



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

**Vývoj UHPLC–MS/MS metody
pro stanovení neurosteroidů
v lidském krevním séru a mozkomíšním moku**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Klára Bambulová
Studijní program:	N1501 Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Ondřej Novák, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2017

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Klára Bambulová
Název práce:	Vývoj UHPLC–MS/MS metody pro stanovení neurosteroidů v lidském krevním séru a mozkomíšním moku
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce:	Mgr. Ondřej Novák, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2017
Abstrakt:	Neurosteroidy jsou látky významně ovlivňující činnost nervových buněk. Hrají tedy významnou úlohu u řady fyziologických (úzkost, procesy učení a paměti) i patofyziologických funkcí (stres, neurodegenerativní choroby). Tato diplomové práce se zabývá popisem neurosteroidů, jejich metabolismu, účinků i způsobů jejich detekce. Cílem práce bylo porovnání purifikačních metod extrakce na pevné fázi s precipitací proteinů srážedlem a nalezení optimálních podmínek pro UHPLC–MS/MS analýzu. Nejvhodnější purifikační protokol využívající kolony Strata-X společně s optimalizovanou UHPLC–MS/MS analýzou byly následně aplikovány na vzorky krevního séra a mozkomíšního moku pacientů s roztroušenou sklerózou a předpokládaných zdravých dárců. Hladiny neurosteroidů DHEA a testosteronu se lišily pouze fyziologicky, avšak u pacientek s roztroušenou sklerózou došlo ke zvýšení hladin progesteronu v krevním séru. Poznání tvorby neurosteroidů i jejich správnou detekcí může být využito v prevenci a léčbě nejen roztroušené sklerózy, ale i dalších neurodegenerativních a psychiatrických onemocnění.
Klíčová slova:	Neurosteroidy, krevní sérum, CSF, SPE, UHPLC–MS/MS
Počet stran:	77
Počet příloh:	0
Jazyk:	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname:	Klára Bambulová
Title of thesis:	Development of UHPLC–MS/MS method for determination neurosteroids in human serum and cerebrospinal fluid
Type of thesis:	Master
Department:	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor:	Mgr. Ondřej Novák, Ph.D.
The year of presentation:	2017
Abstract:	Neurosteroids are substances that significantly modulate activity of nerve cells. They play an important role in a number of physiological (anxiety, learning and memory processes) and pathophysiological (stress, neurodegenerative diseases) functions. The Master's thesis deals with the description of neurosteroids, their metabolism, physiological effects and detection methods. The aim of this thesis was also to compare protein precipitation with purification methods using solid phase extraction and to find optimal conditions for UHPLC-MS/MS analysis. The most appropriate method, Strata-X column purification and optimized UHPLC-MS/MS analysis were then applied to analyse the neurosteroids in blood serum and CSF samples of patients with multiple sclerosis and presumed healthy donors. DHEA and testosterone levels differed only physiologically, but in patients with multiple sclerosis, levels progesterone in serum have increased. Knowledge of neurosteroid formation and their correct detection can be used to prevent and treat not only multiple sclerosis but also other neurodegenerative and psychiatric diseases.
Keywords	Neurosteroids, human serum, CSF, SPE, UHPLC–MS/MS
Number of pages	77
Number of appendices	0
Language	Czech

„Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne

.....
Klára Bambulová

Poděkování

Ráda bych srdečně poděkovala vedoucímu své práce Mgr. Ondřeji Novákovi, Ph.D. za odborné vedení práce, podnětné návrhy a připomínky, také za jeho ochotu a trpělivost. Zvláštní poděkování náleží Ing. Petře Amakorové za pomoc a vynaložený čas při provádění experimentů. Mé díky patří i všem ostatním pracovníkům Laboratoře růstových regulátorů, neboť mi byli ochotni vždy pomoci a vytvářeli tak dobré podmínky pro zpracování této práce.

Tato diplomová práce byla realizována s podporou Interní grantové agentury Univerzity Palackého (projekt IGA_PrF_2017_010).

SEZNAM ZKRATEK

20 α DH-PROG	20 α -dihydroprogesteron
22R,22R-diHC	20R,22R-dihydroxycholesterol
22R-HC	22R-hydroxycholesterol
24S-HC	24S-hydroxycholesterol
3 α 5 α -THP	allopregnanolon (3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-on)
3 α 5 β S	pregnanolon sulfát (20-oxo-5 β -pregnan-3 α -yl sulfát)
3 α 5 β -THP	pregnanolon (3 α -hydroxy-5 β -pregnan-20-on)
3 β -HSD	3 β -hydroxysteroid dehydrogenasa
5 α -DHP	dihydroprogesteron (pregnan-3 α ,20-dion)
AMPA	kyselina α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4 isoxazolpropionová
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku (<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>)
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku (<i>Atmospheric Pressure Photoionization</i>)
BSA	hovězí sérový albumin (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CI	chemické ionizace (<i>Chemical Ionization</i>)
CIA	chemiluminiscenční imunoanalýza (<i>Chemiluminescence Immunoassay</i>)
CNS	centrální nervová soustava
CYP450 _{SCC}	cytochrom P450 štěpící postranní řetězec cholesterolu (CYTOCHROM P450 SIDE-CHAIN CLEAVAGE ENZYME)
DHEA	dehydroepiandrosteron (3 β -hydroxyandrost-5-en-17-on)
DHEAS	dehydroepiandrosteron sulfát (3 β -hydroxyandrost-5-en-17-on sulfát)
DOC	deoxykortikosteron
EI	elektronová ionizace (<i>Electron Ionization</i>)
EIA	enzymová imunoanalýza (<i>Enzyme Immunoassay</i>)
ESI	ionizace elektrosprejem (<i>Electrospray Ionization</i>)
GABA	kyselina γ -aminomáselná (<i>gamma-Aminobutyric Acid</i>)
GABA _A	receptor pro kyselinu γ -aminomáselnou typu A
GABA _B	receptor pro kyselinu γ -aminomáselnou typu B
GABA _C	receptor pro kyselinu γ -aminomáselnou typu C

GC–MS	plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (<i>Gas Chromatography–Mass Spectrometry</i>)
GPCR	receptory spřažené s G-proteiny (G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
KA	kyselina kainová
LC–MS	kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (<i>Liquid Chromatography–Mass Spectrometry</i>)
LOD	mez detekce (<i>Limit of Detection</i>)
LOQ	mez stanovitelnosti (<i>Limit of Quantification</i>)
MALDI–MS/MS	desorpce laserem za přítomnosti matrice ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (<i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization–Tandem Mass Spectrometry</i>)
MAP2	proteiny spojené s mikrotubuly typu 2 (MIKROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN TYPE 2)
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartát
OATPs	organické aniontové transportní proteiny (<i>Organic Anion Transporting Proteins</i>)
PBR	benzodiazepinový receptor
PGRMC1	PROGESTERON RECEPTOR MEMBRANE COMPONENT 1
PMS	premenstruační symptom
PNS	periferní nervová soustava
PP	precipitace proteinů
PREG	pregnenolon (3 β -hydroxypregn-5-en-20-on)
PREGS	pregnenolon sulfát (3 β -hydroxypregn-5-en-20-on sulfát)
PROG	progesteron (preg-4-en-3,20-on)
RIA	radioimunoanalýza (<i>Radioimmunoassay</i>)
RSD	relativní směrodatná odchylka (<i>Relative Standard Deviation</i>)
s _D	směrodatná odchylka (<i>Standard Deviation</i>)
SERMs	selektivní estrogenové receptorové modulátory
SIM	monitorování vybraných iontů (<i>Selected Ion Monitoring</i>)
SPE	extrakce na pevné fázi (<i>Solid Phase Extraction</i>)

SRM	monitorování vybraných reakcí (<i>Selected Reaction Monitoring</i>)
StAR	steroidogenní akutní regulační protein (STEROIDOGENIC ACUTE REGULATORY PROTEIN)
T	testosteron (17 β -hydroxyandrost-4-en-3-on)
THDOC	tetrahydroxydeoxykortikosteron (3 α ,21-dihydroxy-5 α -pregnan-20-on)
TRPM3	TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL CATION CHANNELS SUBFAMILY M MEMBER 3
TSPO	translokační protein (TRANSLOCATOR PROTEIN)
UHPLC–MS/MS	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (<i>Ultra-high Pressure Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry</i>)

OBSAH

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE.....	11
2 TEORETICKÁ ČÁST	13
2.1 Steroidy.....	13
2.2 Neurosteroidy.....	16
2.2.1 Biosyntéza a metabolismus neurosteroidů.....	18
2.2.2 Funkce vybraných neurosteroidů	22
2.2.2.1 Progesteron.....	22
2.2.2.2 Testosteron	22
2.2.2.3 Dehydroepiandrosteron a dehydroepiandrosteron sulfát.....	22
2.2.2.4 Pregnenolon a pregnenolon sulfát.....	23
2.2.2.5 Allopregnanolon.....	24
2.2.2.6 Pregnanolon	24
2.2.3 Mechanismy působení neurosteroidů	24
2.2.3.1 Membránové receptory.....	24
2.2.3.2 Jaderné receptory.....	29
2.2.3.3 Působení na proteiny spojené s mikrotubuly typu 2	30
2.2.4 Fyziologické účinky neurosteroidů	30
2.2.4.1 Úzkost a stres.....	30
2.2.4.2 Procesy paměti a učení	31
2.2.4.3 Role neurosteroidů na rozdíly mezi pohlavími.....	31
2.2.5 Patofyziologické účinky neurosteroidů	32
2.2.5.1 Epilepsie.....	32
2.2.5.2 Premenstruační syndrom	33
2.2.5.3 Deprese.....	33
2.2.6 Klinický potenciál neurosteroidů.....	34
2.3 Analýza neurosteroidů	36
2.3.1 Analýza neurosteroidů za pomoci radioimunoanalýzy	37
2.3.2 Analýza neurosteroidů hmotnostní spektrometrií	37
2.3.2.1 Plynová chromatografie–hmotnostní spektrometrie.....	37

2.3.2.2	Kapalinová chromatografie–hmotnostní spektrometrie.....	38
3	PRAKTICKÁ ČÁST	40
3.1	Materiál a vybavení	40
3.1.1	Biologický materiál	40
3.1.2	Chemikálie	40
3.1.3	Pomůcky	42
3.1.4	Přístrojové vybavení a software	42
3.2	Použité metody.....	43
3.2.1	Experiment I – Optimalizace izolačního protokolu	43
3.2.1.1	Precipitace proteinů.....	43
3.2.1.2	HybridSPE	44
3.2.1.3	Strata-X	45
3.2.1.4	Příprava vzorků před analýzou UHPLC–MS/MS	46
3.2.2	Experiment II – UHPLC–MS/MS analýza.....	46
3.2.2.1	Kalibrace metody.....	47
3.2.2.2	Přesnost a správnost metody	47
3.2.2.3	Pravidla pro porovnání validačních parametrů	48
3.2.3	Experiment III – Stanovení neurosteroidů v lidském krevním séru a mozkomíšním moku.....	49
4	VÝSLEDKY	50
4.1	Optimalizace izolačního protokolu (Experiment I)	50
4.2	UHPLC–MS/MS analýza (Experiment II)	53
4.2.1	Kalibrace metody	55
4.2.2	Přesnost a správnost metody.....	56
4.2.3	Porovnání validačních parametrů	56
4.3	Stanovení neurosteroidů v lidském krevním séru a mozkomíšním moku (Experiment III).....	59
5	DISKUZE	61
6	ZÁVĚR.....	63
7	POUŽITÁ LITERATURA.....	65

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

V roce 1941 Hans Selye objevil v mozku steroidní látky vykazující extrémně rychlé anestetické účinky. Zjistil, že látky progesteron, deoxykortikosteron a jejich metabolity mají výrazný vliv na nervovou tkáň (Selye, 1941). Přítomnost těchto látek v nervové tkáni i dlouho poté, co byly z organismu odstraněny klasické steroidogenní tkáně (nadledviny a gonády), potvrdila nezávislou biosyntézu steroidů přímo v nervové tkáni (Corpéchet et al., 1981; Corpéchet et al., 1983). To odpovídalo i objevu Étienne-Émile Baulieua, že steroidní látky pregnenolon, dehydroandrosteron a jejich sulfáty jsou přítomny v mnohem vyšší koncentraci v nervové tkáni než v krevní plazmě (Baulieu, 1998). Již v roce 1981 Baulieu tyto látky pojmenoval termínem neurosteroidy, avšak mechanismus jejich účinku zůstával ještě dlouho neznámý. (Baulieu, 1981).

Velkou pozornost sklídl hned první synteticky vyrobený neuroaktivní steroid alphaxalon. Jeho velmi rychlé účinky jednoznačně vyvrátily dřívější představy o genomovém působení všech steroidních látek vazbou na jaderné receptory, jejímž charakteristickým znakem je dlouhá doba nezbytná k vyvolání účinku. Následným zkoumáním mechanismu působení byl objeven vliv neurosteroidů na membránové receptory pro neuropřenašeče kyseliny γ -aminomáselné (Smaje, 1976). Pozdější studie odhalily jejich působení i na další ligandem aktivované iontové kanály, jako jsou receptory glutamátová a glycinové receptory (Rupprecht a Holsboer, 1999).

Působením na receptory neuropřenašečů, neurosteroidy významně ovlivňují dráždivost (excitabilitu) neuronů. Neurosteroidy jsou tak zapojeny do mnoha fyziologických i patofyziologických procesů nervové soustavy, představují tak perspektivní skupinu látek vhodných k terapii neuropatologických stavů. Významné jsou jejich anestetické, antiepileptické a anxiolytické účinky. Například allopregnanolon a $3\alpha,5\alpha$ -tetrahydrodeoxykortikosteronu představují vhodnější alternativou farmak při terapii epilepsie než dlouho používané benzodiazepiny. Jako velmi slibné se jeví i využití neurosteroidů při terapii neurodegenerativních chorob a poruch paměti (Reddy, 2010).

Objevením neurosteroidů byl položen základ pro novou vědní oblast zkoumající látky a jejich vliv na nervovou soustavu. Pro zjišťování neurální

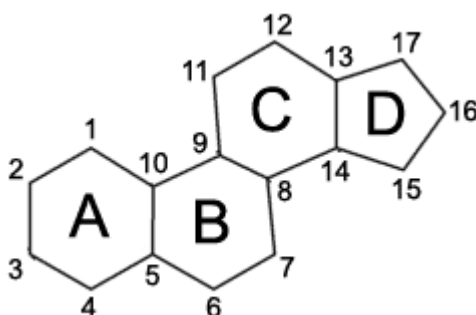
aktivity těchto látek, bylo již od samotného počátku potřeba použít velmi citlivých a specifických metod analýzy. Steroidní látky byly nejdříve analyzovány metodami imunoanalýz, zvláště pak radioimunoanalýzou (RIA). Přesto, že RIA poskytovala velice citlivá měření, z důvodu nedostatečné specifity bylo nezbytné před samotnou analýzou provést mnohé purifikační kroky. V současné době tak do popředí vstoupily metody hmotnostní detekce v kombinaci s kapalinovou či plynovou chromatografií. Tyto metody poskytují dostatečnou citlivost a specifitu pro měření i velmi nízkých koncentrací steroidních látek ve složitých biologických matricích (Griffiths et al., 2006).

Cílem teoretické části této diplomové práce bylo vypracování literární rešerše a podání přehledu o současném stavu dané problematiky, získání přehledu o biosyntéze, metabolismu a účincích neurosteroidů, seznámení s problematikou stanovení steroidních látek a používaných metod. Cílem praktické části diplomové práce bylo nalezení optimální purifikační metody pro stanovení šesti neurosteroidů v referenčních matricích. Dále pak vyvinutí metody ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UHPLC–MS/MS, *Ultra-high pressure liquid chromatography – tandem mass spectrometry*) a určení optimálního koncentračního rozsahu pro stanovení jednotlivých zkoumaných neurosteroidů. Vyvinutá metoda byla následně aplikována na několik vzorků krevního séra a mozkomíšního moku pacientů Neurologické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc. Získané výsledky jsou dále diskutovány s dostupnou literaturou a s již dříve opublikovanými poznatky.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Steroidy

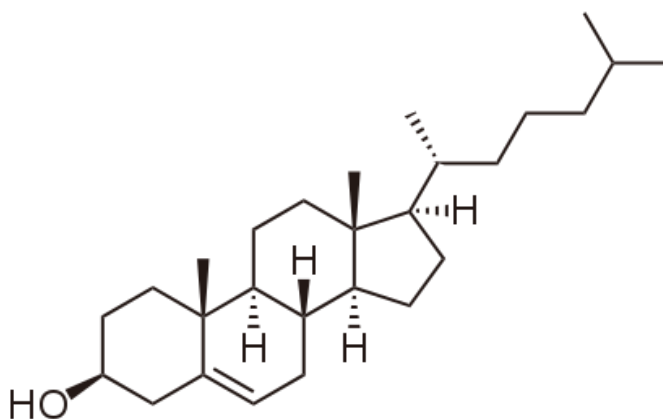
Mezi steroidy se řadí látky organické povahy, které se vyznačují řadou rozdílných fyziologických funkcí. Jejich obecná chemická struktura má však své charakteristické rysy isoprenoidů. Steroidy jsou odvozené z cyklopentanperhydrofenanthrenu (steranu), tetracyklického uhlovodíku složeného ze tří šestičlenných a jednoho pětičlenného cyklu, Obr. 1. Steroidy se mezi sebou liší druhem, počtem, pozicí substituentů a také konfigurací, druhem i počtem vazeb, velmi často také nesou hydroxylovou skupinu v poloze C10 a C13. Postranní řetězec steroidů může být také alkylován v poloze C17. Velký počet látek této skupiny je také dán šesti centry chiralidy steranu, které dávají možnost dalších konfigurací. Mezi hlavní skupiny steroidů se řadí: steroly, žlučové kyseliny a steroidní hormony (Vodrážka, 1996).



Obr. 1: Chemická struktura cyklopentanperhydrofenanthrenu (steranu). Šestičlenné cykly jsou označeny písmeny A, B, C, pětičlenný písmenem D. Číslo označují polohu jednotlivých atomů uhlíku.

Steroly jsou definovány jako steroidy nesoucí hydroxylovou skupinu v poloze C3. V poloze C17 obsahují acylový zbytek s osmi až deseti uhlíky. Struktura sterolů je odvozena od cholestanu (Harvey a Ferrier 2011; IUPAC, 1989). Nenasycený alkohol cholestanu se nazývá cholesterol (3β -cholest-5-en-3-ol), Obr. 2. Tvoří důležitou součást buněčných membrán a podílí se na mezibuněčné komunikaci. I když sám o sobě není schopen přestupovat přes hemotoencefalickou bariéru, může být syntetizován v mozku *de novo*. Tam je

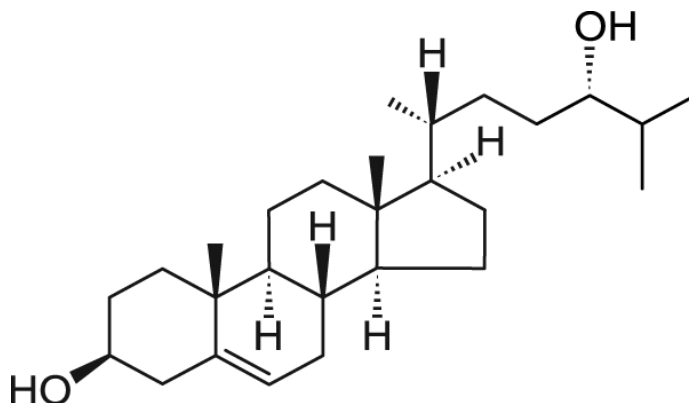
také přítomen ve větším množství a tvoří tak 25 % zásob celkového cholesterolu lidského těla (Dietschy a Turley, 2004). Nejvíce cholesterolu je využito na stavbu myelinových pošev oligodendrocytů (Lund et al., 1999). Hladina cholesterolu v mozkové tkáni při narození se pohybuje okolo 6 mg/g. Koncentrace však v době dospívání z důvodu zvýšené myelinizace vzroste na 10-20 mg/g (Dietschy et al., 2004; Heverin et al., 2004).



Obr. 2: Chemická struktura cholesterolu (3β -cholest-5-en-3-ol).

Oxysteroly jsou pak oksyličené formy cholesterolu či jeho prekurzorů, vznikají enzymaticky prostřednictvím reaktivních forem kyslíku (Griffiths et al., 2016). Na rozdíl od cholesterolu je 24S-hydroxycholesterol (24S-HC, cholest-5-en-3 β ,24(S)-diol) schopen volně přecházet do mozku, kde je pak za účasti cytochromu P46A1 přeměněn na cholesterol, Obr. 3. Hladiny 24S-HC jsou proto v mozkové tkáni mnohem nižší než hladiny cholesterolu, pohybují se v rozmezí 10-20 μ g/g (Heverin et al., 2004). Oxidace 24S-HC se děje v různých částech mozku, v oligodendrocytech a neuronech, kde je exprimován enzym cytochrom P46A1 (Lund et al., 1999). Neustálou přeměnou oxysterolů je udržována stálá homeostáza cholesterolu a mastných kyselin. Proto jakákoliv porucha této metabolické dráhy může zapříčinit spoustu závažných chorobných stavů zahrnujících aterosklerózu, roztroušenou sklerózu a další neurodegenerativní poruchy. Analýza 24S-HC z plazmy je také využívána k určení včasné diagnózy Alzheimerovy či Parkinsonovy choroby (Björkhem et al., 2013; Papassotiropoulos et al., 2000). Zvýšená koncentrace cholest-4-en-3-onu v mozku ukazuje na probíhající oxidační reakce, které mohou být způsobeny utvářením komplexu amyloidu beta a

měďnatých iontů, které vznikají při tvorbě amyloidových plaků při rozvoji Alzheimerovy choroby (Puglielli et al., 2005). Mimo jiné jsou oxysteroly také důležitými meziprodukty pro tvorbu dalších steroidů jako jsou žlučové kyseliny a steroidní hormony (Griffiths et al., 2016).

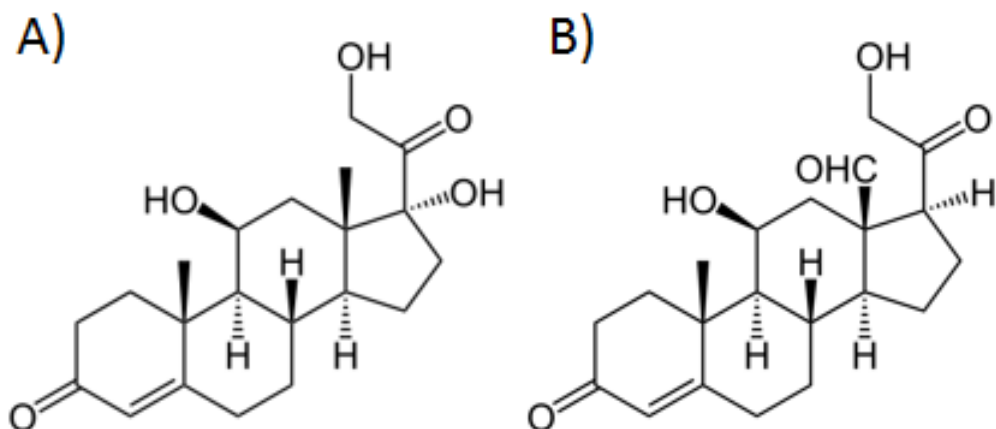


Obr. 3: Chemická struktura 24(S)-hydroxycholesterolu (cholest-5-en-3 β ,24(S)-diol).

Žlučové kyseliny jsou steroidní karboxylové kyseliny, obsahující polární i nepolární část. Tyto amfifilní molekuly mají silnou detergentní funkci, jako součást žluče proto hrají zásadní roli v procesu trávení a vstřebávání lipidů a lipofilních vitamínů. V trávicí soustavě je také důležitá jejich funkce při utváření a regulaci střevní bakteriální mikroflóry (Figueiredo a Garces, 2012).

Mezi steroidní hormony se řadí adrenokortikotropní hormony (glukokortikoidy a mineralkortikoidy), které jsou produkovány kůrou nadledvin. Produkce glukokortikoidů (kortisolu, kortikosteronu) značně stoupá při stresové zátěži organismu, Obr. 4. Kortisol (11 β ,17 α ,21-trihydroxypregn-4-en-3,20-dion) způsobuje utilizaci glukosy v periférii, zvyšuje tvorbu glykogenu a podporuje glukoneogenezi. Mineralkortikoid aldosteron (11 β ,21-dihydroxy-3,20-dioxopregn-4-en-18-al) ovlivňuje metabolismus sodných a draselných iontů a je zodpovědný za udržování objemu extracelulární tekutiny. Další skupinou steroidních hormonů tvoří hormony pohlavní. Pohlavní hormony regulují mnoho fyziologických funkcí důležitých již od vývoje plodu. Klíčové role pohlavních hormonů spočívají v růstu, vývoji a diferenciaci reprodukčních tkání a utváření sekundárních pohlavních znaků. Podle počtu uhlíků můžeme pohlavní hormony rozdělit na tři základní skupiny. Estrogeny (C₁₈) a gestageny (C₂₁) jsou ve větší míře produkovány vaječníky, androgeny (C₁₉) produkují varlata. Krevním oběhem se tyto hormony dostávají do mozku, míchy

periferních nervů, kde ovlivňují endokrinní funkce i chování organismu (Vodrážka, 1996).



Obr. 4: Chemické struktury vybraných adrenokortikotropních hormonů kortisolu ($11\beta,17\alpha,21$ -trihydroxypregn-4-en-3,20-dion; A) a aldosteronu ($11\beta,21$ -dihydroxy-3,20-dioxopregn-4-en-18-al; B).

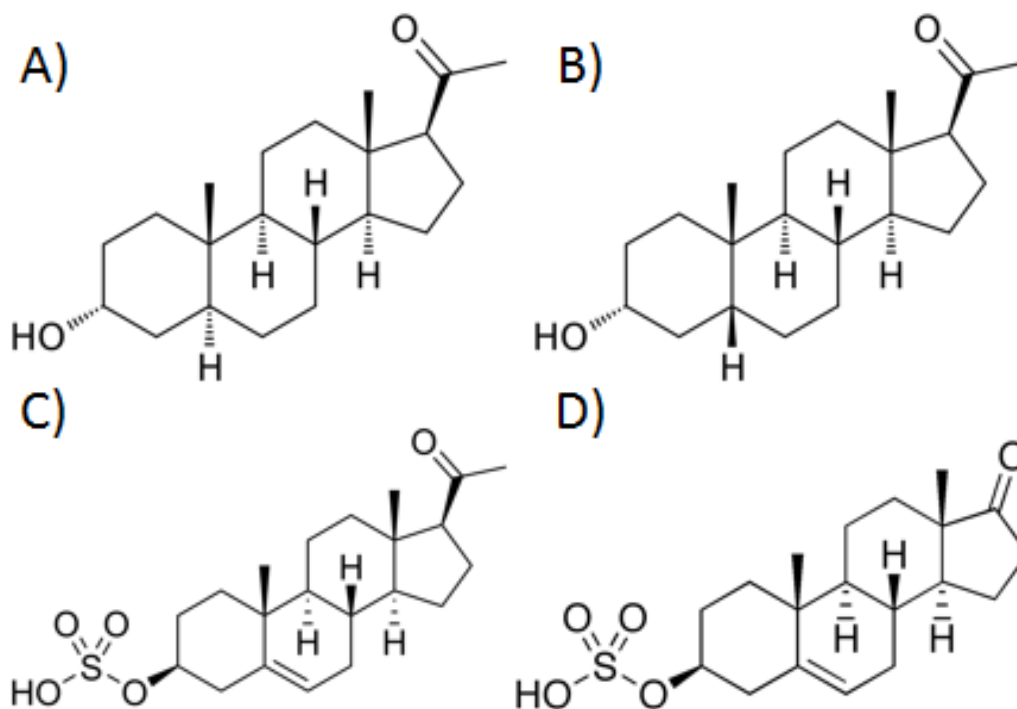
2.2 Neurosteroidy

Étienne-Émile Baulieu označil za neurosteroidy látky steroidní povahy vznikající z cholesterolu či steroidních prekurzorů pocházejících z periferních zdrojů *de novo* v centrální nervové soustavě (CNS) a periferní nervové soustavě (PNS). Steroidní prekurzory neurosteroidů jsou syntetizovány hlavně v gonádách, nadledvinách a placentě, odkud se transportují do nervové soustavy (Baulieu, 1998).

Často se lze také setkat s termínem neuroaktivní steroidy, který zavedli Steven M. Paul a Robert H. Purdy. Neuroaktivní steroidy zahrnují jak steroidy vytvořené v nervové tkáni (tedy neurosteroidy), tak i steroidy působící na nervovou tkáň vzniklé v periferních žlázách. Neuroaktivní steroidy mohou být i steroidy vytvořené synteticky, důležité je však jejich působení na buňky nervové soustavy (Paul a Purdy, 1992; Wang a Griffiths., 2008). V literatuře se často tyto dva termíny prolínají, a ne vždy jsou striktně dodržovány (Henry a Norman, 2003; Wang a Griffiths, 2008).

Neurosteroidy tedy neoznačují konkrétní třídu steroidů, ale místo jejich působení (Khare et al., 2016). Někteří autoři však na základě jejich struktury neurosteroidy rozdělují do několika základních tříd. Jsou jimi neurosteroidy

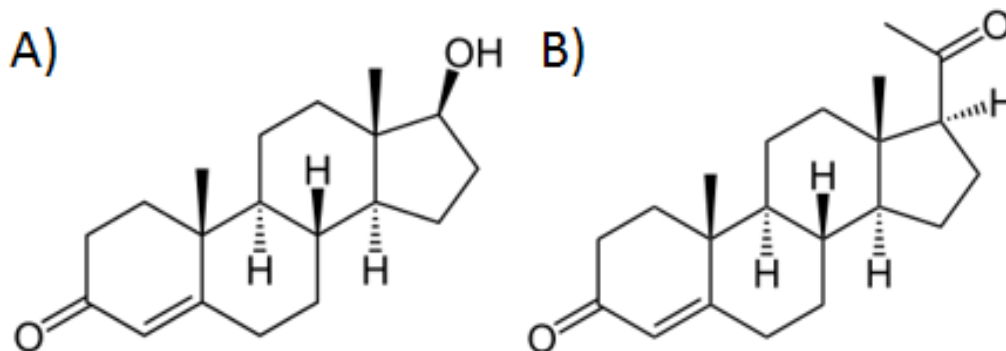
odvozené od pregnanu, kam patří allopregnanolon ($3\alpha,5\alpha$ -THP, 3α -hydroxy- 5α -pregnan-20-on), pregnanolon ($3\alpha,5\beta$ -THP, 3α -hydroxy- 5β -pregnan-20-on) a allotetrahydrodeoxykortikosteron (THDOC, $3\alpha,21$ -dihydroxy- 5α -pregnan-20-on), Obr. 5. Mezi neurosteroidy odvozené od androstanu se řadí androstandiol a etiocholanon. Všechny tyto látky jsou vysoce lipofilní, proto snadno přestupují přes hematoencefalickou bariéru. Další skupinou jsou sulfátové neurosteroidy se zástupci jako jsou pregnenolon sulfát (PREGS, 3β -hydroxypregn-5-en-20-on sulfát) a dehydroepiandrosteron sulfát (DHEAS, 3β -hydroxyandrost-5-en-17-on sulfát). Sulfatací se tyto látky stávají více polární, což se projevuje jejich vyšší koncentrací v krvi než u jejich odpovídajících nesulfátovaných forem (Reddy, 2010). Samy o sobě tyto sulfátové neurosteroidy nemohou přecházet přes hematoencefalickou bariéru, teprve vazbou na organické aniontové transportní proteiny (OATPs) jsou schopny prostoupit do mozku (Knapstein et al., 1986; Ugele et al., 2003).



Obr. 5: Chemické struktury vybraných neurosteroidů allopregnanolonu (3α -hydroxy- 5α -pregnan-20-on; A), pregnanolonu (3α -hydroxy- 5β -pregnan-20-on; B), pregnenolon sulfátu (3β -hydroxypregn-5-en-20-on sulfát; C) a ehydroepiandrosteronu sulfátu (3β -hydroxyandrost-5-en-17-on sulfát; D).

Základní strukturu neurosteroidů pregnenolonu (PREG, 3β -hydroxypregn-5 en-20-on) a dehydroepiandrosteronu (DHEA, 3β -

hydroxyandrost-5-en-17-on) tvoří 3 β -hydroxy- Δ^5 -steroidy, které jsou hlavními meziprodukty mezi cholesterolem a dalšími neurosteroidy. Jejich metabolity tvoří 3-oxo- Δ^4 -steroidy jako jsou testosteron (T; 17 β -hydroxyandrost-4-en-3-on) a progesteron (PROG; preg-4-en-3,20-on) (Baulieu, 1998), Obr. 6.



Obr. 6: Chemické struktury vybraných neurosteroidů testosteronu (17 β -hydroxyandrost-4-en-3-on; A) a progesteronu (preg-4-en-3,20-on; B).

2.2.1 Biosyntéza a metabolismus neurosteroidů

Neurosteroidy jsou syntetizovány v nervové soustavě, a to v buňkách gliových zahrnujících oligodendrocyty, Schwannovy buňky, astrocyty, a neuronech (Plassart-Schiess a Baulieu, 2001). Tyto buňky se nachází v různých částech mozku jako jsou hipokampus, mozková kůra a amygdala, taktéž v PNS (Agís-Balboa et al., 2006). Pro biosyntézu a metabolismus neurosteroidů je nezbytná řada enzymů. Jejich přítomnost či aktivita se může lišit v průběhu života organismu, ale i v různých buněčných typech. Každá steroidogenní tkáň obsahuje specifickou sadu enzymů, důležitých pro produkci unikátního souboru neurosteroidů (King, 2013).

Syntéza neurosteroidů probíhá z cholesterolu či steroidních prekurzorů importovaných z periferních zdrojů. Cholesterol může být syntetizován *de novo* z nízkomolekulárního prekurzorů (například mevalonátu). Metabolická dráha mevalonátu zahrnuje účast 35 enzymů, kdy z acetylkoenzymu A (acetyl-CoA) přes mevalonát, farnesyldifosfát, skvalen a lanosterol vzniká cholesterol (Goldstein et al., 2006; Horton et al., 2002).

Biosyntéza steroidů je dále kontrolována translokačním proteinem (TSPO) taktéž nazývaným jako periferní benzodiazepinový receptor. Protein TSPO je lokalizován na vnější mitochondriální membráně, usnadňuje

cholesterolu přístup na membránu vnitřní. Tento protein je hojně rozšířen jak v periferních tkáních i mozku v oligodendrocytech, astrocytech i neuronech (Papadopoulos et al., 2006). Na vnitřní mitochondriální membráně je exprimován klíčový enzym cytochrom P450 štěpící postranní řetězec cholesterolu (CYP450_{SCC}, CYTOCHROM P450 SIDE-CHAIN CLEAVAGE ENZYME) na PREG, výchozí meziprodukt pro syntézu dalších neurosteroidů. Přítomnost CYP450_{SCC} byla prokázána i na úrovni mRNA v různých částech lidského mozku. Vysoká míra exprese je patrná obzvláště v období embryogeneze, které je charakteristické obrovským neurálním růstem (King et al., 2002; Yu et al., 2002).

Rychlost limitující (*rate-limiting*) krok biosyntézy mimo působení cytochromu CYP450_{SCC} představuje i přítomnost steroidogenního akutního regulačního proteinu (StAR). Tento enzym, který se nachází v neuronech i buňkách gliových taktéž umožňuje další syntézu steroidů. Společná exprese cytochromu P450_{SCC} a StAR proto označuje místa aktuálně probíhající syntézy. Absence těchto enzymů se projevuje poruchou syntézy steroidních látek, což může mít pro organismus fatální následky. Existuje však jedna minoritní dráha, při které StAR není exprimován, a přesto dochází k steroidogenezi. Tato metabolická dráha umožňuje vznik progesteronu z 24S-HC, který je produkován placentou. Oxysterol 24S-HC na rozdíl od cholesterolu může prostoupit na vnitřní mitochondriální membránu bez účasti StAR (King, 2013).

Cholesterol je na vnitřní mitochondriální membráně následně oxidován na 22R-hydroxycholesterol (22-R-HC), dále na 20R,22R-dihydroxycholesterol (22R,22R-diHC) až na PREG. Všechny tyto reakce jsou katalyzovány cytochromem P450_{SCC} patřící do rodiny enzymů CYP11A1 (Ruan et al., 1999). Přítomnost 22R-HC a 20R,22R-diHC byla potvrzena v mozku dospělých i nově narozených myší (Meljon et al, 2012; Meljon et al., 2014).

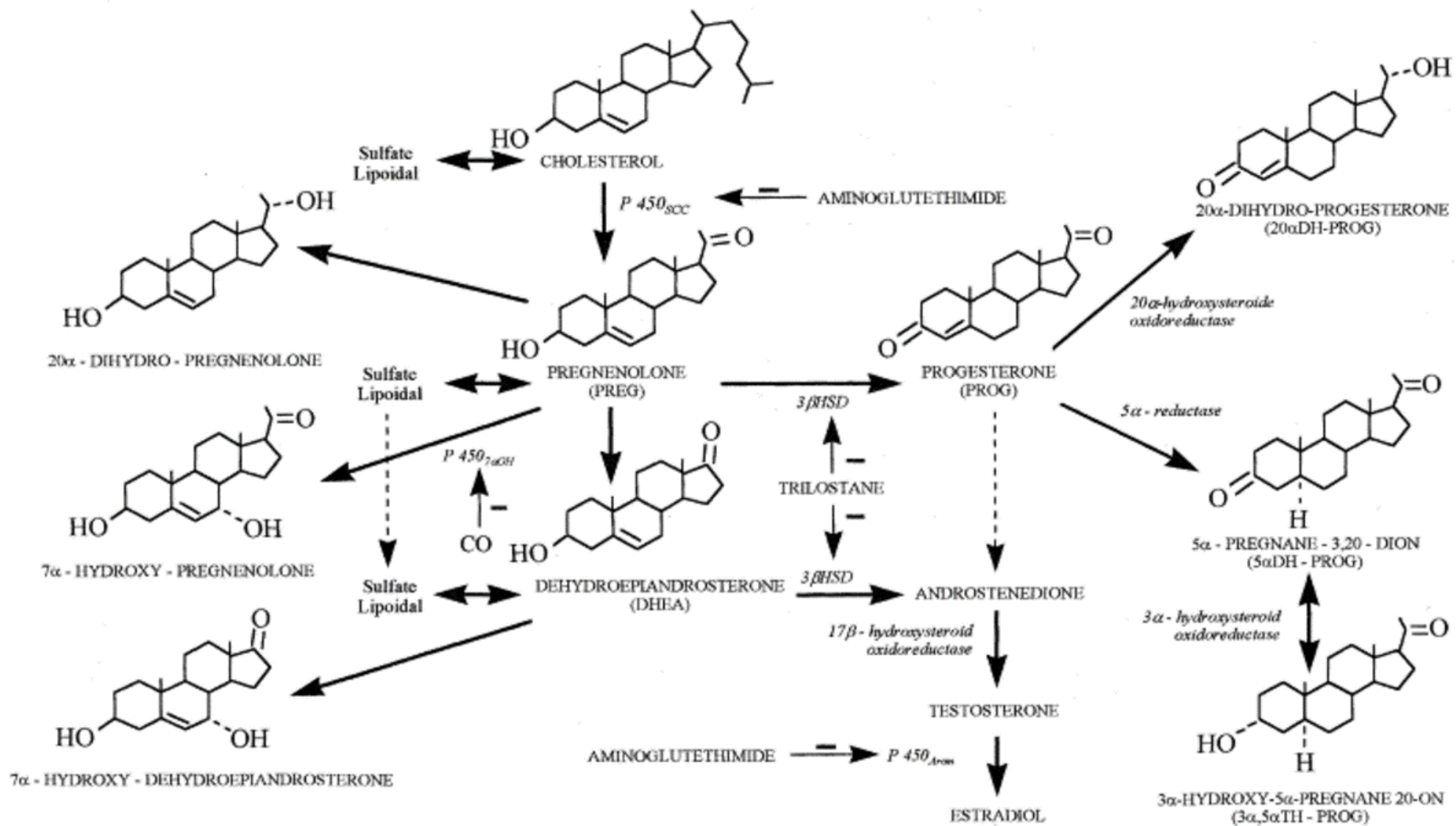
V závislosti na typu buňky je PREG dále metabolizován na další neurosteroidy. Neurosteroid PREG může být v buňkách gliových a neuronech redukován na metabolity 20 α -dihydropregnenolona a 7 α -hydroxypregnenolon (Baulieu, 1998), Obr. 7.

Cytochrom P450c17 disponuje aktivitou 17 α -hydroxylasy a 17,20-lyasy, které přeměňují PREG na DHEA. PREG je také schopný za účasti enzymu

3 β -hydroxysteroid dehydrogenasy (3 β -HSD) konvertovat na DHEA, který je možno dále oxidovat za účasti stejného enzymu na androstenedion (androst-4-en-3,17-dion). Tento enzym se nachází jak v neuronech, tak v buňkách gliových v oblastech zahrnujících mozkovou kůru, hipokampus, amygdalu a střední mozek (Henry a Norman, 2003). Pro syntézu DHEA byla navržena alternativní dráha nezávislá na CYP450_{SCC}. Tato cesta zahrnuje reakce katalyzované železnatými ionty, avšak ve vyšších koncentracích, než je fyziologický rozsah, proto se nepředpokládá její průběh *in vivo* (Biggio a Purdy, 2001).

Androstenedion může dále pokračovat přeměnou na T za přítomnosti enzymu 17 β -hydroxysteroid oxidoreduktasy (17 β -HSD). Přeměnu T na estradiol zajišťuje enzymatický komplex zahrnující cytochrom P450 aromatasu. Androstenedion může také vznikat přeměnou z PROG za účasti cytochromu P450_{c17} a dále pokračovat v konverzi na androgeny a estrogeny (Compagnone et al., 1995). Syntéza estradiolu byla prokázána v buňkách hipokampu (Hoyo et al., 2004). Exprese P450_{c17} byla zjištěna v buňkách astrocytů a neuronů v oblasti mozku i prodloužené míchy dospělých myší (Kibaly et al., 2005; Strömsted a Waterman, 1995).

Z neurosteroidu PREG může za přítomnosti enzymu 3 β -HSD vznikat také PROG, který může být redukován za účasti enzymu 20 α -hydroxysteroid oxidoreduktasy na 20 α -dihydroprogesteron (20 α DH-PROG). PROG se pak vlivem enzymů 5 α -reduktasy přemění na 5 α -dihydroprogesteron (5 α -DHP; pregnan-30,20-dion) a dále pak za účasti enzymu 3 α -HSD vzniká 3 α 5 α -THP (Baulieu, 1998). Mimo nervové soustavy mohou tyto konverze probíhat i na úrovni periferních tkání jako jsou gonády, játra a kůže (Do Rego et al., 2009). Neurosteroid 3 α 5 α -THP může také vznikat v mozku *de novo* (Reddy, 2010).



Obr. 7: Biosyntéza a metabolismus neurosteroidů. Nejčastější biosyntetické a metabolické reakce jsou uvedeny v textu (upraveno podle Baulieu, 1998).

2.2.2 Funkce vybraných neurosteroidů

2.2.2.1 Progesteron

Progesteron (PROG) je velmi důležitou látkou neonatálního období. Je potřebný pro rozsáhlou synaptogenezi, dotváření páteře a pro růst dendritů. Vysoká produkce progesteronu v neonatálním období koresponduje s vysokou aktivitou StAR, CYP450_{SCC} v Purkyňových buňkách a neuronech.

Neurosteroid PROG je také schopný vyvolat proliferaci neurálních progenitorových buněk, a to dokonce bez účasti 5 α -reduktasy. Tento efekt je zprostředkován přes PROGESTERON RECEPTOR MEMBRANE COMPONENT 1 (PGRMC1), jehož funkcí je vazba hemu a aktivace CYP450 (King, 2013).

2.2.2.2 Testosteron

Dá se říci, že působení testosteronu (T) má vliv na vytváření sociálních vztahů. Na úrovni CNS je T totiž zodpovědný za řadu kognitivních funkcí, prožívání emocí a chování. (Starka a Hampl, 2014). Existují studie, které dokazují, že zvýšená hladina T má vliv na zhoršení kognitivních funkcí starších mužů i žen (Hogervorst, 2012; Martin et al., 2007). Vysoké hladiny T mohou dále také za zhoršení exotoxického poškození oligodendrocytů (Caruso et al., 2004).

Neurosteroid T může ovlivňovat vývoj mozkové kůry zvýšením podjednotek α 2 receptoru pro kyselinu γ -aminomáselnou typu A (GABA_A) (King, 2013). Rozdíl v hladinách T je také pozorován mezi pohlavími. O poznání vyšší hladiny T byly naměřeny v sedacím nervu krysích samců oproti hladinám T u samic (Pesaresi et al., 2011a). Na rozdíl od jiných neurosteroidů, hladiny T významně klesají po odstranění gonád a nadledvin. To ukazuje na významnou syntézu T z prekurzorů vznikajících v periferních žlázách (Biggio a Purdy, 2001).

2.2.2.3 Dehydroepiandrosteron a dehydroepiandrosteron sulfát

Dehydroepiandrosteron (DHEA) je látka s širokým spektrem biologických účinků. Vzniká v CNS i v periferních tkáních zahrnující kůru nadledvin, gonády a gastrointestinální trakt. Slouží jako prekurzor pro syntézu androgenů a estrogenů. Látka DHEA společně se sulfátem DHEAS patří mezi nejvíce

zastoupené cirkulující steroidy v mozku mladého člověka. Hladiny DHEA korelují s věkem organismu a jejich odchylky mohou také upozornit na různé neurodegenerativní poruchy (Hampl et al., 2003; Kihel, 2012). Bylo také zjištěno, že se hladiny DHEA liší mezi pohlavími. Samice krysy poskytovaly vyšší hladiny DHEA než samci (Pesaresi et al., 2011b).

Neurosteroid DHEA může také dále metabolizovat na své oxidované formy, které mají široké možnosti působení. Například u metabolitů 7-hydroxyDHEA byly prokázány antiglukokortikoidní, imunomodulační, neuroprotektivní, antioxidační a antiapoptotické účinky (Hampl et al., 2003; Morfin et al., 2000; Pelissier et al., 2004).

Převažující místní syntézu DHEA v nervové tkáni, potvrzuje přetrvávání v nervové soustavě po gonadotomii a adrenotomii či po inhibici cytochromu P450c17 agonistou (Compagnone a Melon, 2000).

2.2.2.4 Pregnenolon a pregnenolon sulfát

Pregnenolon (PREG) může vyvolat strukturální změny neuronů po vazbě na mikrotubuly. Tyto účinky PREG byly prokázány *in vitro* na krysí buněčné linii PC12 odvozené z feochromocytomu dřeně nadledvin, které tak byly ochráněny před polymerací tubulinu nocodalozem. Zvýšená lokální syntéza PREG byla také zjištěna v reakci na poranění, což naznačuje, že díky PREG se neurony lépe vyrovnávají s poškozením (Meffre et al., 2007).

Pregnenolon sulfát (PREGS) stimuluje neurální proliferaci ve struktuře gyrus dentatus spánkového laloku mozku. Může také modulovat neurální buněčnou plasticitu, růst a stárnutí neuronů působením na α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxalon receptory (AMPA). Tyto presynaptické receptory *N*-methyl-D-aspartátu (NMDA) po navázání PREGS uvolňují glutamát, což má za následek zvýšení postsynaptické aktivity AMPA receptorů v oblasti CA1 pyramidálních neuronů. Neurosteroid PREGS také stimuluje uvolnění glutamátu v nově vzniklých Purkyňových buňkách přes jejich TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL CATION CHANNELS SUBFAMILY M MEMBER 3 (TRPM3) - důležité prostředky mezibuněčné komunikace a udržování homeostázi (King, 2013). PREGS také zvyšuje neurální aktivitu inhibicí GABAergních a aktivací glutamatergních

neuropřenašečů. Mimoto může být také silným modulátorem sigma 1 receptoru (Schumacher et al., 2008).

U samců dospělých potkanů dosahovaly hladiny PREG i PREGS řádově 100 pmol v gramu mozkové tkáni. Vyšší hladiny byly získány z hypotalamu, nižší v mozkové kůře (Hu et al., 1987). Hladiny PREG měřené v sedacím nervu krys byly výrazně vyšší u samic než samců (Pesaresi et al., 2011a). Pokusy s adrenalectomií a gonadektomií u krys jednoznačně prokázaly, že PREG jeho syntetizován v CNS nezávisle na periferních zdrojích (Corpéchet et al., 1983).

2.2.2.5 Allopregnanolon

Allopregnanolon (3 α 5 α -THP) je zodpovědný za změny lokalizace neurálních populací v prefrontálním kortexu a thalamu u novorozenců, tyto změny mohou vyvolat změny chování. Citlivost GABA_A receptorů na neurosteroidy se může lišit během vývoje v souvislosti s různou expresí jeho podjednotek. Neurosteroid 3 α 5 α -THP totiž může měnit vazbu na α a β podjednotku receptoru, což bylo prokázáno *in vitro* v buňkách kortikálních neuronů. To ukazuje na důležitost 3 α 5 α -THP při vývoji organismu (King, 2013).

2.2.2.6 Pregnanolon

Pregnanolon (3 α 5 β -THP) také zvaný jako eltanolon je progesteronový metabolit s významnými anestetickými vlastnostmi. Přesto že je 3 α 5 β -TH produkován fyziologicky v menších hladinách než 3 α 5 α -THP, i on je významnou látkou během těhotenství. Naopak jeho nízké hladiny mohou vyvolat předčasný porod (Carl et al., 1994).

2.2.3 Mechanismy působení neurosteroidů

2.2.3.1 Membránové receptory

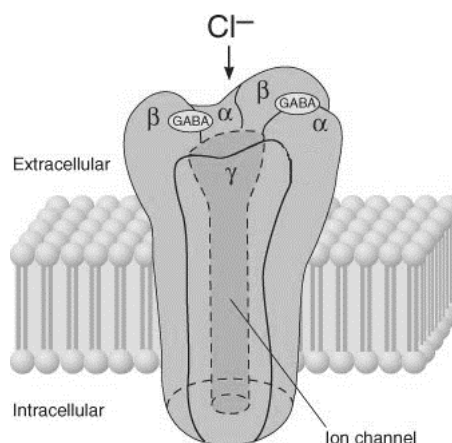
Mnoho neurosteroidů působí na membránové receptory pro neuropřenašeče, mezi které patří kyselina γ -aminomáselná (GABA; *gamma*-Aminobutyric acid), glutamát a glycin. Mezi nejčastější konkrétní cíle neurosteroidů patří receptory GABA_A a NMDA receptory. Pochopení mechanismů aktivace jednotlivých membránových

receptorů, může vést k lepšímu rozpoznání rychlých negenomických účinků jednotlivých neurosteroidů a jejich využití v klinické praxi (Henry a Norman., 2003).

2.2.3.1.1 GABA receptory

Látka GABA je nejrozšířenějším inhibičním neuropřenašečem CNS savců. Receptory aktivované tímto neuropřenašečem jsou tradičně děleny na ionotropní GABA_A receptory tvořící kanál pro chloridové anionty, metabotropní GABA_B receptory spřažené s G-proteiny tvořící kanál pro sodné a draselné kationty a GABA_C receptory lišící se od GABA_A svým podjednotkovým složením, distribucí v organismu a farmakologickými vlastnostmi (Beleboni et al., 2004).

GABA_A receptory jsou tvořeny pěti transmembránovými podjednotkami tvořící chloridový kanál. V současnosti je na základě sekvenční homologie známo 20 podjednotek řazených do 8 tříd (α 1-6, β 1-4, γ 1-3, δ , ϵ , θ , π , ρ 1-3) (Reddy a Estes, 2016). Většina GABA_A receptorů je však tvořena z podjednotek α , β a γ ve stechiometrickém poměru 2 α :2 β : γ , přičemž převládající isoforma zaujímá složení $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ (Möhler at el., 2004), Obr. 8. Na základě jejich umístění jsou dále receptory rozděleny na extrasynaptické a synaptické. Extrasynaptické GABA_A receptory jsou přítomny ve specifických oblastech mozku jako jsou hipokampus, thalamus, hypothalamus, amygdala a mozeček. Tyto receptory vytvářejí tonusové proudy, které jsou však potlačovány extracelulární GABA. Synaptické GABA_A receptory jsou široce zastoupeny v celém mozku a v reakci na uvolnění GABA z váček do synaptické štěrbině produkují proudy fázové (Reddy a Estes, 2016).



Obrázek 8: GABA_A receptor tvořící kanál pro chloridové anionty. Nejčastější zastoupení podjednotek GABA_A receptoru je ve stechiometrickém poměru 2 α :2 β : γ (upraveno podle Reddy a Estes, 2016).

Při zkoumání mechanismů účinku prvního synteticky vytvořeného neuroaktivního steroidu alphaxalonu byl objeven vliv této látky na modulaci GABA_A receptorů (Harrison a Simmonds, 1984). Tento receptor je však potencován i dalšími neurosteroidy jako jsou 3α5α-THP a 3α5β-THP, Tab.1. Tyto látky obsahující konfiguraci 3α pozitivně modulují GABA_A receptory a tím prodlužují dobu otevření iontového kanálu (Callachan et al., 1987). Naopak 3β-redukované analogy neurosteroidů mají na GABA_A receptory účinek inhibiční. Avšak bez ohledu na konfiguraci mají všechny neurosteroidy s navázanou sulfátovou skupinou jako jsou PREGS, pregnanolon sulfát (3α5βS) a analogy 3α5αS, 3β5αS a 3β5βS na GABA_A receptory účinek inhibiční (Wang et al., 2002). To dokazuje různé mechanismy modulace GABA_A receptorů závisících na struktuře neurosteroidů. Roli v účincích neurosteroidů hraje také jeho podjednotkové složení receptoru či jeho lokalizace v nervové soustavě (Belelli a Lambert, 2005).

Například **GABA_C receptor** liší se od GABA_A receptorů právě podjednotkovým složením, jsou modulovány neurosteroidy zcela odlišně. Látky obsahující ve své struktuře 5α-steroid působí na tyto receptory potenciačně, zatímco látky s 5β-steroidy naopak GABA_C receptory inhibují (Morris a Amin, 2004).

Tab. 1: Přehled účinků vybraných neuroaktivních steroidů na funkci GABA_A receptorů (↑=potenciace, ↓=inhibice).

Neuroaktivní steroid	Působení na GABA _A receptor
3α5α-THP	↑
3α5β-THP	↑
Isoallopregnanolon (3β5α-THP)	↓
Isopregnanolon (3β5β-THP)	↓
PREGS	↓
Pregnanolon sulfát (3α5βS)	↓
Pregnanolon sulfát (3α5αS)	↓
Pregnanolon sulfát (3β5αS)	↓
Pregnanolon sulfát (3β5βS)	↓

2.2.3.1.2 Glycinové receptory

Také glycinové receptory tvoří kanál pro průchod chloridových iontů. Strukturně jsou velmi podobné receptorům GABA_A. Proto jsou také cílem mnoha neurosteroidů, které jsou také schopné vázat se na receptory GABA_A. Některé z nich, které aktivují GABA_A receptory jsou schopné téměř úplně zablokovat glycinové receptory. Na druhou stranu však syntetické neuroaktivní steroidy aktivující GABA_A receptory způsobují vznik rekombinantních glycinových receptorů. Koncentrace neurosteroidů nutná k aktivaci glycinových steroidů však musí být řádově 20x vyšší než koncentrace nutná k aktivaci receptorů GABA_A (Smith, 2003).

Bylo také zjištěno, že neurosteroidy (např. PREGS) inhibující GABA_A receptory blokují glycinové receptory v míšních neuronech pokusných kuřat (Wu et al., 1997). Avšak koncentrace nutná k blokaci glycinových receptorů se pohybuje v podobném rozmezí jako koncentrace nutná k inhibici receptorů GABA_A. Zdá se tedy, že mechanismus inhibice PREGS je pro tyto receptory odlišný (Smith, 2003). Oproti tomu neurosteroid 3α5α-THP a syntetický alphaxalon nevyvolávají na glycinových receptorech žádný účinek (Henry a Norman, 2003).

2.2.3.1.3 Glutamátové receptory

Glutamát je hlavní excitační neuropřenašeč CNS obratlovců. Glutamátové receptory se dělí na více rozšířené ionotropní glutamátové receptory a méně početné metabotropní glutamátové receptory spřažené s G-proteiny (GPCR, G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR), které mimo jiné hrají významnou roli v modulaci druhého posla – intracelulárního inositoltrifosfátu. Ionotropní glutamátové receptory se dále dělí na receptory AMPA, NMDA receptory a receptory kainátové, aktivované kyselinou kainovou (KA) (Henry a Norman, 2003).

NMDA receptory jsou tetramery vytvořené ze sedmi typů podjednotek (NR1, NR2A až NR2D, NR3A a NR3B). Jeho podjednotkové složení může být rozdílné v různých místech nervové soustavy a může se taktéž měnit v průběhu vývoje organismu. Mimoto má také zásadní vliv na jeho farmakologické i funkční vlastnosti. V neonatálním období převládají v mozku NR2B a NR2D podjednotky, zatímco během vývoje je postupně doplňují či nahrazují podjednotky NR2C (Cull-

Candy et al., 2001). NMDA receptory mohou být lokalizovány postsynapticky, presynapticky i extrasynapticky v neuronech, jsou však zastoupeny i v buňkách gliových (Van Dongen, 2009). Podjednotka NR2A je převážně součástí synaptických receptorů, zatímco podjednotka NR2B receptorů extrasynaptických (Thomas et al., 2006).

Tyto receptory hrají zásadní úlohu v udržování synaptické plasticity jako je dlouhodobá potenciace (*long-term potentiation*) a dlouhodobá deprese (*long-term depression*). Podílí se také zásadně na procesech učení a paměti. Naopak výrazné prodloužení aktivace těchto receptorů může vést k buněčné smrti či její abnormální regulaci, která může zapříčinit choroby zahrnující roztroušenou sklerózu, epilepsii a další choroby postihující nervový systém (Dingledine et al., 1999).

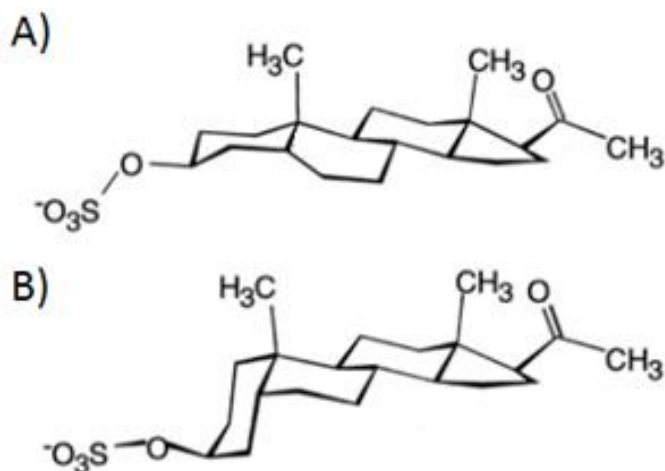
Modulace NMDA receptorů je závislá na záporném náboji, který poskytuje sulfátová skupina. Neurosteroidy, u kterých byl prokázána modulace těchto receptorů, obsahovaly ve své struktuře sulfátovou skupinu v poloze C3 (Tab. 2).

Tab. 2: Přehled účinků vybraných neuroaktivních steroidů na funkci NMDA receptorů (\uparrow =potenciace, \downarrow =inhibice).

Neuroaktivní steroid	Působení na NMDA receptor
PREGS	\uparrow
Pregnanolon sulfát (3 α 5 β S)	\downarrow
Pregnanolon sulfát (3 α 5 α S)	\downarrow
Pregnanolon sulfát (3 β 5 α S)	\uparrow
Pregnanolon sulfát (3 β 5 β S)	\downarrow

Neurosteroid PREGS má významný potenciační vliv na NMDA receptor, po jeho působení je zvýšena pravděpodobnost otevření iontového kanálu (Horak et al., 2006). Naopak pregnanolon sulfát (3 α 5 β S), lišící se od PREGS pouze absencí jedné dvojně vazby, NMDA receptor inhibuje (Petrovic et al., 2005) podobně jako jeho analog 3 α 5 α S (Tab. 2). U 3 β -steroidů existuje rozdílný mechanismus účinku, který je závislý na rozdílné stereospecifitě substituentů na uhlíku C5. Zatímco látka 3 β 5 α S má skelet planární a působí na receptor potenciačně, skelet analogu

$3\beta5\beta S$ je zalomený a receptor NMDA naopak inhibuje (Park-Chung et al., 1997), Obr. 9.



Obr. 9: Tvar molekuly vybraných neuroaktivních steroidů – $3\beta5\alpha S$ tvořící skelet planární (A) a $3\beta5\beta S$ tvořící zalomený skelet (B) (upraveno podle Park-Chung et al., 1997).

AMPA receptory jsou tetramery tvořené ze 4 podjednotek GluR1 až GluR4. **Kainátové receptory** tvoří podjednotky GluR5 až GluR7, podjednotky KA1 a KA2 (Hollmann a Heinemann, 1994). Působení neurosteroidů na AMPA a KA receptory bylo prokázáno pouze ve formě negativní modulace těchto receptorů (Yaghoubi et al., 1998).

2.2.3.2 Jaderné receptory

Některé neurosteroidy mohou mimo působení na membránové receptory působit na receptory jaderné a způsobovat tak genomické účinky. Toto působení je oproti působení na membránové receptory velmi pomalé. O výsledné aktivitě receptoru rozhoduje mimo hladiny samotného neurosteroidů také počet a kvalita příslušných jaderných receptorů.

Androgenní jaderné receptory pro testosteron jsou bohatě zastoupeny v endotelu cévní soustavy. Testosteron tímto působením může ovlivnit mozkovou perfuzi a propustnost hematoencefalické bariéry (Starka a Hampl, 2014). V mozku jsou také exprimovány jaderné receptory pro progesteron (Wang a Griffiths., 2008).

2.2.3.3 Působení na proteiny spojené s mikrotubuly typu 2

Mechanismus účinku některých neurosteroidů může spočívat také v působení na mikrotubuly neuronů prostřednictvím receptoru pro MAP2 (MIKROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN TYPE 2). Tyto neurosteroidy se tak mohou podílet na vytváření a stabilizaci mikrotubulů – hlavních stavebních dílců neurálního cytoskeletu (Plassart-Schiess a Baulieu, 2001).

Neurosteroid PREG prostřednictvím vazby na MAP2 stimuluje polymeraci mikrotubulů, má také významný vliv na zvýšení produkce nervového růstového faktoru v nervových buňkách PC12. Tento faktor je důležitý pro regeneraci buněk nervové soustavy (Fontaine-Lenoir et al., 2006).

2.2.4 Fyziologické účinky neurosteroidů

2.2.4.1 Úzkost a stres

Existují mnohé důkazy o zapojení neurosteroidů do etiologie úzkosti a stresu. Stres u pokusných zvířat a pravděpodobně i u lidí způsobuje rychlý pokles aktivity GABA_A receptorů, který je doprovázen zvýšením hladin neurosteroidů pozitivně modulujících tento typ receptoru. Tyto neurosteroidy obsahující strukturu 3 α 5 α zvyšují svou koncentraci v plazmě a mozku (Barbaccia et al., 2001). Zatímco snížení aktivity GABA_A receptorů dochází do pěti minut po stimulaci, nárůst koncentrace neurosteroidů obsahujících 3 α 5 α je pozvolnější, dosahující vrcholu zhruba po 30 minutách od stimulace (Barbaccia et al., 1996). Předpokládá se, že zvýšené hladiny těchto neurosteroidů představují obranný mechanismus organismu, kterým se brání proti stresu (Dazzi et al., 1996).

Neurosteroidy 3 α 5 α -THP a THDOC jsou látkami se silnými anxiolytickými účinky (Eser et al., 2008). Také podávání PROG vyvolává anxiolytické účinky u pokusných zvířat (Reddy a Kulkarni, 1997). Tyto příznivé účinky byly taktéž potvrzeny syntetickým analogem 3 α 5 α -THP (Vanover et al., 2000). Pacienti s indukovanými záchvaty úzkosti vykazují snížené hladiny 3 α 5 α -THP. Nahrazení toho neurosteroidu jeho syntetickým analogem může představovat slibnou strategii při léčbě úzkostných poruch (Ströhle et al., 2003).

2.2.4.2 Procesy paměti a učení

Neurosteroidy hrají taktéž významnou roli v procesech učení a paměti. Podání sulfatovaných neurosteroidů, které pozitivně ovlivňují NMDA receptory nebo negativně GABA_A receptory (například PREGS, viz Tab. 1 a 2) významně zvyšuje kognitivní funkce zkoumaných zvířat (Isaacson et al., 1995). Naopak neurosteroidy obsahující 3 α 5 α , pozitivně modulující GABA_A receptory, procesy paměti a učení výrazně zhoršují (Turkmen et al., 2004).

Pozitivní vliv na kognitivní funkce mají taktéž neurosteroidy DHEA a DHEAS. Tyto látky se s věkem snižují, mohou tak mít vliv na kognitivní dysfunkce typické pro stárnoucí pacienty. Existují dokonce důkazy, že snížená hladina DHEA a DHEAS se podílí na projevech Alzheimerovy choroby (Murialdo et al., 2001). Léčba 7 β -hydroxyepiandrosteronem pokusných zvířat trpících příznaky Alzheimerovy choroby prokázala jednoznačný neuroprotekticní efekt této látky (Dudas et al., 2004). Zkoumána byla také léčba PREG pacientů trpících schizofrenií. Po pravidelném podávání tohoto neurosteroidu došlo u těchto pacientů k významnému zvýšení jejich kognitivních funkcí (Marx et al., 2009).

2.2.4.3 Role neurosteroidů na rozdíly mezi pohlavími

Hladiny neurosteroidů se mohou lišit mezi pohlavími. Tyto rozdílné hladiny mohou hrát například roli v rozdílech citlivosti na některé nervové poruchy. Ke stavům úzkosti a deprese jsou typicky náchylnější ženy než muži. Existuje možný důkaz, že tyto rozdíly souvisí se systémem neuropřenašeče serotoninu, který je také zodpovědný za různě dlouhou terapeutickou odpověď na antidepresiva.

Sexuální rozdíly byly popsány u pacientů s epilepsií postihující spánkový lalok mozku. To může také zapříčinit odlišnou regionální lokalizace dysfunkce mozku mužů a žen způsobenou v mezizáchvatovém období epilepsie. Během vývoje mozku mají totiž pohlavní hormony a taktéž některé neurosteroidy různě velkou organizační funkci, které tak vede k trvalým rozdílům mezi muži a ženami v různých částech mozku. Avšak přesné mechanismy, které jsou základem pro tuto diferenciaci neurálních obvodů zapojených do potenciace a kontroly záchvatových stavů dosud není známá (Reddy a Estes 2010).

2.2.5 Patofyziologické účinky neurosteroidů

2.2.5.1 Epilepsie

Epilepsie zahrnuje skupinu neurologických poruch s charakteristickými epileptickými záchvaty. Tyto cyklické záchvatovité stavy se mohou lišit svou intenzitou a dobou trvání. Etiologie tohoto onemocnění není přesně známá, proto neexistuje ani léčivo, které by propuknutí epilepsie zcela zabránila. Při terapii tohoto onemocnění se však využívají farmaka ze skupiny antiepileptik (antikonvulsiv), kterými lze mírnit alespoň symptomy onemocnění.

Neurosteroidy vykazují široké spektrum antikonvulzivních účinků. Tyto účinky, které se do značné míry překrývaly s účinky klasických antiepileptik, byly prokázány při pokusech na experimentálních zvířatech (Gaisor et al., 1999). V závislosti na druhu epileptických záchvatů vykazují neurosteroidy různou míru účinku. Nejúčinněji se tyto látky jeví proti záchvatům vyvolaným pilokarpinem – agonistou GABA_A receptorů. Některé neurosteroidy však mohou být významně prospěšné i v potlačení záchvatů vyvolaných návykovými látkami jako je kokain, ethanol či diazepin (Devaud et al., 1996; Tsuda a Suzuki, 1997). Podávání velmi vysokých dávek neurosteroidů dokonce částečně ochránilo pokusné myši před záchvaty způsobené elektrošokem (Reddy a Rogawski, 2001).

Sulfatované neurosteroidy PREGS a DHEAS jsou schopny inhibovat GABA_A receptory a potencovat receptory NMDA. Záchvaty mohou být také částečně blokovány podáváním 3 α -THP nebo dalších neurosteroidů, které pozitivně modulují GABA_A receptory.

Neurosteroidy by mohly být vhodnými farmaky při terapii nejenom epilepsie, ale i onemocnění status epilepticus, které je typické delšími intervaly tetanických záchvatů. Avšak klasické endogenní neurosteroidy i přes své pozitivní vlastnosti disponují některými překážkami, jež brání jejich klinickému použití. Nízká biologická dostupnost těchto látek způsobuje, že jsou rychle inaktivovány a eliminovány pryč z organismu. Jejich oxidací se také zvyšuje aktivita jaderných receptorů pro klasické steroidní hormony, což může mít za následek nepříznivé vedlejší hormonální účinky. Tyto omezení však postrádají synteticky vytvořené analogy těchto látek, některé z nich jsou ve fázích klinických testů a jeví se jako

vhodný alternativní přístup při terapii epilepsie a status epilepticus (Reddy a Estes, 2016).

2.2.5.2 Premenstruační syndrom

Premenstruační syndrom (PMS) je chronická porucha projevující se psychickými i tělesnými změnami cyklicky v druhé polovině menstruačního cyklu. Přesto, že etiologie onemocnění není známa, je předpokládáno, že PROG a jeho deriváty jsou důležité pro klinické projevy tohoto syndromu. U zdravých žen je koncentrace PROG a $3\alpha5\alpha$ -THP nejvyšší v luteální fázi menstruačního cyklu. Jejich hladina se poté prudce snižuje v první den menstruace (Bicikova et al., 1998). Bylo zjištěno, že ženy trpící PMS mají hladiny PROG a $3\alpha5\alpha$ -THP v krevním séru v luteální fázi menstruačního cyklu výrazně nižší než ženy zdravé (Girdler et al., 2001).

2.2.5.3 Deprese

Také při depresích mohou neurosteroidy sehrát klíčovou roli. Studie na zvířatech ukázaly, že antidepresivum fluoxetin zvyšuje hladiny $3\alpha5\alpha$ -THP v mozku (Uzunov et al., 1996). I u lidí fluoxetin významně zvýšil hladiny $3\alpha5\alpha$ -THP pravděpodobně přímou aktivací enzymu 3α -HSD (Mellon et al., 2001).

Bylo prokázáno, že přímé podávání $3\alpha5\alpha$ -THP snižuje depresivní chování na zvířecích modelech (Khisti et al., 2000). Lidé trpící depresí vykazovali v krevním séru a mozkomíšním moku sníženou koncentraci tohoto neurosteroidu, zatímco sérová hladina THDOC byla zvýšena. Snížená hladina $3\alpha5\alpha$ -THP může být částečně vyvolána sníženou syntézou 5α -reduktasy, která může taktéž naznačit depresivní stav (Uzunov et al., 1996).

Také DHEA a jeho sulfatovaná forma DHEAS prokazuje antidepresivní účinky u zvířat i lidí. Stejně tak i sulfatovaný neurosteroid PREGS.

Neurosteroidy mohou také zastávat zásadní úlohu ve vzniku poporodní deprese. Deprese žen v poporodním období může být vyvolána sníženou hladinou PROG. Jeho hladiny se během těhotenství ženy výrazně zvyšují a jeho anxiolytické účinky tak pomáhají ženám lépe si vyrovnat s tělesnými změnami při vývoji plodu. V období po porodu se ale hladina PROG začíná snižovat a u žen se tak mohou objevit depresivní stavy (Smith et al., 2007).

2.2.6 Klinický potenciál neurosteroidů

Neurosteroidy syntetizované v nervové soustavě řídí fyziologii periferních nervů a mohou také vykazovat významné neuroprotektivní účinky. Byly proto navrženy jako vhodná terapie pro různé typy periferních neuropatií objevujících se během stárnutí, chemoterapie, onemocnění diabetes melitus či po fyzickém poranění (Giatti et al., 2015).

Významný terapeutický potenciál PREGS byl demonstrován v buňkách hipokampu dospělých a starších pokusných krys. Starší krysy byly díky PREGS schopny lépe odolávat kognitivním poruchám (Mayo et al., 2005). Významná je také funkce 3α -THP, která byla potvrzena například při zvýšení proliferace neuroprogenitorových buněk v krysím hipokampu i lidské mozkové kůře (Wang et al., 2005). Důležitá je také funkce DHEA podílející se na procesu dělení neurálních kmenových buněk v lidském mozku (Suzuki et al., 2004).

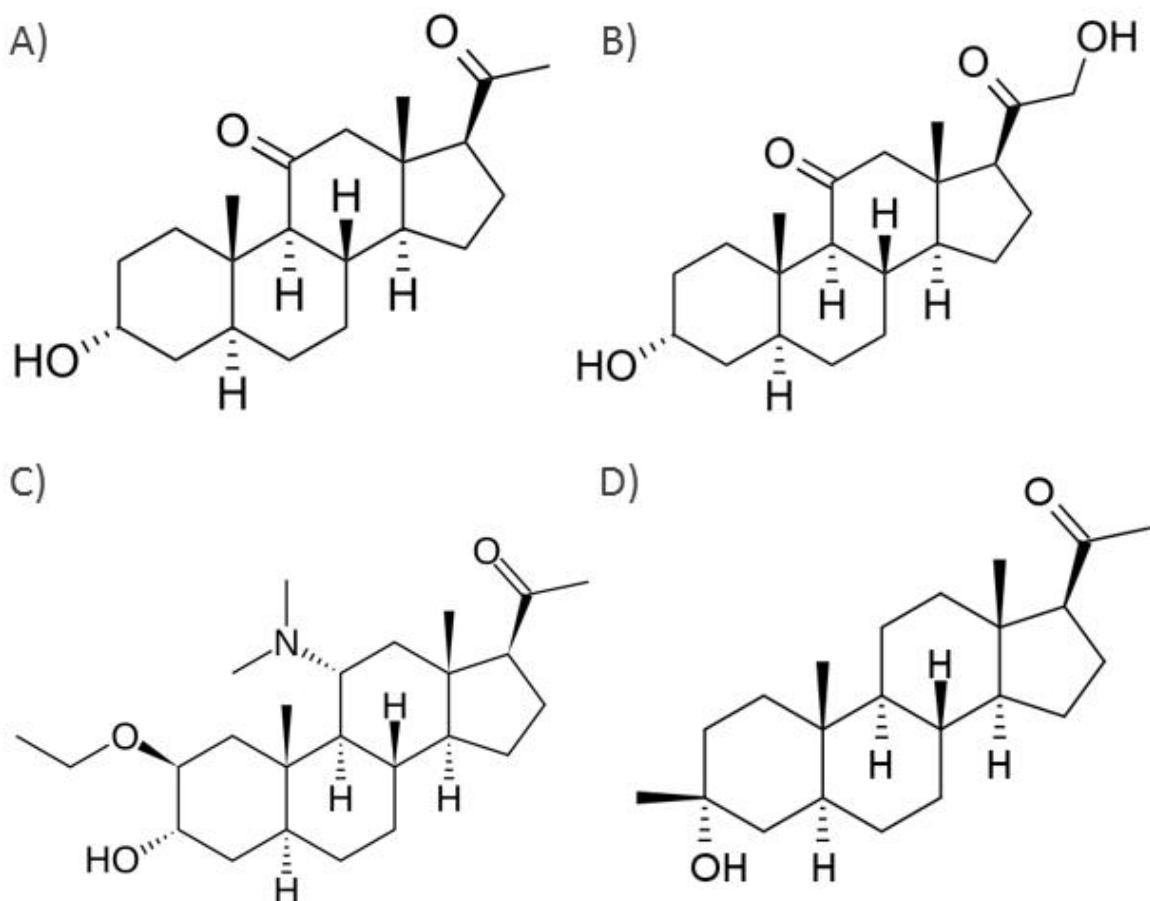
Zajímavou alternativou v léčbě mohou být také syntetické receptorové modulátory. Například selektivní estrogenové receptorové modulátory (SERMs) jako jsou tamoxifen, raloxifen, lasofoxifen či bazedoxifen byly při pokusech s experimentálními zvířaty prokázány jako vhodná neuroprotektivní agens proti některým neurodegenerativním poruchám (Ciriza et al., 2004; O'Neill et al., 2004). Avšak i přes mnoho slibných účinků neuroaktivních steroidů přináší přechod jednotlivých experimentů *in vitro* a pokusů na zvířatech do klinické praxe nejrůznější obtíže až znemožnění jejich aplikace.

Studie ovšem potvrzují, že neurosteroidy by mohly otevřít nové možnosti pro jejich terapeutické využití zvláště v oblasti neurologie. Některé z nich se dokonce ukázaly jako vhodnější farmaka při léčbě epilepsie, než jsou klasicky podávané benzodiazepiny (Reddy a Estes, 2016). Na rozdíl od benzodiazepinů, jejichž mechanismus potenciace $GABA_A$ receptorů spočívá pouze ve zvyšování frekvence otevírání chloridového kanálu, neurosteroidy dobu otevření kanálu prodlužují (Callachan et al., 1987). Navíc již dřívější studie ukázaly, že i po nepřetržitém užívání neurosteroidů nevzniká v organismu na jejich účinek tolerance, dají se tedy užívat i dlouhodobě (Monaghan et al., 1997).

Další možnou strategií léčby pomocí neuroaktivních steroidů by mohlo být zvýšení jejich syntézy navázáním ligandů na periferní benzodiazepinový receptor (PBR). Ten je přítomen na vnější mitochondriální membráně, kde kooperuje se

StaR a ovlivňuje tak steroidogenezi. Výzkumy ukázaly, že navázání ligandu na PBR významně zvyšuje syntézu neuroaktivních steroidů v nadledvinách, gonádách, placentě. Léčba látkami vázajícími se na PBR (například Ro5-4864) způsobuje zvýšenou steroidogenezi taktéž v buňkách gliových, což se projevuje protektivními účinky na buňky CNS a PNS (Leonelli et al., 2005; Veiga et al., 2005).

Vhodnější pro klinickou praxi, než jsou klasické endogenní neurosteroidy, se jeví jejich synteticky vytvořené analogy. Byly proto zkoumány neuroaktivní steroidy alphaxalon (5 α -pregnan-3 α -ol-11,20-dion), alphadolon (3 α ,21-dihydroxy-5 α -pregnan-11,20-dion), minaxolon (11 α -dimethylamino-2 β -ethoxy-3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-on) a ganaxolon (3 α -hydroxy-3 β -methyl-5 α -pregnan-20-on), Obr. 10. Tyto látky disponují výhodami jako je lepší biologická dostupnost, delší poločas rozpadu či mechanismus účinku nezahrnující působení na jaderné receptory, které by svou aktivací mohly vyvolat nepříznivé vedlejší hormonální reakce. Avšak zatímco alphaxalon je pro své anxiolytické účinky stále využívám ve veterinární medicíně, přípravek Althesin (směs alphaxalonu a alphadolonu) byl stáhnut z klinických studií kvůli vzácným, avšak závažným vedlejším účinkům (silné alergické reakce). Také minaxolon byl stažen z klinických testů z důvodu nedostatku důkazů u jeho prospěšných funkcích. Nejslibněji se jeví neuroaktivní steroid ganaxolon, který je v současné době testován v rámci několika klinických studií hodnotících jeho účinky na refrakterní epilepsii, infantilní spasmus, syndrom fragilního X a další onemocnění ovlivňující nervovou soustavu (Reddy a Estes, 2016), Obr. 10.



Obr. 10: Chemické struktury synteticky vytvořených neuroaktivních steroidů alfaxalon (5 α -pregnan-3 α -ol-11,20-dion; A), alphadolon (3 α ,21-dihydroxy-5 α -pregnane-11,20-dion; B), minaxolon (11 α -dimethylamino-2 β -ethoxy-3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-on; C) a ganaxolon (3 α -hydroxy-3 β -methyl-5 α -pregnan-20-on; D).

2.3 Analýza neurosteroidů

Objevení schopnosti neurosteroidů měnit aktivitu nervových buněk vedl k potřebě citlivých, selektivních a specifických metod, které by byly schopny změřit i jejich nízké koncentrace v nervové tkáni.

Mezi metody využívané pro detekci neurosteroidů patří metody imunologické zahrnující metody radioimunoanalýzy (RIA), chemiluminiscenční imunoanalýzu (CIA, *chemiluminescence immunoassay*) a enzymovou imunoanalýzu (EIA, *enzyme immunoassay*) (Wang a Griffiths, 2008). Ačkoliv tyto metody poskytovaly poměrně vysokou citlivost, z důvodu nedostatku jejich specifity začaly být využívány i metody hmotnostní spektrometrie (Wang et al., 2007).

2.3.1 Analýza neurosteroidů za pomoci radioimunoanalýzy

Díky své citlivosti bylo vyvinuto mnoho RIA metod pro kvantifikaci různých steroidních látek. Metoda RIA obzvláště v kombinaci s předchozí separací vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC, *high performance liquid chromatography*) výrazně zlepšuje specifičnost celé analýzy.

Nicméně ani využití separace v preanalytické fázi neposkytovalo při následné analýze konzistentní výsledky (Biggio a Purdy, 2001). Metody radioimunoanalýzy totiž vykazují některé zásadní nedostatky. Mezi ty patří vedlejší křížová reaktivita protilátek a omezení dynamického rozsahu, které mohou vést k nesprávným výsledkům analýzy. Bylo například zjištěno, že při analýze neurosteroidu 3 α 5 α -THP jeho protilátka křížově reaguje s několika dalšími analogy PROG (Purdy et al., 1990). Tato křížová reaktivita může být například nebezpečná při analýze hladin neurosteroidů těhotných žen, neboť v těhotenstvích dochází k výraznému zvýšení některých těchto látek, což by RIA nemusela správně vyhodotit. Také omezená linearita měření je pro takovéto analyty, které vykazují širokou škálu koncentrací, nevhodná (Pennel et al., 2015).

2.3.2 Analýza neurosteroidů hmotnostní spektrometrií

Steroidní látky jsou dnes nejčastěji analyzovány kapalinou chromatografií ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LC–MS, *liquid chromatography–mass spectrometry*) nebo plynovou chromatografií s hmotnostním spektrometrem (GC–MS, *gas chromatography–mass spectrometry*).

2.3.2.1 Plynová chromatografie–hmotnostní spektrometrie

Analýza GC–MS je stále, i navzdory časově náročné preanalytické fázi, hojně využívaná pro analýzu steroidních látek. Preanalytická fáze zahrnuje derivatizaci vzorku pro zvýšení tepelné stability a těkavosti látek. Zvláště vhodné se jeví použití GC pro separaci steroidních izomerů z důvodů vyšší rozlišovací schopnosti v porovnání s analýzou LC.

Pro stanovení steroidních látek se běžně používá elektronová ionizace (EI, *electron ionization*) (Kanceva et al., 2010). Při této ionizaci je zajištěna vysoká citlivost a reprodukovatelnost metody pro všechny typy sloučenin. Vysoké citlivosti lze také dosáhnout detekcí v módu monitorování vybraných iontů (SIM, *selected ion monitoring*), kde místo snímání celého rozsahu hodnot m/z je snímána pouze jedna či více specifických hodnot m/z . Navíc je možné k identifikaci látek využít rozsáhlých EI spektrálních knihoven (Halket et al., 2005). Na druhou stranu je tato ionizace energeticky náročná. Není vhodné měřit nestabilní deriváty steroidních látek, neboť by byly silně fragmentovány a nebylo by vytvořeno dostatečné množství prekurzorových iontů.

Avšak potřeba měřit velmi nízké koncentrace neurosteroidů v mozkové tkáni vedla k využití citlivější chemické ionizace (CI, *chemical ionization*). Ta je v poslední době úspěšně používána pro analýzu steroidních látek při analýze GC–MS (Zhang et al., 2012).

2.3.2.2 Kapalinová chromatografie–hmotnostní spektrometrie

Techniky LC–MS se pro analýzu neurosteroidů dostávají stále více do popředí. Jednou z výhod, které umožňuje tato analýza je stanovení i inaktivních neurosteroidů bez nutnosti derivatizace nebo hydrolýzy konjugátů (Ketola a Hakala, 2010).

Všechny běžné ionizační techniky za atmosférického tlaku jako jsou ionizace elektrosprejem (ESI, *electrospray ionization*), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI, *atmospheric pressure chemical ionization*) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI, *atmospheric pressure photoionization*) již byly úspěšně použity pro analýzu steroidních látek (Liu et al., 2003; f et al., 2008; Guo et al., 2004). Vzhledem k tomu že pro nepolární steroidní látky je ionizační účinnost ESI relativně nízká, je potřeba tyto látky často derivatizovat (například hydroxylaminem), aby v následné analýze bylo dosaženo dostatečné citlivosti. Na druhou stranu ESI umožňuje analýzu intaktních konjugátů, jako jsou glukuronidy a sulfáty. Ionizační techniky APCI a zejména APPI poskytují lepší ionizační účinnost než ESI pro nepolární steroidní látky. Této vysoké citlivosti lze dosáhnout bez nutnosti derivatizace vzorku (Keski-Hynnälä et al., 2002).

Pro získání vyšší citlivosti metody je vhodné použít kombinaci LC s nízkým průtokem s ionizací nanoelektrosprejem (nanoESI)–MS nebo desorpci laserem za přítomnosti matrice ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (MALDI–MS/MS, *matrix-assisted laser desorption/ionization–tandem mass spectrometry*) (Emmet a Caprioli, 1994).

3 PRAKTICKÁ ČÁST

3.1 Materiál a vybavení

3.1.1 Biologický materiál

Referenční matrice:

4% hovězí sérový albumin (4% BSA, bovine serum albumin) – Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)

Referenční mozkomíšní mok – Tocris Bioscience (Bristol, UK)

Referenční sérum – BioPanda Diagnostics (Newtownards, UK)

Matrice 4% BSA byla rozpuštěna v 10mM fosfátovém pufru, pH 7,4 (PBS). Na přípravu 1 l roztoku PBS bylo spotřebováno 3,9 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ a 0,87 g NaCl, které byly rozpuštěny v menším množství redestilované vody, pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 7,4 a objem doplněn do 1 l.

Vzorky pacientů:

Krevní sérum a mozkomíšní mok pacientů s diagnostikovanou roztroušenou sklerózou

Krevní sérum a mozkomíšní mok předpokládaných zdravých dárců (kontrola)

Vzorky sér pacientů Neurologické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc i kontroly byly získány odběrem venózní krve. Séra byla zcentrifugována při 3 000 rpm po dobu 5 minut při teplotě 4 °C a uloženy do ztmavených skleněných vialek uzavřených gumovými zátkami. Vzorky mozkomíšního moku pacientů Neurologické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc i kontroly byly získány lumbální punkcí a sbírány do polypropylenových vakuových zkumavek obalených do hliníkových fólií. Všechny vzorky byly uloženy v temnu při teplotě -70 °C.

3.1.2 Chemikálie

Methanol (MeOH) (> 99,9%) – Merck KGaA (Darmstadt, Germany)

Kyselina mravenčí (98%) – Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)

Acetonitril (ACN) – Merck KGaA (Darmstadt, Germany)

Standardy

Neznačené standardy (*NeuroSTs*) – Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany):

DHEA

Testosteron

Progesteron

Pregnenolon

Allopregnanolon

Progesteron

Stabilně izotopicky značené standardy (*IS-NeuroSTs*) – Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Tewksbury, USA):

[d_3]Testosteron

[$^{13}C_2$]Progesteron

[d_3]Pregnenolon

[d_4]Allopregnanolon

Zásobní roztoky standardů:

Směs šesti neznačených neurosteroidů (*6-NeuroSTs*)

Směs čtyř značených neurosteroidů (*4-IS-NeuroSTs*)

Směs *6-NeuroSTs* v koncentraci $1 \cdot 10^{-7}$ mol.l⁻¹ v MeOH byl vytvořen následovně: šest jednotlivých neznačených standardů neurosteroidů o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol.l⁻¹ bylo po 100 μ l (celkem 600 μ l) smícháno se 400 μ l chlazeného MeOH a byla tak vytvořena koncentrace mixu $1 \cdot 10^{-4}$ mol.l⁻¹. Desítkovým ředěním byly postupně vytvořeny zředěné roztoky až po cílovou koncentraci mixu $1 \cdot 10^{-7}$ mol.l⁻¹.

Směs *4-IS-NeuroSTs* v koncentraci $1 \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹ v MeOH byl vytvořen následovně: čtyři jednotlivé značené standardy neurosteroidů o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol.l⁻¹ byly po 100 μ l (celkem 400 μ l) smíchány se 600 μ l chlazeného MeOH a byla tak vytvořena koncentrace mixu $1 \cdot 10^{-5}$ mol.l⁻¹. Desítkovým zředěním byl dále vytvořen zředěný roztok s koncentrací mixu $1 \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹.

Činidla pro SPE:

Činidlo pro HybridSPE

1% Kyselina mravenčí v ACN

Činidlo pro STRATA-X

5% MeOH

Byl připraven zásobní roztok 1% kyseliny mravenčí o objemu 30 ml. K 306 μ l 98% kyselina mravenčí byla přidána redestilovaná voda do požadovaného objemu. Dále byl připraven zásobní roztok 5% MeOH o objemu 50 ml. K 2,5 ml MeOH byla přidána redestilovaná voda do požadovaného objemu.

Mobilní fáze pro UHPLC:

MeOH (A)

7,5mM kyselina mravenčí (B)

Pro přípravu 500 ml mobilní fáze B byla k 144 μ l 98% kyseliny mravenčí přidána redestilovaná voda do požadovaného objemu.

3.1.3 Pomůcky

Pipety – Eppendorf (Hamburg, Germany)

CoolBox™ 30 Systems – BioCision (San Rafael, USA)

Micro-Spin Filter, Nylon 0,2 μ m NY – Grace Davison Discovery Sciences (Deerfield, USA)

SPE kolony:

HybridSPE® Phospholipid Ultra 30 mg/1 ml – Supelco (St. Louis, USA)

STRATA™-X 33 μ m Polymeric Reversed Phase, 30 mg/1 ml – Phenomenex (Torrance, USA)

Laboratorní sklo: odměrné baňky, kádinky, zkumavky, skleněné vialky

3.1.4 Přístrojové vybavení a software

Milli-Q Simplicity 185 – Millipore Corp. (Billerica, USA)

Míchač Vortex Mixer WIZARD – VELP Scientifica (Usmate, Italy)

Rotátor Bio RS-24 – Unimed (Praha, ČR)

Centrifuga Avanti™ 30 – Beckman (Brea, USA)

Dusíková odparka TurboVap® LV – Caliper Life Sciences (Hopkinton, USA)

Ultrazvuková lázeň SONOREX SUPER RK 514 – Bandelin (Berlin, Germany)

Chromatografická kolona KINETEX® Biphenyl, 1,7 µm 100 x 2,1 mm – Phenomenex (Torrance, USA)

Systém UPHLC–MS/MS – Acquity™ Ultra Performance LC, Binary solvent manager, Sample manager – Waters (Milford, USA) s hmotnostním spektrometrem Xevo™ TQ-S – Waters MS Technologies (Manchester, UK)

TargetLynx™ program a MassLynx™ software – Waters (Milford, USA)

3.2 Použité metody

3.2.1 Experiment I – Optimalizace izolačního protokolu

Cílem Experimentu I. bylo nalezení vhodné purifikační metody pro UHPLC-MS/MS analýzu vybraných zástupců neurosteroidů. Pro purifikaci byla zvolena precipitace proteinů MeOH a následná filtrace na nylonové membráně Micro-Spin Filteru v kombinaci s metodami extrakce na pevné fázi pomocí kolon HybridSPE a Strata-X. Nejvhodnější purifikační protokol byl určen dle parametru návratnosti metody (*method recovery*). Návratnost je vypočtena v procentech jako poměr koncentrace naměřeného značeného standardu ke koncentraci přidaného značeného standardu vynásobený 100.

$$\text{Návratnost (\%)} = (\text{C}_{\text{lab naměřená}} / \text{C}_{\text{lab přidaná}}) \times 100$$

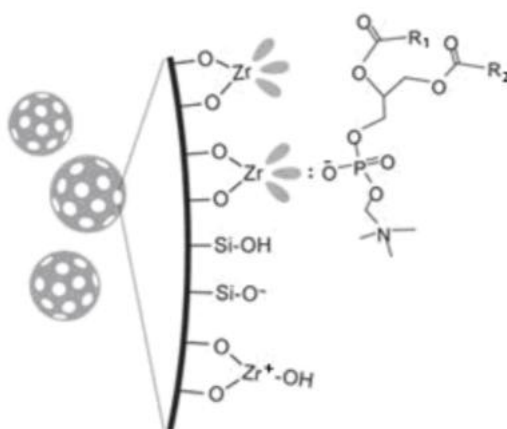
3.2.1.1 Precipitace proteinů

Příprava vzorků při přečištění za pomoci precipitace proteinů (PP) methanolem probíhala následovně: Každý vzorek obsahoval 100 µl biologické matrice, 20 µl směsi 4-IS-NeuroSTs v koncentraci 1.10^{-6} mol.l⁻¹, 30 µl směsi 6-NeuroSTs v koncentraci 1.10^{-7} mol.l⁻¹ a 350 µl chlazeného MeOH. Během všech kroků pipetování byly vzorky chlazeny v chladicím boxu CoolBox™. Vzorky byly poté opatrně promíchávány na míchači po dobu 1 minuty. Následně probíhala precipitace proteinů na rotátoru při teplotě -20 °C po dobu 60 minut. Poté byly

vzorky zcentrifugovány při 10 000 rpm při teplotě 4 °C po dobu 10 minut. Vzniklý supernatant byl přemístěn do zkumavek s Micro-Spin Filterem. Takto byl vzorek opět zcentrifugován při 10 000 rpm při teplotě 4 °C tentokrát po dobu 5 minut. Získaný supernatant byl odpařen do sucha pod proudem dusíku. Odpařené vzorky byly následně uchovávány při teplotě -20 °C do doby provedení UHPLC–MS/MS analýzy.

3.2.1.2 HybridSPE

Kolony HybridSPE využívají kombinaci PP se selektivní schopností extrakce na pevné fázi (SPE, *solid phase extraction*). Precipitace proteinů může sloužit buď k zjišťování fosfolipidové biologické matrice, nebo k odstranění fosfolipidů a proteinů z matričního vzorku a sloužit tak k purifikaci vzorku. Na koloně jsou mezi silikagelovými nosiči substituovány zirkoniové atomy, které díky svému prázdnému *d*-orbitalu mají vlastnosti elektronového akceptoru a tím taky afinitu k elektron-donorovým skupinám fosfolipidů (Sigma-Aldrich, 2017), Obr. 11.



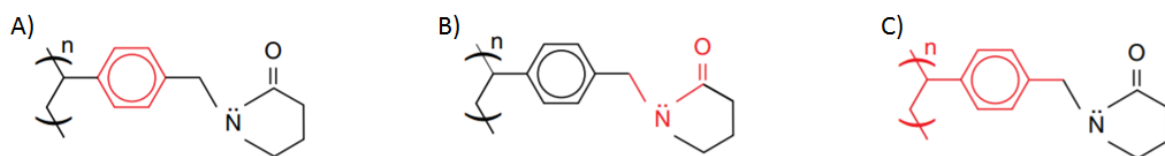
Obr. 11: Interakce HybridSPE zirkoniového sorbentu s fosfolipidovým vzorkem. Zirkoniový atom funguje jako Lewisova kyselina (elektronový akceptor), protože má prázdný *d*-orbital (upraveno podle Sigma-Aldrich., 2017).

Příprava vzorků pro purifikaci pomocí kolony HybridSPE probíhala následovně: každý vzorek obsahoval 100 μl matrice, 20 μl směsi 4-*IS-NeuroSTs* v koncentraci $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$, 30 μl směsi 6-*NeuroSTs* v koncentraci $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ a 350 μl 1% kyseliny mravenčí. Během všech kroků pipetování byly vzorky chlazeny v chladicím boxu CoolBoxTM. Vzorky byly poté opatrně promíchávány na

míchači po dobu 1 minuty. Dále vzorky zcentrifugovány při 10 000 rpm při teplotě 4 °C po dobu 10 minut. Získaný supernatant byl přemístěn na kolonu Hybrid SPE, která nevyžaduje počáteční kondicionaci. Po vytvoření vakua, vzorky velmi pomalu protekly kolonou a byly sbírány do připravených zkumavek. Obsah zkumavek byl dále odpařován do sucha pod proudem dusíku. Odpařené vzorky byly následně uchovávány při teplotě -20 °C do doby provedení UHPLC–MS/MS analýzy (Sigma-Aldrich, 2017)

3.2.1.3 Strata-X

Kolona Strata-X pracuje taktéž na principu reverzní fáze. Silný π - π retenční mechanismus dovoluje promytí s vysokým obsahem organického rozpouštědla (> 5%) bez poškození analytu, vodíkové vazby zvyšují retenci polárních sloučenin a hydrofobní interakce na povrchu účinně zadržují hydrofobní nečistoty (Phenomenex, 2017), Obr. 12.



Obr. 12: Mechanismy SPE kolony Strata-X, které umožňují jednotlivé části sorbentu – π - π retenční mechanismus (A), vodíkové vazby (B) a hydrofobní interakce (C) (upraveno podle Phenomenex, 2017)

Příprava vzorků pro purifikaci pomocí kolony Strata-X probíhala následovně: každý vzorek obsahoval 100 μ l matrice, 20 μ l směsi 4-IS-NeuroSTs v koncentraci $1 \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹, 30 μ l směsi 6-NeuroSTs v koncentraci $1 \cdot 10^{-7}$ mol.l⁻¹ a 350 μ l ACN. Během všech kroků pipetování byly vzorky chlazeny v chladicím boxu CoolBox™. Vzorky byly poté opatrně promíchávány na míchači po dobu 1 minuty. Poté byly vzorky zcentrifugovány při 10 000 rpm při teplotě 4 °C po dobu 10 minut. Získaný supernatant byl nanesen na kolonu Strata-X, která byla kondicionována 1 ml MeOH a dále pak ekvilibrována 1 ml redestilované vody. Poté bylo provedeno promytí kolony 5% MeOH a vzorek eluován 1 ml ACN do připravených zkumavek. Obsah zkumavek byl dále odpařován do sucha pod proudem dusíku. Odpařené vzorky byly následně uchovávány při teplotě -20 °C do doby provedení UHPLC–MS/MS analýzy.

3.2.1.4 Příprava vzorků před analýzou UHPLC–MS/MS

Před analýzou UHPLC–MS/MS bylo ke každému vzorku přidáno 100 μ l chlazeného MeOH. Během všech kroků pipetování byly vzorky chlazeny v chladicím boxu CoolBox™. Vzorky byly dále opatrně promíchány na míchači po dobu 1 minuty. Následně byly zkumavky se vzorky ponořeny do ultrazvukové lázně po dobu 3 minut. Sonifikované vzorky byly přeneseny do zkumavky s Micro-Spin Filterem a zcentrifugovány při 10 000 rpm po dobu 5 minut při teplotě 4 °C. Vzniklé supernatanty byly přeneseny do insertů a ztmavených skleněných vialek. Následná UHPLC–MS/MS analýza je popsána v následující kapitole 4.2.2.

3.2.2 Experiment II – UHPLC–MS/MS analýza

Cílem Experimentu II bylo nalezení UHPLC–MS/MS parametrů analýzy vybraných zástupců ze skupiny neurosteroidů. Pro UHPLC separaci neurosteroidů byla použita chromatografická kolona KINETEX® Biphenyl (1,7 μ m, 100 x 2,1 mm). Kolonu protékaly mobilní fáze: MeOH (A) a 7,5 mM kyselina mravenčí (B) v gradientovém průběhu. Čas jedné analýzy činil 13 minut při průtoku 0,5 ml/min. Gradientová eluce měla následující průběh: 0 min, 60:40 (A:B); 10 min, 75:25 (A:B); 10-11 min, 99:1 (A:B); 11-13 min, 60:40 (A:B). Před každým měřením byla kolona kondicionována na počáteční podmínky analýzy a dvakrát byl spuštěn gradient metody bez nástřiku vzorku. Vzorky byly uloženy v autosampleru při teplotě 4 °C, kolona byla vždy temperována na 40 °C. Nástřiky vzorků činily 2 μ l.

Detekce analytů probíhala pomocí tandemového hmotnostního spektrometru (trojitý kvadrupól) v pozitivním módu ESI(+) za použití následujících optimalizovaných podmínek: teplota zdroje 150 °C, desolvatační teplota 600 °C, průtok desolvatačního plynu (dusík) 1000 l/hod, napětí na kapiláře 2,5 kV, vstupní napětí 20-45 V, kolizní energie 13-30 eV. Pro jednotlivé neurosteroidy byl měřen nejintenzivnější kvantifikační přechod, dále přechod konfirmační a určen přechod příslušného interního standardu (Tab. 5). Za použití monitorování vybraných reakcí probíhala analýza jednotlivých analytů v režimu SRM (*selected reaction monitoring*). Pro každý neurosteroid byl také určen průměrný retenční čas (Tab. 5).

3.2.2.1 Kalibrace metody

Pro stanovení kalibračního rozsahu jednotlivých neurosteroidů bylo měřeno 11 kalibračních bodů vytvořených ze vzorků různých koncentrací značených a neznačených standardů. Nástřik na chromatografickou kolonu byl konstatně 2 μl . Kalibračních roztoky neznačených standardů pro stanovení DHEA, testosteronu, pregnenolonu a allopregnanolonu byly připraveny postupným ředěním v koncentraci od 0,4 fmol do 25 pmol, koncentrace stabilně izotopicky značených standardů byla 0,2 pmol. Kalibračních roztoků neznačených standardů pro stanovení progesteronu měly koncentraci od 0,01 fmol do 5 pmol, koncentrace [$^{13}\text{C}_2$]progesteronu byla od 0,01 pmol po 0,5 pmol.

Rozsah kalibrace pro jednotlivé neurosteroidy byl určen z lineárního průběhu získaného proložení kalibračních bodů. Pro každou kalibrační křivku byla určena rovnice přímky ve tvaru: $y = kx + q$, kde k je směrnice kalibrační křivky udávající směr přímky (jde o $\text{tg } \alpha$, kde α je úhel, který svírá přímka s kladnou poloosou x) a q udává posun po ose y . Koeficient spolehlivosti (R^2) udává hodnotu, jakým je rozptyl měřených hodnot závisle proměnné veličiny y vysvětlen změnami hodnot nezávisle proměnné veličiny x . Koeficient nabývá hodnot od 0 do 1, čím vyšší je hodnota, tím je měření kvalitnější.

Pro každý měřený neurosteroid byly také stanoveny mez detekce a mez stanovitelnosti. Mez detekce (LOD , *limit of detection*) odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. Je vypočtena jako trojnásobek směrodatné odchylky (s_D , *standard deviation*) nejnižší změřené koncentrace kalibrační křivky podělená směrnici přímky k . Mez stanovitelnosti (LOQ , *limit of quantification*) odpovídá koncentraci, při které je přesnost stanovení ještě dovolující kvantitativní vyhodnocení. Je vypočtena jako desetinasobek směrodatné odchylky nejnižší koncentrace kalibrační křivky podělená směrnici přímky k .

$$LOD = 3 \cdot (s_D/k)$$

$$LOQ = 10 \cdot (s_D/k)$$

3.2.2.2 Přesnost a správnost metody

Stanovení přesnosti a správnosti nově vyvinuté metody proběhlo za pomoci směsi značených a neznačených standardů přidané ke 100 μl matrice (viz Kapitola

4.2.1). Přesnost (*precision*) metody je definována jako údaj o míře těsnosti shody mezi vzájemně nezávislými výsledky. Přesnost metody je určena v % relativní směrodatné odchylky (RSD, *relative standard deviation*) naměřených výsledků. Správnost (*accuracy*) metody vyjádřená hodnotou % *bias* je definována jako těsnost shody získané hodnoty a hodnoty skutečné.

3.2.2.3 Pravidla pro porovnání validačních parametrů

Nejvíce obecně uznávanou autoritou pro validaci nových bioanalytických metod je ICH (*International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*). Vydanou směrnicí Q2 (R1) využívají jak farmaceutické, tak lékařské vědy. Další směrnice “*Guideline on Bioanalytical Method Validation*” je zavedena organizací EMA (*European Medicines Agency*). Směrnice “*Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation*” je zavedena organizací FDA (*U.S. Food and Drug Administration*). Jednotlivé metodiky se mezi sebou liší některými limity validačních parametrů či jejich označením (Nováková, 2013), Tab. 3.

Tab. 3: Srovnání validačních parametrů a limitů vyžadovaných organizacemi ICHS, FDA a EMA (upraveno podle Nováková, 2013).

Parametr	Počet koncentračních hladin x repetice				
	ICH	FDA	Limity FDA	EMA	Limity EMA
LOQ	LOQ	LLOQ, ULOQ	Správnost $\pm 20\%$, přesnost $n \leq 20\%$	LLOQ, ULOQ	Správnost $\pm 20\%$, přesnost $\leq 20\%$
LOD	LOD	X		X	
Linearita kalibrační křivky	5	6-8	Správnost $\pm 15\%$ při LLOQ 20 %	6	Správnost $\pm 15\%$ při LLOQ 20 %
Správnost metody (%)	3 x 3	3 x 5	$\pm 15\%$ při LLOQ $\pm 20\%$	4 x 5	$\pm 15\%$ při LLOQ $\pm 20\%$
Přesnost metody (% RSD)	3 x 3	3 x 5	$\leq 15\%$ při LLOQ $\leq 20\%$	4 x 5	$\leq 15\%$ při LLOQ $\leq 20\%$
Návratnost (%)	X	3	Přesné a stálé	X	

Parametr není vyžadován (X), nejnižší mez stanovitelnosti LLOQ (lower limit of quantification), nejvyšší mez stanovitelnosti ULOQ (upper limit of quantification).

3.2.3 Experiment III – Stanovení neurosteroidů v lidském krevním séru a mozkomíšním moku

Cílem Experimentu III bylo aplikovat nejvhodnější purifikační protokol a vyvinutou UHPLC–MS/MS analýzu na vzorky krevních sér a mozkomíšního moku pacientů Neurologické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc a určit jejich endogenní hladiny zkoumaných neurosteroidů.

Osmi lidem (4 ženy a 4 muži) bylo odebráno krevní sérum a mozkomíšní mok. Dvěma ženám a dvěma mužům bylo diagnostikováno onemocnění roztroušená skleróza. U zbylých pacientů bylo předpokládáno, že jsou zdraví dárci a dárkyně, byly proto použity jako kontrola.

Koncentrační hladiny vybraných zástupců ze skupiny neurosteroidů byly stanoveny pomocí metody izotopického zředování (Rittenberg a Foster, 1940). Získané výsledky jsou v dizkuzi dále porovnávány s dostupnou literaturou a s již dříve opublikovanými poznatky.

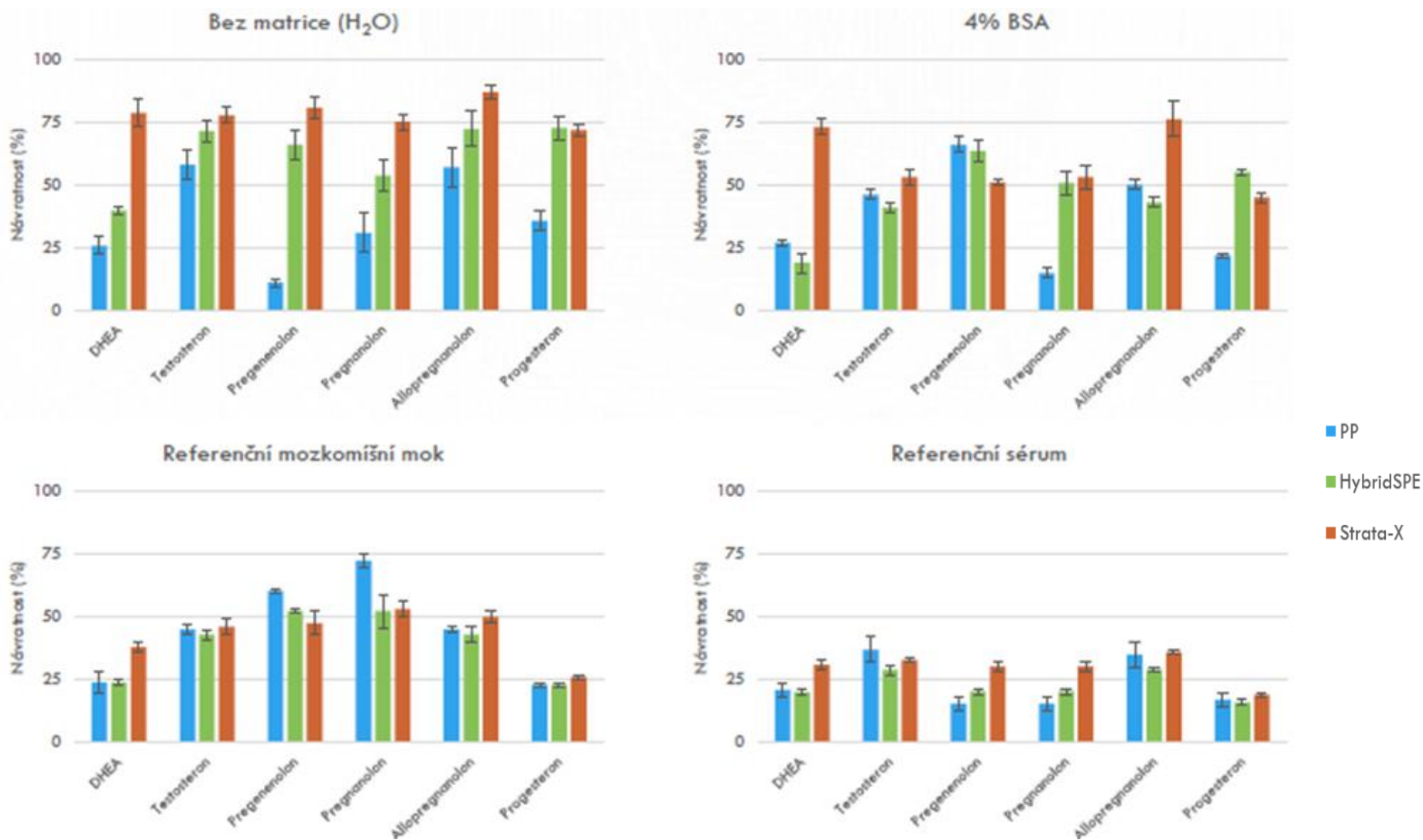
4 VÝSLEDKY

4.1 Optimalizace izolačního protokolu (Experiment I)

Analýza UHPLC–MS/MS využívá velmi citlivých a selektivních metod detekce pomocí režimu SRM. Z důvodů zvýšení robustnosti detekční metody bylo ale nezbytné zavést před analýzou vhodné izolační kroky pro odstranění interferujících látek. Správně zvolený purifikační krok v kombinaci s MS/MS detekcí umožňuje dosažení nejlepších detekčních limitů u nově vyvinutých bioanalytických metod (Nováková a Vlčková, 2009). Proto bylo provedeno porovnání návratnosti různých purifikačních metod pro stanovení jednotlivých steroidů u vzorků bez matrice (přidána pouze redestilovaná voda) a mezi jednotlivými referenčními matricemi zahrnující: 4% BSA, referenční mozkomíšni mok a referenční sérum (Obr. 13).

Nejvyšší průměrná celková návratnost vybraných neurosteroidů vypočtena pro všechny testované purifikační protokoly činila 59 ± 21 % a bylo jí podle očekávání dosaženo u analytů bez použití matrice (pouze H₂O). Průměrná celková návratnost při měření neurosteroidů ve zvolených matricích dosáhla 47 ± 17 % pro 4% BSA, 43 ± 14 % u referenčního mozkomíšního moku a 25 ± 7 % pro referenční sérum. Z výsledků lze vyvodit, že přidaná matrice negativně ovlivňuje konečné stanovení analytu. Navíc koncentrace interferujících látek (proteinů, fosfolipidů) v séru je mnohonásobně vyšší než jejich koncentrace v mozkomíšním moku či 4% BSA. Ve srovnání s dalšími matricemi je proto purifikace krevního séra mnohem náročnější, což potvrzují i výsledky pro jednotlivé neurosteroidy (Obr. 13).

Nejnižší průměrné celkové návratnosti při stanovení neurosteroidů ve všech testovaných matricích bylo dosaženo metodou PP (35 ± 18 %). Průměrná návratnost HybridSPE kolony byla vypočtena na 36 ± 15 %. Nejvyšší průměrné návratnosti bylo dosaženo při izolaci přes kolonu Strata-X (44 ± 15 %), byla tedy zvolena jako nejvhodnější pro izolaci vybraných neurosteroidů ze vzorků odebraných pacientům FN Olomouc. Nakonec byly pro kolonu Strata-X stanoveny návratnosti vybraných neurosteroidů u jednotlivých matric (i H₂O), Tab. 4.

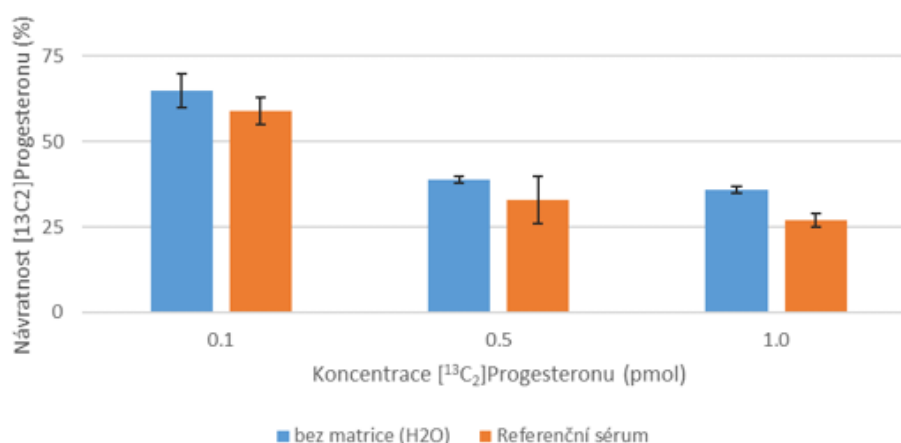


Obr. 13: Srovnání návratností (%) vybraných neurosteroidů v referenčních matricích (i H₂O) při použití PP a SPE kolon (HybridSPE a Strata-X); n=3, chybové úsečky odpovídají s_D.

Tab 4: návratnost (%) stanovení vybraných neurosteroidů v referenčních maticích (i H₂O) po provedení jejich izolace na koloně Strata-X. Celková návratnost udává průměrnou hodnotu návratnosti zkoumaných neurosteroidů pro jednotlivé referenční matrice (i H₂O); n=3, průměr ± S_D.

Matrice	Návratnost (%)						Celková návratnost (%)
	DHEA	Testosteron	Pregnenolon	Pregnanolon	Allopregnanolon	Progesteron	
Bez matrice (H ₂ O)	79 ± 5	78 ± 3	81 ± 4	75 ± 3	87 ± 3	72 ± 2	78 ± 5
4% BSA	73 ± 3	53 ± 3	51 ± 1	53 ± 5	76 ± 7	45 ± 2	59 ± 12
Referenční mozkomíšní mo	38 ± 2	46 ± 3	47 ± 5	53 ± 3	50 ± 2	26 ± 1	43 ± 9
Referenční sérum	31 ± 2	33 ± 5	30 ± 2	30 ± 2	36 ± 1	19 ± 1	30 ± 5

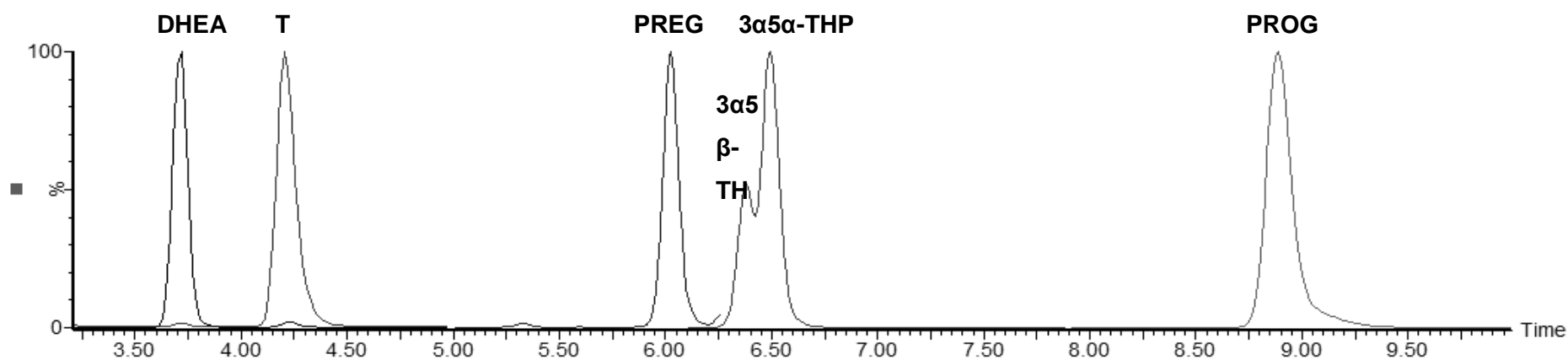
Dále byla testována kapacita zvolené izolační metody (SPE kolony Strata-X) při aplikaci různých koncentračních hladin standardů vybraných neurosteroidů přidaných do krevního séra. Pro příklad je vybrán progesteron, který v předcházejících experimentech vykazoval nejvyšší návratnosti (Obr. 13, Tab. 4). Výsledky ukázaly (Obr. 14), že vzrůstající koncentrace přidaného standardu ($[^{13}\text{C}_2]$ progesteronu) má negativní vliv na jeho návratnost a to jak u vzorků bez použití matrice (H_2O), tak i v referenčním séru. S největší pravděpodobností jde o nedostatečnou kapacitu zvoleného množství SPE sorbentu (30mg). Možným finančně nákladnějším řešením je použití větších Strata-X kolon (60mg/1ml nebo 100mg/3ml), popřípadě vývoji jiných selektivnějších izolačních technik (např. imunoafinitní chromatografie).



Obr. 14: Test kapacity purifikační metody (SPE kolony Strata-X). Koncentrační závislost vlivu značeného standardu $[^{13}\text{C}_2]$ progesteronu v referenční matrici (i H_2O) na jeho návratnost (%); $n=3$, chybové úsečky odpovídají s_D .

4.2 UHPLC–MS/MS analýza (Experiment II)

Vybrané neurosteroidy byly detekovány pomocí hmotnostní spektrometrie v pozitivním módu za použití elektrospreje ve formě iontů $[\text{M}+\text{H}^+]$. K UHPLC separaci byly využity mobilní fáze MeOH a 7,5 mM kyselina mravenčí. Pro jednotlivé analyty separované na KINETEX[®] Biphenyl koloně byly nalezeny optimální chromatografické podmínky, při kterých se kromě izomerů pregnanalonu a allopregnanolonu plně separovaly všechny látky (Obr. 15). Retenční časy měřených neurosteroidů se pohybovaly od 3,7 – 8,9 min a vykazovaly vysokou stabilitu v průměru 0,24 % RSD (Tab. 5).



Obr. 15: Chromatografická separace studovaných metabolitů stanovených metodou UHPLC–MS/MS.

Tab. 5: Optimalizované podmínky UHPLC–MS/MS analýzy pro vybrané neurosteroidy ($n=10$, průměr \pm s_D).

Neurosteroid	Kvantifikační přechod (m/z)	Konfirmační přechod (m/z)	Vstupní napětí (V)	Kolizní energie (eV)	Interní standard	SRM přechod (m/z)	Retenční čas (min)	RSD (%)
DHEA	271 > 253	271 > 213	25	13 / 16	[d_3]Testosteron	292 > 109	3,658 \pm 0,009	0,25
Testosteron (T)	208 > 109	292 > 97	25	22 / 19			4,171 \pm 0,017	0,41
Pregnenolon (PREG)	317 > 159	317 > 81	25	19 / 18	[d_3]Pregnenolon	320 > 162	6,060 \pm 0,006	0,10
Pregnanolon (3α5β-THP)	283 > 81	283 > 95	45	30 / 25	[d_4]Allopregnanolon	287 > 81	6,354 \pm 0,012	0,34
Allopregnanolon (3α5α-THP)	301 > 81	301 > 95	45	30 / 25			6,503 \pm 0,008	0,12
Progesteron (PROG)	315 > 109	301 > 97	25	22 / 19	[$^{13}C_2$]Progesteron	317 > 111	8,866 \pm 0,017	0,19

Pro stanovení jednotlivých neurosteroidů pomocí UHPLC–MS/MS byly nalezeny optimální podmínky, viz Tab. 5. Pro každý měřený neurosteroid byl určen kvantifikační a konfirmační SRM přechod. Taktéž byly určeny SRM přechody všech značených standardů, které byly použity při přesné kvantifikaci metodou izotopického zředování. Neurosteroidy testosteron, pregnenolon, allopregnanolon a progesteron byly měřeny proti příslušným značeným standardům. Neurosteroid DHEA byl kvantifikován proti [d_3]testosteronu, pregnanolon proti [d_4]allopregnanolonu (Tab. 5).

4.2.1 Kalibrace metody

Kalibrace pro jednotlivé neurosteroidy byla určena z 11 bodů kalibrační křivky získané z kalibračních roztoků neznačených a značených standardů. Rozsah kalibračních roztoků činil od 0,4 fmol po 25 pmol, koncentrace značených standardů byla 0,2 pmol pro stanovení DHEA, testosteronu, pregnenolonu a allopregnanolonu. Rozsah kalibračních roztoků pro stanovení progesteronu byl od 0,01 fmol do 5 pmol s koncentrací [$^{13}C_2$]progesteronu v rozmezí 10 fmol a 0,5 pmol.

Kalibrační křivka byla měřena vždy ve dvou opakováních. Pro každý neurosteroid by stanoven rozsah lineární kalibrace, mez detekce a stanovitelnosti (LOD , LOQ), Tab. 6. Dále byly stanoveny parametry regresní přímky (k a q) a koeficient spolehlivosti (R^2). Průměrný koeficient spolehlivosti se pohyboval velmi vysoko (0,9996).

Tab. 6: Rozsah kalibrace, mez detekce a stanovitelnosti (LOD , LOQ), parametry regresní přímky (k a q) a koeficient spolehlivosti (R^2) pro vybrané neurosteroidy

Neurosteroid	Rozsah kalibrace (pmol)	LOD (fmol)	LOQ (fmol)	k	q	R^2
DHEA	0.005 - 1	0,57	1,90	1,0014	1,6237	0,9996
Testosteron	0.005 - 1	1,55	5,18	0,9743	2,4440	0,9997
Pregnenolon	0.04 - 10	4,61	15,37	0,9856	0,1579	0,9996
Pregnanolon	0.05 - 25	2,71	9,03	0,9524	0,5136	0,9997
Allopregnanolon	0.0004 - 4	5,72	19,05	0,9711	6,1349	0,9993
Progesteron	0.0005 - 5	0,15	0,50	1,0008	0,2380	0,9996

4.2.2 Přesnost a správnost metody

Přesnost a správnost metody byla určena pro analýzu neurosteroidů s vybranou purifikační metodou Strata-X a pro porovnání i s precipitací proteinů (PP), Tab. 7. Do každého vzorku byly přidány 3 pmol značeného standardu, jehož koncentrace byla při analýze stanovena (stanovené přidané množství). Přesnost a správnost metody byla také porovnávána bez matrice (jen H₂O) a mezi jednotlivými referenčními matricemi (4% BSA, referenční mozkomíšní mok a referenční sérum).

Průměrné hodnoty přesnosti (% RSD) pro jednotlivé matrice vyšly při izolaci na koloně Strata-X lépe než při PP. Průměrná přesnost při purifikaci Strata-X činila: 7,5 % bez matrice (H₂O), 5,5 % RSD v matrici 4% BSA, 0,5 % v referenčním mozkomíšním moku a 1,4 % v referenčním séru. Průměrná přesnost (% RSD) při PP dosáhla hodnot: 11,4 % RSD bez matrice (H₂O), 9,9 % RSD v matrici 4% BSA, 6,5 % RSD v referenčním mozkomíšním moku a 7,4 % RSD v referenčním séru. Metoda purifikace na koloně Strata-X byla zhodnocena jako přesnější metoda oproti jednoduchému přesrážení PP.

Průměrná správnost metody (% bias) při purifikaci na koloně Strata-X činila: -1,8 % bias bez matrice (H₂O), -13 % bias v matrici 4% BSA, 4,7 % bias v referenčním mozkomíšním moku a -3,7 % bias v referenčním séru. Průměrná správnost (%bias) pro PP dosáhla hodnot: -29 % bias bez matrice (H₂O), -4,0 % bias v matrici 4% BSA, -8,8 % bias v referenčním mozkomíšním moku a -35 % bias v referenčním séru. Průměrné hodnoty správnosti ve stanovení bez matrice (H₂O), referenčním moku a referenčním likvoru vyšly lépe pro stanovení s předchozí purifikací na koloně Strata-X. Průměrná správnost v 4% BSA naopak při použití PP. Avšak tato průměrná hodnota vykazuje vyšší rozdíl krajních hodnot (rozdíl 81 % bias), než odlehlost hodnot dosažených při purifikaci Strata-X (rozdíl 46 % bias).

4.2.3 Porovnání validačních parametrů

Limity přesnosti FDA i EMA (≤ 15 % při LLOQ ≤ 20 %) byly při purifikaci kolonou Strata-X dodrženy. Avšak většina limitů správnosti FDA i EMA (± 15 % při LLOQ ± 20 %) i při této metodě purifikace byla překročena. Těchto limitů nebylo dosaženo pravděpodobně z následujících důvodů: (i) nebyly použity značené

standards pro všechny stanovované neurosteroidy, neurosteroid DHEA byl detekován proti d_3]Testosteronu, pregnanolon proti $[d_4]$ Allopregnanolonu; (ii) u neurosteroidů pregnenenolonu a allopregnanolonu neproběhla na koloně úplná separace (Obr. 15), jejich vyhodnocení bylo tedy značně obtížné; (iii) z důvodů nedostatečného izotopického značení (pouze dva atomy ^{13}C) byl interní standard progesteronu použit v jiné koncentrační hladině než by bylo optimální pro odečtení finální koncentrace v lineární oblasti jeho kalibrační křivky.

Tab. 7: Přesnost (% RSD) a správnost (%bias) metod v jednotlivých referenčních matricích (i H₂O) pro vybrané neurosteroidy v porovnání purifikačních metod Strata-X a PP.

Neurosteroid	Strata-X			PP		
	Stanovené přidané množství	Přesnost metody (% RSD)	Správnost metody (% bias)	Stanovené přidané množství	Přesnost metody (% RSD)	Správnost metody (% bias)
	3 pmol			3 pmol		
<i>bez matrice (H₂O)</i>						
DHEA	3,50 ± 0,18	5,0	17	0,85 ± 0,25	29,8	-72
Testosteron	3,38 ± 0,06	1,9	13	1,88 ± 0,38	20,4	-37
Pregnenolon	3,24 ± 0,24	7,4	8	3,75 ± 0,07	1,7	25
Pregnanolon	3,20 ± 0,17	5,3	7	1,68 ± 0,15	9,2	-44
Allopregnanolon	2,41 ± 0,29	11,8	-20	2,61 ± 0,12	4,5	-13
Progesteron	1,92 ± 0,26	13,4	-36	2,01 ± 0,06	3,1	-33
<i>4% BSA</i>						
DHEA	2,79 ± 0,16	5,6	-7	2,11 ± 0,89	42,1	-30
Testosteron	2,20 ± 0,11	4,9	-23	3,22 ± 0,07	2,1	7
Pregnenolon	2,12 ± 0,02	0,8	-29	2,96 ± 0,11	3,5	-1
Pregnanolon	3,34 ± 0,32	9,6	11	2,57 ± 0,19	7,4	-14
Allopregnanolon	3,15 ± 0,17	5,3	5	4,53 ± 0,05	1,2	51
Progesteron	1,94 ± 0,13	6,9	-35	1,90 ± 0,06	3,1	-37
<i>Ref. mozkomíšní mok</i>						
DHEA	4,02 ± 0,12	2,89	34	3,18 ± 0,03	0,9	-6
Testosteron	3,70 ± 0,21	0,06	23	3,47 ± 0,14	3,9	16
Pregnenolon	3,36 ± 0,23	0,07	12	1,74 ± 0,36	20,5	-42
Pregnanolon	3,26 ± 0,44	0,14	9	3,87 ± 0,24	6,1	29
Allopregnanolon	2,42 ± 0,05	0,02	-19	2,50 ± 0,11	4,2	-17
Progesteron	2,07 ± 0,05	0,03	-31	2,00 ± 0,06	3,1	-33
<i>Referenční sérum</i>						
DHEA	4,02 ± 0,33	8,2	34	1,55 ± 0,12	7,7	-48
Testosteron	3,20 ± 0,46	0,14	15	2,07 ± 0,37	18,0	-31
Pregnenolon	3,41 ± 0,40	0,12	14	2,28 ± 0,05	2,2	-24
Pregnanolon	2,72 ± 0,26	0,10	-10	0,35 ± 0,01	2,9	-82
Allopregnanolon	2,04 ± 0,02	0,01	-32	3,04 ± 0,25	8,2	1
Progesteron	1,71 ± 0,08	0,04	-43	2,23 ± 0,12	5,2	-26

4.3 Stanovení neurosteroidů v lidském krevním séru a mozkomíšním moku (Experiment III)

V rámci Experimentu III byla vyvinutá metoda aplikována pro stanovení vybraných neurosteroidů z několika vzorků krevních sér a mozkomíšních moků pacientů s diagnostikovaným onemocněním rozrušená skleróza Neurologické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc a předpokládaných zdravých dárců (kontrola).

Pomocí SPE–UHPLC–MS/MS metody byly u těchto vzorků detekovány DHEA, testosteron z krevního séra a mozkomíšního moku, a progesteron pouze z krevního séra, Tab. 8. Koncentrační hladiny DHEA detekované z krevního séra kontrol (žen) byly výrazně vyšší (29-46 pmol/ml) než u pacientek s roztroušenou sklerózou (6-10 pmol/ml). Hladiny DHEA v krevním séru mužů (kontroly) se pohybovaly zhruba ve stejné hladině (5-6 pmol/ml), ovšem hladiny u pacientů s roztroušenou sklerózou zaujímaly výrazně vyšší rozptyl hodnot (2-12 pmol/ml). Naopak všechny koncentrační hladiny DHEA detekované z mozkomíšního moku zdravých žen i mužů se pohybovaly v podobných koncentracích (1-3 pmol/ml). Koncentrace DHEA u jedné z pacientek s roztroušenou sklerózou činila kolem 1 pmol/ml, u druhé z pacientek a mužských pacientů byla pod mezí stanovitelnosti (<LOD).

Naměřené hladiny testosteronu z krevního séra kontrol (žen) bylo výrazně nižší (1-2 pmol/ml) než kontrol (mužů) (9-25 pmol/ml). Také hladiny testosteronu z krevního séra pacientek s roztroušenou sklerózou bylo výrazně nižší (1 pmol/ml) než pacientů (6-30 pmol/ml). Naopak naměřená koncentrace testosteronu z mozkomíšního moku žen i mužů (kontroly) se pohybovaly v podobných hodnotách (0,09-0,4 pmol/ml). Detekované hladiny testosteronu z mozkomíšního moku pacientek s roztroušenou sklerózou byly nižší (0,07 pmol/ml) než u pacientů (0,2-0,5 pmol/ml).

Koncentrační hladiny progesteronu stanovené v krevním séru zdravých žen se výrazně lišily, což může souviset s různými fázemi menstruačního cyklu. Stejně tak jedna z pacientek s roztroušenou sklerózou vykazovala vyšší hodnotu progesteronu než druhá pacientka. Koncentrace progesteronu u všech mužů – kontrol i pacientů s roztroušenou sklerózou se pohybovaly kolem podobných hodnot

(1 pmol/ml). Hladiny progesteronu z mozkomíšního moku a dalších neurosteroidů pregnenolonu, pregnanolonu a allopregnanolonu byly pod mezí stanovitelnosti (<LOD).

Tab. 8: Koncentrace (pmol/ml) vybraných neurosteroidů v krevním séru a mozkomíšním moku předpokládaných zdravých dárců (kontrol) a pacientů s roztroušenou sklerózou.

<i>Onemocnění Pohlaví Pacient</i>			DHEA	Testosteron	Progesteron
			pmol/ml	pmol/ml	pmol/ml
<i>Krevní sérum</i>					
Kontrola	Ženy	P1	46,43 ± 5,33	1,34 ± 0,16	10,64 ± 1,07
		P2	28,70 ± 3,95	1,64 ± 0,12	1,59 ± 0,48
	Muži	P3	5,45 ± 0,45	8,55 ± 0,47	1,00 ± 0,25
		P4	5,62 ± 0,99	25,0 ± 1,43	1,14 ± 0,14
Roztroušená skleróza	Ženy	P5	10,23 ± 2,03	0,70 ± 0,08	29,22 ± 1,30
		P6	6,33 ± 0,64	0,58 ± 0,033	5,75 ± 0,17
	Muži	P7	1,98 ± 0,069	6,38 ± 0,88	1,00 ± 0,29
		P8	11,81 ± 1,64	30,4 ± 6,47	1,09 ± 0,53
<i>Mozkomíšní mok</i>					
Kontrola	Ženy	P1	1,23 ± 0,72	0,090 ± 0,021	
		P2	2,90 ± 0,39	0,36 ± 0,031	
	Muži	P3	1,81 ± 0,30	0,24 ± 0,017	
		P4	1,53 ± 0,37	0,43 ± 0,066	
Roztroušená skleróza	Ženy	P5	1,15 ± 0,32	0,066 ± 0,007	
		P6	<LOD	0,067 ± 0,051	
	Muži	P7	<LOD	0,17 ± 0,016	
		P8	<LOD	0,49 ± 0,085	

5 DISKUZE

Předožená diplomová práce shnuje vývoj SPE–UHPLC–MSMS metodiky, která vedla k účinné izolaci vybraných neurosteroidů u vzorků krevního séra a mozkomíšního moku pacientů s diagnostikovanou roztroušenou sklerózou. Neurosteroidy, hrající roli v mnoha neurologických mechanismech jako jsou vývoj šedé a bílé hmoty mozkové či kognitivní procesy, tvoří tak zajímavou skupinu látek zkoumanou mnohými vědeckými studiemi (Pluchino et al., 2013).

Například Stackleton (2007) provedl rozsáhlé zkoumání hladin neurosteroidů z krevního séra mužů a žen s detekcí metodami hmotnostní spektrometrie. Tato studie zjistila, že koncentrační hladiny DHEA v lidském krevním séru dosahovaly 1,3-12,5 ng/ml (4,5-43,4 pmol/ml). Změřené koncentrace progesteronu v krvi dosahovaly hodnot 0,1-2,5 ng/ml (0,32-8,0 pmol/ml). Hladiny testosteronu byly při této studii vyhodnoceny zvlášť pro muže a ženy, kde koncentrace testosteronu v krvi žen činila 0,03-0,46 ng/ml (0,10-1,6 pmol/ml), u mužů pak 1,2-11,1 ng/ml (4,2-38,5 pmol/ml) (Shackleton, 2007). Tyto hodnoty se poměrně shodují i se stanovenými výsledky koncentračních hladin u předpokládaně zdravých dárců (kontrol). Ve zde předládaném experimentu však byly detekovány o něco vyšší hladina DHEA. Hladiny tohoto neurosteroidu se však mohou běžně zvýšit například během stresu (Dor et al., 2015; Fokidis, 2016). Plazmatická koncentrace neurosteroidu DHEA je fyziologicky vyšší u žen než u mužů. U mužů je naopak vyšší koncentrace testosteronu (Friess et al., 2000). S tímto se shodují i zde naměřené výsledky.

Studie, kterou provedli Kim et al. (2000), měřila hladiny neurosteroidů testosteronu v mužském krevním séru a mozkomíšním moku pomocí GC–MS. Průměrná koncentrace testosteronu v krvi mužů činila 2,7 ng/ml (9,4 pmol/ml), v mozkomíšním moku pak 0,2 ng/ml (0,69 pmol/ml) (Kim et al., 2000). Celkově nižší hladiny všech neurosteroidů mohou být způsobeny použitím jiné metody analýzy nebo jinými podmínkami odběru vzorků.

Neurosteroidy jsou také často zkoumány z důvodu jejich zapojení do řady neurodegenerativních onemocnění. Například při rozrušené skleróze se hladiny některých neurosteroidů v určitých částech mozku mohou významně měnit (Weill-Engerer et al., 2002). Studie provedená Caruso et al. (2014) porovnávala hladiny některých neurosteroidů v krevním séru a mozkomíšním moku mezi dospělými

muži trpícími relaps-remitentním stadiem rozroušené sklerózy a předpokládanými zdravými dárci (kontrolami). Hladiny neurosteroidů byly analyzovány LC–MS/MS technikou. Tato studie zjistila, že u v mozkomíšním moku pacientů trpících roztroušenou sklerózou dochází ke zvýšení hladin pregnenolonu a spojené s poklesem jeho metabolitu – progesteronu. V plazmě jsou oba tyto neurosteroidy zvýšené ve srovnání s kontrolami. Další výsledky ukázaly, že hladiny DHEA a testosteronu jsou v krevním séru i mozkomíšním moku pacientů s roztroušenou sklerózou i zdravých dárců stejné (Caruso et al., 2014). Podobné výsledky ve svém širokém koncentračním rozsahu DHEA a testosteronu mezi pacienty s roztroušenou sklerózou a kontrolami (muži) mohou potvrdit i zde předládané výsledky. Vysoké hladiny DHEA u žen (kontrol) mohly být způsobeny fyziologicky, například stresovou zátěží (Dor et al., 2015; Fokidis, 2016). Naměřené hladiny progesteronu v krevním séru pacientů (mužů) nevykazovaly zvýšení hodnot, tak jak je popsáno v literatuře. Avšak snižující se hladiny progesteronu u mužů souvisí také jejich vzrůstajícím věkem (Oettel a Mukhopadhyay, 2004). Je tedy možné, že pacienti (muži) s roztroušenou sklerózou byly vyššího věku než kontroly (muži).

Kanceva et al. (2015) se zaměřily na zkoumání hladin progesteronu v krevním séru žen trpících roztroušenou sklerózou. Tato studie dokázala, že hladiny progesteronu těchto žen dosahují vyšších hodnot než hladiny žen zdravých (Kancheva et al., 2015). To můžou potvrdit i naše výsledky. Tento neurosteroid je pro pacienty zatížené touto chorobou obzvláště důležitý, neboť napomáhá různými mechanismy zmírňovat záněty nervů a předcházet tak poškození organismu (Melcangi et al., 2016).

I když existuje mnoho důkazů o zapojení neurosteroidů do neurální a gliové diferenciace a myelinizace CNS, je zatím předeneseno jen málo důkazů o změně syntézy neurosteroidů při roztroušené skleróze (Lucheti et al., 2011; Schumacher et al., 2007). Vyvinutá metodika by mohla přispět k objasnění úlohy neurosteroidů při různých neurodegenerativních a psychiatrických onemocněních, k pochopení mechanismu jejich působení a vysvětlení jejich fyziologických účinků.

6 ZÁVĚR

V teoretické části mé diplomové práci jsem se zabývala neurosteroidy, popsala jsem jejich metabolismus, hlavní funkce, mechanismy účinku, fyziologické a patofyziologické účinky na organismus a metody jejich detekce.

Přesto, že jde o látky, které půdobí na nervovou tkáň, jejich hladiny lze detekovat i v jiných matricích. Bylo prokázáno, že hladiny neurosteroidů v mozkové tkáni korelují s jejich hladinami v mozkomíšním moku (Naylor et al., 2008). Neurosteroidy navíc díky své lipofilitě mohou volně procházet přes hematoencefalickou bariéru, a proto je jejich analýza možná i v jiných matricích, než je mozková tkáň a mozkomíšní mok. Kromě mozkomíšního moku jsou neurosteroidy také často analyzovány ze vzorků krevního séra (Kim et al., 2000).

V praktické části mé práce jsem vybrala nejvhodnější metodu pro izolaci vybraných neurosteroidů z biologických matric (mozkomíšního moku a krevního séra) využívající SPE kolonu Strata-X, které je vhodná pro izolaci steroidních látek i z rostlinných pletiv (Swaczynová et al., 2007). Dále jsem určila optimální podmínky včetně vhodného koncentračního rozsahu UHPLC–MS/MS metody pro vybrané neurosteroidy. Tuto analýzu jsem následně aplikovala na několik vzorků krevního séra a mozkomíšního moku pacientů trpících onemocněním rozrušená skleróza a předpokládaných zdravých dárců (kontoly).

Roztroušená skleróza je jedním z nejčastějších neurologických onemocnění. Toto neurodegenerativní autoimunitní onemocnění se projevuje jako zánětlivé a demyelinizační poškození CNS (Kanceva et al., 2015). Ve vzorcích kontrol jsem detekovala DHEA, testosteron v krevním séru i mozkomíšním moku a progesteron pak pouze v krevním séru. Koncentrační hladiny sérového DHEA byly výrazně vyšší u žen než u mužů. Koncentrace neurosteroidu testosteronu byla naopak vyšší v séru i mozkomíšním moku mužů. Hladina progesteronu v krevním séru byla opět vyšší u žen. Rozdílné koncentrační hladiny neurosteroidů způsobují různé fyziologické podmínky a o jejich výsledné koncentraci rozhodují nejrůznější faktory, jako jsou pohlaví, zdravotní stav, ale i aktuální míra stresu (Melcangi et al., 2016).

Dále jsem detekovala DHEA, testosteron v séru a mozkomíšním moku, progesteron pouze v séru pacientů s roztroušenou sklerózou. DHEA a testosteron se ve své široké koncentrační hladině významně nelišily. Zvýšení

koncentrační hladin DHEA u žen (kontrol) mohlo být způsobeno stresovou zátěží (Dor et al., 2015; Fokidis, 2016). Avšak ve vzorcích krevního séra pacientek se prokázalo zvýšení hodnot progesteronu. Předkládané výsledky ukazují, že sexuální rozdíly mohou způsobovat rozdíly ve výskytu, symptomatologii a povaze neurologických chorob. Tyto informace naznačují, že neuroaktivní steroidy mohou představovat kandidátní molekuly pro genderově orientovanou léčbu chorob nervového systému. (Melcangi et al., 2016).

Vyvinutá SPE–UHPLC–MS/MS metoda nedosahuje optimálních validačních hodnot a do budoucna si vyžádá další optimalizaci, např. použití nových izotopicky značených standardů. Také proměřený vzorek pacientů nebyl pro širší studium diskuzi dostatečný. Spolupráce Laboratoře růstových regulátorů a Neurologické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc v budoucnu umožní proměření širšího množství vzorků od pacientů s diagnostikovaným neurodegenerativními onemocněními. To by mělo vést k pochopení souvislostí mezi vybranými neurosteroidy a onemocněními ovlivňujícími nervovou soustavu.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- AGÍS-BALBOA, R. C., PINNA G., ZHUBI A. et al. (2006) Characterization of brain neurons that express enzymes mediating neurosteroid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **103**, 14602–14607.
- BARBACCIA, M. L., ROSCETTI G., TRABUCCHI M., et al. (1996) Time-Dependent Changes in Rat Brain Neuroactive Steroid Concentrations and GABAA Receptor Function after Acute Stress. *Neuroendocrinology* **63**(2), 166-172. DOI: 10.1159/000126953. ISSN 00283835.
- BARBACCIA, M. L., SERRA M., PURDY R. H., et al. (2001) Stress and neuroactive steroids. *International Review of Neurobiology* **46**, 243-272. DOI: 10.1016/S0074-7742(01)46065-X. ISSN 00747742.
- BAULIEU, E.-E. (1981) Steroid Hormone Regulation of the Brain, 3-14. DOI: 10.1016/B978-0-08-026864-4.50007-4. ISBN 9780080268644.
- BAULIEU, E.-E. (1998) Neurosteroids: a novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology* **23**(8), 963-987. ISSN 03064530.
- BELEBONI R. O., CAROLINO R. O., PIZZO A. B., et al. (2004) Pharmacological and biochemical aspects of GABAergic neurotransmission: pathological and neuropsychobiological relationships. *Cellular And Molecular Neurobiology* **24**(6), 707-728. ISSN 02724340.
- BELELLI, D. LAMBERT J. (2005) Neurosteroids: endogenous regulators of the GABAA receptor. *Nature Reviews Neuroscience* **6**(7) 565-575. DOI: 10.1038/nrn1703. ISSN 1471003X.
- BICIKOVA M., DIBBELT L., HILL M., et al. (1998) Allopregnanolone in women with premenstrual syndrome. *Hormone And Metabolic Research = Hormon – Und Stoffwechselforschung = Hormones Et Metabolisme* **30**(4) 227-230. ISSN 00185043.
- BIGGIO, G. PURDY R. (2001) Neurosteroids and brain function. San Diego: Academic Press. ISBN 9780123668462.
- BJÖRKHEM, I., LÖVGREN-SANDBLOM A., LEONI V., et al. (2013) Oxysterols and Parkinson's disease: Evidence that levels of 24S-hydroxycholesterol in cerebrospinal fluid correlates with the duration of the disease. *Neuroscience Letters* **555**, 102-105. DOI: 10.1016/j.neulet.2013.09.003. ISSN 03043940.
- CALLACHAN H., COTTRELL G. A., HATHER N. Y., et al. (1987) Modulation of the GABAA receptor by progesterone metabolites. *Proceedings Of The Royal Society Of London. Series B, Biological Sciences* **231**(1264), 359-369. ISSN 09501193.

- CARL P., HØGSKILDE S., LANG-JENSEN T., et al. (1994) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of eltanolone (pregnanolone), a new steroid intravenous anaesthetic, in humans. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* **38**(7), 734-741. ISSN 00015172.
- CARUSO D., MELIS M., FENU G., et al. (2014) Neuroactive steroid levels in plasma and cerebrospinal fluid of male multiple sclerosis patients. *Journal Of Neurochemistry* **130**(4), 591-607. DOI: 10.1111/jnc.12745. ISSN 14714159.
- CARUSO, A., GEREVINI V. D. G., CASTIGLIONE M., et al. (2004) Testosterone amplifies excitotoxic damage of cultured oligodendrocytes. *Journal of Neurochemistry* **88**(5) 1179-1185. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2004.02284.x. ISSN 00223042.
- CARUSO, D., SCURATI S., MASCHI O., et al. (2008) Evaluation of neuroactive steroid levels by liquid chromatography–tandem mass spectrometry in central and peripheral nervous system: Effect of diabetes. *Neurochemistry International* **52**(4), 560-568. DOI: 10.1016/j.neuint.2007.06.004. ISSN 01970186.
- CIRIZA I., CARRERO P., AZCOITIA I., et al. (2004) Selective estrogen receptor modulators protect hippocampal neurons from kainic acid excitotoxicity: differences with the effect of estradiol. *Journal Of Neurobiology* **61**(2), 209-221. ISSN 00223034.
- COMPAGNONE N. A., BULFONE A, RUBENSTEIN J. L. et al. (1995) Steroidogenic enzyme P450c17 is expressed in the embryonic central nervous system. *Endocrinology* **136**(11), 5212-5223. ISSN 00137227.
- COMPAGNONE, N. A., MELLON S. H. (2000) Regular Article: Neurosteroids. *Frontiers in Neuroendocrinology* **21**(1), 1-56. DOI: 10.1006/frne.1999.0188. ISSN 00913022.
- CORPÉCHOT C., SYNGUELAKIS M., TALHA S. et al. (1983) Pregnenolone and its sulfate ester in the rat brain. *Brain Research* **270**, 119–125. ISSN 00068993.
- CORPÉCHOT, C., ROBEL P., AXELSON M., et al. (1981) Characterization and Measurement of Dehydroepiandrosterone Sulfate in Rat Brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**(8), 4704-4707. ISSN 00278424.
- CULL-CANDY S., BRICKLEY S., FARRANT M. (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Current Opinion In Neurobiology* **11**(3), 327-335. ISSN 09594388.
- DAZZI L., SANNA A., CAGETTI E., et al. (1996) Inhibition by the neurosteroid allopregnanolone of basal and stress-induced acetylcholine release in the brain of freely moving rats. *Brain Research* **710**(1-2), 275-280. ISSN 00068993.
- DEVAUD L. L., PURDY R. H., FINN D. A., et al. (1996) Sensitization of gamma-aminobutyric acidA receptors to neuroactive steroids in rats during ethanol

- withdrawal. *Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics* **278**(2), 510-517. ISSN 00223565.
- DIETSCHY J. M., TURLEY S. D. (2004) Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *Journal Of Lipid Research* **45**(8), 1375-1397. ISSN 00222275.
- DINGLEDINE R., BORGES K., BOWIE D., et al. (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological Reviews* **51**(1), 7-61. ISSN 00316997.
- DO REGO J. L., SEONG J. Y., BUREL D., et al. (2009) Neurosteroid biosynthesis, enzymatic pathways and neuroendocrine regulation by neurotransmitters and neuropeptides. *Frontiers in Neuroendocrinology* **30**, 259–301.
- DOR, R., MARX C., SHAMPINE L., et al. (2015) DHEA metabolism to the neurosteroid androsterone: a possible mechanism of DHEA's antidepressant action. *Psychopharmacology* **232**(18), 3375-3383. DOI: 10.1007/s00213-015-3991-1. ISSN 00333158.
- DUDAS B., HANIN I., ROSE M., et al. (2004) Protection against inflammatory neurodegeneration and glial cell death by 7beta-hydroxy epiandrosterone, a novel neurosteroid. *Neurobiology Of Disease* **15**(2), 262-268. ISSN 09699961.
- EMMETT, M. R., CAPRIOLI R. M. (1994) Micro-electrospray mass spectrometry: ultra-high-sensitivity analysis of peptides and proteins. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **5**(7), 605-613. DOI: 10.1016/1044-0305(94)85001-1. ISSN 10440305.
- ESER D., BAGHAI T. C., SCHÜLE C., et al. (2008) Neuroactive steroids as endogenous modulators of anxiety. *Current Pharmaceutical Design* **14**(33), 3525-3233. ISSN 18734286.
- FIGUEIREDO, C. A., GARCES L. C. (2012) Steroids: Biosynthesis, Functions and Health Implications. ISBN 9781620812778.
- FOKIDIS, H. B. (2016) Sources of variation in plasma corticosterone and dehydroepiandrosterone in the male northern cardinal (*Cardinalis cardinalis*): I. Seasonal patterns and effects of stress and adrenocorticotrophic hormone. *General and Comparative Endocrinology* **235**, 192-200. DOI: 10.1016/j.ygcen.2016.05.024. ISSN 00166480.
- FONTAINE-LENOIR, V., CHAMBRAUD B., FELLOUS A., et al. (2006) Microtubule-Associated Protein 2 (MAP2) Is a Neurosteroid Receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(12), 4711. ISSN 00278424.
- FRIESS, E., SCHIFFELHOLZ T., STECKLER T. et al. (2000) Dehydroepiandrosterone – a neurosteroid. *European Journal of Clinical Investigation* **30**, 46-50. ISSN 00142972.

- GASIOR, M., CARTER R. B., WITKIN J. M. (1999) Review: Neuroactive steroids. *Trends in Pharmacological Sciences* **20**(3), 107-112. DOI: 10.1016/S0165-6147(99)01318-8. ISSN 01656147.
- GIATTI, S., ROMANO S., PESARESI M, et al. (2015) Neuroactive steroids and the peripheral nervous system: An update. *Steroids* **103**, 23-30. DOI: 10.1016/j.steroids.2015.03.014. ISSN 0039128X.
- GIRDLER, S. S., STRANEVA P. A., LIGHT K. C., et al. (2001) Original article: Allopregnanolone levels and reactivity to mental stress in premenstrual dysphoric disorder. *Biological Psychiatry* **49**(9), 788-797. DOI: 10.1016/S0006-3223(00)01044-1. ISSN 00063223.
- GOLDSTEIN J. L., DEBOSE-BOYD R. A. a BROWN M. S. (2006) Protein sensors for membrane sterols. *Cell* **124**(1), 35-46. ISSN 00928674.
- GRIFFITHS W. J., ABDEL-KHALIK J., CRICK P. J. et al. (2016) New methods for analysis of oxysterols and related compounds by LC-MS. *Journal Of Steroid Biochemistry And Molecular Biology* **162**, 4-26. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2015.11.017. ISSN 18791220.
- GRIFFITHS, W, J., WANG Y., ALVELIUS G., et al. (2006) Article: Analysis of Oxysterols by Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **17**(3), 341-362. DOI: 10.1016/j.jasms.2005.10.012. ISSN 10440305.
- GUO, T., CHAN M., SOLDIN S. J. (2004) Steroid Profiles Using Liquid Chromatography--Tandem Mass Spectrometry With Atmospheric Pressure Photoionization Source. *Archives of Pathology* **128**(4), 469-475. ISSN 00039985.
- HALKET, J. M., WATERMAN D., PRZYBOROWSKA A. M., et al. (2005) Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. *Journal of Experimental Botany* **56**(410), 219. ISSN 00220957.
- HAMPL R., HILL M., STÁRKA L. (2003) DHEA metabolites during the life span. *DHEA and the Brain*, Taylor & Francis, London and New York.
- HARRISON N. L. a SIMMONDS M. A. (1984) Modulation of the GABA receptor complex by a steroid anaesthetic. *Brain Research* **323**(2), 287-292. ISSN 00068993.
- HARVEY, R. A., FERRIER D. R. (2011) Biochemistry. 5th ed. Philadelphia, Pa.: *Wolters Kluwer*, 520 s. ISBN 978-1-60913-998-8.
- HENRY, H. L., NORMAN A. W. (2003) Encyclopedia of hormones. VOL. 3, N-Z a INDEX. Amsterdam: *Academic*. ISBN 0123411068.
- HEVERIN M., BOGDANOVIC N., LÜTJOHANN D., et al. (2004) Changes in the levels of cerebral and extracerebral sterols in the brain of patients with Alzheimer's disease. *Journal Of Lipid Research* **45**(1), 186-193. ISSN 00222275.

- HOGERVORST E. (2012) Prevention of dementia with sex hormones: a focus on testosterone and cognition in women, *Minerva Medica* **103**(5), 353-359. ISSN 00264806.
- HOJO, Y. HATTORI ENAMI T., et al. (2004) Adult Male Rat Hippocampus Synthesizes Estradiol from Pregnenolone by Cytochromes P45017 α and P450 Aromatase Localized in Neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(3), 865-870. ISSN 00278424.
- HOLLMANN M., HEINEMANN S. (1994) Cloned glutamate receptors. *Annual Review Of Neuroscience* **17**, 31-108. ISSN 0147006X.
- HORAK, M., VLCEK K., CHODOUNSKA H. et al. (2006) Subtype-dependence of N-methyl-d-aspartate receptor modulation by pregnenolone sulfate. *Neuroscience* **137**(1), 93-102. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2005.08.058. ISSN 03064522.
- HORTON J. D., GOLDSTEIN J. L., BROWN M. S. (2002) SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *Journal Of Clinical Investigation* **109**(9), 1125-1131. ISSN 00219738.
- HU, Z. Y., BOURREAU E., JUNG-TESTAS I. et al. (1987). Neurosteroids: oligodendrocyte mitochondria convert cholesterol to pregnenolone. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**(23), 8215–8219. ISSN 00278424.
- ISAACSON, R. L., VARNER J. A., BAARS J. M., et al. (1995) The effects of pregnenolone sulfate and ethylestrenol on retention of a passive avoidance task. *Brain Research* **689**(1), 79-84. ISSN 00068993.
- IUPAC, (1989) Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry (CNOC) and IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN). The nomenclature of steroids. *European Journal of Biochemistry* **186**(3), 429-458. ISSN 00142956.
- KANCEVA R., STÁRKA L., KANCHEVA L., (2015) Increased Serum Levels of C21 Steroids in Female Patients With Multiple Sclerosis. *Physiological Research* **64**, S247. ISSN 08628408.
- KANCEVA, R., HILL M., NOVÁK Z., et al. (2010) Peripheral neuroactive steroids may be as good as the steroids in the cerebrospinal fluid for the diagnostics of CNS disturbances. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **119**(1), 35-44. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2009.12.006. ISSN 09600760.
- KESKI-HYNNILÄ H., KURKELA M., ELOVAARA E., et al. (2002) Comparison of electrospray, atmospheric pressure chemical ionization, and atmospheric pressure photoionization in the identification of apomorphine, dobutamine, and entacapone phase II metabolites in biological samples. *Analytical Chemistry* **74**(14), 3449-3457. ISSN 00032700.

- KETOLA R. A., HAKALA K. S. (2010) Direct analysis of glucuronides with liquid chromatography-mass spectrometric techniques and methods. *Current Drug Metabolism* **11**(7), 561-582. ISSN 18755453.
- KHARE, P., KHARE N., YADAV G. (2016) Recent Advances in Neurosteroids: A Review. *J Drug Res Dev* **2**(2). DOI: <http://dx.doi.org/10.16966/2470-1009.115>.
- KHISTI, R. T., CHOPDE C. T., JAIN S. P. (2000) Antidepressant-like effect of the neurosteroid 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one in mice forced swim test. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* **67**(1), 137-143. DOI: 10.1016/S0091-3057(00)00300-2. ISSN 00913057.
- KIBALY C., PATTE-MENSAH C., MENSAH-NYAGAN A. G. (2005) Molecular and neurochemical evidence for the biosynthesis of dehydroepiandrosterone in the adult rat spinal cord. *Journal Of Neurochemistry* **93**(5), 1220-1230. ISSN 00223042.
- KIHEL, L. E. (2012) Oxidative metabolism of dehydroepiandrosterone (DHEA) and biologically active oxygenated metabolites of DHEA and epiandrosterone (EpiA) – Recent reports. *Steroids* **77**(1), 10-26. DOI: 10.1016/j.steroids.2011.09.008. ISSN 0039128X.
- KIM Y. S., ZHANG H., KIM H. Y. (2000) Profiling neurosteroids in cerebrospinal fluids and plasma by gas chromatography/electron capture negative chemical ionization mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* **277**(2), 187-195. ISSN 00032697.
- KING S. R., MANNA P. R., ISHII T., et al. (2002) An essential component in steroid synthesis, the steroidogenic acute regulatory protein, is expressed in discrete regions of the brain. *The Journal Of Neuroscience: The Official Journal of the Society For Neuroscience* **22**(24), 10613-10620. ISSN 15292401.
- KING, S. R. (2013) Neurosteroids and the nervous system. New York: Springer. SpringerBriefs in neuroscience. ISBN 9781461455585.
- KNAPSTEIN P., David A., WU C., et al. (1968) Metabolism of free and sulfoconjugated DHEA in brain tissue in vivo and in vitro. *Steroids* **11**(6), 885–896.
- LEONELLI, E., YAGUE J. G., BALLABIO M., et al. (2005) Ro5-4864, a synthetic ligand of peripheral benzodiazepine receptor, reduces aging-associated myelin degeneration in the sciatic nerve of male rats. *Mechanisms of Ageing and Development* **126**(11), 1159-1163. DOI: 10.1016/j.mad.2005.06.001. ISSN 00476374.
- LIU S., GRIFFITHS W. J., SJÖVALL J. (2003) Capillary liquid chromatography/electrospray mass spectrometry for analysis of steroid sulfates in biological samples. *Analytical Chemistry* **75**(4), 791-797. ISSN 00032700.
- LUCHETTI S., HUITINGA I., SWAAB D. F. (2011) Neurosteroid and GABA-A receptor alterations in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and multiple

- sclerosis. *Neuroscience* **191**, 6-21. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2011.04.010. ISSN 18737544.
- LUND, E., GUILYARDO J. M., RUSSELL D. W. (1999) CDNA Cloning of Cholesterol 24-Hydroxylase, a Mediator of Cholesterol Homeostasis in the Brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**(13), 7238-7243. ISSN 00278424.
- MARTIN, D. M., WITTERT G., BURNS N. R., et al. (2007) Testosterone and cognitive function in ageing men: Data from the Florey Adelaide Male Ageing Study. (*FAMAS*). *Maturitas* **57**(2), 182-194. DOI: 10.1016/j.maturitas.2006.12.007. ISSN 03785122.
- MARX C. E., KEEFE R. S., BUCHANAN R. W., et al. (2009) Proof-of-concept trial with the neurosteroid pregnenolone targeting cognitive and negative symptoms in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College Of Neuropsychopharmacology* **34**(8), 1885-1903. DOI: 10.1038/npp.2009.26. ISSN 1740634X.
- MAYO, W., LEMAIRE V., MALATERRE J., et al. (2005) Pregnenolone sulfate enhances neurogenesis and PSA-NCAM in young and aged hippocampus. *Neurobiology of Aging* **26**(1), 103-114. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2004.03.013. ISSN 01974580.
- MEFFRE D., PIANOS A., LIERE P., et al. (2007) Steroid profiling in brain and plasma of male and pseudopregnant female rats after traumatic brain injury: analysis by gas chromatography/mass spectrometry. *Endocrinology* **148**(5), 2505-2517. ISSN 00137227.
- MELCANGI, R. C., GIATTI S., GARCIA-SEGURA L. M. (2016) Review: Levels and actions of neuroactive steroids in the nervous system under physiological and pathological conditions. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **67**, 25-40. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2015.09.023. ISSN 01497634.
- MELJON A., THEOFILOPOULOS S., SHACKLETON C. H., et al. (2012) Analysis of bioactive oxysterols in newborn mouse brain by LC/MS. *Journal Of Lipid Research* **53**(11), 2469-2483. DOI: 10.1194/jlr.D028233. ISSN 15397262.
- MELJON, A., WANG Y., GRIFFITHS W. J. (2014) Oxysterols in the brain of the cholesterol 24-hydroxylase knockout mouse. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **446**(3), 768-774. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.01.153. ISSN 0006291X.
- MELLON, S. H, GRIFFIN L. D., COMPAGNONE N. A. (2001) Review: Biosynthesis and action of neurosteroids. *Brain Research Reviews* **37**(1), 3-12. DOI: 10.1016/S0165-0173(01)00109-6. ISSN 01650173.

- MÖHLER H., FRITSCHY J. M., CRESTANI F., et al. (2004) Specific GABA(A) circuits in brain development and therapy. *Biochemical Pharmacology* **68**(8), 1685-1690. ISSN 00062952.
- MONAGHAN E. P., NAVALTA L. A., SHUM L., et al. (1997) Initial human experience with ganaxolone, a neuroactive steroid with antiepileptic activity. *Epilepsia* **38**(9), 1026-1031. ISSN 00139580.
- MORFIN, R., LAFAYE P., COTILLON A. C., et al. (2000) 7 α -Hydroxy-Dehydroepiandrosterone and Immune Response. *Annals of the New York Academy of Sciences* **917**(1), 971-982. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb05464.x. ISSN 00778923.
- MORRIS K. D., AMIN J. (2004) Insight into the mechanism of action of neuroactive steroids. *Molecular Pharmacology* **66**(1), 56-69. ISSN 0026895X.
- MURIALDO G., BARRECA A., NOBILI F., et al. (2001) Relationships between cortisol, dehydroepiandrosterone sulphate and insulin-like growth factor-I system in dementia. *Journal Of Endocrinological Investigation* **24**(3), 139-146. ISSN 03914097.
- NAYLOR J. C., HULETTE C. M., STEFFENS D. C., et al. (2008) Cerebrospinal fluid dehydroepiandrosterone levels are correlated with brain dehydroepiandrosterone levels, elevated in Alzheimer's disease, and related to neuropathological disease stage. *Journal Of Clinical Endocrinology And Metabolism* **93**(8), 3173-3178. DOI: 10.1210/jc.2007-1229. ISSN 0021972X.
- NOVÁKOVÁ, L. (2013) Review: Challenges in the development of bioanalytical liquid chromatography–mass spectrometry method with emphasis on fast analysis. *Journal of Chromatography A* **1292**, 25-37. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.08.087. ISSN 00219673.
- NOVÁKOVÁ, L., VLČKOVÁ H. (2009) Review: A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods. *Analytica Chimica Acta* **656**(1). DOI: 10.1016/j.aca.2009.10.004. ISSN 00032670.
- OETTEL, M., MUKHOPADHYAY A. K. (2004) Progesterone: the forgotten hormone in men? *Aging Male* **7**(3), 236-257. ISSN 13685538.
- O'NEILL, K., CHEN S., DIAZ BRINTON R. (2004) Impact of the selective estrogen receptor modulator, tamoxifen, on neuronal outgrowth and survival following toxic insults associated with aging and Alzheimer's disease. *Experimental Neurology* **188**(2), 268-278. DOI: 10.1016/j.expneurol.2004.01.014. ISSN 00144886.
- PAPADOPOULOS, V., BARALDI M., GUILARTE T. R., et al. (2006) Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based

- on its structure and molecular function. *Trends in Pharmacological Sciences* **27**(8), 402-409. DOI: 10.1016/j.tips.2006.06.005. ISSN 01656147.
- PAPASSOTIROPOULOS, A., LÜTJOHANN D., BAGLI M., et al. (2000) Plasma 24S-hydroxycholesterol. *NeuroReport* **11**(9), 1959-1962. ISSN 09594965.
- PARK-CHUNG M., WU F. S., PURDY R., et al. (1997) Distinct sites for inverse modulation of N-methyl-D-aspartate receptors by sulfated steroids. *Molecular Pharmacology* **52**(6), 1113-1123. ISSN 0026895X.
- PAUL S. M., PURDY R. H. (1992) Neuroactive steroids. *FASEB Journal: Official Publication Of The Federation Of American Societies For Experimental Biology* **6**(6), 2311-2322. ISSN 08926638.
- PELISSIER, M.-A., TRAP C., MALEWIAK M.-I. et al. (2004) Antioxidant effects of dehydroepiandrosterone and 7 α -hydroxy-dehydroepiandrosterone in the rat colon, intestine and liver. *Steroids* **69**(2), 137-144. DOI: 10.1016/j.steroids.2003.12.006. ISSN 0039128X.
- PENNELL, K. D., WOODIN M. A., PENNELL P. B. (2015) Quantification of neurosteroids during pregnancy using selective ion monitoring mass spectrometry. *Steroids* **95**, 24-31. DOI: 10.1016/j.steroids.2014.12.007. ISSN 0039128X.
- PESARESI, M., GIATTI S., CAVALETTI G., et al. (2011a) Sex differences in the manifestation of peripheral diabetic neuropathy in gonadectomized rats: A correlation with the levels of neuroactive steroids in the sciatic nerve. *Experimental Neurology* **228**(2), 215-221. DOI: 10.1016/j.expneurol.2011.01.005. ISSN 00144886.
- PESARESI, M., S. GIATTI, G. CAVALETTI, et al. (2011b) Sex-dimorphic effects of dehydroepiandrosterone in diabetic neuropathy. *Neuroscience* **199**, 401-409. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2011.09.013. ISSN 03064522.
- PETROVIC, M., SEDLACEK M., HORAK M., et al., (2005) 20-Oxo-5 β -Pregnan-3 α -yl Sulfate Is a Use-Dependent NMDA Receptor Inhibitor. *Journal of Neuroscience* **25**(37), 8439-8450. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1407-05.2005. ISSN 02706474.
- PLASSART-SCHIESS E., BAULIEU E.-E. (2001) Neurosteroids: recent findings. *Brain Research. Brain Research Reviews. Neurosteroids* **37**(1), 133-140. DOI: 10.1016/S0165-0173(01)00113-8. ISSN 01650173.
- PLUCHINO N., SANTORO A., CASAROSA E., et al. (2013) Advances in neurosteroids: role in clinical practice. Climacteric: *Journal of the International Menopause Society* **16 Suppl 1**, 8-17. DOI: 10.3109/13697137.2013.809647. ISSN 14730804.
- PUGLIELLI L., FRIEDLICH A. L., SETCHELL K. D., et al. (2005) Alzheimer disease beta-amyloid activity mimics cholesterol oxidase. *Journal of Clinical Investigation* **115**(9), 2556-2563. ISSN 00219738.

- PURDY R. H., MOORE P. H., RAO P. N., et al. (1990) Radioimmunoassay of 3 alpha-hydroxy-5 alpha-pregnan-20-one in rat and human plasma. *Steroids* **55**(7), 290-296. ISSN 0039128X.
- REDDY D. S., ROGAWSKI M. A. (2001) Enhanced anticonvulsant activity of neuroactive steroids in a rat model of catamenial epilepsy. *Epilepsia* **42**(3), 337-344. ISSN 00139580.
- REDDY, D. S. (2010) Chapter 8: Neurosteroids. Endogenous role in the human brain and therapeutic potentials. *Progress in Brain Research* **186**, 113-137. DOI: 10.1016/B978-0-444-53630-3.00008-7. ISSN 00796123.
- REDDY, D. S. a ESTES. (2016) Review: Clinical Potential of Neurosteroids for CNS Disorders. *Trends in Pharmacological Sciences* **37**(7), 543-561. DOI: 10.1016/j.tips.2016.04.003. ISSN 01656147.
- REDDY, D.S., KULKARNI S. K. (1997) Research report: Differential anxiolytic effects of neurosteroids in the mirrored chamber behavior test in mice. *Brain Research* **752**(1), 61-71. DOI: 10.1016/S0006-8993(96)01447-3. ISSN 00068993.
- RITTENBERG D., FOSTER L. (1940) A new procedure for quantitative analysis by isotope dilution, with application to the determination of amino acids and fatty acids. *Journal of Biological Chemistry* **133**, 727-744.
- RUAN B., WILSON W. K., SCHROEPFER G. J. (1999) An improved synthesis of (20R,22R)-cholest-5-ene-3beta,20,22-triol, an intermediate in steroid hormone formation and an activator of nuclear orphan receptor LXR alpha. *Steroids* **64**(6), 385-395. ISSN 0039128X.
- RUPPRECHT, R. a HOLSBOER F. (1999) Neuroactive steroids. Trends in Neurosciences **22**(9), 410-416. DOI: 10.1016/S0166-2236(99)01399-5. ISSN 01662236.
- SELYE, H. (1941) Anesthetic Effect of Steroid Hormones. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **46**(1), 116-121. DOI: 10.3181/00379727-46-11907.
- SHACKLETON, C. (2007) Genetic Disorders of Steroid Metabolism Diagnosed by Mass Spectrometry. *Laboratory Guide to the Methods in Biochemical Genetics*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, s. 549. DOI: 10.1007/978-3-540-76698-8_26. ISBN 978-3-540-76697-1.
- SCHUMACHER M., GUENNOUN R., STEIN D. G. (2007) Progesterone: therapeutic opportunities for neuroprotection and myelin repair. *Pharmacology* **116**(1), 77-106. ISSN 01637258.

- SCHUMACHER, M., LIERE P., AKWA Y., et al. (2008) Pregnenolone sulfate in the brain: A controversial neurosteroid. *Neurochemistry International* **52**(4), 522-540. DOI: 10.1016/j.neuint.2007.08.022. ISSN 01970186.
- SMAJE J. C. (1976) General anaesthetics and the acetylcholine-sensitivity of cortical neurons. *British Journal Of Pharmacology* **58**(3), 359-366. ISSN 00071188.
- SMITH S. S. (2003) Neurosteroid effects in the central nervous system: the role of the GABA-A receptor. Boca Raton: CRC Press. ISBN 9780849323928.
- SMITH, S. S., SHEN H., GONG Q. H., et al. (2007) Neurosteroid regulation of GABAA receptors: Focus on the $\alpha 4$ and δ subunits. *Pharmacology* **116**(1), 58-76. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2007.03.008. ISSN 01637258.
- STARKA, L., HAMPL R. (2014) Testosteron jako neuroaktivní steroid. *DMEV* **17**(1), 17-21.
- STRÖHLE, A., ROMEO E., MICHELE F. D., et al. (2003) Induced Panic Attacks Shift γ -Aminobutyric Acid Type A Receptor Modulatory Neuroactive Steroid Composition in Patients With Panic Disorder: *Preliminary Results. Archives of General Psychiatry* **60**(2), 161-168. ISSN 0003990X.
- STRÖMSTEDT M., WATERMAN M. R. (1995) Messenger RNAs encoding steroidogenic enzymes are expressed in rodent brain. *Brain Research. Molecular Brain Research* **34**(1), 75-88. ISSN 0169328X.
- SUZUKI, M., WRIGHT L. S., MARWAH P., et al. (2004) Mitotic and Neurogenic Effects of Dehydroepiandrosterone (DHEA) on Human Neural Stem Cell Cultures Derived from the Fetal Cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(9), 3202-3207. ISSN 00278424.
- SWACZYNOVÁ, J., NOVÁK, O., HAUSEROVÁ, E., et al. (2007) New technologies for estimation of naturally occurring brassinosteroids. *Journal of Plant Growth Regulation*. **26**(1), 1-14.
- THOMAS C. G., MILLER A. J., WESTBROOK G. L. (2006) Synaptic and extrasynaptic NMDA receptor NR2 subunits in cultured hippocampal neurons. *Journal Of Neurophysiology* **95**(3), 1727-1734. ISSN 00223077.
- TSUDA, M. SUZUKI T. (1997) Modulation of the decrease in the seizure threshold of. *Addiction Biology* **2**(4), 455-460. ISSN 13556215.
- TURKMEN, S., LUNDGREN P., BIRZNIECE V., et al. (2004) 3β - 20β -dihydroxy- 5α -pregnane (UC1011) antagonism of the GABA potentiation and the learning impairment induced in rats by allopregnanolone. *European Journal of Neuroscience* **20**(6) 1604-1612. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2004.03610.x. ISSN 0953816X.

- UGELE B., ST-PIERRE M. V., PIHUSCH M., et al. Characterization and identification of steroid sulfate transporters of human placenta. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284**, 390-398.
- UZUNOV D. P., COOPER T. B., COSTA E., et al. (1996) Fluoxetine-elicited changes in brain neurosteroid content measured by negative ion mass fragmentography. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**,12599–12604.
- VAN DONGEN, A. M. (2009) Biology of the NMDA Receptor. Bota Racon: CRP Press. ISBN 9781420044140.
- VANOVER, K. E., ROSENZWEIG-LIPSON L., HAWKINSON J. E. (2000) Characterization of the anxiolytic properties of a novel neuroactive steroid, Co 2-6749 (GMA-839; WAY-141839; 3alpha, 21-dihydroxy-3beta-trifluoromethyl-19-nor-5beta-pregnan-20-one), a selective modulator of gamma-aminobutyric acid(A) receptors. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **295**(1), 337-345. ISSN 00223565.
- VEIGA S., AZCOITIA I., LUIS M., et al. (2005) Ro5-4864, a peripheral benzodiazepine receptor ligand, reduces reactive gliosis and protects hippocampal hilar neurons from kainic acid excitotoxicity. *Journal of Neuroscience Research* **80**(1), 129-137. ISSN 03604012.
- VODRÁŽKA, Z. (1996) Biochemie. 2. opr. vyd. Praha: *Academia*. ISBN 80-200-0600-1.
- WANG J. M., JOHNSTON P. B., BALL B. G., et al. (2005) The Neurosteroid Allopregnanolone Promotes Proliferation of Rodent and Human Neural Progenitor Cells and Regulates Cell-Cycle Gene and Protein Expression. *Journal of Neuroscience* **25**(19), 4706-4718. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4520-04.2005. ISSN 02706474.
- WANG M., HE Y., EISENMAN L. N., et al. (2002) 3beta -hydroxypregnane steroids are pregnenolone sulfate-like GABA(A) receptor antagonists. *The Journal Of Neuroscience: The Official Journal of the Society For Neuroscience* **22**(9), 3366-3375. ISSN 15292401.
- WANG Y., GRIFFITHS W. J. (2008) Capillary liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry for the study of neurosteroids and oxysterols in brain. *Neurochemistry International* **52**(4-5), 506-521. ISSN 01970186.
- WANG, Y., KARU K., GRIFFITHS W. J. (2007) Analysis of neurosterols and neurosteroids by mass spectrometry. *Biochimie* **89**(2), 182-191. DOI: 10.1016/j.biochi.2006.10.008. ISSN 03009084.
- WEILL-ENGERER S., DAVID J. P., SAZDOVITCH V., et al. (2002) Neurosteroid quantification in human brain regions: comparison between Alzheimer's and nondemented patients. *Journal Of Clinical Endocrinology And Metabolism* **87**(11), 5138-5143. ISSN 0021972X.

- WU F. S., CHEN S. C. a TSAI J. J. (1997) Competitive inhibition of the glycine-induced current by pregnenolone sulfate in cultured chick spinal cord neurons. *Brain Research* **750**(1-2), 318-320. ISSN 00068993.
- YAGHOUBI N., MALAYEV A., RUSSEK S. J., et al. (1998) Neurosteroid modulation of recombinant ionotropic glutamate receptors. *Brain Research* **803**(1-2), 153-160. ISSN 00068993.
- YU, L., ROMERO D. G., GOMEZ-SANCHEZ C. E., et al. (2002) Steroidogenic enzyme gene expression in the human brain. *Molecular and Cellular Endocrinology* **190**(1), 9-17. DOI: 10.1016/S0303-7207(02)00041-2. ISSN 03037207.
- ZHANG Y., TOBIAS H., BRENNAN J. T. (2012) Highly sensitive and selective analysis of urinary steroids by comprehensive two-dimensional gas chromatography combined with positive chemical ionization quadrupole mass spectrometry. *Analyst* **137**(13), 3102-3110. DOI: 10.1039/c2an35087d. ISSN 13645528.

Phenomenex (2017) Strata-X. Torrance: Phenomenex Inc. Dostupné z: <https://www.phenomenex.com/Products/SPDetail/Strata-X>

Sigma-Aldrich (2017) HybridSPE. Darmstadt: Sigma-Aldrich Co. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/sample-preparation/spe/hybridspe-ppt.html>