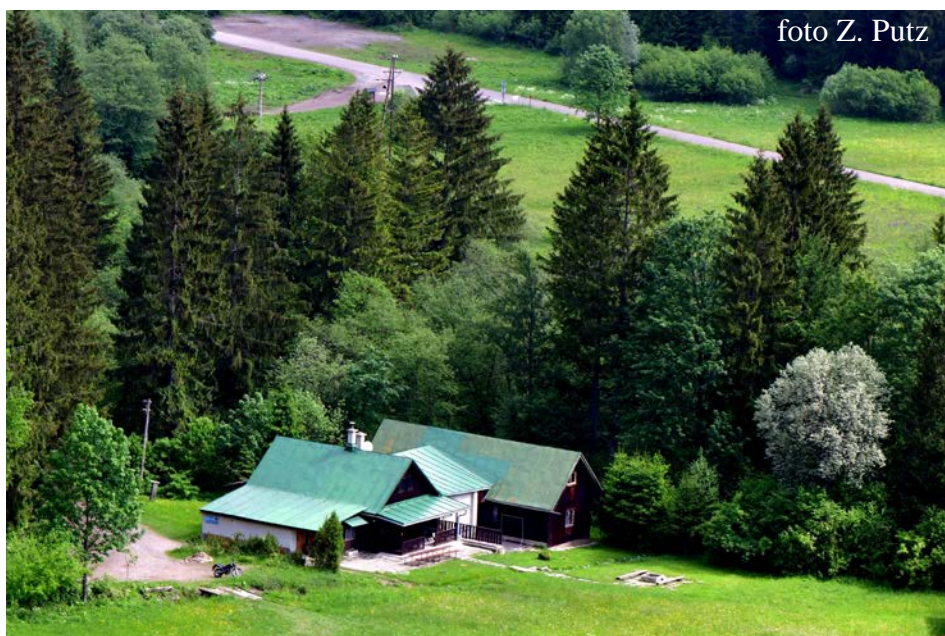




Šilinkův nadační fond  
pod záštitou Endokrinologického ústavu v Praze  
a Ústavu chemie přírodních látek, VŠCHT Praha  
a ve spolupráci s TJ Havran  
pořádá tradiční mezinárodní XXXVI. konferenci a symposion „Imunoanalýza 2022“.



# IMUNOANALÝZA

13. 6. – 17. 6. 2022

Lubochňa – Vyšné Krátké – Chata Lúčka

Sborník abstraktů

Radmila Řápková, Pavel Drašar  
redaktoři



### Programový výbor:

Prof. MUDr. RNDr. Luboslav Stárka, DrSc.

Prof. RNDr. Richard Hampl, DrSc.

Prof. RNDr. Pavel Drašar, DSc.



### Organizační výbor

RNDr. Marie Bičíková

RNDr. Zdeněk Putz, CSc.

Mgr. Ludmila Máčová, Ph.D.



### Program konference

Lubochňa - Program							
		předseda					
pondělí	13.VI	Stárka L.	Putz Z.	Stárka L.	Hampl R.	Máčová L.	Bílek R.
úterý	14.VI	Hampl R.	Drašar P.	Šimková M.	Vítků J.	Třískala Z.	
středa	15.VI	Lapčák O.	Huml L.	Jurášek M.	Marešová A.	Bešťák J.	Matucha P.
čtvrtek	16.VI	Bičíková M.	Bičíková M.	Janšáková K.	Repiská G.	Hill M.	Včelák J.
pátek	17.VI	volná diskuse v kolokviích					



## METANEFŘÍNY A JEJICH VÝZNAM PRO DIAGNOSTIKU FECHROMOCYTOMU

**JIŘÍ BEŠŤÁK**

*Endokrinologický ústav, Národní 8, 116 94 Praha 1  
jbestak@endo.cz*

Metanefríny jsou jedním z produktů metabolismu katecholaminů. Ten probíhá dvěma základními cestami.

Hlavní nebo též intraneuronální cesta je pomocí monoaminoxidázy (MAO) a následnou redukcí aldehyd reduktázou (AR) na dihydroxyphenylglycol (DHPG). Ten je dále metabolizován pomocí catechol-*O*-methyl transferasy (COMT) na methoxyhydroxyphenylglykol (MHPG) a dále pak v játrech alkohol dehydrogenasou (ADH) na kyselinu vanilmandlovou (VMA).

Vedlejší (extraneuronální) cesta vede působením COMT na katecholamíny za vzniku metanefríny (MN) a normetanefríny (NMN). Ty pak mohou být vyloučeny močí ve volné formě nebo ve formě sulfátů. Případně mohou být v játrech dále metabolizovány pomocí MAO a ADH na kyselinu vanilmandlovou (VMA).

Pro diagnostiku feochromocytomu lze využít většinu výše zmíněných látek. Od historicky nejstaršího stanovení kyseliny vanilmandlové přes katecholamíny po metanefríny v moči. Teprve v posledních ca 15 letech došlo k rozmachu stanovení volných plasmatických metanefríny. Toto stanovení se stalo zlatým standardem pro diagnostiku feochromocytomu díky jeho velmi vysoké selektivitě i specificitě.

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

## VITAMIN D JAKO MOŽNÁ PREVENCE COVID -19 S VYUŽITÍM LC/MS/MS

**MARIE BIČÍKOVÁ, LUDMILA MÁČOVÁ, MARTIN HILL**

*Endokrinologický ústav, Národní 8, 116 94 Praha 1  
mbicikova@endo.cz*

We contacted the staff of our medical facility with a request for voluntary provision of at least 2 ml of serum twice a year: winter collection by 15<sup>th</sup> of 2021 and summer collection by 15<sup>th</sup> of September 2021 (*i.e.* in the middle of the pandemic). The volunteers received the Patient Information and signed the Informed Consent in accordance with the discussion of the study proposal by the Ethics Committee of the Institute of Endocrinology. In both samples, the probands completed a questionnaire as to whether or not they had undergone COVID-19, confirmed by a PCR test, whether they were using vitamin D3 substitution, as well as gender and date of sample. The volunteers were rewarded for lost time and inconvenience. The aim of our study was to map vitamin D levels in people who had not had COVID-19 and to compare

the supply of vitamin D (calcidiol) in people who had the disease. Results are summarized in the Table 1.

Table 1. Analysis of relationships between levels of vitamin D and occurrence of COVID-19 and stage of the trial (month) for patients with and without vitamin D supplementation using an ANOVA model

Factor/interaction	F-Ratio	p-value
Cov	7,9	0,007
Mon	37,5	<0.001
Cov·x·Mon	0,0	0,889
Subj·(Sup·Age·Vac·Cov)	7,7	<0.001

*Abbreviations:·Cov...·Covid-19;·mon...month;·subj...¶  
Subjects;·sup...supplementation;·vac...·vaccination<sup>¶</sup>*

Patients with vitamin D levels of 80 nmol / L or higher statistically significantly less often suffered from Covid-19. Our results are consistent with the results collected in the cited review<sup>1</sup>.

*Supported by MH CZ - DRO (Institute of Endocrinology - EÚ, 00023761)"*

## REFERENCE

1. Thacher T. D.: *Nutrients* 14, 464 (2022).

## ANTIVIROVÉ PŮSOBENÍ AMIODARONU PŘI ONEMOCNĚNÍ SARS-CoV-2

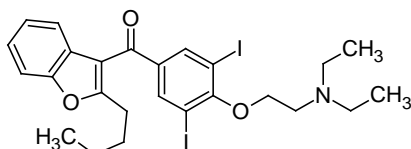
**RADOVAN BÍLEK<sup>a</sup>, VILÉM DANZIG<sup>b</sup>, TEREZA GRIMMICOVÁ<sup>a,c</sup>**

*<sup>a</sup>Endokrinologický ústav, Národní 8, 110 00 Praha 1;  
<sup>b</sup>Karlova univerzita, Všeobecná fakultní nemocnice, II. interní klinika kardiologie a angiologie, Karlovo náměstí 32, 128 08 Praha 2; <sup>c</sup>Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, Interní klinika, divize diabetologie a endokrinologie, Šrobárova 50, 100 34 Praha 10  
rbilek@endo.cz*

V práci se zabýváme SARS-CoV-2 infekcí v České republice probíhající v období 1. 4. 2020 – 30. 6. 2021 a data porovnávané s výskytem tohoto onemocnění za stejné časové období u 1032 pacientů léčených amiodaronem. Z našich dat vyplývá, že ve výše uvedeném období onemocnělo infekcí SARS-CoV-2 v České republice z celkem 10 694 000 obyvatel 15.6 % populace, naproti tomu u 1032 pacientů léčených amiodaronem v tomtéž období ve 2 pražských nemocnicích bylo nakaženo SARS-CoV-2 pouze 3.4 % pacientů.

Amiodaron je léčivo široce používané při výskytu arytmií. Současně je to i blokátor Ca<sup>2+</sup> kanálů a interferuje s endocytosou při infekci SARS-CoV-2, tj. má významné antivirové účinky. Příznivé jsou z hlediska nemoci i jeho antioxidační a protizánětlivé vlastnosti. Rovněž vysoký výskyt volného jodu v cirkulaci, který je z molekuly

amiodaronu uvolňován, má antivirový efekt. Rozdíly v % infekce u populace České republiky a u pacientů léčených amiodaronem jsou natolik velké, že by to mělo vést k výzkumu o možném využití těchto poznatků v praxi.



Obr. 1. Amiodaron

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

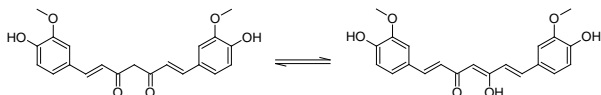
## ŽLUTÝ ZÁZRÁK Z VÝCHODU = KURKUMA

### PAVEL DRAŠAR, MICHAL JURÁŠEK

Ústav chemie přírodních látek, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6  
drasarp@vscht.cz

Kurkuma, v češtině též indický šafrán, žlutý kořen, žlutý zázvor, indický lék, indický ženšen či žlutý zázrak, (angl. turmeric, castor saffron, saffron root) prášek vyráběný vařením (v alkalickém prostředí), usušením a pomletím oddenku kurkumovníku (*Curcuma longa* L.).

Kurkumin (E100, CI Natural Yellow 3, kurkumová žluť, kurkum, diferuoylmethan) je pro tuto stať hlavní součástí a hlavním článkem biologické aktivity.



Obr. 1. Kurkumin

Již v roce 1949 bylo publikováno, že kurkumin má antibakteriální vlastnosti. Poté se po roce 1970 stal předmětem dalšího vědeckého bádání a byly publikovány aktivity jako antidiabetická, hypocholesteromická, protizánětlivá a antioxidační. Později, v osmdesátých letech bylo poukázáno na aktivitu protirakovinnou. V roce 1995 bylo publikováno, že vykazuje protizánětlivou aktivitu. Až do současnosti lze vidět zkoumání použití kurkuminu jako neuroprotektiva a látky pozitivně ovlivňující subjekty s Alzheimerovou chorobou. V letech 2017-2019 byla provedena klinická studie použití kurkuminu na udržování nebo zlepšení fyzických a kognitivních funkcí při stárnutí dospělých při zvýšeném riziku jejich postižení.

Dále je zkoumán i jako látka s extensivním kardioprotektivním účinkem, pro účinky antimalariické, fungicidní, anti-cytotoxické.

Zdá se, že některé přírodní látky mohou mít tak široké spektrum, že je můžeme považovat téměř za univerzální bolehoy, což rádi zaznamenáváme a předkládáme odborné veřejnosti.

## LITERATURA

- Jurášek M., Drašar P.: Chem. Listy 116, 293 (2022).

## THE ROLE OF STEROID CONJUGATES IN PHYSIOLOGY AND PATHOPHYSIOLOGY

### RICHARD HAMPL

Institute of Endocrinology, Národní třída 8, 116 94 Praha 1  
rhampl@endo.cz

Biologically active steroids exist in living organisms in two forms: free (unconjugated) or conjugated with other molecules, most often with sulfuric acid (sulfates) or glucuronic acid. In the past conjugated steroids were believed to be only excretion products but newer investigation revealed that they possess their own biological activities, differing from free hormones and their metabolites. Their levels in biological fluids (blood plasma, interstitial fluid, CSF etc.) as well as their concentrations in the tissues and cell compartments differ considerably from unconjugated ones. While the role of glucuronosidation seems to be mainly a regulation of the actual concentration of biologically active steroids, steroid sulfates display a number of important functions. Let us here to bring a few examples:

The most prominent steroid sulfate is dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS). Well known is its effect as an allosteric modulation of *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in neural cells, consisting in regulation of voltage-gated T-type calcium channel, or an antidepressant-like effects in animal behavioral models of depression by interaction with non-opioid sigma receptors.

As shown recently, DHEAS possess a number of effects through putative G-protein coupled membrane receptors, resulting in activation cAMP regulated responsive elements binding protein (CREB) leading to expression of various proteins<sup>1</sup>. One of these effects is stabilization of tight junction proteins forming the blood-brain barrier (BBB), influencing thus the transport of various substrates into brain. The same effect DHEAS has on blood-testis barrier<sup>2</sup>. The transport of DHEAS itself across the BBB is mediated by organic anion binding protein (OATP), which may serve as a pharmacological target.

Steroid conjugates are also of interest in pharmacy, since they may serve as an alternative mean for entering the steroid drug to the desired site in the organism. From this point of view, let us mention the recent work on steroid amino acid conjugates<sup>3</sup>.

Supported by the Ministry of Health of the Czech Republic – project RVA Endokrinologický ústav – EU 00023761

## REFERENCES

- Clark B. J., Prough R. A., Klinge C. M.: Vitam. Horm. 108, 29 (2018).
- Papadopoulos D., Shihan M., Scheiner-Bobis G.: J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 179, 73 (2017).
- Singla P., Salunke D. B.: Eur. J. Med. Chem. 187, 111909 (2020).

## STEROIDY A GESTAČNÍ DIABETES

**MARTIN HILL<sup>a</sup>, ANTONÍN PAŘÍZEK<sup>b</sup>, LEONA ONDŘEJÍKOVÁ<sup>a</sup>, MARTA VELÍKOVÁ<sup>a</sup>, DANIELA VEJRAŽKOVÁ<sup>a</sup>, LUBOSLAV STÁRKA<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Endokrinologický ústav, Národní třída 8, 116 94 Praha 1,

<sup>b</sup>Gynekologicko-porodnická klinika, VFN, Apolinářská 18, 128 08 Praha 2

mhill@endo.cz

Gestační diabetes mellitus (GDM) je velmi častou a zároveň závažnou těhotenskou komplikací. Hladiny steroidů v těhotenství jsou extrémně zvýšené a jejich role v těhotenství je klíčová, avšak téměř chybí systematické studie zkoumající změny steroidů v souvislosti s patofyziologií GDM. GDM je spojen s nízkými hladinami pohlavní steroidy vázícího globulinu (SHBG), inzulinovou rezistencí a hyperinzulinemií. Dalšími relevantními látkami jsou placentární proteohormony, jako je kisspeptin a CRH, které hrají důležitou roli i mimo těhotenství, kdy jsou však syntetizovány v podstatně nižších množstvích v hypothalamu. Uvedené placentární proteohormony ovlivňují průběh těhotenství i syntézu těhotenských steroidů a mohou se podílet na patofyziologii GDM.

Steroidy jsou v těhotenství primárně syntetizovány fetální zónou nadledviny plodu a dále placentou, nadledvinou matky a játry matky i plodu. Těhotenské steroidy zahrnují zejména sulfatované  $\Delta^5$  steroidy, které primárně působí prostřednictvím modulace různých iontových kanálů a ovlivňují vývoj GDM různými směry, většinou prodiabetogenní progesteron a převážně anti-diabetický estradiol působící na genomové i nengenomové úrovni, androgeny, neuroaktivní steroidy ovlivňující funkci hypofýzy a kortizol, jehož tvorba je stimulována CRH, ale který potlačuje jeho prozánětlivé účinky CRH. Vzhledem ke komplexnímu působení steroidů jsou zapotřebí studie posuzující jejich převažující účinek a jejich vhodnost pro odhad predispozice ke GDM. V současnosti jsme publikovali studie zabývající se těmito otázkami<sup>1,2</sup>. Steroidomické údaje (101 steroidů kvantifikovaných GC-MS/MS) vedly k závěru, že zvyšující se diabetogenní účinky s blížícím se termínem porodu jsou spojeny s přibývajícím hladinami progesteronu. Získané údaje také ukazují, že potlačená tvorba antidiabetického estradiolu může být důležitou složkou v patofyziologii GDM. Pacientky s GDM totiž vykazovaly nižší hladiny testosteronu (v důsledku snížené aktivity AKR1C3) a estradiolu (v důsledku posunu od aktivity HSD17B1 směrem k aktivitě HSD17B2), a dále nižší hladiny 7-oxygenovaných androgenů (soutěžícím s kortizonem o aktivní místa HSD11B1 a posouvajícím takto rovnováhu od diabetogenního kortisolu směrem k neaktivnímu kortizonu) (Obr. 1), sníženou aktivitu SRD5A a CYP17A1 v hydroxylasovém kroku avšak vyšší aktivitu v kroku lyasovém.

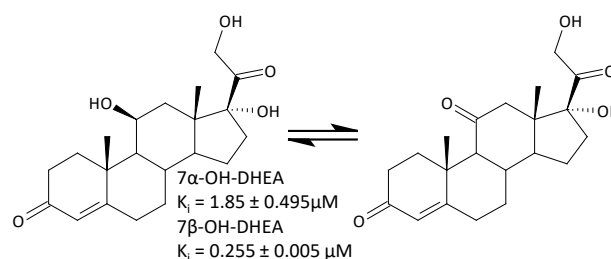
S blížícím se termínem porodu byly pozorovány stoupající aktivity enzymů CYP3A7, AKR1C1, CYP17A1 v hydroxylasovém kroku, avšak pokles aktivity CYP17A1 v lyasovém kroku, stoupající konjugace neuroinhibičních a těhotenství stabilizujících steroidů a pokles aktivity AKR1D1.

Data týkající se aktivity CYP17A1 nastiňovaly význam „postranní cesty“ (backdoor pathway) v metabolismu C21 steroidů, neboť snížené  $5\alpha/\beta$ -pregnany jsou vynikajícími substráty s vysokou afinitou k tomuto enzymu. Tyto metabolicky stabilní analyty se zdají být lepšími indikátory aktivity CYP17A1 jak v hydroxylasovém, tak lyasovém kroku ve srovnání s  $\Delta^5$  a  $\Delta^4$  steroidy. Pokud jde o hladiny sulfatovaných  $\Delta^5$  steroidů, které ovlivňují patofyziologii GDM, naše data naznačují celkově buď vyvážený, nebo mírně pro-diabetogenní účinek těchto neuroaktivních látek.

Pozorovaná nižší konjugace některých fyziologicky aktivních steroidů u žen s GDM naznačuje převládající trend snižování clearance neuroinhibičních (a většinou neuroprotektivních) pozitivních modulatorů GABA<sub>A</sub>R a současně nižší tvorbu excitačních (a někdy i excitotoxických) sulfátových steroidů jako jsou pregnenolon-sulfát a isopregnanolon-sulfát.

Získané údaje dále ukazují, že steroidomické změny související s GDM jsou patrné v mateřské krvi, ale ne ve smíšené pupečnickové krvi, což ukazuje rozhodující roli mateřského kompartmentu v patofyziologii GDM, přestože koncentrace neuroaktivních steroidů, které mohou ovlivnit glukózovou homeostázu, jsou ve srovnání s mateřskou krví výrazně vyšší ve smíšené pupečnickové krvi.

Závěrem lze říci, že u žen s GDM je podstatně změněn mateřský, ne však fetální steroidom, což může mít řadu důsledků v souvislosti s patofyziologií GDM.



Obr. 1. Kompetice 7 oxygenovaných steroidů s kortikoidy o enzym HSD11B1<sup>3</sup>

Granty Agentury pro zdravotnický výzkum ČR NV17-30528A, NU20-01-00308, a NU20-04-00389 podpořily tento výzkum.

## LITERATURA

- Hill M., Pařízek A., Šimják P., Hill M., Koucký M., Anderlová K., Krejčí H., Vejražková D., Ondřejíková L., Černý A., Kancheva R.: *Physiol. Res.* 70, S617 (2021).
- Ondřejíková L., a 13 spoluautorů: *Biomolecules* 11, 1746 (2021).
- Hennebert O., Chalbot S., Alran S., Morfin R.: *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 104, 326 (2007).

**POKROKY VE STANOVENÍ ANABOLICKÝCH ANDROGENNÍCH STEROIDŮ: OD ZAVEDENÉ PRAXE K MULTIDISCIPLINÁRNÍM PŘÍSTUPŮM**

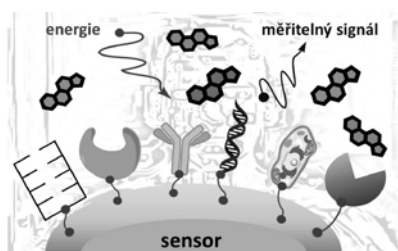
**LUKÁŠ HUML<sup>a</sup>, JAN TAUCHEN<sup>b</sup>, SILVIE RIMPELOVÁ<sup>a</sup>, BARBORA HOLUBOVÁ<sup>a</sup>, MICHAL JURÁŠEK<sup>a</sup>, OLDŘICH LAPČÍK<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28, Praha 6; <sup>b</sup>Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 00, Praha-Suchdol  
lukas.huml@vscht.cz

Anabolické androgenní steroidy (AAS) bývají zneužívány sportovci, ale bohužel často i jedinci běžné populace. Problémy a rizika spojená se zneužíváním AAS přitahují celosvětově stále více pozornosti a tím sílí i požadavky na možnosti stanovení těchto látek.

Zavedené metody pro studium AAS a odhalování dopingu spočívají zejména v separaci kapalinovou či plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí. Tento postup však vyžaduje relativně náročnou přípravu vzorků, znalost metabolismu AAS a dobře vyškolené operátory přístrojů s vysokou pořizovací cenou. Pro svou komplikovanost tak zůstávají v gesci odborníků, což brání jejich širšímu využití.

Ve snaze naplnit aktuální požadavky pro stanovení AAS se část vědecké obce zaměřila na vývoj nových, na míru konstruovaných přístupů. Ty směřují k vývoji časově a ekonomicky efektivnějších metod, které je možné používat rutinně i v terénu. Tato stanovení mají za cíl analýzu nejrůznějších matric, jako jsou biologické tekutiny, doplňky stravy, ale i maso, voda či jiné komponenty životního prostředí. Práce přináší přehled současných pokroků v analýze AAS s důrazem na metody založené na protilátkách, enzymech, aptamerech, oligonukleotidech, buňkách či jejich receptorech, a v neposlední řadě na chemicky navržených umělých senzorech.



Obr. 1. Schématické znázornění senzoru

Tato práce vznikla za podpory grantu Specifického univerzitního výzkumu č.: A1\_FPBT\_2022\_007 a projektu CEREBIT č.: CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_025/0007397.

#### LITERATURA

- Huml L., Tauchen J., Rimpelová S., Holubová B., Lapčík O., Jurášek M.: Sensors 22, 4 (2022).

#### POROVNANIE STEROIDNÉHO PROFILU PREDPUBERTÁLNYCH DIEVČAT S PORUCHOU AUTISTICKÉHO SPEKTRA A NEUROTYPICKÝCH KONTROL

**KATARÍNA JANŠÁKOVÁ<sup>a</sup>, MARTIN HILL<sup>b</sup>, HANA CELUŠÁKOVÁ<sup>a</sup>, GABRIELA REPISKÁ<sup>a</sup>, MARIE BIČÍKOVÁ<sup>b</sup>, LUDMILA MÁČOVÁ<sup>b</sup>, DANIELA OSTATNÍKOVÁ<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Fyziologický ústav LF UK, Sasinkova 2, 813 72 Bratislava, Slovenská republika; <sup>b</sup>Endokrinologický ústav, Oddelení steroidů a proteofaktorů Národní 8, 116 94 Praha, Česká republika

jansakova.katarina@gmail.com

Poruchy autistického spektra (PAS) zahrňují neurovývinové poruchy s doposiaľ nejasnou etiológiou. V závislosti od závažnosti bývajú častejšie diagnostikovaní chlapci než dievčatá v približnom pomere 5:1. V dôsledku tohto nepomeru sa skúmajú rôzne hormóny. Nakoľko dievčat diagnostikovaných s PAS je menej, výskum sa orientuje predovšetkým na chlapcov. Takýmto spôsobom dochádza k opomenutiu jednej skupiny jedincov s PAS a vytvoreniu medzere vo výskume. Cieľom štúdie bola analýza hormónov steroidnej dráhy u dievčat s diagnózou PAS a ich porovnanie s neurotypickými vekovo zodpovedajúcimi kontrolami.

Do štúdie bolo zaradených 16 dievčat (priemerný vek 4,8 rokov) s diagnózou PAS a 16 neurotypických kontrol (CTRL, priemerný vek 4,2 rokov). Diagnóza PAS bola stanovená v Akademickom centre výskumu autizmu, LF UK v Bratislave. Steroidy boli detegované v plazme využitím plynovej chromatografie/hmotnostnej spektrometrie. Pozorovali sme nižšiu koncentráciu pregnenolónu u PAS v porovnaní s CTRL ( $p=0,013$ ). Naopak, pozorovali sme trend smerom k vyššej koncentrácii dehydroepiandrosterón sulfátu ( $p=0,123$ ), androsterónu ( $p=0,145$ ) a jeho sulfátu ( $p=0,188$ ) či epiandrosterón sulfátu ( $p=0,144$ ) u jedincov s PAS v porovnaní s CTRL.

Výsledky poukazujú na možné zapojenie niektorých častí alternatívnej dráhy tvorby androgénov u PAS dievčat, avšak s najväčšou pravdepodobnosťou pre limitovanú vzorku sú rozdiely medzi skupinami nevýznamné. Zaujímavosťou je vyššia koncentrácia spomínaných hormónov u PAS dievčat oproti kontrole a tým aj ich teoreticky možná vyššia podobnosť s chlapcami v rámci steroidného profilu.

Táto štúdia bola podporená grantami APVV 15-0045, APVV 15-0085, APVV-20-0070, APVV-20-0139 a VEGA 1/0068/21.

#### DIMERY ESTRADIOLU JAKO MITOTICKÉ INHIBITORY

**MICHAL JURÁŠEK<sup>a</sup>, JIŘÍ ŘEHULKA<sup>b</sup>, PAVEL POLISCHUK<sup>b</sup>, PETR DŽUBÁK<sup>b</sup>, MARIÁN HAJDÚCH<sup>b</sup>, PAVEL DRAŠAR<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6; <sup>b</sup>Ústav molekulové a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, Hněvotínská 5, 179 00 Olomouc  
jurasekm@vscht.cz

Náš nedávný objev byl, že C-17 přemostěný estradiolový dimer (ED) obsahující dvě 1,4-disubstituované 1,2,3-triazolové skupiny s pyridinovým centrem je vysoce účinným inhibitorem polymerace a dynamiky mikrotubulů<sup>1</sup>. Popsali jsme, že ED je potentnější než dříve v klinických studiích testovaný 2-methoxyestradiol (ME). V tomto příspěvku



budou stručně prezentovány výsledky týkající se dvou sérií nových estradiolových dimerů obsahující modifikace/variance v rámci spojovacího můstku. Biologické *in vitro* testování dimerů ukázalo významné zlepšení selektivity některých dimerů vůči rakovinným buňkám. Analýza buněčného cyklu u dimerů s  $IC_{50}$  nižší než  $10 \mu M$  na CCRF-CEM prokázala zástavu v G2/M fázi a inhibiční aktivita vůči sestavování tubulinu byla ověřena *in vitro* pro celou sérii dimerů. Pro dimery se souhrnně nejzajímavějšími daty byla provedena vizualizace inhibice tubulinové polymerizace na U2-OS. Na základě předpokladu, že se dimery vážou do kolchicinového místa tubulinu, byl navržen *in silico* model zobrazující vazbu dimerů v molekule tubulinu.

*Tato práce vznikla za podpory grantu A1\_FPBT\_2022\_007.*

#### LITERATURA

1. Jurášek M. a 16 spoluautorů: J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 183, 68 (2018).

### CYTOKINY A NÁDOROVÉ MARKERY U ONEMOCNĚNÍ Covid-19 – MOHOU JEJICH HLADINY PŘEDPOVĚDĚT PRŮBĚH ONEMOCNĚNÍ?

**MARIE KARLÍKOVÁ, ONDŘEJ TOPOLČAN**

*Oddělení imunochemické diagnostiky, Fakultní nemocnice Plzeň, Edvarda Beneše 13, 305 99 Plzeň  
karlikovam@fnplzen.cz*

Covid-19 je rychle se rozvíjející infekční onemocnění s těžko předvídatelným průběhem. Před nasazením „agresivní“ léčby, jako je umělá plicní ventilace (UPV) či mimotělní membránová oxygenace (ECMO), je důležité posoudit závažnost onemocnění a odhadnout jeho další vývoj. Zatím nejsou k dispozici spolehlivé prognostické biomarkery. Jednou z možností by mohly být sérové hladiny prozánětlivých cytokinů<sup>1,2</sup> vzhledem k tomu, že právě tzv. cytokinová bouře je jednou z příčin zhoršení stavu pacienta vedoucímu až k orgánovému selhání a smrti. Další eventualitou by mohly být sérové hladiny nádorových markerů<sup>3,4</sup>, jelikož některé z nich se zvyšují v důsledku plicní fibrózy vyvolané onemocněním covid-19.

Provedli jsme retrospektivní nerandomizovanou studii, která zahrnovala tři skupiny pacientů s diagnózou covid-19: 1/ 30 pacientů s mírným až středně těžkým onemocněním, 2/ 30 pacientů na UPV, kteří se uzdravili, 3/ 30 pacientů, kteří zemřeli s covid-19. Cytokinový profil prozánětlivých (IL-1beta, IL-12p70, IL-2, IL-4, IFN gama, TNF alfa, IL-6) a regulačních (IL-10) cytokinů byl měřen v séru pacientů pomocí mikrofluidní imunoanalytické platformy ELLA (ProteinSimple, USA). Nádorové markery (CEA, CA 15-3, CYFRA 21.1, HE4) byly stanoveny automatizovanými imunoanalytickými metodami. Porovnali jsme hladiny cytokinů a hladiny nádorových markerů mezi skupinami. Hladiny IL-10 byly významně vyšší ve skupině 3 ve srovnání se skupinou 2 a 1 ( $p = 0,014$ ). Hladiny IFN gama ve skupině 1 byly vyšší než ve skupině 2 a 3, i když nesignifikantně ( $p =$

0,062). Hladiny IL-6 byly vyšší ve skupině 3 než ve skupině 1 a 2 (průměr 97,4 pg/ml vs. 63,8 a 63,0, v tomto pořadí). Hladiny CEA a CYFRA 1.1 byly významně vyšší ve skupině 3 než ve skupině 1 a 2. Z našich dat vyplývá, že hladiny cytokinů IL-10, IFN gama a IL-6 a hladiny nádorových biomarkerů CEA a CYFRA 21.1 by mohly pomoci predikovat život ohrožující průběh onemocnění covid-19 a tím přispět k volbě léčby.

#### REFERENCES

1. Mandel M., Harari G., Gurevich M., Achiron A.: Cytokine 134, 155 (2020).
2. Del Valle D. M., a 31 spoluautorů: Nat. Med. 26, 1636 (2020).
3. Yang C., Wang J., Liu J., Huang S., Xiong B.: J. Cancer Res. Clin. Oncol. 146, 3385 (2020).
4. Wei X., Su J., Yang K., Wei J., Wan H., Cao X., Tan W., Wang H.: J. Med. Virol. 92, 2036 (2020).

### VÝVOJ LC-MS/MS METODY PRO STANOVENÍ VYBRANÝCH METABOLITŮ VITAMINU D

**LUDMILA MÁČOVÁ, MARIE BIČÍKOVÁ, MARTIN HILL**

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

S objevem pleiotropních pozitivních účinků vitamínu D, které mimo jiné zahrnují také modulaci imunitního systému a neuroprotektivní působení, se vitamin D stal jedním z nejhodněji sledovaných parametrů v klinických laboratořích. S rostoucím počtem provedených měření rostou také analytické nároky na laboratorní stanovení vitamínu D. Vzhledem k lipofilní povaze molekuly, jeho tendenci vázat se na proteinový transportér a extrémně nízkým koncentracím je měření vitamínu D doprovázeno mnoha analytickými problémy. Velké množství strukturně podobných prekurzorů a metabolitů v biologických vzorcích často vede ke zkříženým reakcím a nadhodnocení výsledků při použití běžných rutinních metod založených na imunoreakci. Pro vysokou specifitu a citlivost se pro hodnocení stavu vitamínu D staly preferovanými chromatografické metody s detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie.

Byla vyvinuta vysoce citlivá a rychlá metoda založená na hmotnostní spektrometrii umožňující současnou kvantifikaci 25-hydroxyvitamínu D3, 25-hydroxyvitamínu D2, 24,25-dihydroxyvitamínu D3 a epimerů 3-epi-25-hydroxyvitamínu D3 a 3-epi-25-hydroxyvitamínu D2 v lidském séru. Příprava vzorků zahrnovala precipitaci a extrakci kapalina-kapalina s využitím hexanu. Běžně používaný typ chromatografických kolon C<sub>18</sub> neumožnil uspokojivě rozdělit námi sledované epimery. Dokonalé separace epimerů bylo dosaženo s využitím binárního průtokového gradientu na analytické koloně s pentafluorofenylpropylovou (PFP) stacionární fází a použitím vody a methanolu s 0,1% kyselinou mravenčí jako mobilních fází. Detekce byla provedena pomocí hmotnostního spektrometru s využitím pozitivní elektrosprejové ionizace (ESI) v režimu monitorování více

reakcí (MRM). V koncentračním rozpětí 0,5-100 ng/ml bylo dosaženo dostatečné citlivosti (bez nutnosti derivatizace) a vysokých hodnot linearit.  $R > 0,997$  bylo dosaženo pro všechny sledované analyty. Metoda byla úspěšně validována v souladu se současnými doporučeními agentury Food and Drug Administration (FDA). Ke stanovení parametrů validace byly použity vzorky VD-DDC Mass Spect Gold<sup>®</sup> jako nulové matrice a vzorky séra se známým přídatkem. K zajištění vnitřní kontroly kvality 25-hydroxyvitaminu D<sub>3</sub> a 25-hydroxyvitaminu D<sub>2</sub> byly v analýzách použity dvě různé koncentrační hladiny certifikovaného referenčního materiálu. Bylo provedeno a vyhodnoceno srovnávací měření 25-hydroxyvitaminu D s rutinně používanou ECLIA metodou na 44 patientských vzorcích. Metoda byla aplikována ve studii, kde byly měřeny hladiny vitaminu D ve vztahu k COVID-19, která bude na sympoziu Imunoanalýza 2022 rovněž prezentována (viz příspěvek Bičíková a kol. v tomto sborníku). Vyvinutá metoda představuje jednoduchý a užitečný nástroj pro sledování saturace vitaminem D.

Práce byla podpořena grantem MZ ČR – RVO (Endokrinologický ústav – EÚ, 00023761).

## SYNTEZA LIGANDŮ P2X7 A 6-1 RECEPTORU PRO ZOBRAZOVÁNÍ NUKLEÁRNÍMI TECHNIKAMI

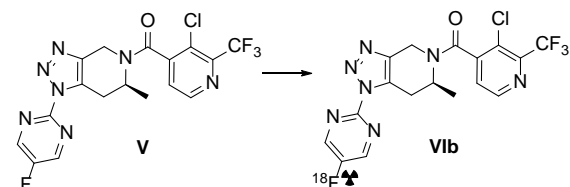
**ANNA MAREŠOVÁ<sup>a</sup>, MICHAL JURÁŠEK<sup>a</sup>,  
VLADIMÍR SHALGUNOV<sup>b</sup>, ALEXANDER POPKOV<sup>c</sup>,  
PAVEL DRAŠAR<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, CZ-166 28 Praha 6; <sup>b</sup>Copenhagen University Hospital, Rigshospitalet, Blegdamsvej 9, DK-2100 Copenhagen  
<sup>c</sup>Kepler Universitätsklinikum, Wagner Jauregg Weg 15, AT-4020 Linz  
maresovb@vscht.cz

P2X7 je membránový receptor patřící do skupiny purinoceptorů, který se účastní regulace apoptózy a zánětu. Je spojován s neurologickými onemocněními jako je Alzheimerova a Parkinsonova choroba a s kardiovaskulárními poruchami<sup>1</sup>. Zde uvádíme syntézu ligandů [<sup>11</sup>C]GSK-1482160<sup>2</sup> a [<sup>18</sup>F]fluorovaného tetrazolu **Vib**, které jsou potencionálně vhodnými nástroji pro detekci patologií zobrazovacími nukleárními technikami. Byla provedena modifikovaná [<sup>11</sup>C]methylace prekurzoru [<sup>11</sup>C]GSK-1482160 za využití zdrojů [<sup>11</sup>C]CH<sub>4</sub> a [<sup>11</sup>C]CO<sub>2</sub> a bylo dosaženo rozdílné specifické aktivity produktů (SA = 123 a 3 GBq/μmol). [<sup>18</sup>F]Fluorace tetrazolového prekurzoru **V** byla provedena na aromatickém kruhu s radiochemickým výtěžkem 4,7 % (RCY) a SA = 9,3 GBq/μmol. Na závěr byla autoradiografií vizualizována distribuce v myším mozku.

Sigma-1 je neopioidní transmembránový receptor, který je zapojen do mnoha onemocnění, včetně neurodegenerativních onemocnění a rakoviny. Dříve publikovaný sigma-1 ligand [<sup>18</sup>F]FTC-146 je slibným zobrazovacím prostředkem pro řadu neurologických onemocnění<sup>3</sup>, ale jeho syntéza je komplikovaná a časově náročná. Zde uvádíme zjednodušený dvoustupňový proces syntézy [<sup>18</sup>F]FTC-146.

Byl připraven analog prekurzoru s chlorem jako odstupující skupinou, na místo původního publikovaného tosylátu<sup>3</sup>. [<sup>18</sup>F]Fluorace pak byla provedena na tomto neaktivovaném alifatickém chloridu se srovnatelným radiochemickým výtěžkem (RCY = 7,5 %) a vysokou radiochemickou konverzí (RCC = 66,7 ± 0,5 %). Na závěr byla autoradiografií vizualizována distribuce v myším mozku.



Schema 1. Radiosyntéza antagonisty P2X7 receptoru. Reaktanty a podmínky: TBAOMs/K<sup>+</sup>/[<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup>, DMSO, 135 °C, 5 min

Tato práce vznikla za podpory grantu A2\_FPBT\_2022\_067.

## LITERATURA

- Adinolfi E., Giuliani A. L., De Marchi E., Pegoraro A., Orioli E., Di Virgilio F.: *Biochem. Pharmacol.* 151, 234 (2018).
- Gao M. Z., Wang M., Green M. A., Hutchins G. D., Zheng Q. H.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25, 1965 (2015).
- James M. L., Shen B., Zavaleta C. L., Nielsen C. H., Mesangeau C., Vuppala P. K., Chan C., Avery B. A., Fishback J. A., Matsumoto R. R., Gambhir S. S., McCurdy C. R., Chin F. T.: *J. Med. Chem.* 55, 8272 (2012).

## PROTILÁTKY IGG PROTI SARS-COV-2, PODTŘÍDY IGG, CÍRKULUJÍCÍ IMUNOKOMPLEXY A SLOŽKY KOMPLEMENTU C3C A C4 V SÉRU OSOB NEOČKOVANÝCH A OČKOVANÝCH PROTI ONEMOCNĚNÍ COVID-19

**KAROLÍNA ABSOLONOVÁ, PETR MATUCHA, IVAN ŠTERZL**

Endokrinologický ústav, Národní 8, 116 94 Praha 1  
pmatucha@endo.cz

Vážný průběh onemocnění Covid-19 je charakterizován zánětem, kam patří vysoké hladiny zánětlivých cytokinů, alveolární zánětlivé infiltráty a vaskulární mikrotromby<sup>1</sup>. Z recentních publikací je zřejmé, že rizikovitost vedlejších účinků onemocnění Covid-19 a očkování proti viru SARS-CoV-2 zvyšují imunokomplexy, které se usazují ve tkáních a cévách, a mohou být podkladem lokální zánětlivé reakce – imunopatologické reakce III. typu – za podpory destrukce tkáně a tvorby trombů. V říjnu 2020 Manzo diskutoval onemocnění Covid-19 jako spouštěč imunokomplexové hypersenzitivní reakce<sup>2</sup>. U onemocnění Covid-19 se předpokládají tři fáze onemocnění: virová, imunologická a hemovaskulární. Manzo<sup>2</sup> zdůraznil nadbytek antigenu ve druhé fázi onemocnění, který může vést ke vzniku imunokomplexů antigen-protilátka, které již nelze odstranit



fagocyty. Ty se mohou usazovat ve tkáních, kde mohou vyvolat přetrvávající zánět. Významnou roli v zánětu hraje i komplement, který se aktivuje v imunologické fázi onemocnění Covid-19 spolu s tvorbou imunokomplexů<sup>2</sup>. Protože nové vakcíny využívající spike protein mají indukovat reakci antigen-protilátka, mohou vyvolat podobné patologické účinky<sup>3</sup>.

Pro stanovení protilátek anti-SARS-CoV-2 IgG, cirkulujících imunokomplexů, složek komplementu a podtříd IgG jsme využili séra očkovaných a neočkovaných jedinců. Rozhodli jsme se ověřit poznatky z literatury na běžné populaci jedinců, kteří prodělali onemocnění a/nebo se nechali očkovat proti viru SARS-CoV-2 v období do 1 roku před odběrem krve.

Výzkumný soubor tvořilo 124 osob (46,13±16,64 let), ženy  $n = 85$  (45,68±15,03 let), muži  $n = 39$  (47,10±19,88 let). Tento soubor tvořili očkovaní  $n = 87$  (46,86±16,25 let), ženy  $n = 63$  (46,21±15,40 let), muži  $n = 24$  (48,58±18,53 let) a neočkovaní  $n = 39$  (42,95±18,30 let), ženy  $n = 24$  (41,83±15,68 let), muži  $n = 15$  (44,73±22,34 let). Zastoupení vakcín v souboru očkovaných bylo 69 Comirnaty (Pfizer/BioNTech), 15 Spikevax (Moderna) a 3 Janssen (Johnson & Johnson). V souboru očkovaných 58 neprodělalo Covid-19, 29 prodělalo. V souboru neočkovaných 17 neprodělalo Covid-19, 22 prodělalo. Všichni jedinci v souboru byli považováni za zdravé, šlo o zaměstnance Endokrinologického ústavu Praha a jejich rodinné příslušníky.

Jako kontrolní soubor bylo použito 17 jedinců ze souboru neočkovaných (48±17 let), muži  $n = 5$  (45,8±23,8 let), ženy  $n = 12$  (49,3 ± 13,9 let), kteří neprodělali Covid-19.

Pro stanovení protilátek IgG proti SARS-CoV-2 pro neočkované jsme použili ELISA kit GA COV-2 IgG, 3920, BioVendor, který detekuje IgG proti spike a nukleokapsidovým antigenům (rekombinantní). Pro očkované jsme použili ELISA kit EIA COVID-19 RBD IgG, CoRG96, TestLine Clinical Diagnostics, který detekuje IgG proti receptor-binding domain proteinu spike S1. Použití těchto dvou kitů je dáno historicky jejich využíváním na našem pracovišti, kdy kit GA COV-2 IgG byl uveden na trh dříve, ale nedetekoval protilátky u očkovaných jedinců, jejichž potřeba stanovení vyplynula až později během pandemie. Z důvodu srovnatelnosti výsledků v čase jsme zachovali oba dva kity v našem portfoliu. Výsledky u obou kitů se vyjadřují v indexu pozitivivity. Stanovení cirkulujících imunokomplexů bylo provedeno na ELISA kitu CIC C1q ELISA, DKO016, DiaMetra. Všechny ELISA soupravy byly měřeny na přístroji Immunomat Base. Složky komplementu C3c, C4, IgG a podtřídy IgG1-4 byly stanoveny turbidimetricky na přístroji Optilite, kity C3c (NK023.OPT), C4 (NK025.OPT), IgG (NK004.OPT), IgG1 (NK006.OPT), IgG2 (NK007.OPT), IgG3 (LK008.OPT), IgG4 (LK009.OPT), The Binding Site.

Statistické zhodnocení bylo provedeno pomocí programu Statgraphics Plus 5.0 (Manugistics Inc., 2115 East Jefferson Street, Rockville, MD 20852, USA). Byly použity Mann-Whitneyův test, Spearmanova korelace, Kruskal-Wallisův test.

V souboru očkovaných nebyly nalezeny žádné korelace mezi anti-SARS-CoV-2 IgG a ostatními parametry (CIK, C3c, C4, IgG, IgG1-4). Byla nalezena korelace mezi CIK a IgG2 ( $r = 0,296493$ ,  $p = 0,0076$ ), mezi C3c a C4 ( $r = 0,615$ ,  $p = 0$ ),

mezi IgG a IgG1 ( $r = 0,824$ ,  $p = 0$ ), mezi IgG a IgG2 ( $r = 0,547$ ,  $p = 0,000001$ ), mezi IgG a IgG4 ( $r = 0,456$ ,  $p = 0,00005$ ), mezi IgG1 a IgG4 ( $r = 0,319$ ,  $p = 0,0049$ ). Příjemci jednotlivých vakcín se lišili pouze v anti-SARS-CoV-2 IgG ( $p = 0,0073$ ). Ti, co prodělali a neprodělali Covid-19 se lišili pouze v anti-SARS-CoV-2 IgG ( $p = 0,0177$ ). Pohlaví se lišila v C4 ( $p = 0,0241$ ) a IgG4 ( $p = 0,0322$ ). U C4 měly vyšší hladinu ženy, u IgG4 muži.

V souboru neočkovaných rovněž nebyly nalezeny žádné korelace mezi anti-SARS-CoV-2 IgG a ostatními parametry. Byla nalezena korelace mezi IgG4 a věkem ( $r = -0,402$ ,  $p = 0,0124$ ), mezi C3c a C4 ( $r = 0,363$ ,  $p = 0,023$ ), mezi IgG a IgG1 ( $r = 0,681$ ,  $p = 0,000005$ ), mezi IgG a IgG2 ( $r = 0,466$ ,  $p = 0,0042$ ), mezi IgG a IgG3 ( $r = 0,385$ ,  $p = 0,020$ ). Ti, co prodělali a neprodělali Covid-19 se lišili pouze v anti-SARS-CoV-2 IgG ( $p = 0,0034$ ). Pohlaví se lišila v IgG2 ( $p = 0,0034$ ) a IgG4 ( $p = 0,0242$ ), v obou případech měly ženy vyšší hladinu než muži.

V souboru všech probandů dohromady byly nalezeny korelace mezi C3c a věkem ( $r = 0,211$ ,  $p = 0,018$ ), mezi IgG4 a věkem ( $r = -0,235$ ,  $p = 0,0087$ ), mezi C3c a C4 ( $r = 0,569$ ,  $p = 0$ ), mezi IgG a IgG1 ( $r = 0,764$ ,  $p = 0$ ), mezi IgG a IgG2 ( $r = 0,548$ ,  $p = 0$ ), mezi IgG a IgG4 ( $r = 0,423$ ,  $p = 0,000005$ ), mezi IgG1 a IgG4 ( $r = 0,204$ ,  $p = 0,031$ ), mezi IgG2 a IgG4 ( $r = 0,195$ ,  $p = 0,034$ ), mezi IgG2 a IgG3 ( $r = 0,206$ ,  $p = 0,025$ ). Korelace mezi anti-SARS-CoV-2 IgG a dalšími proměnnými nelze hodnotit z důvodu použití dvou různých kitů. Prodělání či neprodělání nemoci nevykazovalo odlišnosti v žádném z parametrů, včetně anti-SARS-CoV-2 IgG (zde je ale zřejmě i vliv očkování, který má stejný projev jako prodělání nemoci – vzestup hladiny anti-SARS-CoV-2 IgG). Pohlaví se lišila pouze v IgG2 ( $p = 0,029$ ), kde ženy měly vyšší hladinu než muži. Očkovaní a neočkovaní se v jednotlivých parametrech nelišili (lišili se pouze v anti-SARS-CoV-IgG).

U kontrolního souboru (neočkovaných bez prodělání Covid-19) byla nalezena korelace pouze mezi IgG a IgG1 ( $r = 0,704$ ,  $p = 0,0034$ ). Pohlaví se lišila pouze v IgG4 ( $p = 0,018$ ), kdy ženy měly vyšší hladinu než muži.

Další fází naší studie bude zhodnocení dosažených výsledků a jejich porovnání s literaturou. Předběžně se prozatím jeví, že u jedinců, kteří nejsou v akutní fázi onemocnění, se parametry vracejí k normálnímu stavu.

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

#### LITERATURA

1. Chakraborty S., a 26 spoluautorů: Nature Immunol. 22, 67 (2021).
2. Manzo G.: Front. Immunol. 11, 566000 (2020).
3. Mücke T., Knop V., Mücke M.M., Ochsendorf F., Zeuzem S.: BMC Infect. Dis. 21, 958 (2021).

## METABOLOMICKÁ ANALÝZA MOČU AKO NÁSTROJ NA IDENTIFIKÁCIU POTENCIÁLNYCH BIOMARKEROV PORÚCH AUTISTICKÉHO SPEKTRA

**GABRIELA REPISKÁ<sup>a</sup>, DOMINIKA OLEŠOVÁ<sup>b</sup>, KATARÍNA BABINSKÁ<sup>a</sup>, ANDREJ KOVÁČ<sup>b</sup>, HANA CELUŠÁKOVÁ<sup>a</sup>, STANISLAV KATINA<sup>c</sup>, JAROSLAV GALBA<sup>b</sup>, DANIELA OSTATNÍKOVÁ<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Fyziologický ústav LF UK, Sasinkova 2, 813 72 Bratislava, Slovenská republika; <sup>b</sup>Neuroimunologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 845 10 Bratislava, Slovenská republika; <sup>c</sup>Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav matematiky a statistiky, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Česká republika  
gabriela.repiska@fmed.uniba.sk

Poruchy autistického spektra (PAS) sú súborem heterogénnych neurovývinových ochorení so stúpajúcou prevalenciou. Napriek rozsiahlemu výskumu etiológia PAS stále nie je objasnená, a zároveň nie je identifikovaný biomarker, ktorý by potvrdil diagnózu autizmu. V posledných rokoch sa upriamila pozornosť aj na výskum metabolómového profilu pacientov s PAS.

V pilotnej štúdií sme sa zamerali na analýzu ranného moču 35 detí s PAS a 30 neurotypických detí prostredníctvom LC-MS/MS. Zo 185 analytov zahŕňajúcich metabolizmus aminokyselín, glukózy, mastných kyselín a lipidov bolo vo viac ako 50 % vzoriek detegovaných 83 analytov. V rámci nich sme pozorovali signifikantný rozdiel medzi PAS a nerotypickými deťmi v troch metabolitoch ( $p < 0,05$ ) - pimelylkarnitín (C7-DC), glycerofosfolipid (PC aa C34:1), nonaylkarnitín (C9). Pilotná štúdia poukázala na viaceré faktory, ktoré môžu ovplyvniť výsledok metabolomickej analýzy. Či už sa jedná o preanalytické faktory, ako odber biologického materiálu, spracovanie a skladovanie vzoriek, ale tiež výber kontrolnej skupiny a inklúzných kritérií pre výber probandov.

Pozorované rozdiely v metabolomických markeroch vo vzorkách moču môžu naznačovať metabolický vzorec špecifický pre PAS. V následných analýzách je však potrebné zamerať sa na faktory ovplyvňujúce výsledok analýzy, podrobnejšie preskúmať diagnostickú citlivosť a špecifickosť markerov k PAS a v neposlednom rade ich vzťahy s často sa vyskytujúci komorbiditami, ako sú napríklad tráviace ťažkosti.

Táto štúdia bola podporená grantami APVV 15-0045, APVV 15-0085, APVV-20-0070, APVV-20-0139 a VEGA 1/0068/21.

## GENERAL GLUCOCORTICOID RESISTENCE – CHROUSOS SYNDROME

**LUBOSLAV STÁRKA**

Endokrinologický ústav, Národní 8, 119 94 Praha 1  
lstarka@endo.cz

Chrousos syndrome is generalized glucocorticoid resistance caused by defects in the NR3C1 gene that encodes human glucocorticoid receptors. It presents clinically in greatly variable forms from nearly asymptomatic course to very expressive consequences of higher mineralocorticoid activity and higher androgens. Besides hyperandrogenisation, more striking in women, hypertension is frequently found as a consequence of mineralocorticoid action. Laboratory hormonal analysis shows high cortisol concentration in the circulation, high excretion of free cortisol in urine a frequently higher ACTH. Those data are close to the findings common in Cushing's disease, none of the patients, however, had overt Cushing's syndrome signs. For the treatment of generalised glucocorticoid resistance, high doses of mineralocorticoid sparing synthetic glucocorticoids were suggested. The high doses should activate the mutant or wild-type glucocorticoid receptors and suppress the secretion of ACTH.

Podpořeno Ministerstvem zdravotnictví ČR, RVO (Endokrinologický ústav – EU 00023761).

## REFERENCES

1. Nicolaides N. C., Charmandari E.: Exp. Suppl. 111, 85 (2019).
2. Nicolaides N. C., Charmandari E.: Eur. J. Clin. Invest. 45, 504 (2015).

## ANALÝZA STEROIDNÍCH HORMONŮ V LIDSKÉ PLAZMĚ, PROSTATICKE A TESTIKULÁRNÍ TKÁNI

**MARKÉTA ŠIMKOVÁ<sup>a,b</sup>, LUCIE KOLÁTOROVÁ<sup>a</sup>, PAVEL DRAŠAR<sup>b</sup>, JANA VÍTKŮ<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Endokrinologický ústav, Národní 8, 116 94 Praha; <sup>b</sup>Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha  
msimkova@endo.cz

Vývoj robustní a rychlé metody s jednoduchou přípravou vzorků pro analýzu C<sub>18</sub>-, C<sub>19</sub>-, C<sub>21</sub>- steroidů je předmětem zájmu mnoha výzkumných skupin. Je známo, že koncentrace steroidních hormonů v krvi plně nereflektují aktuální situaci v místě svého účinku. V patofyziologických stavech mužského reprodukčního systému tak hraje analýza intraprostatických a intratestikulárních steroidů zásadní roli.

Cílem studie bylo vyvinout a validovat robustní LC-MS/MS metodu pro analýzu steroidních hormonů v lidské plazmě, a následně ji optimalizovat pro analýzu v prostatě a tkáni varlat.

Vyvinutá metoda umožňuje kvantifikaci 22 steroidů bez nutnosti jakékoli derivatizace a dalších 10 steroidů derivatizovaných 2-fluor-1-methylpyridinium-*p*-toluensulfonátem. Separace analytů bylo dosaženo na reverzní fázi s využitím kolony Kinetex C18 (100 mm × 3,0 mm, 2,6 μm) při gradientové eluci v systému methanol-voda s přidávkem 0,1 % kyseliny mravenčí pro podporu pozitivní ionizace molekul.

Validace v plazmě prokázala, že metoda je použitelná pro kvantitativní analýzu dvou C<sub>18</sub>-steroidů (estron,

estradiol, devatenácti C19-steroidů (testosteron, epitestosteron, dihydrotestosteron, 11-ketodihydrotestosteron, 11p-hydroxyandrostendion, 11p-hydroxytestosteron, 11-ketotestosteron, dehydroepiandrosteron (DHEA), 7 $\alpha$ -hydroxy-DHEA, 7 $\beta$ -hydroxy-DHEA, 7-keto-DHEA, androsteron, epiandrosteron, androstendion, androstendiol, 5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol, 5 $\alpha$ -androstan-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol, 3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol, 5 $\beta$ -androstan-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol) a jedenácti C21-steroidů (kortizol, 21-deoxykortizol, 11-deoxykortizol, kortizon, kortikosteron, 11-deoxykortikosteron, pregnenolon, progesteron, progesteron, progesteron, 17-hydroxyprogesteron, 5 $\alpha$ -dihydroprogesteron). Dolní limity kvantifikace v plazmě se pohybují od 0,017 do 7,32 ng/ml. Validační parametry (specifita, reprodukovatelnost, opakovatelnost, výtěžnost) a výsledky stabilitních testů jsou v souladu se směrnicemi FDA. Byly testovány různé způsoby preanalytického zpracování tkání, optimalizované podmínky pro analýzu prostatické a testikulární tkáně budou diskutovány.

Podpořeno granty AZV ČR NU21J-01-00040 a MZ ČR – RVO (Endokrinologický ústav - EÚ, 00023761).

#### LITERATURA

- Šimková M., Kolátorová L., Drašar P., Vítků J.: Journal of chromatography B in press (2022); <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2022.123294>.

### VÝVOJ HLADIN SLINNÉHO KORTIZOLU U PILOTNÍ SKUPINY DĚTÍ 6–12 LET V SOUVISLOSTI S ABSOLVOVÁNÍM LÁZEŇSKÉ LÉČBY

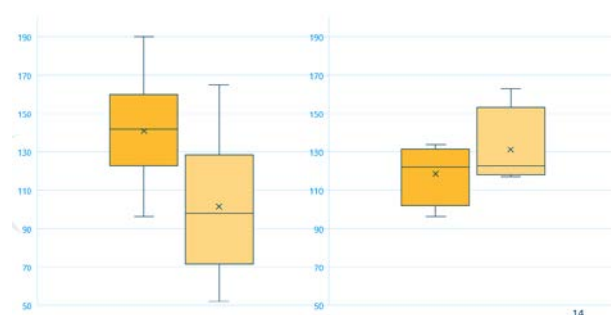
ZDENĚK TRÍSKALA<sup>a</sup>, MARIE BIČÍKOVÁ<sup>b</sup>,  
LUDMILA MÁČOVÁ<sup>b</sup>, MARTIN HILL<sup>b</sup>,  
DOBROSLAVA JANDOVÁ<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Ministerstvo zdravotnictví ČR, Palackého náměstí 4, 128 01 Praha 2, <sup>b</sup>Endokrinologický ústav, Oddělení steroidů a proteofaktorů, Národní 8, 116 94 Praha 1, <sup>c</sup>MediCentrum JONA, K Blahobytu 1596, 530 02 Pardubice  
Zdenek.Triskala@mzcr.cz

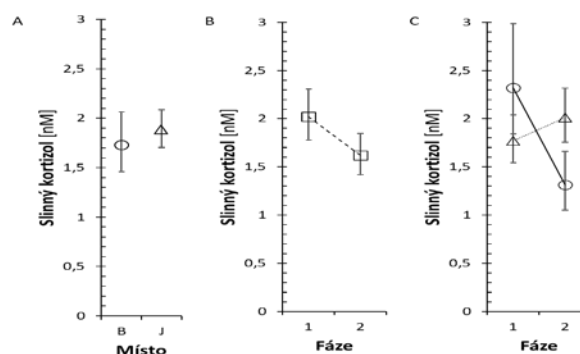
Základem práce bylo porovnání vývoje hodnot slinného kortizolu s výsledky kineziologického rozboru, testů obratnosti, vývoje a antropometrických charakteristik při nástupu do lázní a po třítydenním léčebném pobytu. V letech 2020 a 2021 bylo provedeno testování na skupině 78 probandů, kteří neužívají perorální kortikoidy. Základní otázkou byla vhodnost zařazení tzv. koloběhu (jízdy na koloběžce) mezi standardní aktivity skupinové tělesné výchovy poskytované pojištěncům v rámci léčebného pobytu. Sekundárně byl pak sledován celkový stav pojištěnců a jeho vývoj v souvislosti s absolvováním lázeňského léčebného pobytu.

Zatímco výsledky kineziologických testů prokázaly snížení tzv. celkové dysfunkce u pacientů s přidáním koloběhem, výsledky hodnot slinného kortizolu prokázaly rozdílnou adaptabilitu probandů na zvýšenou zátěž. Byla prokázána závislost mezi primární indikační diagnózou a vývojem hladin kortizolu. Vstupní hodnoty byly srovnatelné

napříč celou skupinou probandů. Po absolvování lázeňského pobytu došlo u obézních dětí (léčené v lázních s obezitou) k poklesu koncentrací slinného kortizolu, u dětí absolvujících léčbu v souvislosti s netuberkulózními onemocněními dýchacího ústrojí byl zaznamenán vzestup těchto koncentrací.



Obr. 1. Porovnání vývoje „celková kineziologická dysfunkce“ před a po absolvování léčby (vlevo jezdící děti, vpravo kontrolní skupina)



Obr. 2. Změny v hladinách slinného kortizolu. Graf „C“ ukazuje rozdílný vývoj obézních a astmatických pojištěnců. Vysvětlivky: ○ obezity, ▲ astmatici, □ kontrolní skupina; Místo B – Bludov, J – Jeseník; Fáze 1 – začátek pobytu, 2 – po absolvování léčby

Očekávatelně bylo prokázáno zlepšení antropometrických hodnot všech probandů absolvujících lázeňskou léčbu, jak po stránce možného nárůstu svalové hmoty, tak ztráty části tukových zásob u obézních dětí. Nicméně výsledky měření slinného kortizolu ukazují, že plošné zařazení koloběhu je diskutabilní s ohledem na celkovou dekonkreci astmatických (v některých případech až kachektických dětí), u kterých představuje koloběh až nadlimitní zátěž.

Výše uvedená tvrzení jsou autory prezentována jako možná interpretace výsledků u relativně malé skupiny pacientů, pro jejíž ověření bude zapotřebí provést srovnání s vývojem hladin slinného kortizolu u běžné populace (příkladně na vybrané základní škole) a provedení testování dalších probandů pro dosažení reprezentativnějších výsledků.

Projekt vznikl za šlechtné podpory Endokrinologického ústavu a Svazu léčebných lázní, který se finančně podílel na částečném uhrazení nákladů projektu. Poděkování patří spolupracujícím zaměstnancům lázní v Bludově a Jeseníku.

## NEUROAKTIVNÍ STEROIDY V SÉRU A MOZKOMÍŠNÍM MOKU U PACIENTŮ S ALZHEIMEROVOU NEMOCÍ

**JOSEF VČELÁK, MARTIN HILL, DANIELA VEJRAŽKOVÁ, BĚLA BENDLOVÁ, MARKĚTA VAŇKOVÁ**

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

Diagnóza Alzheimerovy nemoci (AD) je v současnosti stále založena na klinickém a neuropsychologickém vyšetření. Dosud není k dispozici žádný krevní test, který by dokázal jednoznačně odlišit pacienty s demencí od zdravých jedinců. Neuroaktivní steroidy jsou molekuly syntetizované v periferních tkáních. Neurosteroidy jsou pak molekuly syntetizované přímo v nervovém systému, kde jsou klíčovými regulátory nervových funkcí. Klinické i experimentální studie prokázaly, že hladiny neuroaktivních steroidů jsou zapojeny do řady neurofyziologických a behaviorálních procesů, jako je spánek, učení, paměť, stres a stárnutí a jejich disbalance provází řadu neurodegenerativních onemocnění.

Některé periferní steroidy pronikají hematoencefalickou bariérou. Prediktivní hodnota těchto periferních steroidů by tak mohla být srovnatelná s hodnotou steroidů získaných z mozkomíšního moku (CSF). Proto přibývají analýzy, které srovnávají hladiny steroidů v CSF a v plazmě či séru s cílem využít periferních hormonů k diagnostice onemocnění bez nutnosti invazivního odběru CSF.

Cílem naší studie bylo porovnat hladiny neuroaktivních steroidů v CSF a v séru u pacientů s AD. Za tímto účelem byly hladiny neuroaktivních steroidů vyhodnoceny u 56 pacientů s AD (28 žen a 28 mužů).

Metodika: kvantifikace steroidů v CSF a v séru byla provedena na platformě plynové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí.

Výsledky potvrdily náš předpoklad o srovnatelné prediktivní hodnotě steroidů v CSF a cirkulaci. Pro účely diagnostiky AD, která by využívala steroidní hormony, je tedy možné vyhnout se rizikovému a vysoce invazivnímu odběru CSF a nahradit jej podstatně méně invazivním odběrem krve.

*Podpořeno granty AZV NV 18-01-00399, MZ ČR-DRO (EÚ 00023761).*

## POROVNÁNÍ TŘÍ NOVĚ VYVINUTÝCH A VALIDOVANÝCH METOD PRO STANOVENÍ ESTROGENŮ V LIDSKÉ PLASMĚ

**JANA VÍTKŮ<sup>a</sup>, LUCIE KOLÁTOROVÁ<sup>a</sup>, LENKA HORÁČKOVÁ<sup>a,b</sup>, MARKĚTA ŠIMKOVÁ<sup>a,b</sup>**

*<sup>a</sup>Endokrinologický ústav, Oddělení steroidů a proteofaktorů, Národní 8, 116 94 Praha; <sup>b</sup>Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Ústav chemie přírodních látek  
jvitku@endo.cz*

Estrogeny (estron, estradiol, estriol) představují důležitý ukazatel různých fyziologických a patofyziologických stavů u žen i mužů. Jejich stanovení pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (LC-MS/MS) se neobejde, vzhledem ke špatné ionizaci těchto látek, bez obtíží. Obecně jsou při přípravě vzorku používány 2 přístupy. První způsob je rychlý a jednodušší, spočívá v pouhé extrakci vzorku, má ale nižší citlivost. Druhou možností je přidat derivatizační krok, metoda je pak citlivější, ale také časově náročnější. Cílem této studie bylo (1) vyvinout metody na stanovení estrogenů s a bez derivatizačního kroku pomocí LC-MS/MS a (2) porovnat tyto metody na setu 20 plasmatických vzorků o různých koncentracích estrogenů (muži, ženy ve folikulární a luteální fázi, těhotné ženy a ženy v menopauze). Při vývoji byla vyzkoušena různá extrakční činidla: *tert*-butylmethylether (MTBE), toluen, hexan, ethyl-acetát, případně jejich kombinace. Dále byly optimalizovány 2 derivatizační reakce, první pomocí dansyl-chloridu v acetonu a druhá s využitím 2-fluoro-1-methylpyridinium-*p*-toluensulfonátu (FMP-TS). Nakonec byly testovány různé chromatografické podmínky (různé kolony, gradienty, mobilní fáze, aditiva).

Metoda pro stanovení estrogenů bez derivatizace vykazovala největší intenzity píků při extrakci hexanem s ethyl-acetátem (3:2), separaci na koloně Kinetex Biphenyl (100 mm × 3 mm, 2,6 μm) a použitím mobilních fází vody a acetonitrilu bez aditiv v negativním ESI módu.

Druhá validovaná metoda zahrnuje extrakci hexanem s ethyl-acetátem (3:2), derivatizaci dansylchloridem, separaci na koloně Kinetex C18 (100 mm × 3,0 mm, 1,7 μm) za použití methanolu a vody s přidávkou kyseliny mravenčí jako mobilních fází v pozitivním ESI módu.

Třetí validovaná metoda zahrnuje extrakci MTBE, derivatizaci pomocí FMP-TS, chromatografickou separaci na koloně Kinetex C18 (100 mm × 3,0 mm, 2,6 μm) a využití systému voda-methanol s přidávkou kyseliny mravenčí a měření v pozitivním ESI módu. Diskutovány budou výhody a nevýhody těchto metod, problémy vzniklé během vývoje jednotlivých metodik, výsledky validačních parametrů a porovnání metod na setu vzorků.

*Podpořeno projektem od AZV ČR NU21J-01-00040.*

## REJSTRÍK AUTORŮ

Absolonová, Karolína	172	Máčová, Ludmila	167, 170, 171, 175
Babinská, Katarína	174	Marešová, Anna	172
Bendlová, Běla	176	Matucha, Petr	172
Bešťák, Jiří	167	Olešová, Dominika	174
Bičíková, Marie	167, 170, 171, 175	Ondřejíková, Leona	169
Bílek, Radovan	167	Ostatníková, Daniela	170, 174
Celušáková, Hana	170, 174	Pařízek, Antonín	169
Danzig, Vilém	167	Polischuk, Pavel	170
Drašar, Pavel	168, 170, 172, 174	Popkov, Alexander	172
Džubák, Petr	170	Řehulka, Jiří	170
Galba, Jaroslav	174	Repiská, Gabriela	170, 174
Grimmichová, Tereza	167	Rimpelová, Silvie	169
Hajdúch, Marián	170	Shalgunov, Vladimír	172
HAMPL, Richard	168	Šimková, Markéta	174, 176
Hill, Martin	167, 169, 170, 171, 175, 176	Stárka, Luboslav	169
Holubová, Barbora	169	Šterzl, Ivan	172
Horáčková, Lenka	176	Tauchen, Jan	169
Huml, Lukáš	169	Topolčan, Ondřej	170
Jandová, Dobroslava	175	Třískala, Zdeněk	175
Janšáková, Katarína	170	Vaňková, Markéta	176
Jurášek, Michal	168, 169, 170, 172	Včelák, Josef	176
Karlíková, Marie	171	Vejražková, Daniela	169, 176
Katina, Stanislav	174	Velíková, Marta	169
Kolátorová, Lucie	174, 176	Vítků, Jana	174, 176
Kováč, Andrej	172		
Lapčík, Oldřich	169		

**REMARKS AND NOTES**

**CZECH CHEMICAL SOCIETY SYMPOSIUM SERIES • ročník/volume 20 (2022), čís./no. 3 • 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 • VEDOUCÍ REDAKTOR / EDITOR-IN-CHIEF: V. Vyskočil • REDAKTOŘI / EDITORS: J. Barek, E. Benešová, P. Drašar, P. Holý, P. Chuchvalec, M. Jurášek, Z. Kolská, B. Kratochvíl, J. Masák, J. Podešva, P. Šmejkal • TECHNICKÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: R. Řápková • Redakce čísla (ISSUE EDITOR) P. Drašar • 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: TG TISK s.r.o., 5. května 1010, 563 01 Lanškroun • SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Copyright © 2022 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 29.5.2022.**