



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Metabolické profilování neuroaktivních steroidů
u pacientů s roztroušenou sklerózou**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

| | |
|-------------------------|------------------------------------|
| Autor: | Bc. Michal Kaleta |
| Studijní program: | N1501 Biologie |
| Studijní obor: | Experimentální biologie |
| Forma studia: | Prezenční |
| Vedoucí práce: | Mgr. Jana Oklešťková, Ph.D. |
| Termín odevzdání práce: | 2019 |

Bibliografická identifikace

| | |
|-------------------------|--|
| Jméno a příjmení autora | Michal Kaleta |
| Název práce | Metabolické profilování neuroaktivních steroidů u pacientů s roztroušenou sklerózou |
| Typ práce | Diplomová |
| Pracoviště | Laboratoř růstových regulátorů |
| Vedoucí práce | Mgr. Jana Oklešťková, Ph.D. |
| Rok obhajoby práce | 2019 |
| Abstrakt | <p>Neuroaktivní steroidy jsou steroidní látky přírodního nebo syntetického původu, které jsou schopny ovlivňovat funkce nervového systému. K biosyntéze endogenních neuroaktivních steroidů dochází jednak přímo v nervovém systému (pro tuto skupinu se vžilo označení neurosteroidy) a také v periferních tkáních. Ke změnám hladin těchto steroidů může docházet vlivem neurodegenerativních onemocnění. Právě neurodegenerace je typická pro roztroušenou sklerózu. Cílem této práce bylo metabolické profilování vybraných neuroaktivních steroidů v krevním séru mužů s diagnostikovanou roztroušenou sklerózou a v krevním séru mužů kontrolní skupiny pomocí ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. U obou analyzovaných skupin se podařilo kvantifikovat dehydroepiandrosteron, testosteron, pregnenolon a progesteron. Allopregnanolon a ani konjugáty pregnanolonu detekovány nebyly. Studium vlivu roztroušené sklerózy na změny hladin steroidních hormonů mohou napomoci k objevu nových přístupů v diagnostice nebo dokonce léčbě tohoto onemocnění centrální nervové soustavy.</p> |
| Klíčová slova | Neuroaktivní steroidy, metabolické profilování, UHPLC–MS/MS, roztroušená skleróza. |
| Počet stran | 69 |
| Počet příloh | 1 |
| Jazyk | Český |

Bibliographical identification

| | |
|---------------------------------|--|
| Author's first name and surname | Michal Kaleta |
| Title of thesis | Metabolic profiling of neuroactive steroids in patients with multiple sclerosis |
| Type of thesis | Master |
| Department | Laboratory of Growth Regulators |
| Supervisor | Mgr. Jana Oklešťková, Ph.D. |
| The year of presentation | 2019 |
| Abstract | <p>Neuroactive steroids are a group of natural or synthetic steroid compounds able to influence the nervous system functions. Neuroactive endogenous steroids are biosynthesised either directly in the nervous system (so-called neurosteroids) or in peripheral tissues. The levels of these steroids may be influenced by neurodegenerative diseases. Neurodegeneration is typical for the multiple sclerosis. The aim of this work was the metabolic profiling of selected neuroactive steroids in the blood serum of men diagnosed with multiple sclerosis and of men in control group using ultra-high pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry. For both groups, dehydroepiandrosterone, testosterone, pregnenolone and progesterone were quantified. Allopregnanolone and pregnanolone conjugates were not detected. Studying the influence of multiple sclerosis on steroid hormone levels may be helpful in finding new approaches in diagnosis and treatment of this central nervous system disease.</p> |
| Keywords | Neuroactive steroids, metabolic profiling, UHPLC–MS/MS, multiple sclerosis. |
| Number of pages | 69 |
| Number of appendices | 1 |
| Language | Czech |

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

V Olomouci dne

.....

Poděkování

Rád bych poděkoval paní Mgr. Janě Oklešťkové PhD. za odborné vedení, cenné rady a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování této diplomové práce věnovala. Také bych chtěl velice rád poděkovat paní Ing. Petře Amakorové za vstřícnost a pomoc při provádění experimentů a při následném zpracování výsledků. V neposlední řadě mé poděkování patří také panu doc. Ondřeji Novákovi PhD. a všem pracovníkům Laboratoře růstových regulátorů za veškeré rady a vytvoření příjemných pracovních podmínek.

Tato diplomová práce vznikla za finanční podpory interního grantu Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého (č. IGA_PrF_2019_020).

Obsah

| | |
|--|----|
| Seznam použitých zkratek | 8 |
| 1 Úvod a cíl diplomové práce | 11 |
| 2 Teoretická část | 13 |
| 2.1 Steroidní látky | 13 |
| 2.1.1 Steroidní hormony | 14 |
| 2.2 Neuroaktivní steroidy | 16 |
| 2.2.1 Klasifikace neuroaktivních steroidů | 16 |
| 2.2.2 Biosyntéza a metabolismus steroidů v nervovém systému..... | 17 |
| 2.3 Interakce neuroaktivních steroidů s receptory | 20 |
| 2.3.1 Intracelulární receptory | 21 |
| 2.3.2 Membránové receptory | 21 |
| 2.4 Vybraní zástupci neuroaktivních steroidů..... | 24 |
| 2.4.1 Progesteron a allopregnanolon..... | 24 |
| 2.4.2 Dehydroepiandrosteron a dehydroepiandrosteron sulfát | 25 |
| 2.4.3 Pregnenolon a pregnenolon sulfát..... | 25 |
| 2.5 Terapeutické využití neuroaktivních steroidů | 26 |
| 2.6 Metody analýzy steroidních látek | 28 |
| 2.6.1 Imunoanalytické metody..... | 28 |
| 2.6.2 Chromatografické techniky ve spojení s hmotnostní spektrometrií .. | 29 |
| 2.7 Roztroušená skleróza | 32 |
| 2.7.1 Základní informace | 32 |
| 2.7.2 Klasifikace a příznaky roztroušené sklerózy | 33 |
| 2.7.3 Etiologie roztroušené sklerózy..... | 34 |
| 2.7.4 Patogeneze roztroušené sklerózy | 35 |
| 2.7.5 Diagnostika roztroušené sklerózy..... | 36 |
| 2.7.6 Terapie roztroušené sklerózy | 37 |
| 3 Praktická část | 39 |
| 3.1 Materiál a vybavení..... | 39 |
| 3.1.1 Laboratorní přístroje a pomůcky..... | 39 |
| 3.1.2 Softwarové vybavení | 39 |
| 3.1.3 Chemikálie | 39 |
| 3.1.4 Biologický materiál..... | 41 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3.2 | Experimentální metody | 42 |
| 3.2.1 | Zpracování vzorků krevního séra pro analýzu UHPLC–MS/MS | 42 |
| 3.2.2 | Stanovení neuroaktivních steroidů pomocí UHPLC–MS/MS | 43 |
| 4 | Výsledky | 46 |
| 4.1 | Stanovení neuroaktivních steroidů pomocí UHPLC–MS/MS | 46 |
| 5 | Diskuze | 50 |
| 6 | Závěr | 54 |
| | Seznam literatury | 55 |
| | Přílohy | 65 |

Seznam použitých zkratk

| | |
|----------------------------|---|
| 17 β -HSD | 17 β -hydroxysteroid dehydrogenáza |
| 3 α 5 α S | Allopregnanolon sulfát |
| 3 α 5 α -THP | 3 α ,5 α -tetrahydroprogesteron, allopregnanolon |
| 3 α 5 β S | Pregnanolon sulfát |
| 3 α -HSD | 3 α -hydroxysteroid dehydrogenáza |
| 3 β 5 α S | Epiallopregnanolon sulfát |
| 3 β 5 β S | Epipregnanolon sulfát |
| 3 β -HSD | 3 β -hydroxysteroid dehydrogenáza/ Δ^5 - Δ^4 -izomeráza |
| 5 α -DHP | 5 α -dihydroprogesteron |
| 5 α -DHT | 5 α -dihydrotestosteron |
| 5 α -R | 5 α -reduktáza |
| AMPA | α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionová kyselina |
| ANT | Adenin nukleotidový transportér |
| APCI | Chemická ionizace za atmosférického tlaku |
| API | Ionizace za atmosférického tlaku |
| APPI | Fotoionizace za atmosférického tlaku |
| AROM | Cytochrom P450 aromatáza |
| CIA | Chemiluminiscenční imunoanalýza |
| CNS | Centrální nervová soustava/system |
| CYP450 _{SCC} | Cytochrom P450 štěpící postranní řetězec cholesterolu |
| DHEA | Dehydroepiandrosteron |
| DHEAS | Dehydroepiandrosteron sulfát |
| DMD | Léčiva modifikující průběh choroby |
| EI | Elektronová ionizace |
| EIA | Enzymová imunoanalýza |
| ELISA | <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> |
| ESI | Ionizace elektrosprejem |
| GABA | γ -aminomáselná kyselina |
| GABA _A | Receptor pro γ -aminomáselnou kyselinu typu A |
| GABA _B | Receptor pro γ -aminomáselnou kyselinu typu B |
| GABA _C | Receptor pro γ -aminomáselnou kyselinu typu C |

| | |
|---------------------|--|
| GC | Plynová chromatografie |
| GC×GC | Kompletní dvourozměrná plynová chromatografie |
| GC–MS | Plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií |
| GC–MS/MS | Plynová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií |
| HPLC | Vysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| HST | Hydroxysteroid sulfotransferáza |
| IA | Imunoanalýza |
| LC | Kapalinová chromatografie |
| LC–MS | Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií |
| LC–MS/MS | Kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií |
| LOD | Limit detekce |
| MAP2 | Protein 2 asociovaný s mikrotubuly |
| MAPs | Proteiny asociované s mikrotubuly |
| MRI | Magnetická rezonance |
| MRM | Selektivní záznam více reakcí |
| MS | Hmotnostní spektrometrie |
| MS/MS | Tandemová hmotnostní spektrometrie |
| NAS | Neuroaktivní steroidy |
| NMDA | <i>N</i> -methyl- <i>D</i> -aspartát |
| P450 _{7α} | Cytochrom P450 7α-hydroxyláza |
| P450 _{C11} | Cytochrom P450 11β-hydroxyláza |
| P450 _{C17} | Cytochrom P450 17α-hydroxyláza/17,20 lyáza |
| P450 _{C21} | Cytochrom P450 21-hydroxyláza |
| PNS | Periferní nervová soustava/systém |
| PP-RS | Primárně-progresivní roztroušená skleróza |
| PREG | Pregnenolon |
| PREGS | Pregnenolon sulfát |
| PROG | Progesteron |
| RIA | Radioimunoanalýza |
| RP-RS | Relaps-progredientní roztroušená skleróza |
| RR-RS | Relaps-remitentní roztroušená skleróza |

| | |
|-------------|---|
| RS | Roztroušená skleróza |
| SD | Směrodatná odchylka |
| SP-RS | Sekundárně-progresivní roztroušená skleróza |
| StAR | Steroidní akutní regulační protein |
| STS | Sulfatáza |
| T | Testosteron |
| THDOC | Allotetrahydrodeoxykortikosteron |
| TSPO | Translokační protein |
| UHPLC–MS/MS | Ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií |
| UV | Ultrafialové záření |
| VCAM-1 | Vaskulární buněčná adhezivní molekula-1 |
| VDAC | Napětově závislý aniontový kanál |
| VLA-4 | Velmi pozdní antigen-4 |

1 Úvod a cíl diplomové práce

Aktivitu neuronů mohou regulovat steroidy, které jsou označovány přídomkem neuroaktivní, hovoříme poté o tzv. neuroaktivních steroidech (Zheng, 2009). Po celou dobu života jsou zapojeny do formování struktury a funkce centrálního nervového systému (Belvederi Murri et al., 2016). K těmto steroidním látkám se řadí kupříkladu dehydroepiandrosteron, testosteron, progesteron a zástupci skupiny estrogenů.

Klíčová je úloha neuroaktivních steroidů v patologii a léčbě celé řady neurologických a psychiatrických onemocnění, jako jsou schizofrenie, epilepsie, deprese, premenstruační syndrom, úzkost nebo například roztroušená skleróza (Zheng, 2009). Roztroušená skleróza je zánětlivé demyelinizační onemocnění centrální nervové soustavy, které zasahuje šedou i bílou hmotu mozkovou a míšní (Inglese a Petracca, 2015). Je typická neurodegenerací, která je zahájena v relativně mladém věku, což odlišuje roztroušenou sklerózu od klasických neurodegenerativních chorob. Hlavní podíl v patogenezi roztroušené sklerózy se připisuje Th1 a Th17 subpopulacím pomocných T-lymfocytů (Constantinescu et al., 2011).

Metabolický stav člověka je ovlivňován celou řadou vnějších i vnitřních faktorů (Goodacre, 2007). Mezi tyto faktory se samozřejmě řadí i zdravotní stav. Cílem tzv. metabolického profilování je identifikace a kvantifikace metabolitů, které jsou chemicky příbuzné nebo jsou zapojeny v určité metabolické dráze (Dunn et al., 2005). V současné době je k dispozici široká škála metod umožňujících analýzu steroidů (Fojtíková et al., 2015).

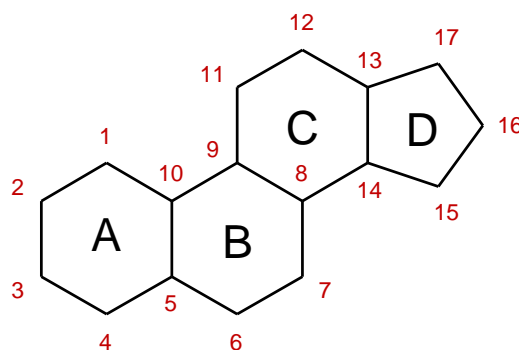
Ústředním bodem teoretické části této diplomové práce bylo vytvoření literární rešerše pojednávající o neuroaktivních steroidech, metodách stanovení steroidních látek a o roztroušené skleróze. Cílem praktické části práce bylo stanovení vybraných neuroaktivních steroidů v krevním séru pacientů mužského pohlaví s diagnostikovanou roztroušenou sklerózou a v krevním séru kontrolní skupiny pacientů pomocí ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Vzorky krevního séra byly poskytnuty Neurologickou klinikou Fakultní nemocnice Olomouc po předchozím schválení etickou komisí. Vlastní identifikaci a kvantifikaci steroidů předcházela purifikace a příprava vzorků k následné analýze. První skupina stanovovaných steroidů zahrnovala progesteron, pregnenolon, allopregnanolon, testosteron a dehydroepiandrosteron. Dalšími stanovovanými steroidy

byly konjugáty pregnanolonu s aminokyselinami, a to pregnanolon glutamát, pregnanolon argininát, pregnanolon aspartát a pregnanolon norvalinát. Na závěr byly výsledky tohoto metabolického profilování vyhodnoceny a diskutovány s dostupnou odbornou literaturou.

2 Teoretická část

2.1 Steroidní látky

V rostlinných i živočišných buňkách lze nalézt celou řadu fyziologicky významných látek, mezi něž lze zařadit také steroidní látky (McMurry, 2007). Steran neboli cyklopentanoperhydrofenanthren tvoří základní strukturu, od které jsou steroidy odvozeny (Norman a Henry, 2015). Tento uhlovodík je tvořen třemi cyklohexanovými kruhy a jedním kruhem cyklopentanovým. Cyklohexanové kruhy steranu jsou označeny písmeny A, B a C. Pětičlenný cyklus nese označení D. Pro bližší určení jednotlivých atomů uhlíku byl vytvořen standardní systém číslování. Chemická struktura steranu, označení jednotlivých cyklů a číslování atomů uhlíku je uvedeno na obrázku 1.



Obr. 1: Chemická struktura steranu, označení jednotlivých cyklů pomocí písmen (A–D) a číslování atomů uhlíku (1–17).

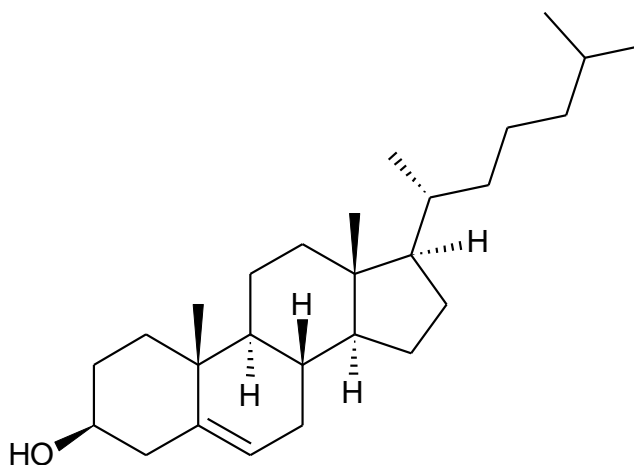
Cholesterol je často spojován s aterosklerotickým procesem a následným rizikem proděláním infarktu myokardu (Murray et al., 2012). Běžně se vyskytuje ve všech buňkách lidského těla, tvoří podstatnou součást lipoproteinů nacházejících se v krevní plazmě. Významný je jeho podíl na regulaci tekutosti a permeability buněčných membrán (Moon et al., 2016). Jedná se rovněž o prekursor biochemicky významných steroidních látek (Murray et al., 2012).

Zdrojem cholesterolu u savců může být přijímaná potrava nebo také endogenní biosyntéza, která probíhá v cytoplazmě a endoplazmatickém retikulu buňky (Goedeke a Fernández-Hernando, 2012).

Centrální nervový systém (CNS) představuje přibližně 2 % tělesné hmotnosti člověka, navzdory tomu obsahuje zhruba 23 % veškerých zásob tělesného cholesterolu (Dietschy a Turley, 2004). Průměrná koncentrace neesterifikovaného cholesterolu je

v mozku dospělého člověka přibližně $23 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. V době narození dosahuje hodnoty $6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. Nárůst koncentrace cholesterolu je spojen s růstem mozku během vývoje a s procesem myelinizace. Cholesterol se do mozku nedokáže dostat z periferie, jelikož není schopen prostoupit skrze hematoencefalickou bariéru (Wang et al., 2007). Dochází zde tudíž k jeho *de novo* syntéze. Pokud je v mozku přítomno nadbytečné množství cholesterolu, je z mozku exportován ve formě oxysterolů nebo je metabolizován na jiné steroidy, které jsou již schopny tuto bariéru překročit.

Významnou úlohu plní cholesterol také v rostlinné říši (Murray, 2012). Vznikají z něj některé alkaloidy, sitosterol a srdeční glykosidy. Chemická struktura cholesterolu je zobrazena na obrázku 2.



Obr. 2: Chemická struktura cholesterolu.

Steroidy nacházející se u savců lze rozdělit do 7 skupin (Norman a Henry, 2015). Patří sem estrogeny, progestiny, androgeny, mineralokortikoidy, glukokortikoidy, vitamín D a také žlučové kyseliny.

2.1.1 Steroidní hormony

K biosyntéze steroidních hormonů dochází v endokrinních žlázách a odtud jsou uvolňovány do krevního oběhu (Norman a Henry, 2015). Lipofilní povaha steroidních hormonů znemožňuje jejich uskladnění ve vezikulách, proto jsou biosyntetizovány jen podle aktuální potřeby (Holst et al., 2004). Steroidní hormony jsou vzhledem ke své nerozpustnosti v krevní plazmě transportovány prostřednictvím transportních proteinů. Menší část tvoří volnou frakci, která je však biologicky aktivní. Jejich uplatnění je možné díky existenci příslušných receptorů (Norman a Henry, 2015). Tyto receptory mají vazebné místo specifické pro konkrétní steroidní hormony a dochází

k tzv. stereospecifické interakci funkčních skupin hormonu s vazebným místem, která umožní konformační změnu receptoru a jeho aktivaci s příslušnou odpovědí v cílové tkáni.

Podle místa syntézy v lidském organismu lze steroidy působící jako hormony rozčlenit do dvou základních skupin (McMurry, 2007). Jsou to pohlavní steroidy, které jsou biosyntetizovány převážně v mužských a ženských pohlavních žlázách. Tyto hormony se podílí na vývoji sekundárních pohlavních znaků a řídí proces reprodukce. Nejvýznamnějším mužským pohlavním hormonem, řadícím se mezi androgeny, je testosteron (T), k jehož syntéze dochází z velké části ve varlatech. Ke vzniku androgenů dochází ale také u žen (Holst et al., 2004). Ženské pohlavní hormony estrogenu (např. estron, estradiol) a gestageny (např. progesteron [PROG]) jsou produkovány převážně ve vaječnících (McMurry, 2007). Estrogeny jsou produkovány rovněž u mužů, a to zčásti ve varlatech, v tukové tkáni, kůži nebo třeba v mozku (Cooke et al., 2017).

Druhou skupinu představují hormony produkované kůrou nadledvin, a to glukokortikoidy, mineralokortikoidy, ale také androgeny (Holst et al., 2004). Glukokortikoidy se účastní regulace celé řady metabolických procesů, stimulují například glukoneogenezi. Klinicky nejvýznamnějším glukokortikoidem je kortizol, jehož zvýšená produkce je spojena se stresem, bolestí a zánětem. Mineralokortikoidy jsou zapojeny do metabolismu minerálů, a to sodíku a draslíku (Rogerson a Fuller, 2000). Hlavním zástupcem této skupiny je aldosteron.

Pohlavní žlázy a kůra nadledvin nejsou jedinými místy, kde probíhá proces steroidogeneze (Stárka et al., 2018). Steroidy jsou biosyntetizovány také v placentě, nervové tkáni, tukové tkáni, v kůži a také ve střevech. Zde se na syntéze a látkové přeměně steroidních látek podílí také střevní mikroflóra a ovlivňuje složení cirkulujících hormonů. Podstatou této funkce je přítomnost enzymů důležitých pro syntézu a metabolismus steroidů právě v těchto buňkách. Složení střevní mikroflóry může být narušeno například užíváním antibiotik, čímž se samozřejmě změní i produkce metabolitů mikroflóry (např. žlučové kyseliny, steroidní hormony) (Antunes et al., 2011). Tento zásah může vést k narušení metabolických cest, které jsou důležité pro fyziologickou funkci hostitele.

2.2 Neuroaktivní steroidy

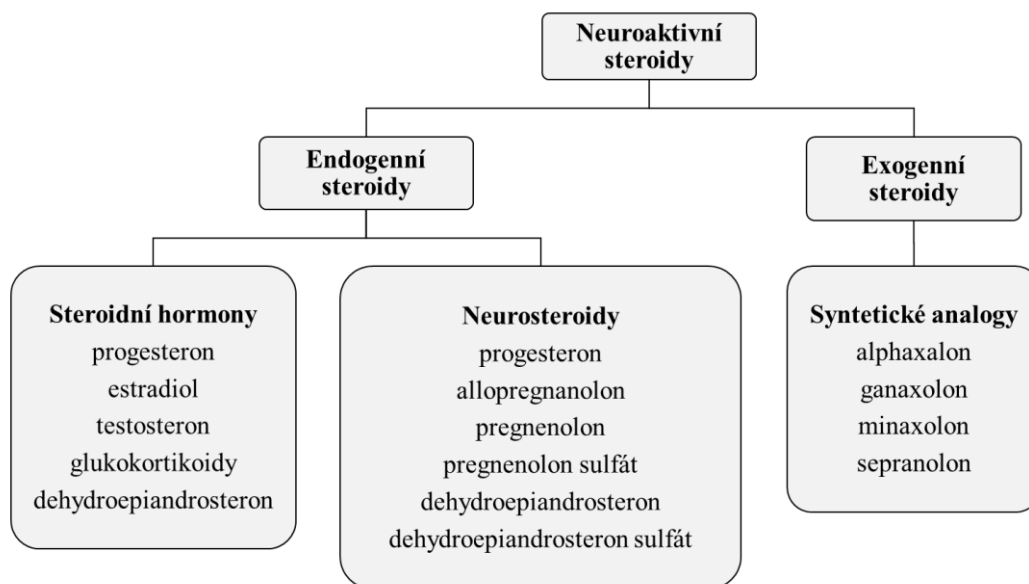
Jako neuroaktivní steroidy (NAS) jsou označovány steroidní látky přírodního nebo syntetického původu, které po vazbě na membránové receptory rychle mění dráždivost (excitabilitu) membrány neuronů (Paul a Purdy, 1992; Melcangi et al., 2016). NAS mohou ale uplatnit i své dlouhodobé účinky a ovlivňovat funkci neuronů, ale také astrocytů, mikroglií, oligodendrocytů a endotelových buněk (Melcangi et al., 2016). Pod termín NAS je tedy možné zahrnout veškeré látky steroidní povahy, které jsou schopny ovlivňovat funkce nervového systému (neurosteroidy, steroidní hormony, syntetické steroidy) (Melcangi et al., 2008).

2.2.1 Klasifikace neuroaktivních steroidů

Tyto steroidní látky lze klasifikovat na základě jejich původu. Rozlišujeme endogenní NAS, které jsou biosyntetizovány přímo v CNS a periferním nervovém systému (PNS) z cholesterolu nebo steroidních prekurzorů pocházejících z periferních endokrinních žláz (Baulieu, 1998). Zdrojem prekurzorů může být také fetoplacentární jednotka (Reddy, 2010). K biosyntéze dochází především v gliových buňkách, dále v neuronech a astrocytech (Baulieu, 1998). Tato skupina steroidů je označována jako neurosteroidy. Tento termín, v současné době široce využívaný pro označení steroidů vznikajících v mozku, původně navrhl francouzský fyziolog Etienne Baulieu (Reddy, 2010). Typickými představiteli neurosteroidů biosyntetizovaných *de novo* v nervové tkáni jsou především pregnenolon (PREG), dehydroepiandrosteron (DHEA), PROG, allopregnanolon neboli $3\alpha5\alpha$ -tetrahydroprogesteron ($3\alpha5\alpha$ -THP) a jejich sulfátové estery, jako je pregnenolon sulfát (PREGS) a dehydroepiandrosteron sulfát (DHEAS) (Zheng, 2009). K endogenním steroidům dále patří steroidní hormony biosyntetizované v periferních tkáních (Melcangi et al., 2008). Jsou to steroidní hormony produkované převážně vaječníky (estradiol, PROG), varlaty (T) a nadledvinami (glukokortikoidy, DHEA) (Zheng, 2009). Druhou skupinou jsou steroidy exogenního původu, kam se řadí synteticky připravené látky s neuroaktivním účinkem (Melcangi et al., 2008). Schématické rozdělení NAS na základě místa jejich syntézy je uvedeno na obrázku 3.

Již výše zmíněné neurosteroidy lze na základě chemické struktury klasifikovat do tří skupin (Reddy, 2010). Neurosteroidy mohou být odvozeny od pregnanu, jejich zástupci jsou např. $3\alpha5\alpha$ -THP a allotetrahydrodeoxykortikosteron (THDOC).

Další skupina je odvozena od androstanu (např. androstandiol a etiocholanolon), nebo se může jednat o neurosteroidy s navázanou sulfátovou skupinou (např. DHEAS a PREGS).



Obr. 3: Schematické zobrazení klasifikace NAS s vybranými zástupci jednotlivých skupin (upraveno podle Zheng, 2009).

2.2.2 Biosyntéza a metabolismus steroidů v nervovém systému

Typickými místy biosyntézy steroidních hormonů jsou pohlavní žlázy, kůra nadledvin a placenta (Holst et al., 2004). Schopnost biosyntetizovat steroidy nervovou tkání patří mezi hlavní objevy výzkumu NAS (Melcangi et al., 2008). Corpéchet a spolupracovníci stanovili DHEAS, PREG a jeho sulfátový metabolit v mozku samců hlodavců, u kterých bylo provedeno chirurgické odstranění pohlavních žláz i nadledvin, z čehož usuzovali, že může docházet k *in situ* biosyntéze těchto steroidů přímo v mozkové tkáni, tedy nezávisle na periferním endokrinním systému (Corpéchet et al., 1981; Corpéchet et al., 1983).

Biosyntéza steroidů probíhá v mnoha oblastech mozku, a to včetně hipokampu a mozkové kůry (Reddy a Estes, 2016). Přítomnost biologicky aktivních enzymů nebo jejich mRNA v nervové tkáni je studována a prokazována imunohistochemickými nebo *in situ* hybridizačními technikami (Do Rego et al., 2009).

Pro biosyntézu NAS je důležitým prekurzorem cholesterol (Baulieu, 1998; Orth a Bellosta, 2012). Intaktní hematoencefalická bariéra obratlovců neumožňuje absorpci lipoproteinů z krevního oběhu, a proto zde vzniká *de novo*. K biosyntéze cholesterolu

dochází v nervové tkáni z nízkomolekulárních prekurzorů. Příkladem může být biosyntetická přeměna mevalonátu na cholesterol tzv. mevalonátovou dráhou. Z acetyl koenzymu A vzniká 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A, který je redukován na mevalonát (Orth a Bellosta, 2012; Moon et al., 2016). Během další metabolické přeměny vzniká farnesyldifosfát. Ten přechází na skvalen a z něj se následně tvoří lanosterol jakožto prekurzor cholesterolu.

Místem syntézy steroidních hormonů jsou v buňkách mitochondrie a hladké endoplazmatické retikulum (Holst et al., 2004). Na přenosu cholesterolu přes mitochondriální membránu se podílí molekulární komplex, který je tvořen translokačním proteinem (TSPO), steroidním akutním regulačním proteinem (StAR), napětově závislým aniontovým kanálem (VDAC) a adenin nukleotidovým transportérem (ANT) (Porcu et al., 2016). Tento krok zajišťuje transport cholesterolu z vnější mitochondriální membrány na vnitřní (Melcangi et al., 2008).

V mnoha částech lidského mozku zahrnujících například čelní lalok, hipokampus a mozeček byla identifikována mRNA proteinu StAR (Inoue et al., 2002). StAR a TSPO limitují rychlost transportu cholesterolu do mitochondrií a podílí se tak na hormonální regulaci (Lavaque et al., 2006). StAR je protein o velikosti 37 kDa. Po rychlém přenosu do mitochondrií dochází k jeho štěpení a stává se neaktivní. TSPO je transmembránový protein o velikosti 18 kDa (Papadopoulos et al., 2006). Původně byl označován jako periferní nebo mitochondriální benzodiazepinový receptor. Ve větší míře se nachází ve tkáních, kde dochází k biosyntéze steroidů. V CNS je lokalizován především ve vnější mitochondriální membráně gliových buněk.

Na vnitřní mitochondriální membráně se nachází cytochrom P450 štěpící postranní řetězec cholesterolu (CYP450_{SCC}) (Lavaque et al., 2006). CYP450_{SCC} umožňuje přeměnu cholesterolu (27 atomů uhlíku) na PREG (21 atomů uhlíku) (Baulieu, 1998). V rámci imunohistochemické studie využívající specifické protilátky byla potvrzena přítomnost enzymatického komplexu CYP450_{SCC} v bílé hmotě mozečku člověka (Le Goascogne et al., 1989). Tento objev tedy naznačuje existenci steroidogenní aktivity v lidských oligodendrocytech. Při cíleném narušení genu kódujícího CYP450_{SCC} u myši je syntéza steroidů deficientní, což se projeví následnými problémy pohlavního vývoje, nerovnováhou hormonální homeostázy a narušením regulace genů (Hu et al., 2002).

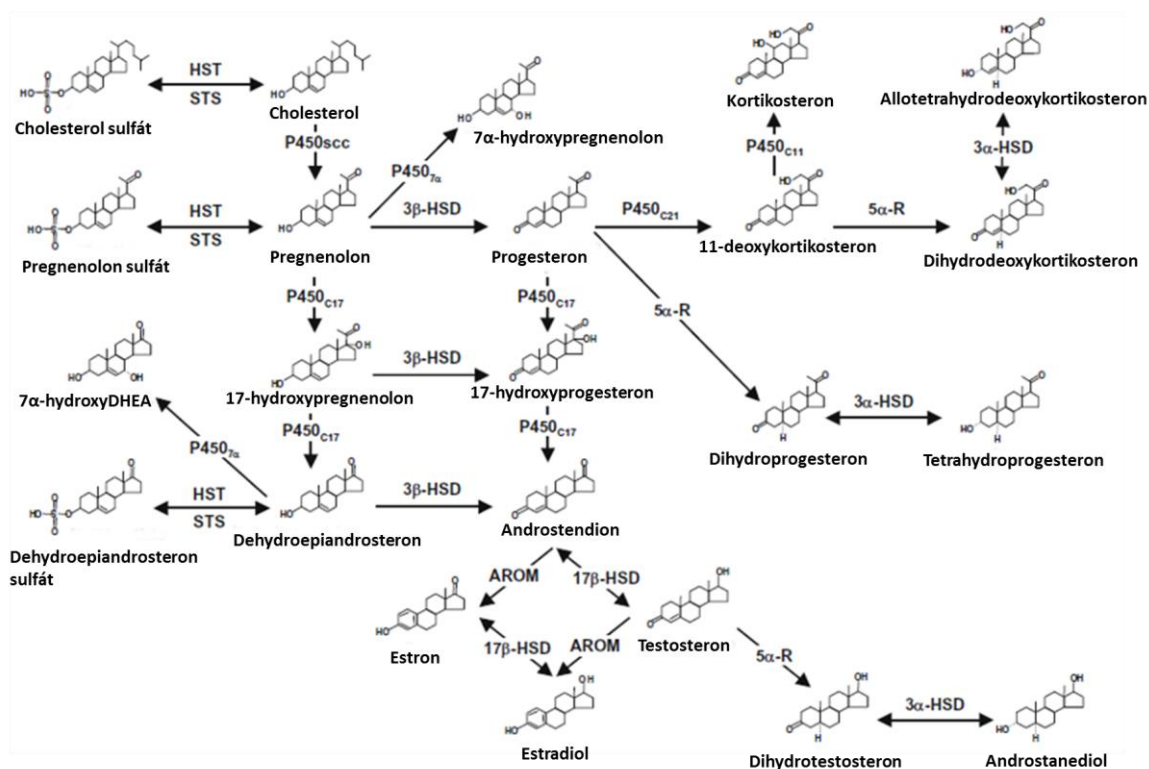
Vzniklý PREG následně difunduje do buněčného cytosolu, kde je dále metabolizován (Porcu et al., 2016). Enzymatickou konverzi Δ^5 -3 β -hydroxysteroidů (PREG, 17-hydroxypregnenolonu, DHEA) na Δ^4 -3-ketosteroidy (PROG, 17-hydroxyprogesteron, androstendion) katalyzuje mitochondriální enzymatický komplex 3 β -hydroxysteroid dehydrogenáza/ Δ^5 - Δ^4 -izomeráza (3 β -HSD) (Do Rego et al., 2009). V mozku potkanů byla prokázána přítomnost tohoto enzymu na úrovni mRNA i proteinů (Guennoun et al., 1995). Enzym 3 β -HSD je nepostradatelný pro další přeměnu PREG na PROG.

Dalším významným enzymatickým komplexem je cytochrom P450 17 α -hydroxyláza/17,20 lyáza (P450_{C17}), který se podílí na přeměně C₂₁ steroidů (PREG, PROG) na C₁₉ steroidy (DHEA, androstendion) (Mensah-Nyagan et al., 1999).

Mikrosomální NADPH-dependentní enzym 5 α -reduktáza (5 α -R) je zapojen zejména do přeměny PROG na α -redukovaný metabolit 5 α -dihydroprogesteron (5 α -DHP) a konverze T na 5 α -dihydrotestosteron (5 α -DHT) (Mensah-Nyagan et al., 1999). Reverzibilní konverze těchto 5 α -redukovaných steroidů 5 α -DHT na 3 α -androstadiol a 5 α -DHP na 3 α ,5 α -THP je zajištěna 3 α -hydroxysteroid dehydrogenázou (3 α -HSD) (Do Rego et al., 2009). Cytochrom P450 7 α -hydroxyláza (P450_{7 α}) katalyzuje konverzi steroidních prekurzorů na hydroxylované metabolity.

Na enzymatické přeměně androgenů C₁₉ (androstendion, T) na C₁₈ estrogeny (estron, estradiol) se podílí cytochrom P450 aromatáza (AROM) (Do Rego et al., 2009). Enzym 17 β -hydroxysteroid dehydrogenáza (17 β -HSD) je zapojen do biosyntézy a inaktivace steroidních hormonů, umožňuje přeměnu mezi 17-ketosteroidy (androstendion, estron) a 17 β -hydroxysteroidy (T, 17 β -estradiol) (Mensah-Nyagan et al., 1999).

Metabolická přeměna PREG na PREGS je katalyzována hydroxysteroid sulfotransferázou (HST) (Wang, 2011). Tento enzym rovněž zajišťuje konverzi DHEA na jeho sulfátový metabolit. Do biosyntézy se může rovněž zapojit sulfatáza (STS), které katalyzuje hydrolyzu sulfatovaných steroidů za vzniku nekonjugovaných steroidů (Mensah-Nyagan et al., 1999). Konjugace se sulfátem je obecně považována za cestu deaktivace, avšak vzniklé konjugáty mohou být reaktivnější než původní prekurzorové steroidy (Vallé, 2016). Mnoho funkcí mozku je regulováno pomocí PREGS. Schéma biosyntézy NAS v nervové tkáni savců je uvedeno na obrázku 4.



Obr. 4: Schéma biosyntézy NAS v savčím mozku (upraveno dle Do Rego et al., 2009). Cytochrom P450 21-hydroxyláza (P450_{c21}), cytochrom P450 11β-hydroxyláza (P450_{c11}).

2.3 Interakce neuroaktivních steroidů s receptory

NAS jsou schopny interagovat s různými typy receptorů, čímž je regulována celá řada procesů (Tuem a Atey, 2017). Patří mezi ně receptory pro γ -aminomáselnou kyselinu (GABA), *N*-methyl-D-aspartátové (NMDA) receptory, napětově řízené vápenaté kanály, VDAC, s mikrotubuly asociovaný protein 2 (MAP2) a mnoho dalších.

Pokud dochází k interakci steroidů s cytoplazmatickými nebo jadernými receptory, výsledný účinek steroidů se projeví za delší časový úsek (Holst et al., 2004). Tyto „klasické“ intracelulární receptory fungují jako transkripční faktory a jsou zapojeny do regulace transkripce genů, popisovaný účinek NAS je proto nazýván genomický (Reddy, 2010; Zheng, 2009). Limitujícím faktorem je v tomto případě rychlost biosyntézy proteinů (Wang, 2011). Řada metabolitů pohlavních hormonů a některých stresových hormonů nicméně působí v CNS nengenomickým mechanismem účinku. Výsledný efekt se dostaví do několika milisekund až sekund. Rychlé nengenomické účinky jsou zprostředkovány iontovými kanály a membránovými receptory (Reddy, 2010).

2.3.1 Intracelulární receptory

Mezi intracelulární receptory patří například estrogenové nebo progesteronové receptory, které mohou být aktivovány PROG a estradiolem (Carta et al., 2012). Progesteronové receptory jsou exprimovány v širokém spektru lidských tkání včetně mozku (Scarpin, 2009). Rovněž estrogenové receptory byly identifikovány v některých oblastech CNS (Taylor a Al-Azzawi, 2000).

Steroid $3\alpha,5\alpha$ -THP není pravděpodobně sám o sobě schopný působit na intracelulární steroidní receptory (Rupprecht et al., 1993). Jeho zapojení do regulace genové exprese je možné, a to v případě, pokud dojde k jeho intracelulární oxidaci na 5α -pregnanový metabolit 5α -DHP, který již vůči progesteronovým receptorům vykazuje aktivitu.

Existence specifických nukleárních receptorů pro DHEA a DHEAS nebyla dosud prokázána (Stárka et al., 2015). Genomický efekt může být však vyvolán, pokud dojde ke konverzi DHEA na T nebo 5α -DHT, jelikož se tyto steroidy již mohou vázat na adrogenní receptory. Možná je také transformace na estradiol a jeho interakce s estrogenovými receptory.

2.3.2 Membránové receptory

2.3.2.1 GABA receptory

Nejrozšířenějším inhibičním neurotransmiterem CNS obratlovců je GABA (Bormann, 2000). Tento neurotransmitter se podílí na regulaci neuronální dráždivosti ve všech oblastech mozku (Nutt a Malizia, 2001). K biosyntéze GABA dochází v presynaptických neuronech (Nutt, 2006). Vzniklý mediátor je následně uskladněn v synaptických vezikulách, odkud je po aktivaci neuronů uvolňován. Nervový systém zpracovává a uchovává informace pomocí synaptického přenosu (Vyklícký et al., 2014).

Výsledkem zvýšené GABAergní signalizace je zklidnění, ztráta paměti a porucha koordinace pohybů (Nutt a Malizia, 2001). Naopak při slabém útlumu GABAergního systému je vyvolána úzkost, nespavost a přehnaná reaktivita.

GABA receptory lze rozdělit na dvě hlavní skupiny, jsou to ionotropní GABA receptory typu A ($GABA_A$) a B ($GABA_B$) a metabotropní GABA receptory typu C ($GABA_C$) (Bormann, 2000). $GABA_B$ receptory jsou spřažené prostřednictvím G-proteinu s K^+ a Ca^{2+} iontovými kanály. $GABA_C$ receptory vytváří Cl^- kanály stejně

jako receptory GABA_A, od těchto receptorů se ale odlišují z hlediska jejich struktury, funkce, farmakologického působení a lokalizace.

Převládajícím typem GABA receptorů v mozku jsou GABA_A receptory (Nutt, 2006). Tyto receptory vznikají kombinací pěti proteinových podjednotek tvořících centrální Cl⁻ kanál (Blanco et al., 2018; Reddy, 2010). Znalost úplné sekvence genomu člověka a i jiných druhů obratlovců umožnila identifikovat 19 genů kódujících podjednotky GABA_A receptoru (Olsen a Sieghart, 2008). Označení těchto podjednotek je $\alpha 1-6$, $\beta 1-3$, $\gamma 1-3$, δ , ϵ , θ , π a $\rho 1-3$. GABA receptor typu A je obvykle tvořen dvěma kopiemi podjednotky α , dvěma kopiemi podjednotky β a buď podjednotkou γ nebo například δ (Olsen, 2018).

Jak již bylo zmíněno, GABA_A receptor je ligandem řízený iontový kanál, který může být aktivován GABA (Reddy, 2010; Reddy a Estes, 2016). Následné otevření iontového kanálu umožní příliv Cl⁻ iontů, přičemž dochází k hyperpolarizaci a omezení vedení akčního potenciálu.

NAS účinkují na tento receptor jako pozitivní nebo negativní modulátory, a to v závislosti na své chemické struktuře (Carta et al., 2012). Vlivem NAS působících jako pozitivní modulátory dochází ke zvýšení frekvence a prodloužení doby otevření iontového kanálu, čímž se zvýší přítok iontů a je potencován inhibiční GABAergní přenos. Nejúčinnější pozitivní modulátory se vyznačují 3 α -hydroxylovou skupinou a jednoduchou vazbou mezi uhlíky C₅ a C₆ (Park-Chung et al., 1999). Do této skupiny lze bezesporu zařadit 3 α ,5 α -THP. NAS se sulfátovou skupinou v poloze C₃ fungují jako negativní modulátory. Inhibiční účinek je dán negativním nábojem této skupiny. Příkladem negativních modulátorů je PREGS a DHEAS.

2.3.2.2 Glutamátové receptory

Aminokyselina L-glutamát je hlavním excitačním neurotransmiterem CNS obratlovců (Sattler a Tymianski, 2001). Převážná část excitačních neurotransmisí v savčím mozku je zprostředkována glutamátovými receptory, které se dělí do dvou typů, a to na ionotropní a metabotropní receptory (Hollmann a Heinemann, 1994). NMDA receptory, AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionová kyselina) receptory i kainátové receptory se řadí do skupiny ionotropních receptorů, což jsou ligandem řízené iontové kanály. Tuto skupinu receptorů doplňují ještě δ receptory (Traynelis et al., 2010). Ionotropní glutamátové receptory jsou rozděleny do těchto tříd

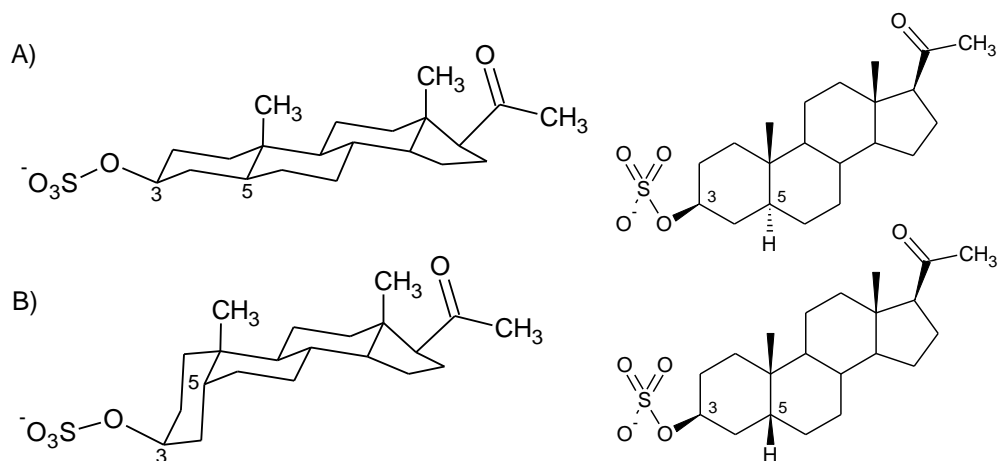
na základě farmakologických vlastností a strukturní homologie. Označení těchto receptorů bylo odvozeno od jejich agonistů, a to NMDA, kainátu a AMPA (Meldrum, 2000). Druhá skupina metabotropních receptorů je charakteristická svým spřažením s G-proteinem (Hollmann a Heinemann, 1994).

NMDA receptory jsou ligandem řízené iontové kanály, které jsou aktivovány L-glutamátem (VanDongen, 2009). Nadměrné uvolňování této aminokyseliny a aktivace glutamátových receptorů může být pro neurony toxická (Sattler a Tymianski, 2001). Tento patologický proces, nazývaný jako excitotoxicita, hraje zásadní úlohu v řadě neurodegenerativních poruch. Utlumení synaptického přenosu a aplikace antagonistů glutamátových receptorů má na nervový systém ochranný efekt.

NMDA receptor je složen ze čtyř podjednotek, které vytváří centrálně iontový kanál selektivní pro kationty (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) (Paoletti, 2011). Tyto podjednotky je možné přiřadit ke třem rodinám receptorových podjednotek, a to GluN1, GluN2 a GluN3. Nativní NMDA receptory jsou složeny ze dvou podjednotek GluN1, které jsou doplněny dvěma podjednotkami GluN2, dvěma GluN3 nebo jednou podjednotkou GluN2 a jednou GluN3 (Horák et al., 2006; Kořínek et al., 2011).

Velká část zájmu je věnována studiu NMDA receptorů z hlediska jejich úlohy v synaptické plasticitě, která souvisí s procesy učení a s pamětí (VanDongen, 2009). Tyto receptory se mimo to zapojují také do dalších kognitivních funkcí mozku, jako je třeba úzkost, strach, nálada a pozornost.

PREGS moduluje NMDA receptory pozitivně (Park-Chung et al., 1997). Všechny čtyři redukované deriváty PREGS jsou také zapojeny do modulace těchto receptorů. Steroidy pregnanolon sulfát ($3\alpha5\beta\text{S}$), allopregnanolon sulfát ($3\alpha5\alpha\text{S}$) a epipregnanolon sulfát ($3\beta5\beta\text{S}$) působí na NMDA receptory inhibičně, zatímco epiallopregnanolon sulfát ($3\beta5\alpha\text{S}$) odpověď těchto receptorů potencuje. Protichůdné účinky $3\beta5\alpha\text{S}$ a $3\beta5\beta\text{S}$ jsou založeny na rozdílné stereospecifitě uhlíku C_5 . Tvar steroidního skeletu molekul $3\beta5\alpha\text{S}$ a $3\beta5\beta\text{S}$ je zobrazen na obrázku 5.



Obr. 5: Srovnání chemické struktury a tvaru molekul 3β5αS (A) a 3β5βS (B).

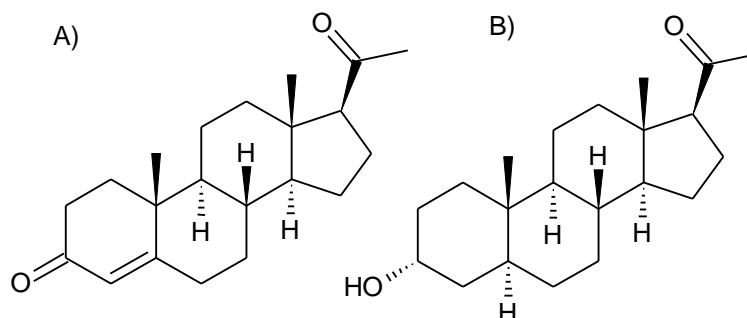
2.4 Vybraní zástupci neuroaktivních steroidů

2.4.1 Progesteron a allopregnanolon

PROG funguje v nervovém systému jako fyziologický regulátor reprodukce (Melcangi a Panzica, 2014). Tento NAS také reguluje vývoj neuronů a gliových buněk, proces myelinizace a jsou také známy jeho významné ochranné účinky během neurodegenerativních procesů (roztroušená skleróza [RS], Parkinsonova choroba atd.).

Terapeutické využití PROG a 3α,5α-THP je považováno za prospěšné při traumatickém poranění mozku, při potlačení edému, zánětu, apoptózy a pro zvýšení antioxidantní aktivity (Melcangi a Panzica, 2014). Vzhledem k určitým srovnávaným parametrům (apoptóza, ztráta neuronů atd.) je 3α,5α-THP účinnější než PROG. Bohužel je využití tohoto přirozeného NAS omezené vzhledem k jeho farmakokinetickým vlastnostem, jako je jeho nízká biologická dostupnost vzhledem k rychlé inaktivaci prostřednictvím konjugace s kyselinou glukuronovou nebo sírovou (Schüle et al., 2014). Další překážkou je možnost oxidace 3α-hydroxylové skupiny 3α,5α-THP, čímž dochází ke vzniku ketonu. Tento problém mohou vyřešit ligandy TSPO (Nothdurfter et al., 2012). TSPO je schopný podporovat syntézu NAS a stává se tak novým potencionálním cílem léčiv s anxiolytickými účinky, které nevyvolávají vedlejší účinky typické pro benzodiazepiny, jako je například sedace, abstinenční příznaky a vznik tolerance. Snížená hladina 3α,5α-THP v periferní krvi i mozkomíšním moku je asociována s úzkostnými poruchami, depresemi nebo například s negativními příznaky u schizofrenie (Melcangi a Panzica, 2014). Právě proto je 3α,5α-THP potencionálním

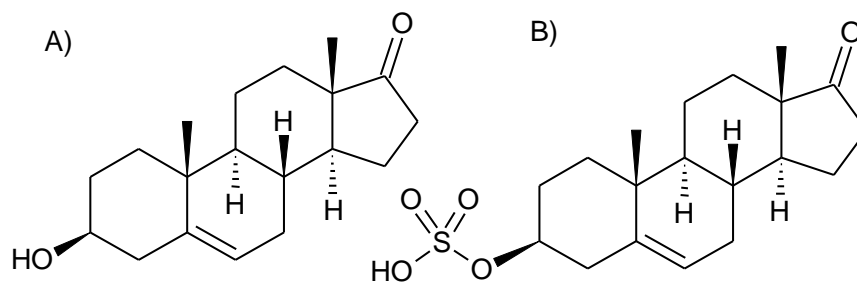
kandidátem pro terapii úzkostných poruch a nálad. Chemická struktura PROG a 3 α ,5 α -THP je uvedena na obrázku 6.



Obr. 6: Chemická struktura PROG (A) a 3 α ,5 α -THP (B).

2.4.2 Dehydroepiandrosteron a dehydroepiandrosteron sulfát

DHEA může sloužit jako substrát pro tvorbu T a produkci estrogenů (Stárka et al., 2015). S rostoucím věkem dochází k významnému snížení hladin cirkulujících hormonů DHEA a DHEAS (Labrie et al., 1997). Jejich chemické struktury jsou uvedeny na obrázku 7. DHEA je zapojen například do modulace funkce endotelu a redukce zánětu (Stárka et al., 2015). Tento steroid zlepšuje citlivost na inzulín, průtok krve, buněčnou imunitu, sexuální funkci, dále poskytuje neuroprotektivní účinky, zlepšuje kognitivní funkce a paměť. Sulfatovaná forma DHEAS vykazuje u lidí antidepresivní, neuroexcitační a neuroprotektivní vlastnosti a má rovněž vliv na paměť.



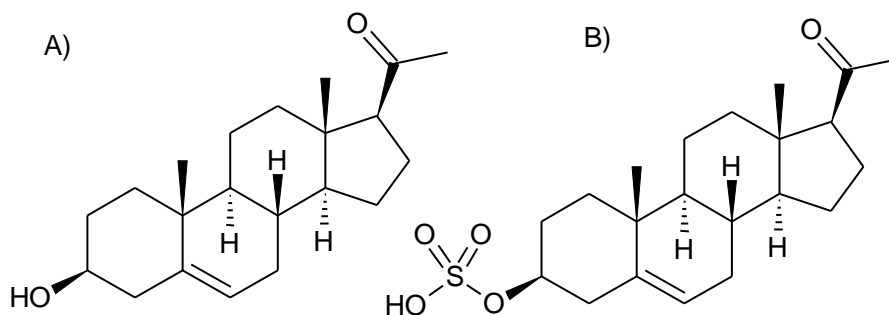
Obr. 7: Chemická struktura DHEA (A) a DHEAS (B).

2.4.3 Pregnenolon a pregnenolon sulfát

Na PREG je převážně pohlíženo jako na prekurzor dalších steroidů, sám je však aktivním steroidem (Vallé, 2016). Jedním z cílů PREG jsou intracelulárně lokalizované proteiny asociované s mikrotubuly (MAPs). Jejich rolí je kontrola rovnováhy mezi rigiditou a plasticitou neuronálních procesů a rovněž spoluurčují tvar neuronů.

Hlavní strukturální složkou cytoskeletu neuronů jsou mikrotubuly (Fontaine-Lenoir et al., 2006). Po vazbě PREG nebo také jeho syntetického analogu 3 β -methoxypregnenolonu na MAP2 dochází ke stimulaci polymerace mikrotubulů pocházejících z mozků krys a PC12 buněk. Předchozí aplikace PREG a 3 β -methoxypregnenolonu vykazuje následně ochranný efekt před působením nocodazolu, což je látka narušující mikrotubuly a způsobující smrštění neuritů.

PREGS je silným pozitivním modulátorem NMDA receptorů a negativním modulátorem GABA_A receptorů (Vallée et al., 2001). Některé NAS mohou hrát zásadní roli v procesech učení a paměti. Výše zmíněný PREGS je jedním z neúčinnějších steroidů zapojených do zvyšování paměti u hlodavců. Chemické struktury PREG a PREGS jsou ukázány na obrázku 8.



Obr. 8: Chemická struktura PREG (A) a PREGS (B).

2.5 Terapeutické využití neuroaktivních steroidů

Již ve 40. letech minulého století Hans Selye pozoroval anestetické a antikonvulzivní účinky u steroidních hormonů PROG a deoxykortikosteronu (Reddy a Estes, 2016). Skupina NAS se projevuje celou řadou psychofarmakologických účinků (Porcu et al., 2016). Odstraňují úzkost, působí sedativně, antidepresivně, anesteticky, analgeticky a mají amnestický efekt (vyvolávají ztrátu paměti). Tyto účinky jsou pravděpodobně zapříčiněny působením NAS na GABA_A receptory.

Některé NAS vykazují také ochranný účinek na nervovou soustavu, tzv. neuroprotekcí (Melcangi et al., 2016). Rozdíly v hladinách NAS jsou mezi muži a ženami patrné jak za fyziologických, tak patologických stavů (např. Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, RS atd.). Velká část těchto onemocnění navíc vykazuje nerovnoměrnou distribuci mezi pohlavími. Například riziko rozvoje Alzheimerovy choroby je vyšší u žen (Andersen et al., 1999), naproti tomu se ukazuje, že Parkinsonova choroba postihuje častěji muže (Wooten et al., 2004). RS, stejně jako

většina ostatních autoimunitních onemocnění, se mnohem častěji vyskytuje u žen (Gleicher a Barad, 2007). Tyto poznatky směřují k možnému vývoji terapeutických strategií, které by byly specifické pro dané pohlaví (Melcangi et al., 2016).

Rozdíly v neuroprotektivních účincích byly zjištěny například u PROG, který byl podáván 4 týdny starým myším s řízeným poškozením mozku (Mannix et al., 2014). U samců došlo ke zlepšení motoriky, naproti tomu u samic docházelo ke zhoršení. Tento experimentální model byl vytvořen vzhledem k potencionálnímu využití PROG při traumatickém poškození mozku u pediatrických pacientů.

Velice významným objevem je prokázání protinádorového působení PROG u experimentálních modelů multiformního glioblastomu, což je nejběžnější agresivní maligní nádor mozku u dospělých s průměrným přežíváním 13–15 měsíců (Atif et al., 2015). Tato oblast vyžaduje další studium, nicméně využití samotného PROG nebo jeho kombinace s chemoterapií, radioterapií a chirurgickým odstraněním nádoru by mohlo prodloužit přežití pacientů a zlepšit kvalitu jejich života.

U NAS $3\alpha,5\alpha$ -THP byly popsány anestetické, sedativní, neuroprotektivní a antikonvulzivní vlastnosti (Monagle et al., 2015). Přímé terapeutické použití $3\alpha,5\alpha$ -THP má jistá omezení, jako je krátký biologický poločas, nízká biologická dostupnost, omezení perorálního podání vzhledem ke špatné rozpustnosti ve vodném prostředí, vývoj tolerance a vedlejší účinky, jako sedace, poruchy paměti a potencionální vývoj závislosti (Porcu et al., 2016).

Klinické využití syntetických analogů některých NAS skýtá v porovnání s přirozenými endogenními steroidy několik výhod, jako je jejich lepší biologická dostupnost a zejména delší biologický poločas, jelikož jsou tyto analogy pomaleji inaktivovány a eliminovány prostřednictvím konjugace s kyselinou glukuronovou nebo sírovou (Reddy a Estes, 2016).

V rámci probíhajících klinických studií je v současné době hodnocena účinnost řady NAS využitelných pro terapii různých onemocnění CNS (epilepsie, syndrom fragilního X, traumatické poranění mozku atd.) (Blanco et al., 2018). Některá vyvinutá léčiva, která se dostala až do fáze klinického hodnocení, však musela být vzhledem k nežádoucím účinkům stažena.

2.6 Metody analýzy steroidních látek

V posledních letech se těší velkému zájmu obor metabolomika (Dunn et al., 2005; Wojtowicz et al., 2013). Toto odvětví se zabývá komplexní analýzou veškerých intracelulárních a extracelulárních metabolitů v biologickém vzorku v konkrétním čase za daného stavu. Termín metabolom označuje soubor veškerých nízkomolekulárních látek (tzv. metabolitů) přítomných v buňce nebo organismu, kde se účastní metabolických dějů důležitých pro růst a udržování fyziologických funkcí. Působením mnoha vnitřních i vnějších faktorů je ovlivňován metabolický stav člověka (Goodacre, 2007). Mezi tyto faktory patří například lidský genotyp, věk, zdravotní stav, výživa, fyzická aktivita, léky, stres atd. Metabolom je tedy značně ovlivněn aktuálním stavem zkoumaného systému a je velmi dynamický (Wojtowicz et al., 2013).

Jednou ze strategií metabolomiky je tzv. metabolické profilování, zabývající se identifikací a kvantifikací metabolitů, které jsou chemicky příbuzné nebo jsou zapojeny v konkrétní metabolické dráze (Dunn et al., 2005). V současné době je k dispozici celá řada technik umožňujících analýzu nízkomolekulárních látek, a tedy i steroidů, které se mezi ně řadí (Fojtíková et al., 2015). Profilování steroidů v moči za účelem diagnostiky poruch syntézy a metabolismu steroidních hormonů je prováděno již od 60. let minulého století (Krone et al., 2010). V této době byla již technika plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC–MS) dostatečně pokročilá (Taylor et al., 2015). Vědci a lékaři více než 40 let široce využívali při analýze steroidních hormonů metody imunoanalýzy (IA). V posledních letech se pohled soustřeďuje na hmotnostní spektrometrii (MS), která vyniká svou specificitou.

Tato kapitola shrnuje metody analýzy steroidních látek, a tudíž i NAS s důrazem na imunoanalytické metody a využití GS–MS a kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LC–MS).

2.6.1 Imunoanalytické metody

Široce používanými technikami v rutinních diagnostických laboratořích byly metody IA, jejichž použití má ale jistá omezení (Krone et al., 2010). Největší překážkou těchto metod je křížová reaktivita, která může mít vliv na specificitu analýzy. Tyto metody jsou založeny na interakci mezi protilátkou a v tomto konkrétním případě steroidem. Steroidní látky mohou být velmi strukturně podobné, a mohou tedy i křížově reagovat

(Hansen et al. 2011). Některé komerčně dostupné testy pro stanovení PROG mohou vykazovat křížovou reaktivitu s PREG kolem 60 % (Hecker et al., 2006). Bylo zjištěno, že u mnoha platforem vytvořených pro analýzu T dochází k interferenci s DHEAS (Middle, 2007). Imunoanalytické metody jsou upřednostňovány především kvůli své jednoduchosti, menší cenové náročnosti a dostupnosti komerčních aplikací (Taylor et al., 2015).

Steroidy lze analyzovat také pomocí radioimunoanalýzy (RIA) (Valle'e et al., 1997). Ačkoli je tato metoda analýzy steroidů i sterolů vysoce citlivá, není dostatečně specifická (Wang et al., 2007). Navíc je nutné před vlastní analýzou definovat stanovované analyty. Při analýze steroidů lze také uplatnit enzymovou imunoanalýzu (EIA), konkrétně metodu ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) (Hecker et al., 2006). Další nevýhodou metod RIA a ELISA je jejich časová náročnost (Hansen et al. 2011). Konvenční testy RIA pro stanovení steroidních hormonů v séru (např. estradiol, PROG, T) vyžadovaly předchozí purifikační kroky (Stanczyk et al., 2018). V klinických laboratořích byly později běžně využívány přímé testy jako chemiluminiscenční imunoanalýza (CIA) bez předchozí purifikace, která umožňovala automatizaci.

2.6.2 Chromatografické techniky ve spojení s hmotnostní spektrometrií

Steroidy jsou dnes běžně stanovovány chromatografickými metodami, jako je plynová chromatografie (GC) nebo kapalinová chromatografie (LC), v různých biologických maticích (Fojtíková et al., 2015). Nutné je jejich spojení s vhodným detekčním systémem. Požadavky kladené na analýzu splňuje spojení LC nebo GC s detekcí pomocí MS nebo tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS). Novější generace těchto metod mají v porovnání s IA lepší specifitu, limity kvantifikace a dobrou linearitu i při nízkých koncentracích (Krone et al., 2010). Náhrada imunoanalytických technik MS je ve všech laboratořích nereálná (Taylor et al., 2015). Zavedení MS je velice nákladné, technicky náročné a vyžaduje speciální instrumentaci. Výrobci se proto snaží vyvinout uživatelsky přívětivější a dostupnější hmotnostní spektrometry, které budou použitelné i v klinických laboratořích.

2.6.2.1 Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií

Vzhledem k náročnější preanalytické fázi GC–MS je v klinických laboratořích ke stanovení jednotlivých steroidů nebo jejich skupiny upřednostňována metoda kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC–MS/MS) (Taylor et al., 2015). Jedním z omezení této metody je nutnost cíleného stanovení analytů (Krone et al., 2010). Velmi obtížná je také strukturní charakterizace nových steroidů. Jednoznačnou výhodou LC–MS/MS je významné snížení objemu vzorku v porovnání s IA. Tato metoda je velice rychlá, specifická a nevyžaduje hydrolýzu konjugátů ani chemickou derivatizaci.

Metody LC–MS jsou kompatibilní s ionizací za atmosférického tlaku (API), díky čemuž lze analyzovat intaktní konjugáty (Wang et al., 2007). Běžně používanými ionizačními technikami pro detekci steroidních látek jsou ionizace prostřednictvím elektrospreje (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) (Shackleton, 2008). Využití ESI je vhodné pro polární molekuly a konjugáty steroidů. U méně polárních látek je vyžadována derivatizace nebo chemická modifikace, čímž je dosažena stejná citlivost jako u APPI a APCI. Příkladem může být derivatizace nekonjugovaných oxosteroidů pomocí hydroxylamin hydrochloridu na jejich oximy (Liu et al., 2003). Ionizační techniky APPI a APCI jsou vhodné pro nekonjugované steroidy (Shackleton, 2008). V tomto případě není nutná derivatizace.

Postupné zlepšování systémů vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a zavedení MS/MS vede k postupnému vytlačování GC–MS (Taylor et al., 2015). Metoda HPLC není omezena pouze jediným mechanismem separace a lze ji tedy využít k separaci velice rozmanitých analytů (Wojtowicz et al., 2013). Může se jednat o sloučeniny hydrofilní, hydrofobní, soli, kyseliny nebo zásady. Vzhledem k relativně nízké účinnosti HPLC byla vyvinuta nová metoda ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC). Sosvorová et al. vytvořili metodu ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UHPLC–MS/MS) ke stanovení vybraných neurosteroidů a steroidů s imunomodulačním účinkem v lidském mozkomíšním moku a krevní plazmě (Sosvorová et al., 2015). V této studii prováděli kvantifikaci volného DHEA, jeho vybraných metabolitů, kortizolu a kortizonu s cílem lépe porozumět degenerativním

onemocněním. U vzorku byla provedena extrakce diethyletherem a derivatizace s 2-hydrazinopyridinem. K ionizaci byla v této studii použita technika ESI.

Ceglarek et al. vyvinuli novou metodu, která kombinuje online extrakci na pevné fázi a kapalinovou chromatografii ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (Ceglarek et al., 2009). Pracovali s APCI. Tento analytický přístup je spolehlivý, rychlý, citlivý a lze jej využít pro diagnostiku a sledování vývoje endokrinních onemocnění.

2.6.2.2 Plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií

GC–MS byla využívána již v 60. letech minulého století ke zkoumání steroidů v biologických matricích (Eneroth et al., 1964; Taylor et al., 2015). Tuto metodu například využil Eneroth et al. (1964) ke stanovení steroidů ve stolici. Metoda GC–MS je převážně využívána k analýze metabolitů steroidních hormonů a jejich prekurzorů (Krone et al., 2010). Je vyžadováno odstranění konjugovaných skupin a derivatizace zbývajících polárních funkčních skupin, která vede ke zvýšení tepelné stability a těkavosti analytu (Wang et al., 2007). Derivatizace zpravidla řídí MS fragmentaci, což umožňuje určit umístění funkčních skupin na molekule steroidu (Krone et al., 2010). GC se ve srovnání s LC vyznačuje lepším chromatografickým rozlišením. Chromatografické rozlišení lze vylepšit za použití malých částic při chromatografické separaci. Běžně využívaným typem ionizace je elektronová ionizace (EI) (Shackleton, 2008).

Profilování steroidů v moči pomocí GC–MS a plynové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (GC–MS/MS) je vhodným nástrojem pro objev nových steroidů, jejich identifikaci a získávání nových znalostí využitelných pro diagnózu metabolických poruch (Christakoudi, 2010; Taylor et al., 2015).

Hansen et al. vytvořili metodu GC–MS/MS pro stanovení devíti steroidních hormonů (PREG, PROG, DHEA, androstendion, T, 5 α -DHT, estron, 17 α -estradiol a 17 β -estradiol) v krvi, krevní plazmě a séru, která byla úspěšně použita k analýze vzorků některých obratlovců (Hansen et al. 2011). Zjištěné výsledky na závěr porovnali se závěry pracovních skupin využívajících RIA a potvrdili křížovou reaktivitu mezi progestageny (PROG, PREG).

Pro analýzu sterolů o nízkých koncentracích v komplexních vzorcích lze využít tzv. kompletní dvourozměrnou plynovou chromatografii (GC \times GC) (Mitreviski et al.,

2008). Ve srovnání s jednorozměrnou GC nabízí lepší separační účinnost a signál. Mitrevski a spolupracovníci zkoumali využitelnost GC×GC ve spojení s MS pro analýzu sterolů přítomných v lidské moči (Mitrevski et al., 2008). Nadějně je použití tohoto systému pro screening, kvantifikaci a potvrzení sterolů v komplexních maticích. Nízké detekční limity by umožnily využití pro dopingové kontroly.

2.7 Roztroušená skleróza

Roztroušená skleróza (RS) se řadí mezi chronická zánětlivá autoimunitní onemocnění CNS, které může progredovat a vyústit těžkým postižením (Loma a Heyman, 2011). Toto onemocnění je typické demyelinizací a postihuje šedou i bílou hmotu mozku a míchy (Inglese a Petracca, 2015). Demyelinizační onemocnění je možné charakterizovat vznikem sklerotické léze během procesu, který zahrnuje zánět, demyelinizaci, remyelinizaci, úbytek oligodendrocytů, astrocytózu, degeneraci neuronů a axonů (Compston a Coles, 2008). Ztráta oligodendrocytů je zásadní, jelikož se zralé oligodendrocyty zapojují do syntézy myelinu. Právě myelinová pochva obklopující axony je důležitá pro přenos informací mezi jednotlivými oblastmi CNS (Huang et al., 2017).

2.7.1 Základní informace

Toto onemocnění je označováno za nejčastější příčinu zdravotního postižení mladých lidí a lidí ve středním věku žijících ve vyspělých zemích (Koch-Henriksen a Sørensen, 2010). K jejímu propuknutí nejčastěji dochází mezi 20. a 40. rokem života (Rolak, 2003). U méně než 1 % případů je RS zjištěna v dětství, po 50. roce života bývá diagnostikována u 2 až 10 % (Ghasemi et al., 2017).

Podle dostupných informací trpělo touto nemocí v roce 2013 zhruba 2,3 milionů lidí na celém světě (Browne et al., 2014). Podíl mužů a žen je mezi pacienty s RS odlišný (Ahlgren et al., 2011). Mnohem častěji tímto onemocněním trpí ženy, což je patrné například ze studie provedené ve Švédsku, kde poměr mezi ženami a muži činil 2,35:1. Z dostupných dat vyplývá, že v letech 2008 až 2009 převyšovala prevalence RS v České republice 160 nemocných na 100 000 obyvatel (Vachová, 2012). Dalším epidemiologickým ukazatelem je incidence, která dosahovala v České republice 11,7 nových případů na 100 000 obyvatel za rok. Tato hodnota byla určena z nárůstu

nemocných mezi lety 2000 až 2007. Obecně ve světě dochází k růstu prevalence. Příčinou tohoto efektu může být zlepšení diagnostických technik, které následně vedou k účinnějšímu zachytu pacientů. Rostoucí prevalence tohoto onemocnění je také výsledkem prodlužující se doby života pacientů s RS (Koch-Henriksen a Sørensen, 2010). V mnoha oblastech světa dochází pravděpodobně ke skutečnému zvýšení výskytu RS, a to zejména u žen, což zvyšuje již zmiňovaný poměr onemocnění mezi muži a ženami. Další studie by se tedy měly zaměřit na změny v životním stylu žen za poslední desetiletí.

Ze studie, která probíhala v Dánsku, vyplývá, že střední doba přežití je u pacientů s RS přibližně o 10 let nižší ve srovnání s věkově odpovídající kontrolní skupinou (Brønnum-Hansen et al., 2004). U více než poloviny případů je základní příčinou úmrtí RS.

2.7.2 Klasifikace a příznaky roztroušené sklerózy

Z hlediska klinického průběhu lze RS dále rozdělit do čtyř odlišných typů, kterými jsou relaps-remitentní RS (RR-RS), primárně-progresivní RS (PP-RS), sekundárně-progresivní RS (SP-RS) a relaps-progredientní RS (RP-RS) (Dargahi et al., 2017).

Podtyp RR-RS je provázen nepředvídatelnými akutními záchvaty tzv. relapsy, které jsou střídány obdobím remise s částečným nebo úplným zotavením (Weiner, 2008). Jedná se o nejběžnější formu, která je diagnostikována přibližně u 85 % pacientů. Akutní záchvat je spojen se vznikem lézí v CNS, které se následně mohou projevit poruchami zraku, únavou, brněním, necitlivostí, zvýšeným svalovým napětím, dysfunkcemi močového a střevního systému nebo poruchami paměti a učení (Ghasemi et al., 2017).

Tento podtyp RS může přecházet v SP-RS, k čemuž dojde téměř u 65 % pacientů s RR-RS (Compston a Coles, 2008). Projevuje se zvýšenou slabostí, poruchami střev a močových cest, únavou, ztuhlostí a psychickými poruchami (Ghasemi et al., 2017).

U některých pacientů však dochází k postupnému rozvoji této formy od počátku a bez relapsů (Miller a Leary, 2007). V tomto případě se jedná o PP-RS. Forma PP-RS je diagnostikována přibližně u 10 až 15 % pacientů (Ghasemi et al., 2017). K typickým projevům patří slabost, problémy s chůzí a rovnováhou. Tato forma RS nastupuje zhruba o 10 let později než RR-RS (průměrně po 40. roce života) (Miller a Leary, 2007).

Nejméně častým typem diagnostikovaným přibližně u 5 % pacientů je RP-RS (Ghasemi et al., 2017). Může se u něj projevovat například bolest oka, dvojitě vidění, závratě, deprese a rovněž dysfunkce střevního, močového a také pohlavního systému. RP-RS je charakteristická akutními relapsy, během období mezi relapsy dochází k progresi onemocnění (Miller a Leary, 2007).

Chronické progresivní formy jsou charakterizovány postupně se rozvíjejícím neurologickým postižením v průběhu měsíců až let (Miller a Leary, 2007). Přibližně 50 % pacientů s RS může během života postihnout závažná deprese (Feinstein, 2004).

Průběh RS je u mužů závažnější a doba nutná k dosažení těžkého postižení je kratší než u žen (Kipp et al., 2012). Stejně tak je výskyt kognitivní poruchy častější u mužů. Rozdílné projevy RS u mužů a žen jsou v neposlední řadě založeny na pohlavních rozdílech ve steroidních hormonech, které působí na imunitní systém a rovněž i na buňky CNS.

Období těhotenství, a to zejména třetí trimestr, je u pacientek s RS spojen s poklesem frekvence relapsů (Confavreux et al., 1998). Nicméně byl v této studii rovněž pozorován zvýšený výskyt atak během následujících tří měsíců po porodu ve srovnání s frekvencí relapsů v průběhu roku před těhotenstvím (Confavreux et al., 1998). Tato období jsou spojena s významnými změnami v hladinách cirkulujících hormonů (Kipp et al., 2012). Pokročilejší těhotenství je charakteristické vysokými hladinami PROG a estrogenů, po porodu dochází k jejich poklesu.

2.7.3 Etiologie roztroušené sklerózy

K rozvoji tohoto onemocnění přispívá velké množství faktorů. Patří mezi ně například genetické predispozice, virové mimikry, nedostatek vitamínů a minerálů a geografická poloha (Dargahi et al., 2017). Jedním z diskutovaných faktorů zvyšující riziko RS je také kouření (O’Gorman et al., 2014).

Geografická distribuce RS je odlišná (Compston a Coles, 2008). V oblasti rovníku dosahuje prevalence obecně nejnižších hodnot a s rostoucí vzdáleností na sever nebo na jih od něj se prevalence zvyšuje. Existují však oblasti, které se tomuto pravidlu vymykají. S nástupem RS je také spojována expozice virům či bakteriím, konkrétně viru Epstein-Barrové, lidskému herpes viru typu 6 a bakterii *mycoplasma pneumonia* (Ghasemi et al., 2017). Dalším velice významným faktorem je nedostatek ultrafialového (UV) záření, které zodpovídá i za endogenní tvorbu vitamínu D (Sloka et al., 2011).

Přiměřená expozice UV záření a dostatečné množství vitamínu D se jeví jako klíčové faktory snižující riziko vzniku RS. Vitamín D je možné vzhledem k jeho zapojení ve vývoji a fungování mozku zařadit mezi NAS (Kalueff a Tuohimaa, 2007).

2.7.4 Patogeneze roztroušené sklerózy

Za účelem studia RS z hlediska terapie a patogenese byl pro toto onemocnění vytvořen experimentální zvířecí model, a to tzv. experimentální autoimunitní encefalomyelitida (Constantinescu et al., 2011).

Během tohoto onemocnění dochází k infiltraci lymfocytů do CNS a v konečném důsledku k poškození myelinu a axonů (Compston a Coles, 2008). Na vzniku lokálního zánětu v CNS se podílí autoreaktivní lymfocyty, které pronikají skrze hematoencefalickou bariéru (Huang et al., 2017). Jedná se o aktivované CD4⁺ lymfocyty T (pomocné T-lymfocyty), které jsou reaktivní vůči myelinu CNS (Garg a Smith, 2015). Svou roli zde mohou hrát také B-lymfocyty, které jsou schopny produkovat autoprotilátky a plnit roli antigen-prezentujících buněk.

Předpokládá se, že na počátku tohoto patologického procesu dochází k poruše imunologické tolerance vůči myelinu a jiným autoantigenům CNS (Garg a Smith, 2015). Tato porucha může být u geneticky náchylných jedinců iniciována enviromentálním faktorem, a to například infekčním agens. T-lymfocyty mohou být na periférii aktivovány infekčním antigenem (např. virovým) nebo superantigenem, které mohou mít molekulární podobnost s některým antigenem přítomným v CNS (Constantinescu et al., 2011). Tento efekt je nazýván molekulárními mimikry. Díky této zkřížené reakci jsou na periférii aktivovány T-lymfocyty, které jsou reaktivní vůči některé složce myelinu (např. myelinový bazický protein) (Garg a Smith, 2015). Tyto autoreaktivní T-lymfocyty (primárně Th1 a Th17) sekretují cytokiny a aktivují zánětlivou kaskádu, jejímž výsledkem je demyelinizace a poškození axonů (Dargahi et al., 2017).

Následně jsou schopny migrovat přes hematoencefalickou bariéru prostřednictvím interakcí integrinů přítomných na povrchu T-lymfocytů (VLA-4) s adhezivními molekulami exprimovanými na endoteliích kapilár (VCAM-1) (Garg a Smith, 2015). Tento proces je dále usnadněn expresí dalších adhezivních molekul, chemokinů a matrixových metaloproteináz. Buňky prezentující antigen v CNS předkládají autoantigeny periferně aktivovaným autoreaktivním T-lymfocytům, čímž

dojde k jejich reaktivaci. Následná zánětlivá kaskáda je doprovázena sekrecí cytokinů a chemokinů a přílivem dalších buněk imunitního systému. Autoreaktivní T-lymfocyty a protilátky mohou rozpoznávat i další složky myelinové pochvy, jako je například myelinový oligodendrocytární glykoprotein a proteolipidový protein (Dargahi et al., 2017).

Do CNS mohou rovněž pronikat protilátky nebo B-lymfocyty, které je mohou po diferenciaci na plazmatické buňky samy produkovat a přispívat tak k zánětlivé demyelinizaci a neurodegeneraci (Constantinescu et al., 2011). Neurony a oligodendrocyty mohou být přímo poškozovány CD8⁺ T-lymfocyty (cytotoxické T-lymfocyty) (Garg a Smith, 2015).

2.7.5 Diagnostika roztroušené sklerózy

Vzhledem k finanční náročnosti této léčby je nutné minimalizovat riziko nesprávné diagnózy (Freedman et al., 2005). Na tento aspekt je kladen velký důraz i z hlediska pacientů, jelikož tato diagnóza vyvolává veliké zděšení.

Pro usnadnění diagnostiky RS jsou v současné době ve výzkumu i klinické praxi využívaná diagnostická kritéria podle McDonalda, jejichž nejnovější verze pochází z roku 2017 (Thompson et al., 2018). Tato kritéria kombinují nálezy klinické, zobrazovací i laboratorní, jelikož neexistuje pouze jediný charakteristický klinický příznak nebo diagnostický test. Integrace těchto přístupů umožňuje včasnější, citlivější a specifitější určení diagnózy.

Prvním vodítkem, které může napomoci k diagnóze, je výskyt určitých klinických příznaků RS (Brownlee et al., 2017). Při podezření na RS je nutné podstoupit neurologické vyšetření. RS se může manifestovat širokou škálou neurologických příznaků, jelikož rozložení lézí v CNS může být velmi variabilní (Huang et al., 2017). Nicméně typickými příznaky jsou porucha smyslů, dysfunkce močového měchýře, kognitivní poruchy, jednostranná ztráta zraku, dvojité vidění, slabost končetin, porucha koordinace pohybů (ataxie), únava a střevní potíže.

Zásadním bodem diagnostiky je znalost pacientovy anamnézy, a to zejména výskyt předchozích neurologických příznaků, které by naznačovaly dřívější ataku (Brownlee et al., 2017). Pokud jsou zaznamenány klinické příznaky signalizující RS, je prospěšné provést vyšetření magnetickou rezonancí (MRI), které umožní vyloučit jiná neurologická onemocnění. MRI umožňuje vysoce citlivou detekci lézí v CNS.

K podpoře diagnózy může být využita analýza mozkomíšního moku. Přítomnost dvou nebo více oligoklonálních páسů IgG v mozkomíšním moku a jejich nepřítomnost v krevním séru signalizuje intratekální syntézu protilátek (Thompson et al., 2018). Pro prokázání intratekální syntézy protilátek je tento test spolehlivější než určení indexu IgG. Pokud má pacient typické klinické a MRI nálezy, není obvykle nutné provádět odběr mozkomíšního moku (Brownlee et al., 2017). Dalším podpůrným diagnostickým nástrojem může být testování evokovaných potenciálů. Tato vyšetřovací metoda je založena na snadném a neinvazivním zaznamenání neuro-elektrických reakcí na senzorní podněty (Walsh, 2005).

V literatuře je často zmiňován tzv. klinicky izolovaný syndrom, což je první neurologická epizoda trvající alespoň 24 hodin se symptomy a objektivními nálezy svědčícími pro zánětlivou demyelinizační příhodu v CNS bez přítomnosti horečky a infekce (Thompson et al., 2018). Již v tomto okamžiku může být diagnostikována RS, a to za předpokladu, je-li potvrzeno rozšiřování v prostoru a v čase a jsou-li vyloučena jiná onemocnění. Klinicky izolovaný syndrom byl v tomto případě první atakou choroby.

2.7.6 Terapie roztroušené sklerózy

Do počátku 90. let dvacátého století byla léčba RS omezena na užívání kortikosteroidů a silných imunosupresivních látek, jako je cyklofosfamid nebo metotrexát (Eckstein a Bhatti, 2016). Přelomem bylo schválení prvního léčiva modifikujícího průběh choroby (DMD) agenturou FDA, což byl interferon β 1b pro léčbu RR-RS. Tuto skupinu přípravků aplikovaných intramuskulárně, subkutánně a intravenózně doplnilo v roce 2010 perorálně podávané léčivo fingolimod.

Současné terapeutické možnosti neumožňují plné vyléčení RS nebo obnovu již vzniklého poškození, a proto je velmi důležité zahájit léčbu ve fázi, kdy ještě nedošlo k závažnějšímu poškození (Loma a Heyman, 2011). Velkým průlomem pro relabující formy RS byla DMD (např. interferon β , glatiramer acetát, mitoxantron, natalizumab atd.). K léčbě primární progresivní formy RS nebylo agenturou FDA k roku 2011 schváleno žádné léčivo.

Terapie RS si obecně klade za cíl snížit počet relapsů a zabránit progresi dalšího postižení (Inglese a Petracca, 2015). Zjednodušeně lze tyto terapeutické intervence z hlediska doby trvání rozdělit na krátkodobé a dlouhodobé. Krátkodobá terapie je

důležitá při akutních relapsech. Toto akutní vzplanutí RS je obvykle řešeno aplikací adrenokortikotropního hormonu (kortikotropinu) nebo kortikosteroidů (např. methylprednisolon) (Myhr a Mellgren, 2009). Krátkodobé perorální nebo intravenózní podávání methylprednisolonu vede k urychlení zotavení z relapsů.

Dlouhodobá terapie umožňuje stabilizaci onemocnění a je založena zejména na přístupech potlačujících zánět (Inglese a Petracca, 2015). Hledání účinných terapeutických strategií cílících na zánětlivou, ale zejména na neurodegenerativní fázi onemocnění zůstává i nadále výzvou. K dlouhodobé terapii jsou využívány tzv. DMD.

Již zmíněný interferon β je schopný snižovat množství relapsů a omezovat progresi onemocnění (Loma a Heyman, 2011). Tato terapie pomocí interferonu β se ale také pojí s možným vznikem nežádoucích účinků, ke kterým patří například zánět v místě vpichu, příznaky podobné chřipce a možný rozvoj deprese. U pacientů podstupujících tuto terapii musí být vyšetřován krevní obraz a funkce jater.

Součástí terapie RS obvykle bývají i rehabilitace (Inglese a Petracca, 2015). RS doprovází celá škála symptomů ovlivňujících kvalitu života (poruchy nálady, křeče, inkontinence atd.) (Eckstein a Bhatti, 2016). Samozřejmostí je tedy i jejich tlumení.

3 Praktická část

3.1 Materiál a vybavení

3.1.1 Laboratorní přístroje a pomůcky

Centrifuga Heraeus™ Multifuge™ X1R (Thermo Scientific, USA)

Dusíková odparka TurboVap® Classic LV (Biotage, Švédsko)

Rotátor SB3 (Stuart, Velká Británie)

Stolní centrifuga MiniSpin® (Eppendorf, Německo)

Třepačka WIZARD IR Infrared Vortex Mixer (VELP Scientifica, Itálie)

Ultrazvuková lázeň SONOREX RK 510S (Bandelin, Německo)

Kapalinový chromatograf Acquity™ Ultra Performance LC (Waters, USA)

Hmotnostní spektrometr Xevo™ TQ-S (Waters MS Technologies, Velká Británie)

Chromatografická kolona KINETEX® Biphenyl (2,1 x 100 mm; velikost částic 1,7 µm)
(Phenomenex, USA)

Systém na úpravu vody Direct-Q® 3 UV Water Purification System (Merck Millipore, Německo)

Micro-Spin Filtry 0,2 µm NY (Grace Davison Discovery Sciences, USA)

Laboratorní sklo

3.1.2 Softwarové vybavení

MassLynx™ (Waters, USA)

TargetLynx™ (Waters, USA)

3.1.3 Chemikálie

Standardy konjugátů pregnanolonu s aminokyselinami:

Pregnanolon glutamát

Pregnanolon argininát

Pregnanolon aspartát

Pregnanolon norvalinát

Tyto standardy byly připraveny a poskytnuty Ústavem organické chemie a biochemie v Praze.

Standardy steroidů (Sigma-Aldrich, USA):

Progesteron (PROG)

Pregnenolon (PREG)

Allopregnanolon ($3\alpha5\alpha$ -THP)

Testosteron (T)

Dehydroepiandrosteron (DHEA)

Izotopicky značené interní standardy (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., USA):

[$^{13}\text{C}_2$]-progesteron

[$^2\text{H}_3$]-pregnenolon

[$^2\text{H}_4$]-pregnenolon

[$^2\text{H}_4$]-allopregnanolon

[$^2\text{H}_3$]-testosteron

[$^2\text{H}_3$]-pregnanolon glutamát

Izotopicky značený standard [$^2\text{H}_3$]-pregnanolon glutamát byl připraven v Ústavu organické chemie a biochemie v Praze.

Methanol hypergrade for LC–MS LiChrosolv[®] (Merck KGaA, Německo)

Methanol gradient grade for liquid chromatography LiChrosolv[®] (Merck KGaA, Německo)

Kyselina mravenčí 98% (Honeywell Fluka, USA)

3.1.3.1 Roztoky

Zásobní roztok stabilně izotopicky značených interních standardů (MIX-5-ZIS):

Zásobní roztok stabilně izotopicky značených interních standardů rozpuštěných v methanolu na koncentraci $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ obsahoval [$^{13}\text{C}_2$]-progesteron, [$^2\text{H}_4$]-allopregnanolon, [$^2\text{H}_3$]-testosteron, [$^2\text{H}_3$]-pregnanolon glutamát a [$^2\text{H}_3$]-pregnenolon nebo [$^2\text{H}_4$]-pregnenolon.

Zásobní roztok standardů steroidů (MIX-5):

Zásobní roztok neznačených standardů steroidů rozpuštěných v methanolu na koncentraci $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ obsahoval PROG, PREG, $3\alpha5\alpha$ -THP, T a DHEA.

Zásobní roztok standardů konjugátů pregnanolonu s aminokyselinami (MIX2-4):

Tento zásobní roztok neznačených standardů konjugátů pregnanolonu rozpuštěných v methanolu na koncentraci $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ obsahoval pregnanolon glutamát, pregnanolon argininát, pregnanolon aspartát a pregnanolon norvalinát.

Mobilní fáze pro chromatografickou separaci:

Methanol (roztok A)

Kyselina mravenčí $7,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ (roztok B)

Do odměrné baňky bylo přeneseno 288 μl 98% kyseliny mravenčí a odměrná baňka byla doplněna deionizovanou vodou na objem 1000 ml.

Kalibrační řada pro UHPLC–MS/MS:

Ze zásobních roztoků neznačených standardů MIX-5 a MIX2-4 o koncentraci $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byla postupným ředěním připravena pětibodová kalibrační řada v methanolu. K jednotlivým kalibračním bodům bylo přidáno 5 pmol zásobního roztoku standardů MIX-5-ZIS. Výsledné koncentrace neznačených standardů steroidů byly $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, $1 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, $1 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a $1 \cdot 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

3.1.4 Biologický materiál

Veškeré vzorky krevního séra, které byly analyzovány v rámci této práce, byly poskytnuty Neurologickou klinikou Fakultní nemocnice Olomouc. Jejich využití bylo umožněno na základě souhlasu uděleného etickou komisí. Odběr krevních vzorků od pacientů a jejich následné zpracování bylo provedeno na základě zavedených metodik Neurologické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc, které byly popsány ve článku Hényková et al., 2016. Vzorky krevního séra byly do dalšího zpracování uskladněny v temnu při teplotě $-70 \text{ }^\circ\text{C}$.

Celkově bylo analyzováno krevní sérum od 164 osob mužského pohlaví narozených mezi lety 1930 až 1999. Vzorky krevního séra byly rozděleny do dvou skupin. První tzv. kontrolní skupina zahrnovala krevní sérum mužů, u kterých nebyla diagnostikována RS, byla tvořena 26 osobami. U této skupiny ale nelze vyloučit výskyt jiného neurologického onemocnění. Druhá skupina pacientů s diagnostikovanou RS zahrnovala 138 pacientů. Identifikace a stanovení NAS v krevním séru pacientů bylo provedeno ve třech opakováních, celkově bylo tedy analyzováno 492 vzorků.

3.2 Experimentální metody

3.2.1 Zpracování vzorků krevního séra pro analýzu UHPLC–MS/MS

3.2.1.1 Purifikace vzorků krevního séra

Prvním krokem zpracování vzorků krevního séra byla jejich purifikace, jejímž cílem byla precipitace sérových proteinů a jejich odstranění. U každého pacienta byly pro UHPLC–MS/MS analýzu připraveny vzorky ve třech opakováních.

Do mikrozkušavky bylo přeneseno 150 μl krevního séra, k tomuto objemu bylo přidáno 20 μl zásobního roztoku izotopicky značených interních standardů steroidů MIX-5-ZIS o koncentraci $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (20 pmol). Celkový objem byl doplněn chlazeným methanolem na 740 μl . Slepé vzorky byly připraveny tak, že k 720 μl chlazeného methanolu bylo přidáno 20 μl zásobního roztoku MIX-5-ZIS o koncentraci $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (20 pmol). Všechny následující kroky byly prováděny současně u vzorků krevního séra i u vzorků slepých. Přídavek izotopicky značených interních standardů umožnil následnou kvantifikaci analytů pomocí metody izotopického zředování.

Nachystané vzorky byly krátce promíchány na třepačce a poté umístěny na rotátor, kde byly promíchávány po dobu 60 minut při teplotě 4 °C. Po tomto kroku byly vzorky opětovně promíchány na třepačce. Následně byla provedena jejich centrifugace při 7 280 x g po dobu 10 minut a při teplotě 4 °C. Takto získaný supernatant byl přemístěn do mikrozkušavek s Micro-Spin Filtrem a byla provedena další centrifugace, tentokrát při 7 280 x g po dobu 5 minut a při teplotě 4 °C. Filtrát byl poté odpařen do sucha na odparce pod proudem dusíku. Takto připravené vzorky byly uskladněny v temnu při teplotě -20 °C.

3.2.1.2 Příprava vzorků před analýzou

Dalším bodem byla příprava vzorků pro UHPLC–MS/MS analýzu. K odpařeným vzorkům, které byly získány v předchozím kroku, bylo přidáno 100 μl chlazeného methanolu. Tyto vzorky byly následně promíchány na třepačce a vloženy do ultrazvukové lázně na dobu 3 minut. Objem mikrozkušavek byl následně přenesen do mikrozkušavek s Micro-Spin Filtrem a byla provedena centrifugace při 2 509 x g po dobu 5 minut. Filtrát byl poté přenesen do insertu, který byl vložen do skleněné vialky.

3.2.2 Stanovení neuroaktivních steroidů pomocí UHPLC–MS/MS

Vlastní UHPLC–MS/MS analýza NAS ve vzorcích připravených v předchozích krocích byla provedena za optimálních podmínek, které jsou popsány dále v textu.

Analyzované vzorky byly vloženy do autosampleru přístroje. V tomto prostoru byla po celou dobu analýzy udržována teplota 4 °C. Chromatografická separace byla provedena s využitím chromatografické kolony KINETEX® Biphenyl (2,1 x 100 mm; velikost částic 1,7 μm). Před vlastní separací NAS vzorků bylo nutné kolonu kondicionovat na výchozí separační podmínky. Chromatografická separace probíhala při průtokové rychlosti 0,5 ml · min⁻¹. Teplota na koloně činila 40 °C. Vzorky byly nastříkovány na kolonu v objemu 2 μl. Mobilní fáze protékající kolonou obsahovala methanol (roztok A) a 7,5mmol · l⁻¹ kyseliny mravenčí (roztok B). Délka jedné analýzy dosahovala 13 minut. Během chromatografické separace byla použita gradientová eluce, jejíž průběh je uveden v tabulce 1.

Tab. 1: Průběh gradientové eluce při chromatografické separaci (roztok A = methanol, roztok B = 7,5mmol · l⁻¹ kyselina mravenčí).

| Čas (min) | Průtoková rychlost (ml · min ⁻¹) | Roztok A (%) | Roztok B (%) |
|--------------|---|-----------------|-----------------|
| 0,00 | 0,5 | 60 | 40 |
| 10,00 | 0,5 | 75 | 25 |
| 10,25 | 0,5 | 99 | 1 |
| 10,75 | 0,5 | 99 | 1 |
| 11,00 | 0,5 | 60 | 40 |
| 13,00 | 0,5 | 60 | 40 |

Analyty byly detekovány prostřednictvím tandemového hmotnostního spektrometru s ESI ionizací v pozitivním módu. Součástí hmotnostního spektrometru byl trojitý kvadrupól. Analýza probíhala za následující podmínek: teplota zdroje 150 °C, napětí na kapiláře 2,5 kV, desolvatační teplota 600 °C a průtok desolvatačního plynu 1000 l · hod⁻¹. Desolvatačním plynem byl dusík. V rámci této analýzy byl využit režim selektivního záznamu více reakcí (MRM). V tabulkách 2 a 3 jsou uvedeny kvantifikační a konfirmační přechody jednotlivých stanovovaných NAS, hodnoty vstupního napětí, kolizní energie a využití izotopicky značené interní standardy se svými přechody umožňující kvantifikaci odpovídajících analytů.

Tab. 2: Podmínky stanovení vybraných NAS pomocí UHPLC–MS/MS.

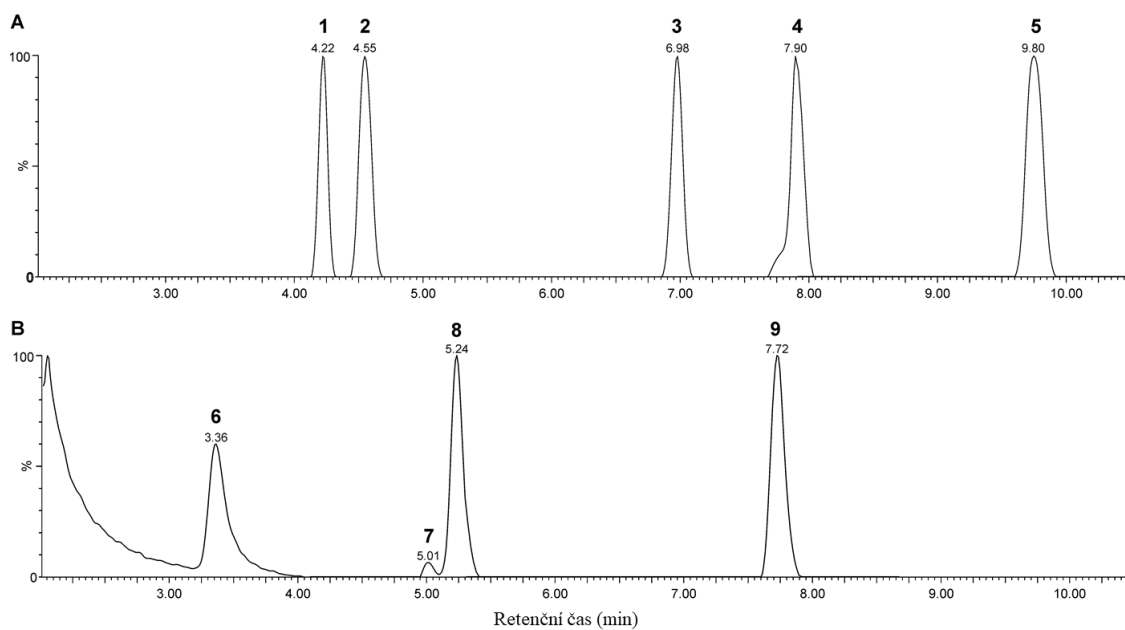
| Analyt | Kvantifikační přechod Konfirmační přechod (m/z) | Vstupní napětí (V) | Kolizní energie (eV) | Interní standard | MRM přechod (m/z) |
|----------|---|--------------------------|----------------------------|---|-------------------------|
| DHEA | 271 > 253 | 20 | 13 | [² H ₃]-testosteron | 292 > 97 |
| | 271 > 213 | 27 | 16 | | |
| T | 289 > 97 | 25 | 19 | [² H ₃]-testosteron | 292 > 97 |
| | 289 > 109 | 22 | 22 | | |
| PREG | 299 > 159 | 25 | 19 | [² H ₃]-pregnenolon/ [² H ₄]-pregnenolon | 303 > 159 |
| | 317 > 159 | 25 | 22 | | 320 > 162 |
| 3α5α-THP | 283 > 81 | 45 | 30 | [² H ₄]-allopregnanolon | 287 > 95 |
| | 283 > 95 | 45 | 25 | | |
| PROG | 315 > 97 | 23 | 19 | [¹³ C ₂]-progesteron | 317 > 99 |
| | 315 > 109 | 25 | 22 | | |

Tab. 3: Podmínky UHPLC–MS/MS analýzy vybraných konjugátů pregnanolonu.

| Analyt | Kvantifikační přechod Konfirmační přechod (m/z) | Vstupní napětí (V) | Kolizní energie (eV) | Interní standard | MRM přechod (m/z) |
|---------------------------|---|--------------------------|----------------------------|---|----------------------|
| Pregnanolon glutamát | 448 > 148 | 45 | 16 | [² H ₃]- pregnanolon glutamát | 451 > 148 |
| | 448 > 283 | 45 | 19 | | |
| Pregnanolon argininát | 475 > 175 | 25 | 27 | [² H ₃]- pregnanolon glutamát | 451 > 148 |
| | 475 > 116 | 45 | 36 | | |
| Pregnanolon aspartát | 434 > 134 | 30 | 13 | [² H ₃]- pregnanolon glutamát | 451 > 148 |
| | 434 > 283 | 25 | 19 | | |
| Pregnanolon norvalinát | 418 > 118 | 23 | 10 | [² H ₃]- pregnanolon glutamát | 451 > 148 |
| | 418 > 283 | 20 | 19 | | |

Na obrázku 9 jsou uvedeny chromatogramy ukazující separaci standardů analyzovaných steroidů a konjugátů pregnanolonu pomocí zvoleného uspořádání UHPLC–MS/MS. U jednotlivých analytů je v obrázku doplněn také jejich retenční čas. Všechny zkoumané analyty se podařilo úspěšně separovat.

Pro vytvoření této metody a pro následné zpracování dat byly využity softwarové nástroje MassLynxTM a TargetLynxTM. Kvantifikace NAS v analyzovaných vzorcích byla provedena s využitím metody izotopického zředování.



Obr. 9: Chromatografická separace standardů analyzovaných steroidů (chromatogram A: 1 – DHEA, 2 – T, 3 – PREG, 4 – 3 α 5 α -THP, 5 – PROG) a konjugátů pregnanolonu (chromatogram B: 6 – pregnanolon argininát, 7 – pregnanolon aspartát, 8 – pregnanolon glutamát, 9 – pregnanolon norvalinát) pomocí systému UHPLC–MS/MS, retenční čas (min).

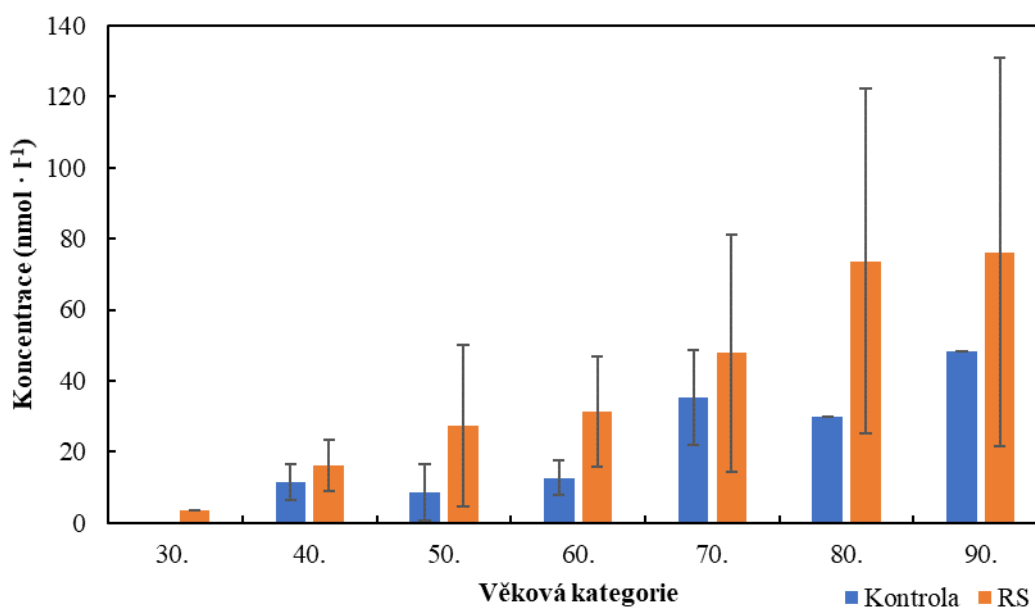
4 Výsledky

4.1 Stanovení neuroaktivních steroidů pomocí UHPLC–MS/MS

Data získaná během analýzy byla následně vyhodnocena. Skupina tvořená kontrolními jedinci a skupina pacientů s diagnostikovanou RS byla dále rozdělena do 7 věkových kategorií podle data narození analyzovaných osob. Muži narození mezi lety 1930 až 1939 byli v této práci pro zjednodušení označováni jako 30. ročník. Podle stejného klíče byli ostatní jedinci rozděleni do dalších věkových kategorií, a to 40. ročník (1940–1949), 50. ročník (1950–1959), 60. ročník (1960–1969), 70. ročník (1970–1979), 80. ročník (1980–1989) a 90. ročník (1990–1999). U všech kategorií byla vypočítána průměrná koncentrace daného steroidu a směrodatná odchylka (SD). Grafy v následující části ukazují průměrné hladiny NAS v jednotlivých kategoriích obou skupin.

U kontrolní skupiny i skupiny pacientů trpících RS se podařilo v krevním séru kvantifikovat DHEA, T, PREG a PROG. $3\alpha5\alpha$ -THP kvantifikován nebyl, u všech analyzovaných jedinců byl pod limitem detekce (LOD). Předmětem zkoumání byly také steroidní konjugáty, a to pregnanolon glutamát, pregnanolon aspartát, pregnanolon norvalinát a pregnanolon argininát. Ani tyto látky nebyly ve vzorcích detekovány.

Na obrázku 10 je patrné, že s rostoucím věkem docházelo u skupiny mužů s diagnostikovanou RS k postupnému snižování hladiny DHEA.

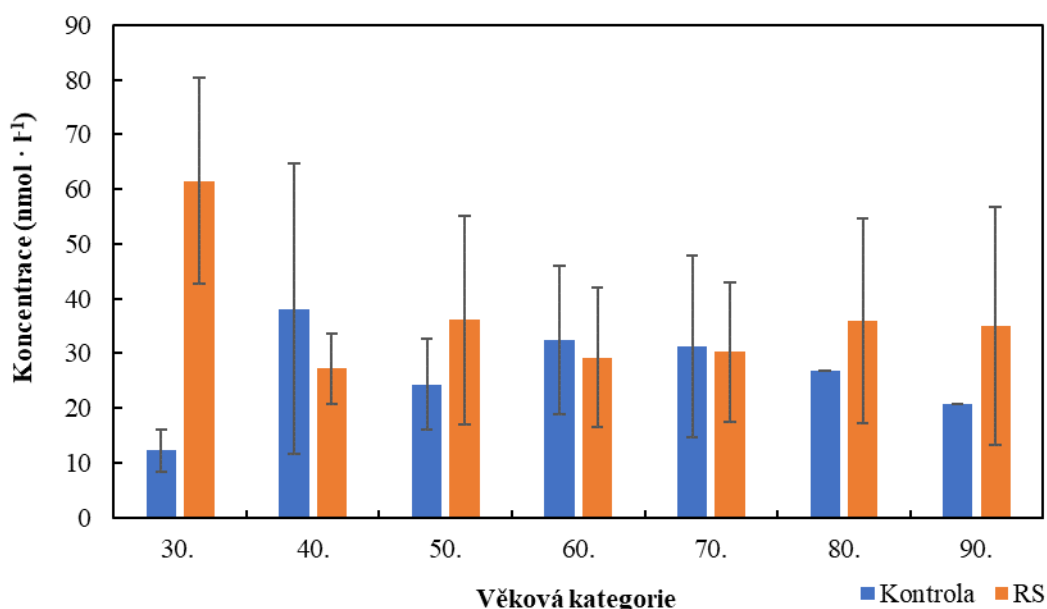


Obr. 10: Koncentrace DHEA ($\text{nmol} \cdot \text{l}^{-1}$) u jednotlivých věkových kategorií kontrolní skupiny a skupiny pacientů s diagnostikovanou RS.

U skupiny s RS byla nejnižší průměrná hladina DHEA stanovena u věkové kategorie 30. ročník ($3,53 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$). Naopak nejvyšší průměrná hladina tohoto steroidu byla detekována u kategorie, která shromažďovala jedince nejmladší, tedy 90. ročník ($76,17 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$). U skupiny pacientů byl DHEA stanoven ve všech kategoriích.

Určitý pokles hladiny DHEA s věkem byl zaznamenán i u skupiny kontrolní. Nejnižší průměrná hladina tohoto hormonu byla stanovena u kategorie 50. ročník ($8,60 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$). Stejně jako u skupiny s RS byla i zde detekována nejvyšší průměrná koncentrace DHEA u 90. ročníku ($48,17 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$). Průměrné hladiny DHEA dosahovaly u kontrolní skupiny v jednotlivých kategoriích ve srovnání se skupinou pacientů nižších hodnot. U kategorie 30. ročník kontrolní skupiny nebyl tento steroid stanoven dokonce vůbec.

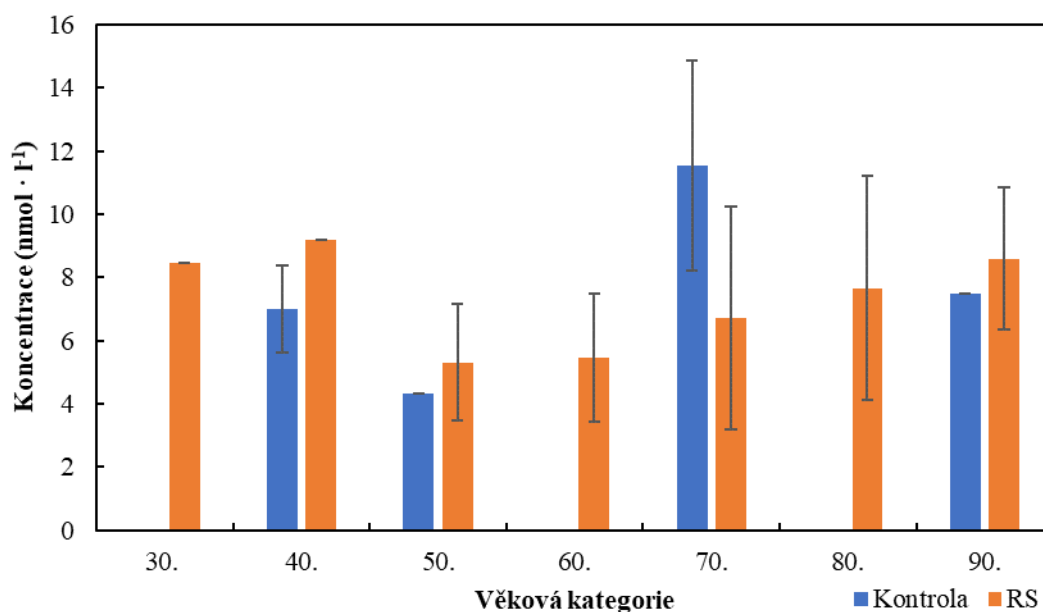
Průměrné hladiny T obou zkoumaných skupin u jednotlivých věkových kategorií jsou uvedeny na obrázku 11. V tomto případě nebyla zaznamenána závislost hladin T na věku, a to ani u jedné skupiny. Tento steroid byl stanoven ve všech věkových kategoriích. Průměrné hladiny T jednotlivých kategorií kontrolní skupiny se pohybovaly v rozmezí $12,25\text{--}38,16 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$. U skupiny mužů s RS to bylo $27,23\text{--}61,54 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$. U některých věkových kategorií dosahovala vyšších sérových hladin skupina kontrolní, u jiných však zase skupina pacientů.



Obr. 11: Koncentrace T ($\text{nmol} \cdot \text{l}^{-1}$) u jednotlivých věkových kategorií kontrolní skupiny a skupiny pacientů s diagnostikovanou RS.

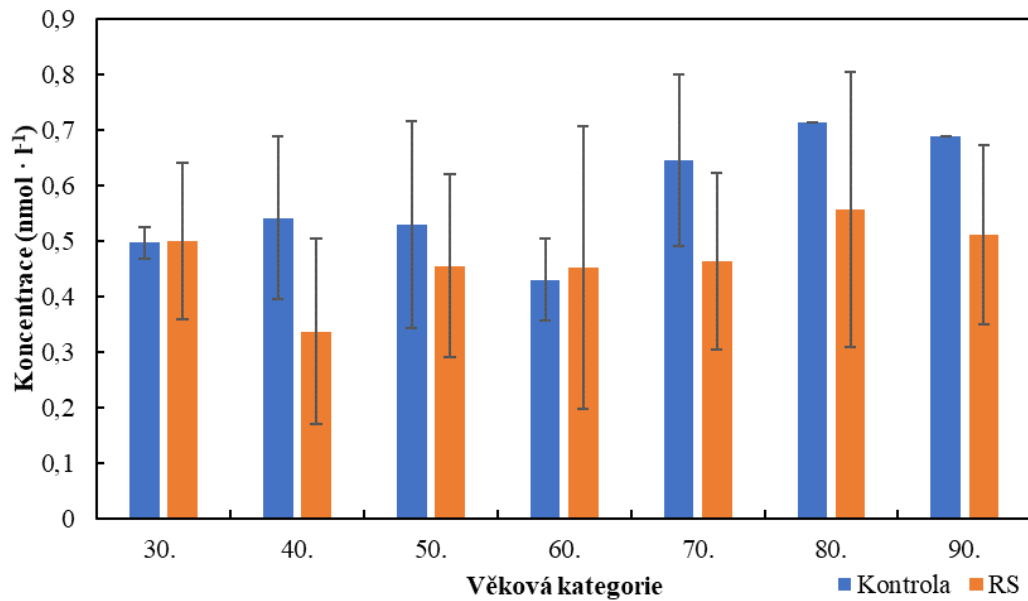
U skupiny mužů s diagnostikovanou RS se podařilo PREG stanovit ve všech věkových kategoriích, což je ukázáno na obrázku 12. S výjimkou pacientů s RS v kategorii 30. a 40. ročník lze pozorovat, že s rostoucím věkem docházelo k postupnému poklesu hladin PREG. Průměrné hladiny PREG u jednotlivých věkových kategorií pacientů byly v rozsahu 5,31–9,19 nmol · l⁻¹.

U kontrolní skupiny mužů nebyl PREG kvantifikován ve všech věkových kategoriích. Nebyla zde detekována ani žádná závislost hladiny tohoto steroidního hormonu na věku. U této skupiny se průměrné hladiny PREG pohybovaly mezi 4,33–11,53 nmol · l⁻¹.



Obr. 12: Koncentrace PREG (nmol · l⁻¹) u jednotlivých věkových kategorií kontrolní skupiny a skupiny pacientů s diagnostikovanou RS.

Hladiny PROG obou studovaných skupin mužů jsou uvedeny na obrázku 13. Průměrné hladiny tohoto hormonu se u jednotlivých věkových kategorií kontrolní skupiny pohybovaly v rozmezí 0,43–0,71 nmol · l⁻¹. Naproti tomu u skupiny pacientů trpících RS to bylo 0,34–0,56 nmol · l⁻¹. U věkových kategorií 40., 50., 70., 80. a 90. ročník kontrolní skupiny byly pozorovány ve srovnání se skupinou pacientů vyšší hladiny PROG.



Obr. 13: Koncentrace PROG (nmol · l⁻¹) u jednotlivých věkových kategorií kontrolní skupiny a skupiny mužů s diagnostikovanou RS.

Souhrnné tabulky se stanovenými hodnotami sérových koncentrací steroidů DHEA, T, PREG a PROG veškerých jedinců analyzovaných v rámci této práce jsou uvedeny v příloze A. Její součástí je tabulka S1 s hladinami steroidů stanovených u kontrolní skupiny a také tabulka S2 udávající hladiny NAS stanovené u skupiny pacientů s diagnostikovanou RS.

5 Diskuze

Hlavním tématem této diplomové práce bylo metabolické profilování vybraných NAS ve vzorcích krevního séra prostřednictvím analytického systému UHPLC–MS/MS. Dříve již bylo prokázáno, že neurodegenerativní onemocnění mohou způsobovat změny hladin cirkulujících NAS, které by mohly být využity jako potencionální biomarkery upozorňující na patologické procesy probíhající v nervovém systému (Caruso et al., 2014). V rámci zde předkládaného experimentu byly stanovovány hladiny endogenních steroidů u dvou skupin mužů, a to u kontrolní skupiny a u skupiny tvořené pacienty s potvrzenou diagnózou RS.

Profilování steroidů se věnují i jiné práce, které využívají mimo krevní sérum i jiné biologické matrice, jako je například moč, vlasy nebo nehty (Noppe et al., 2015; Shafigullina et al., 2018; Voegel et al., 2018).

Studiem vztahu mezi hladinami některých steroidů a RS se ve své práci zabývali Kančeva a spolupracovníci (2015). Za tímto účelem analyzovali steroidy a polární konjugáty steroidů u 12 pacientek s RS a u 6 žen tvořících kontrolní skupinu. Na rozdíl od této práce využili systém GC–MS. U žen s RS pozorovali významné zvýšení hladin cirkulujících C₂₁ steroidů (např. PREG), jejich polárních konjugátů (např. PREGS), a také i některých C₁₉ steroidů (např. androstendion). Tato diplomová práce byla zaměřena na metabolické profilování NAS u mužů, jelikož vzorky pocházející od žen je nutné dostatečně charakterizovat z hlediska fáze menstruačního cyklu, případného těhotenství nebo menopauzy. Tato období totiž významně ovlivňují hladiny steroidních hormonů.

Caruso a kolegové (2014) analyzovali NAS v krevní plazmě a mozkomíšním moku mužů s diagnostikovanou RS (průměrný věk 34 let), konkrétně formou RR-RS, a ve vzorcích představujících kontrolu (průměrný věk 29 let). Ke stanovení využili metodu UHPLC-MS/MS. U vzorků krevní plazmy pacientů s RS pozorovali ve srovnání s kontrolami nárůst hladin PREG, PROG a pokles hladin 3 α 5 α -THP. Dále zjistili, že hladiny T nebyly u pacientů významně změněny. Z grafů, které Caruso et al. (2014) uvádějí, je dále patrné, že u pacientů dochází k mírnému zvýšení hladiny DHEA, které není ale významné. Určité zvýšení hladiny DHEA, ovšem u pacientek s RS, rovněž zaznamenali Kančeva et al. (2015). Toto zvýšení hladiny DHEA u pacientů by korespondovalo s výsledky zjištěnými v této diplomové práci.

S postupujícím věkem dochází u mužů k poklesu hladin cirkulujícího DHEA (Labrie et al., 1997). Tento trend se v rámci experimentu rovněž podařilo potvrdit, a to u obou zkoumaných skupin.

Referenční interval pro DHEA určený pomocí MS, který udává Shackleton (2008) je u mužů $1,80\text{--}12,50 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ ($6,25\text{--}43,38 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$). S tímto rozmezím se shodují téměř všechny průměrné hladiny u jednotlivých věkových kategorií kontrolní skupiny, vyšší sérová hladina byla stanovena pouze u kategorie 90. ročník ($48,17 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$). U skupiny s RS převyšují tento referenční interval ročník 70. ($47,78 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$), 80. ($73,64 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$) a 90. ($76,17 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$). Zvýšené hladiny DHEA mohou být například reakcí na akutní psychosociální stres (Lennartsson et al., 2012a).

Průměrné hladiny T dosahovaly u některých věkových kategorií vyšších hodnot u skupiny kontrolní, u jiných kategorií u skupiny pacientů. Nelze tedy posoudit, zda RS ovlivňuje nějakým způsobem jeho hladiny. Caruso et al. (2014) a ani Kančeva et al. (2015) nezaznamenali významné rozdíly v hladinách cirkulujících androgenů u pacientů a kontrol. Zato Sefarinejad (2008) ve své studii detekoval pomocí RIA u pacientů s RS významný pokles sérových hladin T. Tyto rozpory mohou být způsobeny využitím rozdílných analytických metod. S postupujícím věkem dochází u mužů rovněž k fyziologickému poklesu hladiny celkového T (Decaroli a Rochira, 2017). Tento trend v této práci ovšem zaznamenán nebyl.

Fyziologická hladina T pro muže určená MS činí $1,20\text{--}11,10 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ ($4,16\text{--}38,49 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$) (Shackleton, 2008). Vyšší průměrná koncentrace T byla stanovena pouze u věkové kategorie 30. ročník skupiny pacientu s RS ($61,54 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$). Důvodem může být to, že tato věková kategorie nezahrnovala dostatek jedinců. Vyšší hladiny T mohou být rovněž reakcí na stresor (Lennartsson et al., 2012b). Ke zvýšení bazální hladiny T u mužů středního věku napomáhá ovšem také intenzivní trénink (Sellami et al., 2018).

Je také podstatné zmínit důležitost sjednocení času odběru krevního vzorku, což v rámci této práce dodrženo nebylo. Boyce a kolegové (2004) dokonce udávají odlišná referenční rozmezí v závislosti na denní době. Rozmezí pro ranní hladiny T je u mužů mladších 40 let $10,07\text{--}38,76 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ a u mužů starších 40 let $7,41\text{--}24,13 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Večerní rozmezí jsou poté $6,69\text{--}31,51 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ a $6,46\text{--}21,93 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Hladiny T se u mužů mění dokonce i v průběhu roku (Decaroli a

Rochira, 2017). Bylo zjištěno, že hladiny T ve slinách mužů dosahují vyšších hodnot na podzim a nejnižších na jaře (Stanton et al., 2011).

PREG byl kvantifikován u skupiny pacientů s RS ve všech věkových kategoriích, na rozdíl od kontrolní skupiny. Z toho lze usuzovat, že u skupiny s RS jsou hladiny PREG obecně vyšší, a proto se je podařilo stanovit ve více případech. U věkové kategorie 90. ročník, která přibližně odpovídá věkovému průměru mužů analyzovaných ve studii, kterou uvádí Caruso et al. (2014), dosahuje vyšší hladiny PREG skupina pacientů s RS. Caruso a spolupracovníci (2014) také zaznamenali zvýšené hladiny PREG u skupiny s RS. Ke stejnému závěru dospěli také Kančeva et al. (2015).

Kushnir et al. (2006) ve své práci udává referenční interval PREG u mužů ve věku 18–52 let stanovený metodou LC-MS/MS v rozmezí 0,28–1,65 ng · ml⁻¹ (0,89–5,21 nmol · l⁻¹). V této diplomové práci byla u většiny věkových kategorií stanovena vyšší průměrná hladina PREG. Značný vliv na to má i velká variabilita hladin PREG mezi analyzovanými jedinci i v rámci jednotlivých kategorií. Příprava vzorků, kterou uvádí Kushnir et al. (2006), na rozdíl od této práce zahrnovala extrakci na pevné fázi a derivatizaci hydroxylaminem.

U několika věkových kategorií skupiny s RS byly pozorovány nižší hladiny PROG. Caruso a spolupracovníci (2014) naopak pozorovali nárůst hladin PROG u pacientů s RS. S jejich závěrem se shoduje i Kančeva et al. (2015). Je třeba brát v úvahu, že v rámci této diplomové práce byl analyzován vyšší počet osob, nicméně by bylo potřeba některé věkové kategorie rozšířit a sjednotit. Kontrolní skupinu tvořilo 26 mužů a skupinu pacientů s RS 138 osob. Caruso et al. (2014) analyzovali steroidy u 26 mužů s RS a u 12 mužů představujících kontrolu. Dalším rozdílem je to, že se zaměřili pouze na pacienty s konkrétní formou RS, a to RR-RS. Pacienti v této diplomové práci takto rozdělení nebyli. Stejně tak se lišila příprava vzorku i následná analýza. Extrakční a purifikační protokol, který použili Caruso et al. (2014), mimo jiné zahrnoval homogenizaci ve směsi methanol a kyselina octová a následně i extrakci na pevné fázi. Při analýze využili ionizační techniku APCI.

Podle údajů, které uvádí Shackleton (2008), jsou normální hladiny PROG u mužů $\leq 0,30 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ ($\leq 0,95 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$). Stanovené průměrné koncentrace PROG u jednotlivých věkových kategorií toto kritérium splňují.

Velké SD u průměrných koncentrací NAS jednotlivých věkových kategorií jsou důsledkem existence interindividuální variability v hladinách zkoumaných hormonů.

Tato variabilita je patrná ze stanovených koncentrací těchto hormonů u jednotlivých osob, které jsou uvedeny v souhrnných tabulkách v příloze A.

Hladiny $3\alpha 5\alpha$ -THP se nacházely ve všech analyzovaných vzorcích obou skupin pod LOD.

Rambousek a kolegové (2011) se ve své práci věnovali vývoji a testování nového syntetického antagonisty NMDA receptorů, a to konkrétně pregnanolon glutamátu. Antagonisté těchto receptorů působí neuroprotektivně, jelikož NMDA receptory hrají významnou roli v excitotoxicitě. Jedním z předmětů studia této diplomové práce bylo také zjistit, zda se ve vzorcích krevního séra analyzovaných jedinců nachází pregnanolon glutamát, ale i jiné konjugáty, jako pregnanolon aspartát, pregnanolon norvalinát a pregnanolon arginát. Žádný z těchto konjugátů nebyl u kontrolní skupiny ani u skupiny mužů nemocných RS detekován.

6 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo vytvoření uceleného přehledu o NAS, metodách umožňujících stanovení steroidních látek a o aspektech RS. Experimentální část zahrnovala vlastní stanovení vybraných steroidů s neuroaktivními účinky v krevním séru mužů rozdělených do dvou skupin, a to konkrétně ve vzorcích jedinců tvořících kontrolní skupinu a ve vzorcích pacientů, u kterých bylo diagnostikováno onemocnění RS. K tomuto metabolickému profilování byla využita metoda UHPLC–MS/MS.

Ve vzorcích krevního séra obou skupin analyzovaných jedinců se podařilo kvantifikovat steroidní hormony DHEA, T, PREG a PROG. U obou zkoumaných skupin byla pozorována závislost sérové hladiny DHEA na věku. Tento hormon dále vykazoval vyšší hladiny u pacientů s RS. Určitá závislost hladiny PREG na věku byla zaznamenána u skupiny mužů s RS. U této skupiny se na rozdíl od kontroly podařilo PREG kvantifikovat v rámci všech věkových kategorií, což naznačuje, že hladiny tohoto steroidu dosahují u pacientů trpících RS vyšších hodnot. $3\alpha5\alpha$ -THP byl ve všech případech pod LOD. Rovněž konjugáty pregnanolon glutamát, pregnanolon aspartát, pregnanolon norvalinát a pregnanolon argininát nebyly detekovány ani u jedné ze zkoumaných skupin mužů.

Na závěr je důležité zdůraznit, že krevní séra využitá v této práci byla původně shromažďována pro jiný experiment, což způsobuje mnohé limitace. Pro další studium by bylo nutné provést detailnější charakterizaci analyzovaných jedinců, a to zejména z hlediska přítomnosti dalších chorob nebo užívané terapie, která by mohla ovlivňovat hladiny cirkulujících steroidních hormonů. Rovněž by bylo potřeba sjednotit počty jedinců v jednotlivých věkových kategoriích a odebírat vzorky krevního séra za standardizovaných podmínek. Hladiny některých steroidních hormonů se totiž mění během dne.

Průběžné výsledky těchto analýz byly prezentovány na konferenci Isoprenoids 2018 v polském Białystoku formou plakátového sdělení.

Další výzkumy zaměřené na hledání změn v hladinách steroidních hormonů u mužů i žen s RS v porovnání se zdravou populací by mohly napomoci hlubšímu pochopení patofyziologie RS, objevu nových možností diagnostiky nebo dokonce nalezení nových terapeutických přístupů. Tyto oblasti v sobě skýtají značný potenciál, ale neobejde se to bez dalšího bádání.

Seznam literatury

- Ahlgren C., Odén A. a Lycke J. (2011) High nationwide prevalence of multiple sclerosis in Sweden. *Multiple Sclerosis Journal* **17**(8), 901-908.
- Andersen K., Launer L. J., Dewey M. E., et al. (1999) Gender differences in the incidence of AD and vascular dementia. *Neurology* **53**(9), 1992-1997.
- Antunes L. C. M., Han J., Ferreira R. B. R., et al. (2011) Effect of Antibiotic Treatment on the Intestinal Metabolome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **55**(4), 1494-1503.
- Atif F., Yousuf S. a Stein D. G. (2015) Anti-tumor effects of progesterone in human glioblastoma multiforme: Role of PI3K/Akt/mTOR signaling. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **146**, 62-73.
- Baulieu E. E. (1998) Neurosteroids: a novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology* **23**(8), 963-987.
- Belvederi Murri M., Fanelli F., Pagotto U., et al. (2016) Neuroactive Steroids in First-Episode Psychosis: A Role for Progesterone?. *Schizophrenia Research and Treatment* **2016**, 1-6.
- Blanco M. J., La D., Coughlin Q., et al. (2018) Breakthroughs in neuroactive steroid drug discovery. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **28**(2), 61-70.
- Bormann J. (2000) The 'ABC' of GABA receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* **21**(1), 16-19.
- Boyce M. J., Baisley K. J., Clark E. V., et al. (2004) Are published normal ranges of serum testosterone too high? Results of a cross-sectional survey of serum testosterone and luteinizing hormone in healthy men. *BJU International* **94**(6), 881-885.
- Brønnum-Hansen H., Koch-Henriksen N. a Stenager E. (2004) Trends in survival and cause of death in Danish patients with multiple sclerosis. *Brain* **127**(4), 844-850.
- Browne P., Chandraratna D., Angood C., et al. (2014) Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. *Neurology* **83**(11), 1022-1024.
- Brownlee W. J., Hardy T. A., Fazekas F., et al. (2017) Diagnosis of multiple sclerosis: progress and challenges. *The Lancet* **389**(10076), 1336-1346.
- Carta M. G., Bhat K. M. a Preti A. (2012) GABAergic neuroactive steroids: a new frontier in bipolar disorders?. *Behavioral and Brain Functions* **8**(1), 1-8.
- 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), 591-597.

- Ceglarek U., Kortz L., Leichtle A., et al. (2009) Rapid quantification of steroid patterns in human serum by on-line solid phase extraction combined with liquid chromatography–triple quadrupole linear ion trap mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta* **401**(1-2), 114-118.
- Compston A. a Coles A. (2008) Multiple sclerosis. *The Lancet* **372**(9648), 1502-1517.
- Confavreux C., Hutchinson M., Hours M. M., et al. (1998) Rate of Pregnancy-Related Relapse in Multiple Sclerosis. *The New England Journal of Medicine* **339**(5), 285-291.
- Constantinescu C. S., Farooqi N., O'Brien K., et al. (2011) Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *British Journal of Pharmacology* **164**(4), 1079-1106.
- Cooke P. S., Nanjappa M. K., Ko C., et al. (2017) Estrogens in Male Physiology. *Physiological Reviews* **97**(3), 995-1043.
- Corpéchet 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.
- Corpéchet C., Synguelakis M., Talha S., et al. (1983) Pregnenolone and its sulfate ester in the rat brain. *Brain Research* **270**(1), 119-125.
- Dargahi N., Katsara M., Tselios T., et al. (2017) Multiple Sclerosis: Immunopathology and Treatment Update. *Brain Sciences* **7**(7), 1-27.
- Decaroli M. C. a Rochira V. (2017) Aging and sex hormones in males. *Virulence* **8**(5), 545-570.
- Dietschy J. M. a 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.
- 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**(3), 259-301.
- Dunn W. B., Bailey N. J. C. a Johnson H. E. (2005) Measuring the metabolome: current analytical technologies. *The Analyst* **130**(5), 606-625.
- Eckstein C. a Bhatti M. T. (2016) Currently approved and emerging oral therapies in multiple sclerosis: An update for the ophthalmologist. *Survey of Ophthalmology* **61**(3), 318-332.

- Eneroth P., Hellström K. a Ryhage R. (1964) Identification and quantification of neutral fecal steroids by gas–liquid chromatography and mass spectrometry: studies of human excretion during two dietary regimens. *Journal of Lipid Research* **5**, 245-262.
- Feinstein A. (2004) The Neuropsychiatry of Multiple Sclerosis. *The Canadian Journal of Psychiatry* **49**(3), 157-163.
- Fojtíková L., Göselová S. a Holubová B. (2015) Anabolické androgenní steroidy – nebezpečí v doplňcích stravy. *Chemické listy* **109**(12), 913-917.
- 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), 4711-4716.
- Freedman M. S., Thompson E. J., Deisenhammer F., et al. (2005) Recommended Standard of Cerebrospinal Fluid Analysis in the Diagnosis of Multiple Sclerosis. *Archives of Neurology* **62**(6), 865-870.
- Garg N. a Smith T. W. (2015) An update on immunopathogenesis, diagnosis, and treatment of multiple sclerosis. *Brain and Behavior* **5**(9), 1-13.
- Ghasemi N., Razavi S. a Nikzad E. (2017) Multiple sclerosis: pathogenesis, symptoms, diagnoses and cell-based therapy. *Cell Journal* **19**(1), 1-10.
- Gleicher N. a Barad D. H. (2007) Gender as risk factor for autoimmune diseases. *Journal of Autoimmunity* **28**(1), 1-6.
- Goedeke L. a Fernández-Hernando C. (2012) Regulation of cholesterol homeostasis. *Cellular and Molecular Life Sciences* **69**(6), 915-930.
- Goodacre R. (2007) Metabolomics of a Superorganism. *The Journal of Nutrition* **137**(1), 259S-266S.
- Guennoun R., Fiddes R. J., Gouézou M., et al. (1995) A key enzyme in the biosynthesis of neurosteroids, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 -isomerase (3 β -HSD), is expressed in rat brain. *Molecular Brain Research* **30**(2), 287–300.
- Hansen M., Jacobsen N. W., Nielsen F. K., et al. (2011) Determination of steroid hormones in blood by GC–MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **400**(10), 3409-3417.
- Hecker M., Newsted J. L., Murphy M. B., et al. (2006) Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid in vitro determination of effects on steroidogenesis: Hormone production. *Toxicology and Applied Pharmacology* **217**(1), 114-124.

- Hényková E., Vránová H. P., Amakorová P., et al. (2016) Stable isotope dilution ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry quantitative profiling of tryptophan-related neuroactive substances in human serum and cerebrospinal fluid. *Journal of Chromatography A* **1437**, 145-157.
- Hollmann M. a Heinemann S. (1994) Cloned Glutamate Receptors. *Annual Review of Neuroscience* **17**(1), 31-108.
- Holst J. P., Soldin O. P., Guo T., et al. (2004) Steroid hormones: relevance and measurement in the clinical laboratory. *Clinics in Laboratory Medicine* **24**(1), 105-118.
- Horák M., Vlček K., Chodounská H., et al. (2006) Subtype-dependence of N-methyl-D-aspartate receptor modulation by pregnenolone sulfate. *Neuroscience* **137**(1), 93-102.
- Hu M. C., Hsu N. C., El Hadj N. B., et al. (2002) Steroid Deficiency Syndromes in Mice with Targeted Disruption of Cyp11a1. *Molecular Endocrinology* **16**(8), 1943-1950.
- Huang W. J., Chen W. W. a Zhang X. (2017) Multiple sclerosis: Pathology, diagnosis and treatments. *Experimental and Therapeutic Medicine* **13**(6), 3163-3166.
- Christakoudi S., Cowan D. A. a Taylor N. F. (2010) Steroids excreted in urine by neonates with 21-hydroxylase deficiency: Characterization, using GC–MS and GC–MS/MS, of the D-ring and side chain structure of pregnanes and pregnenes. *Steroids* **75**(1), 34-52.
- Inglese M. a Petracca M. (2015) Therapeutic strategies in multiple sclerosis: A focus on neuroprotection and repair and relevance to schizophrenia. *Schizophrenia Research* **161**(1), 94-101.
- Inoue T., Akahira J., Suzuki T., et al. (2002) Progesterone Production and Actions in the Human Central Nervous System and Neurogenic Tumors. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **87**(11), 5325-5331.
- Kalueff A. V. a Tuohimaa P. (2007) Neurosteroid hormone vitamin D and its utility in clinical nutrition. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* **10**(1), 12-19.
- Kančeva R., Stárka L., Kancheva L., et al. (2015) Increased Serum Levels of C21 Steroids in Female Patients With Multiple Sclerosis. *Physiological Research* **64**(2), S247-S254.
- Kipp M., Amor S., Krauth R., et al. (2012) Multiple sclerosis: Neuroprotective alliance of estrogen–progesterone and gender. *Frontiers in Neuroendocrinology* **33**(1), 1-16.
- Koch-Henricksen N. a Sørensen P. S. (2010) The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *The Lancet Neurology* **9**(5), 520-532.

- Kořínek M., Kapras V., Vyklický V., et al. (2011) Neurosteroid modulation of N-methyl-D-aspartate receptors: Molecular mechanism and behavioral effects. *Steroids* **76**(13), 1409-1418.
- Krone N., Hughes B. A., Lavery G. G., et al. (2010) Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) remains a pre-eminent discovery tool in clinical steroid investigations even in the era of fast liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **121**(3-5), 496-504.
- Kushnir M. M., Rockwood A. L., Roberts W. L., et al. (2006) Development and Performance Evaluation of a Tandem Mass Spectrometry Assay for 4 Adrenal Steroids. *Clinical Chemistry* **52**(8), 1559-1567.
- Labrie F., Bélanger A., Cusan L., et al. (1997) Marked Decline in Serum Concentrations of Adrenal C19 Sex Steroid Precursors and Conjugated Androgen Metabolites During Aging. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **82**(8), 2396-2402.
- Lavaque E., Sierra A., Azcoitia I., et al. (2006) Steroidogenic acute regulatory protein in the brain. *Neuroscience* **138**(3), 741-747.
- Le Goascogne C., Gouézou M., Robel P., et al. (1989) The Cholesterol Side-Chain Cleavage Complex in Human Brain White Matter. *Journal of Neuroendocrinology* **1**(3), 153-156.
- Lennartsson A. K., Kushnir M. M., Bergquist J., et al. (2012a) DHEA and DHEA-S response to acute psychosocial stress in healthy men and women. *Biological Psychology* **90**(2), 143-149.
- Lennartsson A. K., Kushnir M. M., Bergquist J., et al. (2012b) Sex steroid levels temporarily increase in response to acute psychosocial stress in healthy men and women. *International Journal of Psychophysiology* **84**(3), 246-253.
- Liu S., Sjövall J. a Griffiths W. J. (2003) Neurosteroids in Rat Brain: Extraction, Isolation, and Analysis by Nanoscale Liquid Chromatography–Electrospray Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **75**(21), 5835-5846.
- Loma I. a Heyman R. (2011) Multiple Sclerosis: Pathogenesis and Treatment. *Current Neuropharmacology* **9**(3), 409-416.
- Mannix R., Berglass J., Berkner J., et al. (2014) Gender differences in the effect of progesterone after controlled cortical impact in adolescent mice: a preliminary study. *Journal of Neurosurgery* **121**(6), 1337-1341.
- McMurry J. (2007) Organická chemie. Brno: VUTIUM.

- Melcangi R. C. a Panzica G. C. (2014) Allopregnanolone: State of the art. *Progress in Neurobiology* **113**, 1-5.
- Melcangi R. C., Garcia-Segura L. M. a Mensah-Nyagan A. G. (2008) Neuroactive steroids: State of the art and new perspectives. *Cellular and Molecular Life Sciences* **65**(5), 777-797.
- Melcangi R. C., Giatti S. a Garcia-Segura L. M. (2016) Levels and actions of neuroactive steroids in the nervous system under physiological and pathological conditions: Sex-specific features. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **67**, 25-40.
- Meldrum B. S. (2000) Glutamate as a Neurotransmitter in the Brain: Review of Physiology and Pathology. *The Journal of Nutrition* **130**(4), 1007S-1015S.
- Mensah-Nyagan A. G., Do Rego J. L., Beaujean D., et al. (1999) Neurosteroids: expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the central nervous system. *Pharmacological Reviews* **51**(1), 63-81.
- Middle J. G. (2007) Dehydroepiandrosterone sulphate interferes in many direct immunoassays for testosterone. *Annals of Clinical Biochemistry* **44**(2), 173-177.
- Miller D. H. a Leary S. M. (2007) Primary-progressive multiple sclerosis. *The Lancet Neurology* **6**(10), 903-912.
- Mitrevski B. S., Brenna J. T., Zhang Y., et al. (2008) Application of comprehensive two-dimensional gas chromatography to sterols analysis. *Journal of Chromatography A* **1214**(1-2), 134-142.
- Monagle J., Siu L., Worrell J., et al. (2015) A Phase 1c Trial Comparing the Efficacy and Safety of a New Aqueous Formulation of Alphaxalone with Propofol. *Anesthesia and Analgesia* **121**(4), 914-924.
- Moon J. Y., Choi M. H. a Kim J. (2016) Metabolic profiling of cholesterol and sex steroid hormones to monitor urological diseases. *Endocrine-related cancer* **23**(10), R455-R467.
- Murray R. K., Bender D. A., Botham K. M., et al. (2012) Harperova ilustrovaná biochemie. Praha: Galén.
- Myhr K. M. a Mellgren S. I. (2009) Corticosteroids in the treatment of multiple sclerosis. *Acta Neurologica Scandinavica* **120**(189), 73-80.
- Noppe G., de Rijke Y. B., Dorst K., et al. (2015) LC-MS/MS-based method for long-term steroid profiling in human scalp hair. *Clinical Endocrinology* **83**(2), 162-166.
- Norman A. W. a Henry H. L. (2015) Hormones. Academic Press.

- Nothdurfter C., Rupprecht R. a Rammes G. (2012) Recent developments in potential anxiolytic agents targeting GABA_A/BzR complex or the translocator protein (18 kDa) (TSPO). *Current Topics in Medicinal Chemistry* **12**(4), 360-370.
- Nutt D. J. (2006) GABA_A receptors: subtypes, regional distribution, and function. *Journal of Clinical Sleep Medicine* **2**(2), S7-S11.
- Nutt D. J. a Malizia A. L. (2001) New insights into the role of the GABA_A-benzodiazepine receptor in psychiatric disorder. *The British Journal of Psychiatry* **179**(05), 390-396.
- O’Gorman C., Bukhari W., Todd A., et al. (2014) Smoking increases the risk of multiple sclerosis in Queensland, Australia. *Journal of Clinical Neuroscience* **21**(10), 1730-1733.
- Olsen R. W. (2018) GABA_A receptor: Positive and negative allosteric modulators. *Neuropharmacology* **136**, 10-22.
- Olsen R. W. a Sieghart W. (2008) International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of γ -Aminobutyric Acid_A Receptors: Classification on the Basis of Subunit Composition, Pharmacology, and Function. Update. *Pharmacological Reviews* **60**(3), 243-260.
- Orth M. a Bellosta S. (2012) Cholesterol: Its Regulation and Role in Central Nervous System Disorders. *Cholesterol* **2012**, 1-19.
- Paoletti P. (2011) Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *The European Journal of Neuroscience* **33**(8), 1351-1365.
- Papadopoulos V., Beraldi 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.
- Park-Chung M., Malayev A., Purdy R. H., et al. (1999) Sulfated and unsulfated steroids modulate γ -aminobutyric acid_A receptor function through distinct sites. *Brain Research* **830**(1), 72-87.
- Park-Chung M., Wu F. S., Purdy R. H., et al. (1997) Distinct sites for inverse modulation of N-methyl-D-aspartate receptors by sulfated steroids. *Molecular Pharmacology* **52**(6), 1113-1123.
- Paul S. M. a Purdy R. H. (1992) Neuroactive steroids. *FASEB Journal: Official Publication Of The Federation Of American Societies For Experimental Biology* **6**(6), 2311–2322.
- Porcu P., Barron A. M., Frye C. A., et al. (2016) Neurosteroidogenesis Today: Novel Targets for Neuroactive Steroid Synthesis and Action and Their Relevance for Translational Research. *Journal of Neuroendocrinology* **28**(2), 1-34.

- Rambousek L., Bubeníková-Valešová V., Kačer P., et al. (2011) Cellular and behavioural effects of a new steroidal inhibitor of the N-methyl-d-aspartate receptor 3 α 5 β -pregnanolone glutamate. *Neuropharmacology* **61**(1-2), 61-68.
- Reddy D. S. (2010) Neurosteroids: Endogenous role in the human brain and therapeutic potentials. *Progress in Brain Research* **186**, 113-137.
- Reddy D. S. a Estes W. A. (2016) Clinical Potential of Neurosteroids for CNS Disorders. *Trends in Pharmacological Sciences* **37**(7), 543-561.
- Rogerson F. M. a Fuller P. J. (2000) Mineralocorticoid action. *Steroids* **65**(2), 61-73.
- Rolak L. A. (2003) Multiple sclerosis: it's not the disease you thought it was. *Clinical Medicine and Research* **1**(1), 57-60.
- Rupprecht R., Reul J. M. H. M., Trapp T., et al. (1993) Progesterone receptor-mediated effects of neuroactive steroids. *Neuron* **11**(3), 523-530.
- Sattler R. a Tymianski M. (2001) Molecular Mechanisms of Glutamate Receptor-Mediated Excitotoxic Neuronal Cell Death. *Molecular Neurobiology* **24**(1-3), 107-129.
- Scarpin K. M., Graham J. D., Mote P. A., et al. (2009) Progesterone Action in Human Tissues: Regulation by Progesterone Receptor (PR) Isoform Expression, Nuclear Positioning and Coregulator Expression. *Nuclear Receptor Signaling* **7**(1), 1-13.
- Sefarinejad M. R. (2008) Evaluation of Endocrine Profile, Hypothalamic-Pituitary-Testis Axis and Semen Quality in Multiple Sclerosis. *Journal of Neuroendocrinology* **20**(12), 1368-1375.
- Sellami M., Dhahbi W., Hayes L. D., et al. (2018) The effect of acute and chronic exercise on steroid hormone fluctuations in young and middle-aged men. *Steroids* **132**, 18-24.
- Shackleton C. (2008). Genetic Disorders of Steroid Metabolism Diagnosed by Mass Spectrometry. *Laboratory Guide to the Methods in Biochemical Genetics*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 549-605.
- Shafigullina Z. R., Velikanova L. I., Vorokhobina N. V., et al. (2018) Urinary steroid profiling by gas chromatography mass spectrometry: Early features of malignancy in patients with adrenal incidentalomas. *Steroids* **135**, 31-35.
- Schüle C., Nothdurfter C. a Rupprecht R. (2014) The role of allopregnanolone in depression and anxiety. *Progress in Neurobiology* **113**, 79-87.
- Sloka S., Silva C., Pryse-Phillips W., et al. (2011). A Quantitative Analysis of Suspected Environmental Causes of MS. *The Canadian Journal of Neurological Sciences* **38**(1), 98-105.

- Sosvorová L., Vítků J., Chlupáčová T., et al. (2015) Determination of seven selected neuro- and immunomodulatory steroids in human cerebrospinal fluid and plasma using LC-MS/MS. *Steroids* **98**, 1-8.
- Stanczyk F. Z., Xu X., Sluss P. M., et al. (2018) Do metabolites account for higher serum steroid hormone levels measured by RIA compared to mass spectrometry?. *Clinica Chimica Acta* **484**, 223-225.
- Stanton S. J., Mulette-Gillman O. A. a Huettel S. A. (2011) Seasonal variation of salivary testosterone in men, normally cycling women, and women using hormonal contraceptives. *Physiology & behavior* **104**(5), 804-808.
- Stárka L., Dušková M. a Hill M. (2015) Dehydroepiandrosterone: A neuroactive steroid. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **145**, 254-260.
- Stárka L., Hampl R. a Dušková M. (2018) Steroidní hormony a mikrobiom. *Diabetologie-Metabolismus-Endokrinologie-Výživa* **21**(1), 40-44.
- Taylor A. E., Keevil B. a Huhtaniemi I. T. (2015) Mass spectrometry and immunoassay: how to measure steroid hormones today and tomorrow. *European Journal of Endocrinology* **173**(2), D1-D12.
- Taylor A. H. a Al-Azzawi F. (2000) Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues. *Journal of Molecular Endocrinology* **24**(1), 145-155.
- Thompson A. J., Banwell B. L., Barkhof F., et al. (2018) Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *The Lancet Neurology* **17**(2), 162-173.
- Traynelis S. F., Wollmuth L. P., McBain C. J., et al. (2010) Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacological Reviews* **62**(3), 405-496.
- Tuem K. B. a Atey T. M. (2017) Neuroactive Steroids: Receptor Interactions and Responses. *Frontiers in Neurology* **8**, 1-10.
- Vachová M. (2012) Epidemie roztroušené sklerózy ve světě?. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie* **75**(6), 701-706.
- Vallée M. (2016) Neurosteroids and potential therapeutics: Focus on pregnenolone. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **160**, 78-87.
- Vallée M., Mayo W., Darnaudéry M., et al. (1997). Neurosteroids: deficient cognitive performance in aged rats depends on low pregnenolone sulfate levels in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**(26), 14865-14870.

- Vallée M., Shen W., Heinrichs S. C., et al. (2001) Steroid structure and pharmacological properties determine the anti-amnesic effects of pregnenolone sulphate in the passive avoidance task in rats. *The European Journal of Neuroscience* **14**(12), 2003-2010.
- VanDongen A. M. (2009) Biology of the NMDA receptor. Boca Raton: CRC Press.
- Voegel C. D., La Marca-Ghaemmaghami P., Ehlert U., et al. (2018) Steroid profiling in nails using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Steroids* **140**, 144-150.
- Vyklický V., Kořínek M. a Smejkalová T., et al. (2014) Structure, Function, and Pharmacology of NMDA Receptor Channels. *Physiological research* **63**(1). S191-S203.
- Walsh P., Kane N. a Butler S. (2005) The clinical role of evoked potentials. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* **76**(2), ii16-ii22.
- Wang M. (2011) Neurosteroids and GABA-A Receptor Function. *Frontiers in Endocrinology* **2**, 1-23.
- Wang Y., Karu K. a Griffiths W. J. (2007) Analysis of neurosterols and neurosteroids by mass spectrometry. *Biochimie* **89**(2), 182-191.
- Weiner H. L. (2008) A shift from adaptive to innate immunity: a potential mechanism of disease progression in multiple sclerosis. *Journal of Neurology* **255**(S1), 3-11.
- Wojtowicz P., Janečková H., Friedecký D., et al. (2013) Techniky metabolomiky v biomedicině. *Chemické listy* **107**(1), 3-11.
- Wooten G. F., Currie L. J., Bovbjerg V. E., et al. (2004) Are men at greater risk for Parkinson's disease than women?. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* **75**(4), 637-639.
- Zheng P. (2009) Neuroactive steroid regulation of neurotransmitter release in the CNS: Action, mechanism and possible significance. *Progress in Neurobiology* **89**(2), 134-152.

Přílohy

Příloha A: Koncentrace vybraných steroidů v krevním séru analyzovaných mužů.

Tab. S1: Koncentrace DHEA, T, PREG a PROG ($\text{nmol} \cdot \text{l}^{-1}$) v krevním séru 26 mužů tvořících kontrolní skupinu.

| Ročník | Osoba | Koncentrace \pm SD | | | |
|--------|-------|---|--|---|---|
| | | DHEA ($\text{nmol} \cdot \text{l}^{-1}$) | T ($\text{nmol} \cdot \text{l}^{-1}$) | PREG ($\text{nmol} \cdot \text{l}^{-1}$) | PROG ($\text{nmol} \cdot \text{l}^{-1}$) |
| 30. | K1 | <LOD | 17,59 \pm 0,45 | <LOD | 0,50 \pm 0,01 |
| | K2 | <LOD | 10,01 \pm 0,19 | <LOD | 0,46 \pm 0,04 |
| | K3 | <LOD | 9,16 \pm 1,20 | <LOD | 0,53 \pm 0,02 |
| 40. | K4 | 10,45 \pm 0,04 | 48,12 \pm 3,09 | <LOD | 0,55 \pm 0,06 |
| | K5 | <LOD | 64,72 \pm 1,99 | <LOD | 0,58 \pm 0,00 |
| | K6 | 3,53 \pm 0,28 | 25,12 \pm 3,01 | <LOD | 0,29 \pm 0,03 |
| | K7 | 6,74 \pm 0,80 | 92,17 \pm 15,89 | <LOD | 0,51 \pm 0,07 |
| | K8 | 14,86 \pm 1,96 | 9,52 \pm 0,42 | 5,62 \pm 0,72 | 0,44 \pm 0,02 |
| | K9 | 9,75 \pm 0,74 | 25,50 \pm 2,15 | 8,38 \pm 0,01 | 0,83 \pm 0,03 |
| | K10 | 17,17 \pm 0,10 | 14,09 \pm 1,03 | <LOD | 0,51 \pm 0,04 |
| | K11 | 18,22 \pm 0,87 | 26,08 \pm 0,85 | <LOD | 0,63 \pm 0,01 |
| 50. | K12 | 4,53 \pm 0,27 | 15,85 \pm 2,45 | 4,33 \pm 0,58 | 0,90 \pm 0,07 |
| | K13 | 4,78 \pm 0,42 | 13,45 \pm 0,84 | <LOD | 0,52 \pm 0,05 |
| | K14 | 24,34 \pm 1,98 | 37,37 \pm 3,77 | <LOD | 0,34 \pm 0,01 |
| | K15 | 5,57 \pm 0,60 | 23,20 \pm 1,39 | <LOD | 0,58 \pm 0,04 |
| | K16 | <LOD | 25,08 \pm 0,47 | <LOD | 0,47 \pm 0,03 |
| | K17 | 3,78 \pm 0,34 | 31,09 \pm 0,50 | <LOD | 0,36 \pm 0,01 |
| 60. | K18 | 19,54 \pm 1,12 | 23,62 \pm 0,80 | <LOD | 0,35 \pm 0,05 |
| | K19 | 8,08 \pm 0,67 | 22,72 \pm 0,78 | <LOD | 0,55 \pm 0,01 |
| | K20 | 7,82 \pm 1,03 | 27,81 \pm 3,43 | <LOD | 0,41 \pm 0,02 |
| | K21 | 15,43 \pm 1,97 | 55,85 \pm 4,83 | <LOD | 0,41 \pm 0,00 |
| 70. | K22 | 48,25 \pm 0,43 | 24,01 \pm 2,43 | 14,84 \pm 0,32 | 0,78 \pm 0,10 |
| | K23 | 40,53 \pm 1,09 | 54,34 \pm 1,06 | 8,21 \pm 0,11 | 0,72 \pm 0,03 |
| | K24 | 16,78 \pm 0,76 | 15,46 \pm 2,02 | <LOD | 0,43 \pm 0,00 |
| 80. | K25 | 29,76 \pm 2,24 | 26,92 \pm 1,60 | <LOD | 0,71 \pm 0,04 |
| 90. | K26 | 48,17 \pm 3,83 | 20,85 \pm 2,56 | 7,50 \pm 0,49 | 0,69 \pm 0,01 |

Tab. S2: Koncentrace DHEA, T, PREG a PROG (nmol · l⁻¹) v krevním séru 138 mužů s diagnostikovanou RS.

| Ročník | Osoba | Koncentrace ± SD | | | |
|--------|-------|-----------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| | | DHEA (nmol · l ⁻¹) | T (nmol · l ⁻¹) | PREG (nmol · l ⁻¹) | PROG (nmol · l ⁻¹) |
| 30. | P1 | <LOD | 80,31 ± 1,64 | 8,44 ± 0,14 | 0,64 ± 0,07 |
| | P2 | 3,53 ± 0,45 | 42,76 ± 0,85 | <LOD | 0,36 ± 0,05 |
| 40. | P3 | <LOD | 24,56 ± 1,28 | <LOD | 0,37 ± 0,03 |
| | P4 | <LOD | 38,04 ± 3,62 | 9,18 ± 0,36 | 0,26 ± 0,03 |
| | P5 | 19,77 ± 1,92 | 17,63 ± 2,14 | <LOD | 0,04 ± 0,00 |
| | P6 | 12,99 ± 1,27 | 34,03 ± 1,51 | <LOD | 0,38 ± 0,00 |
| | P7 | 6,17 ± 0,81 | 32,20 ± 1,16 | <LOD | 0,34 ± 0,02 |
| | P8 | <LOD | 21,88 ± 2,08 | <LOD | 0,24 ± 0,01 |
| | P9 | <LOD | 23,70 ± 0,50 | <LOD | 0,42 ± 0,02 |
| | P10 | 25,86 ± 0,75 | 25,75 ± 0,25 | <LOD | 0,66 ± 0,01 |
| 50. | P11 | 2,64 ± 0,24 | 19,16 ± 0,32 | <LOD | 0,51 ± 0,02 |
| | P12 | 19,03 ± 0,97 | 33,42 ± 0,98 | 6,35 ± 0,50 | 0,58 ± 0,04 |
| | P13 | <LOD | 26,31 ± 2,04 | <LOD | 0,28 ± 0,04 |
| | P14 | 11,92 ± 0,74 | 58,48 ± 5,06 | <LOD | 0,27 ± 0,01 |
| | P15 | 62,28 ± 3,53 | 28,30 ± 1,63 | 6,89 ± 0,24 | 0,57 ± 0,03 |
| | P16 | 5,15 ± 0,53 | 34,44 ± 1,31 | 4,99 ± 0,56 | 0,56 ± 0,08 |
| | P17 | <LOD | 47,13 ± 0,66 | <LOD | 0,38 ± 0,04 |
| | P18 | <LOD | 14,50 ± 0,50 | <LOD | 0,27 ± 0,02 |
| | P19 | 69,97 ± 4,11 | 44,66 ± 0,68 | 6,20 ± 0,06 | 0,48 ± 0,02 |
| | P20 | 28,21 ± 1,07 | 84,05 ± 1,82 | 4,10 ± 0,17 | 0,61 ± 0,04 |
| 60. | P21 | 6,16 ± 0,08 | 36,22 ± 1,77 | 3,34 ± 0,49 | 0,78 ± 0,04 |
| | P22 | 8,91 ± 0,11 | 19,61 ± 1,46 | 4,68 ± 0,62 | 0,36 ± 0,05 |
| | P23 | 39,37 ± 0,09 | 28,15 ± 0,42 | 9,49 ± 0,34 | 0,55 ± 0,04 |
| | P24 | 19,64 ± 0,82 | 30,38 ± 0,76 | <LOD | 0,26 ± 0,02 |
| | P25 | <LOD | 21,28 ± 0,74 | <LOD | 0,37 ± 0,01 |
| | P26 | 64,68 ± 1,03 | 31,69 ± 0,31 | 3,67 ± 0,28 | 0,71 ± 0,02 |
| | P27 | 33,75 ± 1,67 | 75,93 ± 3,14 | 3,43 ± 0,12 | <LOD |
| | P28 | 11,15 ± 0,54 | 16,09 ± 0,63 | <LOD | 0,20 ± 0,02 |
| 60. | P29 | 12,49 ± 1,01 | 29,35 ± 1,49 | <LOD | 0,36 ± 0,03 |
| | P30 | 21,81 ± 1,57 | 38,13 ± 1,94 | 5,33 ± 0,82 | 0,44 ± 0,03 |
| | P31 | 18,83 ± 1,00 | 17,21 ± 0,58 | 5,84 ± 0,30 | 0,29 ± 0,02 |
| | P32 | 41,81 ± 5,21 | 6,92 ± 0,41 | <LOD | 0,16 ± 0,03 |
| | P33 | 27,08 ± 0,71 | 41,35 ± 3,29 | 5,27 ± 0,71 | 0,62 ± 0,01 |
| | P34 | 21,65 ± 1,41 | 15,72 ± 0,48 | <LOD | 0,31 ± 0,04 |
| | P35 | 21,42 ± 0,65 | 66,93 ± 3,35 | 3,78 ± 0,03 | 0,52 ± 0,03 |
| | P36 | <LOD | 16,20 ± 1,47 | <LOD | 0,32 ± 0,02 |
| | P37 | 28,32 ± 2,64 | 37,99 ± 1,74 | 5,53 ± 0,29 | 0,46 ± 0,06 |
| | P38 | 22,24 ± 2,18 | 27,47 ± 1,37 | 4,33 ± 0,30 | 0,29 ± 0,03 |
| | P39 | 42,06 ± 3,14 | 13,85 ± 0,66 | <LOD | 0,30 ± 0,01 |

| Ročník | Osoba | Koncentrace ± SD | | | | | | | |
|--------|-------|-----------------------------------|--|--------------------------------|--|-----------------------------------|--|-----------------------------------|--|
| | | DHEA (nmol · l ⁻¹) | | T (nmol · l ⁻¹) | | PREG (nmol · l ⁻¹) | | PROG (nmol · l ⁻¹) | |
| | P40 | <LOD | | 17,17 ± 0,27 | | <LOD | | 0,46 ± 0,04 | |
| | P41 | 20,24 ± 1,63 | | 34,51 ± 0,09 | | 2,97 ± 0,19 | | 0,35 ± 0,05 | |
| | P42 | 23,79 ± 1,53 | | 37,69 ± 2,08 | | <LOD | | 0,37 ± 0,04 | |
| | P43 | 52,83 ± 1,37 | | 19,41 ± 0,43 | | 10,53 ± 0,19 | | 0,57 ± 0,05 | |
| | P44 | 27,27 ± 1,38 | | 40,28 ± 2,29 | | 6,93 ± 0,25 | | 0,32 ± 0,03 | |
| | P45 | 54,96 ± 0,17 | | 41,75 ± 0,28 | | 4,33 ± 0,31 | | 0,33 ± 0,01 | |
| | P46 | 83,04 ± 3,31 | | 30,95 ± 0,07 | | 9,00 ± 0,12 | | <LOD | |
| | P47 | 35,48 ± 0,65 | | 22,79 ± 0,67 | | <LOD | | 0,57 ± 0,09 | |
| | P48 | 28,80 ± 0,95 | | 38,07 ± 1,42 | | 3,68 ± 0,06 | | <LOD | |
| | P49 | 18,01 ± 1,83 | | 43,37 ± 1,69 | | 6,39 ± 0,21 | | 1,45 ± 0,05 | |
| | P50 | <LOD | | 23,61 ± 1,12 | | <LOD | | 0,53 ± 0,08 | |
| | P51 | 32,49 ± 1,59 | | 14,47 ± 0,15 | | <LOD | | 0,22 ± 0,00 | |
| | P52 | 15,20 ± 1,08 | | 20,36 ± 0,29 | | 3,50 ± 0,41 | | 0,70 ± 0,05 | |
| | P53 | 35,87 ± 0,60 | | 34,61 ± 0,64 | | <LOD | | <LOD | |
| | P54 | 33,92 ± 0,47 | | 31,45 ± 1,36 | | 4,27 ± 0,12 | | <LOD | |
| | P55 | 43,58 ± 4,41 | | 33,20 ± 1,77 | | 6,78 ± 0,17 | | 0,52 ± 0,03 | |
| | P56 | 17,30 ± 1,64 | | 47,82 ± 3,16 | | <LOD | | 0,46 ± 0,01 | |
| | P57 | 40,66 ± 3,16 | | 47,73 ± 2,05 | | 8,52 ± 1,10 | | 0,45 ± 0,07 | |
| | P58 | 67,54 ± 2,44 | | 41,51 ± 2,63 | | 9,03 ± 1,22 | | 0,31 ± 0,00 | |
| | P59 | 83,96 ± 10,09 | | 33,79 ± 2,86 | | 21,88 ± 2,02 | | <LOD | |
| | P60 | 39,69 ± 1,28 | | 16,73 ± 0,49 | | 7,23 ± 0,31 | | 0,64 ± 0,07 | |
| | P61 | 47,03 ± 1,19 | | 20,64 ± 1,55 | | 3,24 ± 0,42 | | 0,51 ± 0,07 | |
| | P62 | 7,31 ± 0,76 | | 13,58 ± 0,24 | | <LOD | | 0,38 ± 0,00 | |
| | P63 | 34,80 ± 4,30 | | 24,63 ± 2,20 | | 7,93 ± 0,60 | | 0,48 ± 0,01 | |
| | P64 | 21,91 ± 1,77 | | 14,25 ± 1,01 | | <LOD | | 0,43 ± 0,03 | |
| | P65 | 26,08 ± 1,26 | | 29,52 ± 1,74 | | 2,56 ± 0,18 | | 0,43 ± 0,02 | |
| | P66 | 51,38 ± 1,78 | | 22,14 ± 0,83 | | 3,58 ± 0,11 | | 0,28 ± 0,03 | |
| | P67 | 38,75 ± 1,70 | | 54,18 ± 2,68 | | 3,67 ± 0,31 | | 0,37 ± 0,05 | |
| 70. | P68 | 36,04 ± 2,39 | | 47,59 ± 2,11 | | 5,09 ± 0,35 | | 0,42 ± 0,00 | |
| | P69 | 13,05 ± 0,09 | | 35,91 ± 1,15 | | 4,01 ± 0,29 | | 0,62 ± 0,04 | |
| | P70 | 98,39 ± 4,54 | | 14,94 ± 0,37 | | 9,35 ± 0,24 | | 0,65 ± 0,02 | |
| | P71 | 17,31 ± 0,80 | | 34,98 ± 0,93 | | <LOD | | 0,38 ± 0,04 | |
| | P72 | 54,49 ± 2,83 | | 45,55 ± 3,16 | | 4,36 ± 0,12 | | 0,48 ± 0,03 | |
| | P73 | 21,89 ± 1,15 | | 28,42 ± 0,51 | | 7,67 ± 0,20 | | 0,69 ± 0,02 | |
| | P74 | 53,90 ± 1,87 | | 20,42 ± 0,76 | | 9,47 ± 0,09 | | 0,43 ± 0,03 | |
| | P75 | 11,71 ± 1,59 | | 17,48 ± 1,32 | | <LOD | | 0,49 ± 0,01 | |
| | P76 | 50,80 ± 5,21 | | 34,77 ± 4,51 | | 5,26 ± 0,24 | | 0,77 ± 0,04 | |
| | P77 | 49,03 ± 1,51 | | 51,06 ± 1,61 | | 6,82 ± 0,30 | | 0,44 ± 0,02 | |
| | P78 | 9,88 ± 0,51 | | 9,76 ± 0,29 | | 4,63 ± 0,03 | | 1,00 ± 0,03 | |
| | P79 | 25,78 ± 0,54 | | 15,64 ± 0,36 | | <LOD | | 0,30 ± 0,02 | |
| | P80 | 59,81 ± 1,16 | | 43,06 ± 0,55 | | 6,81 ± 0,52 | | 0,43 ± 0,05 | |
| | P81 | 53,00 ± 2,46 | | 46,06 ± 2,37 | | 7,05 ± 0,53 | | 0,42 ± 0,02 | |

| Ročník | Osoba | Koncentrace ± SD | | | | | | | |
|--------|-------|-----------------------------------|---------|--------------------------------|--------|-----------------------------------|--------|-----------------------------------|--------|
| | | DHEA (nmol · l ⁻¹) | | T (nmol · l ⁻¹) | | PREG (nmol · l ⁻¹) | | PROG (nmol · l ⁻¹) | |
| | P82 | 37,99 | ± 0,51 | 16,19 | ± 0,65 | 5,67 | ± 0,03 | 0,41 | ± 0,06 |
| | P83 | 38,11 | ± 1,91 | 48,71 | ± 0,94 | 6,65 | ± 0,16 | <LOD | |
| | P84 | 105,03 | ± 5,60 | 13,41 | ± 0,45 | 9,93 | ± 1,04 | 0,57 | ± 0,03 |
| | P85 | 41,86 | ± 0,64 | 33,82 | ± 0,59 | 3,32 | ± 0,45 | 0,43 | ± 0,06 |
| | P86 | 73,33 | ± 1,44 | 49,85 | ± 1,31 | 7,17 | ± 0,37 | 0,51 | ± 0,01 |
| | P87 | 57,29 | ± 2,36 | 17,77 | ± 0,59 | 6,32 | ± 0,33 | 0,47 | ± 0,05 |
| | P88 | 35,87 | ± 1,29 | 27,34 | ± 1,06 | 2,88 | ± 0,16 | 0,38 | ± 0,02 |
| | P89 | 28,98 | ± 1,43 | 26,92 | ± 0,34 | <LOD | | 0,09 | ± 0,00 |
| | P90 | 47,94 | ± 2,61 | 25,94 | ± 0,06 | <LOD | | 0,27 | ± 0,03 |
| | P91 | 29,21 | ± 1,56 | 24,85 | ± 0,42 | <LOD | | <LOD | |
| | P92 | 68,15 | ± 0,35 | 43,52 | ± 0,29 | 5,28 | ± 0,06 | 0,55 | ± 0,01 |
| | P93 | 196,23 | ± 1,44 | 32,80 | ± 0,98 | 10,67 | ± 0,28 | 0,46 | ± 0,04 |
| | P94 | 20,73 | ± 0,59 | 23,57 | ± 0,26 | <LOD | | <LOD | |
| | P95 | 41,33 | ± 3,13 | 14,58 | ± 0,56 | <LOD | | 0,19 | ± 0,01 |
| | P96 | 109,71 | ± 3,90 | 26,04 | ± 1,19 | 5,00 | ± 0,06 | <LOD | |
| | P97 | 22,45 | ± 1,18 | 15,27 | ± 0,67 | 3,45 | ± 0,29 | 0,29 | ± 0,03 |
| | P98 | 49,79 | ± 4,34 | 32,65 | ± 2,73 | 3,37 | ± 0,08 | 0,19 | ± 0,03 |
| | P99 | 38,72 | ± 1,12 | 26,80 | ± 0,63 | 11,23 | ± 1,01 | 0,40 | ± 0,01 |
| | P100 | 77,38 | ± 11,41 | 53,64 | ± 2,26 | <LOD | | 0,05 | ± 0,01 |
| | P101 | 53,25 | ± 3,00 | 20,73 | ± 1,18 | 4,78 | ± 0,47 | 0,56 | ± 0,02 |
| | P102 | 166,18 | ± 12,95 | 16,57 | ± 1,04 | 8,56 | ± 0,39 | 0,50 | ± 0,04 |
| | P103 | 41,04 | ± 1,78 | 14,70 | ± 0,68 | 13,21 | ± 0,32 | 0,39 | ± 0,03 |
| | P104 | 55,37 | ± 8,45 | 31,33 | ± 3,79 | 4,29 | ± 0,65 | 0,47 | ± 0,03 |
| | P105 | 35,26 | ± 1,30 | 43,58 | ± 0,96 | 4,38 | ± 0,02 | 0,49 | ± 0,04 |
| | P106 | 55,67 | ± 3,09 | 59,99 | ± 3,32 | 5,77 | ± 0,18 | 0,82 | ± 0,04 |
| | P107 | 65,89 | ± 2,82 | 101,29 | ± 4,69 | 9,39 | ± 0,61 | 0,71 | ± 0,09 |
| | P108 | 151,67 | ± 3,77 | 40,75 | ± 0,65 | 12,14 | ± 0,50 | 0,55 | ± 0,02 |
| | P109 | 180,40 | ± 12,00 | 38,66 | ± 1,55 | 8,47 | ± 0,57 | 1,06 | ± 0,12 |
| 80. | P110 | 71,35 | ± 3,57 | 57,31 | ± 3,12 | 11,32 | ± 0,67 | 0,51 | ± 0,05 |
| | P111 | 125,97 | ± 9,21 | 54,14 | ± 3,51 | 16,62 | ± 1,79 | 0,68 | ± 0,02 |
| | P112 | 77,78 | ± 7,76 | 19,48 | ± 0,65 | 8,32 | ± 0,41 | 0,89 | ± 0,04 |
| | P113 | 56,42 | ± 2,29 | 66,53 | ± 2,28 | 6,51 | ± 0,67 | 0,48 | ± 0,03 |
| | P114 | 58,26 | ± 1,42 | 35,30 | ± 0,94 | 9,82 | ± 0,79 | 1,21 | ± 0,06 |
| | P115 | 50,67 | ± 2,01 | 37,83 | ± 2,63 | 5,57 | ± 0,24 | 0,81 | ± 0,10 |
| | P116 | 27,48 | ± 0,62 | 21,60 | ± 1,08 | <LOD | | 0,62 | ± 0,07 |
| | P117 | 67,63 | ± 5,00 | 31,96 | ± 2,51 | 8,56 | ± 0,07 | 0,56 | ± 0,05 |
| | P118 | 60,10 | ± 1,36 | 24,68 | ± 0,82 | 5,87 | ± 0,26 | 0,40 | ± 0,07 |
| | P119 | 27,00 | ± 0,48 | 52,00 | ± 3,20 | 4,08 | ± 0,13 | 0,68 | ± 0,13 |
| | P120 | 57,60 | ± 2,95 | 37,47 | ± 0,82 | 3,92 | ± 0,06 | 0,43 | ± 0,02 |
| | P121 | 45,79 | ± 2,01 | 9,38 | ± 0,20 | 3,67 | ± 0,12 | 0,56 | ± 0,01 |
| | P122 | 44,93 | ± 1,06 | 37,49 | ± 0,70 | 5,71 | ± 0,24 | <LOD | |
| | P123 | 143,58 | ± 4,47 | 32,32 | ± 0,84 | 12,45 | ± 0,72 | 0,15 | ± 0,04 |

| Ročník | Osoba | Koncentrace ± SD | | | | | | | |
|--------|-------|-----------------------------------|---------|--------------------------------|--------|-----------------------------------|--------|-----------------------------------|--------|
| | | DHEA (nmol · l ⁻¹) | | T (nmol · l ⁻¹) | | PREG (nmol · l ⁻¹) | | PROG (nmol · l ⁻¹) | |
| | P124 | 50,43 | ± 1,23 | 35,62 | ± 0,34 | 7,14 | ± 0,23 | 0,72 | ± 0,04 |
| | P125 | 51,38 | ± 0,88 | 24,30 | ± 0,91 | 4,14 | ± 0,09 | <LOD | |
| | P126 | 222,89 | ± 6,13 | 18,60 | ± 0,43 | 13,58 | ± 0,50 | 0,59 | ± 0,02 |
| | P127 | 50,52 | ± 1,30 | 23,72 | ± 0,40 | 5,96 | ± 0,46 | 0,36 | ± 0,04 |
| | P128 | 113,19 | ± 3,15 | 52,31 | ± 1,73 | 9,96 | ± 0,51 | 0,47 | ± 0,04 |
| | P129 | 37,64 | ± 0,96 | 34,57 | ± 2,45 | <LOD | | <LOD | |
| | P130 | 5,73 | ± 0,54 | 89,71 | ± 5,04 | <LOD | | 0,54 | ± 0,08 |
| | P131 | 65,19 | ± 7,12 | 7,81 | ± 0,75 | 8,29 | ± 0,27 | 0,60 | ± 0,08 |
| | P132 | 48,35 | ± 0,83 | 17,23 | ± 0,29 | <LOD | | 0,48 | ± 0,04 |
| 90. | P133 | 53,23 | ± 2,72 | 31,41 | ± 1,89 | 8,53 | ± 0,85 | 0,53 | ± 0,00 |
| | P134 | 203,32 | ± 30,21 | 27,36 | ± 0,02 | 11,70 | ± 1,15 | 0,61 | ± 0,08 |
| | P135 | 22,91 | ± 1,45 | 27,50 | ± 0,57 | <LOD | | 0,80 | ± 0,10 |
| | P136 | 79,36 | ± 10,08 | 16,16 | ± 2,20 | 6,62 | ± 0,66 | 0,57 | ± 0,05 |
| | P137 | 66,03 | ± 2,86 | 28,22 | ± 1,09 | 4,57 | ± 0,32 | 0,16 | ± 0,02 |
| | P138 | 142,93 | ± 0,23 | 53,34 | ± 0,44 | 10,49 | ± 0,86 | 0,35 | ± 0,02 |