ ; volumenski delež

FLP; fetalna jetra, placenta

Gdm $^+$; gvanidinijev kation

His; histidin
HSA; humani serumski albumin
 H_2T ; dihidrotestosteron
Hx; heksan
IR; infra rdeče
 K_a ; konstanta asociacije
 K_d ; konstanta disociacije
 K_D ; koeficienta distribucije
 K_p ; porazdelitveni koeficient
LLE; ekstrakciji tekoče faze
Lys; lizin
 μ ; dipolni moment
MeCN; acetonitril
 Me_2CO ; aceton
P4; progesteron
P5; pregnenolon
PB1, PB2; fosfatni pufer
PBG; vezavni protein za progesteron
SHBG; vezavni protein za spolne hormone
SPE; ekstrakciji trdne faze
T; testosteron
Trp; triptofan
Tyr; tirozin
UDPGA; uridindifosfoglukuronska kislina
UV-VIS; ultravijolično-vidno
11dOC; 11-deoksi-kortikosteron
18OHC; 18-hidroksi-kortikosteron
18AldoC; 18-aldo-kortikosteron, aldosteron
11dOC_l; 11-deoksi-kortizol

17OHP5; 17-hidroksi-pregnenolon

17OHP4; 17-hidroksi progesteron

1 Uvod

1.1 Definicija, metabolizem in fiziološki pomen steroidnih hormonov

Steroidni hormoni so skupina nizkomolekularnih (povprečna molska masa je 280 g·mol⁻¹), lipofilnih kemijskih snovi s strukturo, osnovano na steranskom policikličnem jedru. Strukturne in posledično tudi fiziološke razlike med posameznimi steroidnimi hormoni pa prihajajo od medsebojnih razlik v tipu in številu stranskih alkilnih skupin, izoliranih ali konjugiranih dvojnih vezi ter v številu in stopnji različno oksidiranih (hidroksi, oksi ("keto")) kisikovih substituent.

Pri sesalcih je biosinteza steroidnih hormonov (steroidogeneza) nevrohumoralno regulirana ter v glavnem omejena na endokrine žleze, kot so gonade (testisi in ovariji), nadledvični žlezi ter med gestacijo v fetoplacentarni enoti. Dokazana pa je tudi sinteza tako imenovanih nevrosteroidov v centralnem in perifernem živčnem sistemu [1, 2].

V smislu fiziološke aktivnosti [6], steroidne hormone delimo na hormone nadledvične (adrenalne) žleze oziroma kortikosteroide, kamor spadajo glukokortikoidi in mineralokortikoidi ter v spolne hormone, kamor spadajo androgeni, estrogeni in progestageni.

Glavni reaktant, ključen za hitrost biosinteze steroidnih hormonov (Slika 1) je eksogeni, nekoliko manj pa *de novo* sintetizirani holesterol [111, 112a]. Iz njega se preko Δ^5 intermediata, pregnenolona (P5), biosinteza nadaljuje v smeri Δ^5 poti s sintezo predhodnikov progestagenov (21 C atomov) in androgenov (19 C atomov). Direkno iz pregnenolona ali posredno iz njegovih Δ^5 produktov (17OHP5, dHeA, A4dion) se sinteza lahko nadaljuje preko niza encimskih reakcij Δ^4 poti, v smeri progestagenov do mineralokortikoidov (11dOC, C) in glukokortikoidov (C, Col,

18AldoC) ter v smeri androgenov do A5diol in T z nadaljevanjem do estrogenov (E1, E2, E3). V steroidogenih celicah [112a] encim notranje mitohondrijske membrane citokrom P450scc (monoooksigenaza; 20,22-dezmolaza) katalizira transformacijo holesterola v pregnenolon s cepitvijo alkilne verige na C20-22. Nadaljne biotransformacije pregnenolona se lahko nadaljujejo v matriksu mitohondrija ali v matriksu citoplazme oziroma je nadaljevanje do sinteze končnih produktov povezano s prehodi med temo dvema predeloma. V matriksu citoplazme ga transformirajo tkivno specifični izoencimi gladkega endoplazmatskega retikuluma, med katerimi so poglaviti: hidroksisteroid dehidrogenazi (3β -HSD (Δ^{5-4} izomeraza), 17β -HSD), 21α -hidroksilaza (P450c21), aromataza (P450aro) ter 5α -reduktaza. V matriksu mitohondrija pa potekajo transformacije z mitohondrijskimi hidroksilazami, kot so: β -hidroksilaza (P450c11), encim z 17α -hidroksilazno in 17,20-liazno aktivnostjo (citokrom P450c17) ter encim z 11- in 18-hidroksilazno aktivnostjo (aldosteron sintaza; P450c11AS). Prevladujoč mehanizem biosinteze je v posameznih tkivih odvisen od izražanja vrste encimov, reverzibilnost samih encimskih reakcij pa od razmernostnega deleža koencimov. Tako v *zoni retikularis* nadledvične žleze nastajajo androgeni (dehidroepiandrosteron (dHeA), androstendion (A4dion)), v *zoni fascikulati* glukokortikoidi (kortikosteron (C), kortizol (Col)) ter v *zoni glomerularis* nadledvične žleze mineralokortikoidi (aldosteron (18AldoC), 11-deoksi-kortikosteron (11dOC), ter C) [3a, 111, 112a, 115a]. Biosinteza steroidnih hormonov v ovariju je odvisna od faze endometrija [3b, 111, 112a, 115d]. Tako v lutealni fazni endometriji v celicah granuloze nastaja predvsem progesteron (P4), v folikularni fazni endometriji pa nastajajo v celicah teke estrogeni (estrон (E1)). V gestacijskem obdobju je glavni izvor progestagenov (P5, P4) fetoplacentarna enota. Placentarni P5 se metabolizira v fetalni nadledvični žlezi v dHeA ter nadalje v *zoni retikularis* korteksa konjugira s sulfatom v dHeAS. S prehodom v fetalna jetra se dHeAS oksidira do 16-OH dHeAS, ki se v placenti desulfatira s placentarno sulfatazo ter metabolizira v estriol (E3) (Slika 1, *FLP*; fetalna jetra, placenta). V testisih so Leydigove celice odgovorne za proizvodnjo velikih količin testosterona (T), ki se metabolno pretvori v dihidrotestosteron (H_2T) in androstendion (5α -Adion). Aromatizacija H_2T in 5α -Adion s P450aro v jetrih in adipoznem tkivu pa pri moškem predstavlja glavni izvor estrona (E1) in estradiola (E2) [3b, 111, 112a, 115b]. Takoj po biosintezi se steroidni hormoni brez akumulacije v steroidogenih celicah sproščajo v sistem predvsem z

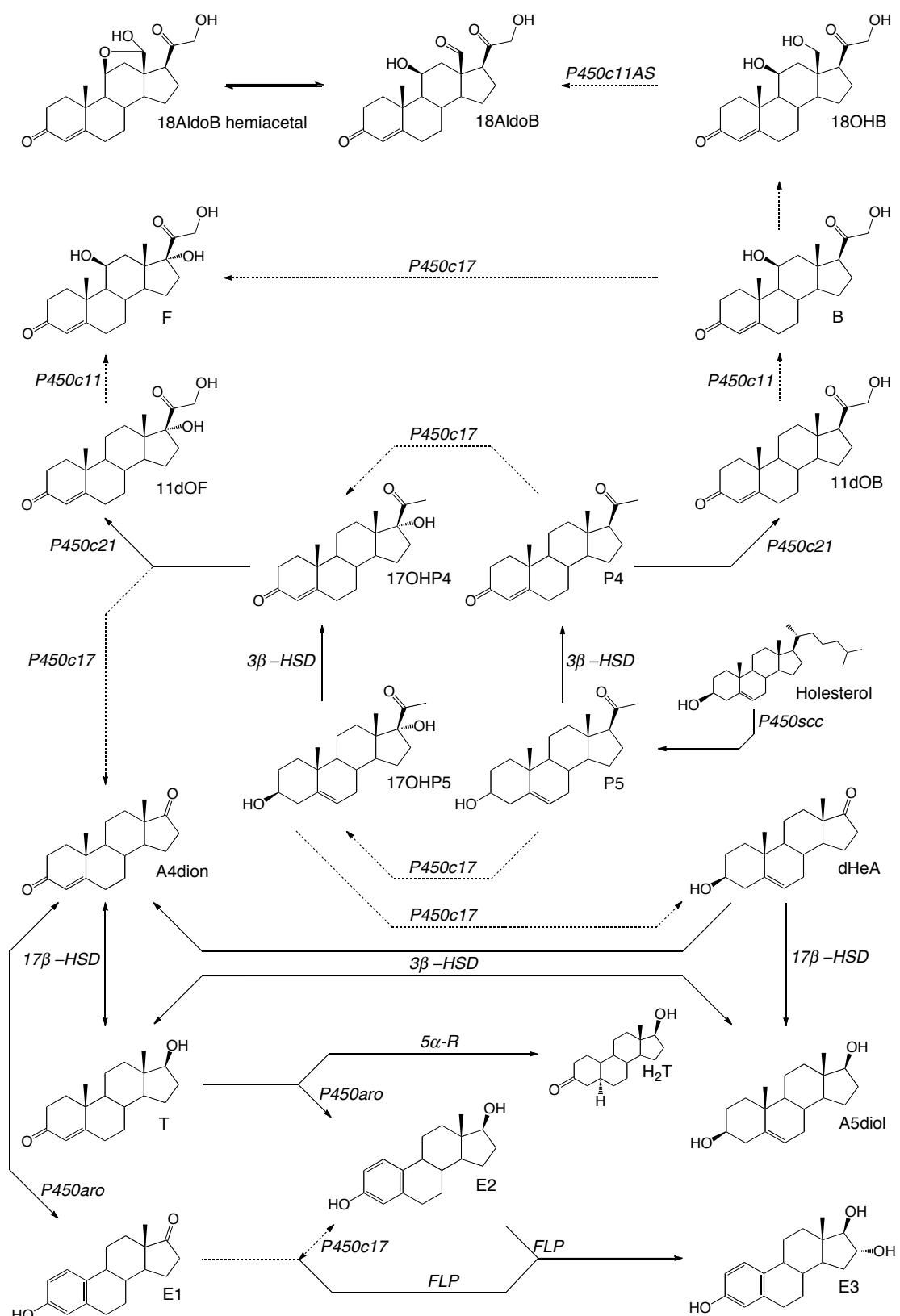
endokrinim ali parakrinim mehanizmom [3b]. Nevrosteroidi pa signalizirajo predvsem s parakrinim ali avtokrinim mehanizmom [1, 2]. V krvni plazmi se steroidni hormoni, asociirani z različnimi proteini transportirajo do tarčnih celic. Med 20 do 50 % jih je nespecifično asociiranih z albuminom, del pa tudi na specifičnih transporterjih β -globularne frakcije serumskih proteinov (vezavni protein za kortikosteroid (CBG), vezavni protein za spolne hormone (SHBG), vezavni protein za progesteron (PBG)). Tako imenovana vezana frakcija, prvič, predstavlja relativno stalen vir steroidnih hormonov za dolgotrajno delovanje, tako da je zaradi velikosti kompleksov steroidni hormon-protein retenirana renalna ekskrecija in drugič, podaljšuje razpolovno dobo steroidnih hormonov tako, da aktivne oblike ščiti pred perifernim metabolizmom [40]. 1 do 10 % koncentracije steroidnih hormonov v plazmi je neasociirane in predstavlja prosto frakcijo. Ko steroidni hormoni prispejo do tarčne celice hormoni delujejo nanjo preko dveh mehanizmov [4, 5, 16, 17, 18]. V intrakrinem, tako imenovanem genomskem mehanizmu je za dolgotrajen učinek steroidnih hormonov potrebna njihova specifična asociacija s tkivno specifičnimi intracelularnimi receptorji, ki se pod določenimi pogoji izražajo v tarčnih celicah. S količino izraženih receptorjev v tarčnem tkivu se vzporedno tudi premika koncentracijsko ravnotežje steroidnih hormonov med intra- in ekstracelularnim matriksom. Tako zaradi koncentracijskih razlik steroidni hormoni prosto difundirajo v intracelularni matriks, kjer se vzpostavi dodatna kontrola nad njihovim metabolizmom. *In situ* metabolna aktivacija (pogosto z redukcijo ali izomerizacijo Δ^4 vezi, ali z demetilacijo C10 in aromatizacijo obroča A) ali deaktivacija steroidnih hormonov v tarčnih celicah modulira nadaljne izražanje učinkov. Aktivirani steroidni hormoni se nato asociirajo s specifičnimi receptorji. Nastali kompleksi receptor-steroidni hormon izražajo visoko afiniteto do hormonsko odzivnih elementov na DNA. Posledično se kompleksi akumulirajo v jedru celice, kjer regulirajo gensko transkripcijo. Večurni proces je moduliran z inhibicijo, oziroma aktivacijo transkripcije in translacije. Nasprotno, v negenomskem mehanizmu steroidni hormoni niso vključeni v gensko transkripcijo. Učinki negenomskega mehanizma so zelo kratkotrajni (od nekaj sekund do nekaj minut) in niso povezani z intracelularnim transportom steroidnih hormonov. Kažejo se lahko s spremembou membranske fluidnosti, kot posledico nespecifičnih interakcij s celično membrano. Lahko pa se povežejo s specifičnimi membranskimi receptorji ter jih tako regulirajo. V

membransko-receptorskem delovanju po negenomskem mehanizmu je dolgotrajnost učinka odvisna od izražanja določenih membranskih receptorjev [4, 5].

Po opravljeni funkciji na nivoju tarčne celice se za prekinitev kemijskega signala steroidni hormoni inaktivirajo. Za vzdrževanje homeostaze pa inaktivacija in katabolizem steroidnih hormonov potekata v perifernem metabolizmu. V glavnih organih (jetra, deloma ledvice in gastrointestinalni trakt), vključenih v periferni metabolizem, se aktivirani steroidni hormoni inaktivirajo s spremembjo polarnosti hidrofobne molekule [112a, 115a-d]. Inaktivacija lahko vključuje redukcijo Δ^4 vezi, redukcijo okso skupine na C3 ali C20 v sekundarno hidroksilno skupino, oksidacijo C17 hidroksilne skupine ali s hidrosilacijo na različnih mestih molekule. Del steroidnih hormonov se inaktivira v procesu kovalentne konjugacije. Ta poteka večinoma na C3 in C17 hidroksilnih skupinah: glukuronidacijo z derivatom glukuronske kisline (UDPGA; uridin 5'-difosfoglukuronska kislina) katalizira glukuronil transferaza, sulfatiranje z 3'-fosfoadenozin-5'-fosfatosulfatom (PAPS) pa sulfokinaza. Nastali hidrofilni glukuronidni in/ali sulfatni konjugati ter hidroksilirani steroidni hormoni imajo manjšo afiniteto do transportnih proteinov v plazmi in povečano topnost v vodi. Posledično se odstranijo iz telesa z urinom in fecesom. Čeprav se steroidni hormoni lahko netarčno akumulirajo v adipoznem tkivu ter se od tam tudi reciklirajo, ostaja izločanje steroidnih hormonov prevladujoč mehanizem [25, 84].

Fiziološko delovanje steroidnih hormonov ima na organizem sistemski vpliv. Od diferenciacije in proliferacije organizma, do metabolne, imuno- ter nevromodulacije. Različne nepravilnosti endokrinih žlez ali hipofize, ki so nastale kot posledice infekcije, atrofije, hiperplazije ali neoplastične transformacije, se lahko kažejo s povišano ali znižano sekrecijo steroidnih hormonov. Tako spremembe v koncentracijah izločenih C, 11dOC, 18AldoC ali dHeA lahko diferencialno povežemo z različnimi metabolnimi insuficiencami nadledvične žleze (Cushingov sindrom, Connov sindrom, Addisonova bolezen) [6, 111, 112a, 115a]. Spremenjene količine izločenih T, H₂T in dHeA z adrenogenitalnim sindromom, hipogonadizmom ali psevdohermafrodisizmom [112a, 115b]. Koncentracija E3 lahko kaže na morebitno metabolno okvaro fetusa, povezano z znanimi kromosomalnimi in kongenitalnimi

anomalijami (Downov sindrom, Edwardsov sindrom) [112a]. V zadnjem času je poudarek raziskovanja predvsem na dokazovanju povezave med antropogenimi in endogenimi androgeni z neoplazenskimi transformacijami reproduktivnih organov, predvsem karcinomi endometrija [7, 8], dojke [9, (72, 74), 115d] ter prostate [10]. V teh študijah se pogosto določata progesteron in estradiol predvsem zaradi pomankanja zanesljive korelacije med koncentracijami endogenih steroidnih hormonov v plazmi in tkivu s katerimi bi bilo mogoče zanesljivo napovedati oceno rizičnosti morebitnega nastanka neoplazme. Tako je na primer predmet raziskav mitogenski vpliv povišanih koncentracij endogenega ali eksogenega (kontracepcija, polutanti v okolju, hrana) estrogena ter njegovih metabolitov [115f] na napoved in razvoj raka v endometriju [7, 8] ali dojkah [9] ter antimitogenski vpliv progestagenov v teh situacijah. Prav tako so z analizo derivatov metabolizma in analizo specifičnih receptorjev jasnejše tudi metabolne (npr.: encimske) in nemetabolne poti v teh prepatoloških in patoloških situacijah [7, 8, 9, 115d]. Pomembno vlogo pa ima tudi določanje koncentracij progesterona v terapiji umetnega oplojevanja [115e] ter estradiola pri zdravljenju ženske neplodnosti [115f]. Androstendiona, ki je intermediat v biosintezi poti estradiola in testosterona, pa je zelo pogosto določan tudi v doping kontrolah pri športnikih.



Slika 1. Shematski prikaz klasičnih poti biosinteze steroidnih hormonov. Prirejeno po [111, 112a, 115a-d]. (Opomba: končnica F je uporabljena za derivat kortizola (Col), končnica B za derivat kortikosterona (C)).

1.2 Nomenklatura in polarnost struktturnih variacij molekul steroidnih hormonov

Rigidno tetraciklično steransko jedro, $C_{17}H_{28}$ (perhidrociklopenta[α]fenantren; tetraciklo[8.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}] heptadekan) steroidnih hormonov sestavljajo kondenzirani trije heksagonalni (A , B , C) in en pentagonalni (D) ogljikov obroč [111, 112a, 113]. Kondenzirana obroča A/B lahko zavzemata cis (žolčne kisline) ali trans konformacijo, medtem ko B/C in C/D ponavadi zavzemata trans konformacijo [114]. Gonan (Slika 2) osnovna nesubstituirana in nasičena struktura s šestimi asimetričnimi ogljikovimi centri, ne vsebuje heteroatomov in posledično nobenih dipol-dipol intermolekularnih interakcij. Nepolarni značaj (Preglednica 1) se še dodatno poveča z β -metilnimi substituentami (Slika 2) na C13 strukture estrana (13β -metil-gonan) ali na C10 in C13 strukture androstana ($10\beta,13\beta$ -dimetil-gonan) ter z dodatno C17 β -etylno substituento strukture pregnana ($10\beta,13\beta$ -dimetil- 17β -etyl-gonan). Derivati estrana, androstana ali pregnana (Slika 2) steroidni hormoni (Slika 1), strukturno vsebujejo vezane tudi hidroksilne in/ali okso reaktivne skupine, večinoma na pozicijah C3-A in C17-D obroča steranskega jedra ter C-20 etilne substituente D obroča. Dipolni momenti teh substituent tako prispevajo k višji polarnosti steroidnih hormonov. Nekateri vmesni ter glavni metabolni produkti, predvsem adrenokortikotropni hormoni imajo dodatno hidroksilno (C, Col) ali ketonsko skupino na C11-C obroču (Con) ali aldehidno skupino (18AldoB) na C18 alkilni substituenti stika obročev C - D . V skupini estrogenov pa konjugiran sistem dvojnih vezi obroča A daje aromatski značaj. Posledično so estrogeni šibke kisline, saj lahko njihova C3 hidroksilna skupina v vodnem alkalnem mediju, pri $pH > pK_a$ (estrogen), ionizira [91].

Direktna lastnost povezana s polarnostjo molekule in polarnostjo okolice, je topnost. Steroidni hormoni sodijo v skupino slabo topnih snovi v vodi, saj so njihove topnosti v vodi reda od 10^{-3} do $10^{-5} g \cdot l^{-1}$ (Preglednica 1).

Preglednica 1. Pregled in korelacija nekaterih parametrov povezanih s polarnostjo molekul steranskih derivatov

steroid	$\log P^a$	molekul. formula	pK_a^a	OH/O	Δ^n	$10^{-5} nK_a^b / (\text{l}\cdot\text{mol}^{-1})$	topnost v vodi ^g / [mol·l ⁻¹]	topnost v vodi ^g / (g·l ⁻¹)
holesterol	7.11	C ₂₇ H ₄₆ O		1/0	Δ^5		$2.069 \cdot 10^{-7}$ (30°C)	$8.000 \cdot 10^{-5}$
pregnan	6.55	C ₂₁ H ₃₆						
androstan	5.82	C ₁₉ H ₃₂						
estrano	5.52	C ₁₈ H ₃₀						
gonan	5.22	C ₁₇ H ₂₈						
E1	4.31, 3.43 ^e , (1.95) ^j	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	10.326	1/1	$\Delta^{1,3,5(10)}$	1.2 ^c	$1.3 \cdot 10^{-3}$	$(1.3 \cdot 10^{-3})^e, (1.3 \cdot 10^{-3})^f$
P4	4.19 (2.78) ⁱ	C ₂₁ H ₃₀ O ₂		0/2	Δ^4	10.8 ^c , 3.7 ^d	$2.800 \cdot 10^{-4}$ (25°C) $4.260 \cdot 10^{-4}$ (37°C, pH 7.4)	$8.805 \cdot 10^{-3}$, $1.340 \cdot 10^{-3}, (9 \cdot 10^{-3})^h$
A4dion	3.93	C ₁₉ H ₂₆ O ₂		0/2	Δ^4		$2.000 \cdot 10^{-4}$ (25°C, pH 7.3) $1.399 \cdot 10^{-4}$ (37°C, pH 7.4)	$5.728 \cdot 10^{-2}, 4.007 \cdot 10^{-2}$
E2	3.75, 3.94 ^e , 4.01 ^e , (1.88) ^j	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	10.327	2/0	$\Delta^{1,3,5(10)}$	0.71 ^c		$(1.30 \cdot 10^{-3})^e, (1.51 \cdot 10^{-3})^f,$ $(5 \cdot 10^{-3})^h$
A	3.77	C ₁₉ H ₃₀ O ₂		1/1	Δ^4			
P5	3.58	C ₂₁ H ₃₂ O ₂		1/1	Δ^5		$2.230 \cdot 10^{-5}$ (37°C, pH 7.4)	$7.058 \cdot 10^{-3}$
H ₂ T	3.41	C ₁₉ H ₃₀ O ₂		1/1				
T	3.41, (1.94) ⁱ	C ₁₉ H ₂₈ O ₂		1/1	Δ^4	5.2 ^c , 2.4 ^d	$8.480 \cdot 10^{-5}$ (25°C), $1.250 \cdot 10^{-4}$ (37°C, pH 7.3)	$2.446 \cdot 10^{-2}, 3.605 \cdot 10^{-2},$ $(24 \cdot 10^{-3})^h$
dHeA	3.36	C ₁₉ H ₂₈ O ₂		1/1	Δ^5		$1.000 \cdot 10^{-4}$ (37°C, pH 7.3)	$2.884 \cdot 10^{-2}$
11dOC	3.33, (1.72) ⁱ	C ₂₁ H ₃₀ O ₃	13.865	1/2	Δ^4	2.5 ^c , 1.4 ^d	$4.387 \cdot 10^{-4}$ (25°C), $1.800 \cdot 10^{-4}$ (37°C, pH 7.3)	$1.450 \cdot 10^{-2}, 5.948 \cdot 10^{-2}$
A4diol	2.95	C ₁₉ H ₃₀ O ₂		2/0				
E3	2.67, 2.81 ^e , (1.74) ^j	C ₁₈ H ₂₄ O ₃	10.328	3/0	$\Delta^{1,3,5(10)}$			$(1.3 \cdot 10^{-3})^e$
11dHC	2.41	C ₁₈ H ₂₄ O ₃	13.865	3/1	Δ^4			
C	2.02 (0.66) ⁱ	C ₂₁ H ₃₀ O ₄	13.865	2/2	Δ^4	0.92 ^c , 0.37 ^d		
Con	1.66 (0.15) ⁱ	C ₂₁ H ₂₈ O ₅	13.875	2/3	Δ^4		$6.000 \cdot 10^{-4}$ (37°C, pH 7.3), $6.379 \cdot 10^{-4}$ (25°C)	$2.163 \cdot 10^{-1}, 2.299 \cdot 10^{-1}$ $(230 \cdot 10^{-3})^h$
Col	1.27 (0.20) ⁱ	C ₂₁ H ₃₀ O ₅	13.875	3/2	Δ^4	0.29 ^c , 0.18 ^d	$8.190 \cdot 10^{-4}$ (25°C)	$2.969 \cdot 10^{-1}$
18AldoC	1.06	C ₂₁ H ₂₈ O ₅	13.867	2/3	Δ^4		$1.420 \cdot 10^{-4}$ (37°C, pH 7.4)	$5.118 \cdot 10^{-2}$

Z OH/O je označeno število hidroksilnih in karbonilnih skupin, z Δ^n položaj dvojne vezi na steranskem jedru.

^a Teoretične vrednosti $\log P$ (oktanol/voda) in pK_a .

[Izračunano s programom MarvinSketch verzija 5.3.01, ChemAxon Ltd., za operacijski sistem i368 Mac OS X 10.5.8.]

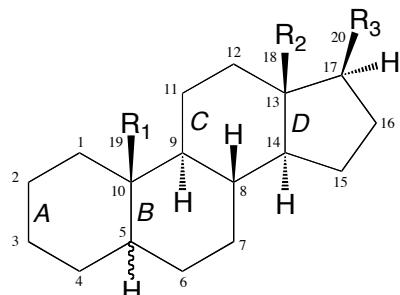
^{b, c, d} Konstanta afinitete, nK_a , steroidnega derivata za α_1 -kisli glikoprotein, kjer je število primarnih veznih mest n = 1.

Izjema je E2 z n = 5 ± 2. Podatki povzeti iz [26]. ^c Konstanta določena pri 4°C, ^d pri 37°C.

^e Eksperimentalno določena vrednost $\log P$ (oktanol/voda) in topnost estrogenov v vodi [27]

^{f, g, h} Topnosti v čisti vodi ^f povzeto iz [28], ^g iz [29], ^h iz [30]

^{i, j} Eksperimentalno določena vrednost $\log P$ (dietileter/voda) Povzeto iz ⁱ [96], ^j [97]



$R_1, R_2, R_3 = H$; gonan (C_{17})

$R_1, R_3 = H, R_2 = CH_3$; estran (C_{18})

$R_3 = H, R_1, R_2 = CH_3$; androstan (C_{19})

$R_1, R_2 = CH_3, R_3 = CH_2CH_3$; pregnan (C_{21})

Slika 2. Osnovna razdelitev steranskih ogljikovodikov po alkilni substituciji.
Prirejeno po [111, 112a, 115a-d].

Kemijska nomenklatura nekaterih sistematičnih imen po IUPAC-IUB [111, 113] in pogosta trivialna imena [115a] za uporabljene lastne okrajšave steroidnih hormonov.

P5; pregnenolon [3β -hidroksi-pregn-5-en-20-on]

17OHP5; 17-hidroksi-pregnenolon [$3\beta,17\alpha$ -dihidroksi-pregn-5-en-20-on]

P4; progesteron [pregn-4-en-3,20-dion]

17OHP4; 17-hidroksi progesteron [$3\beta,17\alpha$ -dihidroksi-pregn-4-en-20-on]

A; androsteron [3α -hidroksi-pregn-5-en-17-on]

dHeA; dehidroepiandrosteron (DHEA); trans-dehidroandrosteron;
dehidroizoandrosteron [3β -hidroksi-androst-5-en-17-on]

A5diol; androstendiol [androst-5-en- $3\beta,17\beta$ -diol]

A4dion; androstendion [androst-4-en-3,17-dion]

T; testosterone [17β -hidroksi-androst-4-en-3-on]

H₂T; dihidrotestosteron [17β -hidroksi- 5β -androstan-3-on]

E1; estron [3 -hidroksi-estra-1,3,5(10)-trien-17-on]

E2; estradiol* [estra-1,3,5(10)-trien-3, 17^* -dion, * 17α ali 17β izomer]

E3; estriol [estra-1,3,5(10)-trien-3, $16\alpha,17\beta$ -triol]

Col; kortizol (CORT); hidrokortizon; 17-hidroksi kortikosteron;
Kendallova substanca F [$11\beta,17\alpha,21$ -trihidroksi-pregn-4-en-3,20-dion]

11dOCol; 11-deoksi-kortizol; 11-deoksi-17-hidroksi kortikosteron;
Reichsteinova substanca S [$17\alpha,21$ -dihidroksi-pregn-4-en-3,20-dion]

Con; kortizon; Kendallova substanca E, Reichsteinova substanca F
[$17\alpha,21$ -dihidroksi-pregn-4-en-3,11,20-trion]

C; kortikosteron; Kendallova substanca B; Reichsteinova substanca H
[$11\beta,21$ -dihidroksi-pregn-4-en-3,20-dion]

11dOC; 11-deoksi-kortikosteron (DOC); Reichsteinova substaca Q
[21-hidroksi-pregn-4-en-3,20-dion]

18OHC; 18-hidroksi-kortikosteron [18,21-dihidroksi-pregn-4-en-3,20-diol]

18AldoC; 18-aldo-kortikosteron; aldosteron [$11\beta,21$ -dihidroksi-3,20-dioksopregn-4-en-18-al, 18,11-hemiacetal]

1.3 Interakcija steroidnih hormonov z biološkimi makromolekulmi

1.3.1 Merilo za moč interakcije: afiniteta

Biološka aktivnost steroidnih hormonov je neposredno odvisna od afinitete vezave na določene makromolekule. Paramemeter merila nekovalentne interakcije steroidnega hormona, kot liganda L , z veznim mestom makromolekule (npr. protein), kot receptorjem R , je konstanta asociacije ali afinitete liganda do receptorja, K_a [43]. V nekooperativni bimolekularni asociativni reakciji liganda L in receptorja R v kompleks RL (Enačba 1) [53c]



je konstanta afinitete po Klotzu [41, 42] definirana kot kvocient koncentracij kompleksa LR in produkta koncentracij L in R . V praksi se pogosteje uporablja ravnotežna konstanta disociacije, K_d (dimenzija koncentracije, SI enota: $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), ki predstavlja reverzno reakcijo asociaciji (Enačba 2)

$$K_d = K_a^{-1} = \frac{[L][R]}{[LR]}. \quad (2)$$

Ker vrednost K_d določa stabilnost kompleksa LR v ravnotežju, nam predstavlja merilo afinitete komponent L za R in vice versa [53c].

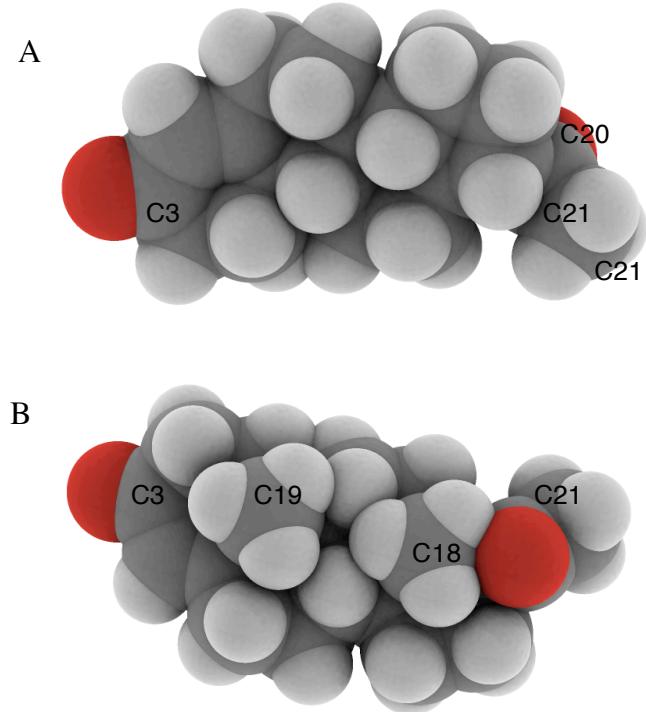
Parametra K_d ali K_a bosta v nadaljevanju uporabljeni pri opisu vplivov in odvisnosti interakcij različnih izoliranih makromolekul s steroidnimi hormoni. Iz posameznih odvisnosti bo tako mogoče dobiti jasnejši vpogled na kompleksnost možnih interakcij steroidnih hormonov z makromolekulami tkivnega homogenata v procesu izolacije steroidnih hormonov.

1.3.2 Interakcija: steroidni hormon - proteini

Parametri, ki vplivajo na moč interakcije steroidni hormon - protein, ter njihove posledice.

1.3.2.1 Polarnost molekule

V zgodnjih študijah je leta 1934 Brunelly [35] prvič eksperimentalno pokazal, da steroidni hormon E1 tvori s serumskimi proteini kompleks, ki ga ni bilo mogoče ločiti z dializo. Temu odkritju je sledila sistematična analiza interakcij serumskih proteinov z estrogenom in drugimi steroidnimi hormoni Bischoffa in sodelavcev [31, 32]. V nadaljevanju raziskav na področju afinitete steroidnih hormonov za določene proteine so Westphal in sodelavci [32, 33, 34] dokazali, da obstaja približno inverzna relacija med polarnostjo in močjo interakcije s proteini [31, 37]. Osnovni modeli študij so bili proteini (humani serumski albumin (HSA), β -laktoglobil (β LGb) ter drugi), ki ne izražajo katalitske aktivnosti, saj bi za slednje veljalo sorazmerje med polarnostjo steroidne molekule in močjo interakcije z encimom [27, 33]. Ugotovili so, da je za interakcije derivatov steroidnih hormonov, dobljenih s kemijskimi transformacijami, z modelnimi proteini, pomembna stopnja elektronegativnosti steroidne molekule [32, 33, 34]. S pomočjo stereokemijskih modelov (Slika 3) je bilo razvidno, da ima molekula steroidnega hormona v najstabilnejši 5α -konformaciji stika obročev A/D (trans konformacija, konformacija stola) [114], tako imenovano superiorno konveksno ter inferiorno planarno površino [33]. Ekvatorialne (α) substituente vključno s C3 karbonilno skupino tvorijo inferiorno površino molekule. V primerjavi s superiorno je zaradi manjše sterične zasenčenosti inferiorna površina primernejša kontaktna površina za interakcije s proteini.

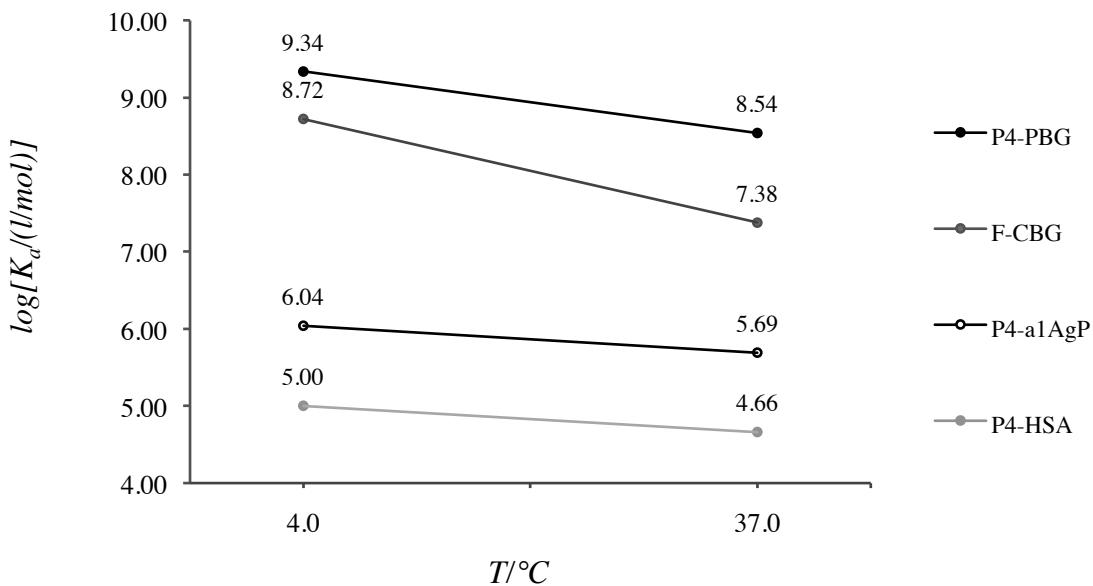


Slika 3. Stuartov model P4.

A: inferiorna stran, B: superiorna stran. Označeni ogljikovi atomi (temno sivo) C3 ter C18, C19 in C20,21 alkilnih substituent. Kisikovi atomi (rdeče) na C3 in C20. Vodikovi atomi (svetlo sivo). Povzeto in predelano po [26] s programom QuteMol 0.4.1. Mac OS X.

1.3.2.2 Temperatura

Kot vsaka termodinamska konstanta je tudi K_a odvisna od temperature. Študije kompleksov proteinov z različnimi Δ^4 -3-ketosteroidi [40, 45] so pokazale, da je odvisnost K_a od temperature inverzno proporcionalna (Graf 1, 2). V teh študijah so pretežno uporabili kot model termostabilni α_1 -kisli glikoprotein ($\alpha_1\text{AGp}$; orosomukoid), kot tudi vezavni protein za progesteron (PBG).



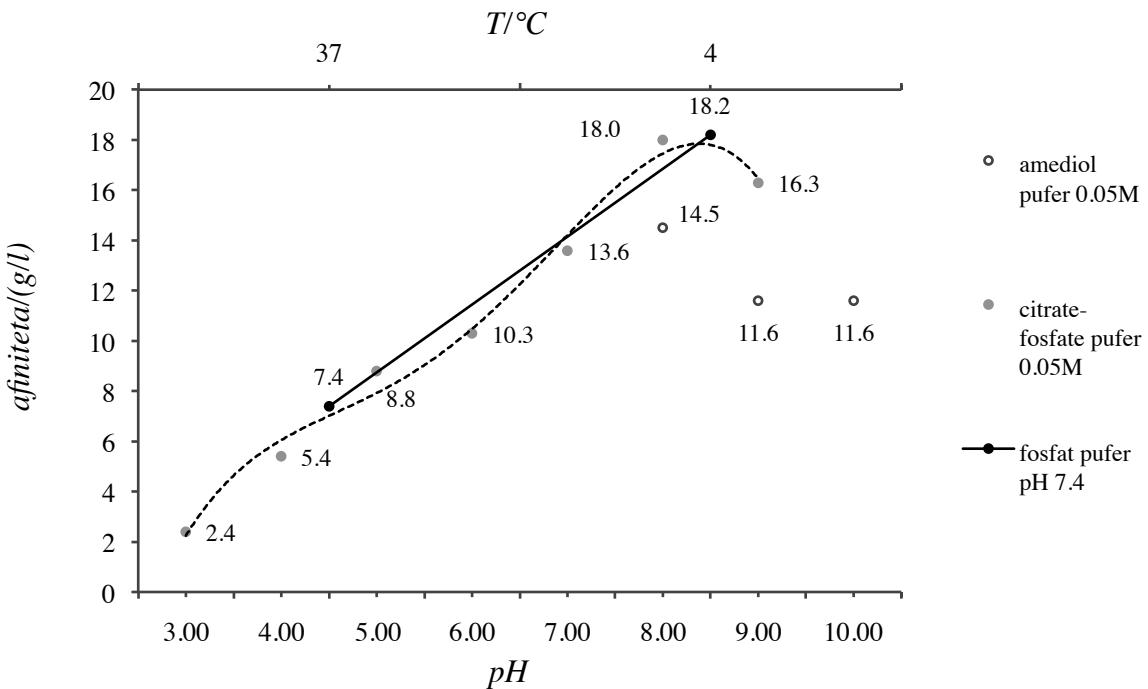
Graf 1. Primerjava vrednosti konstant asociacije za posamezne interakcije, izraženih kot $\log K_a$, v odvisnosti od temperature: Progesteron (P4) s PBG, HSA ter α_1 -AgP in kortizol (Col) s CBG. Povzeto po [40, 45, 46].

Red velikosti K_d za stabilno interakcijo ligand-receptor je ponavadi $\leq 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ [43]. Obstajajo pa tudi redke izjeme, kot je $K_d \cong 10^{-15} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ kompleksa avidin-biotin [44]. Nizka K_d kompleksov steroidni hormon-protein (Preglednica 1) je izrednega pomena, saj je v posredovanju celičnega odgovora na steroidne hormone nujna počasna disociacija citosolnih receptorskih kompleksov. Tako je izpolnjen nujno potreben pogoj, da ti kompleksi ostanejo vezani in aktivirajo nadaljne reakcije v jedru celice. Za transportne proteine steroidnih hormonov je značilno nasprotno. Tu hitra disociacija kompleksa takoj omogoča hormon tarčni celici. Kljub temu pa mora biti asociacija hormona na transportni protein hitra in visokoafinitetna [40].

1.3.2.3 Lastnosti medija: koncentracija oksonijevih ionov, pH.

Edinstvena sekundarna in deloma terciarna struktura globularnih proteinov sta vzdrževani z množico kompleksnih nekovalentnih intramolekularnih interakcij med aminokislinskimi enotami. Tako je funkcionalno aktivna in termodinamično stabilna nativna konformacija (konformacija z najnižjo možno prosto energijo) proteina dinamično in specifično sinhronizirana in vzdrževana z vodikovimi interakcijami,

nepolarnimi interakcijami, dipolnimi interakcijami (Van der Waals-Keesomove, Van der Waals-Debije ali Van der Waals-Londonove sile) ter elektrostatskimi interakcijami. Stanje konformacije in tudi visoka afiniteta steroidnih hormonov do proteinov sta odvisni od temperaturne vodnega okolja [40, 45, 53a]. Konformacijo in splošno stanje proteina lahko poleg temperature destabilizira več kemijskih dejavnikov, imenovanih tudi perturbanti. Med slednjimi je izrednega pomena koncentracija oksonijevih ionov (ozioroma njen kologaritem, pH) vodne raztopine, v kateri se protein nahaja. Pri spremembi pH (ΔpH) vodnega medija od optimalnega fiziološkega pH proteina se kompleksno spreminja ionizacija in s tem polarnost aminokislinskih preostankov ter posledično tudi celotni naboja proteina. Po Le Chatelierjevem principu se protein odzove na ΔpH s protoniranjem ali deprotoniranjem H-akceptorskih ozioroma H-donorskih aminokislinskih preostankov [53a]. Odvisno od velikosti in smeri ΔpH , ima ta lahko lokalni vpliv na reverzibilne spremembe ionizacije receptorskih mest ali aktivnih centrov do ligandov. Slednje se kaže v spremembi afinitete, s spremenjeno K_a za določeno interakcijo liganda z receptorskim mestom proteina. Za interakcije steroidnega hormona s proteinom sta Bischoff in Pilhorn [37] ugotovila, da topnost steroidnih hormonov P4 in T v vodni raztopini albumina minimalno narašča z naraščanjem pH (od 5.3 do 8.0), medtem ko topnost v vodni raztopini brez albumina ostaja enaka. Koncentracija albumina v serumu je pri fiziološkem pH in temperaturi 37.5°C odgovorna za približno 70% topnosti T in 85% topnosti P4 [37]. Vzrok, za tako imenovano disperzno moč albumina pripisujeta deprotoniranemu histidinu (His^0) albumina v določenem intervalu pH (med 7.4 in 8.1). Danes je znano, da so za nizkoafinitetno asociacijo albumina s steroidnimi hormoni odgovorna vezna mesta, ki imajo nepolarne (Trp, Tyr in deprotoniran Lys) ter polarne (Arg in protoniran Lys^+) aminokislinske preostanke [47]. Arginin je prav tako ohranjena aminokislina v ostalih transportnih proteinih ter visokoafinitetnih specifičnih steroidnih receptorjih [48]. Bolj intenzivno kot za albumin se afiniteta vezave P4 na $\alpha_1\text{-AgP}$ povečuje s povečevanjem pH (Graf 2) [45].



Graf 2. Titracijska krivulja odvisnosti afinitete interakcije P4 z $\alpha 1\text{-AgP}$ od pH (spodnja abscisa) in dvotočkovna krivulja odvisnosti afinitete enake interakcije od temperature pri pH 7.4 (zgornja abscisa). Povzeto po [37, 45].

V skrajnem primeru velikih ΔpH pride do splošnih sprememb naboja na celotnem proteinu. Nastane prehodna konformacija proteinskega agregata, ki je v termodinamičnem ravnotežju z raztopljeno nativno konformacijo proteina. Če se ΔpH še veča, potem agregirana oblika z višjo prosto energijo od nativne oblike ni več sposobna vzdrževati vseh sil v dinamičnem prostorskem ravnotežju. Posledica je destabilizacija agregirane strukture z ekspanzijo in razkritjem hidrofobne sredice agregiranega proteina, s tem pa, zaradi razlik v polarnosti od okolice, do izgube topnosti oziroma do morebitne amorfne precipitacije [53a]. Tako lahko zmanjšano disperzno moč albumina pri vrednosti pH (med 4.8 in 5.3), ki je enaka pH izoelektrične točke albumina (pI) [54], pripisujemo delni spremembi v nativni konformaciji albumina, ter posledično nižji topnosti oziroma afiniteti albumina do steroidnih hormonov [52, 53a]. Na samo molekulo steroidnega hormona ΔpH nima posebnega vpliva, saj so njihove pK_a približno 13.8 in posledično slabo ionizirajo v vodnem mediju. Izjema so estrogeni (E1, E2 in E3) katerih pK_a ima vrednost 10.32 (Preglednica 1).

1.3.2.4 Lastnosti medija: elektroliti in neelektroliti

Tako kot sprememba temperature in ΔpH pomembno vpliva tudi sprememba ionske moči na K_a določene interakcije L-R. Ionska moč raztopine soli je odvisna od molarne koncentracije ter od valence ionov in je definirana kot polovica vsote faktorjev koncentracij ionov in kvadrata njihovih valenc. Empirično zakonitost znižanja topnosti neelektrolitov v vodni raztopini zaradi vpliva elektrolitov je 1889 prvič matematično formuliral Setchenow [49]. Ugotovil je, da se logaritem topnosti neelektrolita linearno spreminja s koncentracijo soli po enačbi (Enačba 3)

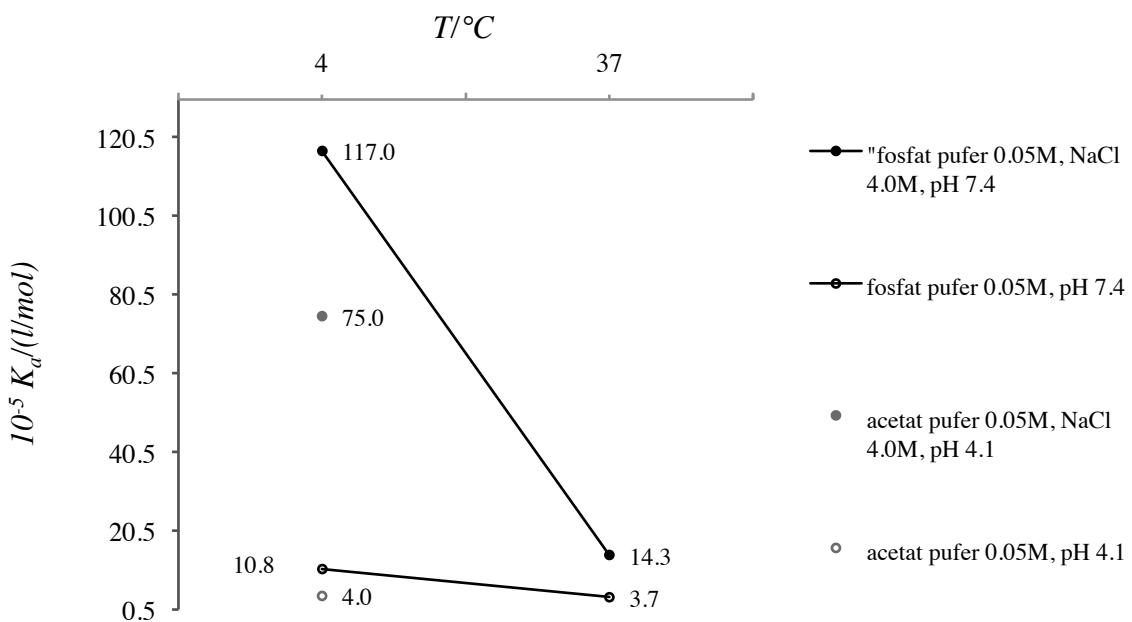
$$\ln S = \ln S^0 - K_s [C], \quad (3)$$

kjer je S topnost topljenca (neelektrolita) v raztopini soli (elektrolita) in S^0 topnost topljenca v čisti vodi, C molarna koncentracija soli ter K_s Setchenova konstanta, specifična za topljenec. Osnovno enačbo so kasneje leta 1952 Debije, MacAuley ter Hückel izpopolnili v enačbo, ki natančneje opisuje vpliv elektrolita na topnost neelektrolita [37, 50, 51]. Zmanjšanje topnosti neelektrolita oziroma vpliv izsoljevanja¹ (ang. salting-out), je tako odvisen od temperaturе, valence in radija ionov, dielektrične konstante topila ter njene hitrosti spremembe glede na spremembo koncentracije topljenca. Bischoff in sodelavci [36, 37] uporabijo teoretični model na študije topnosti steroidnih hormonov. Ugotovijo, da se pri konstantni temperaturi topnosti P4, T ter E2 nižajo z naraščajočo koncentracijo NaCl, kar ustreza naraščajoči ionski moči raztopine ter Setschenowemu zakonu izsoljevanja¹. S pionirskim delom pa Ganguly in Westphal [26] razširita ugotovitve glede vpliva posameznih koncentracij in tipa soli na interakcije steroidni hormon-protein. Zaradi podobnosti v strukturi, kot tudi v specifičnih veznih lastnostih s transkortinom (CBG), so za študije uporabili α_1 -AgP. Ugotovita, da ima vodni medij z dodatkom različnih nevtralnih soli na proteinsko konformacijo ter na jakost K_a interakcije P4 in α_1 -AgP, trende treh smereh. V smeri destabiliziranja (vsoljevanja ali ang. salting-in efekta) konformacije in interakcije delujejo LiBr, CaCl₂ ter KCNS, v smeri stabiliziranja (izsoljevanja ali ang. salting-out efekta) in posledično večje K_a interakcije pa delujejo Na₂SO₄, (NH₄)₂SO₄, Li₂SO₄, NaCl, CsCl, LiCl ter KCl. Nekatere soli, kot so KBr, NH₄Cl ali NH₄Ac, pa so za to interakcijo brez vpliva. Zaporedje učinkov soli, imenovanih tudi perturbanti, je podobno klasični Hofmeisterjevi (ali liotropni) sekvenci², začenjši z najbolj stabilizirajočum učinkom: Na₂SO₄ > Li₂SO₄ > (NH₄)₂SO₄ > NaCl > CsCl >

$\text{LiCl} > \text{NaAc} > \text{KCl} > \text{RbCl} > \text{NaBr} > (\text{KBr} \equiv \text{NH}_4\text{Cl} \equiv \text{NH}_4\text{Ac}) > \text{LiBr} > \text{CaCl}_2 >$ (urea) $> \text{KCNS}$. Razvidno je tudi, da fosfatni ali kakodilatni pufer medija v primerjavi z vodnim medijem, delujeta stabilizirajoče na interakcijo P4 in $\alpha_1\text{-AgP}$, medtem ko jo aminski pufer (amediol; 2-amino-2-metil-1,3-propandiol) pufer destabilizira [26]. Učinki perturbantov so sorazmerni koncentracijam perturbantov in večinoma reverzibilni oziroma je njihova reverzibilnost odvisna od koncentracije perturbanta. Prav tako so tudi sorazmerni v povezavi s spremembo temperature in spremembo pH (Graf 2). Na splošno se K_a za interakcijo steroidnih hormonov (v smeri naraščajoče polarnosti: P4 < T < 11dOCs < C < Col E1 < E2) z $\alpha_1\text{-AgP}$, zaradi uporabe medija s 4 molarno koncentracijo NaCl, poveča pri 4°C za faktor 10 do 33 oziroma za faktor 4 do 8 pri 37°C . V matriksu s 4 mol·L⁻¹ uree, pa bi se vrednosti K_a interakcije P4 z $\alpha_1\text{-AgP}$ pri 4°C , približno znižale za faktor 55 [26]. Dodatno lahko izsledimo, da so velikosti spremembe K_a sorazmerne s polarnostjo steroidnega hormona [26].

¹ Setschenow zakon je veljaven do relativno visokih koncentracij soli (1 - 4 M). Za nekatere soli pri visokih koncentracijah odvisnost ni več linearна: K_s lahko alternira med pozitivnim in negativnim predznakom, kar pomeni, da se nadaljnja topnost neelektrolita spreminja minimalno z povišanjem koncentracije istega elektrolita [65].

² Leta 1888 Hofmeister [67] opazi sposobnost nekaterih soli, da denaturirajo proteine. Ugotovil je, da sposobnost soli, da denaturira oziroma precipitira proteine jajčnega beljaka, narašča s sposobnostjo soli za urejanje vodne strukture. Slednje soli je uredil uredil v sekvenco posameznih ionov, ki so urejeni po sposobnosti modulacije hidrofobnosti (izsoljevanja, raztopljanja) hidrofobnih snovi v raztopini elektrolita. Po hidrofobnem efektu oziroma Hofmeisterjevem efektu [64] ionov na uredidev (tropijo) vodne strukture se ti klasificirajo na kozmotrope (urejevalce vodne strukture) in njim nasprotne kaotrope [66]. Po vplivu posameznih ionov je splošno Hofmeisterjeva zaporedje kozmotropskih anionov (topnost proteinov pada) v približnem vrtnem redu: citrat³⁻ $>$ $\text{SO}_4^{2-} > \text{S}_2\text{O}_3^{2-} > \text{HPO}_4^{2-} > (\text{OH}^-, \text{F}^-) > \text{Ac}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{ClO}_4^- > \text{I}^- > \text{SCN}^-$ ter kozmotropskih kationov v približnem vrsnem redu: $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Cs}^+ > \text{Rb}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{H}^+ > \text{Li}^+ > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Al}^{3+} > \text{Gua}^+$ [63, 64]. Posamezni učinki ionov so na splošno aditivni. Tako soli iz različno kombiniranih kationov in anionov, različno izražajo Hofmeisterjevev efekt. Danes se izraza "kozmotropi" in "kaotropi" uporabljata predvsem kot izraza za izražanje učinka iona na organizacijo vode.



Graf 3. Primerjava odvisnosti K_a interakcije P4 s $\alpha 1\text{-AgP}$ od raztopine NaCl pri različnih temperaturah in pH. Prirejeno po [26].

Mehanizem Hofmeisterjevega ³ vpliva elektrolitov na raztopino neelektrolita je izredno kompleksen in še v popolnosti nedognan. Na podlagi različnih termodinamskih študij na *in silico* modelih [63, 65, 66] predvidevajo, da je efekt odvisen od velikosti in/ali naboja iona, oziroma njegove gostote naboja ter težnjo po hidratizaciji .

³ Za kozmotropne ione je značilno, da so majhni in močno nabiti ter da posledično izražajo močno težnjo po hidratizaciji (hidrofilne interakcije z vodo). Kozmotropni ioni v bližnjem kontaktu s hidratizacijskim slojem proteinske molekule indirektno povzročajo močno perturbacijo tega sloja, dodatno pa tudi znižujejo organizacijo vodne raztopine, ki je posledično slabše topilo. Zaradi zmanjševanja elektrostatičnih interakcij nabitih površin in zmanjševanja stopnje hidratizacije proteina se zaradi povišane površinske napetosti zmanjša površina strukture za vodno topilo (hidrofobne interakcije). Intermolekularno pa so možni tudi kristalni kontakti [63]. Nastala kompaktna struktura proteina ima manjšo topnost. Kaotropni ioni zaradi manše tendence po hidratizaciji ne perturbirajo stopnje hidratizacije proteina ter ne zmanjšujejo stopnje organizacije vodne raztopine, kot je značilno za kozmotrope. Takšna raztopina je boljše topilo in povzroči, da protein poveča kontaktno površino s topilom. S posledično večjo stopnjo hidratizacije proteinske molekule, se poveča sama topnost proteina [63]. Vendar je dominanten mehanizem s katerim kaotropni ioni povečajo topnost proteina direktna interakcija iona z šibko hidratizirano regijo proteina [63].

Denaturant, uvrščen v skrajno kaotropne katione, je gvanidin ozziroma gvanidiniev kation (Gdm^+ , $(\text{NH}_2)_2\text{CNH}_2^+$). Zanimiv je predvsem zato, ker je v kombinaciji z nekaterimi anioni sposoben delovati tudi izredno kozmotropno ali celo nevtralno na proteinsko konformacijo. Slednjo dualno naravo gvanidinijevih soli na ribonukleazo sta demonstrativno predstavila von Hippel in Wong [56]. Njuni rezultati kažejo, da soli strogo sledijo Hofmeisterjevi vrsti in sicer v smeri denaturativnih sposobnosti: $\text{GdmSCN} \gg \text{GdmCl} > \text{GdmAc}$. Znotraj te ureditve pa opazita velik vpliv aniona na splošen Hofmeisterjev učinek Gdm^+ . Tako ima GdmAc na ribonukleazo minimalen kaotropni učinek (ozziroma nevtralen [64]), medtem ko pa Gdm_2SO_4 deluje izredno kozmotropno na proteinsko strukturo. Iz tega zaključita, da imajo anioni velik vpliv na Hofmeisterjev učinek, ter da so sposobni celo nevtralizirati kaotropni učinek Gdm^+ . Znotraj posameznih soli pa lahko ugotovimo še od koncentracije odvisno dualno vlogo. GdmCl pri nizkih koncentracijah (od 0 do $0.03 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) stabilizira konformacijo proteina. Z naraščanjem koncentracije pa vse bolj prevladuje denaturativni učinek [68, 69]. Podobno lastnost lahko opazimo tudi za Gdm_2SO_4 [56]. Ta pri nizkih koncentracijah deluje denaturativno. Podobno kot za ostale Hofmeisterjeve ione je natančen mehanizem delovanja Gdm^+ še delna skrivnost. V principu deluje Gdm^+ kot H-donor (podobnost z ureo, le da je ta tudi H-akceptor) in sicer tako, da prekinja in tekmuje z intraproteinskimi vodikovimi vezmi ter s tvorbo vodikovih vezi s peptidno vezjo. Hidrofobni del molekule pa sodeluje pri interakcijah z nepolarnimi aminokislinskimi preostanki, predvsem aromatskimi [56, 53b].

Urea ($(\text{NH}_2)_2\text{CO}$) je neelektrolit in se po moči Hofmeisterjevega efekta uvršča med skrajno kaotropne snovi Hofmeisterjeve vrste². Kaotropni efekt uree je zelo podoben efektu enako molarne koncentracije CaCl_2 [26]. Pojemanje K_a je približno logaritemsko z naraščajočo koncentracijo uree: pri 4°C v prisotnosti $3 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ uree, je K_a za interakcijo P4 in $\alpha_l\text{-AgP}$ ($0.05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfatni pufer, pH 7.4) zmanjšana iz $10.5 \cdot 10^5 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}$ za faktor 16 (približno $0.65 \cdot 10^5 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}$) [po sklepu iz 26]. V tem primeru zmanjšano afiniteto pripisujemo z ureo-induciranimi konformacijskimi spremembami proteina ozziroma stopnji denaturacije proteina. Na splošno velja, da je stopnja denaturacije ter njene reverzibilnosti primarno odvisna od strukturne stabilnosti proteina ter od koncentracije uree [56, 57]. Novejše študije [59, 60] predvidevajo, da kompleksen destabilizacijski efekt uree na proteine temelji v osnovi na dveh mehanizmih. Po "indirektnem mehanizmu" se predvideva, da urea perturbativno

deluje na ureditev strukture vodne mreže, predvsem v primarnem hidratizacijskem ovoju proteina [59] tako, da znižuje organizacijo topila z nadomeščanjem vodnih molekul. Nova organizacija topila deluje kot surfaktant in omogoča proteinu večjo konformacijsko svobodo s solvatiranjem hidrofobnih grup ter posledično destabilizacijo proteina. V nasprotnem prevladajočem, "direktnem mehanizmu" pa urea reagira direktno in nespecifično s polipeptidno sekvenco. Predvidevajo se direktne ter šibke interakcije s polarnimi aminokislinsimi ter amidnimi (peptidnimi) vezmi proteinske sekvence, preko vodikovih in elektrostatskih interakcij in/ali direktno s nepolarnimi aminokislinskimi stranskimi verigami preko Van der Waalsovih interakcij. Slednje interakcije predvidevajo destabilizacijo z znižanjem hidrofobnega efekta ter vzajemno stabilizacijo nenativne konformacije. Nedavna študije [58] pa vse bolj podpirajo dinamični doprinos obeh, indirektnega ter direktnega mehanizma.

1.3.2.5 Lastnosti medija: organska topila

Znano je, da pri rigoroznem mehanskem mešanju heterogenega sistema zrak-vodna raztopina proteina, prihaja na razpršeni površini zračnih mehurčkov v vodni raztopini do denaturacije proteinov. Zanimivo je, da z minimalnim dodatkom nekaterih organskih topil v tako mešani raztopini proteinov, preprečujemo nastanek zračnih mehurčkov in tako sicer lahko preprečimo denaturacijo [61], ne preprečimo pa znižanja afinitete proteina do liganda [62]. V primeru hemoglobina lahko tovrstno denaturacijo popolnoma inhibiramo s približno 10 - 40 % volumnskim deležem (ϕ) metanola, ϕ etanola 3 - 30 %, ϕ propanola 3 - 10 % ali ϕ butanola 2 - 8 % [55]. Višji volumnski deleži teh organskih topil bi povzročili denaturacijo. Denaturativni učinek polarnega organskega topila narašča približno z dolžino alkilne, verige oziroma z razvejanostjo stranskih verig v kisik vsebujočih organskih topil (alkoholi, ketoni, etri) oziroma z stopnjo nepolarnosti [56, 61]. V skladu s stopnjo nepolarnosti organska topila kot sta kloroform ali toluen delujeta denaturativno na hemoglobin že pri volumnski koncentraciji 0.5 % [61]. V pristopu izolacije s tekočinskimi ekstrakcijami so ponavadi uporabljena organska topila vsaj v 50 % volumnskem deležu. S tem je zadoščeno koncentracijskemu pogoju nepolarnega organskega topila, da vsaj deloma

destabilizira nepolarne interakcije v sami nativni strukturi proteinov, kot tudi nepolarne interakcije kompleksov proteinov s steroidnimi hormoni [31, 32, 33, 34, 37] ter posledično zniža K_a interakcije steroidni hormon - protein. Prisotna je lahko še dodatna destabilizacija kot posledica mešanja.

1.3.3 Interakcija: steroidni hormon - lipidi

Za holesterol je znano, da močno asociira s celično membrano in modulira njen fluidnost [21, 22]. Ker so steroidni hormoni derivati holesterola z ohranjenim rigidnim tetracikličnim obročem, je pričakovano, da asociirajo podobno kot holesterol. Na tej osnovi je leta 1961 Willmer [21] predlagal teorijo mehanizma delovanja steroidov. V njej predpostavlja, da steroidi, ki imajo podobno planarno strukturo kot holesterol, tudi podobno interagirajo in prehajajo biološko membrano, ter tako delujejo kot hormoni. Gershfeld in sod. [20] v študijah interakcij steroidnih hormonov (A, T, P4) z modelnimi monomolekulske lipidnimi filmi dokažejo, da so steroidni hormoni, kljub zelo nizkim koncentracijam ($10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), sposobni minimalno in nespecifično spremeniti površinsko napetost filma. Ugotovijo tudi, da so v primerjavi s filmi iz holesterola ali derivatov oktadekanola in stearata, interakcije s filmom, ki ima aminsko strukturo (oktadecilamin) relativno pomembnejše, saj ostaja del steroidnih hormonov na njih adsorbiran. Slednje dejstvo nakazuje na selektivnost kemijske strukture filma. Avtorji sicer ne uspejo dokazati penetracije filma, zato iz dobljenih rezultatov podprejo takratni koncept delovanja steroidnih hormonov preko specifičnih kompleksov, ki predvideva s steroidom inducirano konformacijsko ali strukturno spremembo tarčnih makromolekul z aminsko strukturo. Kot primerne tarčne molekule pa izpostavijo proteine. Nadaljne študije dokazujojo [22, 23], da se z odstranitvijo holesterola iz celične membrane povečata afiniteta in sposobnost prehajanja (translociranja) polarnih steroidnih hormonov (C, Col), kar nakazuje na pomembnost vloge sestave membran pri transportu in regulaciji aktivnih snovi. Holesterol in nekoliko manj divalentni kationi ($\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$) v fosfolipidnih celičnih membranah delujejo kot stabilizatorji kondenzirane konformacije membrane [24] ter tako zmanjšujejo njen permeabilnost za steroidne hormone. Slednjo lahko z odpiranjem konformacije in morebitnim posledičnim nastankom micelijev povečajo

interkalatorji divalentnih ionov ter organska topila, kot so alkoholi [24] ali druga. Danes veliko študij potrjuje, da transport steroidnih hormonov skozi celične membrane ni nujno vezan in posredovan z endocitozo specifičnih steroidnih receptorjev, ampak da so steroidni hormoni sposobni prosto difundirati skozi biološko oziroma celično membrano [16, 17, 18]. Razlika v polarnosti membrane (ta je podobna polarnosti heksana) in vodne okolice omogoča porazdeljevanje nekonjugirane steroidne molekule med tema dvema fazama. Oren in sod. [18] predlagajo mehanizem proste difuzije poimenovan tudi kot "flip-flop" prehajanje membranskega dvosloja. Nekatere študije pa nakazujejo možnost, da se lahko v intersticijskem prostoru dvoslojne membrane steroidni hormoni akumulirajo [19]. Podobno, kot idealen depo za steroidne hormone konjugirane z maščobnimi kislinami, služi nepolarni intracelularni prostor adipocitov [25, 84].

1.3.4 Interakcija: steroidni hormon - nukleinske kisline

Makromolekularno strukturo nukleinskih kislin sestavljajo polimeri nukleotidnih monomerov. Nukleotidni monomeri pa se razlikujejo po tipu nukleinskih baz. Ločimo purinske (adenin, gvanin) ter pirimidinske (citozin, timin, uracil) baze. Z ekstremno spremembo pogojev vodnega medija (temperatura, dodatek destabilizatorjev, *pH*) raztopine nukleinskih kislin, izzovemo denaturacijo s prekinitevijo nativne sekundarne in terciarne strukture. Produkt denaturacije helikalne dsDNA (ds; dvovijačne) so odprte in naključne oblike dsDNA z nižjo stopnjo organizacije ali celo prosta ssDNA (ss; enovijačna). Zanimivo je, da imajo steroidni hormoni prav do denaturirane DNA visoko afiniteto [13,14]. Ti eksperimenti so pokazali, da je za asociacijo steroidnih hormonov pri teh pogojih potrebna 2-amino skupina gvaninskih preostankov v polideoksi- in polioksi- ribonukleotidih. Primerjave povprečnih konstant asociacij za vsa vezna mesta nK_a kažejo, da je afiniteta za 2-amino skupino gvanina denaturirane DNA največja pri P4, sledi T, ter najmanjša pri steroidih, ki imajo α izomerno hidroksilno substituento na C17 ($E2 > 17\alpha$ -OHP4 > Con) [14]. Dodatno se z višanjem stopnje hidroksilacije niža tudi afiniteta do denaturirane DNA. Tako ima pri 5 °C interakcija T in E2 z nativno DNA vrednost nK_a približno enako $15 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}$, ki pa se za interakcijo T z denaturirano DNA pri enakih pogojih poveča za faktor 14.5

ozioroma za interakcijo E2 z denaturirano DNA za faktor 4.5. Pri temperaturni spremembi iz 5 °C na 27 °C se nK_a interakcije T z denaturirano DNA zmanjša na približno 1/3 vrednosti nK_a pri 5 °C. nK_a za interakcijo T z histonskimi proteini ima vrednost $1.4 \cdot 10^{-3} \text{ } l \cdot g^{-1}$, kar je 25 - 30 krat nižje kot za DNA. Navajajo tudi [13,14], da na magnitudo nK_a vplivata ionska moč in temperatura. Zaradi višje ionske moči medija, ki minimalizira repulzivne sile fosfatnih skupin, in nižje temperature, so nukleinske baze bolj skupaj. Posledično pa so višje tudi nK_a za interakcije z denaturirano DNA. Nasprotno se pri znižani ionski moči medija (npr. v 0.01 mol·l⁻¹ NaCl) in zvišanju temperature afiniteta E2 in T za nativno DNA poveča, oziroma pada za denaturirano DNA [12]. Arya in Yang [11] ugotovita tudi, da E2 in T stabilizirata strukturo nukleinskih kislin. Zaradi kritične geometrije optimalnih veznih mest avtorji težko podajo število veznih mest n , ocenjujejo pa, da je število maksimalnih veznih mest glede na maksimalne konstante manjše od 1/10000 nukleotidov [12]. Znane pa so tudi specifične interakcije steroidnih hormonov z umetnimi sekvencami DNA v trojnem stiku DNA aptamerov [15]. Naključen nastanek slednjih specifičnih konformacij pri denaturaciji je najverjetnejše malo verjeten.

1.4 Izolacija steroidnih hormonov iz tkiva

Steroidne hormone je možno izolirati iz biološkega materiala na različne načine: z uporabo imunoafinitetne ekstrakcije, ekstrakcije na različnih polimernih ali drugih stacionarnih fazah (kromatografske metode), ekstrakciji trdne faze (SPE) ali ekstrakciji tekoče faze (LLE) [115b]. V našem primeru uporabljena ekstrakcija tekoče faze ima delno pomankljivost pred ostalimi metodami, predvsem v neselektivni koizolaciji ostalih komponent matriksa biološkega materiala, ki lahko predstavljajo vir interferenc pri sami analizi. Vendar je nepogrešljiva, saj z njo ločimo tekočo fazo z raztopljenim analitom od netopnih "trdnih" delcev tkivnega homogenata. Kakorkoli, do danes zaenkrat ne obstaja metoda, ki bi učinkovito in specifično izolirala vse steroidne hormone iz biološkega tkiva [115b].

1.4.1 Predpriprava vzorca tkiva za tekočinsko ekstrakcijo

Ekstrakcija steroidnih hormonov iz tkiv se prične s predfazo mehanske in/ali ultrazvočne homogenizacije tkiva s pomočjo različnih ročnih ali električnih homogenizatorjev. Pri tem lahko tkivo direktno homogeniziramo v vodnem mediju (ponavadi v raztopini pufra [70-79]) ali v polarnih organskih topilih [99]. Pogosto se za mehansko homogenizacijo uporablja metoda homogeniziranja v tekočem dušiku. Slednji način zahteva, da nastali homogenat za ekstrakcijo suspendiramo v primernem topilu. V primeru vodnega topila (raztopina pufra), ekstrahiramo steroidne hormone iz tkiva z organskimi topili.

1.4.2 Teorija tekočinske ekstrakcije (ekstrakcija tekoče-tekoče)

Ekstrakcija tekoče-tekoče je v principu zasnovana na porazdeljevanju (particiji) neioniziranega analita med vodno fazo in teoretično v vodi netopno fazo organskega topila, do vzpostave ravnotežja. Porazdeljevanje analita med obema fazama je odvisno od topnosti analita v posamezni fazi topil. V termodinamičnem ravnotežju je porazdelitveni koeficient K_p koncentracij analita med obema fazama za neioniziran

analit konstanten. Če je v binarnem sistemu eno topilo vodna faza (aq) in v njej ravnotežna koncentracija analita A, $[A]_{aq}$ ter druga faza organsko topilo (o) z ravnotežno koncentracijo analita $[A]_o$, definiramo K_p v ravnotežju s kvocientom koncentracije analita zgornje faze, z nižjo gostoto topila in koncentracijo analita spodnje faze, z višjo gostoto topila (Enačba 4) [104, 105]:

$$K_p \equiv \frac{[A]_o}{[A]_{aq}}. \quad (4)$$

Pri tem se predpostavlja, da analit ne disociira ali dimerizira v enem ali drugem topilu, saj bi v slednjem primeru prišlo do distribucije analita in spremembe ravnotežne K_p na račun konstante disociacije, oziroma konstante dimerizacije analita. V tem primeru reaktivne ekstrakcije dobi K_p novo definicijo koeficiente distribucije, K_D [92, 104]. Pri porazdeljevanju steroidnih hormonov med dvema fazama pri nevtralnem pH ter tudi v širšem območju, najverjetnejše ne prihaja do dimerizacije in prav tako ne do disociacije. pK_a steroidnih hormonov je z izjemo estrogenov izredno visoka, kar pomeni, da kot izredno šibke kisline nimajo tendence po deprotonaciji v vodnem mediju. Estrogeni, katerih pK_a določena v vodi ima vrednost 10.33 (Preglednica 1), pa v vodnem mediju s $pH > pK_a + 2$ popolnoma ionizirajo. Posledično se zaradi izražanja fenoksidnega iona estrogenom poveča topnost v vodnem mediju, kar pomeni, da se pri porazdeljevanju med dvema fazama topil obrne smer ravnotežja proti vodo-topnosti estrogenov. Izkoriščanje te lastnosti v izolacijske namene estrogenov imenujemo Brownova porazdelitev [91].

Ponavadi se podajajo vrednosti deskriptorja lipofilnosti nevtralne snovi, K_p ali deskriptorja od pH odvisne ionizacije snovi, K_D , kot $\log K_p$ odnosno $\log K_D$ in sicer največkrat v binarnem sistemu topil oktanol-voda.

1.4.3 Kvantitativnost tekočinske ekstrakcije

Problem tekočinske ekstrakcije je, da se z vzpostavitvijo ravnotežja koncentracij analita v binarnem sistemu topil ne ekstrahira oziroma izolira celotne koncentracije analita. Samo ena ekstrakcija z določeno količino topila (kljub temu, da se pri njej ekstrahira največji delež analita) ni nikoli tako učinkovita, kot če enako količino

topila razdelimo na n-enakih delov in ekstrahiramo zaporedno n -krat. Če je q_0 delež analita v vodni fazi, je po vzpostavitev ravnotežja za binarni sistem topil delež analita v organski fazi p_0 , enak 1- q_0 . Ker se pri vsaki ekstrakciji odstrani enak delež analita, imamo po n -ti ekstrakciji v vodni fazi preostali delež analita q_n (Enačba 5):

$$q_n = \left(\frac{1}{K_p V_r + 1} \right)^n. \quad (5)$$

V poenostavljeni enačbi (Enačba 5) je K_p porazdelitveni koeficient, V_r pa označuje volumnsko razmerje faze organskega topila in vodne faze [104, 105].

Teoretično bi tako za 99.99 % izolacijo E2 iz vodne faze z ekstrakcijo morali ekstrahirati 1-krat z volumnom n-oktanola, ki je enak volumnu vodne faze ali 2-krat z dietiletrom, katerega volumen je enak volumnu vodne faze [preračunano po 96]. V praksi je potrebno upoštevati še temperaturo in čas vzpostavitev ravnotežja. Vendar so pogoji, kot so upoštevani čas in število stopenj zaporednih ekstrakcij ter volumnsko razmerje med vodno fazo in fazo organskega topila zelo poljubni. Tako zasledimo, da se 1 volumnski del tkivne suspenzije, ki vsebuje od 50 do 100 mg tkiva, le 1-krat 15 minut ekstrahira z 10-kratnim volumnom organskega topila [71, 76] ali ekstrahira 2-krat zaporedno s 2-kratnim volumnom organskega topila [74] ali 3-krat z 3-kratnim volumnom organskega topila [71]. Zelo pogosto pa zasledimo, da čas trajanja ekstrakcij ni podan.

Za oceno ponovljivosti in uspešnosti (izkoristka) samih postopkov ekstrakcij in čiščenj, je potrebno biološkemu materialu dodati interni standardni material [115b, 116]. Slednji je lahko kemijsko enak molekuli analiziranega steroidnega hormona, le da je označen s stabilnim izotopom (^{13}C , ^{14}C , ^3H) [70 - 73, 80, 83, 84, 115b] oziroma je kemijski analog molekule (večinoma uporaben v primeru kromatografskih metod). Možno je uporabiti tudi standardne dodatke steroidnih hormonov, ki so kemijsko identični analiziranim steroidnim hormonom iz biološkega vzorca [76, 115b]. Pogoj je, da se standard porazdeljuje med komponentami v biološkem matriksu enako, kot analiziran endogeni steroidni hormon. Približno enakovredno porazdelitev standardov steroidnih hormonov dosežemo z njihovo predhodno inkubacijo v biološkem vzorcu.

Standardni materiali nam ne dajejo samo vpogleda in korekcijskih faktorjev za samo kvaliteto metode oziroma dela, temveč nam lahko dajo vpogled tudi na uporabljen inventar in delno znižujejo njegov negativen vpliv. Pri uporabljenem laboratorijskem inventarju lahko prihaja zaradi adsorpcije na plastične (polietilen, polikarbonat) in steklene površine ali oksidacije na kovinskih površinah do irreverzibilnih izgub steroidnih hormonov in posledično lažno znižanih rezultatov [101, 103, 115b, 116]. Nespecifično adsorpcijo steroidnih hormonov na stekleno površino epruvet lahko deloma preprečimo z inaktivacijo steklenih površin z impregnacijo z dimetildiklorosilanom (silaniziranje) ali z uporabo plastičnih epruvet [115b]. Slabost pri uporabi plastičnih epruvet je nekompatibilnost in raztapljanje plastičnega materiala z organskimi topili ter ekstrakcija ftalatov, ki lahko interferirajo v sami analizi. Prav tako je nezaželeno izparevanje ekstrakta do suhega, saj se adsorbirani steroidni hormoni težko desorbirajo z organskim topilom ali še težje z raztapljanjem v vodnem mediju (raztopini pufra) pred analizo. Problemu se izognemo z raztapljanjem steroidnih hormonov v minimalni količini [115b] polarnih organskih topil (metanol, etanol) pred vodnim medijem [70, 71]. Na račun večje koncentracije dodanega standarda pa lahko zmanjšamo adsorbcijo ali oksidacijo analita iz biološkega vzorca [115b]. Adsorbcija se lahko deloma zmanjša, če vzorec vsebuje proteine [100] ali, da oziroma če medij vsebuje 0.1 % raztopino želatine [101]. Najverjetnejše gre tu za podoben učinek, kot pri Vromanovem efektu [102], le da se tukaj nadomestijo na površino adsorbirani steroidni hormoni. Po teoriji se pri Vromanovem efektu sprva hitro adsorbirani proteini na določen material sčasoma nadomestijo z adsorpcijo proteinov, ki imajo višjo afiniteto do tega materiala.

1.4.4 Tekočinska ekstrakcija steroidnih hormonov iz tkiv

Samuels [78] že v zgodnjih študijah metabolizma steroidnih hormonov za ekstrakcije teh iz tkiv, ki jih encimsko deaktivira in denaturira z vrenjem pod refluksom, uporabi za ekstrakcijo dietileter (Et_2O). Ugotovi, da ekstrakcija z Et_2O daje skoraj 100 % izkoristke ter, da je možno z uporabo kombinacij različnih drugih zmesi topil (etanol, petroleter, pentan in kloroform) selektivno eluirati steroidne hormone iz kromatografske kolone. Kaj kmalu se iz tega naslova pojavi prve modifikacije osnovnega topila z namenom selektivnejše ekstrakcije [79, 87]. Tako lahko z

povečevanjem polarnosti osnovnega nepolarnega in aprotičnega topila, vplivamo selektivno na topnost steroidnih molekul v tem topilu, ter na selektivno porazdeljevanje med posameznimi fazami topil. To najpogosteje dosežemo z uporabo sekundarnih polarnejših aprotičnih (estri, etri) oziroma protičnih topil (alkoholi) v osnovnem primarnem topilu. Med takšne kombinacije topil najpogosteje sodijo zmesi kloroform [87], heksana [75, 99], izooktana [81], benzena in petroletra [80, 91], ali drugih nepolarnih topil z metanolom, etanolom, etilacetatom ali drugimi. Tako je selektivnost topila zagotovo najpomembnejši dejavnik pri ekstrakciji. Verjetno najbolj uporabljen pristop za klasifikacijo topil na osnovi selektivnosti je Snyderjev model [106] tako imenovanega "selektivnega trikotnika". V modelu trikotnega koordinatnega sistema Snyder klasificira topila po koordinatah na osnovi polarnosti ter prejemanja in oddajanja vodikov. Različna topila so po teh kriterijih vnešena v trikotni koordinatni sistem ter na osnovi selektivnosti razvrščena v osem razredov. Za določitev optimalnega topila oziroma zmesi topil za ekstrakcijo lahko izberemo dve ali tri topila iz Snyderjevih razredov ter z njimi oziroma njihovimi zmesmi ekstrahiramo analit. Na osnovi koncentracij ekstrahiranega analita v ekstraktih s čistimi topili in v zmesih topil določimo koeficiente porazdelitve. Dobljena grafična krivulja v primerem koordinatnem sistemu pa nam opiše koeficiente porazdeljevanja kot funkcije zmesi topil [107]. Moč topila je po Snyderju [106] definirana s polarnostjo in s tem s sposobnostjo, da razaplja polarne snovi. Selektivnost pa je definirana s sposobnostjo razapljanja različnih snovi, ki imajo enako polarnost. Tako so na osnovi Snyderjevega modela v razapljanje neionizirane snovi oziroma analita vključene vsaj tri vrste interakcij topila z analitom: vodik-donorske in akceptorske ter dipolarne. Relativni prispevki teh treh tipov interakcij definirajo selektivnost topila. Obstajajo različni fizikalni parametri za opis polarnosti topila ter prav tako različne skale polarnosti topil. Na splošno pa je grobo merilo polarnosti topila dilektrična konstanta oziroma relativna statična permitivnost topila, ϵ_r . Topila z ϵ_r nižjo od 15 se na splošno po "A" klasifikaciji topil (Preglednica 2) [109] smatrajo za nepolarna, polarna topila z ϵ_r večjo od 15 pa se nadaljnje delijo na protična in aprotična [108, 109]. Protičnost dobro opiše parameter sposobnosti donoriranja vodikove vezi (H-vezi), E_T^N . Protična topila imajo E_T^N med 0.5 in 1.0 v primerjavi z nepolarnimi, katerih E_T^N je med 0.0 in 0.3. Protična topila so dobri donorji in akceptorji H-vezi ter preko vodikovih interakcij solvatirajo snovi s presežkom elektronov (anioni, prosti

elektronski pari). Na drugi strani so lahko aprotična topila z E_T^N med 0.3 in 0.5 dobri akceptorji vodikovih vezi, medtem ko niso dobri donorji vodikovih vezi in posledično slabo solvatirajo snovi s presežkom elektronov [109]. Aprotična topila bi lahko nadaljne klasificirali po intenziteti fizikalnega parametra, ki označuje separacijo naboja molekule, dipolni moment (μ). Na splošno je za nepolarna topila μ manjši od 2.49 Debya. Takšna razvrstitev razloži predvsem topnost kationov preko dipolarnih interakcij z polarnimi topili, bodisi protičnimi ali dipolarnimi aprotičnimi [108].

Preglednica 2. Razvrstitev topil s fizikalnimi konstantami po "A" klasifikaciji topil [109].

	$t_{bp}/^{\circ}\text{C}$ (1.013 kPa)	d/(kg/l) (25 °C)	ϵ_r (25 °C)	μ/D	E_T^N
polarno protično topilo					
voda	100.0	0.9971	78.36	1.85	1.000
etanol	78.3	0.7850	24.55	1.65	0.654
dipolarno aprotično topilo					
acetonitril	81.6	0.7766	35.94	3.89	0.460
aceton	56.1	0.7844	20.56	2.69	0.355
nepolarno topilo					
etilacetat	77.2	0.8946	6.02	1.77	0.228
dietileter	34.5	0.7076	4.20	1.14	0.117
heksan	68.7	0.6548	1.88	0.00	0.009

t_{bp} ; vrelišče, ϵ_r ; relativna dielektrična konstanta, μ ; dipolni moment (enota Debye), E_T^N ; sposobnost doniranja vodikove vezi [109], d; gostota [110].

Idealno naj bi organska topila oziroma zmesi topil, uporabljena za ekstrakcijo steroidnih hormonov, imela destabilizacijske oziroma denaturativne lastnosti. To pomeni, da bi bila z destabilizacijo strukture znižana afiniteta specifičnih in nespecifičnih povezav med molekulo steroidnega hormona in s topilom destabiliziranimi oziroma denaturiranimi tkivnimi makromolekulami (predvsem proteini) [61, 115b]. Slednja lastnost bi tako povečala prosto frakcijo steroidnih hormonov in posledično izkoristek ekstrakcije. Zaradi topil z dobrimi denaturativnimi lastnostmi bi lahko omogočili kvantitativno deproteinizacijo s centrifugiranjem [115b]. Izkoristek ekstrakcije je možno izboljšati tudi s spremembou ionske moči medija (Setchenow zakon [36, 37, 49]) (npr. vodni medij, ki vsebuje NaCl (0.01 mol·l⁻¹) [116]) ali z uporabo denaturantov proteinskih struktur [26, 67] (npr. raztopina 4 mol·l⁻¹ uree [116]).

Dietileter je na tem področju razširjen kot osnovno topilo in najverjetneje tudi edino topilo, ki je bilo preverjano glede denaturativnih lastnosti. Van Landeghem in sod. [70] namreč trdijo, da ekstrakcija tkiva z dietiletrom Et₂O ni tako učinkovita kot ekstrakcija s predhodno denaturacijo z zmesjo etanol-acetona (1/1) (EtOH:Me₂CO) . Navajajo, da je skupni izkoristek ekstrakcije estrogenov z Et₂O le 35 do 50%. Od tega je mogoče direktno ekstrahirati le 31 - 35% [³ H]-standardov, ki so bili administrirani *in vivo* pred histerektomijo. V primeru predhodne ekstrakcije z EtOH:Me₂CO (1/1) se ta izkoristek poveča za dodatnih 25 - 27%. To dejstvo pripisujejo večji sposobnosti zmesi topila EtOH:Me₂CO (1/1), da denaturira tkivne makromolekule, ki imajo visoko afiniteto za steroidne hormone (npr. steroidni receptorji). Kljub skupnemu izkoristku 62 - 67 % pa v citosolni frakciji ostaja 27 - 33% derivatov steroidnih hormonov, ki se niso ekstrahirali z Et₂O. Slednji odgovarjajo glukuronidnim in sulfatnim konjugatom steroidnih hormonov. Za [³H]-interne standardne, dodane tkivnemu homogenatu, pa določijo 80 - 100 % izkoristek ekstrakcije pri ekstrakciji z Et₂O in skoraj 100% izkoristek ekstrakcije pri ekstrakciji z EtOH:Me₂CO (1/1). Dodatno avtorji izsledijo, da tako imenovana nuklearna frakcija (subcelularni delci, celični fragmenti in ostali celični debris), da 100% izkoristek le s sonikacijo v EtOH:Me₂CO (1/1). Mnenju van Landeghema in sod. [65] pa nasprotujejo izsledki Bonneya in sod. [71], saj ti dokazujo, da med temo dvema topiloma ni statistično značilnih razlik. Minimalne razlike pripisujejo dodatnim eksperimentalnim korakom pri testiranju topil. Visok odsotek, več kot 95 % izkoristka standardnih dodatkov (T, A4dion, P4) navajajo tudi pri ekstrakciji z zmesjo triklorometan-metanol (Cl₃Me:MeOH (1/1)) [76]. Manjši, približno 70 % izkoristek ekstrakcije pa navajajo za ekstrakcijo E2 in E3 z zmesjo heksan-etylacetat (Hx:EtOAc (2/3)) [72] ter za ekstrakcijo P4, 17OHP4 s topilom heksan-metanol (Hx:MeOH(80%) (1/7)) [75]. Le Bizec in sodelavci [77] pa navajajo, da je ekstrakcija steroidnih hormonov, ne glede na njihovo obliko (vključno s konjugiranimi steroidnimi hormoni), učinkovita tudi, če kot topilo uporabimo raztopino metanola v 0.2 M acetatnem pufru s pH 5.2. Nekonjugirane in polarne, konjugirane steroidne hormone, je namreč možno ekstrahirati iz vodnega medija tkivne suspenzije s polarnimi organskimi topili, ki se mešajo v vseh razmerjih z vodo (aceton, (izo, n)-propanol, etanol, metil cianid, metanol, piridin ali 1-klorobutan) [115b], ali z uporabo lipofilnih kvarternih (tetraalkil) amonijevih soli v tako imenovani ekstrakciji ionskega para [98].

Danes se zelo pogosto uporablja predvsem nezahtevna metoda po Boluferju in sod. [74], kjer gre za enostavno ekstrakcijo 1 volumnskega dela puferne suspenzije tkiva z 2-krat 4 volumnskimi deli (Et)₂O. Vendar vprašanje glede denaturativnih lastnosti dietiletra ostaja odprto.

Ekološki in ekonomski vidiki pa narekujejo trende uporabe tako imenovanih "zelenih topil". Med mnogimi topili ima ekstrakcija s superkritičnim CO₂ velik potencial pri zmanjševanju časa ekstrakcije in porabi organskih topil ter predvsem izboljšanju izkoristkov [117].

1.4.5 Pogoji za izbor organskega topila za ekstrakcijo

Izbor organskih topil za ekstrakcijo je odvisen od dobre topnosti analita v določenih organskih topilih. Iz pregleda teoretičnih vrednostih *logP* (Preglednica 1) za steroidne hormone je mogoče ugotoviti, da topnost steroidnih hormonov sledi pravilu "podobno se topi v podobnem". Torej, čim polarnejši je steroidni hormon, nižja je njegova topnost v nepolarnih organskih topilih in obratno. Na splošno je topnost steroidnih hormonov v vodi zelo nizka, povprečno v intervalu med 10⁻³ in 10⁻⁵ g·l⁻¹ (Preglednica 1).

Selektivno topilo oziroma zmes topil karakterizira tudi minimalna ko-ekstrakcija nezaželenih komponent matriksa [115b, 116]. Problematiki ko-ekstrakcije nezaželenih komponent se da v veliki meri izogniti z izolacijo komponent ekstrakta z ekstrakcijo SPE ali kromatografijo [73, 76, 77, 83, 84]. Če ne uporabimo separacijskih kolon, se temu ne da popolnoma izogniti. Ko-ekstrahirane komponente pri neselektivni ekstrakciji tekoče-tekoče lahko zmanjšamo s ponovno predhodno izolacijo teh komponent ali s ponovno ekstrakcijo (re-ekstrakcijo) ekstrakta z drugim topilom. Zaradi možnih interferenc pri analizi so problematični predvsem tkivni homogenati, ki vsebujejo veliko lipidov (adipoza dojke, abdominalna adipoza, možgani). Predvsem se težava v izolaciji pojavi, kadar želimo določiti z maščobnimi kislinami konjugirane steroidne hormone. Klasični postopek je delipidacija tkivne suspenzije ali organskega ekstrakta z dolgotrajno ekstrakcijo lipidov v vodni raztopina MeOH ali EtOH ter izolacijo lipidov pri -20 °C [72, 73, 76]. Druga možnost

je neselektivna ekstrakcija z zmesmi nepolarnih topil (petroleter, heksan, triklorometanom, toluen, izo-oktan) ter reekstrakcija suhega ostanka s polarnejšimi zmesmi topil [70, 83]. Možna pa je tudi varianta v obratni smeri.

Pomemben pogoj organskega topila je, da se sme le minimalno raztapljati v vodi in obratno, saj tako ostajajo fizikalne lastnosti topil relativno nespremenjene. Prav tako se ne sme spremeni volumnsko razmerje topil binarnega sistema organsko topilo-voda. V primeru ekstrakcije vodne suspenzije tkivnega homogenata je optimalno, da ima organsko topilo nižjo gostoto od vode in posledično nastopa kot zgornja faza, saj bi v nasprotnem primeru tkivo lahko sedimentiralo v spodnji fazi organskega topila. Topilo naj ima nizko viskoznost, saj bi visoka viskoznost pri mehanskem stresanju povečevala verjetnost nastanka emulzije. Nastanek emulzije pri mehanskem stresanju tudi sicer ni izjema. Temu se lahko deloma izognemu z dodatkom trdnega NaOH in manjšo močjo stresanja [116]. Pomembno je tudi, da je topilo nereaktivno z analitom in komponentami matriksa, da je kompatibilno z drugimi topili v mešanicah organskih topil, da je kemijsko stabilno in atmosfersko inertno ter netoksično in prijazno do okolja. Dodatna zaželjena lastnost je nizko vrelische organskega topila, saj se praviloma frakcije ekstraktov z organskim topilom po ekstrakciji združijo in izparijo (evaporacija).

1.4.6 Dekonjugacija konjugatov steroidnih hormonov

Molekule steroidnih hormonov imajo omejeno število reaktivnih funkcionalnih skupin. Te molekule se v telesu deloma, če ne v celoti deaktivirajo z maskiranjem teh funkcionalnih skupin s konjugacijo. Ker so analizne metode za določanje steroidnih hormonov zasnovane večinoma na osnovi (re)aktivnosti prostih funkcionalnih skupin, je potrebno predanalitsko konjugirane steroidne hormone dekonjugirati. Dodatna lastnost konjugiranih steroidnih hormonov pa je njihova spremenjena topnost. Tako so sulfatni in glukuronidni ter v novejšem času tudi acetatni estri (anabolni steroidi) steroidnih hormonov zaradi visoke polarnosti molekule zelo topni v vodnem mediju. Nepolarni konjugati z acilnimi estri (maščobne kisline), pa nasprotno skoraj netopni v vodnem mediju.

Za dekonjugacijo obstajajo različne metode. V osnovnem načelu in zgodovinsko

najstarejše so ne-encimske, kemiske metode. Tako so sprva konjugate razcepljali po klasičnem načinu s kislo hidrolizo pri visokih temperaturah. Slednje metode so se izkazale za zelo destruktivne, saj namreč prispevajo k nastanku nezaželenih (razgradnih) produktov. Ti lahko predstavljajo interference pri analizi in tako kvantitativno vplivajo na rezultat [88]. Za nekoliko manj agresivne so se izkazale metode dekonjugacije s solvolizo. V nasprotju s hidrolizo, kjer reaktivno molekulo (nukleofil) predstavljata proton ali hidroksidni ion disociacije vode, je tukaj nukleofil molekula aktiviranega organskega topila. Lieberman in Burstein ter sodelavci [81, 82] uporabijo metode solvolize sulfatnih in glukuronidnih konjugatov v tetrahidrofuranu ali etilacetatu v prisotnosti katalizatorjev, kot sta H_2SO_4 (pri pH 1) [116] in $NaCl$ [83], Na_2SO_4 [85] ali $HClO_4$ [86, 88].

Za dekonjugacijo acetatov in lipoidnih derivatov (estri maščobnih kislin) se uporablja predvsem dolgotrajna alkalna hidroliza (saponifikacija) [77] ali časovno krajsa in učinkovitejša solvoliza v metanolu ali etanolu ob prisotnosti katalizatorjev, kot sta KOH , $NaOH$ ali Na -metoksid [77, 84, 89].

Steroidne konjugate pa je možno hidrolizirati tudi s pomočjo encimov [73, 77, 83, 118]. Ti encimi so najpogosteje izolirani iz mehkužcev, predvsem iz velikega vrtnega polža (*Helix pomatia*), nekoliko manj iz rodu *Ampullaria* ter iz školjk rodu *Pattella* (*P.vulgata*) in *Haliotis*. Razširjeni pa so tudi encimi, izolirani iz ekstrakta kravjih jeter (ketodaza: β -glukuronidaza) ter danes, najpogosteje iz bakterij rodu *Escherichia coli*. Vsi ti encimi imajo glukuronidazno aktivnost, vendar se med seboj razlikujejo po hidrolitski aktivnosti in specifičnosti. Poleg glukuronidazne aktivnosti pa encimi mehkužcev izražajo še sulfatazno aktivnost. Na splošno metode encimsko kataliziranih dekonjugacij poleg specifičnosti odlikujeta tudi visok izkoristek in krajsi čas dekonjugacije [118].

1.5 Analiza steroidnih hormonov

Za analizo steroidnih hormonov in njihovih metabolnih produktov iz bioloških vzorcev obstaja veliko različnih metod. Zaradi zelo nizke merjene koncentracije je prvi pogoj analiznih metod visoka občutljivost. Drugi pogoj je visoka specifičnost: ker so steroidni hormoni v bioloških vzorcih lahko prisotni v različnih oblikah in bodisi v konjugirani ali nekonjugirani obliki, ter ker so biološki vzorci izredno heterogen material in kot tak vir ko-izoliranih kontaminantov. Analizne metode, ki se pogosto uporabljajo, so predvsem tekočinska in plinska kromatografija visoke ločljivosti, z detekcijskim sistemom masne spektroskopije ali danes nekoliko manj uporabljeni UV-VIS, IR ali Raman spektroskopske metode. Pri kromatografskih metodah je potrebno iz vzorca izoliran analit velikokrat kemično spremeniti s postopki derivatizacije. V klinični kemiji se za rutinsko analizo steroidnih hormonov najpogosteje uporabljajo metode na osnovi imunokemijskih reakcij. Slednje imunokemijske metode odlikujejo visoka točnost, natančnost in specifičnost, zelo nizka meja detekcije, relativno kratki čas analize ter enostavnost v izvajanju analize. V izvedbah so metode, ki so ročne, delno ali v celoti avtomatizirane. Klasični biološki materiali v analizi steroidnih so krvna plazma ali serum, urin ter slina. Metode določanja steroidnih hormonov iz teh materialov so zasnovane tako, da je večinoma brez predhodne izolacije, možno določen steroidni hormon kvantitativno določiti direktno v vzorcu. Tovarniško so pripravljeni in dostopni reagenčni kitovi večinoma za rutinsko analizo posameznih hormonov (progesteron, androstendion, estradiol, estriol, testosteron, dihidrotestosteron, dehidroepiandrosteron sulfat, kortizol, itd.). Reagenčni kit lahko vsebujejo tudi snovi, ki pospešujejo disociacijo plazmskih proteinskih kompleksov in steroidnih hormonov [125]. Biološka materiala kot sta tkivo in feses pa pred analizo zahtevata še stopnjo kvantitativne izolacije steroidnih hormonov iz teh materialov.

1.5.1 Princip imunokemijskih analiznih metod

Imunokemijski testi so zasnovani na osnovi kvantitativne in primarne asociativne reakcije epitopa liganda (antigena ali haptena) s specifičnim paratopom protitelesom z nastankom kompleksa ligand-protitelo [119]. Testi se lahko delijo glede na ločitev nastalega kompleksa pred meritvijo; homogeni testi ne potrebujejo faze ločevanja, medtem ko jo pogosteje uporabljeni heterogeni testi potrebujejo. V novejših izvedbah testov se ločevanje omogoča z uporabo konjugiranih protiteles na nosilcih, kot so polistirenske ali supramagnetne kroglice. Teste nadalje lahko delimo na kompetitivne in nekompetitivne teste [119]. Pri nekompetitivnih testih analit (x) v prvi stopnji reagira s primarnim protitelesom (ab_1) v kompleks antigen-protitelo ($x-ab_1$). Če je v prvi stopnji nastal kompleks $x-ab_1$, poteče v drugi stopnji asociativna reakcija med primarnim protitelesom kompleksa in sekundarnim označenim protitelesom (ab_2^*). Nastane količina označenega kompleksa $[ag-ab_1]ab_2^*$ sorazmerna s koncentracijo analita x . Pri pogostejšem principu kompetitivnih testov med sabo tekmujeta neoznačen analit (x) iz vzorca in označen analit (x^*) za omejeno količino primarnih protiteles. Ker po reakciji nastaneta različna deleža kompleksov $ab-x$ in $ab-x^*$, je nastala količina označenega kompleksa obratnosorazmerna koncentraciji analita x iz vzorca. Uporabljeni imunski testi (IA; immunoassay) se med seboj razlikujejo predvsem v načinu detekcije majhne količine analita. Tako sta aktivacija in detekcija signala označenih kompleksov odvisni od tipa označene molekule liganda oziroma protitelesa. Pri kompleksih s sekundarnimi protitelesi, označenimi z encimom (EIA; enzyme immunoassay), je signal sprememb absorbance kromogenega substrata zaradi katalitične aktivnosti encima na molekuli substrata. Pri kompleksih, kjer je analit označen z radioaktivnim izotopom, npr. z ^{125}I ali ^3H (RIA; radioimmunoassay), je signal emitirano radioaktivno sevanje. Zelo visoko analitično občutljivost imajo metode, ki uporabljajo sekundarna protiteesa ali ligande označene z luminofori (LIA; luminescent immunoassay) oziroma fluorofori, kjer je signal emitirana svetloba. Luminofori se lahko aktivirajo s kemijsko reakcijo (CLIA; chemiluminescence immunoassay, DELFIA; dissociation-enhanced lanthanide fluoroimmunoassay), s spremembou napetosti (ECLIA; electrochemiluminescence immunoassay), ali z ekscitacijsko valovno dolžino (fotoluminescenco) [112a, 115b, 119].

1.5.2 Koncentracije steroidnih hormonov v endometriju

Referenčna območja koncentracij steroidnih hormonov so v krvnem serumu, z razliko od tkiv, dobro definirana. V tkivih so koncentracije steroidnih hormonov relativno variabilne in nizke, v območju femto- do pikomolarne, ki se navadno izraža na maso vlažnega ali suhega tkiva (fmol/g, pmol/g) ali na maso proteinov. Prav tako določanje koncentracij steroidnih hormonov v tkivih, še nima rutinskega diagnostičnega pomena, temveč se izvaja večinoma v okviru znanstvenih študij.

Preglednica 3. Koncentracije steroidnih hormonov (*pmol/g* tkiva) v endometriju.

steroidni hormon	stanje endometrija:		
	normalno	atrofija	malignost
E1	2.74 ^a	1.00 ^b	
E2	5.12 ^a , 0.314 ^c	1.53 ^b	0.498 ^c
A4diol	22.8 ^a		
dHeA	304 ^a , 269 ^d		81.3 ^d
dHeAS	469 ^d		499 ^d

Povzeto in preračunano po referencah: Za ekstrakcijo ^a [71] in ^b [121] je uporabljena metoda ekstrakcije po van Landeghemu in sod. [70], za ekstrakcijo ^c [81] je uporabljena metoda po Boluferju in sod. [74], ^d [122] v vodni fazi po ekstrakciji z zmesjo heksan-dietileter (4:1).

2 *Namen dela in načrt za delo*

V Laboratoriju za analitiko hormonov in tumorskih markerjev Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo (KIKKB)-UKC Ljubljana smo se znašli v situaciji, kjer bo potrebno določiti koncentracije estradiola in progesterona v endometriju. Ker laboratorij večinoma operira z analizami steroidnih hormonov iz plazme, urina in sline, bo tkivo endometrija poseben izziv, saj bo potrebno steroidne hormone predhodno kvantitativno izolirati. Za izolacijo iz endometrija bomo izbrali uveljavljen postopek ekstrakcije tekoče-tekoče z dietiletrom po Boluferju in sod [74]. Zaradi obsežne literature na tem področju in številnih možnih metod izolacije steroidnih hormonov z ekstrakcijo tkiv, se tudi pojavi vprašanje o izkoristku uporabljene metode izolacije. V želji, da bi podali odgovor na to problematiko, bomo prirejeno metodo, modificirano po Boluferju in sod. [74] primerjali z metodo ekstrakcije po van Landeghemu in sod. [70], saj sta ti dve metodi kritizirani kot nasprotujoči [70] oziroma enakovredni [71]. Za primerjave ekstrakcij bomo uporabili tudi različne kombinacije zmesi alternativnih organskih topil.

Tako bo namen diplomske naloge določiti optimalne pogoje ekstrakcije steroidnih hormonov, iz humanega tkiva z morebitno modifikacijo vrste organskih topil za ekstrakcijo. Pri tem se bomo omejili na analizo progesterona, androstendiona ter estradiola iz ekstraktov, saj so si relativno podobni po konstanti porazdeljevanja med vodno fazo in fazo organskega topila. V nekaterih ekstraktih s polarnejšimi zmesmi topil bomo izvedli tudi analizo dehidroepiandrosteron sulfata s katerim bomo žeeli ocenili izkoristek ekstrakcije konjugiranih steroidnih hormonov.

Preveriti in optimizirati bi žeeli naslednje pogoje:

1. vpliv raztopine pufra pri suspendiranju tkivnega homogenata;
2. vpliv posameznih organskih topil ali zmesi topil glede na izkoristek ekstrakcije steroidnih hormonov iz tkiv;
3. izkoristek ekstrakcije po uporabi denaturantov;
4. potreben čas in število stopenj ekstrakcij za kvantitativno ekstrakcijo steroidnih hormonov iz tkiv.

Cilj vseh ugotovitev bo, imeti v laboratoriju lastne dobro opredeljene pogoje ekstrakcije, s katerimi bi izolacija steroidnih hormonov iz tkiva imela največji izkoristek. Prav tako bo cilj pripravljenost laboratorija ob morebitni ponovitvi situacije, pri kateri bi bilo potrebno izolirati steroidne hormone iz podobnega tkiva.

3 Materiali in metode

3.1 Materiali

3.1.1 Biološki material

Biološki material za študijo ekstrakcij je tkivo endometrija, ki so nam odstopili, kot del lastne študije na Inštitutu za biokemijo (IBK) Medicinske fakultete v Ljubljani ter hranili na -20 °C:

netumorsko (normalno) tkivo, smo alikvotirali na 18 vzorcev (oznaka tkiva NE00), tumorsko tkivo, 4 vzorci (oznaka tkiva TE05, TE14).

Za posamično testiranje vplivov smo ekstrakcije izvedli v paralelkah (oznaka a, b).

Opomba: vrste materiala (endometrij) nismo sami ciljno izbirali.

3.1.2 Reagenti in topila

Za ekstrakcije smo uporabili kemikalije naslednjih čistoč in proizvajalcev:

Aceton, $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ (min 99.7 %), za kromatografijo; Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija

Acetonitril, CH_3CN , (min 99.8 %), za analizo ostanka; Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija

n-Heksan, C_6H_{14} (min. 95 %), za analizo ostanka; Fluka Chemie, Buchs, Švica

Etanol, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ absolutni (min. 99.8 vol %); Riedel-de Häen AG, Nemčija

Dietileter, $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$ (min. 99.5 %); Sigma-Aldrich, St. Louis, MO

Etil acetat, $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ (min. 99 %); Kemika Zagreb, Hrvaška

Klorovodikova kislina, HCl kadeča (min. 37.0 %); Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija

Ocetna kislina, $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ (min. 99.9 %); Carlo Erba Reagenti, Italija
Sečnina, $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ (min. 99.5 %); E. Merck, Darmstadt, Nemčija
Natrijev acetat, $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$ brezvodni (min. 99 %); Riedel-de Häen AG, Nemčija
Natrijev dihidrogenfosfat, NaH_2PO_4 brezvodni; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Natrijev hidrogenfosfat, Na_2HPO_4 brezvodni (min. 99 %); Carlo Erba Reagenti, Italija
Natrijev hidroksid, NaOH (min 85 %); Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Redestilirana voda pH 5.0-7.0, za injekcije, sterilno; Klinični center, Ljubljana, Slovenija (oznaka Aq).

3.1.3 Topila za ekstrakcijo

Kot osnovno topilo smo uporabili čisti dietileter. Za ostala testiranja pa smo pripravili zmesi organskih topil za ekstrakcijo z volumskim razmerjem 1/1 (v oklepaju so navedene uporabljeni oznake topil):

1. zmesi nepolarnih in dipolarnih aprotičnih topil:

dietileter/aceton ($\text{Et}_2\text{O}:\text{Me}_2\text{CO}$ (1/1))
dietileter/acetonitril ($\text{Et}_2\text{O}:\text{MeCN}$ (1/1))
etilacetat/aceton ($\text{EtOAc}:\text{Me}_2\text{CO}$ (1/1))

2. zmesi polarnih protičnih in dipolarnih aprotičnih topil:

etanol/aceton ($\text{EtOH}:\text{Me}_2\text{CO}$ (1/1))
etanol/acetonitril ($\text{EtOH}:\text{MeCN}$ (1/1))

3. zmes polarnega protičnega in nepolarnega topila:

etanol/etilacetat ($\text{EtOH}:\text{EtOAc}$ (1/1))

3.1.4 Raztopine pufrov in reagentov

Za suspendiranje tkivnega homogenata in rekonstitucijo suhega ekstrakta smo pripravili naslednje vodno raztopine pufrov:

0.1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfatni pufer s pH 7.4 (oznaka PB1) smo pripravili po protokolu Calbiochem Buffers [120]. Pufer smo natančno naravnali na vrednost pH 7.40 z raztopino HCl ali NaOH s pomočjo pH metra.

0.5 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfatni pufer s pH 7.4 (oznaka PB5) smo pripravili po protokolu [112b]. Pufer smo natančno naravnali na vrednost pH 7.40 z raztopino HCl ali NaOH s pomočjo pH metra.

0.1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ acetatni pufer s pH 5.2 (oznaka AB) smo pripravili po protokolu [112b]. Pufer smo natančno naravnali na vrednost pH 5.20 z raztopino HCl ali NaOH s pomočjo pH metra.

Za denaturacijo tkivne suspenzije smo pripravili 8.0 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ vodno raztopino uree.

3.1.5 Aparature

Stresalnik Vortex Genie 1 Touch Mixer, stresalnik Schütler SP2, centrifuga Tehnica Neofuge, analitska tehnicka Mettler B6, zamrzovalnik HLT in pH meter.

3.1.6 Laboratorijska oprema

Steklene epruvete 5 ml z zamaškom na obrus NS 10/19, Pasteurjeve pipete, steklene kroglice premera 3 mm, 1000 μl batna pipeta Eppendorf (tip A), 100 μl steklena batna pipete SMI (tip D1) ter standardna laboratorijska oprema.

3.2 Metode

Vse postopke, razen homogenizacije smo izvedli pri sobni temperaturi.

Homogenizacijo tkiva smo izvedli na Inštitutu za biokemijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Nadaljne delo je potekalo v Laboratoriju za analitiko hormonov in tumorskih markerjev Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemija (KIKKB)-UKC Ljubljana.

Analiza steroidnih hormonov se je izvajala na dveh lokacijah: Na Kliniki za nuklearno medicino Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani so bile izvedene analize progesterona in druge serije estradiola. Analize dHeAS, A4dion ter analize prve serije estradiola smo izvedli v Laboratoriju za analitiko hormonov in tumorskih markerjev KIKKB.

3.2.1 Homogenizacija tkiva

1. Netumorske vzorce tkiva (NE00) smo združili in mehansko s pestilom v terilnici homogenizirali v tekočem dušiku. Homogenizirane vzorce smo alikvotirali po približno 100 mg v naprej stehtane mikro-epruvetke. Alikvote vzorcev smo do preiskave hranili v zamrzovalniku pri -20 °C.
2. Tumorske vzorce tkiv (TE05, TE14), ki so bili že vnaprej homogenizirani, smo hranili do preiskave v zamrzovalniku na -20 °C.

3.2.2 Suspenzija tkiva v vodnem mediju

1. Posamezne alikvote vzorcev (NE00) smo kvantitativno prenesli v 5 ml steklene epruvete s 5-kratnim suspendiranjem tkiva v 100.0 μl vodnega medija, s pomočjo 1000 μl batne pipete in nastavki z razširjenimi odprtinami na konicah.

Od tega smo za suspendiranje po dveh alikvotov uporabili redestilirano vodo (pH 5.0-7.0) in 0.1 M acetatni pufer (pH 5.2) (Preglednica 6). V ostalih primerih smo za

suspendiranje tkiva uporabili 0.1 M fosfatni pufer (pH 7.4) (Preglednica 5). Za boljše suspendiranje tkiva med ekstrakcijo smo dodali v vsak alikvot tri steklene kroglice.

2. Posamezne homogenate vzorcev (TE05, TE14) smo alikvotirali na 50 mg natančno direktno v 5 ml steklene epruvete za ekstrakcijo, s pomočjo steklene batne mikropipete na pozitivni odmik. Od tega smo alikvote tkiva pred ekstrakcijo suspendirali ali v $500.0 \mu l$ 0.5 M fosfatnega pufra (pH 7.4) ali pa smo jih pustili nesuspendirane (Preglednica 4).

3.2.3 Ekstrakcija tkiva

Ekstrakcijo tkiva z organskimi topili in zmesmi organskih topil smo izvedli po sledečih shemah: Shema A (Preglednica 4), shema B (Preglednica 5) in shema C (Preglednica 6). Ekstrahirali smo različno dolgo, na dveh različnih mešalnikih (Vortex, Schütler). Med posameznimi ekstrakcijami smo ločili faze homogenata tkiva oziroma njegove vodne suspenzije od ekstrakta z organskim topilom, z centrifugiranjem 5 minut pri 3000 obratih/min oziroma 10 minut pri 3000 obratih/min pri ekstrakcijah z organskimi topili z zmesjo etanola (Preglednica 5, shema ekstrakcij B). Po centrifugiranju smo alikvote zamrznili za 30 minut in ločili fazi z dekantiranjem v novo zbirno stekleno epruveto. Združena organska topila ekstraktov posameznega alikvota smo po končanih ekstrakcijah izparili do suhega pod tokom inertnega dušika. Suhe alikvote vzorcev smo do analize hranili v zamrzovalniku pri $-20^{\circ}C$. Pred analizo smo alikvote suhih ekstraktov rekonstituirali v fosfatnem pufru. V primeru, da smo v ekstraktu analizirali dva steroidna hormona (Preglednica 4; progesteron in estradiol), smo alikvote rekonstituirali v $500 \mu l$ fosfatnega pufra ter v primeru, da smo v ekstraktu analizirali štiri steroidne hormone (Preglednici 5 in 6; progesteron, androstendion, estradiol ter dehidroepiandrosteron sulfat) pa v $1000 \mu l$ fosfatnega pufra.

Preglednica 4. Shema ekstrakcij A.

vzorec	alikvot	suspenzija PB (pH 7.4, 0.5 M)	ekstrakcija suspenzije Et ₂ O 2ml (schütler 20 min.)	rekonstitucija suhega ekstrakta PB (pH 7.4, 0.5 M)
TE05	a	500 μ l	2x	500 μ l
	b		2x	500 μ l
TE14	a	500 μ l	2x	500 μ l
	b		3x	500 μ l

PB; fosfatni pufer

Preglednica 5. Shema ekstrakcij B.

vzorec	alikvot	suspenzija	ekstrakcija	ekstrakcija	rekonstitucija
			suspenzije	suhega ekstrakta	suhega ekstrakta
N00	4a	PB (pH 7.4, 0.1M)	MeCN:Et ₂ O (1/1)		1000 μ l
			2ml		
	4b	PB (pH 7.4, 0.1M)	MeCN:Et ₂ O (1/1)		1000 μ l
			2ml		
	5a	PB (pH 7.4, 0.1M)	Me ₂ CO:Et ₂ O (1/1)		1000 μ l
			2ml		
	5b	PB (pH 7.4, 0.1M)	Me ₂ CO:Et ₂ O (1/1)		1000 μ l
			2ml		
	6a	PB (pH 7.4, 0.1M)	EtOAc:EtOH (1/1)	Et ₂ O 2ml	1000 μ l
			2ml		
	6b	PB (pH 7.4, 0.1M)	EtOAc:EtOH (1/1)	Et ₂ O 2ml	1000 μ l
			2ml		
	7a	PB (pH 7.4, 0.1M)	Me ₂ CO:EtOH (1:1)	Et ₂ O 2ml	1000 μ l
			2ml		
	7b	PB (pH 7.4, 0.1M)	Me ₂ CO:EtOH (1/1)	Et ₂ O 2ml	1000 μ l
			2ml		
	8a	PB (pH 7.4, 0.1M)	MeCN:EtOH (1/1)	Et ₂ O 2ml	1000 μ l
			2ml		
	8b	PB (pH 7.4, 0.1M)	MeCN:EtOH (1/1)	Et ₂ O 2ml	1000 μ l
			2ml		

PB; fosfatni pufer

Preglednica 6. Shema ekstrakcij C.

vzorec	alikvot	suspenzija	ekstrakcija	rekonstitucija	ekstrakcija	vodna	ekstrakcija	rekonstitucija
			suspenzije	suhega ekstrakta	suspenzije	suspenzija	suspenzije	suhega ekstrakta
		500 μ l (5x100 μ l)	3x (vortex 1 min.)	PB (pH 7.4, 0.1M)	3x (čiščenje) (schütler 10)	(denaturacija)	3x (shutler 10 min.)	PB (pH 7.4, 0.1M)
N00	1a	dAq	Et ₂ O 2ml	500 μ l	Et ₂ O 2ml	HCl 37%	Et ₂ O 2ml	1000 μ l
	1b	dAq	Et ₂ O 2ml	500 μ l	Et ₂ O 2ml	HCl 37%	Et ₂ O 2ml	1000 μ l
	2a	PB (pH 7.4, 0.1M)	Et ₂ O 2ml	500 μ l	Et ₂ O 2ml	urea 8M	Et ₂ O 2ml	1000 μ l
	2b	PB (pH 7.4, 0.1M)	Et ₂ O 2ml	500 μ l	Et ₂ O 2ml	urea 8M	Et ₂ O 2ml	1000 μ l
	3a	AB (pH 5.2, 0.1M)	Hx 2ml	500 μ l	Et ₂ O 2ml		Me ₂ CO:EtOAc 2ml	1000 μ l
	3b	AB (pH 5.2, 0.1M)	Hx 2ml	500 μ l	Et ₂ O 2ml		Me ₂ CO:EtOAc 2ml	1000 μ l

PB; fosfatni pufer, PB; acetani pufer, Aq; čista voda.

3.2.4 Analiza ekstrakta: Analiza steroidnih hormonov

Dehidroepiandrostron sulfat (dHeAS)

Koncentracijo dehidroepiandrosten sulfata smo določili s kompetitivno kemiluminiscenčno imunometrično metoda IMMULTE® (DHEAS-SO₄) proizvajalca SIEMENS. Za izvedbo postopka smo uporabili aparaturo IMMULITE® 1000 proizvajalca Siemens Medical Solutions Diagnostics.

Meja detekcije 3 µg/ml (0.08 µmol/l), merilno območje 15-1000 µg/ml (0.41-27 µmol/l), natančnost metode CV(%) ≤ 9.5 [123].

Androstendion (A4dion)

Koncentracijo androstenediona smo določili s kompetitivno radioimunološko metodo ACTIVE® Androstenedione RIA, proizvajalca BECKMAN COULTER Diagnostic System Laboratories. Za izvedbo postopka smo uporabili aparaturo Automatic Gamma Counter Wallac Wizard 1470.

Meja detekcije 0.03 ng/ml (0.1 nmol/l), merilno območje 0.03-10.0 ng/ml (0.1-34.5 nmol/l), natančnost metode CV(%) ≤ 9.8 [124].

Estradiol (E2)

Koncentracijo estradiola smo v prvi seriji določili s kompetitivno kemiluminiscenčno imunometrično metodo proizvajalca LIAISON (LIAISON® Estradiol). Za izvedbo postopka smo uporabili aparaturo LIAISON proizvajalca Byk Sangtec.

Meja detekcije 12 pg/ml (44 pmol/l), merilno območje 12-1100 pg/ml (44-4038 pmol/l), natančnost metode CV(%) ≤ 14.7 [125].

V drugi seriji smo koncentracijo estradiola določili s kompetitivno kemiluminiscenčno imunometrično metodo IMMULITE® (LKE2) proizvajalca

SIEMENS. Za izvedbo postopka smo uporabili aparaturo IMMULITE® 2000 proizvajalca Siemens Medical Solutions Diagnostics.

Meja detekcije 20 pg/ml (73 pmol/l), merilno območje 20-2000 pg/ml (73-7340 pmol/l), natančnost metode CV(%) ≤ 7.7 [123].

Progesteron (P4)

Koncentracijo progesterona smo določili s kompetitivno kemiluminiscenčno imunometrično metodo IMMULITE® (LKPG) proizvajalca SIEMENS. Za izvedbo postopka smo uporabili aparaturo IMMULITE® 2000 proizvajalca Siemens Medical Solutions Diagnostics.

Meja detekcije 0.2 ng/ml (0.64 nmol/l), merilno območje 0.2-40 ng/ml (0.64-127 nmol/l), natančnost metode CV(%) ≤ 11.3 [123].

4 Rezultati

Dobljeni rezultati analiz ekstraktov tkivne suspenzije so predstavljeni v preglednicah (Preglednica 7, 8, 9 in 10) ter grafično (Graf 4, 5, 6 in 7) za lažjo vizualizacijo in analizo rezultatov. Molarne koncentracije so preračunane na množino steroidnega hormona v masi alikvota tkiva (enota pmol/g). V grafičnem prikazu rezultatov so uporabljene vrednosti rezultatov iz preglednic (odebeljen tisk), ki so ali individualne vrednosti alikvotov vzorca ali vrednosti aritmetičnih sredin alikvotov (v preglednici označeno kot povpr.).

Preglednica 7. Rezultati ekstrakcij po shemi ekstrakcij A.

vzorec	alikvot	masa tkiva (g)	koncentracija			
			P4		E2	
			nmol/l	pmol/g	nmol/l	pmol/g
TE5	a	0.050	2.109	21.19	3.378	33.78
	b	0.050	1.475	14.75	2.242	22.42
TE14	a	0.050			1.446	14.46
	b	0.050	0.867	8.67	1.128	11.28

Preglednica 8. Rezultati ekstrakcij po shemi ekstrakcij B.

vzorec	alikvot	masa tkiva (g)	koncentracija											
			P4			A4dion			E2			dHeAS	dHeAS	
			nmol/l	pmol/g	pmol/g povpr.	nmol/l	pmol/g	pmol/g povpr.	nmol/l	pmol/g	pmol/g povpr.	μmol/l	pmol/g	
N00	4a	0.0592	0.712	12.03		0.797	13.50		0.679	11.50		0.03	506	
					16.08			13.10			13.20			
	4b	0.0318	0.64	20.13		0.405	12.70		0.474	14.91		0.00	0	
	5a	0.1208	1.38	11.42		1.631	13.50		1.04	8.61				
					9.22			13.10			7.80			
	5b	0.0877	0.64	7.30		1.113	12.69		0.613	6.99				
	6a	0.1291	1.24	9.60		1.681	13.02		1.20	9.30		0.01	77	
					8.90			12.47						
	6b	0.0864	0.71	8.21		1.030	11.92		71.7	830		0.01	115	
	7a	0.1228	0.64			0.485	3.95		0.602	4.90		0.03	245	
					pmd			3.75			5.28			
	7b	0.1113	0.64			0.395	3.55		0.664	5.67		0.01	90	
	8a	0.0963	1.38	14.33		1.306	13.56		5.04	52.3		0.04	415	
	8b	0.0742	0.825	11.12		0.676	9.11		0.576	7.76		0.02	269	

Opomba: 1. Oznaka pmd pomeni pod mejo detekcije. 2. Visoki koncentraciji estradiola alikvotov 6b in 8a sta v primerjavi s koncentracijami ostalih vzorcev (4, 5, 6, 7 in 8) ter na osnovi kriterija koncentracije, ki presega 100 % najnižje vrednosti paralelnega vzorca, izključeni kot ubežnika; v nadaljnjih grafičnih primerjavah niso upoštevane povprečne vrednosti šestega in osmega alikota vzorca.

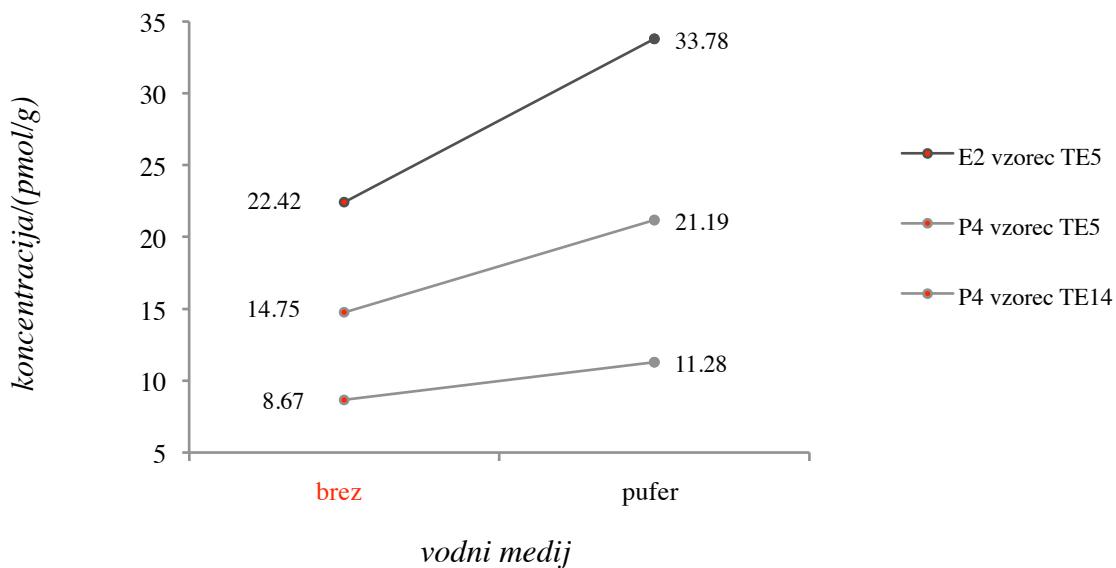
Preglednica 9. Rezultati ekstrakcij po shemi ekstrakcij C.

vzorec	alikvot	masa tkiva (g)	koncentracija											
			P4			E2			E2			dHeAS		
			nmol/l	pmol/g	pmol/l povpr.	nmol/l	pmol/g	pmol/g povpr.	nmol/l LIAISON	pmol/g	pmol/g povpr.	μmol/l	pmol/g	pmol/g
N00	1a	0.1044	1.40	13.40		1.02	9.77		2.8	13.4		0.04		383
					17.09			12.20			>16.4			
	1b	0.1033	2.09	20.23		1.51	14.62		>4.0	>19.4		0.02		193
	2a	0.0858	2.04	23.78		1.43	16.67		3.5	20.4				
					19.49			16.44			17.4			
	2b	0.1079	1.06	15.20		1.75	16.21		3.1	14.4				
	3a	0.1173	0.709	6.07		0.244	2.08		0.2	0.85		0.00		0
	3b	0.1216	0.64	5.26		0.26	2.14		0.1	0.41		0.00		0

Preglednica 10. Rezultati ekstrakcij po shemi ekstrakcij C (nadaljevanje preglednice 9).

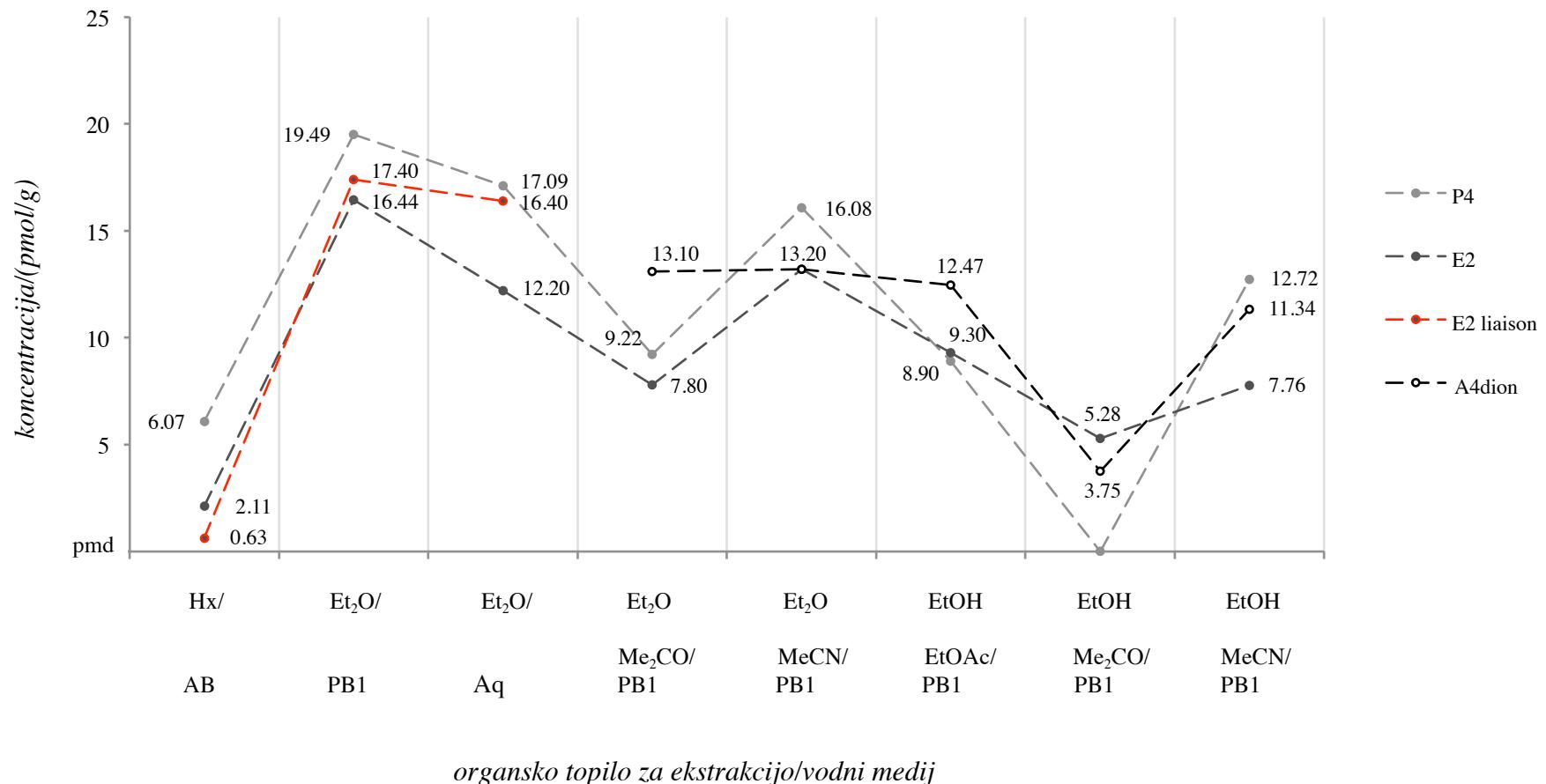
vzorec	alikvot	masa tkiva (g)	koncentracija																	
			P4			E2			P4			E2								
			nmol/l	pmol/g	nmol/l	pmol/g	pmol/g	nmol/l	pmol/g	nmol/l	pmol/g	nmol/l	pmol/g	pmol/g						
N00	1a	0.1044																		
	1b	0.1033																		
	2a	0.0858	0.64			0.613	7.14			0.64			0.407	4.74						
	2b	0.1079	0.64	pmd		0.554	5.13	6.14		0.64	pmd		4.30							
	3a	0.1173																		
	3b	0.1216																		
vzorec	alikvot	masa tkiva (g)	koncentracija																	
			P4	nmol/l	pmol/g	pmol/g	A4dion	nmol/l	pmol/g	E2	nmol/l	pmol/g	pmol/g	dHeAS						
				povpr.					povpr.					μ mol/l						
N00	1a	0.1044	1.06	10.2							1.01	9.67								
								21.26						17.03						
	1b	0.1033	3.34	32.33							2.25	24.39								
	2a	0.0858	0.64							0.488	5.69									
	2b	0.1079	0.64							0.518	4.80									
	3a	0.1173	0.64							0.569	4.85									
				pmd						0.0	0.547	4.50	4.68							
	3b	0.1216	0.64							0.0										

Opomba: 1. Oznaka pmd pomeni pod mejo detekcije. 2. Rezultat koncentracije A4diona alikvota 3a je v primerjavi s koncentracijami A4diona alikvotov 2a, 2b in 3b izključen kot ubežnik.



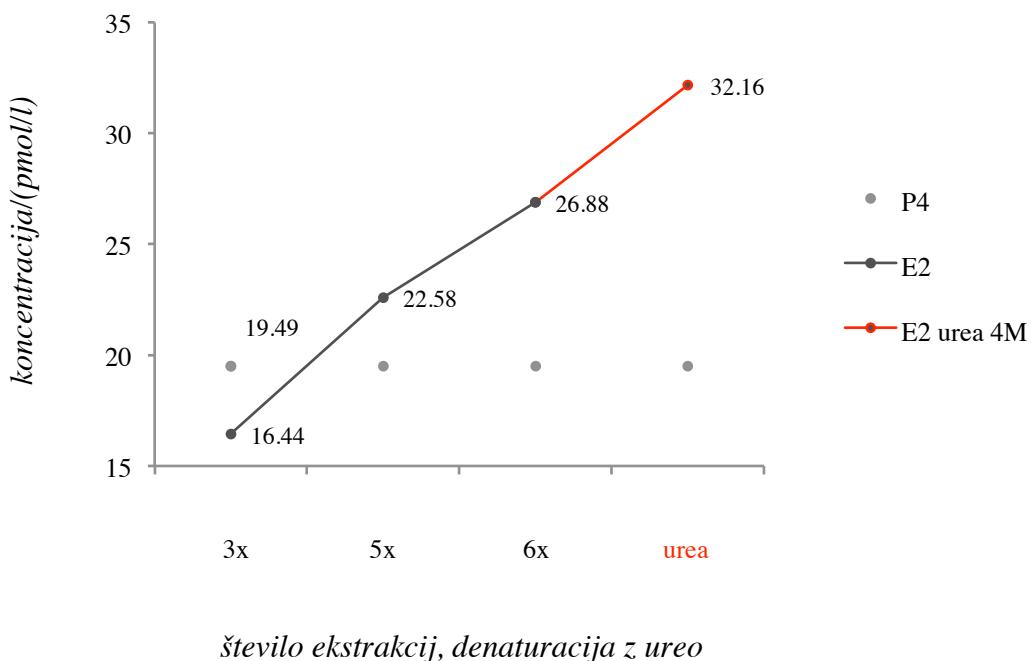
Graf 4. Grafični prikaz rezultatov ekstrakcij po shemi A. Vpliv vodnega medija.

Ekstrakcija tkivnega homogenata z dietiletrom v odsotnosti ali prisotnosti vodnega medija (fosfatni pufer). Podana je odvisnost 3-krat ekstrahirane koncentracije P4 in E2 v odsotnosti (rdeče) ali pristnosti vodne faze (fosfatni pufer (pH 7.4, 0.5 M)).



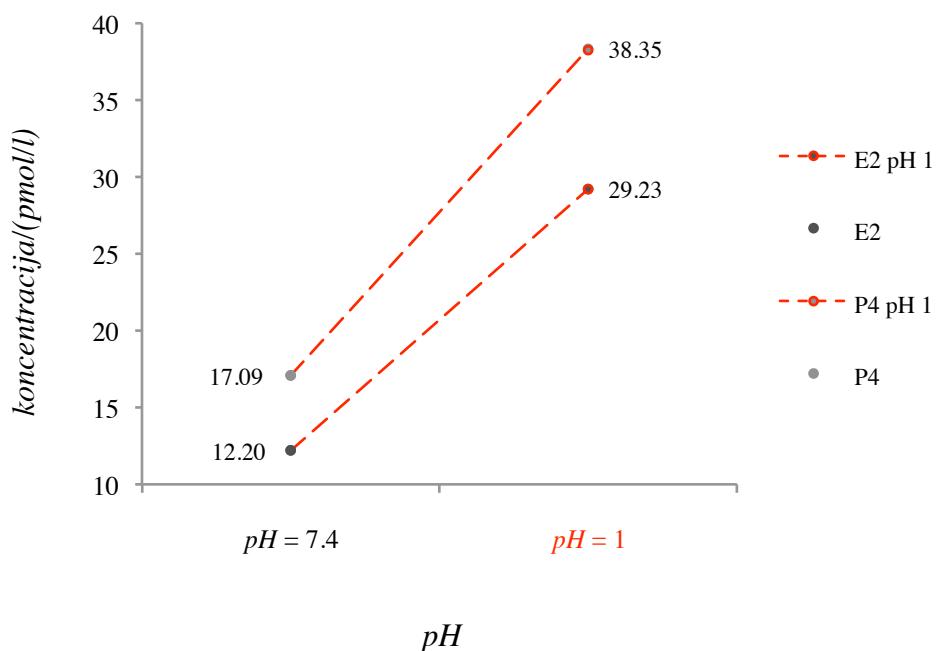
Graf 5. Grafični prikaz rezultatov ekstrakcij po shemi B in C. Vpliv posameznih organskih topil in vodnega medija.

Ekstrakcija tkivne suspenzije z različnimi organskimi topili. Koncentracije ekstrahiranih steroidnih hormonov (P4, E2, A4dion) v odvisnosti od vrste uporabljenega organskega topila oziroma zmesi toplil za ekstrakcijo ter vodne faze (AB; acetatni pufer (pH 5.4, 0.1M), PB1; fosfatni pufer (pH 7.4, 0.1 M), Aq; čista voda). Posamezne koncentracije steroidnih hormonov so povezane s črtkano črto zaradi lažjega spremeljanja razlik.



Graf 6. Grafični prikaz rezultatov po shemi C. Zaporedne ekstrakcije in vpliv denaturanta, urea.

Graf prikazuje povprečne kumulativne koncentracije po različnem številu združenih ekstraktov vodne tkivne suspenzije (fosfatni pufer) z dietiletrom (Preglednica 6, shema C, alikvota 2a in 2b). (Oznaka 3x predstavlja koncentracijo P4 in E2 po 3-kratni ekstrakciji alikvotov vzorca, 5x, po 5-kratni in 6x, po 6-kratni ekstrakciji alivotov vzorca). Urea (rdeče) označuje povišanje koncentracije E2 zaradi denaturativnega učinka uree.



Graf 7. Grafični prikaz rezultaov po shemi C. Vpliv denaturanta, ΔpH .

Graf prikazuje povišanje ekstrahirane koncentracije P4 in E2 pri spremebi pH . Ekstrakcija tkivnega homogenata 3-krat z dietiletrom (Preglednica 8, Preglednica 9, shema B, alikvota 1a, 1b).

5 Razprava

V odseku razprave bomo na osnovi rezultatov analiz ekstraktov po shemah ekstrakcij A, B in C (Preglednica 7, 8, 9 in 10 ter Graf 6, 5 in 7) poskusili odgovoriti na zastavljena vprašanja iz namena naloge.

Pri ekstrakcijah za oceno izkoristka ekstrakcije nismo uporabili nobenega standardnega materiala, saj z dragimi standardnimi materiali v laboratoriju ne razpolagamo. Neuporabo opravičujemo z mnenjem, da se dodan standardni material [75, 115b, 116] *in vitro* v postopku ekstrakcije ne bi identično porazdeljeval, kot endogeni steroidni hormoni tkiva. Slednji bi se od endogenih steroidnih hormonov razlikovali v deležu s tkivnimi makromolekulami vezane ter proste frakcije steroidnih hormonov. Da bi za dodane standarde dosegli podobnost v deležu s tkivnimi makromolekulami vezane ter proste frakcije steroidnih hormonov, kot je ta delež zastopan *in vivo*, bi bilo potrebno tkivne homogenate inkubirati s standardi steroidnih hormonov na 37 °C. Oceno izkoristkov ekstrakcij progesterona, androstendiona ter estradiola smo tako podali relativno s primerjavo koncentracij steroidnih hormonov posameznih ekstraktov glede na ekstrakt z najvišjimi koncentracijami. Slednja ekstrakcija je bila smatrana, da ima 100 % izkoristek. Iz teoretičnega dela je razvidno, da so odvisnosti moči interakcij skrajno nepolarnih steroidnih hormonov (progesteron > androstendion > estradiol) s proteini obratno sorazmerna z njihovo polarnostjo [31, 37], obratno sorazmerna s temperaturo vodnega okolja [40, 45] ter sorazmerna z nizko ionsko močjo raztopine kozmotropnega fosfatnega pufra [26]. Tako smo pričakovali, da pri sobni temperaturi v vodni suspenziji tkivnega homogenata progesteron, androstendion ter estradiol zelo močno asocirajo predvsem s proteini tkivnega homogenata. Možna, vendar ne tako pomembna, kot asociacija steroidnih hormonov s proteini pa je tudi asociacija z denaturirano DNA [13, 14]. Na osnovi teorije interakcij ter teorije ekstrakcij [104, 105] smo ekstrakcije izvajali zaporedno 3-

krat po 10 minut. V primeru ekstrakcije 3-krat po 1 minuto na vorteksu pa smo želeli podati morebitno razliko v času in načinu ekstrahiranja glede na intenzivnost mešanja. Tkivo endometrija ne vsebuje velikega deleža lipidov. Posledično temu nismo izvedli delipidacije tkiva [72, 73, 76], saj s strani lipidov nismo pričakovali težav pri ekstrakciji steroidnih hormonov ter kasnejših težav z interferencami teh pri analizi. Prav tako zaradi kaotropnega delovanja nepolarnih organskih topil na membrane nismo pričakovali zadrževanja steroidnih hormonov v membrani [19].

Po končanih ekstrakcijah smo znotraj istega vzorca, med posameznimi alikvoti opazili visoko variabilnost v analiziranih koncentracijah progesterona, androstendiona in estradiola. Ker je razmernostni trend določenih steroidnih hormonov med posameznimi alikvoti podoben, kaže da je lahko izvor variabilnosti rezultatov, kljub skrbnemu alikvotiranju in nadaljnjam postopkom, v sami heterogenosti in homogenizaciji tkivnega materiala. Znotraj paralelnih ekstrakcij vzorcev je variabilnost koncentracij steroidnih hormonov nižja od približno 70 %. V kolikor je bila variabilnost višja od 100 % najnižje koncentracije smo na osnovi primerjav z ostalimi ekstrakcijami določili ubežno koncentracijo ter jo izločili iz interpretacije rezultatov.

Na podlagi analize progesterona, androstendiona, estradiola ter dehidroepandrosteron sulfata iz tkivnih ekstraktov smo ugotovili:

1. Uporaba vodnega medija, v tem primeru fosfatni pufer s pH 7.4, ima za suspendiranje vzorca in porazdeljevanje steroidnih hormonov med ekstrakcijo z organskim topilom pomemben vpliv (Graf 4). Iz tkiva, ki ni bilo suspendirano v raztopini pufra, se pri 3-kratni ekstrakciji z dietiletrom ekstrahira 20 % do 30 % manj progesterona in estradiola. Ob enaki ekstrakciji z dietiletrom so ekstrahirane koncentracije suspendiranega tkiva v čisti vodi progesterona nižje za približno 10 % ter estradiola nižje za 25 %. Od ekstrahiranih koncentracij tkiva suspendiranega v raztopini pufra (Graf 5). Primerjava s koncentracijami estradiola znotraj istih vzorcev, ki so bile določene z drugo metodo (Preglednica 8, LIAISON), ne kaže na pomembne razlike med uporabo čiste vode ali fosfatnega pufra, kot medija za suspendiranje tkiva. Literatura navaja [37, 45, 52, 53a], da se z delnim znižanjem pH vodnega medija lahko zniža afiniteta interakcij steroidni hormonov s proteini. Posledično bi bil

delež izkoristka ekstrakcij steroidnih hormonov večji. V našem primeru, pri ekstrakciji tkivne suspenzije v acetatnem pufru s pH 5.4 s heksanom, ni prišlo do pričakovanega višjega izkoriska ekstrakcije. Ugotavljamo tudi, da se za suspendiranje tkiva pogosto uporablja pufer, enak pufru za rekonstitucijo suhega ekstrakta pred analizo [70, 71, 72, 84]. Tako sta največkrat za suspendiranje tkiva uporabljena Tris ali fosfatni pufer s pH 7.4 iz testnih reagentov (na to so nas napeljale specifične snovi v uporabljenih pufrih, kot so NaN_3 ter želatina).

Ugotovitev, da je za tekočinsko ekstrakcijo z večjim izkoristkom potrebna vodna faza, je nasprotuoča nekaterim metodam [99], pri katerih se ekstrakcija izvaja direktno s homogenizacijo tkiva v organskem topilu. Slednje je odvisno od vrste uporabljenega organskega topila oziroma zmesi topil. Če je namen direktne homogenizacije v organskem topilu zagotavljanje in vzdrževanje suspenzije tkiva ob vzporedni ekstrakciji steroidnih hormonov, smo to problematiko rešili z uporabo steklenih kroglic pred in med ekstrakcijo. V predhodnem testiranju se je namreč izkazalo, da dodatek nepolarnih organskih topil (dietileter, heksan) vodni suspenziji tkivnega homogenata namreč povzroči agregacijo tkiva. Posledično bi lahko bila ekstrakcija iz takšnega agregiranega tkiva slabša. V primerjavi agregacije tkiva z dietiletrom je agregacija tkiva zaradi bolj nepolarnega heksana močnejša. Posledično temu pa je bolj heterogena tudi nastala suspenzija tkiva. Tako si zaradi previsoke nepolarnosti heksana nizek izkoristek pri ekstrakciji progesterona in estradiola deloma razlagamo s slabšo ekstrakcijo iz slabo suspendiranih tkivnih agregatov.

Homogenizacija tkiva pred ekstrakcijo je najbolj učinkovita, če epruvete stresamo (Vortex) v takšnem položaju, da je največ strižnih sil, ki uspešno fragmentirajo tkivo. Nastalo homogenost tkiva pa preverjamo vizualno.

Ocene izkoristka ekstrakcij dehidroepiandrosteron-sulfata (dHeAS) z vodnim medijem ali nekaterimi polarnimi zmesmi topil nismo mogli podati, saj ima metoda določanja dHeAS više merilno območje (od 0.41 do 27 $\mu\text{mol/l}$), kot so koncentracije hormona v ekstraktih (Preglednica 3). Na podlagi tega ni mogoče podati ocene o primerni kombinaciji organskega topila ali zmesi topil za ekstrakcijo ter vodne faze, kjer ne bi prišlo do porazdeljevanja konjugiranih steroidnih hormonov v smer faze organskega topila. Slednja ekstrakcija bi namreč bila primerna za analizo

konjugiranih steroidnih hormonov iz vodne faze. Za rešitev te problematike bi bilo potrebno izbrati metodo določanja dHeAS z nižjim merilnim območjem.

2. Največji izkoristek ekstrakcije progesterona in estradiola iz tkivnega homogenata dobimo pri 3-kratni ekstrakciji s čistim dietileterom (Graf 5). V primerjavi s 3-kratno ekstrakcijo z dietiletrom je s 3-kratno ekstrakcijo s čistim heksanom možno ekstrahirati le 20 % progesterona in 10 % estradiola, kar lahko kaže na izrazito nepolarnost heksana in posledično porazdeljevanje steroidnih hormonov v smeri vodnega medija. Za ti dve topili predvidevamo, da je zaradi podobne polarnosti androstendiona s progesteronom tudi odstotek izkoristka ekstrakcije androstendiona podoben progesteronu.

Pri zmesih dietiletra z dipolarnim aprotičnim topilom je pri 3-kratni ekstrakciji v zmesi z acetonitrilom ($\text{Et}_2\text{O}:\text{MeCN}$) izkoristek ekstrakcije progesterona in estradiola v primerjavi s čistim dietiletrom nižji za približno 20 %. V zmesi z acetonom ($\text{Et}_2\text{O}:\text{Me}_2\text{CO}$) pa nižji za približno 50 %. Med tem dvojico zmesem topil je izkoristek ekstrakcije androstenediona nespremenjen.

Alternativno topilo dietiletru, etilacetat, ima v zmesi s protičnim etanolom podoben izkoristek ekstrakcije progesterona, estradiola in androstendiona, kot zmes etiletra z acetonom, vendar nižjo od čistega dietiletra.

Razmerje ekstrahirane količine estradiola (E2) in progesterona (P4), (E2/P4), je v večini ekstrakcij večje od 0.7. Z uporabo razmerja E2/P4 lahko interpretiramo selektivnost organskih topil oziroma zmesi topil pri ekstrahiranju deležev estradiola in progesterona. Pri ekstrakciji z zmesjo etanola in acetonitrila ($\text{EtOH}:\text{MeCN}$) je to razmerje malenkost nižje. Razmerje preide v vrednost ena pri ekstrakciji z zmesjo etanola in etilacetata ($\text{EtOH}:\text{EtOAc}$) vendar je to podobno ekstrakciji z zmesjo dietiletra in acetona ($\text{Et}_2\text{O}:\text{Me}_2\text{CO}$). Na osnovi te podobnosti v izkoristku ekstrakcij progesterona, estradiola in androstendiona lahko predvidevamo podobnosti v potencialu ekstrahiranja med dietiletrom in etilacetatom. Pri ekstrakciji z zmesjo etanola in acetona ($\text{EtOH}:\text{Me}_2\text{CO}$), pa razmerje ni definirano, saj je količina ekstrahiranega progesterona pod mejo detekcije. Slednje nakazuje na selektivnejše

topilo za ekstrakcijo androstendiona ter estradiola od progesterona. Predvidevamo, da bi ta zmes lahko bila uporabljena za selektivno ekstrakcijo bolj polarnih steroidnih hormonov, ki imajo $\log P$ nižji od 4 (Preglednica 1), od relativno nepolarnih steroidnih hormonov.

V predhodni denaturativni ekstrakciji (Graf 5) so uporabljene zmesi polarnega protičnega topila (etanol) in dipolarnih aprotičnih topil (acetonitril, aceton). Z uporabo denaturativne zmesi topil etanola in acetona [70] se količine ekstrahiranih steroidnih hormonov precej znižajo v primerjavi z ekstrakcijo s čistim dietiletrom, oziroma njegovimi zmesmi z dipolarnimi aprotičnimi topili. In sicer, progesteron za približno 100 %, estradiol in androstendion pa za približno 70 %. Bonney in sod. [71] navajajo, da je vzrok za nižje koncentracije lahko izguba zaradi dodatne vpeljane faze: sekundarna ekstrakcija primarnega suhega ekstrakta z dietiletrom.

Vendar, celotna primerjava nakazuje na negativen vpliv uporabe etanola na izkoristek ekstrakcij steroidnih hormonov iz tkiva v teh treh denaturativnih zmeseh. Iz nadaljne primerjave z zmesmi dietiletra z acetonom ali acetonitrilom, lahko negativen vpliv etanola dodatno potrdimo. Vzrok je najverjetneje v previsoki osnovni polarnosti in protičnosti zmesi topil ter nastali novi zmesi, saj se organska zmes meša z vodno fazo. Ker ima aceton podobno polarnost kot etanol (Preglednica 2), predvidevamo, da je posledično slabše porazdeljevanje steroidnih hormonov iz tkiva in v raztopino organske in vodne faze tudi zaradi višje protičnosti zmesi. To je razvidno tudi iz primerjave ekstrakcij z zmesjo etiletra in acetona ($\text{Et}_2\text{O}:\text{Me}_2\text{CO}$) ter etanola in etilacetata ($\text{EtOH}:\text{EtOAc}$). Če predpostavimo podobnost med dietiletrom in etilacetatom, so izkoristki ekstrahiranega progesterona, androstendiona ter estradiola v omenjenih zmeseh podobni. Slednje nam nakazuje podobnost lastnosti acetona in etanola pri ekstrakcijah. Dodatno nam to potrjuje ekstrakcija z zmesjo etanola in acetona ($\text{EtOH}:\text{Me}_2\text{CO}$), kjer je učinek na znižan izkoristek aditiven. Razlika zaradi večje polarnosti je očitna, saj je pri ekstrakciji z zmesjo etanola in močnejšega dipolarnega aprotičnega acetonitrila ($\text{EtOH}:\text{MeCN}$), izkoristek ekstrahiranega estradiola za več kot 50 % nižji od ekstrakcije s čistim dietiletrom ter podoben izkoristku z zmesjo etiletra in acetona ($\text{Et}_2\text{O}:\text{Me}_2\text{CO}$). Medtem pa so izkoristki progesterona in androstendiona pri ekstrakciji z zmesjo etanola in acetonitrila nižji za približno 30 % od izkoriska ekstrakcije s čistim dietiletrom. Iz omenjenjenih dejstev

je mogoče predvidevati, da polarni protični etanol v zmeseh z dipolarnim aprotičnim topilom (aceton ali acetonitril), nima ugodnega vpliva na ekstrakcijo steroidnih hormonov iz tkivne suspenzije. Slednje nasprotuje trditvam van Landeghema in sod. [70], da je za ekstrakcijo steroidnih hormonov iz tkivne suspenzije potrebno topilo z dobrimi denaturativnimi lastnostmi, kot je zmes etanola in acetona ter Bonneya in sod. [71], da sta si ti dve topili (zmes etanola in acetona ter dietileter) podobni po denaturativnih lastnostih. Ugotavljamo tudi, da je z metodo van Landeghema in sod. [70] težko podati stopnjo denaturacije proteinskih kompleksov s steroidnimi hormoni z zmesjo etanola in acetona, saj se ekstrahirana faza s to zmesjo vedno loči od tkivnega homogenata, izpari do suhega ter ponovno ekstrahira z dietiletrom. Ugotovitve si razlagamo z dejstvom, da porazdeljevanje steroidnih hormonov med tkivnim homogenatom in zmesjo etanola in acetona ni enako porazdeljevanju med vodno tkivno suspenzijo ter dietiletrom. V omenjenih metodah [70, 74] se tako izolira iz tkiva le količina ki se je porazdelila med tkivnim homogenatom in polarno zmesjo vode, etanola in acetona, kar je manjše, kot v primeru z ekstrakcijo vodne tkivne suspenzije z dietiletrom. V objavljenih rezultatih [71, 121] je slednje najverjetnejše tudi vzrok nizkih koncentracij steroidnih hormonov v tkivnih ekstraktih (Preglednica 3). V skladu s teorijo dominantnih nepolarnih interakcij steroidnih hormonov s proteini [31, 37, 47] je pričakovano, da je organsko topilo, ki uspešno denaturira proteine [61] ter disociira komplekse steroidnih hormonov, nepolarno in aprotično. Takšno topilo najverjetneje bolje solvatira steroidne hormone v veznih mestih proteina in tako znižuje njihovo afiniteto do veznih mest. Na osnovi rezultatov ugotavljamo, da ima uporaba dipolarnih aprotičnih topil (aceton, acetonitril) v zmeseh z nepolarnimi topili (dietileter, etilacetat) ali v zmeseh z polarnimi protičnimi topili (etanol) za denaturacijo kompleksov pri ekstrakciji, kot tudi na izkoristek ekstrakcije steroidnih hormonov neugoden vpliv. Predvidevamo tudi, da pri ekstrakciji steroidnih hormonov iz tkivne suspenzije dajo največji izkoristek nepolarna organska topila z relativno dielektrično konstanto $\epsilon_r > 4$ (Preglednica 2; dietileter, etilacetat).

Omeniti velja tudi, da so ekstrakcije z zmesmi topil, ki se mešajo z vodno fazo (zmesi z etanolom) časovno zamudne in praktično izredno težavne, predvsem v postopku izolacije topila od tkivnega homogenata.

Pri preverjanju vpliva dodatka denaturanta proteinskih kompleksov s steroidnimi hormoni za boljši izkoristek ekstrakcije, smo alikvote očistili proste frakcije steroidnih hormonov, tako da smo jih pred dodatkom denaturanta 3-krat ekstrahirali z dietiletrom (Preglednica 9, vzorec 2, F4+5, F6). Teoretično bi s prvimi tremi ekstrakcijami kvantitativno izolirali ves progesteron in estradiol iz vodnega medija. Ugotovili smo, da je koncentracija progesterona v združenih četrtem in petem (F4+5) ekstraktu ter v šestem (F6) ekstraktu pod mejo določitve analizne metode. Slednje nakazuje na kvantitativno izolacijo progesterona s prvimi tremi ekstrakcijami z dietiletrom. Nasprotno teoretičnemu pričakovanju, pa opazimo pri ekstrakciji estradiola in sicer, da četrti, peti in šesti ekstrakti še vsebujejo določeno koncentracijo estradiola. Rezultati kažejo, da je s četrto in peto ekstrakcijo izkoristek ekstrakcije še približno 40 % in s šesto 25 % v primerjavi s vrednostmi prve 3-kratne ekstrakcije z dietiletrom. Slednje vrednosti najverjetneje niso posledica solvolize ali hidrolize sulfatnih konjugatov estradiola, saj ni zadoščeno reakcijskim pogojem (nizek *pH*) solvolize ali hidrolize. Predvidevamo, da je izkoristek ekstrakcije estradiola z dietiletrom znižan zaradi počasne disociacije tkivnih makromolekularnih kompleksov z estradiolom. Za kvantitativno izolacijo estradiola bi najverjetneje morali podaljšati čas porazdeljevanja pri ekstrakciji ali povečati število stopenj ekstrakcij. Predvidevamo tudi, da bi z uporabo različnih ionskih denaturantov lahko izboljšali izkoristek ekstrakcij. Ureo bi lahko nadomestili s CaCl_2 zaradi relativne podobnosti v izražanju Hofmeisterjevega efekta na proteinsko strukturo [26] ali z gvanidinijevim tiocianatom zaradi še močnejšega izražanja Hofmeisterjevega efekta [56, 63, 64]. Na osnovi Setchenowega zakona, ionski denaturanti ne delujejo samo kaotropno na proteinsko strukturo in posledično na interakcije s steroidnimi hormoni, temveč znižujejo tudi samo topnost steroidnih hormonov v vodni fazi in posledično premikajo koncentracijsko ravnotežje v fazo z organskim topilom. Ionski reagenti lahko prav tako priponorejo k zmanjševanju morebitne nastale emulzije. Dodatno menimo, da z uporabo steklenih kroglic in posledično homogenizacijo med samo ekstrakcijo prispevamo k večji količini prostega estradiola in posledično višjemu izkorisku ekstrakcije. Pri tem dodatna površina steklenih krogljic najverjetneje ne predstavlja zmanjšanja izkoristka ekstrakcij zaradi adsorpcije steroidnih hormonov na osnovi podobnosti z Vromanovim efektom [100, 102], saj vsebuje tkivni vzorec visoko koncentracijo proteinov. V kolikor naše ugotovitve držijo so lahko v nasprotju z

metodo po Boluferju in sod. [74], ki navaja kvantitativno izolacijo steroidnih hormonov z 2-kratno ekstrakcijo tkivne suspenzije z dietiletrom.

3. Uporaba 4 molarne uree ne spremeni količine progesterona ekstrahiranega z dietiletrom, medtem ko se količina estradiola poviša za približno 30 % vrednosti 3-kratne ekstrakcije z dietiletrom (Graf 6). Če združimo vrednosti četrte in pete, šeste ter z ureo denaturativne ekstrakcije, je ekstrahirana količina estradiola kar 100 % višja kot v osnovni 3-kratni ekstrakciji z dietiletrom. Zanimivo je, da po 3-kratnem čiščenju tkivne suspenzije z dietiletrom, ekstrakcija zmesjo etilacetata in acetona da podoben izkoristek estradiola (ni grafično prikazan) kot ekstrakcija z dietiletrom po denaturaciji z ureo. Ali ima aceton v tem primeru ugoden vpliv na denaturacijo kompleksov in izolacijo estradiola, je zaenkrat težko odgovoriti. Za utemeljitev odgovorja bi bilo potrebno potek testiranja zastaviti drugače. Verjetno pa je, da imajo organska topila kot sta dietileter in etilacetat zaradi mehanizma denaturacije šibek denaturativen potencial na komplekse estradiola s tkivnimi proteini. Sproščanje estradiola iz kompleksov je namreč postopno, kar predvsem dokazujejo izkoristki četrte, pete in šeste ekstrakcije.

Poizkus z denaturacijo kompleksov pri $pH = 1$, prav tako kaže na pomembne spremembe (Graf 7). Pri $pH = 1$ se količina ekstrahiranega progesterona glede na količino ekstrahirano s čistim dietiletrom poveča povprečno za 75 do 125 % in estradiola povprečno za 75 do 140 %. Čeprav so ekstrahirane vrednosti estradiola primerljive z vsoto vrednosti četrtega, petega, šestega ter vrednosti po denaturaciji z ureo, predvidevamo, da so slednje razlike najverjetneje še večje, na račun dodatnih treh ekstrakcij uporabljenih za čiščenje tkivne suspenzije. Dodatno ekstrahirano količino estradiola, bi lahko pripisali morebitni solvolizi estradiola konjugiranega s sulfatom, kar pa ne razloži dodatno ekstrahiranega progesterona. Solvoliza v dietiletru je možna, vendar je časovno zelo dolgotrajna [82], kar delno zmanjšuje verjetnost dodatno ekstrahiranega estradiola zaradi solvolize. Najverjetneje pa je to delež estradiola, ki se ni ekstrahiral v prvi 3-kratni ekstrakciji z dietiletrom oziroma je nastal zaradi popolne denaturacije pri teh pogojih. Suspenzija, ki je nastala po dodatku HCl tkivnemu homogenatu, je bila zelo homogena, z dispergiranimi diskretnimi delci tkiva, kar nakazuje na popolno denaturacijo. Ker ne poznamo

koncentracije sulfatnega konjugata estradiola, je zaenkrat nemogoče opredeliti ali je dodatna količina ekstrahiranega estradiola resnično posledica solvolize ali le posledica dodatne homogenizacije med ekstrakcijo ali denaturacije tkivnih makromolekularnih, predvsem proteinskih kompleksov s steroidnimi hormoni.

4. Pri primerjavi ekstrakcij z dietiletrom smo ugotovili, da je ekstrahiranje tkivne suspenzije 3-krat po 1 minuto s stresanjem na Vorteksu pri srednji moči in z vmesnimi prekinittvami, enakovredno s 3-kratnim ekstrahiranjem po 10 minut s stresanjem na klasičnem linearinem stresalniku (Schütler). Uvedene vmesne prekinitve vorteksiranja se izkažejo za nujne, saj z njimi deloma preprečujemo nastanek emulzije. Menimo, da je 3-kratna ekstrakcija po 1 minuto, z enakim volumnom dietiletra kot vodnega medija učinkovita, saj koncentracije analize nadaljnih ekstraktov, ne kažejo več prisotnosti progesterona v ekstraktu (Preglednica 9, vzorec 2, F4+5, F6). Podobno je možno sklepati zaradi relativne ohranitve trenda razmerja estradiola in progesterona (E2/P4) med posameznimi ekstrakcijami z različnimi topili, vendar temu nasprotujejo rezultati dodatnih ekstrakcij za čiščenje, predvsem za E2. V tem primeru bi najverjetneje bilo potrebno podaljšati čas ekstrakcije ali predekstrakcijske homogenizacije.

Pri ekstrakcijah 1 dela vodne suspenzije tkiva ($500 \mu\text{l}$) smo za ekstrahiranje steroidnih hormonov uporabili 4 dele organskega topila oziroma zmesi topil (razmerje vodne faze proti fazi organskega topila: 1:5). Predvidevamo, da z uporabo manšega dela organskega topila oziroma zmesi topil povečamo verjetnost nastanka emulzije. Faze smo pri morebitni nastali emulziji, kot tudi sicer ločili z centrifugiranjem. Pri tem smo dobili čisto vodno fazo s tkivno usedlino in čisto fazo organskega topila. Faza z organskim topilom se da primerno ločiti s Pasteurjevo pipeto. Slednji način sicer povzroča nekoliko težav pri pipetiranju zelo hlapnega dietiletra, zato ga ne predlagamo. V tem primeru smo uporabili zanesljivejše ločevanje z zamrznitvijo vodne faze in dekantiranjem organske faze. Zamrzovanje na - 20 °C traja med 20 in 30 minut.

6 Sklep

Iz rezultatov eksperimentalnega testiranja različnih organskih topil in postopkov za ekstrakcijo steroidnih hormonov iz humanega tkiva ugotovimo:

1. Uporaba vodnega medija (raztopine pufra s pH med 6 in 8 ali čiste vode) ima pri ekstrakciji pomemben vpliv (doprinos do 30 %) na pogoje porazdeljevanja steroidnih hormonov med nastalo vodno suspenzijo tkiva in organskim topilom. Dodatno je vodni medij pomemben za kvantitativen prenos tkivnega homogenata.
2. Med topili ima čisti dietileter največji potencial pri izkoristku ekstrakcij steroidnih hormonov. Alternativno topilo dietiletru bi lahko bil čisti etilacetat. Vplivi posameznih polarnejših in protičnih organskih topil v zmesih niso pokazali izboljšanja, ne v denaturaciji oziroma disociaciji proteinskih kompleksov s steroidnimi hormonov kot tudi ne v izkorisku ekstrakcij steroidnih hormonov. Iz tega stališča ne vidimo razloga za modifikacijo osnovnega nepolarnega organskega topila (dietileter ali etilacetat) s polarnejšimi organskimi topili.
3. Denaturacija tkivnih proteinov z ureo ima približno 30 % doprinos v koncentraciji estradiola, medtem ko izkoristek progesterona ostaja pod mejo detekcije. V kolikor bi izključili povečan izkoristek progesterona in estradiola zaradi morebitne solvolize sulfatnih konjugatov ima denaturativni vodni medij pri $pH = 1$ pomemben, več kot 100 % doprinos pri ekstrakciji progesterona in estradiola z dietiletrom.
4. Za kvantitativno izolacijo progesterona iz suspenzije tkivnega homogenata je zadostna ekstrakcija s količino dietiletra, ki je enaka štirikratnemu volumnu vodnega medija, na klasičnem stresalniku 3-krat po 10 minut ali alternativno 3-krat po 1 minuto na Vorteksu. Vendar na osnovi ekstrahiranih količin estradiola pri četri, peti in šesti ekstrakciji, ki imajo več kot 70 % doprinos estradiola menimo, da bi bilo tkivo potrebno že v osnovnih treh zaporednih ekstrakcijah denaturativno homogenizirati z ureo ali še bolje z ioskim denaturantom oziroma njuno kombinacijo ter najverjetneje

podaljšati tudi čas ekstrakcije. Predlagamo tudi uporabo steklenih kroglic za vzdrževanje homogenosti suspenzije med samo ekstrakcijo.

Zaenkrat lahko na vprašanje za določitev konkretnih pogojev slednjega in denaturacije s spremembo pH odgovorimo le teoretično.

Zanimivi in nepričakovani rezultati ter zaenkrat neskladja z nekaterimi objavami avtorjev nam zagotovo predstavljajo izredno motivacijo za nadaljne delo na področju tekočinskih ekstrakcij steroidnih hormonov iz tkiv.

7 Literatura

- [1] Baulieu E.E. Neurosteroids: of the nervous system, for the neurosystem. Recent Progress in Hormone Research 1997; 52:1-32
- [2] Baulieu E.E. Neurosteroids: a novel function of the brain. Psycho-neuroendocrinology 1998; 23:963-982
- [3a] Dudek R.W. High-yield histology, 2-nd ed. Lippincott-Williams & Smith, 2000. str. 158-166 ISBN 0-683-72134-2
- [3b] Dudek R.W. High-yield histology, 2-nd ed. Lippincott-Williams & Smith, 2000. str. 167-189 ISBN 0-683-72134-2
- [4] Brann D.W., Hendry L.B., Mahesh V.B. Emerging diversities in the mechanism of action of steroid hormones. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 1995; 52:113-133
- [5] Falkenstein E.H.C., Christ T.M., Feuring M., Wheling M. Multiple actions of steroid hormones - a focus on rapid, nongenomic effects. Pharmacological Reviews 2000; 51:513-556
- [6] White O.C., Mune T., Agarwal A.K. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase and syndrome of apparent mineralocorticoid excess. Endocrine Reviews 1997; 18,1:135-156
- [7] Lukanova A., Lundin E., Micheli A., Arsian A., Ferrari P., Rinaldi S., Krogh V., Lenner P., Shore R.E., Biessy C., Muti P., Riboli E., Koenig K.L., Levitz M., Stattin P., Berrino F., Hallmans G., Kaass R., Toniolo P., Zeleniuch-Jacquotte A. Circulating levels of sex steroid hormones and risk of endometrial cancer in postmenopausal women. International Journal of Cancer 2003; 108,3:425-432
- [8] Allen N.E., Key T.J., Dossus L., Rinaldi S., Cust A., Lukanova A., Peeters P.H., Onland-Moret N.C., Lahmann P.H., Berrino F., Panico S., Larrañaga N., Pera G., Tormo M-J., Sánchez M-J., Quirós J.R., Ardanaz E., Tjønneland A., Olsen A., Chang-Claude J., Linseisen J., Schulz M., Boeing H., Lundin E., Palli D., Overvad K., Clavel-Chapelon F., Boutron-Ruault M-C., Bingham S., Khaw K-T., Bueno-de-Mesquita H.B., Trichopoulos A., Trichopoulos D., Naska A., Tumino R., Riboli E., Kaaks R. Endogenous sex hormones and endometrial cancer risk in women in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) Endocrine-Related Cancer 2008; 15:485-497

- [9] Suzuki T., Miki Y., Nakamura Y., Moriya T., Ito K., Ohuchi N., Sasano H. Sex steroid-producing enzymes in human breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 2005; 12:701-720
- [10] Titus M. A., Gregory C.W., Harris Ford III O., Schell M.J., Megarden S., Mohler J.L. Steroid 5- reductase isozymes I and II in recurrent prostate cancer. *Clinical Cancer Research* 2005; 11,12:4365-4371
- [11] Arya S.K., Yang J.T. Interaction of steroids with Nucleic acids. *Biochemistry* 1975; 14,5:963-969
- [12] Cohen P., Chin R-C., Kidson C. Interaction of hormonal steroids with nucleic acids II. Structural and thermodynamic aspects of binding. *Proceeding of the National Academy of Science of the united States of america (PNAS)* 1969; 8,9:3603-3609
- [13] Cohen P., Kidson C. Interaction of hormonal steroids with nucleic acids I. A specific requirement for guanine. *Proceeding of the National Academy of Science of the united States of america (PNAS)* 1969; 63:458-464
- [14] Ts'o P.O.P., Lu P. Interaction of nucleic acids I. Physical binding of thymine, adenine, steroids and aromatic hydrocarbons to nucleic acids. *Proceeding of the National Academy of Science of the united States of america (PNAS)* 1963; 51:17-24
- [15] Kato T., Yano K., Ikebukuro K., Karube I. Interaction of tree-way DNA junction with steroids. *Nucleic Acid Research* 2000; 28,9: 1963-1968
- [16] Chen H.C., Farese R.V. Jr. Steroid hormones: Interaction with membrane-bound receptors. *Current Biology* 1999; 9:R478-R481
- [17] Vijayan R., Biggin P.C. A steroid in a lipid bilayer: Localization, orientation and energetics. *Biophysical Journal: Biophysical Letters* 2008; 59.7:L45-L47
- [18] Oren I., Fleishman S.J., Kessel A., Ben-Tal N. Free Diffusion of steroid hormones across biomembranes: A simplex search with implicit solvent model calculations. *Biophysical Journals* 2004; 87.2:768-779
- [19] Li P., Shu H-J., Wang C., Mannerick S., Zorumski C F., Covey D.F., Steinbach J.H., Akk G. Neurosteroid migration to intracellular compartments reduces steroid concentration in the membrane and diminishes GABA-A receptor potentiation. *Journal of Physiology* 2007; 584.3:789-800
- [20] Gershfeld N.L., Muramatsu M. The interaction between steroid hormones and lipid monolayers on water. *Jourmnal of General Physiology* 1971; 58:650-666
- [21] Willmer E.N. Steroids amd cell surfaces. *Biological Reviewv* 1961; 36:368-398
- [22] Graham J.M., Green C. The binding of hormones and related compounds by normal and cholesterol-depleted plasma membranes od rat liver. *Biochemical Pharmacology* 1969; 18,2:493-502

- [23] Cleary G.W., Zatz J.L. Interaction of hidrocortisone with model membranes containing phospholipid and cholesterol. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1967; 66,7:975-980
- [24] Grunwald C. Effect of sterols on permeability of alcohol-trated Red Beet Tissue. *Plant Physiology* 1968; 43:484-488
- [25] Turgeon J., Carr M.C., Maki P.M., Wise M., Wise P.M. Compleks action of sex steroids in adipose tissue, the cardiovascular system and brain: Insights from basic science and clinical studies. *Endocrine Reviews* 2006; 27,6:575-605
- [26] Ganguly M., Westphal U. Steroid-Protein Interactions XVII, Influence of solvent environment on interaction between human α_1 -acid glycoprotein and progesterone. *Journal of Biological Chemistry* 1968; 243:6130-6139
- [27] Routledge E.J., Sheahan D.A., Desbrow C., Brighty G.C., Waldock M., Sumpter J.P. Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 2. In Vivo Responses in Trout and Roach. *Environ. Sci. Technol.* 1998; 32:1559-1565
- [28] Shareef A., Angove M.J., Wells J.D., Johnson B.B. Aqueous solubilities of estrone, 17β -estradiol, 17α -ethynylestradiol and bisphenol A. *J. Chem. Eng. Data* 2006; 51 (3):879-881. DOI: 10.1021/je050318c
- [29] Yalkowsky S.H., He Y. *Handbook of aqueous solubility data* 2003; CRC Press LLC
- [30] Florence A.T., Attwood D. *Physicochemical principles of pharmacy*, fourth edition, Pharmaceutical Press 2006; 144-146
- [31] Eik-Nes K., Schellman J.A., Lumry R., Samuels L.T. The binding of steroids to protein I. Solubility determinations. *J. Biol. Chem.* 1954; 152:411-419
- [32] Westphal U., Ashley B.D. Steroid-Protein Interactions VI. Stereochemical aspects of interaction between Δ^4 -3-ketosteroids on interaction with human serum albumin and β -lactoglobulin. *Journal of Biological Chemistry* 1958; 233:57-62
- [33] Westphal U., Ashley B.D. Steroid-Protein Interactions IV. Influence of functional groups in Δ^4 -3-ketosteroids and human serum albumin. *Journal of Biological Chemistry* 1959; 234:2847-2851
- [34] Westphal U., Ashley B.D. Steroid-Protein Interactions VIII. Structure of Δ^4 -3-ketosteroids in relation to spectrophotometric interaction with human serum albumin. *Journal of Biological Chemistry* 1961; 237:2763-2768
- [35] Brunelly B., Arch. Intern. Pharmacodynamie 1934; 49:262
- [36] Bischoff F., Katherman R.E. Distribution of estradiol between serum and red cells. *Am. J. Physiol* 1948; 152:189-196

- [37] Bischoff F., Pilhorn H.R. The state and distribution of steroid hormones in biologic systems III. Solubilities of testosterone, progesterone and α -estradiol in aqueous salt and protein solution and in serum. *J. Biol. Chem.* 1948; 174:663-682
- [38] Westphal U., Ashley B.D. Federation Proceedings 1957; 16:269
- [39] Pearlman W.H., Crépy O. Steroid Interaction with particular reference to testosterone binding by human serum. *Journal of Biological Chemistry* 1967; 242,2:182-189
- [40] Stroupe S.D., Westphal U. Steroid-protein interactions. Stopped flow fluorescence studies of the interaction between steroid hormones and progesterone-binding globulin. *Journal of Biological Chemistry* 1975; 250,22:8735-8739
- [41] Klotz I.M. The nature of some ion-protein complexes. *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.* 1950; 14:97-112
- [42] Klotz I.M., Neurath H., Bailey K. The proteins. Vol. I. Academic Press New York 1953; str. 727
- [43] Attie A.D., Raines R.T. Analysis of receptor-ligand interactions. *Journal of Chemical Education* 1995; 72,2:119-124
- [44] Green N.M. Avidin 1. The use of [^{14}C]biotin for kinetic studies and for assay. *Biochem. J.* 1962; 89:585-591
- [45] Westphal U. Steroid-Protein Interactions. Annual progress report on steroid-protein interactions. Defense Technical Information Center 1963; DDC AD No. 423987
- [46] Chader G.J., Westphal U. Steroid-protein interaction XVI. Isolation and characterization of the corticosteroid-binding globulin of the rabbit. *Journal of Biological Chemistry* 1967; 213,:928-939
- [47] Romeu A.M., Martino E.E., Stoppani A.O.M. Structural requirements for steroid binding and quenching of albumin fluorescence in bovine plasma albumin. *Biochimica et Biochemica acta - Protein Structure* 1976; 439:175-193
- [48] Kubinyi H. Hydrogen bonding: The last mystery in Drug design ? Pharmacokinetic Optimization in Drug Research. Biological, Physicochemical, and Computational Strategies, B. Testa, H. van de Waterbeemd, G. Folkers and R. Guy, Eds., Helvetica Chimica Acta and Wiley-VCH, Zürich, 2001, pp. 513-524
- [49] Setschenow, J. Über Die Konstitution Der Salzlösungen auf Grund Ihres Verhaltens Zu Kohlen- saure, *Zeitschrift für Physikalische Chemie* 1889; 4,255:117-125
- [50] Debije P., MacAuley W. Das elektrische Feld der Ionen und die Neutralsalzwirkung. "Theory of salting out". *Zeitschrift für Physikalische Chemie* 1925; 26:22

- [51] Hückel E. Zur Theorie konzentrierter wässriger Lösungen starker Elektrolyte. Phys. Z. 1925; 26:93(25)
- [52] Foster J. F. Albumin structure, function and uses. Academic Press, Oxford 1977. pp. 53-84.
- [53a] Creighton T.E. Encyclopedia of molecular biology Vol. 1-4, john Wiley & Sons Inc. 1999: 1135-1356 (Electronic ISBN: 978-1-59124-523-0)
- [53b] Creighton T.E. Encyclopedia of molecular biology Vol. 1-4, john Wiley & Sons Inc. 1999: 1905-1906 (Electronic ISBN: 978-1-59124-523-0)
- [53c] Creighton T.E. Encyclopedia of molecular biology Vol. 1-4, john Wiley & Sons Inc. 1999: 3534-3546 (Electronic ISBN: 978-1-59124-523-0)
- [54] Mannuzza F.J., Montalto J.G; Is albumin too complex to be just a commodity? Part one: Molecular structure. BioProcess International 2010; 8,2:40-43
- [55] Ryan M., Westphal U. Steroid-protein interaction XXIV: Progesterone-binding affinity of isoelectric variants of human α_1 -acid glicoprotein. The Journal of Biological Science 1972; 247,12:4050-4056
- [56] von Hippel P., Wong K-Y. On the conformational stability of globular proteins. The effects of various electrolytes and nonelectrolytes on the thermal ribonuclease transition. Journal of Biological Chemistry 1965; 240,10:3909-3923
- [57] Greene R.F. Jr., Pace N., Urea and guanidine hydrochloride denaturation of ribonuclease, lysozyme, α -chimotripsin and β -lactoglobulin. Journal of Biological Chemistry 1974; 249,17:5388-5392
- [58] Lindgren M. On the mechanism of urea-induced protein denaturation. Doctoral Thesis, Umeå university, Sweden, 2010; ISBN 978-91-7264-997-2
- [59] Hua L., Zhou R., Thirumalai D., Berne B.J. Urea denaturation by stronger dispersion interactions with proteins than water implies a 2-stage unfolding. Proceeding of the National Academy of Science of the united States of america (PNAS) 2008; 105, 44:16928-16933
- [60] Bennion B.J., Daggett V. The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. Proceeding of the National Academy of Science of the united States of america (PNAS) 2003; 100, 9:5142-5147
- [61] Asakura T., adachi K., Schwartz E. Stabilizing effects of various organic solvents on protein. Journal of Biological Chemistry 1978; 253,18:6423-6425
- [62] Klotz I.M., Tam J.W. Acetylation of sickle cell hemoglobin by aspirin. Proceeding of the National Academy of Science of the united States of america (PNAS) 1973; 70, 9:1313-1315

- [63] Collins K.D. Ions from the Hofmeister series and osmolytes: effects on proteins in solution and crystallization process. Elsevier Methods 2004; 34:300-311
- [64] Baldwin R.L. How Hofmeister ion interactions affect protein stability. Biophysical journal 1996; 71:2056-2063
- [65] Zangi R., Berne B.J. Aggregation and dispersion of small hydrophobic particles in aqueous electrolyte solutions. Journal of Physical Chemistry 2006; 110:22736-22741
- [66] Hribar B., Southall T.N., Vlachy V. Dill K.A. How ions affect the structure of water. Journal of the American Chemical Society (JACS) 2002; 124:12302-12311
- [67] Hofmeister F. Naunyn-Schmiedebergs Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie, Leipzig 1888; 24:247-260
- [68] Mayr L.M., Schmid F.X. Stabilization of a protein by guanidinium chloride. Biochemistry 1993; 10;32(31):7994–7998.
- [69] Hagihara Y., Aimoto S., Goto Y. Guanidine hydrochloride-induced folding of proteins. Journal of Molecular Biology 1993; 231,2:180-184
- [70] van Landeghem A.A.J, Poortman J., Helmond-Agema A., Thijssen J.H.H. Measurement of endogenous subcellular concentration of steroid in tissue. Journal of steroid Biochemistry 1984; 20,2:639-644
- [71] Bonney R.C, Sparks C.A., Cheng R.W., Reed M.J., James V.H.T., The measurement of steroid hormones in endometrial tissue: A comparison between two methods of extraction. Journal of Steroid Biochemistry 1984; 21,4:479-481
- [72] Pasqualini J.R., Cortes-Prjeto J., Chetrite G., Talbi M., Ruiz A. Concentration of estrone, estradiol and their sulfates and evaluation of sulfatase and aromatase activities in patients with breast fibroadenoma. International Journal of Cancer 1997 70:639-643
- [73] Szymczak J., Milewicz A., Thijssen H.H., Blankenstein M.A., Daroszewski J., Concentration of sex steroids in adipose tissue after menopause. Steroids 1998; 63:319-321
- [74] Bolufer P., Ricart E., Liuch A., Vazquez C., Rodriguez A. Aromatase activity and estradiol in human breast cancer: its relationship to estradiol and epidermal growth factor receptors and tumor-node-metastasis. Journal of Clinical Oncology 1992; 10:438-446
- [75] Hodges J.K., van Aarde R.J., Heistermann M., Hoppen H-O. Progestin content and biosynthetic potential of the corpus luteum of the african elephant (*Loxodonta africana*) Journal of reproduction and fertility 1994; 102:163-168
- [76] Lagana A., d'Ascenzo G., Marino A. An efficient Procedure for extraction and determination of steroids in the tissue of laboratory animals. Chromatographia 1978;

- [77] Le Bizec B., Marchand P., Gadé C., Maume D., Monteau F., André F. Detection and identification of anabolic steroid residues in tissue by gas chromatography coupled to mass spectrometry. Proceedings of the EuroPesidue IV Conference, Veldhofen, The Netherlands, 2000; 8–10:226–231
- [78] Samuels T.L., Metabolism of steroids by tissues I. Determination of testosterone and related steroids in tissue extracts. Journal of biological Chemistry 1947; 168,2:471-475
- [79] Wiswell J.G., Samuels L.T. The metabolism of progesterone by liver tissue in vitro. Journal of biological Chemistry 1952; 201,1:155-160
- [80] Fahmy D., Griffiths K., Turnbull A.C., Symington T. A comparison of the metabolism in vitro of [7α - 3 H]dehydroepiandrosterone sulfate and [4 - 14 C]pregnenolone by tissue from hilus cell tumor of ovary. Journal of Endocrinology 1968; 41:61-68
- [81] Burstein S., Jacobsohn G.M., Lieberman S. The Cleavage of androsterone β -d-glucopyranosidouric acid in organic media. Journal of American Society 1959; 82:1226
- [82] Burstein S., Lieberman S. Hydrolysis of ketosteroid hydrogen sulfate by solvolysis procedure. Journal of Biological Chemistry 1958; 233:331-335
- [83] Morfin R., Young J., Corpéchot C., Egestad B., Sjövall J. Neurosteroids: Pregnenolone in human sciatic nerve. Proceeding of the National Academy of Science of the united States of america (PNAS) 1992; 89:6790-6793
- [84] Badeau M., Vihma V., Mikkola T.S., Tiitinen A., Tikkanen M. Estradiol fatty acid esters in adipose tissue and serum of pregnant and pre- and postmenopausal women. The journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2007; 92,11:4327-4331
- [85] Ebner M.J., Corol D.I., Havlíková H., Honour J.W., Fry J.P. Identification of neuroactive steroids and their precursors and metabolism in adult male rat brain. Endocrinology 2006; 147,1:179-190
- [86] Matur C., Prasad V.V.K., Raju V.S., Welch M., Lieberman S. Steroids and their conjugates in the mammalian brain. Proceeding of the National Academy of Science of the united States of america (PNAS) 1992; 90:85-88
- [87] Masson H.L. Isolation of androsterone, etiocholan-3(α)-ol-17-one and Δ^5 -androstene-3(β), 17(α)-diol from the urine after administration of dehydroisoandrosterone to a man. journal of biological chemistry 1945; 160:255-246
- [88] DePaoli J., Nishizawa E.E., Eik-Nes K.B. Hydrolysis of conjugated 17-ketosteroids. Journal of Clinical Endocrinology 1963; 23:81-89

- [89] Ibayashi H., Nakamura M., Tanioka T., Murakawa S., Uchikawa T., Yamaji T. Japanese Journal of Clinical Medicine 1964; 22:546
- [90] Cohen S.L., Oneson I.B. The conjugated steroids IV. The hydrolysis of ketosteroid sulfates. Journal of Biological Chemistry 1953; 204:245-256
- [91] Brown J.B. A chemical method for the determination of oestriol, oestrone and oestradiol in human urine. Journal of Biochemistry 1955; 60:185-193
- [92] Rice N.M, Irwig H.N.N.H., Leonard M.A. Nomenclature for liquid-liquid distribution (solvent extraction). IUPAC Recommendations 1993. Pure & Applied Chemistry 1993; 55,1:2373-2396
- [93] Tomida H., Yotsuyanagi T., Ikeda K. Solubilization of steroid hormones by polyoxyethylene lauryl ether. Chem. Pharm. Bull. 1978; 26,9:2832-2837 (Flynn G.L. Pharm. Sci 1971; 60:345 (original))
- [94] Hurwitz A.R., Liu S.T. Determination of aqueous solubility and pKa values of estrogens. Journal of Pharmaceutical Sciences 1977; 66,5:624-627
- [95] Mather A. Distribution of estrogens between immiscible solvents. Journal of Biochemical Chemistry 1942; 144:617-623
- [96] Tomida H., Yotsuyanagi T., Ikeda K. Solubilization of steroid hormones by polyoxyethylene lauryl ether. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 1978; 26,9:2832-2837
- [97] Engel L.L., Slaunwhite W.R. Jr., Carter P., Nathanson I.T., The separation of natural estrogens by countercurrent distribution. Journal of Biological Chemistry 1950; 185:255-263
- [98] Sjöval J., Axelson M. Never approaches to the isolation, identification and quantitation of steroids in biological materials. Vitamines and Hormones 1982; 39:31-144
- [99] Anderson S.H.G., Sjöval J. Analysis of profiles of unconjugated steroids in rat testicular tissue by gas chromatography-mass spectroscopy. Journal of Chromatography 1985; 23:469-475
- [100] Bruning P.F., Jonker K.M., Boerema-Baan; Adsorption of steroid hormones by plastic tubing. Journal of Steroid Biochemistry 1981; 14,6:553-555
- [101] Shaw M.A., Back D.J. Adsorption of pregnanediol-3 α -glucuronide by plastic and glass. Journal of Steroid Biochemistry 1983; 19,5:1681-1682
- [102] Walker C.W., Watson J.E. Adsorption of estrogens on laboratory materials and filters during sample preparation. Journal of Environmental Quality 2010; 39:774-748

- [103] Willems G.M., Hermens W.T.H., Hemker H.C. Surface exclusion on molecular mobility may explain Vroman effects in protein adsorption. *Journal of Biomaterial Science* 1991; 2,3:217-226
- [104] Vogel A.I., Tatchell A.R., Furnis B.S., Hannaford A.J., Smith P.W.G. *Vogel's textbook of practical organic chemistry*, 5th ed. Pearson Prentice Hall, England 1989, str. 158-160
- [105] Gordus A.A. *Shaum's outline of theory and problems of analytical chemistry*, 1-st edition. McGraw-Hill, Inc, New York, 1985, str. 198-199
- [106] Snyder L.R. Classification of the solvent properties of common liquids. *Journal of Chromatographic Science* 1971; 15:223-234
- [107] Wieling J., Dijkstra H., Mensingk C.K., Jonkman J.H.G., Coenegracht P.M.J., Duineveld C.A.A., Doornbos D.A. Chemometrics in bioanalytical sample preparation: A fractionated combined mixture and factorial design for the modeling of the recovery of five tricyclic amines from plasma after liquid-liquid extraction prior to high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 1993; 629,2:181-199
- [108] Lowery T.H., Richardson K.S. *Mechanism and Theory in Organic Chemistry*, Harper Collins Publishers 3rd ed. 1987 str. 85-90. ISBN 0063640449
- [109] Reichardt C. Solvents and solvents effects in organic chemistry, 3rd ed. Wiley-VCH Weinheim 1992. str. 472-475 ISBN: 3-527-30618-8
- [110] Flick E.W. *Industrial solvents handbook* 5th ed. Noyes Data Corporation, 1998 ISBN: 0-8155-1413-1
- [111] Bhat S.V., Nagasampagi B.A., Sivakumar M. *Chemistry of natural products*, 2-nd ed. Narosa, Springer Berlin Heidelberg, 2006. str 18-102 ISBN 3-540-40669-7
- [112a] Štraus B. Medicinska biokemija, 2. dopolnjeni ponatis. Medicinska naklada, Zagreb, 1992 str. 591-671
- [112b] Štraus B. Medicinska biokemija, 2. dopolnjeni ponatis. Medicinska naklada, Zagreb, 1992 str. 1151-1152
- [113] Moss G.P. International Union of Pure and Applied Chemistry and International biochemical union of biochemistry. Joint Commission on Biochemical Nomenclature (IUPAC-IUB, JCBN). *Nomenclature of steroids. Recomendations 1989*. Pure & Applied Chemistry 1989; 61,10:1783-1822
- [114] van Lensen A.M. Partial synthesis of corticosteroids. Introduction of the side chain in 17-oxosteroids using Tosylmethyl Isocyanide. *Proefschrift. Rijksuniveriteit Groningen*, 1990
- [115a] Makin H.L.J., Gower D.B. *Steroid analysis*, 2-nd Ed. Springer 2010. str. 12-

14 ISBN 978-1-4020-9774-4

[115b] Makin H.L.J., Gower D.B. Steroid analysis, 2-nd Ed. Springer 2010. str. 169-174 ISBN 978-1-4020-9774-4

[115c] Makin H.L.J., Gower D.B. Steroid analysis, 2-nd Ed. Springer 2010. str. 239-338 ISBN 978-1-4020-9774-4

[115d] Makin H.L.J., Gower D.B. Steroid analysis, 2-nd Ed. Springer 2010. str. 457-472 ISBN 978-1-4020-9774-4

[115e] Makin H.L.J., Gower D.B. Steroid analysis, 2-nd Ed. Springer 2010. str. 559-575 ISBN 978-1-4020-9774-4

[115f] Makin H.L.J., Gower D.B. Steroid analysis, 2-nd Ed. Springer 2010. str. 605-618 ISBN 978-1-4020-9774-4

[116] O'Keffe M. Residue analysis in food. Principles and applications. Harwood Academic Publishers 2000. str. 31-32 ISBN 90-5702-441

[117] Stolker A.A.M., Zoonjes P.W., von Ginkel L.A. The use of supercritical fluid extraction for the determination of the steroids in animal tissues. Analyst 1998; 123:2671-2676

[118] Gomes R.A., Meredith W., Snape C.E., Sephton M.A. Analysis of conjugated steroid androgens: Deconjugation, derivatisation and associated issues. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2009; 48,5:1133-1140

[119] Mikkelsen S.R., Cortón E. Bioanalytical chemistry, 1-st. ed. Willey-Interscience 2004. str. 99-130 ISBN 0-471-54447-7

[120] Mohan C. Calbiochem buffers. A guide for the preparation and use of buffers in biological systems. Calbiotech, Eduard Merck Diagnostics (EMD) Bioscience, Inc. Darmstadt, Germany, 2003

[121] Vermeulen-Meiners C., Jaszmann L.J.B., Haspels A.A., Poortman J., Thijssen J.H.H. The endogenous concentration of estradiol and estrone in normal human postmenopausal endometrium. Journal of Steroid Biochemistry 1984; 21,5:607-612

[122] Jones D.L., James V.H.T. Determination of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate in blood and tissue. Studies of normal women and women with breast or endometrial cancer. Journal of Steroid Biochemistry 1987; 26,1:151-159

[123] Kühnel W. IMMULITE® and IMMULITE® 2000 Reference range compendum 1st. ed. Diagnostic Products Corporation (DPC), Los Angeles, CA, 2000 str. 13,17, 41

[124] Beckman Coulter ACTIVE® Androstenedione RIA. Raadioimmunoassay kit for the quantitative measurement of androstenedione in human serum or plasma. DSL 3800, IMMUNOTECH Prague, 2010

[125] LIAISON® Estradiol (310400). DiaSorin Inc.USA, 2005