

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Hormonální poruchy kůry nadledvin
Michaela Šancová

Bakalářská práce
2020

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Hormonal disorders of adrenal cortex
Michaela Šancová

Bachelor thesis
2020

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Michaela Šancová**
Osobní číslo: **C17223**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Hormonální poruchy kůry nadledvin**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Vypracovat teoretickou rešerši týkající se hormonálních poruch kůry nadledvin.
2. V úvodu uvést charakteristiku hormonů kůry nadledvin, jejich rozdělení, syntézu, sekreci, transport.
3. V dalších kapitolách popsat jednotlivé skupiny kortikoidů, uvést zástupce a jejich úlohu v organismu. U každé skupiny uvést onemocnění související s poruchou produkce daných hormonů.
4. Popsat základní laboratorní vyšetření hormonů kůry nadledvin.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Šárka Štěpánková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **20. prosince 2019**
Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2020**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 14.7.2020

.....

Michaela Šancová

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Šárce Štěpánkové, Ph.D. za její ochotu, vstřícnost, trpělivost a odborné rady během tvorby mé bakalářské práce.

ANOTACE

Tato bakalářská práce popisuje hormonální poruchy kůry nadledvin. Na začátku je popsána struktura kůry nadledvin a princip produkce hormonů. V práci je uvedeno základní rozdělení hormonů, jejich působení a onemocnění, které s nimi souvisí. Dále se zaměřuje na diagnostiku a léčbu onemocnění. V závěru práce jsou popsána laboratorní vyšetření.

KLÍČOVÁ SLOVA

kůra nadledvin, glukokortikoidy, mineralokortikoidy, androgeny, diagnostika, léčba, stanovení

TITTLE

Hormonal disorders of adrenal cortex

ANNOTATION

This bachelor thesis describes hormonal disorders of adrenal cortex. At the beginning, it is described anatomy of adrenal cortex and principle of hormone production. The basic division of hormones, its action and its diseases related to them is presented. It also focuses on the diagnosis and treatment of the diseases. At the end of the thesis, the laboratory method are described.

KEY WORDS

Adrenal cortex, glucocorticoids, mineralocorticoids, androgens, diagnosis, treatment, detection

Seznam zkratek

11 β -HSD ₁	enzym katalyzující přeměnu kortizonu na kortizol
11 β -HSD ₂	enzym katalyzující přeměnu kortizolu na kortizon
ACA	autoprotilátky kůry nadledvin (adrenal cortex autoantibodies)
ACTH	adrenokortikotropní hormon
APS 1	autoimunitní polyendokrinní syndrom typu 1
ATP	adenosintrifosfát
ATPáza	adenosintrifosfatáza
AVP	argininový vasopresin
CAH	kongenitální adrenální hyperplazie
CBG	kortikosteron – vázající globulin (corticosterone-binding globulin)
CRH	kortikoliberin (corticotropin-releasing hormone)
CS	Cushingův syndrom
<i>CYP 11A</i>	gen cytochromu P450 rodiny 11A
<i>CYP 11B1</i>	gen cytochromu P450 rodiny 11B1
<i>CYP 11B2</i>	gen cytochromu P450 rodiny 11B2
<i>CYP 17</i>	gen cytochromu P450 rodiny 17
<i>CYP 21</i>	gen cytochromu P450 rodiny 21
DHEA	dehydroepiandrosteron
DHEA-S	dehydroepiandrosteron sulfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
GR	glukokortikoidové receptory
HDL	lipoprotein s vysokou hustotou (high-density lipoprotein)
LBD	ligand vázající doménu (ligand-binding domain)
LDL	lipoprotein s nízkou hustotou (low-density lipoprotein)
mRNA	mediátorová RNA

MR	mineralokortikoidový receptor
PA	primární aldosteronismus
PAI	primární adrenální nedostatečnost (primary aldosteronism insufficiency)
PCOS	syndrom polycystických ovarií (polycystic ovary syndrome)
RAS	renin–angiotensinový systém

Seznam obrázků

OBRÁZEK 1: STRUKTURNÍ VZOREC CHOLESTEROLU.....	15
OBRÁZEK 2: STRUKTURNÍ VZOREC PREGNENOLONU.....	15
OBRÁZEK 3: STRUKTURNÍ VZOREC PROGESTERONU.....	15
OBRÁZEK 4: STRUKTURNÍ VZOREC KORTIZOLU.....	17
OBRÁZEK 5: PŘEMĚNA FOREM GLUKOKORTIKOIDŮ	19
OBRÁZEK 6: STRUKTURNÍ VZOREC ALDOSTERONU	31
OBRÁZEK 7: STRUKTURA DHEA	40

Obsah

1	ÚVOD	13
2	CHARAKTERISTIKA HORMONŮ KŮRY NADLEDVIN	14
2.1	STAVBA KŮRY NADLEDVIN.....	14
2.2	SYNTÉZA HORMONŮ V KŮŘE NADLEDVIN	14
2.3	REGULACE TVORBY A SEKRECE	15
2.3.1	<i>Regulace tvorby a sekrece glukokortikoidů</i>	16
2.3.2	<i>Regulace tvorby a sekrece mineralokortikoidů</i>	16
2.3.3	<i>Regulace tvorby a sekrece androgenů</i>	16
3	GLUKOKORTIKOIDY	17
3.1	KORTIZOL	17
3.2	FUNKCE GLUKOKORTIKOIDŮ V LIDSKÉM TĚLE.....	18
3.2.1	<i>Mechanismus působení</i>	18
3.2.2	<i>Glukokortikoidové receptory</i>	19
3.2.3	<i>Účinky na organismus a jejich terapeutické využití</i>	21
3.3	ONEMOCNĚNÍ SOUVISEJÍCÍ S NEDOSTATKEM GLUKOKORTIKOIDŮ	23
3.3.1	<i>Addisonova choroba</i>	23
3.4	ONEMOCNĚNÍ SOUVISEJÍCÍ S NADBYTKEM GLUKOKORTIKOIDŮ	26
3.4.1	<i>Cushingův syndrom</i>	27
4	MINERALOKORTIKOIDY	31
4.1	ALDOSTERON	31
4.2	FUNKCE MINERALOKORTIKOIDŮ V LIDSKÉM TĚLE.....	32
4.2.1	<i>Mechanismus působení</i>	32
4.2.2	<i>Mineralokortikoidové receptory</i>	32
4.2.3	<i>Účinky na organismus a jejich terapeutické využití</i>	33
4.3	ONEMOCNĚNÍ SOUVISEJÍCÍ S NEDOSTATKEM MINERALOKORTIKOIDŮ	35
4.4	ONEMOCNĚNÍ SOUVISEJÍCÍ S NADBYTKEM MINERALOKORTIKOIDŮ	35
4.4.1	<i>Primární hyperaldosteronismus</i>	36
4.4.2	<i>Sekundární hyperaldosteronismus</i>	38
5	ANDROGENY	40
5.1	DEHYDROEPIANDROSTERON.....	40
5.2	FUNKCE ANDROGENŮ V LIDSKÉM TĚLE.....	41
5.2.1	<i>Receptory pro DHEA</i>	41
5.2.2	<i>Účinky na organismus a jejich terapeutické využití</i>	41
5.3	ONEMOCNĚNÍ SOUVISEJÍCÍ S NEDOSTATKEM ANDROGENŮ	43
5.4	ONEMOCNĚNÍ SOUVISEJÍCÍ S NADBYTKEM ANDROGENŮ	43
5.4.1	<i>Kongenitální adrenální hyperplazie</i>	44
5.4.2	<i>Syndrom polycystických ovaríí</i>	47
6	LABORATORNÍ STANOVENÍ	49
6.1	IMUNOANALYTICKÉ METODY	49
6.2	PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE S TANDEMOVOU HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ.....	49

6.3	KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE S TANDEMOVOU HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ.....	51
7	ZÁVĚR	53
	ZDROJE	54

1 Úvod

Hormony jsou v dnešní době téma, které je jak mezi veřejností, tak i mezi odborníky velmi diskutované. Hormony produkované kůrou nadledvin jsou pro normální fungování lidského organismu nezbytné, ovlivňují podstatné fyziologické pochody a nedostatek nebo naopak nadbytek může způsobit závažné zdravotní stavy. Co se týče androgenů, jejich působení v lidském těle je prostudováno jen zřídka. Farmakologické přípravky na bázi glukokortikoidů, mineralokortikoidů a androgenů se využívají pro terapii, lepší fyzické výkony, ale ani jeden exogenně podaný hormon se neobejde bez vedlejších účinků, které mohou mít pro organismus až fatální následky. Pro jejich podávání v rámci léčby se tak najde spousta stoupců, ale i odpůrců.

Nemoci související s adrenálními hormony se nevyskytují v populaci tak často, oproti jiným onemocněním. Velkou roli hrají genetické predispozice a imunitní systém. Vzhledem k tomu, že se hormony z kůry produkují pod vlivem stimulace jiných systémů, nemusí být vždy příčina výkyvu fyziologických hodnot v nadledvinách. Onemocnění související s těmito hormony, vzhledem k jejich funkci, postihuje několik tkání, takže se tyto nemoci projevují právě přes tyto tkáně. Léčba není zcela jednoznačná a pacienti musí být neustále pod lékařským dohledem.

2 Charakteristika hormonů kůry nadledvin

V kůře nadledvin se tvoří hormony steroidní povahy, rozdělujeme je do třech základních skupin, a těmi jsou mineralokortikoidy, glukokortikoidy a androgeny. Hromadně je nazýváme kortikosteroidy. Poslední zmíněné androgeny se oproti prvním dvěma skupinám tvoří v kůře nadledvin ve velmi malé míře. [1] Vznikají postupnou přeměnou cholesterolu. Liší se v principu sekrece, společný ale pro všechny tři skupiny je transport krví pomocí vazby na bílkovinu. [2]

2.1 Stavba kůry nadledvin

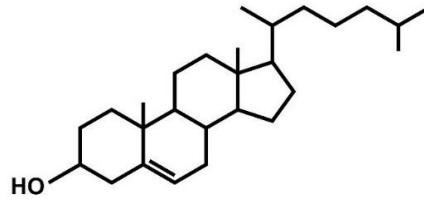
Nadledvina (lat. *glandula suprarenalis*) je endokrinní žláza skládající se z kůry a dřeně. Levá a pravá nadledvina se od sebe liší tvarem, nasedají na horní část ledvin. Kůra nadledviny tvoří přes 70 % žlázy a skládá se především z epitelových buněk. Výživu orgánu zajišťují kapiláry a sinusoidy. Histologicky rozlišujeme v kůře tři vrstvy, každá má svou vlastní funkci. [1]

První vrstvou je *zona glomerulosa*, kterou najdeme jako tenkou vrstvu na povrchu kůry. Hlavní funkcí této vrstvy je produkce mineralokortikoidů, především aldosteronu. Prostřední vrstvou je *zona fasciculata* zabírající největší část kůry. Zodpovídá za produkci glukokortikoidů. Mezi hlavní hormony této skupiny patří kortizol. Poslední vrstvou je *zona reticularis*, která produkuje androgeny, jako je např. dehydroepiandrosteron a také jeho sulfátový produkt. V menší míře se v této části produkuje také testosteron nebo androstendion. [3]

2.2 Syntéza hormonů v kůře nadledvin

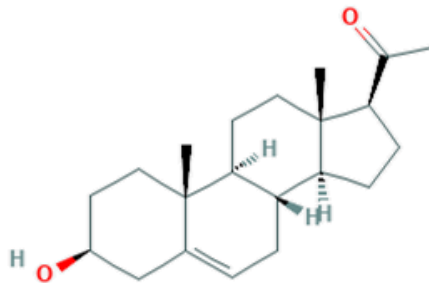
Výchozí látkou pro tvorbu steroidních hormonů je cholesterol. Tvorba steroidních hormonů probíhá na hladkém endoplazmatickém retikulu v kůře nadledvin, také ve vaječnících a varlatech. [4]

Cholesterol (obr. 1) je pro syntézu v kůře nadledvin vychytáván z cirkulující krve ve formě LDL cholesterolu („low density“ lipoprotein), využívají se i tukové kapénky v cytoplazmě. Cholesterol se tvoří ve všech tkáních s jadernými buňkami, tím pádem i v kůře nadledvin, a tak se pro tvorbu hormonů využívá i *de novo* syntetizovaný cholesterol. [4]



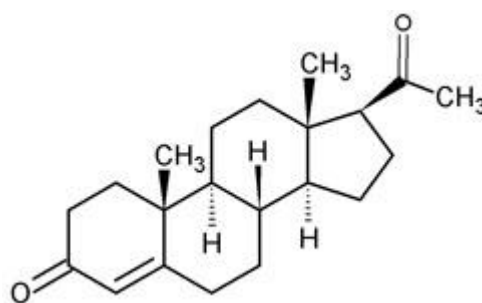
Obrázek 1: Strukturální vzorec cholesterolu [5]

Na začátku tvorby hormonů dochází k omezení rychlosti reakce enzymem desmolázou. Najdeme ji pouze ve tkáních, kde se tvoří steroidní hormony. Katalyzuje zařazení karbonylových skupin do cholesterolu a zároveň štěpí postranní řetězec mezi 20. a 22. uhlíkem. Vznikne základní molekula pro steroidní hormony pregnenolon (obr. 2). [4]



Obrázek 2: Strukturální vzorec pregnenolonu [6]

Pregnenolon je alkohol, zpravidla se přeměňuje na progesteron (keton) (obr. 3). Ten je v jednotlivých vrstvách kůry nadledvin přeměňován na daný kortikosteroid. V *zona reticularis* se tvoří i malé množství estradiolu a testosteronu. [4]



Obrázek 3: Strukturální vzorec progesteronu [7]

2.3 Regulace tvorby a sekrece

Kortikosteroidy se liší v principu jejich regulace. Zatímco glukokortikoidy jsou spolu s androgeny závislé na správné funkci hypothalamu a hypofýzy, mineralokortikoidy, především hlavní zástupce této skupiny aldosteron, spadá do renin-angiotensinového systému (RAS). [8]

2.3.1 Regulace tvorby a sekrece glukokortikoidů

Tvorba glukokortikoidů a jejich sekrece je řízena systémem negativní zpětné vazby. Klíčovou roli pro tvorbu a sekreci této skupiny hormonů hraje hypothalamus. Ten reaguje na změny související s glukokortikoidy (náročná stresová situace, hypoglykémie atd.) tak, že zvýší tvorbu kortikotropin uvolňujícího hormonu (CRH) a argininového vasopresinu (AVP). Hlavní funkcí těchto hormonů je stimulace předního laloku hypofýzy, adenohypofýzy, která jako odpověď začne produkovat adrenokortikotropní hormon (ACTH). Adrenokortikotropin se naváže na receptor a krevním oběhem se dostává do nadledvin, kde působí na reakci, při které dochází k přeměně cholesterolu na pregnenolon, který se v *zona fasciculata* přemění na glukokortikoid, konkrétně kortizol. Adrenokortikotropní hormon neovlivňuje pouze přeměnu cholesterolu až na samotný kortizol, ale také uvolnění vzniklého hormonu z kůry nadledvin. Jedná o systém zpětné vazby, tudíž pokud v případě nedostatku glukokortikoidů v krevním oběhu dochází ke stimulaci jejich tvorby, v případě jejich zvýšené koncentrace dojde k útlumu tvorby CRH, což povede k útlumu produkce ACTH a glukokortikoidů v nadledvinách. [4]

2.3.2 Regulace tvorby a sekrece mineralokortikoidů

Na tvorbě a sekreci mineralokortikoidů se v minimální míře podílí také adrenokortikotropin. Hlavním stimulantem pro tuto skupinu hormonů, konkrétně pro aldosteron, je renin–angiotensinový systém. Jako důsledek poklesu krevního tlaku je z ledvin uvolňován enzym renin, který se podílí na vzniku angiotensinu II. Nejprve dojde k rozštěpení angiotensinogenu na angiotensin I, poté následuje proteolytická reakce na konečný produkt, pro aldosteron potřebný, angiotensin II. Jeho hlavní funkcí je katalýza přeměny kortikosteronu na aldosteron a regulace sekrece mineralokortikoidů. Z tohoto vyplývá, že sekrece aldosteronu se zvyšuje v případě poklesu krevního tlaku, ale také při potřebě ledvin zadržet vodu a sodné kationty. [4]

2.3.3 Regulace tvorby a sekrece androgenů

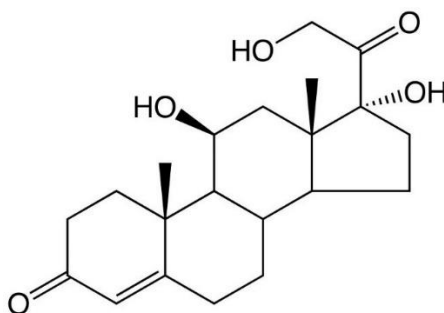
V rámci kůry nadledvin dochází k minimální tvorbě androgenů. Mechanismus je ale stejný, jako v případě glukokortikoidů. Dochází k regulaci nadledvin pomocí ACTH a k vylučování androgenů. [9]

3 Glukokortikoidy

Tato skupina patří mezi nejvíce produkované hormony kůrou nadledvin. V lidském těle ovlivňují několik funkcí a procesů, tím pádem jsou pro lidský život nepostradatelné. Ovlivňují metabolické procesy, cévní soustavu ale také se zásadně podílí na lidské imunitě. Jejich účinek na tělo se dá hodnotit, jako kladný a prospěšný tělu, a proto jsou glukokortikoidy v dnešní době zneužívány jako doping. Jak již bylo zmíněno, nejvíce se glukokortikoidy tvoří v kůře nadledvin, bylo však zjištěno, že tvorba probíhá i mimo kůru nadledvin, a to například v brzlíku, v mozku či v cévách. Tvorba a sekrece ale v jiných tkáních probíhá v naprosto minimálním množství. [10] Jedná se o sloučeniny s jednadeceti uhlíky ve struktuře. Jsou to látky steroidní povahy vznikající z cholesterolu.

3.1 Kortizol

Nejznámějším zástupcem této skupiny je hormon kortizol (obr. 4) neboli 11 β ,17 α ,21-trihydroxypregn-4-en-3,20-dion. V *zona fasciculata* dochází k postupným reakcím vedoucím ke vzniku kortizolu. Nejdříve působí cytochrom P450 17 (*CYP 17*) neboli 17 α -hydroxyláza na pregnenolon. Stejně působí enzym i na progesteron. Přeměňuje je na 17 α -hydroxypregnenolon a 17 α -hydroxyprogesteron. Hydroxy forma progesteronu může vzniknout také přeměnou hydroxypregnenolonu, a to pomocí 3 β -hydroxysteroidní dehydrogenázy. Na tuto látku působí cytochrom P450 21 (*CYP 21*), který přeměňuje hydroxyprogesteron na 11-deoxykortizol. Tento cytochrom také označujeme jako 21-hydroxyláza. Posledním krokem pro vznik kortizolu je působení cytochromu P 450 11B1 (*CYP 11B1*), neboli 11 β -hydroxylázy. Tato reakce je posledním krokem pro vznik kortizolu v kůře nadledvin. [8]



Obrázek 4: Strukturální vzorec kortizolu [11]

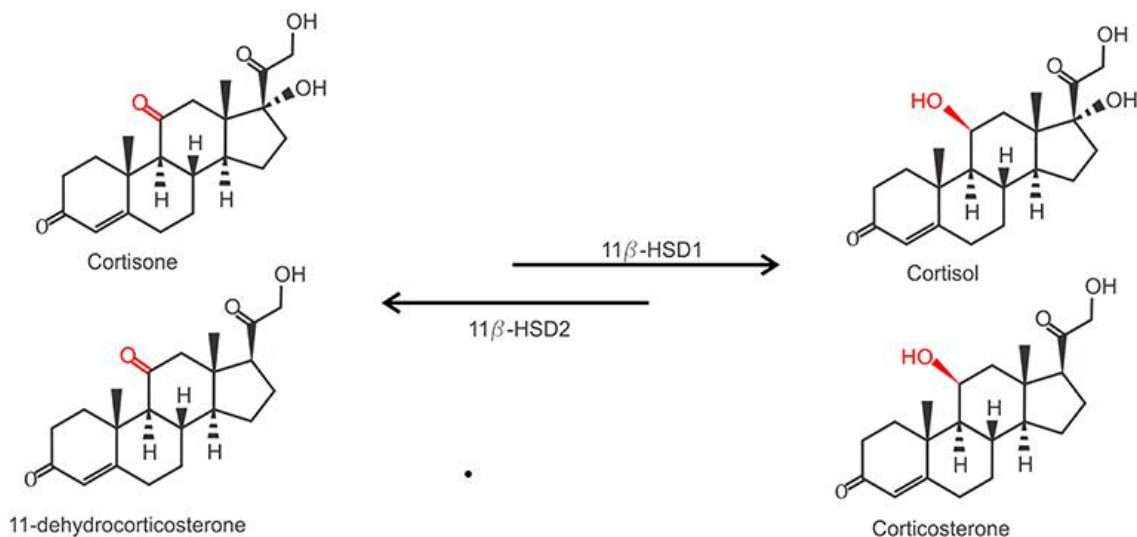
Tento hormon má v těle spoustu funkcí, je nedílnou součástí několika fyziologických pochodů v těle. Využití má několik, nejčastěji se setkáme s pojmenováním stresový hormon. Jeho sekrece je ovlivňována hypothalamo-hypofyzárním systémem (viz 2.3.1.). V krvi je transportován v různých formách. Velmi malé množství z celkového kortizolu se v krvi vyskytuje ve volné formě. Vazba na transportní proteiny je ale pro kortizol primární. Hlavní protein pro přenos kortizolu se nazývá transkortin–globulin vázající kortikosteroidy (CBG). Je tak nejen primárním přenašečem kortizolu, ale i ostatních kortikoidů. Jako další transportní protein slouží albumin. Kortizol je degradován v játrech, a nakonec vyloučen močí. [12]

Nadměrná tvorba kortizolu nebo jeho nadměrná aplikace do těla (především u sportovců) může vést k onemocnění, tzv. Cushingův syndrom. Naopak, nedostatek kortizolu a celé této skupiny hormonů může vést až k fatálním následkům. Snížená tvorba kortizolu je znakem pro Addisonovu chorobu. [12]

3.2 Funkce glukokortikoidů v lidském těle

3.2.1 Mechanismus působení

Lipofilní povaha glukokortikoidů zajišťuje volný transport přes membránu. V cytoplazmě buněk ale dochází k regulaci množství glukokortikoidů. A to tak, že buňka udržuje rovnováhu mezi aktivní formou hormonu a neaktivní formou hormonu. Buňka má v sobě dva enzymy, které jsou zodpovědné za přeměnu neaktivní formy na aktivní a naopak. V případě kortizolu se jedná o enzymy 11 β -hydroxysteroidní dehydrogenáza 1 (11 β -HSD₁) a 11 β -hydroxysteroidní dehydrogenáza 2 (11 β -HSD₂). Enzym 11 β -HSD₁ přeměňuje neaktivní formu hormonu, kortizon, na aktivní formu, kortizol. Druhý enzym působí protichůdně, čili inaktivuje kortizol na kortizon (obr. 5). Tyto enzymy nalezneme převážně v játrech. Klíčová je pro působení glukokortikoidů přítomnost glukokortikoidových receptorů. Jak receptory, tak i samotné glukokortikoidy mohou působit genomovými cestami nebo nengenomovými. [10]



Obrázek 5: Přeměna forem glukokortikoidů [10]

3.2.2 Glukokortikoidové receptory

Jedná se o cytoplazmatický receptor, pro tuto skupinu hormonů se nazývá glukokortikoidový receptor (GR). Bylo prokázáno, že kortizol vykazuje určitou afinitu i k receptoru pro mineralokortikoidy (MR). Tyto receptory jsou ale chráněny enzymem $11\beta\text{-HSD}_2$, dochází tak ke vzniku neaktivní formy hormonu. Bohužel během Cushingova syndromu je schopnost přeměny hormonu na neaktivní formu znemožněna a kortizol se tak váže na MR ve zvýšené míře. [12]

Jedná se o steroidní cytoplazmatické (= intracelulární) receptory, řadíme je do skupiny jaderných receptorů, stejně jako receptory pro progesteron, androgen, estrogen a další. Jelikož patří do skupiny jaderných receptorů, působí na geny. To znamená, že působí tzv. genomovými cestami. Tato varianta slouží hlavně pro dlouhodobější působení. Konkrétně působí jako transkripční faktory. Chemicky řadíme tyto receptory mezi proteiny. Můžeme je najít v různých tkání v celém těle. Právě i glukokortikoidy působí na řadu tkání a buněk, jejich působení, ale musí být pro určitou tkáň specifické. I na specifičnosti působení glukokortikoidů se podílí GR a to tím, že mají své vlastní izoformy. Všechny steroidní receptory mají 3 hlavní domény, N-terminální doménu, DNA-vázající a ligand vázající doménu. DNA-vázající doména a ligand vázající doména jsou odděleny pantovou oblastí. [10, 13]

Pokud se uvnitř buňky nenachází aktivní forma glukokortikoidu, GR se v cytoplazmě vyskytuje jako monomer lokalizovaný v multiproteinovém komplexu. Tento komplex můžeme také nazvat jako chaperonový komplex, který

je důležitý především pro vazbu ligandu a aktivaci GR. Poté co dojde k translaci receptoru, vytvoří se komplex Hsp70-Hsp40-GR. Hsp70 je jeden z hlavních a nejvíce se vyskytujících chaperonových komplexů, Hsp40 je spíše „můstek“ mezi receptorem a chaperonem Hsp70. Toto ale není konečné umístění GR. Dále je přenesen do chaperonu Hsp90. Postupně dochází k maturačním úpravám. Tyto úpravy vedou především ke zvýšení afinity komplexu GR-chaperon vůči ligandu, jehož navázání je nezbytně nutné pro správnou funkci a sled reakcí. [10]

Poté, co se glukokortikoidy dostanou do intracelulárního prostoru buňky, dojde k navázání glukokortikoidu na GR, ten se uvolní z multiproteinového komplexu. Tímto začíná proces, během kterého dochází ke změně v komplexu GR-chaperon. Dojde k translokaci receptoru do jádra přes jaderné póry, kde dochází buď ke transkripční aktivaci, nebo naopak k transkripčnímu potlačení genu. Působení na geny může GR vykonávat v podobě monomeru, kdy je vázán na určité transkripční faktory, nebo ve formě dimeru. V tomto případě na sebe váže takové látky, které jsou citlivé na působení glukokortikoidů. Komplex se může z jádra vrátit opět zpět do cytoplazmy, jakmile se ocitne v prostoru mimo jádro, není schopen transkripce. [10]

Důležitou funkcí receptoru je především jeho specifita. To je zajištěno nejen výskytem izoform (α , β) receptoru, ale také určitými signály, které korigují funkci GR. První skupinu tvoří alosterické signály vydávané DNA. Stačí jedna jediná odlišná sekvence mezi prvky, které reagují na glukokortikoidy, dojde k ovlivnění funkce receptoru a také jeho konformace. Druhý signál ovlivňuje transkripci GR. Nejspíše k tomu dochází vlivem ligandu, který se váže na ligand vázající doménu (LBD). Podle ligandu navázaného na doménu dojde k úpravě konformace LBD, dojde k přitáhnutí dalších kofaktorů, a to má za následek změny transkripce GR. Další vliv na funkci receptoru mají posttranslační úpravy, které ovlivní místo výskytu receptoru, vazbu ligandu aj. Na závěr je GR ovlivňován svými vazbami na faktory a kofaktory a spolu s ním jsou zapojeny do stejných funkcí. [9, 13]

Receptory pro glukokortikoidy mohou ale působit i krátkodobě. Během krátkého, a především rychlého působení není třeba transkripce a působení na geny. Tomuto způsobu působení říkáme negenomové. Bohužel tato cesta není ještě zcela objasněna. Jasně je, že dochází ke sledu reakcí, které zasahují do funkcí kináz (například fosfatidylinositol-3-kináza). Běžné GR jsou uloženy

intracelulárně. Ukázalo se, že glukokortikoidy dokážou působit i na membránový GR, jehož funkce je ale spjatá s běžným cytoplazmatickým GR. Objevil se ale i další receptor, na který tyto steroidní hormony působí. Ten ale není v žádném směru glukokortikoidovým receptorům podobný. Může také docházet ke změně signálů z kaskády proteinů, které mají za úkol přenést signál z receptoru nacházejícího se na povrchu buňky k DNA. Třetím a zároveň posledním typem nengenomového působení GR je vliv na funkci mitochondrií. Tato izoforma receptoru je schopna ovlivnit transkripci genu a také metabolismus v mitochondriích. [10, 13]

3.2.3 Účinky na organismus a jejich terapeutické využití

Glukokortikoidy se účastní v těle několika fyziologických procesů, reagují na patologické podněty. V rámci imunitního systému potlačují T-lymfocyty a eosinofilní granulocyty. Naopak podporují syntézu neutrofilních granulocytů a dokážou inhibovat produkci cytokinů. Tímto způsobem dokážou zabránit zánětu. Podílí se na udržení acidobazické rovnováhy v těle, velkou roli hrají v metabolismu glukózy. Podporují glukoneogenezi, působí tak jako antagonisté inzulínu. Co se týká tukových tkání, glukokortikoidy způsobují lipolýzu, dochází ke zvýšení volných mastných kyselin v krvi, zároveň ke zvýšení celkového cholesterolu, triacylglycerolů, naopak HDL cholesterol („high density“ cholesterol) je snížen. Naopak na proteiny, konkrétně na jejich syntézu, působí tlumivým účinkem, což v případě svalů může vést až k atrofii. Nejen růstový hormon má vliv na růst člověka, velký podíl nesou také glukokortikoidy. To znamená, že mají značný vliv i na růst kostí. Mezi jejich další účinky řadíme působení na kůži, nervovou soustavu, dýchací soustavu a další tkáně či orgány. Kortizol vykazuje také aktivitu jako mineralokortikoidy. Je schopen působit v distálním tubulu stejně jako aldosteron. Tato činnost ale probíhá v minimální míře oproti aldosteronu. [8, 15]

Terapeuticky se glukokortikoidy používají především v případě zánětlivých reakcí, astmatu, roztroušené sklerózy, revmatoidní artritidy a kožních onemocnění. Také u malých dětí v přiměřených dávkách na podporu růstu. I přesto, že je to v dnešní době velice rozšířená varianta léčby, nese velké riziko. Musí se podávat v mírných dávkách a nejlépe co nejkratší dobu. Pokud dojde k opakovanému podávání velkých dávek, může dojít k nežádoucím účinkům

léčby. Jedním z hlavních vedlejších účinků glukokortikoidů jsou prudká hypertenze, osteoporóza, nedostatečnost nadledvin, hyperglykémie, která lehce přechází na diabetes mellitus. Pacient trpí přerušovaným spánkem, poruchami nálad, může se vyskytnout šedý zákal. V rámci krevního obrazu dochází k poklesu lymfocytů, lymfocytopenii. Využíváme je pro léčbu lokální (pouze jedné tkáně či orgánu) nebo systémové, ta je právě rozšířená u dětí při léčbě růstu. [10]

Glukokortikoidy můžeme užívat ve formě krémů, tablet, injekcí, očních kapek a inhalačních sprejů. Téma těchto hormonů a celkově steroidů je velmi probíráno v odvětví sportu. Tyto látky v přiměřeném množství dokážou sportovci „pomoci“ a to tím, že zvýší potenciální výkon. Bohužel sportovci toho využívají, glukokortikoidy přijímají ve vyšších dávkách, než je tělu prospěšné, postupně se z výkonného sportovce stává nemocný člověk. Jak již bylo zmíněno, vysoké a časté dávky hormonů mohou tělu uškodit. Pokud tedy sportovec přijímá glukokortikoidy často, je pro něj toto chování velmi riskantní. Pro sportovce je zakázáno přijímat v době soutěží glukokortikoidy systémově (to znamená intramuskulární, intravenózní, orální a jim podobná podání). Naopak, lokální podání (per artikulární) je povoleno, protože působí jen na danou tkáň a nestimuluje tělo k lepšímu výkonu, ale spíše slouží k potlačení bolesti v daném místě. Sportovcům jsou také doporučovány pro lepší výkonnost nápoje s obsahem glukokortikoidů a dalších podporujících látek. Někteří sportovci, především z atletického okruhu, uvádí, že po podání glukokortikoidů je přepadl pocit štěstí a radosti. Dochází i k takovým pokusům jako je kombinace glukokortikoidů, diety a lehčího tréninku, aby došlo ke zhubnutí sportovce ale zároveň k zachování svalstva. Problémy související s podáváním steroidů bohužel ale mohou být přisuzovány únavě z trénování nebo třeba pórazovým následkům. Pokud sportovec nepřizná užívání glukokortikoidů, lékař může hledat jinou příčinu potíží. Pro sportovce jsou dána přísná pravidla užívání glukokortikoidů, je to velice obtížné, protože snad na každé onemocnění předepíše lékař glukokortikoidy, zvláště na onemocnění, kterými trpí hlavně sportovci. Vyšetření glukokortikoidů se provádí z moči. [16]

Mezi uměle vyrobené glukokortikoidy patří hydrokortizon, prednison, methylprednisolon a dexamethason. Chemicky jsou velmi podobné glukokortikoidům produkovaným v těle. Jejich účinek samozřejmě závisí na

rozpuštěnosti léku, na rychlosti absorpce do tkání, na metabolismu jedince a také na schopnosti navázat se na receptor. [15, 17]

3.3 Onemocnění související s nedostatkem glukokortikoidů

Co se týče nedostatečnosti kůry nadledvin, může být způsobena špatným vývojem nebo hypotrofií. Tyto vady se projeví v rámci klinického obrazu na hormonech kůry nadledvin. Rozlišujeme dva typy hypofunkce kůry nadledvin – primární a sekundární. Primární hypofunkce se týká právě samotné kůry nadledvin, dochází zde k nedostatečné tvorbě hormonů. Většinou se jedná o genově vázaná onemocnění. Buď je přímo porušena tvorba, nebo existují také situace, kdy je kůra rezistentní vůči stimulaci ACTH. Primární onemocnění nazýváme jako Addisonovu chorobu. K sekundárnímu hypoadrenokorticismu dochází vlivem poruchy hypofýzy nebo hypothalamu. Netvoří se dostatek ACTH a kůra nadledvin nemá tak dostatek stimulace k tvorbě svých hormonů. Typickými příznaky nadledvinové nedostatečnosti jsou svalové křeče, trvalý pokles glykémie, hubnutí, které může dojít až k anorexii, neustávající únava, vypadávání vlasů a zásadní roli mají i kardiovaskulární problémy. [8, 18]

3.3.1 Addisonova choroba

Jedná se o autoimunitní chorobu, konkrétně je příčinou primární nadledvinové insuficience (PAI). V populaci připadá 1 člověk s Addisonovou chorobou na přibližně 6 000 lidí. Svým charakterem ji zařazujeme mezi složky autoimunitního polyendokrinního syndromu typu 1 a 2. Choroba vyžaduje celoživotní substituční terapii. Neustálé podávání syntetických glukokortikoidů se ale neobejde bez vedlejších účinků, které při dlouhodobém požívání uměle vyrobených hormonů přicházejí. U žen se díky této nemoci setkáváme s nižší plodností, předčasnými porody a potraty. [19]

Genetické vlivy byly pozorovány především u autoimunitního polyendokrinního syndromu typu 1 (APS1). Rozlišujeme celkem čtyři typy tohoto syndromu, rozdíly jsou především v cílových skupinách pacientů, dědičnosti a v zasažených žlázách. Do syndromu typu 1 zařazujeme Addisonovu chorobu, chronickou hypoparathyreózu a chronickou mukokutánní kandidózu. Způsobuje ho mutace v autoimunitním regulačním genu, který se nachází na krátkém raménku chromozomu 21. Diagnostika probíhá nepřímou, pomocí protilátek proti INF- α

(interferon alfa) a INF- ω (interferon omega). Další možností, jak stanovit APS1 je detekce mutace v genu. Řadíme ho do skupiny autosomálně recesivních onemocnění. [20]

Jak se ukázalo, velkou roli v dědičnosti hrají buňky hlavního histokompatibilního komplexu a také buňky HLA (= human leucocyte antigen) systému. Jedny z nejdůležitějších genů mimo histokompatibilní komplex jsou ty, které regulují funkci T-lymfocytů. [21]

Projevy této nemoci se zpočátku mohou objevovat jen ve stresových situacích, u některých jedinců je nástup nemoci velmi pomalý a někdy dojde k diagnostice onemocnění pozdě. Glukokortikoidy jsou v krevním oběhu v minimálním množství. Hypotalamo-hypofyzární systém reaguje zvýšenou produkcí ACTH a propiomelanokortinu. Následkem této zvýšené produkce se projevuje jeden z nejzákladnějších symptomů Addisonovy choroby, melanodermie. Jedná se o hyperpigmentaci kůže, která se nejvíce objevuje v oblastech nejvíce vystavovaných světlu (obličej, krk, ruce), v částech těla již hyperpigmentovaných fyziologicky (perigenitální oblasti) a také v místech častého tření. U člověka se ve zvýšené míře objevují jizvy, postupem času tmavnou. Existují i výjimky, u kterých se hyperpigmentace neprojevila. Další projevy jsou velmi nespecifické, ale pokud se projeví ve velké míře, slouží také jako ukazatelé. Zařazuje se mezi ně úbytek na váze (až anorexie), u dětí zpomalený růst, bolesti hlavy a břicha, časté nevolnosti, hypotenze, silná astenie, bolest svalů. Pokud nedojde k časnému záchytu onemocnění, může nemocný upadnout do kómatu. Nemocný bojuje s psychickými problémy, častými bolestmi hlavy a depresemi. Vzhledem k tomu, že se tato choroba objevuje i v rámci APS1 s jinými onemocněními, jsou pozorovány i příznaky související s funkční poruchou štítné žlázy. [19, 22]

Laboratorní obraz nasvědčuje elektrolytickému rozvratu v těle. Hodnoty sodného kationtu jsou sniženy. Naopak hodnoty vápníku, iontů chlóru a vodíku jsou zvýšeny. Následkem tohoto rozvratu bývá dehydratace. U dětí je často pozorována hypoglykémie. V rámci laboratorní detekce se objevují nízké hladiny kortizolu v séru, naopak hladiny ACTH jsou prudce zvýšeny. Aldosteron se objevuje také v nižší koncentraci, naopak renin, ten se opět vyskytuje ve vyšší koncentraci. Obecně se dá říct, že hormon z poškozené žlázy bude na minimálních hodnotách, stimulační hormony pocházející převážně z hypofýzy

budou ve zvýšené míře, protože reagují na malé množství adrenokortikotropních hormonů v krevním oběhu. V rámci histologie se může prokázat infiltrace kůry lymfocyty a atrofie parenchymu. Postupem času se třívrstvá kůra začne rozpadat. I to souvisí s projevy onemocnění, dokud není poškozena drtivá většina buněk, onemocnění může být bez projevů. [23]

Pro diagnostiku Addisonovy choroby nestačí pouze stanovení kortizolu. Pro určení stupně adrenální poruchy, ale i pro potvrzení diagnózy se používá ACTH stimulační test. Intravenózně nebo intramuskulárně se podává peptid ACTH 1-24 - tetrakosaktid, kterým se stimuluje kůra nadledvin. Množství podaného peptidu může být buď 250, µg nebo při upravené variantě testu se podává pouze 1 µg. Hladina kortizolu v krvi se měří hned na počátku testování, poté 30 a 60 minut po stimulaci. Každá laboratoř si stanovuje referenční hodnoty podle svých postupů a užívaných látek. Obecně se uvádí, že pokud nejvyšší koncentrace nepřesahuje 500 nmol/l, je vše v pořádku. Do třetice se provádí průkaz adrenálních autoprotilátek (ACA). V tomto případě se detekují protilátky proti enzymu 21α-hydroxyláza, jedná se o protilátky třídy IgG (imunoglobuliny typu G). Jelikož tyto protilátky nemají velkou patogenní roli, jejich stanovení je velmi citlivé a specifické. Pokud se objeví, jsou jasným ukazatelem probíhajícího autoimunitního onemocnění nadledviny. Stanovit můžeme i protilátky proti 17α-hydroxyláze, nebo proti cytochromům P450. Označují se jako markery specifické spíše pro APS1 nebo pro onemocnění vaječnicků u žen. Mezi nedostatečností ledvin a nedostatečností ovarií je velmi úzká souvislost. Protilátky proti 21α-hydroxyláze se vyskytují a jsou specifické i pro nedostatečnost vaječnicků. U menšího procenta pacientů byly detekovány protilátky sloužící jako hlavní marker pro poškození štítné žlázy v rámci APS1. Pokud hodnoty protilátek jsou nízké až nulové, je podstatné provést zobrazovací vyšetření nadledvinek, aby se vyloučila infiltrace tkáně (například nádorem). Úzkou vazbu má Addisonova choroba i s tuberkulózou, amyloidózou, nebo s Waterhouseovým-Friderischenovým syndromem. [19, 23]

Pro tzv. preklinické stadium Addisonovy choroby, kdy se pozorují pouze změny v rámci krevního obrazu (výskyt protilátek, nízká hodnota kortizolu aj.) nejsou žádné léky, které by mohly chorobu oddálit, pacient dochází pouze na krevní odběry, je přísně sledován, aby nedošlo pozdě k nasazení léčby. Léčba začíná

zpravidla v případě s vysokým množstvím ACTH v krvi a s minimální odpovědí kortizolu na stimulační test. Hladiny protilátek se zvyšují podle míry nefunkčnosti kůry nadledvin. [19]

Člověk s Addisonovou chorobou je závislý na celoživotní substituční léčbě. Některé studie ale ukazují, že po dlouhodobém podávání některých léků (cosyntropin, rituximab) dochází k znovuobnovení funkce nadledvin. Pacientům se podává hydrokortizon v denních dávkách přibližně 15–20 mg. Některé studie se přiklánějí k volbě podávání hydrokortizonu s tzv. řízeným uvolňováním, který se podává pouze jedenkrát denně. Pro maximální napodobení fyziologického cyklu kortizolu v těle se doporučuje podávat denně dvě až tři dávky hydrokortizonu, aby denní dávka dosáhla hodnoty 50 mg, a to by mělo být pro tělo dostačující. Větší část denní dávky by měl pacient užívat hned po probuzení. Další dávky se užívají s odstupem šesti hodin a v menších dávkách, poslední dávka by měla být podána nejdéle šest hodin před spaním. Protože Addisonova nemoc poškozuje kůru jako celek, je třeba podávat v rámci léčby i mineralokortikoidy, konkrétně fludrokortizon, denní dávka je ale podstatně menší oproti glukokortikoidům. U minimálního počtu pacientů (žen) se předepisuje v rámci léčby podávání dehydroepiandrosteronu. Hydrokortizon se prokazuje zatím jako nejlepší možnou volbou pro terapii. Substituční terapie pacientovi ale nenahradí endogenní hormony na sto procent. Téměř vždy budou hodnoty ACTH vyšší, než je fyziologická mez, naopak kortizol bude nižší. Pacient musí být neustále hlídán a musí se dávat pozor na vedlejší účinky vyvolané syntetickými glukokortikoidy. Nemocný musí být poučen o úpravě dávek v případě běžných onemocnění (chřipka, střevní potíže atd.) a stresových situacích. V případě krizových situací je třeba okamžitá hospitalizace. Denní dávky se určují podle klinických parametrů, jako je váha pacienta, krevní tlak atd. [19, 24]

3.4 Onemocnění související s nadbytkem glukokortikoidů

Hyperadrenokorticismus neboli nadměrná funkce kůry nadledvin, nazýváme také jako Cushingův syndrom (CS). Onemocnění může být pouze v rámci kůry, kdy kůra sama produkuje nadbytek kortizolu do krevního oběhu. Druhou možností je vliv předního laloku hypofýzy, ve které se nadměrně produkuje ACTH, tudíž stimuluje i nadledviny více než je běžné. Opět můžeme použít rozdělení na primární a sekundární onemocnění. Při dlouhodobé terapii glukokortikoidy si

může člověk vyvolat tzv. iatrogenní Cushingův syndrom. Při dlouhotrvající a nadměrné produkci alkoholu dochází k „pseudo-Cushingovu“ syndromu. Při tomto onemocnění se tvoří a uvolňuje kortizol v daleko vyšší míře, než je fyziologicky běžné. [8]

3.4.1 Cushingův syndrom

Tento syndrom je vzácné onemocnění vznikající v důsledku dlouhodobého výskytu vyšší hladiny kortizolu v těle. Ve většině případů došlo ke vzniku syndromu při dlouhodobém podávání glukokortikoidů při léčbě astmatu, revmatoidních a jiných onemocnění. Cushingův syndrom vzniklý výhradně v kůře nadledvin bez exogenního přičinění je velice vzácný a ročně se tato forma onemocnění vyskytuje velmi málo (2–3 nemocní/1 000 000 obyvatel). [25]

V rámci endogenní formy CS převládá sekundární forma onemocnění, to znamená, že je porušena hypofýza, která v nadbytku tvoří ACTH (tzv. ACTH-dependentní forma). Poškozená bývá nejčastěji nádorem, adenomem, takovou formu nazýváme jako Cushingova choroba nebo Cushingova nemoc. Tato nemoc postihuje nejvíce ženy. K tvorbě ACTH dochází mimo hypofýzu, nejčastěji štítnou žlázou, slinivkou a neuroendokrinními nádory plic. V daleko menší míře se vyskytuje primární forma onemocnění, kdy je postižena přímo kůra nadledvin a dochází k hyperprodukci kortizolu (ACTH-nondependentní forma), nejčastěji vlivem nádoru kůry nadledvin, primární bilaterální makronodulární adrenální hyperplazie nebo pigmentovaným uzlinovým adrenokortikálním onemocněním. Mezi vyvolávající onemocnění patří i nepigmentovaná forma posledního zmíněného onemocnění. V dětském věku se onemocnění vyskytuje opravdu jen velmi zřídka, a když už se vyskytne, bývá většinou součástí McCuneova-Albrightova syndromu. [25]

Cushingův syndrom se klinicky na pacientovi projevuje rozmanitě, klinické příznaky stěžují správnou diagnózu a mohou ji oddálit o několik týdnů. Postižení lidé CS mají častý výskyt modřin, na břiše se jim vyskytují strie, na nohou i rukách může docházet k proximální atrofii, u žen dochází k poruchám menstruačního cyklu. Dále trpí nadváhou, většina tuku se hromadí v oblasti břicha. U dětí se tento příznak projevuje jen nepatrně, byl u nich zpozorován zpomalený růst a opožděný nástup puberty. Pacient je unavený, podrážděný a u žen se vyskytuje

růst chloupků v místech typických spíše pro muže, tzv. hirsutismus. Rizikovou skupinou pacientů pro tuto chorobu jsou ti, kteří trpí silným diabetem, hypertenzí, osteoporózou a jejich celkový vzhled neodpovídá jejich věku. Jako snad u všech onemocnění, ne vždycky se tyto příznaky projeví. V menší míře se tyto znaky objevují u sekundárního CS, konkrétně při ektopické tvorbě ACTH. V tomto případě se nedá říci, že by hladina volného kortizolu nějakým způsobem odpovídala věku, celkovému stavu pacienta nebo rodinné anamnéze. Vyskytuje se i subklinická forma tohoto syndromu, hormony jsou zvýšeny jen nepatrně, ale mohou způsobit závažné problémy, jako třeba metabolické poruchy, poruchy cévního systému a vyšší lámavost kostí. [25]

V rámci laboratorního screeningu se provádí tři základní vyšetření. Jejich citlivost je dostatečná pro potvrzení nebo vyloučení diagnózy. Prvním z nich je stanovení volného kortizolu v moči, kdy pacient celých 24 hodin (nejméně dvakrát) odevzdává moč. Volný kortizol není ovlivněn CBG, což je pro testování výhodou. Výsledek může negativně ovlivnit nízký příjem tekutin pacienta, který musí omezit příjem některých léků, které by mohly stanovení narušit, pokud by se provádělo pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Mírné zvýšení kortizolu se projevuje i u těhotných žen. Jako potvrzení diagnózy se berou ty hodnoty, které dosáhly čtyřnásobku hraniční fyziologické hodnoty. U pacientů s poruchou ledvin se od tohoto testu upouští. Dalším stanovením je určení hodnoty kortizolu ve slinách, tzv. pozdní noční slinný kortizol. U pacientů s CS není fyziologická sekrece kortizolu. V pozdních večerních hodinách je koncentrace kortizolu ve slinách vysoká. Odběr se provádí okolo 23. hodiny večer. Množství kortizolu ve slinách odpovídá množství volného, a především biologicky aktivního kortizolu v krvi. Hodnota ve slinách není závislá na množství slin, pacient ale nesmí před odběrem jíst, pít, čistit si zuby nebo kouřit, dokonce ani žvýkat žvýkačky. Pokud by měl pacient poraněné dásně, odběr by se provést neměl. Některé látky v jídle, cigaretách nebo i v přípravcích pro dásně mají inhibiční vliv na 11β -HSD₂. Nedošlo by tak k přeměně kortizolu na kortizon a výsledky by mohly vyjít falešně vysoké. Vhodný je především pro pacienty s cyklickou formou CS. Jako poslední test se provádí test potlačení dexamethasonu. Tato metoda se dá zahrnout do funkčních testů. Pacient perorálně přijme přibližně v půlnoci dexamethason, konkrétně 1 mg, po 8 hodinách se mu provede krevní odběr na

lačno. Druhým způsobem této metody je podávání dexamethasonu v menší dávce (0,5 mg) po dobu dvou dnů v intervalech šesti hodin. Následující ráno po posledním podání se mu opět provede test na kortizol z krve. V případě, že je pacient zdravý, by měl nastat útlum tvorby ACTH a kortizolu, u lidí s CS k tomu nedojde. V obou případech se jako pozitivní výsledek bere hodnota nižší než 50 nmol/l. Jakmile jsou hodnoty zvýšené, je to jasný důkaz toho, že zpětná vazba nefunguje tak, jak by měla. Pro tento test je důležité znát anamnézu pacienta a všechny jeho léky, které užívá. Mnoho z běžně užívaných léků může zkreslovat výsledky (například hormonální léčba u žen). Zkreslené výsledky mohou vyjít u lidí trpících depresí, alkoholiků (mluvíme o pseudo-Cushingovém syndromu) a u lidí s metabolickými poruchami. [25, 26]

Poté co dojde ke stanovení diagnózy, je nutné určit, o jaký typ CS se jedná. Základem „rozpoznávacího“ testování je detekce ranní hladiny ACTH. Obecně se uvádí, že hodnoty nad 20 pg/ml značí pro sekundární typ onemocnění. Hodnoty menší než 10 pg/ml svědčí pro formu primární. Nejčastější využití a zatím nejvyšší citlivost vykazuje test, při kterém se pacientovi podá intravenózně kortikoliberin. Dříve se hojně využíval test suprese dexamethasonu s vysokou dávkou, dnes je spíše nouzovou náhradou za test kortikoliberinem. Jako doplňující vyšetření se může provést stimulační test desmopresinu. [25, 26]

Pro diagnostiku se využívá i magnetická rezonance lebky, která pomáhá odhalit tumory hypofýzy a zlepšit léčbu. Používá se jako šetrnější varianta pro pacienta. Ne vždy ale stačí a využívá se také odběr spodního petrosálního sinusu a scintigrafické zobrazení somatostatinových receptorů. [25, 26]

Pro CS je typické, že se nevyskytuje sám, ale spolu s ním se vyskytuje řada přidružených onemocnění. Nejhorší kombinace pro pacienta je CS s kardiovaskulárními poruchami (trombotická diatéza, ateroskleróza, hypertenze, aj.). Tato varianta má nejhorší statistiky, co se úmrtí týče. Další nejčastější kombinací je CS spolu s metabolickým syndromem. Tato dvě onemocnění mají za následek především obezitu u pacienta, poruchu metabolismu glukózy, hypertenzi. Tyto znaky často zůstávají i po vyléčení CS. Nemocní jsou daleko náchylnější na zlomeniny kostí, psychické potíže, mají oslabenou imunitu a jejich svalstvo je také oslabeno. [25, 27]

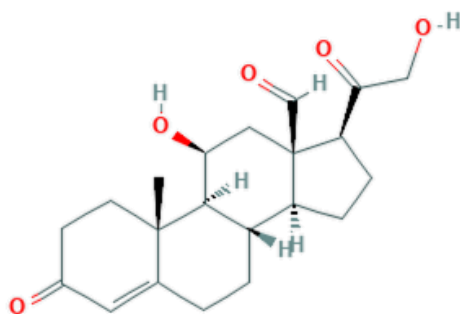
V rámci léčby je podstatné odstranění nežádoucích tumorů, radioterapie a podávání vhodných léků pro normalizaci sekrece kortizolu. V případě primárního typu onemocnění se může provést v rámci léčby i adrenalectomie. Důležitá je kontrola i u vyléčených pacientů, některé podporující příznaky přetrvávají i po vyléčení. Může dojít i k návratu onemocnění po úspěšné léčbě. U některých pacientů dochází k výskytu Nelsonova syndromu. [27]

4 Mineralokortikoidy

Tato skupina hormonů je na rozdíl od glukokortikoidů zaměřená především na jeden orgán v těle, a tím jsou ledviny. V daleko menší míře působí v tlustém střevě a také mozku. Podílí se na vodním hospodářství, ovlivňují vstřebávání iontů při vylučování ledvinami. Podílí se i na udržování krevního tlaku. Bohužel i tato skupina hormonů je často zmiňována v souvislosti se zneužíváním v rámci sportu. Jedná se o skupinu steroidních hormonů s jednadvaceti uhlíky. [15, 28]

4.1 Aldosteron

Hlavním a nejdůležitějším zástupcem mineralokortikoidů je aldosteron. Vzniká sledem několika reakcí, obdobně jako kortizol, aldosteron ale v jiné vrstvě kůry nadledvin, a to v *zona glomerulosa*. Pro aldosteron (obr. 6), neboli 11 β ,21-dihydroxy-3,20-diketo-4-pregnen-18-al, je výchozí molekulou opět cholesterol, na který působí cytochrom P 450 11a (*CYP 11A*), stejně jako u kortizolu. Vzniká pregnenolon, ten se vlivem enzymu 3 β -hydroxysteroid dehydrogenázy přemění na progesteron. Na progesteron působí 21 α -hydroxyláza (*CYP 21*), vzniká 11-deoxykortikosteron. Ten se přeměňuje pod vlivem cytochromu P 450 11B1 11 β -hydroxylázy (*CYP 11B1*) na prekurzor aldosteronu kortikosteron. Posledním krokem je působení cytochromu P 450 11B2 11 β -hydroxylázy (*CYP 11B2*) a vznik aldosteronu. [8, 29]



Obrázek 6: Strukturní vzorec aldosteronu [30]

Aldosteron hraje klíčovou roli pro organismus v rámci ledvin a kardiovaskulárního systému. Zásadním rozdílem mezi aldosteronem a hormony ze skupin glukokortikoidů a androgenů je princip řízení tvorby a sekrece. V těle je transportován pomocí transkortinu a albuminu. Aldosteron je ovlivňován renin-angiotensinovým systémem (viz kapitola 2.3.2.). Nedostatek aldosteronu,

nedokonalá tvorba a působení může mít za následek až smrtelnou koncentraci draslíku v ledvinách a téměř nulový obsah sodíku. Naopak, zvýšená sekrece aldosteronu má za následek nadbytek sodíku v těle, což má za následek narušení jiných fyziologických systémů v těle. Takovému onemocnění se říká primární (hyper)aldosteronismus. [28, 29]

4.2 Funkce mineralokortikoidů v lidském těle

4.2.1 Mechanismus působení

Aldosteron se dostává do buněk distálního tubulu a sběrného kanálku, kde působí na jejich jádra a podporuje syntézu mediátorové RNA (mRNA). Tyto mRNA působí na sodíkové kanály, enzymy a adenosintrifosfatázu (ATPázu). Hlavní mechanismus působení aldosteronu a celkově mineralokortikoidů je zajišťován pomocí mineralokortikoidních receptorů, které můžeme najít na nejrůznějších buňkách, dokonce i na kardiomyocytech, fibroblastech a buňkách hladkého svalstva. [14, 29]

4.2.2 Mineralokortikoidové receptory

Stejně jako GR i receptory pro mineralokortikoidy patří do skupiny jaderných, steroidních receptorů. Mineralokortikoidové receptory jsou nejdelšími zástupci ve skupině transkripčních faktorů. Jako hlavní ligand slouží aldosteron, avšak dostatečnou afinitu vůči tomuto typu receptorů vykazují i glukokortikoidy. V kapitole 3.2.2 je zdůvodněno, proč k vazbě kortizolu nedochází v takové míře. [31]

Princip MR je obdobný jako u GR (viz kapitola 3.2.2). Pokud není na MR navázán žádný ligand, v intracelulárním prostoru je receptor navázán v rámci chaperonového komplexu. Jakmile dojde k navázání potřebného ligandu na receptor, dojde k odštěpení MR z komplexu, k translokaci v jádře a vzniká homodimer, který se dokáže navázat na potřebná místa. Nastává potřebná transkripce. Existuje několik látek, které působí na transkripci jako stimulatory (například koaktivátor p300/CBP) a také jejich antagonisté (nukleární transkripční faktor Y). Běžné děje uvnitř buňky, jako je fosforylace nebo acetylace, mají na průběh transkripce také nemalý vliv. [14]

Malý zlomek tvoří ale i receptory zakotvené v membráně a dochází tak k negenomové signalizaci. Základní estrogenové receptory produkuje *zona glomerulosa*, receptor asociovaný s G-proteinem je produkován především adenomem. Dochází k reakcím, které vedou ke stimulaci buněčné proliferace, apoptózy a extracelulárního signálu regulované kinázy. Estrogenové receptory inhibují syntézu aldosteronu. Tento systém však ještě nebyl dostatečně prostudován. [14, 32]

Nejvíce jsou MR lokalizovány v oblasti distálních tubulů a sběrných kanálků. Receptory se vyskytují ale i v buňkách endotelu a hladkého svalstva. Dlouhodobá aktivace MR především v endotelu vede k postupným zánětlivým reakcím, které mohou mít za následek poškození ledvin, mozku, srdce a také plic. Dále může docházet k ateroskleróze, trombóze nebo třeba kalcifikaci. Aktivace receptoru ligandem v endotelu a hladké svalovině, má za následek zvýšenou aktivitu NADPH oxidázy. Vznikají reaktivní kyslíkové sloučeniny a zároveň klesá tvorba oxidu dusnatého, dochází tak k poškození tkáně vlivem oxidačního stresu a epitel ztrácí funkčnost. Pokud je ve vazbě jako ligand aldosteron, dochází k defektu glukóza-6-fosfát dehydrogenázy a narušuje se tak redoxní potenciál v buňce. To celé má jednotný následek, snížení vasodilatace v cévách, vznik prozánětlivých mechanismů a jim podobné reakce. [33, 34]

4.2.3 Účinky na organismus a jejich terapeutické využití

Aldosteron účinkuje pomocí svých receptorů. Hlavní úloha je v ledvinách. Dá se říci, že ovlivňuje složení moče, protože zadržuje sodný kationt v ledvinách spolu s vodou, a naopak draselný kationt vylučuje. Pomocí receptorů mají mineralokortikoidy schopnost působit na jádro buněk v distálních tubulech a sběrných kanálkách. V jádře podporují tvorbu mRNA a ta následně působí na samotné tubuly, kanálky a funkce, které jsou zastoupeny v membránách buněk. V membránách je zakotvena ATP-áza, jejíž hlavní úlohou je přenos sodíku a draslíku přes membránu z vnitřního prostředí buňky do extracelulární tekutiny a naopak. Na^+ je základní extracelulární ion, do intracelulárního prostoru buňky se dostává pomocí pasivní difúze ve směru elektrického gradientu. Jakmile vstoupí Na^+ do buňky, draselné kanály umožňují pasivní výstup K^+ z buňky. ATP-áza udržuje tento gradient a zároveň umožňuje transport Na^+ do krve a K^+ z krve do buněk. Tento systém se popisuje jako aktivní transport, molekuly jsou

transportovány proti gradientu za spotřeby ATP (adenosintrifosfátu), což je makroergická sloučenina a jak z názvu vyplývá, poskytuje pro transport energii. Nepřímo působí i na vylučování iontů vodíku. Spolu s antidiuretickým hormonem ovlivňuje i vstřebávání vody v ledvinách a tím pádem i objem extracelulární tekutiny. To definuje jeho další funkci, a to ovlivnění krevního tlaku v lidském těle, a tak ovlivňuje i kardiovaskulární systém. Velké změny se v ledvinách dějí i při onemocnění jako je diabetes mellitus, změny v hodnotách aldosteronu tak nastávají i při tomto onemocnění. [29]

Velkou souvislost v rámci krevního tlaku má aldosteron s estrogenem. Koncentrace aldosteronu se v krevním řečišti během menstruačního cyklu významně mění, dá se říci, že estrogen (a progesteron) má vliv na RAS. Estrogeny přispívají k udržování normálních hodnot krevního tlaku. Vlivem menopauzy ale dochází k inhibici tvorby estrogenů, což se projeví zvýšením aldosteronu a krevního tlaku, to může dospět k ateroskleróze a k závažným patologickým stavům (infarkt myokardu, cévní mozková příhoda). Pokud se tato situace začne řešit ihned po zástavě tvorby estrogenů, dá se důsledkům zvýšení krevního tlaku předejít substituční terapií. Tyto mechanismy a postupy ještě nejsou zcela popsány, ale ukazuje se, že by estrogeny mohly hrát důležitou roli v léčbě hypertenze. [32]

Dříve se pro terapii užívaly inhibitory proti receptorům angiotensinu II, inhibitor angiotensin–konvertázy a blokátory reninu. Léčba se ale ukázala jako neúčinná, protože i po době delšího podávání těchto látek docházelo k opětovnému zvýšení aldosteronu v těle. Daleko více se osvědčila léčba s „přidanou hodnotou“, kterou je blokátor aldosteronového receptoru. Při pozorování změn u léčby s přidáním blokátoru receptoru došlo ke zjištění, že dochází ke zlepšení stavu ledvin a srdeční komory. Nejen z anatomického hlediska, ale i z hlediska funkčního. Tyto blokátory se používají nejen u lidí trpících hypertenzí, ale i u lidí s nadváhou. Tento způsob léčby se používá pro léčbu hypertenze až srdečního selhávání, pro léčbu chronického onemocnění ledvin a podobných onemocnění. Každá léčba má své vedlejší účinky, stejně tak i podávání blokátorů aldosteronových receptorů. Vedlejší účinky, jako zvýšená hladina draslíku v krevním řečišti a gynekomastie, jsou závislé na podané dávce léčiva. Dá se říci, že hyperkalémie je přirozený mechanismus podaného léku a vyskytuje se velmi ojediněle.

Gynekomastie závisí na druhu podaného blokátoru. Spironolakton může narušovat tvorbu steroidních hormonů, to může mít za následek již zmíněnou gynekomastii, nepravidelnost menstruačního cyklu a u mužů může způsobovat impotenci. Šetrnější pro člověka je metabolit spironolaktonu, kanrenon. Funkcí blokátorů je nejen účinná léčba, ale také funkce ochranná. [35]

4.3 Onemocnění související s nedostatkem mineralokortikoidů

Nedostatek mineralokortikoidů se projevuje v rámci Addisonovy choroby nebo kongenitální adrenální hyperplazie. Tato dvě onemocnění postihují hormony v kůře nadledvin jako celek. Typický projev u Addisonovy choroby související s poklesem mineralokortikoidů je hypotenze. Pokles hormonů ale nastává v případě primární Addisonovy choroby. Pokud je onemocnění sekundární, což znamená, že porucha není přímo v nadledvině, aldosteron je produkován běžným způsobem, protože syntéza aldosteronu není ovlivňována hypofýzou, ale pomocí RAS. Podrobnější popis choroby, diagnostika a léčby i v souvislosti s mineralokortikoidy byla popsána v kapitole 3.3.1. Jelikož je v těle méně mineralokortikoidů (denní sekrece aldosteronu je v rozmezí 100–150 µg), jejich substituční léčba proto není tak rozsáhlá. [22, 29]

4.4 Onemocnění související s nadbytkem mineralokortikoidů

Zvýšená sekrece aldosteronu vede k tzv. hyperaldosteronismu. Vzhledem k funkcím aldosteronu se dá předpokládat, že pacienti s tímto onemocněním budou trpět vysokým tlakem a riziko smrti zapříčiněné kardiovaskulární chorobou bude vysoké. Nejčastějšími příčinami primárního hyperaldosteronismu (porušena je samotná kůra nadledvin) je adenom produkující aldosteron, bilaterální hyperplazie kůry nadledvin neboli idiopatický hyperaldosteronismus, familiární hyperaldosteronismus a unilaterální hyperplazie kůry nadledvin. Podobně jako u glukokortikoidů, i mineralokortikoidy mají sekundární podobu onemocnění. Ta nastává v případě poškození renin-angiotensinového systému, například nádorem. Každý typ hyperaldosteronismu má variabilní genetiku. [36, 37]

4.4.1 Primární hyperaldosteronismus

Výskyt primárního hyperaldosteronismu (PA) v populaci je velice diskutabilní. Některé studie tvrdí, že až u 20 % pacientů je toto onemocnění příčinou sekundární hypertenze. Jiné zdroje uvádí, že případy nebyly dostatečně prozkoumány, a proto tedy tvoří PA příčinu u necelého jednoho procenta lidí se sekundární hypertenzí. Prameny se shodují na tom, že PA postihuje zpravidla více ženy než muže. [36, 37]

Nejčastěji se vyskytuje idiopatický hyperaldosteronismus, hned druhým nejčastějším je adenom produkující aldosteron neboli Connův syndrom. Aldosteron je produkován ve zvýšené míře, ať už nádorem, mikronádorem, buněčnými klastry produkujícími aldosteron nebo jinak patologicky změněnými buňkami. Následkem jeho zvýšené koncentrace je i jeho zvýšená činnost v ledvinách. Na⁺ spolu s vodou jsou zadržovány více, než je pro organismus potřebné. Naopak K⁺ je vylučován nadměrně. Tím, že je sodík zadržován ve velké míře, dochází k hromadění extracelulární tekutiny v těle. Jako následek velkého objemu tekutiny dochází ke zvýšení krevního tlaku. Pokud pacient trpí dlouhodobě zvýšeným tlakem, měl by být testován na PA. U hypokalémie se ale nemůže říci, že se objevuje vždycky. U řady pacientů, především u familiárního typu, je koncentrace draslíku v normě. Pokud se nezačne včas s léčbou, může docházet k postupné vazivové přeměně orgánů, například ledvin a srdce, k chronickému onemocnění ledvin a postupnému srdečnímu selhávání. Z hlediska kardiovaskulárního systému je neléčený PA nebezpečný. [38]

Primární rozdělení mezi idiopatickou formou a Connovým syndromem se provádí na základě počítačové tomografie, kde je adenom jasně vidět. I přesto, že imunohistologické stanovení nebylo a ještě stále není v diagnóze primárním stanovením, ukázalo se, že je pro určení přesné diagnózy klíčové. Provádí se pomocí protilátek proti *CYP 11B1* a *CYP 11B2*, což jsou důležité cytochromy podílející se na tvorbě aldosteronu. Pomocí typu *B2* byly nalezeny malé buněčné klastry produkující aldosteron, ty pomocí tomografie viditelné nejsou, dokonce splývají se zdravými buňkami kůry. Imunohistologické stanovení tyto buňky umožnilo prokázat a lokalizovat i se somatickými mutacemi. Celkově se dá říci, že toto stanovení napomáhá odhalit různé somatické mutace v nadledvině. [39, 40]

V rámci laboratorního vyšetření se stanovuje koncentrace aldosteronu a reninu. Základem pro stanovení hyperaldosteronismu je nízká až téměř neprokazatelná hodnota reninu, a naopak nepřiměřeně vysoká hodnota aldosteronu. Pro rozlišení primárního a sekundárního typu onemocnění se využívá stanovení plazmatické koncentrace reninu a stanovení plazmatické reninové aktivity. V případě primárního typu budou hodnoty snižené, protože aldosteron je produkován kůrou nadledvin v nadbytku v rámci patologie, renin nemá vliv a není potřeba jeho produkce. Naopak, u sekundární varianty budou hodnoty zvýšené. Dalším stanovením je určení poměru koncentrace aldosteronu k aktivitě reninu. Fyziologické hodnoty tohoto poměru nejsou zcela objasněny a každá společnost s ohledem na metodu uvádí různé hodnoty v řádech ng/dl. Pokud výsledky poměru vyjdou pozitivně, pro správné potvrzení diagnózy by se měly provést celkem čtyři testy a to solný infuzní test, test na potlačení fludrokortizonu, test s kaptoprilem a zátěžový test se sodíkem. Test s fludrokortizonem se pro svou časovou a také finanční náročnost nevyužívá. Nejvyužívanější je orální zátěžový test se sodíkem a infuzní test. V případě zátěžového testu pacient po dobu tří dnů přijímá nadměrné množství sodíku, ať už ve stravě nebo v podobě tablet. Měří se vylučování aldosteronu močí. Pokud je hodnota vyšší než 12 µg/den, potvrzuje to diagnózu hyperaldosteronismu. Po dobu čtyř hodin se pacientovi podává infuzí fyziologický roztok, jako potvrzující výsledek se bere hodnota koncentrace aldosteronu nad 10 ng/dl. Tento test často dává falešné výsledky. Některé laboratoře využívají i testování aldosteronu v moči, kterou pacient sbírá po dobu 24 hodin. Pro pacienty je k dispozici i náročné vyšetření, během kterého se odebírá žilní krev nadledvin a slouží především pro určení léčby. Důležitý je screening obyvatel, lékaři doporučují provádět screening u všech pacientů, kteří trpí hypertenzí delší dobu, a také u těch, kteří měli v rodině případ PA. [36, 37]

Pro léčbu je podstatné určení, o jaký typ PA se jedná. V případě bilaterální formy se uplatňuje léčba pomocí antagonistů mineralokortikoidových receptorů. Nejčastěji lékaři předepisují spironolakton nebo eplerenon. Jako každá látka se ale ani spironolakton neobejde bez vedlejších účinků, vykazuje specifitu vůči receptorům pro androgeny, působí jako jejich antagonist a prostřednictvím receptorů pro progesteron vykazuje naopak souhlasné účinky. To se projevuje především u mužů gynekomastií a poruchou erekce, u žen v podobě mastodynie

a narušením menstruačního cyklu. Eplerenon nevykazuje vedlejší účinky jako spironolakton, v Evropě je ale jeho použití zakázané pro léčbu tohoto onemocnění, i když je účinný bez vlivů vnějších faktorů (například strava). Za účinky spironolaktonu odpovídají především jeho metabolity, které vydrží biologicky aktivní několik desítek hodin. To je důležité pro dávkování, pro normalizaci hladin je podstatné podávání léků alespoň deset dní. Z důvodu jeho četných vedlejších účinků se nedoporučuje překročit doporučenou denní dávku 100 mg, dávka by se měla určovat individuálně pro každého pacienta s ohledem na váhu a celkový zdravotní stav. Účinnost tohoto léku je závislá na složení potravy a zdravotním stavu pacienta. Pokud pacient trpí poškozením jater nebo ledvin, dávkování musí být opatrné a celá léčba musí být dostatečně zvažena. Connův syndrom a zbylé unilaterální formy onemocnění se řeší chirurgickým zákrokem, konkrétně odebráním nadledvin. Adrenolektomie se doporučuje provést jako úplná, částečná se nedoporučuje z důvodu obtížného určení přesné lokalizace adenomu a zároveň postižené oblasti, která poskytuje zvýšenou sekreci aldosteronu. V rámci sledování pacientů po léčbě bylo prokázáno, že pacienti, kteří podstoupili chirurgický zákrok, potřebovali daleko menší dávky léčiv a zároveň byl jejich zdravotní stav daleko lepší než u pacientů, kteří jsou léčeni pomocí léků. Dokonce u pacientů po adrenolektomii bylo prokázáno zlepšení hypertenze. Ať už pacient absolvuje léčbu pomocí zmíněných medikamentů nebo chirurgickým zákrokem, musí být i nadále pečlivě sledován. Případná přetrvávající hypertenze nebo výchyly draslíku od fyziologických hodnot musí být léčeny léky proti konkrétní příčině, například léky na vysoký tlak, v případě léčby pomocí antagonistů MR může být znovu obnovena. I v tomto případě ale platí, že čím dříve se PA diagnostikuje, tím větší naději na vyléčení pacient má. [41, 42]

4.4.2 Sekundární hyperaldosteronismus

Jak už název vypovídá, tento typ hyperaldosteronismu nemá přímou souvislost s kůrou nadledvin, naopak se systémem RAS, který ovlivňuje produkci a sekreci aldosteronu v kůře. Systém reninu a angiotensinu II je ve zvýšené míře stimulován k produkci angiotensinu II a reninu vlivem stenózy renální tepny, edému, srdečního selhání, během těhotenství, nebo pokud pacient trpí cirhózou. Příčina může být i v ledvinách, a to když jsou ledviny postiženy nádorem, který

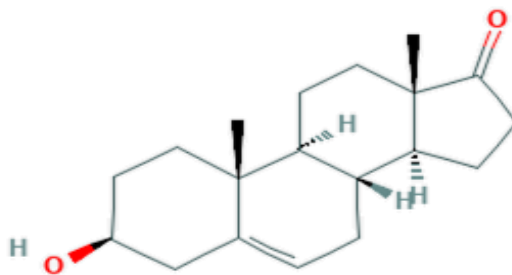
ve zvýšené míře produkuje právě renin. Nádor ale nebývá tak častou příčinou sekundárního hyperaldosteronismu. Ostatní zmíněné příčiny mají za následek pokles objemu krve v těle, což má za následek právě zvýšenou produkci reninu. Léčba spočívá v odstranění primární příčiny, a pak podle situace se volí medikamentní léčba. [36]

5 Androgeny

V kůře nadledvin se tvoří jen nepatrná část androgenů z celkového množství v těle. To, že jejich produkce není v takovém množství jako třeba u glukokortikoidů, ale neznamená, že pro člověka nejsou potřebné nebo nemohou způsobit patologickou reakci. Podílí se na pohlavním vývoji člověka a to hlavně v období puberty, kdy je jejich aktivita největší. Stejně jako pro glukokortikoidy a mineralokortikoidy je pro tvorbu androgenů výchozí molekulou cholesterol, rozdíl je ale v počtu uhlíků. Androgeny mají ve své molekule uhlíků pouze 19. [9]

5.1 Dehydroepiandrosteron

V *zona reticularis* probíhá sled reakcí vedoucí ke vzniku několika látek, které nadledviny produkují. V největší míře se z kůry uvolňuje dehydroepiandrosteron (DHEA) a jeho sulfát. V daleko menší míře se uvolňují androstendion a jeho formy a opravdu v minimálním množství testosteron. Dehydroepiandrosteron (obr. 7) spolu s dalšími produkty *zona reticularis* slouží v krevním řečišti hlavně jako výchozí molekuly pro tvorbu pohlavních hormonů testosteronu a estradiolu. Z molekuly cholesterolu se postupnými reakcemi (již popsány výše) stává 17 α -hydroxypregnenolon, na který působí 17 α -hydroxyláza. Tím dochází ke vzniku DHEA. Androstendion vzniká působením 3 β -hydroxysteroid dehydrogenázy na DHEA nebo působením 17 α -hydroxylázy na 17 α -hydroxyprogesteron. Z těchto molekul už mimo nadledvinu dochází ke vzniku pohlavních hormonů. V kůře probíhá pomocí sulfokinázy přeměna DHEA na dehydroepiandrosteron sulfát (DHEA-S). [8, 9]



Obrázek 7: Struktura DHEA [43]

5.2 Funkce androgenů v lidském těle

Největší podíl z celkového množství DHEA a DHEA-S v těle je tvořen v kůře nadledvin, ale menší část se tvoří i v pohlavních buňkách a mozku. Mechanismus působení těchto dvou hormonů v těle nebyl ještě důkladně prostudován. Je jasné, že účinkuje přes receptory, ale na rozdíl od předchozích hormonů, nemá žádné specifické receptory. Působí na řadu hormonů, a jak se zdá, negenomovými cestami. Genomově může působit také, ale nepřímo, kdy se nejdříve musí přeměnit na testosteron a jeho formy nebo přeměna musí dojít až na samotný estradiol. Tyto molekuly se poté vážou na své androgenní a estrogenové receptory. [44]

5.2.1 Receptory pro DHEA

Dehydroepiandrosteron se svým sulfátem působí na řadu receptorů. Jednou z největších skupin receptorů, na které se váže a tím je aktivuje, jsou jaderné receptory, konkrétně se jedná o skupinu transkripčních faktorů. Na ty se váže buď ve formě DHEA nebo pomocí přeměny na jiné androgenní hormony. Vazba mezi DHEA a jadernými receptory není tak silná jako u vazeb jiných ligandů a receptorů. Podle nejnovějších studií se předpokládá, že má hormon schopnost ovlivňovat koncentraci receptorů. Mezi receptory, na které se DHEA váže a vykazuje s nimi určitou aktivitu, patří pregnanový x receptor, konstitutivní androstanový receptor, receptory pro estrogen typu α i β a receptory aktivované peroxizómovými proliferátory. Dokáže ale působit i na MR, i když v tomto případě je afinita o dost menší. [45]

Tím, že jsou tyto hormony schopny působit na různé tkáně v lidském těle (buňky prostaty, játra, buňky nervové soustavy a další), jsou schopny ovlivňovat několik fyziologických dějů. Působí na proteinovou kinázu, na NADPH a její oxidázu, ovlivňuje děje v mitochondriích, v buňce působí pomocí mRNA a působí i na iontové kanály zabudované v membráně buněk. Velký vliv receptorů se prokázal u rakoviny prsu. Všechny tyto děje po vazbě ligandu na receptor jsou ve fázi zkoumání na laboratorních zvířatech. [45, 46]

5.2.2 Účinky na organismus a jejich terapeutické využití

Jak běžná forma dehydroepiandrosteronu, tak i jeho sulfátová forma se v těle nachází v rozmezí 12 až 2 000 nmol/l. Ve větší míře se vyskytuje forma se

sulfátem. Koncentrace hormonů má tak velké rozmezí, protože je velice variabilní v závislosti na věku a pohlaví. Ihned po porodu je koncentrace vysoká, ale během pár dní se rychle sníží. V období puberty se množství DHEA a DHEA-S v těle opět dostává na vyšší hodnoty. Během stárnutí nastává opět útlum tvorby, hladiny se rapidně snižují. Jelikož se jedná o substrát pro tvorbu pohlavních hormonů, změny koncentrace se zaznamenávají i při těhotenství nebo naopak při menopauze. Celkově se může říct, že jakékoliv změny v rámci pohlavního systému se dají pozorovat na koncentraci DHEA a DHEA-S, také v tomto případě se používá léčba pomocí androgenů, jejich podávání například během menopauzy si našlo mnoho zastánců, ale i odpůrců. Nervově vypjaté situace souvisí s tvorbou glukokortikoidů, ale také androgenů v kůře nadledvin. Také DHEA se dá označit jako stresový hormon, proto se může podle některých používat i na léčbu depresí. Jeho účinky na tělo jsou různorodé, ale jestli v podání tablet užitečné, na tom se lékaři neshodují. Pozitivní vliv mají na léčbu rakovin zejména u žen, při onemocnění kostí a podávání farmakologicky vyrobeného DHEA se ukazuje jako prospěšné i u Crohnovy choroby. Vědci pozorováním na zvířatech zjistili, že DHEA má pozitivní vliv v léčbě obezity. Z toho vyplývá, že mají účinek na metabolismus lipidů, sacharidů. To souvisí i se svaly a krevním řečištěm, kdy mohou pozitivně ovlivnit vývoj aterosklerózy. Nejnovější studie poukazují na „tlumící“ funkci těchto hormonů a ukazují na možnost jejich využití jako analgetik. Tím, že se tvoří v mozku a díky své malé molekulové hmotnosti dokážou projít hematoencefalickou bariérou, působí na nociceptory, kde se právě tlumící účinek nejvíce projevuje. Jako farmakologické přípravky se podává DHEA a oxandrolon, ten se ale nedokáže přeměnit v těle na DHEA-S, který vykazuje schopnost pozitivně ovlivnit imunitní systém, čehož se může využít u podpůrné léčby HIV nebo u systémového *lupus erythematoses*. Studie také prokazují, že DHEA „zpomaluje“ stárnutí. Drtivá většina těchto poznatků je ale zatím na začátku prozkoumávání a v praxi se tak tyto poznatky zatím ne zcela využívají. [47–49]

I v tomto případě není lék bez vedlejších účinků. Mezi vedlejší účinky nejen léku, ale i nepřiměřených hladin hormonů vyskytujících se fyziologicky v těle, patří projevy související se sekundárními pohlavními znaky. Protože DHEA slouží jako substrát pro specifické pohlavní hormony, ty se mohou tvořit také ve větší míře,

a to se projeví u žen například růstem vousů na obličeji, nepravidelností menstruačního krvácení, menší velikostí prsou, vypadáváním vlasů atd. Muži pocítují zvýšenou citlivost hrudníku, zvýšenou agresi a nerovnoměrný vývoj varlat. Ve výše uvedených tkáních může působit pozitivně, stejně tak i negativně (nízký krevní tlak, alergie, bolest svalstva, psychické problémy, zvýšený cholesterol, obezita). Androgen je zpracováván v játrech, tudíž pacientům trpícím onemocněním jater by se tyto léky podávat neměly. Rozhodně se musí dát pozor na změny v rámci koagulačního systému v těle, v těchto případech může dojít až k embolií. Důležité je znát anamnézu člověka, protože lidé s psychickými poruchami nebo ti, kteří prodělali nebo mají genetické dispozice k rakovině, by tuto léčbu podstupovat neměli. U diabetologických pacientů by se mělo dávat také velký pozor při léčbě dehydroepiandrosteronem, protože má vliv na citlivost těla vůči inzulínu. Léčba pomocí těchto hormonů se využívá i u onemocnění související s glukokortikoidy a mineralokortikoidy. [48, 49]

5.3 Onemocnění související s nedostatkem androgenů

Nedostatek androgenů vycházejících z kůry nadledvin se projevuje jako přidružený projev u Addisonovy choroby v rámci patologie. Fyziologicky hladina androgenů koreluje s věkem, přibližně po dvacátém roce věku pomalu klesá. Starší lidé jsou náchylnější na infekce, poruchy metabolismu a podobné poruchy objevující se v pokročilém věku a jejich hladina DHEA a DHEA-S je nízká. Nejnovější studie poukazují na souvislost, hlavně co se týče imunitního systému a cév. Samozřejmě, čím více klesá hladina DHEA a hlavně jeho sulfátu, tím méně se tvoří pohlavní hormony. Tím pádem na změny související s pohlavním systémem člověka má dehydroepiandrosteron sulfát vliv. Podle nejnovějších studií se prokázalo, že ženy se sníženou koncentrací těchto forem hormonu trpí plicními obtížemi. Poruchy mohou nastat, i pokud dojde k poruše hypofýzy. [50]

5.4 Onemocnění související s nadbytkem androgenů

Zvýšené hladiny DHEA a jeho sulfátového esteru a dalších androgenů z kůry nadledvin mohou způsobit nežádoucí účinky, ať už v dospívání nebo později. Všechny tyto účinky souvisí s vedlejšími účinky popsány v kapitole 5.2.2. Vysoké hladiny se vyskytují v rámci několika onemocnění, v následujících podkapitolách budou popsány dvě nejvýznamnější choroby související

s výkyvem androgenů, kongenitální adrenální hyperplazie (CAH) a syndrom polycystických vaječníků.

5.4.1 Kongenitální adrenální hyperplazie

Toto onemocnění se řadí mezi geneticky podmíněné, konkrétně autosomálně recesivní. Hlavní příčinou je mutace, která postihuje enzym podílející se na tvorbě steroidních hormonů v kůře nadledvin. Většinou nastane situace, kdy je tvorba jedné skupiny potlačena, ale vlivem snahy hypothalamo-hypofyzárním systémem udržet správnou koncentraci hormonu v těle, dochází ke stimulaci nadledvin a ostatní skupiny hormonů se tvoří naopak v nadbytku. Nemusí být způsobena pouze genetickými vlivy, ale k rozvoji CAH vede i Addisonova nemoc, kdy vlivem autoprotilátek dochází k poškození hydroxyláz. [51, 52]

Nejvíce vyskytujícím se typem je defekt 21-hydroxylázy, téměř u 90 % pacientů trpících CAH. Zbýlých 10 % tvoří CAH způsobené defektem 17 α -hydroxylázy, 11 β -hydroxylázy, enzymu štěpícím postranní řetězce výchozí molekuly, cholesterolu, nedostatkem 3 β -hydroxysteroidní dehydrogenázy typu 2 a oxidoreduktázy P450. Popisuje se, že na 10–20 000 obyvatel se vyskytuje jeden postižený CAH, konkrétně s deficitem 21-hydroxylázy. Novorozenecký screening napomáhá toto onemocnění diagnostikovat včas. [53]

Tento enzym se podílí jak na tvorbě kortizonu i aldosteronu. V rámci defektu 21-hydroxylázy se rozlišují dvě formy onemocnění, klasická a neklasická. Klasická forma postihuje drtivou většinu pacientů trpících CAH. Mutace je natolik agresivní, že aktivita 21-hydroxylázy je nulová. Vzhledem k tomu, že tento enzym zasahuje do tvorby glukokortikoidů a mineralokortikoidů, musí se počítat s příznaky deficitu u obou těchto skupin. V rámci kortizolu dochází až k život ohrožujícímu nedostatku. U nedostatku aldosteronu je narušena elektrolytová rovnováha a pacient ve zvýšené míře vylučuje sůl, v důsledku těchto dějů může u člověka dojít k šoku až smrti. Naopak androgeny jsou abnormálně zvýšeny a u kojenců ženského pohlaví se to projeví nejasnými genitáliemi. Nadbytek androgenů má vliv i na vývoj kostí, zpočátku je vývoj rychlý, pak je ale většinou nemocný menší, než je v populaci běžné. Pokud není deficit enzymů natolik závažný, u dívek se to může projevit až předčasnou pubertou, kdy nastává nepravidelná menstruace, na obličeji je viditelné silné akné, objevuje se

ochlupení v místech neobvyklých pro dívky až syndrom polycystických vaječnicků. Pokud postižená nedodrží léčbu, tak jak by měla, vede to k nárůstu svalové hmoty a hlas má poněkud hlubší, než je u žen zvykem. U chlapců tyto projevy nejsou tolik agresivní, po narození jsou většinou bezpříznakoví. Postupem času nastává předčasná puberta, během které dochází k hyperpigmentaci, nepřiměřenému zvětšení genitálií, a vlivem aldosteronu jsou narušené biochemické parametry minerálů v těle. I u mužů je popsána neplodnost, jejíž hlavní příčinou jsou nejspíše benigní tumory ze zbytků nadledvin ve varleti. U některých novorozených chlapečků se nemoc nediagnostikuje a do dvou týdnů po narození dochází k selhání organismu vlivem solné krize. [51, 54]

Neklasická forma je u některých národnostních menšin (například Židé) jedno z nejvíce se vyskytujících dědičných onemocnění. Oproti klasické formě je nejzásadnější rozdíl ten, že aktivita 21-hydroxylázy není nulová, ale zachovaná až z 60 %. Projevy se objevují během normálního dospívání a popisují se především u žen v podobě hirsutismu, předčasnou pubertou, poruše menstruace a problémů s plodností. [53]

Vzhledem k tomu, že se jedná o vrozenou poruchu, vyšetření na toto onemocnění se provádí u dětí ihned po narození v rámci novorozeneckého screeningu, zvláště v těch případech, kdy je na výskyt podezření. Při novorozeneckém screeningu se využívá metoda tzv. suché krevní skvrny. Vyšetřuje se koncentrace 17-hydroxyprogesteronu a kortizolu. Tento test je nutný provádět v dubletu, ukázala se vysoká falešnost výsledků u prvního testu, který se provádí pomocí fluorescenční analýzy. Druhé vyšetření se provádí metodou kapalinové chromatografie/tandemové hmotnostní spektrometrie, která je citlivější. Toto vyšetření se provádí s předpokladem, že adrenální hormony jsou v těle v běžné míře. Proto například u dříve narozených dětí mohou být koncentrace abnormální. Krev se odebírá nejčastěji z patičky. Toto potvrdí diagnózu klasické cesty CAH. [55]

Pokud je hodnota 17-hydroxyprogesteronu zvýšená, svědčí to pro defekt 21-hydroxylázy. Pacienti s CAH mají hodnoty 17-hydroxyprogesteronu až nad 5 000 ng/dl, u neklasické formy jsou daleko menší hodnoty (přibližně 1 500 ng/dl). Stanovení se provádí brzy ráno a jako hraniční hodnota pro potvrzení diagnózy se uvádí 200 ng/dl. Druhé stanovení pomocí spektrometrie napomáhá detekovat

narušené pochody jiných enzymů, které se vyskytují v menší míře. Pokud i tato dvě stanovení nedají lékaři jasný výsledek rozhodující pro diagnostiku, využívá se stimulace cosyntropinem, nazýváme ho ACTH-stimulačním testem, díky kterému se zjistí celková odpověď kůry na stimulaci. Cosyntropin se podává intravenózně nebo do svalu a je na volbě lékaře, zda se vzorek po stimulaci odebere po třiceti nebo šedesáti minutách. Stanovují se koncentrace kortizolu a 17-hydroxyprogesteronu. Čím dříve se nemoc diagnostikuje a začne léčit, tím větší má pacient šanci na normální život. Samozřejmě s tímto onemocněním souvisí i změněné hodnoty látek v těle (snížená koncentrace glukózy, sodného kationtu, zvýšené hodnoty draselného iontu). Důležitým krokem, zvláště u ztracení soli, je stanovení aktivity reninu, progesteronu a ostatních androgenů kvůli špatným následkům. Dále se provádí genetické vyšetření a zřídka se využívají i zobrazovací metody pro potvrzení pohlaví a zobrazení kostí. [54, 56]

Principem léčby CAH je náhrada nedostatku v těle snížených glukokortikoidů a mineralokortikoidů a zároveň se pomocí léčby snaží dosáhnout utlumení projevů CAH, kontrola růstu kostí, správný vývoj v pubertálním období, snaha o pravidelnost menstruačního cyklu u žen a podporu plodnosti. Léčba se musí přísně hlídat a pomocí výsledků laboratorního vyšetření androstendionu a testosteronu se určuje, zda je jejich koncentrace odpovídající věku a pohlaví. Progesteron s 17-hydroxyprogesteronem nejsou vhodné pro určení dávky substituční terapie a jejich hladina v těle kolísá v závislosti na glukokortikoidech. Tvorba DHEA-S je substituční terapií potlačena. U dětí a dospívajících se jako náhrada glukokortikoidů používá hydrokortizon, u dospělých prednison, dexamethason nebo v kombinaci s hydrokortizonem. Za mineralokortikoidy se podává fludrokortizon acetát. Vzhledem k tomu, že v počátku onemocnění jsou velké ztráty solí, podávají se u malých dětí větší dávky než v dospělosti. Pro potlačení projevů CAH se mohou podávat antiandrogeny, jejich podávání se ale musí pečlivě zvážit, postihují játra, mohou zapříčinit hemolytickou anémii a v těhotenství mohou být nebezpečné pro plod. Pro zlepšení parametrů se uzpůsobuje i strava. Farmakologické přípravky se užívají buď v perorální podobě, nebo injekčně do svalu. V dnešní době se vyvíjí různé pumpy (podobné inzulinovým), které by glukokortikoidy dávkovaly podle potřeb organismu. V případě akutních onemocnění se dávky musí zvýšit. U žen se provádí

chirurgické zákroky v případě virilizace, u mužů se léčí tumory ze zbytků nadledvin ve varlatech. Pokud je u plodu stanoveno podezření na CAH, těhotným ženám se podává dexamethason pro zmírnění virilizace nebo pro prevenci. [56]

5.4.2 Syndrom polycystických ovarií

Onemocnění vaječnicků související s nadbytkem androgenů se vyskytuje až u deseti procent žen v plodném věku. Mezi hlavní znaky syndromu polycystických ovarií (PCOS) patří již zmíněný hyperandrogenismus, dysfunkce vaječnicků a morfologie polycystických vaječnicků. Zvýšené bývají v největší míře testosteron, delta androstendion a DHEA s DHEA-S. Onemocnění se projevuje čtyřmi subfenotypy A-D. Fenotypy A a B se označují jako klasické, mají typické příznaky a jsou snadno identifikovatelné. Fenotyp C se vyznačuje absencí dysfunkce vaječnicků a poslední typ D se vyznačuje normálními hodnotami androgenů a v rámci projevů se ani inzulinová rezistence neprojevuje v takové míře. Dalšími projevy PCOS jsou rezistence na inzulin a zvýšená hladina inzulinu v krvi, dyslipidémie, porucha menstruačního cyklu, který je buď nepravidelný, anebo vůbec nenastane a hirsutismus. Následkem dyslipidémie je obezita, lidé trpící PCOS trpí nadváhou a častý je i přidružený výskyt diabetu druhého typu. Obezita a poruchy inzulinové rezistence jsou také rizikovými faktory pro vznik PCOS. [57, 58]

Pro správné stanovení diagnózy PCOS jsou dány 3 podmínky, pro potvrzení diagnózy stačí přítomnost jednoho ze základních projevů zmíněných výše. Důležitým krokem v diagnostice je vyloučení chorob, které by mohly vyvolat podobné projevy jako PCOS. Nefunkčnost vaječnicků se objevuje až u 80 % žen trpících PCOS a je způsobena především narušením vazby mezi vaječnický a hypothalamo-hypofyzárním systémem. Vlivem narušení této vazby se v krevním oběhu zvyšují hodnoty gonadotropin uvolňujícího hormonu, to má za následek zvýšení luteinizačního hormonu a kisspeptinu. Jako nefunkční označujeme vaječnický, pokud je celý menstruační cyklus kratší než 21 dní nebo delší než 35 dní. Dalším parametrem je počet cyklů za rok, pokud jich je pod osm, vaječnický jsou nefunkční. Když u ženy nastane vynechání minimálně dvou menstruačních cyklů v době pohlavní zralosti a od pubertálního období již uběhly 3 roky, s největší pravděpodobností se jedná o dysfunkci vaječnicků. Pokud ženy trpí hirsutismem, měly by podstoupit vyšetření na dysfunkci ovarií a PCOS i přesto,

že jejich menstruace je naprosto v pořádku, protože i v takovém případě nemusí být vše v pořádku. U hirsutismu se provádí hodnocení podle dané stupnice. Zvýšené koncentrace androgenů se projevují především hirsutismem, vypadáváním vlasů a jejich řídnutím a akné. [57, 59]

Pokud dojde na laboratorní diagnostiku, stanovuje se volný testosteron a androgen, může se stanovit výpočtem biologicky dostupného testosteronu. Pro vyšetření je podstatné, aby žena vysadila hormonální antikoncepci minimálně tři měsíce před vyšetřením. Co se týče morfologie polycystických vaječnicků, vyšetření se provádí pomocí ultrazvuku, ale nemusí to být vždycky spolehlivé. [57]

V rámci léčby se mohou využívat antikoncepční přípravky, které dokážou ovlivnit menstruační cyklus a snížit výskyt hirsutismu. Antikoncepce dokáže zvýšit koncentraci globulinu vázajícího pohlavní hormony, ten se váže na testosteron, takže koncentrace volného testosteronu klesá a tím pádem se hirsutismus nevyskytuje v takové síle. Tyto léky mají ale závažné vedlejší účinky, především jejich vliv na koagulační systém se nesmí zanedbat, a proto nejsou tolik využívány. Výběr spironolaktonu se doporučuje pouze ženám, které již nejsou schopny oplodnění. Obecně se k léčbě PCOS využívají ty léky, které mají vliv na přidružené projevy (diabetes mellitus, poruchy metabolismu tuků, obezita, kardiovaskulární postižení aj.). Nové studie uvádí, že po podávání statinů pacientce s PCOS se zlepšily problémy související s cholesterolem a pohlavními funkcemi a snížila se hladina testosteronu i DHEA, nejspíše mají ale negativní vliv na metabolismus glukózy. [58, 60]

6 Laboratorní stanovení

Stanovení koncentrace hormonů a enzymů nezbytných pro tvorbu hormonů pocházejících z kůry nadledvin je rozhodující pro stanovení diagnózy onemocnění, která postihují nadledviny. Vyšetření se provádí jak z krve, moči, slin nebo vlasů. Testy prováděné pro diagnostiku jednotlivých onemocnění jsou zmíněny v kapitolách o onemocnění. V této kapitole se budu věnovat laboratorním metodám, které se pro stanovení hormonů nejvíce využívají. Nejčastěji se jedná o spektrometrické stanovení v kombinaci s chromatografickými metodami, od imunoanalytických metod se upouští ve specializovaných laboratořích pro jejich nízkou specifitu. [61]

6.1 Imunoanalytické metody

Imunoanalytické metody jsou stále hojně využívány, nejsou natolik finančně náročné oproti jiným metodám, ale jejich citlivost a specifita není na tak vysoké úrovni. Metod na principu imunotestů je několik, imunosorbentové metody s využitím enzymu i homogenní metody. Hormony steroidní povahy si jsou strukturálně velmi podobné, takže protilátky proti těmto hormonům využívané ke stanovení mohou reagovat i s jinými hormony než s těmi, které jsou potřebné pro diagnostiku. Zkříženou reakci poskytují metabolity těchto hormonů, které imunotesty nejsou schopny, na rozdíl od chromatografií, rozeznat. [62]

Pro steroidní hormony se používají především přímé imunoanalytické metody. Využívá se pevného nosiče, na kterém je navázána protilátka nebo antigen. Poté se přidá vzorek a nejčastěji enzymem značený antigen nebo protilátka, následuje promytí roztoku pro odstranění přebytečných, nenavázaných molekul. Přidá se substrát, dojde k měření barevného signálu, který je přímo úměrný zjišťované koncentraci. [63]

6.2 Plynová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií

Pro stanovení látek pomocí plynové chromatografie je nutné několik předreakčních kroků. Nejprve se oddělí steroidy od vzorku a následně zakoncentrují, nejčastěji se použije metoda extrakce na pevné fázi. V dalším kroku se odstraní pomocí kyselin nebo enzymů glukuronidy a sulfátové konjugáty, v těchto podobách se steroidní hormony vylučují. Pro plynovou

chromatografii je třeba, aby byly látky co nejméně polární, ale zároveň dostatečně těkavé. Toho se dosáhne silylačními činidly, která mají vliv na hydroxylové skupiny, které s vlastnostmi jako je polarita a těkavost souvisí, stejně tak jako ketonové skupiny. Derivatizací může dojít ke vzniku izomerů a hmotnost molekul se může zvýšit. Místo silylačních činidel se mohou využít acetáty nebo estery. Pro zvýšení citlivosti metody se využívá specializovaná metoda, která snižuje šum v pozadí. Tato metoda je oproti imunoanalytickým testům daleko náročnější, především časově, ale pro stanovení moči je vhodnější, co se týká specifity a citlivosti. Poté, co dojde k aplikaci vzorku do přístroje, je vzorek unášen plynou fází, jakmile dojde k setkání vzorku s fází stacionární na koloně, dochází k separaci. [64, 65]

Hlavním úkolem spektrometru využitého v této metodě je ionizovat molekuly ve vzorku a následně je stanovit pomocí poměru hmotnosti k náboji. Pro ionizaci se nejčastěji využívá elektrosprej, jehož výhodou je použití i pro polární sloučeniny. Pomocí kapiláry se aplikují vzorky do přístroje, poté jsou rozprašovány na malé kapičky s nábojem, z těchto kapiček se oddělí ionty. Na kapiláře je vloženo napětí o hodnotě přibližně 3–5 kV. Elektrosprej se řadí mezi zdroje, které dodávají molekulám malé množství energie. V případě silnější fragmentace se zvýší napětí ve zdroji. Molekuly s nábojem jsou unášeny do prostoru s vakuem. K analýze se nejčastěji využívá trojitý kvadrupólový spektrometr. První kvadrupól slouží jako filtr zajišťující přechod žádaného iontu na druhý kvadrupól. Ionty jsou „naváděny“, aby došlo k jejich fragmentaci pomocí srážky s inertním plynem. Dochází k tzv. disociaci vyvolané kolizí. Jako kolizní buňka se v tomto případě uvažuje kvadrupól, který udržuje nízký ale zároveň dostatečný tlak plynu a přenáší většinu fragmentovaných iontů. V případě trojitého kvadrupólového spektrometru se vloží kolizní buňka mezi dva kvadrupólové analyzátoři. Může se na tomto analyzátoru nastavit určitá hodnota poměru hmotnosti k náboji pro detekci anebo se může stanovit určité spektrum. [64, 66]

Jako další analyzátoři se používají analyzátor doby letu, iontové pasti a hybridní analyzátoři. Výsledkem je strukturální informace, která nám umožní identifikovat, o jakou látku se přesně jedná, čehož se využívá v toxikologii. Pro kvantitativní stanovení se používá metoda stabilního ředění izotopů, která je schopna potlačit interferující vlivy stanovení, které by mohly způsobit falešný výsledek. [64, 66]

6.3 Kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií

Tato metoda je v laboratořích využívána čím dál častěji. Při diagnostice onemocnění souvisejících s poruchou kůry nadledvin je nutné detekovat i meziprodukty a enzymy, které se podílí na tvorbě konečných forem glukokortikoidů, mineralokortikoidů a androgenů. Slouží nejen k detekci tělních metabolitů, ale také pro sledování farmakologických metabolitů v těle, třeba v rámci dopingových testů. Meziprodukty a enzymy jsou v těle ve velmi nízkých hodnotách, které jsou těžce detekovatelné, ale kapalinová chromatografie v kombinaci se spektrometrií má vysokou specifitu oproti testům na principu imunologie. Další výhodou této metody je schopnost stanovit více analytů naráz, i přesto, že objem vzorků je menší, než by vyžadovaly jiné metody. Na rozdíl od plynové chromatografie není preanalytická fáze tolik náročná. Nevýhodou jsou matricové efekty, které vedou k nežádoucím supresím iontů. Výběr této techniky pro stanovení aldosteronu není vhodný, protože se těžko ionizuje. Pomocí úprav v metodě ale lze dosáhnout správného výsledku. Citlivost metody se dá pro některé analyty zvýšit derivatizací. V rámci studií se přechází na metody ultra-vysoce účinné kapalinové chromatografie. [61, 67]

Po přijetí vzorku do laboratoře, zapsání do laboratorního informačního systému se provede úprava vzorku. Během této preanalytické fáze je třeba odstranit, všechny nežádoucí molekuly, které by mohly narušit průběh stanovení (např. proteiny), a také ty molekuly, jako například fosfolipidy, které by mohly vyvolat matricový efekt. Nejlepší variantou je, když s odstraněním těchto nežádoucích látek dojde k zakoncentrování vzorku. Využívají se metody ředění (pro vzorky moče), deproteinace vzorku (plazma, krev, sérum), extrakce z kapaliny do kapaliny, pomocí extrakční platiny, využití média pro separaci fosfolipidů, extrakce na pevné fázi a její různé modifikace. Může se provádět i kombinace procesů nebo se používají v závislosti na sobě. [68]

Jako mobilní fáze v rámci kroku chromatografické separace se používají látky jako např. methanol, ethanol nebo chloroform v kombinaci s pufrům. Pro zajištění správné ionizace, která poté následuje, je nutné vyvarovat se použití pufru s anorganickými molekulami a fluorovanými karboxylovými kyselinami. Naopak pufrů s přídavkem organických látek (př. mravenčan amonný) ionizaci za pomoci

elektrospreje podporuje. U vzorků moče se v některých laboratořích využívá metoda bez chromatografické separace. Detekce pomocí spektrometrie probíhá na principu popsaném u plynové chromatografie. [66, 67]

7 Závěr

Tématem mé bakalářské práce byly poruchy související s hormony, které produkuje kůra nadledvin. Popsala jsem stavbu kůry nadledvin, princip sekrece hormonů. U každé skupiny hormonů jsem uvedla, jakým způsobem vznikají a v těle působí. Dále jsem se věnovala popisu onemocnění, která s těmito hormony souvisí, jejich diagnostice a léčbě. Zmínila jsem se i o zneužívání těchto hormonů v podobě farmakologických přípravků. Uvedla jsem nejčastější metody využívané pro stanovení hormonů.

Všechny zmíněné hormony jsou pro správný průběh biochemických procesů v těle nezbytné. Jejich výchozí molekulou je cholesterol, proto je třeba jeho dostatečné množství v těle a také správné fungování enzymů, které se na vzniku konečných produktů podílí.

Onemocnění mohou mít původ buď v samotné kůře, nebo v systémech, které stimulují jejich tvorbu. Základní rozdělení je tedy na primární a sekundární. Projevy onemocnění jsou charakteristické, a také vizuálně dost viditelné. Vědci se snaží objasnit přesný průběh reakcí vedoucích k onemocnění, ale spousta příčin je stále ještě neobjasněných. Vyvíjí se léky, které napomáhají člověku k tomu, aby mohl vést plnohodnotný život bez handicapu a případné recidivy. Důležitá je včasná diagnóza.

Malé nemocniční laboratoře používají pro stanovení hormonů imunoanalytické metody. Kombinace spektrometrie s chromatografií je finančně velmi nákladná, a tak se tato metoda používá jen ve specializovaných laboratořích. Citlivost a specifita je ale daleko vyšší než v případě imunoanalytických metod.

Zdroje

- [1] ČIHÁK R, GRIM M. *Anatomie 2., 2., upr.dopl. vyd vyd.* Praha: Grada, 2002. ISBN isbn80-247-0143-x.
- [2] MEHTA S. C, KAR A. Regulation of Secretion. In: *Pharmaceutical Pharmacology* [online]. B.m.: New Academic Science, nedatováno. ISBN 978-1-78183-068-0. [cit. 2019-11-05]. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt011NODD6/pharmaceutical-pharmacology/regulation-secretion>
- [3] WILD D.G. Clinical Disorders. In: *Immunoassay Handbook - Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques (4th Edition)* [online]. B.m.: Elsevier, 2013. ISBN 978-0-08-097037-0. [cit. 2019-11-05]. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00BK6SQ8/immunoassay-handbook/the-adrena-clinical-disorders>
- [4] PANINI, SANKHAVARAM R. *Medical biochemistry: an illustrated review. I.* New York: Thieme, 2013. ISBN 978-1-60406-316-5.
- [5] Struktura cholesterolu [online]. [cit. 2019-11-10]. Dostupné z: <https://www.vscht.cz/images/0!0/uzel/45346/0001~~808q0IMwVNBVKC4pKs0uKS1KVEjOyM9JLS5JLcrPKQUA.jpg>
- [6] Struktura pregnenolonu [online]. [cit. 2019-11-10]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/imgsrv.fcgi?cid=8955&t=l>
- [7] Struktura progesteronu [online]. [cit. 2020-05-19]. Dostupné z: https://ourpharmacompanytestsite.weebly.com/uploads/2/6/4/4/26444126/4212525_orig.jpg
- [8] MCQUEEN ChA., BOND J, RAMOS K, et al. Adrenocortical Steroidogenesis. In: *Comprehensive Toxicology, Volumes 1-14 (2nd Edition)* [online]. B.m.: Elsevier, nedatováno. ISBN 978-0-08-046868-6. [cit. 2019-12-03]. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt0084HOOA/comprehensive-toxicology/adrenocortical-steroidogenesis>
- [9] ANTONIOU-TSIGKOS A, ZAPANTI E, GHIZZONI L, et al. Adrenal Androgens. *Endotext* [online]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc., 2000. [cit. 2020-1-04]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278929/>
- [10] TIMMERMANS S, SOUFFRIAU J, LIBERT C. A General Introduction to Glucocorticoid Biology. *Frontiers in Immunology* [online]. 2019, **10**. [cit. 2019-11-10]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2019.01545
- [11] Struktura kortizolu [online]. [cit. 2020-11-10]. Dostupné z: <https://www.arborassays.com/assets/cortisol-structure.jpg>

- [12] RAFF H, SHARMA ST, NIEMAN LK. Physiological Basis for the Etiology, Diagnosis, and Treatment of Adrenal Disorders: Cushing's Syndrome, Adrenal Insufficiency, and Congenital Adrenal Hyperplasia. *Comprehensive Physiology* [online]. 2014, **4**(2), 739–769. ISSN 2040-4603.[cit. 2020-03-1]. Dostupné z: doi:10.1002/cphy.c130035
- [13] OAKLEY, RH, CIDLOWSKI JA. The Biology of the Glucocorticoid Receptor: New Signaling Mechanisms in Health and Disease. *The Journal of allergy and clinical immunology* [online]. 2013, **132**(5), 1033–1044. ISSN 0091-6749. [cit. 2020-02-27]. Dostupné z: doi:10.1016/j.jaci.2013.09.007
- [14] PARRY T, LEDEE D, WILLIS MS, et al. Nuclear Receptors and the Adaptive Response of the Heart. *Endocrinology of the Heart in Health and Disease* [online]. B.m.: Academic Press, 2017. s. 249–284. ISBN 978-0-12-803111-7. [cit. 2020-03-02]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-803111-7.00010-5
- [15] WALLE DG, SAMPSON AP. Corticosteroids (glucocorticoids and mineralocorticoids). *Medical Pharmacology and Therapeutics (Fifth Edition)* [online]. B.m.: Elsevier, 2018. s. 503–511. ISBN 978-0-7020-7167-6. [cit. 2020-03-02]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-7020-7167-6.00044-0
- [16] VERNEC A, SLACK A, HARCOURT PR, et al. Glucocorticoids in elite sport: current status, controversies and innovative management strategies—a narrative review. *British Journal of Sports Medicine* [online]. 2020, **54**(1), 8–12. ISSN 0306-3674. [cit. 2020-03-06]. Dostupné z: doi:10.1136/bjsports-2018-100196
- [17] SCHERHOLZ ML, SCHLESINGER N, ANDROULAKIS IP. Chronopharmacology of glucocorticoids. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2019, **151–152**, Editor's Collection 2019, 245–261. ISSN 0169-409X. [cit. 2020-03-06]. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2019.02.004
- [18] LOTFI CFP, KREMER JL, DOS SANTOS PASSAIA B, et al. The human adrenal cortex: growth control and disorders. *Clinics* [online]. 2018, **73**(Suppl 1). ISSN 1807-5932. [cit. 2020-03-12]. Dostupné z: doi:10.6061/clinics/2018/e473s
- [19] SAVERINO S, FALORNI A. Autoimmune Addison's disease. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* [online]. 2020, 101379. ISSN 1521-690X. [cit. 2020-03-12]. Dostupné z: doi:10.1016/j.beem.2020.101379
- [20] BELLO MO, GARLA VV.. Polyglandular Autoimmune Syndrome Type I. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2020 [vid. 2020-03-12]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537211/>
- [21] HELLESEN A, BRATLAND E, HUSEBYE ES. Autoimmune Addison's disease – An update on pathogenesis. *Annales d'Endocrinologie* [online]. 2018, **79**(3), Klotz Communications 2018 : Cortisol and all its disorders Klotz Communications 2018 : Le Cortisol et tous ses dérèglements, 157–

163. ISSN 0003-4266. [2020-03-12]. Dostupné z:
doi:10.1016/j.ando.2018.03.008
- [22] DINEEN R, THOMPSON CHJ, SHERLOCK M. Adrenal crisis: prevention and management in adult patients. *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism* [online]. 2019, **10**, 2042018819848218. ISSN 2042-0188. [cit. 2020-03-18]. Dostupné z: doi:10.1177/2042018819848218
- [23] BROOKE AM, JP. Addison's disease. *Medicine* [online]. 2017, **45**(8), 492–496. ISSN 1357-3039. [cit. 2020-03-18]. Dostupné z:
doi:10.1016/j.mpmed.2017.05.006
- [24] BARTHEL A, BENKER G, BERENS K, et al. An Update on Addison's Disease. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* [online]. 2019, **127**(02/03), 165–175. ISSN 0947-7349, 1439-3646. [cit. 2020-03-18]. Dostupné z: doi:10.1055/a-0804-2715
- [25] BARBOT M, ZILIO M, SCARONI C. Cushing's syndrome: Overview of clinical presentation, diagnostic tools and complications. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* [online]. 2020, 101380. ISSN 1521-690X. [cit. 2020-03-20]. Dostupné z:
doi:10.1016/j.beem.2020.101380
- [26] DELIVANIS DA, SHARMA A, HAMIDI O, et al. Advances in the Diagnosis and Medical Management of Cushing's Syndrome. In: Alexander L. SHIFRIN, ed. *Advances in Treatment and Management in Surgical Endocrinology* [online]. B.m.: Elsevier, 2020. s. 151–174. ISBN 978-0-323-66195-9. [cit. 2020-03-20]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-66195-9.00015-7
- [27] RAGNARSSON O. Cushing's syndrome – Disease monitoring: Recurrence, surveillance with biomarkers or imaging studies. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* [online]. 2020, 101382. ISSN 1521-690X. [cit. 2020-03-20]. Dostupné z:
doi:10.1016/j.beem.2020.101382
- [28] CAREY RM, PADIA SH. Primary Mineralocorticoid Excess Disorders and Hypertension. *Endocrinology: Adult and Pediatric (Seventh Edition)* [online]. Philadelphia: W.B. Saunders, 2016. s. 1871-1891.e6. ISBN 978-0-323-18907-1. [cit. 2020-03-22]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-18907-1.00108-6
- [29] SCOTT JH, MENOVAR MH, DUNN RJ. Physiology, Aldosterone. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2020 [cit. 2020-03-22]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470339/>
- [30] Struktura aldosteronu [online]. [cit. 2020-03-22]. Dostupné z:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/imgsrv.fcgi?cid=5839&t=1>
- [31] BAUDRAND R, POJOGA L, ROMERO JR. Aldosterone's Mechanism of Action: Genomic and Nongenomic Signaling. In: Ajay K. SINGH a Gordon H. WILLIAMS, ed. *Textbook of Nephro-Endocrinology (Second Edition)*

- [online]. B.m.: Academic Press, 2018. s. 173–188. ISBN 978-0-12-803247-3. [cit. 2020-03-22]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-803247-3.00010-6
- [32] ROSSI GP, CAROCCIA B, SECCIA TM. Role of estrogen receptors in modulating aldosterone biosynthesis and blood pressure. *Steroids* [online]. 2019, **152**, 108486. ISSN 0039-128X. [cit. 2020-03-23]. Dostupné z: doi:10.1016/j.steroids.2019.108486
- [33] BERTOCCHIO, Jean-Philippe, David G. WARNOCK a Frederic JAISSER. Mineralocorticoid receptor activation and blockade: an emerging paradigm in chronic kidney disease. *Kidney International* [online]. 2011, **79**(10), 1051–1060. ISSN 0085-2538. [cit. 2020-03-23]. Dostupné z: doi:10.1038/ki.2011.48
- [34] BARRERA-CHIMAL, JAISSER JF. Vascular mineralocorticoid receptor activation and disease. *Experimental Eye Research* [online]. 2019, **188**, 107796. ISSN 0014-4835. [cit. 2020-03-23]. Dostupné z: doi:10.1016/j.exer.2019.107796
- [35] SANTESE G, STEFANIO C, BELLETTI G, et al. The role of aldosterone receptor blocker therapy in hypertension and heart failure. *IJC Metabolic & Endocrine* [online]. 2015, **8**, 34–37. ISSN 2214-7624. [cit. 2020-03-24]. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijcme.2014.10.010
- [36] DOMINGUEZ A, MUPPIDI V, GUPTA S. Hyperaldosteronism. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2020 [cit. 2020-03-24]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499983/>
- [37] SHEN H, XU Z, LI Q. New advances in the diagnosis of primary aldosteronism. *Chronic Diseases and Translational Medicine* [online]. 2020, **6**(1), 1–5. ISSN 2095-882X. [cit. 2020-03-24]. Dostupné z: doi:10.1016/j.cdtm.2019.12.009
- [38] PARMAR MS, SINGH S. Conn Syndrome. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2020 [cit. 2020-03-25]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459197/>
- [39] OMATA K, SATOH F, MORIMOTO R, et al.. CELLULAR AND GENETIC CAUSES OF IDIOPATHIC HYPERALDOSTERONISM. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* [online]. 2018, **72**(4), 874–880. ISSN 0194-911X. [cit. 2020-03-27]. Dostupné z: doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11086
- [40] VOLPE C, HAMBERGER B, ZEDENIUS J, et al. Impact of immunohistochemistry on the diagnosis and management of primary aldosteronism: An important tool for improved patient follow-up. *Scandinavian Journal of Surgery* [online]. 2020, **109**(2), 133–142. ISSN 1457-4969. [cit. 2020-03-27]. Dostupné z: doi:10.1177/1457496918822622
- [41] FUNDER J. Primary aldosteronism: Treatment of the disease, and new therapeutic approaches. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* [online]. 2020, **34**(2), Endocrine hypertension, 101368. ISSN

- 1521-690X. [cit. 2020-03-27]. Dostupné z:
doi:10.1016/j.beem.2019.101368
- [42] LECHNER B, LECHNER K, HEINRICH D, et al. Medical treatment of primary aldosteronism. *European Journal of Endocrinology* [online]. 2019, **181**(4), R147–R153. ISSN 0804-4643. [cit. 2020-03-27]. Dostupné z:
doi:10.1530/EJE-19-0215
- [43] *Struktura DHEA* [online]. [cit. 2020-05-17]. Dostupné z:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/imgsrv.fcgi?cid=5881&t=l>
- [44] STÁRKA L, DUŠKOVÁ M, HILL M. Dehydroepiandrosterone: A neuroactive steroid. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* [online]. 2015, **145**, DHEA (dehydroepiandrosterone) and sex steroid formation (intracrinology), 254–260. ISSN 0960-0760. [cit. 2020-05-18]. Dostupné z: doi:10.1016/j.jsbmb.2014.03.008
- [45] PROUGH RA, CLARK BJ, KLINGE CM. Novel mechanisms for DHEA action. *Journal of Molecular Endocrinology* [online]. 2016, **56**(3), R139–R155. ISSN 1479-6813, 0952-5041. [cit. 2020-05-18]. Dostupné z:
doi:10.1530/JME-16-0013
- [46] YOKOKAWA T, SATO K, NARUSAWA R, et al. Dehydroepiandrosterone activates 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase and suppresses lipid accumulation and adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2020, **528**(3), 612–619. ISSN 0006-291X. [cit. 2020-05-21]. Dostupné z:
doi:10.1016/j.bbrc.2020.05.136
- [47] OGINO Y, MIYAGAWA S, IGUCHI T. Dehydroepiandrosterone. *Handbook of Hormones* [online]. San Diego: Academic Press, 2016. s. 513–514. ISBN 978-0-12-801028-0. [cit. 2020-05-21] Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-801028-0.00223-3
- [48] BENTLEY C, HAZELDINE J, GREIG C, et al. Dehydroepiandrosterone: a potential therapeutic agent in the treatment and rehabilitation of the traumatically injured patient. *Burns & Trauma* [online]. 2019, **7**. ISSN 2321-3868. [cit. 2020-06-13]. Dostupné z: doi:10.1186/s41038-019-0158-z
- [49] SAHU P, GIDWANI B, DHONGADE HJ. Pharmacological activities of dehydroepiandrosterone: A review. *Steroids* [online]. 2020, **153**, 108507. ISSN 0039-128X. [cit. 2020-06-13]. Dostupné z:
doi:10.1016/j.steroids.2019.108507
- [50] PESCE G, TRIEBNER K, VAN DER PLAAT DA, et al. Low serum DHEA-S is associated with impaired lung function in women. *EClinicalMedicine* [online]. 2020, **23**, 100389. ISSN 2589-5370. [cit. 2020-06-13]. Dostupné z:
doi:10.1016/j.eclinm.2020.100389
- [51] MOMODU II, SINGH G. Congenital Adrenal Hyperplasia. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2020 [cit. 2020-06-22]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448098/>

- [52] ASLAKSEN S, METHLIE P, VIGELAND MD, et al. Coexistence of Congenital Adrenal Hyperplasia and Autoimmune Addison's Disease. *Frontiers in Endocrinology* [online]. 2019, **10**. ISSN 1664-2392. [cit. 2020-06-22]. Dostupné z: doi:10.3389/fendo.2019.00648
- [53] KOCOVA M, ANASTASOVSKA V, FALHAMMAR H. Clinical outcomes and characteristics of P30L mutations in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocrine* [online]. 2020. ISSN 1355-008X. [cit. 2020-06-22]. Dostupné z: doi:10.1007/s12020-020-02323-3
- [54] HADDAD NG, EUGSTER EA. Peripheral precocious puberty including congenital adrenal hyperplasia: causes, consequences, management and outcomes. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* [online]. 2019, **33**(3), Puberty, 101273. ISSN 1521-690X. [cit. 2020-06-24]. Dostupné z: doi:10.1016/j.beem.2019.04.007
- [55] GRECSO N, ZADORI A, SZECSEI I, et al. Storage stability of five steroids and in dried blood spots for newborn screening and retrospective diagnosis of congenital adrenal hyperplasia. *Plos One* [online]. 2020, **15**(5), e0233724. ISSN 1932-6203. [cit. 2020-06-25]. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0233724
- [56] WITCHEL SF. Congenital Adrenal Hyperplasia. *Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology* [online]. 2017, **30**(5), 520–534. ISSN 1083-3188. [cit. 2020-06-27]. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpag.2017.04.001
- [57] MUMUSOGLU S, YILDIZ BO. Polycystic ovary syndrome phenotypes and prevalence: Differential impact of diagnostic criteria and clinical versus unselected population. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research* [online]. 2020, **12**, 66–71. ISSN 2451-9650. [cit. 2020-06-27]. Dostupné z: doi:10.1016/j.coemr.2020.03.004
- [58] YANG S, GU YY, Fei JING, YU CHX, et al. The Effect of Statins on Levels of Dehydroepiandrosterone (DHEA) in Women with Polycystic Ovary Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* [online]. 2019, **25**, 590–597. ISSN 1234-1010. [cit. 2020-06-27]. Dostupné z: doi:10.12659/MSM.914128
- [59] MASCARENHAS M, BALEN AH. Treatment update for anovulation and subfertility in polycystic ovary syndrome. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research* [online]. 2020, **12**, 53–58. ISSN 2451-9650. [cit. 2020-06-29]. Dostupné z: doi:10.1016/j.coemr.2020.03.003
- [60] GLINTBORG D, ANDERSEN M. Medical treatment and comorbidity in polycystic ovary syndrome: An updated review. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research* [online]. 2020, **12**, 33–40. ISSN 2451-9650. [cit. 2020-06-29]. Dostupné z: doi:10.1016/j.coemr.2020.02.014
- [61] STORBECK KH, GILLIGAN L, JENKINSON C, et al. The utility of ultra-high performance supercritical fluid chromatography–tandem mass

- spectrometry (UHPSFC-MS/MS) for clinically relevant steroid analysis. *Journal of Chromatography B* [online]. 2018, **1085**, 36–41. ISSN 1570-0232. [cit. 2020-06-30]. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2018.03.033
- [62] KRASOWSKI MD, DREES D, MORRIS CS, et al. Cross-reactivity of steroid hormone immunoassays: clinical significance and two-dimensional molecular similarity prediction. *BMC Clinical Pathology* [online]. 2014, **14**, 33. ISSN 1472-6890. [cit. 2020-07-01]. Dostupné z: doi:10.1186/1472-6890-14-33
- [63] AYDIN S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides* [online]. 2015, **72**, Festschrift to highlight the career of Abba J. Kastin as a founding editor, researcher, and educator in the peptide field, 4–15. ISSN 0196-9781. [2020-07-01]. Dostupné z: doi:10.1016/j.peptides.2015.04.012
- [64] MCDONALD JG, MATTHEW S, AUCHUS RJ. Steroid Profiling by Gas Chromatography–Mass Spectrometry and High Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry for Adrenal Diseases. *Hormones & cancer* [online]. 2011, **2**(6), 324–332. ISSN 1868-8497. [cit. 2020-07-02]. Dostupné z: doi:10.1007/s12672-011-0099-x
- [65] CONKLIN SE, KNEZEVIC CE. Advancements in the gold standard: Measuring steroid sex hormones by mass spectrometry. *Clinical Biochemistry* [online]. 2020. ISSN 0009-9120. [cit. 2020-07-02]. Dostupné z: doi:10.1016/j.clinbiochem.2020.03.008
- [66] PITT JJ. Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *The Clinical Biochemist Reviews*. 2009, **30**(1), 19–34. ISSN 0159-8090.
- [67] TRAVERS S, MARTINERIE L, BOUVATTIER C, et al. Multiplexed steroid profiling of gluco- and mineralocorticoids pathways using a liquid chromatography tandem mass spectrometry method. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* [online]. 2017, **165**, 202–211. ISSN 0960-0760. [cit. 2020-07-02]. Dostupné z: doi:10.1016/j.jsbmb.2016.06.005
- [68] STONE J. A practical guide to sample preparation for liquid chromatography-tandem mass spectrometry in clinical research and toxicology. 2018, **30**(6), 5.