

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie živočichů

**Neuroaktivní steroidy v lidské fyziologii a patofyziologii
(těhotenství a porod)**

Neuroactive steroids in human physiology and pathophysiology
(pregnancy and parturition)

Jana Kubátová



Diplomová práce

Praha, 2010

Školitel: Ing. Martin Hill, DrSc.

Tato diplomová práce je součástí studií podpořených Interní grantovou agenturou Ministerstva zdravotnictví (Změny profilu steroidů a jejich neuroaktivních metabolitů ve vztahu k predikci termínu porodu - NS/9834-4 a Neuroaktivní steroidy v diagnostice poporodních duševních poruch - 9790-4)

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením svého školitele Ing. Martina Hilla, DrSc. na Endokrinologickém ústavu s použitím uvedených literárních pramenů.

V Praze dne.....

.....

podpis

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala Ing. Martinu Hillovi, DrSc. za pomoc, podporu a odborné rady při vypracování mé diplomové práce. Za technickou výpomoc v laboratoři děkuji Martě Velíkové.

Abstrakt

Diplomová práce je zaměřena na hodnocení steroidního metabolomu v tělních tekutinách z hlediska fyziologie lidského těhotenství a porodu.

Výsledky dosažené v rámci diplomové práce vedou k následujícím závěrům:

1. Podporují tezi o zásadním významu kortikoliberinu pro načasování lidského porodu skrze stimulaci steroidogenezy ve fetální zóně fetální nadledviny (FZ). Změny steroidního metabolomu však mnohem lépe predikují načasování porodu, než změny hladin kortikoliberinu.
2. Distribuce izoform placentárních oxidoreduktáz zřejmě určuje převahu oxidovaných forem pohlavních steroidů a neuroaktivních steroidů (NAS) u fétu a naopak převahu redukováných forem těchto látek u matky. Tento mechanismus zásadně ovlivňuje bioaktivitu steroidů. Výsledky naznačují roli NAS při udržení těhotenství, jejich analgetický efekt okolo porodu a jejich úlohu v patofyziologii poporodních depresí.

Abstract

The present diploma thesis is focused on the evaluation of steroid metabolome in body fluids in human pregnancy and parturition and also concentrates on the estimation of steroids in men with epilepsy (MWE) regarding the influence of epilepsy and its treatment with antiepileptic drugs (AEDs).

The results obtained eventuate to the following conclusions:

1. They support the proposition about the key importance of corticoliberin for the timing of human parturition via stimulation of the steroidogenesis in the fetal zone of the fetal adrenal (FZ). Changes in steroid levels, however, much better predict the timing of parturition than the variation in corticoliberin.
2. The distribution of isoforms of placental oxidoreductases determines the excess of oxidized forms of the sex steroids and NAS in the fetus and the excess of their reduced forms in mother. This mechanism fundamentally affects the steroid bioactivity. The results indicate the role of NAS in pregnancy sustaining, their analgesic effect around parturition and their role in the pathophysiology of postpartum blues.

OBSAH

1.	Úvod	9
2.	Teoretický přehled	10
2.1.	Historie	10
2.2.	Chemická struktura NS	10
2.3.	Biosyntéza NAS.....	11
2.3.1.	Enzymy podílející se na biosyntéze NAS	12
2.4.	Mechanismus účinku NAS	14
2.4.1.	Negenomové účinky	14
2.4.2.	Genomové účinky	17
2.5.	Úloha NAS v těhotenství	17
2.5.1.	Role kortikoliberinu (CRH).....	18
2.5.2.	Role progesteronu v udržení těhotenství	18
2.5.3.	Oxidoredukční rovnováha u steroidů v mateřském a fetálním kompartmentu..	19
2.5.4.	Rovnováhy mezi konjugovanými a volnými neuroaktivními steroidy	22
2.5.5.	NAS a jejich úloha při porodu.....	25
3.	Cíle diplomové práce.....	26
4.	Materiál a metodika	27
4.1.	Účastnice studie	27
4.2.	Sběr vzorků.....	27
4.3.	Roztoky a chemikálie.....	27
4.4.	Měřicí zařízení	27
4.5.	Princip GC-MS.....	28
4.6.	Měřené steroidy.....	29
4.7.	Příprava vzorků pro GC-MS systém.....	30
4.8.	Statistická analýza dat	31
4.8.1.	Matematický popis OPLS modelu	31
5.	Výsledky.....	33
5.1.	Vyhodnocení prediktivní hodnoty steroidů pro odhad gestačního věku a nástupu porodu.....	33
5.2.	Ověření hypotézy o klíčovém vlivu distribuce placentárních oxidoreduktáz na difference v zastoupení aktivních forem pohlavních hormonů a neurosteroidů v cirkulaci matky a plodu.....	40
6.	Diskuse	43
6.1.	Vyhodnocení prediktivní hodnoty steroidů pro odhad gestačního věku a nástupu porodu (cíl č.1)	43
6.2.	Ověření hypotézy o klíčovém vlivu distribuce placentárních oxidoreduktáz na difference v zastoupení aktivních forem pohlavních hormonů a neurosteroidů v cirkulaci matky a plodu (cíl č. 2)	44
7.	Závěr.....	46
8.	Seznam použité literatury	47
9.	Přílohy.....	52
9.1.	Informovaný souhlas	
9.2.	článek Hill a kol. 2010	

Seznam použitých zkratek

Δ^4 steroidy	3-oxo-4-en steroidy
Δ^5 steroidy	3 β -hydroxy-5-en steroidy
3α-THDOC	3 α -tetrahydrodeoxykortikosteron
17βHSD	17 β -hydroxysteroidní dehydrogenáza
A2	androstendion
A216α	16 α -hydroxyandrostendion
A3α5α	androsteron
A3α5α17βC	5 α -androstan-3 α ,17 β -diol
A3α5β	etiocholanolon
A3α5β17βC	5 β -androstan-3 α ,17 β -diol, androstandiol
A3β5α	epiandrosteron
A3β5αC	polární konjugáty epiandrosteronu
A3β5α17βC	5 α -androstan-3 β ,17 β -diol
A3β5β	epietiocholanolon
A3β5β17βC	5 β -androstan-3 β ,17 β -diol
Ab	protilátka (antibody)
ACTH	adrenokortikotropní hormon
Adiol	5-androsten-3 β ,17 β -diol
AEDs	antiepileptická léčiva (antiepileptic drugs)
Ag	antigen
AT7α	5-androsten-3 β ,7 α ,17 β -triol
AT7β	5-androsten-3 β ,7 β ,17 β -triol
BMI	index tělesné hmotnosti (body mass index)
DHT	5 α -dihydrotestosteron
E1	estron
E116α	16 α -hydroxyestron
E2	estradiol
E3	estriol
FSH	folikuly stimulující hormon
FZ	fetální zóna fetální nadledviny

GC-MS	plynová chromatografie s hmotovou detekcí (gas chromatography-mass spectrometry)
CNS	centrální nervová soustava
CRH	kortikoliberin
DHEA	dehydroepiandrosteron
DHEA7α	7 α -hydroxy-dehydroepiandrosteron
DHEA7β	7 β -hydroxy-dehydroepiandrosteron
DHEA16α	16 α -hydroxy-dehydroepiandrosteron
DHEAS	dehydroepiandrosteron sulfát
DOC	deoxykortikosteron
IRMA	imunoradiometrické stanovení (immunoradiometry)
LH	luteinizační hormon
MOX	methoxyaminhydrochlorid
NAS	neuroaktivní steroidy
NS	neurosteroidy
OPLS	ortogonální projekce do latentních struktur
P3α5α	allopregnanolon
P3α5α20α	5 α -pregnan-3 α ,20 α -diol
P3β5α	isopregnanolon
P3β5α20α	5 α -pregnan-3 β ,20 α -diol
P5α	5 α -dihydroprogesteron
P5α20α	5 α ,20 α -tetrahydroprogesteron
P5β	5 β -dihydroprogesteron
P5β20α	5 β ,20 α -tetrahydroprogesteron
P3α5β	pregnanolon
P3α5β20α	5 β -pregnan-3 α ,20 α -diol
P3β5β	epipregnanolon
P3β5β20α	5 β -pregnan-3 β ,20 α -diol
PCOS	syndrom polycystických ovarií
PKC	proteinkináza C
Preg	pregnenolon
Preg7α	7 α -hydroxypregnenolon

Preg7β	7 β -hydroxypregnenolon
Preg16α	16 α -hydroxypregnenolon
Preg17	17-hydroxypregnenolon
Preg20α	20 α -hydroxypregnenolon
PregS	pregnenolonsulfát
Prog	progesteron
Prog16α	16 α -hydroxyprogesteron
Prog17	17-hydroxyprogesteron
Prog20α	20 α -dihydroprogestron
RIA	radioimunochemické stanovení (radioimmunoassay)
SHBG	pohlavní hormony vázající globulin
T	testosteron
T16α	16 α -hydroxytestosteron

1. Úvod

Steroidy jsou látky lipofilní povahy, které mohou prostupovat hematoencefalickou bariérou. Kromě klasických hormonálních funkcí, mohou působit i na nervovou soustavu a to rovněž prostřednictvím vazby na intracelulární receptory a následné regulace genové exprese. Jsou také schopny vázat se i na membránové receptory a tak ovlivňovat excitabilitu neuronu [1]. Tato skupina se nazývá neuroaktivní steroidy (NAS) a zahrnuje jak steroidy periferního původu, tak steroidy syntetizované přímo v nervové soustavě - neurosteroidy. Biologická odpověď způsobená tímto typem regulace je velice rychlá, řádově jde o sekundy. Při fyziologických podmínkách ovlivňují NAS široké spektrum behaviorálních funkcí, jako je sexuální chování, odpovědi na stres, emoce, paměť a kognici [2-6].

V těhotenství jsou hladiny pohlavních steroidů a NAS extrémně zvýšené. V případě pohlavních steroidů jsou jejich funkce dobře známé a v případě neuroaktivních steroidů jsou dobře prozkoumány přinejmenším jejich obecné fyziologické účinky. Na druhé straně však, nejen v případě NAS, ale i v případě těhotenských steroidů obecně existuje stále mnoho otázek ohledně jejich vzniku a reálného vlivu na fyziologii a patofyziologii lidského těhotenství a porodu. Stále chybí komplexní metabolomický přístup k této problematice vedoucí k zodpovězení těchto nejasností. Situace je navíc komplikována jedinečností mechanismu ovlivňujícího trvání gestace u lidí. Studium na lidských modelech je eticky nepřijatelné a adekvátnost výsledků získaných na laboratorních zvířatech je problematická. V této situaci může cenné informace přinést metabolomický přístup s využitím tělních tekutin matky a eventuálně plodu, kde však již rovněž narážíme na otázky etiky.

Ve své diplomové práci jsem se zaměřila na získání výše uvedených chybějících informací na základě vývoje steroidního metabolomu v tělních tekutinách matky a plodu v závislosti na gestačním věku. Vzorky získané od ženských dobrovolnic při předčasných porodech, byly vybrány tak, aby pravděpodobnost vlivu steroidů na jejich iniciaci byla minimální. Snahou našeho týmu bylo, aby steroidní spektrum žen a plodů v okamžiku předčasných porodů co nejvíce odpovídalo srovnatelnému gestačnímu věku žen, které však rodily později v termínu a bez komplikací.

Výsledky by mohly pomoci odhadnout význam NAS v prenatalní diagnostice vzhledem k riziku či předčasného porodu.

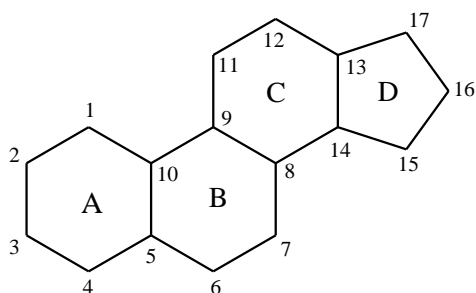
2. Teoretický přehled

2.1. Historie

Již ve 40. letech minulého století Hans Selye prokázal anestetický efekt progesteronu (Prog) a deoxykortikosteronu (DOC) a označil jejich 3 α -hydroxymetabolity s redukováným A kruhem za extrémně účinné utišující a uspávací látky [7]. Ačkoli tyto výsledky byly velmi slibné, v dalších letech nedošlo k žádnému většímu pokroku ohledně mechanismu působení těchto látek a jejich využití v klinické praxi. Až v 70. letech Gyermek a Soyka diskutují využití steroidů jako anestetik [8] a Lawrence a kol. přicházejí s hypotézou o interakci steroidních anestetik s lipidovou vrstvou neuronálních membrán [9]. Konkrétnější byl o 3 roky později Barker a kol., kteří prokázali vliv pentobarbitonu, krátkodobě působícího barbiturátu, na excitabilitu buněk skrze modulaci GABA_A receptorů [10]. Později bylo prokázáno i u metabolitů Prog a DOC, jmenovitě 3 α ,5 α -tetrahydroprogesteronu (P3 α 5 α , allopregnanolon) a 3 α ,5 α -tetrahydrodeoxykortikosteronu (3 α -THDOC), že účinkují jako modulátory GABA_A receptorů a interagují se stejným či podobným vazebným místem jako barbituráty [11]. Tímto byl zahájen intenzivní výzkum účinků neuroaktivních steroidů na GABA_A receptory [1, 12-15]. Dále byly zjištěny účinky NAS také na glycinové [16], NMDA [17-18], nikotinové acetylcholinové receptory [19] či receptory spřažené s G-proteiny [20]. Termín „neurosteroid“ (NS) byl v české literatuře poprvé použit v roce 1980 [21], v zahraničí o rok později [22] a označuje steroidy, které ovlivňují nervovou soustavu a jsou zde také syntetizovány *de novo*. Vyskytují se tedy v nervové soustavě i za nepřítomnosti steroidogenních žláz. NAS zahrnují všechny steroidy, které ovlivňují nervovou aktivitu, bez ohledu na místo jejich syntézy [1].

2.2. Chemická struktura NS

Jako steroidy se označují látky s cyklopentanoperhydrofenantrenovým skeletem složeným ze 4 kruhů (Obr. 1). Jsou to látky ve vodě málo rozpustné, lipofilní. Mohou tedy snadno přecházet přes hematoencefalickou bariéru. Jejich rozpustnost v cirkulaci se naopak zvyšuje, pokud jsou ve formě esterů s kyselinou sírovou, sulfátů, příp. ve formě glukuronidů.



Obr.1 Cyklopentanoperhydrofenantren

Podle počtu atomů uhlíku můžeme rozlišit 3 skupiny steroidních hormonů.

- C21 steroidy – gestageny, jež mají dvouhlíkový postranní řetězec na pozici 17 a methylové skupiny na C10 a C13. Tyto steroidy a jejich deriváty se někdy označují jako pregnanové steroidy.
- C19 steroidy – androgeny, obsahující keto- nebo hydroxyskupinu na C17 a dále methylové skupiny na C10 a C13 stejně jako gestageny. Tyto steroidy a jejich deriváty bývají někdy označovány jako androstanové steroidy.
- C18 steroidy – estrogeny. Jsou uvolňovány vaječnickovými folikuly, žlutým tělískem, placentou a nadledvinou. Kruh A je aromatizován a obsahuje hydroxy skupinu na C3. Další hydroxy- nebo ketoskupinu najdeme na C17. Na pozici C13 se nachází methylová skupina. Jejich deriváty nazýváme estranové steroidy.

Ve všech skupinách se nacházejí steroidy s neuroaktivními vlastnostmi.

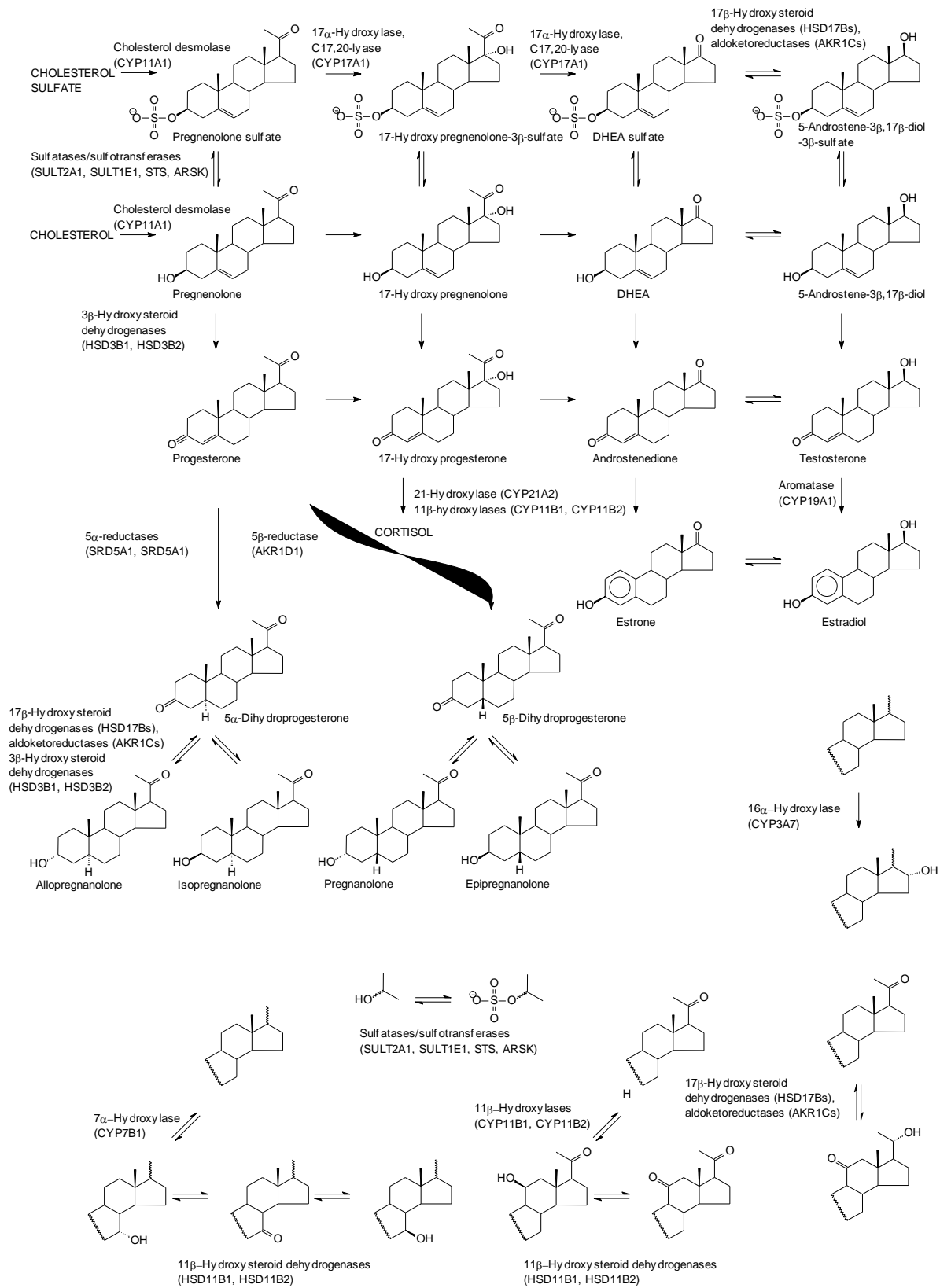
2.3. Biosyntéza NAS

Steroidní hormony či jejich polární konjugáty se tvoří v nadledvinách, pohlavních žlázách, fetoplacentární jednotce a nervovém systému. Biosyntéza všech steroidů začíná enzymatickou konverzí cholesterolu na pregnenolon (Preg), která je katalyzována cytochromem P450_{sc} (CYP11A1). Tento enzym z molekuly cholesterolu odštěpuje isokaproaldehyd (C6). Totéž platí i pro cholesterol konjugovaný. Limitujícím krokem syntézy steroidů je dodávka cholesterolu z vnější do vnitřní mitochondriální membrány, kde je CYP11A1 lokalizován. Přenos cholesterolu přes vnitřní mitochondriální membránu zprostředkovává steroidogenní akutní regulační protein (StAR)[23] s translokačním proteinem (TSPO) [24], dříve nazývaným periferní benzodiazepinový receptor (PBR) [25]. K přeměně Preg na steroidní hormony dochází v endoplazmatickém retikulu, v mitochondriích a v cytoplazmě buněk. Každá steroidogenní tkáň obsahuje specifickou sadu

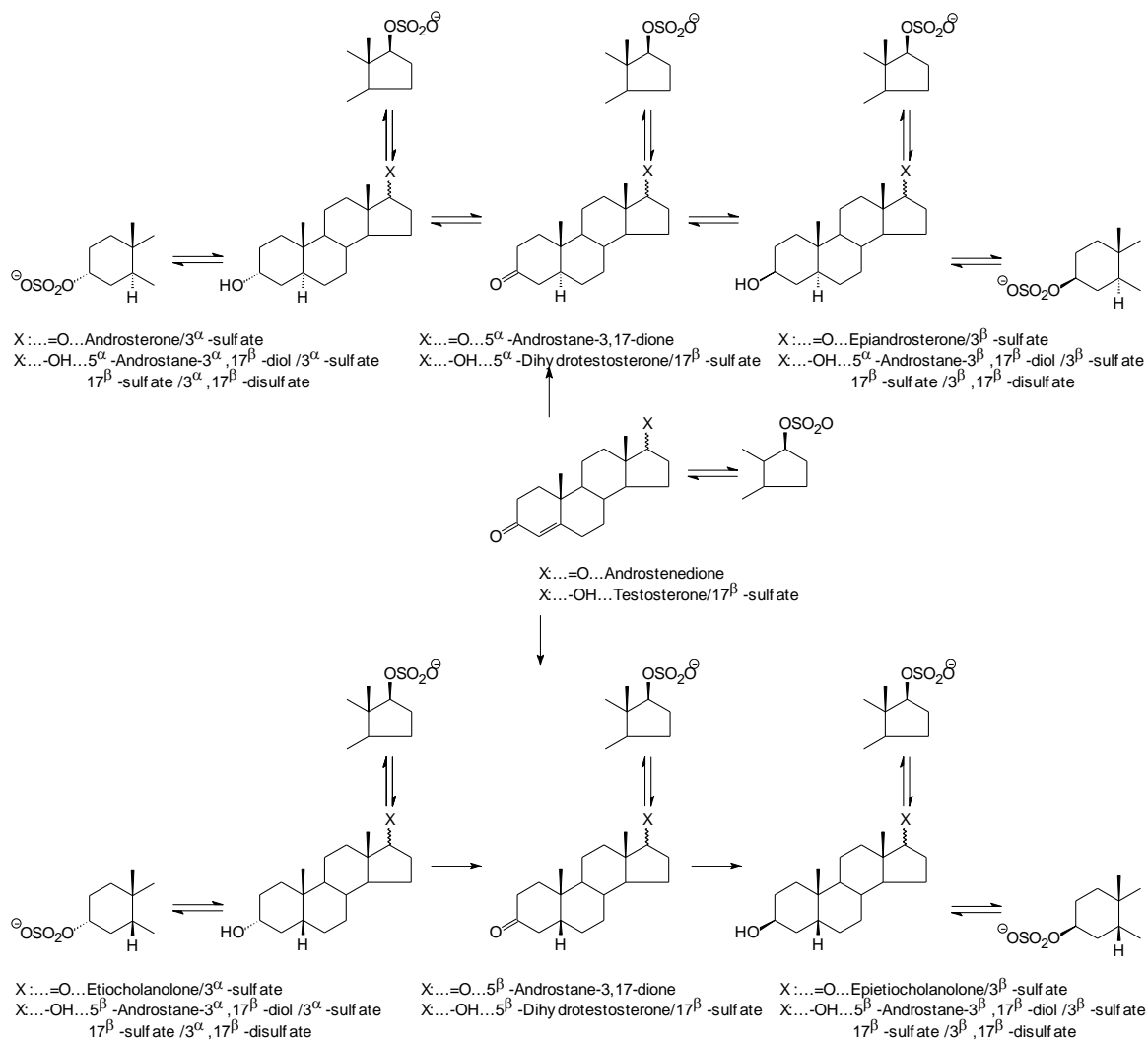
enzymů, tedy produkuje unikátní soubor steroidních hormonů. Biosyntéza NAS výrazně závisí na pohlaví a věku. U netěhotných žen v reprodukčním věku je největší podíl steroidů pregnanového typu (C21 steroidy). Jsou to metabolity Prog, které jsou syntetizovány v *corpus luteum*, zejména v luteální části menstruačního cyklu. Většinu prekurzorů NAS mimo luteální část menstruačního cyklu a těhotenství tvoří kůra nadledvin. Největší produkce pochází ze *zona fasciculata*, která je řízená osou kortikoliberin (CRH)-adrenokortikotropní hormon (ACTH), menší ze *zona glomerulosa* řízené osou renin-angiotensin. *Zona reticularis* produkuje spíše androgenní prekurzory, které jsou substráty pro tvorbu neuroaktivních androstanových metabolitů. Na Obr. 2 a 3 je shrnuta syntéza pregnanových i androstanových steroidů a jejich metabolitů.

2.3.1. Enzymy podílející se na biosyntéze NAS

V prvním metabolickém kroku je cholesterol konvertován na Preg již zmiňovaným cytochromem P450sc. V dalších krocích směrem k NAS pregnanového typu se uplatní 3 β -hydroxysteroidní dehydrogenáza, tvořící z Preg Prog. Enzymy 5 α - a β -reduktáza se podílejí na redukci jak Prog, tak i DOC, testosteronu či kortizolu. Tyto enzymy jsou velice aktivní v játrech, buňkách nervového systému a ve tkáních spojených s těhotenstvím a porodem. V dalším kroku dochází působením pluripotentních isoenzymů 17 β -hydroxysteroidních dehydrogenáz a aldoketoreduktáz katalyzujících interkonverzi hydroxy-skupin na ketony a opačně v pozicích 3 (3 α -hydroxy- \leftrightarrow 3-oxo- \leftrightarrow 3 β -hydroxy; 20 α -hydroxy- \leftrightarrow 20-oxo a 17 β -hydroxy \leftrightarrow 17-oxo) ke vzniku pregnanových či androstanových metabolitů. Jednotlivé izoformy posledně jmenovaných enzymů zajišťují buď spíše redukční či spíše oxidační směr metabolismu pregnanových či androstanových metabolitů a celý proces je tedy vratný. Některé z uvedených izoform působících oxidačním směrem tj. z 3 α -hydroxylů na ketony, katalyzují i další konverzi vzniklých ketonů na 3 β -hydroxy-izomery.



Obr. 2. Zjednodušené schéma steroidogenézy



Obr. 3. Zjednodušené schéma biosyntézy redukovaných androstanových metabolitů

2.4. Mechanismus účinku NAS

2.4.1. Negenomové účinky

Mechanismus účinku NAS spočívá hlavně v ovlivňování excitability nervových buněk cestou modulace propustnosti iontových kanálů skrze membránové ionotropní receptory. V CNS se NAS váží na GABA_A (GABA_A-r) a NMDA (NMDA-r) receptory a moduluje jejich činnost [26-28]. Protože se při tom neovlivňuje transkripce genů, říkáme těmto účinkům negenomové. Toto negenomové působení je velice rychlé, účinkuje během sekund nebo milisekund. Tím se liší od klasického genomového působení steroidních hormonů, kdy se hormon naváže na intracelulární receptor, který potom v komplexu s hormonem putuje do jádra, kde funguje jako transkripční faktor a odpověď nastupuje později a déle také trvá.

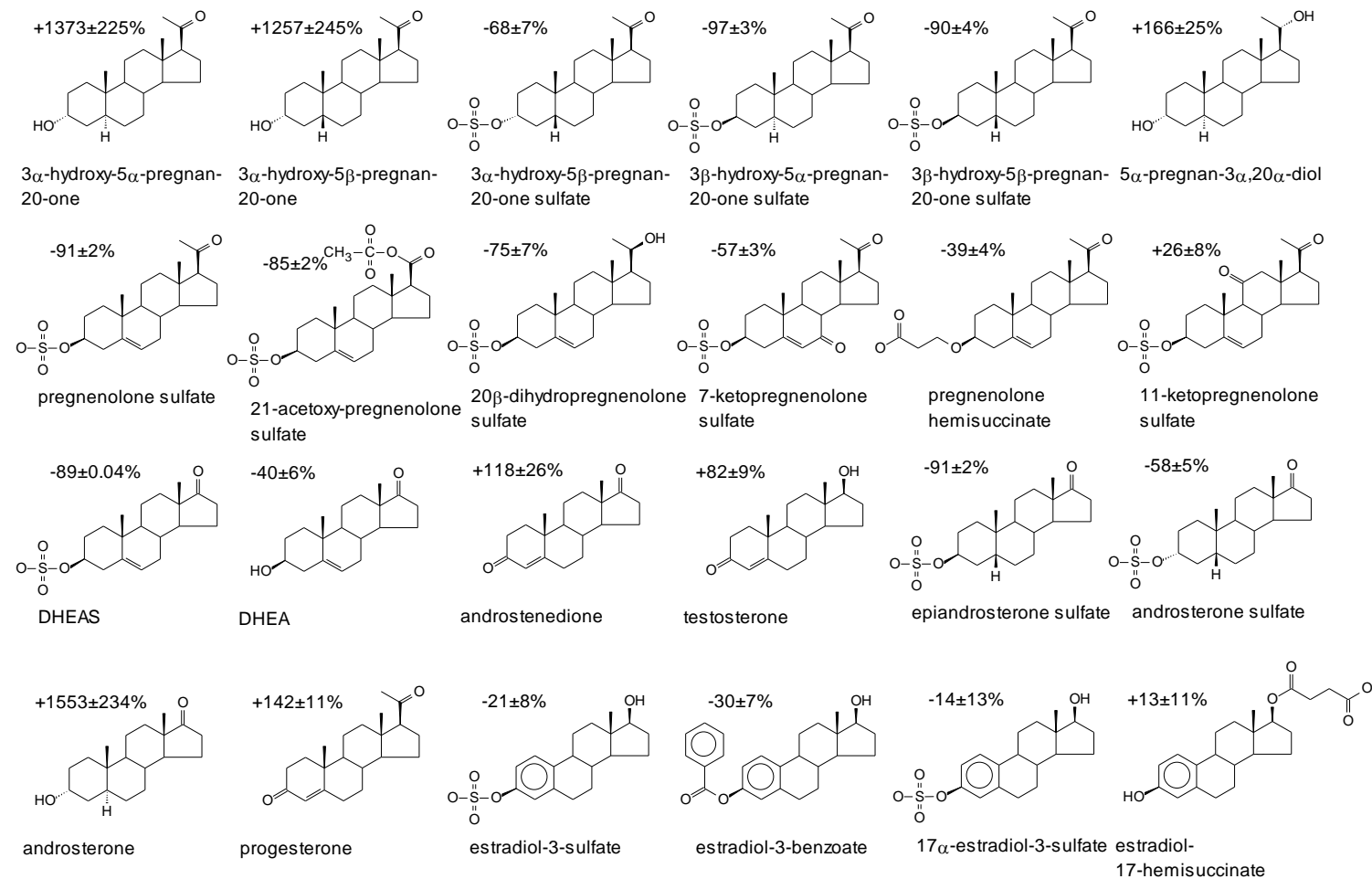
U steroidů vázajících se na GABA_A-r i NMDA-r je důležitá stereoselektivita. Přítomnost 3 α -hydroxy skupiny na A kruhu je nezbytná pro pozitivní modulaci GABA_A-r. Mezi pozitivní modulátory GABA_A-r patří 3 α -pregnanové steroidy [11], včetně izomerů THDOC a také 3 α -androstanové metabolity [29]. Tyto látky účinkují tak, že zvyšují frekvenci a dobu otevírání chloridových kanálů, které jsou spojené s GABA_A-r. Vtok chloridů do nervových buněk způsobuje útlum jejich aktivity.

Z obecného hlediska jsou to tedy neuroinhibitory a vykazují sedativní, hypnotické, anestetické, anxiolytické a antikonvulsivní vlastnosti. 3 β -pregnanové steroidy [30], konjugáty všech pregnanových steroidů [31] a sulfáty Δ^5 steroidů (pregnenolon sulfát- PregS, dehydroepiandrosteron sulfát-DHEAS) se projevují jako negativní modulátory GABA_A-r a celkově působí na neuron aktivačně. Pro pozitivní modulaci GABA_A-r jsou nezbytné alespoň nanomolární koncentrace steroidů, zatímco antagonisté účinkují až v množstvích mikromolárních. Pro přehled jsou modulátory GABA_A-r znázorněny v Tabulce 1.

Tabulka 1. Pozitivní a negativní modulátory GABA_A receptorů

Modulace GABA_A receptorů	
<p>pozitivní</p> <p>3α-pregnanové izomery</p> <p>3α-androstanové izomery</p> <p>3α-THDOC</p> <p>→ neuroinhibitory</p>	<p>negativní</p> <p>3β-pregnanové izomery</p> <p>PregS</p> <p>DHEAS</p> <p>polární konjugáty všech pregnanových izomerů</p> <p>→ neuroaktivátory</p>

U NMDA-r jsou také známy pozitivní a negativní modulátory. Pozitivní modulátory po vazbě na receptor zvyšují vtok vápenatých iontů do buňky a tím způsobují aktivaci neuronu. Mezi ně patří sulfáty Δ^5 steroidů [32] a polární konjugáty 5 α -pregnanových steroidů (převážně sulfáty) [17]. Opačné účinky vykazují polární konjugáty 5 β -pregnanových steroidů [18]. Pro přehled jsou tyto látky shrnuty v Tabulce 2 a jejich modulační účinnost je pak demonstrována na Obr. 4.



Obr. 4. Modulační účinnost steroidů na iontovékanály spojené s GABA_A-r (neuron z míchy kuřete, koncentrace GABA = 3 μ M, membránový potenciál = -70V, koncentrace steroidu=100 μ M) (převzato z článku Park-Chung, M., et al. Sulfated and unsulfated steroids modulate gamma-aminobutyric acidA receptor function through distinct sites. *Brain Res*, 1999. 830: 72-87.)

NAS mohou mít účinky i na periferní nervovou soustavu. 17β -estradiol, Prog a allotetrahydrokortikosteron ovlivňují kontraktilitu myometria působením na napětově závislé draslíkové kanály [33-34]. Byly zjištěny i účinky 5β -pregnanových steroidů na vápníkové kanály typu T, které jsou odpovědné za periferní vnímání bolesti [35].

Tabulka 2. Pozitivní a negativní modulátory NMDA receptorů

Modulace NMDA receptorů	
<p>Pozitivní</p> <p>Polární konjugáty</p> <p>5α-pregnanových izomerů</p> <p>PregS</p> <p>DHEAS</p> <p style="text-align: center;">→ neuroaktivátory</p>	<p>negativní</p> <p>Polární konjugáty</p> <p>5β-pregnanových izomerů</p> <p style="text-align: center;">→ neuroinhibitory</p>

2.4.2. Genomové účinky

Některé NAS však mohou působit i klasickou genomovou cestou skrze vazbu na intracelulární receptory (např. progesteronové receptory, PR). Allopregnanolon a $3\alpha,5\alpha$ -THDOC se mohou vázat na PR poté, co jsou v buňce oxidovány na 5α -dihydroprogesteron, příp. 5α -dihydrodeoxykortikosteron [36]. Byl nalezen také nukleární pregnanový X receptor, který po vazbě 5β -redukovaných steroidů, zejména 5β -dihydroprogesteronu (5β -DHP), napomáhá relaxaci uteru, což by mohlo mít zásadní význam pro udržení těhotenství, či naopak (při snížení koncentrace těchto látek) pro nástup porodu [37-38].

2.5. Úloha NAS v těhotenství

Výsledky získané u laboratorních zvířat ukazují, že NAS skutečně hrají významnou roli v rovnováze zajišťující trvání těhotenství a na druhé straně mohou změny jejich hladin těhotenství ukončit. V porovnání s netěhotnými ženami [39] jsou hladiny NAS pregnanového typu u těhotných žen extrémně zvýšeny [40-44]. Ačkoli mechanismy počátku porodu jsou u mnoha savců do značné míry objasněny, u člověka zatím prvotní impuls, který spustí kaskádu dalších dějů, není znám.

2.5.1. Role kortikoliberinu (CRH)

Důležitou roli ve fyziologii těhotenství a zvláště porodu hraje CRH. Tento peptid je v období mimo těhotenství produkován hlavně hypothalamem a řídí sekreci ACTH z hypofýzy. V některých částech CNS, které jsou zodpovědné zejména za neurofyziologickou odpověď na stres, může působit jako neurotransmitter [45]. Během těhotenství produkuje velké množství CRH placenta. CRH i ACTH dále stimulují steroidogenezu ve fetální nadledvině. Hlavními produkty jsou dehydroepiandrosteron sulfát (DHEAS), pregnenolon sulfát (PregS) [46-47] dehydroepiandrosteron (DHEA) a kortizol [48]. Tyto děje jsou schématicky znázorněny na Obr. 6. Syntéza CRH se exponenciálně zvyšuje v posledních čtyřech týdnech těhotenství až k porodu, přičemž hladina příslušného vazebného proteinu (CRH-BP) klesá [48]. Produkce CRH a CRH-BP je specifická pouze pro člověka a vyšší primáty [49]. Navzdory velkým změnám v hladinách CRH v průběhu těhotenství se CRH ukázal jako nevhodný ukazatel pro predikci předčasného porodu [50]. Na druhou stranu změny ve steroidním metabolomu indukované CRH by mohly lépe predikovat nastupující porod [47].

Sekrece CRH v placentě je na rozdíl od hypothalamu pravděpodobně řízena pouze cirkulujícími a lokálně produkovanými humorálními faktory, mezi něž patří neurotransmitery, cytokiny, prostaglandiny, peptidové hormony a steroidy [48].

2.5.2. Role progesteronu v udržení těhotenství

U hlodavců a přežvýkavců s postupujícím těhotenstvím klesá hladina těhotenství udržujícího Prog a zvyšují se hladiny porod vyvolávajícího estradiolu (E2)[51-52]. U člověka se hladiny Prog před porodem výrazně nemění, iniciace porodu je spojena spíše se změnami exprese izoforem progesteronových a estradiolových receptorů [53]. Prog je nejprve produkován žlutým tělískem ve vaječníku. Mezi 2. a 3. měsícem těhotenství nastává luteo-placentální posun, kdy žluté tělísko zaniká a produkci Prog přebírá placenta. Obecně se předpokládá, že Prog vzniká v placentě *de novo* z mateřského LDL-cholesterolu.

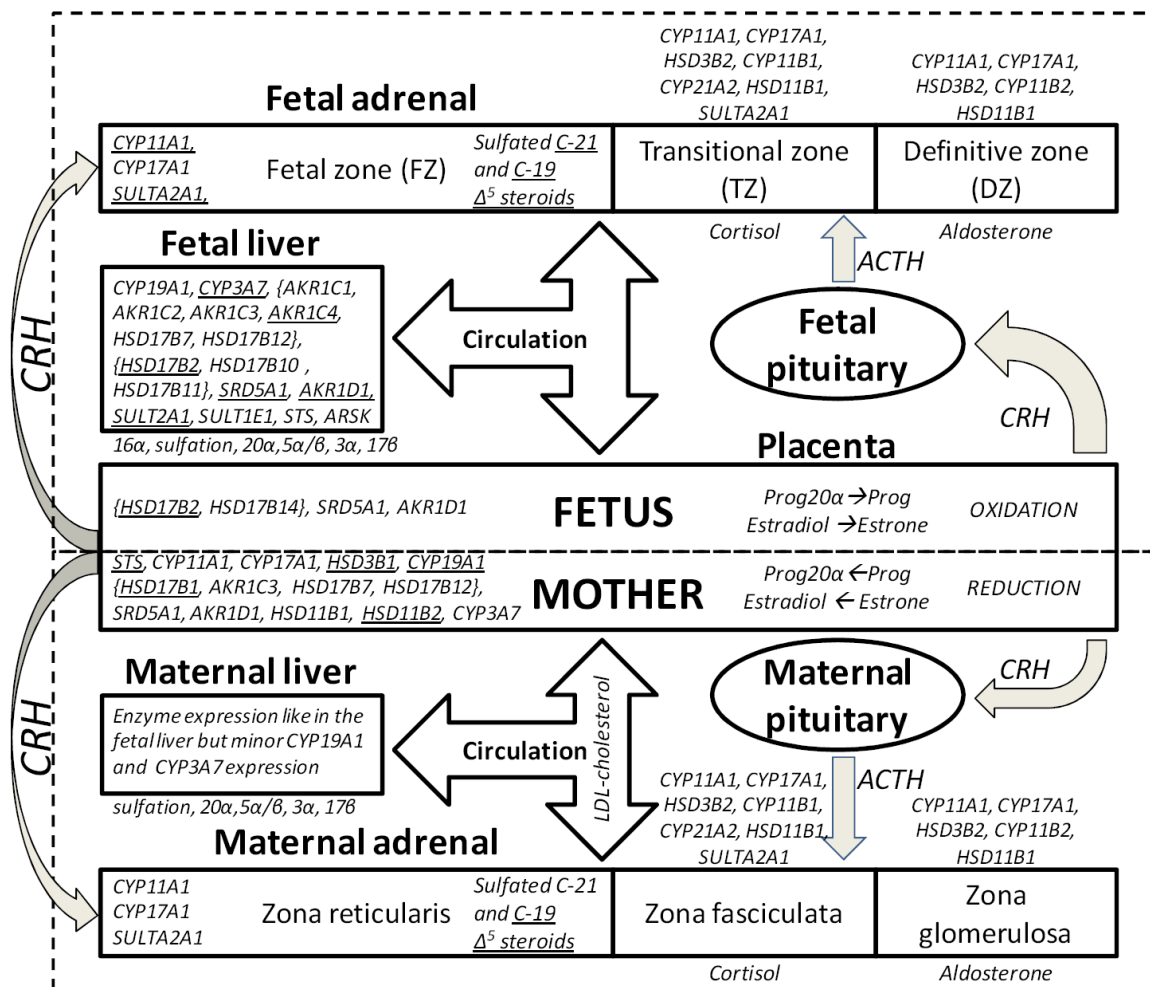
Ve fetální nadledvině se kolem 30. týdne gestace formují kompartmenty, které se později vyvinou v jednotlivé zóny nadledviny dospělé [54]. Fetální zóna fetální nadledviny (FZ) je část, která se velmi podobá v produkci steroidů *zona reticularis* a po porodu z ní také tato zóna vznikne. Pro FZ i *zona reticularis* je specifická produkce velkého množství DHEAS [46]. FZ je však v prenatálním období hypertrofována v důsledku stimulace CRH a po porodu atrofuje do *zona reticularis*. Na rozdíl od *zona reticularis* FZ tvoří navíc kromě DHEAS a

androstendiol sulfátu také srovnatelné či větší množství sulfatovaných C21 steroidů PregS a sulfátu 17-hydroxypregnenolonu [47, 55], přičemž fyziologická funkce hyperprodukce sulfatovaných C21 steroidů v těhotenství zatím nebyla objasněna. Současné práce naší skupiny však vysvětlení fyziologického významu tohoto jevu naznačují [47]. Přejídná zóna fetální nadledviny je analogická k *zona fasciculata* a zajišřuje v pozdním těhotenství rovněž tvorbu kortisolu [56]. Definitivní zóna, stejně jako *zona glomerulosa*, pak produkuje aldosteron. Na Obr. 5 jsou znázorněny vrstvy nadledvin u matky i plodu s produkovanými steroidy a vztahy mezi nimi. Celá nadledvina je v důsledku hypertrofie FZ velikostí srovnatelná s fetální ledvinou [57].

Naše skupina [47] přišla s hypotézou o alternativní produkci Prog využívající jako substrát nejhojnější produkt fetální nadledviny PregS. Jak bylo výše zmíněno, FZ produkuje velké množství PregS, jehož fyziologický význam v těhotenství dosud nebyl objasněn. V placentě se vyskytují všechny enzymy potřebné k přeměně PregS na Prog tj. steroidní sulfatáza a 3 β -hydroxysteroidní dehydrogenáza [58-59] a jsou v této tkáni zcela mimořádně aktivní. Tyto enzymy jsou totožné s enzymy, které katalyzují přeměnu DHEAS na androstendion, který je dále aromatázou transformován na estron. Tento enzymový systém, s výjimkou aromatizace, může být pravděpodobně využit i pro další metabolismus PregS.

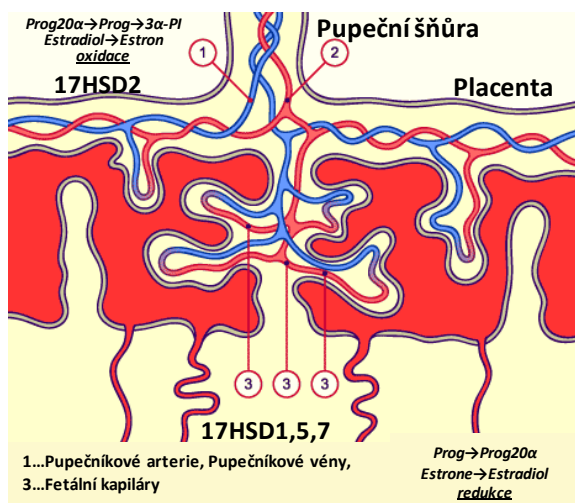
2.5.3. Oxidoredukční rovnováha u steroidů v mateřském a fetálním kompartmentu

Absence korelace mezi fetálními a mateřskými hladinami Prog by mohla souviset s distribucí 17 β -hydroxysteroidních dehydrogenáz zejména typu 1 a 2 (HSD17B typu 1 a 2) a eventuelně dalších izoenzymů 17 β -hydroxysteroidních dehydrogenáz a aldoketoreduktáz. HSD17B typu 1 (HSD17B1) je lokalizována v syncytiotrofoblastu a cytotrofoblastu, tedy v tkáni nejbliže mateřskému kompartmentu, a redukuje jak estron (E1) na E2, tak Prog na 20 α -dihydroprogesteron (Prog20 α). Na druhé straně v placentálních endoteliálních buňkách v blízkosti plodu oxiduje HSD17B typu 2 E2 (HSD17B2) na E1 [60] a Prog20 α na Prog (Obr. 6 a 7). Z tohoto důvodu patrně nebyly nalezeny korelace v hladinách Prog. Překvapivě však byly nalezeny parciální korelace mezi fetálním a mateřským Prog20 α , tedy redukováným metabolitem Prog, a dále mezi Prog20 α a Prog v mateřské krvi [61] (Tabulka 3). Hladinami dalších oxidovaných a redukováných forem bioaktivních steroidů jsem se zabývala ve svém druhém cíli. V případě fetálních steroidních hormonů byl již dříve diskutován fakt, že HSD17B2 patrně chrání plod před aktivními estrogeny a androgeny [60, 62].

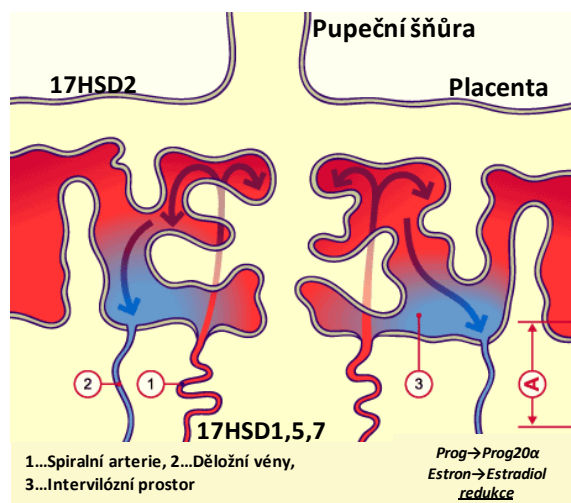


Obr.5. Placentární CRH jako hlavní regulátor produkce steroidů v těhotenství (Hill et al. 2010) CYP11A1...cholesterol desmoláza, CYP17A1...17 α -hydroxyláza/17,20lyáza; SULT...hydroxysteroidní sulfotransferáza (typy 2A1, 1E1); HSD3B2...3 β -hydroxysteroidní dehydrogenáza/ Δ (5 \rightarrow 4) izomeráza typu 2; CYP11B1...11 β -hydroxyláza; CYP11B2...aldosteron syntáza; CYP21A2...P450 21 hydroxyláza; HSD11B...11 β -hydroxysteroidní dehydrogenáza (typ 1 a 2); CYP19A1...aromatáza; CYP3A7...cytochrom P4503A7 (bez dalšího názvu); SDR... dehydrogenáza/reduktáza (typ 5A1), STS...steroidní sulfatáza; AKR...aldo-ketoreduktáza (typ 1C1,1C2,1C3,1C4,1D1); HSD17B... 17 β -hydroxysteroidní dehydrogenáza (typ 1, 2,10,12,14)

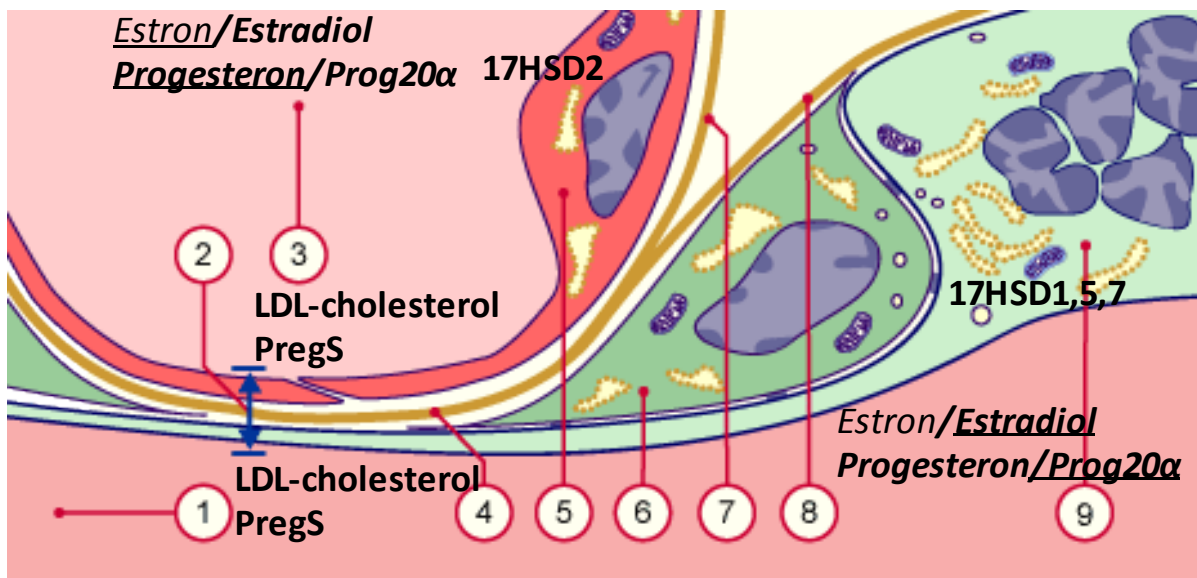
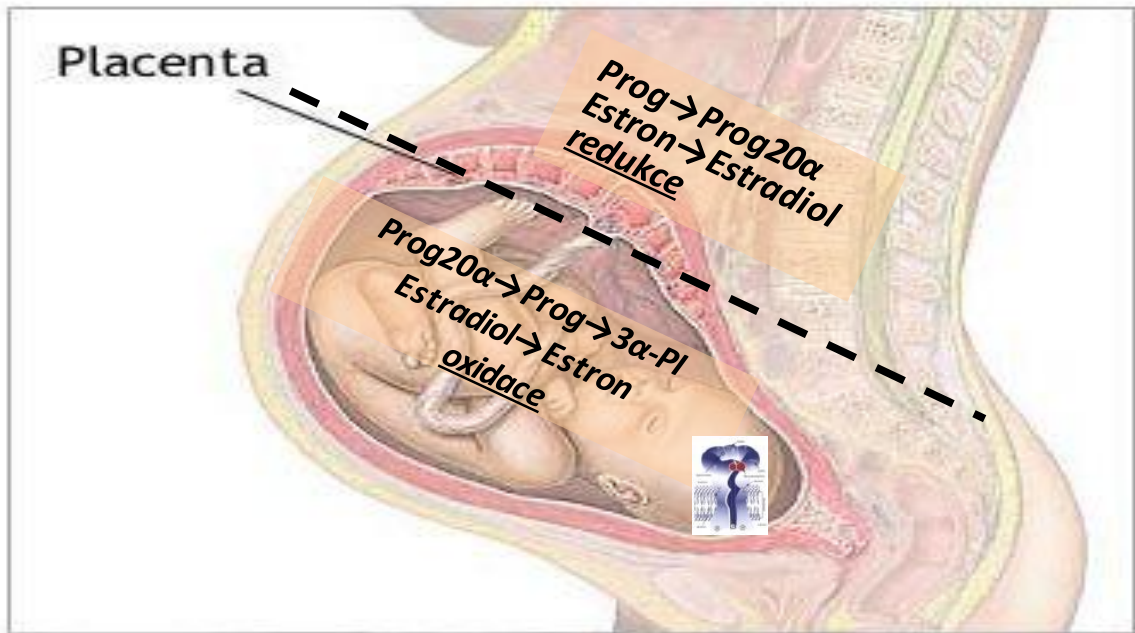
Fetální cirkulace



Mateřská cirkulace



Obr. 6. Zjednodušené schéma placentární cirkulace vztahované k účinkům placentárních izoenzymů HSD17B a AKR1C



Obr. 7. Zjednodušené schéma znázorňující placentární kompartmenty. 1. Intervilózní prostor (s mateřskou krví), 2. Placentární bariéra terminálního vilu, 3. Fetální kapiláry, 4. Spojené bazální membrány fetálních kapilár a syncytiotrofoblastu, 5. Endotelové buňky, 6. Řídký výskyt buněk cytotrofoblastu, 7. Bazální membrána kapilár, 8. Bazální membrána trofoblastové části, 9. Syncytiotrofoblast s proliferačními uzly (oblast bohatá na buněčná jádra)

Tabulka 3. Párové a parciální korelace mezi progesteronem (Prog) a volným (Prog20 α) a konjugovaným 20 α -hydroxyprogesteronem (Prog20 α C) v séru z pupečnickové vény (UV) and mateřské loketní vény (MV; párové a parciální korelace s adjustací na konstantní hladiny všech steroidů v korelační matici vyjma testovaného páru jsou nad respektive pod diagonálou. (Převzato z Hill, M., et al. Is maternal progesterone actually independent of the fetal steroids? *Physiol Res*, 2009)

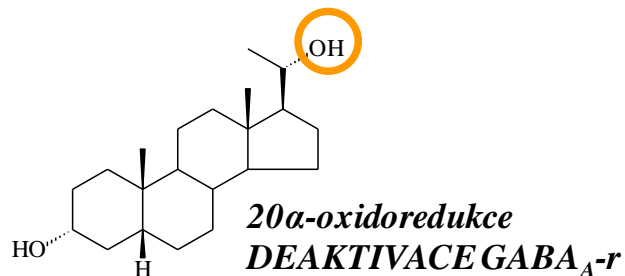
		UV			MV			
		Prog	Prog20 α	Prog20 α C	Prog	Prog20 α	Prog20 α C	
UV	Prog		0.277 46	0.196 46	0.083 46	0.103 46	0.188 46	PEARSON'S CORRELATIONS
	Prog20 α	0.241 46		0.569 46	0.326 46	0.632 46	0.527 46	
	Prog20 α C	0.124 46	0.254 46		0.202 46	0.515 46	0.747 46	
MV	Prog	0.030 46	0.105 46		0.178 46	0.000 46	0.000 46	
	Prog20 α	0.090 46	-0.124 46	-0.135 46		0.680 46	0.310 46	
	Prog20 α C	0.569 46	0.433 46	0.395 46	0.647 46	0.000 46	0.036 46	
		-0.156 46	0.432 46	0.071 46		0.602 46	0.000 46	
		0.323 46	0.004 46	0.655 46	0.000 46		0.000 46	
		0.072 46	-0.016 46	0.597 46	-0.032 46	0.283 46		
		0.651 46	0.922 46	0.000 46	0.842 46	0.070 46		
		PARTIAL CORRELATIONS						

2.5.4. Rovnováhy mezi konjugovanými a volnými neuroaktivními steroidy

Rovnováhy mezi konjugovanými a nekonjugovanými NAS, s výjimkou nadledvinových sulfatovaných Δ^5 steroidů, jsou zajišťovány převážně jaterními sulfatázami, sulfotransferázami, eventuálně glukuronosyltransferázami. Tyto rovnováhy mohou být velmi důležité v udržení těhotenství [47]. 5 α / β -Redukované metabolity s hydroxylem na pozici 3 α jsou pozitivní modulátory GABA_A receptorů. Pokud však jsou sulfatovány, je jejich účinek opačný. Sulfatace též zvyšuje polaritu látek a přispívá k jejich lepší rozpustnosti v cirkulaci, zatímco spíše brzdí jejich vstup hematoencefalickou bariérou. Konjugovaných neuroaktivních steroidů se nachází v krvi zhruba o 2-3 řády více než volných. Co se týče jejich modulační schopností, konjugáty dosahují zhruba pouze 1/10 účinnosti příslušných volných steroidů při jejich působení na GABA_A receptory [31]. S postupujícím těhotenstvím aktivita steroidních sulfatáz zřejmě narůstá [40].

Katabolismus bioaktivních steroidů (Obr. 8), oxidoredukční rovnováhy a poměry mezi konjugovanými a nekonjugovanými steroidy mohou být rozhodující pro udržení těhotenství [31, 40].

Pregnandioly
(PD, 20 α -hydroxy)

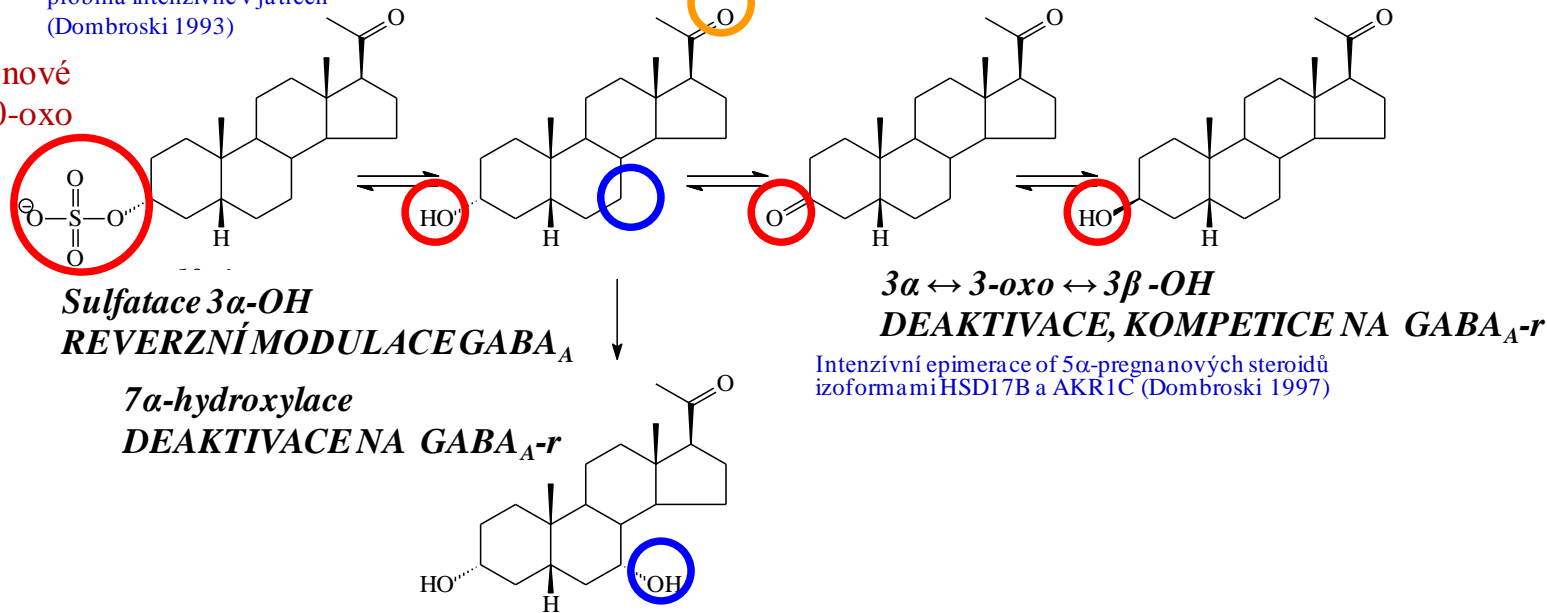


Izoformy HSD17B a AKR1C
(placenta, játra, mozek)

Sulfokonjugace pregnanolonových izomerů neproíhá v extrahepatických tkáních ale probíhá intenzivně v játrech (Dombroski 1993)

5 α -PI \rightarrow 5 α -DHP \rightarrow transport plod - matka \rightarrow
5 α -DHP \rightarrow 5 α -PI
(Dombroski 1997)

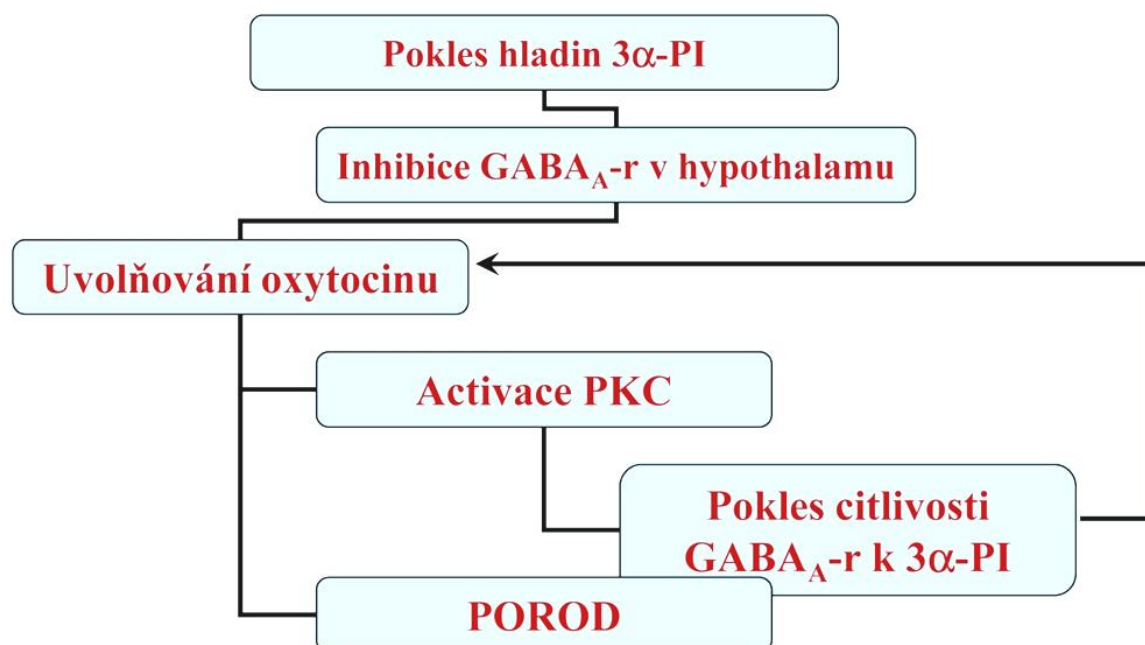
Pregnanolonové
Izomery, 20-oxo
(PI)



Obr. 8. Zjednodušené schéma katabolismu GABAergních steroidů

2.5.5. NAS a jejich úloha při porodu

Zatím stále není jasné, jaký impuls vede u člověka k ukončení těhotenství a počátku porodu. Co se týče oxytocin-produkujících neuronů v supraoptickém jádru hypotalamu myši, je známo, že citlivost $GABA_A$ receptorů k jeho modulátorům je dána jak typem podjednotek receptoru [63], tak rovnováhami mezi aktivitou fosfatáz a proteinkináz v buňce [64]. Citlivost 3α -pregnanových izomerů k oxytocinovým neuronům je způsobena podstatně vyšší fosfatázovou aktivitou v neuronu. Tato citlivost může být dočasně potlačena posunem rovnováhy směrem k vyšší aktivitě proteinkinázy C (PKC) [64-65]. Obr. 9 naznačuje, jak NAS zasahují do mechanismu porodu.



Obr.9. Úloha NAS v mechanismu porodu (SON...supraoptické jádro; 3α-PI...3α- pregnanové izomery)

Při poklesu hladin 3α -pregnanových izomerů dochází k inhibici $GABA_A$ receptorů v supraoptickém jádru v hypotalamu a v důsledku toho se začne uvolňovat z buněk oxytocin. Ten v první řadě působí na kontraktilitu děložních svalů a provokuje porod a také aktivuje PKC, která desenzitizuje $GABA_A$ receptory [65]. Tím více se pak uvolňuje oxytocinu, dochází zde tedy k formování pozitivní zpětné vazby.

3. Cíle diplomové práce

1. Vyhodnocení prediktivní hodnoty steroidů pro odhad gestačního věku a nástupu porodu
2. Ověření hypotézy o klíčovém vlivu distribuce placentárních oxidoreduktáz na difference v zastoupení aktivních forem pohlavních hormonů a neurosteroidů v cirkulaci matky a plodu

4. Materiál a metodika

4.1. Účastnice studie

Studijní skupina se skládala z 50 žen (21-41 let) v 28. až 41. týdnu těhotenství. Dvanáct žen (24%) porodilo po 38. týdnu těhotenství bez žádných komplikací. Ze zbylých 38 (76%) porodů, které nastaly mezi 28. a 37. týdnem gestace, 29 (76.3%) jich bylo ukončeno císařským nožem kvůli zdravotním rizikům a 9 (23.7%) porodů se uskutečnilo přirozenou cestou se spontánní uterinní aktivitou. Důvodem předčasného porodu u těchto žen byla infekční choroba v rodičce, leukocytóza a horečka. Tato studie byla schválena Etickou komisí Endokrinologického ústavu. Všechny účastnice podepsaly informovaný souhlas (Příloha 9.1). Byly odebírány vzorky krve z pupečnickové vény a arterie, mateřské loketní vény a také z plodové vody.

4.2. Sběr vzorků

Vzorky z pupečnickové tepny a žíly a vzorky z loketní žíly rodičky byly odebrány ihned po oddělení plodu od pupeční šňůry. Plodová voda byla odebrána ve 2. stadiu porodu, což je období mezi úplným roztažením děložního hrdla a dobou kdy, se dítě dostane ven z porodního kanálu. Každý vzorek byl uložen do chlazené plastové zkumavky, která obsahovala 100 μ l 5% EDTA. Plasma byla získána 5-ti minutovou centrifugací krevních vzorků při 4°C a 2000 x g. Vzorky plasmy a plodové vody byly uloženy v teplotě -20°C až do doby, kdy byly zpracovány.

4.3. Roztoky a chemikálie

Steroidy byly zakoupeny v Steraloids (Newport, RI, USA), Sylon B v Supelco (Bellefonte, PA, USA), methoxylamin hydrochlorid v Sigma (St.Louis, MO, USA) a roztoky v Merck (Darmstadt, Germany).

4.4. Měřicí zařízení

K měření byl použit GC-MS-QP2010 Plus systém od firmy Shimadzu (Kyoto, Japonsko), který se skládá z plynového chromatografu vybaveného automatickou kontrolou průtoku a jednoduchým kvadrupólovým detektorem s nastavitelným elektrickým napětím od 10 do

195 V. Pro analýzu byla použita kapilární kolona střední polaritý RESTEK Rxi (průměr 0.25 mm, délka 15 m, tloušťka filmu 0.1 μ m). Elektron-impakt ionizace probíhala při napětí 70V a emisní proud byl nastaven na 160 μ A. Teplota injekčního portu byla nastavena na 220°C, iontového zdroje na 300°C a rozhraní mezi detektorem a kolonou na 310°C. Analýza byla prováděna ve splitless módu při konstantní průtokové rychlosti nosného plynu (He) – 60cm/s. Oplach septa byl nastaven na 3 ml/min. Vzorby byly napichovány ve vysokotlakovém režimu (200 kPa) udržovanému po dobu 1 min. Napětí na detektoru bylo nastaveno na 1.4 kV.

4.5. Princip GC-MS

GC-MS je kombinace dvou mikroanalytických metod: plynové chromatografie (GC) tj. separační metody a hmotové spektrometrie (MS) tj. identifikační metody. Výhodou GC-MS je schopnost poskytnout celé hmotové spektrum často již z několika pikomolů analytu. Připravený analyt se dávkuje do plynového chromatografu injektorem, který obsahuje skleněnou vložku, ve které dochází vysokou teplotou k rychlému odpaření vzorku a ke správnému promíchání par vzorku s nosným plynem. Odpařený vzorek se dostává do kolony, jejíž délka bývá různá, u kapilárních sloupců se pohybuje od 10 do stovek metrů. Kolona je potažena stacionární fází, může to být pevná látka či viskózní kapalná látka s vysokým bodem varu (v našem případě polysiloxany). Mobilní fází je představována nosným plynem. Kolona je umístěna v peci, která je temperována na určitou teplotu. Nosný plyn táhne odpařený vzorek kolonou, kde jednotlivé komponenty vzorku více či méně interagují se stacionární fází. Čím více je složka rozpustná ve stacionární fází, tím delší dobu stráví v koloně - má delší retenční čas. Složky oddělené plynovou chromatografií jsou poté převedeny do iontového zdroje hmotového spektrometru. Nejběžnější je vytvoření iontů pomocí ionizace elektronovým dopadem. Neutrálním molekulám je dodána taková energie, kdy je odtržen elektron za vzniku molekulárního iontu. Ten má nadbytek energie, která poslouží k přerušení některých chemických vazeb za vzniku dílčích pozitivně nabitých iontů. Součet jejich hmot je roven hmotnosti původního iontu. Ne všechny molekulární ionty se rozloží na menší ionty. Např. aromatické sloučeniny produkují relativně stabilní molekulární ionty, naopak alifatické alkoholy jsou skoro všechny rozloženy na dílčí ionty. Ionty jsou poté ve vakuu od sebe odděleny podle hodnoty m/z , což je poměr hmoty k náboji. Na výsledném hmotovém spektru jsou ionty prezentovány v podobě peaků (vrcholů)[66].

4.6. Měřené steroidy

Pomocí GC-MS bylo změřeno 40 volných steroidů a 29 konjugovaných (značka S na konci zkratky steroidu značí konjugát) tělesných tekutinách matky a plodu. Stanovovaly se:

- Δ^5 steroidy: Preg, 17-hydroxypregnenolon (Preg17), DHEA a 5-androsten-3 β ,17 β -diol (Adiol) včetně příslušných polárních konjugátů
- Δ^4 steroidy: Prog, 17-hydroxyprogesteron (Prog17), androstendion (A2), testosteron (T), estrogeny- E1, E2, estriol (E3), 16 α -hydroxyestron (E116 α) včetně příslušných konjugátů s výjimkou E116 α C
- 5 α / β redukované 20-oxo-metabolity Prog: 5 α -dihydroprogesteron (P5 α), allopregnanolon (P3 α 5 α), isopregnanolon (P3 β 5 α), 5 β -dihydroprogesteron (P5 β), pregnanolon (P3 α 5 β), epipregnanolon (P3 β 5 β)
- 20 α -hydroxy-metabolity Prog a Preg: 20 α -hydroxypregnenolon (Preg20 α) a Prog20 α včetně jejich konjugátů
- 5 α / β redukované 20 α -hydroxy-metabolity Prog: 5 α ,20 α -tetrahydroprogesteron (P5 α 20 α), 5 α -pregnan-3 α ,20 α -diol (P3 α 5 α 20 α), 5 α -pregnan-3 β ,20 α -diol (P3 β 5 α 20 α), 5 β ,20 α -tetrahydroprogesteron (P5 β 20 α), 5 β -pregnan-3 α ,20 α -diol (P3 α 5 β 20 α), 5 β -pregnan-3 β ,20 α -diol (P3 β 5 β 20 α), včetně příslušných polárních konjugátů
- C19 5 α / β redukované 17-oxo-steroidy: androsteron (A3 α 5 α), etiocholanolon (A3 α 5 β), jejich polární konjugáty a také polární konjugát epiandrosteronu (A3 β 5 α S)
- polární konjugáty C19 5 α / β redukovaných 17 β -hydroxy-steroidů: 5 α -androstan-3 α ,17 β -diol (A3 α 5 α 17 β S), 5 α -androstan-3 β ,17 β -diol (A3 β 5 α 17 β S), 5 β -androstan-3 α ,17 β -diol (A3 α 5 β 17 β S), 5 β -androstan-3 β ,17 β -diol (A3 β 5 β 17 β S)
- 7 α / β -hydroxy-metabolity Preg a DHEA: 7 α -hydroxypregnenolon (Preg7 α), 7 β -hydroxypregnenolon (Preg7 β), 7 α -hydroxy-DHEA (DHEA7 α), 7 β -hydroxy-DHEA (DHEA7 β)
- 7 α / β -hydroxy-metabolity Adiolu: 5-androsten-3 β ,7 α ,17 β -triol (AT7 α), 5-androsten-3 β ,7 β ,17 β -triol (AT7 β) a jejich konjugáty
- 16 α -hydroxy-metabolity Δ^5 steroidů: 16 α -hydroxypregnenolon (Preg16 α), 16 α -hydroxy-DHEA (DHEA16 α) a jejich příslušné konjugáty
- 16 α -hydroxy-metabolity Δ^4 steroidů: 16 α -hydroxyprogesteron (Prog16 α), 16 α -hydroxyandrostendion (A216 α), 16 α -hydroxytestosteron (T16 α)

4.7. Příprava vzorků pro GC-MS systém

K 1ml plazmy nebo plodové vody bylo přidáno 20 μ l vnitřního standardu (epiestradiol), a vzorek byl poté extrahován 1 min pomocí diethyl-etheru (3ml). Po vymražení vodné fáze byla éterová fáze slita a odpařena při 37°C. Z vodné fáze se dále zpracovávaly konjugáty. Odparky byly rozpuštěny ve směsi methanol-voda v poměru 4:1 (1ml). Byl přidán pentan (1ml) a vzorek byl poté 1 min extrahován. Následně se vzorek stočil a spodní polární fáze byla odebrána pomocí Pasteurovy pipety. Vzorky byly odpařeny ve vakuové centrifuze při 60°C. Odparek byl rozpustěn ve 100 μ l acetonitrilu, převeden do vialky a odpařen proudem dusíku. Následovala derivatizace. K odparku bylo přidáno 50 μ l činidla methoxyaminhydrochloridu v pyridinu (2:98; MOX) a proběhla inkubace při 60°C 1 hod. Vzorek byl pak odpařen pod proudem dusíku. K odparku bylo přidáno 50 μ l činidla Silon BFT (99% bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamidu a 1% trimethylchlorosilan), které utvořilo trimethylsilyl deriváty na hydroxy-skupinách (90°C, 1h). Následně byla směs po druhém derivatizačním kroku vysušena tokem dusíku a odparky byly rozpuštěny ve 20 μ l isooktanu a 1 μ l tohoto roztoku byl použit pro GC-MS analýzu.

Ke steroidním konjugátům bylo přidáno 20 μ l vnitřního standardu a 1ml methanolu, který vysráží bílkoviny. Roztok byl centrifugován 20 min při 3000 otáčkách a supernatant poté stáhnut do zkumavky. Dále byl odpařen při 45°C ve vakuové odparce. K odparkům byl přidán 1ml 1M trimethylchlorosilanu v methanolu a byla provedena methanolýza při 55°C (1h). Poté proběhla neutralizace přidáním malého množství hydrouhličitanu sodného. Směs byla odpařena při 45°C. Bylo přidáno 0.5ml destilované vody a vzorky byly extrahovány 3 ml etheru 1 min. Směs byla vymražena, supernatant slit a odpařen při 37°C. Odparky byly rozpuštěny ve směsi methanol-voda v poměru 4:1(1ml). Poté byl přidán pentan (1ml) a vzorky byly 1 min extrahovány. Následně byl vzorek stočen a odebrána spodní polární fáze pomocí Pasteurovy pipety. Vzorky byly odpařeny ve vakuové centrifuze při 60°C. Odparek byl rozpustěn ve 100 μ l acetonitrilu, převeden do vialky a odpařen proudem dusíku. Následovala derivatizace. K odparku bylo přidáno 50 μ l činidla MOX v pyridinu (2:98) a vzorky se nechaly inkubovat při 60°C 1 hod. Poté byly odpařeny pod proudem dusíku. K odparku bylo přidáno 50 μ l činidla Silon BFT (99% bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamidu a 1% trimethylchlorosilan), které utvořilo trimethylsilyl deriváty na hydroxy-skupinách (90°C, 1h). Následně byla směs po

druhém derivatizačním kroku vysušena tokem dusíku a odparky byly rozpuštěny ve 200 μ l isooktanu a 1 μ l tohoto roztoku byl použit pro GC-MS analýzu.

4.8. Statistická analýza dat

Data byla nejprve transformována pomocí softwaru Statgraphics Centurion, verze XV od Statpoint Inc. (Herndon, Virginie, USA). Poté byla na datech provedena vícerozměrná regrese pomocí metody ortogonálních projekcí do latentních struktur (OPLS model) [67]. Tento model umožňuje zjistit, jak mezi sebou korelují matice proměnných, v tomto případě jako závisle proměnná byl vybrán gestační věk (GV), nezávisle proměnné reprezentují hladiny steroidů. Variabilita byla rozdělena do 2 nezávislých komponent. První komponenta vysvětluje variabilitu mezi jednotlivými hladinami steroidů a GV a nazývá se prediktivní komponenta. Druhá komponenta, ortogonální, ukazuje variabilitu mezi hladinami steroidů navzájem v matici nezávisle proměnných. OPLS model umožňuje najít jak nejlepší prediktory, tak nejlepší kombinaci prediktorů pro odhadnutí GV z hladin steroidů. Tento model byl sestaven pro 4 různé biologické tekutiny – pupečnickovou věnu a arterii, loketní věnu matky a plodovou vodu. K tomu byl použit statistický software SIMCA-P v.12.0.0.0 od firmy Umetrics AB (Umeå, Švédsko).

4.8.1. Matematický popis OPLS modelu

Model OPLS je založen na redukci dimenzionality původních datových matic X („nezávisle“ proměnné) a Y („závisle“ proměnné) a simultánní projekci prostorů X a Y do méně-dimenzionální nadplochy. Smyslem analýzy je popis vztahů mezi maticemi Y a X maximalizací korelací mezi X a Y prostřednictvím extrakce komponent, které jsou lineárními kombinacemi původních proměnných. Význam proměnné pro konstrukci komponenty je vyjádřen regresním/korelačním koeficientem původní proměnné s komponentou (komponentní váhy). Komponenty jsou vzájemně nezávislé (ortogonální). Variabilita v X a Y vysvětlená komponentami klesá od 1. Komponenty Na rozdíl od regresních modelů bez redukce dimenzionality, multikolinearita (těsné korelace uvnitř matic X nebo Y) není překážkou, ale je výhodou zesilující prediktivitu (čím těsnější korelace, tím méně komponent s vyšší prediktivitou bývá vyextrahováno).

- OPLS separuje PLS komponenty vyextrahované z **X** do dvou skupin:
 - Komponenty korelující s **Y**, **prediktivní**
 - Komponenty ortogonální k **Y**, **ortogonální**
- OPLS je jednosměrná (Y lze predikovat z X, ale ne naopak)

„Nezávisle“ proměnné $\mathbf{X} = \mathbf{T}_P \mathbf{P}_P^T + \mathbf{T}_O \mathbf{P}_O^T + \mathbf{E}$

„Závisle proměnné“ $\mathbf{Y} = \mathbf{T}_P \mathbf{C}_P^T + \mathbf{F}$

$\mathbf{T}_P, \mathbf{T}_O$... matice komponentních skóre prediktivních a ortogonálních komponent, resp. pro matici nezávisle proměnných **X**, \mathbf{P}_P ... matice komponentních vah prediktivních komponent odrážející korelace mezi maticemi **X** a **Y**, \mathbf{P}_O ... matice komponentních vah ortogonálních komponent odrážející korelace uvnitř matic **X** a **Y**, **E**, **F**... reziduální matice

5. Výsledky

5.1. Vyhodnocení prediktivní hodnoty steroidů pro odhad gestačního věku a nástupu porodu

Hodnoty změřených volných a konjugovaných steroidů ze všech 4 tělních tekutin při porodu jsou uvedeny v Tabulce 4. Písmeno S na konci zkratky steroidu značí konjugát. Určité androstanové steroidy, 7 α -hydroxy metabolity Δ^5 steroidy steroidů, některé 20 α -hydroxymetabolity C21-steroidů, jejich konjugátů a 16 α -hydroxytestosteron byl měřen v těchto tělních tekutinách poprvé.

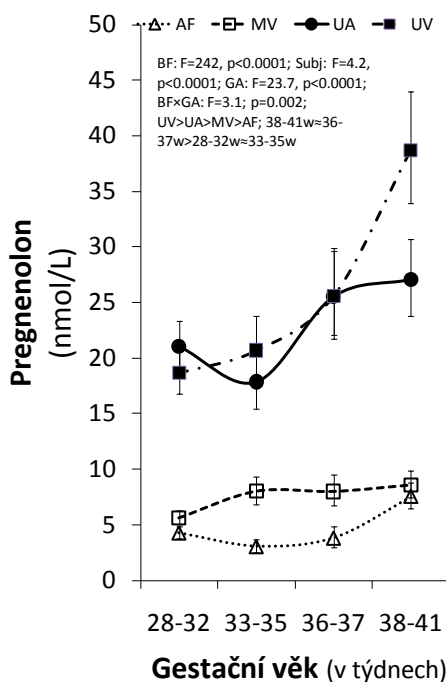
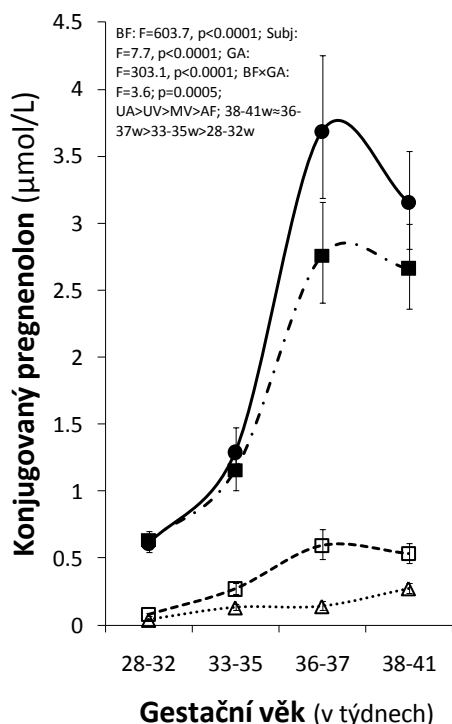
Hladiny většiny steroidů závisely na gestačním věku při porodu. Na Obr. 10 – 13 jsou zobrazeny steroidy, které nejvíce korelovaly s gestačním věkem při předčasných a fyziologických porodech.

Tabulka 4. Hladiny 69 steroidů ve 4 tělních tekutinách - pupečnickové větvi, pupečnickové arterii (UA-umbilical artery), mateřské loketní větvi (MV) a plodové vodě (AF-amniotic fluid) při předčasných a normálních porodech od 28. do 41. týdne gestačního věku. Výsledky jsou uvedeny v nmol/l a udávají hodnoty mediánů a v závorkách horní a dolní kvartily.

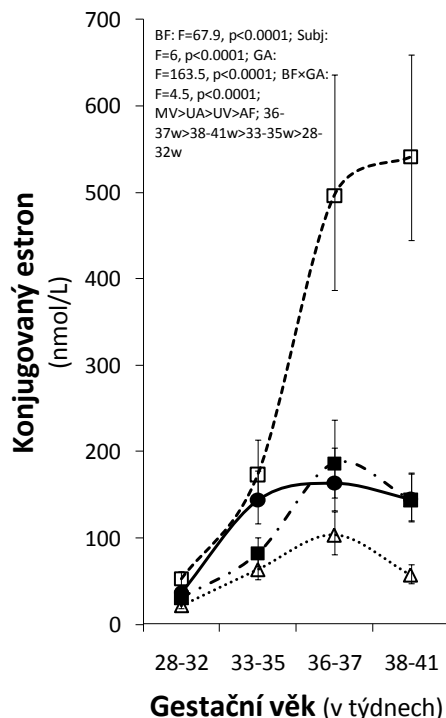
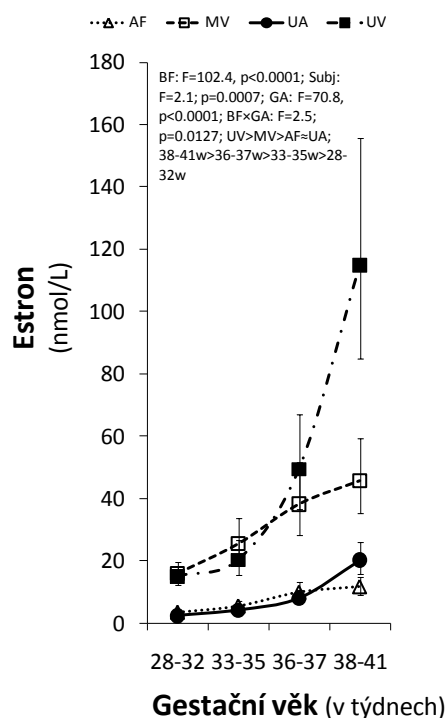
Výsledky [nmol/L]	Pupečnicková arterie	Pupečnicková věna	Mateřská loketní věna	Plodová voda
Preg	25.8 (23.5, 31.2)	37 (35.7, 44.9)	6.59 (6.09, 12.64)	7.15 (6.71, 10.4)
PregS	3214 (3081, 3999)	2691 (2500, 3517)	514 (506, 645)	258 (244, 396)
Preg17	26.9 (23.6, 57.1)	8.9 (7.2, 15.3)	16.4 (13.2, 22.6)	4.12 (3.72, 4.73)
Preg17S	941 (878, 1462)	699 (659, 1214)	83.2 (64.8, 129)	25.5 (24.9, 72.1)
DHEA	8.1 (7.5, 11.7)	2.19 (2.1, 2.72)	14.1 (13.9, 16.1)	1.58 (1.44, 2.07)
DHEAS	1698 (1291, 2516)	1625 (1525, 2289)	1288 (1178, 1883)	97.4 (73.8, 220)
Adiol	0.226 (0.175, 0.297)	0.081 (0.068, 0.121)	0.642 (0.592, 0.859)	0.058 (0.052, 0.113)
AdiolS	3406 (3058, 4061)	3680 (3432, 4303)	388 (323, 597)	244.5 (235.8, 395.5)
Prog	745 (599, 1249)	1440 (1411, 2177)	386 (369, 497)	150 (145, 169)
Prog17	30 (25.9, 38)	60.1 (55, 71.4)	19.1 (18, 66.1)	6.78 (6.65, 10.8)
A2	3.42 (3.19, 4.21)	2.22 (2.01, 2.61)	9.9 (9.8, 11.9)	3.26 (2.96, 4.41)
T	1.25 (1.13, 1.76)	1.04 (0.97, 1.99)	3.6 (3.44, 4.37)	1.06 (1.00, 1.70)
E1	17.4 (15.3, 40.7)	113 (112, 166)	50.3 (45.6, 65.4)	12.3 (11.5, 16.5)
E1S	157 (135, 232)	146 (133, 232)	623 (579, 728)	54.0 (50.1, 83.8)
E2	3.50 (3.27, 7.36)	13.7 (13, 16.6)	36.2 (33.6, 45.8)	2.10 (1.90, 3.22)
E2S	16.0 (15.4, 16.9)	17.6 (17.1, 18.4)	32.5 (31.3, 38.2)	5.63 (5.13, 6.74)
E3	53 (52.1, 94.0)	256 (252, 389)	31.2 (28.5, 36.6)	90.5 (66.5, 204)
E3S	3382 (3237, 4630)	2950 (2899, 3805)	349 (338, 499)	2959 (2597, 3479)
E116 α	1.53 (1.52, 2.45)	9.21 (8.76, 11.3)	1.38 (1.29, 1.41)	9.37 (8.46, 11.4)
P5 α	38.3 (34.6, 53.4)	36.9 (32.9, 54.0)	17.6 (16.0, 25.8)	12.9 (12.4, 13.6)
P3 α 5 α	4.60 (4.40, 5.60)	3.63 (3.51, 4.47)	6.40 (6.10, 8.20)	2.22 (2.15, 4.91)
P3 α 5 α S	210 (200, 257)	239 (238, 311)	1087 (1037, 1373)	73.0 (69.0, 114)
P3 β 5 α	9.50 (9.10, 12.9)	5.96 (5.63, 8.77)	2.87 (2.81, 3.93)	5.99 (5.42, 7.01)
P3 β 5 α S	356 (356, 433)	318 (301, 480)	436 (410, 569)	48.9 (45.7, 75.2)
P5 β	9.80 (8.90, 16.2)	9.80 (7.80, 21.2)	1.31 (1.27, 1.78)	1.54 (1.33, 2.38)
P3 α 5 β	12.8 (12.1, 15.1)	4.42 (3.92, 6.33)	4.40 (4.20, 6.20)	2.87 (2.45, 3.94)
P3 α 5 β S	184 (177, 253)	193 (175, 229)	475 (444, 573)	108 (101, 208)

Tabulka 4, pokračování. Hladiny 69 steroidů ve 4 tělních tekutinách - pupečnickové véné, pupečnickové arterii (UA-umbilical artery), mateřské loketní véné (MV) a plodové vodě (při předčasných a normálních porodech od 28. do 41. týdne gestačního věku. Výsledky jsou uvedeny v nmol/l a udávají hodnoty mediánů a v závorkách horní a dolní kvartily.

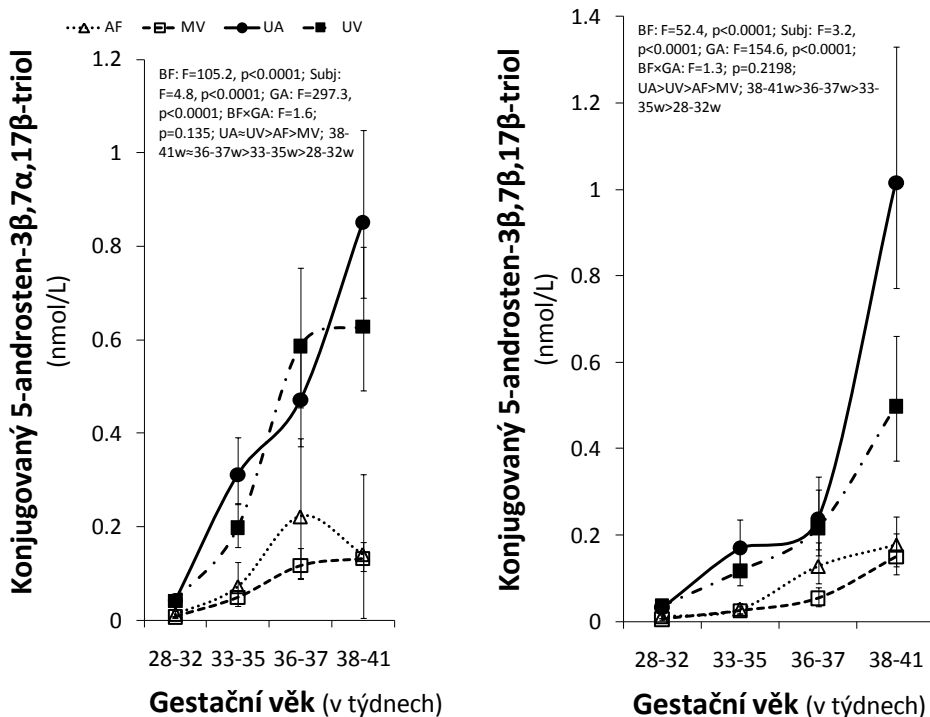
Výsledky [nmol/L]	Pupečnicková arterie	Pupečnicková vena	Mateřská loketní vena	Plodová voda
P3β5β	1.04 (0.89, 1.38)	0.66 (0.60, 1.03)	0.36 (0.33, 0.66)	0.28 (0.17, 0.42)
P3β5βS	51.5 (47.5, 81.1)	64.6 (59.7, 81.2)	42.9 (40.3, 51.8)	18.4 (16.8, 25.4)
Preg20α	2.47 (2.41, 2.76)	1.68 (1.67, 3.09)	1.82 (1.74, 2.03)	0.48 (0.46, 1.80)
Preg20αS	1924 (1843, 2463)	2028 (1770, 2798)	996 (848, 1208)	262 (207, 344)
Prog20α	76 (73, 98)	50.2 (45.1, 73.3)	64.4 (62.1, 93.7)	7.0 (6.8, 9.1)
Prog20αS	77.9 (77.8, 104.1)	94.9 (92.8, 117)	35.2 (32.9, 52.9)	23.1 (16.9, 35.2)
P5α20α	56.6 (49.1, 80.2)	40.3 (39.0, 54.2)	28.9 (26.5, 36.6)	11.1 (10.0, 21.1)
P5α20αS	109 (100, 176)	90 (88, 148)	52.3 (44, 69)	69.6 (57.1, 129)
P3α5α20α	0.382 (0.361, 0.516)	0.233 (0.215, 0.346)	0.423 (0.392, 0.496)	0.276 (0.234, 0.509)
P3α5α20αS	126 (112, 137)	122 (83, 352)	17.5 (14.2, 27.4)	13.6 (11.5, 36.1)
P3β5α20α	2.14 (1.84, 2.65)	1.59 (1.48, 2.35)	1.65 (1.49, 1.95)	0.69 (0.59, 2.14)
P3β5α20αS	1500 (1387, 1947)	1615 (1576, 1750)	4008 (3805, 5412)	530 (365, 956)
P5β20α	13.9 (12.9, 26.7)	13.0 (10.6, 22.3)	1.65 (1.59, 2.74)	1.06 (0.99, 1.22)
P5β20αS	54.6 (51.1, 92.1)	59.2 (54.5, 91.7)	11.6 (11.4, 13.9)	13.3 (11.8, 25.2)
P3α5β20α	12.1 (11.6, 15.4)	2.85 (2.57, 3.80)	5.28 (4.34, 8.04)	3.12 (1.98, 7.81)
P3α5β20αS	1657 (1462, 2386)	1362 (1250, 1719)	1806 (1760, 2967)	1090 (916, 1449)
P3β5β20α	0.424 (0.393, 0.569)	0.187 (0.168, 0.268)	0.235 (0.221, 0.335)	0.115 (0.1, 0.274)
P3β5β20αS	311 (254, 392)	307 (267, 389)	587 (489, 867)	65.6 (49.8, 231)
A3α5α	0.170 (0.160, 0.198)	0.057 (0.052, 0.081)	0.302 (0.271, 0.420)	0.065 (0.061, 0.128)
A3α5αS	11 (11, 19)	13.1 (11, 18)	384 (361, 428)	31 (28, 45)
A3β5αS	58.3 (46.2, 93.7)	58.4 (56, 87.8)	94.9 (88.6, 174.9)	7.7 (6.9, 13.3)
A3α5β	0.050 (0.042, 0.066)	0.056 (0.054, 0.0687)	0.148 (0.141, 0.168)	0.062 (0.052, 0.138)
A3α5βS	2.58 (2.47, 3.03)	2.55 (2.47, 3.08)	30.9 (29.7, 46.3)	8.76 (8.49, 11.3)
A3α5α17βS	13.5 (12.6, 18.7)	13.13 (12.7, 20.4)	25.3 (21.8, 38.5)	4.38 (3.9, 11.7)
A3β5α17BS	4.33 (3.66, 6.90)	6.13 (5.58, 7.98)	18.7 (17.2, 22.2)	1.93 (1.86, 5.61)
A3α5β17BS	3.22 (3.20, 3.87)	3.88 (3.67, 4.84)	5.58 (5.38, 9.77)	0.77 (0.68, 5.03)
A3β5β17Bs	1.08 (1.05, 1.66)	1.53 (1.52, 1.71)	0.52 (0.39, 1.05)	0.92 (0.82, 1.71)
Preg7α	0.346 (0.325, 0.496)	0.509 (0.500, 0.673)	0.215 (0.198, 0.253)	0.089 (0.086, 0.115)
Preg7β	0.189 (0.184, 0.342)	0.423 (0.422, 0.439)	0.300 (0.286, 0.441)	0.082 (0.077, 0.153)
DHEA7α	1.79 (1.72, 2.17)	1.83 (1.70, 2.23)	1.67 (1.64, 2.01)	0.78 (0.70, 1.04)
DHEA7β	0.226 (0.222, 0.265)	0.234 (0.230, 0.265)	0.392 (0.378, 0.489)	0.168 (0.164, 0.239)
AT7α	0.023 (0.019, 0.038)	0.006 (0.005, 0.010)	0.068 (0.061, 0.171)	0.009 (0.009, 0.011)
AT7αS	0.729 (0.664, 1.44)	0.485 (0.454, 0.586)	0.114 (0.104, 0.250)	0.152 (0.142, 0.177)
AT7β	0.010 (0.009, 0.018)	0.006 (0.005, 0.009)	0.058 (0.056, 0.073)	0.006 (0.006, 0.008)
AT7βS	0.779 (0.603, 1.45)	0.523 (0.494, 0.750)	0.123 (0.115, 0.247)	0.201 (0.163, 0.303)
Preg16α	9.30 (9.20, 17.3)	5.08 (4.36, 6.34)	1.23 (1.11, 1.71)	3.49 (2.92, 12.5)
Preg16αS	10.8 (10.8, 15.9)	12.3 (11.69, 26.6)	2.09 (1.65, 3.52)	15.9 (15.8, 27.9)
DHEA16α	18.2 (16.7, 21.5)	52.5 (48.9, 65.7)	6.27 (5.95, 9.05)	18.0 (16.3, 37.0)
DHEA16αS	1368 (1129, 4221)	1645 (1325, 4831)	219 (211, 425)	521 (290, 843)
Prog16α	180 (171, 261)	393 (377, 694)	80.1 (77.7, 123)	44.1 (36.6, 115)
A216α	15.9 (15.5, 19.6)	14.4 (14.0, 21.0)	3.17 (2.91, 4.54)	15.0 (14.0, 24.8)
T16α	11.8 (10.2, 20.3)	17.0 (14.4, 21.9)	7.8 (7.2, 9.9)	8.12 (7.92, 13.0)



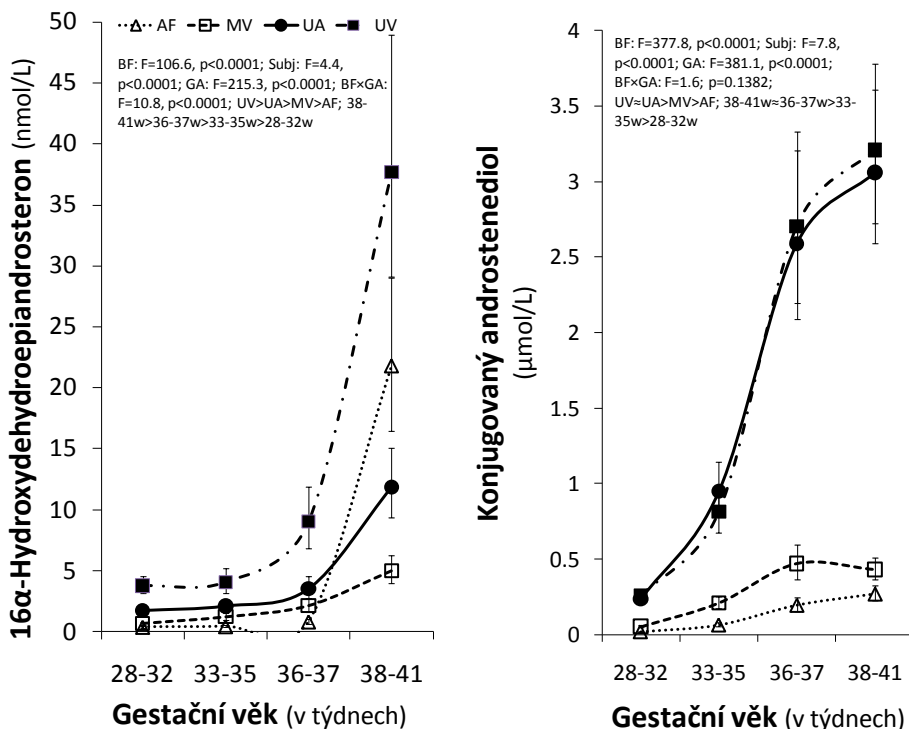
Obr.10. Hladiny volného a konjugovaného pregnenolonu v plodové vodě (AF-amniotic fluid), mateřské loketní větě (MV), pupečnickové arterii (UA-umbilical artery) a pupečnickové větě (UV-umbilical vein) v závislosti na gestačním věku. Symboly s úsečkami reprezentují retransformované průměry a jejich 95% konfidenční intervaly. Intervaly, které se nepřekrývají, označují významné odlišnosti mezi příslušnými dvojicemi. Subj..faktor subjekt (separuje inter-individuální variabilitu). BF...faktor tělesné tekutiny (body fluid); GA...faktor gestačního věku (gestational age); BF×GA...interakce faktorů; w...týden gestace (week of gestation)F...Fisher-Snedecorova statistika; >...statisticky významně vyšší než; ≈ statisticky nevýznamný rozdíl.



Obr. 11. Profily estronu a jeho konjugátu v pupečnickové arterii (UA-umbilical artery), plodové vodě (AF-amniotic fluid), mateřské loketní větě (MV) a pupečnickové větě (UV-umbilical vein) v závislosti na gestačním věku. Symboly a obrázky jsou identické, jako na Obr. 10.

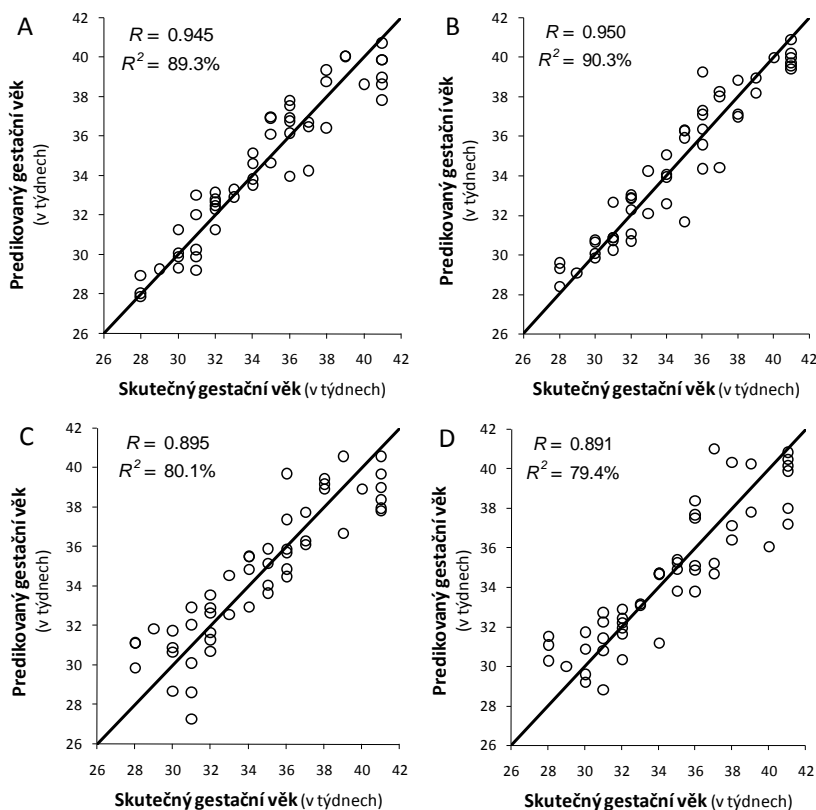


Obr. 12. Profily konjugovaného 5-androsten-3β,7α,17β-triolu a konjugovaného 5-androsten-3β,7β,17β-triolu v pupečnickové arterii (UA-umbilical artery), plodové vodě (AF-amniotic fluid), mateřské loketní větě (MV) a pupečnickové větě (UV-umbilical vein) v závislosti na gestačním věku. Symboly a obrázky jsou identické, jako na Obr. 10.

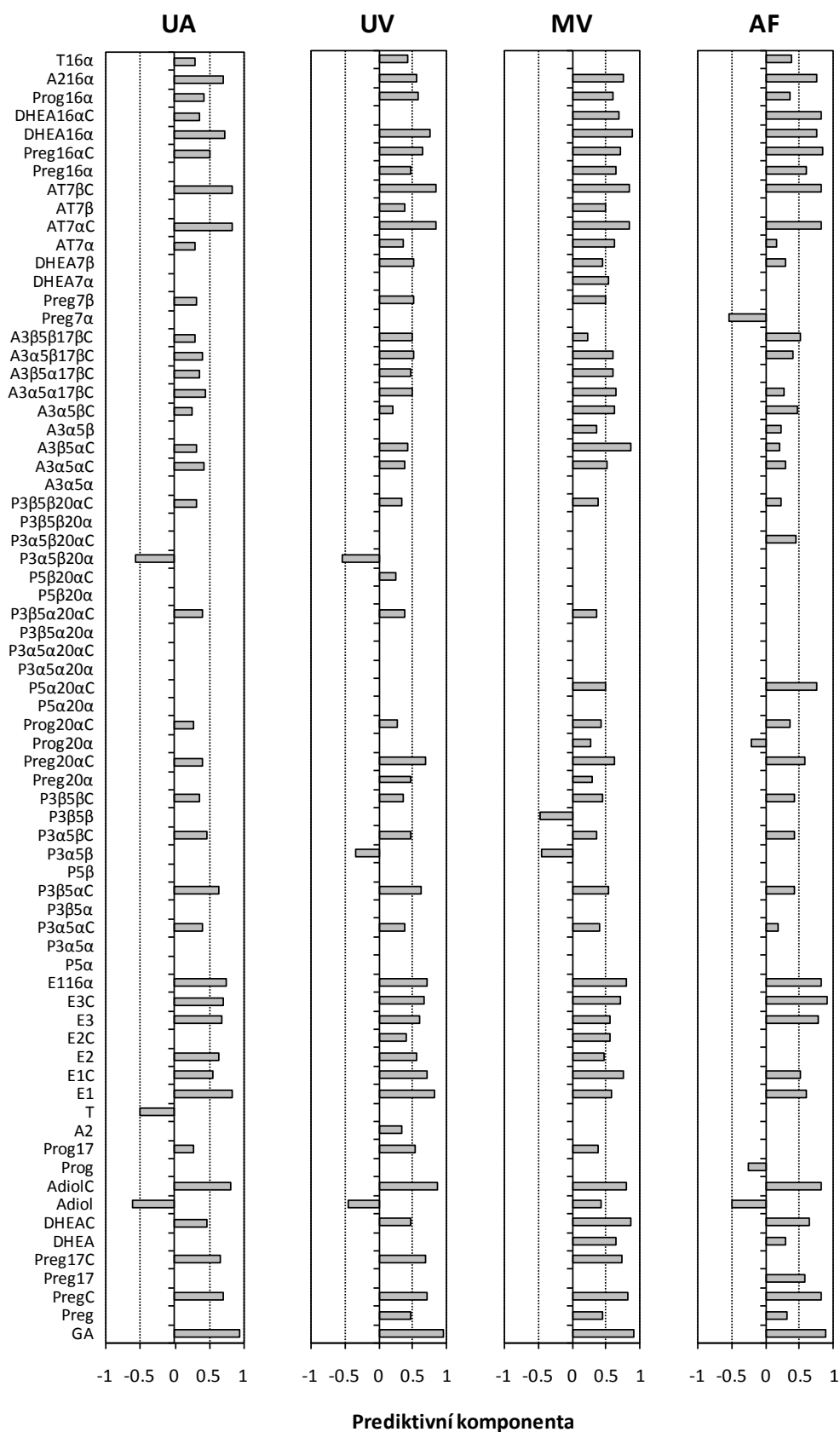


Obr. 13. 16α-Hydroxydehydroepiandrosteron a konjugovaný androstenediol v pupečnickové arterii (UA-umbilical artery), plodové vodě (AF-amniotic fluid), mateřské loketní větě (MV) a pupečnickové větě (UV-umbilical vein) v závislosti na gestačním věku. Symboly a obrázky jsou identické, jako na Obr. 10.

Dále byla porovnávána prediktivita mezi různými tělními tekutinami. Bylo zjištěno, že nejlepší prediktivní vlastnosti má pupečnicková vena ($R=0,950$), následuje pupečnicková arterie ($R=0,945$), loketní vena matky ($R=0,895$) a plodová voda ($R=0,891$). Korelační koeficient vícerozměrné regrese R ukazuje, jak dobře souhlasí predikce se skutečnými hodnotami gestačního věku. Jeho mocnina, tzv. koeficient determinance (R^2) prezentuje, jaké procento variability gestačního věku je vysvětleno hladinami relevantních steroidů, přičemž kritériem relevance proměnné je významnost statistiky variable importance (VIP) [67]. Čím více se hodnoty blíží hodnoty R k 1, tím lepší je model a jeho prediktivita. Korelace mezi skutečným a predikovaným GV u různých tělních tekutin jsou zobrazeny na Obr. 14. Prediktivity jednotlivých steroidů jsou znázorněny na Obr. 15. Tento sloupcový graf zobrazuje komponentní váhy (vyjádřené jako korelační koeficienty) mezi jednotlivými steroidy i GV charakterizující jejich korelovanost s prediktivní komponentou. Čím je absolutní hodnota komponentní váhy proměnné (s prediktivní komponentou) blíže číslu 1, tím má steroid lepší prediční vlastnosti. Steroidy, u kterých chybí sloupeček byly na základě VIP označeny jako nerelevantní a nebyly zařazeny do modelu.



Obr.14 Porovnání prediktivity OPLS modelu pro predikci gestačního věku z hladin endogenních steroidů v pupečnickové arterii (A), pupečnickové véné (B), loketní véně matky (C) a plodové vodě (D). R je korelační koeficient a R^2 je procento variability v matici závisle proměnné Y (gestační věk) vysvětlené OPLS modelem.



Obr.15. Korelace relevantních steroidů a gestačního věku (GA) se společnou prediktivní komponentou (komponentní váhy vyjádřené jako korelačních koeficienty.) Steroidy, u kterých chybí příslušný sloupec, nedosáhly relevance na základě kritéria VIP. Písmeno C na konci zkratky steroidu značí polární konjugáty steroidu.

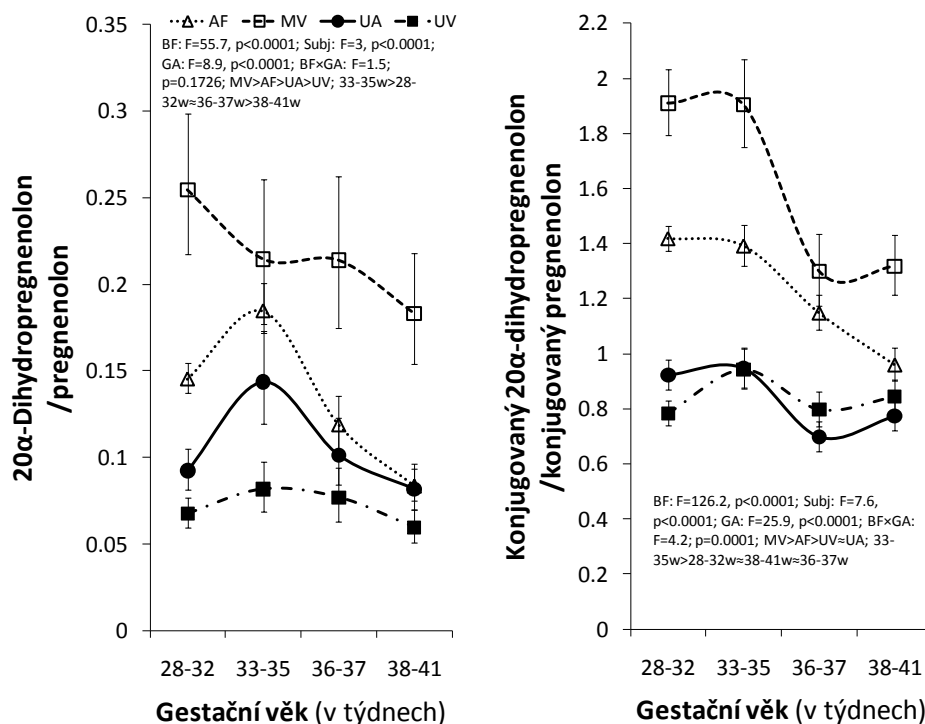
Dostupnost měřených tělních tekutin je různá. Jak odběr plodové vody, tak odběr krevních vzorků z pupeční šňůry v průběhu těhotenství jsou invazivní metody. Na druhé straně odběr krve z loketní žíly rodičky je snadný a nepřináší žádné vážné komplikace ani pro matku ani pro plod. Predikce porodu ze steroidů z mateřské krve je tedy z hlediska klinické praxe nejvýhodnější. Proto byla ještě pro ilustraci sestavena tabulka hladin steroidů v maternální vlně v různých týdnech gestačního věku (Tabulka 5).

Tabulka 5. Porovnání významných hladin steroidů v maternální loketní vlně v různých týdnech gestačního věku při předčasných a fyziologických porodech. Písmeno S na konci zkratky steroidu značí steroidní konjugát. Výsledky jsou uvedeny jako mediány s kvartily v nmol/l. Rozdíly mezi skupinami jsou hodnoceny Kruskal-Wallisovým testem následovaným vícenásobným porovnáváním dle Dunna.

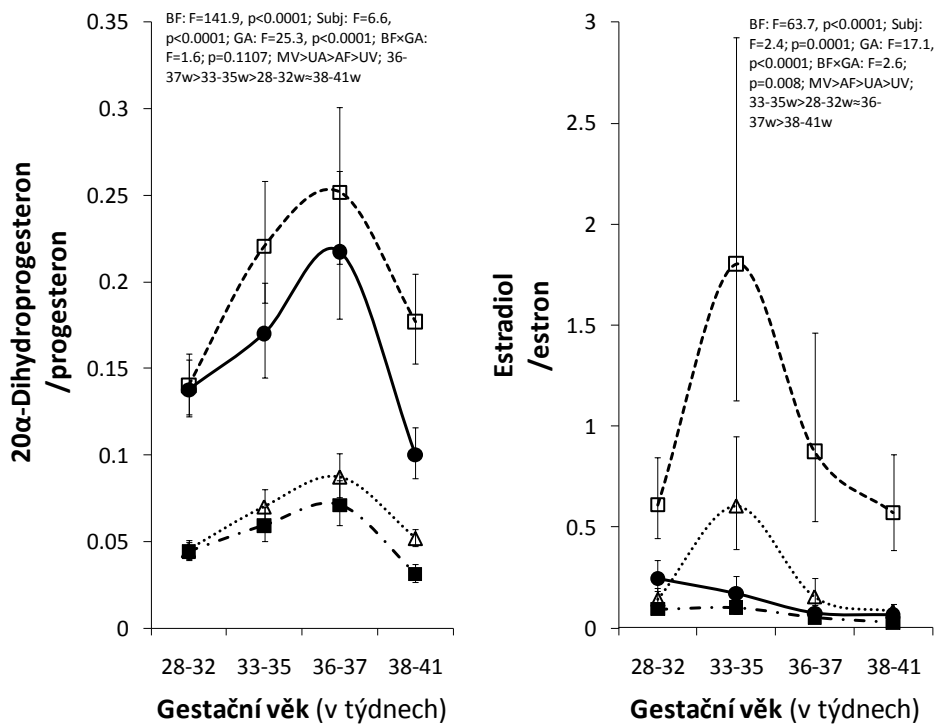
Steroid	Skupina A 28.-32. týden n=19	Skupina B 33.-35. týden n=10	Skupina C 36.-37. týden n=9	Skupina D 38.-41. týden n=12	Rozdíly mezi skupinami ^{aj}
Preg	5.1 (4.2, 7.6)	7.9 (6.6, 9.4)	8.9 (7, 11)	6.6 (5.8, 13)	p=0.0057, AB, AC, AD
PregS	70 (60, 102)	274 (221, 354)	540 (444, 957)	514 (407, 645)	p<0.0001, AB, AC, AD, BC, BD
Preg17S	3.5 (1.8, 19)	81 (62, 113)	93 (48, 158)	83 (36, 129)	p<0.0001, AB, AC, AD
DHEA	2 (0.92, 4.2)	5.8 (4.5, 6.6)	5.6 (4.4, 12)	14 (8, 16)	p<0.0001, AC, AC, AD, BD,
DHEAS	92 (45, 153)	382 (202, 548)	1220 (1010, 1530)	1290 (778, 1880)	p<0.0001, AB, AC, AD, BC, BD
Adiol	0.32 (0.22, 0.58)	0.62 (0.44, 0.83)	0.34 (0.29, 0.6)	0.64 (0.41, 0.86)	p=0.0195, AB, AD
AdiolS	58 (37, 91)	171 (124, 282)	328 (318, 393)	387 (308, 597)	p<0.0001, AB, AC, AD
Prog17	17 (8.8, 23)	23 (13, 29)	19 (19, 66)	27 (24, 28)	p=0.0643, AC, AC, AD
E1	15 (5.1, 28)	25 (18, 32)	36 (28, 55)	50 (35, 65)	p=0.0036, AC, AC, AD
E1S	44 (29, 98)	159 (111, 191)	472 (282, 731)	623 (390, 728)	p<0.0001, AB, AC, AD, BD
E2	12 (6.2, 20)	36 (25, 59)	23 (20, 49)	36 (28, 46)	p<0.0001, AB, AC, AD
E2S	11 (8.6, 14)	50 (34, 62)	31 (27, 42)	33 (22, 38)	p<0.0001, AB, AC, AD
E3	9.8 (5.9, 14)	24 (22, 28)	20 (16, 48)	31 (23, 37)	p=0.0053, AB, AC, AD
E3S	50 (43, 74)	476 (300, 625)	524 (331, 1430)	348 (261, 499)	p<0.0001, AB, AC, AD
E116α	0.32 (0.18, 0.48)	0.66 (0.39, 0.74)	0.58 (0.37, 0.8)	1.4 (1.1, 1.4)	p<0.0001, AB, AD, BD, CD
P3α5αS	451 (299, 617)	1600 (1050, 2110)	2070 (1710, 3040)	1090 (803, 1370)	p<0.0001, AB, AC, AD
P3β5αS	138 (80, 186)	488 (288, 821)	805 (429, 1380)	436 (285, 569)	p<0.0001, AB, AC, AD
P3α5β	8.5 (7.1, 11)	9.6 (6.3, 12)	7.6 (7.2, 9.3)	4.4 (3, 6.2)	p=0.0207, AD, BD
P3α5βS	226 (161, 370)	561 (384, 1030)	794 (591, 1070)	475 (405, 573)	p<0.0001, AB, AC, AD
P3β5β	0.86 (0.58, 1.2)	0.71 (0.64, 0.81)	0.58 (0.52, 0.75)	0.36 (0.19, 0.66)	p=0.045, AD
P3β5βS	21 (17, 30)	56 (47, 62)	68 (60, 104)	43 (33, 52)	p<0.0001, AB, AC, AD, CD
Preg20α	1.1 (0.79, 1.7)	1.6 (1.3, 1.9)	2.4 (1.6, 3.7)	1.8 (1, 2)	p=0.0158, AC, AC
Preg20αS	228 (185, 293)	1030 (855, 1280)	1090 (786, 1500)	849 (656, 1180)	p<0.0001, AB, AC, AD
Prog20α	53 (22, 83)	97 (63, 186)	150 (94, 186)	64 (46, 94)	p=0.0063, AB, AC, CD
Prog20αS	18 (11, 34)	38 (30, 59)	38 (34, 71)	35 (27, 53)	p=0.0101, AB, AC, AD
P5α20αS	25 (19, 43)	98 (69, 127)	82 (46, 100)	52 (35, 69)	p<0.0001, AB, AC, AD
P3β5α20αS	2010 (1130, 2700)	9600 (5440, 12400)	7670 (4570, 10500)	4010 (2500, 5410)	p<0.0001, AB, AC, AD
P3β5β20αS	252 (159, 427)	814 (598, 1040)	946 (594, 1130)	587 (359, 867)	p<0.0001, AB, AC, AD
A3α5αS	51 (30, 165)	133 (74, 167)	173 (137, 400)	384 (201, 428)	p=0.0011, AC, AC, AD, BD
A3β5αS	10 (6.5, 16)	28 (17, 36)	77 (46, 141)	95 (75, 175)	p<0.0001, AB, AC, AD, BC, BD
A3α5β	0.071 (0.048, 0.11)	0.081 (0.054, 0.1)	0.09 (0.07, 0.13)	0.15 (0.11, 0.17)	p=0.0489, AD, BD
A3α5βS	4.5 (2.1, 10)	8.6 (6.8, 11)	17 (15, 27)	31 (27, 46)	p<0.0001, AC, AC, AD, BD
A3α5α17βS	7.3 (4.6, 9.7)	29 (22, 39)	26 (22, 33)	25 (17, 38)	p<0.0001, AB, AC, AD
A3β5α17βS	4.3 (2.8, 7.1)	17 (8.3, 18)	17 (13, 21)	19 (12, 22)	p<0.0001, AB, AC, AD
A3α5β17βS	1.2 (0.92, 2.3)	4.4 (2.4, 12)	4 (3.1, 7.5)	5.6 (3.9, 9.8)	p<0.0001, AB, AC, AD
A3β5β17βS	0.36 (0.2, 0.49)	1.2 (0.66, 1.7)	1.1 (0.86, 1.2)	0.52 (0.23, 1)	p<0.0001, AB, AC, BD, CD
Preg7β	0.04 (0.016, 0.071)	0.088 (0.039, 0.17)	0.031 (0.02, 0.12)	0.3 (0.1, 0.44)	p<0.0001, AD, BD, CD
DHEA7α	0.98 (0.66, 1.3)	1.1 (0.84, 1.5)	0.97 (0.86, 1.2)	1.7 (1.3, 2)	p=0.0067, AD, BD, CD
DHEA7β	0.094 (0.074, 0.32)	0.32 (0.22, 0.36)	0.38 (0.27, 0.53)	0.39 (0.33, 0.49)	p=0.0075, AC, AC, AD
AT7α	0.011 (0.0056, 0.021)	0.06 (0.04, 0.09)	0.041 (0.029, 0.081)	0.068 (0.045, 0.17)	p<0.0001, AB, AC, AD
AT7αS	0.01 (0.004, 0.01)	0.06 (0.031, 0.069)	0.16 (0.06, 0.21)	0.11 (0.08, 0.25)	p<0.0001, AB, AC, AD
AT7β	0.014 (0.0054, 0.035)	0.062 (0.05, 0.089)	0.06 (0.047, 0.093)	0.058 (0.035, 0.073)	p<0.0001, AB, AC, AD
AT7βS	0.004 (0.002, 0.01)	0.03 (0.015, 0.048)	0.088 (0.029, 0.15)	0.12 (0.097, 0.25)	p<0.0001, AB, AC, AD, BD
Preg16α	0.45 (0.3, 0.8)	0.71 (0.57, 0.77)	1.6 (1.1, 1.8)	1.2 (0.81, 1.7)	p<0.0001, AC, AC, AD, BC, BD
Preg16αS	0.3 (0.19, 0.61)	0.8 (0.48, 1.6)	1.2 (0.45, 2.9)	2.1 (1.2, 3.5)	p<0.0001, AB, AC, AD
DHEA16α	0.75 (0.43, 0.92)	1.3 (0.9, 1.5)	2.3 (1.8, 2.9)	6.3 (2.8, 9.1)	p<0.0001, AB, AC, AD, BD
DHEA16αS	44 (19, 67)	46 (32, 61)	118 (50, 565)	218 (119, 425)	p<0.0001, AC, AC, AD, BD

5.2. Ověření hypotézy o klíčovém vlivu distribuce placentárních oxidoreduktáz na diference v zastoupení aktivních forem pohlavních hormonů a neurosteroidů v cirkulaci matky a plodu

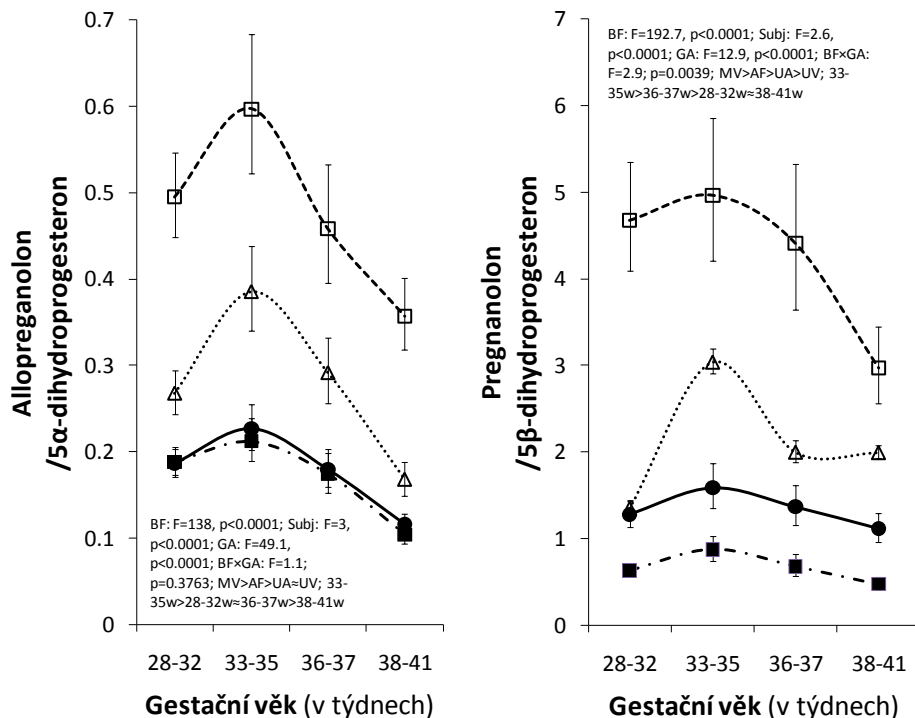
Hladiny oxidovaných a redukovaných forem steroidů ve 4 tělních tekutinách jsou zobrazeny v tabulce 4. Do grafů (Obr. 16–20) byl proti gestačnímu věku vynesena poměr redukované formy steroidu k formě oxidované. Z grafů je zřejmé, že tyto poměry jsou vždy nejvyšší v maternální vlně a to pro všechny skupiny podle gestačního věku. Zjišťujeme tedy, že v mateřské krvi koluje v aktivní formě více estrogenů a GABAergních steroidů (5 α / β -redukováno pregnanové i androstanové metabolity s hydroxylem v poloze 3 α -). Naopak ve fetální krvi, zejména v pupečníkové vlně odvádějící krev z placenty, je více aktivních gestagenů progesteronu a 5 α / β -dihydroprogesteronů (Obr. 17, 18). Pupečníková vlna totiž ukazuje hladiny steroidů kolující v plodu ještě před jejich katabolismem v játrech plodu. V mateřské krvi se nachází větší množství GABAergních 3 α -pregnanových izomerů, tedy pozitivních modulátorů, oproti neaktivním (a na GABA_A-r dokonce kompetujícím) 3 β -analogům (Obr. 19).



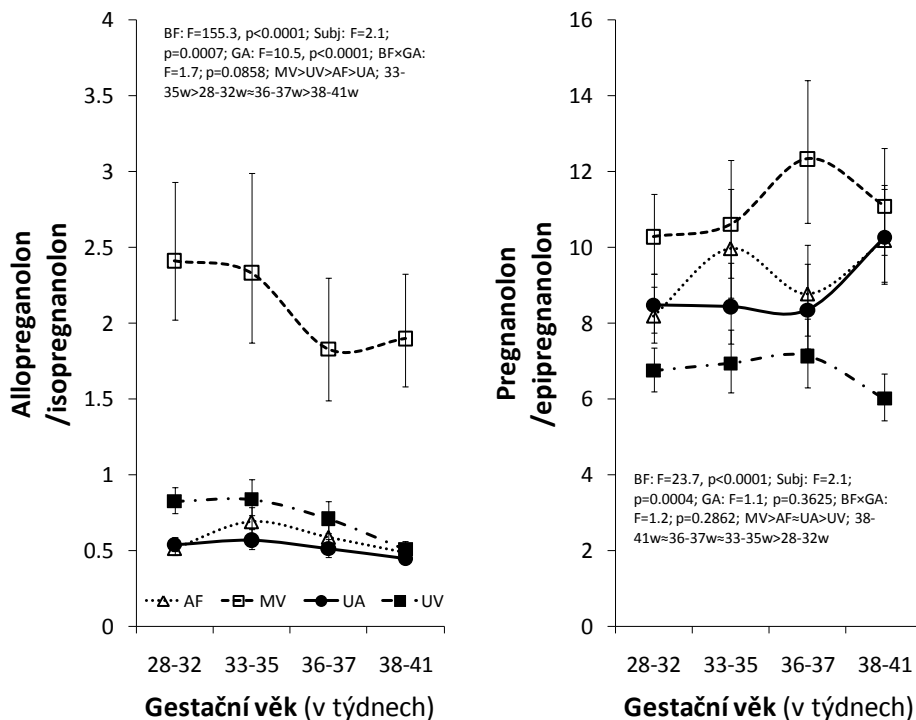
Obr. 16. Poměry redukovaných k oxidovaným formám steroidů ve 4 různých tekutinách: v pupečníkové arterii (UA-umbilical artery), plodové vodě (AF-amniotic fluid), mateřské loketní vlně (MV) a pupečníkové vlně (UV-umbilical vein) v závislosti na gestačním věku. Symboly a obrázky jsou identické, jako na Obr. 10.



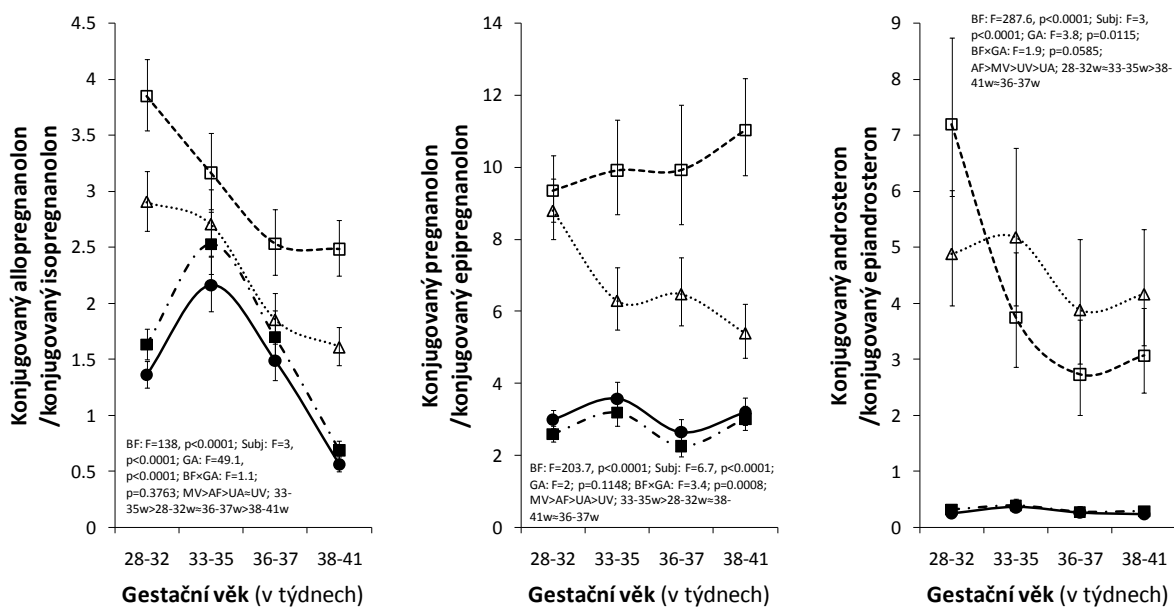
Obr. 17. Poměry neaktivních redukováných 20α- k aktivním oxidovaným 20-oxo- formám gestagenů a redukováných aktivních 17β- k oxidovaným neaktivním 17-oxo- formám estrogenů ve 4 různých tekutinách: v pupečnickové arterii (UA-umbilical artery), plodové vodě (AF-amniotic fluid), mateřské loketní větě (MV) a pupečnickové větě (UV-umbilical vein) v závislosti na gestačním věku. Symboly a obrázky jsou identické, jako na Obr. 10.



Obr. 18. Poměry GABAergních 3α- k neaktivním 3-oxo- formám steroidů ve 4 různých tekutinách: v pupečnickové arterii (UA-umbilical artery), plodové vodě (AF-amniotic fluid), mateřské loketní větě (MV) a pupečnickové větě (UV-umbilical vein) v závislosti na gestačním věku. Symboly a obrázky jsou identické, jako na Obr. 10.



Obr. 19. Poměry 3α -GABAergních k neaktivním kompetujícím 3β -formám (na $GABA_A$ -r) steroidů ve 4 různých tekutinách: v pupečnickové arterii (UA-umbilical artery), plodové vodě (AF-amniotic fluid), mateřské loketní vlně (MV) a pupečnickové vlně (UV-umbilical vein) v závislosti na gestačním věku. Symboly a obrázky jsou identické, jako na Obr. 9. (Konverze v metabolické steroidní cestě 3α -hydroxy- \leftrightarrow 3-oxo \leftrightarrow 3β -hydroxy- mohou zajišťovat stejné izoformy enzymů HSD17B a AKR1C.)



Obr. 20. Poměry polárních konjugátů 3α -GABAergních k neaktivním kompetujícím 3β -formám (na $GABA_A$ -r) steroidů ve 4 různých tekutinách: v pupečnickové arterii (UA-umbilical artery), plodové vodě (AF-amniotic fluid), mateřské loketní vlně (MV) a pupečnickové vlně (UV-umbilical vein) v závislosti na gestačním věku. Symboly a obrázky jsou identické, jako na Obr. 10 (Konverze v metabolické steroidní cestě 3α -hydroxy- \leftrightarrow 3-oxo \leftrightarrow 3β -hydroxy- mohou zajišťovat stejné izoformy enzymů HSD17B a AKR1C.)

6. Diskuse

6.1. Vyhodnocení prediktivní hodnoty steroidů pro odhad gestačního věku a nástupu porodu (cíl č.1)

Metodou GCMS byl změřen téměř celý steroidní metabolom v pupečníkové arterii a véně, plodové vodě a mateřské loketní véně. Některé redukované androstanové steroidy, 7 α -hydroxymetabolity Δ^5 steroidů, některé 20 α -hydroxy-C21 steroidy, jejich konjugáty a 16 α -hydroxytestosteron byly v mateřských a fetálních tekutinách měřeny poprvé. Ostatní hladiny steroidů byly víceméně v souladu s výsledky jiných autorů [68-73]. Hladiny 20-oxo metabolitů progesteronu byly v porovnání s daty jiných autorů spíše nižší [42-43, 71]. Mohlo to být způsobeno sběrem vzorků v poněkud odlišných fázích porodu. Je známo, že hladiny těchto steroidů se po porodu rychle a velmi výrazně snižují. U jejich konjugátů je naopak známa větší stabilita jejich hladin [74].

Ženy, které rodily předčasně, neměly porod spojený s nerovnováhou v hladinách steroidů. Vždy se jednalo o jiné komplikace, jako např. horečka či leukocytóza. Můžeme tedy předpokládat, že tyto hladiny, snad jen s výjimkou kortikoidů ukazují, jaké jsou hladiny steroidů v týdnech před normálním fyziologickým porodem. Z naměřených dat byl sestrojen predikční model, který ukazuje, jaké steroidy nejvíce korelují s gestačním věkem. Důležité také je, o jakou tělní tekutinu se jedná. Prediktivita je nejvyšší u steroidů z pupečníkové vény a arterie, následuje mateřská loketní žíla a nakonec plodová voda. Z obecného hlediska mají steroidy ve všech sledovaných tělních tekutinách velice významnou prediktivní hodnotu. Z Obr. 15 lze vyčíst, že největší prediktivitu vykazují produkty FZ, tj. konjugáty Δ^5 steroidů a jejich 7 α/β -hydroxy- a 16 α -hydroxy-metabolity, jako je AT7 α S a AT7 β S, PregS, AdiolS, DHEA16 α a dále estrogeny. Konjugáty AT7 α i AT7 β , PregS a AdiolS jsou silnými prediktory ve všech 4 tekutinách. Z estrogenů se ukázaly jako dobré prediktory E116 α a E3S ve všech tělních tekutinách. E1 vysoce koreluje s gestačním věkem v pupečníkové véně i arterii, menší korelace je vidět u mateřské loketní žíly a plodové vody. Tyto výsledky souhlasí s poznatkem, že jak aktivita FZ, tak aktivita placentální aromatázy se zvyšuje s postupujícím těhotenstvím [75]. V plodové vodě dosahují vysokých korelací 16 α -hydroxy metabolity steroidů. Výsledky souhlasí s faktem, že tyto katabolity jsou vylučovány do plodové vody. Z praktického hlediska je výhodné všimnout si prediktorů v mateřské krvi, vzhledem k její snadné dostupnosti a

neinvazivnosti. V Tabulce 5 jsou uvedeny hladiny steroidů z mateřské plazmy, které se významně mění v závislosti na gestačním věku. Jako silné prediktory v mateřské krvi (i v ostatních tekutinách) se jeví DHEA16 α , což je katabolit vznikající hlavně v játrech plodu, DHEAS a PregS. Velice dobrými prediktory v mateřské krvi byly shledány E1S a E116 α . Vysoké hodnoty predikce v mateřské vlně dosahuje také A3 β 5 α S. Je možné, že se na produkci tohoto steroidu podílí ve větší míře steroidogenní orgány matky a proto je zde nalezena taková korelace. Naopak poměrně nízkou prediktivní hodnotu mají redukované metabolity progesteronu, včetně pregnanových izomerů. Konjugované metabolity sice s gestačním věkem korelují, ale méně než Δ^5 steroidy. Výsledky předchozí studie potvrzují, že volné pregnanové steroidy jsou s postupujícím gestačním věkem ve větší míře sulfatovány na příslušné konjugáty [40]. Tento děj má velký význam v regulaci hladin neuroaktivních steroidů na konci těhotenství. Je pravděpodobné, že sulfatace v některých případech posunuje biologickou aktivitu směrem k vyvolání porodu. O 5 β -redukovaných steroidech je známo, že udržují vazbou na pregnanové X receptory dělohu v klidu (Mitchell 2005), přičemž zvýšenou sulfatací se jejich hladina snižuje. 5 β -Redukované steroidy negativně korelují s gestačním věkem v mateřské krvi a P3 α 5 β ještě v pupečnickové vlně. Dalším důvodem jejich poklesu kromě sulfatace je zřejmě ještě snižující se aktivita 5 β -reduktázy v placentě [40, 43, 71].

6.2. Ověření hypotézy o klíčovém vlivu distribuce placentárních oxidoreduktáz na difference v zastoupení aktivních forem pohlavních hormonů a neurosteroidů v cirkulaci matky a plodu (cíl č. 2)

Naše nedávno publikované předběžné výsledky potvrzující mj. absenci korelace hladin progesteronu mezi UV a MV, avšak překvapivě nalézající analogickou korelaci pro volný i konjugovaný 20 α -hydroxy-metabolit progesteronu a další analogie pro 5 α / β -dihydroprogesterony, nás vedla k dalšímu zkoumání úlohy steroidních placentárních dehydrogenáz/reduktáz (short chain dehydrogenases, SDR) a aldoketoreduktáz (AKR) ve fyziologii a patofyziologii lidského těhotenství a porodu. Také práce Droleta a kol. [60] naznačovala, že jejich lokalizace by se mohla lišit v závislosti na jejich funkci. Tato diplomová práce měla za cíl ověření této hypotézy s využitím steroidní metabolomiky a její zobecnění pro většinu skupin biologicky aktivních steroidů. V syncytiotrofoblastu se vysoce exprimuje

HSD17B1, která katalyzuje konverzi směrem k redukovaným formám steroidů. Syncytiotrofoblast je oblast nejbližší mateřskému kompartmentu. Do mateřské krve by tedy, podle naší hypotézy, měly přecházet hlavně redukované formy steroidů, které jsou v případě estrogenů a GABAergních steroidů bioaktivní a jsou naopak inaktivní v případě gestagenů. Nejbližší fetálnímu kompartmentu se nacházejí endoteliální buňky, které exprimují velké množství HSD17B2, která katalyzuje konverzi estrogenů a GABAergních směrem k inaktivním oxidovaným formám [60] a naopak, v případě gestagenů překvapivě k formám bioaktivním. V tomto případě by zde snad mohla být souvislost s pravděpodobně neuroprotektivním účinkem gestagenů u plodu [76]. Výsledky získané v rámci diplomové práce skutečně plně potvrdily naši hypotézu a to včetně paradoxně vyšších hladin gestagenů v UV ve srovnání s MV. Při porovnání celého steroidního metabolomu v pupečnickové a mateřské žíle je zjevné, že placentární zóny, které jsou v kontaktu s mateřským kompartmentem produkují spíše více redukované metabolity progesteronu a estrogenů, kdežto placetární zóny blíže k plodu tvoří (s výjimkou 3 β -hydroxy-steroidů, jejichž vznik katalyzují také spíše oxidačně působící izoenzymy HSD17B a AKR1C) metabolity více oxidované. To znamená, že pupečnicková krev obsahuje větší podíl 20-oxo-steroidů, jako je Prog, 17-oxo-steroidů (estron, DHEA), 3-oxo-steroidy (5 α / β -DHP) a 3 β -hydroxy-steroidy (isopregnanolon a epipregnanolon), na rozdíl od mateřské krve, kde se nachází výrazně vyšší podíl 20 α -hydroxy-steroidů (Prog20 α), 17 β -hydroxy-steroidů (E2, androstendiol) a 3 α -hydroxy-steroidů (allopregnanolon a pregnanolon). Již dříve byl Droletem a kol. a dalšími autory [60] diskutován fakt, že umístění HSD17B2 v endoteliálních buňkách placenty má uplatnění v ochraně plodu před bioaktivními formami pohlavních hormonů [60, 62]. Naše výsledky tuto hypotézu potvrzují nejen v případě plodu, ale vedou k závěrům obecnějším ukazujícím, že distribuce placentárních enzymů rozhoduje o zcela odlišné bioaktivitě těhotenství ovlivňujících steroidů u plodu a matky. Výsledky ukazují zvýšené poměry redukovaných 3 α -pregnanových steroidů (GABAergních modulátorů), ku inaktivním 3-oxo-izomerům i kompetujícím inaktivním 3 β -izomerům v krvi matky. 3 α -Pregnanové izomery vykazují sedativní, hypnotické, anestetické a anxiolytické vlastnosti. Dalo by se tedy spekulovat, zdali není matka těmito zvýšenými hladinami lépe chráněna před stresem a komplikacemi spojenými s těhotenstvím. 3 α -Pregnanové steroidy jsou také těhotenství udržujícími steroidy, které snižují aktivitu myometria prostřednictvím negenomových mechanismů [77].

7. Závěr

Pomocí vícerozměrné regrese byl sestrojen predikční model, který ukazuje prediktivitu steroidů ve 4 různých tělních tekutinách, přičemž nejlepší prediktivita byla zjištěna u steroidů z pupečnickové vény. Předpovídání nástupu porodu je ale prakticky schůdné, a přitom stále účinné, z hladin mateřských steroidů. Byly zjištěny nejlepší prediktory nástupu porodu v krvi z mateřské loketní vény potvrzující klíčovou úlohu osy placenta-FZ při iniciaci porodu. Tento vysoce pravděpodobný mechanismus umožňuje predikci termínu porodu na základě hormonálních změn. Tento model však nezohledňuje náhlé komplikace, které nesouvisí s rovnováhou těhotenství-ovlivňujících steroidů. Je nutno zdůraznit, že přístup použitý naším týmem rovněž umožnil obejít invazivní získávání vzorků tělních tekutin plodu.

Dalším výsledkem diplomové práce je nalezení obecného mechanismu založeného na distribuci placentárních izoenzymů HSD17B a AKR1C, který určuje proporce pohlavních steroidů a neurosteroidů u matky a plodu.

Výsledkem diplomové práce je i publikace přijatá do tisku v renomovaném zahraničním časopise (Příloha 9.2.) O výsledky získané v rámci této diplomové práce se hodlám opřít i souvislosti s tématem plánovaného postgraduálního studia.

8. Seznam použité literatury

- [1] Paul, S.M. and R.H. Purdy. Neuroactive steroids. *FASEB J*, 1992. 6: 2311-22.
- [2] Frye, C.A. The role of neurosteroids and non-genomic effects of progestins and androgens in mediating sexual receptivity of rodents. *Brain Res Brain Res Rev*, 2001. 37: 201-22.
- [3] Serra, M., et al. Social isolation-induced decreases in both the abundance of neuroactive steroids and GABA(A) receptor function in rat brain. *J Neurochem*, 2000. 75: 732-40.
- [4] Darnaudery, M., et al. The neurosteroid pregnenolone sulfate infused into the medial septum nucleus increases hippocampal acetylcholine and spatial memory in rats. *Brain Res*, 2002. 951: 237-42.
- [5] Johansson, I.M., et al. Allopregnanolone inhibits learning in the Morris water maze. *Brain Res*, 2002. 934: 125-31.
- [6] Vallee, M., et al. Neurosteroids: deficient cognitive performance in aged rats depends on low pregnenolone sulfate levels in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94: 14865-70.
- [7] Selye, H. The anesthetic effect of steroid hormones. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1941. 46: 116-121.
- [8] Gyermek, L. and L.F. Soyka. Steroid anesthetics. *Anesthesiology*, 1975. 42: 331-44.
- [9] Lawrence, D.K. and E.W. Gill. Structurally specific effects of some steroid anesthetics on spin-labeled liposomes. *Mol Pharmacol*, 1975. 11: 280-6.
- [10] Barker, J.L. and B.R. Ransom. Pentobarbitone pharmacology of mammalian central neurones grown in tissue culture. *J Physiol*, 1978. 280: 355-72.
- [11] Majewska, M.D., et al. Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science*, 1986. 232: 1004-7.
- [12] Gee, K.W. and N.C. Lan. Gamma-aminobutyric acidA receptor complexes in rat frontal cortex and spinal cord show differential responses to steroid modulation. *Mol Pharmacol*, 1991. 40: 995-9.
- [13] Hauser, C.A., et al. Modulation of recombinant alpha 6 beta 2 gamma 2 GABAA receptors by neuroactive steroids. *Eur J Pharmacol*, 1995. 289: 249-57.
- [14] Demirgoren, S., et al. Receptor binding and electrophysiological effects of dehydroepiandrosterone sulfate, an antagonist of the GABAA receptor. *Neuroscience*, 1991. 45: 127-35.
- [15] Majewska, M.D., et al. The neurosteroid dehydroepiandrosterone sulfate is an allosteric antagonist of the GABAA receptor. *Brain Res*, 1990. 526: 143-6.
- [16] Wu, F.S., T.T. Gibbs, and D.H. Farb. Inverse modulation of gamma-aminobutyric acid- and glycine-induced currents by progesterone. *Mol Pharmacol*, 1990. 37: 597-602.

- [17] Weaver, C.E., et al. Geometry and charge determine pharmacological effects of steroids on N-methyl-D-aspartate receptor-induced Ca(2+) accumulation and cell death. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000. 293: 747-54.
- [18] Park-Chung, M., F.S. Wu, and D.H. Farb. 3 alpha-Hydroxy-5 beta-pregnan-20-one sulfate: a negative modulator of the NMDA-induced current in cultured neurons. *Mol Pharmacol*, 1994. 46: 146-50.
- [19] Valera, S., M. Ballivet, and D. Bertrand. Progesterone modulates a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. 89: 9949-53.
- [20] Grazzini, E., et al. Inhibition of oxytocin receptor function by direct binding of progesterone. *Nature*, 1998. 392: 509-12.
- [21] Schreiber, V. [Neuropeptides and neurosteroids (author's transl)]. *Cas Lek Cesk*, 1980. 119: 656-659.
- [22] Corpechot, C., et al. Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981. 78: 4704-7.
- [23] Lavaque, E., et al. Steroidogenic acute regulatory protein in the brain. *Neuroscience*, 2006. 138: 741-7.
- [24] Papadopoulos, V., et al. Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol Sci*, 2006. 27: 402-9.
- [25] Hauet, T., et al. Peripheral-type benzodiazepine receptor-mediated action of steroidogenic acute regulatory protein on cholesterol entry into leydig cell mitochondria. *Mol Endocrinol*, 2005. 19: 540-54.
- [26] Joels, M. Steroid hormones and excitability in the mammalian brain. *Front Neuroendocrinol*, 1997. 18: 2-48.
- [27] Rupprecht, R. Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological properties. *Psychoneuroendocrinology*, 2003. 28: 139-68.
- [28] Beyenburg, S., et al. Neuroactive steroids and seizure susceptibility. *Epilepsy Res*, 2001. 44: 141-53.
- [29] Kaminski, R.M., et al. Anticonvulsant activity of androsterone and etiocholanolone. *Epilepsia*, 2005. 46: 819-27.
- [30] Wang, M.D., T. Backstrom, and S. Landgren. The inhibitory effects of allopregnanolone and pregnanolone on the population spike, evoked in the rat hippocampal CA1 stratum pyramidale in vitro, can be blocked selectively by epiallopregnanolone. *Acta Physiol Scand*, 2000. 169: 333-41.
- [31] Park-Chung, M., et al. Sulfated and unsulfated steroids modulate gamma-aminobutyric acidA receptor function through distinct sites. *Brain Res*, 1999. 830: 72-87.
- [32] Irwin, R.P., et al. Pregnenolone sulfate augments NMDA receptor mediated increases in intracellular Ca2+ in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci Lett*, 1992. 141: 30-4.

- [33] Yoshihara, S., et al. A neuroactive steroid, allotetrahydrocorticosterone inhibits sensory nerves activation in guinea-pig airways. *Neurosci Res*, 2005. 53: 210-5.
- [34] Knock, G.A., et al. Modulation of potassium current characteristics in human myometrial smooth muscle by 17beta-estradiol and progesterone. *Biol Reprod*, 2001. 64: 1526-34.
- [35] Todorovic, S.M., et al. 5beta-reduced neuroactive steroids are novel voltage-dependent blockers of T-type Ca²⁺ channels in rat sensory neurons in vitro and potent peripheral analgesics in vivo. *Mol Pharmacol*, 2004. 66: 1223-35.
- [36] Rupprecht, R., et al. Progesterone receptor-mediated effects of neuroactive steroids. *Neuron*, 1993. 11: 523-30.
- [37] Putnam, C.D., et al. Inhibition of uterine contractility by progesterone and progesterone metabolites: mediation by progesterone and gamma amino butyric acidA receptor systems. *Biol Reprod*, 1991. 45: 266-72.
- [38] Mitchell, B.F., et al. Metabolites of progesterone and the pregnane X receptor: a novel pathway regulating uterine contractility in pregnancy? *Am J Obstet Gynecol*, 2005. 192: 1304-13; discussion 1313-5.
- [39] Havlikova, H., et al. Serum profiles of free and conjugated neuroactive pregnanolone isomers in nonpregnant women of fertile age. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006. 91: 3092-9.
- [40] Hill, M., et al. Circulating levels of pregnanolone isomers during the third trimester of human pregnancy. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2007. 105: 166-75.
- [41] Luisi, S., et al. Serum allopregnanolone levels in pregnant women: changes during pregnancy, at delivery, and in hypertensive patients. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000. 85: 2429-33.
- [42] Pearson Murphy, B.E., et al. Neuroactive ring A-reduced metabolites of progesterone in human plasma during pregnancy: elevated levels of 5 alpha-dihydroprogesterone in depressed patients during the latter half of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. 86: 5981-7.
- [43] Gilbert Evans, S.E., et al. 3alpha-reduced neuroactive steroids and their precursors during pregnancy and the postpartum period. *Gynecol Endocrinol*, 2005. 21: 268-79.
- [44] Mickan, H. and J. Zander. Pregnanolones, pregnenolone and progesterone in the human fetoplacental circulation at term of pregnancy. *J Steroid Biochem*, 1979. 11: 1461-6.
- [45] Lenz, H.J., et al. CRF initiates biological actions within the brain that are observed in response to stress. *Am J Physiol*, 1987. 252: R34-9.
- [46] Smith, R., et al. Corticotropin-releasing hormone directly and preferentially stimulates dehydroepiandrosterone sulfate secretion by human fetal adrenal cortical cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998. 83: 2916-20.
- [47] Hill, M., et al. Steroid metabolome in fetal and maternal body fluids in human late pregnancy. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2010. xxx: xxx-xxx.

- [48] McLean, M. and R. Smith. Corticotrophin-releasing hormone and human parturition. *Reproduction*, 2001. 121: 493-501.
- [49] Power, M.L. and J. Schulkin. Functions of corticotropin-releasing hormone in anthropoid primates: from brain to placenta. *Am J Hum Biol*, 2006. 18: 431-47.
- [50] Sibai, B., et al. Plasma CRH measurement at 16 to 20 weeks' gestation does not predict preterm delivery in women at high-risk for preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol*, 2005. 193: 1181-6.
- [51] Nathanielsz, P.W. Comparative studies on the initiation of labor. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1998. 78: 127-32.
- [52] Wu, W.X., et al. Prostaglandin mediates premature delivery in pregnant sheep induced by estradiol at 121 days of gestational age. *Endocrinology*, 2004. 145: 1444-52.
- [53] Mesiano, S. Myometrial progesterone responsiveness and the control of human parturition. *J Soc Gynecol Investig*, 2004. 11: 193-202.
- [54] Mesiano, S. and R.B. Jaffe. Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. *Endocr Rev*, 1997. 18: 378-403.
- [55] Mathur, R.S., et al. Plasma steroid concentrations in maternal and umbilical circulation after spontaneous onset of labor. *J Clin Endocrinol Metab*, 1980. 51: 1235-8.
- [56] Sirianni, R., et al. Corticotropin-releasing hormone directly stimulates cortisol and the cortisol biosynthetic pathway in human fetal adrenal cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. 90: 279-85.
- [57] Rainey, W.E., K.S. Rehman, and B.R. Carr. The human fetal adrenal: making adrenal androgens for placental estrogens. *Semin Reprod Med*, 2004. 22: 327-36.
- [58] Li, Y., et al. Expression of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1, P450 aromatase, and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1, 2, 5 and 7 mRNAs in human early and mid-gestation placentas. *Placenta*, 2005. 26: 387-92.
- [59] Selcer, K.W., et al. Immunohistochemical analysis of steroid sulfatase in human tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2007. 105: 115-23.
- [60] Drolet, R., et al. Human type 2 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase mRNA and protein distribution in placental villi at mid and term pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol*, 2007. 5: 30.
- [61] Hill, M., et al. Is maternal progesterone actually independent of the fetal steroids? *Physiol Res*, 2009.
- [62] Moghrabi, N., J.R. Head, and S. Andersson. Cell type-specific expression of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human placenta and fetal liver. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997. 82: 3872-8.
- [63] Brussaard, A.B. and A.E. Herbison. Long-term plasticity of postsynaptic GABAA-receptor function in the adult brain: insights from the oxytocin neurone. *Trends Neurosci*, 2000. 23: 190-5.

- [64] Brussaard, A.B. and J.J. Koksma. Conditional regulation of neurosteroid sensitivity of GABAA receptors. *Ann N Y Acad Sci*, 2003. 1007: 29-36.
- [65] Leidenheimer, N.J., et al. Activation of protein kinase C selectively inhibits the gamma-aminobutyric acidA receptor: role of desensitization. *Mol Pharmacol*, 1992. 41: 1116-23.
- [66] Watson, J.T. and O.D. Sparkman, *Introduction to mass spectrometry : instrumentation, applications and strategies for data interpretation*. 4th ed. 2007, Chichester, England ; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons. xxiv, 818 p.
- [67] Trygg, J., E. Holmes, and T. Lundstedt. Chemometrics in metabonomics. *J Proteome Res*, 2007. 6: 469-79.
- [68] Csapo, A.I., et al. Peripheral plasma progesterone levels during human pregnancy and labor. *Am J Obstet Gynecol*, 1971. 110: 630-2.
- [69] Younglai, E.V. and S.B. Effer. Amniotic fluid progestins and estrogens in relation to length of gestation. *Am J Obstet Gynecol*, 1971. 111: 833-9.
- [70] Belisle, S., et al. Sources of 17 alpha-hydroxypregnenolone and its sulfate in human pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*, 1978. 46: 721-8.
- [71] Sheehan, P.M., et al. 5 Beta-dihydroprogesterone and steroid 5 beta-reductase decrease in association with human parturition at term. *Mol Hum Reprod*, 2005. 11: 495-501.
- [72] Donaldson, A., et al. Changes in concentrations of cortisol, dehydroepiandrosterone sulphate and progesterone in fetal and maternal serum during pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1991. 35: 447-51.
- [73] Troisi, R., et al. Correlation of serum hormone concentrations in maternal and umbilical cord samples. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2003. 12: 452-6.
- [74] Hill, M., et al. Neuroactive steroids, their precursors and polar conjugates during parturition and postpartum in maternal blood: 2. Time profiles of pregnanolone isomers. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2001. 78: 51-7.
- [75] Ishida, T., et al. [Changes in placental enzymatic activities in relation to estrogen production during pregnancy]. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*, 1985. 37: 547-54.
- [76] Schumacher, M., R. Sitruk-Ware, and A.F. De Nicola. Progesterone and progestins: neuroprotection and myelin repair. *Curr Opin Pharmacol*, 2008. 8: 740-6.
- [77] Perusquia, M. and J. Jasso-Kamel. Influence of 5alpha- and 5beta-reduced progestins on the contractility of isolated human myometrium at term. *Life Sci*, 2001. 68: 2933-44.

9. Přílohy

9.1. Informovaný souhlas

Název projektu:

20 α -Hydroxy-metabolity neuroaktivních pregnanolonových izomerů, progesteronu a pregnenolonu okolo porodu a jejich význam ve fyziologii a diagnostice

Informovaný souhlas účastníka studie

INFORMOVANÝ SOUHLAS PACIENTA

Potvrzuji svým podpisem, že svoluji k odběrům krve dle časového harmonogramu (avšak vždy nejvýše 6 ml) za předpokladu zachování naprosté anonymity v souladu se zákonem na ochranu dat č. 101/2000 Sb. v platném znění zákona. Stvrzuji dále, že jsem byla informována, že materiál nebude sloužit ke komerčním, nýbrž výhradně k vědeckým účelům, o jejichž významu jsem byla poučena. Souhlasím s tím, aby případné zbytky séra získaného z mé krve byly, za předpokladu naprosté anonymity, uschovány a mohly být použity pro zdravotnický výzkum v budoucnosti.

Datum:

Podpis pacienta:.....

Podpis svědka:.....

Podpis lékaře:.....

9.2. Příloha

Přijato do THE JOURNAL OF STEROID BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY

STEROID METABOLOME IN FETAL AND MATERNAL BODY FLUIDS IN HUMAN LATE PREGNANCY

Martin Hill¹, Antonín Pařízek², David Cibula², Radmila Kancheva¹, Jan Evangelista Jirásek³, Marie Jirkovská⁴, Marta Velíková¹, Jana Kubátová¹, Michaela Klímková², Andrea Pašková², Zdeněk Žižka², Lyudmila Kancheva¹, Hana Kazihnitková¹, Ludmila Zamrazilová, and Luboslav Stárka¹

¹*Institute of Endocrinology, Prague, Czech Republic*

²*Department of Obstetrics and Gynecology of the First Faculty of Medicine and General Teaching Hospital, Prague, Czech Republic*

³*Department of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics of the First Faculty of Medicine and General Teaching Hospital, Prague, Czech Republic*

⁴*Department of Analytical Chemistry, University of Pardubice, Czech Republic*

¹Martin Hill, PhD, DSc, Institute of Endocrinology, Národní třída 8, Prague, CZ 116 94, Czech Republic, e-mail: mhill@endo.cz

²Antonín Pařízek, MD, PhD, Department of Obstetrics and Gynecology of the First Faculty of Medicine and General Teaching Hospital, Apolinářská 18, 128 51 Prague 2, CZ 116 94, Czech Republic, e-mail: parizek@porodnice.cz

²Professor David Cibula, MD, PhD, Department of Obstetrics and Gynecology of the First Faculty of Medicine and General Teaching Hospital, Apolinářská 18, 128 51 Prague 2, CZ 116 94, Czech Republic, e-mail: cibula@porodnice.cz

¹Radmila Kancheva, MD, PhD, Institute of Endocrinology, Národní třída 8, Prague, CZ 116 94, Czech Republic, e-mail: rkanceva@endo.cz

³Professor Jan Evangelista Jirásek, MD, PhD, DSc, Institute for the Care of Mother and Child, Prague, Podolske nabrezi 157, 147 00, Prague 4 – Podolí, Czech Republic, e-mail: jirasek@upmd.cz

⁴Marie Jirkovská, MD, PhD, Charles University in Prague, First Faculty of Medicine, Institute of Histology and Embryology, Albertov 4, Prague 2, CZ 128 01 Czech Republic, e-mail: mjirk@lf1.cuni.cz

¹Marta Velíková, Institute of Endocrinology, Národní třída 8, Prague, CZ 116 94, Czech Republic, e-mail: mvelikova@endo.cz

¹Jana Kubátová, Institute of Endocrinology, Národní třída 8, Prague, CZ 116 94, Czech Republic, e-mail: jkubatova@endo.cz

²Michaela Klímková, MD, Department of Obstetrics and Gynecology of the First Faculty of Medicine and General Teaching Hospital, Apolinářská 18, 128 51 Prague 2, CZ 116 94, Czech Republic, e-mail: Michaela.Klimkova@vfn.cz

²Andrea Pašková, MD, Department of Obstetrics and Gynecology of the First Faculty of Medicine and General Teaching Hospital, Apolinářská 18, 128 51 Prague 2, CZ 116 94, Czech Republic, e-mail: Andrea.Paskova@vfn.cz

²Zdeněk Žižka, MD, PhD, Department of Obstetrics and Gynecology of the First Faculty of Medicine and General Teaching Hospital, Apolinářská 18, 128 51 Prague 2, CZ 116 94, Czech Republic, e-mail: Zdenek.Zizka@lf1.cuni.cz

¹Professor Luboslav Stárka, MD, PhD, DSc, Institute of Endocrinology, Národní třída 8, Prague, CZ 116 94, Czech Republic, e-mail: lstarka@endo.cz

Corresponding author:

Martin Hill, PhD, DSc, Institute of Endocrinology, Národní třída 8, Prague, CZ 116 94, Czech Republic

Tel: +420-2-24905 267, Fax: +420-2-24905 325

e-mail: mhill@endo.cz

Abstract

Despite the extensive research during the last six decades the fundamental questions concerning the role of steroids in the initiation of human parturition and origin and function of some steroids in pregnancy were not definitely answered. Based on steroid metabolomic data found in the literature and our so far unpublished results, we attempted to bring new insights concerning the role of steroids in the sustaining and termination of human pregnancy, and predictive value of these substances for estimation of term. We also strived to explain enigmas concerning the biosynthesis of progesterone and its bioactive catabolites considering the conjunctions between placental production of CRH, synthesis of bioactive steroids produced by fetal adrenal, localization of placental oxidoreductases and sustaining of human pregnancy. Evaluation of data available in the literature, including our recent findings as well as our new unpublished data indicates increasing progesterone synthesis and its concurrently increasing catabolism with approaching parturition, confirms declining production of pregnancy sustaining 5β -pregnane steroids providing uterine quiescence in late pregnancy, increased sulfation of further neuroinhibiting and pregnancy sustaining steroids and indicates also the functioning of alternative mechanism for progesterone synthesis and close relationships between localization of placental oxidoreductases and consistently higher levels of sex hormones, neuroactive steroids and their metabolites in the oxidized form in the fetus and in the reduced form in the maternal compartment.

Keywords: steroids, labor, plasma, metabolome, GC-MS

1. Introduction

Despite the extensive research during the last six decades the questions concerning the role of steroids in the initiation of human parturition and origin and function of some steroids in pregnancy were not definitely answered. Human parturition is unique [1] and therefore the use of animal model is frequently inadequate. Therefore the information contained in steroid metabolome in human body fluids may be helpful for a better understanding the physiology of human pregnancy and parturition. Although the steroid metabolome in maternal circulation was extensively studied, the information is deficient concerning the metabolomic profiles in human fetal body fluids. In this study we attempted to review existing state of art in the steroid metabolomics focused on human late pregnancy. The data found in the literature including our recently published data and our current, so far unpublished results, which were obtained from women at labor from the 28th to 41st week of gestation using GC-MS will be reviewed. The latter data includes almost complete steroid metabolome in fetal umbilical arterial and venous blood as well as in the maternal venous blood and amniotic fluid. The metabolomic profiles were recorded in 12 women giving birth after the 38th week of gestation who were without perinatal complications and the group of 38 preterm births being selected so that the reasons in preterm labors were independent of the steroid status (for details see [2] or [3]).

Some of the mechanisms explaining the hormonal control of pregnancy sustaining and onset of parturition involve progesterone withdrawal at concurrently increasing estradiol production before the onset of parturition [4-5]. However, progesterone levels in human maternal blood do not markedly change around parturition [6-7]. Regarding progesterone, the initiation of human delivery is rather connected to a changed expression of specific isoforms of progesterone receptors than to a change in progesterone levels. In addition to the increased circulating estradiol levels, the changing expression of specific isoforms of estradiol receptors probably also contributes to the onset of labor [8]. From the further steroids, cortisol may inhibit progesterone action in the regulation of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase expression at term [9].

In pregnancy and parturition a role of the most abundant neuroinhibiting reduced progesterone metabolite allopregnanolone was suggested in rats [10]. Allopregnanolone, and probably also some other steroids, operate via positive modulation of the type-A γ -aminobutyric acid receptors (GABA_A-r) [11-12] on the membranes of hypothalamic oxytocin-producing cells. However, the role of allopregnanolone and further neuroactive steroids (NS) in the timing of human parturition is still unclear.

The levels of pregnane NS are excessively increased in pregnant women [13] in comparison with those in non-pregnant [14]. Besides GABA_A-r, the polar conjugates of the reduced 3 α / β -hydroxy-5 α / β -reduced pregnane steroids are also active on N-methyl-D-aspartate receptors (NMDA-r) showing positive and negative modulation for the 5 α - and 5 β - isomers, respectively [15]. Although CNS possesses independent steroid production [16], the peripherally produced NS may pass the blood-brain barrier [17] and influence the steroid metabolome in the CNS. NS may also operate at the peripheral level like allopregnanolone and progesterone, both attenuating myometrial contractions via the opening of voltage-dependent K⁺-channels, contrary to estradiol, which is their antagonist [18-19]. The NS may be also produced locally, exerting intracrine and paracrine effects. On the other hand, conjugated steroids may be easily transported by circulation in high amounts from more distant sources. The reduced progesterone metabolites might also exert peripheral analgesic effects via blockade of T-type calcium channels, which are responsible for pain perception [20].

Besides non-genomic effects, reduced progesterone metabolites, which are synthesized in large quantities in pregnancy [13, 21-27], may also bind on nuclear receptors such as progesterone receptors [28] providing uterine quiescence. Some studies including ours reported decreasing production of pregnancy sustaining 5 β -pregnane steroids that provide uterine quiescence via binding to nuclear pregnane X receptors [13, 26, 29-31].

The kinetics of irreversible catabolism of the bioactive steroids, oxido-reductive balances between active and inactive forms of steroids [32] and balances between free steroids and their conjugates [33] may be crucial for the regulation of their biological activity and consequently for the pregnancy sustaining.

Concerning the steroid metabolome in human body fluids, there are four key steroidogenic organs such as fetal and maternal adrenal, placenta, fetal and maternal liver (Fig. 1). Considering the endocrine, autocrine and paracrine steroid effects, the uterus and fetal membranes might be of a great importance [34]. However, the contribution of the steroids produced in these tissues to steroid metabolome in fetal and maternal blood does not seem to be essential.

1.1. Steroid metabolism in fetal and maternal adrenal

1.1.1. The key role of placental CRH in the regulation of steroid biosynthesis in pregnancy

The paramount mechanism controlling overall production of the most of pregnancy steroids is based on placental production of CRH (Fig. 1) [35]. CRH in non-pregnant subjects is a hypothalamic hormone controlling the pituitary secretion of ACTH and, in turn, the production of corticosteroids in an adult adrenal. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in these subjects is based on a negative feedback loop between the final active hormone, ACTH and CRH. The situation in pregnancy after luteo-placental shift is different. CRH is primarily expressed in human placenta and instead of the negative feedback loop cortisol-ACTH-CRH; there is a positive one between cortisol and CRH, while the ACTH production stagnates. CRH directly stimulates production of Δ^5 steroid sulfates in the fetal zone of the fetal adrenal (FZ) [36-37] and cortisol synthesis in the transitional zone of the fetal adrenal (TZ) [38] via binding to ACTH receptors [39]. ACTH receptor mRNA is localized in all cortical zones but its abundance is higher in DZ (definitive zone) than in FZ [40]. The fetal adrenal gland at term is almost the size of the fetal kidney and the FZ at term produces steroids more abundantly than normally secreting adrenal glands of the adult [35]. The C-19- and possibly also the C-21 Δ^5 steroids, originating in the FZ and being further processed in placenta and liver, represent the largest fraction of steroids in pregnancy [41-44]. However, progesterone is commonly considered to originate mainly in placenta from maternal LDL-cholesterol [7, 45].

After midgestation, the TZ cells may have the capacity to synthesize cortisol and be analogous to cells of the *zona fasciculata* of the adult adrenal. By the 30th week of gestation, the definitive zone of the fetal adrenal (DZ) and TZ begin to resemble the adult *zona glomerulosa* and *zona fasciculata*, respectively [46]. The FZ still producing conjugated C-19 Δ^5 steroids is similar to the adult *zona reticularis* but unlike the adult *zona reticularis*, the FZ produces excessive amounts of conjugated C-21 Δ^5 steroids, including sulfates of pregnenolone (PregS), 17-hydroxypregnenolone [35] and androstenediol (Fig. 2). As generally accepted, the Δ^5 steroid sulfates (originating in the FZ) serve as precursors for the placental production of estradiol [36-37] and as suggested in our recent study [2], possibly also for progesterone synthesis.

The levels of CRH are extremely high in maternal and high in the fetal blood [47]. The rising levels of human placental CRH in maternal circulation in the last four weeks of pregnancy stimulate the production of conjugated C-19- [36] and probably also the C-21- Δ^5 steroids [2] in FZ in a dose-dependent manner. CRH is as effective as ACTH at stimulating sulfated dehydroepiandrosterone (DHEAS) production but is 70% less potent than ACTH at stimulating cortisol production. Although CRH increases the expression of cholesterol desmolase (CYP11A1, cholesterol side chain cleavage enzyme) it is not mitogenic for fetal adrenal cortical cells [36].

It should be outlined that the excessive production of placental CRH is specific for primates and the boost in CRH production in late pregnancy is specific only for human and great apes [48]. This should be considered when addressing the initiation of human parturition and this is the primary reason for which the animal models may not be optimal for investigation of human pregnancy. Only human beings and great apes produce a circulating binding protein for CRH (CRHBP), the levels of which fall at the end of pregnancy thus increasing the bioavailability of CRH [49-50].

Despite the substantial alterations in the placental CRH production in late pregnancy, the predictivity of the unstable CRH for an estimation of term is relatively poor [51]. Nevertheless, the CRH induced changes in the steroid metabolome may better predict the approaching parturition. When using the simultaneous quantification of the steroid metabolome in one sample by GC-MS or LC-MS and multivariate approach for evaluation of the results obtained, the cumulative effect of mutually strongly inter-correlated steroids substantially improves the predictivity. This algorithm appears to be less expensive and more informative. As demonstrated in our recent study [3], the predictivity of the primary products of the FZ for the onset of human parturition is high.

1.1.2. Steroid 17 α -hydroxylase/17,20 lyase (CYP17A1)

Besides stimulation of CYP11A1, CRH also stimulates 17 α -hydroxylase/17,20 lyase (CYP17A1) expression possessing both 17 α -hydroxylase and 17,20-lyase activities [36]. CYP17A1 proteins and mRNAs were detected only in FZ and TZ, not in the DZ [52-53]. CYP17A1 also exhibits marked progesterone 16 α -hydroxylase activity in human steroidogenic cells including those from the fetal adrenal [54]. CYP17A1 has extremely low C-17,20-lyase activity toward C-21 Δ^4 steroids and fails to convert these substances to corresponding C-19 steroids [54]. However, also the levels of sulfated C-21 Δ^5 steroids are elevated in the maternal blood [55] and excessively elevated in the fetal circulation in contrast to the situation in non-pregnant women (Fig. 2), which indicates limited C-17,20-lyase activity in the FZ also for C-21 Δ^5 steroids.

1.1.3. Steroid sulfotransferases and sulfatases

The human type 2A1 hydroxysteroid sulfotransferase (SULT2A1) displaying reactivity towards $3\alpha/\beta$ -hydroxysteroids, estrogens, and 17-hydroxyl group of androgens is highly expressed in the adrenal cortex [56]. TZ and FZ showed immunoreactivity for SULT2A1, but not the DZ [53]. SULT2A1 enzyme activities are independent of the gestational age (GA) [57]. In addition to the SULT2A1 expression, the estrogen preferring sulfotransferase (SULT1E1) activity [58] and relatively high steroid sulfatase (STS) immunoreactivity were also reported in the adult adrenal gland [59].

1.1.4. Activities of enzymes enrolled in the synthesis of corticoids

3β -Hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta(5\rightarrow4)$ -isomerase (HSD3B) catalyzes the oxidative conversion of 3β -hydroxy- Δ^5 steroids. HSD3B immunoreactivity is not detected in the fetal adrenal prior to 22 weeks of gestation, but becomes discernible in the TZ and DZ after 23 weeks [52-53]. In late pregnancy, TZ and DZ provide the conversion of Δ^5 -steroids to 3-oxo- Δ^4 precursors of corticosteroids expressing type 2 HSD3B (HSD3B2) [60]. Early in gestation, only the Δ^5 -steroid production occurs in the TZ and FZ, which expresses CYP11A1 and CYP17A1 [52]. ACTH does not influence steroidogenesis in the FZ [61]. Like the HSD3B2, the enzymes CYP21A2 (P450 21 hydroxylase, or P450C-21), CYP11B1 (11 β hydroxylase or P450c11) and CYP11B2 (aldosterone synthase) are necessary for corticoid synthesis. CYP21A2 immunoreactivity is minor in the DZ but is detectable in almost all cells in the TZ and FZ [53, 62]. After 23 gestational weeks, the immunoreactivity for CYP21A2 is detected in all three zones [53]. TZ expressing CYP11A1, CYP17A1, HSD3B2, CYP21A2, type 1- (CYP11B1) and type 2 11 β -hydroxylase (CYP11B2) has the capacity to synthesize cortisol after midgestation [53, 62] while the DZ may synthesize mineralocorticoids, but not until near term [62]. CYP17A1, CYP11B1, and CYP11B2 immunoreactivities are present in the TZ and FZ but absent in the DZ but [62]. Later in gestation, the DZ produces mineralocorticoids, TZ produces glucocorticoids and the FZ continues to produce Δ^5 -steroids [52].

Human adrenal glands also possesses 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD11B) activity catalyzing inactivation of glucocorticoids [63].

1.1.5. Adrenal C-3, C-17 and C-20 oxidoreductive conversions

HSDs, catalyzing reversible C-3, C-17 and C-20 oxidoreductive inter-conversions belong to either the short-chain Dehydrogenase/Reductases (SDRs) or the Aldo-Keto Reductases (AKRs). Several SDRs are active in the adrenals.

The type 11 17 β -HSD HSD17B11 $3(\alpha\rightarrow\beta)$ -hydroxysteroid epimerase prefers the oxidative conversion converting 5α -androstan- $3\alpha,17\beta$ -diol to androsterone [64-65].

Type 6 17 β -HSD (HSD17B6) possessing both oxidoreductase and $3(\alpha\rightarrow\beta)$ -hydroxysteroid epimerase activities acts on both C-19 and C-21 3α -hydroxysteroids. Because bioactive steroids commonly exert their effect in a stereo-specific manner, epimerase activity may be of biological importance [66].

Type 7 17 β -HSD (HSD17B7) preferably operates as reductase and catalyzes the reduction of the oxo- group in either 17- or 3-position of the substrate to the corresponding 17 β - or 3α -hydroxy counterparts, respectively. HSD17B7 exhibits also minor 3β HSD-like activity towards progesterone and 20α -dihydroprogesterone (Prog 20α) [67]. Like the HSD17B7 the type 12 17 β -HSD (HSD17B12) also prefers the reductive direction catalyzing the conversion of estrone into estradiol and was also detected in the adrenal [68].

1.1.6. 16α -Hydroxylation

16α -Hydroxylation being primarily provided by cytochrome P450 CYP3A7 enzyme probably regulates the levels of precursors for the synthesis of hormonally active steroids. The CYP3A7 is also active in the fetal adrenal but the levels of the CYP3A7 isozyme in fetal adrenals are only 33% of that in fetal livers [69-70].

1.1.7. Differences in enzyme expression between fetal and adult adrenal

While the expression of some enzymes like CYP17A1, 21-hydroxylase, 11 β hydroxylase, and CYP11B2 do not significantly differ between the fetal adrenal in late pregnancy and adult adrenal, others show pronounced differences. CYP11A1, cytochrome b5 enzyme (CYb5) and P450 oxidoreductase (POR) messenger RNA (mRNA) expression is nearly twice higher in fetal than in adult adrenal, and SULT2A1 transcript shows even 13-fold higher levels in the fetal adrenal. Alternatively, HSD3B2 mRNA expression in midgestation is 127-fold lower than that in the adult adrenal. It is evident that increased expression of CYP11A1 in fetal adrenal reflects high cholesterol utilization for steroidogenesis. CYb5 and POR cofactors may stimulate CYP17A1 activity and thus the production of sulfated Δ^5 steroids in the fetal adrenal [71]. Markedly higher expression of SULT2A1 reflect high claim for steroid sulfation enabling a production of sufficiently soluble precursors, which can be easily

transported in excessive amounts by circulation for the placental synthesis of sex hormones. Alternatively, the lack of HSD3B2 in the FZ provides preferential synthesis of the Δ^5 C-21 steroids over cortisol production.

1.2. Steroid metabolism in fetal and maternal liver

The activities of CYP11A1 and HSD3Bs in the fetal liver are negligible or even absent in human pregnancy [72]. However, other steroidogenic enzymes in the maternal- and particularly in the fetal liver may substantially influence the steroid metabolome in both fetal and maternal circulation.

1.2.1. Liver 16 α -Hydroxylation and estrogen formation

16 α -Hydroxylation is provided by cytochrome P450 CYP3A7 enzyme that is pronouncedly expressed in the microsomal fraction from fetal liver [70, 73] although this activity in the adult liver is negligible [43]. While CYP3A4 and CYP3A5 enzymes are responsible for the production of 7 α -hydroxy-DHEA (DHEA7 α), 7 β -hydroxy-DHEA (DHEA7 β), and 16 α -hydroxy-DHEA (DHEA16 α) in the adult liver microsomes, the fetal/neonatal CYP3A7 produces DHEA16 α and DHEA7 β [74].

The fetal liver is the primary source of 16 α -hydroxy-metabolites of Δ^5 steroids, as also documented by consistently higher levels of 16 α -hydroxy-metabolites of the substances in fetal circulation when compared with the maternal compartment [75-76], confirmed also by our unpublished results (Fig. 3). However, some authors [54, 75] suggested Prog16 α synthesis from Preg16 α catalyzed by CYP17A1 localized in the placenta.

The levels of 16 α -hydroxy-steroids in the fetal blood increase from the second to the third trimester [61, 75-76] and rise considerably at delivery [77]. In addition, the ratios of 16 α -hydroxymetabolites to 16-deoxy-steroids significantly increased after 30th week of gestation indicating increasing catabolism of the sex hormone precursors in the fetal liver [78] (Fig. 3) (unpublished results).

According to the Diczfalusy's concept [79], the DHEAS from the fetal adrenals is hydroxylated at the 16 α -position in the fetal liver and then aromatized to E3 in the placenta and most of this huge amount of E3 exits the placenta into the uterine vasculature and maternal circulation.

The inhibitory effect of sulfated DHEA16 α on estrogen production is minimal at low DHEAS concentrations (favoring the secretion of estrone and estradiol) and is greatly enhanced at concentrations of DHEAS that induced maximum estrone and estradiol secretions. In trophoblastic cells, the metabolism of DHEAS can modulate E3 secretion, and the metabolism of sulfated DHEA16 α can modulate the secretion of estrone and estradiol [80]. However, whilst each substrate appeared to inhibit the aromatization of the other, the 16-deoxy-C-19 steroids are more potent inhibitors [81]. 16 α -Hydroxy-metabolites of testosterone and androstenedione are only poor substrates for the placental CYP19A1 in contrast to the corresponding 16-deoxy-steroids [82] and the initial rates of estrogen formation are higher for the 16-deoxy-C-19 steroids [81].

Lee and colleagues [83] reported that at a physiologically relevant low substrate concentration (10 nM), CYP3A7 had a strong catalytic activity for the 16 α -hydroxylation of estrone, and the ratio of its 16 α -hydroxylation to 2-hydroxylation was 107%. However, when estradiol was the substrate, CYP3A7 had only very weak catalytic activity for 16 α -hydroxylation, and the ratio of its 16 α -hydroxylation to 2-hydroxylation was 10-33%. Moreover, the maximum velocity/*K*(m) ratio was more than 100 times higher for the 16 α -hydroxylation of estrone than for estradiol. This prompts that estrone originating in placenta from androstenedione is transported by circulation into the fetal liver, where may be further conjugated by sulfatases and glucuronidases, converted to estradiol by reductive and SDRs and AKR1Cs (mainly AKR1C4 being independent of the substrate sulfation status). Estradiol of the placental and liver origin may be also sulfated, then the free and conjugated estrone may be 16 α -hydroxylated by CYP3A7 (the most potent AK1C4 is independent of the substrate sulfation status) and finally, liver SDRs and AKR1Cs may catalyze further conversion of the free and conjugated (in C-3 position) 16 α -hydroxy-estrone to free and conjugated estriol.

Like in the case of CYP3A7, the adult liver exhibits little CYP19A1 activities but the fetal liver is capable to extensively aromatize various C-19 steroids to estrogens [84-85] and the CYP19A1 activity in the fetal hepatocytes appears to be up regulated by glucocorticoids [86].

1.2.2. C-3, C-17 and C-20 oxidoreductive conversions

Because active hydroxysteroids generally exert their effect in a stereo-specific manner, epimerase activity may potentially play an important role in regulating the biological activities of various steroids.

Human liver contains all isoforms (AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, and AKR1C4) of dihydrodiol dehydrogenase with 20 α -, 17 β -, 3 α - or 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase-like activity [87-89]. Activities of AKR1Cs could control occupancy of the androgen- and GABA_A-r [90]. *In vivo*, all AKR1Cs preferentially work as reductases [91] and are capable to reduce estrone and estradiol to progesterone and Prog20 α , respectively. On the other hand,

AKR1Cs may decrease the neurosteroid concentrations by inactivating allopregnanolone and eliminating the precursors like progesterone from the synthetic pathways via reduction of the 20-oxo-steroid group [32, 92]. The AKR1C2 preferring 3 α -reduction over the 3 β -reduction may catalyze 3 α -, 17 β -, and 20 α -HSD reactions [32, 89, 92-93]. AKR1C3 catalyze the reduction of 5 α -dihydrotestosterone (5 α -DHT), androstenedione, estrone and progesterone to produce 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol, testosterone, estradiol and Prog20 α , respectively [88]. AKR1C4, the expression of which is limited to the liver [32, 94-95], catalyzes the transformation of the 5 α -DHT into 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol. Liver specific AKR1C4 shows superior catalytic efficiency versus the other isoforms. This efficiency exceeded those obtained with the other isoforms by 10-30-fold. In contrast to the other isoforms, the catalytic efficiency for AKR1C4 is unaffected by steroid conjugation [89].

Two liver SDRs, HSD17B7 and HSD17B12, also preferentially work as reductases. HSD17B7 preferring the reduction of the oxo group in 20-, 17- or 3-position to the corresponding 20 α -hydroxy-, 17 β -hydroxy- or 3 α -hydroxy-counterparts is also significantly expressed in the liver [67, 96] as well as HSD17B12 catalyzing the transformation of estrone into estradiol [68].

HSD17B2, HSD17B10 and HSD17B11, which are also highly expressed in the liver, prefer the oxidative direction. HSD17B2 may contribute to formation of 20 α - and 17 β -steroids from their 20-oxo- and 17-oxo-counterparts [42]. HSD17B6 prefers oxidoreductase and 3(α - \rightarrow β)-hydroxysteroid epimerase activities and acts on both C-19 and C-21 3 α -hydroxysteroids [66]. Type 10 17 β -HSD (HSD17B10) being abundantly expressed in the liver, is capable of catalyzing the oxidation of steroid modulators of GABA_A-r [97]. HSD17B10 catalyzes the oxidation of 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol to 5 α -DHT [98] and conversion of allopregnanolone and allotetrahydrodeoxycorticosterone (3 α ,5 α -THDOC) to the corresponding inactive 3-oxo steroids. The catalysis of HSD17B10 appears to be essential for maintaining normal functions of GABAergic neurons [99]. Finally, the HSD17B11 [64] can convert 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol to androsterone [64-65].

Commonly, 20 α -hydroxysteroids are considered as inactive catabolites. However, 20 α -dihydropregnenolone relax the tonic contractions induced by KCl in a concentration-dependent way [100].

1.2.3. 5 α / β -Reductases

5 α - and 5 β -Reductions are important for the biosynthesis of NS. Conjugation of the androgens occurs extensively in the liver which has high activity of 5 α - and 5 β -reductases [101-102].

There are two isoforms of 5 α -reductase, with a limited degree of homology, different biochemical properties and distinct tissue distribution. Type 1 5 α -reductase (SRD5A1) is widely distributed in the body, with the highest levels in the liver. SRD5A1 converts testosterone into 5 α -dihydrotestosterone and progesterone or corticosterone into their corresponding 5 α -3-oxo-steroids. In the androgen-dependent structures, 5 α -DHT is almost exclusively formed by 5 α -reductase type 2 (SRD5A2) [103]. In the peripheral tissues, including the liver, SRD5A1 and reductive 3 α -HSD isoforms work consecutively to eliminate the androgens and protect against the hormone excess [104].

AKR1D1 belonging to AKRs, efficiently catalyzes the reduction of both C-19 and C-21 3-oxo- Δ^4 steroids to the corresponding 5 β -reduced metabolites. 11 β -Hydroxy group in corticoids hinders the transformation [102].

The higher levels of several 5 β -reduced progesterone metabolites in the fetus than in maternal compartment (Figs. 4B,D and 5C,D) (unpublished data) indicate higher placental expression of AKR1D1 towards the fetal compartment and/or higher expression of AKR1D1 in the fetal liver. The latter possibility appears to be more likely because both 5 β -PI display lower levels in the blood from umbilical vein (UV) than in blood from the umbilical artery (UA) (Figs. 5C,D) (unpublished data). In addition, the ratio of 5 β -DHP to progesterone is significantly higher in UA than in UV (Fig. 4D).

1.2.4. Balance between polar conjugates and unconjugated steroids

The balance between the sulfated and unsulfated NS may be decisively influenced by the activities of liver sulfatases, sulfotransferases and perhaps also the glucuronosyltransferases. The pregnane and androstane 5 α / β -reduced metabolites being frequently neuroactive are readily sulfated in the liver. As already mentioned, the balances between free steroids and their conjugates [33] may be crucial for the regulation of their biological activity and consequently for the sustaining of pregnancy. The 5 α / β -reduced metabolites with a hydroxyl in the 3 α -position positively modulate GABA_A-r. Their sulfates operate in the opposite way, though on different binding sites. Sulfation may also decrease the concentration of unconjugated NS, the polarity of which is more favorable for crossing the blood-brain barrier. The modulation efficiencies of the conjugated neurosteroids on GABA_A-r may reach about 1/10 of those for the corresponding unconjugated substances [33]. Nonetheless, in maternal circulation the concentrations of conjugated pregnane steroids are about 2 orders of magnitude higher when compared with their unconjugated analogues. Conjugation is a prerequisite for the

activity of 3 α / β -hydroxy-5 α / β -reduced pregnane steroids on N-methyl-D-aspartate receptors (NMDA-r) showing positive and negative modulation for the 5 α - and 5 β - isomers, which are neuroactivating and neuroinhibiting substances, respectively [15]. Finally, the sulfation might influence the activity and/or availability of the peripherally active pregnancy-sustaining steroids like the 5 α / β -reduced pregnane and androstane steroids but may also facilitate their transport by circulation. However, even in these cases, the sulfation rather shift the biological activity towards induction of labor, catabolizing the 5 β -reduced steroids that provide uterine quiescence via pregnane X type receptors [29] and allopregnanolone that relaxes myometrium through voltage-dependent K⁺ channels [105].

Our previous [13] and current data consistently show rising sulfation of all PI including neuroinhibiting GABA-ergic substances in late pregnancy (Fig. 5E-H) (unpublished data).

The sulfotransferase SULT2A1 is highly expressed in human liver [56, 106-108]. In the fetal liver, SULT2A1 activity exhibits remarkable inter-individual variability, which may be the cause for an absent correlation with the GA [57]. Liver glucuronosyltransferase enzyme UGT2B7 catalyzes the glucuronidation of bile acid substrates but also the 3 α -hydroxylated androgenic steroids, and 17 β -estrogens at very high rates [109].

The sulfotransferase enzyme SULT1E1 has the lowest K(m) values for estrogens and catecholestrogens of the known human SULT isoforms [110]. SULT1E1 is responsible for the sulfation and inactivation of estradiol at physiological concentrations. The enhanced SULT1E1 activity may have a role in inhibiting GH-stimulated STAT5b phosphorylation and IGF-1 synthesis via the sulfation and inactivation of estradiol [111]. SULT1E1 may also play an important role in protecting peripheral tissues from possible excessive estrogenic effects [58].

Besides placenta, also the liver shows strong expression of STS [112]. Although Warren and French [113] reported about four times less activity for DHEAS hydrolysis in human liver when compared with placenta, Selcer and co-workers reported comparable STS immunoreactivity in these tissues [112]. In contrast to placenta where the arylsulfatase K (ARSK) is not expressed, this enzyme might contribute to the hydrolysis of steroid sulfates in the liver [114].

1.2.5. Inactive steroid catabolites and prediction of term

Taking into account the simple availability of maternal blood in contrast to the fetal blood and amniotic fluid, the GA-predicting steroids in maternal plasma are of greatest interest. The inactive catabolites of sulfated Δ^5 steroids produced by the FZ or placental estrogens frequently exhibit even better predictivity for an estimation of GA than the parent steroids. These catabolites appear to be the end products of the steroid metabolism, the biosynthesis of which is readily catalyzed by the liver enzymes. For instance, the excellent predictivity was recorded for conjugated 16 α -hydroxy-metabolites of Δ^5 steroids and estrogens (Fig. 6), polar conjugates of 5 α / β -reduced C-19 steroids (Fig. 7A-C) and some 5-androstene-3 β ,7 α / β ,17 β /oxo-steroids (Fig. 7D-F) [3]. Moreover, an acceleration of 16 α - and possibly also 7 β -hydroxylation was reported with approaching term [61, 75-76].

1.3. Transport of steroid sulfates into the placenta

The transport of steroid sulfates from the fetal and maternal circulations into the placental cells (where they are further metabolized) appears to be mediated by an organic anion transporter OAT-4, which is localized in the cytotrophoblast membranes and at the basal surface of the syncytiotrophoblast [115] (Fig. 8). The data indicates the transport of steroid conjugates between the fetal and maternal compartment without preceding hydrolysis.

1.4. Steroid metabolism in placenta

Sex hormones produced by the placenta play a key role in the endocrine control of pregnancy and parturition. Placental CRH stimulates the production of estradiol in a time- and dose-dependent manner and also the mRNA levels of the key enzymes for estrogen synthesis such as aromatase (CYP19A1), type 1 17 β -HSD (HSD17B1) [116] as well as enzymes involved in progesterone synthesis like type 1 3 β -HSD (HSD3B1) and CYP11A1 [117].

1.4.1. Cholesterol desmolase in placenta

In contrast to other tissues producing cholesterol, placenta lacks short term modulation of steroid synthesis. In this tissue, the electron supply to CYP11A1 limits the conversion rate permitting pregnenolone synthesis to proceed at only 16% maximum velocity. Thus, the mitochondria have a near-saturating cholesterol concentration for CYP11A1, likely provided by the StAR-like protein MLN64. Cholesterol translocation to the

CYP11A1 is not critical for placental progesterone synthesis and the subsequent pregnenolone conversion to progesterone [118].

1.4.2. Steroid sulfatases and placental production of sex hormones

The principal metabolic step preceding further placental metabolism of sulfated Δ^5 steroids originating in FZ is their desulfation being provided by the placental STS, which is localized in the endoplasmic reticulum [119]. The placental STS expression in pregnancy explicitly outweighs the production in other tissues [58]. STS allows access of DHEA to the HSD3B1 and CYP19A1 within the syncytiotrophoblast layer and conversion to estrogens [120]. Placental STS is independent of substrate concentration [121] and of GA [122-124].

1.4.3. 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity

HSD3B1 is necessary for the placental synthesis of progesterone and C-19 3-oxo-4-ene steroids. The latter substances are further metabolized to estrogens [60, 125]. HSD3B1 placental activity is predominantly located in the syncytiotrophoblast and intermediate trophoblast cells [126-127]. The specific activities of HSD3B for C-21 steroids in mitochondrial and microsomal preparations from human term placenta are about two times higher than for the C-19 steroids [128]. Like in the case of sulfatase activity, placental HSD3B1 activities are constant throughout the human gestation [129] [122-123] and around parturition [124, 130]. Progesterone and DHEAS may cause marked HSD3B inhibition in physiological conditions [121, 131].

1.4.4. Estrogen formation

Placenta is the primary site of estrogen formation in pregnancy. CYP19A1 catalyzing the last steps of estrogen biosynthesis from Δ^4 C-19 steroids is abundantly expressed in syncytiotrophoblast [132]. Estrogens regulate their own synthesis by the product inhibition. The substrate inhibition is more apparent for 16-deoxy-estrogens than for their 16 α -hydroxy-metabolites [133]. 16-deoxy- and 16-hydroxy-C-19 substrates bind at separate, but interactive sites and each substrate on binding inhibits the aromatization of the other [134-135].

CYP19A1 activity strongly depends on GA. The increase in estradiol levels in maternal blood from the 2nd to the 3rd trimester is greater than that of the placental weight and there is significantly higher placental CYP19A1 activity in the 3rd trimester than in the 2nd trimester [122]. The aforementioned results as well as our recent data [3] indicate high predictivity of parturition onset for some estrogens (Fig. 9) (unpublished data).

1.4.5. 16 α -Hydroxylation

Although the CYP3A7 is primarily expressed in the fetal liver, its activity was also found in the placenta. The amounts of placental and endometrial CYP3A7 mRNA and protein substantially increase from the first to the second trimester of pregnancy [73].

1.4.6. 5 α / β -Reductases

The pioneer studies on placental 5 α -reductase [129] reported *in vitro* synthesis of 5 α -reduced pregnanes 3H]5 α -pregnane-3,20-dione and [3H]3 β -hydroxy-5 α -pregnan-20-one from [3H]progesterone by placental tissue. 5 α -Reduced steroids, including allopregnanolone, suppress neuronal activity and may have neuroprotective effects in the fetus. Placental expression of both isoenzymes increased with advancing gestation. Placental 5 α -reductases may provide precursors to brain allopregnanolone synthesis [136].

AKR1D1 is primarily expressed in the liver but its activity was also detected in other tissues including placenta [30]. The progesterone metabolite 5 β -dihydroprogesterone (5 β -DHP) is a potent tocolytic. Acute *in vitro* treatment with 5 β -DHP causes rapid uterine relaxation that is not mediated by pregnane X-type receptors (PXR) but the 5 β -reduced metabolites of progesterone may also act chronically in pregnancy through a PXR-mediated mechanism [29]. In the placenta and myometrium, relative expression of AKR1D1 decreases in association with labor by about two-fold and 10-fold, respectively [30]. In contrast to the turnover of progesterone to 5 α -DHP reflecting 5 α -reductase activity which remains stable (Fig. 4C), the conversion of progesterone to 5 β -DHP reflecting 5 β -reductase activity decreases later in pregnancy [13, 26, 30] (Fig. 4D) (our unpublished data). This data is consistent with a possible role for 5 β -DHP in the onset of spontaneous human parturition. The placental expression of 5 β -reductase m-RNA is about two orders of magnitude higher than in myometrium and about three orders of magnitude higher than in chorion and amnion [30].

1.4.7. Steroid sulfotransferase

SULT2B1 catalyzing sulfation of DHEA but not estradiol is present in syncytiotrophoblast [107-108, 137-138] while SULT1E1 and SULT2A1 show negligible functional activity in placental tissues [139], which means that estrogens are sulfated in an extra placental way, most probably in the liver.

1.4.8. Reversible C-3, C-11, C-17 and C-20 oxidoreductive inter-conversions in placenta

Placenta expresses various dehydrogenases belonging to SDRs and AKRs. From the SDRs, the cytoplasmic HSD17B1 is highly expressed in syncytiotrophoblast [42]. Besides catalyzing the conversion of estrone and progesterone to estradiol and Prog20 α , respectively, HSD17B1 may also catalyze the formation of 5-androstene-3 β ,17 β -diol from DHEA [140-141]. Syncytiotrophoblast, coming directly into contact with maternal blood, converts estrone to estradiol. In contrast to type HSD17B1 mRNA, type HSD17B2 mRNA is not detectable in cell cultures of human cytotrophoblast or syncytiotrophoblast [142]. Besides HSD17B1, the AKR1 member C3 enzyme (AKR1C3), HSD17B7 and HSD17B12 may also catalyze progesterone deactivation to Prog20 α and conversion of inactive estrone to bioactive estradiol [68, 88, 132, 141].

AKR1C3 is pluripotent widely distributed enzyme catalyzing the conversion of aldehydes and ketones to alcohols [143-144]. AKR1C3 functions as a bi-directional 3 α -, 17 β - and 20 α -HSD and can interconvert active androgens, estrogens and progestins with their cognate inactive metabolites, however, like other AKR1Cs *in vivo*, AKR1C3 preferentially works as a reductase [88, 91, 143].

Regarding 3 α -pregnanolone isomers (PI) positively modulating GABA_A-r, the oxidoreductive conversion of 20-oxo- to 20 α -hydroxy-group or a modification of the C17,20 side chain results in a selective (subtype dependent) reduction of positive allosteric modulation of GABA_A-r (about six-fold) [145]. In addition, the reversible oxido-reductive interconversion of 3 α -hydroxy/3-oxo/3 β -hydroxy-5 α / β -reduced pregnane and androstane steroids may influence the ratio of neuroinhibiting 3 α -hydroxy-5 α / β -reduced metabolites, which are allosteric positive modulators of GABA_A-r, to the corresponding 3-oxo-metabolites and 3 β -hydroxy-metabolites. The latter ones are biologically inactive but compete with the 3 α -hydroxy-isomers for the active sites on the receptors [146].

In contrast to the aforementioned enzymes, the HSD17B2 prefers the oxidative direction catalyzing the progesterone biosynthesis from inactive Prog20 α as well as the conversion of bioactive estradiol to biologically inactive estrone [42]. The site of expression of HSD17B2 was identified in two studies, either in endothelial cells of fetal capillaries and some stem villous vessels [42] or in endothelial cells of villous arteries and arterioles [147]. Moghrabi et al. suggested a protective role of the HSD17B2 from the excess of bioactive estrogens and androgens in the fetus [42]. Besides HSD17B2, the type 14 17 β -HSD (HSD17B14) a member of SDRs may also convert estradiol to estrone and 5-androstene-3 β ,17 β -diol to DHEA [147].

The metabolism of placental sex steroids in the reductive direction increases as pregnancy advances and significantly rises during human parturition [129, 148]. This phenomenon may be of an importance in the mechanism of initiation and continuation of labor and might indicate a mechanism of progesterone withdrawal in association with the onset of human parturition.

HSD11B1 expression is abundant in syncytiotrophoblast microvillus membranes juxta the maternal circulation whereas HSD11B2 expression is extensive throughout the remainder of the syncytiotrophoblast, including the basal cell membrane and epithelial basal lamina [149]. HSD11B1 expression is constant, but the expression of HSD11B2 in the placenta increases significantly with GA. The adaptation of HSD11B2 activity prevents the increasing maternal cortisol concentrations from transplacental passage [150].

1.5. Distribution of placental oxidoreductases and sources of progesterone, estrogens and neuroactive steroids in pregnancy

As indicated by growing progesterone levels in UV (our unpublished results) (Fig. 10), placental production of progesterone probably increases shortly before termination of pregnancy but its levels in UA, MV, and amniotic fluid (AF) remain constant. This means that there should be concurrently increasing progesterone catabolism in this period.

Paradoxically, although progesterone is the most important steroid in human pregnancy there are a lot of peculiarities and contradictions regarding its biosynthesis. As already mentioned, the FZ is analogous to adult *zona reticularis*. However, while both FZ and *zona reticularis* produce large amounts of DHEAS, the extensive production of PregS is specific for FZ. This substantial dissimilarity between FZ and *zona reticularis* remains unexplained. Although, DHEAS from the FZ is generally accepted as the substrate for placental estrogen synthesis, the physiological role of PregS in human pregnancy is unknown.

On the other hand, the maternal LDL cholesterol is considered to be a single substrate for placental progesterone synthesis, although the conversion of cholesterol/sulfate to pregnenolone/sulfate is the rate limiting step but not the cholesterol transport to active sites like in extra placental tissues. It is generally accepted that the activities of STS and HSD3B1 are enormous in comparison with other human tissues and being independent of GA are capable to readily convert DHEAS to estrogens. Inconsistently, the fate of PregS was not considered although its concentrations in late pregnancy are at least the same as DHEAS levels. Whereas DHEAS easily penetrates to the active sites in placenta being desulfated and converted to androstenedione and testosterone, there is no reason for PregS to act differently. Neither STS nor HSD3B1 activities are rate limiting for placental progesterone synthesis [118]. Therefore, it may be more expedient to utilize fetal PregS instead of the necessity to synthesize total maternal progesterone *de novo* from maternal LDL cholesterol.

The progesterone is vital for pregnancy sustaining and so there may be independent sources for its production. Whereas the conversion of maternal LDL cholesterol may be the first of them, there is no reason for placenta to reject processing of pregnenolone sulfate in the same way as DHEAS, obviously, except for the final step, i.e. estrogen synthesis. The former source provides stability of progesterone production in the cases where the steroid production in the FZ fails, however, the latter may substantially contribute to the progesterone production. As our data indicates, the rise in production of Δ^5 steroids with approaching labor is linked to rise of progesterone levels in UV but not in other body fluids. This data indicates that primarily placental- and perhaps also the liver oxidoreductases may readily convert progesterone to its metabolite Prog20 α and *vice versa* and that the different location of the reductase- or oxidoreductase-preferring isoforms in placental tissues may be decisive for the reductive or oxidative status of steroid metabolome in mother and fetus. Not only the progesterone levels, but also the concentration of estrogens, NS and other substances which influence pregnancy sustaining like 5 α / β reduced pregnane- and androstane metabolites in fetal and maternal circulations are in all probability controlled by the distribution of placental oxidoreductases.

The reason why the placental production was considered to be independent of the fetal PregS might be the absence of correlations between maternal and fetal progesterone although the levels of estradiol (synthesized from the fetal DHEAS) also do not correlate between mother and fetus. However, as reported in our recent study [2], there are significant partial correlations for both free and conjugated Prog20 α between UV and MV and the correlation between Prog20 α and progesterone in MV (Tab. 1). In addition, there are also significant partial correlations between estrone polar conjugates in UV and unconjugated estradiol in MV and a correlation between estrone and estradiol in MV (Tab. 2) (unpublished data).

Assuming that the distribution of placental oxidoreductase isoforms controls the reductive and oxidative status of steroid inter-conversions in maternal and fetal compartment, respectively, the difference between oxidative fetal- and reductive maternal steroid metabolomic status should be the most apparent when comparing blood from UV, containing placental steroids before their further metabolism in other fetal tissues (mainly liver), and MV. In accordance with the aforementioned assumption, the blood from UV contains higher proportions of 20-oxo-steroids like progesterone, 17-oxo steroids (e.g. estrone and DHEA), 3-oxo-steroids like 5 α / β -DHP and 3 β -hydroxy-steroids (isopregnanolone and epipregnanolone), while maternal venous blood contains higher proportions of 20 α -hydroxy-steroids like 20 α -dihydroprogesterone, 17 β -hydroxy-steroids such as estradiol and androstenediol and 3 α -hydroxy-steroids like neuroinhibiting allopregnanolone and pregnanolone (Fig. 11) (unpublished data). Furthermore, the levels of conjugated 3 α -hydroxy-5 α / β -reduced C-19 steroids in MV are pronouncedly higher (Fig. 7A-C) than in the fetal circulation and amniotic fluid, while the 3 β -isomer conjugated epiandrosterone do not significantly differ between mother and fetus (Fig. 7B).

Besides the neuroinhibiting effects in the CNS (which are probably counterbalanced by changed phosphorylation status of the GABA_A-r [10]) the higher levels of the 3 α -hydroxy steroids in MV might be useful for pregnancy sustaining by reducing myometrial activity via the voltage-gated K⁺ channels [105].

Gilbert Evans and colleagues reported 3 α -hydroxysteroid oxidoreductase-mediated turnover of 5 α - and 5 β -DHP to their metabolites allopregnanolone and pregnanolone. In the maternal circulation, between the 28th and 38th week of gestation, a decrease of allopregnanolone and increase of pregnanolone occurred [26]. On the contrary, our data showed a consistent decrease in both allopregnanolone/5 α -DHP and pregnanolone/5 β -DHP ratios between the 28th and 41st week of gestation (Fig. 11E,F). In addition, we have recorded a slight but significant decrease even in the allopregnanolone/isopregnanolone ratio (Fig. 11G) (unpublished data). Considering the enzyme distribution in placenta, these results indicate increasing activity of placental and perhaps also the liver HSD17B7 in late pregnancy. The data also points to decreasing synthesis of neuroinhibiting GABA-ergic steroids with advancing gestation.

2. Conclusions

The data available in the literature including our recent findings and new unpublished data indicate increasing progesterone synthesis that is accompanied by increasing catabolism with approaching parturition. The data also confirms declining production of pregnancy sustaining 5β -pregnane steroids. These substances provide uterine quiescence in late pregnancy. There is also an increasing sulfation of neuroinhibiting and pregnancy sustaining steroids with approaching term. The alternative mechanism for progesterone synthesis may be closely associated with the distribution of placental oxidoreductases and consistently higher levels of sex hormones, neuroactive steroids and their metabolites.

3. Acknowledgements

This study was supported by grant IGA MZ ČR NR/9146-3.

4. References

- [1] Smith, R. Parturition. *N Engl J Med*, 2007. 356: 271-83.
- [2] Hill, M., et al. Is maternal progesterone actually independent of the fetal steroids? *Physiol Res*, 2009.
- [3] Hill, M., et al. Steroid metabolome in plasma from the umbilical artery, umbilical vein, maternal cubital vein and in amniotic fluid in normal and preterm labor. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2009. XX: XXX.
- [4] Nathanielsz, P.W. Comparative studies on the initiation of labor. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1998. 78: 127-32.
- [5] Wu, W.X., et al. Prostaglandin mediates premature delivery in pregnant sheep induced by estradiol at 121 days of gestational age. *Endocrinology*, 2004. 145: 1444-52.
- [6] Mathur, R.S., S. Landgrebe, and H.O. Williamson. Progesterone, 17-hydroxyprogesterone, estradiol, and estriol in late pregnancy and labor. *Am J Obstet Gynecol*, 1980. 136: 25-7.
- [7] Hercz, P., L. Ungar, and P. Siklos. Perinatal progesterone in maternal-fetoplacental system during mature and premature deliveries. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 1988. 67: 233-5.
- [8] Mesiano, S. Myometrial progesterone responsiveness and the control of human parturition. *J Soc Gynecol Investig*, 2004. 11: 193-202.
- [9] Karalis, K., G. Goodwin, and J.A. Majzoub. Cortisol blockade of progesterone: a possible molecular mechanism involved in the initiation of human labor. *Nat Med*, 1996. 2: 556-60.
- [10] Koksma, J.J., et al. Oxytocin regulates neurosteroid modulation of GABA(A) receptors in supraoptic nucleus around parturition. *J Neurosci*, 2003. 23: 788-97.
- [11] Majewska, M.D. and D.B. Vaupel. Steroid control of uterine motility via gamma-aminobutyric acidA receptors in the rabbit: a novel mechanism? *J Endocrinol*, 1991. 131: 427-34.
- [12] Majewska, M.D. Steroid regulation of the GABAA receptor: ligand binding, chloride transport and behaviour. *Ciba Found Symp*, 1990. 153: 83-97; discussion 97-106.
- [13] Hill, M., et al. Circulating levels of pregnanolone isomers during the third trimester of human pregnancy. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2007. 105: 166-75.
- [14] Havlikova, H., et al. Serum profiles of free and conjugated neuroactive pregnanolone isomers in nonpregnant women of fertile age. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006. 91: 3092-9.
- [15] Weaver, C.E., et al. Geometry and charge determine pharmacological effects of steroids on N-methyl-D-aspartate receptor-induced Ca^{2+} accumulation and cell death. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000. 293: 747-54.
- [16] Rune, G.M. and M. Frotscher. Neurosteroid synthesis in the hippocampus: role in synaptic plasticity. *Neuroscience*, 2005. 136: 833-42.
- [17] Wang, M.D., G. Wahlstrom, and T. Backstrom. The regional brain distribution of the neurosteroids pregnenolone and pregnenolone sulfate following intravenous infusion. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1997. 62: 299-306.
- [18] Yoshihara, S., et al. A neuroactive steroid, allotetrahydrocorticosterone inhibits sensory nerves activation in guinea-pig airways. *Neurosci Res*, 2005. 53: 210-5.

- [19] Knock, G.A., et al. Modulation of potassium current characteristics in human myometrial smooth muscle by 17beta-estradiol and progesterone. *Biol Reprod*, 2001. 64: 1526-34.
- [20] Todorovic, S.M., et al. 5beta-reduced neuroactive steroids are novel voltage-dependent blockers of T-type Ca²⁺ channels in rat sensory neurons in vitro and potent peripheral analgesics in vivo. *Mol Pharmacol*, 2004. 66: 1223-35.
- [21] Milewich, L., et al. Initiation of human parturition. VI. Identification and quantification of progesterone metabolites produced by the components of human fetal membranes. *J Clin Endocrinol Metab*, 1977. 45: 400-11.
- [22] Dombroski, R.A., M.L. Casey, and P.C. MacDonald. 5-Alpha-dihydroprogesterone formation in human placenta from 5alpha-pregnan-3beta/alpha-ol-20-ones and 5-pregnan-3beta-yl-20-one sulfate. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1997. 63: 155-63.
- [23] Mickan, H. and J. Zander. Pregnanolones, pregnenolone and progesterone in the human fetoplacental circulation at term of pregnancy. *J Steroid Biochem*, 1979. 11: 1461-6.
- [24] Meng, L.J., et al. Progesterone metabolites and bile acids in serum of patients with intrahepatic cholestasis of pregnancy: effect of ursodeoxycholic acid therapy. *Hepatology*, 1997. 26: 1573-9.
- [25] Hill, M., et al. Neuroactive steroids, their precursors, and polar conjugates during parturition and postpartum in maternal and umbilical blood: 1. Identification and simultaneous determination of pregnanolone isomers. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2000. 75: 237-44.
- [26] Gilbert Evans, S.E., et al. 3alpha-reduced neuroactive steroids and their precursors during pregnancy and the postpartum period. *Gynecol Endocrinol*, 2005. 21: 268-79.
- [27] Pearson Murphy, B.E., et al. Neuroactive ring A-reduced metabolites of progesterone in human plasma during pregnancy: elevated levels of 5 alpha-dihydroprogesterone in depressed patients during the latter half of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. 86: 5981-7.
- [28] Putnam, C.D., et al. Inhibition of uterine contractility by progesterone and progesterone metabolites: mediation by progesterone and gamma amino butyric acidA receptor systems. *Biol Reprod*, 1991. 45: 266-72.
- [29] Mitchell, B.F., et al. Metabolites of progesterone and the pregnane X receptor: a novel pathway regulating uterine contractility in pregnancy? *Am J Obstet Gynecol*, 2005. 192: 1304-13; discussion 1313-5.
- [30] Sheehan, P.M., et al. 5 Beta-dihydroprogesterone and steroid 5 beta-reductase decrease in association with human parturition at term. *Mol Hum Reprod*, 2005. 11: 495-501.
- [31] Sheehan, P.M. A possible role for progesterone metabolites in human parturition. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, 2006. 46: 159-63.
- [32] Penning, T.M., et al. Human 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms (AKR1C1-AKR1C4) of the aldo-keto reductase superfamily: functional plasticity and tissue distribution reveals roles in the inactivation and formation of male and female sex hormones. *Biochem J*, 2000. 351: 67-77.
- [33] Park-Chung, M., et al. Sulfated and unsulfated steroids modulate gamma-aminobutyric acidA receptor function through distinct sites. *Brain Res*, 1999. 830: 72-87.
- [34] Andersson, S., et al. Estrogen and progesterone metabolism in the cervix during pregnancy and parturition. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008. 93: 2366-74.
- [35] Rainey, W.E., K.S. Rehman, and B.R. Carr. The human fetal adrenal: making adrenal androgens for placental estrogens. *Semin Reprod Med*, 2004. 22: 327-36.
- [36] Smith, R., et al. Corticotropin-releasing hormone directly and preferentially stimulates dehydroepiandrosterone sulfate secretion by human fetal adrenal cortical cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998. 83: 2916-20.
- [37] Sirianni, R., et al. Corticotropin-releasing hormone (CRH) and urocortin act through type 1 CRH receptors to stimulate dehydroepiandrosterone sulfate production in human fetal adrenal cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. 90: 5393-400.
- [38] Sirianni, R., et al. Corticotropin-releasing hormone directly stimulates cortisol and the cortisol biosynthetic pathway in human fetal adrenal cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. 90: 279-85.

- [39] Rehman, K.S., et al. The regulation of adrenocorticotrophic hormone receptor by corticotropin-releasing hormone in human fetal adrenal definitive/transitional zone cells. *Reprod Sci*, 2007. 14: 578-87.
- [40] Mesiano, S., et al. Localization and regulation of corticotropin receptor expression in the midgestation human fetal adrenal cortex: implications for in utero homeostasis. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996. 81: 340-5.
- [41] Ingelman-Sundberg, M., A. Rane, and J.A. Gustafsson. Properties of hydroxylase systems in the human fetal liver active on free and sulfoconjugated steroids. *Biochemistry*, 1975. 14: 429-37.
- [42] Moghrabi, N., J.R. Head, and S. Andersson. Cell type-specific expression of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human placenta and fetal liver. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997. 82: 3872-8.
- [43] Lacroix, D., et al. Expression of CYP3A in the human liver--evidence that the shift between CYP3A7 and CYP3A4 occurs immediately after birth. *Eur J Biochem*, 1997. 247: 625-34.
- [44] Leeder, J.S., et al. Variability of CYP3A7 expression in human fetal liver. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005. 314: 626-35.
- [45] Rabe, T., et al. Human low density lipoproteins (LDL) in combination with cholesterol or cholesteryl linoleate as precursors for progesterone synthesis of human placenta in organ culture. *Biol Res Pregnancy Perinatol*, 1984. 5: 6-10.
- [46] Mesiano, S. and R.B. Jaffe. Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. *Endocr Rev*, 1997. 18: 378-403.
- [47] Goland, R.S., et al. High levels of corticotropin-releasing hormone immunoactivity in maternal and fetal plasma during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*, 1986. 63: 1199-203.
- [48] Power, M.L. and J. Schulkin. Functions of corticotropin-releasing hormone in anthropoid primates: from brain to placenta. *Am J Hum Biol*, 2006. 18: 431-47.
- [49] Linton, E.A., et al. Corticotropin releasing hormone-binding protein (CRH-BP): plasma levels decrease during the third trimester of normal human pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*, 1993. 76: 260-2.
- [50] Linton, E.A., et al. Corticotropin-releasing hormone (CRH)-binding protein: reduction in the adrenocorticotropin-releasing activity of placental but not hypothalamic CRH. *J Clin Endocrinol Metab*, 1990. 70: 1574-80.
- [51] Sibai, B., et al. Plasma CRH measurement at 16 to 20 weeks' gestation does not predict preterm delivery in women at high-risk for preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol*, 2005. 193: 1181-6.
- [52] Mesiano, S., C.L. Coulter, and R.B. Jaffe. Localization of cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage, cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase/17, 20-lyase, and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase isomerase steroidogenic enzymes in human and rhesus monkey fetal adrenal glands: reappraisal of functional zonation. *J Clin Endocrinol Metab*, 1993. 77: 1184-9.
- [53] Narasaka, T., et al. Temporal and spatial distribution of corticosteroidogenic enzymes immunoreactivity in developing human adrenal. *Mol Cell Endocrinol*, 2001. 174: 111-20.
- [54] Swart, P., et al. Progesterone 16 alpha-hydroxylase activity is catalyzed by human cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase. *J Clin Endocrinol Metab*, 1993. 77: 98-102.
- [55] Kancheva, R., et al. Relationships of circulating pregnanolone isomers and their polar conjugates to the status of sex, menstrual cycle, and pregnancy. *J Endocrinol*, 2007. 195: 67-78.
- [56] Comer, K.A. and C.N. Falany. Immunological characterization of dehydroepiandrosterone sulfotransferase from human liver and adrenal. *Mol Pharmacol*, 1992. 41: 645-51.
- [57] Pacifici, G.M. Sulfation of drugs and hormones in mid-gestation human fetus. *Early Hum Dev*, 2005. 81: 573-81.
- [58] Miki, Y., et al. Systemic distribution of steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in human adult and fetal tissues. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. 87: 5760-8.
- [59] Reed, M.J., et al. Steroid sulfatase: molecular biology, regulation, and inhibition. *Endocr Rev*, 2005. 26: 171-202.

- [60] Mason, J.I., et al. Regulation of expression of the 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenases of human placenta and fetal adrenal. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1993. 47: 151-9.
- [61] Kozaki, T., et al. [Changes of dehydroepiandrosterone (DHA), 16 alpha OH-DHA and estriol levels in maternal peripheral blood during late pregnancy and labor--measured by gas chromatography-mass spectrometry with application of deuterated steroids as internal standards (author's transl)]. *Acta Obstet Gynaecol Jpn*, 1981. 33: 935-44.
- [62] Coulter, C.L. and R.B. Jaffe. Functional maturation of the primate fetal adrenal in vivo: 3. Specific zonal localization and developmental regulation of CYP21A2 (P450c21) and CYP11B1/CYP11B2 (P450c11/aldosterone synthase) lead to integrated concept of zonal and temporal steroid biosynthesis. *Endocrinology*, 1998. 139: 5144-50.
- [63] Tortorella, C., F. Aragona, and G.G. Nussdorfer. In vivo evidence that human adrenal glands possess 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity. *Life Sci*, 1999. 65: 2823-7.
- [64] Brereton, P., et al. Pan1b (17betaHSD11)-enzymatic activity and distribution in the lung. *Mol Cell Endocrinol*, 2001. 171: 111-7.
- [65] Chai, Z., et al. 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type XI localizes to human steroidogenic cells. *Endocrinology*, 2003. 144: 2084-91.
- [66] Huang, X.F. and V. Luu-The. Molecular characterization of a first human 3(alpha-->beta)-hydroxysteroid epimerase. *J Biol Chem*, 2000. 275: 29452-7.
- [67] Torn, S., et al. Production, purification, and functional analysis of recombinant human and mouse 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 7. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. 305: 37-45.
- [68] Sakurai, N., et al. Systemic distribution and tissue localizations of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 12. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2006. 99: 174-81.
- [69] Yanaihara, T. and K. Arai. In vitro release of steroids from the human fetal adrenal tissue. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 1981. 60: 225-8.
- [70] Wang, H., et al. Changes of multiple biotransformation phase I and phase II enzyme activities in human fetal adrenals during fetal development. *Acta Pharmacol Sin*, 2008. 29: 231-8.
- [71] Rehman, K.S., B.R. Carr, and W.E. Rainey. Profiling the steroidogenic pathway in human fetal and adult adrenals. *J Soc Gynecol Investig*, 2003. 10: 372-80.
- [72] Pezzi, V., et al. Profiling transcript levels for steroidogenic enzymes in fetal tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2003. 87: 181-9.
- [73] Schuetz, J.D., S. Kauma, and P.S. Guzelian. Identification of the fetal liver cytochrome CYP3A7 in human endometrium and placenta. *J Clin Invest*, 1993. 92: 1018-24.
- [74] Miller, K.K., et al. Stereo- and regioselectivity account for the diversity of dehydroepiandrosterone (DHEA) metabolites produced by liver microsomal cytochromes P450. *Drug Metab Dispos*, 2004. 32: 305-13.
- [75] Haruyama, T. [An evaluation of the plasma dynamics of the 16 alpha-hydroxy steroids in fetuses and neonates (author's transl)]. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*, 1980. 32: 653-62.
- [76] Gothoda, Y., et al. [A study of 16 alpha OH-DHA and 16 alpha OH-pregnenolone in feto-placental unit (author's transl)]. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*, 1982. 34: 325-34.
- [77] Arai, K. and T. Yanaihara. Steroid hormone changes in fetal blood during labor. *Am J Obstet Gynecol*, 1977. 127: 879-83.
- [78] Suzuki, H., et al. [Changes in maternal plasma levels of C21 and C19 steroid hormones during pregnancy]. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*, 1988. 40: 575-82.
- [79] Diczfalusy, E. The early history of estriol. *J Steroid Biochem*, 1984. 20: 945-53.
- [80] Zbella, E.A., et al. Competitive studies with dehydroepiandrosterone sulfate and 16 alpha-hydroxydehydroepiandrosterone sulfate in cultured human choriocarcinoma JEG-3 cells: effect on estrone, 17 beta-estradiol, and estriol secretion. *J Clin Endocrinol Metab*, 1986. 63: 751-7.

- [81] Othman, Y.S. and R.E. Oakey. Why so much oestriol? A comparison of the aromatisation of androstenedione and 16 alpha-hydroxyandrostenedione when incubated alone or together with human placental microsomes. *J Endocrinol*, 1996. 148: 399-407.
- [82] Cantineau, R., et al. Aromatization of 15 alpha and 16 alpha hydroxylated androgens in the human placental using [1,2-3H]-substrates. *J Steroid Biochem*, 1982. 16: 157-63.
- [83] Lee, A.J., A.H. Conney, and B.T. Zhu. Human cytochrome P450 3A7 has a distinct high catalytic activity for the 16alpha-hydroxylation of estrone but not 17beta-estradiol. *Cancer Res*, 2003. 63: 6532-6.
- [84] Yamamoto, T., et al. Estrogen biosynthesis in human liver--a comparison of aromatase activity for C-19 steroids in fetal liver, adult liver and hepatoma tissues of human subjects. *Endocrinol Jpn*, 1984. 31: 277-81.
- [85] Price, T., J. Aitken, and E.R. Simpson. Relative expression of aromatase cytochrome P450 in human fetal tissues as determined by competitive polymerase chain reaction amplification. *J Clin Endocrinol Metab*, 1992. 74: 879-83.
- [86] Lanoux, M.J., et al. Factors affecting the conversion of androstenedione to estrogens by human fetal hepatocytes in monolayer culture. *Endocrinology*, 1985. 117: 361-8.
- [87] Shiraishi, H., et al. Sequence of the cDNA of a human dihydrodiol dehydrogenase isoform (AKR1C2) and tissue distribution of its mRNA. *Biochem J*, 1998. 334 (Pt 2): 399-405.
- [88] Penning, T.M., et al. Structure-function aspects and inhibitor design of type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3). *Mol Cell Endocrinol*, 2001. 171: 137-49.
- [89] Jin, Y., et al. Human cytosolic hydroxysteroid dehydrogenases of the aldo-ketoreductase superfamily catalyze reduction of conjugated steroids: implications for phase I and phase II steroid hormone metabolism. *J Biol Chem*, 2009. 284: 10013-22.
- [90] Penning, T.M. Molecular determinants of steroid recognition and catalysis in aldo-keto reductases. Lessons from 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1999. 69: 211-25.
- [91] Steckelbroeck, S., et al. Human cytosolic 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenases of the aldo-keto reductase superfamily display significant 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity: implications for steroid hormone metabolism and action. *J Biol Chem*, 2004. 279: 10784-95.
- [92] Usami, N., et al. Substrate specificity of human 3(20)alpha-hydroxysteroid dehydrogenase for neurosteroids and its inhibition by benzodiazepines. *Biol Pharm Bull*, 2002. 25: 441-5.
- [93] Jin, Y., et al. Crystal structure of human type III 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase/bile acid binding protein complexed with NADP(+) and ursodeoxycholate. *Biochemistry*, 2001. 40: 10161-8.
- [94] Nishizawa, M., et al. Close kinship of human 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase gene with three aldo-keto reductase genes. *Genes Cells*, 2000. 5: 111-25.
- [95] Penning, T.M., et al. Structure-function of human 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenases: genes and proteins. *Mol Cell Endocrinol*, 2004. 215: 63-72.
- [96] Krazeisen, A., et al. Determination of cDNA, gene structure and chromosomal localization of the novel human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 7(1). *FEBS Lett*, 1999. 460: 373-9.
- [97] He, X.Y., et al. Characterization and localization of human type 10 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Eur J Biochem*, 2001. 268: 4899-907.
- [98] He, X.Y., et al. Oxidative 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity of human type 10 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2003. 87: 191-8.
- [99] Shafqat, N., et al. Expanded substrate screenings of human and *Drosophila* type 10 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases (HSDs) reveal multiple specificities in bile acid and steroid hormone metabolism: characterization of multifunctional 3alpha/7alpha/7beta/17beta/20beta/21-HSD. *Biochem J*, 2003. 376: 49-60.
- [100] Hidalgo, A., et al. Calcium and depolarization-dependent effect of pregnenolone derivatives on uterine smooth muscle. *Gen Pharmacol*, 1996. 27: 879-85.

- [101] Meikle, A.W., et al. Plasma 5 alpha-reduced androgens in men and hirsute women: role of adrenals and gonads. *J Clin Endocrinol Metab*, 1979. 48: 969-75.
- [102] Charbonneau, A. and V.L. The. Genomic organization of a human 5beta-reductase and its pseudogene and substrate selectivity of the expressed enzyme. *Biochim Biophys Acta*, 2001. 1517: 228-35.
- [103] Poletti, A., et al. 5 alpha-reductase isozymes in the central nervous system. *Steroids*, 1998. 63: 246-51.
- [104] Jin, Y. and T.M. Penning. Steroid 5alpha-reductases and 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenases: key enzymes in androgen metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2001. 15: 79-94.
- [105] Perusquia, M. and J. Jasso-Kamel. Influence of 5alpha- and 5beta-reduced progestins on the contractility of isolated human myometrium at term. *Life Sci*, 2001. 68: 2933-44.
- [106] Zhang, H., et al. Sulfuryl transfer: the catalytic mechanism of human estrogen sulfotransferase. *J Biol Chem*, 1998. 273: 10888-92.
- [107] Meloche, C.A. and C.N. Falany. Expression and characterization of the human 3 beta-hydroxysteroid sulfotransferases (SULT2B1a and SULT2B1b). *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2001. 77: 261-9.
- [108] Geese, W.J. and R.B. Raftogianis. Biochemical characterization and tissue distribution of human SULT2B1. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. 288: 280-9.
- [109] Gall, W.E., et al. Differential glucuronidation of bile acids, androgens and estrogens by human UGT1A3 and 2B7. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1999. 70: 101-8.
- [110] Adjei, A.A., et al. Human estrogen sulfotransferase (SULT1E1) pharmacogenomics: gene resequencing and functional genomics. *Br J Pharmacol*, 2003. 139: 1373-82.
- [111] Li, L., et al. Increased SULT1E1 activity in HepG2 hepatocytes decreases growth hormone stimulation of STAT5b phosphorylation. *Steroids*, 2009. 74: 20-9.
- [112] Selcer, K.W., et al. Immunohistochemical analysis of steroid sulfatase in human tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2007. 105: 115-23.
- [113] Warren, J.C. and A.P. French. Distribution of Steroid Sulfatase in Human Tissues. *J Clin Endocrinol Metab*, 1965. 25: 278-82.
- [114] Sardiello, M., et al. Sulfatases and sulfatase modifying factors: an exclusive and promiscuous relationship. *Hum Mol Genet*, 2005. 14: 3203-17.
- [115] Ugele, B., et al. Characterization and identification of steroid sulfate transporters of human placenta. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003. 284: E390-8.
- [116] You, X., et al. Corticotropin-releasing hormone stimulates estrogen biosynthesis in cultured human placental trophoblasts. *Biol Reprod*, 2006. 74: 1067-72.
- [117] Yang, R., et al. Corticotropin-releasing hormone inhibits progesterone production in cultured human placental trophoblasts. *J Mol Endocrinol*, 2006. 37: 533-40.
- [118] Tuckey, R.C. Progesterone synthesis by the human placenta. *Placenta*, 2005. 26: 273-81.
- [119] Sugawara, T., E. Nomura, and N. Hoshi. Both N-terminal and C-terminal regions of steroid sulfatase are important for enzyme activity. *J Endocrinol*, 2006. 188: 365-74.
- [120] Siiteri, P.K. The continuing saga of dehydroepiandrosterone (DHEA). *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. 90: 3795-6.
- [121] Watanabe, H., et al. Effects of DHA-S on placental 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity, progesterone and 20 alpha-dihydroprogesterone concentrations in placenta and serum. *Endocrinol Jpn*, 1990. 37: 69-77.
- [122] Ishida, T., et al. [Changes in placental enzymatic activities in relation to estrogen production during pregnancy]. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*, 1985. 37: 547-54.
- [123] Fukuda, M., T. Okuyama, and H. Furuya. Growth and function of the placenta--with special reference to various enzymes involved in the biosynthesis of steroids in the human placenta. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*, 1986. 38: 411-6.

- [124] Leslie, K.K., et al. Oestrogen modulation with parturition in the human placenta. *Placenta*, 1994. 15: 79-88.
- [125] Hawes, C.S., et al. Epitopic heterogeneity of human 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in villous and extravillous human trophoblast. *J Mol Endocrinol*, 1994. 12: 273-81.
- [126] Mitchell, B.F. and W.A. Powell. Progesterone production by human fetal membranes: an in vitro incubation system for studying hormone production and metabolism. *Am J Obstet Gynecol*, 1984. 148: 303-9.
- [127] Riley, S.C., et al. Immunohistochemical localization of 3 beta-hydroxy-5-ene-steroid dehydrogenase/delta 5-->delta 4 isomerase in human placenta and fetal membranes throughout gestation. *J Clin Endocrinol Metab*, 1992. 75: 956-61.
- [128] Asibey-Berko, E., J.L. Thomas, and R.C. Strickler. 3 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase in human placental microsomes and mitochondria: co-solubilization of androstene and pregnene activities. *Steroids*, 1986. 47: 351-63.
- [129] Milewich, L., et al. Initiation of human parturition. IX. Progesterone metabolism by placentas of early and late human gestation. *Obstet Gynecol*, 1978. 51: 278-80.
- [130] Riley, S.C., et al. Changes in the abundance of mRNA for type-I 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-->delta 4 isomerase in the human placenta and fetal membranes during pregnancy and labor. *Gynecol Obstet Invest*, 1993. 35: 199-203.
- [131] Raimondi, S.G., et al. Regulation of the 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in tissue fragments and microsomes from human term placenta: kinetic analysis and inhibition by steroids. *J Steroid Biochem*, 1989. 32: 413-20.
- [132] Li, Y., et al. Expression of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1, P450 aromatase, and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1, 2, 5 and 7 mRNAs in human early and mid-gestation placentas. *Placenta*, 2005. 26: 387-92.
- [133] Shimizu, Y., C. Yarborough, and Y. Osawa. Competitive product inhibition of aromatase by natural estrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1993. 44: 651-6.
- [134] Purohit, A. and R.E. Oakey. Evidence for separate sites for aromatisation of androstenedione and 16 alpha-hydroxyandrostenedione in human placental microsomes. *J Steroid Biochem*, 1989. 33: 439-48.
- [135] Numazawa, M., et al. Aromatization of 16alpha-hydroxyandrostenedione by human placental microsomes: effect of preincubation with suicide substrates of androstenedione aromatization. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2002. 81: 165-72.
- [136] Vu, T.T., et al. Changes in human placental 5alpha-reductase isoenzyme expression with advancing gestation: effects of fetal sex and glucocorticoid exposure. *Reprod Fertil Dev*, 2009. 21: 599-607.
- [137] Her, C., et al. Human hydroxysteroid sulfotransferase SULT2B1: two enzymes encoded by a single chromosome 19 gene. *Genomics*, 1998. 53: 284-95.
- [138] He, D., et al. Different subcellular localization of sulphotransferase 2B1b in human placenta and prostate. *Biochem J*, 2004. 379: 533-40.
- [139] Mitra, P. and K.L. Audus. Expression and Functional Activities of Selected Sulfotransferase Isoforms in BeWo Cells and Primary Cytotrophoblast Cells. *Biochem Pharmacol*, 2009.
- [140] Lin, S.X., et al. Structural basis of the multispecificity demonstrated by 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 5. *Mol Cell Endocrinol*, 2006. 248: 38-46.
- [141] Peltoketo, H., et al. Two 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases (17HSDs) of estradiol biosynthesis: 17HSD type 1 and type 7. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1999. 69: 431-9.
- [142] Bonenfant, M., et al. Localization of type 1 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase mRNA and protein in syncytiotrophoblasts and invasive cytotrophoblasts in the human term villi. *J Endocrinol*, 2000. 165: 217-22.
- [143] Matsuura, K., et al. Identification of a principal mRNA species for human 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase isoform (AKR1C3) that exhibits high prostaglandin D2 11-ketoreductase activity. *J Biochem*, 1998. 124: 940-6.

- [144] Penning, T.M., et al. Aldo-keto reductase (AKR) 1C3: role in prostate disease and the development of specific inhibitors. *Mol Cell Endocrinol*, 2006. 248: 182-91.
- [145] Belelli, D., et al. Modulation of human recombinant GABAA receptors by pregnanediols. *Neuropharmacology*, 1996. 35: 1223-31.
- [146] Lundgren, P., et al. Allopregnanolone-stimulated GABA-mediated chloride ion flux is inhibited by 3beta-hydroxy-5alpha-pregnan-20-one (isoallopregnanolone). *Brain Res*, 2003. 982: 45-53.
- [147] Lukacik, P., et al. Structural and biochemical characterization of human orphan DHRS10 reveals a novel cytosolic enzyme with steroid dehydrogenase activity. *Biochem J*, 2007. 402: 419-27.
- [148] Diaz-Zagoya, J.C., W.G. Wiest, and F. Arias. 20 alpha-Hydroxysteroid oxidoreductase activity and 20 alpha-dihydroprogesterone concentration in human placenta before and after parturition. *Am J Obstet Gynecol*, 1979. 133: 673-6.
- [149] Pepe, G.J., M.G. Burch, and E.D. Albrecht. Localization and developmental regulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase-1 and -2 in the baboon syncytiotrophoblast. *Endocrinology*, 2001. 142: 68-80.
- [150] Schoof, E., et al. Course of placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase mRNA expression during human gestation. *Eur J Endocrinol*, 2001. 145: 187-92.

Table 1. Correlations (after power transformation to Gaussian distribution and constant variance) between progesterone (Prog), 20 α -dihydroprogesterone (Prog20 α), and 20 α -dihydroprogesterone polar conjugates (Prog20 α C) in umbilical venous blood (UV) and maternal venous blood (MV); Pearson's and partial correlations (with adjustment of all variables in the correlation matrix to constant except the pair under investigation) are above and below the diagonal, respectively.

		UV			MV		
		Prog	Prog20 α	Prog20 α C	Prog	Prog20 α	Prog20 α C
UV	Prog		0.277 46	0.196 46	0.083 46	0.103 46	0.188 46
	Prog20 α	0.241 46		0.569 46	0.326 46	0.632 46	0.527 46
	Prog20 α C	0.124 46	0.254 46	0.000 46	0.027 46	0.000 46	0.000 46
MV	Prog	0.090 46	-0.124 46	-0.135 46		0.680 46	0.310 46
	Prog20 α	0.569 46	0.433 46	0.395 46		0.000 46	0.036 46
	Prog20 α C	-0.156 46	0.432 46	0.071 46	0.647 46		0.602 46
		0.323 46	0.004 46	0.655 46	0.000 46		0.000 46
		0.072 46	-0.016 46	0.597 46	-0.032 46	0.283 46	
		0.651 46	0.922 46	0.000 46	0.842 46	0.070 46	
PARTIAL CORRELATIONS							

PEARSON'S CORRELATIONS

Table 2. Correlations (after power transformation to Gaussian distribution and constant variance) between estrone (E1), estrone polar conjugates (E1C), estradiol (E2), and estradiol polar conjugates (E2C), in umbilical venous blood (UV) and maternal venous blood (MV); Pearson's and partial correlations (with adjustment of all variables in the correlation matrix to constant except the pair under investigation) are above and below the diagonal, respectively.

		UV				MV			
		E1	E1C	E2	E2C	E1	E1C	E2	E2C
UV	E1		0.540 45	0.702 45	0.337 46	0.427 47	0.615 46	0.355 47	0.366 47
	E1C	-0.015 45		0.596 46	0.557 48	0.335 48	0.853 48	0.396 48	0.629 48
	E2	0.930 45	0.109 46		0.691 47	0.343 47	0.610 46	0.278 47	0.421 47
	E2C	0.623 45	0.024 48	0.698 47		0.226 49	0.507 48	0.430 49	0.683 49
MV	E1	0.001 47	-0.189 48	0.185 47	-0.207 49		0.458 49	0.614 50	0.406 50
	E1C	0.998 46	0.231 48	0.248 46	0.182 48		0.001 49	0.000 49	0.004 49
	E2	0.201 46	0.691 48	0.042 46	-0.035 48	0.279 49		0.397 49	0.612 49
	E2C	0.215 46	0.000 48	0.796 47	0.824 48	0.070 49		0.005 49	0.000 49
MV	E1	0.194 47	0.075 48	-0.195 47	0.152 49		0.526 50	-0.180 49	0.658 50
	E1C	0.224 47	0.636 48	0.223 47	0.332 49		0.000 50	0.249 49	0.000 50
	E2	0.072 47	0.149 48	-0.280 47	0.503 49	0.002 50	0.191 49		0.399 50
	E2C	0.656 47	0.347 48	0.076 47	0.001 49	0.988 50	0.220 49		0.007 50
PARTIAL CORRELATIONS									

PEARSON'S CORRELATIONS

Legends to figures

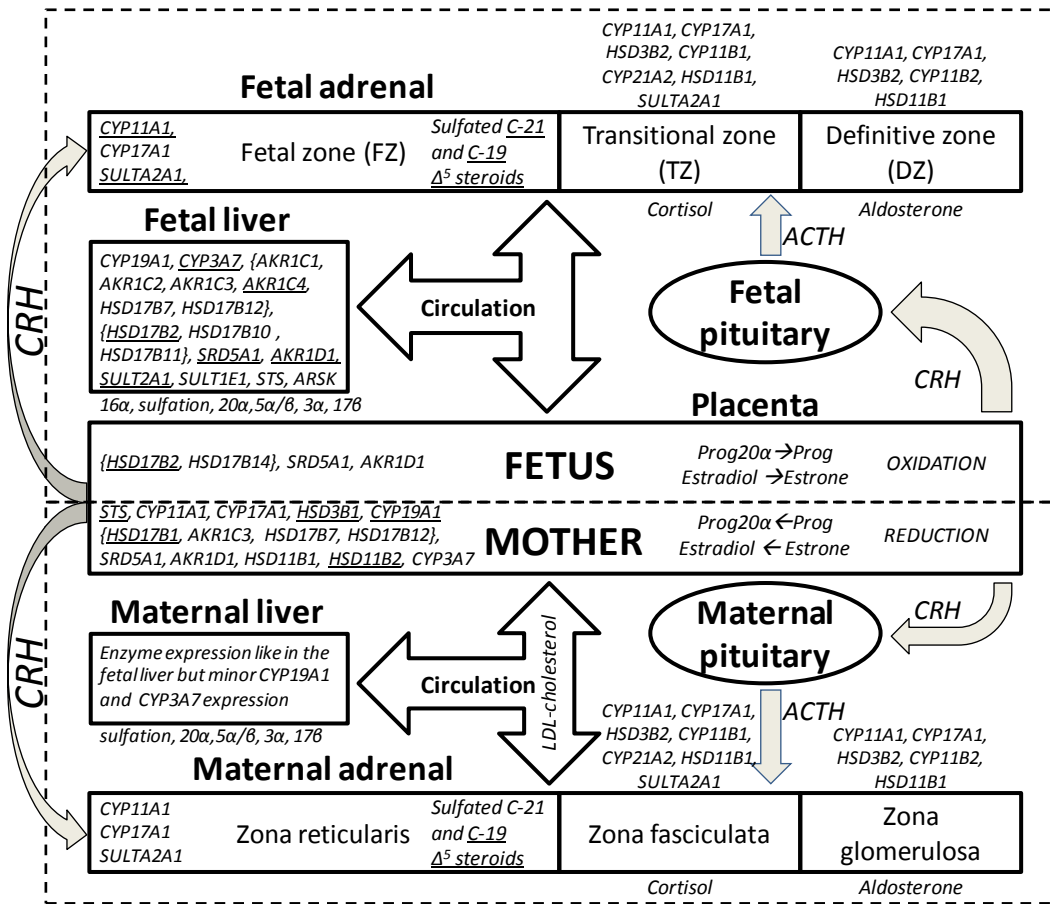


Figure 1: Simplified scheme of steroidogenesis in human late pregnancy.

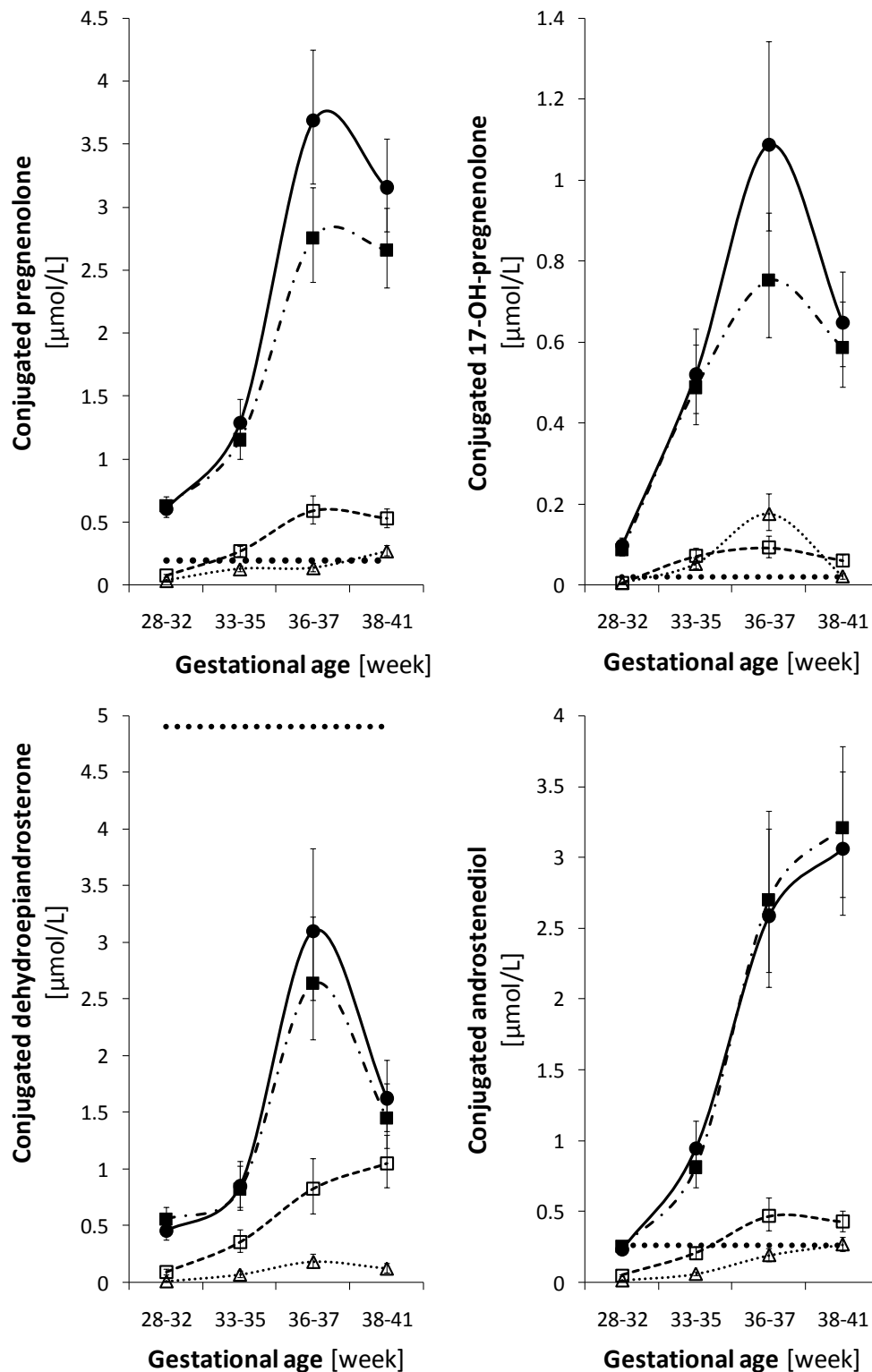


Figure 2: Profiles of conjugated sulfated Δ^5 steroids in the plasma from the umbilical artery (UA), umbilical vein (UV) and maternal cubital vein (MV) and in amniotic fluid (AF) according to the gestational age. The repeated measures ANOVA model was used for the evaluation of the relationships between steroid levels, GA and the type of body fluid. The model consisted of within-subject factor body fluid (factor BF - four body fluids were investigated in each subject), subject factor (factor Subj), between-subject factor gestational age (factor GA – the subjects were separated into 4 groups according to the GA) and body fluid \times GA interaction (BF \times GA interaction). The symbol w denotes the week of gestation. Significant BF \times GA interaction indicates that there is a significant difference between the dependences of the individual body fluids on GA. *F*-ratio represents the

Fisher's statistic and p designates statistical significance for the factors and interaction. The symbols with error bars represent re-transformed means with their 95% confidence intervals for individual body fluids (full circles...UA, full squares...UV, empty squares...MV, empty triangles...UA). The significance testing in the form of the subgroup confidence intervals is for the interaction of body fluid (sample material) with GA. The 95% confidence intervals are computed using the least significant difference multiple comparisons ($p < 0.05$). The confidence intervals, which do not overlap each other, denote significant difference between the respective subgroup means. Further embedded table contains the multiple comparisons that are completed separately for the gestation week and for the sample material (body fluid). The symbol " \sim " expresses insignificant difference, while the symbol " $>$ " means „significantly higher than“. The significance level was considered for $p < 0.05$. The horizontal line from the full circles represents the mean level of the steroid in the luteal phase of the menstrual cycle.

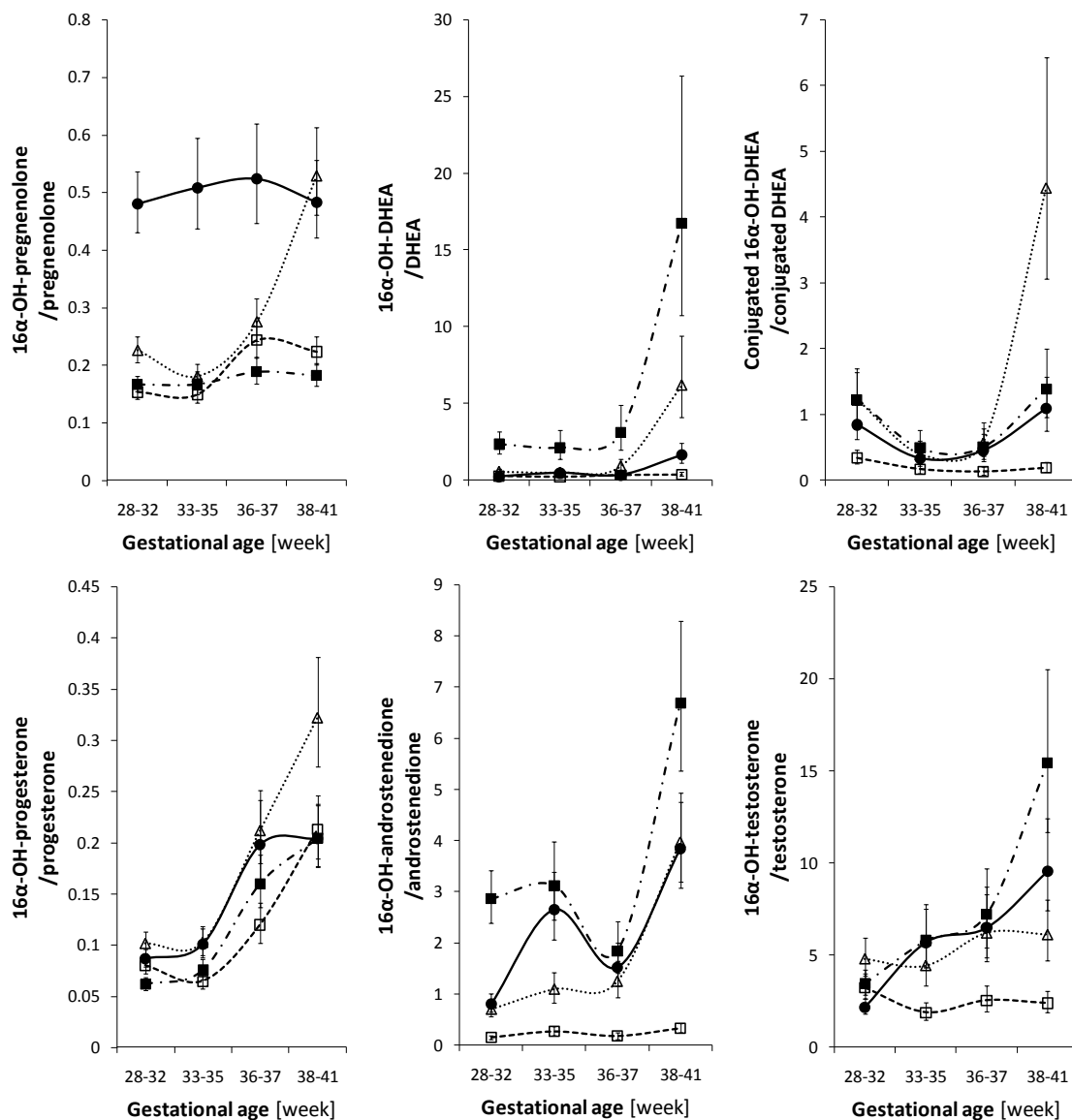


Figure 3: Profiles of the ratios of 16 α -hydroxy-steroids to the corresponding 16-deoxy-steroids in the plasma from the umbilical artery (UA), umbilical vein (UV) and maternal cubital vein (MV) and in amniotic fluid (AF) in preterm and normal labor. The drawings and symbols are the same as for Figure 2.

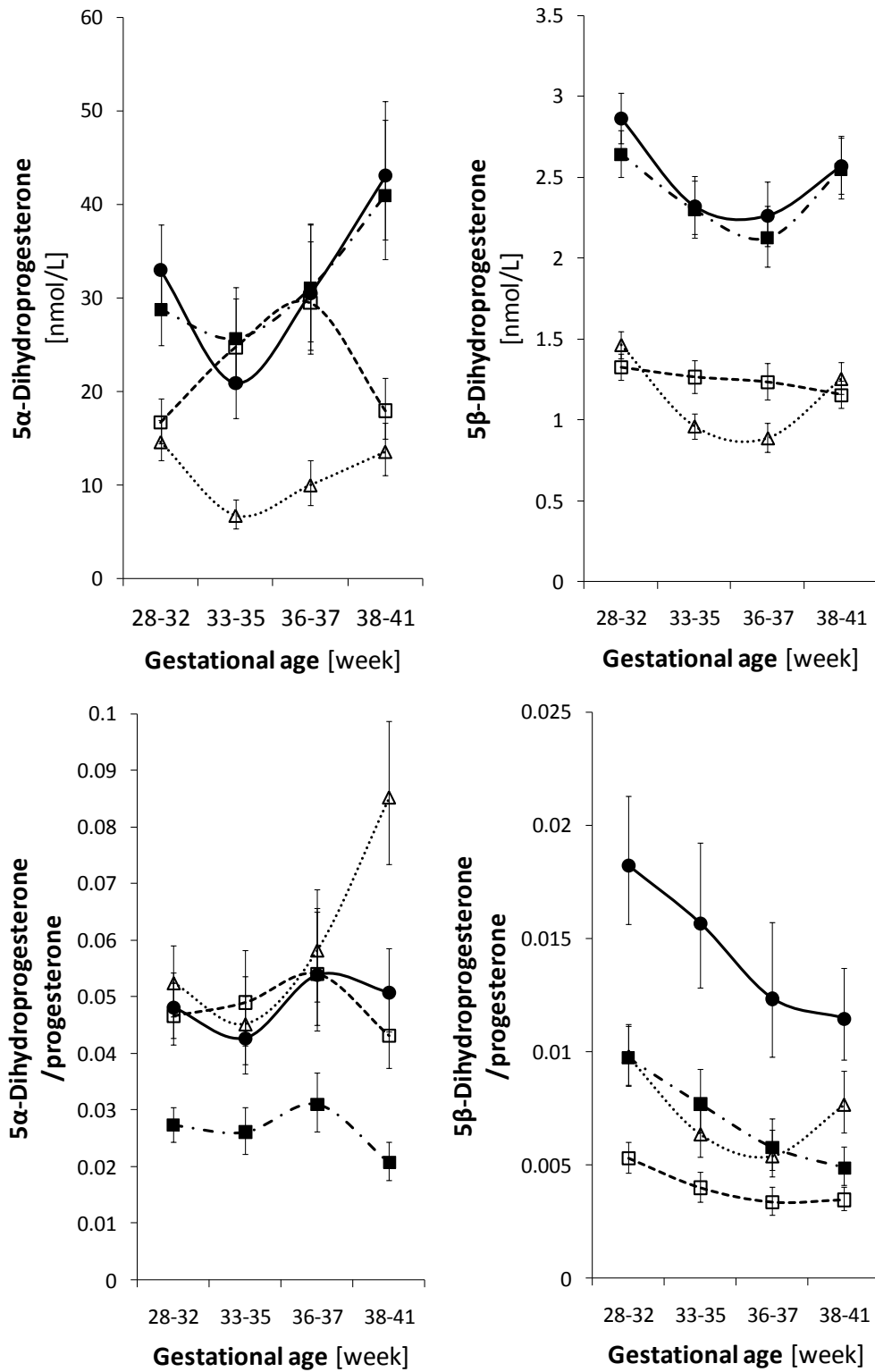


Figure 4: Profiles of 5α-dihydroprogesterone and 5β-dihydroprogesterone and their ratios to progesterone in the plasma from the umbilical artery (UA), umbilical vein (UV) and maternal cubital vein (MV) and in amniotic fluid (AF) in preterm and normal labor. The drawings and symbols are the same as for Figure 2.

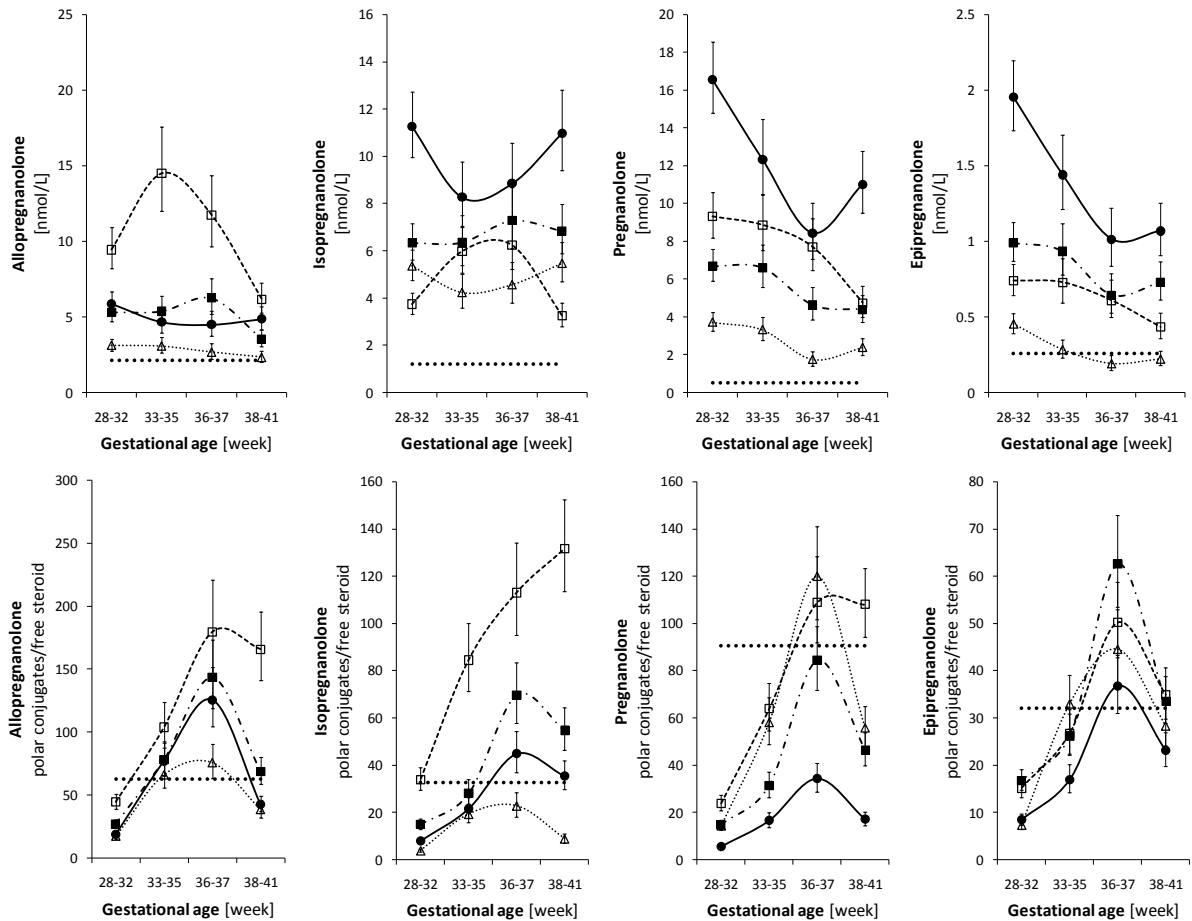


Figure 5: Profiles of unconjugated pregnanolone isomers and ratios of conjugated pregnanolone isomers to corresponding unconjugated steroids in the plasma from the umbilical artery (UA), umbilical vein (UV) and maternal cubital vein (MV) and in amniotic fluid (AF) in preterm and normal labor. The drawings and symbols are the same as for Figure 2.

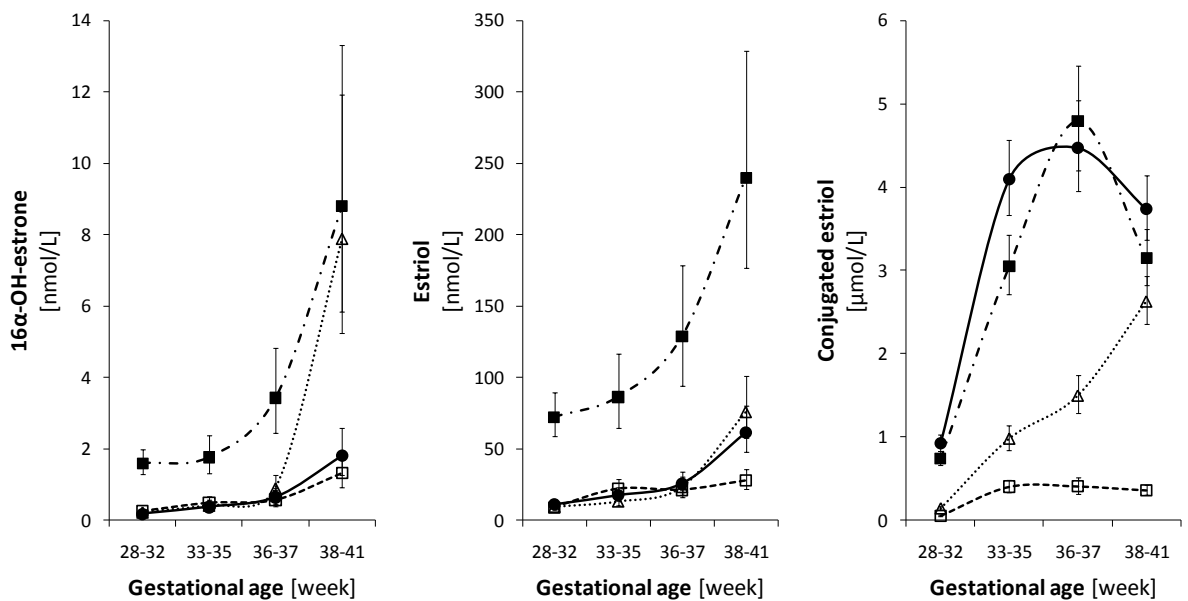


Figure 6: Profiles of 16 α -hydroxy-estrogens in the plasma from the umbilical artery (UA), umbilical vein (UV) and maternal cubital vein (MV) and in amniotic fluid (AF) in preterm and normal labor. The drawings and symbols are the same as for Figure 2.

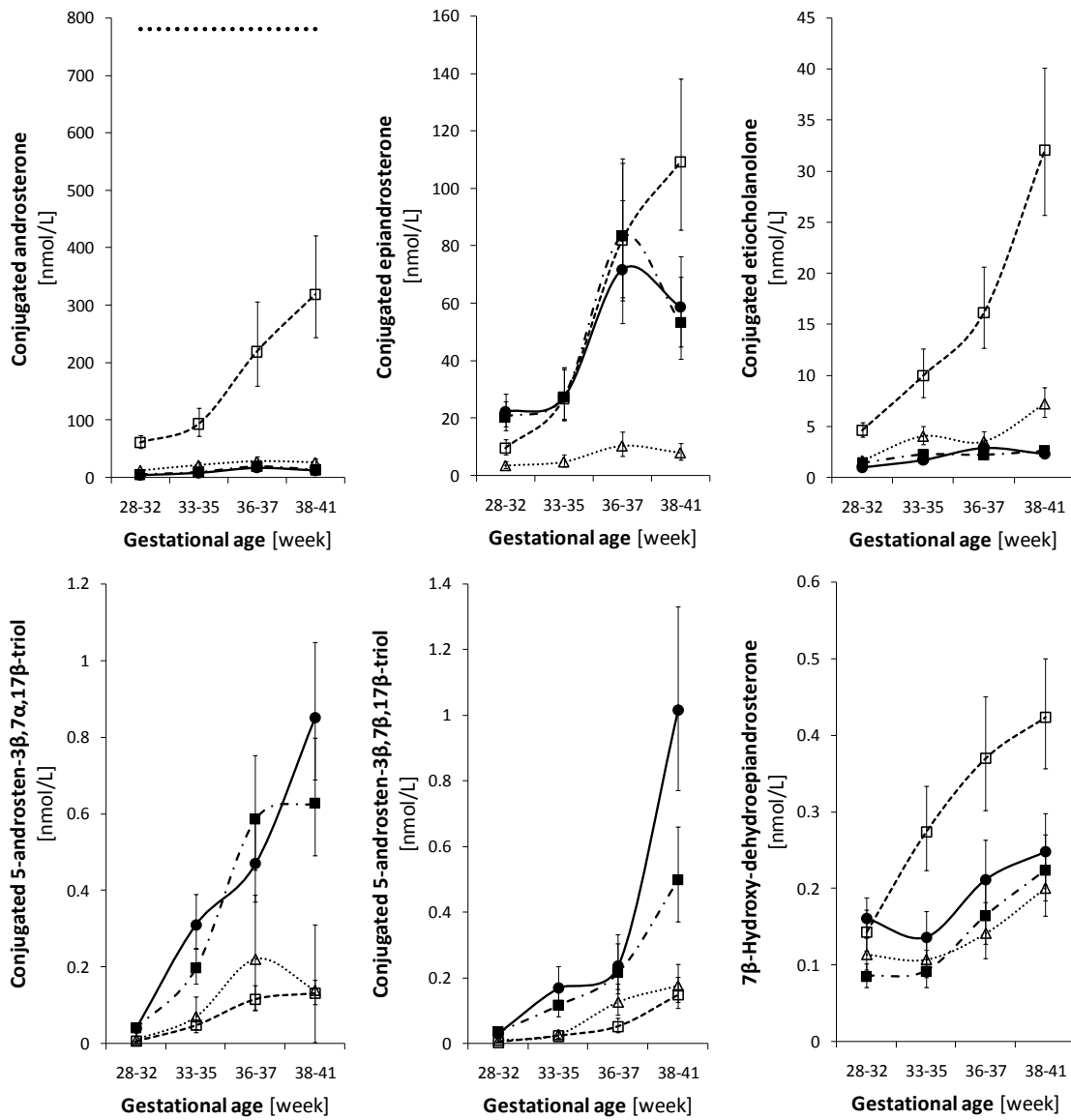


Figure 7: Profiles of three conjugated $3\alpha/\beta$ -hydroxy- $5\alpha/\beta$ -androstane-17-ones and some 5-androstene- 3β , $7\alpha/\beta$, $17\beta/17$ -oxo-steroids in the plasma from the umbilical artery (UA), umbilical vein (UV) and maternal cubital vein (MV) and in amniotic fluid (AF) in preterm and normal labor. The drawings and symbols are the same as for Figure 2.

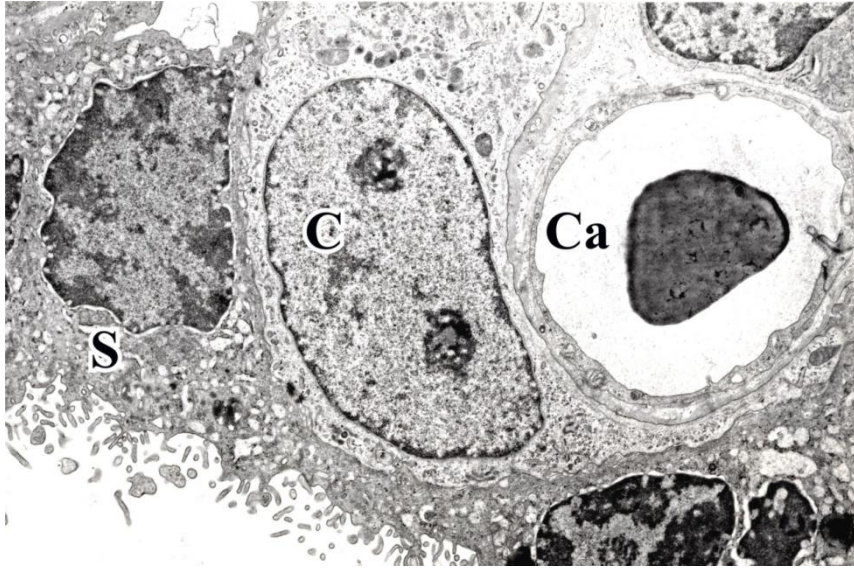


Figure 8: Transmission electron micrograph of the human placenta; S...syncytiotrophoblast, C...cytotrophoblast, Ca...fetal villous capillary, bar...2 μm .

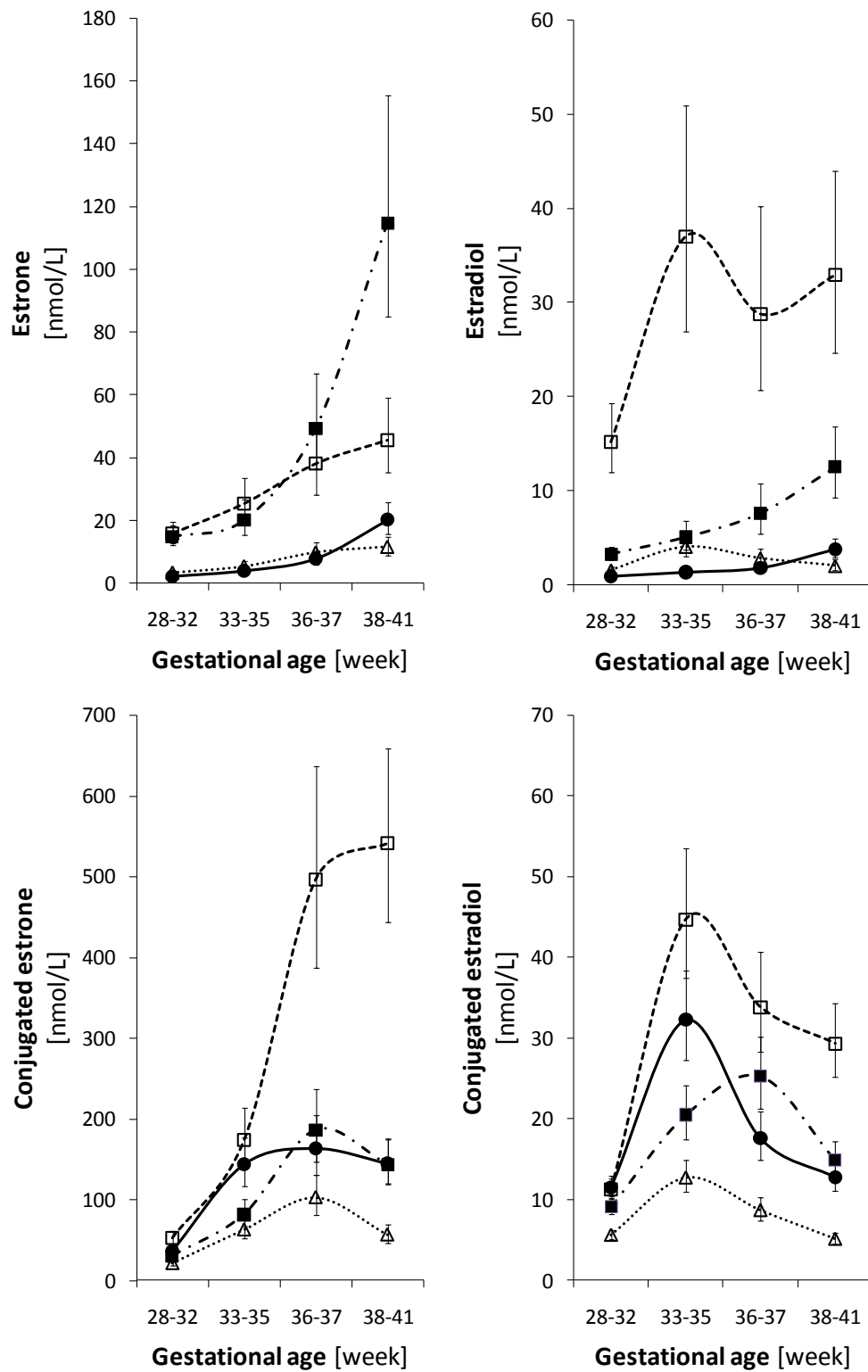


Figure 9: Profiles of free and conjugated estrogens in the plasma from the umbilical artery (UA), umbilical vein (UV) and maternal cubital vein (MV) and in amniotic fluid (AF) in preterm and normal labor. The drawings and symbols are the same as for Figure 2.

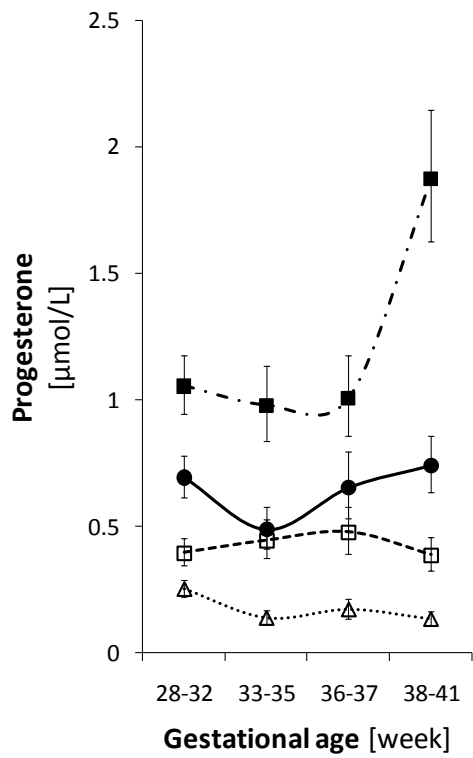


Figure 10: Profile of progesterone in the plasma from the umbilical artery (UA), umbilical vein (UV) and maternal cubital vein (MV) and in amniotic fluid (AF) in preterm and normal labor. The drawings and symbols are the same as for Figure 2.

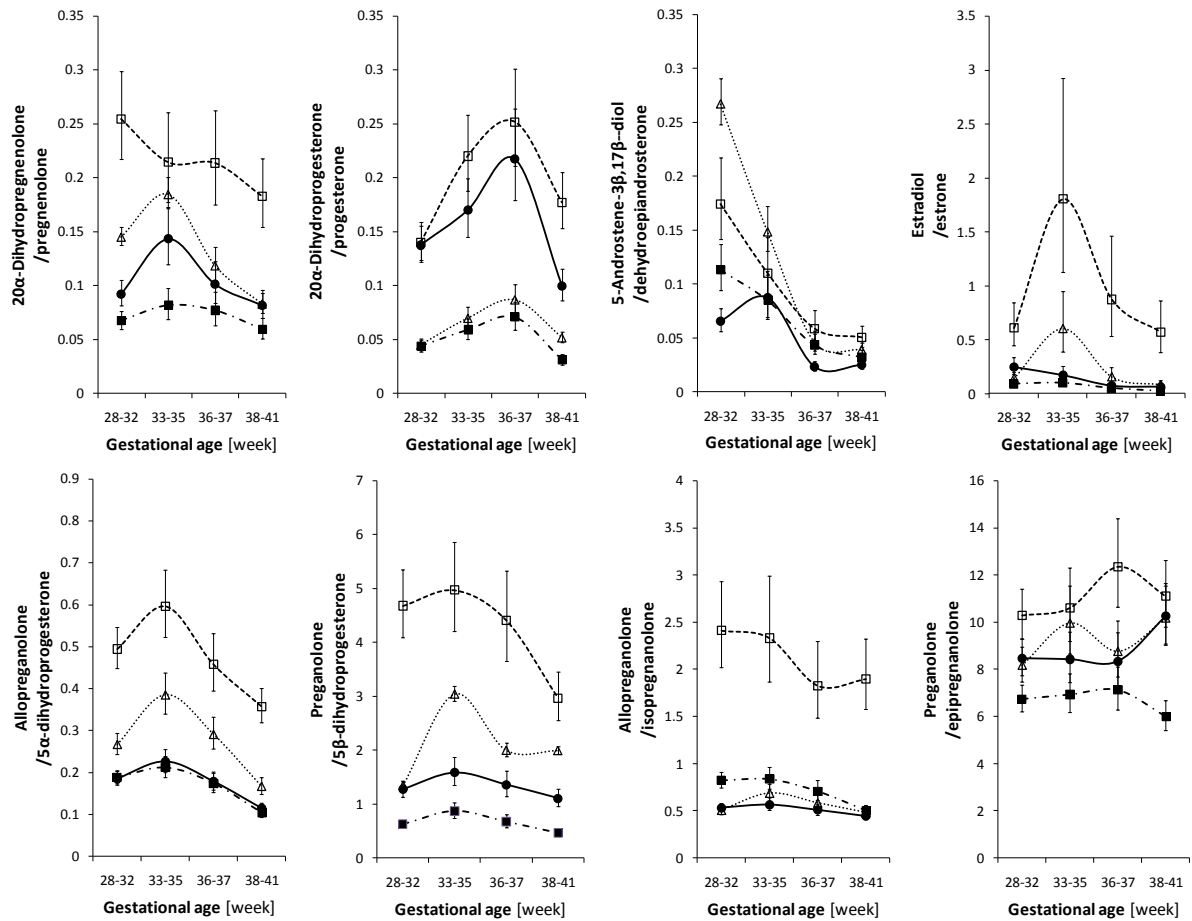


Figure 11: Profiles of the ratios of steroids in reduced forms to the corresponding oxidized forms in the plasma from the umbilical artery (UA), umbilical vein (UV) and maternal cubital vein (MV) and in amniotic fluid (AF) in preterm and normal labor. The drawings and symbols are the same as for Figure 2.