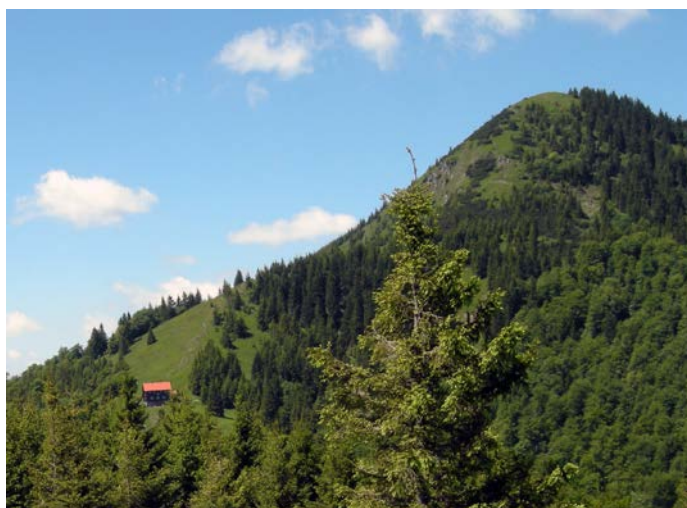




Šilinkův nadační fond
pod záštitou Endokrinologického ústavu v Praze
a ve spolupráci s TJ Havran
pořádá tradiční XXXII. symposium „Imunoanalýza 2018“.



IMUNOANALÝZA

28. 5. – 1. 6. 2018

Lubochňa – Vyšné Krátké – Chata Lúčka

Sborník abstraktů

Radmila Řápková, Radovan Bílek, Pavel Drašar
redaktoři



Programový výbor:

Prof. MUDr. RNDr. Luboslav Stárka, DrSc.

Prof. RNDr. Richard Hampl, DrSc.

Doc. Ing. Radovan Bílek, CSc.

Organizační výbor

RNDr. Marie Bičíková

RNDr. Zdeněk Putz, CSc.

Mgr. Ludmila Máčová, Ph.D.



FYZIOLOGICKÉ ZMĚNY PO LÉČEBNĚM POBYTU V LÁZNÍCH – Z ENDOKRINOLOGICKÉHO HLEDISKA

MARIE BIČÍKOVÁ^{a*}, LUDMILA MÁČOVÁ^a, LUCIE KOLÁTOROVÁ^a, MARTIN HILL^a, DOBROSLAVA JANDOVÁ^b, JAROSLAV NOVOTNÝ^c, JAN KUBÁNEK^c, PAVLA FORMANOVÁ^c

^aEndokrinologický ústav, Národní 8, 116 94 Praha; 3. LF UK Praha, Ruská 2411/87, 100 00 Praha 10; ^cPriessnitzovy léčebné lázně a.s., Priessnitzova 299, 790 03 Jeseník
mbicikova@endo.cz

Naprostá většina pacientů se po pobytu v lázních cítí zdravotně lépe. Tato skutečnost je ovšem pouze subjektivní a odpůrci lázeňské léčby, která je bezesporu nákladná, tvrdí, že subjektivní dobrý pocit je vyvolaný pouze tím, že dotčený pacient je zbaven denních starostí o práci a o rodinu. Pravda je jiná. Positivní efekt léčebného lázeňského pobytu se projevuje dlouhou dobu i po návratu do běžných všedních dnů. Objektivní hledisko pro hodnocení stavu pacienta, které by bylo neoddiskutovatelné, stále chybí.

V předložené práci prezentujeme výsledky naší snahy o nalezení objektivních parametrů pro hodnocení výsledků lázeňské léčebně rehabilitační péče u osob s chronickým onemocněním a u osob s psychickými poruchami tj. na prvním místě klienti s indikací IX (psychiatrická převážně nepsychotická onemocnění). Do souboru byli zařazeni i jednotlivci chronicky nemocní se závažnými nemocemi dýchacími, které jejich onemocnění integrálně doprovází anxiózně-depresivní symptomatologie a několik onkologických klientů po prodělaném zhoubném nádoru rovněž s anxiózně-depresivní symptomatologií.

Při návrhu studie jsme vycházeli z našich zkušeností s neuroaktivními steroidy a neurosteroidy, které hrají zásadní roli v psychické pohodě pacientů. Je známo, že mozek jako největší žláza s vnitřní sekrecí, produkuje celou řadu *de novo* vznikajících nebo z prekurzorů vzniklých steroidních hormonů, které se nazývají neurosteroidy. Neurosteroid, které jsou vlastně podskupinou neuroaktivních steroidů mohou působit na receptorech, které fungují jako iontové kanály. Positivní modulace neurosteroidy obsazených receptorů působí *de facto* proti sobě a zaručuje tak rovnováhu organizmu.

Dalšími faktory podléjícími se na zlepšení zdravotního stavu klientů lázní jsou z endokrinologického hlediska velmi citlivé a důležité ukazatele aminokyselina homocystein a serotonin. Homocystein je aminokyselina vznikající při metabolismu esenciální aminokyseliny metioninu jako vedlejší produkt, který je buď recyklován opět na methionin, nebo na užitečnou neesenciální aminokyselinu cystein, která je významnou složkou bílkovin. Metabolismus homocysteinu je ovlivňován kyselinou listovou (B9), vitamínem B6 a B12. Jestliže vyjmenované vitaminy nejsou přítomny v dostatečném množství, dochází k poruchám- dysfunkcím a to na prvním místě v centrálním nervovém systému. Pokud se naopak homocystein nadměrně hromadí v krvi, vzniká takzvaná hyperhomocysteinemie a s jistotou můžeme říci, že vysoké koncentrace homocysteinu jsou pro organizmus

škodlivé. Nahromadění homocysteinu může vést až k oxidačnímu stresu, který patří k současným největším nepřátelům člověka. Vedle kardiovaskulárních onemocnění, je v současnosti hyperhomocysteinemie potvrzována u celé řady civilizačních onemocnění jakými jsou například: deprese, Alzheimerova choroba, parkinsonismus, roztroušená skleróza mozkomíšni, migrény, chronický únavový syndrom, alergie, snížená imunita a další.

O blahodárnosti serotoninu není potřeba se šířit. Prekursor (L-tryptofan) tohoto „hormonu štěstí“ je možné koupit jako potravinový doplněk snad v každé lékárně. L-tryptofan je esenciální aminokyselina (jedna z osmi esenciálních aminokyselin = nezbytných stavebních prvků bílkovin), které tělo musí získávat ze stravy (například z banánů). Na trhu se lze setkat s celou řadou potravinových doplňků obsahujících L-tryptofan, které by měly podpořit tvorbu serotoninu.

Výsledky vyšetření sledovaných látek z odběrů krve je v číselné podobě vyjádřený jako relativní rozdíl v procentech. Serotonin u všech pacientek stoupl v souhrnu o relativních 23 %, zatímco homocystein klesl o 17,1 %. Už tyto dvě hodnoty ukazují na pozitivní vliv lázeňské léčby. Výsledky skupiny steroidů, svědčí o aktivaci kůry nadledvin. Její funkce má u pacientů s různými, zpravidla tlumícími farmaky, dalekosáhlý význam. Zvýšení hladiny kortizolu (o 18,3 %) zůstalo vždy v rámci referenčních mezí, tzn. kortizol dosáhl fyziologické hladiny. Odborná literatura u některých pacientů s psychickými poruchami poukazuje na utlumení funkce osy hypotalamus – hypofýza – nadledvina. Nárůst hladin kortizolu lze tedy interpretovat jako tendenci k normalitě funkce kůry nadledvin. Pregnenolon stoupl o relativních 44,5 %. Tento steroid stojí na začátku vzniku všech steroidních hormonů a je považován odbornou veřejností za látku zvyšující mentální aktivitu a neuroprotektivní látku. O podobných relativních 40,6 % stoupl 3 α ,5 α -tetrahydroprogesteron - allopregnanolon, endogenní látka se silným protizánětlivým účinkem. Positivně moduluje GABAA receptory s následným uklidňujícím účinkem. Nález zvýšených hladin DHEA a pregnenolon sulfátu (o 16,4 %), které pozitivně moduluji N-methyl-D-aspartátové receptory vedou k celkové stimulaci organismu, zbystření a pozitivnímu myšlení. Vysoce pozitivní je nález 7 α -OH-DHEA, stoupl o 15,7 %. Tento steroid je silným imunoprotektivem a působí proti autoimunitním reakcím, kterými jsou klienti/ s psychickými poruchami ohroženi.

Zvýšené hladiny konjugovaných steroidů ať již glukuronidů nebo sulfátů jsou rovněž vysoce důležité, protože jejich pozitivní účinek je dlouhodobý. Lze tedy usuzovat, že celkové zlepšení duševního stavu pacientů, zvýšení imunity podporujících látek a látek chránících proti autoimunitním reakcím se po ukončení léčby v lázních dlouhodobě udrží.

Podpořeno MZ ČR - RVO (Endokrinologický ústav - EÚ, 00023761).

ENDOKRINNÍ DISRUPTORY**RADOVAN BÍLEK**

*Endokrinologický ústav, Národní 8, 116 94 Praha
rbilek@endo.cz*

Život závisí na schopnosti normálního vývoje a reprodukce, což není možné bez zdravého endokrinního systému. Látky, které mohou interferovat s tímto systémem, se nazývají endokrinní disruptory (ED). Endokrinologická společnost¹ v roce 2012 definovala endokrinní disruptory jako exogenní chemikálie nebo směs chemikálií, které mohou interferovat v jakékoliv souvislosti s hormonální akcí, a v roce 2015 zdůraznila, že nejzávažnější je vliv expozice ED při vývoji. ED jsou především průmyslově vyráběné látky chemicky velmi heterogenní, často lipofilní, jako jsou persistentní organické polutanty, např. 209 polychlorovaných bifenyliů, 209 polybromovaných difenyleterů, perfluorované uhlovodíky, organohalogenové pesticidy DDT, DDE, polychlorované dioxiny, ftaláty, parabeny, organometalické látky a nanočástice, diethylstilbestrol, bisfenol A, kontraceptiva, ale i přírodní látky typu fytoestrogenů. ED kontaminují vzduch, vodu, potraviny i výrobky sloužící k osobní péči a mohou tak negativně ovlivňovat reprodukční funkci, způsobovat abnormální růst a opožďovat vývoj nervové soustavy u dětí, měnit imunitu, negativně ovlivňovat funkci štítné žlázy, zvyšovat riziko vzniku obezity, metabolického syndromu i maligních onemocnění apod. ED jsou nejvíce ohroženy těhotné ženy a jejich děti, přičemž vliv ED se může projevit až v dospělosti, ale může být i transgenerační.

Podpořeno MZ ČR - RVO (Endokrinologický ústav - EÚ, 00023761).

LITERATURA

1. Gore A.C., Chappell V.A., Fenton S.E., et al.: *Endocr. Rev.* 36, E1 (2015).

KARDIOTONICKÉ STEROIDY A NOVÉ MOŽNOSTI JEJICH KLINICKÉHO POUŽITÍ (REPURPOSING)

**EVA KMONÍČKOVÁ^a, MICHAL JURÁŠEK^b,
PAVEL DRAŠAR^b**

*^aÚstav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i., Videňská 1083, Praha 4; ^bÚstav chemie přírodních látek, FPBT, VŠCHT v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
Pavel.Drasar@vscht.cz*

Možnosti změny klinické indikace (repurposing) standardně schválených a používaných API (active pharmaceutical ingredient) jsou v současné době velmi lákavé. Dopusud získané informace o látce by umožnily podstatné zkrácení výzkumného a schvalovacího procesu, který obvykle vede k eventuelnímu zavedení nového léčiva do praxe. Navíc, pokud je API přírodní sloučeninou, je další

využití obnovitelného zdroje ekonomickým faktorem, který je velmi žádoucí, mj. i ze současného pohledu na „cirkulární ekonomiku“.

Rostliny s obsahem kardioglykosidů jsou v lidové medicíně známy po mnoho tisíc let a byly užívány jako droga. Jejich použití jako emetika, k podpoře srdeční činnosti, proti otokům je dokumentováno ve starověkém Egyptě i Číně, dávno před 3000 lety¹. V novodobé humánní medicíně jsou kardiotonické steroidy užívány k léčbě městnavého srdečního selhání a arytmií.

V poslední době se objevují práce, které používají kardiotonické steroidy i k jiným léčebným účelům, jako např. antimalarika², antivirotika³ aj. Nicméně, mnoho prací uvádí jejich možné využití jako látek protirakovinných⁴.

Zahájili jsme menší projekt, který má ukázat významnou protinádorovou aktivitu 19-oxokardenolidů. Zaměřujeme se například na to, že farmakologická léčba nemalobuněčného karcinomu plic je neuspokojivá a je třeba hledat nová léčiva a postupy. Jednou ze strategií zásahu nádorových buněk je přetrvávající zvýšení intracelulárních iontů vápníku vedoucí k apoptóze. Kardenolidy se jeví jako kandidáti této strategie, neboť jako inhibitory Na⁺/K⁺-ATPasy zvyšují koncentraci kalcia v buňce. Naše pilotní studie ukazují jak inhibici pumpy (enzymu), tak cytotoxický účinek jednoho z kardenolidů (hyrkanosid) v nádorových buňkách⁵. Předkládáme hypotézu, že hyrkanosid má protinádorový potenciál u plicního karcinomu. Pro cílenou aktivaci apoptózy nádorových buněk budeme zkoumat možnost zvýšit účinek 19-oxokardenolidů synergií s inhibitory sarko/endoplasmatické Ca²⁺-ATPasy a reaktivátorem proteinu p53, uvedené na podobném mechanismu jako je princip syntetické letality. Molekulární modelování, *in vitro* a *in vivo* experimenty uplatněné v projektu umožní získat nové poznatky pro racionální kombinace malé molekuly hyrkanosidu s další protinádorovou terapií a pro syntézu cíleného kardenolidu v léčbě plicních nádorů. Cílem nového projektu je studovat cytotoxické účinky 19-oxokardenolidů, inhibitorů Na⁺/K⁺-ATPasy v modelu nemalobuněčného nádoru plic v podmínkách *in vitro* a *in vivo*, definovat molekulární podstatu buněčné smrti při racionální kombinaci s jinou protinádorovou léčbou a navrhnout semisyntetický targetovaný derivát.

Tato práce vznikla na podporu grantu GA ČR 19-04483S a za podpory grantu MŠMT ČR LO1304.

LITERATURA

1. Wan F.: *Herb Lore*, 5. vydání, Oakland, California (1936).
2. Hoopes G.M., Hamilton J.P., Kim J., Zhao D.Y., Wiegert-Rininger K., Crisovan E., Buell C.R.: *G3: Genes, Genomes, Genet.* 8, 385 (2018).
3. Yang C.W., Chang H.Y., Hsu H.Y., Lee Y.Z., Chang H.S., Chen I.S., Lee S.J.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 332, 129 (2017).
4. Gurel E., Karvar S., Yucesan B., Eker I., Sameeullah M.: *Curr. Pharm. Design* 23, 5104 (2017).
5. Mráz M., Opletal L., Sovová M., Drašar P., Havel M. *Planta Medica* 58, 467 (1992).

HORMONY A STŘEVNÍ MIKROBIOM**RICHARD HAMPL***, LUBOSLAV STÁRKA*Endokrinologický ústav, Národní 8, 11694 Praha
rhampl@endo.cz*

Mikrobiota tvořící střevní flóru jsou v současnosti v popředí zájmu pro své pozoruhodné – příznivé i nepříznivé účinky na lidský organismus. Lidský střevní mikrobiom obsahuje kolem 10^{14} organismů, jeho hmotnost se pohybuje mezi 1-2 kg. Tvoří jej bakterie, houby a viry. Účastní se zpracování látek, procházejících zaživacím ústrojím, především potravy, ale i cizorodých látek z vnějšího prostředí včetně, léků a toxinů. Výrazně zasahují do imunity a jsou součástí ochrany proti patogenům. Ve střevní mikroflóře probíhá celá řada biosyntetických a metabolických pochodů, jež doplňují celkový metabolismus hostitele. Microbiota výrazně ovlivňuje trávení, včetně štěpení komplexních sacharidů. Zvláštní význam má tvoření mastných kyselin s krátkým řetězcem, jež jako neurotransmitery zasahují do neuroendokrinních mechanismů. Vztah mezi střevním mikrobiomem a hostitelem je oboustranný, tzn. regulační systémy hostitele – nervový, imunitní a endokrinní - ovlivňují složení a funkce mikrobiomu a obráceně.

Z biologicky účinných látek, jež tvoří střevní mikroflóra na druhé straně hostitel, patří v neposlední míře i hormony resp. hormonálně účinné působky. Z nich pak nejvíc poznatků bylo získáno o steroidech. Mikrobiom je vybaven prakticky kompletním arsenálem biosyntézy i metabolismu steroidních hormonů – glukokortikoidů, mineralokortikoidů, androgenů I estrogenu. Steroidy snadno přecházejí střevní stěnu v obou směrech: Steroidy z cirkulace podléhají ve střevech metabolickým přeměnám (zmiňme zde např. vysokou aktivitu 11 β -hydroxysteroidní dehydrogenasy I. Typu) a naopak steroidy tvořené či metabolizované střevními mikroflorou tvoří součást cirkulujících hormonů a ovlivňují tvorbu a sekreci hypotalamických a hypofyzárních hormonů. Často se mluví o ose střevo-mozek (gut – brain axis). Bylo dokonce prokázáno, že nepříznivé změny střevního mikrobiomu jsou asociovány s rozvojem neurodegenerativních chorob jako Alzheimerova demence či Parkinsonismus.

Steroidy tvořené střevní flórou nejsou jedinými hormonálně účinnými látkami, jež ovlivňují endokrinní regulaci. Střevní mikrobiom produkuje celou řadu proteinových faktorů (cytokiny, adipokiny, růstové faktory) i látky sloužící jako neurotransmitery, jež ovšem nelze vždy odlišit od hormonů tvořených buňkami gastrointestinálního traktu. Skladbu i funkci střevního mikrobiomu ovlivňují i hormony štítné žlázy, což se opět odrazí ve fungování osy střevo-mozek.

V tomto přehledu budou stručně shrnuty současné poznatky o tom, jak střevní mikroflóra zasahuje do endokrinních regulací a naopak jak cirkulující hormony mění střevní mikrobiom, spolu s nejvýznamnějšími patologickými dopady.

Podpořeno MZ ČR - RVO (Endokrinologický ústav - EÚ, 00023761).

**ZMĚNY STEROIDNÍCH PROFILŮ U
SUBKLINICKÉHO HYPERKORTIZOLIZMU A
NEFUNKČNÍCH NADLEDVINOVÝCH ADENOMŮ
MĚŘENÉ GC-MS²****MARTIN HILL^a**, MARTA VELÍKOVÁ^a, VÁCLAV
HÁNA Jr.^b, MIKULÁŠ KOSÁK^b

*^aEndokrinologický ústav, Národní 8, 116 94 Praha; ^bIII.
interní klinika, VFN a 1. LF UK, U nemocnice 1, 128 08
Praha 2
MHill@endo.cz*

Zkvalitnění zobrazovacích technik vede v důsledku k nárůstu počtu nalezených nadledvinových incidentalomů, většinou adenomů. Pro rutinní hormonální hodnocení těchto možných hormonálních hypersekrecí u těchto patologií se dosud využívá jen několik nejznámějších steroidů, avšak komplexní obraz změn steroidního metabolomu dosud nebyl publikován. Předmětem studie byla kvantifikace hladin 91 sérových endogenních steroidů u pacientů s unilaterálními a bilaterálními nadledvinovými incidentalomy s cílem zhodnotit změny steroidogenezy a steroidního metabolismu u pacientů se subklinickým hyperkortizolizmem (SH) přičemž šlo o průřezovou studii zahrnující 52 pacientů s nadledvinovými incidentalomy (unilaterální (n = 29), bilaterální (n = 23), z toho byla část nefunkčních (NF, n = 11)) a část s SH (n = 41). NF a SH se pak porovnávaly vzájemně a proti věkově a pohlavně odpovídajícím kontrolám z obecné populace (n=26). Stanovení 91 steroidů probíhalo simultánně z jediného vzorku séra metodikou GC-MS². Stanovení pľnočního kortizolu, kortizolu v moči za 24 h a ACTH bylo provedeno s využitím imunoanalytických metod. Z 91 sérových steroidů 10 vykazovalo signifikantně nižší hladiny u pacientů s SH (DHEAS, androsteronsulfát, epiandrosteronsulfát, androstenediolsulfát, konjugovaný 5 α -androstan-3 β ,17 β -diol, konjugovaný 5 α -androstan-3 α ,17 β -diol) i v případě odděleného hodnocení podskupin podle unilaterálních a bilaterálních incidentalomů či pohlaví. Dále sérové hladiny 5-androstan-3 β ,7 β ,17 β -triolu, konjugovaného 5 β -androstan-3 α ,17 β -diolu, 7-oxo-DHEA, a 20 α -dihydropregnenolonsulfátu byly nižší u unilaterálních, bilaterálních incidentalomů u žen a u mužů rovněž, avšak zde rozdíl nedosáhly statistické významnosti. Při použití ROC křivek byla nejlepší diskriminace mezi pacienty a kontrolami u DHEAS a dále pak následovaly pľnoční sérový kortizol, epiandrosteronsulfát, androsteronsulfát, ACTH, a 16 α -hydroxypregnenolon.

Závěrem lze říci, že SH je spojen se sníženými hladinami řady steroidů přičemž GCMS² se ukázal jako účinný nástroj pro kvantifikaci dosud nepopsaných změn steroidního metabolismu u této patologie.

Práce byla podpořena granty AZV ČR 17-30528A „Predikce gestačního diabetu na základě metabolismu steroidů“, MŠMT (OP VVV, Excelentní výzkum - ENDO.CZ, MZ ČR - RVO (Endokrinologický ústav -EÚ 00023761), OPK CZ.2.16/3.1.00/21518 "Přístroj pro metabolický výzkum" a Operační program Praha – Pól růstu ČR CZ.07.1.02/0.0/0.0/16_040/0000381.

SKUPINOVĚ SELEKTIVNÍ IMUNOANALYTICKÝ SYSTÉM PRO DETEKCI SUTHERLANDIOSIDŮ**LUKÁŠ HUML^a, N. NGUYEN^b, W. R. FOLK^b, PETRA MIKŠÁTKOVÁ^a, J. TAUCHEN^c, OLDŘICH LAPČÍK^a**

^aÚstav chemie přírodních látek, FPBT, VŠCHT v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6; ^bDiv. Biochem., University of Missouri-Columbia, MO 65211-7020, Columbia, USA
^cKatedra kvality zemědělských produktů, FAPPZ, ČZU v Praze, Kamýčká 129, 165 21, Praha 6
humllu@vscht.cz

Sutherlandia frutescens je významná jihoafrická léčivka jejíž majoritní terpenovou složkou a zároveň chemotaxonomickým markerem je skupina cykloartanových glykosidů, sutherlandiosidy A-D. U této skupiny látek se předpokládá podíl na pozorovaných účincích sutherlandie. Pro účely ověření compliance pacientů v průběhu klinického testování byla vyvinuta nepřímá kompetitivní ELISA, využívající pro detekci metabolitů sutherlandiosidů v moči skupinově selektivní polyklonální antisérum. Při přímém stanovení bez úpravy vzorků byla metoda zatížena efektem matrice, jenž se projevoval špatnou reprodukovatelností výsledků. Z tohoto důvodu byl hledán vhodný postup úpravy vzorků, který by nebyl časově ani finančně příliš nákladný. Nakonec jsme zvolili ředění moči 1:4 v 20 mM fosfátovém pufru se zahřátím na 95°C po dobu 5 minut. I přesto, že jsme pozorovali u takto ošetřených vzorků výrazné snížení detekované imunoreaktivity, reprodukovatelnost metody byla významně zlepšena. Dosavadní výsledky naznačují, že tuto metodu bude možné použít pro ověření compliance pacientů.

Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č. 21-SVV/2018).

FLUORESCENČNÍ SONDY PRO SLEDOVÁNÍ TRANSPORTU CHOLESTEROLU A PORUCHY LYSOZOMÁLNÍHO UKLÁDÁNÍ**JARMILA KRÁLOVÁ^{a,*}, MICHAL JURÁŠEK^c, LUCIE KRČOVÁ^c, BOHUMIL DOLENSKÝ^c, IVAN NOVOTNÝ^b, MICHAL DUŠEK^d, MICHAL KAHLE^a, PAVEL DRAŠAR^c, PETR BARTŮNĚK^a, VLADIMÍR KRÁL^c**

^aCZ-OPENSREEN, ^bLight Microscopy Core Facility, Ústav molekulární genetiky AVČR, v.v.i., Vídeňská 1083, Praha 4, CZ-142 20; ^cÚstav chemie přírodních látek, FPBT, VŠCHT v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6; ^dFyzikální ústav AVČR, v.v.i., Na Slovance 1999/2, Praha 8, CZ-182 21
*kralova@img.cas.cz

Monitorování intracelulární homeostázy a transportu cholesterolu v živých buňkách je velmi důležité, protože nerovnováha může vést k mnoha patologickým stavům¹. V příspěvku představím návrh a syntézu kationických fluorescenčních sond (FS) pro rozpoznávání cholesterolu a demonstrují jejich vlastnosti na živých buňkách. Syntetizovaná série 14 sond byla založena na sterolových heterocyklických

(pyridinových) derivátech značených různými fluorofory. Nejslibnější sonda, zeleně emitujícím BODIPY značený konjugát FS-5, byla podrobně analyzována. FS-5 vykazovala intenzivní fluorescenční barvení buněčných membrán následovanou intracelulární redistribucí do různých organel bohatých na cholesterol. FS-5 má silnější signál s rychlejší kinetikou než komerční sonda TopFluor cholesterol². Buňky s farmakologicky přerušovaným transportem cholesterolu (U18666A) nebo s genetickou mutací proteinu NPC1 transportujícího cholesterol vykazovaly silný a rychlý signál FS-5 v endo / lysosomální struktuře, kolokalizující s filipinovým barvením cholesterolu. Tato data naznačují vysoký potenciál sondy FS-5 pro sledování distribuce (jeho poruch) cholesterolu v živých systémech.

Tato práce vznikla za podpory grantu GAČR 17-02836S a MŠMT ČR LO1304.

LITERATURA

1. Hu J., Zhang Z., Shen W. J., Azhar S.: *Nutr. Metab.* 47, 7 (2010).
2. Holttä-Vuori M., Sezgin E., Eggeling C., Ikonen, E.: *Traffic* 1054, 17 (2016).

MAREK A JEHO STEROIDOGENEZE**BOŽENA KALVACHOVÁ**

*Endokrinologický ústav, Národní 8, 116 94 Praha
bkalvachova@endo.cz*

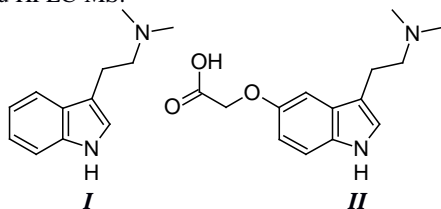
Kazuistika chlapce, který se v novorozeneckém věku jevil jako vrozená adrenální hyperplazie (CAH) z deficitu P450c21se solnou poruchou. Chlapec na klasické léčbě sice dobře prospíval, začal se však opožďovat v růstu. Řada pozdějších vyšetření, i po krátkodobém přerušení substituční-supresní léčby prokázala, že přes stoupající ACTH zůstávaly cirkulující hladiny 17- hydroxyprogesteronu, androstendionu i kortizolu subnormální nativně i po stimulaci, také odpad aldosteronu v moči byl nízký. Nálezy odpovídaly diagnóze vrozené adrenální hypoplazie (AHC), která patří mezi těžké formy nadledvinového selhání a bez léčby je zpravidla letální. Díky spolupráci se steroidní laboratoří EÚ jsme ji mohli posléze stanovit. Následná molekulární genetická analýza prokázala v DAX-1 genu missense mutaci, která u chlapců způsobuje také závažné poruchy sexuálního vývoje. Marek je jeden z prvních dvou pacientů s touto diagnózou v České republice.

IMUNOANALÝZA DIMETHYLTRYPTAMINU A JEHO ANALOG V BIOLOGICKÉM MATERIÁLU**JAKUB FOJTÍK, MICHAL MARYŠKA, MARTIN KUCHAR, LUKÁŠ HUML, OLDŘICH LAPČÍK***Ústav chemie přírodních látek, FPBT, VŠCHT v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
lapciko@vscht.cz*

N,N-Dimethyltryptamin (DMT) **I** je přírodní agonista serotoninových receptorů s psychedelickými účinky. DMT byl ve stopových množstvích detegován v mozku člověka i dalších obratlovců a v supernatantu tkáňových kultur melanomu. Řádově vyšší koncentrace, postačující k vyvolání psychických efektů, se nacházejí v několika desítkách druhů rostlin (např. *Psychotria viridis* - ayahuasca, *Mimosa hostilis*), strukturně blízké psychoaktivní tryptaminy se nacházejí v některých houbách (např. *Psilocybe* spp., *Panaeolus* spp.) a živočiších (např. *Bufo alvarius*). DMT je dostupný rovněž synteticky.

Pro vývoj imunochemické metody byl připraven haptén **II**, a standardní karbodiimidovou metodou navázán na hovězí sérový albumin (BSA). Konjugát DMT-BSA byl poté využit k imunizaci králíků i jako imobilizační antigen pro potažení polystyrenových mikrotitračních destiček pro nepřímou kompetitivní ELISA. Vyvinutá ELISA metoda dosahuje detekčního limitu pro DMT v řádu 10 pg/ml a hodnoty I_{50} 250 pg/ml. Vedle DMT metoda vykazuje citlivost vůči strukturně blízkým tryptaminům: 5-methoxydimethyltryptamin (100 %), psilocin (12 %), 5-methoxy-*N*-methyl-*N*-isopropyltryptamin (2,3 %), 5-methoxy-*N,N*-diallyltryptamin (1,2 %). Fosforylované tryptaminy (psilocybin, baeocystin, norbaeocystin) křížově nereagují.

Metoda byla testována pro detekci DMT a jeho analog v extraktech z rostlin rodů *Psychotria* a hub rodů *Psilocybe* a *Panaeolus*. Naměřená data byla porovnána s výsledky analýz metodou HPLC-MS.



Tato práce vznikla za účelové podpory na specifický školský výzkum MŠMTč. 21-SW/2018.

MIMOKOSTNÍ ÚČINKY VITAMÍNU D**LUDMILA MÁČOVÁ, MARIE BIČÍKOVÁ***Endokrinologický ústav, Národní 8, 116 94 Praha
lmacova@endo.cz*

Od dvacátých let minulého století, kdy byl poprvé popsán nový vitamín účinný při léčbě křivice¹, byl vitamín D

sledován především jako tzv. antirachitický hormon, který se podílí na udržení kalciofosfátového metabolismu. V posledních letech se stále častěji ukazuje, že vitamín D působí také „mimokostními“ účinky. Četné studie hovoří nejčastěji o imunomodulačních, neuroprotektivních a antioxidačních účincích vitamínu D, jehož nedostatek je rizikovým faktorem pro rozvoj diabetu, obezity, hypertenze, nádorů, chřipky, ale i neuropsychiatrických onemocnění jako Alzheimerova choroba, roztroušená skleróza, schizofrenie, migréna nebo autismus.

Klasická představa genomového mechanismu účinku vitamínu D zahrnuje regulaci aktivovaným jaderným receptorem pro vitamín D (VDR) na úrovni genové transkripce. Po vazbě vitamínu D na VDR se aktivovaný komplex specificky váže do promotorových oblastí responzivních genů pro vitamín D. Naopak rychlé negenomové účinky jsou zprostředkovány VDR umístěnými na membránách buněk a nezávisí na transkripci. Jako membránový receptor VDR reguluje uvolňování druhých posílá a tím reguluje signální dráhy negenomového charakteru se zapojením kinas, fosfatas a iontových kanálů.

Nedávná studie provedená v Endokrinologickém ústavu, při které byly vyšetřeny hladiny vitamínu D u dětí ve věku 4-7 let, vedla k alarmujícímu zjištění. Průměrné hladiny 25 (OH) vitD byly $70,35 \pm 20,7$ nmol/l a celkem 62% dětí mělo suboptimální hladiny vitamínu D (tj. < 75 nmol/l).

Nízká hladina vitamínu D zvláště v prenatálním a časné raném vývoji představuje významný rizikový faktor pro rozvoj mnohých autoimunních a neurodegenerativních onemocnění. Mechanismus účinku vitamínu D je však potřeba hodnotit ze širší perspektivy. Účinek vitamínu D nezávisí pouze na aktuální sérové koncentraci, ale je v lidském organismu ovlivněn dalšími faktory. Jedná se především o různou citlivost VDR v cílových tkáních, dále poměr biologicky aktivního vitamínu D, který je nepřímo úměrný množství vazebného proteinu (DBP) nebo různou afinitu DBP vůči metabolitům vitamínu D. Některé nejnovější práce navrhují u vybraných skupin pacientů sledovat spíše hladiny volného než rutinně stanoveného celkového vitamínu D².

Podpořeno MZ ČR - RVO (Endokrinologický ústav - EÚ, 00023761).

LITERATURA

1. McCollum E. V., Simmonds N., Becker J. E., Shipley P. G.: *J. Biol. Chem.* 53, 293 (1922).
2. Tsuprykov O., Chen X., Hoche C.F., Skoblo R., Lianghong Y., Hoche B.: *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* In press (2017), doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.11.014

PARALELNÍ STANOVENÍ NĚKTERÝCH STEROIDŮ METODAMI GCMS², LCMS² A RIA

IVONA KRÁLOVÁ^a, MARTA VELÍKOVÁ^a, LUCIE KOLÁTOROVÁ^a, JANA VÍTKŮ^a, MARKÉTA ŠIMKOVÁ^a, DOBROSLAVA JANDOVÁ^b, MARTIN HILL^a, MARIE BIČÍKOVÁ^a, LUBOSLAV STÁRKA^a

^aEndokrinologický ústav, Národní 8, 116 94 Praha;

^bPriessnitzovy léčebné lázně a.s., Priessnitzova 299, 790 03 Jeseník

ikralova@endo.cz

K moderním vysoce účinným analytickým metodám patří v současnosti zejména kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí trojitým kvadrupólem (LC-MS²) a její ekvivalent plynová chromatografie s hmotnostní detekcí trojitým kvadrupólem (GC-MS²). V oblasti analýzy endogenních steroidů má každá z metodik své přednosti i nedostatky. Zatímco LC-MS² je v současnosti rozšířenější a robustnější a je tudíž vhodnější pro rutinní laboratorní stanovení, její nižší selektivita, pokud jde o současné stanovení izomerů, poněkud omezuje její využití pro metabolický výzkum. V Endokrinologickém ústavu využíváme obě analytické metody jak při rutinním stanovení, tak ve výzkumu. Předmětem tohoto příspěvku je srovnání stanovení vybraných steroidů v séru oběma metodami a v případě kortizolu navíc ještě radioimunoanalytickou metodikou (RIA). Vzhledem k nekonstantnímu rozptylu experimentálních bodů byla pro srovnání použita robustní Passing-Bablokova regrese, která pro odhady směrnice a úseku používá mediány směrnic a úseků pro všechny kombinace dvojic experimentálních bodů mezi metodikou s předpokládanou nižší chybou stanovení (zde vybraná robustnější LC-MS²) a metodikou porovnávanou (zde GC-MS²). Dále byly metodiky hodnoceny také Bland Altmanovou metodou rozdílů vynášejících do grafu rozdílů mezi výsledky měření metodik proti jejich průměrné hodnotě u každého experimentálního bodu. Vzhledem k unikátnosti metodik pro stanovení některých steroidů byly zahrnuty jen některé společně stanovené analyty, jako jsou 17-hydroxyprogesteron, dehydroepiandrosteron (DHEA), 7 α -hydroxy-DHEA, testosteron a kortizol. Nejlepší shody bylo dosaženo v případě DHEA, kdy 95% interval spolehlivosti směrnice zahrnoval hodnotu 1 a 95% interval spolehlivosti úseku zahrnoval hodnotu 0. Metodiky tedy byly z hlediska výsledků zaměnitelné. Také korelace mezi metodikami byla pro DHEA těsná a to s korelačním koeficientem 0.928. Ještě těsnější korelace byla nalezena pro testosteron ($r=0.977$), avšak v tomto případě metodika GCMS² systematicky v průměru o 28.7% nadhodnocovala proti LCMS², přičemž 95% interval spolehlivosti úseku (0.458 – 0.652 nM) neobsahoval hodnotu 0 a 95% interval spolehlivosti směrnice (1.191 – 1.363) neobsahoval hodnotu 1. V případě pregnenolonu i 17-hydroxyprogesteronu, GC-MS² systematicky podhodnocovala i když těsnost byla u 17-hydroxyprogesteronu poměrně vysoká, ($r=0.944$), nicméně u pregnenolonu byla nízká ($r=0.751$). U 7 α -hydroxy DHEA byla shoda rovněž nízká ($r=0.664$), avšak zde GC-MS² systematicky nadhodnocovala se směrnicí v intervalu (1.073 – 1.544) a úsek byl významně záporný (-0.581—0.056 nM). V případě kortizolu GC-MS² proti LC-MS² systematicky nadhodnocovala se směrnicí v intervalu (1.075 – 1.354), úsek byl ještě významně

kladný (7.922—102 nM) a těsnost proložení byla uspokojivá ($r=0.838$). Při srovnání RIA proti GC-MS² byl zjištěn významný úsek (64.2 – 194 nM) avšak směrnice byla nevýznamně odlišná od hodnoty 1 (0.807 – 1.077), což naznačuje přítomnost výrazné interference s jinými látkami spíše v případě RIA.

Závěrem lze říci, že kvantitativní stanovení LC-MS² a GC-MS² se pro jednotlivé analyty liší steroid od steroidu a ačkoliv hodnoty naměřené oběma metodikami jsou převážně srovnatelné nelze je obecně z hlediska výsledků považovat za zcela zaměnitelné.

Práce byla podpořena granty AZV ČR 17-30528A „Predikce gestačního diabetu na základě metabolismu steroidů“, MŠMT (OP VVV, Excelentní výzkum ENDO.CZ, MZČR RVO (Endokrinologický ústav EÚ, 00023761), OPK CZ.2.16/3.1.00/21518 „Přístroj pro metabolický výzkum“ a Operační program Praha – Pól růstu ČR CZ.07.1.02/0.0/0.0/16_040/0000381.

KORELACE PARAMETRŮ BUNĚČNÉ IMUNITY, AUTOIMUNITNÍCH PROTILÁTEK PROTI ŠTÍTNÉ ŽLÁZE A DALŠÍCH TYREOIDÁLNÍCH PARAMETRŮ U PACIENTŮ S ONEMOCNĚNÍM ŠTÍTNÉ ŽLÁZY

PETR MATUCHA, KAROLÍNA ABSOLONOVÁ, IVAN ŠTERZL

Endokrinologický ústav, Národní 8, 116 94 Praha

pmatucha@endo.cz

U 54 pacientů s onemocněním štítné žlázy (průměrný věk 42,1 \pm 15,6 let), z nichž bylo 10 mužů (průměrný věk 45,4 \pm 16,2 let) a 44 žen (průměrný věk 41,4 \pm 15,5 let) jsme stanovovali parametry buněčné imunity pomocí imunofenotypizace, hladiny autoprotilátek proti štítné žláze a další tyreoidální parametry. Pacienti spadali do 5 diagnóz: 19 pacientů do E063: Autoimunitní tyreoiditida, 11 pacientů do E050: Tyreotoxikóza s difúzní strumou, 14 pacientů do E890: Hypotyreóza po operačních a jiných výkonech, 5 pacientů do E059: Tyreotoxikóza a 5 pacientů do E040: Difúzní netoxická struma. Pomocí Kruskal-Wallisovy ANOVy jsme zjistili rozdíl mezi skupinami dle diagnóz pouze u hladin TRAKu, přičemž skupina s diagnózou E063 se významně lišila od skupin s diagnózou E040, E050 a E890.

V celém souboru jsme našli Spearmanovy korelace mezi hladinami cytotoxických lymfocytů a autoprotilátek proti Tg ($r=-0.282$, $p=0.039$), T-lymfocytů a autoprotilátek proti Tg ($r=-0.322$, $p=0.018$), T-lymfocytů a TSH ($r=0.393$, $p=0.003$), B-lymfocytů a FT3 ($r=0.363$, $p=0.007$), NK buněk a autoprotilátek proti Tg ($r=0.323$, $p=0.017$), NK buněk a TSH ($r=-0.357$, $p=0.008$), Treg buněk a autoprotilátek proti Tg ($r=0.50949$, $p=0.0001$), Treg buněk a TSH ($r=-0.319$, $p=0.019$), Treg buněk a FT4 ($r=0.360$, $p=0.008$), Treg buněk a TRAKu ($r=0.294$, $p=0.031$).

Naše studie potvrzuje význam stanovení buněčné složky imunity při rozvoji autoimunitních tyreopatií, to nám potvrzuje korelace například Treg buněk s autoprotilátkami proti Tg ($r=0.711$, $p=0.0006$) a proti TPO ($r=0.569$, $p=0.011$).

Podpořeno MZ ČR - RVO (Endokrinologický ústav - EÚ, 00023761)

GEN *CaSR* – ZAVEDENÍ MOLEKULÁRNĚ GENETICKÉ DIAGNOSTIKY FAMILIÁRNÍ HYPOKALCIURICKÉ HYPERKALCÉMIE TYPU 1

JITKA MORAVCOVÁ^a, JANA VRBÍKOVÁ^b, LYUDMILA KANCHEVA^{b,c}, ELIŠKA PAULÍKOVÁ^b, JOSEF VČELÁK^a, KATEŘINA ZAJÍČKOVÁ^b

^aOddělení molekulární endokrinologie; ^bOddělení klinické endokrinologie; ^cOddělení steroidů a proteofaktorů, Endokrinologický ústav, Národní 8, 116 94 Praha
jmoravcova@endo.cz

Gen *CaSR* kóduje vápníkový senzitivní receptor (z angl. calcium-sensing receptor, CASR). Protein CASR je plazmatický membránový receptor, který je exprimován nejen na povrchu buněk příštítných tělísek, ve kterých reguluje syntézu a sekreci hormonu parathormonu, ale je přítomen i na povrchu buněk renálních tubulů, ve střevcích a v kostech. Parathormon hraje významnou roli při udržování homeostázy vápníku v těle. Zvyšuje koncentraci vápníku v séru tím, že se účastní uvolňování vápníku z kostí, reabsorpce vápníku z primární moči a zvyšuje absorpci vápníku z gastrointestinálního traktu prostřednictvím vitamínu D. Udržování homeostázy vápníku je nezbytné pro normální fyziologické funkce, jako je buněčná signalizace, nervová a svalová funkce (včetně srdeční kontraktility), uvolňování a regulace hormonů a kostní metabolismus. Mutace v genu *CaSR* mohou způsobovat hyperkalcémii (inaktivující mutace) nebo hypokalcémii (aktivující mutace). Heterozygotní inaktivující mutace mohou vést k familiární hypokalcicurické hyperkalcémii typu 1 (FHH1), která je často označována jako benigní forma hyperkalcémie. Homozygotní inaktivující mutace mohou vést k těžkému novorozeneckému hyperparathyroidismu (NSHPT), který je charakterizován extrémní hyperkalcémií, demineralizací skeletu a bez parathyreoidektomie je často fatální. Heterozygotní aktivující mutace mohou vést k autosomálně dominantní hypokalcémii a Barterově syndromu typu V, při kterém je porušeno vylučování elektrolytů ledvinami.

DNA byla izolována ze 17 vzorků periferní krve u pacientů s podezřením na FHH1. Vzorky byly analyzovány pomocí masivně paralelního sekvenování PCR produktů všech kódujících částí genu *CaSR* (exony 1-7) kitem Nextera XT (Illumina) na sekvenátoru MiSeq (Illumina).

U tří probandů byly detekovány čtyři různé mutace v genu *CaSR* (Gly557Glu, Asp398Asn, Pro55Thr a Leu666ProfsTer33). U prvního probanda byly identifikovány dvě varianty. První varianta Gly557Glu byla již popsána u japonské rodiny, kde byla asociována s hyperkalcémií a druhá varianta Asp398Asn je v databázích označována jako pravděpodobně benigní. U dalšího probanda byla identifikována mutace Pro55Thr, která se stejně jako Gly557Glu řadí mezi inaktivující mutace a je spojena s FHH1. U této pacientky jsme potvrdili mutaci Pro55Thr i u jejího otce, který měl podobné klinické projevy. U třech dalších rodinných příslušníků s normokalcémií nebyla tato mutace detekována. U třetího probanda s variantou Leu666ProfsTer33 došlo k posunu čtecího rámce insercí dvou nukleotidů s následným vznikem předčasného stop

kodonu. CASR poté funguje jako monomer, proto se tento typ mutace obecně projevuje mírnější hyperkalcémií. Tomu odpovídá i mírný biochemický obraz FHH1.

Na Oddělení molekulární endokrinologie se nám podařilo zavést rutinní vyšetření genu *CaSR*. V našem souboru byly detekovány 4 mutace, z nichž tři se řadí mezi inaktivující mutace a jsou spojeny s FHH1. Vzorky pacientů s mutací Gly557Glu a Pro55Thr jsou právě podrobeny funkční analýze ve spolupracující laboratoři v Montrealu k potvrzení inaktivujícího účinku.

Podpořeno MZ ČR - RVO (Endokrinologický ústav - EÚ, 00023761).

DETEKCE FÚZNÍCH GENŮ U PAPILÁRNÍHO KARCINOMU ŠTÍTNÉ ŽLÁZY

BARBORA PEKOVÁ^a, VLASTA SÝKOROVÁ^a, ŠÁRKA DVOŘÁKOVÁ^a, ELIŠKA VÁCLAVÍKOVÁ^a, GABRIELA VACÍNOVÁ^a, PETR LAŠTŮVKA^b, JAN PLZÁK^b, P. BAVOR^c, RAMI KATRA^d, PETR VLČEK^e, P. SÝKOROVÁ^e, D. KODETOVÁ^f, JOSEF VČELÁK^a, BĚLA BENDLOVÁ^a

^aOddělení molekulární endokrinologie, Endokrinologický ústav, Národní 8, 116 94 Praha; ^bKlinika ORL a chirurgie hlavy a krku, 1. LF UK a FN Motol; ^cChirurgická klinika; ^dKlinika ušní, nosní a krční; ^eKlinika nukleární medicíny a endokrinologie; ^fÚstav patologie a molekulární medicíny, 2. LF UK a FN Motol, V Úvalu 84, Praha 5, 150 06

Fúzní geny jsou chromozomální přestavby hrající významnou roli u karcinomu štítné žlázy. V důsledku inverze, translokace, inserce nebo delece dochází ke spojení částí dvou odlišných genů a vzniká chimerický protein (transkripční faktor, kinasa) se změnou funkcí a aktivitou. Tato přeskupení byla nalezena u různých typů karcinomu štítné žlázy, jak u diferencovaných (papilární a folikulární karcinom), tak i vzácně u níže diferencovaných a nediferencovaných karcinomu či u medulárního karcinomu. U papilárního karcinomu (PTC) je nejčastějším fúzním genem RET/PTC vzniklý spojením genu RET kódujícího tyrozinkinasový receptor s různými partnerskými geny. Naším cílem bylo detekovat dva nejčastější typy RET/PTC přeskupení - CCDC6/RET (RET/PTC1) a NCOA4/RET (RET/PTC3).

Soubor tvořilo 528 pacientů s PTC včetně dětí a dospívajících. Z odoperovaných zamražených tkání byla izolována RNA, která byla reverzní transkripcí převedena na cDNA. RET/PTC přeskupení bylo pomocí specifických primerů detekováno metodou Real Time PCR (LC480, Roche).

RET/PTC přeskupení jsme detekovali celkem u 44 pacientů s PTC (8,3%) - 29 RET/PTC1 (65,9%) a 15 RET/PTC3 (34,1%). Častěji se vyskytovalo u dětí a dospívajících než u dospělých pacientů (20,5% vs. 6,2%).

Vzhledem k tomu, že RET/PTC přeskupení jsme našli celkem u 8,3 % pacientů a k tomu, že bylo mnohem častější u dětských a dospívajících pacientů, kteří jsou dle literatury na

tento typ genetických změn citlivější, rozhodli jsme tento soubor dále testovat. V současné době probíhá masivně paralelní sekvenování RNAscan panelu (Qiagen), díky němuž je možné kromě již známých přeskupení zachytit i nové dosud nepopsané fúzní geny. Na konferenci budou předneseny první výsledky.

Podpořeno projekty AZV 16-32665A a MZ ČR - RVO (Endokrinologický ústav - EÚ, 00023761).

ANABOLICKÝMI STEROIDY INDUKOVANÝ HYPOGONADISMUS

**LUBOSLAV STÁRKA^a, MICHAELA DUŠKOVÁ^a,
OLDŘICH LAPČÍK^{a,b}**

^aEndokrinologický ústav, Národní 8, 116 94 Praha; ^bÚstav chemie přírodních látek, FPBT, VŠCHT v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
lstarcka@endo.cz

Anabolické vlastnosti některých androgenů a od nich odvozených syntetických steroidů byly původně lékařsky využívány pro rychlejší realimentaci válečných zajatců z války v Tichomoří a k rychlejšímu hojení popálenin zejména u obětí námořní války. Brzy si však tyto látky našly mnohem širší uplatnění v zlepšování síly a tělesného složení a také bojovnosti nejdříve u výkonnostních sportovců a později i u běžných sportovců nebo v komunitách, kde vyšší agresivita nebo mužnější chování je výhodou (pouliční gangy, ženy v manažerských pozicích apod.)

Ve sportu se hojněji počaly objevovat problémy s anabolickým dopingem při olympiádě v Melbourne (1956), ale k zákazu anabolických steroidů ve sportu došlo až v r. 1975. O zdravotních komplikacích po užití anabolik je řada zpráv, ale ve sportu je jejich zneužití spíše etickým než zdravotním problémem. Nejčastější nežádoucí důsledek užívání anabolických steroidů je vznik anabolickými steroidy indukovaného hypogonadotropního hypogonadismu (ASIH). Androgeny blokují sekreci LH, snižují vlastní testikulární produkci testosteronu a ten pak přímo ve varleti nedosahuje koncentrace potřebné pro spermiogenezu. Důsledkem může být pak i poškození hypotalamo-hypofyzární regulace gonadotropinů, která může přetrvávat i dlouho po vysazení dopingu nebo může přejít na trvalé poškození. Porucha se pak projeví v příznacích sexuální nedostatečnosti nebo i ve fertilitě. Bylo zjištěno, že plná pětina hypogonadismů ve věku od 30 do 40 let má v anamnéze zneužití steroidních anabolik. Takový pacient s extrémními nebo naopak zcela nízkými hodnotami celkového testosteronu může být diagnostickým problémem, jak uvádí kasuistika.

Anabolika mohou ovlivnit některé z naměřených laboratorních hormonálních hodnot, jejichž příčinu odhalí až přiznání pacienta k steroidnímu dopingovi, což nebývá obvyklé. Analýza zneužitých dopingových látek není s výjimkou dopingových laboratorní dosažitelná, nadto je často různě vypracovanými triky zamaskována.

Je-li příčina ASIH známa, pomáhá většinou vysazení kauzálního anabolika. Návrat k normálu bývá až

několikaměsíční a někdy k němu nedochází vůbec. Pak je možno zkusit obnovení normální centrální regulace sekrece gonadotropinů jejich substitucí, ale léčba nepřináší vždy žádaný účinek. Jiným přístupem je užití selektivních modulátorů estrogenních receptorů (kломifen, tamoxifen, raloxifen) nebo inhibitorů aromatasu, ale příznivý výsledek je spíše ojedinělý.

Podpořeno MZ ČR - RVO (Endokrinologický ústav - EÚ, 00023761).

ZAVEDENÍ GENETICKÉHO VYŠETŘENÍ Z BIOPSIE TENKOU JEHLU U PACIENTŮ S ONEMOCNĚNÍM ŠTÍTNÉ ŽLÁZY

**VLASTA SÝKOROVÁ^a, ŠÁRKA DVOŘÁKOVÁ^a,
JITKA MORAVCOVÁ^a, ELIŠKA VÁCLAVÍKOVÁ^a,
BARBORA PEKOVÁ^a, JOSEF VČELÁK^a, TEREZA
GRIMMICHOVÁ^{a,b}, PETRA PAČESOVÁ^a, ZDENĚK
NOVÁK^a, LIBUŠE SRBOVÁ^a, JANA VRBÍKOVÁ^a,
MARIE HLAVÁČKOVÁ^a, BĚLA BENDLOVÁ^a**

^aEndokrinologický ústav, Národní 8, 116 94 Praha

^bII. interní klinika, Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, Šrobárova 1150/50, 100 34 Praha 10
vsykorova@endo.cz

Biopsie tenkou jehlou (FNAB) patří při podezření na malignitu štítné žlázy vedle sonografického vyšetření k základním diagnostickým postupům. Odebraný materiál je cytologicky vyhodnocen dle klasifikace Bethesda do šesti kategorií se vzrůstajícím rizikem malignity. V posledních letech je upřena velká pozornost na možnost genetického vyšetření, které by mohlo přispět k přesnější diagnóze a prognóze onemocnění. Hlavními geny u nádorů štítné žlázy jsou geny *BRAF*, *RAS*, *RET* a *TERT*. Naším cílem bylo zavést genetickou analýzu těchto genů u FNAB.

Od roku 2017 jsme geneticky vyšetřili celkem 267 vzorků od 259 pacientů s onemocněním štítné žlázy. Všechny vzorky byly cytologicky vyhodnoceny dle klasifikace Bethesda a vyšetřeny na přítomnost mutace V600E v *BRAF* genu pomocí alelicky specifické Real Time PCR. U 51 pacientů byla pomocí sekvenování nové generace (NGS) provedena analýza kitem Thyro-ID zaměřeným na vybrané exony genů spojených s nádory štítné žlázy. U jedné pacientky s podezřením na medulární karcinom byla provedena kapilární sekvenace 16. exonu *RET* genu.

BRAF mutace V600E byla detekována celkem u 11 vzorků (4 %) - 2 Bethesda IV (9,5 %), 5 Bethesda V (31,3 %) a 4 Bethesda VI (57,1 %). Analýzu se nepodařilo provést u tří pacientů (1,1 %) pravděpodobně kvůli nedostatečnému množství či kvalitě genetického materiálu. U pacientky s cytologicky suspektním medulárním karcinomem byla detekována somatická mutace M918T v *RET* genu. Pomocí panelu Thyro-ID byly detekovány mutace celkem u 22 pacientů (43,1 %) - 4 Bethesda III (16 %), 6 Bethesda IV (60 %), 6 Bethesda V (50 %) a 3 Bethesda VI (75 %). Kromě 8 *BRAF* V600E mutací (15,7 %) byly u 7 pacientů detekovány mutace v genu *NRAS* (13,7 %), u jednoho

pacienta v genu *HRAS* (2 %), u jednoho pacienta v genu *KRAS* (2 %) a u tří pacientů byly přítomny kromě *BRAF* mutace i mutace v genu *TERT* (5,9 %). U jedné pacientky byla v *BRAF* genu detekována vzácnější mutace K601E.

U pacientů s onemocněním štítné žlázy byla úspěšně zavedena analýza *BRAF* mutace V600E, která se v Endokrinologickém ústavu stala již rutinní součástí vyšetření. Mutace byla detekována v Bethesda kategoriích IV-VI (9,5-57,1 %). Díky NGS panelu byly kromě *BRAF* mutace detekovány ještě mutace v *NRAS*, *KRAS*, *HRAS* a *TERT* genu u Bethesda III-VI (16-75 %). Zatímco *BRAF*, *RET* a *TERT* mutace jsou u FNAB spojeny s téměř 100% rizikem malignity a je dle doporučení společnosti ETA z roku 2017 doporučována TTE, u detekovaných mutací v *RAS* genech, jejichž klinický význam je zatím nejasný, je riziko malignity nižší (41-95 %) a je doporučována spíše lobektomie.

Podpořeno projekty AZV 16-32665A a MZ ČR - RVO (Endokrinologický ústav - EÚ, 00023761).

POKROKY V ANALÝZE NUKLEOVÝCH KYSELIN

FRANTIŠEK ŠTUMR, BARBARA ŠTUMROVÁ

*MeDiLa spol. s r.o., Štrossova 1931, Pardubice
frantisek.stumr@medila.cz*

Molekulárně biologické postupy používané v rutinní analýze nukleových kyselin zaznamenaly v posledních 3 desetiletích neobyčejně bouřlivý rozvoj. Jejich praktické využití přináší velké množství významných informací pro řadu oborů.

Nejčastějším je využití v laboratorní medicíně. Analýza extrahumánního genomu v rozličných biologických materiálech umožňuje zjistit přítomnost nebezpečných patogenů v organismu – bakterií, virů, parazitů a hub. V této souvislosti dostávají lékaři i řadu dalších informací – např. pro výběr terapie (genotyp patogenu a citlivost k lékům) a monitoring terapie (semikvantitativní údaje o množství patogenu). Molekulárně biologické postupy jsou v některých případech jedinou cestou k objektivnímu zjištění přítomnosti daného patogenu (např. pro nemožnost kultivačního vyšetření a nespolehlivá serologická vyšetření).

Analýza humánního genomu je velice rozsáhlou kapitolou této disciplíny. Vývoj začal identifikací genů, odpovídajících za monogenní onemocnění. S postupem možností sekvenace nukleových kyselin bylo záhy zjištěno, že řada vrozených poruch je závislá na změnách ve více genech. Doprovodným jevem tohoto vývoje se tak bohužel stala skutečnost, že významnou část získaných informací je zatím velmi obtížné interpretovat a dále využít. Přesto jsou tyto postupy stále šířeji uplatňovány v onkologii, gynekologii, kardiologii, hematologii a v dalších medicínských oborech.

Lidské zdraví je také ohrožováno nebezpečnými zoonózami, tedy nemocemi, přenášenými ze zvířat na člověka a které máme možnost takto identifikovat. Středem

pozornosti odborníků je i využití uvedených postupů pro zdraví zvířat a rostlin.

Dalším důležitým oborem, kde jsou tyto postupy rutinně využívány, je výroba potravin, kontrola jejich bezpečnosti a také původu.

Velmi významné je i forenzní využití (vyšetřování nezákonných činů) a vojenské využití (zjišťování a identifikace biologických zbraní).

Pokroky zaznamenalo v posledních letech velké množství přírodních oborů, a to díky využití právě molekulárně biologických postupů pro analýzu nukleových kyselin.

V přednášce budou z výše uvedeného pohledu prezentovány praktické příklady využití molekulárně biologických postupů, pokroky v technologii, spolupráce laboratoří a kliniků, institucí a státní správy, etické aspekty genetické analýzy a další.

Hlavním zdrojem této přednášky jsou především poznatky z uplynulých 14ti ročníků naší konference RANK (Rutinní Analýza Nukleových Kyselin), která je pravidelně pořádaná každý rok na přelomu ledna a února v Pardubicích.

MNOHOČETNÁ ENDOKRINNÍ NEOPLÁZIE TYPU 2 A GENETICKÉ VYŠETŘENÍ V DESETI LETECH EXTERNÍ KONTROLY KVALITY

ELIŠKA VÁCLAVÍKOVÁ, JOSEF VČELÁK, BĚLA BENDLOVÁ

*Odd. molekulární endokrinologie, Endokrinologický ústav,
Národní 8, 116 94 Praha
evaclavikova@endo.cz*

Mnohočetná endokrinní neoplázie typu 2 (MEN2) je autozomálně dědičné onemocnění, jehož hlavním symptomem je hereditární medulární karcinom štítné žlázy (MTC), feochromocytom a další neoplázie, jako je hyperparathyreóza v případě MEN2A a ganglioneuromatóza, slizniční neurinomy a marfanoidní habitus v případě MEN2B. Genetické vyšetření představuje sekvenční analýzu exonů 8, 10, 11, 13-16 *RET* proto-onkogenu (NM_020975.4) u pacientů s MTC a rodinných příslušníků pacientů s MEN2 s cílem detekovat aktivační zárodečnou mutaci.

Externí kontrolu kvality pro genetické vyšetření MEN2 pořádá the European Molecular Genetics Quality Network (EMQN) sídlící v Manchesteru, UK. Od roku 2008, kdy bylo otevřeno pilotní schéma pro MEN2, se naše laboratoř jako jediná z České republiky tohoto schématu každoročně účastní. Analyzovány jsou tři vzorky DNA pacientů, zasláné s popisem osobní a rodinné anamnézy, která je podkladem pro genetické vyšetření. Výsledky odesíláme ve formě zprávy obsahující také klinicko- genetickou interpretaci výsledku. Posuzuje se tak nejen správnost genetického výsledku a nomenklatury detekovaných mutací, ale také interpretace výsledku a forma a přesnost údajů ve výsledkovém listu.

Klinická interpretace výsledku vychází z nejnovějších doporučení ATA pro management pacientů s MTC z r. 2015. Nesmí být nedostatečná či zavádějící. Zpráva by měla být krátká, zaměřená na klíčové body, aby nezapadly důležité

informace. Při pozitivním výsledku nesmí chybět krátký popis biologického efektu mutace, je nezbytné vyjádřit riziko agresivního MTC a 50% riziko přenosu na potomstvo a odkázat na genetické poradenství a možnost prediktivního testování potomků. U pozitivního prediktivního vyšetření se upozorní na doporučení profylaktické TTE a screeningu pro feochromocytom a hyperparathyreózu. Negativní nález u rodinného příslušníka potvrdí vyloučení zvýšeného rizika MTC, ale je nutné uvést rozsah, limity a senzitivitu použité metody. Nově se i u neinformativního výsledku (tj. s normálním genotypem) doporučuje další sledování pacienta.

Hodnocení genotypové/výsledkové části během naší 10leté účasti v EHK je v průměru 99,5%, hodnocení interpretační části 95%. Souhrnné vyhodnocení všech účastníků se laboratorii pak upozorní na chyby a doporučí, co musí být nezbytnou součástí zprávy. Neustále se vyvíjí a reaguje na poznatky z výzkumu a vývoj nových technik. Zajišťuje tak, aby evropské i mimoevropské laboratoře vydávaly přesné a srovnatelné výsledky molekulárně diagnostických laboratorních testů a neustále se zlepšovaly.

Práce byla podpořena grantovými projekty AZV 16-32665A a MZ ČR - RVO (EÚ, 00023761).

OVLIVNĚNÍ PRŮBĚHU ORÁLNÍHO GLUKOSOVÉHO TOLERANČNÍHO TESTU GENEM *NME7*

JOSEF VČELÁK^a, MARKÉTA VAŇKOVÁ^a, DANIELA VEJRAŽKOVÁ^a, PETRA LUKÁŠOVÁ^a, BĚLA BENDLOVÁ^a, LUCIE ŠEDOVIČOVÁ^b, ONDŘEJ ŠEDA^b

^aEndokrinologický ústav, Národní 8, 116 94 Praha; ^bÚstav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i., Vítězská 1083, 142 20 Praha; Ústav biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN Praha, Albertov 4, 128 00 Praha 2
jvcelak@endo.cz

Řada studií je v poslední době zaměřena na tvar křivky během OGTT. Tvar křivky glykémie, která odráží dynamiku odpovědi na glukosový podnět, je považována za prediktor pro porušenou glukosovou toleranci nebo později vznik a rozvoj diabetu 2. typu.

Cílem naší studie bylo zjistit, 1) zda charakteristiky glykemické křivky, tj. tvar křivky a čas dosažení maximálního vrcholu hodnoty glykémie, souvisí s porušenou glukosovou tolerancí, 2) zda jsou tyto charakteristiky dány genetickým pozadím vybraných genů a 3) nakolik jsou sledované charakteristiky stále v časovém odstupu.

Do studie jsme zařadili 1481 3-hod OGTT křivek s intervalem odběrů glykémie po 30 minutách. Po 5 až 10 letech jsme opakovaně vyšetřili 262 křivek. Soubor zahrnoval 997 žen (věk 33±9,4 let) a 222 mužů (věk 34±12,1 let) s různou glukosovou tolerancí. Opakovaně jsme vyšetřili 216 žen a 46 mužů.

Křivky byly rozděleny podle tvaru na monofazické, bifazické, trifazické a na křivky se 4 a více vrcholy a na

základě této klasifikace byly porovnány metabolické parametry osob v jednotlivých skupinách.

Genotypizace polymorfizmů v genech *NME7*, *ATP1B1*, *BLZF1*, *GCK*, *KCNJ11*, *LRP5*, *PPARGCIA*, *PPARG* a *SLC30A8* byla provedena technologií TaqMan SNP genotyping assays na přístroji RealTime LC480 (Roche).

Výsledky: Většina křivek byla monofazická (735; 49,6 %), dále trifazická (398; 29,9%), bifazická (274; 18,5 %), se 4 a více vrcholy (70; 4,7 %) a 4 křivky (0,3 %) byly nezařaditelné.

Osoby v monofazické skupině byly starší ($p < 0.001$), měly vyšší BMI ($p < 0.001$) a oproti ostatním měly vyšší plochu pod křivkou glykémie (AUC glykémie; $p < 0.0001$), horší inzulínovou senzitivitu (HOMA-R, Matsuda index; $p < 0.0001$) a nižší časovou inzulínovou sekreci (inzulinogenní index; $p < 0.0001$). Posun maximálního vrcholu hodnoty glykémie ze 30. minuty do pozdějších fází OGTT znamenal další zhoršení sledovaných parametrů. Z opakování křivek s časovým odstupem jsme zjistili, že 39 % křivek zůstalo ve stejné skupině, 17 % se zhoršilo, tj. přesunuly se do skupiny monofazických křivek, a 27 % se naopak přesunulo se ze skupiny monofazických křivek do jiných skupin.

Tvar křivky pozitivně asocioval s polymorfizmy v genu *NME7*.

Tvar OGTT křivek je značně variabilní a zdá se, že zde existuje souvislost s genetickými faktory. Zhoršená glukosová tolerance a s ní související metabolické komplikace jsou charakteristické především pro monofazické křivky. Ze studovaných genů měl největší vliv gen *NME7*.

Podpořeno granty GAČR 17-13491S, MZ ČR - RVO (EÚ, 00023761).

PROJEKT „SOFTWAREVÉ NÁSTROJE PRO ODHALENÍ PREDISPOZICE ČI DIAGNOSTIKU JATERNÍCH TĚHOTENSKÝCH KOMPLIKACÍ“ JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKOU UNÍÍ

HELENA VČELÁKOVÁ

Endokrinologický ústav, Národní 8, 116 94 Praha
jvcelakova@endo.cz

Cílem projektu je příprava softwarových nástrojů k odhalení predispozice k intrahepatické cholestáze v těhotenství a jejich zavedení do klinické praxe. Včasné odhalení predispozice vede ke snížení rizika trvalého poškození či smrti plodu.

Problémem diagnostiky intrahepatické cholestázy v těhotenství (intrahepatic cholestasis of pregnancy - ICP) s vysokou prevalencí (představující zhruba 60 až 150 těhotenství ročně v Praze a v celé České republice pak zhruba 440 až 1 100 těhotenství ročně) je absence metody (v ČR i ve světě) pro odhad rizika predispozice k ICP ještě před započítím těhotenství a existence pouze jediného pracoviště v ČR s vysoce účinnou metodikou pro včasné odhalení ICP v těhotenství (stanovení celkových žlučových kyselin v krvi matky). Bude vyvinuta, zatím neexistující vysoce účinná metodika pro odhad rizika predispozice k ICP ještě před

započetím těhotenství na základě změn hladin 5-10 steroidů a tato metodika bude vtělena do softwarového produktu HEPAPRED umožňujícího výpočet pravděpodobnosti výskytu ICP v těhotenství. Tím bude umožněno soustředit se na ženy s vysokou pravděpodobností výskytu ICP v těhotenství po otěhotnění, zvláště pak ve 3. trimestru gestace. Pro včasné odhalení ICP během tohoto období u rizikových pacientek i dalších žen bude sloužit metodika založená rovněž na základě změn hladin 5-10 steroidů a vtělená do softwarového produktu HEPAGEST umožňujícího výpočet pravděpodobnosti přítomnosti ICP u těhotných žen. Jedná se o zcela inovativní projekt, který bude řešit oba problémy uvedené výše. Výzkumná skupina Ing. Martina Hilla, DrSc. - odborného garanta projektu, je jediným pracovištěm v České republice a jedním ze zhruba pěti pracovišť na světě, které se dlouhodobě zabývá výzkumem steroidního metabolomu v průběhu a okolí těhotenství.

Projekt spolufinancovaný Evropskou unií a Magistrátem hl. m. Prahy v rámci Operačního programu Praha – pól růstu CZ.07.1.02/0.0/0.0/16_040/0000381.



ODRAZ INTRAPERITONEÁLNĚ APLIKOVANÉHO PREGNANOLON GLUTAMÁTU V HIPOKAMPU KRYSÍCH MLÁDAT, POSTRANNÍ METABOLISMUS PREGNANOLONU

MARTA VELÍKOVÁ^a, MARTIN HILL^a, IVONA KRÁLOVÁ^a, K. VALEŠ^{b,c}, P. MAREŠ^b, P. MOHR^c, EUBOSLAV STÁRKA^a

^aEndokrinologický ústav, Národní 8, 116 94 Praha;

^bFyziologický ústav AVČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4;

^cNárodní ústav duševního zdraví, Topolová 748

250 67 Klecany

mvelikova@endo.cz

Hypoxicko-ischemické poškození mozku je nejčastější příčinou perinatálních mozkových postižení vedoucí k trvalým následkům například ve formě pozdějších epileptických záchvatů. Klíčovou roli v této patologii hrají děje na molekulární úrovni spojené s masivním uvolňováním excitotoxického glutamátu, který aktivuje ionotropní glutamátové receptory a extrémně zvyšuje influx převážně vápenatých iontů do nervových buněk, což může být fatální zejména u vyvíjejícího se mozku plodu. Současné studie přitom naznačují, že v této situaci lze snížit riziko trvalého poškození aplikací exogenních negativních modulatorů NMDA receptorů a pozitivních modulatorů GABA receptorů typu A (GABAR)¹. V obou případech lze využít derivátů pregnanolonu, který je nejhojnějším pregnanolonovým izomerem v těhotenství. Volný pregnanolon a známější allopregnanolon, který je hojnější mimo těhotenství, jsou nejsilnějšími endogenními pozitivními modulatory neuroinhibičních GABAR², zatímco pregnanolsulfát je účinným inhibitorem glutamátových receptorů, tedy NMDAR³ a AMPA receptorů (AMPA)⁴. Z exogenních derivátů pregnanolonu byl na laboratorních

zvířatech úspěšně ověřen neuroinhibiční účinek pregnanolon glutamátu (PG) na NMDAR. Otázkou zůstává, v jakých cílových formách může intraperitoneálně podávaný PG působit na vyvíjející se mozek, neboť lze předpokládat jeho transport skrze hematoencefalickou bariéru (blood-brain barrier, BBB)⁵ jednak v původní formě a rovněž ve formě volného pregnanolonu, podobně jako v případě periferně aplikovaného pregnenolonsulfátu⁶, a konečně ve formě různých metabolitů, z nichž u některých lze rovněž přepokládat neuroprotektivní účinky. Pokus byl sestaven následujícím způsobem vždy po pěti zvířatech ve skupině (krysi samci): intaktní zvířata (skupina I), zvířata, kterým byl podáván roztok cyklodextrinu (skupina C) a zvířata, kterým byl podáván PG v roztoku cyklodextrinu (skupina P). Byla studována zvířata ve stáří 12 dnů a 25 dnů. PG byl aplikován i.p. v dávce 1 mg/kg, a hladiny steroidů byly stanovovány v hippocampu zvířat s využitím platformy GCMS². Celkem bylo v uvedených šesti skupinách kvantifikováno 64 steroidů ve volné a/nebo konjugované formě.

Bylo zjištěno, že po aplikaci PG měla zvířata extrémně zvýšené hladiny konjugovaného i volného pregnanolonu, zvýšené hladiny 5 β -dihydroprogesteronu při nezměněných hladinách 5 β ,20 α -tetrahydroprogesteronu, dále pak extrémně zvýšené hladiny volného i konjugovaného 5 β -pregnan-3 α ,20 α -diolu, volného 5 β -pregnan-3 α ,17,20 α -triolu a volného i konjugovaného 17-hydroxypregnanolonu. Dále byly zjištěny výrazně zvýšené hladiny volného, ne však konjugovaného etiocholanolonu a nezměněné hladiny volných i konjugovaných 5 β -androstan-3 α / β -diolů.

Z uvedených dat pořízených na zvířatech lze pro situaci u člověka odvodit následující závěry:

PG se dekonjuguje již v periférii a volný pregnanolon pak aktivní difuzí proniká přes BBB a vedle toho může PG v podstatném množství pronikat přímo přes BBB a jeho část se pak může v mozku dále dekonjugovat na volný pregnanolon. V mozku primátů je do jisté míry aktivní steroidní sulfatasa při nízké aktivitě steroidních sulfotransferas^{7,8} glukuronyltransferas i glukuronidas⁹.

PG se v periférii metabolizuje přímo tj. bez předchozí hydrolyzy na glukuronidy 20 α -derivátů a překvapivě i na 17-hydroxyderivátů a tyto deriváty PG pak pronikají přes BBB paralelně s volnými deriváty vzniklými z pregnanolonu po hydrolyze PG či po hydrolyze jeho 20 α - a 17-hydroxy-derivátů PG periferními glukuronidasami.

Ačkoliv aktivita 17-hydroxylasového kroku CYP17A1 v organismu hlodavců je podle literatury¹⁰ zanedbatelná a hladiny 17-hydroxy-kortikoidů a jejich prekurzorů v Δ^5 (17-hydroxypregnenolon) a Δ^4 (17-hydroxypregesteron) cestách jsou v hippocampu neměřitelně nízké, Dochází ke vzniku 17-hydroxylovaných 5 α - i 5 β -redukovaných metabolitů v tzv. postranní cestě „backdoor pathway“, která byla v literatuře zatím dokumentována jen u 5 α -redukovaných steroidů¹¹. Tato cesta je jednoznačně dokumentována i výrazným zvýšením hladin volného etiocholanolonu po aplikaci PG, neboť neexistuje jiná možnost jeho vzniku po přidání PG než prostřednictvím lyasového kroku CYP17A1 štěpícího v periférii volný pregnanolon na volný etiocholanolon, který pak difunduje přes BBB. Navíc absence zvýšení konjugovaného etiocholanolonu po aplikaci PG potvrzuje zanedbatelnou aktivitu sulfotransferas a glukuronyltransferas v mozku krys. Ukazuje se tedy, že zatímco

17-hydroxylace v krysích nadledvinách neprobíhá, může probíhat mimo ně, například v játrech vykazujících rovněž vysokou aktivitu CYP17A1⁹.

Na rozdíl od etiocholanolonu, nebylo po podání PG nalezeno zvýšení hladin u jeho volného 11 β -hydroxy-metabolitu ani u jeho konjugované formy, což naznačuje, že 11 β -hydroxyetiocholanolon nevzniká 11 β -hydroxylací etiocholanolonu, ale patrně štěpením kortikoidů katalyzovaným CYP17A1 v lyasovém kroku.

Konečně byly nalezeny silné věkové závislosti steroidů v hippocampu mladých krysích samečů jak mimo podání PG, tak i po něm naznačující vyšší propustnost BBB u mladších zvířat.

Práce byla podpořena granty AZV ČR 17-30528A „Predikce gestačního diabetu na základě metabolismu steroidů“, MŠMT (OP VVV, Excelentní výzkum - ENDO.CZ, MZ ČR - RVO (Endokrinologický ústav - EÚ, 00023761), OPVK CZ.2.16/3.1.00/21518 „Přístroj pro metabolický výzkum“ a Operační program Praha – Pól růstu ČR CZ.07.1.02/0.0/0.0/16_040/0000381.

LITERATURA

- Hirst J.J., Kelleher M.A., Walker D.W., Palliser H.K.: J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 139, 144 (2014).
- Ranna M., Sinkkonen S.T., Moykkynen T., Uusi-Oukari M., Korpi E.R.: BMC Pharmacol. 6, 1 (2006).
- Malayev A., Gibbs T.T., Farb D.H.: Br. J. Pharmacol. 135, 901 (2002).
- Yaghoubi N., Malayev A., Russek S.J., Gibbs T.T., Farb D.H.: Brain Res. 803, 153 (1998).
- Kancheva R., Hill M., Novak Z., Chrastina J., Kancheva L., Starka L.: Neuroscience 191, 22 (2011).
- Wang M.D., Wahlstrom G., Backstrom T.: J. Steroid Biochem. Mol. Biol.: 62, 299 (1997).
- Kriz L., Bicikova M., Hill M., Hampl R.: Steroids 70, 960 (2005).
- Kriz L., Bicikova M., Mohapl M., Hill M., Cerny I., Hampl R.: J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 109, 31 (2008).
- BioGPS. 2011/11/13 ed: Affymetrix; 2015.
- Luu-The V.: J. Steroid Biochem. Mol. Biol.: 137, 176 (2013).
- Kamrath C., Hochberg Z., Hartmann M.F., Remer T., Wudy S.A.: J. Clin. Endocrinol. Metab. 97, E367 (2012).

CÍLENÉ DERIVÁTY PHORBOLU

TOMÁŠ ZIMMERMANN^a, SØREN BRØGGER CHRISTENSEN^{b,*}, HENRIK FRANZYK^b, ILARI TARVAINEN^c

^a*Ústav chemie přírodních látek, FPBT, VŠCHT v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6; ^bUniversity of Copenhagen, Department of Drug Design and Pharmacology, Jagtvej 162,*

*Copenhagen Ø, DK-2100, Denmark; ^cUniversity of Helsinki, Division of Pharmacology, Viikinkaari 5E (P.O. Box 56), Helsinki, FIN-00790, Finland
soren.christensen@sund.ku.dk*

„Phorbol-estery“ jsou přírodní produkty patřící strukturně k tiglianovým diterpenům, nejvíce se vyskytující v rostlinných rodech *Croton* nebo *Jatropha*. Dříve se tyto látky používaly v tradiční Čínské nebo Ayurvedské medicíně. Současné poznatky o „phorbol-esterech“ nejčastěji zmiňují prozánětlivé, proapoptotické, kokarcinogenní účinky včetně zvýšení hladiny Ca²⁺ v cytosolu. Jejich aktivita¹ spočívá v aktivaci fosfokinasy C (PKC).

PKC (cit.²) hraje důležitou roli v drahách zodpovědných za přenos signálu v buňce a přímou fosforylací může podílet na různých biologických procesech jako regulace buněčného cyklu, p53, p21, buněčná adheze, syntéza a transkripce DNA, apoptóza, rezistence vůči léčivům a buněčné dělení. PKC izozymů je vícero druhů a podle všeho je pro biologický efekt zásadní který konkrétní izozym je aktivován. Taktéž kokarcinogenní účinky phorbol-esterů skrz aktivaci PKC byly nedávno přehodnoceny a PKC se nyní jeví daleko více jako tumor supresor³. Tyto účinky byly doloženy například schopností phorbol-myristát-acetátu (PMA) spustit apoptózu u LNCaP buněk skrze aktivaci izozymu PKC- δ (cit.⁴). Taktéž předběžná studie PMA nebo PMA kombinované terapie na lidech s amylocytickou leukémií zaznamenala úspěch v podobě mnohočetných remisí nebo podstatnému snížení nádorových buněk⁵.

Tyto poznatky nás vedly k navrhnutí postupu pro vývoj prolečiv, jejichž aktivní část by byly estery phorbolu. Použity byly peptidy specificky štěpené v nádorových tkáních, které byly předtím s úspěchem použity u jiného přírodního cytotoxinu thapsigarginu⁶. Postup zahrnoval zjištění schopnosti vázat se na PKC a to aktivních derivátů phorbolu bez peptidu a následně otestovat tyto látky na LNCaP buňkách pro jejich cytotoxicitu stejně tak jako platnost strategie peptidového cílení. V této době již máme výsledky testů finálních prolečiv s víceméně pozitivními výsledky.

LITERATURA

- Goel G., Makkar H. P. S., Francis G., Becker K.: Int. J. Toxicol. 26, 279 (2007).
- Kang J.-H.: New J. Sci. 2014, Article ID 231418.
- Antal C. E., Hudson A. M., Kang E., Zanca C., Wirth C., Stephenson N. L., Trotter E. W., Gallegos L. L., Miller C. J., Furnari F. B., Hunter T., Brognard J., Newton A. C.: Cell 160, 489 (2015).
- Gonzalez-Guerrico A. M., Kazanietz M. G.: J. Biol. Chem. 280, 38982 (2005).
- Han Z. T., Zhu X. X., Yang R. Y., Sun J. Z., Tian G. F., Liu X. J., Cao G. S., Newmark H. L., Conney A. H., Chang R. L.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95, 5357 (1998).
- Doan N. T. Q., Paulsen E. S., Sehgal P., Moeller J. V., Nissen P., Denmeade S. R., Isaacs J. T., Dionne C. A., Christensen S. B.: Steroids 97, 2 (2015).

REJSTRÍK AUTORŮ

Absolonová, Karolína
Bartůněk, Petr
Bavor, P.
Bendlová, Běla
Bičíková, Marie
Bílek, Radovan
Dolenský, Bohumil
Drašar, Pavel
Dušek, Michal
Dušková, Michaela
Dvořáková, Šárka.
Fojtík, Jakub
Folk, W. R.
Formanová, Pavla
Franzyk, Henrik
Grimmichová, Tereza
HAMPL, Richard
Hána Jr., Václav
Hill, Martin
Hlaváčková, Marie
Huml, Lukáš
Christensen, Søren Brøgger
Jandová, Dobroslava
Jurášek, Michal
Kahle, Michal
Kalvachová, Božena
Kancheva, Lyudmila
Katra, Rami
Kmoníčková, Eva
Kodetová, D.
Kolátorová, Lucie
Kosák, Mikuláš
Král, Vladimír
Králová, Ivona
Králová, Jarmila
Krčová, Lucie
Kubánek, Jan
Kuchař, Martin
Lapčík, Oldřich
Laštůvka, Petr
Lukášová, Petra
Máčová, Ludmila
Mareš, P.
Maryška, Michal
Matucha, Petr
Mikšátková, Petra
Mohr, P.
Moravcová, Jitka
Nguyen, N.
Novák, Zdeněk
Novotný, Ivan
Novotný, Jaroslav
Pačesová, Petra
Paulíková, Eliška
Peková, Barbora
Plzák, Jan
Srbová, Libuše
Stárka, Luboslav
Sýkorová, P.
Sýkorová, Vlasta
Šeda, Ondřej
Šedová, Lucie
Šimková, Markéta
Šterzl, Ivan
Štumor, František
Štumrová, Barbara
Tarvainen, Ilari
Tauchen, J.
Vacinová, Gabriela
Václavíková, Eliška
Valeš, K.
Vaňková, Markéta
Včelák, Josef
Včeláková, Helena
Vejražková, Daniela
Velíková, Marta
Vítků, Jana
Vlček, Petr
Vrbíková, Jana
Vrbíková, Jana
Zajíčková, Kateřina
Zimmermann, Tomáš

REMARKS AND NOTES

CZECH CHEMICAL SOCIETY SYMPOSIUM SERIES • ročník/volume 16 (2018), čís./no. 4 • ISSN 2336-7202 (Print), ISSN 2336-7210 (On-line) • ISSN 2336-7229 (CD-ROM) • evidenční číslo MK ČR E 21999 • Vydává Česká společnost chemická jako časopis Asociace českých chemických společností ve spolupráci s VŠCHT Praha, s ČSPCH a ÚOCHB AV ČR za finanční podpory Rady vědeckých společností ČR, Akademie věd ČR, Nadace Český literární fond a kolektivních členů ČSCH • IČO 444715 • Published by the Czech Chemical Society • VEDOUČÍ REDAKTOR / EDITOR-IN-CHIEF: B. Kratochvíl • REDAKTOŘI / EDITORS: J. Barek, Z. Bělohav, E. Benešová, P. Drašar, P. Holý, P. Chuchvalec, Z. Kolská, J. Masák, J. Podešva, V. Vyskočil; Webové stránky: V. Vyskočil • TECHNICKÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: R. Řápková • Redakce čísla (ISSUE EDITOR) P. Drašar, R. Bílek • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ/ MANUSCRIPTS IN CZECH, SLOVAK OR ENGLISH CAN BE SENT TO: Chemické listy, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./phone +420 221 082 370, +420 222 220 184, e-mail: chem.listy@csvts.cz • PLNÁ VERZE NA INTERNETU/FULL VERSION ON URL: <http://www.ccsss.cz> • TISK: Garamon s.r.o., Wonkova 432, 500 02 Hradec Králové • SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Copyright © 2018 Czech Chemical Society Symposium Series/Česká společnost chemická • Cena výtisku / Single issue price 180 Kč • This journal has been registered with the Copyright Clearance Center, 2322 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA, where the consent and conditions can be obtained for copying the articles for personal or internal use • Pokyny pro autory najdete na <http://www.ccsss.cz>, zkratky časopisů podle Chemical Abstract Service Source Index (viz <http://cassi.cas.org/search.jsp>) • Molekulární námět na obálce: Vladimír Palivec • Dáno do tisku 20.5.2018.