



VILNIAUS UNIVERSITETAS

Chemijos fakultetas

Analizinės ir aplinkos chemijos katedra

Chemijos studijų programos II kurso studentė
Gintarė Dubinkaitė

Magistro darbas

**Pilkųjų ruonių (*Halichoerus grypus*) steroidinių
hormonų išskyrimas ir analizė**

Darbo vadovai:

Habil. dr. Vida Bendikienė,
Prof. (HP) dr. Stasys Tautkus

Vilnius, 2016

Pilkųjų ruonių (*Halichoerus grypus*) steroidinių hormonų išskyrimas ir analizė

Extraction and analysis of grey seals (*Halichoerus grypus*) steroid hormones

Darbas atliktas VU Biochemijos ir molekulinės biologijos katedroje, taikomosios enzimologijos laboratorijoje
(vadovai: habil. dr. Vida Bendikienė, prof. (HP) dr. Stasys Tautkus)

Darbą atliko:

Gintarė Dubinkaitė

Darbo vadovai:

Habil. dr. Vida Bendikienė

Prof. (HP) dr. Stasys Tautkus

TURINYS

| | |
|---|-----------|
| SANTRUMPOS | 4 |
| ĮVADAS | 5 |
| 1. LITERATŪROS APŽVALGA | 7 |
| 1.1. Pilkieji ruoniai | 7 |
| 1.1.1. Dauginimasis ir žindymas | 7 |
| 1.2. Steroidiniai hormonai ir jų įtaka ruonių elgsenai | 10 |
| 1.2.1. Testosterono funkcijos, sintezė ir metabolizmas | 11 |
| 1.2.2. Testosterono įtaka ruonių elgsenai | 12 |
| 1.2.3. Estradiolio funkcijos, sintezė ir metabolizmas | 13 |
| 1.2.4. Estradiolio įtaka ruonių elgsenai | 15 |
| 1.2.5. Dihidrotosterono funkcijos, sintezė ir metabolizmas | 15 |
| 1.2.6. Dihidrotosterono veikla žinduoliuose | 16 |
| 1.2.7. Kortizolio funkcijos, sintezė ir metabolizmas | 16 |
| 1.2.8. Streso įtaka | 18 |
| 1.3. Mėginio paruošimas analizei | 19 |
| 1.3.1. Skysčių-skysčių ekstrakcija organiniais tirpikliais | 19 |
| 1.3.2. Kietafazė ekstrakcija | 20 |
| 1.4. Analitiniai metodai steroidiniams hormonams nustatyti | 21 |
| 1.4.1. Imunoanalizė | 22 |
| 1.4.2. Dujų chromatografija / masių spektrometrija | 23 |
| 1.5. Steroidų derivatizacija dujų chromatografijai | 25 |
| 2. MEDŽIAGOS IR METODAI | 27 |
| 2.1. Medžiagos | 27 |
| 2.1.1. Tyrimo objektas | 29 |
| 2.2. Metodai | 29 |
| 2.2.1. Mėginio paruošimas ELISA analizei | 29 |
| 2.2.2. Mėginio paruošimas DC-MS analizei | 29 |
| 2.2.3. Kietafazė ekstrakcija | 29 |
| 2.2.4. Steroidų derivatizacija | 30 |
| 2.2.5. ELISA analizė | 30 |
| 2.2.6. DC-MS analizė | 31 |
| 2.2.7. Pilkųjų ruonių jauniklių morfometrinių parametrų ir amžiaus nustatymas | 33 |
| 2.2.8. Statistinis duomenų apdorojimas | 33 |
| 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS | 35 |
| 3.1. ELISA analizė | 35 |
| 3.1.1. Metodo validumo patikrinimas. Išgavos ir paraleliškumo įvertinimas | 35 |
| 3.1.2. Kiekybinė analizė | 37 |
| 3.1.3. Steroidų koncentracijos priklausomybė nuo jauniklių morfometrinių parametrų ir amžiaus | 39 |
| 3.2. Dujų chromatografija-masių spektrometrija | 40 |
| 3.2.1. Mėginio ekstrakcijos optimizavimas | 40 |
| 3.2.2. Dujų chromatografija / masių spektrometrijos SIM režimo generavimas | 41 |
| 3.2.3. Kiekybinis steroidinių hormonų nustatymas | 42 |
| 3.2.4. Steroidų koncentracijos priklausomybė nuo jauniklių morfometrinių parametrų ir lyties | 45 |
| 3.3. Rezultatų apibendrinimas | 40 |
| IŠVADOS | 48 |
| SANTRAUKA | 49 |
| SUMMARY | 50 |
| PADĖKA | 51 |
| LITERATŪROS SĄRAŠAS | 52 |

SANTRUMPOS

DHT – dihidrotestosteronas;

DTL – didelio tankio lipoproteinas;

E2 – estradiolis (8R,9S,13S,14S,17S)-13-metil-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dekahidrociklopenta[a]fenantreno-3,17-diolis;

E1 – estronas (3-hidroksiestra-1,3,5(10)-trien-17-onas);

E3 – estriolis (8R,9S,13S,14S,16R,17R)-13- metil-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dekahidrociklopenta[a]fenantreno-3-3,16,17-triolis;

ELISA –imunoanalizės metodas (enzyme-linked immunosorbent assay);

FSH– folikulus stimuliuojantis hormonas;

DC/MS – dujų chromatografija / masių spektrometrija;

GnRH– gonadropinus išleidžiantis hormonas;

11 β -HSD –11 β -hidroksisteroid dehidrogenazės sistema;

KO – kortizolis (11 β)-11,17,21-trihidroksipregn-4-ene-3,20-dionas);

LH – liuteinizuojantis hormonas;

MSFTA – trimetilsililtrifluoracetamidas;

MTL – mažo tankio lipoproteinas;

SHBG – lytinius hormonus surišantis globulinas;

T – testosteronas (8R,9S,10R,13S,14S,17S)- 17-hidroksi-10,13-dimetil-1,2,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17- dodekahidrociklopenta[a]fenantren-3-onas.

ĮVADAS

Pilkasis arba ilgasnukis ruonis (lot. *Halichoerus grypus*) – plėšrūnų (*Carnivora*) būriui priklausantis žinduolis, paplitęs Šiaurinėje Atlanto vandenyno dalyje (Thompson and Härkönen, 2008), taip pat sutinkamas Lietuvos teritorijos vandenyse. Šiame darbe yra analizuojami pilkųjų ruonių jauniklių steroidiniai hormonai: testosteronas (T), estradiolis (E2), dihidrotestosteronas (DHT) ir kortizolis (KO). Minėti hormonai turi įtakos pilkųjų ruonių seksualinei bei socialinei elgsenai. Kaip ir kituose žinduoliuose, jie kontroliuoja ruonių reprodukcinę elgseną, patelių rūpinimąsi jaunikliais, teritorijos žymėjimą, patinų agresiją ir kovas dėl patelių, jauniklių brendimą, tarpusavio bendravimą ir išgyvenimą bado laikotarpiu (Wassarman and Neill, 2006). Ruonių vystymosi procese taip pat labai svarbus cholesterolis, iš kurio sintetunami steroidiniai hormonai. Tačiau jo koncentracijos plazmoje ir serume siekia apie 0,5 mg/ml ir jį nustatyti problemų nėra, todėl didesnis dėmesys skiriamas steroidiniams hormonams.

Literatūros šaltiniuose pateikta informacija apie steroidinių hormonų nustatymą suaugusiuose pilkųjų ruonių individuose, tačiau labai mažai dėmesio skirta jauniklių steroidinių hormonų poveikiui jų organizmams. Problemos, su kuriomis susiduriama, yra sudėtingas ruonių kraujo mėginių paruošimas (itin lipemiška matrica) bei mažos (pg/ml) steroidinių hormonų koncentracijos plazmoje bei serume. Literatūroje minimi radioimunoanalizės bei imunoanalizės metodai. Tačiau dėl antikūnų kryžminių reakcijų su antigenais šie metodai nėra pakankamai selektyvūs kai kuriems steroidiniams hormonams nustatyti. Vis labiau populiarėja dujų / skysčių chromatografijos ir masių spektrometrijos metodai. Norint analizuoti šiais metodais, būtinas kruopštus mėginių paruošimas, kuris užima didžiąją dalį analizės laiko. Šiame darbe steroidiniams hormonams nustatyti pasirinkti du metodai – ELISA (imunoanalizė) ir dujų chromatografijos / masių spektrometrijos sistema. Pastarajam taikytas mėginio paruošimas, kuriame naudota kietafazė ekstrakcija (SPE) bei steroidų derivatizacija.

Ruonių kraujo plazmos / serumo mėginiai surinkti St. Andrews universiteto, Jūrinių tyrimų instituto (Sea Mammal Research Unit) mokslinių tyrimų bazėje, Island of May saloje, Škotijoje.

Darbo tikslas:

Iš ruonių plazmos / serumo išskirti steroidinius hormonus ir nustatyti tinkamiausią metodą jų analizei.

Darbo uždaviniai:

1. Optimizuoti steroidinių hormonų ekstrakcijos metodą:
 - 1) nustatyti tinkamiausius organinius tirpiklius steroidinių hormonų išskyrimui iš ruonių plazmos / serumo;
 - 2) optimizuoti kietafazės ekstrakcijos metodą steroidiniams hormonams išskirti iš plazmos / serumo;
 - 3) atrinkti tinkamiausią steroidinių hormonų ekstrakcijos metodą, reikalingą ELISA metodui.
2. Kiekybiškai įvertinti testosterono, estradiolio ir kortizolio koncentracijas ELISA metodu.
3. Kiekybiškai įvertinti testosterono, dihidrotestosterono ir estradiolio koncentracijas DC/MS (dujų chromatografijos / masių spektrometrijos) sistema.
4. Palyginti ir įvertinti kiekybinius estradiolio ir testosterono rezultatus, gautus ELISA ir DC/MS metodais.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Pilkieji ruoniai

Pilkasis arba ilgasnukis ruonis – ruonių plėšrūnų (Carnivora) būrio jūros žinduolis, paplitęs borealinėje Atlanto vandenyno dalyje, prie šiaurės vakarų Europos ir Šiaurės Amerikos rytuose. Tai yra didžiausias Baltijos jūros žinduolis. Patinų kūno ilgis siekia iki 2,5 m, svoris iki 300 kg. Patelės mažesnės – iki 2 m ilgio ir 200 kg svorio, gimę jaunikliai sveria apie 14 kg (Thompson and Härkönen, 2008).



1.1 pav. Pilkasis ruonis (David Element. Wildlife Photography).

1.1.1. Dauginimasis ir žindymas

Baltijos regione pilkieji ruoniai dauginasi vasario – kovo mėnesiais, kai ledo danga Baltijos jūroje yra storiausia (Jüssi et al., 2008). Vakarinėje Atlanto pakrantėje veisimosi sezonas vyksta gruodžio – sausio, o rytinėje – spalio – gruodžio mėnesiais (Thompson and Härkönen, 2008).

Pilkiesiems ruoniams būdinga patelių gynybos poliginija. Jauniklius vesti pasiruošusios patelės sausumoje pasiskirso į neapibrėžto dydžio grupes, kuriose veda ir žindo jauniklius bei vėliau poruojasi. Tuo tarpu patinai stengiasi savo įtakos zonoje išlaikyti kuo didesnę patelių, su kuriomis vėliau poruosis, skaičių (Boness and James, 1979; Anderson and Fedak, 1985). Ruoniai nesudaro nuolatinių porų, dominuojantys patinai poruojasi su visomis prieinamomis patelėmis. Žindymo pabaigoje patelė poruojasi su vienu ar daugiau dominuojančių patinų, esančių veisimosi vietoje. Dar po kelių dienų ji išplaukia į jūrą maitintis ir atgauti prarastą svorį, kurio neteko maitindama jauniklį.

Poravimosi sezonu patinai būna ypač agresyvūs. Didžiausi patinai, paprastai vyresni nei 10 metų, konkuruoja grupėje dėl patelių apvaisinimo. Nors dažniausiai patinų konkurencija nepereina į glaudaus kontakto agresyvias kovas ir užtenka varžovą išvyti vokalizacijos pagalba bei retkarčiais įkasti sprunkančiam į plaukmenis, kovos yra taip pat stebimos. Tokiu atveju patinai gali rimtai susižaloti (Lidgard et al., 2005; Boness and James, 1979; Anderson et al., 1975).

Pilkųjų ruonių patinas lytiškai subręsta maždaug šešerių metų amžiaus, nors dažniausiai jam trūksta kūno masės ir patirties sėkmingai konkuruoti su dominuojančiais patiniais, todėl sėkmingai poruotis pradeda tik 10-12 metų. Dėl šios priežasties jauni patinai yra priversti laikytis seklumose arba kitais būdais kovoti dėl galimybės poruotis su patele. Toks elgesys būdingas iki kol patinas pasiekia pakankamą kūno masę ir įgauna reikiamos patirties, kad galėtų laimėti kovas dėl veisimosi teritorijų (Boness and James, 1979; Survilienė et al., 2016; Anderson and Fedak, 1985).

Pilkųjų ruonių patelė pirmą kartą pastoja 4-5 metų amžiaus ir jauniklius veda kelis dešimtmečius. Kai kiaušinėlis apvaisinamas, vaisius pradeda vystytis maždaug po trijų mėnesių laiko ir auga apie devynis mėnesius. Praėjus metams laiko nuo apvaisinimo, motinos instinktyviai grįžta į veisimosi vietą. Dažniausiai patelės veisiasi toje pačioje teritorijoje daug metų iš eilės (Pomeroy et al., 2000; Pomeroy et al., 2001). Gimdymas paprastai yra greitas. Dažniausiai gimsta vienas jauniklis, kurį po gimimo motina apuosto ir vėliau gali pagal kvapą atpažinti savo jauniklį (Atkinson, 1997; Bowen et al., 2003; Mellish et al., 1999; Bowen et al., 2006; Iverson et al., 1993).

Pilkųjų ruonių jaunikliai gimę sveria apie 14 kg ir turi minkštą baltą kailį – *lanugo* – kuris jauniklius apsaugo nuo šalčio pirmosiomis dienomis, jiems dar nespėjus sukaupti pakankamo poodinio riebalų sluoksnio (Thompson and Härkönen, 2008; Jüssi et al., 2008). Jaunikliai gimsta silpni ir pirmąsias keletą savaičių yra visiškai priklausomi nuo motinos pieno. Pilkųjų ruonių patelės žindo jauniklius apie 16 – 20 dienų. Pilkųjų ruonių patelių pienas yra nepaprastai riebus. Žindymo periodu pieno riebumas svyruoja tarp 30-60 %, todėl ruoniukai auga labai greitai (apie 2 kg per dieną). Per šį laiką jauniklis priauga apie 30-40 kg. Šį svorio prieaugį daugiausia sudaro poodinis riebalų sluoksnis, kuris yra gyvybiškai svarbus izoliacijai nuo šalčio bei kaip energijos šaltinis jauniklių badavimo laikotarpiu po žindymo (Muelbert et al., 2003; Iverson et al., 1995; Lang et al., 2009; Noren et al., 2008; Baker, 1990). Žindymo laikotarpiu patelė netenka 65 kg (30-40%) kūno masės (Bowen et al., 1992; Iverson et al., 1993).

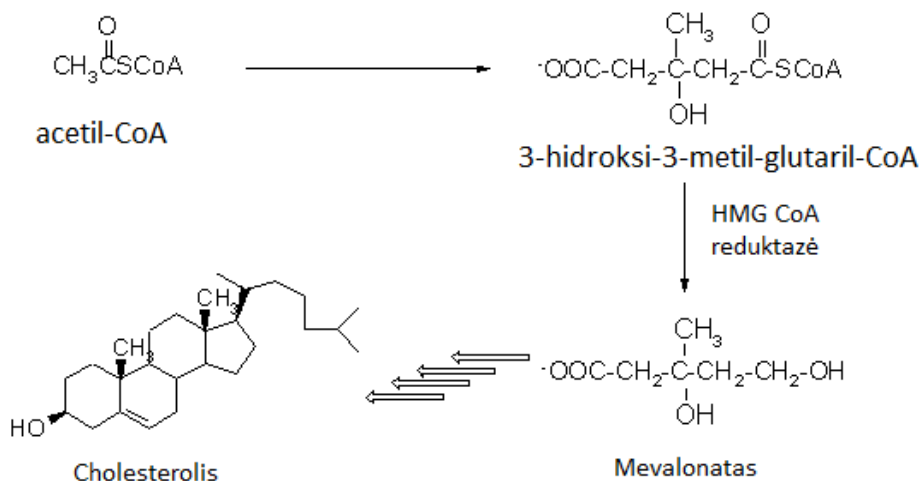
Tikimybė išgyventi pirmais metais siejama su didesne jauniklio kūno mase bei sukauptais energijos rezervais, kurie tiesiogiai koreliuoja su patelės kūno masės rodikliais (Bennett et al., 2007). Žindymo laikotarpiu išgyvena ne visi jaunikliai. Ypač jautrūs yra vyriškos lyties jaunikliai, kurie gimsta didesni ir jiems reikia daugiau energetinių resursų išgyvenimui (Kovacs, 1987). Išgyvenamumas priklauso nuo motinos amžiaus, nes vyresnės patelės turi daugiau patirties auginant jauniklį (pirmą kartą pagimdžiusios patelės linkusios palikti jauniklį), atplaukia į veisimosi teritorijas anksčiau, todėl išvengia išiaudrinusių patinų trikdymo (Bowen et al., 2006). Taip pat jos pasižymi didesne kūno mase ir turi sukauptas daugiau energetinių resursų, kurie leidžia ilgiau žindyti jauniklį, jų jaunikliai gimsta didesni, stipresni (Iverson et al., 1993; Mellish et al., 1999). Tuo tarpu patelių amžiui perkopus 20 metų, jų reprodukcinis sėkmingumas pradeda mažėti – nors jaunikliais rūpinasi taip pat, jų organizmas nepagamina pakankamai pieno, lyginant su jaunomis patelėmis, jos veda silpnesnius jauniklius (Bowen et al., 2006).

Patele pasitraukus iš veisimosi teritorijos, jaunikliai lieka sausumoje dar apie 20 dienų ir nesimaitina. Šis badavimo laikotarpis reikalingas jauniklių fiziniam brendimui, pasiruošimui gyventi vandenyje, judėjimo sausumoje bei plaukiojimo įgūdžiams praktikuoti (Jenssen et al., 2010; Oritsland et al., 1985; Reilly, 1991; Bennett et al., 2007). Maždaug po mėnesio jie pilnai pasitraukia iš veisimosi teritorijos, išmoksta maitintis ir prisijungia prie kitų ruonių poilsio gulyklose, kur žaidžia ir lavina socialinius įgūdžius (Survilienė et al., 2016).

Pilkųjų ruonių jauniklių išgyvenimo tikimybė iškart po atjunkymo badavimo laikotarpiu dažniausiai priklauso nuo jų sukauptų energetinių resursų, kurie garantuoja sėkmingą vystymąsi, mioglobino kaupimą raumenyse, riebalų vartimą baltymais (riebalinio audinio vartimą raumeniniu), normalią imuninės sistemos veiklą. Badavimo metu jaunikliai netenka apie 10 kg savo kūno masės. Net 90 % energetinių resursų yra pasisavinama iš poodinio riebalinio sluoksnio (Oritsland et al., 1985; Reilly, 1991; Mellish et al., 1999). Vis dėlto kalbant apie jauniklių mirtingumą nuo atjunkymo iki metų amžiaus stebimas labai dideli skirtumai tarp lyčių. Patelės pasižymi 3,37 karto didesniu pirmų metų išgyvenamumu nei patinai. Patinai yra labiau priklausomi nuo energetinių resursų, sukauptų žindymo metu (Hall et al., 2001). Tačiau kokie veiksniai nulemia jų didesnį mirtingumą nėra aišku. Plačiau apie kai kuriuos veiksnius bus kalbama kituose skyriuose.

1.2. Steroidiniai hormonai ir jų įtaka ruonių elgsenai

Kaip anksčiau minėta, steroidiniai hormonai yra sintetinami iš cholesterolio. Šis pirmtakas gali būti sintetinamas *de novo* iš acetato (1.3 pav.), pasisavinamas iš ląstelėje esančių lipidų lašelių ir juose sukauptų cholesterolio esterių arba pasisavinamas iš cholesterolio turinčių mažo tankio lipoproteinų (MTL). Lipoproteinų cholesterolio atsargos plazmoje yra svarbiausios. Steroidinių hormonų biosintezei yra reikalingi oksiduojantys fermentai, esantys mitochondriose ir endoplazminiame tinkle (Rommerts, 2004). Manoma, kad cholesterolio atsargos gali prisidėti ne tik pre energetinių resursų jaunikių organizme palaikymo bei termoreguliacijos, tačiau gali pasitarnauti ir steroidinių hormonų gamybai. Pilkųjų ruonių jaunikių cholesterolio koncentracija kraujyje yra itin didelė – 0,5 mg/ml (0–1 dienų jaunikių), 0,96 mg/ml (14–15 dienų jaunikių), kai tuo tarpu žindančių patelių ji siekia apie 0,5–0,6 mg/ml (Iverson et al., 1995). Po žindymo kelis mėnesius cholesterolio kiekis kraujyje išlieka didelis, tačiau metų amžiaus jaunikių jis būna jau tris kartus mažesnis (Schweigert, 1993).



1.3 pav. Cholesterolio *de novo* biosintezės schema.

Hormonai yra signalinės molekulės. Jų išskyrimas į kraujotaką lemia funkcinis pakitimus organizmo ląstelėse, audiniuose ir organuose. Juos sintetina endokrininiai organai (pvz., sėklidės, kiaušidės) ir jie yra išskiriami į kraują. Didžioji dalis hormonų yra susijungusi su baltymais ir tik mažas jų procentas (2-3 proc.) cirkuliuoja laisvai. Būtent ši laisvoji dalis yra aktyvi ir difunduoja į audinius ir ląsteles. Taikinio ląstelės turi specifinius receptorių, prie kurių jungiasi atitinkami hormonai ir taip aktyvuoja receptorių (Kadziauskas, 2012).

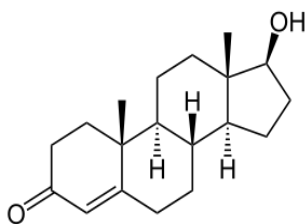
Steroidiniai hormonai, kaip ir skydliaukės hormonai, turi nemažai įtakos ankstyvojoje ontogenezėje bei lemia seksualinį stuburinių gyvūnų elgesį. Stuburiniuose gyvūnuose lytiniai hormonai yra sintetinami iš cholesterolio. Jie gali būti suskirstyti į keturias

funkcines grupes: tris lytinių hormonų grupes (androgenai, estrogenai ir progestagenai) ir gliukokortikoidai. Pastarieji yra svarbūs metabolizmo ir augimo reguliavime bei osmoreguliacijoje (Falkenstein et al., 2000). Žinduoliuose steroidiniai hormonai daugiausiai sintetinami antinksčiuose, lytinėse liaukose bei placentoje. Kiekvieno lytinio hormono gamyba vyksta specifinėse liaukose, pvz., testosteronas sintetinamas sėklidėse, estrogenas ir progesteronas kiaušidėse ir t. t. Šie organai daugumoje rūšių mažais kiekiais gali sintetinti ir kitos rūšies hormonus.

Daugelyje stuburinių pagumburis, tarpinių smegenų dalis, esanti po gumburu, ir hipofizė yra atsakingi už išskiriamų į kraujotaką hormonų koncentracijas ir dauginimosi bei seksualinio elgesio laiką. Pagumburyje gausu nervinių ląstelių, atliekančių signalo perdavimo ir sekrecijos funkcijas. Jis išskiria peptidą, gonadotropinus išleidžiantį hormoną (GnRH), kuris stimuliuoja hipofizę sintetinti folikulus stimuliuojantį hormoną (FSH) ir liutenizuojantį hormoną (LH). Šie hormonai reguliuoja progesterono, estradiolio ir testosterono sintezę. Lytinių hormonų ir lytinių liaukų vystymasis taip reguliuojami (teigiama ir neigiama grįžtamoji reguliacija) per FSH ir LH hormonų produkciją (Reijnders, 2002).

Jau ne kartą minėta, kad steroidiniai hormonai turi įtakos pilkųjų ruonių jauniklių raidai ir elgsenai. Šiame darbe analizuojami aukščiau aprašyti hormonai: estradiolis, testosteronas, dihidrotestosteronas ir kortizolis. Nuo jų sintezės, išskyrimo ir sąveikos su receptoriais priklauso ruonių jauniklių vystymasis, jų seksualinė bei socialinė elgsena (Wassarman and Neill, 2006).

1.2.1. Testosterono funkcijos, sintezė ir metabolizmas



1.2 pav. Testosterono struktūra.

Testosteronas (vyriškasis lytinis hormonas, 1.2 pav.) yra svarbus stuburinių kraujyje randamas lytinis hormonas, svarbiausias androgenas. Didžiausias testosterono kiekis (daugiau nei 95%) yra gaminamas sėklidžių Leidigo ląstelėse. Šios ląstelės specializuojasi gaminti testosteroną, lemiantį pirminių vyriškų lytinių požymių vystymąsi ir jas stimuliuoja

liuteinizuojantis hormonas (LH). Moterų organizmuose testosteronas taip pat gaminamas ir išskiriamas, tačiau mažesniais kiekiais. Apie 50 proc. testosterono gaminama periferiniuose audiniuose, kita dalis susidaro kiaušidėse ir antinksčiuose. Vyrų kraujyje testosterono koncentracija 3-4 kartus didesnė nei moterų. Vyrauja trys testosterono formos: SHBG-prisijungęs testosteronas (apie 60%), albuminą-prisijungęs testosteronas (apie 38%), ir laisvas testosteronas (apie 2%) (Rommerts, 2004).

Androgenų veikimas svarbus lyties ir kitų organų funkcijai palaikyti, lemia seksualinę bei socialinę elgseną stuburiniuose. Androgenai skatina tam tikrų baltymų sintezę ir audinių, kurie turi androgenų receptorių, augimą. Testosterono poveikius galima suskirstyti į anabolinį bei androgeninį. Daugeliu atveju testosterono poveikis gali būti dvejopas, todėl šis skirstymas nėra vienareikšmiškas. Anaboliniams poveikiams priskiriamas raumenų masės augimas ir jėga, padidintas kaulų tankis bei stiprumas. Androgeninį poveikį apibūdina lytinių organų brendimas, ypač varpos ir kapšelio formavimasis gimdoje ir po gimdymo (lytinio brendimo metu). Dauguma šių požymių yra antriniai lytiniai požymiai. Testosteronas yra būtinas normaliam spermos vystymuisi. Jis aktyvuoja Sertoli ląstelių, kurios skatina spermatogenezės diferenciaciją, genus (Mooradian et al., 1987).

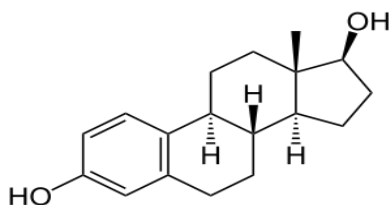
Priklausomai nuo ląstelėse esančių fermentų, testosteronas gali būti metabolizuojamas į du aktyvius metabolitus. Maždaug 5 % testosterono metabolizuoja 5α – reduktazė, redukuodama jį iki 5α – dihidrotestosterono (DHT). Šį fermentą stipriai ekspresuoja patinų lytiniai organai ir plaukų folikulai. Dihidrotestosterono prostatoje yra 10 kartų daugiau nei paties testosterono. Maždaug 0,3 % testosterono metabolizuoja aromatazė, fermentas ekspresuojamas smegenyse, kepenyse ir riebaliniame audinyje, versdama jį į estradiolį (Mooradian et al., 1987). Testosteronas pernešamas į tam tikrus audinius per kraują. Jis susijungia su specifiniais kraujo plazmos baltymais ir lytinis hormonus jungiančiu globuliniu. Svarbiausia šio globulino funkcija yra laisvo testosterono koncentracijos reguliavimas kraujo serume. Keičiantis jo koncentracijai, kinta laisvo testosterono koncentracija.

1.2.2. Testosterono įtaka ruonių elgsenai

Jei patinui trūksta testosterono, jo organizmas deramai nesivysto ir nefunkcionuoja. Tik esant didelėms testosterono koncentracijoms nėštumo metu ir iškart po gimimo, vystosi pirminiai lytiniai požymiai (Arnold and Gorski, 1984; Almeida and De Araújo, 2001). Individai yra ypač jautrūs hormonų organizaciniam poveikiui kritiniais raidos etapais, pvz., perinataliniu periodu (vaisiaus iki gimimo ir ankstyvuju laikotarpiu po gimimo). Jie dalyvauja smegenų pusrutulių vystymesi, taip pat pirminių ir antrinių lytinių organų formavimesi priklausomai nuo

lyties –patinuose vyksta defemenizacija ir maskulinizacija, o patelėse - femenizacija ir demaskulinizacija (Hotchkiss et al., 2003; Wallen and Baum, 2009). Kadangi patelių piene gausu cholesterolio, tai prasčiau išmaitinti jaunikliai gali turėti mažesnius cholesterolio resursus testosterono produkcijai ir prastesnį vyriškų lytinių požymių vystymąsi. Iš to gali sekti išvada, kad pilkųjų ruonių jaunikliai, kurie atsiskiria nuo motinos dar nesibaigus žindymo periodui ir yra sukaupę mažiau energetinių resursų, gali neišgyventi arba sulaukti vėlesnės brandos. Taigi jei patinas vėliau subręsta, jis gali būti mažiau agresyvus bei mažiau aktyvus poravimosi sezonu (Natkevičiūtė, 2012). Atlikta nemažai tyrimų, kurių metu paaiškėjo, kad prasta mityba turi įtakos lytiškai subrendusiems žinduolių patinams. Jie pasižymi žemesne testosterono koncentracija, nei gerai besimaitinantys patinai, taip pat, prastėja sėklidžių funkcija, gametų gamyba, keičiasi seksualinė elgsena ir mažėja reprodukcinis sėkmingumas (Setchell et al., 1965; Howland, 1975; Marcelly de Souza Santos et al., 2004).

1.2.3. Estradiolio funkcijos, sintezė ir metabolizmas



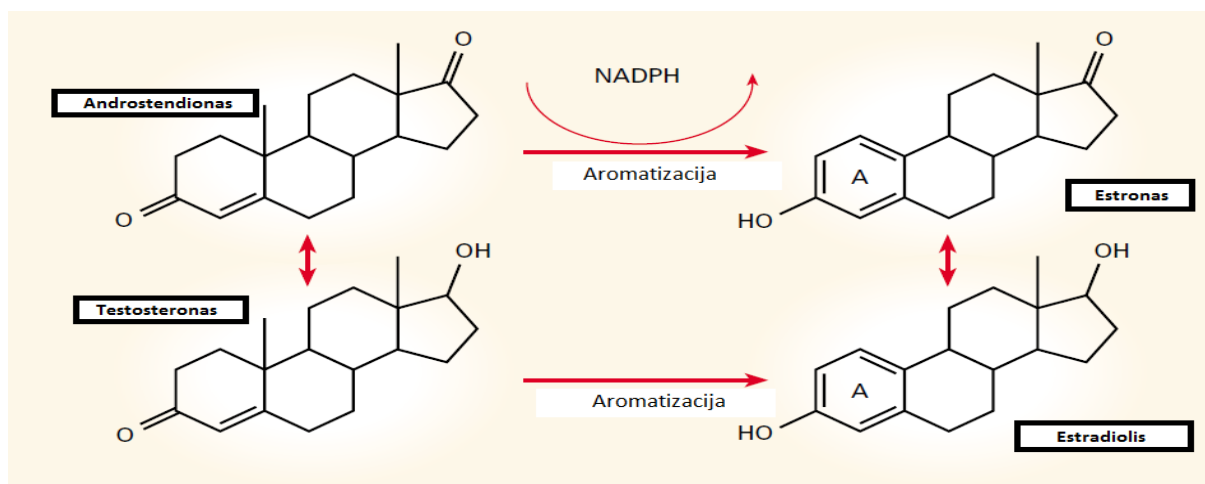
1.4 pav. Estradiolio struktūra.

Estradiolis (E2) – moteriškasis lytinis hormonas (1.4 pav.) Yra trijų rūšių endogeniniai estrogenai. Kiti du estrogeniškai aktyvūs junginiai estronas (E1) ir estriolis (E3) yra estradiolio apykaitos produktai, tačiau estradiolis yra biologiškai aktyviausias estrogenas. Estrogenai nekaupiami, bet tuoj pat išskiriami (Gruber et al., 2002). Kaip ir kiti lytiniai hormonai, kraujyje estradiolis yra konjuguotas su SHBG, lytinius hormonus sujungiančiu globuliniu, o kita dalis hormono yra susijungusi su albuminu ir tik apie 2-3 proc. yra laisvo hormono (Zeginiadou et al., 1997).

Estrogenai turi įtakos beveik visų audinių veiklai, tačiau pagrindinė jų funkcija yra patelių reprodukcinės sistemos augimo ir subrendimo stimuliavimas ir reprodukinių savybių palaikymas. Jie skatina folikulų augimą, gimdos gleivinės vystymąsi, antrinių lytinių požymių formavimąsi ir palaiko nėštumą. Estrogenai yra svarbūs normaliai kaulų mineralinių medžiagų apykaitai. Estradiolis skatina kalcio išsilaikymą kauliniame audinyje. Jis gerina gimdos raumenų apvalkalo augimą. Estradiolis yra būtinas išlaikyti ovocitus kiaušidėje. Liutentinėje

fazėje estradiolis kartu su progesteronu paruošia gimdą implantavimui. Nėštumo metu estradiolio kiekis padidėja dėl placentos gamybos (Lasiuk and Hegadoren, 2007).

Trijose iš eilės hidroksilinimo reakcijose, estronas ir estradiolis susidaro iš jų pirmtakų androstendiono ir testosterono atitinkamai. Visas estradiolio biosintezės kelias pavaizduotas 1.5 pav.



1.5 pav. Estrono ir estradiolio susidarymo schema.

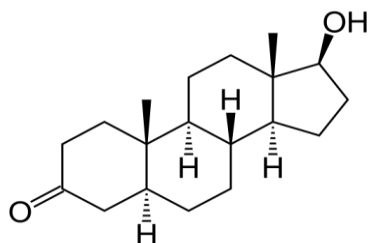
Estradiolis sintetinamas *theca* ir *granulosa* ląstelėse kiaušidėse. Estronas ir estriolis pirmiausia susidaro kepenyse iš estradiolio. Aromatazės veikla taip pat buvo aptikta raumenyse, riebaluose, nerviniame audinyje ir sėklidžių Leidigo ląstelėse. Nėštumo metu estriolis sintetinamas sincitiotrofoblastų placentoje (Gruber et al., 2002). Estradiolis yra taip pat gaminamas arterijų sienelėse, tačiau jis negali būti greitai pernešamas iš kraujotakos sistemos į smegenis (Padridge and Mietus, 1979). Kaip vienas iš dviejų veikliųjų testosterono metabolitų (kitas yra dehidrotestosteronas) gali būti susintetinamas iš šio hormono smegenyse.

Plazmoje estradiolis daugiausia prisijungia prie lytinius hormonus jungiančio globulino, taip pat prie albumino. Kraujyje tik apie 2% yra laisvo ir biologiškai aktyvaus hormono. Inaktyvacija apima vertimą į mažiau aktyvius estrogenus, tokius kaip estronas ir estriolis. Estriolis yra pagrindinis šlapimo metabolitas. Estradiolis yra surišamas kepenyse, formuojantis sulfatui (fermentas – sulfotransferazė) ir gliukuronidui (fermentas – gliukoroniltransferazė) ir tuomet išskiriamas per inkstus (Desta et al., 2012). Kai kurie vandenyje tirpūs junginiai yra išskiriami tulžies latakų ir iš dalies reabsorbuojami virškinimajame trakte po hidrolizės. Ši enterohepatinė cirkuliacija padeda išlaikyti estradiolio kiekį kraujyje.

1.2.4. Estradiolio įtaka ruonių elgsenai

Pilkųjų ruonių patelių reprodukcinė organų sistema skiriasi nuo moterų. Jos turi du gimdos ragus, nėra menstruacijų proceso. Blastocistos implantacija dažniausiai vyksta tame gimdos rage priklausomai nuo to, kurioje pusėje yra ovuliuojanti kiaušidė. Estradiolis veikia kartu su kitu lytiniu hormonu progesteronu. Šie hormonai veikia gimdos proliferaciją liuminaliniame ir liaukiniame audiniuose. Mažesni estradiolio kiekiai gali turėti įtakos sutrikusiam gimdos imlumui ir sutrukdyti sėkmingam blastocistos implantavimosi gimdoje. Estradiolio koncentracija pradeda didėti po implantacijos ir aukščiausia būna jauniklio atsivedimo metu bei žindymo periodu (~400 pmol/l) (Reijnders, 1990).

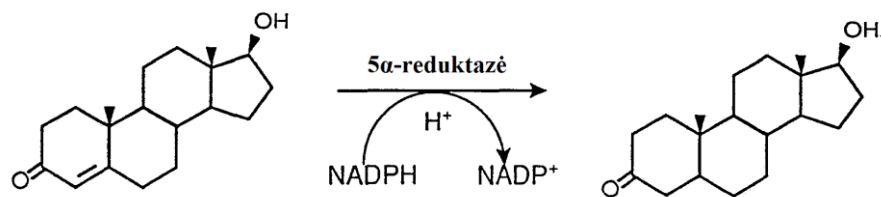
1.2.5. Dihidrotosterono funkcijos, sintezė ir metabolizmas



1.6 pav. Dihidrotosterono struktūra.

Dihidrotosteronas (DHT) (1.6 pav.) yra lytinis steroidas ir androgeninis hormonas. DHT prostatoje, sėklidėse, plaukų folikuluose, ir antinksčiuose iš testosterono sintetina fermentas 5α -aromatazė. Šis hormonas lemia vyrų antrinių lytinių požymių vystymąsi. DHT turi didesnę androgenų receptorių giminingumą nei testosteronas ir antinksčių androgenai. Testosterono disociacija nuo receptoriaus yra penkis kartus greitesnė nei DHT (Grino et al., 1990, Amory et al., 2008). Vykstant embriogenezei DHT atlieka esminį vaidmenį vyrų išorinių lytinių organų formavime vaisiaus vystymosi metu ir po jo. DHT gali slopinti estrogenus trimis būdais: 1) tiesiogiai trukdyti estrogenų gebėjimui veikti audiniuose; 2) slopinti fermentą aromatazė; 3) sumažinti gonadotropino, iš kurio sintetinamos medžiagos, reikalingos estrogenų produkcijai, sekreciją.

Dihidrotosteronas didelėmis koncentracijomis aptinkamas prostatoje ir kituose reprodukcinuose audiniuose (Mooradian et al., 1987). Fermentas 5α -reduktazė redukuoja $4,5$ testosterono dvigubą ryšį ir susidaro DHT (1.7 pav.). Yra dvi fermento izoformos. Abi randamos prostatoje ir kepenyse. Skiriasi jų pH optimumas, jie skirtingai reaguoja į inhibitorius (Carson and Rittmaster, 2003).



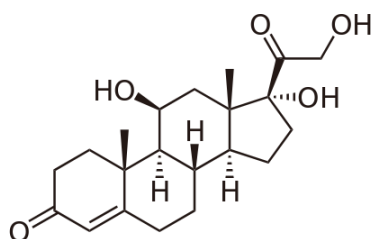
1.7 pav. Dihidrotosterono susidarymo schema.

Skirtingai nuo kitų androgenų, tokių kaip testosteronas, DHT fermento aromatazės negali būti paverčiamas į estradiolį. DHT į 3α-androstanediolį ir 3β-androstanediolį paverčia fermentai 3α-hidroksisteroiddehidrogenazė ir 3β-hidroksisteroiddehidrogenazė atitinkamai (Rizner et al., 2006).

1.2.6. Dihidrotosterono veikla žinduoliuose

Dihidrotosterono įtaka pilkųjų ruonių patinų seksualinei ir socialinei veiklai nebuvo tirta. Tačiau jų kraujyje aptinkamas fermentas 5α-reduktazė, kuris verčia testosteroną į dihidrotosteroną bei pats hormonas. Kadangi steroidinių hormonų veikla pilkuosiuose ruoniuose yra gimininga kitų žinduolių steroidinių hormonų veiklai, galime daryti prielaidą apie dihidrotosterono įtaką ruonių elgsenai. Atlikta tyrimų su kitų žinduolių rūšimis ir nustatytas šio hormono poveikis jų seksualinei elgsenai. Nustatyta, kad kastruotuose triušiuose bei jūrų kiaulytėse dihidrotosteronas atkuria norą poruotis. Kai kuriose pelių rūšyse sisteminiai dihidrotosterono papildai atkuria tokį seksualinį elgesį, koks buvo prieš kastraciją. Šis androgenas taip pat aktyvuoja seksualinį elgesį *macaca mulatta* rūšies beždžionėse (Agmo, 2011).

1.2.7. Kortizolio funkcijos, sintezė ir metabolizmas

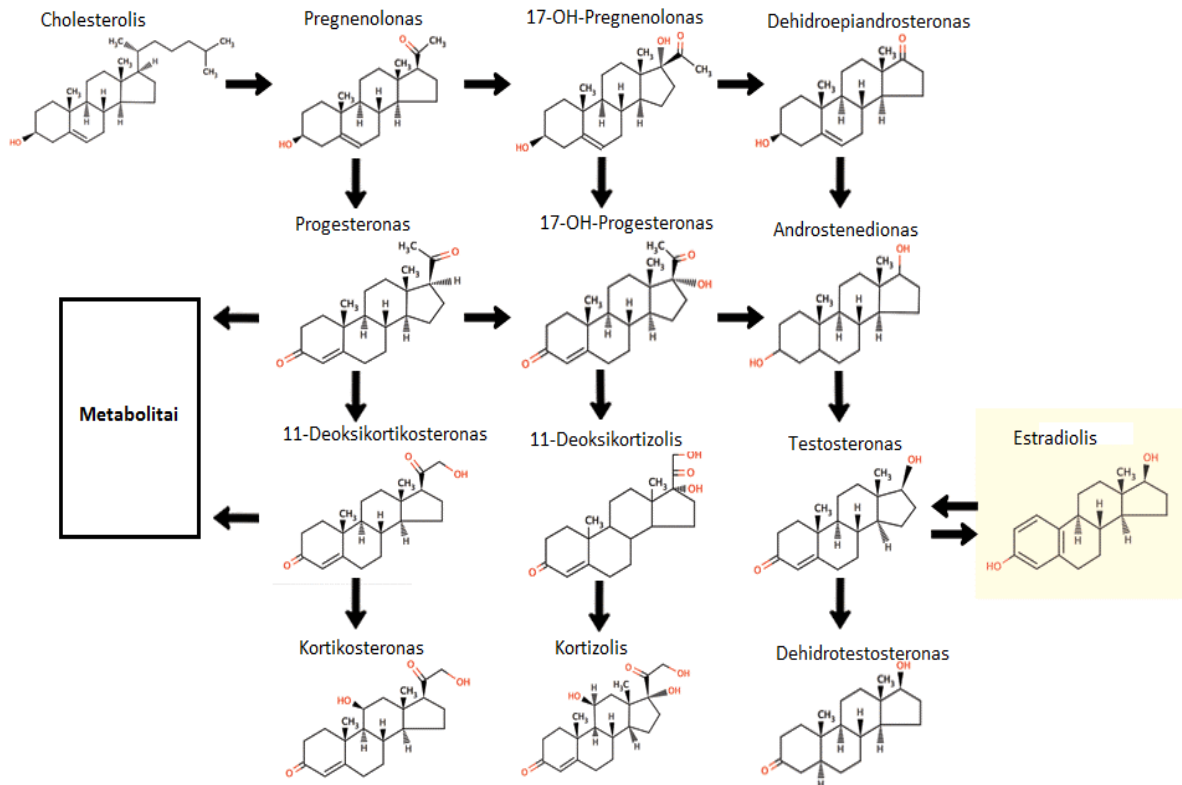


1.8 pav. Kortizolio struktūra.

Kortizolis (1.8 pav.) formaliai daugiau žinomas kaip hidrokortizonas, yra steroidinis hormonas, priskiriamas gliukokortikoidams. Kraujyje kortizolis, kaip ir kiti steroidiniai hormonai, sudaro kompleksus su baltymais. Laisvo, aktyvaus kortizolio kiekis yra tik 8%. Jis padeda reguliuoti arterinį kraujo spaudimą ir yra svarbus normaliai širdies ir kraujagyslių sistemos funkcijai. Kortizolis svarbus organizmo reakcijose į stresą, baltymų, angliavandenių ir riebalų apykaitai organizme (Hoehn and Marieb, 2010).

Kortizolio receptorių daugiausia turi kepenų, inkstų, skersaruožių raumenų, jungiamojo audinio ir limfoidinio audinio ląstelės. Kortizolis yra būtinas organizmo homeostazės palaikymui. Jis vadinamas „streso hormonu“, turi įtakos ir reguliuoja daugelį pokyčių organizme, kurie įvyksta kaip atsakas į stresą. Kepenyse kortizolio-receptorius kompleksas indukuoja gliukoneogenezės genų, todėl daugėja fruktozės-1,6-difosfato ir gliukozės-1-fosfato, taip pat indukuojami aminortransferazių genai. Taigi kortizolis kepenyse aktyvina gliukoneogenezę iš aminorūgščių. Svarbiausias fiziologinis atsakas – veikia priešingai insulinui, didėja gliukozės koncentracija kraujyje. Raumenyse, jungiamajame ir limfiniame audiniuose kortizolis slopina genų ekspresiją, o raumenyse slopina baltymų sintezę. Šio reiškinio fiziologinis atsakas – padidėjusi aminorūgščių koncentracija kraujyje. Jungiamajame audinyje kortizolis slopina kolageno sintezę, o limfiniame audinyje – antikūnų sintezę. Pastarojo reiškinio fiziologinis atsakas – uždegiminių reakcijų slopinimas. Kortizolis žinomas kaip pats stipriausias prieš uždegiminius preparatus (Coderre et al., 1991; Djurhuus et al., 2002).

Kortizolis gaminamas antinksčių žievėje iš cholesterolio. Citochromas P450 kerpa cholesterolį ir susidaro pregnenolonas. Toliau vyksta eilė reakcijų ir paskutiniame etape, iš 11-deoksikortizolio, veikiant fermentui 11 β -hidroksilazei, susidaro kortizolis (Craigie et al., 2009). Kortizolį metabolizuoja 11 β -hidroksisteroido dehidrogenazės sistema (11 β -HSD), kuri susideda iš dviejų fermentų: 11 β -HSD1 (1 tipo) ir 11 β -HSD2 (2 tipo) dehidrogenazių. 11 β -HSD1 naudoja kofaktorių NADPH ir verčia biologiškai inertišką kortizoną į biologiškai aktyvų kortizolį. 11 β -HSD2 naudoja kofaktorių NAD⁺ ir verčia kortizolį į kortizoną. Taigi, 11 β -HSD1 didina aktyvaus kortizolio koncentracijas tam tikrame audinyje, tuo tarpu 11 β -HSD2 mažina jas (Tomlinson et al., 2004). Taip pat fermentai 5 α -reduktazė ir 5 β -reduktazė metabolizuoja kortizolį į 5 α -tetrahidrokortizolį ir 5 β -tetrahidrokortizolį atitinkamai (Craigie et al., 2009). Specifinė biosintezė žinduoliuose pateikiama 1.9 pav.



1.9 pav. Steroidinių hormonų biosintezės kelias.

1.2.8. Streso įtaka

Stresas apibūdinamas kaip vidinės įtampos būseną – fizinę ir psichinę organizmo įtampą, reakcija į slegiančias situacijas, keliančias grėsmę individo gerovei, sveikatai ar gyvybei. Gyvūnuose streso modelis yra suskirstytas į tris pagrindines stadijas: stresoriaus atpažinimą, biologinį atsaką prieš stresorių ir pasėkmes, galinčias pakenkti organizmo homeostazei (Moberg, 2000). Nepakankama mityba, badavimas veikia kaip stresoriai (Matteri et al., 2000). Kortizolis turi didelės įtakos poravimosi metu slopindamas individų elgseną. Patinuose jo įtakas pasireiškia testosterono koncentracijos sumažėjimu. Kai kurie tyrimai parodė, kad gliukokortikoidų veiksmas reprodukcinei funkcijai yra slopinami poravimosi metu kaip atsakas į stresą, kuris skatina individus daugintis stresinėse aplinkose (Lidgard et al., 2008). Žemiausią rangą užimantys patinai pasižymi mažiausiu testosterono kiekiu kraujyje ir didžiausiu kortizolio kiekiu. Tuo tarpu aukščiausio rango patinai poravimosi metu nesimaitina, todėl badavimas veikia kaip stresoriai ir skatina kortizolio sintezę (Rommerts, 2004). Taigi streso metu, badaujant, kovojant dėl patelių, poliginiški pilkųjų ruonių suaugę patinai yra prisitaikę išlaikyti lytinį aktyvumą, o jaunikliai – palaikyti normalią lytinę diferenciaciją. Tačiau dar nėra nustatyta, ar prastesnė mityba turi įtakos testosterono koncentracijai jauniklių kraujyje.

1.3. Mėginio paruošimas analizei

Svarbi problema dirbant su laukinių žinduolių krauju yra mėginių paėmimas, todėl mėginiai dažnai yra riboto tūrio. Imant kraują iš jauniklių būtina nuraminti ne tik juos, bet ir jų motinas. Taip pat didelė problema yra ekstremaliai lipemiški plazmos mėginiai (Speake et al., 1999), su kuria būtent ir susiduriama tiriant ruonių, ypač jų jauniklių, plazmą. Kaip minėta anksčiau, jie yra maitinami riebiu motinos pienu, turinčiu apie 60 proc. riebalų. Tokie lipidai kaip riebalai (triacilgliceroliai, trigliceridai), laisvos riebalų rūgštys (RR), fosfolipidai, cholesterolis gali trukdyti imuno-, radioimunoanalizei, dujų bei skysčių chromatografijai (Rash et al., 1980; Jawad et al., 1981). Imunoanalizėje svarbu pašalinti medžiagas, kurios gali sąveikauti su antikūnais. Chromatografiniuose metoduose ekstrakcija itin svarbi norint neužteršti ir neperkrauti chromatografinės kolonėlės. Todėl atskirti steroidus iš plazmos ir audinių mėginių nuo lipidų ir kitų trukdančių medžiagų yra labai svarbu, norint gauti tikslius bei patikimus rezultatus. Nustatant steroidų koncentraciją, ypač audiniuose, mėginio paruošimas yra kritinis žingsnis prieš bet kokią analizę ir turi tiesioginę įtaką rezultatų tikslumui ir glaudumui (Chard, 1995). Taigi šių mėginių analizei reikalingas griežtas ir daugiaetapis mėginio paruošimas (Koren et al., 2012).

1.3.1. Skysčių-skysčių ekstrakcija organiniais tirpikliais

Steroidams ekstrahuoti iš mėginių tradiciškai naudojami įvairūs organiniai tirpikliai (pvz., dichlorometanas, dietilo eteris, etilo acetatas, heksanas). Tačiau norint pasirinkti tinkamą ekstrakcijos metodą reikia atsižvelgti į daug faktorių. Šie faktoriai apima steroidų koncentracijos matavimą, tyrimų rūšį, lytį, sezoną, reprodukcinę būseną ir mėginio tipą (audinys, plazma ar serumas). Ekstrakcija vien organiniais tirpikliais galima mėginiuose, kuriuose yra mažai lipidų (Soma and Wingfield, 2001) ar imunoanalizėse, kuriose reikalingi labai maži mėginio kiekiai. Tačiau plazmos / serumo mėginiuose arba audinių mėginiuose, kuriuose yra didelis lipidų kiekis, ekstrakcija organiniais tirpikliais gali sąlygoti mažą atkuriamumą (O'Grady, 1968), kintamą atkuriamumą (Fuqua et al., 1995) arba nevisišką trukdančių medžiagų pašalinimą. Svarbu tai, kad organinių tirpiklių ekstrahavimo veiksmingumas turėtų būti nustatomas empiriškai kiekvienu atveju atskirai. Kitas veiksnys yra tas, kad steroidų ekstrakcijoje naudojami organiniai tirpikliai dažnai yra labai reaktyvūs arba labai degūs. Pavyzdžiui, dichlorometanas (DCM) yra chlororganinis junginys, pasižymintis kancerogeninėmis savybėmis, dietilo eteris yra labai lakus ir degus (Newman et al., 2010).

1.3.2. Kietafazė ekstrakcija

Plazmos arba serumo mėginius galima ekstrahuoti naudojant kietafazę ekstrakciją (SPE) su komerciškai prieinamomis C₁₈ kolonėlėmis. SPE metodu gaunamos geros išgavos ir atsikartojamumas, ji plačiai naudojama ekstrahuoti junginiams, esantiems sudėtingoje matricoje. Šiuo metodu efektyviai galima atskirti steroidus nuo sąveikaujančių molekulių, net kai ekstrahuojama iš daug lipidų turinčios plazmos ir smegenų audinių. Duomenys rodo, kad SPE yra pranašesnė už organinių tirpiklių ekstrakciją keletu aspektų. SPE yra gana paprasta atlikti laboratorijoje, o reikalingos medžiagos yra komerciškai prieinamos. Kietafazėje ekstrakcijoje kieto sorbento medžiaga, dažniausiai alkilu surištas silicio dioksidas, yra supakuota į kolonėlę. Santykinai nepolinių junginių ekstrakcija (pvz., steroidų) iš polinių matricų (pavyzdžiui, vandens) reikalauja kieto sorbento, kuriame yra nepolinės oktadecilo (C₁₈) funkcinės grupės, prijungtos prie silicio dioksido. Gali būti naudojami ir kiti sorbentai, pvz., turintys aminopropilo grupes (Newman, 2008).

Kietafazės ekstrakcijos metu steroidai susijungia su C₁₈ grupėmis, esančiomis sorbente, o pašaliniai poliniai junginiai eliuojami iš mėginio matricos. SPE eigos protokolas su C₁₈ šerdelėmis susideda iš septynių pagrindinių veiksmų:

- 1) šerdelės kondicionavimo (kolonėlė plaunama organiniais tirpikliais);
- 2) pusiausvyros pasiekimo (vanduo prateka per kolonėlę, kad paruoštą sorbentą mėginio pakrovimui);
- 3) mėginio pakrovimo (mėginiai, esantys vandeninėse matricose, praleidžiami per kolonėlę);
- 4) trukdančių medžiagų pašalinimo (vanduo tekėdamas per kolonėlę išplauna polines medžiagas);
- 5) mėginio eliucijos (steroidai yra išplaunami iš kolonėlės su nedideliu kiekiu eliuento į stiklinius buteliukus);
- 6) džiovinimo (eliuatas yra džiovinamas ore arba azoto dujų aplinkoje);
- 7) suspendavimo (sausieji eliuatai ištirpinami reikiamame tirpiklyje).

Ekstrakcijos atkuriamumas visuomet įvertinamas į mėginius pridėjus žinomos koncentracijos tiriamosios medžiagos. Labai svarbu pasirinkti tinkamą tirpiklį eliucijai, norint padidinti ekstrakcijos efektyvumą (Newman, 2008). Newman taip pat nustatė, kad steroidų eliucija per C₁₈ šerdeles su 90 % švarumo metanoliu dejonizuotame vandenyje pasiekia geriausią pakartojamumą. Metanolis suformuoja vandenilinius ryšius su silicio oksido paviršiumi ir nutraukia Van der Waals (Van der Waals) ryšius tarp steroidų ir C₁₈ sorbento.

Todėl tai puikiai tinkamas tirpiklis nepolinėms analitėms, tokioms kaip steroidiniai hormonai, išskirti. Tirpiklio reguliavimas gali nulemti, kuri analizė bus išplauta. Pavyzdžiui, plaunant su mažesniu procentiniu metanolio kiekiu vandenyje, galima specifiškai išplauti sulfuotus steroidus, o nekonjuguotus steroidus palikti (Liere et al., 2004). Kiti nepoliniai tirpikliai, pavyzdžiui, acetonitrilas ir etilo acetatas, taip pat gali gerai veikti su nepolinėmis, lipofilinėmis analitėmis ir turėtų būti nagrinėjami tolimesniuose tyrimuose. Ng ir Yuen (Ng and Yuen, 2003) ekstrahavo testosteroną iš plazmos su dichlorometano / 2,2,4-trimetilpentano mišiniu (3:2, v/v) bei pasiūlė naudoti 0,02 M natrio dihidrogenfosfato / acetonitrilo / metanolio mišinio (51:47:2, v/v) pH 3.1 mobilią fazę su C₁₈ šerdelėmis.

Rečiau yra naudojamos aminopropil-[(SiO₂)_x-(CH₂)₃NH₂]- sorbentu pakrautos kolonėlės. Polimeriškai surišta, vidutiniškai polinė, silicio pagrindu surišta kieta fazė, turinti silpnai bazinį paviršių, leidžia tiek normalių fazių ekstrakciją, tiek atvirkščių fazių ekstrakciją. Poliniai sorbentai dažnai naudojami matricos įtakai pašalinti. Sulaikomi hidrofiliniai matricos komponentai, o analizės eliuojamos. Tarp sorbento ir sulaikomos medžiagos atsiranda vandeniliniai ryšiai, pasireiškia dipolių, π-π, indukuotų dipolių sąveika (Vičkačkaitė, 2008). Sorbentas gali būti naudojamas kaip polinis sorbentas, pasižymintis skirtingu selektyvumu rūgštinėms / bazinėms analitėms arba silpniems anijonų mainams vandeninėje terpėje, kai pH 8,0 ir mažesnis. Pritaikymas taip pat apima naftos produktų frakcionavimą, sacharidų, vaistų, metabolitų, fenolių ir fenolio pigmentų ekstrakciją.

1.4. Analitiniai metodai steroidiniams hormonams nustatyti

Daugybė pastangų įdėta siekiant surasti jautrius detekcijos metodus steroidų nustatymui kraujyje, šlapime, seilėse ir kituose fiziologiniuose mėginiuose. Steroidiniams hormonams plazmoje ir serume nustatyti šiuo metu plačiai naudojama imunoanalizė, radioimunoanalizė, efektyvioji skysčių chromatografija, taip pat dujų chromatografija. Paskutiniaisiais metais didelis dėmesys skiriamas skysčių chromatografijai-masių spektrometrijai bei dujų chromatografijai-masių spektrometrijai (Ng and Yuen, 2003).

Wilke ir kt. (Wilke et al., 1987) pateikė metodus, kuriais galima greitai išmatuoti testosterono koncentraciją naudojant radioimunoanalizę. Wintersteiger ir Sepulveda (Wintersteiger and Sepulveda, 1993) naudojo elektrocheminį aptikimo metodą su pakankamai geru jautrumu (12,5 ng/ml) ir atsikartojamumu (85,7–96,9 %). Šis metodas susidėjo iš kietafazės ekstrakcijos, derivatizacijos bei kolonės perjungimo, tačiau nepasižymėjo dideliu

tikslumu ir atsikartojamumu. Be to, elektrocheminiai metodai dažnai susiduria su bazinės linijos stabilumu.

1.4.1. Imunoanalizė

Steroidų analizavimas imunoanalizininiais metodais yra labai dažnas, norint nustatyti endokrininės sistemos būseną. Pvz., kortikosterono ir lytinių hormonų koncentracija dažnai matuojama norint įvertinti streso fiziologiją (Newman and Soma, 2006; Romero et al., 2006) ir reprodukcinę būseną įvairiose gyvūnų rūšyse (Williams et al., 2005). Šie metodai itin patrauklūs klinikinėse laboratorijose dėl paprastumo, greitumo ir analitinio jautrumo. Tačiau, naudojant imunoanalizę, vyksta kryžminės antikūnų reakcijos su struktūriškai panašiais junginiais (Ismail et al., 2002). Koncentracijos keičiasi priklausomai nuo naudojamų antikūnų (Wilke and Utley, 1987). Tai ypač problematiška, kai analizuojamos molekulės, turinčios panašią struktūrą, pvz., testosteronas ir dihidrotestosteronas struktūriškai yra beveik identiški ir skiriasi tik dvi vandenilio atomais. Klinikinėse laboratorijose naudojami automatiniai analizatoriai arba komerciniai, antikūnų pagrindu sukurti rinkiniai ELISA ir RIA, kurie yra lengvai prieinami ir gana paprasti naudoti. Tačiau vienas rinkinys skirtas matuoti tik vienam hormonui, todėl tą patį mėginį būtina padalinti į kelias dalis. Taigi reikia tiek skirtingų rinkinių, kiek hormonų norime matuoti.

1.4.1.1. Problemos naudojant imunoanalizę

Nepaisant imunoanalizės metodo analitinio jautrio ir matavimų, kuriems dažnai nereikia ypatingos išankstinės ekstrakcijos, paprastumo, imunoanalizės nėra pakankamai specifinės ir tikslios. Specifiškumas priklauso ne tik nuo antikūno gebėjimo prisijungti prie antigeno, bet taip pat nuo mėginyje esančio antigeno ir jo matricos, reagentų sudėties ir imunoanalizės formato (Krasowski et al., 2014). Medžiagos, kurios keičia išmatuojamos analizės koncentraciją mėginyje arba keičia antikūnų prijungimą, gali lemti analizės trukdžius. Analitiniai trukdžiai yra apibrėžiami kaip medžiagų, esančių mėginyje, poveikis, kuris daro įtaką teisingai rezultato reikšmei. Atsiradęs trukdis gali būti priklausomas arba nepriklausomas nuo analizės. Nepriklausomi trukdžiai susiję su bendrais hemolizės, lipemijos trukdžiais ir su antikoagulantų poveikiu bei mėginių saugojimu, bet nepriklauso nuo analizės koncentracijos. Nuo analizės priklausomi imuniniai trukdžiai nurodo trukdžius tarp sudedamųjų dalių sąveikos mėginyje su vienu arba daugiau reagentų antikūnų. Jie apima junginius su cheminiais skirtumais, tačiau struktūriniais panašumais, kurie kryžmiškai reaguoja su antikūnu,

heterofiliniais antikūnais, žmogaus anti-gyvūnų antikūnais, autoanalitiniais antikūnais, reumatoidiniais faktoriais ir kitais baltymais (Schiettecatte et al., 2012).

Trukdžiai gali lemti klaidingai didesnę arba klaidingai mažesnę analitės koncentraciją, priklausomai nuo imunoanalizės reakcijos trukdžių vietos. Jie gali pasireikšti prieštaringais rezultatais vienai arba kelioms analitėms ir gali būti aptikti vienoje arba keliose analizės sistemose, kurios yra paveiktos analitės. Poveikio dydis priklauso nuo trukdančios medžiagos koncentracijos, bet nebūtinai yra tiesiogiai proporcingas. Trukdžiai veikia platų imunoanalizės analičių spektrą, įskaitant hormonų, naviko žymenų, narkotikų, širdies troponino ir mikrobu serologinius tyrimus. Svarbu atpažinti potencialius imunoanalizės trukdžius ir išsiaiškinti ar procedūros tinkamos atitinkamoms analitėms nustatyti (Tate and Ward, 2004).

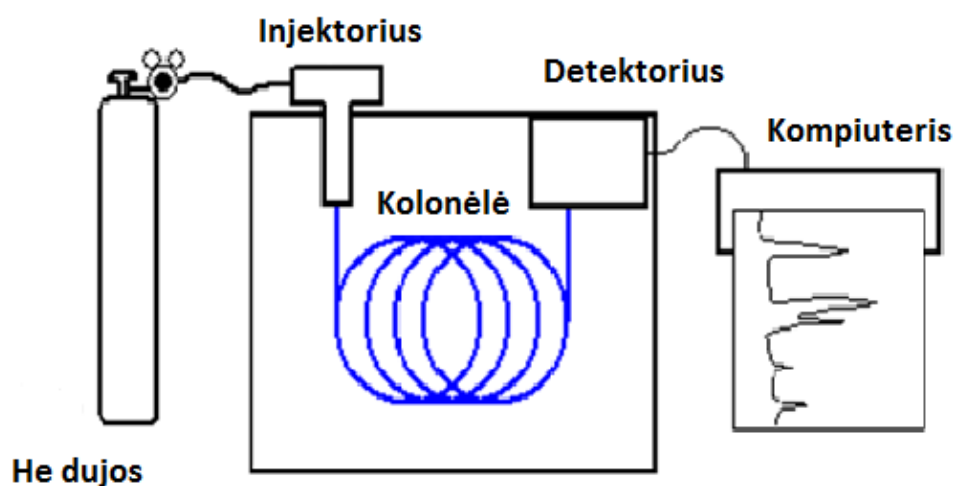
Hormonus prijungiantys baltymai gali keisti analitės koncentraciją mėginyje, pašalindami arba blokuodami analitę. Pavyzdžiui, steroidiniai hormonai gali prisijungti prie lytinius hormonus surišančio globulino arba kortizolis gali prisijungti prie kortizolį surišančio globulino ir sumažinti laisvos analitės koncentraciją. Kortizolio prisijungimas gali būti sumažintas denatūravus jį surišantį baltymą arba pridėjus blokuojančio reagento. Išstūmus analitę iš endogeninių hormonų jungiančių baltymų, galima paveikti tyrimo pusiausvyrą ir sumažinti arba padidinti analitės koncentraciją. Tai galima pasiekti naudojant atitinkamus buferinius tirpalus (Shrivastav, 2002).

1.4.2. Dujų chromatografija / masių spektrometrija

Dujų chromatografija yra chromatografinis skirstymo metodas, kuriame judri fazė yra dujos (pvz., argonas, helis, azotas). Naudojant dujų chromatografą kartu su masių spektrometru nešančiomis dujomis dažniausiai pasirenkami helis arba vandenilis. Šis metodas dažnai naudojamas, nes yra greitas, patogus ir juo galima nustatyti keletą analičių vienu metu. Šiam tikslui turi būti pasirinktas temperatūrinis gradientas, kad skirtingų virimo temperatūrų junginiai išeitų skirtingu laiku. Chromatografiškai išskirstytos medžiagos nustatomos masių spektrometru. Dujų chromatografijoje naudojami įvairūs masių spektrometrai, kurie pasirenkami priklausomai nuo analizuojamų medžiagų. Šiame darbe buvo naudotas masių spektrometrinis detektorius (MSD), kuriuo galima nustatyti cheminių junginių struktūrą, kai ji nėra žinoma. Masės spektrometrų veikimas pagrįstas tiriamų molekulių jonizacija, defragmentacija bei gautų molekulių fragmentų rūšiavimu pagal masės ir krūvio santykį. Gautų rezultatų analizė ir junginių identifikavimas vyksta gautų masės spektrų palyginimu su kompiuterine masės spektrų duomenų baze. Su šiuo detektoriumi galima registruoti bendrą jonų

srautą (TIC), o tuomet pasirinkti registruoti intensyviausius junginių molekulinis jonus (SIM) (Hübschmann, 2015).

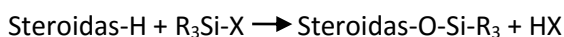
Analizuojamų medžiagų koncentracijos dažnai yra per mažos, o mėginių matricos (pvz., plazmos ar serumo) yra sudėtingos, kad juos būtų galima analizuoti tiesiogiai. Mėginio paruošimas dažnai tampa ilgiausia ir sudėtingiausia analizės stadija, užimančia iki dviejų trečdalių bendros analizės trukmės ir didžiąją dalimi nulemiančia analizės paklaidas. Todėl labai svarbu parinkti tinkamą mėginio paruošimo būdą, įgalinantį kuo greičiau, lengviau bei pigiau atlikti analizę. Dujų chromatografija / masių spektrometrija gerai tinka daugeliui steroidų ir jų metabolitų nustatyti dėl savo aukšto chromatografijos rezoliucijos pajėgumo ir atkuriamo jonizacijos efektyvumo. Tačiau jos sėkmė dažnai priklauso pirmiausia nuo derivatizacijos procedūrų, atliekamų prieš mėginio injekciją. Derivatizacijos metu yra keičiamos funkcinės grupės, modifikuojant jas į junginį, labiau tinkamą DC / MS analizei. Yra didinamas junginio lakumas ir / ar terminis stabilumas. Nors derivatizacija gali užimti daug laiko, ji leidžia sėkmingai atskirti polinius ir nepolinius steroidus. Nors karbonilo grupės paprastai nekelia analitinio iššūkio DC / MS analizei, hidroksilo grupės reikėtų modifikuoti. Kadangi steroidai turi įvairius karbonilo ir hidroksilo grupių derinius, išsami įvairių steroidų analizė priklauso nuo selektyvios hidroksilo grupių derivatizacijos. Pasirinktos derivatizacijos taikymas leidžia sumažinti artefaktus ir nepageidaujamus derivatizacijos produktus (Budzinski et al., 2006).



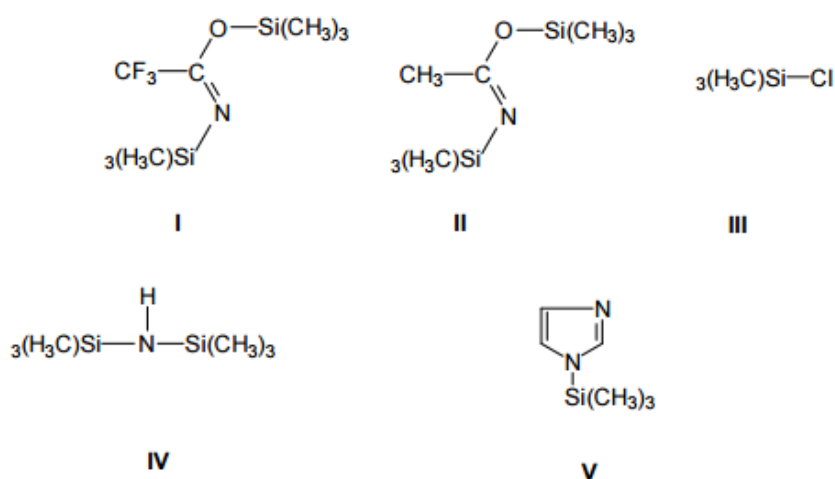
1.10 pav. DC/MS supaprastinta schema

1.5. Steroidų derivatizacija dujų chromatografijai

Dauguma junginių, tokių kaip angliavandeniai ir steroidai dėl savo dydžio ir poliškumo nėra tinkami tiesiogiai analizuoti dujų chromatografu. Todėl juos reikia derivatizuoti, norint padidinti jų lakumą ir / arba tirpumą. Derivatizacijai dažnai naudojami sililinantys junginiai, kurie padeda peržengti esančias ribas, suformuodami alkilsililiderivatus ir pakeisdami aktyvius protonus -NH, -OH arba -SH grupėse. Reakcijos laikas ir temperatūra yra svarbiausios sąlygos steroidų derivatizacijoje, siekiant išvengti nepageidaujamos derivatizacijos bei perversi junginį į norimą formą (dažniausia temperatūra yra 60–70 °C, reakcijos laikas 30–90 min). Be to, norint pagerinti derivatizacijos procesą galima padaryti keletą kitų pakeitimų: keisti tirpiklius ir naudoti alternatyvius šildymo būdus, pavyzdžiui, mikrobangomis. Akivaizdu, kad siekiant efektyvios derivatizacijos, reikėtų naudoti patobulintus optimizuotus metodus. Bendra derivatizacijos procedūra gali būti užrašyta:



Ši reakcija normaliai vyksta net ir kambario temperatūroje. Sililo grupių įvedimas padidina lakumą ir pagerina terminį derivatų stabilumą. Heksametildisilazanas (HMDS) (IV) ir trimetilchlorosilanas (TMCS) (III), buvo du pirmieji reagentai, naudojami sililinimui. Paskui buvo surasta daugiau pagerintų ir specializuotų reagentų, pavyzdžiui, BSTFA (N, O-bis(trimetilsilil) trifluoracetamidas) (I), BSA (N,O-bis(trimetilsilil)acetamidas) (II) ir TMSI (trietilsililimidazolas) (V), kurie dabar yra komerciškai prieinami (1.11 pav.). TMCS yra dažnai naudojamas kaip katalizatorius kartu su kitais reagentais ir taip didina derivatizacijos efektyvumą. Dauguma sililinimo reagentų jautriai reaguoja į drėgmę, todėl visas praktinis darbas turėtų būti atliekamas sandariai uždarytuose stikliniuose buteliukuose, naudojant bevandenius tirpiklius, kad būtų išvengta hidrolizinio poveikio. Sililinimo reagentai dažnai gali būti naudojami taip pat kaip reakcijos terpės, nepridedant kitų tirpiklių. Kai tirpikliai reikalingi arba pageidaujami, piridinas yra populiarus pasirinkimas dėl savo katalizinių savybių ir gebėjimo veikti kaip HCl akceptorius reakcijose, kuriose dalyvauja organiniai chlorsilantai. Kiti naudojami tirpikliai yra dimetilsulfoksidas, dimetilformamidas ir tetrahidrofuranas (Umea Universitet, 2010).



1.11 pav. Populiarūs sililavimo reagentai.

Budzinski ir kolegos ištyrė įvairių sililinančių reagentų efektyvumą. Buvo naudoti: MSTFA (N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamidas), BSTFA, PFPA (pentafluoropropioninės rūgšties anhidridas), TMCS. Optimizavus sąlygas nustatyta, kad didžiausia reakcijos išeiga susidaro naudojant MSTFA / merkaptoetanolio / amonio jodido mišinį, esant 60 °C temperatūrai ir kaitinant 30 min. Delgado su bendraautoriais pasiūlė panašų derivatizacijos metodą – naudoti MSTFA / NH₄I / ditioeritritolio (1000:2:4) (v/w/w) mišinį. Reakcijos mišinys taip pat kaitintas 60 °C temperatūroje 30 min. Dabartiniai DC / MS tyrimai steroidų analizei skirti aptikti iš karto kelias analites, orientuojantis į mažas giminingų steroidų grupes ar konkrečių steroidų klases. Tačiau nustatytų standartinių metodų protokolų trūkumas patikimai steroidų derivatizacijai dažnai atgraso nuo steroidų analizės DC / MS (Bowden et al., 2009).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Medžiagos

Amonio jodidas (Sigma Aldrich, Vokietija);
chloroformas (Roth, Vokietija);
dejonizuotas vanduo;
dietylo eteris (Sigma Aldrich, Vokietija);
dihidrotosteronas (Dr. Ehrenstofer, Vokietija);
ELISA rinkiniai (IBL, Šveicarija);
estradiolis (Dr. Ehrenstofer, Vokietija);
etilo acetatas (Roth, Vokietija);
kortizolis (Dr. Ehrenstofer, Vokietija);
metilo alkoholis (Roth, Vokietija);
merkaptioetanolis (Sigma Aldrich, Vokietija);
natrio acetatas (Roth, Vokietija);
testosteronas Dr. Ehrenstofer (Vokietija);
N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoractamidas 97% (Acros Organics, Belgija);
žmogaus kraujo serumas neturintis steroidų (IBL, Šveicarija).

2.1.1. Tyrimo objektas

Ruonių kraujo plazmos (2012 metais) ir serumo (2013 metais) mėginiai surinkti St. Andrews universiteto, Jūrinių tyrimų instituto („Sea Mammal Research Unit“) mokslinių tyrimų bazėje, Island of May saloje, Škotijoje. Mėginiai rinkti spalio, lapkričio ir gruodžio mėnesiais – pilkųjų ruonių veisimosi Šiaurės jūroje periodu. Kraujo mėginiai buvo renkami iš jauniklių nugarinės venos naudojant sterilias adatas į vienkartinius mėgintuvėlius, padengtus EDTA (etilendiamintetraacetato) koaguliantu plazmai ir į niekuo nepadengtus mėgintuvėlius serumui. Prieš surenkant kraują jaunikliams buvo suleidžiama 0,025 – 0,075 ml (priklausomai nuo amžiaus ir kūno masės) tiletamino hipochlorido ir zolazepamo hipochlorido tirpalo (Zoletil, Virbac). Mėginiai nuo surinkimo iki centrifūgavimo laikyti kambario temperatūroje (iki 8 val.). Nucentrifuguota plazma arba serumas išskirstyti į sterilius 2 ml talpos mėgintuvėlius ir užšaldyti -20 °C temperatūroje iki analizės. Mėginiai iš pilkųjų ruonių jauniklių buvo imti 2-4 kartus veisimosi sezonu, skirtingais jų ankstyvojo vystymosi periodais. Kiekvieno tirto individo buvo registruojama kūno masės, ilgio ir pločio parametrai, mėginių ėmimo specifika, motinos kūno parametrai, data, laikas.

Iš viso išanalizuoti 57 mėginiai: 33 mėginiai ELISA metodu (2.1 lentelė), 24 mėginiai DC/MS sistema. Visų individų tirtų DC/MS sistema amžius ir vystymosi stadija buvo panašūs, jaunikliai buvo atjunkyti, priklausė V vystymosi stadijai, todėl pateikiama tik jauniklių lytis (3.2 pav.).

2.1 lentelė. ELISA metodu tirti ruonių jauniklių plazmos mėginiai. M-patinas, F-patelė.

| Žymėjimas | Data | Lytis | Kūno masė (kg) |
|-----------|------------|-------|----------------|
| 45251 | 2012-11-11 | M | 41,40 |
| 45251 | 2012-11-23 | M | 39,60 |
| 45410 | 2012-10-30 | M | 30,00 |
| 45410 | 2012-11-07 | M | 47,80 |
| 45410 | 2012-11-26 | M | 39,00 |
| 51115 | 2012-10-27 | M | 23,80 |
| 51115 | 2012-11-07 | M | 50,20 |
| 51115 | 2012-11-15 | M | 48,40 |
| 57045 | 2012-11-15 | F | 41,60 |
| 57062 | 2012-10-30 | F | 29,00 |
| 57062 | 2012-11-28 | F | 39,00 |
| 58038 | 2012-10-26 | F | 25,20 |
| 58038 | 2012-11-06 | F | 49,20 |
| 58785 | 2012-11-01 | F | 21,80 |
| 58785 | 2012-11-11 | F | 42,80 |
| 58785 | 2012-11-18 | F | 38,80 |
| 58785 | 2012-11-28 | F | 33,00 |
| 72146 | 2012-12-02 | M | 21,00 |
| 72146 | 2012-11-10 | M | 38,00 |
| 3U | 2012-11-03 | F | 20,80 |
| 3U | 2012-12-01 | F | 30,60 |
| 72448/9 | 2012-11-11 | M | 37,80 |
| 72448/9 | 2012-11-22 | M | 41,40 |
| D8 | 2012-11-03 | M | 25,00 |
| D8 | 2012-11-14 | M | 46,60 |
| D8 | 2012-11-23 | M | 44,40 |
| OH | 2012-11-04 | F | 21,80 |
| OH | 2012-11-17 | F | 40,00 |
| OJ | 2012-11-06 | F | 35,80 |
| PFT | 2012-10-27 | F | 23,00 |
| 54015 | 2012-11-21 | F | 41,20 |
| 6J | 2012-10-26 | F | 24,00 |

2.2. Metodai

2.2.1. Mėginio paruošimas ELISA analizei

Steroidai iš 1 ml plazmos ekstrahuoti dietilo eteriu santykiu 1:5 (v:v). Užpiltas tirpiklis ir mėginiai purtyti 10 min, nucentrifuguoti, organinis sluoksnis surinktas. Procedūra kartota 3 kartus. Dietilo eteris nugarintas ir sausi ekstraktai užpilti steroidų neturinčiu žmogaus kraujo serumu. Toliau atlikta ELISA analizė.

2.2.2. Mėginio paruošimas DC-MS analizei

Mėginio paruošimas DC / MS analizei susidėjo iš dviejų etapų. Pirmojo etapo metu steroidai iš 2-3 ml plazmos ekstrahuoti dietilo eteriu santykiu 1:5 (v:v), sumaišyti ir palikti pastovėti 15 min. Po to nucentrifuguoti ir organinis sluoksnis surinktas. Procedūra kartota kelis kartus. Dietilo eteris nugarintas ir palikta 100 µl visų frakcijų mėginio tūrio. Antras etapas buvo mėginių kietafazė ekstrakcija. Ekstraktas užpiltas 1,9 ml 0,01 M natrio acetato buferiu, pH 5,0 ir tirpintas ultragarso vonelėje 30 min, šildant 30 °C temperatūroje.

2.2.3. Kietafazė ekstrakcija

Kietafazė ekstrakcija atlikta VDU Biochemijos ir biotechnologijų katedroje naudojant kietafazės ekstrakcijos vakuuminį kolektorių „Supelco Visiprep™“ (JAV) ir 3 ml tūrio 200 mg C₁₈ sorbento KFE šerdeles „Thermo Scientific“ (JAV) bei 6 ml tūrio 500 mg LC-NH₂ sorbento KFE šerdeles „Sigma Aldrich“ (Vokietija).

Kietafazės ekstrakcijos eiga, naudojant C₁₈ šerdeles.

1. Šerdelės praplovimas. 3 ml metanolio leidžiama per šerdelę vakuumu, tuomet šerdelė plaunama 2 ml bidistiliuoto vandens.
2. Mėginio užnešimas. 2 ml pasiruošto ekstrakto natrio acetato buferyje yra užnešamas ant šerdelės ir vakuumuojama, išbėgęs tirpalas surenkamas į atliekas.
3. Labai polinių junginių plovimas. Likę kolonėlėje trukdantys labai poliniai junginiai nuplaunami 3 ml bidistiliuoto vandens. Tirpalas surenkamas į atliekas.
4. Šerdelės džiovinimas. Surinkus visą tirpalą, šerdelė dar papildomai džiovinama 1 valandą vakuumuojant.
5. Analičių desorbcija. Analitės desorbuojamos plaunant šerdelę 2 ml metanolio, procedūrą kartojant du kartus. Ekstraktai surenkami ir išdžiovinami.

KFE ekstrakcija su aminopropil-[(SiO₂)_x-(CH₂)₃NH₂]- šerdelėmis:

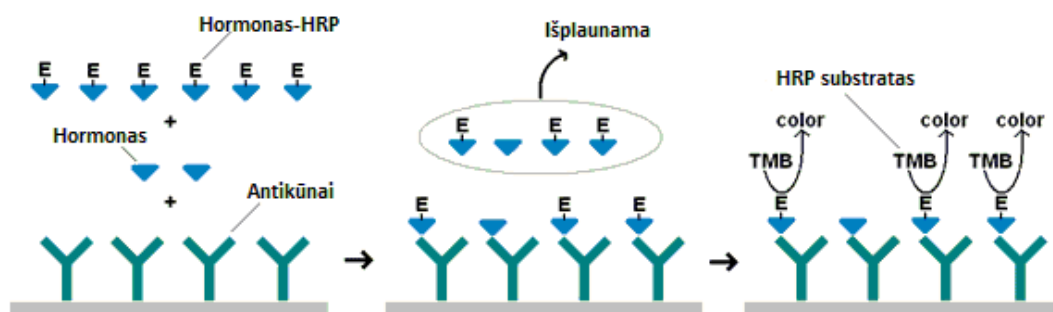
1. Šerdelės praplovimas. 2 ml etilo acetato leidžiama per šerdelę vakuumu, tuomet šerdelė plaunama 3 ml etilo acetato:metanolio (4:1, v:v) mišiniu.
2. Mėginio užnešimas. Sausas ekstraktas po ekstrakcijos su C₁₈ sorbentu užpiltas 2 ml etilo acetato:metanolio (4:1) mišiniu ir užneštas ant kolonėlės ją vakuumuojant.
3. Mėginio surinkimas. Mėginys surenkamas į stiklinius buteliukus ir papildomai dar nuplaunamas 3 ml mišinio, kad padidinti ekstrakcijos efektyvumą.

2.2.4. Steroidų derivatizacija

Tirpiklis nugarintas ir steroidai derivatizuoti su pasiruoštu reagentu: MSFTA / amonio jodidas / merkaptoetanolis (99,1 % / 0,5 % / 0,4 %). 60 μl reagento užpilta ant sauso mėginio. Kaitinta 60 °C vandens vonelėje 30 min. Mėginiai atvėsinti, užpilti 940 μl izooktano ir 2 μl mėginio analizuoti DC-MS sistema.

2.2.5. ELISA analizė

Mikrolėkštelių, turinčių 96 šulinėlius, paviršius padengtas polikloniniais (triušio) antikūnais prieš testosteroną / estradiolį / kortizolį. Ruonių plazmos mėginyje esantys išvardinti hormonai dėl prisijungimo prie antikūnų vietų konkuruoja su testosteronu / estradioliu / kortizoliu, žymėtu krienų peroksidaze. 3',5,5'- tetrametilbenzidas (TMB) naudotas kaip krienų peroksidazės substratas. Vykstant reakcijai susidaro spalvoti junginiai. Spalvos intensyvumas (įvertintas spektrofotometriškai) yra atvirkščiai proporcingas testosterono / estradiolio / kortizolio koncentracijoms, esančioms ruonių kraujo plazmos mėginiuose.



2.1 pav. ELISA analizės schema

ELISA eiga.

1. Po 25 μl tiriamųjų serumo mėginių įpilama į šulinėlius.

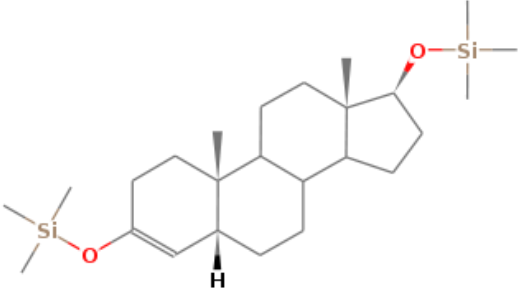
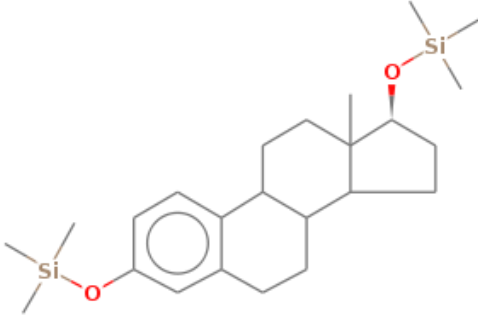
- Šulinėliai užpilami 200 µl fermentų konjugato, užklijuojama folija ir purtoma 10 sekundžių.
- Estradiolis inkubuojamas 2 valandas, o testosteronas su kortizoliu - 1 valandą.
- Plaunama 3 kartus po 300 µl dejonizuoto vandens ir išpurtoma.
- Užpilama 100 µl substrato tirpalo ir inkubuojama 15 min.
- Spektrofotometriniam nuskaitymui naudotas mikroplokštelių optinio tankio skaitytuvas ELx800™ (BioTek, Olandija).

2.2.6. DC-MS analizė

Steroidų kiekybinė analizė buvo atlikta VDU Biochemijos ir Biotechnologijų katedroje dujų chromatografu DC-QP2010 (Shimadzu, Japonija) (kolonėlė – RTX – 5 MS, 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm; Perkin Elmer, JAV su masių spektrometru). Mėginiai įleisti (2 µl) į dujų chromatografą esant 250 °C injektoriaus temperatūrai, naudojant AOC-5000 Shimadzu autoinjektorių „Splitless“ režimu. Nešančios dujos - helis (99,999 %), 1,3 ml/min tekės greitis. Dujų chromatografo temperatūros gradientas: 90°C (1 min), pakeltas iki 290 °C, esant 7,5 °C/min greičiui. Gautų bandinių ištirtų dujų chromatografu chromatogramos buvo analizuojamos Lab Solution GCMS solution 2.71 versija Shimadzu programa. Masių spektrometro elektronų srauto energija 70 eV, SIM (single ion monitoring) režimu, naudojant molekulinį kiekvieno junginio joną arba specifinį jono fragmentą. Sąsajos temperatūra 280 °C, jonų šaltinio temperatūra 260 °C.

2.2 lentelė. Testosterono, estradiolio ir dihidrotestosterono trimetilsilil- derivatų struktūrinės formulės bei atitinkami jų molekuliniai jonai.

| Nr. | Hormonas | TMS (trimetilsilil) derivato struktūrinė formulė | Molekulinis jonas (m/z) |
|-----|---------------|--|--|
| 1. | Testosteronas | | 432 (papildomas patvirtinantis jonas 417) |

| | | | |
|----|----------------------|--|--|
| 2. | Dihidrotestosteronas |  | 434 (papildomas patvirtinantis jonas 405) |
| 3. | Estradiolis |  | 416 (papildomas patvirtinantis jonas 405) |

2.2.7. Pilkųjų ruonių jauniklių morfometrinių parametų ir amžiaus nustatymas

Po mėginio ėmimo jaunikliai buvo pasverti (kg), išmatuota jų krūtinės apimtis (cm) bei kūno ilgis (cm), nustatytas jų amžius (remiantis išoriniais kūno požymiais, kūno mase arba tiksliai žinant gimimo laiką). Remiantis išoriniais kūno požymiais (lytinėmis angomis) nustatoma jauniklio lytis.

Taip pat buvo įvertinta ir jauniklio vystymosi stadija. Jauniklio vystymosi stadijos skirstomos pagal išorinius jauniklio požymius – kailio spalvą, šėrimosi intensyvumą, kūno formą:

I – vienos dienos amžiaus naujagimis, geltonu kailiuku, matosi kraujo liekanos (2.2 pav);

II – 2-7 dienų amžiaus jauniklis, vis dar gelsvu kailiuku, pailgos kūno formos;

III – maždaug 8-13 dienų jauniklis, baltu kailiuku, tačiau priaugęs svorio, apvalesnis, verpstės formos;

IV – maždaug 14-22 dienų amžiaus jauniklis, baltas kailis stipriai šeriasi, lengvai išsipeša, jauniklio kūno forma daugiau mažiau apvali;

V – visiškai nusišėręs jauniklis, maždaug > 24 dienų amžiaus, dažniausiai atjunkytas (2.3 pav.).

Nors vystymosi stadijos tiesiogiai koreliuoja su jauniklio amžiumi, tačiau skirtingų jauniklių vystymosi stadijos gali trukti ilgiau ar trumpiau.



2.2 pav. Ką tik gimęs I stadijos jauniklis. V. Survilienės nuotr.



2. 3 pav. Atjunktas jauniklis V vystymosi stadijoje. V. Survilienės nuotr.

2.2.8. Statistinis duomenų apdorojimas

Statistinei analizei naudotos programos Statistica 8.0.550 bei Exel (2008, Microsoft Corp.). Reikšmingumo koeficientas p laikytas reikšmingu, kai $\alpha = 0,05$. Estradiolio, testosterono ir kortizolio ELISA analizė su kiekvienu ruonių plazmos / serumo mėginiu buvo

kartota 2 kartus. Mėginių analizė su DC-MS po 3 kartus, o kalibracinei kreivei sudaryti po 4 kartus. Visi skaičiavimai: santykiniai standartiniai nuokrypiai, paklaidos, vidurkiai, išgava, variacijos koeficientai, T-testas skaičiuoti „Excel“ programa.

ELISA metodo validumui patikrinti skaičiuota estradiolio, testosterono bei kortizolio išgava. Taip pat naudotas paraleliškumo testas, kurio metu buvo žiūrima ar tiesės išsidėsčiusios lygiagrečiai (lyginamas kreivių nuolydis („slope“)). Porinis T-testas priklausomoms nevienodoms imtims buvo naudojamas patikrinti, ar standartinės ir tolygiai skiesto mėginio kreivės nėra reikšmingai nutolusios viena nuo kitos. Kreivei lyginti naudotos tos standartų reikšmės, kurių ribose rastos skiesto mėginio reikšmės.

Jauniklių steroidų koncentracijos priklausomybė nuo jauniklių morfometrinių parametrų (kūno masės (kg), krūtinės apimties (cm) ir kūno ilgio (cm)) bei amžiaus (dienomis) buvo nustatyta naudojant Pearson`o koreliaciją (r, p). Priklausomybė vystymosi stadijų nustatyta naudojantis vienkrypte ANOVA (F, p), o nuo lyties – Student`o T testą (t, p). Morfometrinių parametrų skirtumai tarp lyčių taip pat nustatyti naudojant T-testą. Jei neįvardinta kitaip, 3.1.3 ir 3.2.4 skyriuose yra pateikti steroidų koncentracijų vidurkiai \pm standartinis nuokrypis.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. ELISA analizė

3.1.1. Metodo validumo patikrinimas. Išgavos ir paraleliškumo įvertinimas

Vykiant ELISA analizę su komerciniais rinkiniais, buvo patikrintas metodo validumas ruonių kraujo plazmos mėginiais. Šiam tikslui sumaišytas atskiras „nežinomas“ mėginys (nm), sudarytas iš visų tirtų tuo metu mėginių, kurie „nežinoma“ mėginį sudaro vienodomis dalimis. Jis skiestas skirtingais santykiais (0,75; 0,5; 0,25) bei maišytas su dviem žinomos koncentracijos kontroliniais tirpalais (stdC ir stdE). Gauti rezultatai surašyti 3.1 lentelėje.

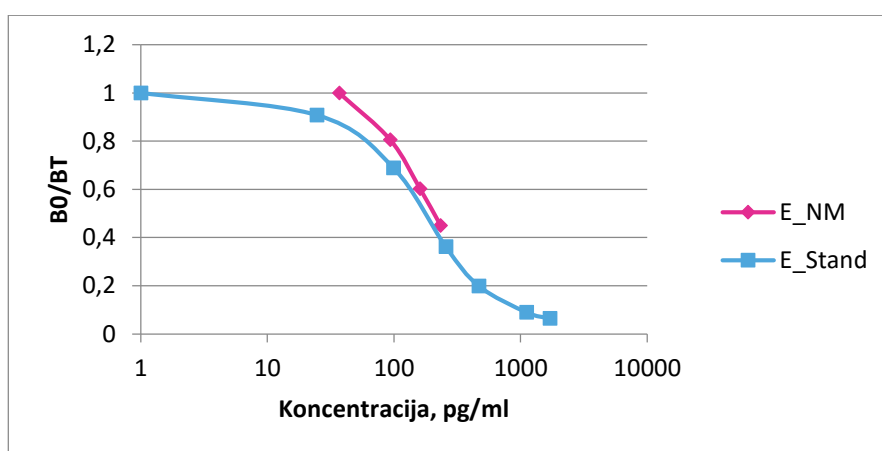
3.1 lentelė. Estradiolio (E), testosterono (T), kortizolio (C) koncentracijos „nežinomame“ mėginyje (nm) nustatytos ELISA metodu ir apskaičiuotos teoriškai iš nm.

| | nm | 0,75*nm | 0,5*nm | 0,25*nm | stdC_nm | stdE_nm | Išgava (%) |
|---|--------|---------|--------|---------|---------|---------|--------------|
| Gauta E koncentracija (pg/ml) | 221,05 | 164,20 | 94,23 | 39,94 | 138,82 | 304,87 | |
| Apskaičiuota E koncentracija (pg/ml) | | 165,79 | 110,52 | 55,26 | 160,00 | 344,89 | |
| E išgava | 94,43 | 99,04 | 85,26 | 72,27 | 86,76 | 88,39 | 86,35 |
| Gauta T koncentracija (ng/ml) | 0,61 | 0,41 | 0,29 | 0,13 | 0,54 | 3,95 | |
| Apskaičiuota T koncentracija (ng/ml) | | 0,46 | 0,31 | 0,15 | 0,50 | 3,35 | |
| T išgava | 87,21 | 90,27 | 93,44 | 82,62 | 109,90 | 117,94 | 82,47 |
| Gauta C koncentracija (ng/ml) | 94,43 | 76,67 | 40,64 | 21,58 | 77,96 | 163,71 | |
| Apskaičiuota C koncentracija (ng/ml) | | 78,68 | 50,60 | 25,30 | 74,73 | 159,08 | |
| C išgava | 99,29 | 97,45 | 80,31 | 85,29 | 104,32 | 102,91 | 94,06 |

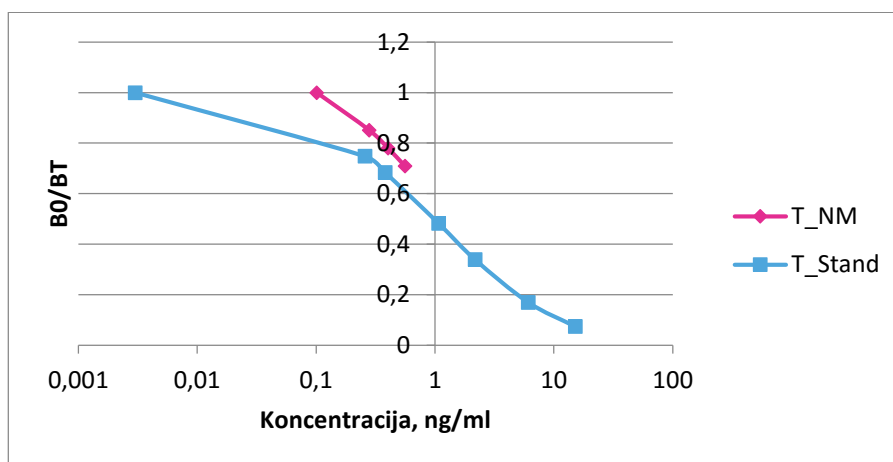
Iš rezultatų matyti, kad išgava su visais steroidiniais hormonais yra virš 80 proc. Literatūros šaltiniuose pateikiama informacija, kad vykiant ELISA imunoanalizę priimtina išgava yra 80-120%, todėl galime teigti, kad šis rinkinys tinkamas nustatyti hormonams ruonių kraujo plazmoje (Brown et al., 2003). Mėginiai prieš analizę turi būti ekstrahuoti dietilo eteriu,

tirpiklis nugarintas ir tuomet užpilti steroidų neturinčia žmogaus kraujo plazma. Taip išvengiama matricos įtakos imunoanalizėje.

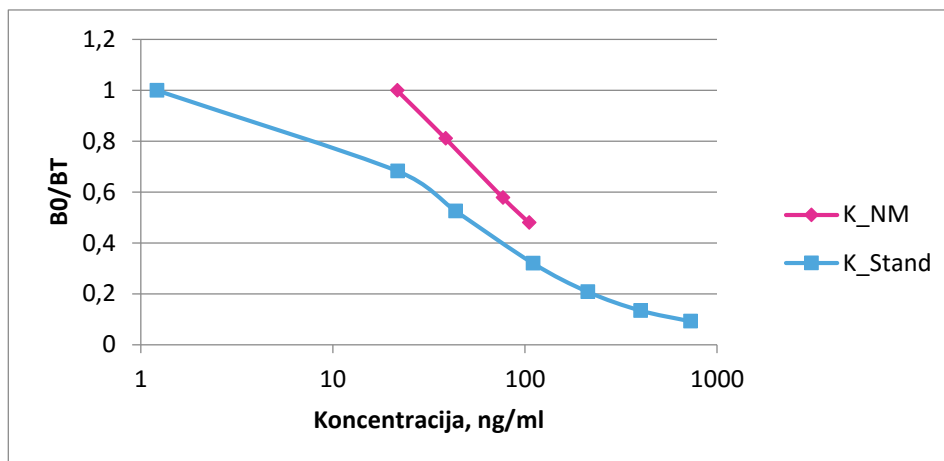
Paraleliškumo įvertinimas – tai būdas nustatyti ar tyrimo metu matuojamos tikslinės analizės, taip pat jis gali nusakyti kokie mėginių skiedimai yra reikalingi analizei. Braižomas grafikas pagal 8 kontrolinių mėginių koncentracijų priklausomybę nuo šviesos sugerties santykio (B_0/BT , B_0 - atitinkamos koncentracijos šviesos sugertis, BT - neigiamos kontrolės šviesos sugertis). Jei bandinio kreivė paraleli standartinei kreivei, vadinasi hormonas imunologiškai panašus į standartą ir gali būti proporcingai matuojamas. Paraleliškumo patikrinimo grafikai pavazduoti 3.1-3.3 pav.



3.1 pav. Estradiolio paraleliškumo įvertinimas. E_NM – kreivė, vaizduoja estradiolio koncentracijos priklausomybę ruonių plazmos / serumo mėginiuose nuo šviesos sugerties santykio. E_Stand – kreivė, vaizduoja kontrolinių mėginių koncentracijos priklausomybę nuo šviesos sugerties santykio.



3.2 pav. Testosterono paraleliškumo įvertinimas. T_NM – kreivė vaizduoja testosterono koncentracijos priklausomybę ruonių plazmos / serumo mėginiuose nuo šviesos sugerties santykio. T_Stand – kreivė, vaizduoja kontrolinių mėginių koncentracijos priklausomybę nuo šviesos sugerties santykio.



3.2 pav. Kortizolio paraleliškumo įvertinimas. K_NM – kreivė, vaizduoja kortizolio koncentracijos priklausomybę ruonių plazmos mėginiuose nuo šviesos sugerties santykio. K_Stand – kreivė, vaizduoja kontrolinių mėginių koncentracijos priklausomybę nuo šviesos sugerties santykio.

Tolygiai skiesto mėginio testosterono, estradiolio ir kortizolio kreivės buvo lygiagrečios atitinkamoms standartinėms kreivėms. Analizės validumą užtikrino rasti nereikšmingi skirtumai tarp atitinkamų skiesto mėginio ir standartinių mėginių kreivių (porinis T-testas nuolydžiui [standartinė kreivė vs. skiesto mėginio kreivė]: E nuolydis -0.003 vs. -0.003, $p = 0.49$; T nuolydis -0.44 vs. -0.63, $p = 0.73$; KO nuolydis -0.006 vs. -0.006, $p = 0.61$).

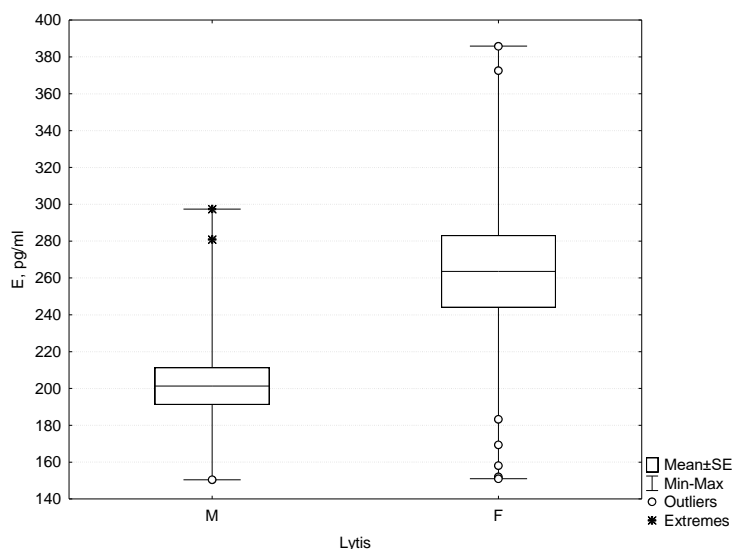
Taip pat buvo įvertintas vidinis analizės svyravimas (*interassay variation, CV*). Jis paaiškina, kaip tiksliai ir tolygiai buvo išpilstyti mėginiai bei ar skirtumai tarp dublikatų neviršijo 10 %. Gauti tokie rezultatai: estradiolio CV – 4,81 %, testosterono – 8,89 %, kortizolio – 6,35 %. Įvertinus visus duomenis nustatyta, kad ruonių jauniklių plazmos mėginius galima analizuoti ELISA metodu.

3.1.2. Kiekybinė analizė

Steroidinių hormonų (estradiolio, testosterono, kortizolio) kiekis nustatytas 32 mėginiuose (15 patinų ir 17 patelių). Nerasta patikima koreliacija tarp steroidų koncentracijos ir paros laiko (E: $r = -0,27$, $p = 0,16$; T: $r = -0,18$, $p = 0,32$; C: $r = 0,1$, $p = 0,6$).

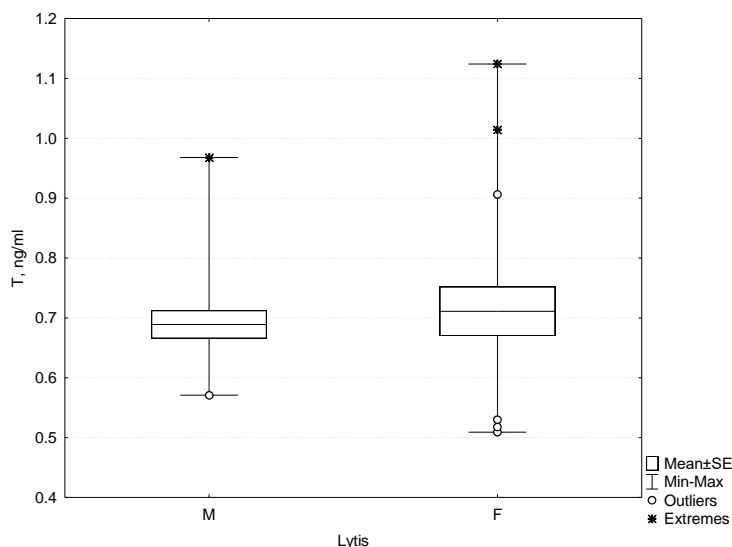
Komerciniuose rinkiniuose pateikiama informacija apie metodų jautrumą ir specifiškumą. ELISA metodo nustatymo riba estradioliui yra 9,7 pg/ml. Metodo specifiškumas: kryžminės reakcijos vyksta su estrioliu (0,05 %) ir estronu (0,2%). Nustatyta vidutinė E koncentracija 234 ± 13 pg/ml. Rastas reikšmingas E koncentracijos plazmoje skirtumas tarp

lyčių ($t = 2,7$, $df = 30$, $p = 0,01$). Patelių E koncentracija yra vidutiniškai 263 ± 20 pg/ml. E koncentracijos patinuose šiek tiek mažesnės nei patelėse ir vidutiniškai siekia 201 ± 10 pg/ml.



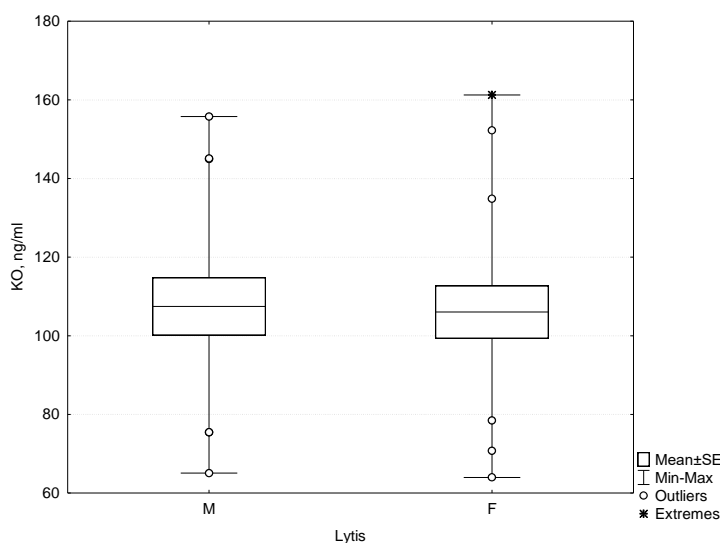
3.3 pav. Kraujo plazmos estradiolio (E) koncentracijos skirtumas tarp lyčių (F – patelės, M – patinai).

Pateikta nustatymo riba testosteronui yra $0,07$ ng/ml. Metodo specifiškumas: kryžminės reakcijos vyksta su 11β -OH-testosteronu (8,67 proc.), 11α -OH-testosteronu (3,24 proc.), dihidrotestosteronu (1,92 proc.), androstenedionu (0,83 proc.) bei metiltestosteronu (0,44 proc.). Nustatyta vidutinė T koncentracija $0,7$. Nerastas reikšmingas T koncentracijos skirtumas tarp lyčių ($t = 0,45$, $df = 30$, $p = 0,66$). T koncentracija patelių kraujo plazmoje svyruoja nuo $0,51$ ng/ml iki $1,12$ ng/ml, vidutiniškai $0,71 \pm 0,04$ ng/ml, o patinų – $0,69 \pm 0,02$ ng/ml.



3.4 pav. Kraujo plazmos testosterono (T) koncentracijos skirtumas tarp lyčių (F – patelės, M – patinai).

ELISA rinkinio kortizoliui nustatyti analitinis jautrumas yra 2,46 ng/ml. Analitinis specifiškumas: kryžminės reakcijos vyksta su prednizolonu (30 proc.), 11-dezoksikortizoliu (7 proc.), kortikosteronu (1,4 proc.), kortizonu (4,2 proc.), prednizonu (2,5 proc.), 17 α -OH-progesteronu (0,4 proc.) ir dezoksikortikosteronu (0,9 proc.). Nustatyta vidutinė KO koncentracija 106,7 \pm 5 ng/ml. Nerastas reikšmingas KO koncentracijos skirtumas tarp lyčių ($t = -0,15$, $df = 30$, $p = 0,89$). Vidutinė KO koncentracija ruonių jauniklių patinuose yra 107,48 \pm 7 ng/ml, patelėse – 106,03 \pm 7 ng/ml.

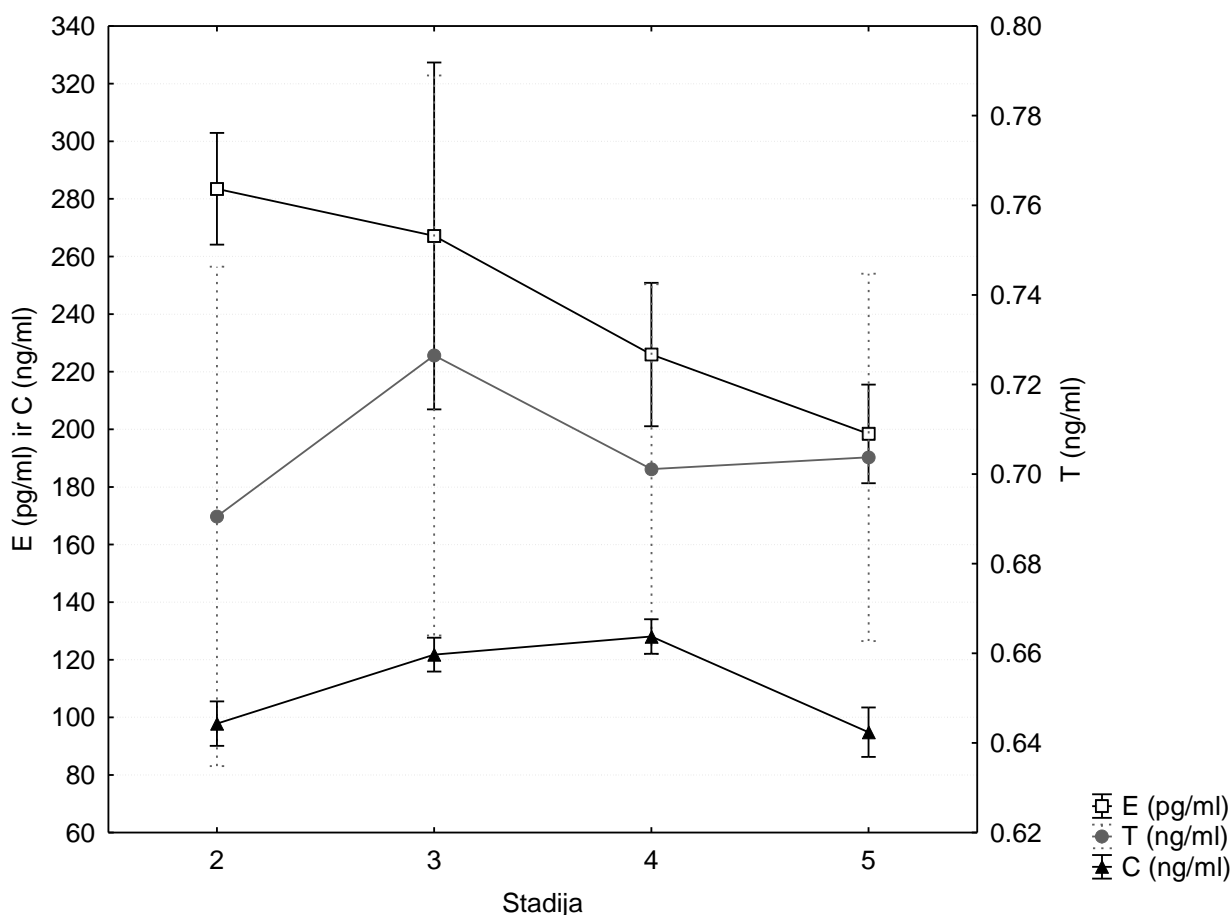


3.5 pav. Kraujo plazmos kortizolio (KO) koncentracijos skirtumas tarp lyčių (F – patelės, M – patinai).

3.1.3. Steroidų koncentracijos priklausomybė nuo jauniklių morfometrinių parametų ir amžiaus

Jauniklių morfometriniai duomenys neturėjo tiesioginio patikimo ryšio su jų kraujo steroidų koncentracijomis. Nerasta patikima koreliacija tarp tirtų steroidų koncentracijos ir jauniklio kūno masės (E: $r = -0,32$, $p = 0,07$; T: $r = 0,14$, $p = 0,44$; KO: $r = 0,27$, $p = 0,14$), krūtinės apimtys (E: $r = -0,27$, $p = 0,13$; T: $r = 0,18$, $p = 0,31$; C: $r = 0,31$, $p = 0,09$) bei kūno ilgio (E: $r = -0,24$, $p = 0,19$; T: $r = -0,07$, $p = 0,7$; KO: $r = -0,01$, $p = 0,96$).

Vystymosi stadijos turėjo reikšmingą įtaką E ir C koncentracijoms kraujyje (E: $F(3; 28) = 3,18$, $p = 0,04$; KO: $F(3; 28) = 3,9$, $p = 0,02$) (pav.). Tuo tarpu T koncentracijos nepriklausė nuo vystymosi stadijų ($F(3; 28) = 0,038$, $p = 0,99$).



3.6 pav. Kraujo plazmos estradiolio (E), testosterono (T) ir kortizolio (KO) koncentracijos skirtingomis jauniklių vystymosi stadijomis (2-5).

Reikšminga neigiama koreliacija buvo rasta tarp jauniklių amžiaus ir E ($r = -0,49$, $p < 0,01$), tačiau ne tarp T ($r = -0,01$, $p = 0,97$) ir KO ($r = -0,21$, $p = 0,25$) steroidų koncentracijų.

3.2. Dujų chromatografija-masių spektrometrija.

3.2.1. Mėginio ekstrakcijos optimizavimas.

Dėl sudėtingos mėginių matricos buvo būtinas daugiatapis mėginio paruošimas, siekiant analizuoti dujų chromatografijos-masių spektrometrijos sistema. Literatūroje pateikiami įvairių stuburinių gyvūnų plazmos / serumo steroidų ekstrakcijos būdai. Tačiau nei vienas nebuvo pritaikytas ruonių jauniklių mėginių paruošimui. Steroidų ekstrakcija buvo atlikta vadovaujantis Budzinski (Budzinski et al., 2006) pateikta metodika, tačiau ji buvo pritaikyta ruonių jauniklių plazmos / serumo mėginiams. Nustatyta, kad ruonių jauniklių kraujo plazmos / serumo mėginių užnešti tiesiogiai ant kietafazės ekstrakcijos šerdelių negalima. Dėl sudėtingos matricos (didelio riebalų, baltymų kiekio) šerdelės greitai užsikemša ekstrakcijai neįpusėjus. Todėl nuspręsta prieš vykdant KFE, lipidų frakciją atskirti skysčių-skysčių ekstrakcijos metodu, naudojant dietilo eterį. Taip pat kadangi lipidų frakcija netirpsta

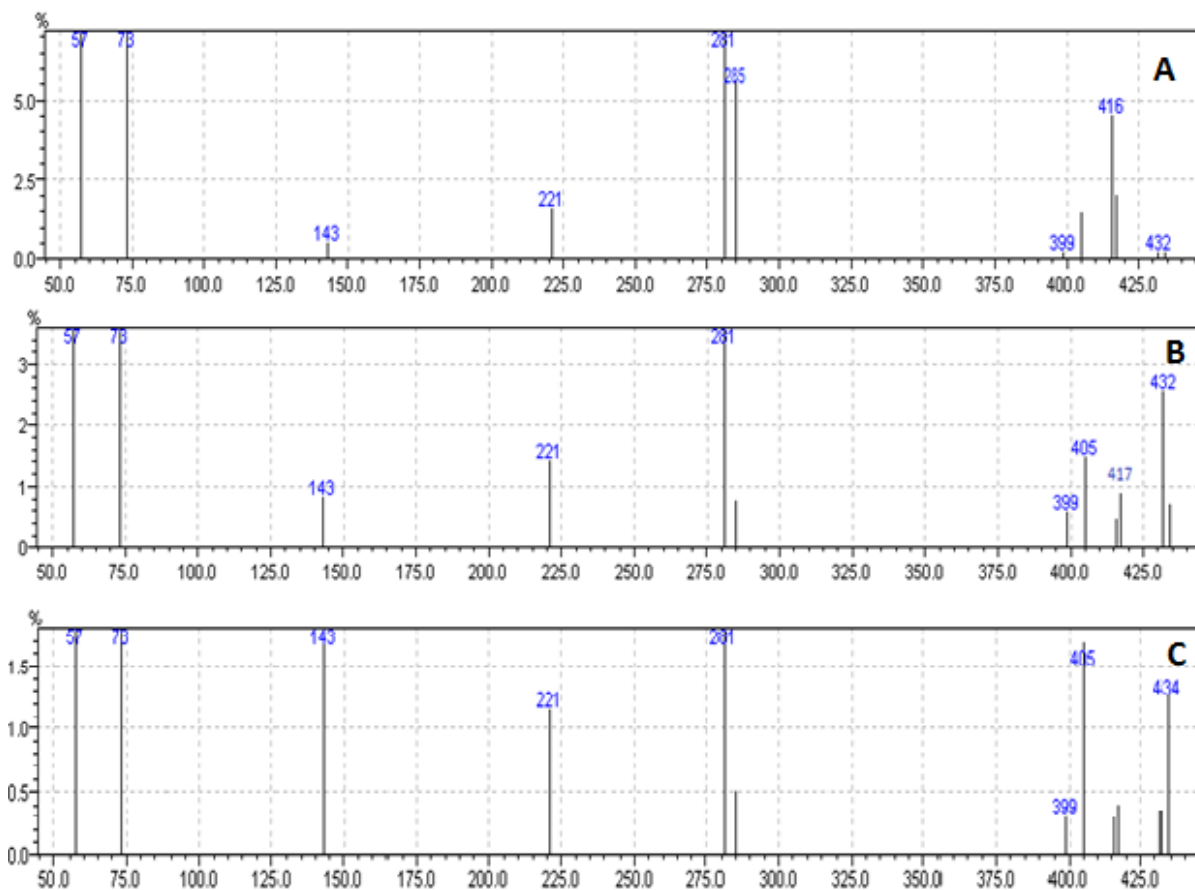
vandeniniuose tirpikliuose, kurie reikalingi užnešti mėginius ant C₁₈ sorbento buvo ieškota optimalaus tirpiklio, kuriame tirptų lipidai, bei jis maišytųsi su buferiniu tirpalu. Optimizavus šias sąlygas paaiškėjo, kad tas pats dietilo eteris atlieka abi funkcijas ir yra universaliausias tirpiklis šio tipo ekstrakcijai. Nustatyta, kad optimalus jo kiekis yra 100 µl 2 ml buferinio tirpalo (tirpumas vandenyje yra 6,05 g/100 ml, esant 25 °C). Esant tokiai dietilo eterio koncentracijai (5 proc.) steroidai nėra išplaunami per C₁₈ šerdelę, o prisijungia prie sorbento, išplaunama tik labai polinių junginių frakcija. Tolimesnė ekstrakcija su aminopropil- grupę turinčiomis šerdelėmis atlikta vadovaujantis Budzinski metodika.

Nustatyta, kad estradiolio, testosterono bei dihidrotestosterono derivatizacijai su MSFTA trukdo metanolis bei etilo acetatas, kuriuose buvo ruošti standartiniai tirpalai. Didėjant tirpiklio kiekiui mažėja derivatizuotos formos junginio, smaيليų plotai mažėja proporcingai didėjant hormono koncentracijai. Todėl ruošiant tirpalus kalibracinei kreivei sudaryti, tirpiklis iš pradžių buvo nugarintas, tuomet nuosėdos užpiltos derivatizuojančiu reagentu, o prieš DC-MS analizę praskiestos iki 1 ml tūrio izooktanu.

Į tą patį mėginį pridedant skirtingų koncentracijų vidinio standarto buvo apskaičiuota viso mėginio paruošimo procedūros (kietafazė ekstrakcija, derivatizacija) išgava: estradiolio 96 % ±5, testosterono 99 % ±3, dihidrotestosterono 93 % ±11.

3.2.2. Dujų chromatografija / masių spektrometrijos SIM režimo generavimas

Buvo paruošti ir derivatizuoti 1 µg/ml estradiolio, testosterono bei dihidrotestosterono kontrolinių mėginių tirpalai. Šie tirpalai praleisti per dujų chromatografijos-masių spektrometrijos sistemą TIC režimu. Iš chromatogramų, pagal intensyviausias smailes bei lyginant su literatūroje pateikiama informacija, nustatyti estradiolio, testosterono, dihidrotestosterono derivatų molekuliniai jonai bei papildomi, juos identifikuojantys, molekuliniai jonai. 3.4 pav. pateikti bis(trimetilsilil)estradiolio, 3,17-bis[(trimetilsilil)oksi]androsta-3,5-dieno ir bis(trimetilsilil)dihidrotestosterono masių spektrai.

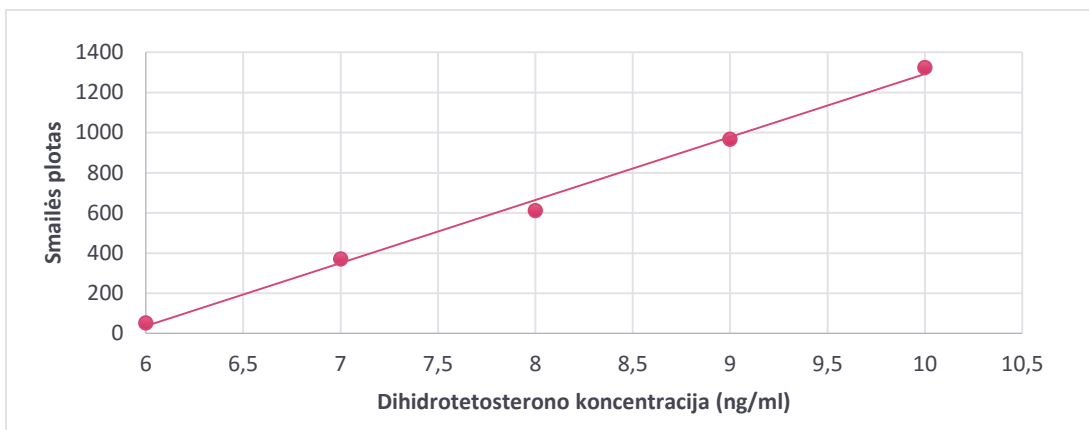


3.4 pav. Steroidinių hormonų trimetilsilil- derivatų masių spektrai: A – estradiolio, B – testosterono, C – dihidrotestosterono.

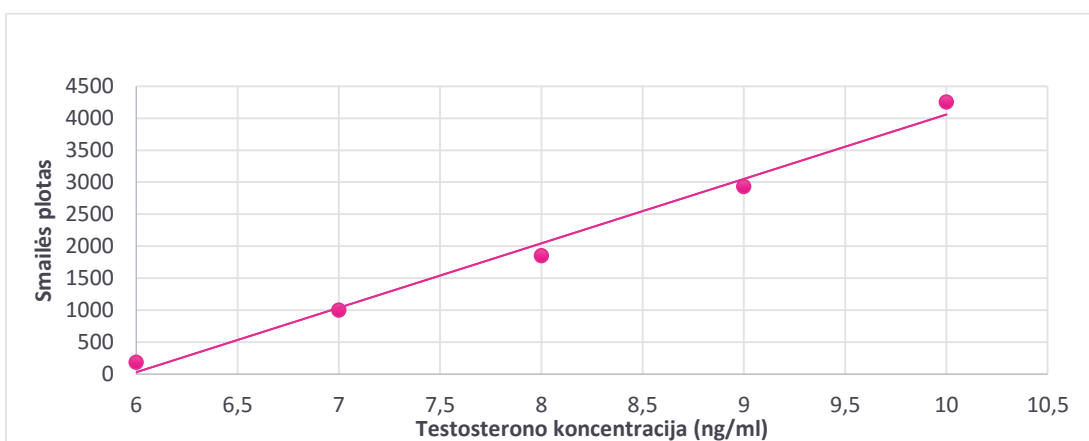
Pagal hormonų derivatų molekulinis jonus: estradiolio 416 m/z ir 285 m/z, testosterono 432 m/z ir 417 m/z, dihidrotestosterono 434 m/z ir 405 m/z dujų chromatografo kompiuterinėje programoje buvo sugeneruotas SIM režimas. Tolesnė analizė kalibracinei kreivei sudaryti bei steroidiniams hormonams nustatyti ruonių jaunikių plazmoje / serume buvo atlikta šiuo režimu.

3.2.3. Kiekybinis steroidinių hormonų nustatymas

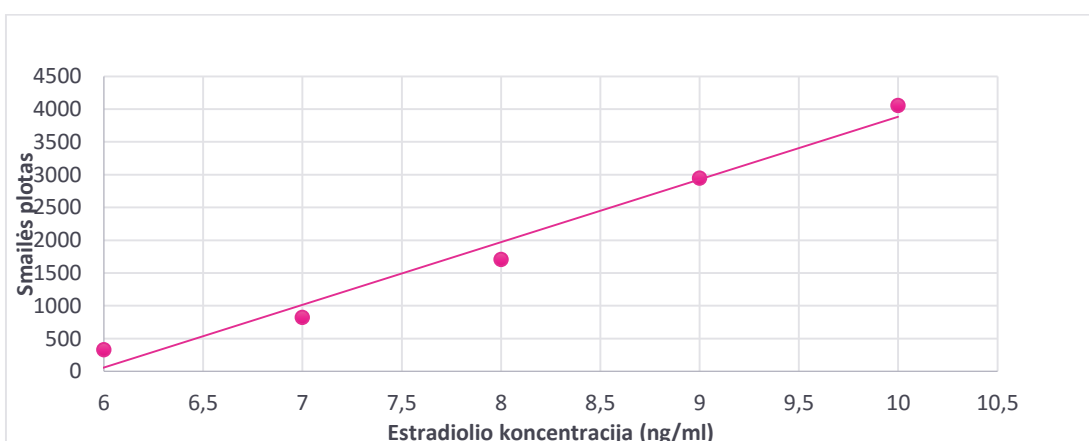
Hormonams mėginiuose nustatyti buvo sudarytos trijų steroidinių hormonų derivatų: (trimetilsilil)estradiolio, 3,17-bis[(trimetilsilil)oksi]androsta-3,5-dieno ir bis(trimetilsilil)dihidrotestosterono kalibracinės kreivės. Kalibracinėms kreivėms sudaryti paruošti standartiniai atitinkamų hormonų tirpalai. Pasirinkti 5 taškai (6, 7, 8, 9, 10 ng/ml). Apskaičiavus gautų smailių plotų vidurkius nubrėžtos tiesinės priklausomybės nuo hormonų koncentracijos.



3.5 pav. Dihidrotetosterono derivato kalibracinė kreivė. Kreivės lygtis: $y = 314,1x - 1848$, tiesiškumo koeficientas: $R^2 = 0,9954$.

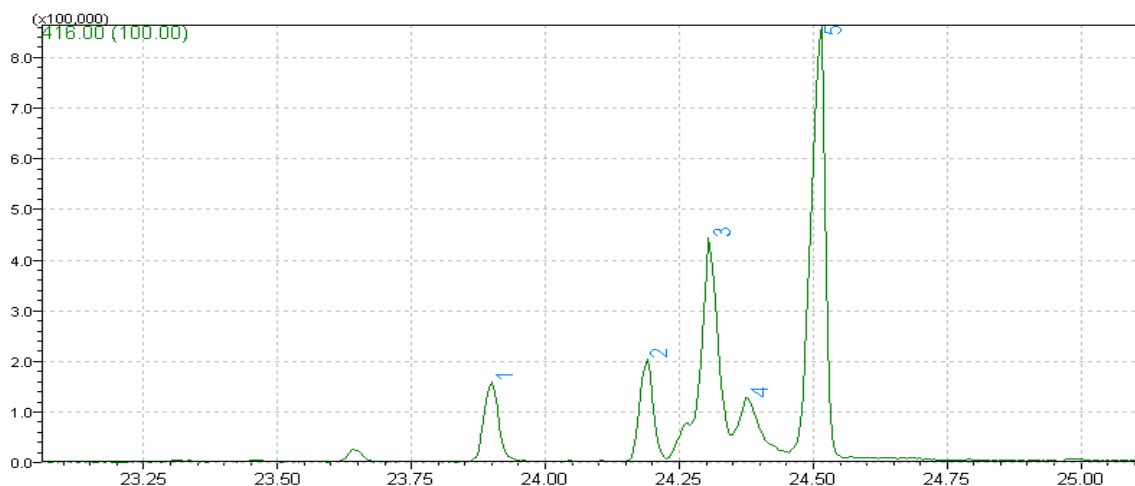


3.6 pav. Testosterono derivato kalibracinė kreivė. Kreivės lygtis: $y = 1007,5x - 6016$, tiesiškumo koeficientas: $R^2 = 0,9889$.



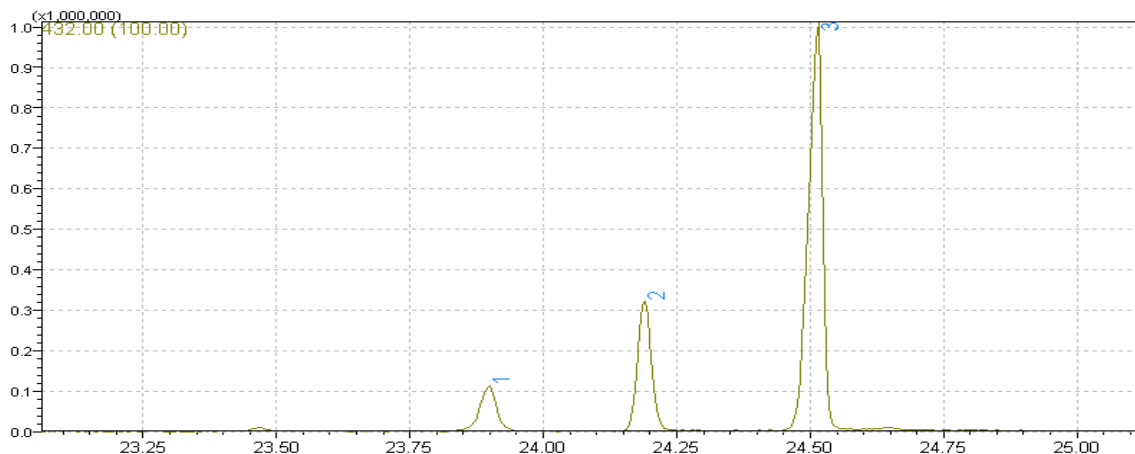
3.7 pav. Estradiolio kalibracinė kreivė. Kreivės lygtis: $y = 956,9x - 5684$, tiesiškumo koeficientas: $R^2 = 0,9775$.

Nustatytos aptikimo ribos estradioliui – 2 ng/ml, testosteronui – 3 ng/ml, dihidrotestosteronui – 4 ng/ml, nustatymo ribos – 4, 5, 6 ng/ml atitinkamai. Į kiekvieną mėginį įdėtas nustatomų steroidų mišinio 5 ng/ml vidinis standartas. Pagal standartinių mėginių išėjimo laikus (estradiolio 23,897 min, testosterono – 23,896 min, dihidrotestosterono – 23,573 min) ir atitinkamus molekulinis jonus apskaičiuotos hormonų koncentracijos.

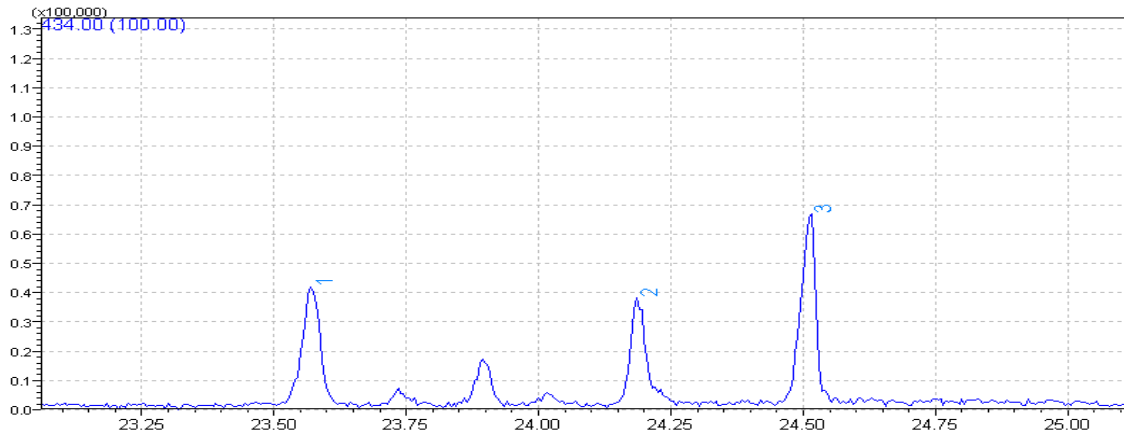


3.3 pav. D8 mėginio, 416 m/z chromatograma. 1 – estradiolio derivato smailė, 2, 3, 4, 5 – kitų panašios struktūros steroidų derivatų smailės.

Pagal papildomus molekulinis jonus numanoma, kad 2 skaičiumi pažymėta smailė galėtų būti 5-dihidroandrostenediono derivato, 3 – estrono derivato, 4 – 4-androstenediono derivato, 5 – nežinomos struktūros steroidų derivatų smailė.



3.4 pav. D8 mėginio, 432 m/z chromatograma. 1 – testosterono derivato smailė, 2, 3 – kitų panašios struktūros steroidų derivatų smailės.



3.5 pav. D8 mėginio, 434 m/z chromatograma. 1 – dihidrotestosterono derivato smailė, 2, 3 – kitų panašios struktūros steroidų derivatų smailės.

Skaičiumi 2 pažymėta smailė galėtų būti 5-dihidroandrostenediono derivato, 3 – nežinomos struktūros steroidų derivatų smailė.

3.2.4. Steroidų koncentracijos priklausomybė nuo jaunikių morfometrinių parametrų ir lyties

Pagal kalibracinių kreivių tiesės lygtis apskaičiuotos testosterono, estradiolio, dihidrotestosterono koncentracijos 24 ruonių jaunikių plazmos ir serumo mėginiuose. Hormonų koncentracijų vidurkiai (n=3) pateikti 3.2 lentelėje. Vidutinė E koncentracija siekė $1,63 \pm 0,1$ ng/ml, vidutinė T – $1,94 \pm 0,1$ ng/ml, vidutinė DHT – $1,57 \pm 0,1$ ng/ml.

Viso ištirta 15 patelių ir 7 patinai. Steroidų priklausomybė nuo amžiaus ir vystymosi stadijų negalėjo būti nustatyta, kadangi visų tirtų individų amžius ir vystymosi stadija buvo panašūs, jaunikliai buvo atjunkyti, priklausė V vystymosi stadijai. Taigi pakankamai logiška, kad ir reikšmingi tirtų steroidų skirtumai tarp lyčių nebuvo rasti. E koncentracija patinuose siekė $1,62 \pm 1,03$ ng/ml, patelėse – $1,63 \pm 0,9$ ng/ml ($t = 0,07$, $df = 20$, $p = 0,95$). T koncentracija patelėse siekė $1,85 \pm 0,98$ ng/ml, patinuose $2,13 \pm 1,38$ ng/ml ($t = -1,15$, $df = 20$, $p = 0,26$), DHT – patelėse $1,56 \pm 0,83$ ng/ml, patinuose – $1,61 \pm 0,19$ ng/ml ($t = -0,2$, $df = 20$, $p = 0,84$).

3.2 lentelė. Estradiolio, testosterono, dihidrotestosterono koncentracijos (ng/ml) nustatytos ruonių jaunikių plazmos ir serumo mėginiuose DC-MS metodu. M - patinas, F - patelė.

| Nr. | E | T | DHT | Lytis |
|-----|-------|-------|-------|-------|
| 1. | 1,060 | 1,159 | 1,050 | F |
| 2. | 0,914 | 0,982 | 0,837 | F |
| 3. | 1,115 | 1,243 | 1,080 | F |
| 4. | 1,125 | 1,380 | 1,119 | M |
| 5. | 1,174 | 1,458 | 1,155 | F |
| 6. | 1,566 | 1,934 | 1,516 | M |
| 7. | 1,220 | 1,723 | 1,229 | M |
| 8. | 1,258 | 1,544 | 1,302 | F |
| 9. | 1,353 | 1,712 | 1,389 | F |
| 10. | 1,031 | 3,317 | 1,071 | M |
| 11. | 1,724 | 2,119 | 1,806 | M |
| 12. | 1,800 | 2,110 | 1,744 | F |

| Nr. | E | T | DHT | Lytis |
|-----|-------|-------|-------|-------|
| 13. | 2,178 | 2,397 | 2,162 | M |
| 14. | 1,877 | 2,111 | 1,816 | F |
| 15. | 2,034 | 2,193 | 1,964 | F |
| 16. | 1,876 | 2,149 | 1,769 | F |
| 17. | 1,972 | 2,007 | 1,691 | F |
| 18. | 2,022 | 2,358 | 1,880 | F |
| 19. | 1,914 | 2,197 | 1,930 | F |
| 20. | 2,077 | 2,485 | 1,992 | F |
| 21. | 2,094 | 2,154 | 1,882 | M |
| 22. | 2,510 | 2,042 | 2,333 | M |
| 23. | 2,178 | 2,397 | 2,162 | M |
| 24. | 1,877 | 2,111 | 1,816 | F |

3.3. Rezultatų apibendrinimas

Įvertinus atskirai kiekvieno steroidinio hormono derivato ((trimetilsilil)estradiolio, 3,17-bis[(trimetilsilil)oksi]androsta-3,5-dieno ir bis(trimetilsilil)dihidrotosterono) smailių plotų pakartojamumus (n=3), gautos tokios santykinų standartinių nuokrypių (SSN) reikšmės: (trimetilsilil)estradiolio – SSN = 3,5 %, 3,17-bis[(trimetilsilil)oksi]androsta-3,5-dieno – 6,1 %; bis(trimetilsilil)dihidrotosterono) – 5,9 %. Iš gautų santykinų standartinių nuokrypių matyti, kad pakartojamumo paklaidos yra mažos. Galima teigti, kad pasirinktas metodas yra tinkamas ir leidžia nustatyti steroidinius hormonus.

Dujų chromatografijos-masių spektrometrijos metodu nustatytos estradiolio bei testosterono koncentracijos yra nuo 2 iki 10 kartų didesnės nei nustatytos ELISA metodu. Kodėl gauti tokie rezultatai, kol kas nėra išsiaiškinta ir reikalingi išsamūs tolimesni tyrimai. Galimos šios priežastys: 1) laisvų steroidinių hormonų koncentracija kraujyje yra apie 2-3 proc., o kiti yra susijungę su baltymais, todėl galėjo būti, kad mėginių surinkimo metu ar ekstrahuojant, dalis hormonų disocijavo nuo baltymų ir buvo nustatytos didesnės jų koncentracijos. Šios problemos pagrįstumui įvertinti reikalinga lygiagrečiai atlikti abu tyrimus su tuo pačiu mėginiu; 2) derivatizacijos metu, kai prie hidroksi- ir keto- grupių prisijungia trimetilsililgrupės galime gauti panašios struktūros junginius kaip (trimetilsilil)estradiolis, 3,17-bis[(trimetilsilil)oksi]androsta-3,5-dienas, kurie turi tokius pačius molekulinis jonus bei išėjimo laikus. Nors kontroliniuose mėginiuose toks ryšys nepastebėtas, tačiau mėginio matricoje grynų steroidų gali būti iki 18 ir nežinomas kiekis jų metabolitų. Šiai hipotezei

patvirtinti arba paneigti ateityje reikia atlikti derivatizaciją bei DC-MS analizę su didesniu kiekiu kontrolinių mėginių; 3) kaip anksčiau minėta, imunoanalizės nėra pakankamai specifinės ir tikslios, ir dėl antikūnų kryžminių reakcijų su antigenais šie metodai nėra pakankamai selektyvūs kai kuriems hormonams nustatyti. Komerciniuose rinkiniuose pateikiama informacija apie metodų specifiškumą praktiškai ne visuomet patvirtinama ir kryžminės reakcijos gali vykti net iki 50 proc.

IŠVADOS

1. Nustatyta, kad ruonių jauniklių plazmos / serumo mėginių analizei ELISA metodu steroidinius hormonus reikia ekstrahuoti dietilo eteriu (tūriniu santykiu 1:5, plazma / serumas:eteris), tirpiklį nugarinti ir lipidų frakciją ištirpinti steroidų neturinčioje žmogaus plazmoje.
2. Patikrinus komercinio ELISA rinkinio validumą, ištirta, kad šiuo metodu kiekybiškai galima įvertinti testosterono, estradiolio ir kortizolio koncentracijas ruonių jauniklių plazmos / serumo mėginiuose.
3. Po optimizuoto mėginio paruošimo DC-MS analizei nustatyta, kad:
 - steroidiniams hormonams išskirti iš plazmos / serumo būtinas kietafazės ekstrakcijos metodas, naudojant C₁₈ ir NH₂ sorbentų šerdeles;
 - prieš vykdant kietafazę ekstrakciją plazmos / serumo mėginius reikia ekstrahuoti dietilo eteriu tūriniu santykiu 1:5 (plazma / serumas:eteris), surinktas frakcijas nugarinti iki 100 µl tūrio ir užpilti 1,9 ml 0,01 M natrio acetato buferiu pH 5,0;
 - po kietafazės ekstrakcijos tirpiklį reikia nugarinti ir steroidus derivatizuoti MSFTA / amonio jodido / merkaptoetanolio (99,1 % / 0,5 % / 0,4 %) mišiniu, kaitinant 60 °C vandens vonelėje 30 min.
4. Kiekybiškai įvertinus testosterono, dihidrotestosterono ir estradiolio koncentracijas dujų chromatografijos / masių spektrometrijos sistema, nustatytos aptikimo ribos: estradiolio - 2 ng/ml, testosterono - 3 ng/ml, dihidrotestosterono - 4 ng/ml, nustatymo ribos – 4 ng/ml, 5 ng/ml, 6 ng/ml atitinkamai. Apskaičiuoti santykiniai standartiniai nuokrypiai: (trimetilsilil)estradiolio –3,5 %, 3,17-bis[(trimetilsilil)oksi]androsta-3,5-dieno – 6,1 %; bis(trimetilsilil)dihidrotestosterono) – 5,9 %.
5. Palyginus testosterono bei estradiolio kiekybinius rezultatus ELISA ir DC-MS metodais, pastebėta, kad DC-MS metodu nustatytos estradiolio koncentracijos yra 8-10 kartų didesnės, o testosterono 2-7 kartus didesnės, todėl reikalingi išsamesni bei lygiagretūs tyrimai.

SANTRAUKA

Pilkasis arba ilgasnukis ruonis (lot. *Halichoerus grypus*) – plėšrūnų (*Carnivora*) būriui priklausantis žinduolis, paplitęs Šiaurinėje Atlanto vandenyno dalyje, taip pat sutinkamas Lietuvos teritorijos vandenyse. Šiame darbe yra analizuojami pilkųjų ruonių jauniklių steroidiniai hormonai: testosteronas, estradiolis, dihidrotestosteronas ir kortizolis. Šie hormonai turi įtakos pilkųjų ruonių seksualinei bei socialinei elgsenai. Jie kontroliuoja ruonių reprodukcinę elgseną, motinų rūpinimąsi jaunikliais, teritorijos žymėjimą, patinų agresiją ir kovas dėl patelių, jauniklių brendimą, tarpusavio bendravimą ir išgyvenimą bado laikotarpiu. Šio darbo tikslas buvo iš ruonių plazmos / serumo išskirti steroidinius hormonus ir nustatyti tinkamiausią metodą jų analizei. Problemos, kurios iškilo nustatant steroidus ruonių jauniklių plazmoje / serume, buvo sudėtingas ruonių kraujo mėginių paruošimas dėl itin lipemiškos matricos bei mažų (pg/ml, ng/ml) steroidinių hormonų koncentracijų. Šiame darbe steroidiniams hormonams nustatyti pasirinkti du metodai – ELISA ir dujų chromatografijos / masių spektrometrijos sistema. ELISA metodui optimizuota mėginio ekstrakcija: plazmos mėginiai ekstrahuoti dietilo eteriu, nugarinti iki nuosėdų ir užpilti steroidų neturinčia žmogaus plazma. Nustatytos estradiolio, testosterono, kortizolio koncentracijos.

Mėginio paruošimas DC / MS vyko keliais etapais: skysčių-skysčių ekstrakcija dietilo eteriu, mėginio tirpinimas 0,01 M natrio acetato buferyje pH 5,0 ir užnešimas ant C₁₈ sorbento šerdelių, o tuomet ant NH₂ sorbento šerdelių. Mėginiai derivatizuoti vandens vonelėje 60 °C temperatūroje 30 minučių, MSFTA / amonio jodido / merkaptioetanolio (99,1 % / 0,5 % / 0,4 %) mišiniu. Derivatizuotų steroidų tirpalas praskiestas izooktanu ir 2 µl mėginio analizuoti DC / MS. Steroidiniai hormonai identifikuoti dujų chromatografui veikiant SIM režimu pagal intensyviausius molekulinis jonus, papildomus juos identifikuojančius jonus ir atitinkamus išėjimo laikus.

Nustatyta, kad ELISA ir DC-MS metodai yra tinkami steroidinių hormonų nustatymui ruonių jauniklių plazmoje / serume, tačiau DC-MS metodu nustatytos testosterono ir estradiolio koncentracijos yra 2-10 kartų didesnės nei nustatytos ELISA metodu. Todėl reikalingi tolimesni palyginamieji tyrimai.

SUMMARY

Grey seal (*Halichoerus grypus*) - *Carnivora* order sea mammal, common in northern Atlantic Ocean and encountered in Lithuanian territory. Steroid hormones: testosterone, estradiol, dihydrotestosterone and cortisol were analysed in this study. These hormones influences gray seals sexual and social behavior. They control the seal's reproductive behavior, maternal care of pups, territorial marking, aggression in males and fights for females, juveniles puberty, relationships and survival during starvation.

The aim of this study was to extract steroid hormones from seals plasma / serum and to determine the most appropriate method for steroid analysis. The problem that arise in determining steroids in seal pups plasma / serum is difficult sample preparation. Seals blood samples are extremely lipemic and concentrations of steroid hormones are low (pg/ml, ng/ml). In this work, steroid hormones were analysed by two methods: ELISA and gas chromatography-mass spectrometry. The sample extraction was optimized for ELISA analysis: lipid fraction was extracted with diethyl ether and dried residue dissolved in steroid-free human plasma.

Sample preparation for GC/MS included several phases: serum samples were extracted with diethyl ether, mixed with 0.01 M sodium acetate buffer, pH 5, loaded onto C₁₈ cartridge and then loaded onto NH₂ cartridge. Steroids passed through and were collected into tubes. Then the samples were derivatized in water bath at 60 °C for 30 minutes with MSFT / ammonium iodide / mercaptoethanol (99.1% / 0.5% / 0.4%) mixture. After derivitization mixture was cooled, diluted with isooctane and analyzed with GC/MS. Steroids were identified when GC/MS was programmed in selective ion monitoring (SIM) mode using one target (quantification) ion, one qualifier (confirmatory) ion and also identified by corresponfing retention time.

It was found that the ELISA and GC-MS methods are suitable for determining steroid hormones in grey seals pups plasma / serum. However, testosterona and estradiol concentrations determined with GC-MS method are 2-10 times higher than those determined by ELISA. Therefore, the further comparative studies needs to be done.

PADĖKA

Dėkoju dr. (HP) Vidai Bendikienei už suteiktą galimybę atlikti šį magistro baigiamąjį darbą jos vadovaujamoje laboratorijoje, kantrų ir nuoseklų vadovavimą, pagalbą rašant magistrinį darbą, patarimus bei įgytas žinias.

Dėkoju analizinės ir aplinkos chemijos katedros vedėjui prof. (HP) dr. Stasiui Tautkui už suteiktą galimybę atlikti magistro baigiamąjį darbą.

Noriu padėkoti VDU Biochemijos ir biotechnologijos katedros prof. Audriui Sigitui Maruškai bei doktorantui Mantui Stankevičiui už profesionalią ir nuoširdžią pagalbą atliekant tiriamų mėginių kietafazę ekstrakciją ir DC-MS tyrimus.

Dėkoju dokt. Vaidai Survilienei už ruonių plazmos / serumo mėginius, analizei reikalingas medžiagas, suteiktas žinias, patarimus bei kantrybę.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Agmo A. Functional and Dysfunctional Sexual Behavior. A Synthesis of Neuroscience and comparative psychology. 2011. p. 196-200.
2. Almeida SS, De Araújo M. Postnatal protein malnutrition affects play behavior and other social interactions in juvenile rats. *Physiol Behav.* 2001;74:45-51.
3. Anderson SS, Fedak MA. Grey seal males: energetic and behavioural links between size and sexual success. *Animal Behav.* 1985;33: 829-838.
4. Anderson SS, Burton R & Summers CF. Behaviour of Grey seals (*Halichoerus grypus*) during breeding season at North Rona. *J Zoo.* 1975;177: 179–195.
5. Arnold AP, Gorski RA. Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system. *Ann Rev Neurosci.* 1984;7: 413-442.
6. Atkinson S. Reproductive biology of seals. *Rev Reprod.* 1997;2:175-194.
7. Baker JB. Grey seal (*Halichoerus grypus*) milk composition and its variation over lactation. *Br Vet J.* 1990;146(3): 233–238.
8. Bennett KA, Speakman JR, Moss SE, Pomeroy P, Fedak MA. Effects of mass and body composition on fasting fuel utilisation in grey seal pups (*Halichoerus grypus*): an experimental study using supplementary feeding. *J Exp Biol.* 2007;210(17):3043–3053.
9. Boness DJ and James H. Reproductive behaviour of the Grey seal (*Halichoerus grypus*) on Sable Island, Nova Scotia. *J Zoo.* 1979; 188:477–500.
10. Bowden JA, Colosi DM, Mora-Montero DC, Garrett TJ, Yostm RA. Enhancement of chemical derivatization of steroids by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). *J Chromatogr B.* 2009; 877 (27), 3237-3242.
11. Bowen WD, Ellis SL, Iverson SJ and Boness DJ. Maternal and newborn life-history traits during periods of contrasting population trends: implications for explaining the decline of harbour seals (*Phoca vitulina*) on Sable Island. *J Zoo.* 2003;261(2):155–163.
12. Bowen WD, Iverson SJ, McMillan JI, Boness DJ. Reproductive performance in grey seals: Age-related improvement and senescence in a capital breeder. *J Anim Ecol.* 2006; 75(6):1340–1351.
13. Bowen WD, Stobo WT and Smith SJ. Mass changes of grey seal (*Halichoerus grypus*) pups on Sable Island: differential maternal investment reconsidered. *J Zoo.* 1992;227(4):607–622.

14. Bredhult C. Effects of some endocrine disruptors on human and grey seal uterine cells. [Disertation] Uppsala: Acta Universitatis Upsakliensis; 2007.
15. Brown J, Walker S and Steinman K. Endocrine manual for reproductive assessment of domestic and non-domestic species. Smithsonian National Zoological Park, Conservation and Research Center. 2003;69.
16. Budzinski H, Devier MH, Labadie P, Togola A. Analysis of hormonal steroids in fish plasma and bile by coupling solid-phase extraction to GC/MS. Anal Bioanal Chem. 2006; 386, 1429-1439.
17. Coderre L, Srivastava AK, Chiasson JL. Role of glucocorticoid in the regulation of glycogen metabolism in skeletal muscle. Am J Physiol. 1991;260(6):927–32.
18. Craigie E, Mullins JJ, Bailey MA. Cardiovascular hormone systems: from molecular mechanisms to novel therapeutics. Glucocorticoids and mineralocorticoids. Bader M, ed. 2009;1-64.
19. Desta Z, Nguyen A, Flockhart D, Skaar T, Fletcher R, Weinshilboum R, Berlin DS, Klein TE, Altman RB. Estrogen metabolism in the liver. 2012.
20. Djurhuus CB, Gravholt CH, Nielsen S, Mengel A, Christiansen JS, Schmitz OE, Møller N. Effects of cortisol on lipolysis and regional interstitial glycerol levels in humans. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2002;283(1):172–7.
21. Duck C, Scottish Natural Heritage (Agency). Seals: naturally scottish. 2007 p. 1-48.
22. Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M. Multiple actions of steroid hormones – A focus on rapid, nongenomic effects. Pharmacol Rev. December 1, 2000; 52; 4; 513-556.
23. Griffiths DJ. The annual cycle of the testis of the elephant seal (*Mirounga leonina*) at macquarie Island. J Zool. 1984;203:193-204.
24. Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. Production and actions of estrogens. N Engl J Med. 2002;346(5):340-52.
25. Håkonsen LB, Thulstrup AM, Aggerholm AS, Olsen J, Bonde JP, Andersen CY, Bungum M, Ernst EH, Hansen ML, Ernst EH, Ramlau-Hansen CH. Does weight loss improve semen quality and reproductive hormones? Results from a cohort of severely obese men. Reprod Health. 2011;8:24.
26. Hall AJ, McConnell BJ and Barker RJ. Factors Affecting First-Year Survival in Grey Seals and Their Implications for Life History Strategy. J Anim Ecol. 2001;70(1):138–149.

27. Hübschmann Hans-Joachim. Handbook of GC-MS: Fundamentals and applications. John Wiley and Sons, 2015. p. 7-14.
28. Ismail AAA, Walker PL, Cawood ML, Barth JH. Interference in immunoassay is an underestimated problem. *Ann Clin Biochem.* 2002;39:366–373.
29. Iverson SJ, Bowen WD, Bones DJ, Oftedal OT. The effect of maternal size and milk energy output on pup growth in grey seals (*Halichoerus grypus*). *Physiol Zool.* 1993;66(1):61–68.
30. Iverson SJ, Oftedal OT, Bowen WD, Boness DJ, Sampugna J. Prenatal and postnatal transfer of fatty acids from mother to pup in the hooded seal. *J Comp Physiol B.* 1995;165:1–12.
31. Jenssen BM, Åsmula JI, Ekkerb M, Vongraven D. To go for a swim or not? Consequences of neonatal aquatic dispersal behaviour for growth in grey seal pups. *Anim Behav.* 2010;80(4):667–673.
32. Jüssi M, Härkönen T, Helle E, Jüssi I. Decreasing ice coverage will reduce the breeding success of Baltic grey seal (*Halichoerus grypus*) females. *Ambio.* 2008;37(2):80–85.
33. Koren L, Ng ESM, Soma KK and Wynne-Edwards KE. Sample preparation and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for multiple steroids in mammalian and avian circulation. *PLoS ONE.* 2012; 7(2):32496.
34. Kovacs KM. Maternal behaviour and early behavioural ontogeny of harp seals, *Phoca groenlandica*. *Animal Behav.* 1987;35(3),844–855.
35. Krasowski MD, Drees D , Morris CS , Maakestad J, Blau JL, Ekins S. Cross-reactivity of steroid hormone immunoassays: clinical significance and two-dimensional molecular similarity prediction. *BMC Clin Pathol.* 2014; 14:33.
36. Lang SLC, Iverson SJ and Bowen WD. Repeatability in lactation performance and the consequences for maternal reproductive success in gray seals. *Ecology.* 2009;90(9):2513–2523.
37. Lasiuk GC, Hegadoren KM. The effects of estradiol on central serotonergic systems and its relationship to mood in women. *Biol Res Nurs.* 2007;9(2):147-60.
38. Lidgard DC, Boness DJ, Bowen WD, McMillan JI. State-dependent male mating tactics in the grey seal: the importance of body size. *Behav Ecol.* 2005;16: 541-549.
39. Lidgard DC, Boness DJ, Bowen WD, McMillan JI. The implications of stress on male mating behavior and success in a sexually dimorphic polygynous mammal, the grey seal. *Horm and Behav.* 2008;53:241-248.

40. Mellish JE, Iverson SJ and Bowen WD. Variation in milk production and lactation performance in grey seals and consequences for pup growth and weaning characteristics. *Physiol Biochem Zool: Ecological and Evolutionary Approaches*. 1999;72.6: 677–690.
41. Mooradian AD, Morley JE, Korenman SG. Biological actions of androgens. *Endocr Rev*. 1987;8:1-28.
42. Mooradian AD, Morley JE, Korenman SG. Biological Actions of Androgens. *Endocr Rev* 1987;8:1-28.
43. Muelbert MMC, Bowen WD and Iverson SJ. Weaning mass affects changes in body composition and food intake in harbour seal pups during the first month of independence. *Physiol Biochem Zool*. 2003;76(3): 418–427.
44. Natkevičiūtė V. Ankstyvoji pilkųjų ruonių (*Halichoerus grypus*) ontogenezė ir elgsena. [Magistrinis darbas]. Vilnius: Vilniaus universitetas; 2012.
45. Newman AE, Chin EH, Schmidt KL, Bond L, Wynne-Edwards KE, Soma KK. Analysis of steroids in songbird plasma and brain by coupling solid phase extraction to radioimmunoassay. *Gen Comp Endocrinol*. 2008;155(3):503-10.
46. Ng BH, Yuen KH. Determination of plasma testosterone using a simple liquid chromatographic method. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2003;793(2):421-6.
47. Noren SR, Boness DJ, Iverson SJ, McMillan J, Bowen WD. Body condition at weaning affects the duration of the postweaning fast in gray seal pups (*Halichoerus grypus*). *Physiol Biochem Zool*. 2008; 81(3):269–277.
48. Oritsland NA, Pásche AJ, Markussen NH, Ronald K. Weight loss and catabolic adaptations to starvation in grey seal pups. *Comp Biochem Physiol*. 1985;82A:931–933.
49. Pardridge WM, Mietus LJ. Transport of steroid hormones through the rat blood-brain barrier. Primary role of albumin-bound hormone. *J Clin Invest*. 1979;64(1):145–154.
50. Pomeroy PP, Wilmer JW, Amos W, Twiss SD. Reproductive performance links to fine-scale spatial patterns of female grey seal relatedness. *Proc Biol Sci*. 2001; 268(1468):711–717.
51. Pomeroy PP, Twiss SD and Redman P. Philopatry, site fidelity and local kin associations within grey seal breeding colonies. *Ethology*. 2000;106(10):899–919.
52. Reijnders PJH. Chapter 3. Reproductive and developmental effects of environmental organochlorines on marine mammals. *Toxicology of marine mammals*. Vos J, Bossart G, Fournier M and O'Shea T. Taylor and Francis, NY. 2003; p. 55.

53. Reilly JJ. Adaptations to prolonged fasting in free-living, weaned gray seal pups. *American J Physiol.* 1991;260:267–272.
54. Rizner TL, Lin HK, Peehl DM, Steckelbroeck S, Bauman DR, Penning TM. Human type 3 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase (aldo-keto reductase 1C2) and androgen metabolism in prostate cells. *Endocrinol.* 2003;144(7): 2922–32.
55. Rommerts FFG. Testosterone: an overview. In: Testosterone. Action, deficiency, substitution. 3rd edition. Nieschlag E, Behre HM, editors. 2004. p. 1-38.
56. Schiettecatte J, Anckaert E and Smits J. Interferences in Immunoassays. UZ Brussel, Laboratory Clinical Chemistry and Radioimmunology, 2012.
57. Schweigert FJ. Effects of energy mobilization during fasting and lactation on plasma metabolites in the grey seal (*Halichoerus grypus*). *Comp Biochem Physiol.* 1993; 105A:347-352.
58. Seely AJ, Ronald K. Testosterone profiles in male grey seals (*Halichoerus grypus*). *Aquatic Mammals.* 1991;17.3:152-155.
59. Shrivastav TG. Matrix interference in direct total testosterone enzyme immunoassay and its elimination with the use of non-cross reactive steroids in serum based standards. *Health Popul Perspect Issues.* 2002;25(2): 55-64.
60. Survilienė V, Rukšėnas O and Pomeroy P. Play Behavior of Wild Grey Seals (*Halichoerus grypus*): Effects of haulout group size and composition. *Aquatic Mammals.* 2016;42(2):144–161.
61. Tate J, Ward G. Interferences in Immunoassay. *The Clinical Biochemist Reviews.* 2004;25(2):105-120.
62. Thompson D, Härkönen T. *Halichoerus grypus*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. 2008.
63. Toribio-Delgado F, Maynar-Mariño M, Caballero-Loscos MJ, Robles-Gil MC, Olcina-Camacho GJ and Maynar-Mariño JI. Qualification and quantification of seventeen natural steroids in plasma by GC–Q-MS and GC-IT–MS/MS. *J Chromatogr Sci.* 2012; 50(4): 349-357.
64. Umea Universitet. Chromatography D, 10 p Analytisk Kemi, CV/TJ Lab: Derivatization for GC, 2010.
65. Vičkačkaitė V. Ekstrakciniai mėginio paruošimo dujų chromatografinėi analizei metodai. Vilniaus universitetas. 2008. p. 27.
66. Wassarman P, Neill JD. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Wassarman P, Neill J, editors. Oxford, UK, Elsevier Academic Press. 2006. p. 3230.

67. Wilke TJ, Utley DJ. Total testosterone, free-androgen index, calculated free testosterone, and free testosterone by analog RIA compared in hirsute women and in otherwise-normal women with altered binding of sex-hormone-binding globulin. *Clin Chem.* 1987;33:1372.
68. Wintersteiger R and Sepulveda MJ. Electrochemical detection of anabolics in human plasma and urine. *Anal Chim Acta.* 1993;273:383–390.
69. Zeginiadou T, Koliass S, Kouretas D, Antonoglou O. Nonlinear binding of sex steroids to albumin and sex hormone binding globulin. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 1997;22(3):229-35.