



**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Laboratoř růstových regulátorů**

**Vývoj imunoafinitní chromatografie pro stanovení  
neurosteroidů**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor: **Michal Kaleta**  
Studijní program: B1501 Experimentální biologie  
Studijní obor: Experimentální biologie  
Forma studia: Prezenční  
Vedoucí práce: **Mgr. Jana Oklešťková, Ph.D.**  
Termín odevzdání práce: 2017

## **Bibliografická identifikace**

Jméno a příjmení autora	Michal Kaleta
Název práce	Vývoj imunoafinitní chromatografie pro stanovení neurosteroidů
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Jana Oklešťková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2017
Abstrakt	Tato práce se zabývá problematikou stanovení neurosteroidů pomocí imunochemických metod. Imunitní systém je schopný rozlišit tělu cizí struktury (antigeny) a produkovat prostřednictvím plazmatických buněk protilátky, které s těmito antigeny specificky reagují a váží se na ně. Vznik této vazby hraje klíčovou roli v imunochemických metodách, které byly v této práci využity pro izolaci neurosteroidů. Cílem této práce bylo charakterizovat polyklonální protilátky proti neurosteroidům pomocí enzymové imunoanalýzy. Protilátky byly následně navázány na afinitní gel, který byl použit pro imunoafinitní chromatografii vzorků pocházejících od pacientů trpících neurologickými poruchami.
Klíčová slova	Neurosteroidy, allopregnanolon, protilátky, enzymová imunoanalýza, imunoafinitní chromatografie.
Počet stran	48
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## **Bibliographical identification**

Author's first name and surname	Michal Kaleta
Title of thesis	Development of immunoaffinity chromatography for determination of neurosteroids
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Jana Okleštková, Ph.D.
The year of presentation	2017
Abstract	<p>This thesis deals with the characterisation of neurosteroids using immunochemical methods. The immune system is able to distinguish structures foreign to the body (antigens) and, using plasma cells, produce antibodies specifically reacting with these antigens. The bond creation is a key to the immunochemical methods used for neurosteroid isolation in this thesis. The aim of the thesis is to describe the polyclonal antibodies against neurosteroids using enzyme immunoassay. The antibodies were bound to the affinity gel used for immunoaffinity chromatography of samples from patients suffering a neurological disorder.</p>
Keywords	Neurosteroids, allopregnanolone, antibodies, enzyme immunoassay, immunoaffinity chromatography.
Number of pages	48
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne .....

.....

## **Poděkování**

Tímto bych chtěl poděkovat paní Mgr. Janě Oklešťkové PhD. za cenné rady, ochotu a odbornou pomoc při řešení mé bakalářské práce.

Také bych rád poděkoval panu Mgr. Ondřeji Novákovi PhD. a paní Ing. Petře Amakorové za kvantifikaci neurosteroidů pomocí UHPLC-MS/MS a také všem ostatním pracovníkům Laboratoře růstových regulátorů za veškeré rady a vytvoření vhodných pracovních podmínek.

# Obsah

Seznam použitých zkratk	7
1 Úvod a cíl bakalářské práce	9
2 Teoretická část	11
2.1 Neurosteroidy	11
2.1.1 Biosyntéza neurosteroidů	12
2.1.2 Mechanismus působení na receptory	13
2.1.3 Vliv na chování	16
2.1.4 Allopregnanolon	16
2.2 Protilátky a antigeny	18
2.2.1 Struktura protilátek	18
2.2.2 Třídy imunoglobulinů	20
2.2.3 Tvorba protilátek	21
2.2.4 Příprava protilátek	22
2.3 Imunochemie a imunoanalýza	23
2.3.1 Enzymová imunoanalýza	24
2.3.2 Imunoafinitní chromatografie	27
3 Praktická část	29
3.1 Přístroje, chemikálie a roztoky	29
3.1.1 Přístroje	29
3.1.2 Chemikálie	29
3.1.3 Roztoky	30
3.2 Metody	31
3.2.1 Izolace protilátek	31
3.2.2 Optimalizace ELISA metody	31
3.2.3 Křížová reaktivita	32
3.2.4 Příprava imunoafinitního gelu	33
3.2.5 Stanovení kapacity imunoafinitního gelu	34
3.2.6 Kvantifikace neurosteroidů v krevním séru a mozkomíšním moku	36
4 Výsledky	37
4.1 Charakteristiky protilátky	37
4.2 Křížová reaktivita	39
4.3 Kapacita imunoafinitního gelu	41
4.4 Kvantifikace neurosteroidů v krevním séru a mozkomíšním moku	42
5 Diskuze	43
6 Závěr	45
Seznam literatury	46

## Seznam použitých zkratek

AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-propionát
APC	Antigen prezentující buňka
B	B-lymfocyt
BCR	B-cell receptor
BSA	Hovězí sérový albumin
C doména	Konstantní doména
CDR	Complementarity Determining Region
CNS	Centrální nervová soustava
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEAS	Dehydroepiandrosteron sulfát
DMSO	Dimethylsulfoxid
EIA	Enzymová imunoanalýza
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
Fab-fragment	Fragment Antigen Binding
Fc-fragment	Fragment Crystalizable
FR	Framework Region
GABA	$\gamma$ -aminomáslená kyselina
H řetězec	Těžký řetězec
HRP	Křenová peroxidáza
IAC	Imunoafinitní chromatografie
KA	Kainát
L řetězec	Lehký řetězec
LD	Limit detekce
MOPS	Kyselina 3-morfolinopropansulfanová
MS	Hmotnostní spektrometrie
NMDA	N-methyl-D-aspartát
NS	Neurosteroidy
PBS	Fosfátový pufr
RIA	Radioimunoanalýza
RS	Roztroušená skleróza
scc	Side-chain cleavage (štěpící postranní řetězec)
TBM	3,3', 5,5'-tetrametylbenzidin
T <sub>H</sub>	Pomocný lymfocyt T
THDOC	Allotetrahydrodeoxykortikosteron

TSPO	Translokátorový protein
UHPLC	Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
V doména	Variabilní doména



# 1 Úvod a cíl bakalářské práce

Neurosteroidy jsou steroidní látky, jež jsou syntetizované přímo v nervové tkáni z cholesterolu nebo z prekurzorů, které jsou přenášeny krví. Tyto látky pozitivně ovlivňují vývoj nervové soustavy, mají vliv na stres, učení, paměť, agresivitu, úzkost a patří mezi klíčové faktory, které ovlivňují chování v dospělosti. Změny v jejich koncentracích mohou vést ke vzniku patologických stavů nebo naopak mohou mít léčebné účinky, a proto mohou být neurosteroidy, zejména tedy jejich syntetické deriváty, použity v medicíně k léčbě neurologických a neurodegenerativních chorob.

Neurosteroidy, ale i jiné látky lze stanovit pomocí imunochemických metod, které jsou v dnešní době velice rozšířeny. Imunitní systém je schopný rozlišit tělu cizí struktury tzv. antigeny a produkovat prostřednictvím plazmatických buněk protilátky, které s těmito antigeny specificky reagují a váží se na ně. Protilátky jsou známé více než sto let, mají globulární charakter, proto jsou označovány jako imunoglobuliny. Jedná se o glykoproteinové molekuly, které jsou přítomny zejména v krevním séru. Základní jednotka imunoglobulinu se skládá ze dvou těžkých a dvou lehkých polypeptidových řetězců, které jsou navzájem spojeny disulfidovými můstky. Na molekule imunoglobulinu se nachází vazebná místa, která jsou schopná specificky reagovat s antigeny, které vyvolaly tvorbu této protilátky. Konkrétně reagují jen s částí antigenu, která se nazývá antigenní determinanta. Vznik této vazby hraje klíčovou roli v imunochemických metodách pro stanovení, kvantifikaci nebo separaci různých látek. V dnešní době jsme schopni připravit protilátky uměle imunizací laboratorního zvířete, tyto protilátky jsou poté izolovány a následně využity v imunochemických metodách. Během imunizace vzniká směs protilátek, každou protilátku produkuje jiný klon lymfocytu B a každá je specifická k jiné antigenní determinantě. Tyto protilátky se nazývají polyklonální. Monoklonální protilátky jsou produktem jediného klonu lymfocytu B, jsou homogenní a specifické vůči konkrétní antigenní determinantě. Získávají se laboratorně pomocí hybridomové technologie.

Cílem této práce bylo charakterizovat polyklonální protilátky proti neurosteroidu s označením JB12, to bylo provedeno pomocí enzymové

imunoanalýzy (EIA). Tyto protilátky byly následně navázány na vhodný sorbent, vzniknul tak imunosorbent (imunoafinitní gel) použitelný pro imunoafinitní chromatografii (IAC). Koncentrace izolovaných neurosteroidů byla měřena pomocí ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC) ve spojení s hmotnostní spektrometrií (MS). U takto připraveného imunosorbentu byla stanovena jeho kapacita a na závěr byl použit pro izolaci neurosteroidů ze vzorků pocházejících přímo od pacientů trpících roztroušenou sklerózou.

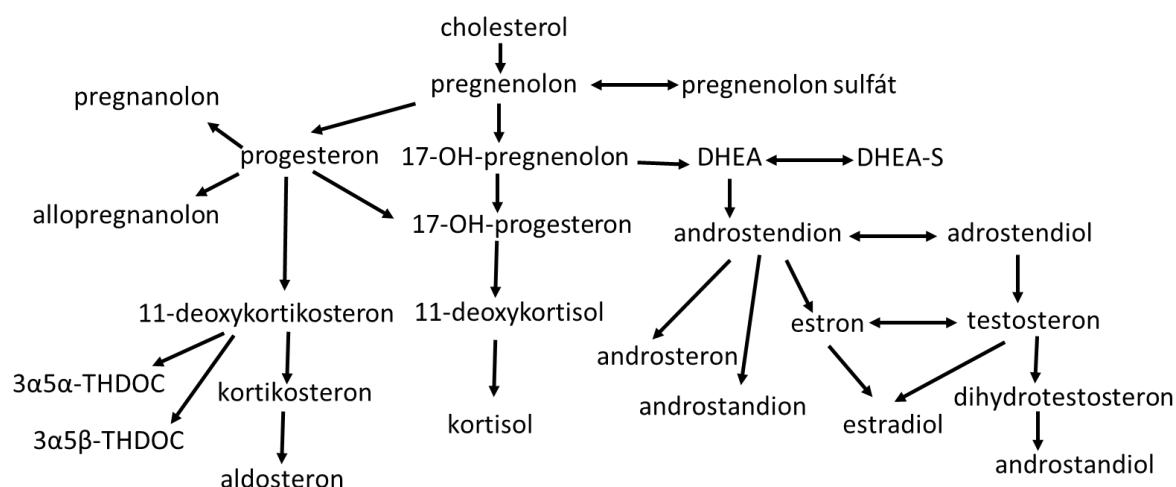
## 2 Teoretická část

### 2.1 Neurosteroidy

Steroidní látky, které jsou syntetizovány přímo v nervové tkáni, se nazývají neurosteroidy (Corpéchet et al., 1981). Neurosteroidy tvoří důležitou podskupinu neuroaktivních steroidů (Bičíková a Hampl, 2004), které zahrnují látky ovlivňující nervový systém negenomickou cestou (Knytl a Mohr, 2016). Patří sem tedy již zmíněné neurosteroidy, vznikající v nervovém systému, a steroidní hormony, které jsou syntetizovány v periferních endokrinních žlázách a do mozku se dostávají krví.

Označení neurosteroid poprvé použil v roce 1981 francouzský fyziolog Etienne Baulieu pro dehydroepiandrosteron sulfát (DHEAS), který byl nalezen ve vysokých koncentracích v mozku i po odstranění pohlavních žláz a nadledvin (Knytl a Mohr, 2016). Tento pojem je nyní široce používán pro steroidy syntetizované v mozku (Reddy, 2010).

Jejich syntéza probíhá z cholesterolu nebo ze steroidních prekurzorů, které pochází z periferních zdrojů (Cais a Vyklický, 2006). Neurosteroidy jsou vysoce lipofilní a můžou snadno překročit hematoencefalickou bariéru a vyvolat změny ve fungování nervové soustavy (Reddy, 2010). Lze je rozdělit do tří skupin: Jsou to pregnanové neurosteroidy (např. allopregnanolon), androstanové neurosteroidy (např. androstan-3,17-diol) a sulfatované neurosteroidy (např. pregnenolon sulfát).



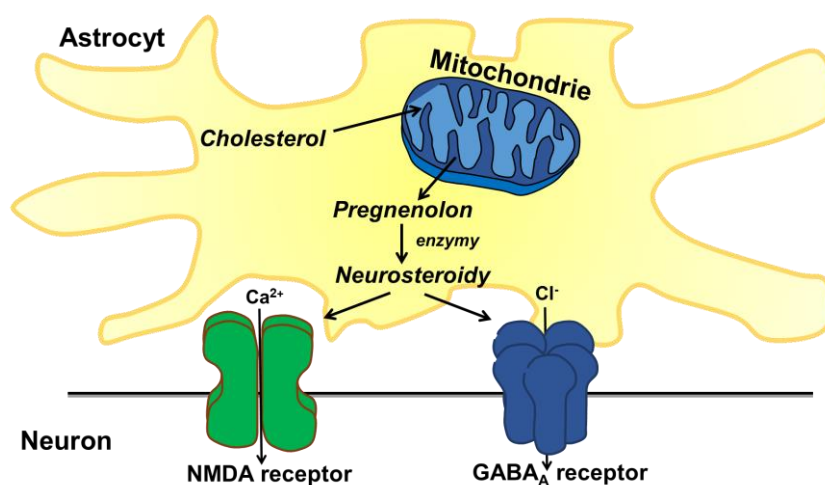
Obr. 1: Zjednodušená schéma biosyntézy steroidů (upraveno dle Knytl a Mohr, 2016)

### 2.1.1 Biosyntéza neurosteroidů

Neurosteroidy jsou částečně nezávislé na sekreci steroidogenních žláz. Tvoří se *de novo* z cholesterolu nebo z prekurzorů, které překonaly hematoencefalickou bariéru, v gliových buňkách a v neuronech (Bičíková a Hampl, 2007; Reddy, 2010). Steroidní prekurzory neurosteroidů jsou syntetizovány převážně v pohlavních žlázách, nadledvinkách a v placentě (Reddy, 2010).

V nervové tkáni se vyskytují enzymy, které se podílí na tvorbě i na degradaci biologicky aktivních neurosteroidů (Dorda et al., 2001). Mezi enzymy, které slouží pro tvorbu nejdůležitějších neurosteroidů patří hydroxysteroidní dehydrogenázy, 5 $\alpha$ -reduktáza, sulfatáza, sulfotransferáza a 7-hydroxyláza (Bičíková a Hampl, 2007).

Astrocyty a neurony exprimují v mozku enzym cytochrom P450, který dokáže štěpit postranní řetězec cholesterolu (CYP450scc) (Reddy, 2010). Z cholesterolu poté vznikne pregnenolon, což je klíčový meziprodukt nezbytný pro biosyntézu neurosteroidů (obr. 2). Enzym 3 $\beta$ -hydroxysteroidní dehydrogenáza je nutná pro další přeměnu pregnenolonu na progesteron. Biosyntézu neurosteroidů se účastní translokátorový protein (TSPO), dříve nazývaný periferní nebo mitochondriální benzodiazepinový receptor (Reddy, 2010). Tento protein se nachází v periferních tkáních a mozku na vnější mitochondriální membráně. Podporuje transport cholesterolu na vnitřní membránu, kde je dostupný pro CYP450scc a umožňuje tak syntézu neurosteroidů.



Obr. 2: Biosyntéza neurosteroidů (upraveno dle Benarroch, 2007)

## 2.1.2 Mechanismus působení na receptory

Klasické steroidní hormony působí tak, že dochází k vazbě steroidu na nitrobuňčné receptory, následně dojde k přemístění komplexu steroidní hormon-receptor do jádra buňky a ovlivnění genové transkripce, účinek je na rozdíl od neurosteroidů vyvolán v řádu hodin až dnů (Dorda et al., 2001). Působení neurosteroidů se v centrální nervové soustavě (CNS) projeví již během několika sekund nebo dokonce milisekund, mají negenomický účinek.

Přenos mezi neurony tzv. synaptický přenos je zásadní pro schopnost nervového systému zpracovávat a ukládat informace (Vyklícký et al., 2014). Synapse jsou specializované kontakty mezi neurony, které se realizují pomocí neurotransmiterů (neuropřenašečů). Neurotransmitter jednoho neuronu aktivuje neurotransmiterové receptory na membráně neuronu dalšího.

Ionotropní GABA a NMDA receptory zprostředkovávají většinu synaptických přenosů v CNS, využívají k tomu již zmíněné neurotransmitery (Cais a Vyklícký, 2006). Neurosteroidy jsou schopné působit na tyto membránové receptory a moduluji funkce některých ligandem (neurotransmitter) aktivovaných iontových kanálů. Dochází tak ke změně potenciálu buněčné membrány. Ligandem aktivované iontové kanály tedy hrají klíčovou roli v etiologii celé řady neurologických a psychiatrických poruch. Toho může být v budoucnu využito v terapii a psychofarmakologii.

### 2.1.2.1 GABA receptory

Kyselina  $\gamma$ -aminomáselná patří mezi hlavní inhibiční neurotransmitery v CNS (Dorda et al., 2001). Je schopna aktivovat iontové kanály propustné pro chloridové ionty.

Receptory, které jsou aktivovány pomocí kyseliny  $\gamma$ -aminomáselné se nazývají GABA receptory, dělíme je na ionotropní GABA<sub>A</sub>, které přímo tvoří iontový kanál pro Cl<sup>-</sup> (Cais a Vyklícký, 2006). Dále metabotropní GABA<sub>B</sub> receptor, který je spřažen G proteinem s Na<sup>+</sup> a K<sup>+</sup> kanály. Třetí skupinou jsou GABA<sub>C</sub> receptory, které také tvoří iontový kanál pro Cl<sup>-</sup>, ale liší se podjednotkovým složením, distribucí v organismu a vlastnostmi.

GABA<sub>A</sub> receptor se skládá z pěti transmembránových podjednotek, které vytváří iontový kanál (Cais a Vyklícký, 2006). Receptor GABA<sub>A</sub> je hlavním cílem

neurosteroidů. Neurosteroidy mohou být pozitivními nebo negativními modulátory funkce tohoto receptoru v závislosti na struktuře steroidní molekuly (Reddy, 2010) a podjednotkovém složení receptoru (Dorda et al., 2001).

Neurosteroidy jako allopregnanolon nebo pregnanolon modulují GABA<sub>A</sub> receptor pozitivně, to znamená, že prodlužují dobu, po kterou jsou otevřeny jejich iontové kanály (Cais a Vyklický, 2006). Výsledný účinek je hypnotický, analgetický, odstraňující úzkost a snižující paměť, účinky jsou podobné benzodiazepinům (Bičíková a Hampl, 2004).

Sulfatací se stávají tyto metabolity negativními modulátory (Bičíková a Hampl, 2004). Pregnanolon sulfát nebo pregnenolon sulfát působí na GABA<sub>A</sub> receptory inhibičně (Cais a Vyklický, 2006) a příznivě ovlivňují paměť (Reddy, 2010).

#### **2.1.2.2 Glutamátové receptory**

Nevýznamnějším excitačním neurotransmiterem v CNS je L-glutamát (Cais a Vyklický, 2006).

Na základě mechanismu účinku rozlišujeme dvě skupiny glutamátových receptorů (Cais et al., 2009). Jsou to ionotropní glutamátové receptory, které po aktivaci glutamátem přímo propouštějí kationty do buňky. Druhou skupinou jsou metabotropní glutamátové receptory, které jsou spřaženy s G proteiny.

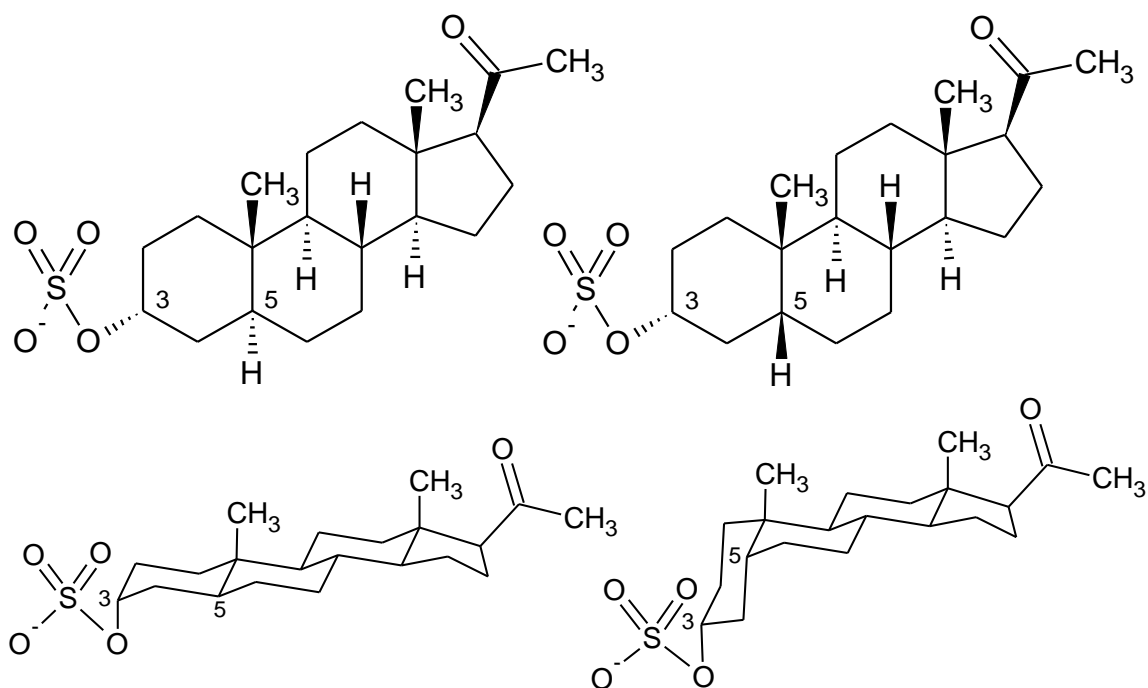
Ionotropní glutamátové receptory můžeme dále rozdělit do tří tříd nazvaných podle látek, které mají schopnost se k nim vázat (Cais et al., 2009). NMDA (N-methyl-D-aspartát), KA (kainát) a AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-propionát) receptory. Nejdůležitější skupinou jsou NMDA receptory.

NMDA receptor se skládá z několika podjednotek, je vysoce propustný pro vápenaté ionty a tím ovlivňuje řadu nitrobuňčných procesů (Cais a Vyklický, 2006). Pro jeho aktivaci je potřeba přítomnost glutamátu a glycinu.

Hrají významnou roli v celé řadě buněčných procesů, jako je například excitotoxicita, což je buněčná smrt způsobena v důsledku nadměrné aktivace glutamátových receptorů, čímž dojde k narušení homeostázy (Cais et al., 2009). NMDA receptory se podílejí na tvorbě paměti a procesu učení, ale také plní roli při vzniku a průběhu řady patologických stavů CNS (ischemické poškození, Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, schizofrenie).

U neurosteroidů, které mají přímý vliv na NMDA receptory, se vyskytuje v poloze C3 sulfátová skupina (Cais a Vyklický, 2006). Pregnenolon sulfát má na NMDA receptory potenciační účinek, zvyšuje se pravděpodobnost otevření iontového kanálu. Pozitivní modulátory (pregnenolon, pregnenolon sulfát, dehydroepiandrosteron, dehydroepiandrosteron sulfát) paměť zvyšují (Bičíková a Hampl, 2007). Potenciační účinek je větší, pokud je neurosteroid aplikován před glutamátem (Cais et al., 2009). Mechanismus působení tohoto neurosteroidu je komplexnější. Bylo zjištěno, že má i inhibiční účinek, který je ale však maskován mnohonásobně silnější potencionací. Působení neurosteroidů s potenciačním účinkem je závislé na fosforylaci.

Pregnanolon sulfát se liší absencí jedné dvojné vazby a odpovědi NMDA receptorů inhibuje, snižuje pravděpodobnost otevření iontového kanálu (Cais a Vyklický, 2006). Konečný účinek závisí na podjednotkovém složení NMDA receptorů. Společným rysem inhibičních steroidů je to, že mají nabitou skupinu na C3 steroidního jádra a dále je prostorové uspořádání chirálního uhlíku C3 a C5 takové, aby dávalo celé molekule zlomený tvar ( $5\beta$ ), jak je ukázáno na obr. 3 (Cais et al., 2009). K inhibici dojde, jen pokud byly receptory předem aktivovány agonistou.



Obr. 3: Struktura a tvar molekuly: allopregnanolon sulfát ( $5\alpha$ ) a pregnanolon sulfát ( $5\beta$ )

### 2.1.3 Vliv na chování

Bylo zjištěno, že neurosteroidy ovlivňují paměť, schopnost učení, reakci na stres, agresivitu a úzkost. (Cais a Vyklický, 2006). Jsou důležité pro správný vývoj a fungování mozku (Knytl a Mohr, 2016).

Změna v hladinách neurosteroidů, především tedy jejich snížená tvorba, může vést ke vzniku řady patologických stavů jako je například premenstruační syndrom, různé druhy deprese, některé formy epilepsie a také mohou přispívat k rozvoji neurodegenerativních chorob (Bičíková a Hampl, 2007). Bylo by je tedy možné potencionálně využít k léčbě neurologických a psychiatrických onemocnění (Cais a Vyklický, 2006).

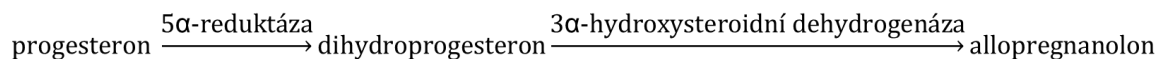
Některé neurosteroidy vykazují protikřečové účinky, čehož může být využito u osob trpících epilepsií (Dorda et al., 2001). Přirozeně se vyskytující allopregnanolon nebo pregnanolon snižují úzkost, stejné účinky mají i jejich syntetické analogy. Mohli by tak být alternativou k dnes používaným lékům proti úzkosti (např. benzodiazepiny), které mohou způsobovat poruchy paměti. Progesteron a allopregnanolon rovněž zkracují dobu potřebnou k navození spánku a prodlužují dobu non-REM fáze spánku, je tedy možné, že hrají přirozenou roli v regulaci spánku a mohli by být použity pro léčbu nespavosti.

Přírodní neurosteroidy mají nízkou biologickou dostupnost, mohou být tedy rychle inaktivovány a odstraněny (Reddy, 2010). Syntetické analogy mají lepší farmakokinetiku a účinnost, jsou využívány jako sedativa a léky proti úzkosti (minaxolon), anestetika (alfaxolon) a proti epilepsii (ganaxolon).

### 2.1.4 Allopregnanolon

Allopregnanolon ( $3\alpha$ -hydroxy- $5\alpha$ -pregnan-20-on) je nejstudovanějším neurosteroidem, a to vzhledem ke svým pozitivním vlastnostem (Stárka a Dušková, 2015). Jeho struktura je uvedena na obr. 5. Působí sedativně, antidepresivně, proti křečím, úzkosti, tlumí bolest, chrání nervový systém a příznivě ovlivňuje tvorbu myelinových pochev. Je to metabolit progesteronu, který vzniká z progesteronu v periférii i v mozku působením dvou enzymů:  $5\alpha$ -reduktázy a  $3\alpha$ -hydroxysteroidní dehydrogenázy (Bičíková a Hampl, 2004; Stárka a Dušková, 2015). Tato syntéza je znázorněna na obr. 4.





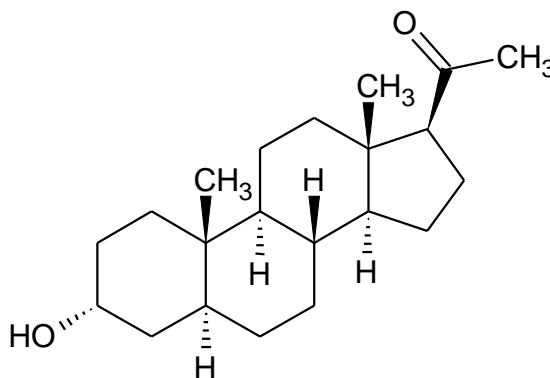
Obr. 4: Schéma syntézy allopregnanolonu

K léčebnému použití se moc nehodí, protože má krátký biologický poločas (Reddy, 2010) a může být metabolizován na nežádoucí produkty (Bičíková a Hampl, 2004). Významné jsou jeho syntetické deriváty. Další možností je podpora tvorby neurosteroidů přímo v mozku například zvýšením transportu cholesterolu na vnitřní mitochondriální membránu (Stárka a Dušková, 2015).

Ve stresových situacích nebo u onemocnění spojených se stresem (úzkostí, panika, deprese) byly zjištěny změny v hladinách neurosteroidů (Stárka a Dušková, 2015). Akutní stres má za následek zvýšení hladiny allopregnanolonu. Dlouhodobé stresové situace vedou k poklesu jeho hladiny. U lidí s velkými depresemi jsou hladiny allopregnanolonu sníženy, zvýšení jejich koncentrace má antidepresivní účinky. Allopregnanolon, ale i jiné deriváty progesteronu, lze použít i v léčbě epileptických stavů.

Allopregnanolon by bylo možné použít v terapii traumatického poškození mozku (Stárka a Dušková, 2015). Účinkuje na mozková traumata tak, že snižuje otok, zánět, apoptózu, oxidační stres a chrání mozek před ischemickým poškozením. Byl pozorován příznivý účinek allopregnanolonu na Alzheimerovu, Parkinsonovu nemoc a roztroušenou sklerózu. Allopregnanolon vyvolává tvorbu neuronů a oligodendrocytů.

V těhotenství je produkován ve zvýšené míře (Stárka a Dušková, 2015). Pomáhá překonat stres a zasahuje do sekrece oxytocinu a brání jeho předčasnému vyplavování. U plodu chrání nervový systém a povzbuzuje vývoj mozku. Je to klíčový faktor ve zrání nervového systému a následně i pro chování v dospělosti.



Obr. 5: Struktura allopregnanolonu

## 2.2 Protilátky a antigeny

Protilátky jsou známy přes sto let (Ferenčík et al., 2005). Již koncem 19. století se vědělo, že krevní sérum lidí a zvířat po překonání určitého onemocnění obsahuje látky, které jsou schopné ochránit jedince před tímto onemocněním v budoucnu. Paul Ehrlich tyto látky roku 1891 nazval jako protilátky. Spolu s Iljou Iljičem Mečnikovem dostal Nobelovu cenu za vypracování první teorie tvorby protilátek. K podrobnějšímu poznání jejich struktury došlo v 50. letech 20. století (Jílek, 2014). Později došlo k vysvětlení mechanismu vzniku variability protilátek a byl objeven způsob, jak připravit monoklonální protilátky.

Imunitní systém má schopnost rozlišit cizí struktury a reagovat na ně specifickou imunitní odpovědí, čímž dojde ke zneškodnění a vyloučení tělu cizorodé látky (Hamplová et al., 2015). Molekulární nebo buněčné struktury, které mají schopnost reagovat specificky s protilátkou, se nazývají antigeny (Fukal a Holubová, 2007). Antigeny mohou být přirozeného nebo syntetického původu (Lochmanová, 2014). Kompletní antigen je často nazýván jako imunogen, má schopnost navodit imunitní odpověď (tvorba protilátek, zapojení lymfocytů) a je schopný reagovat s protilátkami a lymfocyty. Imunogen se skládá z vysokomolekulárního nosiče a z nízkomolekulárních determinantních skupin (antigenní determinanty, epitopy) (Fukal, 1989). Nekompletní antigen se nazývá haptén. Je to nízkomolekulární látka, která sama nedokáže vyvolat imunitní odpověď (Bartoš et al., 2013). Toho je schopna jen po navázání na vhodný vysokomolekulární nosič. Imunogen má tedy vždy vlastnosti antigenu, ale antigen nemusí vždy navodit tvorbu protilátek (Fukal a Holubová, 2007).

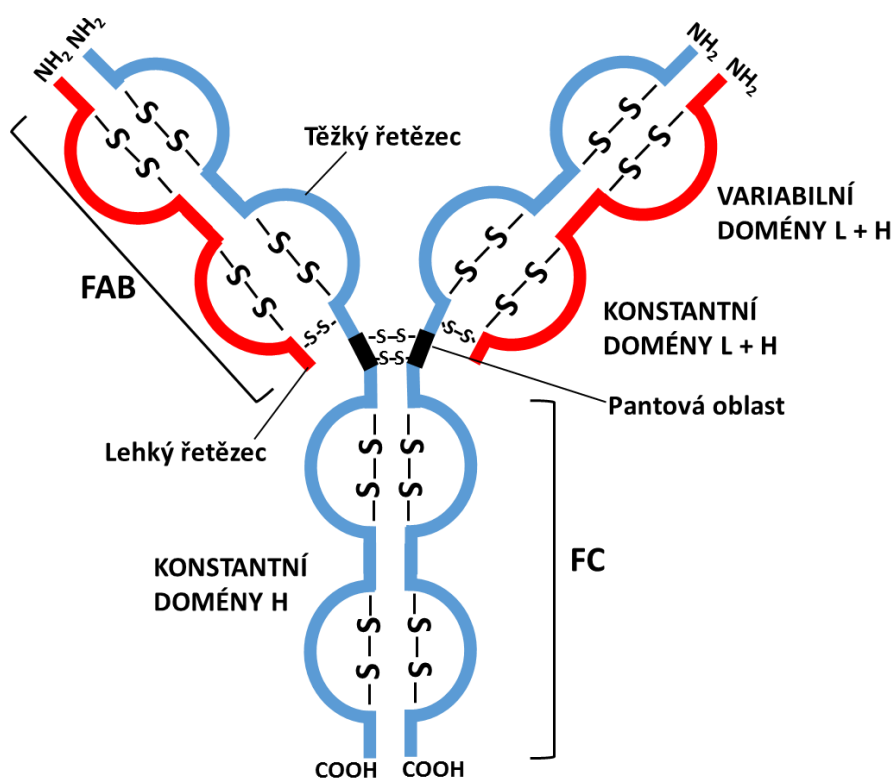
### 2.2.1 Struktura protilátek

Protilátky mají globulární charakter, proto patří mezi tzv. imunoglobuliny (Ig) (Fukal a Holubová, 2007). Z chemického hlediska se jedná o glykoproteinové molekuly, tedy proteiny s navázanými sacharidy (Bartůňková a Paulík, 2011).

Protilátky jsou charakterizovány dvěma základními vlastnostmi: specificita a rozmanitost (Lochmanová, 2014). Protilátky vznikají specificky proti konkrétní antigenní struktuře. Vytváří se tak ohromná rozmanitost, která umožňuje reakci protilátek s velkým množstvím různých antigenních struktur.

Každá molekula imunoglobulinu obsahuje nejméně jednu základní jednotku, která je tvořena 4 polypeptidovými řetězci (Lochmanová, 2014; Jílek, 2014; Bartůňková a Paulík, 2011). Její struktura je uspořádána do tvaru písmene ypsilon (obr. 6). Dva identické delší řetězce se označují jako těžké řetězce (H - Heavy) a dva identické kratší se nazývají lehké řetězce (L - Light) (Jílek, 2014). Lehké řetězce existují ve dvou typech, a to kappa ( $\kappa$ ) nebo lambda ( $\lambda$ ) (Ferenčík et al., 2005). Molekula imunoglobulinu obsahuje vždy jen jeden typ lehkého řetězce (Fukal a Holubová, 2007). Těžké řetězce existují v pěti typech ( $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) a podle nich se protilátky zařazují do 5 tříd (IgA, IgM, IgG, IgD, IgE) a následně i podtříd (Ferenčík et al., 2005). Na konstantní část těžkého řetězce je navázán oligosacharid (Fukal a Holubová, 2007).

Řetězce jsou navzájem spojeny disulfidovými vazbami mezi dvěma aminokyselinami (cysteiny) (Jílek, 2014). Disulfidové vazby se nachází i uvnitř řetězce, dochází tak ke vzniku kruhovitých smyček - domén. Názvy domén vycházejí z variabilního (V) nebo konstantního (C) pořadí aminokyselin v dané části řetězce (Lochmanová, 2014). Lehký řetězec obsahuje doménu variabilní (VL) a konstantní (CL), těžký řetězec jednu doménu variabilní (VH) a 3–4 domény konstantní (CH1–4).



Obr. 6: Struktura imunoglobulinu (upraveno dle Ferenčík et. al, 2005)

Konstantní domény slouží k aktivaci komplementu, vazbě na fagocyty, opsonizaci atd. (Jílek, 2014). Variabilní domény těžkého a lehkého řetězce slouží k navázání molekuly protilátky na antigenní determinantu. V molekule imunoglobulinu jsou dvě shodná vazebná místa (Ferenčík et al., 2005). Specifičnost protilátky je určena uspořádáním aminokyselin ve vazebném místě. Vazebné místo tvoří 3 hypervariabilní úseky (CDR - Complementarity Determining Region), v těchto úsecích může docházet k záměně aminokyselin (Fukal a Holubová, 2007). Tyto úseky jsou prostoupeny relativně konstantními oblastmi, (FR - Framework Region) které tvoří kostru variabilní oblasti.

Protilátky reagují pouze s malými částmi antigenu, které se nazývají antigenní determinanty (epitopy) (Jílek, 2014). Jejich struktura závisí na typu antigenu, tvoří ji aminokyselinové nebo monosacharidové jednotky (Fukal a Holubová, 2007). Protilátky mají jedinečnou schopnost rozlišovat i nepatrné rozdíly jednotlivých antigenních determinant (Jílek, 2014). Při vzniku vazby mezi antigenní determinantou a vazebným místem protilátky se uplatňují různé druhy interakcí: hydrofobní interakce, vodíkové můstky, van der Waalovy síly a elektrostatické síly. Vazebné místo protilátky je vždy svým tvarem komplementární k epitopu na povrchu antigenu. Vzniká imunokomplex, který je reverzibilní (Hořejší et al., 2013).

Oblast, která se nachází v polovině těžkých řetězců je nazývána jako pantová oblast (Hinge), jelikož vykazuje značnou prostorovou flexibilitu (Lochmanová, 2014). Tato oblast je citlivá na působení enzymů. Papein nebo pepsin je schopný v tomto místě oddělit antigen vážící fragment Fab-fragment (Fragment Antigen Binding) od Fc-fragmentu (Fragment Crystalizable), který slouží k vazbě protilátky s Fc-receptorem řady buněk.

### **2.2.2 Třídy imunoglobulinů**

Protilátky třídy IgG, IgD, IgE a sérový IgA mají tvar písmene ypsilon (Ferenčík et al., 2005). Sekreční IgA je dimer, molekula IgM se vyskytuje jako pentamer v krevním séru a monomer jako součást antigenního receptoru B-lymfocytů. Molekuly všech tříd mají stejné lehké řetězce, liší se navzájem těžkými řetězci.

Imunoglobuliny se vyskytují především v krevním séru (Fukal a Holubová, 2007). V menším množství také v jiných tělních tekutinách, intracelulárním

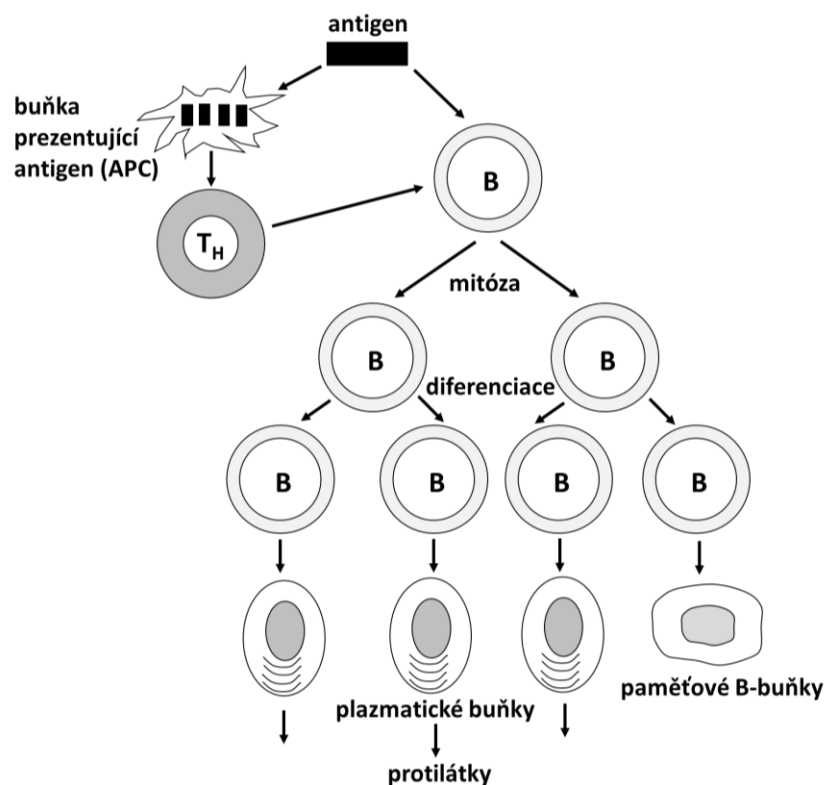
prostoru a cytoplazmatické membráně B-lymfocytů. IgG a IgM patří mezi typické protilátky cirkulující v krvi, tvoří se při specifické imunitní reakci vyvolané antigenem, který pronikl do krve (Ferenčík et al., 2005). Při prvním kontaktu s antigenem vznikají protilátky IgM, při dalším kontaktu protilátky IgG, které jsou součástí celkové imunitní reakce. Největší koncentraci v krevním séru má IgG. Protilátky IgA se tvoří, pokud se antigen do organismu dostane sliznicí, vzniká pak místní imunitní reakce. V sekretech sliznic se nachází sekreční IgA, v krevním séru pak jeho monomerní forma. IgD je součástí receptorů, které rozeznávají antigen na B-lymfocytech. IgE vzniká jako odpověď na alergeny a účastní se časných alergických reakcí z přecitlivělosti a chrání sliznice před parazity.

### **2.2.3 Tvorba protilátek**

U člověka imunizace probíhá přirozeně během vývoje jedince nebo umělým podáváním očkovací látky za účelem ochrany proti infekčním onemocněním (Ferenčík, 1989). Zvířata se imunizují za účelem získání protilátek ve formě imunního séra tzv. antiséra. Tvorby protilátek se účastní plazmatické buňky, které vznikají z lymfocytů B (Bartůňková a Paulík, 2011). Heterogenita protilátek je umožněna díky velké variabilitě v sekvenci aminokyselin jednotlivých polypeptidových řetězců (Bartoš et al., 2013). K rozrůznění dochází během zrání B-lymfocytů, kdy dochází k náhodnému přeskupování strukturálních genů, které jsou složeny ze subgenů lehkých a těžkých řetězců. Obrovská rozmanitost protilátek je umožněna kombinací lehkých a těžkých řetězců.

Na povrchu B-lymfocytů se nachází receptor pro antigen, který se nazývá BCR (B-cell receptor) (Bartůňková a Paulík, 2011). Tento receptor je tvořen molekulami imunoglobulinů (IgD a monomerní IgM) (Ferenčík et al., 2005). Každá skupina B-lymfocytů má jinou specifičnost, to znamená, že reagují s jiným antigenem. Pokud je navázán antigen na BCR receptor, dojde k tvorbě informačních molekul v cytoplazmě lymfocytů B (Jílek, 2014). Tyto molekuly dokážou v jádře spustit přepis genů pro imunoglobuliny nebo připravovat buněčné dělení.

Aktivovaný B-lymfocyt se začne dělit a diferenciovat na plazmatické buňky, tyto buňky syntetizují a vylučují protilátky se stejnou specifíčností, jako měl imunoglobulin v BCR receptorech aktivované skupiny lymfocytů B (Ferencík et al., 2005). Takto přímo mohou aktivovat B-lymfocyty především polysacharidové antigeny. Proteinové antigeny musí být nejdříve upraveny v buňkách prezentujících antigen a vyžadují také zapojení pomocných lymfocytů T ( $T_H$ ).



Obr. 7: Aktivace B-lymfocytů specifickým antigenem

## 2.2.4 Příprava protilátek

Protilátky se nejčastěji získávají umělým aplikováním imunogenu laboratorním zvířatům. Tento proces se nazývá imunizace (Bartoš et al., 2013). Největší množství protilátek se nachází v krvi, izolace specifických protilátek je velmi složitá, proto se nejčastěji používá kompletní krevní sérum imunizovaného zvířete (antisérum), případně lze použít izolovaná globulinová frakce nebo výjimečně izolované specifické protilátky (Fukal a Holubová, 2007). V laboratorních podmínkách se na přípravu protilátek používají myši a králci, při potřebě většího množství antiséra se využívají kozy, prasata, ovce nebo koně. Imunogen je do těla zvířete vpraven injekčně spolu s podpurnými látkami

(adjuvans), které mají za úkol chránit imunogen před rychlým odbouráním a stimulovat imunitní odpověď. Dochází tak ke stimulaci různých klonů lymfocytů B, jejich proliferaci a diferenciaci na plazmatické buňky (Bartoš et al., 2013). Každý klon reaguje na jiný epitop, proto vznikají i protilátky proti různým epitopům daného antigenu. Tyto protilátky se nazývají polyklonální.

Po první aplikaci imunogenu je vyvolána primární imunitní odpověď, vzniká malé množství protilátek především třídy IgM (Fukal a Holubová, 2007). Proto je zvíře imunizováno opakovaně po dobu několika týdnů až měsíců podle navržených imunizačních schémat, aby došlo ke vzniku sekundární imunitní odpovědi. Z antiséra je možné izolovat imunoglobulinovou frakci srážením síranem amonným, ionexovou nebo gelovou chromatografií atd. Takto připravené protilátky jsou směsí protilátek, jsou tedy značně heterogenní. Proto byl v 70. letech minulého století vypracován postup přípravy monoklonálních protilátek. Monoklonální protilátky jsou produktem plazmatických buněk odvozených od jednoho B-lymfocytu a jsou specifické proti jednomu epitopu (Bartůňková a Paulík, 2011). Jedná se o homogenní protilátky, které jsou naprosto identické, se stejnou strukturou, specificitou a afinitou k antigenu (Fukal a Holubová, 2007). Monoklonální protilátky tedy umožňují standardizaci imunochemických metod. Plazmatické buňky nejsou schopné neomezeného množení, proto se fúzí s nádorovými buňkami (myelomové buňky), které jsou nesmrtelné (Chromý, 2011). Výsledkem je hybridomová buňka (hybridom), která má vlastnosti lymfocytů i myelomových buněk (Novák, 2002). To znamená, že je schopna tvořit protilátky a zachovala si nesmrtelnost myelomové linie. Monoklonální protilátky vznikají v organismu především za patologických okolností (Hořejší et al., 2013).

### **2.3 Imunochemie a imunoanalýza**

Poznatky z imunologie, která se zabývá studiem imunitního systému, jeho strukturou, organizací a funkcí, v dnešní době pronikly do mnoho dalších oborů, jako je například alergologie, imunogenetika, buněčná imunologie a imunochemie (Hamplová et al., 2015). Pojem imunochemie poprvé použil švédský chemik S. A. Arhenius v roce 1907 (Chromý, 2011).

Imunochemie zkoumá imunitní procesy na molekulární úrovni, biosyntézu, strukturu, biologickou aktivitu a interakce molekul imunitního systému (především antigenů a protilátek) (Fukal, 1989).

Imunochemické metody jsou založeny na specifické interakci mezi protilátkou a antigenem (nebo haptenem), proti kterému byla tato protilátka vytvořena (Bartoš et al., 2013). Tyto metody mohou být využity pro detekci, stanovení nebo separaci různých biologicky aktivních látek. Slouží ke sledování koncentrací antigenů, haptenu i protilátek, což umožňuje stanovit diagnózu, zjistit zbytkovou koncentraci léčiv nebo odhalit nepovolené používání návykových a podpůrných látek (Fukal a Holubová, 2007). V posledních dvou desetiletích došlo k velkému rozvoji a využití těchto technik imunoanalýzy především v biochemických a medicínských oborech.

### **2.3.1 Enzymová imunoanalýza**

Enzymová imunoanalýza (EIA) je vysoce citlivá imunochemická metoda využívající reakci mezi antigenem a protilátkou (Lochmanová, 2014). Slouží k detekci nebo kvantifikaci stanovované látky (Fukal a Holubová, 2007).

Detekce imunokomplexu (protilátka a antigen) se provádí za použití enzymaticky značené protilátky nebo antigenu (Bartůňková a Paulík, 2011). Enzymy byly k značení v imunoanalýze poprvé použity v roce 1971. Nahradily některé radionuklidy, které byly do té doby používány (Chromý 2011).

Enzym je chemicky vázán na protilátku nebo na antigen, takto označená látka se nazývá konjugát (Bartoš et al., 2013). Enzymy vhodné pro použití musí mít malou molekulovou hmotnost, musí být schopné vazby na protilátky nebo antigeny, musí být stabilní, musí mít vysokou enzymovou aktivitu, reakční produkt musí být barevný nebo snadno detekovatelný a enzym musí být snadno dostupný (Lochmanová, 2014). Nejpoužívanějším enzymem pro EIA je křenová peroxidáza. Jejím substrátem je obvykle peroxid vodíku. Při reakci enzymu se substrátem se uvolňuje kyslík, který v spřažené reakci oxiduje chromogen a vzniká barevný reakční produkt. Jako chromogen je využíván například TBM (3,3', 5,5'-tetrametylbenzidin), oxidací tohoto chromogenu vznikají jasně modré reakční produkty (Fukal a Holubová, 2007). Enzymová reakce je následně zastavena kyselinou a barva produktů se mění na žlutou s absorpčním



maximem 450 nm. Dalšími vhodnými enzymy jsou alkalická fosfatáza, beta galaktozidáza a glukozaoxidáza (Lochmanová, 2014).

### **2.3.1.1 Homogenní enzymová imunoanalýza**

Homogenní kompetitivní imunoanalýza využívá kompetice mezi známým množstvím antigenu, který je značen enzymem a neznačeným (stanovovaným) antigenem o vazbu na omezeném množství protilátky (Lochmanová, 2014). Aktivita volné značené molekuly je odlišná, než aktivita značené molekuly v komplexu protilátka-antigen (Ferenčík, 1989). Homogenní stanovení tedy nevyžaduje oddělení volného značeného antigenu a vázaného značeného antigenu (Novák, 2002). Pokud dojde k navázání značeného antigenu na protilátku, tak dochází k zastínění aktivního centra enzymu a enzym nevykazuje aktivitu (Bartoš et al., 2013). Enzymová aktivita je tím vyšší, čím je větší množství stanovovaného antigenu ve vzorku, protože se ho na protilátku naváže více a v nenavázané formě zůstane více značeného antigenu. Enzymová aktivita je pak přímo úměrná množství stanovovaného antigenu.

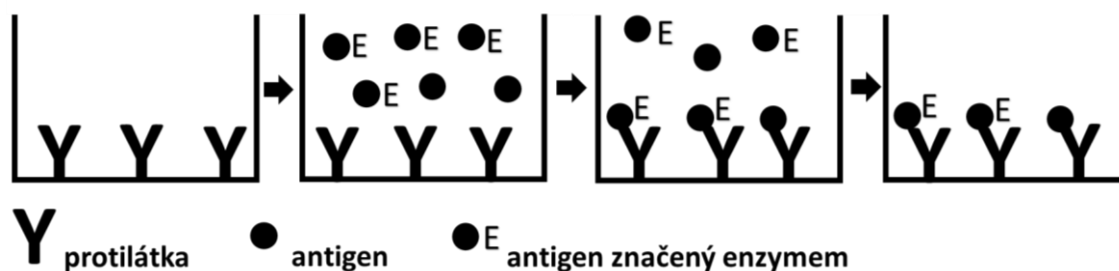
### **2.3.1.2 Heterogenní enzymová imunoanalýza na pevné fázi**

Heterogenní imunoanalýza bývá označována jako ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) (Lochmanová, 2014). Heterogenní stanovení vyžaduje oddělení nenavázaného značeného reaktantu od jeho vázané formy, to se nejčastěji provádí pomocí adsorpce na pevnou fázi a následným promytím (Novák, 2002). Jedna ze složek reakce (antigen nebo protilátka) je navázána na povrchu pevné fáze (Lochmanová, 2014). Jako pevná fáze se používá povrch zkumavek, jamky mikrotitračních destiček, polystyrenové nebo magnetické částice. Proteiny jsou na pevný nosič zakotveny pomocí nescifických hydrofobních interakcí (Fukal a Holubová, 2007). Nejpoužívanějším materiálem je polystyren. Látky, které nemají bílkovinou povahu, se nejdříve musí konjugovat s inertním proteinem. Mikrotitrační destičky standardního rozměru obsahují 96 jamek v osmi řádcích a dvanácti sloupcích, objem jedné jamky je okolo 300 µl.

Existuje celá řada variant uspořádání této metody (Fukal a Holubová, 2007). Lze je rozdělit podle toho, zda probíhá v kompetitivním nebo

v nekompetitivním uspořádání a také podle imunoreaktantu, který je zakotven na pevnou fázi (antigen nebo protilátka).

U kompetitivního přímého uspořádání ELISA metody (obr. 8) soutěží známé množství značeného antigenu s neznačeným stanovovaným antigenem o omezené množství vazebných míst protilátky vázané na pevném nosiči (Lochmanová, 2014). Množství značeného antigenu je vždy větší než množství protilátky. Proto nedojde k navázání všech přítomných antigenů (Bartoš et al., 2013). Neznačený (stanovovaný) antigen inhibuje navázání maximálního množství značeného antigenu na protilátku (Fukal a Holubová, 2007). Čím více je neznačeného antigenu, tím méně dochází k vazbě značeného antigenu na protilátku. Vznikají dva komplexy, jeden značený (značený antigen, protilátka) a jeden neznačený (neznačený antigen, protilátka) (Bartoš et al., 2013). Množství vznikajícího značeného komplexu je nepřímo úměrné množství přítomného neznačeného antigenu. Toto uspořádání bylo využito v praktické části této práce.



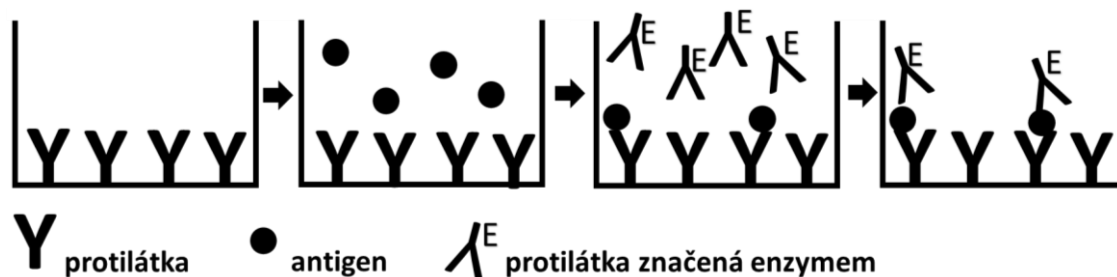
Obr. 8: Schéma přímé ELISA metody

Po proběhnutí imunochemické reakce jsou během promytí odstraněny nenavázané složky, které nebyly navázané do imunokomplexu (Bartoš et al., 2013). Po přidání enzymového substrátu a inkubaci je substrát pomocí enzymu, kterým byl označen v tomto případě antigen, přeměňován na barevný produkt. Tato enzymatická reakce je po určité době zastavena a následně je provedeno spektrofotometrické měření.

K spektrofotometrické detekci se používá ELISA-reader (Bartůňková a Paulík, 2011). Jedná se o modifikovaný spektrofotometr, který umožňuje měření barevné reakce v jamkách mikrotitrační destičky při různých vlnových délkách.

Druhým typem je nekompetitivní enzymová imunoanalýza (Lochmanová, 2014). Při stanovení antigenů je na pevnou fázi navázána specifická protilátka,

kteřá je vzhledem ke stanovovanému analytu v přebytku. S ní reaguje stanovovaný antigen (Bartoš et al., 2013). Pro kvantifikaci slouží druhá specifická protilátka, která je vhodně označená. Přidává se v nadbytku a váže se na tento antigen na jinou antigenní determinantu. Po promytí se spektrofotometricky měří enzymová aktivita. Množství komplexu (protilátka, antigen a značená protilátka) je přímo úměrné množství stanovovaného antigenu. Tato metoda je označovaná jako sendvičová (obr. 9).



Obr. 9: Schéma sendvičové ELISA metody

### 2.3.2 Imunoafinitní chromatografie

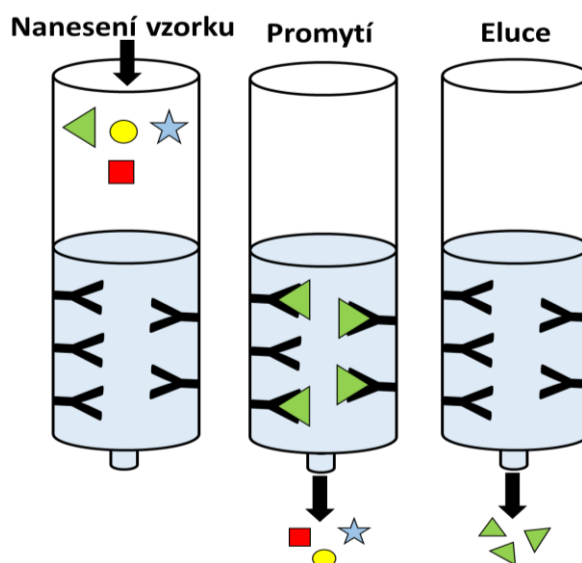
Další metodou je imunoafinitní chromatografie (IAC). Řadí se mezi separační techniky (Káš et al., 2005). Pracuje na stejném principu jako jiné afinitní chromatografie, které využívají přirozené schopnosti řady látek rozpoznat jiné molekuly.

Dochází ke specifické interakci mezi ligandem kovalentně navázaným na pevném nosiči a látkou, která má být izolována (Fukal a Holubová, 2007). V případě imunoafinitní chromatografie (obr. 10) spolu interaguje protilátka a antigen nebo haptén. Jeden člen z této dvojice tzv. ligand je navázan na pevný nosič (Ferenčík, 1989). Na tento nosič se poté nanese roztok, který obsahuje různou směs látek. Na ligand se budou vázat jen molekuly druhého člena z dané dvojice, které mají k ligandu afinitu. Molekuly této druhé látky se poté uvolňují desorpční a získávají se v čistém stavu. Pokud je izolována protilátka, tak ligandem je antigen, když je izolován antigen, tak ligandem je protilátka. Ligand používaný při analýze musí mít schopnost vázat molekuly, které mají být izolované a také musí obsahovat reaktivní skupinu, prostřednictvím které se naváže na nosič (Ferenčík, 1989).

Nosič (imunosorbent), na který je zakotven ligand, musí splňovat určité vlastnosti (Fukal a Holubová, 2007). Jeho chemická reaktivita musí umožnit

navázat ligand (dostatek aktivních skupin), imunosorbent musí být nerozpustný a chemicky stabilní při interakci se vzorkem a při eluci, musí být odolný proti enzymové a mikrobiální degradaci, musí mít nízké nespécifické sorpce, měl by mít hydrofilní charakter a jeho částice by měly mít vhodný tvar a velikost. Jako imunosorbenty splňující tyto požadavky se používají nosiče na bázi agarózy, celulózy, škrobu, polyakrylamidu, hydroxyalkylmetakrylátu a porézního skla. Například Affi-Gel 10 a 15, což je N-hydroxysukcinimidový ester derivátu zesíťované agarózy. Tento derivát je schopný reagovat s primárními aminovými skupinami, které se nachází v proteinech. Imunoglobuliny tak mohou být ukotveny v nosiči a vzniká imunosorbent (Ferenčík, 1989). Imunosorbent je umístěn do plastové kolonky, přes kterou se nechá protéct sérum nebo jiný roztok, z kterého jsou izolovány antigeny nebo protilátky.

Při imunoafinitní chromatografii dojde k interakci antigenu s protilátkou navázanou na nosič (Fukal a Holubová, 2007). Tento specificky navázaný antigen nebo haptén musí být z imunosorbentu uvolněn. Provádí se to změnou chemických a fyzikálních podmínek, při které dochází ke změně sekundární a terciární struktury obou partnerů imunoreakce a následnému rozštěpení imunokomplexu. Tyto konformační změny by měly být vratné, aby mohl být antigen izolován v nativní formě a aby byla zachována imunoreaktivita imunosorbentu a mohl být tak opakovaně využíván. K uvolnění antigenu se nejčastěji používá změna pH, snížení iontové síly (destilovaná voda), chaotropní činidla, denaturační činidla nebo nepolární rozpouštěla.



Obr. 10: Schéma imunoafinitní chromatografie  
28

## 3 Praktická část

### 3.1 Přístroje, chemikálie a roztoky

#### 3.1.1 Přístroje

Vortex (Infrared Vortex Mixer - Wizard, VELP Scientifica, Itálie), ultrazvuková čistička (Elmasonic S10, Elma, Německo), centrifuga (Heraeus Biofuge Stratos, Thermo Scientific, USA), pH metr (pH 700, Eutech instruments, Nizozemsko), Rotátor (Rotator SB3, Stuart, UK), spektrofotometr (UV-1601, Shimadzu, Japonsko), ELISA-reader (Microplate reader, Finstruments, Finsko), odparka (Turbo VAP, LV, Caliper Life Sciences, USA), automatická plnička (Labsystems Multidrop DW, Thermo Scientific, USA).

#### 3.1.2 Chemikálie

Síran amonný (Lach-Ner, ČR), amoniak (Lach-Ner, ČR), chlorid sodný (Lach-Ner, ČR), dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného (Lach-Ner, ČR), dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného (Lach-Ner, ČR), uhličitan sodný (Lachema, ČR), hydrogenuhličitan sodný (Lachema, ČR), TWEEN<sub>20</sub> (Sigma-Aldrich, USA), hovězí sérový albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, USA), octan sodný (Lachema, ČR), kyselina citronová (Lachema, ČR), dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich, USA), peroxid vodíku (Lach-Ner, ČR), Affi-Gel 10 (Bio-Rad, Německo), 1 mol/l Ethanolamin hydrochlorid (pH 8) (Sigma-Aldrich, USA), methanol (Merck KGaA, Německo), standardy steroidů (Sigma-Aldrich, USA), azid sodný (Sigma-Aldrich, USA), křenová peroxidáza (HRP) (Sigma-Aldrich, USA), kyselina sírová (Lachema, ČR), acetonitril (Merck KGaA, Německo), MOPS (kyselina 3-morfolinopropansulfonová) (Sigma-Aldrich, USA), referenční matrice (Biopanda Reagents, UK), interní standardy neurosteroidů (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., USA).

Standardy neurosteroidů s označením JB12, JB13, VK 485, VK 145, VK 146 a VK 466 byly připraveny v Ústavu organické chemie a biochemie v Praze. Polyklonální protilátky proti antigenu JB12-BSA byly připraveny

v Laboratoři růstových regulátorů, stejně jako konjugát tohoto antigenu s křenovou peroxidázou.

### **3.1.3 Roztoky**

*Síran amonný:* K mírně zahřáté redestilované vodě byl přidán síran amonný, roztok byl připraven mírně přesycený, pomocí amoniaku bylo pH upraveno na 7,2, byl přefiltrován, k roztoku byl přidán i nerozpuštěný síran amonný.

*Pufr PBS:* 0,87 g chloridu sodného a 7,8 g dihydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného na 1 litr destilované vody, pH 7,2

*PBS pufr pro dialýzu:* 9 g chloridu sodného a 17,9 g dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu disodného na 1 litr destilované vody, pH 7,2

*Pufr na ředění standardů:* 8,5 g chloridu sodného, 2,69 g dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu disodného a 0,34 g dihydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného na 1 litr destilované vody, pH 7,2

*Koutovací pufr:* 1,5 g uhličitanu sodného a 2,93 g hydrogenuhličitanu sodného na 1 litr destilované vody, pH 9,6

*Promývací roztok (PBST<sub>20</sub>):* 1 g TWEEN<sub>20</sub>, na 1 litr PBS pufru

*Ředící roztok pro tracer:* 1 g BSA na 1 litr destilované vody

*Roztok octanu sodného:* 27,2 g octanu sodného na 100 ml destilované vody, pH upraveno pomocí 1 mol/l kyseliny citronové na hodnotu 5,8

*TBM:* 0,1 g TBM na 10 ml DMSO

*Ředěný peroxid vodíku:* Peroxid vodíku 30% byl zředěn s destilovanou vodou v poměru 1:5.

*Substrát:* 10 ml destilované vody, 0,5 ml připraveného roztoku octanu sodného, 100 µl TBM a 10 µl ředěného peroxidu vodíku

*MOPS pufr:* 20,93 g MOPS (kyselina 3-morfolinopropansulfonová) a 17,53 g chloridu sodného na 1 litr destilované vody, pH 7,2

## **3.2 Metody**

### **3.2.1 Izolace protilátek**

#### **3.2.1.1 Precipitace protilátek**

V centrifugační zkumavce byly smíchány 2 ml PBS pufru s 5 ml krevního séra obsahující protilátky proti neurosteroidu JB12. Za stálého míchání na třepačce bylo opatrně přikapáváno 7 ml roztoku síranu amonného. Vzniklá suspenze byla ponechána 30 minut při laboratorní teplotě, obsah centrifugační zkumavky byl během této doby několikrát promíchán. Následně byla provedena centrifugace po dobu 20 minut, při teplotě 4 °C a při 7500 rpm.

#### **3.2.1.2 Rozpuštění a dialýza protilátek**

Po centrifugaci byl supernatant z centrifugační zkumavky odstraněn a sediment byla rozpuštěna a rozmíchána v minimálním množství PBS pufru. Dialyzační membrána byla namočena do destilované vody, kde došlo k její regeneraci. Následně byl rozpuštěný a rozmíchaný supernatant z centrifugační zkumavky převeden do dialyzační membrány. Dialýza probíhala proti PBS pufru 2 dny při teplotě 4 °C. Pufry na dialýzu byl během této doby několikrát vyměněn.

Následně byla změřena absorbance protilátek na spektrofotometru při vlnové délce 280 nm a vypočítána koncentrace protilátek. Směs protilátek byla uskladněna s přídavkem azidu sodného při -20 °C.

### **3.2.2 Optimalizace ELISA metody**

U získané protilátky je nutné stanovit její základní charakteristiky, to bylo v praktické části této práce provedeno pomocí přímé ELISA metody. Tato metoda musí být nejdříve optimalizována pro konkrétní protilátku.

Do 96 jamkové mikrotitrační desky byly navázány protilátky. Do každé jamky bylo pipetováno 150 µl roztoku protilátky o koncentraci 51 µg/ml v koutovacím pufru. Takto připravené mikrotitrační desky byly inkubovány po dobu 24 hodin při 4 °C.

Následně byl obsah jamek rychlým převrácením vylit do odpadu a jamky mikrotitrační desky byly pomocí automatické plničky dvakrát promyty (pufrem

PBST<sub>20</sub>), aby došlo k vymytí nenavázané protilátky. Promývací roztok byl rychlým převrácením mikrotitrační desky vylit do odpadu. Při druhém promytí byl promývací pufr nechán působit po dobu 15 minut, aby došlo k zablokování nespecifických vazeb. Poté byl pufr odstraněn a deska byla vysušena.

Do všech jamek bylo napipetováno 100 µl PBS pufru na ředění standardů. Do jamek prvního sloupce bylo napipetováno 50 µl standardu neurosteroidu JB12 v koncentraci 10<sup>-5</sup> mol/l. Vícekanálovou pipetou byl obsah jamek promíchán. Z jamek prvního sloupce bylo pipetováno 50 µl do sloupce druhého, obsah byl znovu promíchán a bylo znovu pipetováno 50 µl do jamek sloupce třetího, postup byl opakován až po jedenáctý sloupec, ze kterého bylo 50 µl odebráno a zlikvidováno, do dvanáctého sloupce nebyl napipetován žádný standard neurosteroidu.

Následně byl připraven roztok značeného antigenu. Do zkumavky bylo napipetováno 5 ml ředícího roztoku pro tracer a 5 µl konjugátu (20 ng, neurosteroid JB12 značený křenovou peroxidázou - HRP). Obsah zkumavky byl promíchán, 50 µl roztoku bylo pomocí krokovací pipety rychle napipetováno do všech jamek kromě jamky 12A, která obsahovala jen PBS pufr na ředění standardů a sloužila jako reference pro měření absorbance. Inkubace probíhala po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Obsah jamek byl poté vylit do odpadu a jamky byly dvakrát promyty promývacím roztokem. Mikrotitrační deska byla vysušena.

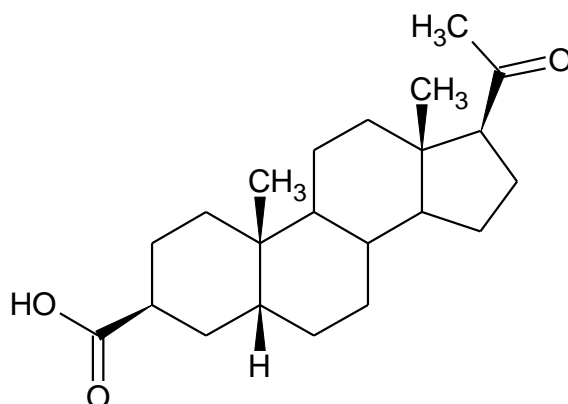
Do vaničky pro vícekanálovou pipetu byl připraven substrát, tak že bylo smícháno: 15 ml destilované vody, 750 µl octanu sodného, 150 µl TBM a 15 µl peroxidu vodíku. Obsah vaničky byl promíchán, substrát byl pipetován v objemu 150 µl do všech jamek ELISA desky. Po inkubaci a dostatečném vzniku modrého zbarvení (15 minut) bylo přidáno 50 µl 2 mol/l kyseliny sírové. Mikrotitrační deska byla umístěna do spektrofotometru a byla změřena absorbance žlutého zbarvení při vlnové délce 450 nm.

### **3.2.3 Křížová reaktivita**

Křížová reaktivita je reakce protilátky s jiným antigenem, odlišným od toho, který byl použit k imunizaci a vyvolal tvorbu této protilátky. K vazbě dochází díky strukturním podobnostem. V tomto případě byl použit k imunizaci laboratorního



zvířete neurosteroid s označením JB12 navázaný na bílkovinný nosič (BSA). Jedná se o 20-oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\beta$ -karboxylovou kyselinu (obr. 11). Křížová reaktivita tohoto standardu byla tedy 100 %.



Obr. 11: Struktura steroidu JB12

Postup ELISA testu byl stejný jako v případě optimalizace, jen do jamek C–H prvního sloupce byly pipetovány standardy pro studium křížové reaktivity, vždy ve dvou opakováních v koncentraci 10<sup>-5</sup> mol/l.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	JB12 (10 <sup>-5</sup> mol/l)											Blank
B	JB12 (10 <sup>-5</sup> mol/l)											B <sub>0</sub>
C	Progesteron (10 <sup>-5</sup> mol/l)											B <sub>0</sub>
D	Progesteron (10 <sup>-5</sup> mol/l)											B <sub>0</sub>
E	Testosteron (10 <sup>-5</sup> mol/l)											B <sub>0</sub>
F	Testosteron (10 <sup>-5</sup> mol/l)											B <sub>0</sub>
G	DHEA (10 <sup>-5</sup> mol/l)											B <sub>0</sub>
H	DHEA (10 <sup>-5</sup> mol/l)											B <sub>0</sub>

Obr. 12: Schéma aplikace standardů na mikrotitrační desku pro testování křížové reaktivity pomocí ELISA metody

### 3.2.4 Příprava imunoafinitního gelu

Izolované protilátky proti neurosteroidu JB12 byly nejdříve dialyzovány, sérum obsahující protilátky bylo převedeno do zregenerované dialyzační membrány, membrána byla uzavřena pomocí svorek. Do kádinky obsahující MOPS pufr, bylo vloženo míchadlo a dialyzační membrána. Dialýza probíhala po dobu 24 hodin při 4 °C.

Do kolonky byl pipetován pomocí Pasteurovy pipety Affigel 10 do požadovaného objemu 3 ml. Gel byl promyt 10 ml redestilované vody a

15 ml MOPS pufru. Takto připravený gel byl přenesen do vhodné centrifugační zkumavky, kde byl smíchán s 1,5 ml roztoku obsahující protilátky (25 mg protilátky na 1 ml gelu). Reakční směs byla míchána po dobu 4 hodin při teplotě 4 °C. Poté byla nadbytečná místa blokována přidavkem 1 mol/l Ethanolamin · HCl (0,1 ml na 1 ml gelu). Po jedné hodině byl gel přenesen po 500 µl do 6 kolonek s fritami, gel byl propláchnut 10 ml redestilované vody a 15 ml PBS pufru. Kolonky s imunoafinitním gelem byly uschovány v PBS pufru s přidavkem azidu sodného při 4 °C.

### **3.2.5 Stanovení kapacity imunoafinitního gelu**

Kapacita imunoafinitního gelu byla stanovena pomocí standardu allopregnanolonu a směsi standardů neurosteroidů, která obsahovala pregnenolon, allopregnanolon, testosteron, progesteron a DHEA.

#### **3.2.5.1 Příprava vzorků**

Tento krok slouží k úpravě vzorku před imunoafinitní chromatografií, během této úpravy jsou odstraněny proteiny. Při stanovení kapacity byla využita referenční matrice, která měla simulovat krevní sérum a napodobit podmínky izolace neurosteroidů ze vzorků od pacientů.

Do mikrozkuvek bylo napipetováno 100 µl referenční matrice, 25 pmol značeného interního standardu allopregnanolonu ( $^2\text{H}_4$  allopregnanolon) a allopregnanolon o látkovém množství 5 pmol, 10 pmol, 50 pmol, 100 pmol, 500 pmol a 1000 pmol. Objem v mikrozkuvkách byl doplněn methanolem na 500 µl.

Obdobným způsobem byly připraveny vzorky obsahující 0,1 pmol, 1 pmol, 10 pmol, 50 pmol, 100 pmol a 300 pmol směsi standardů neurosteroidů (progesteron, testosteron, pregnenolon, allopregnanolon a DHEA). Ke každému vzorku bylo opět přidáno 25 pmol směsi interních standardů neurosteroidů ( $^2\text{H}_3$  pregnenolon,  $^2\text{H}_3$  testosteron,  $^2\text{H}_4$  allopregnanolon,  $^{13}\text{C}_2$  progesteron).

Vzorky byly připraveny v triplicátech. K allopregnanolonu i ke směsi standardů byly připraveno šest slepých vzorků. První dva byly připraveny v mikrozkuvce z 400 µl methanolu a 100 µl matrice. Pro allopregnanolon byly připraveny dva slepé vzorky. Bylo smícháno 2,5 µl (25 pmol) značeného

interního standardu allopregnanolonu a 100 µl matrice, objem byl doplněn methanolem do 500 µl. Stejně byly připraveny dva slepé vzorky pro směs neurosteroidů, jen s použitím směsi značených interních standardů.

Obsah mikrozkušavek byl promíchán, mikrozkušavky byly umístěny na kolotoč na dobu 20 minut. Poté byla provedena centrifugace po dobu 10 minut, při teplotě 4 °C a při 10 000 rpm. Supernatanty byly přeneseny na 0,2 µm microspin filtr. Filtráty byly znovu zcentrifugovány po dobu 5 minut, při teplotě 4 °C a při 10 000 rpm. Filtráty byly odpařeny do sucha na vakuové rotační odparce. Odparky byly poté rozpuštěny ve 25 µl PBS a 975 µl methanolu, mikrozkušavky byly umístěny na 3 minuty do ultrazvuku a poté byl jejich obsah promíchán.

### **3.2.5.2 Imunoafinitní chromatografie**

Z kolonky byl odstraněn roztok PBS s přísadkou azidu sodného. Následně byla kolonka zregenerována a to tak, že byla postupně promyta 3 ml destilované vody, 3 ml 70% acetonitrylu, 3 ml destilované vody a 3 ml PBS pufru, další roztok se vždy přidával až po vykapání roztoku předcházejícího. Pomocí vzorků, které byly připraveny v předchozím kroku, byla stanovena kapacita imunoafinitního gelu.

Na imunoafinitní gel byl nanesen vzorek, tento vzorek prokapal kolonkou a byl zachycen ve zkumavce, poté byl znovu nanesen na imunoafinitní gel v kolonce. Tento proces byl sedmkrát zopakován. Poté byla kolonka promyta 9 ml destilované vody. Do připravené zkumavky byl eluován zachycený neurosteroid pomocí 3 ml vychlazeného methanolu. Tato zkumavka byla vložena do odparky, kde byl eluát odpařen do sucha. Imunoafinitní gel v kolonce byl promyt 3 ml destilované vody a byl opět zregenerován. Po regeneraci bylo možné nanést další vzorky. Práce probíhala současně na několika kolonkách. Po skončení byl gel v kolonkách zregenerován a kolonky byly uchovány v PBS pufru s přísadkou azidu sodného při 4 °C.

Vzorky z odparky byly následně rozpuštěny ve 100 µl methanolu a byly vloženy na 1 minutu do ultrazvuku, poté byly promíchány na vortexu a přepipetovány do vialky s insertem. Koncentrace neurosteroidu byla změřena

pomocí UHPLC-MS/MS. Z těchto hodnot byla vypočítána návratnost a kapacita imunoafinitního gelu pro allopregnanolon a pro směs neurosteroidů.

### **3.2.6 Kvantifikace neurosteroidů v krevním séru a mozkomíšním moku**

Koncentrace neurosteroidů byla stanovována u vzorků 8 pacientů z krevního séra a mozkomíšního moku. Příprava vzorků probíhala obdobně jako u stanovení kapacity imunoafinitního gelu. Do mikrozkušavky bylo napipetováno 100  $\mu$ l vzorku (krevní sérum nebo mozkomíšní mok), 20  $\mu$ l směsi značených interních standardů neurosteroidů (20 pmol) a 380  $\mu$ l methanolu. Vzorky byly přichystány ve třech opakováních. Pro stanovení bylo připraveno 6 slepých vzorků. Čtyři slepé byly připraveny smícháním 380  $\mu$ l methanolu a 20  $\mu$ l směsi značených interních standardů neurosteroidů. Zbylé dva obsahovaly jen 400  $\mu$ l methanolu.

Mikrozkušavky byly inkubovány 60 min. při 4 °C, po celou dobu byly promíchávány. Poté byla provedena centrifugace po dobu 10 minut, při teplotě 4 °C a při 10 000 rpm. Supernatanty byly přeneseny na 0,2  $\mu$ m microspin filtr a byly znovu zcentrifugovány po dobu 5 minut, při teplotě 4 °C a při 10 000 rpm. Filtráty byly odpařeny do sucha. Odparky byly poté rozpuštěny v 25  $\mu$ l PBS a 975  $\mu$ l methanolu, mikrozkušavky byly umístěny na 3 minuty do ultrazvuku a protřepány na třepačce.

U takto připravených vzorků byla provedena imunoafinitní chromatografie, podle stejného postupu, který je uveden při stanovení kapacity imunoafinitního gelu. Koncentrace neurosteroidů byla stanovena pomocí UHPLC-MS/MS.

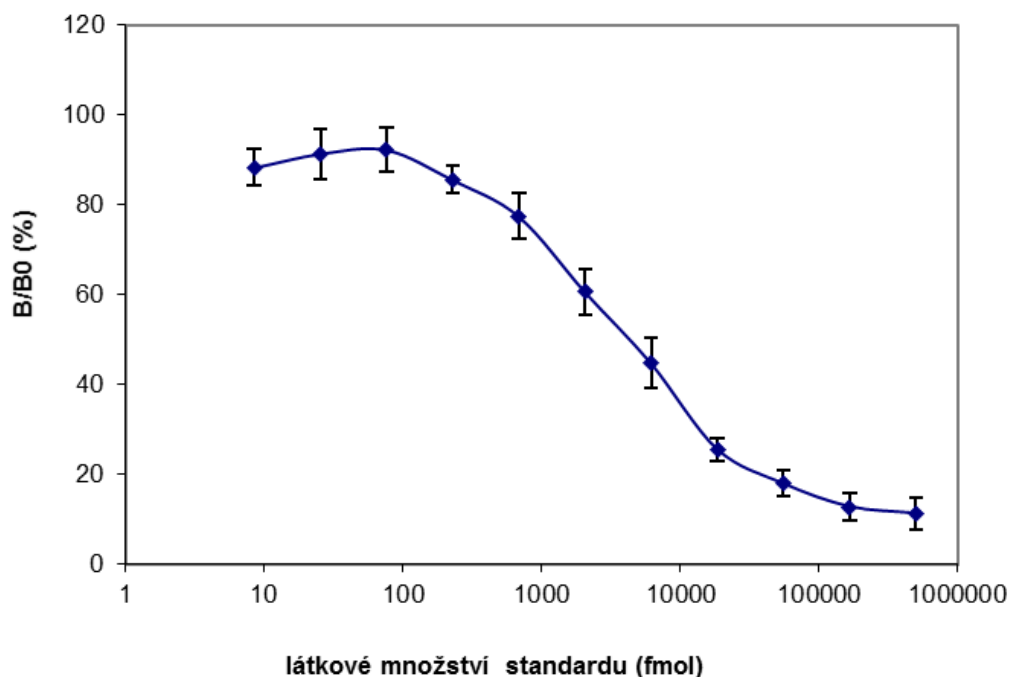
## 4 Výsledky

### 4.1 Charakteristiky protilátky

Koncentrace izolovaných polyklonálních protilátek byla vypočítána z absorbance protilátek, která byla změřena na spektrofotometru při vlnové délce 280 nm. Koncentrace protilátky proti neurosteroidu JB12, naměřená po vysrážení z krevního séra a následné dialýze, byla 51 mg/ml.

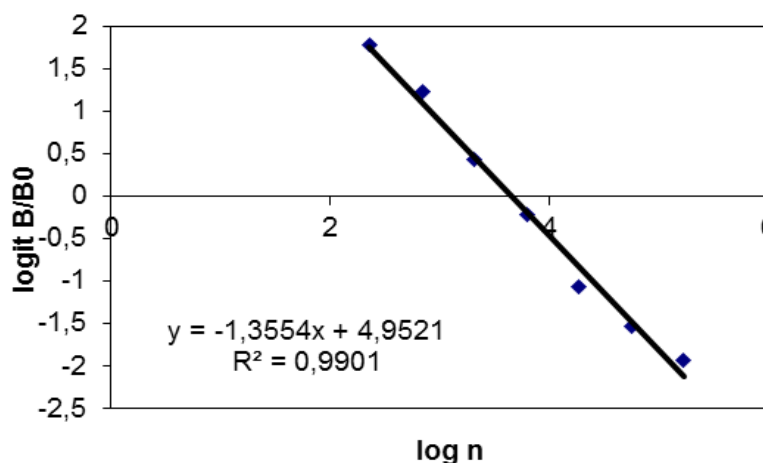
Další charakteristiky protilátky byly určeny pomocí přímé ELISA metody, která musela být pro tuto konkrétní protilátku nejdříve optimalizována. Optimalizace musí být provedena pro každou protilátku zvlášť, protože různé protilátky mají odlišnou chemickou i biologickou aktivitu. Během optimalizace metody je určena vhodná koncentrace jednotlivých složek ELISA metody (protilátka, enzymaticky značený antigen), tak aby bylo docíleno dobré vaznosti protilátky s antigenem a také aby bylo dosaženo vhodných hodnot absorbance při spektrofotometrickém měření. Hlavním cílem optimalizace je získat kalibrační křivku pro standard neurosteroidu (obr. 12). Kalibrační křivka byla linearizována logaritmickeou transformací (obr. 13) pomocí vzorce:

$$\text{logit } B/B_0 = \ln [B/B_0/(100-B/B_0)].$$



Obr. 13: Kalibrační křivka ELISA testu pro neurosteroidy

### ELISA log/logit transformace



Obr. 14: Log/logit transformace kalibrační křivky ELISA testu

Během optimalizace metody bylo zjištěno ideální množství protilátky, která má být imobilizována do mikrotitrační desky, 51  $\mu\text{g}$ /jamku a ideální množství přidávaného značeného antigenu 20 ng/jamku. Další charakteristikou ELISA testu je lineární rozsah měření, ten je určen z log/logit transformace kalibrační křivky. Jedná se o rozsah koncentrací standardu, které jsou pro tuto metodu použitelné. Lineární rozsah měření je  $4,56 \cdot 10^{-9}$ – $3,33 \cdot 10^{-6}$  mol/l. Nejnižší množství analytu, které ještě vyvolá odezvu odlišnou od šumu, se nazývá detekční limit. Detekční limit této metody je  $4,56 \cdot 10^{-9}$  mol/l, jedná se o nejnižší hodnotu lineárního rozsahu měření. Pro tuto metodu byla stanovena hodnota polovičního vytěsnění  $1,06 \cdot 10^{-7}$  mol/l. Hodnota nespecifické vazby je 4,60 %, hodnota variabilita testu 1,17 % a hodnota variability mezi testy 6,47 %. Všechny základní parametry jsou uvedeny v tab. 1.

Tab. 1: Základní parametry ELISA testu s protilátkou proti steroidu JB12

koncentrace protilátky	51 $\mu\text{g}$
množství značeného antigenu	20 ng
lineární rozsah měření	$4,56 \cdot 10^{-9}$ – $3,33 \cdot 10^{-6}$ mol/l
detekční limit	$4,56 \cdot 10^{-9}$ mol/l
hodnota polovičního vytěsnění (B/B <sub>0</sub> )	$1,06 \cdot 10^{-7}$ mol/l
nespecifická vazba	4,60 %
variabilita testu	1,17 %
variabilita mezi testy	6,47 %

## 4.2 Křížová reaktivita

K imunizaci byl použit antigen JB12 (20-oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\beta$ -karboxylovová kyselina), který byl nakonjugován na bílkovinný nosič (BSA). Křížová reaktivita látky, která byla použita při imunizaci, byla 100 %. Testování křížové reaktivity bylo provedeno u 38 steroidních látek. Všechny tyto látky i s hodnotou jejich křížové reaktivity jsou uvedeny v tab. 2.

Vysoké hodnoty křížové reaktivity vykazují steroidní látky, které jsou strukturně podobné látce, která byla použita k imunizaci. Nejvyšší hodnoty křížové reaktivity byly stanoveny u syntetických derivátů (pregnanolon aspartát 328,5 %, pregnanolon glutamát 793 % a pregnanolon norvalinát 333 %), které se navzájem liší jen substituentem navázaným na C3 uhlíku. Látka JB13 (20-oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -karboxylovová kyselina) se od JB12 (20-oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\beta$ -karboxylovová kyselina) liší jen prostorovým uspořádáním na uhlíku C3, její křížová reaktivita je 62,2 %. Hodnoty křížové reaktivity vyšší než 10 % lze považovat za vysoké. Tyto hodnoty křížové reaktivity mají všechny látky, které jsou odvozeny od progestagenů (např. pregnenolon, progesteron). Nízké hodnoty vykazují androgeny (např. dehydroepiandrosteron sulfát, testosteron), estrogeny (např. estron, estriol), glukokortikoidy (např. kortizol) a mineralokortikoidy (např. aldosteron) vzhledem k jejich odlišné struktuře.

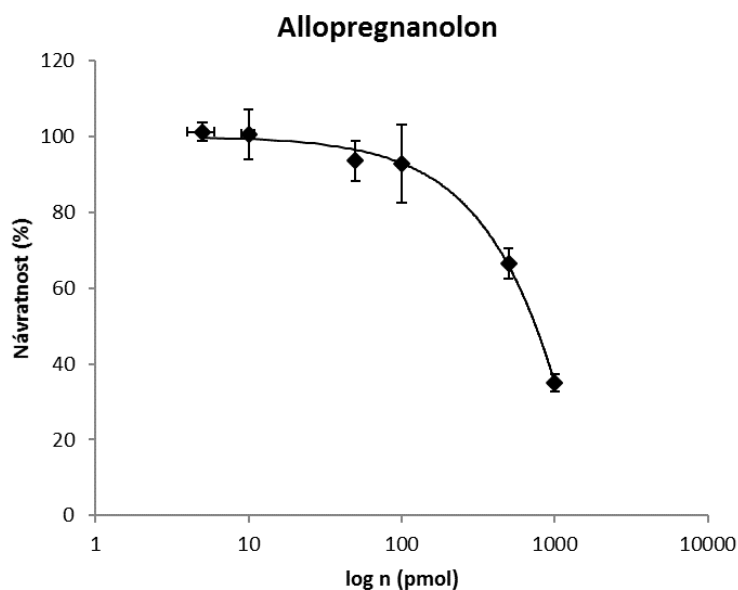
Tab. 2: Křížové reaktivity látky JB12 a příbuzných steroidů s protilátkami proti JB12

Steroidní látka	Křížová reaktivita (%)
JB12 (20-oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\beta$ -karboxylovová kyselina)	100
JB13 (20-oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -karboxylovová kyselina)	62,2
VK 485 (Pregnanolon argininát)	58,9
VK 145 (Pregnanolon aspartát)	328,5
VK 146 (Pregnanolon glutamát)	793
VK 466 (Pregnanolon norvalinát)	333
Progesteron	140
$\beta$ -estradiol	< 0,01
Danazol	< 0,01
Norethindron	< 0,01
Estron	< 0,01
Hydrokortizon	< 0,01
Estriol	< 0,01
Prednisolon	< 0,01
17 $\alpha$ -hydroxyprogesteron	0,53
17 $\alpha$ -hydroxypregnenolon	< 0,01
4-pregne-17 $\alpha$ -21-diol-3,20-dion	0,013
Kortexolon	< 0,01
Dehydroepiandrosteron sulfát (DHEAS)	< 0,01
Kortikosteron	< 0,01
11 $\alpha$ -hydroxyprogesteron	24,3
4,16-pregnadien-3,20-dion (16-dehydroprogesteron)	< 0,01
Etiocholan-3 $\alpha$ -od-17-on (5 $\beta$ -androstane-3 $\alpha$ -ol-17-on)	< 0,01
5 $\alpha$ -pregnan-3,20-dion (5 $\alpha$ -dihydroprogesteron)	107
4-androsten-3,17-dion	0,38
Pregnenolon	33,65
Testosteron	0,28
Cholesterol	< 0,01
Dihydrotestosteron	< 0,01
Kortison	< 0,01
5 $\alpha$ -pregnane-3 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -diol	53,9
16 $\alpha$ -hydroxyprogesteron	1,18
19-norprogesteron	32,2
19-hydroxy-4-androsten-1,17-dion	< 0,01
Allopregnanolon	83
Nandrolon	0,12
Aldosteron	< 0,01
Pregnanolon	51,2
Dehydroepiandrosteron	0,62

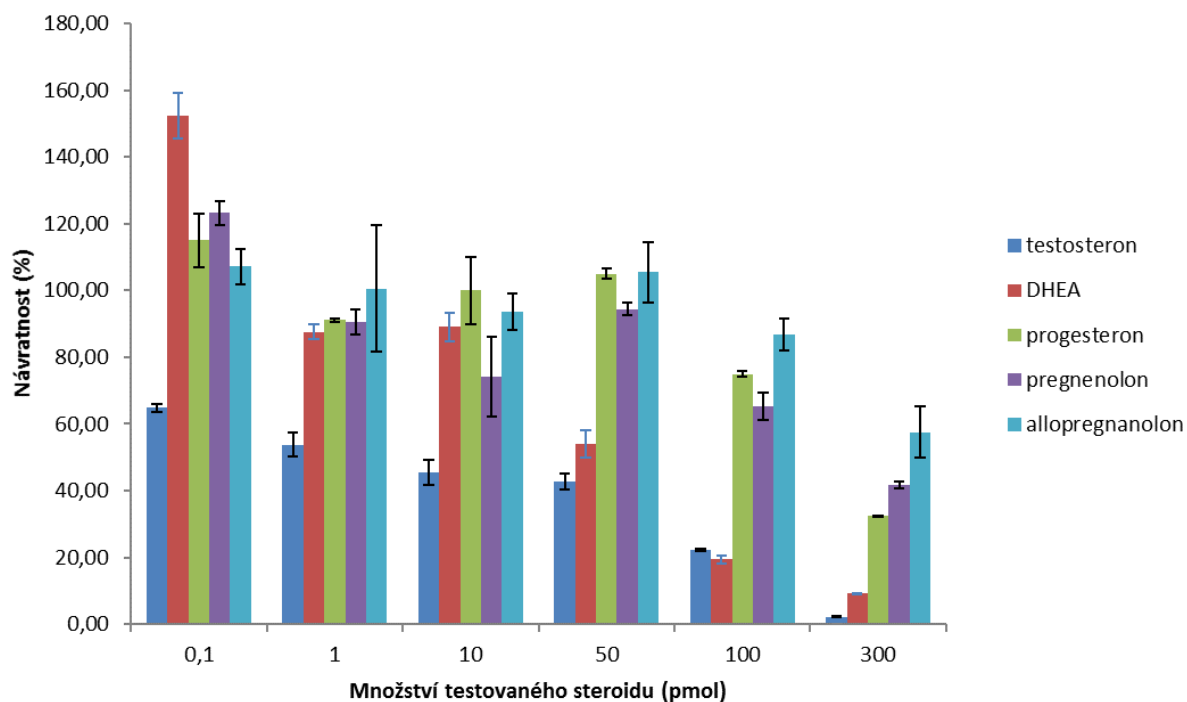


### 4.3 Kapacita imunoafinitního gelu

Důležitou vlastností imunoafinitního gelu je jeho kapacita. Ta byla v této práci stanovována pomocí standardu allopregnanolonu (obr. 14) a směsi standardů neurosteroidů (obr. 15), která obsahovala pregnenolon, allopregnanolon, testosteron, progesteron a DHEA. Se vzrůstajícím látkovým množstvím standardů neurosteroidů klesá i návratnost těchto standardů.



Obr. č. 15: Závislost návratnosti na látkovém množství allopregnanolonu



Obr. č. 16: Návratnost testovaných steroidů v závislosti na jejich látkovém množství

Nejvyšší návratnost u standardu allopregnanolonu byla 101,21 % při látkovém množství 5 pmol. Nejnižší návratnost 34,98 % byla při látkovém množství 1000 pmol. Kapacita imunoafinitního gelu pro allopregnanolon se tedy pohybuje okolo 1 nmol/ml gelu.

U směsi neurosteroidů, která obsahovala testosteron, DHEA, progesteron, pregnenolon a allopregnanolon také docházelo k tomu, že se zvyšující koncentrací těchto neurosteroidů jejich návratnost postupně klesala.

#### 4.4 Kvantifikace neurosteroidů v krevním séru a mozkomíšním moku

Vyvinutá imunoafinitní chromatografie byla na závěr použita pro izolaci neurosteroidů ze vzorků, které pocházely přímo od pacientů trpících neurologickými poruchami, konkrétně roztroušenou sklerózou.

Stanovovány byly neurosteroidy testosteron, DHEA, pregnenolon, progesteron a allopregnanolon v krevním séru a mozkomíšním moku pacientů. Celkově bylo testováno osm pacientů různého věku. U čtyř pacientů byla diagnostikována roztroušená skleróza (dva muži, dvě ženy), další čtyři pacienti (dva muži, dvě ženy) sloužili jako kontrolní pacienti. Stanovené koncentrace jsou zaznamenány v tab. 3.

Tab. 3: Koncentrace neurosteroidů v krevním séru a mozkomíšním moku (LD – Limit detekce, RS – Roztroušená skleróza, Ž – žena, M – muž)

vzorek		Testosteron (nmol/l)	DHEA (nmol/l)	Pregnenolon (nmol/l)	Progesteron (nmol/l)	Allopregnanolon (nmol/l)	
Krevní sérum	Kontrolní pacient	Ž (1969)	0,47 ± 0,02	28,17 ± 3,20	2,61 ± 0,21	8,35 ± 1,19	<LD
		Ž (1991)	1,20 ± 0,06	68,98 ± 6,16	5,77 ± 0,90	0,13 ± 0,03	1,10 ± 0,03
		M (1972)	4,34 ± 0,44	4,12 ± 0,49	<LD	0,04 ± 0,01	<LD
		M (1953)	17,7 ± 1,38	2,79 ± 0,64	<LD	0,06 ± 0,02	<LD
	Pacient s RS	Ž (1982)	0,33 ± 0,04	23,53 ± 3,12	<LD	29,17 ± 1,09	1,80 ± 0,09
		Ž (1975)	0,30 ± 0,001	10,89 ± 1,55	<LD	2,75 ± 0,12	<LD
		M (1974)	6,43 ± 0,96	4,70 ± 2,15	<LD	0,04 ± 0,01	<LD
		M (1958)	30,58 ± 1,87	9,52 ± 0,87	<LD	0,23 ± 0,10	<LD
Mozkomíšní mok	Kontrolní pacient	Ž (1969)	<LD	<LD	<LD	0,15 ± 0,01	<LD
		Ž (1991)	<LD	<LD	<LD	0,11 ± 0,03	<LD
		M (1972)	0,05 ± 0,01	<LD	<LD	<LD	<LD
		M (1953)	0,05 ± 0,01	<LD	<LD	0,07 ± 0,03	<LD
	Pacient s RS	Ž (1982)	<LD	<LD	<LD	0,24 ± 0,01	<LD
		Ž (1975)	<LD	<LD	<LD	0,10 ± 0,01	<LD
		M (1974)	0,05 ± 0,01	<LD	<LD	0,04 ± 0,01	<LD
		M (1958)	0,15 ± 0,05	<LD	<LD	0,13 ± 0,09	<LD

## 5 Diskuze

Z krevního séra byly izolovány polyklonální protilátky proti 20-oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\beta$ -karboxylovové kyselině pomocí precipitace síranem amonným a následné dialýzy. Dalším důležitým krokem bylo stanovení charakteristik protilátky pomocí přímé ELISA metody. Největší hodnotu křížové reaktivity s protilátkou vykazovaly progestageny a syntetické organické látky, které byly strukturně podobné imunogenu. Látky s vysokou hodnotou křížové reaktivity by bylo možné izolovat pomocí vyvinuté imunoafinitní chromatografie, která byla připravena za použití této protilátky. Během vývoje imunoafinitní chromatografie bylo nejprve nutné navázat tuto protilátku na vhodný sorbent. U takto připraveného imunoafinitního gelu byla následně stanovena jeho kapacita. Kapacita imunoafinitního gelu pro allopregnanolon se pohybuje okolo 1 nmol/ml gelu. Látkové množství DHEA, které bylo pomocí imunoafinitní chromatografie izolováno, bylo velmi vysoké, navzdory tomu, že křížová reaktivita polyklonální protilátky s DHEA byla nižší než 0,1 %. Je to umožněno díky vysoké kapacitě imunoafinitního gelu.

Vyvinutá imunoafinitní chromatografie byla na závěr použita k izolaci neurosteroidů z krevního séra a mozkomíšního moku od pacientů s roztroušenou sklerózou (RS) a kontrolních pacientů. Stanovené koncentrace jsou zaznamenány v tabulce 3. Izolace neurosteroidů probíhala úspěšněji u krevního séra, mozkomíšní mok se zde ukázal jako složitější matrice, ze které lze neurosteroidy izolovat obtížněji. Většina hodnot se zde nacházela pod limitem detekce, touto detekční metodou je tedy nebylo možné stanovit. Kontrolní pacienti netrpěli roztroušenou sklerózou, ale nelze u nich vyloučit přítomnost jiného neurologického postižení nebo užívání léků, které by mohlo způsobit změny v hladinách neurosteroidů. U testovaných žen navíc není zaznamenáno, v jaké fázi menstruačního cyklu se zrovna nachází, zda nebyly v době odběru těhotné nebo v období menopauzy, což by mělo zásadní vliv na hladiny neurosteroidů. Ze zjištěných hodnot tedy nelze objektivně určit, souvislost onemocnění s hladinou neurosteroidů, jelikož nejsou známy podrobnější informace o pacientovi.

U kontrolních pacientů a pacientů s RS nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly, které by ukazovaly, že pacienti trpící RS mají odlišné hladiny neurosteroidů než pacienti kontrolní. Výsledky různých autorů se vzájemně liší. Grinsted et al. (1989) zjišťovali hladiny pohlavních hormonů u žen s RS. Studie byla provedena u 14 pacientek fertillního věku, kontrolní skupinu tvořilo 14 zdravých žen. Krevní sérum bylo u obou skupin odebráno během folikulární fáze. Nekonjugované steroidy (estron, estradiol, testosteron, dihydrotestosteron) byly stanovovány pomocí radioimunoanalýzy (RIA), které předcházela extrakce etherem a sloupcová chromatografie. Pacientky trpící RS měly signifikantně vyšší průměrnou hladinu prolaktinu, celkového a volného testosteronu, dihydrotestosteronu a výrazně nižší hladinu estron sulfátu než kontrolní skupina. Průměrná koncentrace celkového testosteronu u pacientek s RS byla  $1,3 \pm 0,1$  nmol/l a u kontrolní skupiny  $0,9 \pm 0,1$  nmol/l. Hodnoty koncentrací testosteronu zjištěné v této bakalářské práci se mírně liší od závěrů Grinsteda. Na tento výsledek má zejména vliv to, že byl testován malý počet pacientů a o pacientech nebyly známy podrobnější informace. Výsledky také nelze plně srovnávat, jelikož ke kvantifikaci byly použity rozdílné analytické metody. Tomassini et al. (2005) zkoumali vztah mezi hladinou pohlavních hormonů a poškozením CNS u mužů a žen trpících RS pomocí magnetické rezonance. Mezi mužskými pacienty a kontrolní skupinou nebyly zaznamenány žádné významné rozdíly. U žen s RS byla detekována výrazně nižší koncentrace testosteronu ve folikulární i luteální fázi menstruačního cyklu. Toto potvrzuje i práce Foroughipoura et al. (2012), ti zjistili, že pacientky s RS mají nižší hladinu testosteronu. Stanovení prováděli pomocí metody RIA. Wei a Lightman (1997) u 6 mužů s RS z celkového počtu 25 detekovali hladinu testosteronu na spodní hranici normálu. Nízké hladiny testosteronu u mužů s RS se nacházely v rozmezí od 1,7 nmol/l do 8,7 nmol/l. U hladin testosteronu zjištěných u testovaných mužů s RS v této bakalářské práci nelze potvrdit, že pacienti s RS mají nižší hodnoty hladiny testosteronu než kontrolní pacienti. Hladiny testosteronu například výrazně ovlivňuje věk pacienta.

## 6 Závěr

Neurosteroidy hrají zásadní úlohu ve vývoji a fungování nervové soustavy člověka, změna v jejich hladinách může vést k rozvoji neurologických a neurodegenerativních chorob. Z tohoto hlediska je izolace a následné stanovení neurosteroidů velmi významné. Cílem této bakalářské práce bylo vyvinout imunoafinitní chromatografii, díky které je možné tyto neurosteroidy izolovat ze vzorků a následně stanovit pomocí dalších metod jako je například vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotností spektrometrií. Toto uspořádání bylo využito v této bakalářské práci.

Pro vývoj imunoafinitní chromatografie bylo na počátku potřeba charakterizovat polyklonální protilátky získané po imunizaci pokusných zvířat neurosteroidem s označením JB12. Ke stanovení charakteristik byla využita enzymová imunoanalýza, konkrétně kompetitivní přímé uspořádání ELISA metody. Obdobně byla stanovena i křížová reaktivita této protilátky se strukturně podobnými sloučeninami. Po úspěšné charakterizaci byly tyto protilátky využity pro přípravu imunoafinitního gelu. U tohoto gelu byla následně stanovena i jeho kapacita. Na závěr byla tato vyvinutá imunoafinitní chromatografie úspěšně použita pro izolaci neurosteroidů ze vzorků, které pocházely přímo od pacientů trpících roztroušenou sklerózou. Bylo zjištěno, že steroidy s vysokou křížovou reaktivitou lze pomocí této metody vyizolovat a stanovit i ve vzorcích tělních tekutin.

## Seznam literatury

Bartoš V., Šafarčík K., Karlíková M., Lochmanová A., Zeman D., Švagera Z. a Vrzalová J. *Imunoanalytické metody*. Ostrava: Ostravská univerzita v Ostravě, Lékařská fakulta, 2013. ISBN 978-80-7464-366-8.

Bartůňková J. a Paulík M. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3533-7.

Benarroch E. E. Neurosteroids: endogenous modulators of neuronal excitability and plasticity. *Neurology* [online]. 2007, 68(12), 945–947.

Bičíková M. a Hampl R. Neurosteroidy – deriváty progesteronu. *Psychiatrie*. 2004, 8(Suppl.2), 29–31.

Bičíková M. a Hampl R. Neurosteroidy a jejich význam. *Časopis lékařů českých*. 2007, 146(3), 223–226. ISSN 0008-7335.

Cais O. a Vyklický L. Molekulární a systémové účinky neurosteroidů. *Psychiatrie*. 2006, 10(Suppl. 3), 8–11. ISSN 1211-7579.

Cais O., Adamusová E., Kořínek M., Borovská J. a Vyklický L. Neurosteroidy: účinné modulátory NMDA receptorů. *Psychiatrie*. 2009, 13(4), 148–152. ISSN 1211-7579.

Corpéchet C., Robel P., Axelson M., Sjövall J. a Baulieu E. E. Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1981, 78(8), 4704–4707.

Dorda M., Vlček K., Chodounská H. a Vyklický L. Neurosteroidy - mechanismus působení a možnosti užití v klinické praxi: Minikonference Centra neuropsychiatrických studií, 20.6.2001. Přehledná sdělení. *Psychiatrie*. 2001, 5(Suppl. 3), 5–9. ISSN 1211-7579.

Ferenčík M., Rovenský J., Shoenfeld Y. a Maršha V. *Imunitní systém: informace pro každého*. Vyd. 1. české. Praha: Grada, 2005. ISBN 80-247-1196-6.

Foroughipour A., Norbakhsh V., Najafabadi SH., Meamar R. Evaluating sex hormone levels in reproductive age women with multiple sclerosis and their relationship with disease severity. *Journal of Research in Medical Sciences: The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences*. 2012, 17(9): 882–885.

Fukal L. a Holubová B. *Imunochemie a imunoanalýza*. Praha: L. Fukal, c2007. ISBN 978-80-239-8903-8.

Grinsted L., Heltberg A., Hagen C., et al. Serum sex hormone and gonadotropin concentrations in premenopausal women with multiple sclerosis. *J Intern Med* 1989, 226: 241–244.

Hamplová L. a kolektiv. *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie, hygiena pro bakalářské studium a všechny typy zdravotnických škol*. 1. vydání. V Praze: Juhaňák Stanislav - Triton, 2015. ISBN 978-80-7387-934-1.

Hořejší V., Bartůňková J., Brdlička T a Spíšek R. *Základy imunologie*. 5. vyd. Praha: Triton, 2013. ISBN 978-80-7387-713-2.

Chromý V. *Bioanalytika: analytické metody v klinické chemii a laboratorní medicíně*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav chemie, 2011. ISBN 978-80-904539-3-7.

Jílek P. *Imunologie: stručně, jasně, přehledně*. Praha: Grada, 2014. ISBN 978-80-247-4822-1.

Káš J., Kodíček M. a Valentová O. *Laboratorní techniky biochemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-708-0586-2.

Knytl P. a Mohr P. Neuroaktivní steroidy, neurosteroidy a jejich úloha ve schizofrenii. *Psychiatrie*. 2016, 20(3), 132-138.

Lochmanová A. *Základy imunologie*. Ostrava: Ostravská univerzita v Ostravě, 2014. ISBN 978-80-7464-570-9.

Novák F. *Úvod do klinické biochemie*. Praha: Karolinum, 2002. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0366-7.

Reddy D. S. Neurosteroids: Endogenous Role in the Human Brain and Therapeutic Potentials. *Progress in Brain Research*. 2010, 186, 113–137.

Stárka L. a Dušková M. Allopregnanolon – neurosteroid s nadějnými léčebnými výhledy. *Diabetologie - Metabolismus - Endokrinologie - Výživa*. 2015, 18(1), 24–30. ISSN 1211-9326.

Tomassini V., Onesti E., Mainero C., et al. Sex hormones modulate brain damage in multiple sclerosis: MRI evidence. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*. 2005, 76(2): 272–275.

Vyklický V., Kořínek M., Smejkalová T., Balík A., Krausová B., Kaniaková M., et al. Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiol Res*. 2014, 63 (Suppl. 1), S191–S203.

Wei T. a Lightman L. Stafford. The neuroendocrine axis in patients with multiple sclerosis. *Brain*. 1997, 120, 1067–1076.