

Univerzita Karlova v Praze
1. lékařská fakulta

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Hana Pospíšilová

METABOLICKÝ SYNDROM A STEROIDNÍ SPEKTRUM

Dihydrotestosteron a metabolické parametry

METABOLIC SYNDROME AND STEROID SPECTRUM

Dihydrotestosterone and metabolic parametres

Disertační práce

Školitel: Prof. MUDr. et RNDr. Luboslav Stárka, DrSc.

Školitel – konzultant: MUDr. Michaela Dušková, Ph.D.

Praha, 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 28.8.2013

Hana Pospíšilová

Podpis:

Identifikační záznam:

POSPÍŠILOVÁ, Hana. *Metabolický syndrom a steroidní spektrum. [Metabolic syndrome and steroid spectrum]*. Praha, 2013. Počet stran - 80, počet příloh 4. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Endokrinologický ústav. Školitel Stárka, Luboslav, školitel-konzultant Dušková, Michaela.

Poděkování:

Tato disertační práce by nevznikla bez podpory a pochopení mých spolupracovníků a vedení Endokrinologického ústavu v Praze.

Především bych ráda poděkovala panu profesorovi Luboslavu Stárkovi a paní doktorce Michaele Duškové za profesionální vedení, mnoho cenných rad, morální podporu, bezmeznou ochotu a trpělivost, kterou mi věnovali.

Ráda bych také poděkovala panu Ing. M. Hillovi, DrSc. za vedení při analýze a statistickém vyhodnocení dat. Současně děkuji celému týmu Oddělení steroidů a proteofaktorů Endokrinologického ústavu za podporu a pomoc.

Předložená práce byla podporována granty IGA NS 10125-3 a GAUK 367511.

Obsah	stránka
I. SEZNAM ZKRATEK.....	6
II. SOUHRN	8
III. SUMMARY.....	9
IV. CÍLE PROJEKTU A HYPOTÉZA	10
V. ÚVOD	11
1. Hladiny DHT a stimuly ovlivňující hladiny DHT	12
2. Vliv fyziologické hladiny DHT na tělesné složení.....	14
3. Úloha DHT v tukové tkáni	14
4. Vztah DHT k rizikovým faktorům kardiovaskulárních onemocnění	15
5. Androgenní alopecie (AGA) jako stav s nadbytkem DHT	16
6. Stav s nedostatkem DHT	17
7. Změny steroidogeneze u obézních	19
VI. METODY	21
VII. VÝSLEDKY	36
VIII. DISKUZE	57
IX. ZÁVĚR	62
X. SHRUTÍ ZÁVĚRŮ PRÁCE	63
XI. LITERATURA	64
XII. VLASTNÍ PRÁCE.....	73
XIII. SEZNAM PŘÍLOH	79

I. Seznam zkratek

AGA - androgenní alopecie

AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3 - aldo-keto reduktázy

ANCOVA - analýza kovariace

ANOVA – analýza rozptylu

AR – androgenní receptor

A2 – 4-androsten-3,17-dion

A3 α 5 α C – konjugovaný androsteron

A3 α 5 α 17 β C - konjugovaný 5 α -androstane-3 α ,17 β -triol

A3 α 5 β C - konjugovaný etiocholanolon

A3 β 5 α C - konjugovaný epiandrosteron

A3 β 5 α 17 β C - konjugovaný 5 α -androstan-3 β ,17 β -triol

A3 β 5 β C - konjugovaný epietiocholanolon

BMI – body mass index

BPD – diastolický krevní tlak

BPS – systolický krevní tlak

BSA - bovine serum albumin

C pep – C peptid

CYP17A1 - C17,C20-lyázy

C1-14 – kožní řasy

DHEA – dehydroepiandrosteron

DHEAS – dehydroepiandrosteron sulfát

DHT – dihydrotestosteron

fDHT – volný dihydrotestosteron

fT – volný testosteron

FSH – folikulostimulační hormon

GC-MS - plynová chromatografie hmotnostní spektrometrie

Glykop – glykované proteiny

HDL-cholesterol – high-density lipoprotein cholesterol

HSD3B2 - 3 β -hydroxysteroid-dehydrogenáza typu 2

HSD17B - 17 β -hydroxysteroid-dehydrogenáza

CH - cholesterol

IMT - intimomediální tloušťka

IRI – imunoreaktivní inzulín

IRMA - imunoradiometrická analýza

LDL-cholesterol – low-density lipoprotein cholesterol

LH – luteinizační hormon

LSD - least significant difference- nejméně signifikantních rozdílů

mRNA - messenger RNA

OGTT – orální glukózový toleranční test

O2PLS - vícerozměrná regrese s redukcí dimenzionality metodou obousměrných ortogonálních projekcí do latentní struktury

Preg 17 - 17 α -hydroxy-pregnenolon

Prog – progesteron

Prog 17 - 17 α -hydroxy progesteron

P3 α 5 α C - konjugovaný allopregnanolon

P3 α 5 β S - konjugovaný pregnanolon

RIA - radioimunoanalýza

SHBG - sex hormone binding globulin

T – testosteron

TK diast – diastolický krevní tlak

TK syst – systolický krevní tlak

Tg - triglyceridy

USA - Spojené státy americké

WHR – poměr pas boky

17-OH prog - 17 α -hydroxy progesteron

II. Souhrn

Pohlavní steroidy ovlivňují ukládání tuku. Rozložení tuku je jedním ze sekundárních pohlavních znaků. Androgeny působí na tukovou tkáň u mužů buď přímo stimulací androgenního receptoru, nebo nepřímo po aromatizaci přes estrogenní receptor. Androgeny dělíme na aromatizovatelné a nearomatizovatelné. Testosteron (T) je hlavním aromatizovatelným androgenem, jeho metabolit dihydrotestosteron (DHT) je nearomatizovatelný androgen a působí pouze přes androgenní receptor. Právě účinek pouze přes androgenní receptor dal vznik hypotéze o rozdílném efektu DHT a T na tělesné složení, kdy právě DHT by mohl být zodpovědný za mužský typ ukládání tuku.

V rámci mého postgraduálního studia jsme analyzovali závislost sérové hladiny volných frakcí T a DHT na věku, a změny jejich poměru s věkem. Dále jsme hledali vztah aromatizovatelných a nearomatizovatelných androgenů s metabolickými a antropometrickými parametry. Dále jsme se věnovali sledování změn steroidogeneze u obézních mužů.

Prokázali jsme, že před pubertou je dominantním androgenem spíše DHT než T, poměr f_{DHT}/f_T byl v průběhu života dospělých mužů konstantní. Po pubertě jsme nenalezli žádný evidentní zvrát v poměru obou hormonů, který by mohl přispět k vysvětlení výskytu např. benigní hyperplazie a karcinomu prostaty nebo androgenní alopecie až po dovršení středního věku.

Dále jsme zjistili, že hladina DHT a T negativně koreluje s antropometrickými a metabolickými ukazateli, našli jsme pozitivní korelaci mezi množstvím svalstva, hladinou HDL cholesterolu a hladinou T i DHT, neprokázali jsme tedy rozdíl v účinku aromatizovatelných a nearomatizovatelných androgenů. Oba androgeny působí na metabolické a antropometrické parametry stejně.

Ze sledování změn steroidogeneze u obézních lze odvodit, že biosyntéza testosteronu u mužů s nadváhou a u obézních mužů je inhibována již v okamžiku štěpení postranních řetězců C21 steroidních hormonů a dále poklesem aktivity 17β -hydroxysteroid-dehydrogenázy.

III. Summary

Sex steroids influence the storing of fat, and differences in the distribution of fat are a typical secondary sexual characteristic. Androgens act on fatty tissues in males either directly through stimulation of the androgen receptor or indirectly through aromatization of the estrogen receptor. Androgens can be classified as aromatizable or non-aromatizable. Testosterone (T) is the main aromatizable androgen, while its metabolite dihydrotestosterone (DHT) is a non-aromatizable androgen that acts only through the androgen receptor. It is precisely this difference in having activity only through the androgen receptor that has given rise to the hypothesis concerning the differing effects of DHT and T on body composition, with DHT possibly being responsible for male-type fat distribution.

As part of my post-graduate studies we analyzed the dependence serum levels of T and DHT on age, as well as changes in their ratio with age. Further, we sought relationships between aromatizable and non-aromatizable androgens and metabolic and anthropometric parameters. We also focused on following any changes in steroidogenesis in obese males.

We showed that before puberty the dominant androgen is rather DHT than T, that the fDHT/fT ratio during the life of adult males is constant, and that there is no evidence of a reversal in ratios of these hormones after puberty.

We further found that levels of DHT and T are negatively correlated with anthropometric and metabolic indicators, and that there was a positive correlation between muscle mass, HDL cholesterol level and levels of T and DHT. We thus did not find differences in the effects of aromatizable and non-aromatizable androgens. Both types of androgens similarly influence metabolic and anthropometric parameters.

From following changes in steroidogenesis in obese males it can be concluded that the biosynthesis of testosterone in overweight and obese males is inhibited already at the moment when side chains of C₂₁ steroid hormones are cleaved and further with the decrease in activity of 17 β -hydroxysteroid-dehydrogenase.

IV. Cíle projektu a hypotéza

Hypotéza

Dva hlavní endogenní androgeny člověka se liší v některých svých metabolických účincích

Cíle práce

Cílem této práce je studium úlohy dihydrotestosteronu v rámci rozvoje metabolického syndromu u mužů a rozpracování hypotézy rozdílného účinku aromatizovatelných a nearomatizovatelných androgenů na rozvoj obezity. K tomu bude nutné:

1. analyzovat závislost sérové hladiny volných frakcí testosteronu a dihydrotestosteronu na věku v populaci českých mužů a zjistit, zda jsou změny v poměru DHT a testosteronu spjaty s obdobími, v nichž se objevují klinické příznaky relativního nadbytku DHT, jako je plešatění a poruchy prostaty.
2. provést analýzu DHT u dobře definovaného souboru zdravých kontrol - hledat vztah aromatizovatelných a nearomatizovatelných androgenů a metabolických parametrů
3. provést analýzu metabolitů DHT u dobře definovaného souboru zdravých kontrol - hledat vztah těchto steroidů a antropometrických údajů
4. sledovat změny enzymů steroidogeneze v závislosti na nárůstu hmotnosti analýzou prekursorů a produktů steroidogeneze

V. Úvod

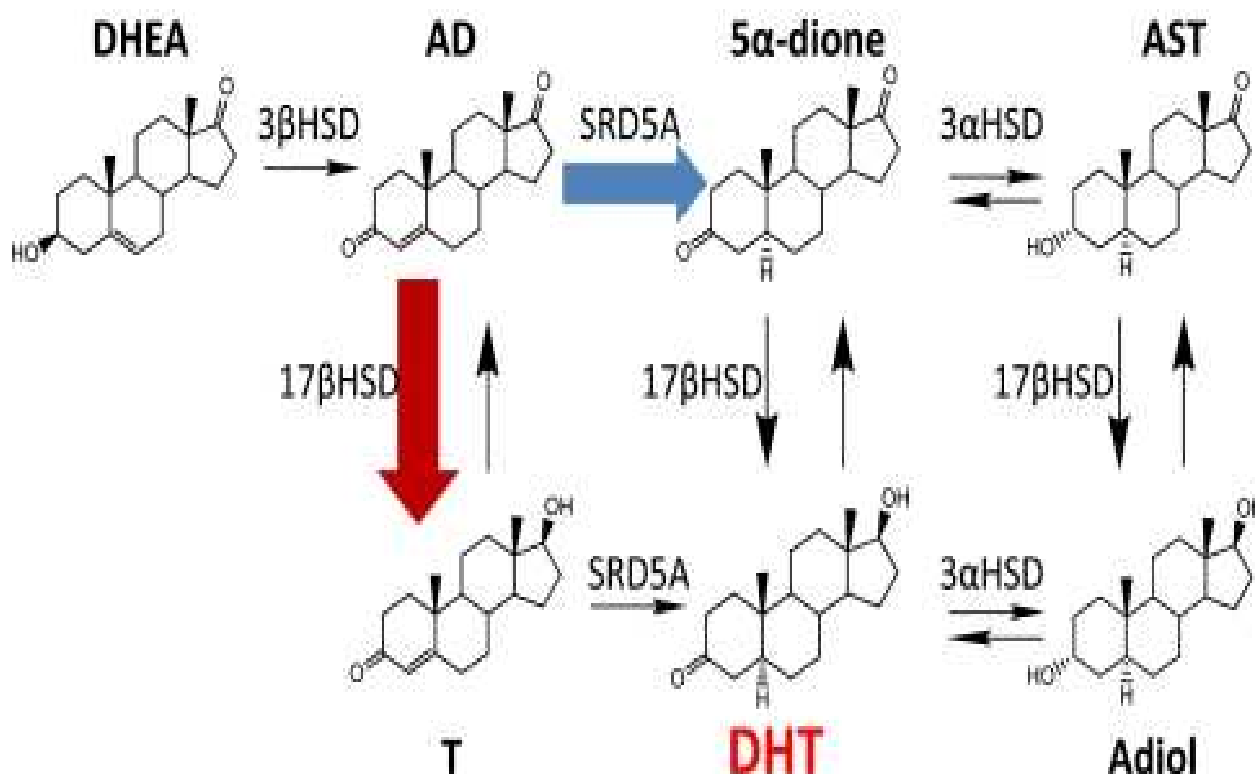
Dihydrotestosteron (DHT) byl poprvé popsán ve třicátých letech minulého století (Dorfman and Hamilton, 1939). Dlouhou dobu byl považován za neúčinný metabolit testosteronu. Jeho účinek byl nalezen až o třicet let později (Bruchovsky and Wilson, 1968). Nyní o DHT víme, že je nejsilněji působícím androgenem, má 5x vyšší afinitu k androgennímu receptoru než testosteron (T). Vlastní androgenní účinnost proti testosteronu v cílových tkáních je asi dvojnásobná až trojnásobná. Testosteron je někdy považován za modulátor účinku DHT ve smyslu zmírnění jeho efektu.

Dihydrotestosteron je v malé míře produkován gonádami, ale výrazná většina ho vzniká v periférii lokálním působením 5 α -reduktázy na testosteron. Popsána byla sice i cesta tvorby dihydrotestosteronu bez testosteronového mezistupně (obr. 1), ta se však uplatňuje jen za výjimečných situací (Flück et al., 2011).

DHT v organismu placentárních savců vzniká již od 6. týdne intrauterinního života ireversibilní redukcí testosteronu za katalytického působení enzymu 5 α -reduktázy. To je enzym, který zasahuje do metabolismu progesteronu, deoxykortikosteronu a testosteronu. Tento enzym se vyskytuje ve dvou izoformách typu I a II. Obě izoformy jsou rozdílně exprimovány v různých tkáních a během vývojových stádií. U lidí se 5 α -reduktáza typu I nachází v mazových žlázách kůže, v játrech, svalech a mozku, v malém množství je přítomna také v prostatě a může se zvyšovat u karcinomu prostaty. 5 α -reduktáza typu I je zodpovědná asi za 1/3 cirkulujícího DHT. 5 α -reduktáza typu II se vyskytuje v prostatě, semenných váčcích, epididymis, vlasových folikulech, játrech, je zodpovědná za 2/3 cirkulujícího DHT. V karcinomu prostaty byla nalezena ještě isoforma typu III. (Uemura et al., 2008). DHT hraje roli v prenatální diferenciaci zevního genitálu, je řídicím hormonem pro sestup varlat a vývoj zevního genitálu, dále má vliv na kožní adnexa (vlasový folikul a mazové žlázy), na zrání spermatozoid v epididymis a také na tělesné složení (Aumüller et al., 1996).

Je známo, že pohlavní steroidy ovlivňují u mužů a žen ukládání tuku. Rozložení tuku je jedním ze sekundárních pohlavních znaků. U mužů je tendence ukládat tuk abdominálně, mají větší množství viscerálního tuku než premenopausální ženy (androidní typ). U žen je preferenční tuková distribuce tuků gluteofemorálně a celkově vyšší procento tuku v těle (gynoidní typ). Androgeny mohou ovlivňovat tukovou tkáň u mužů buď přímo stimulací androgenního

receptoru, nebo nepřímo po aromatizaci stimulací estrogenního receptoru. DHT jako nearomatizovatelný androgen by mohl být zodpovědný za mužský typ distribuce tuku (Dušková, Pospíšilová, 2011).



Obr 1. schéma steroidogenezy testosteronu a dihydrotestosteronu (zdroj: Flück et al., 2011).

1. Hladiny DHT a stimuly ovlivňující hladiny DHT

Koncentrace DHT v séru mužů je přibližně o řád nižší než koncentrace testosteronu. Diurnální profil u testosteronu je dobře znám. Rozdíl mezi dopolední a odpolední hodnotou testosteronu je u mladého muže až 25%, ve vyšším věku tento rozdíl klesá asi na 10%. Dihydrotestosteron má podobný diurnální profil, jeho výkyvy jsou však ve všech věkových kategoriích menší (Brambilla et al., 2009).

Literární údaje o poměru DHT a T během života se liší. Některé studie popisují zvýšení DHT oproti T během života (Feldman et al., 2002). Podle dalších studií se tento poměr nemění (Gray et al., 1991, Maier, 2001, Pirke and Doerr, 1975). Změna poměru těchto dvou androgenů v průběhu života je některými autory zvažována jako příčina rozvoje benigní hyperplazie prostaty a androgenní alopecie ve středním věku.

Některé práce popisují geografické a rasové rozdíly mezi hladinami DHT u jednotlivých etnik. Velká americká studie vyšetřila skupinu 1899 mužů ve věku od 30 do 79 let. Nenalezli rozdíl u jednotlivých etnik mezi hladinami T a SHBG. Nalezli však po adjustaci vyšší DHT a vyšší poměr DHT/T u černochoů než u bělochoů a hispánců. Tento rozdíl by mohl vysvětlit rasové rozdíly ve výskytu karcinomu prostaty a tělesném složení (Litman et al., 2006). V další studii byly popisovány hladiny u 5003 starších mužů z pěti kontinentů. Tato studie dokázala nejenom rasové, ale i geografické rozdíly v hladinách steroidů, které nelze vysvětlit rozdíly v tělesném složení. Geografické rozdíly se uplatňovaly silněji než rasové. DHT byl vyšší u Japonců (0.52 ng/ml) a mužů z Hong Kongu (0.45 ng/ml), oproti DHT u Asiatů z USA (0.34 ng/ml), kteří měli podobné hladiny jako běloši (0.36 ng/ml) a černoši z USA (0.38 ng/ml) a Švédové (0.36 ng/ml) (Orwoll et al., 2010).

Hladiny DHT mohou být ovlivněny některými zevními vlivy. Spánková deprivace snižuje hladiny dihydrotestosteronu, po rekonvalescenci dochází k úpravě. Pokles androgenů není sledován poklesem gonadotropinů, ty zůstávají beze změny (Akerstedt et al., 1980, González-Santos et al., 1989). Kombinace velké fyzické zátěže s energetickou a spánkovou deprivací vyvolá pokles gonadotropinů, a také pokles testosteronu a dihydrotestosteronu (Opstad, 1992).

Aerobní cvičení po dobu jednoho roku zvyšuje hladiny DHT a SHBG, ale nemění hladinu T, estradiolu, 3 α -androstane-20 α -diol-3-one-17 β -glukuronidu a volného testosteronu (Hawkins et al., 2008). Jedna studie sledovala efekt třítydenní diety obohacené kreatinem u hráčů ragby proti placebo. Kreatin zvyšoval hladinu DHT, neměnil hladinu testosteronu (van der Merwe et al., 2009). Z uvedených prací vyplývá, že některé potravní stimuly, stres nebo fyzická námaha mohou měnit hladiny androgenů i jejich poměry, což by mohlo vysvětlit geografické rozdíly mezi hladinami androgenů. Tyto změny je nutné také zvažovat při interpretaci výsledků studií porovávajících vliv jednotlivých faktorů na rozvoj onemocnění.

2. Vliv fyziologické hladiny DHT na tělesné složení

Androgeny se uplatňují v řízení tělesného složení u mužů. V posledních třech dekadách vznikla celá řada původních prací i souborných článků popisujících efekt testosteronu a jeho suplementaci na tělesné složení. Testosteron působí na snížení abdominálního tuku a zvýšení svalové hmoty. Suplementace testosteronem však přinesla řadu kontroverzních výsledků. Blouin et al., 2008 ve svém souborném článku popisují metabolický efekt testosteronu jako fyziologické okno, kdy jak jeho nižší tak i vyšší hladiny mají negativní vliv na tělesné složení a kardiovaskulární riziko. Právě nedodržení fyziologických hladin je zřejmě jedním z důvodů kontroverzních výsledků.

DHT je věnováno mnohem méně prací. V některých zvířecích modelech je využíván jeho efekt zprostředkovaný pouze androgenním receptorem. Množství tuku jak subkutánně tak viscerálně negativně koreluje s hladinou jak testosteronu tak DHT (Nielsen et al., 2007). DHT se uplatňuje v řízení proliferace tukových buněk stejně jako testosteron (Singh et al., 2003). Fyziologické hladiny DHT by tedy mohly působit na tělesné složení stejně jako testosteron. U DHT byl dále prokázán pozitivní vliv na kostní denzitu (Ilangovan et al., 2009).

3. Úloha DHT v tukové tkáni

Působení DHT v tukové tkáni se věnuje řada experimentálních modelů. V buněčných liniích DHT působí stejně jako testosteron na pluripotentní buňku a blokuje její přeměnu na adipocyt (Singh et al., 2003). V další práci DHT inhiboval diferenciaci mezenchymových buněk a preadipocytů prostřednictvím androgenního receptoru, ale neovlivňoval jejich proliferaci (Gupta et al., 2008).

Několik zvířecích modelů se věnovalo účinku DHT na tukovou tkáň. Byly provedeny dvě rozsáhlé genetické analýzy tukové tkáně gonadektomovaných samců myší po substituci DHT. Substituce DHT zlepšovala metabolismus tukové tkáně mnoha mechanismy: stimulací glykolýzy, produkcí mastných kyselin a triacylglycerolů, lipolýzy a reorganizací buněk, i jejich proliferací a diferenciací (Bolduc et al., 2004, Bolduc et al., 2007). V jedné práci byl pozorován u gonadektomovaných myší po substituci DHT rozvoj obesity a snížení

energetického výdeje a oxidace tuků při nezměněné spotřebě potravy či fyzické aktivitě (Moverare-Skrtic et al., 2006). Ve studii Moverare – Skrticové bylo použito pouze 45 µg/den po dobu 5 týdnů oproti studii Bolducové et al., kde bylo podáváno 0,1mg denně po 3 týdny. Dávka v uvedené studii (Moverare – Skrtic et al., 2006) mohla být nedostatečná pro plnou saturaci DHT na fyziologickou hladinu, která je 0.59 nmol/l (Potter et al., 2006).

Ve viscerálním tuku u obézních mužů byly nalezeny rozdíly v hladinách a metabolismu DHT. Obézní muži mají ve viscerálním tuku vyšší hladinu DHT než v subkutánním tuku (Bélanger et al., 2006). U obézních je také vyšší odbourávání DHT v omentálním tuku oproti štíhlým (Blouin et al., 2006). Právě metabolit DHT androstan-3 α ,17 β -diol-17-glukoronid pozitivně koreloval nejen s množstvím tuku, ale také s centrální distribucí tuku, intrahepatálním tukem, poruchou lipidového spektra a inzulínovou resistencí (Vandenput et al., 2007). Proto je zvažováno, že spíše metabolity DHT, než přímo DHT, by mohly být zodpovědné za mužský typ ukládání tuku.

4. Vztah DHT k rizikovým faktorům kardiovaskulárních onemocnění

Vlivu DHT na rizikové faktory kardiovaskulárních onemocnění se věnuje řada experimentálních modelů. Experimenty na zvířeti přinášejí doklady o pozitivním účinku normalizace hladin DHT na kardiovaskulární riziko. U gonadektomovaných potkanů substituce DHT zlepšuje trombotický potenciál destiček (Li et al., 2007), u gonadektomovaných králíků DHT zmírňuje rozvoj aterosklerózy supresí tvorby pěnových buněk z makrofágů v intimě cestou suprese lecitin-like oxidized-low-density lipoprotein receptor-1 (Qiu et al., 2010).

Studie s buněčnými liniemi přinášejí nálezy o efektu vysokých hladin DHT. Vysoká hladina DHT inhibuje růst hladkých svalových buněk cév v buněčné kultuře, tato inhibice je dávkově závislá (Somjen et al., 2009). Exogenní podání DHT do buněčné kultury lidských makrofágů, stimuluje expresi proaterogenních genů v linii mužských makrofágů, ale nikoli u ženských makrofágů (Ng et al., 2003). Použitá dávka DHT ve studii byla však desetkrát vyšší, než je fyziologická hladina u mužů v plazmě, což zřejmě ovlivnilo její výsledek.

Yanes a Romero, 2009 sledovali vliv DHT na produkci aldosteronu v buněčné linii lidských adrenokortikálních buněk. Účinek DHT je dávkově závislý. Fyziologická hladina DHT nemění sekreci aldosteronu. Suprafyziologická hladina DHT stimuluje sekreci aldosteronu účinkem na calmodulin/calmodulin-dependentní proteinkinasu a proteinkinasu C intracelulární signální dráhy, ale nezávisle na klasickém androgenním receptoru. Suprafyziologické hladiny androgenů mohou podle autorů tímto mechanismem přispívat k rozvoji kardiovaskulárních onemocnění.

5. Androgenní alopecie (AGA) jako stav s nadbytkem DHT

AGA je nejčastější formou výpadu vlasů u mužů. Výskyt prvních příznaků AGA je u dvaceti procent dvacetiletých mužů a stoupá s každou dekádou o 10%. Jako předčasnou alopecii označujeme plně manifestní plešatost před 35. rokem. Androgeny řídí růst vlasu po celém těle. Jejich účinek je však na různých místech různý. Necitlivá na androgeny je oblast týlní kštice, obočí a řasy. V ostatních oblastech mají androgeny na růst vlasů opačné účinky. Na bradě, hrudníku, v axile, v pubické oblasti a na končetinách je vlasový folikul na počátku puberty stimulován vyšší hladinou androgenů k dozrání v terminální folikul. Na čelní a parietální kštici jsou folikuly inhibovány u mužů s vrozenou predispozicí k plešatění. Proč reaguje odlišně ochlupení na androgeny v různých částech těla bylo předmětem různých hypotéz, ale přesvědčivé zdůvodnění není dosud známo. Jako příčina se uvádí rozdílná úroveň receptorů pro androgeny, zvýšená lokální produkce dihydrotestosteronu, snížení metabolické degradace androgenů, ale také další faktory (Kaufman, 2002).

Zásadní úlohu DHT pro růst vlasu a pro rozvoj androgenní alopecie potvrzuje syndrom Imperato- McGinleyové, který je způsoben mutací genu pro 5 α -reduktázu II. typu, což zabraňuje expresi tohoto enzymu a dostatečné produkci dihydrotestosteronu. Muži s tímto syndromem nemají ve vyšším věku zvětšenou prostatu a neplešatí (Imperato-McGinley et al., 1974). Dalším dokladem je, že vytržené folikuly nebo vzorky kůže z míst lysin u androgenní alopecie mají vyšší obsah DHT než u mužů bez pleše (Jamin, 2002). O úloze 5 α -reduktázy I. typu pro růst vlasu nevíme mnoho, ale její úroveň je vysoká v sebaceálních žlázkách, zejména v oblastech náchylných k akné (Thiboutot et al., 1995). Klinickým průkazem role

dihydrotestosteronu jsou i studie, které se zaměřily na použití inhibitorů 5 α -reduktázy při léčbě androgenní alopecie, ať už lokalizované na vertexu (Finasteride Male Pattern Hair Loss Study Group, 2002), nebo projevující se ústupem frontální hranice vlasu.

Androgenní alopecie jako příznak zvýšené aktivity androgenů je intenzivně studována jako možný rizikový faktor některých onemocnění. V literatuře je popisováno především vyšší riziko jak benigní hyperplazie (Oh et al., 1998, Chen et al., 2004), tak karcinomu prostaty (Hawk et al., 2000, Gilles et al., 2002), tedy onemocnění prostaty, která je podobně jako vlasový folikul více pod vlivem dihydrotestosteronu než testosteronu. V některých pracích nebyl potvrzen vztah AGA a karcinomu prostaty (Hsieh et al., 1999).

Předčasná androgenní alopecie je také spojována s vyšším výskytem obezity (Hirsso et al., 2007). Řada prací přináší doklady o androgenní alopecii jako nezávislém rizikovém faktoru kardiovaskulárních a metabolických onemocnění (Trevisan et al., 1993, Ford et al., 1996, Herrera et al., 1995, Lesko et al., 1993, Sasmaz et al., 1999, Lotufo et al., 2000, Matilainen et al., 2000, Dušková et al., 2004, González-González et al., 2008, Dogramaci et al., 2009). Některé práce se však potýkají s metodickými problémy jako malý počet probandů, což tyto výsledky zpochybňuje. Ve velké epidemiologické studii, která zahrnovala 5056 mužů ve věku od 45 do 64 let, nebyl prokázán vztah mezi androgenní alopecií a infarktem myokardu, ani mezi androgenní alopecií a intimomediální tloušťkou jako markerem symptomatické aterosklerózy (Shahar et al., 2008). Největším problémem této studie je nesledování začátku výpadu vlasů, neboť zřejmě pouze předčasná androgenní alopecie má vztah ke zmiňovaným onemocněním. Je však nutno připomenout, že změny na prostatě stejně jako změny metabolických parametrů a kardiovaskulární rizikové faktory budou zřejmé u mužů s předčasnou androgenní alopecií signifikantní až v pozdějším věku. Lokální nadbytek dihydrotestosteronu by tedy mohl hrát roli v rozvoji, jak předčasné androgenní alopecie, tak obezity mužského typu.

6. Stavy s nedostatkem DHT

Přirozeně se vyskytuje několik stavů, kde je snížen účinek androgenů. Prvním z nich je syndrom kompletní insenzitivity na androgeny. Fenotypické ženy s tímto syndromem mají

genotyp 46,XY. Jedna studie se zabývala metabolickými parametry a tělesným složením u žen s tímto syndromem. Byla nalezena vyšší prevalence obezity, zhoršení lipidového spektra a inzulínové resistance (Dati et al., 2009). Problémem této studie je malý počet probandek, který je dán vzácností tohoto syndromu.

Existuje zvířecí model tohoto syndromu, knock-out myši pro AR receptor jsou obézní při nezměněných potravních návycích, ale nemají změněné lipidové spektrum (Sato et al., 2003).

Druhým přirozeným modelem týkajícím se přímo DHT je syndrom Imperato-McGinleyové, který je způsoben mutací genu pro 5 α -reduktázu II. typu, což zabraňuje expresi tohoto enzymu. Postižení jedinci produkují testosteron v normálním nebo dokonce mírně zvýšeném množství, ale nekonvertují jej na dihydrotestosteron v dostatečné míře. Homozygotní pacienti s mužským karyotypem se rodí fenotypicky jako specifický typ hermafroditismu a podobají se spíše dívkám až do doby dospívání. V pubertě u nich pod vlivem rostoucích hladin testosteronu dochází k virilizaci, mají normální libido a ustálí se mužský fenotyp, ale mají řídké vousy a sporé tělesné ochlupení, nedochází u nich ve vyšším věku k růstu prostaty a k plešatění (Imperato-McGinley et al., 1974). V literatuře nejsou zmínky o jejich tělesném složení ani kardiovaskulárním riziku.

Polymorfismus genu pro 5 α -reduktázu byl studován ve vztahu k onemocnění periferních tepen. Byl nalezen signifikantní vztah mezi polymorfismem genu pro 5 α -reduktázu I. typu, který je spojen s nižší aktivitou tohoto enzymu a onemocněním periferních tepen. Nižší hladina DHT by tedy mohla predisponovat ke zmíněnému onemocnění. (Signorelli et al., 2008). Otázkou zůstává, jak se tento polymorfismus projeví, když 5 α -reduktáza typu I je zodpovědná pouze za jednu třetinu DHT.

Léčba finasteridem je uměle vytvořeným modelem nižší hladiny DHT. Hlavní problém léčby finasteridem, jako modelu účinku nižších hladin DHT, je fakt, že tento lék je předepisován u pacientů, kteří mají DHT nadbytek. Finasterid jako blokátor 5 α -reduktázy je využíván v léčbě benigní hyperplazie prostaty a v posledních letech byla jeho indikace rozšířena i na léčbu androgenní alopecie, a to v nižší celkové denní dávce. Kumuluje se tedy v tomto modelu dvojitý efekt a to dlouhodobé expozice vyšší hladiny DHT a pak snížení jejich hladin pomocí finasteridu, které je relativně krátkodobé.

Podávání zdravým jedincům bez rozlišení, zda se jednalo o probandy s nadbytkem DHT či nikoli, se zabývaly dvě studie. Gormley et al., 1990 nepozorovali změny v lipidovém profilu po krátkodobém užívání finasteridu ve vyšších i nízkých dávkách. Amory et al., 2008 nenalezli při podávání finasteridu ani dutasteridu signifikantní vliv na lipidový metabolismus u zdravých mužů při dlouhodobém užívání. Další dvě práce sledovaly efekt finasteridu u pacientů s nadbytkem DHT. Denti et al., 2000 pozorovali zvýšení hladiny HDL-cholesterolu a lipoproteinů po 6 měsíční léčbě u pacientů s benigní hyperplazií prostaty. Ve studii Duškové et al., 2010 našli zvýšení cholesterolu, HDL, LDL po 3, 6, 8 měsících, s normalizací všech parametrů po jednom roce léčby. U pacientů s androgenní alopecií pozorovali pokles inzulinové resistance v inzulinovém tolerančním testu po roce léčby finasteridem.

Tento model se tedy nezdá být vhodný pro studium účinku nižších hladin DHT, spíše však by byl vhodný pro dlouhodobé sledování, které by mohlo ukázat, zda dochází ke změnám metabolických parametrů snížením hladiny DHT u pacientů exponovaných vyšším hladinám DHT. Zatím publikované studie jsou krátkodobé a na malém počtu probandů.

7. Změny steroidogeneze u obézních

Snížené hladiny testosteronu spadající až do rozmezí hypogonadismu jsou při mužské obezitě časté (Hofstra et. al, 2008, De Maddalena et.al., 2012, Dandona et Dhindsa, 2011, Allan et McLachlan, 2010, Wang C et al., 2011). Mechanismus poklesu koncentrace cirkulujícího celkového testosteronu je vysvětlován silnou expresí aromatázy, enzymu, který konvertuje testosteron na estradiol v tukové tkáni, což vede ke zvýšení hladiny estradiolu. Společně se zvýšeným leptinem a adipokinázami z tukové tkáně to spouští inhibici osy hypothalamus-hypofýza-gonády (Glass, 1989, Cohen, 1999). To vede k hypogonadotropnímu hypogonadismu, jenž je u obézních mužů ve velké míře pozorován.

Ačkoli se několik málo publikací zabývá vztahem hladin testosteronu, dihydrotestosteronu a estradiolu k obezitě, vlivu obezity na metabolismus androgenů je věnována ještě menší pozornost. Určitá důležitá data byla získána měřením intra-adipózního metabolismu androgenů (Corbould et al., 2002, Wake et al., 2007). Aktivita enzymů zapojených do

metabolismu androgenů se v různých částech tukové tkáně mění a společně s lokální aktivitou glukokortikoidů představuje důležitý faktor distribuce tuku.

Údaje týkající se cirkulujících androgenů a jejich prekurzorů u obézních mužů, s výjimkou testosteronu a dihydrotestosteronu (Côté et al., 2012) jsou vzácné (De Pergola et al., 1994, Labrie et al., 1997, Tchernof et Labrie, 2004, Barrett-Connor et Ferrara, 1996).

VI. Metody

1. část studie

Analyzovali jsme relevantní údaje z let 1994 – 2007 z databáze Endokrinologického ústavu, což zahrnovalo 13152 mužů léčených ambulantně pro jiná onemocnění, než jsou poruchy osy hypotalamus-hypofýza-gonády. Z této skupiny byly získány sérové koncentrace DHT, testosteronu a SHBG od 2665 mužů. Muži léčení testosteronem nebo inhibitory 5 α -reduktázy, které prokazatelně ovlivňují poměr vyšetřovaných steroidních hormonů, byli ze studie vyřazeni. Nestanovili jsme žádná další vylučovací kritéria, jelikož naším cílem bylo do studie zahrnout skupinu pacientů co možná nejpodobnější spektru klientů našeho Ústavu, který má v péči zejména pacienty s poruchami štítné žlázy, s diabetem a dalšími metabolickými poruchami a obezitou. Co se týče etnického původu mužů, všichni jsou kavkazského typu. Vzorky krve byly odebírány z kubitální žíly mezi osmou a desátou hodinou ránní a vzorky séra byly následně uchovávány při -20°C, než došlo k jejich laboratornímu zpracování.

Laboratorní metody

Testosteron: Po extrakci diethyl-éterem s použitím králičího polyklonálního antiséra proti testosteron-3-CMO:BSA a radiojódem značeného testosteron-tyrozin methylesteru jako značky byla provedena radioimunoanalýza. Intra-analyzační a inter-analyzační variační koeficienty byly pro danou metodu 8,2 % a 10,7 %, v uvedeném pořadí.

Dihydrotestosteron: Byl stanoven pomocí radioimunoanalýzy po extrakci diethyl-éterem po KMnO₄-oxidaci zkříženě reagujících 4-en-3-oxosteroidů s použitím králičího antiséra proti dihydrotestosteron-3-CMO:BSA a [3H]dihydrotestosteronu jako značky (Amersham, UK) (Hampl et al., 1978). Intra-analyzační a inter-analyzační variační koeficienty byly pro danou metodu 8,7 % a 12,1 %, v uvedeném pořadí.

SHBG byl stanoven pomocí IRMA kitu (Orion, Espoo, Finsko).

Volné frakce testosteronu a DHT byly vypočítány podle vzorce:

$$fT = \left(\sqrt{A(A/4) + (T/23.3)10^{-18}} - (A/2) \right) 10^{12}$$

$$f_{DHT} = \left(\sqrt{B(B/4) + (1/1.304) \times (DHT/23.3)10^{-18}} - (B/2) \right) 10^{12}$$

podle Vermeulen et al., 1996 s použitím konstant (Sodergard et al., 1982), kde $A = ((SHBG-T + 23.3)/23.3)10^{-9}$ a $B = A/1.346$.

Statistická analýza

Závislost volných frakcí DHT a T na věku:

Pro vyhodnocení závislosti hladin volných frakcí steroidních hormonů a poměru DHT a testosteronu na věku byla použita polynomická regrese. Optimální stupeň polynomu byl stanoven pomocí střední kvadratické chyby predikce a korelační koeficient polynomické regrese byl adjustován na daný počet stupňů volnosti (jednalo se tedy o predikovaný korelační koeficient).

Adekvátnost proložení byla ověřena rovněž pomocí dalšího testu známého jako Lack of Fit Test. Navíc byla závislost na věku hodnocena jednofaktorovou ANOVA následovanou vícenásobným porovnáním metodou nejmenšího významného rozdílu. Data byla transformována pomocí mocninné transformace s ohledem na původně nesymetrickou distribuci dat u všech závislých proměnných tak, aby bylo dosaženo symetrie v distribuci studentizovaných reziduí a transformovaných dat pro regresi a ANOVA (Meloun et al., 2000). V obou metodách byly nehomogenity detekovány pomocí reziduální analýzy (Meloun et al., 2002, 2004) a výpočty byly provedeny z dat bez nehomogenit, které v žádném z výpočtů nepředstavovaly více než 5 % z původních dat.

2. část studie: zkoumání rozdílu mezi vlivem T a DHT

Do studie byla zavzata skupina 232 zdravých mužů ve věku 20 až 78 let s body mass indexem (BMI) v širokém spektru od 18 do 39. Měřeny byly antropometrické parametry (tj. hmotnost, výška, pas, boky, poměr pas-boky, 14 kožních řas, BMI, procentuální zastoupení svalové a tukové tkáně) a také byla provedena laboratorní analýza metabolických parametrů (lipidové spektrum – triglyceridy, celkový cholesterol, HDL, LDL, parametry metabolismu glukózy – glykémie, C-peptid, orální glukózový toleranční test – oGTT a steroidní hormony - dihydrotestosteron, testosteron, 17 α -hydroxy-progesteron, dehydroepiandrosteron, dehydroepiandrosteron sulfát, 4-androsten-3,17-dion, LH, FSH, 17 α -hydroxy-pregnenolon a SHBG.

Celková charakteristika mužských dobrovolníků rozdělených do podskupin štíhlí a obézní je uvedena v tabulce 1.

Studii schválila etická komise a všichni pacienti podepsali informovaný souhlas před tím, než se studie zúčastnili.

Tabulka 1.

Charakteristika mužských dobrovolníků

Souhrnná statistika antropometrických charakteristik a laboratorních známek štíhlé a obézní podskupiny

Proměnné	BMI≤25 kg/m ²		BMI>25 kg/m ²	
	Průměr(SD)	Median (quartiles)	Průměr (SD)	Median (quartiles)
Věk [roky]	30,5 (11)	26,5 (23,7, 34,2)	46,6 (17,3)	45,7 (32,1, 60,3)
BMI [kg/m ²]	22,5 (2,79)	22,8 (21,4,24)	29,6 (4,82)	28,2 (26,7, 31,4)
Tělesná výška[cm]	181 (18,2)	181 (177, 185)	179 (17,8)	180 (173, 183)
Břicho[cm]	82,7 (9,78)	82,2 (78,3, 86,6)	103 (15)	101 (94,4, 108)
Boky[cm]	95,9 (9,88)	96 (93,1, 98,8)	107 (12,3)	105 (101, 110)
Pas[cm]	79,4 (9,28)	78,8 (74,9, 83,4)	100 (15,1)	97,8 (91,1, 106)
Kostní hmota[kg]	12,8 (1,9)	12,8 (11,8, 13,6)	13,5 (2,08)	13,5 (12,2, 14,6)
Kostní hmota[%]	17,4 (2,41)	17,3 (16,2, 18,5)	14,5 (2,09)	14,5 (13,5, 15,5)
Svaly[kg]	34,2 (4,79)	33,9 (31,5, 36,5)	39 (6,31)	38,8 (35,4, 42,4)
Svaly[%]	46,5 (5,75)	46,6 (44,1, 48,8)	41,7 (5,84)	41,6 (39,5, 43,6)
Tuk[kg]	10,2 (4,11)	9,32 (6,91, 12,9)	20,2 (7,91)	19 (14,8, 24,8)
Tuk [%]	13,6 (4,78)	12,7 (9,87, 16,8)	21,3 (6,7)	20,7 (16,4, 25,6)
Hmotnost [kg]	73,9 (10,2)	73,8 (69,1, 79)	94,6 (15,7)	92,6 (84,3, 100)
c1 [cm] (kožní řasa na tváři)	6,85 (3,26)	6 (4,5, 9)	16 (5,73)	15,8 (12, 20)
c2 [cm] (kožní řasa na bradě)	9,6 (4,7)	8,45 (5,63, 13)	18,2 (6,45)	18,3 (13,5, 21,9)
c3 [cm] (kožní řasa hrudníku1)	14,6 (6,36)	14 (9, 19)	27,8 (10,3)	27 (23, 33,5)
c4 [cm] (kožní řasa hrudníku2)	7,05 (3,01)	7 (5, 8)	11,5 (5,5)	10 (8, 13)
c5 [cm] (kyčelní kožní řasa)	3,22 (1,67)	3 (2, 4)	7,43 (4,25)	6,5 (4, 10)
c6 [cm] (břišní kožní řasa)	3,18 (1,77)	2,5 (2, 3,5)	6,44 (3,5)	6 (4, 8,38)
c7 [cm] (patelární kožní řasa)	9,2 (4,82)	8,5 (5,63, 12)	14,5 (7,09)	12,8 (9,5, 18)
c8 [cm] (bicipitální kožní řasa)	10,3 (4,15)	9,5 (7, 12,4)	20,1 (6,76)	20 (16,5, 22,9)
c9 [cm] (předloketní kožní ř.)	7,16 (3,34)	6,5 (5, 9)	11,3 (5,26)	10 (8, 13,9)
c10 [cm] (tricipitální kožní ř.)	13,3 (5,21)	13 (10, 16)	19,2 (8,45)	18,5 (12, 23,9)
c11 [cm] (zádová kožní řasa)	7,06 (3,46)	6 (4,5, 9,88)	9,72 (4,6)	9 (6,5, 12)
c12 [cm] (lýtková kožní ř.1)	5,61 (1,56)	5,5 (4,63, 6,5)	8,05 (2,53)	8 (6,5, 9)
c13 [cm] (stehenní kožní ř.)	4,19 (2,27)	3,75 (2,5, 5)	8,71 (3,91)	8 (6, 11)
c14 [cm] (lýtková kožní ř.2)	4,98 (3,06)	4 (3, 6)	8,49 (5,24)	7 (4,5, 11)
TKsyst [mm Hg]	121 (18,4)	120 (111, 129)	134 (23,4)	130 (120, 145)
TKdiast[mm Hg]	72,9 (11,3)	72 (66,5, 78,5)	79,9 (14,3)	80 (71, 89)
glORTT0 [mM]	4,86 (0,855)	4,7 (4,5, 5,1)	6,37 (2,77)	5,3 (4,7, 7)
cpep0 [nM]	0,526 (0,189)	0,485 (0,4, 0,63)	0,892 (0,373)	0,805 (0,61, 1,11)
IRI0 [mIU/L]	5,46 (3,06)	4,72 (3,3, 6,85)	11,4 (9,48)	8,9 (6,3, 12,1)
IRI180 [mIU/L]	4,33 (4,32)	3,3 (2,38, 4,7)	7,86 (7,03)	5,6 (3,7, 9,5)
Tg [mM]	0,934 (0,412)	0,78 (0,63, 1,18)	1,89 (1,58)	1,62 (1,14, 2,22)
CH [mM]	4,25 (0,907)	4,15 (3,65, 4,73)	4,94 (1,05)	4,96 (4,36, 5,51)
HDL [mM]	1,39 (0,335)	1,35 (1,18, 1,58)	1,12 (0,305)	1,08 (0,92, 1,32)
LDL [mM]	2,43 (0,812)	2,33 (1,85, 2,93)	2,98 (0,859)	2,9 (2,52, 3,51)
Glykop [%]	1,1 (0,166)	1,07 (1, 1,14)	1,21 (0,251)	1,13 (1,05, 1,31)
DHT [nM]	2,17 (8,58)	1,32 (1,12, 1,58)	1,93 (8,8)	1,07 (0,863, 1,3)
T [nM]	18,5 (6,05)	17,4 (13,8, 22,4)	14,4 (5,03)	13,8 (11,1, 17,2)
17-OH-progesteron [nM]	3,37 (3)	2,89 (2,32, 3,75)	2,48 (2,08)	2,09 (1,52, 2,84)
DHEAS [nM]	7,28 (3,65)	6,64 (5,49, 9,17)	5,99 (3,36)	6,04 (3,55, 7,81)
DHEA [nM]	23,9 (12,7)	21,5 (14,9, 31)	16,6 (10,8)	14,9 (8,29, 21,5)
Androstendion (A2) [nM]	7,81 (9,42)	7,08 (5,42, 8,38)	6,33 (1,95)	6,02 (5,1, 7,53)
LH [IU/L]	5,01 (3,53)	4,35 (3,3, 5,52)	5,13 (3,46)	4,2 (3,3, 5,98)
FSH [IU/L]	4,77 (6,27)	3,85 (2,77, 4,83)	6,67 (7,03)	4,65 (3,2, 7,38)
SHBG [nM]	31,3 (14,3)	29,5 (21,6, 37,2)	30,2 (24,6)	25 (18,9, 33,8)
17-OH-pregnenolon [nM]	15,9 (12,7)	13 (7,05, 21,9)	9,22 (9,12)	6 (2,73, 11,8)

Zkratky: DHT dihydrotestosteron; T testosteron; Prog progesteron; A2 androstendion; DHEA dehydroepiandrosteron; Prog17 17-hydroxyprogesteron; Preg17 17-hydroxypregnenolon; c1-c14 kožní řasy; TKsyst systolický krevní tlak; TKdiast diastolický krevní tlak; glORTT0 glukóza na lačno; cpep0 C-peptid na lačno; IRI0 imunoreaktivní inzulin na lačno; Tg triglyceridy; Chol celkový cholesterol; Glykop glykované proteiny.

Antropometrická data

Antropometrická data byla odebírána nalačno. Tělesná hmotnost, výška, obvod pasu a boků byly měřeny u všech účastníků studie za účelem výpočtu body mass indexu (BMI) a vyšetření akumulace viscerálního tuku pomocí obvodu pasu a poměru pasu a boků (WHR).

Dále bylo měřeno 14 kožních řas (c1 – c14). Složení těla (% hmoty podkožního tuku, % svalové hmoty a % kostní hmoty z celkové tělesné hmotnosti) bylo následně vypočteno pomocí programu ANTROPO (Bláha, 1991). Byla měřena hmotnost (s přesností na 0,1 kg) a výška (s přesností na centimetry). Obvody byly měřeny ve stoje, obvod pasu v polovině mezi dolními žebry a hřebenem kosti kyčelní a obvod boků v úrovni velkých trochanterů. BMI byl vypočten jako hmotnost (kg) dělená druhou mocninou výšky (m^2) a WHR jako obvod pasu dělený obvodem boků.

Biochemická analýza

Po celonočním lačnění byly odebrány vzorky krve ke stanovení biochemických parametrů. Hladina glukózy v krvi byla měřena metodou glukózo-oxidázy (Beckmanův analyzátor glukózy 2). Glykované proteiny (Glykop) byly stanoveny pomocí spektrofotometrické redox reakce s použitím nitro blue tetrazolia jako senzitivního redox indikátoru pro specifickou kvantifikaci fruktosaminů v alkalickém roztoku. Imunoreaktivní inzulin (IRI) byl měřen pomocí imunometrické analýzy a sérové hladiny C-peptidu byly měřeny radioimmunometricky (Immunotech IRMA, Marseilles, Francie). Celkový cholesterol (Merckotest, CHOD-PAP-Metoda), cholesterol s vysokou denzitou (HDL, Merck System Cholesterol, CHOD-PAP-Metoda) a koncentrace triglyceridů (Merck System, GPO-PAP-Metoda) byly v séru měřeny pomocí analyzátoru Merck (Vitalab Eclipse). Hladina cholesterolu s nízkou denzitou (LDL)

byla vypočtena jako: $LDL = \text{celkový cholesterol} - (TG/2,2) - HDL$. U všech subjektů byl proveden tříhodinový orální glukózový toleranční test (oGTT) s glukózovou náloží v dávce 75 g.

Analýza steroidních hormonů

Sérový testosteron byl stanoven standardní radio-imuno analýzou (RIA) s použitím antisérového anti-testosteron-3-karboxymethyloximu: BSA a testosteron-3-karboxymethyloxim-tyrosylmethyl-ester- ^{125}I jako značka. Intra-analýzový koeficient byl 7,2 % a inter-analýzový koeficient činil 10 %, senzitivita byla 0,21 nmol/l. Androstendion byl stanoven pomocí standardní RIA s antisérovým anti-androstendion-6-karboxymethyloximem: BSA a 3H androstendion jako značka. Intra-analýzový koeficient činil 8,1 % a inter-analýzový 10,2 %, senzitivita byla 0,39 nmol/l. Vazebný globulin pro pohlavní hormony (SHBG) byl stanoven pomocí IRMA kitu (Orion, Espoo, Finsko). Ke stanovení LH, FSH (IRMA kit), 17-hydroxyprogesteronu, DHEA a DHEAS (RIA kit) byly použity komerční kity (Immunotech, Marseilles, Francie). DHT byl stanoven originální metodologií (Hampl et al., 1990). 17-hydroxy-5-pregnenolon byl stanoven pomocí metody RIA.

Analýza statistických dat

Původní data vykazovala většinou negaussovské rozdělení a nekonstantní rozptyl. Pro přiblížení distribuce dat normálnímu rozdělení a k dosažení homoscedasticity byla původní data před dalším zpracováním transformována Box-Cox transformací. Optimální transformační parametr byl nalezen s použitím statistického softwaru Statgraphics Centurion, verze XVI ze Statpoint Inc. (Herndon, Virginia, USA).

S využitím vícerozměrné regrese s redukcí dimenzionality metodou obousměrných ortogonálních projekcí do latentní struktury (O2PLS) byla provedena simultánní analýza vztahů mezi antropometrickými údaji a metabolickými parametry na jedné straně (matice **X**) a steroidními hormony a k nim vztaženými sloučeninami na straně druhé (matice **Y**) a byly hodnoceny prediktivní hodnoty individuálních proměnných a byl objasněn jejich vztah k získaným údajům. Metoda O2PLS umožňuje predikci proměnných tvořících matici **Y** z proměnných matice **X** a naopak (Trygg, 2002). Prediktivita individuálních proměnných pro model může být vyjádřena jako vztah dané proměnné s prediktivní komponentou společnou pro **X** i **Y**. Prediktivní komponenta zahrnuje variabilitu sdílenou mezi **X** a **Y**, přičemž tato sdílená variabilita je oddělena od variability ortogonálních komponent vysvětlujících variabilitu sdílenou uvnitř matice **X** či **Y**. Vysvětlení těchto posledně jmenovaných variabilit však není z hlediska interpretace modelu O2PLS zajímavé, neboť v těchto případech lze použít analýzu hlavních komponent, či faktorovou analýzu.

Transformovaná data byla podrobena analýze O2PLS, která je robustní multikolinearitě uvnitř matic závisle i nezávisle proměnných. Na rozdíl od regrese bez redukce dimenzionality, který není k multikolinearitě robustní, se zvyšujícím se stupněm multikolinearity roste u modelu s redukcí dimenzionality, jako je OPLS, prediktivita modelu. Metoda O2PLS umožnila nalezení proměnných s vysokou prediktivní hodnotou pro popis vztahu mezi **X** a **Y** a umožnila i nalezení struktury těchto vztahů.

Model O2PLS lze vyjádřit následovně:

$$\mathbf{X} = \mathbf{T}_p \mathbf{P}_p^T + \mathbf{T}_o \mathbf{P}_o^T + \mathbf{E}$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{U}_p \mathbf{Q}_p^T + \mathbf{U}_o \mathbf{Q}_o^T + \mathbf{F}$$

kde \mathbf{X} je matice s nezávisle proměnných s l proměnnými, \mathbf{Y} je matice závisle proměnných s m proměnnými. \mathbf{T}_p a \mathbf{T}_o představují matice komponentních skóru z prediktivních a ortogonálních komponent, v uvedeném pořadí, extrahovaných z \mathbf{X} . \mathbf{P}_p a \mathbf{P}_o představují matice komponentních vah pro prediktivní a ortogonální komponenty, v uvedeném pořadí, extrahovaných z \mathbf{X} . Podobně \mathbf{U}_p a \mathbf{U}_o představují matice komponentních skóru z prediktivních a ortogonálních komponent, v uvedeném pořadí, extrahovaných z \mathbf{Y} a \mathbf{Q}_p a \mathbf{Q}_o představují matice komponentních vah z prediktivních a ortogonálních komponent, v uvedeném pořadí, extrahovaných z \mathbf{Y} . \mathbf{E} a \mathbf{F} jsou chybové matice.

Relevanci individuálních proměnných pro O2PLS model byla testována s použitím kritéria *VIP* (variable importance). Do modelu byly zahrnuty pouze proměnné, které měly statisticky významné *VIP* pro první a/nebo druhou prediktivní komponentu. Kritérium uváděné jako predikovaná reziduální suma čtverců odchylek (Prediction Error Sum of Squares, PRESS), bylo použito pro testování relevance prediktivních komponent, tj. je zjištění počtu relevantních prediktivních komponent.

K analýze dat byl použit statistický software SIMCA-P+ Verze 12.0.0.0 z Umetrics (Umeå, Švédsko).

Tento software nám, kromě zjištění počtu relevantních komponent, umožnil i detekci vícerozměrných nehomogenit a ověření vícerozměrného normálního rozdělení a homoscedasticity v (transformovaných) datech (Trygg et al., 2007).

3. část studie: rozdíl mezi vlivem DHT a jeho metabolitů

Ve třetí části studie jsme provedli náhodný výběr z celé skupiny 232 vzorků asi 10% sér pro stanovení metabolitů DHT. Vybrali jsme skupinu 25 mužů s věkovým průměrem 33,5 roku a průměrným BMI 23,6, u kterých jsme stanovili nejen metabolity DHT ale prakticky celé steroidní spektrum pomocí plynové chromatografie hmotnostní spektrometrie (GC-MS).

K měření koncentrací steroidů po derivatizaci byl použit systém GCMS-QP2010 Plus od firmy Shimadzu (Kjóto, Japonsko) skládající se z plynového chromatografu vybaveného automatickou kontrolou průtoku, autosamplerm AOC-20s a samostatným kvadrupólovým detektorem (single quadrupole detector) a iontovým zdrojem s volitelným napětím v rozmezí 10–195 V. K analýze byla použita středně polární kapilární kolona RESTEK Rxi (průměr 0,25 mm, délka 15 m, tloušťka filmu 0,1 μm).

Měření probíhalo na základě ionizace dopadem elektronů s napětím iontového zdroje nastaveným na 70 V a s emisním proudem 160 μA . Teplota injekčního portu, zdroj iontů a rozhraní bylo udržováno na teplotě 220 $^{\circ}\text{C}$, 300 $^{\circ}\text{C}$ a 310 $^{\circ}\text{C}$ v daném pořadí. Analýzy byly provedeny v módu selected ion monitoring s konstantní lineární rychlostí transportního plynu (He), udržovanou na 60 cm/s.

Průtok oplachu septa byl nastaven na 3 ml/min. Vzorky byly vstříkovány pomocí vysokotlakého módu, kdy byl tlak při vstřiku a po něm byl udržován po dobu 1 minuty na úrovni 200 kPa. Napětí detektoru (elektronásobiče) bylo nastaveno na úrovni 1,4 kV.

V séru byly pomocí metody GC-MS měřeny následující steroidy:

- Δ^5 steroidy – pregnenolon, dehydroepiandrosteron (DHEA) a androstendiol včetně odpovídajících polárních konjugátů,
- Δ^4 steroidy – progesteron, androstendion, testosteron,
- $5\alpha/\beta$ -redukované-20-oxo-metabolity progesteronu tj. allopregnanolon, isopregnanolon, pregnanolon, epipregnanolon,
- 20α -hydroxy-metabolity Preg – 20α -dihydropregnenolon odpovídají polární konjugát,
- $5\alpha/\beta$ -redukované- 20α -hydroxy-metabolity progesteronu – 5α -pregnan- $3\alpha,20\alpha$ -diol, 5α -pregnan- $3\beta,20\alpha$ -diol, 5β -pregnan- $3\alpha,20\alpha$ -diol, 5β -pregnan- $3\beta,20\alpha$ -diol, včetně odpovídajících polárních konjugátů

- C19 5 α / β -redukované-17-oxo-steroidy – androsteron, etiocholanolon a také jejich odpovídající polární konjugáty a polární konjugáty epiandrosteronu,
- polární konjugáty C19 5 α / β -redukovaných-17 β -hydroxy-steroidů – 5 α -androstan-3 α ,17 β -diolu, 5 α -androstan-3 β ,17 β -diolu, 5 β -androstan-3 α ,17 β -diolu a 5 β -androstan-3 β ,17 β -diolu,
- 7 α / β -hydroxy-metabolity DHEA a androstendiolu –7 α -hydroxy-DHEA, 7 β -hydroxy-DHEA, 5-androsten-3 β ,7 α ,17 β -triol, 5-androsten-3 β ,7 β ,17 β -triol, stejně jako jejich odpovídající polární konjugáty,
- 16 α -hydroxy-metabolity Δ^5 steroidů – 16 α -hydroxypregnenolon, 16 α -hydroxy-DHEA a také jejich odpovídající polární konjugáty

Příprava vzorků

Nekonjugované steroidy byly extrahovány z 1 ml krevní plazmy diethyléterem (3 ml). Diethyléterový extrakt byl odpařen v termobloku při 37 °C. Lipidy v odparku po diethyléterové extrakci byly odděleny extrakcí mezi směsí metanolu a vody v poměru 4 : 1 (1 ml) a pentanu (1 ml), přičemž pentanová fáze obsahující lipidy byla zlikvidována a polární fáze se steroidy byla odpařena ve vakuové centrifuze při 60°C (po dobu 2 hodin).

Odparek polární fáze byl derivatizován nejprve roztokem methoxylamin-hydrochloridu v pyridinu (2 %), kdy byly obsazeny oxo-skupiny (inkubace při 60 °C, 1 hodina). Směs vzniklá po první derivatizaci byla odpařena v proudu dusíku a vzniklý odparek byl dále derivatizován pomocí reagentie Sylon B (99% bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamid a 1% trimethylchlorosilan) za vzniku trimethylsilyl-derivátů na hydroxy-skupinách steroidů (TMS-MOX deriváty), (inkubace při 90 °C, 1 hodina). Směs vzniklá při druhé derivatizaci byla odpařena v proudu dusíku a odparek byl rozpuštěn ve 20 μ l izooktanu přičemž pro GC-MS analýzu byl použit 1 μ l roztoku.

Steroidní konjugáty, které zůstaly v rafinátech (vodných fázích) po extrakci diethyléterem, byly analyzovány následovně: Rafináty byly odpařeny ve vakuové centrifuze (při 37 °C po dobu 5 hodin) a odparky byla hydrolyzovány podle Dehennina (Dehennin et al., 1996). Hydrolyzované vzorky byly znovu odpařeny ve vakuové centrifuze (při 37 °C po dobu 5 hodin).

Odparky pak byly rekonstituovány v 1 ml chromatografické vody a následně analyzovány stejným postupem jako v případě volných steroidů. Na rozdíl od přípravy vzorku volného steroidu byl však odparek po druhé derivatizaci rozpuštěn ve 200 μ l izooktanu namísto 20 μ l izooktanu. Před dalším zpracováním byly k původním vzorkům i vodným fázím po hydrolýze a extrakci diethyleterem přidán 17α -estradiol jako vnitřní standard.

Odezva vnitřního standardu byla zaznamenávána na efektivních hmotnostech $m/z = 231, 285$ a 416 . Přidání vnitřního standardu k tělní tekutině před přípravou vzorku (volné steroidy) a k polární fázi po extrakci diethyleterem (konjugované steroidy) zohlednilo vliv ztrát vznikajících během zpracování vzorku a ty pak neovlivňovaly vlastní kvantifikaci steroidů. Nicméně zkoumali jsme rovněž extrakční účinnost diethyleterové extrakce, stejně jako účinnost rozdělení odparku po diethyleterové extrakci mezi směs metanolu a vody a pentanu.

V prvním případě se extrakční účinnost pohybovala mezi $75,6 \%$ a $96,2 \%$, s lepšími parametry pro méně polarizované steroidy. Pro rozdělení odparku po diethyleterové extrakci mezi směs metanolu a vody a pentanu byla extrakční účinnost nejnižší pro málo polární izomery pregnanolonu, jako je pregnanolon ($76,3 \%$), a naopak dosahovala téměř 100% v případě steroidů s vyšší polaritou než u progesteronu, u kterého byla účinnost extrakce $99,6 \%$.

Ačkoli je přidání odpovídajícího steroidního konjugátu jako vnitřního standardu k původnímu vzorku správnější než přidání nekonjugovaného standardu do vodné fáze po extrakci volných steroidů diethyleterem, nenašli jsme žádný odpovídající a komerčně dostupný steroidní konjugát, který by dosahoval zanedbatelných hladin v lidském krevním oběhu.

Nicméně účinnost hydrolýzy v několika komerčně dostupných steroidních konjugátech byla ověřena porovnáním známých množství nekonjugovaných steroidů (1 ng) po extrakci diethyleterem s ekvimolárním množstvím příslušných sulfátů po hydrolýze a extrakci volných steroidů diethyleterem. Testovali jsme účinnost hydrolýzy v 10 paralelních měřeních a naměřili jsme hodnoty $98,4 \pm 1,8 \%$, $89,8 \pm 1,3 \%$, $82 \pm 1,5 \%$, $93,7 \pm 1,7 \%$, $91,8 \pm 1,9 \%$, $77,4 \pm 1,5 \%$, $79,6 \pm 2,3 \%$, $92,5 \pm 2,8 \%$, $84 \pm 2,2 \%$, $66,8 \pm 2 \%$ a $72,4 \pm 2 \%$ (průměr \pm SEM) pro sulfáty androsteronu, etiocholanolonu, epiandrosteronu, 17-hydroxypregnenolonu, dehydroepiandrosteronu, pregnenolonu, epipregnanolonu, allopregnanolonu, pregnanolonu a isopregnanolonu, v uvedeném pořadí.

Tyto hodnoty ukazují, že odhady pro steroidní konjugáty s použitím hydrolýzy navržené (Dehenninem et al. 1996) ve většině případů dobře odrážejí aktuální hladiny konjugovaných steroidů v krevním oběhu. I když by bylo vhodné použít získané hodnoty ke korekci našich výsledků pro steroidní polární konjugáty, sulfáty byly komerčně dostupné pouze pro menšinu zkoumaných steroidů. Z toho důvodu jsme tyto korekční faktory nepoužili. Ztráty steroidů nezávislé na odpovídajícím kroku hydrolýzy pak byly pokryty přidáním vnitřního standardu do rafinátu (vodné fáze) po extrakci nekonjugovaných steroidů (obsahující steroidní konjugáty) diethyleterem před hydrolýzou a dalším zpracováním rafinátu.

Teplotní a tlakové gradienty pro GC-MS analýzu trimethylsilyl-derivátů a retenční časy steroidů

Abychom účinně využili biologický materiál, jednotlivé vzorky byly použity v nezávislých zpracováních, pokaždé s uplatněním části vyšetřovaných steroidů. Volba steroidů měřených v individuálních zpracováních, teplotní a tlakové gradienty a volba efektivních hmotností použitých pro měření v módu selected ion monitoring (SIM) byly kompletně optimalizovány, aby bylo dosaženo minimálního limitu detekce (LOD) při dostatečné selektivitě.

Použitý teplotní gradient pro první, třetí a čtvrtý běh (G1, G3, G4): 1 min prodleva při 80 °C, zvýšení na 190 °C (40 °C/min), zvýšení na 210 °C (4 °C/min), zvýšení na 300 °C (20 °C/min), 5 min prodleva při 300 °C, počáteční tlak 34 kPa, teplota injektoru 220 °C, délka trvání analýzy 18,25 min.

Gradient použitý pro 2. běh (G2): zvýšení z 80 °C na 190 °C (40 °C/min), zvýšení na 205 °C (1,6 °C/min), zvýšení na 300 °C (40 °C/min), 5 minut prodleva při 300 °C, iniciační tlak 34 kPa, teplota injektoru 240 °C, délka trvání analýzy 19,5 min.

Gradient použitý pro 5. běh (G5): 1 min prodleva při 80 °C, zvýšení na 170 °C (40 °C/min), zvýšení na 180 °C (1 °C/min), zvýšení na 300 °C (40 °C/min), 5 minut prodleva při 300 °C, iniciační tlak 34 kPa, teplota injektoru 220 °C, délka trvání analýzy 21,5 min.

Gradient použitý pro 6. běh (G6): 1 minuta prodleva při 80 °C, zvýšení na 200 °C (40 °C/min), zvýšení na 240 °C (8 °C/min), zvýšení na 300 °C (40 °C/min), 5 minut prodleva při 300 °C, iniciační tlak 34 kPa, teplota injektoru 220 °C, délka trvání analýzy 15,5 min.

Efektivní hmotnosti, retenční časy chromatografických maxim, číslo sekvence pro skupiny steroidů a gradienty použité při kvantifikaci individuálních steroidů a validace jsou uvedeny v publikaci (Hill et al., 2010).

Statistická analýza dat

O2PLS byl použit pro statistické zpracování. Původní data vykazovala většinou negaussovské rozdělení a nekonstantní rozptyl. Pro přiblížení distribuce dat normálnímu rozdělení a k dosažení homoscedasticity byla původní data data před dalším zpracováním transformována Box-Cox transformací. Optimální transformační parametr byl nalazen s použitím statistického softwaru Statgraphics Centurion, verze XVI ze Statpoint Inc. (Herndon, Virginia, USA).

S využitím vícerozměrné regrese s redukcí dimenzionality metodou obousměrných ortogonálních projekcí do latentní struktury (O2PLS) byla provedena simultánní analýza vztahů mezi antropometrickými údaji a metabolickými parametry na jedné straně (matice \mathbf{X}) a steroidními hormony a k nim vztaženými sloučeninami na straně druhé (matice \mathbf{Y}) a byly hodnoceny prediktivní hodnoty individuálních proměnných a byl objasněn jejich vztah k získaným údajům. Metoda O2PLS umožňuje predikci proměnných tvořících matici \mathbf{Y} z proměnných matice \mathbf{X} a naopak (Trygg, 2002). Prediktivita individuálních proměnných pro model může být vyjádřena jako vztah dané proměnné s prediktivní komponentou společnou pro \mathbf{X} i \mathbf{Y} . Prediktivní komponenta zahrnuje variabilitu sdílenou mezi \mathbf{X} a \mathbf{Y} , přičemž tato sdílená variabilita je oddělena od variability ortogonálních komponent vysvětlujících variabilitu sdílenou uvnitř matice \mathbf{X} či \mathbf{Y} . Vysvětlení těchto posledně jmenovaných variabilit však není z hlediska interpretace modelu O2PLS zajímavé, neboť v těchto případech lze použít analýzu hlavních komponent, či faktorovou analýzu.

Transformovaná data byla podrobena analýze O2PLS, která je robustní multikolinearitě uvnitř matic závisle i nezávisle proměnných. Na rozdíl od regrese bez redukce dimenzionality, který není k multikolinearitě robustní, se zvyšujícím se stupněm multikolinearity roste u modelu s redukcí dimenzionality, jako je OPLS, prediktivita modelu. Metoda O2PLS umožnila nalezení proměnných s vysokou prediktivní hodnotou pro popis vztahu mezi \mathbf{X} a \mathbf{Y} a umožnila i nalezení struktury těchto vztahů.

Model O2PLS lze vyjádřit následovně:

$$\mathbf{X} = \mathbf{T}_p \mathbf{P}_p^T + \mathbf{T}_o \mathbf{P}_o^T + \mathbf{E}$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{U}_p \mathbf{Q}_p^T + \mathbf{U}_o \mathbf{Q}_o^T + \mathbf{F}$$

kde \mathbf{X} je matice s nezávisle proměnných s l proměnnými, \mathbf{Y} je matice závisle proměnných s m proměnnými. \mathbf{T}_p a \mathbf{T}_o představují matice komponentních skóru z prediktivních a ortogonálních komponent, v uvedeném pořadí, extrahovaných z \mathbf{X} . \mathbf{P}_p , a \mathbf{P}_o představují matice komponentních vah pro prediktivní a ortogonální komponenty, v uvedeném pořadí, extrahovaných z \mathbf{X} . Podobně \mathbf{U}_p a \mathbf{U}_o představují matice komponentních skóru z prediktivních a ortogonálních komponent, v uvedeném pořadí, extrahovaných z \mathbf{Y} a \mathbf{Q}_p , a \mathbf{Q}_o představují matice komponentních vah z prediktivních a ortogonálních komponent, v uvedeném pořadí, extrahovaných z \mathbf{Y} . \mathbf{E} a \mathbf{F} jsou chybové matice.

Relevanci individuálních proměnných pro O2PLS model byla testována s použitím kritéria *VIP* (variable importance). Do modelu byly zahrnuty pouze proměnné, které měly statisticky významné *VIP* pro první a/nebo druhou prediktivní komponentu. Kritérium uváděné jako predikovaná reziduální suma čtverců odchylek (Prediction Error Sum of Squares, PRESS), bylo použito pro testování relevance prediktivních komponent, tj. ke zjištění počtu relevantních prediktivních komponent.

K analýze dat byl použit statistický software SIMCA-P+ Verze 12.0.0.0 z Umetrics (Umeå, Švédsko).

Tento software nám, kromě zjištění počtu relevantních komponent, umožnil i detekci vícerozměrných nehomogenit a ověření vícerozměrného normálního rozdělení a homoscedasticity v (transformovaných) datech (Trygg et al., 2007).

4. část studie: změny steroidogeneze u obézních

Analýzou poměrů mezi steroidy vyšetřenými ve druhé části studie (dihydrotestosteron, testosteron, 17 α -hydroxy-progesteron, dehydroepiandrosteron, dehydroepiandrosteron sulfát, 4-androsten-3,17-dion, 17 α -hydroxy-pregnenolon) jsme sledovali změny enzymů. Porovnávali jsme vždy prekurzor a produkt. Vyšetřované muže jsme rozdělili do tří skupin podle BMI. První skupinu tvořili muži s BMI do 25, ve druhé skupině byli muži s BMI 25-30. Ve třetí skupině pak byli muži s BMI nad 30.

Analýza statistických dat

K objasnění vztahu mezi sledovanými parametry a BMI jsme použili model ANCOVA se skupinou BMI jako hlavním faktorem s adjustací na věk subjektů (kovariát) následovanou vícenásobným porovnáváním metodou nejmenšího významného rozdílu (least significant difference (LSD) multiple comparisons).

Původní závislé proměnné a kovariáty byly transformovány mocninnou transformací pro přiblížení dat a reziduí konstantnímu rozptylu a symetrické distribuci (Meloun et al., 2000). Výpočty byly provedeny pomocí statistického softwaru Statgraphic Centurion verze XVI (Herndon, VA, USA). Homogenita dat a reziduí byla zkontrolována metodikou uvedenou v literatuře (Meloun et al., 2002, Meloun et al., 2004).

VII. Výsledky

1. část studie: sledování změn v průběhu života

Závislost DHT a T na věku

V první části studie jsme sledovali věkovou závislost volného T a volného DHT, tato práce je pokračováním studie z naší laboratoře o hladinách celkových androgenů a jejich změnách s věkem. Tato data zde uvádím, protože studie o volných steroidech na ně přímo navazuje.

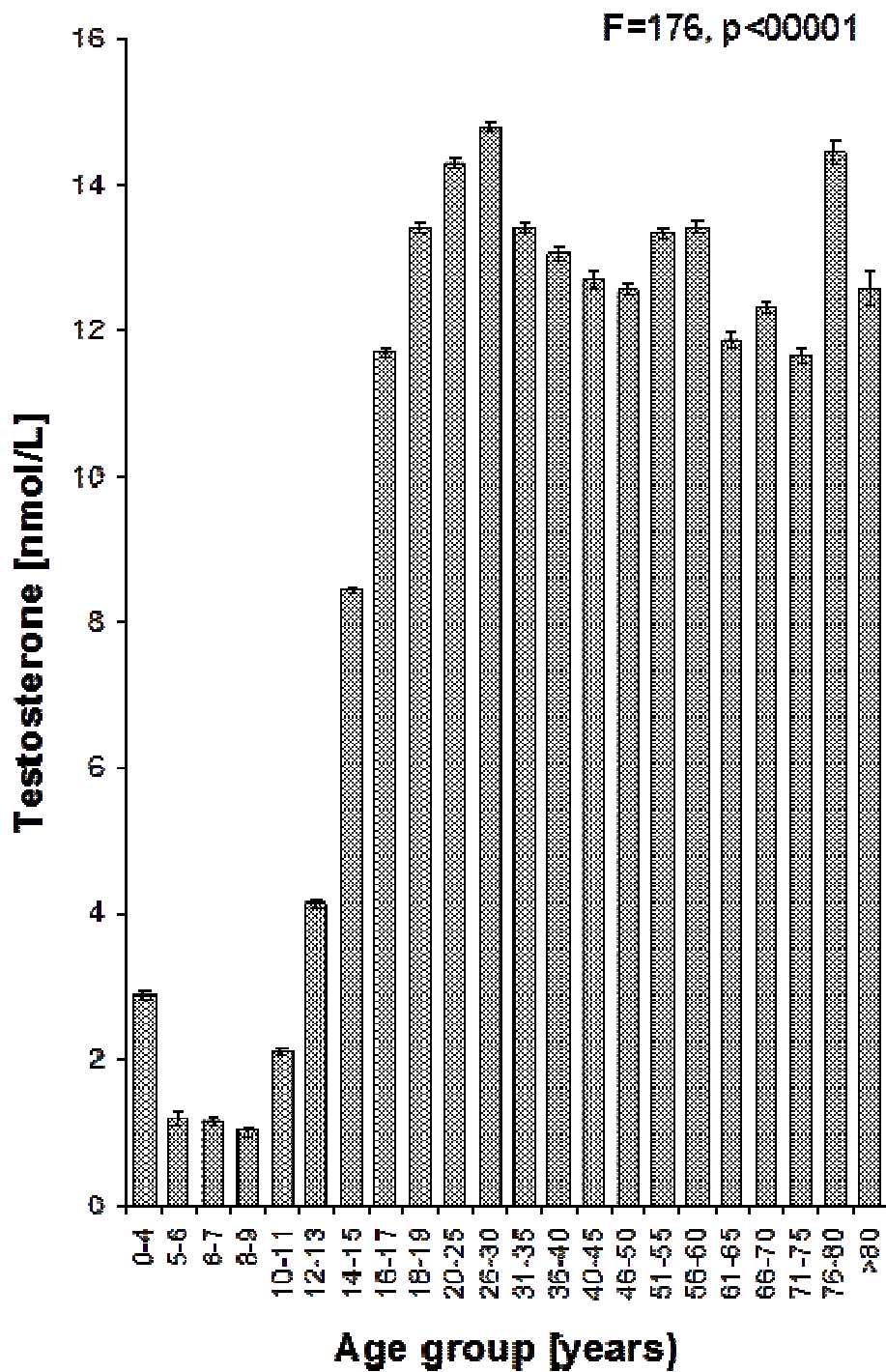
Graf závislosti koncentrací testosteronu a dihydrotestosteronu na věku je znázorněn na obr.2 a 3 a graf závislosti poměru DHT k testosteronu na obr.4. Poměr obou steroidů zůstal v průběhu života konstantní.

Změny v hladině testosteronu ve spojitosti s věkem jsou obecně ve shodě s ostatními daty poklesu testosteronu s věkem (Elmlinger et al., 2003, Li et al., 2005).

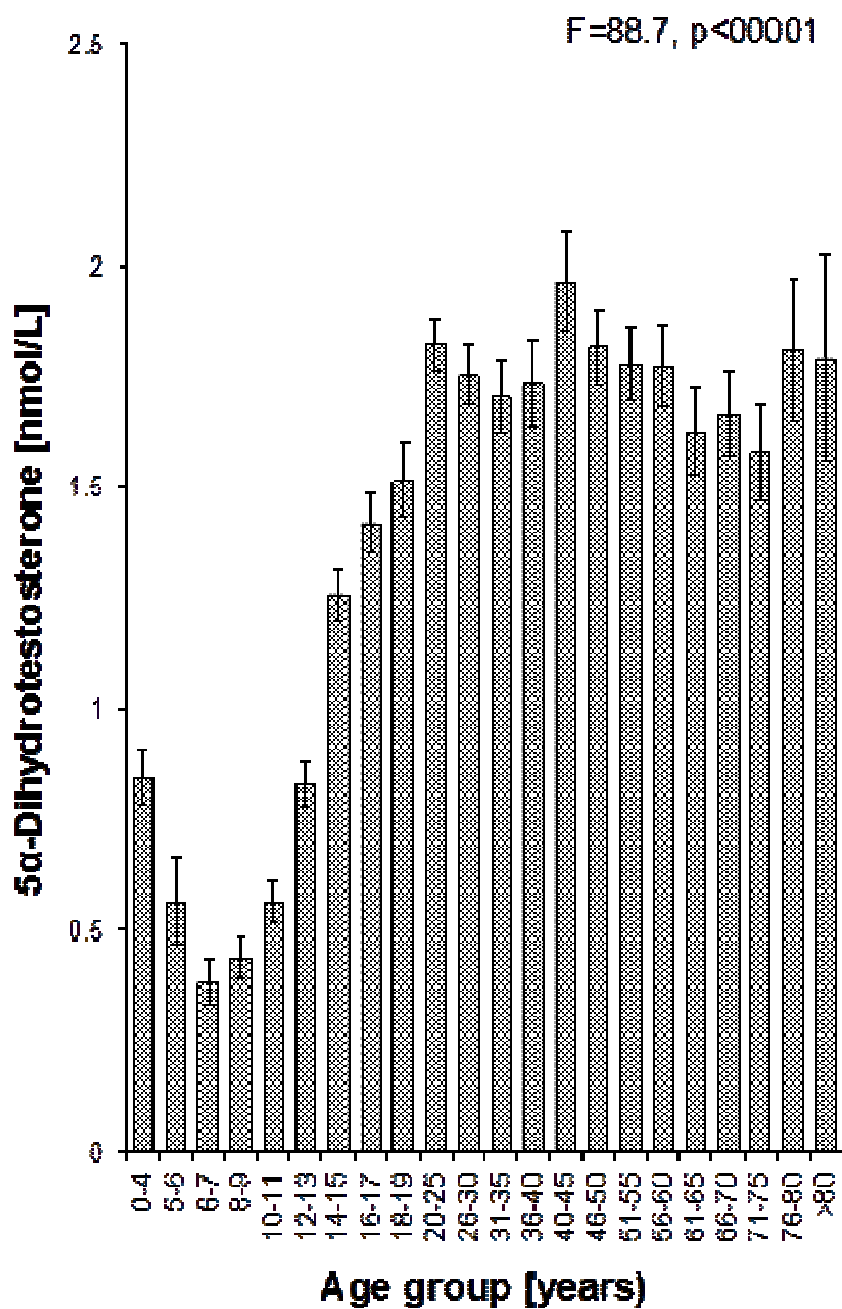
Ve věkové skupině 45 – 50 let a 50 – 55 let byl zjištěn mírný, nicméně statisticky významný vzestup hladin testosteronu, tj. ve věku rozvoje andropauzy. Další autoři také popsali podobný vzestup sérových hladin testosteronu v analogické věkové skupině (Anderson et al., 2007). DHT vykázal podobný trend, s méně výrazným vzestupem před andropauzou. Křivka poměru DHT a testosteronu ukázala vyšší hodnoty, tj. převládání DHT nad testosteronem v dětství, ale prakticky konstantní průběh od dospělosti do senia. Nicméně u nejstarších subjektů křivka ukázala pokles, který byl pozorován ve vybrané populaci se známkami dlouhověkosti (Stárka et al., 2008).

Závislost volného DHT a T na věku

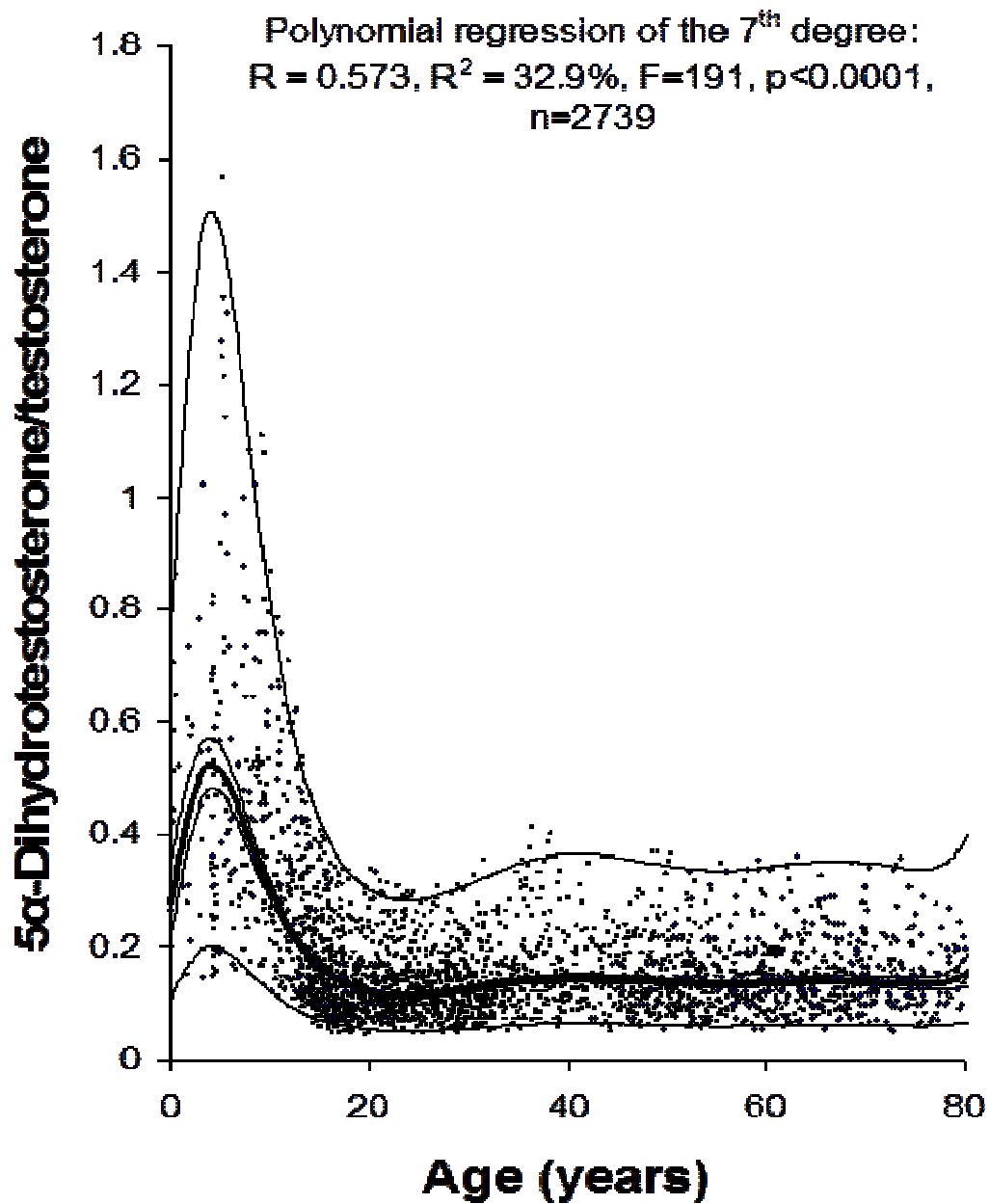
Průběhy volného DHT a volného T jsou ukázány na obrázku 5 a 6. Poměr volného DHT k volnému T je na obrázku 7. Volný DHT má stejný průběh jako volný T, jejich poměr zůstává konstantní od puberty. V dětství převládá aktivita volného DHT.



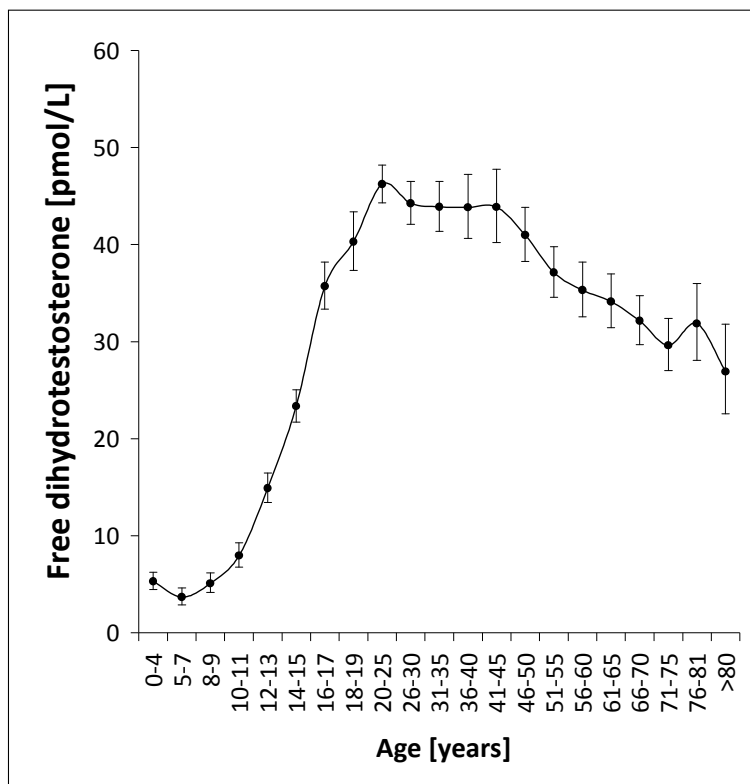
Obr. 2 Graf závislosti sérových koncentrací testosteronu na délce dožití českých mužů.
(zdroj: Stárka et al., 2008)



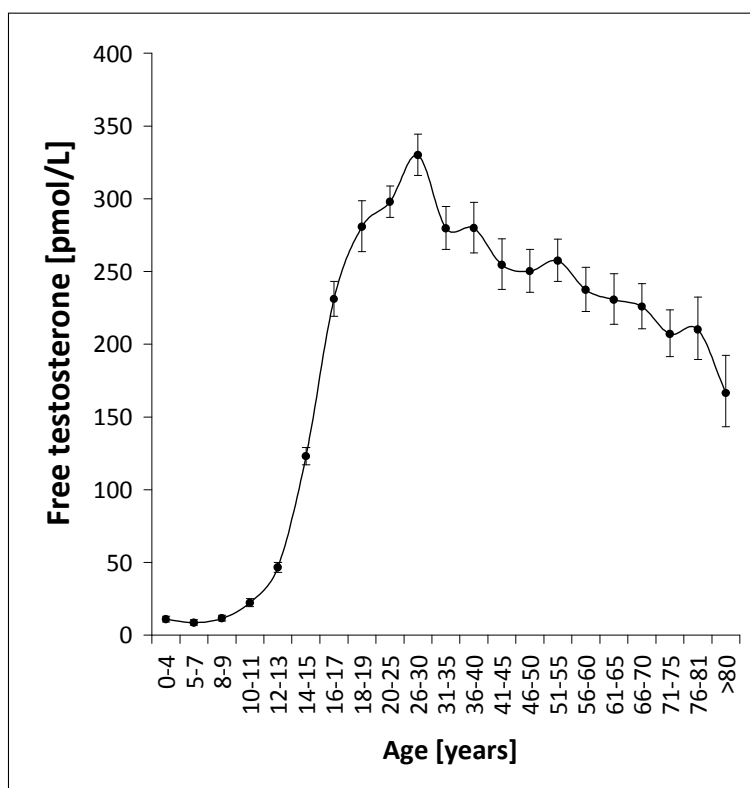
Obr.3 Graf závislosti sérových koncentrací dihydrotestosteronu na délce dožití českých mužů (zdroj: Stárka et al., 2008).



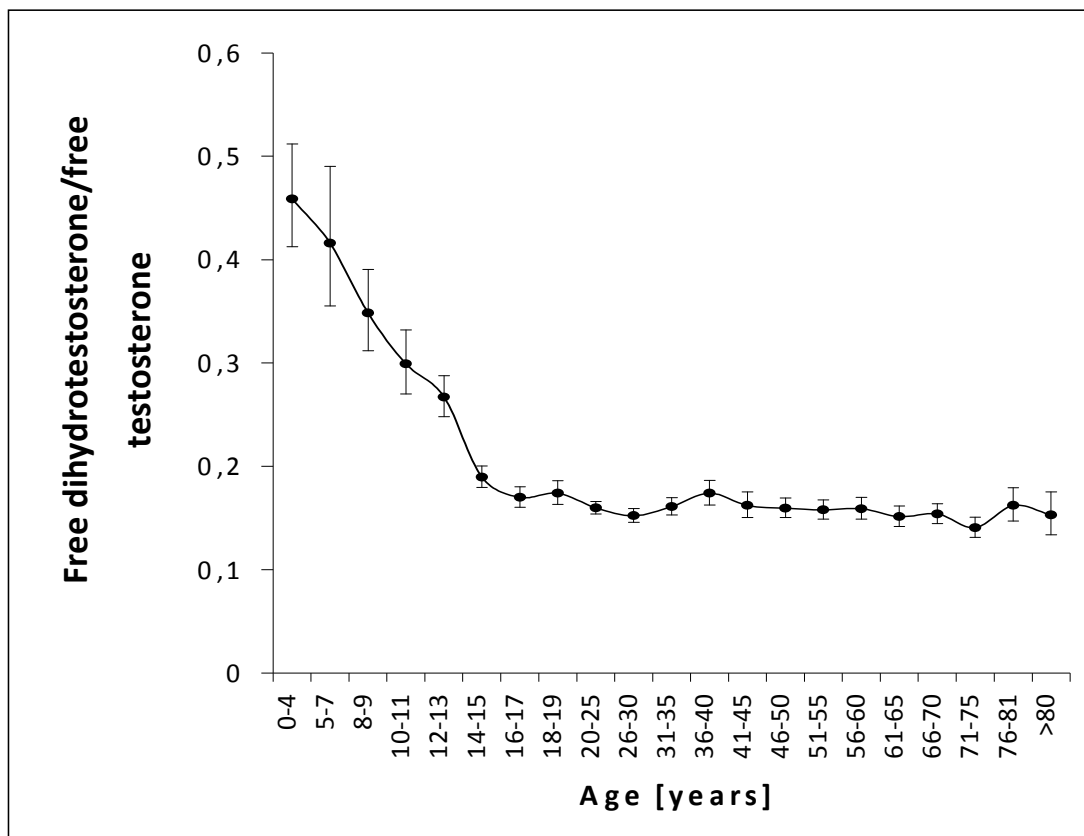
Obr.4 Graf závislosti poměru DHT/testosteron na věku u 3076 mužů (zdroj: Stárka et al., 2008).



Obr. 5 Graf průběhu volného DHT v závislosti na věku.



Obr. 6 Graf průběhu volného T v závislosti na věku.



Obr. 7 Graf poměru volného DHT k volnému T v závislosti na věku.

2. část studie: zkoumání rozdílu mezi vlivem T a DHT

V naší studii jsme ověřili úzký vztah mezi dihydrotestosteronem a testosteronem týkající se účinku na tělesné složení a hlavní metabolické parametry. Porovnáním hladin hormonů a antropometrických parametrů jsme zjistili negativní korelaci obou androgenů s věkem, hmotností, kožními řasami, obvodem pasu, boků a poměrem pasu a boků. (obr. 8)

Vícečetná regresní analýza ukázala korelaci steroidních hormonů s jednoduchou proměnnou (tabulky 2 – 4). Vztah steroidů ke složení hmoty těla, BMI, tukové hmotě, kostní hmotě a svalové hmotě je vyznačen v tabulce 2, vztah k parametrům metabolismu glukózy – glukóze nalačno, C-peptidu nalačno, inzulínu nalačno - v tabulce 3 a vztah ke složení lipidů, jako je celkový cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol a triglyceridy, v tabulce 4.

Pozitivní korelace kostní hmoty a svalové hmoty na jedné straně s hladinami T, DHT a SHBG a negativní korelace androgenního spektra s BMI a tukovou hmotou byly prokázány podle očekávání.

Hladiny inzulínu a C-peptidu byly negativně spjaty jak s testosteronem, tak s dihydrotestosteronem, ale koncentrace glukózy měla pouze slabý negativní vztah k dihydrotestosteronu. Byla prokázána negativní korelace celkového cholesterolu, LDL cholesterolu a triglyceridů s oběma androgeny. HDL cholesterol koreloval pozitivně. (obr. 8)

Regresní koeficienty testosteronu a dihydrotestosteronu ve vztahu k dalším proměnným jsou velmi podobné kromě koeficientů T a DHT pro tukovou hmotu (Tabulka 2) a HDL- a LDL-cholesterol (tabulka 4). Zdá se, že testosteron ovlivňuje tyto parametry účinněji než dihydrotestosteron.

Souhrnně jsou účinky testosteronu a dihydrotestosteronu na antropometrická data, kontrolu glukózy a lipidové spektrum kvalitativně stejné.

Sledovali jsme také poměr DHT/T u štíhlých a obézních mužů. Tento poměr byl konstantní a neměnil se s BMI.

Multivariační regresní analýza odhaluje vzájemné vztahy mezi zkoumanými složkami celku. První klíčová složka celku (tabulka 5) ukazuje, že androgeny a jejich prekurzory jsou v negativním vztahu k parametrům metabolického syndromu. V souvislosti s tímto zjištěním je

FSH k metabolickému syndromu v pozitivním vztahu. Navíc je zde pozitivní korelace mezi SHBG a parametry metabolického syndromu. 17-hydroxy-progesteron (Prog17) překvapivě vykazuje jak nejvyšší vazbu komponenty na první prediktivní komponentu, tak poměr komponenty k 95 % intervalu spolehlivosti. Zatímco první sloupec tabulky 5 (vazba komponent k prediktivním komponentám vyjádřeným jako regresní koeficienty) představuje vliv proměnné, parametr poměru regresního koeficientu k jeho 95 % intervalu spolehlivosti (v následujícím sloupci 2 v tabulce 5) demonstruje statistickou významnost vazby komponenty na proměnnou.

Nejvýznamnější parametr z matice X je obvod pasu; nicméně nejsignifikantnější je kožní řasa c1 (obličejová kožní řasa), pravděpodobně kvůli větší interindividuální variabilitě obvodu pasu. Obecně vykazují aktivní androgeny (T, DHT) nižší význam ve srovnání se steroidy primárně adrenálního původu (Prog17, Preg17 a DHEA).

Za normálních, fyziologických okolností s neovlivňovanými (nemanipulovanými) hladinami androgenů jsme zjistili negativní korelaci mezi hmotností, kožními řasami, obvodem pasu, obvodem boků, poměrem pas-boky, BMI, celkovým cholesterolem, LDL-cholesterolem a inzulinovou rezistencí na jedné straně a hladinami testosteronu a dihydrotestosteronu a SHBG na druhé straně. Alternativně jsme zjistili pozitivní korelaci mezi svalstvem a HDL-cholesterolem na jedné straně a hladinami DHT, T a SHBG na straně druhé. (obr.8)

Tabulka2.Vztah mezi hormony a tělesným složením na základě výsledku vícenásobné regrese^a odvozené z O2PLS modelu

Proměnná	Vyjádřená proměnná: BMI		Vyjádřená proměnná: Břicho		Vyjádřená proměnná: Boky		Vyjádřená proměnná: Pas		Vyjádřená proměnná: Kostí[%]		Vyjádřená proměnná: Svaly[%]		Vyjádř. proměnná: tuk[%]	
	Regresní koeficient	Regresní koeficient/95% CI	Regresní koeficient	Regresní koeficient/95% CI	Regresní koeficient	Regresní koeficient/95% CI	Regresní koeficient	Regresní koeficient/95% CI	Regresní koeficient	Regresní koeficient/95% CI	Regresní koeficient	Regresní koeficient/95% CI	Regresní koeficient	Regresní koeficient/95% CI
	Vyjádř.prom. = 27,2% (25,7%)		Vyjádř.prom. = 28,3% (26,9%)		Vyjádř.prom. = 20,3% (19,2%)		Vyjádř.prom. = 31,4% (29,9%)		Vyjádř.prom. = 22,9% (21,8%)		Vyjádř.prom. = 20,5% (19,2%)		Vyjádř.prom. = 27,2% (25,3%)	
DHT	-0,124 **	-2,19	-0,127 **	-2,23	-0,115 **	-2,17	-0,126 **	-2,17	0,113 **	2,13	0,125 **	2,64	-0,139 **	-2,89
T	-0,140 **	-3,38	-0,141 **	-3,79	-0,133 **	-5,75	-0,136 **	-3,52	0,137 **	4,12	0,155 **	4,22	-0,189 **	-3,79
Prog17	-0,155 **	-5,29	-0,162 **	-5,05	-0,140 **	-5,49	-0,164 **	-4,52	0,132 **	6,61	0,142 **	5,73	-0,139 **	-2,78
DHEA	-0,106 **	-3,84	-0,121 **	-4,25	-0,086 **	-3,46	-0,131 **	-4,21	0,062 **	2,64	0,055 *	1,40	0,005	0,09
A2	-0,053 *	-1,40	-0,062 **	-1,66	-0,042 *	-1,08	-0,068 **	-2,00	0,027	0,76	0,022	0,51	0,015	0,27
FSH	0,043 *	1,07	0,054 *	1,48	0,031	0,73	0,060 **	1,67	-0,015	-0,45	-0,007	-0,23	-0,038	-0,93
SHBG	-0,123 **	-2,41	-0,114 **	-2,55	-0,127 **	-3,19	-0,102 **	-2,19	0,147 **	2,57	0,177 **	3,45	-0,261 **	-6,60
Preg17	-0,099 **	-3,02	-0,111 **	-3,01	-0,083 **	-3,85	-0,118 **	-3,14	0,064 **	1,88	0,061 **	1,61	-0,018	-0,26

Zkratky: DHT dihydrotestosteron; T testosteron; Prog progesteron; A2 androstendion; DHEA dehydroepiandrosteron; Prog17 17-hydroxyprogesteron; Preg17 17-hydroxypregnenolon; c1-c14 kožní řasy; TKsyst systolický krevní tlak; TKdiast diastolický krevní tlak; gLORTTO glukóza na lačno; cpep0 C-peptid na lačno; IRI0 imunoreaktivní inzulín na lačno; TG triglyceridy; Chol celkový cholesterol; Glykop glykované proteiny

^aVztah za předpokladu konstantní hodnoty zbylých nezávisle proměnných

Tabulka 3. Vztah mezi hormony a metabolismem glukózy zjištěný s využitím vícenásobné regrese odvozené z O2PLS modelu

Proměnná	Vyjádřená proměnná: gIOTT0		Vyjádřená proměnná: cpep0		Vyjádřená proměnná: IRI0	
	Regresní koeficient	Regresní koeficient/95% CI	Regresní koeficient	Regresní koeficient/95% CI	Regresní koeficient	Regresní koeficient/95% CI
DHT	-0,046 *	-1,20	-0,108 **	-2,95	-0,078 **	-2,66
T	-0,019	-0,42	-0,126 **	-3,56	-0,105 **	-2,20
Prog 17	-0,091 *	-1,57	-0,129 **	-4,44	-0,080 **	-2,20
DHEA	-0,163 **	-4,85	-0,074 *	-1,22	-0,004	-0,07
A2	-0,095 **	-2,86	-0,035 *	-1,54	0,004	0,14
FSH	0,103 **	3,73	0,025	0,61	-0,016	-0,39
SHBG	0,078 *	1,28	-0,125 **	-2,32	-0,140 **	-2,55
Preg17	-0,131 **	-2,47	-0,072 **	-1,77	-0,015	-0,27

Zkratky: Jako v tabulce 1

^aVztah za předpokladu konstantní hodnoty zbylých nezávisle proměnných

Tabulka 4. Vztah mezi hormony a lipidovými markery zjištěný pomocí vícenásobné regrese odvozené z modelu O2PLS

Proměnná	Vyjádřená proměnná: TG		Vyjádřená proměnná: Chol		Vyjádřená proměnná: HDL		Vyjádřená proměnná: LDL	
	Regresní koeficient	Regresní koeficient/95% CI	Regresní koeficient	Regresní koeficient/95% CI	Regresní koeficient	Regresní koeficient/95% CI	Regresní koeficient	Regresní koeficient/95% CI
DHT	-0,077 **	-2,52	-0,084 **	-2,46	-0,087 **	-2,18	-0,088 **	-1,91
T	-0,112 **	-2,10	-0,108 **	-2,36	-0,098 **	-4,24	-0,097 **	-5,67
Prog17	-0,071 **	-1,61	-0,091 **	-2,94	-0,108 **	-4,05	-0,112 **	-3,87
DHEA	0,027	0,39	-0,021	-0,33	-0,073 *	-1,52	-0,083 **	-1,84
A2	0,024	0,58	-0,005	-0,15	-0,036 *	-1,34	-0,043 *	-1,53
FSH	-0,039	-0,79	-0,006	-0,13	0,030	0,80	0,037	0,98
SHBG	-0,170 **	-2,73	-0,133 **	-1,99	-0,087 **	-1,83	-0,079 *	-1,40
Preg17	0,009	0,14	-0,029	-0,51	-0,069 **	-1,79	-0,076 **	-2,26

Zkratky: Jako v tabulce 1

^aVztah za předpokladu konstantní hodnoty zbylých nezávisle proměnných

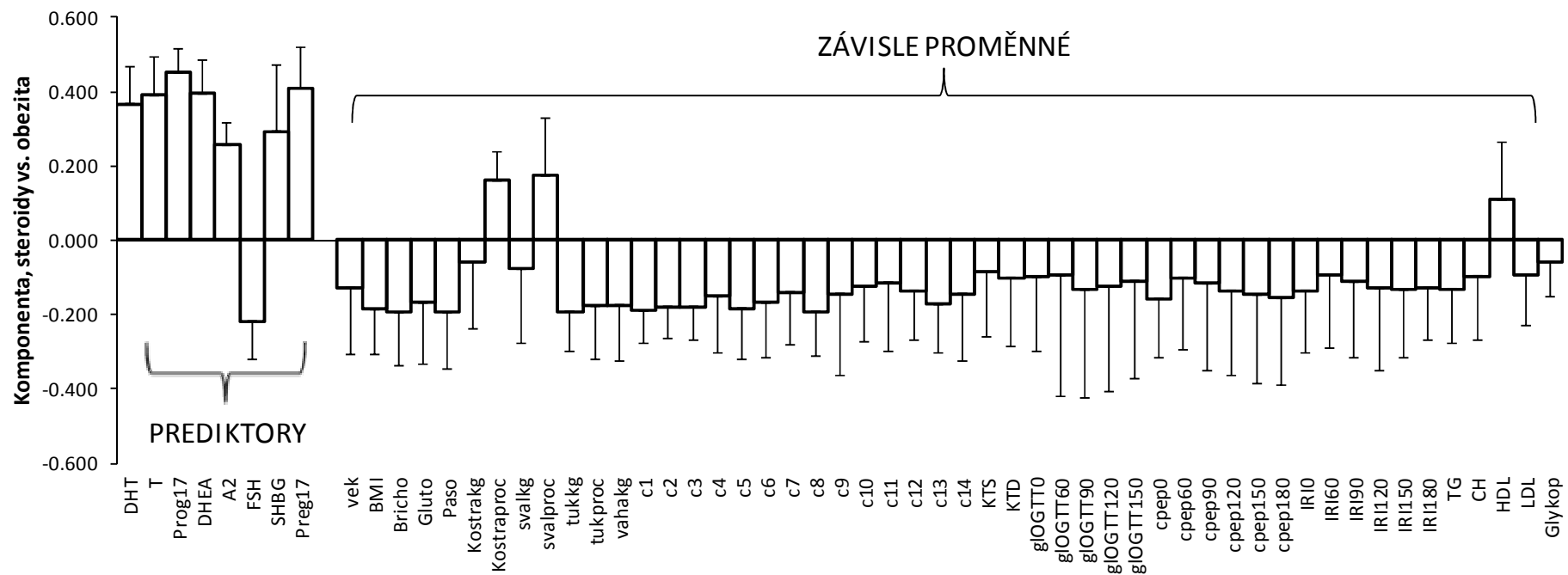
Tabulka 5. Vztahy mezi steroidy a souvisejícími hormony (matice **X**) a antropometrickými a metabolickými parametry (matice **Y**) vyjádřené jako komponentní váhy

		Prediktivní komponenta 1						Prediktivní komponenta 1			
		Vyjádřená proměnná = 14,5% (13,5%)						Vyjádřená proměnná = 14,5% (13,5%)			
Proměnná	Proměnná	Proměnná			R ^c	Proměnná	Proměnná			R ^c	
		Parametr ^a	Parametr /95% CI ^b				Parametr ^a	Parametr /95% CI ^b			
X	DHT	0,367	3,70	0,602	**	Y	c10	-0,124	-0,84	-0,283	
	T	0,391	3,83	0,641	**		c11	-0,115	-0,62	-0,195	
	Prog17	0,450	7,05	0,737	**		c12	-0,135	-1,01	-0,371 *	
	DHEA	0,395	4,47	0,643	**		c13	-0,172	-1,32	-0,504 *	
	A2	0,255	4,39	0,419	**		c14	-0,144	-0,79	-0,379	
	FSH	-0,218	-2,13	-0,356	**		BPS	-0,086	-0,50	-0,254	
	SHBG	0,294	1,66	0,481	**		BPD	-0,101	-0,55	-0,326	
	Preg17	0,410	3,75	0,672	**		gLOGTT0	-0,100	-0,50	-0,327	
Y	Věk	-0,128	-0,71	-0,475		gLOGTT60	-0,095	-0,29	-0,196		
	BMI[kg/m ²]	-0,185	-1,54	-0,523	*	gLOGTT90	-0,134	-0,46	-0,322		
	Břicho	-0,194	-1,35	-0,533	*	gLOGTT120	-0,125	-0,45	-0,275		
	Boky	-0,169	-1,02	-0,452	*	gLOGTT150	-0,109	-0,41	-0,267		
	Pas	-0,194	-1,29	-0,559	*	cpep0	-0,157	-0,99	-0,394		
	Kosti[kg]	-0,058	-0,33	-0,150		cpep60	-0,101	-0,52	-0,220		
	Kosti[%]	0,160	2,03	0,458	**	cpep90	-0,117	-0,50	-0,268		
	Svaly[kg]	-0,077	-0,38	-0,234		cpep120	-0,135	-0,59	-0,286		
	Svaly[%]	0,174	1,14	0,449	*	cpep150	-0,145	-0,61	-0,354		
	Tuk[kg]	-0,191	-1,75	-0,483	**	cpep180	-0,155	-0,65	-0,344		
	Tuk[%]	-0,177	-1,22	-0,433	*	IRI0	-0,135	-0,80	-0,362		
	Hmotnost	-0,175	-1,16	-0,486	*	IRI60	-0,092	-0,46	-0,199		
	c1	-0,190	-2,22	-0,547	**	IRI90	-0,113	-0,56	-0,234		
	c2	-0,179	-2,15	-0,437	**	IRI120	-0,130	-0,59	-0,238		
	c3	-0,180	-2,02	-0,456	**	IRI150	-0,133	-0,73	-0,301		
	c4	-0,151	-0,98	-0,434		IRI180	-0,127	-0,90	-0,306		
	c5	-0,183	-1,33	-0,476	*	TG	-0,132	-0,91	-0,349		
	c6	-0,167	-1,12	-0,448	*	Chol	-0,097	-0,57	-0,286		
	c7	-0,141	-0,99	-0,313		HDL	0,110	0,72	0,311		
	c8	-0,191	-1,58	-0,533	*	LDL	-0,091	-0,66	-0,268		
	c9	-0,144	-0,65	-0,363		Glykop	-0,058	-0,61	-0,204		

^akomponentní váhy prediktivní komponenty vyjádřené ve formě regresních koeficientů; ^bkonfidenční interval (interval spolehlivosti); ^ckomponentní váhy prediktivní komponenty vyjádřené jako párové korelační koeficienty individuálních proměnných s prediktivními komponentami; **p*<0,05, ***p*<0,01; hodnoty v závorkách představují vysvětlenou variabilitu po cross-validaci

Statistické vyhodnocení ukazuje, že většina variability sdílené mezi Y a X je vyjádřena 1. prediktivní komponentou (14,5 % celkové variability). Druhá „relevantní“ prediktivní komponenta představuje pouze 1,5 % celkové variability a je těžko interpretovatelná, příslušné parametry nejsou uvedeny. První prediktivní komponenta ukazuje, že androgeny a jejich prekurzory jsou v negativním vztahu k parametrům metabolického syndromu.

Zkratky: DHT dihydrotestosteron; T testosteron; Prog progesteron; A2 androstendion; DHEA dehydroepiandrosteron; Prog17 17-hydroxyprogesteron; Preg17 17-hydroxypregnenolon; c1-c14 kožní řasy; BPSsystolický krevní tlak; BPDdiastolický krevní tlak; gIORTT0...180 glukóza v glukózovém orálním tolerančním testu (ORTT) v 0...180 min; cpep0...cpep180 C-peptidv ORTT v 0 ...180 min; IRI0...IRI180 imunoreaktivní inzulin; TG triglyceridy; Chol celkový cholesterol; Glykop glykované proteiny



Obr. 8 Vztahy mezi steroidy a souvisejícími hormony (matice **X**) a antropometrickými a metabolickými parametry (matice **Y**) vyjádřené jako komponentní váhy. Porovnáním hladin hormonů a antropometrických údajů jsme našli mezi hmotností, kožními řasami, obvodem pasu a boků, poměrem pas/boky a BMI, celkovým cholesterolem, LDL a insulinorezistencí negativní korelaci k hladině testosteronu (T) a dihydrotestosteronu (DHT) a SHBG. Dále pak pozitivní korelaci HDL a svalstva k hladině T, DHT a SHBG.

3. část studie: rozdíl mezi vlivem DHT a jeho metabolitů

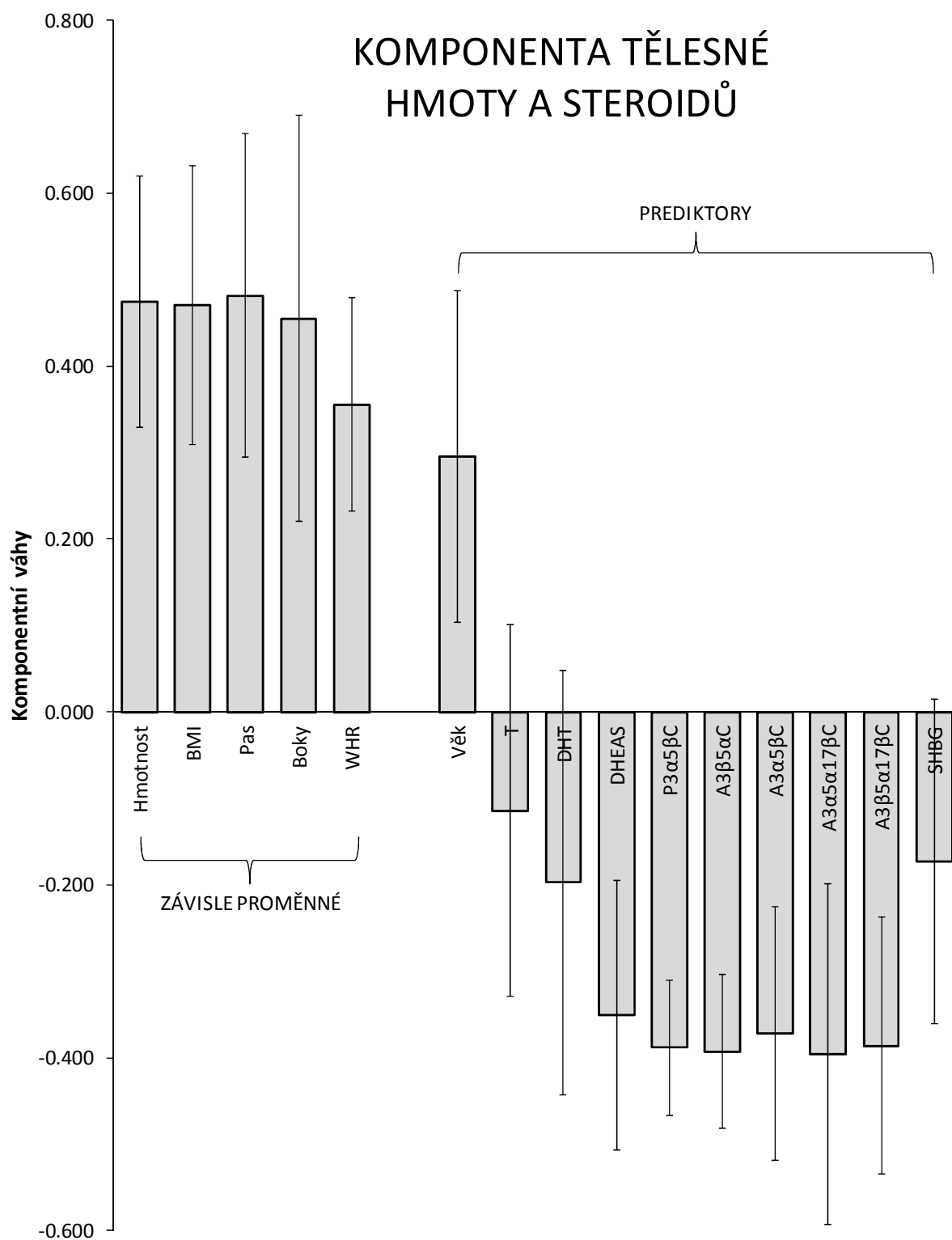
Porovnáním hladin steroidů a antropometrických údajů jsme našli negativní korelaci mezi hmotností, obvodem pasu a boků, poměrem pas/boky a BMI na jedné straně a hladinami testosteronu, dihydrotestosteronu, konjugovaného allopregnanolonu (P3α5αC), konjugovaného pregnanolonu (P3α5βC), konjugovaného androsteronu (A3α5αC), konjugovaného epiandrosteronu (A3β5αC), konjugovaného etiocholanolonu (A3α5βC), konjugovaného epietiocholanolonu (A3β5βC), konjugovaného 5α-androstane-3α,17β-triolu (A3α5α17βC), konjugovaného 5α-androstan-3β,17β-triolu (A3β5α17βS) a SHBG na straně druhé. (tabulka 6)

Nebyl prokázán rozdíl mezi vlivem DHT a jeho metabolitů na antropometrické parametry. (obr.9)

Tabulka 6. Vztahy mezi relevantními ukazateli tělesné hmoty a relevantními sérovými steroidy a SHBG u mužů hodnocené simultánně vícerozměrnou regresí s redukcí dimensionality, metoda obousměrných ortogonálních projekcí do latentní struktury (O2PLS)

Proměnná		KOMPONENTA TĚLESNÉ HMOTY A STEROIDŮ			R ²
		Komponentní váhy	Komponentní váhy /95% IS		
Závislé	Hmotnost	0.474	3.27	0.643	**
	BMI	0.470	2.93	0.697	**
	Pas	0.482	2.57	0.582	**
	Boky	0.455	1.94	0.636	**
	WHR	0.355	2.88	0.369	**
Prediktory	Věk	0.295	1.54	0.592	*
	T	-0.114	-0.53	-0.229	
	DHT	-0.197	-0.80	-0.396	
	DHEAS	-0.351	-2.26	-0.704	**
	P3α5βC	-0.388	-4.94	-0.779	**
	A3β5αC	-0.393	-4.42	-0.789	**
	A3α5βC	-0.372	-2.54	-0.747	**
	A3α5α17βC	-0.396	-2.01	-0.794	**
	A3β5α17βC	-0.386	-2.60	-0.775	**
	SHBG	-0.173	-0.92	-0.348	
Variabilita vysvětlená prediktivní komponentou	41.6% (33.9% po cross validaci)				

^aR...Komponentní váhy vyjádřené jako párové korelační koeficienty s prediktivní komponentou; *...p<0.05, **...p<0.01



Obr. 9 Porovnáním hladin steroidů a antropometrických údajů jsme našli negativní korelaci mezi hmotností, obvodem pasu a boků, poměrem pas/boky a BMI na jedné straně a hladinami testosteronu (T), dihydrotestosteronu (DHT) a metabolitů DHT.

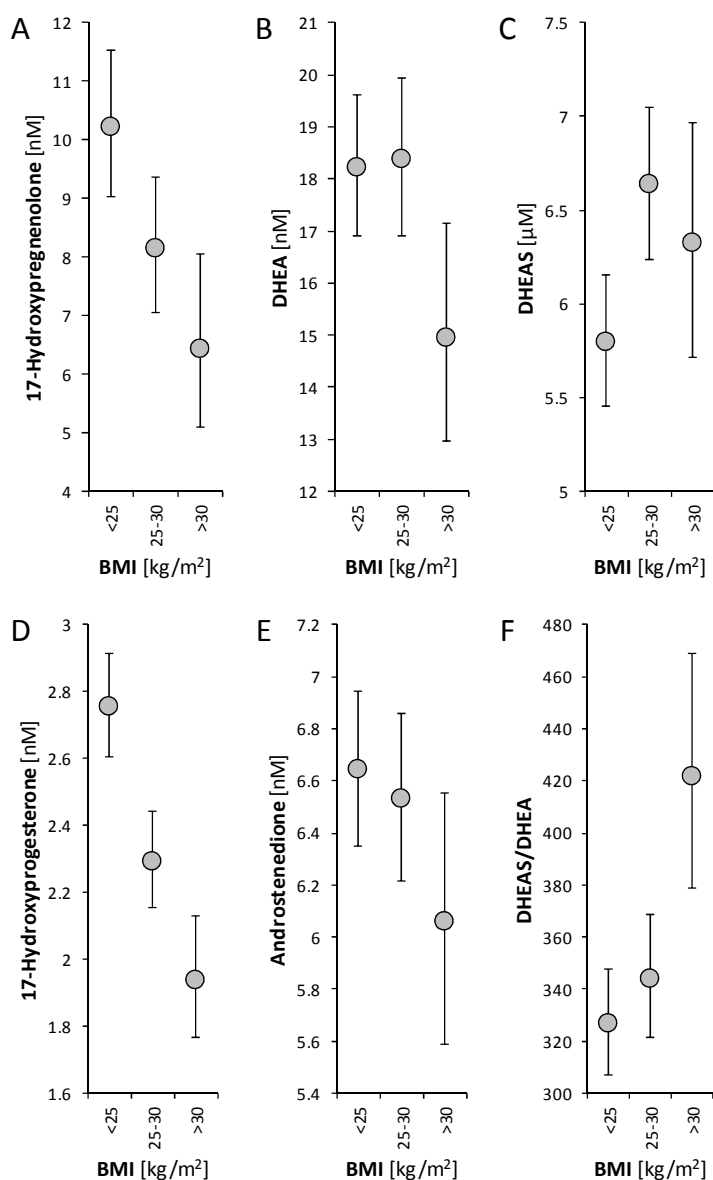
4. část studie: změny steroidogeneze u obézních

Srovnání mužů s normálním BMI, mužů s nadváhou a obézních mužů ukázalo, že statisticky významný pokles parametrů pro testosteron (Obr. 11A), dihydrotestosteron (Obr. 11A) a SHBG koreluje se vzrůstající tělesnou hmotou. Se vzrůstajícím BMI klesají také oba C21 prekurzory androgenů, 17 α -hydroxyprogesteron a 17 α -hydroxypregnenolon (Obr. 10A, D), zatímco změny hladin androstendionu, DHEA a DHEAS (Obr. 10B, C, E), stejně jako změny hladin gonadotropinů nedosahují statistické významnosti (Obr. 11 D, E). Ačkoli pokles SHBG doprovází pokles hladiny testosteronu, čímž kompenzuje ztrátu volného testosteronu, nebyla pozorována žádná změna indexu volných androgenů (Obr. 11F).

Poměr dihydrotestosteronu/testosteronu nekoreluje se stupněm obezity (Obr. 11C), s poměrem 17 α -hydroxyprogesteronu/17 α -hydroxypregnenolonu a poměrem androstendionu/dehydroepiandrosteronu (Obr. 12A, B), což demonstruje nedotčenou aktivitu 3 β -hydroxysteroid-dehydrogenázy typu 2 (HSD3B2). Naproti tomu je z poměrů DHEA/17 α -hydroxypregnenolon a androstendion/17 α -hydroxyprogesteron (Obr. 13A,B) zjevné, že aktivita C17,C20-lyázy (CYP17A1) se stupněm obezity klesá, zvláště v případě dráhy Δ 4 (Obr. 13B).

Statisticky významně klesá poměr testosteronu/androstendionu (Obr. 14), což je v souladu s poklesem aktivity 17 β -hydroxysteroid-dehydrogenázy (HSD17B).

Multivariační statistická analýza ukázala, že věk je signifikantním faktorem pro korelaci BMI a hladiny 17 α -hydroxypregnenolonu, 17 α -hydroxyprogesteronu, androstendionu, dehydroepiandrosteronu a jeho sulfátu a SHBG. Pokles testosteronu a dihydrotestosteronu byl se vzrůstajícím BMI nezávislý na věku. (Obr. 15)



Obrázek 10. Vztahy mezi hladinami steroidních hormonů, poměrem DHEAS/DHEA a BMI zjištěné pomocí ANCOVA se skupinou BMI jako hlavním faktorem s adjustací na věk subjektů (kovariát, podrobnosti viz analýza statistických dat). Kroužky s chybovými sloupci představují průměry skupin s jejich 95 % intervaly spolehlivosti vypočtenými pro vícenásobná porovnávání metodou nejmenšího významného rozdílu (least significant difference, LSD multiple comparisons) ($p=0,05$).

Nepřekrývající se intervaly spolehlivosti znamenají statisticky významný rozdíl mezi odpovídajícími skupinami.

Statistické údaje (R=korelační koeficient lineárního modelu, p=hladina významnosti, F=kvantil Fisherova-Snedecorova rozdělení pro individuální závislé proměnné) jsou následující:

A: $R=0,507$, $p<0,0001$; Skupina: $F=3,02$, $p=0,0508$; Věk: $F=30,87$, $p<0,0001$.

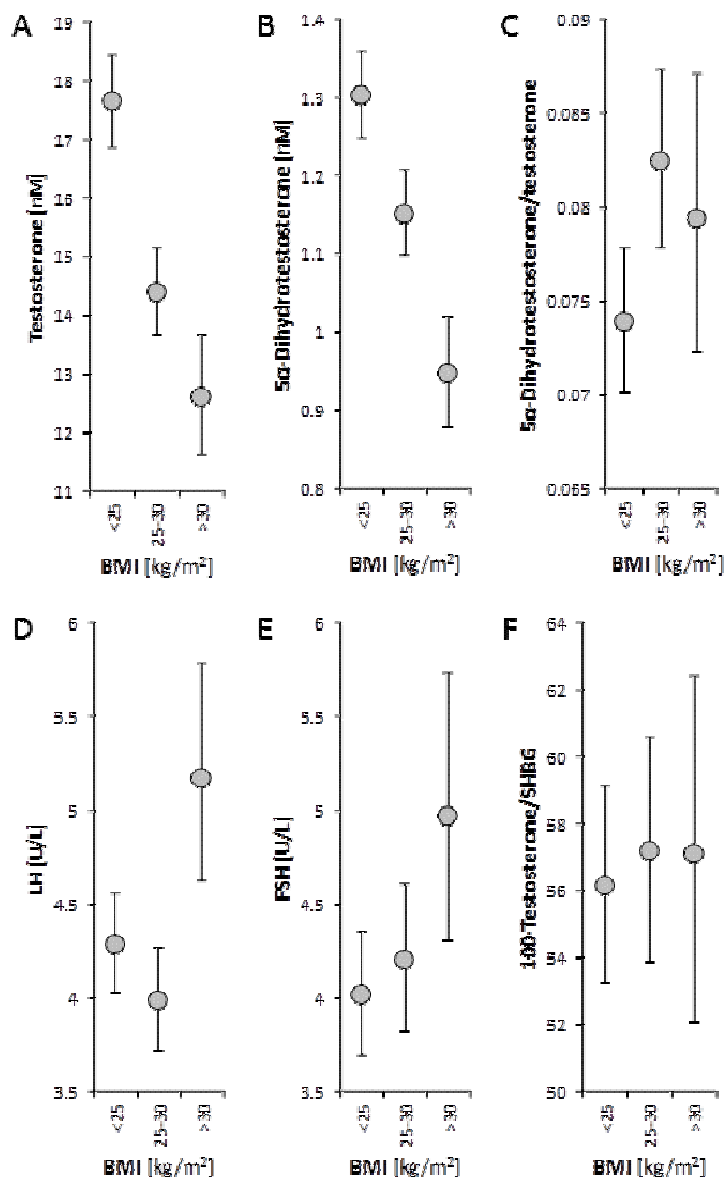
B: $R=0,63$, $p<0,0001$; Skupina: $F=1,85$, $p=0,1599$; Věk: $F=83,14$, $p<0,0001$.

C: $R=0,605$, $p<0,0001$; Skupina: $F=2,22$, $p=0,1107$; Věk: $F=97,98$, $p<0,0001$.

D: $R=0,456$, $p<0,0001$; Skupina: $F=9,38$, $p=0,0001$; Věk: $F=6,96$, $p=0,0089$.

E: $R=0,279$, $p=0,0006$; Skupina: $F=0,93$, $p=0,3973$; Věk: $F=7,08$, $p=0,0084$.

F: $R=0,278$, $p=0,0006$; Skupina: $F=3,72$, $p=0,0259$; Věk: $F=1,97$, $p=0,1618$.



Obrázek 11. Vztahy mezi hladinami androgenů, poměrem 5 α -dihydrotestosteron/testosteron, gonadotropiny a indexem volných androgenů (100-testosteron/SHBG) a BMI zjištěné pomocí ANCOVA se skupinou BMI jako hlavním faktorem s adjustací na věk subjektů (kovariát, podrobnosti viz analýza statistických dat). Kroužky s chybovými sloupci představují průměry skupin s jejich 95 % intervaly spolehlivosti vypočtenými pro vícenásobná porovnávání metodou nejmenšího významného rozdílu (least significant difference, LSD multiple comparisons) ($p=0,05$).

Nepřekrývající se intervaly spolehlivosti znamenají statisticky významný rozdíl mezi odpovídajícími skupinami.

Statistické údaje (R =korelační koeficient lineárního modelu, p =hladina významnosti, F =kvantil Fisherova-Snedecorova rozdělení pro individuální závislé proměnné) jsou následující:

A: $R=0,403$, $p<0,0001$; Skupina: $F=13,44$, $p<0,0001$; Věk: $F=0,17$, $p=0,6838$.

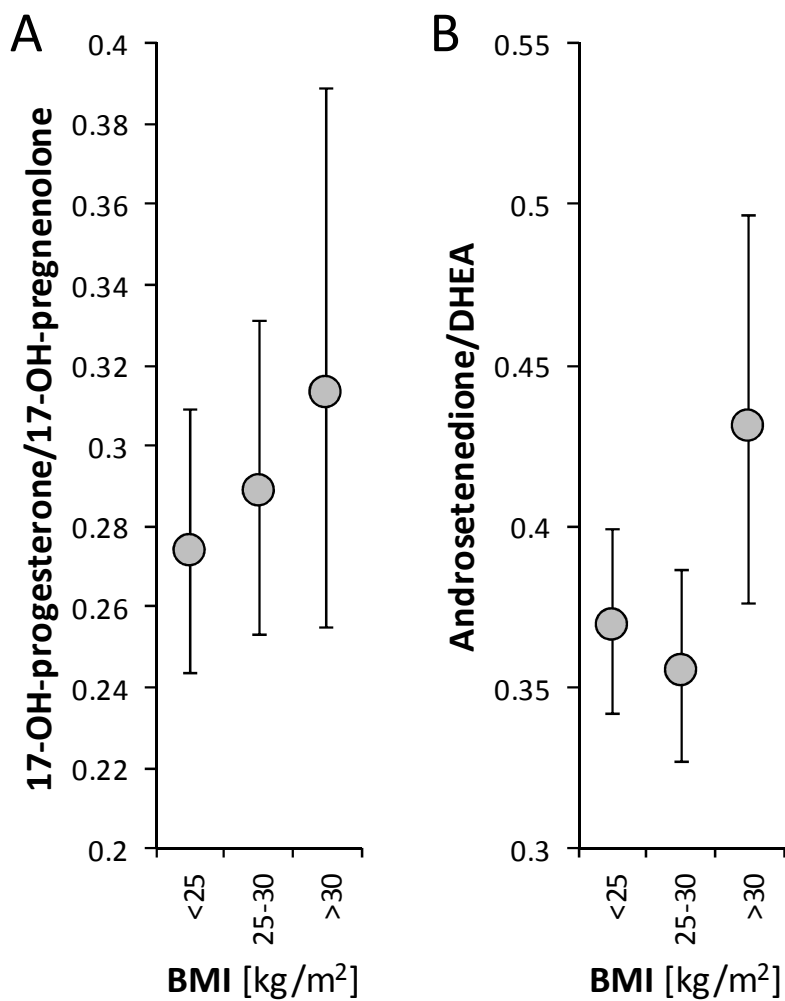
B: $R=0,389$, $p<0,0001$; Skupina: $F=11,92$, $p<0,0001$; Věk: $F=0,49$, $p=0,4861$.

C: $R=0,129$, $p=0,308$; Skupina: $F=1,78$, $p=0,1717$; Věk: $F=0,29$, $p=0,5886$.

D: $R=0,21$, $p=0,0222$; Skupina: $F=4,25$, $p=0,0155$; Věk: $F=0,07$, $p=0,795$.

E: $R=0,366$, $p<0,0001$; Skupina: $F=1,48$, $p=0,231$; Věk: $F=13,32$, $p=0,0003$.

F: $R=0,447$, $p<0,0001$; Skupina: $F=0,05$, $p=0,9516$; Věk: $F=37,44$, $p<0,0001$.



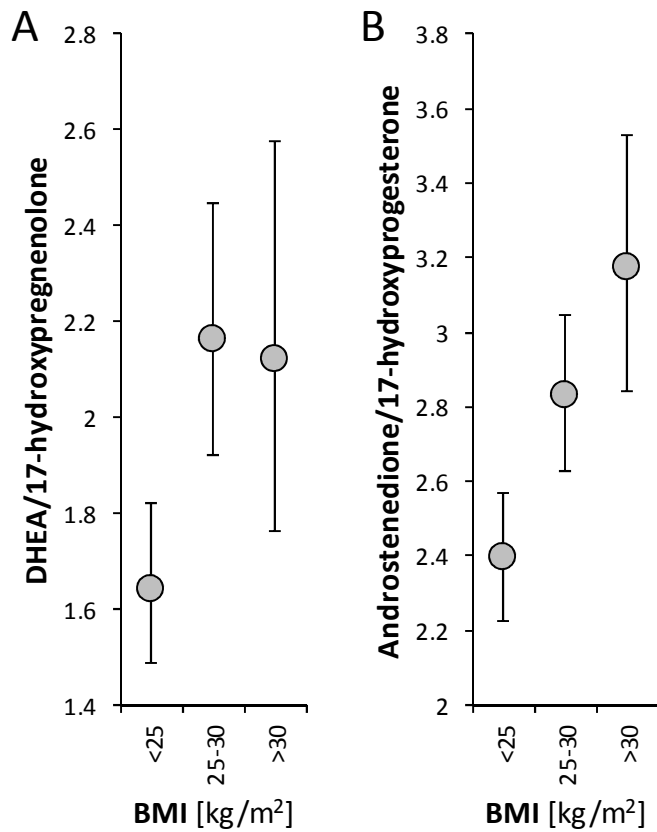
Obrázek 12. Vztahy mezi poměry steroidních hormonů odrážející aktivitu 3 β -hydroxysteroid-dehydrogenázy typu 2 (HSD3B2) a BMI zjištěné pomocí ANCOVA se skupinou BMI jako hlavním faktorem s adjustací na věk subjektů (kovariát, podrobnosti viz analýza statistických dat). Kroužky s chybovými sloupci představují průměry skupin s jejich 95 % intervaly spolehlivosti vypočtenými pro vícenásobná porovnávání metodou nejmenšího významného rozdílu (least significant difference, LSD multiple comparisons) ($p=0,05$).

Nepřekrývající se intervaly spolehlivosti znamenají statisticky významný rozdíl mezi odpovídajícími skupinami.

Statistické údaje (R=korelační koeficient lineárního modelu, p=hladina významnosti, F=kvantil Fisherova-Snedecorova rozdělení pro individuální závislé proměnné) jsou následující:

A: R=0,367, $p<0,0001$; Skupina: F=0,27, $p=0,7658$; Věk: F=19,43, $p<0,0001$.

B: R=0,524, $p<0,0001$; Skupina: F=1,54, $p=0,2176$; Věk: F=47,02, $p<0,0001$.



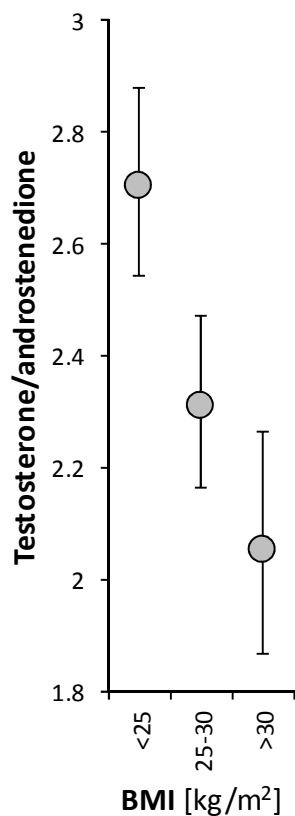
Obrázek 13. Vztah mezi poměry steroidních hormonů odrážející aktivitu C17-hydroxylázy, C17,20-lyázy (CYP17A1) a BMI zjištěné pomocí ANCOVA se skupinou BMI jako hlavním faktorem s adjustací na věk subjektů (kovariát, podrobnosti viz analýza statistických dat). Kroužky s chybovými sloupci představují průměry skupin s jejich 95 % intervaly spolehlivosti vypočtenými pro vícenásobná porovnávání metodou nejmenšího významného rozdílu (least significant difference, LSD multiple comparisons) ($p=0,05$).

Nepřekrývající se intervaly spolehlivosti znamenají statisticky významný rozdíl mezi odpovídajícími skupinami.

Statistické údaje (R =korelační koeficient lineárního modelu, p =hladina významnosti, F =kvantil Fisherova-Snedecorova rozdělení pro individuální závislé proměnné) jsou následující:

A: $R=0,181$, $p=0,0676$; Skupina: $F=2,95$, $p=0,0546$; Věk: $F=0,03$, $p=0,8645$.

B: $R=0,239$, $p=0,0054$; Skupina: $F=4,3$, $p=0,0147$; Věk: $F=0,01$, $p=0,9056$.



Obrázek 14. Vztahy mezi poměry steroidních hormonů odrážející aktivitu 17-hydroxysteroid-dehydrogenázy typu 3 (HSD17B3) a BMI zjištěné pomocí ANCOVA se skupinou BMI jako hlavním faktorem s adjustací na věk subjektů (kovariát, podrobnosti viz analýza statistických dat). Kroužky s chybovými sloupci představují průměry skupin s jejich 95 % intervaly spolehlivosti vypočtenými pro vícenásobná porovnávání metodou nejmenšího významného rozdílu (least significant difference, LSD multiple comparisons) ($p = 0,05$).

Nepřekrývající se intervaly spolehlivosti znamenají statisticky významný rozdíl mezi odpovídajícími skupinami.

Statistické údaje (R =korelační koeficient lineárního modelu, p =hladina významnosti, F =kvantil Fisherova-Snedecorova rozdělení pro individuální závislé proměnné) jsou následující:

$R=0,226$, $p=0,0113$; Skupina: $F=5,23$, $p=0,006$; Věk: $F=6,73$, $p=0,0102$.

VIII. Diskuze

DHT v průběhu života

Někteří autoři vyslovili domněnku, že testosteron je kompetitivním hormonem při obsazování vazebných míst androgenních receptorů mnohem silnějším androgenem dihydrotestosteronem a tedy jistým ochranným faktorem proti působení DHT zejména na prostatu a kožní adnexa. Vzhledem k tomu, že běžný výskyt benigní hyperplazie a karcinomu prostaty nebo androgenní alopecie je spojen až s dosažením středního věku, byla vyslovena i domněnka, že zde hraje roli věkově závislá změna v poměru hladin obou androgenů.

U různých druhů savců se změny poměru DHT/testosteron v čase velmi liší. U daňka skvrnitého (Rolf, Fischer, 1990) vykazují během ročního cyklu individuální profily T a DHT protichůdné vztahy, u makaků (*Macaca fascicularis*) hodnoty testosteronu plynule narůstají, dospělých hodnot dosahují ve věku 5 – 6 let, zatímco hladiny DHT mají tendenci se ustálit od 4 - 5 let věku (Meusy-Desolle, Dang, 1985). U potkanů jsou hladiny testosteronu nízké (nižší než 1 ng/ml) do 42.dne života; dospělých hladin (3 – ng/ml) je dosaženo v 62.den života a s narůstajícím věkem hladiny testosteronu postupně klesají. Hladiny 5 α -dihydrotestosteronu (DHT) se od prepubertálního věku do pokročilého věku výrazně nemění (90 – 160 pg/ml) (Saksena, Lau, 1979). Sérový DHT u slonů odráží hladiny testosteronu, kromě prudkého zvýšení testosteronu u samců slona indického během říje, jež není provázeno souběžným zvýšením hladin DHT (Rasmusen et al., 1984).

Na rozdíl od dobře známého poklesu koncentrací testosteronu během života muže jsou data týkající se závislosti věku na hladinách dihydrotestosteronu nejasná. Někteří autoři uvádějí pokles hladin DHT (Drafta et al., 1982, Ghanadian, Puah, 1981, Housti et al., 1975), ale další nezjistili žádné signifikantní změny u starších mužů (Gray et al., 1991, Maier, 2001, Pirke, Doerr, 1975). Longitudinální výsledky z Massachusettské studie stárnutí mužů ukázaly u starších mužů vzrůstající hladiny DHT (Feldman et al., 2002). Tento jev by mohl souviset s výraznou změnou poměru DHT/testosteron ve stáří. Naše výsledky získané z reprezentativní analýzy skupiny středoevropské populace ukazují převážně konstantní poměr DHT/testosteron.

Vliv testosteronu a DHT na tělesné složení a metabolické parametry

Vyšší incidence kardiovaskulárních onemocnění u mužů než u žen v reprodukčním věku nejprve vedla k předpokladu, že je testosteron rizikovým faktorem pro kardiovaskulární onemocnění. To však dosud nebylo prokázáno. Naproti tomu jsou nízké (v některých případech vysoké) hladiny testosteronu spojeny s viscerální obezitou, metabolickým syndromem, diabetem mellitem a kardiovaskulárními onemocněními. Suplementace testosteronu nepřinesla uniformní výsledky (Blouin et al., 2008). Tak zvané fyziologické okno pro testosteron bylo popsáno jak pro případy, kdy měla nižší hladina T negativní vliv na složení těla a kardiovaskulární riziko, tak pro případy s vyšší hladinou T. Nicméně obecně je přijímána spojitost nízké sérové hladiny testosteronu se zvýšenou adipozitou, nežádoucím metabolickým rizikovým profilem, aterosklerózou a kardiovaskulárním rizikem (Page et al., 2005, Basaria et al., 2010, Ohlsson et al., 2011), jež mohou být u hypotestosteronemických mužů pouze částečně korigovány pomocí exogenního testosteronu. Tento poznatek byl potvrzen také nynější studií, Pospíšilová et al. 2012, v níž byla zjištěna pozitivní korelace obou androgenů, T a DHT, s kostní hmotou, svalovinou, HDL-cholesterolem, a negativní korelace s antropometrickými parametry obezity, LDL-cholesterolu, celkového cholesterolu, triglyceridů, glykémie nalačno, inzulínu a C-peptidu. To platí za normálních fyziologických podmínek bez jakéhokoli zásahu do přirozených hladin testosteronu a dihydrotestosteronu.

Na vliv DHT na rizikové faktory pro kardiovaskulární onemocnění bylo zaměřeno několik experimentálních modelů. Studie na zvířetech ukazují na účinek hladiny DHT na redukci kardiovaskulárního rizika (Li et al, 2007, Qiu, et al., 2010). Experimenty s buněčnými liniemi poskytly doklad účinku vysoké hladiny DHT ve smyslu inhibice růstu buněk hladké svaloviny cév v buněčné kultuře; tato inhibice je závislá na dávce (Somjen et al., 2009). Exogenní dodání DHT do lidské buněčné kultury makrofágů je proaterogenní (Ng et al., 2003). Nicméně dávka DHT používaná ve studiích byla desetkrát vyšší než fyziologické hladiny DHT v krevní plazmě mužů, což potvrzuje negativní, na dávce závislý účinek vysokých hladin DHT.

Yanes et al., 2009 sledovali účinek DHT na tvorbu aldosteronu v buněčné kultuře a dokázali, že se mohou suprafyziologické hladiny androgenů podílet na rozvoji kardiovaskulárních onemocnění.

Účinek DHT na tukovou tkáň byl zkoumán na několika zvířecích modelech. Dvě rozsáhlé genetické analýzy tukové tkáně u gonadektomovaných myší po substituci DHT prokázaly, že několik genů pro glykolýzu a lipogenezi je regulováno pomocí DHT (Bolduc et al., 2007, Bolduc et al., 2004).

Výsledky výzkumu skupiny Bolducovy (Bolduc et al., 2007) naznačují, že chronická léčba androgeny může pomoci zlepšit metabolický profil díky regulaci různých kritických biochemických drah podílejících se na fyziologii tukové tkáně. Kromě toho bylo po 21 denní léčbě pomocí DHT up-regulováno několik genů spojených se zdravějším metabolickým profilem, jako je adiponektin a antigen CD36. Studie na myších (Movérare-Skrtic et al., 2006) ukázaly, že léčba DHT vedla k obezitě spojené s omezeným výdejem energie a oxidace tuků. Naproti tomu však DHT neměl vliv na konzumaci potravy a motorickou aktivitu. Léčba DHT dále měla za následek zvýšení hladin HDL-cholesterolu a triglyceridů spojené s významným poklesem genové exprese 7 α -hydroxylázy, indukující sníženou tvorbu žlučových kyselin.

Jak testosteron, tak DHT blokuje transformaci pluripotentních buněk na tukové buňky (Singh et al., 2003).

Některé studie prokázaly rozdílný metabolismus DHT v tukové tkáni u obézních a štíhlých pacientů. Byly zjištěny rozdíly v hladinách DHT a metabolismu viscerálního tuku u obézních mužů. U obézních mužů byly vyšší hladiny DHT ve viscerálním tuku než v podkožním tuku (Bélanger et al., 2006). Ve srovnání se štíhlými muži byla u obézních mužů pozorována větší degradace DHT v omentálním tuku (Blouin et al., 2006). Metabolit DHT androstan-3 α ,17 β -diol-17-glukuronid je metabolit, který koreluje pozitivně nejen s množstvím tuku, ale také s centrální distribucí tuku, intrahepatálním tukem, rizikovým typem lipidového spektra a inzulínovou rezistencí (Vandenput et al., 2007). V naší studii jsme neprokázali rozdílný vliv mezi DHT a jeho metabolity na tělesné složení.

Některé hypotézy předpokládají, že změna poměru androgenů ve prospěch DHT se může objevit spolu s účinkem na rozvoj obezity. V naší studii Stárka et al. 2009 jsme sledovali poměr DHT/T u štíhlých a obézních mužů. Tento poměr byl konstantní. Oba androgeny mají ten samý účinek jak u štíhlých, tak u obézních mužů. Nebyla detekována žádná změna poměru DHT/T.

Ve druhé části studie nebyly zjištěny žádné klíčové rozdíly mezi vztahem testosteronu a dihydrotestosteronu ve vztahu ke složení těla a antropometrickým údajům, lipidovému spektru a regulaci parametrů glukózy. Přesto je možné, že za upravených podmínek buď s blokovanou tvorbou DHT, nebo při podávání testosteronu může být pozorován specifický účinek na tvorbu tuku nebo lokalizaci tukových depozit.

Srovnání hormonálních hladin s antropometrickými údaji v naší studii neprokázalo žádné rozdíly v účinku aromatizovatelných a nearomatizovatelných steroidů. Oba druhy steroidů spolu úzce vzájemně korelují ve vztahu k antropometrickým charakteristikám, takže můžeme vzít v úvahu možnost zastoupení jednoho typu za druhý v rámci účinku na složení těla. To znamená, že fyziologické hladiny DHT jsou ekvivalentní hladinám testosteronu v účincích na složení těla a oba tyto steroidní hormony se mohou zastupovat. To nicméně neplatí pro další účinky těchto dvou steroidů, jako je jejich úloha v intrauterinním vývoji a jejich vliv na kožní adnexa, nebo pro situaci, kdy jsou hladiny testosteronu nebo dihydrotestosteronu ovlivněny podáváním hormonů a jejich modulátorů.

Testosteron má příznivé účinky na složení těla a kontrolu glykémie u hypogonadálních mužů. Randomizované studie přinášejí silné důkazy, že terapie testosteronem ovlivňuje složení těla z metabolického hlediska, ale změny jsou nevelké a nejsou konzistentně převáděny do inzulinové rezistence a zlepšení metabolismu glukózy (Blouin et al., 2008, Grossmann, 2011, Dandona et Dhindsa, 2011). Byly zaznamenány pokusy zavést v praxi substituci hypogonadismu pomocí transdermální léčby dihydrotestosteronem (Ly et al., 2001, Kunelius et al., 2002, Roth et Page, 2011), což našlo uplatnění také jako zneužití v podobě anabolického dopingu (Fabregat et al., 2011). Nicméně ve světle současných výsledků se zdá, že ve srovnání s testosteronem nepřináší dihydrotestosteron žádné výhody, pokud jde o příznivé účinky na metabolické parametry a složení těla, jsou-li udržovány fyziologické hladiny androgenů.

Změny steroidogeneze u obézních

Ze získaných údajů v poslední části studie můžeme odvodit, že biosyntéza testosteronu u mužů s nadváhou a u obézních mužů je inhibována již v okamžiku štěpení postranních řetězců C21 steroidních hormonů a dále poklesem aktivity redukující 17 β -hydroxysteroid-

dehydrogenázy (HSD17B). V popředí zájmu je změněný poměr DHEAS k DHEA, což může být důsledek poklesu sulfatázy nebo vzestupu sulfotransferázy nebo zvýšené sekrece DHEAS z nadledvin (Dušková et al., 2013).

Ve vztahu ke steroidní 5 α -reduktáze (SRD5A1) a 3 β -hydroxysteroid-dehydrogenáze (HSD3B2) nebyly v souvislosti s nárůstem BMI pozorovány žádné změny.

Uvedená zjištění se shodují s in vitro studii metabolismu testosteronu v tukové tkáni v různých lokalizacích. Ve studii intra-adipózního metabolismu pohlavních hormonů (Wake et al., 2007), byla generalizovaná obezita (BMI) spojena s nárůstem hladin aromatázy mRNA a 5 α -reduktáza typu 1 nepredikovala množství nebo distribuci tuku. To podporuje hypotézu, podle níž je intra-adipózní metabolismus pohlavních hormonů determinantem ženského nebo mužského vzoru distribuce tělesného tuku.

Modifikovaná dráha metabolismu androgenů ovlivňuje tukovou tkáň, jelikož androgeny modulují funkci adipocytů a ovlivňují velikost kompartmentů tukové tkáně u člověka. Například enzymy aldo-keto reduktázy 1C (AKR1C), zejména AKR1C2 a AKR1C3 mohou být cestou lokální syntézy a inaktivace androgenů zapojeny do jemné regulace dostupnosti androgenů v tukové tkáni (Blouin et al., 2009). V abdominálních preadipocytech je 17 β -hydroxysteroid-dehydrogenáza typu 3 exprimována společně s aromatázou (Corbould et al., 2002).

Lze předpokládat, že u mužů klesá se stoupajícím body mass indexem tvorba C₁₉ steroidních hormonů z jejich C₂₁ prekurzorů a snížená aktivita 17 β -hydroxysteroid-dehydrogenázy dále omezuje tvorbu testosteronu a dihydrotestosteronu. Naproti tomu soustava pohlavních steroidních hormonů ovlivňuje ukládání tuku a jeho lokalizaci.

IX. Závěr

- Poměr fDHT/FT byl v průběhu života dospělých mužů konstantní, žádný evidentní zvrát v poměru obou hormonů jsme po pubertě nenalezli
- Před pubertou je dominantním androgenem spíše DHT než T
- Zjistili jsme negativní korelaci DHT a T a hmotností, kožními řasami, obvodem pasu, boků, poměrem pasu a boků, celkovým cholesterolem, LDL cholesterolem a triglyceridy
- Nalezli jsme pozitivní korelaci mezi množstvím svalstva, hladinou HDL cholesterolu a T i DHT
- Účinky testosteronu a dihydrotestosteronu na antropometrická data, kontrolu glukózy a lipidové spektrum jsou kvalitativně stejné
- Neproukázali jsme tedy rozdíl v účinku aromatizovatelných a nearomatizovatelných androgenů na tělesné složení a metabolické parametry
- Neproukázali jsme rozdíl v účinku mezi DHT a jeho metabolity na tělesné složení
- Nalezli jsme u mužů pokles tvorby C₁₉ steroidních hormonů z jejich C₂₁ prekurzorů se stoupajícím BMI
- Nalezli jsme sníženou aktivitu 17β-hydroxysteroid-dehydrogenázy, která dále omezuje tvorbu testosteronu a dihydrotestosteronu

X. Shrnutí závěrů práce

Naše výsledky přinesly komplexní pohled na androgeny ve vztahu k věku, tělesnému složení, metabolickým parametrům. Oba hlavní androgeny mají v těchto oblastech stejné účinky, není rozdíl mezi aromatizovatelnými a nearomatizovatelnými androgeny. U obézních mužů se na poklesu C19 steroidních hormonů podílí také snížení jejich tvorby z C21 prekurzorů.

XI. Literatura

1. Akerstedt T, Palmblad J, de la Torre B, Marana R, Gillberg M. Adrenocortical and gonadal steroids during sleep deprivation. *Sleep* 3(1): 23–30, 1980.
2. Allan CA, McLachlan RI. Androgens and obesity. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 17(3): 224–232, 2010.
3. Amory JK, Anawalt BD, Matsumoto AM, Page ST, Bremner WJ, Wang C, Swerdloff RS, Clark RV. The effect of 5alpha-reductase inhibition with dutasteride and finasteride on bone mineral density, serum lipoproteins, hemoglobin, prostate specific antigen and sexual function in healthy young men. *J Urol.* 179(6): 2333–8, 2008.
4. Andersson A-M, Jensen T, Juul A, Petersen JH, Jørgensen T, Skakkebaek NE. Secular decline in male testosterone sex hormone binding globulin serum levels in Danish population surveys. *J Clin Endocrinol Metab.* 92(12): 4696-4705, 2007.
5. Aumueller G, Eicheler W, Renneberg H, Adermann K, Vilja P, Forssmann WG. Immunocytochemical evidence for differential subcellular localization of 5 alpha-reductase isoenzymes in human tissues. *Acta Anat.* 156: 241–52, 1996.
6. Barrett-Connor E, Ferrara A. Dehydroepiandrosterone, dehydroepiandrosterone sulfate, obesity, waist-hip ratio, and noninsulin-dependent diabetes in postmenopausal women: the Rancho Bernardo Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 81(1): 59-64, 1996.
7. Basaria S, Cobiello AD, Travison TG, Storer TW, Farwell WE, Jette AM. Adverse effects associated with testosterone administration. *New Engl J Med.* 363(2): 109-122, 2010.
8. Bélanger C, Hould FS, Lebel S, Biron S, Brochu G, Tchernof A. Omental and subcutaneous adipose tissue steroid levels in obese men. *Steroids.* 71(8): 674–82, 2006. Epub Jun 9, 2006
9. Bláha P: ANTROPO-ein Programm für automatische Bearbeitung anthropologischer Daten, *Wiss. Zeitsch. Humboldt-Univ.Berlin* 5, 153-156, 1991.
10. Blouin K, Boivin A, Tchernof A. Androgens and body fat distribution. *J Steroid Biochem Mol Biol.* Feb 108(3–5): 272–80, 2008.
11. Blouin K, Richard C, Brochu G, Hould FS, Lebel S, Marceau S, Biron S, Luu-The V, Tchernof A. Androgen inactivation and steroid-converting enzyme expression in abdominal adipose tissue in men. *J Endocrinol.* 191(3): 637–647, 2006.
12. Blouin K, Veilleux A, Luu-The V, Tchernof A. Androgen metabolism in adipose tissue: recent advances. *Mol Cell Endocrinol.* 301(1–2): 97–103, 2009.
13. Bolduc C, Larose M, Yoshioka M, Ye P, Belleau P, Labrie C, Morissette J, Raymond V, Labrie F, St-Amand J. Effects of dihydrotestosterone on adipose tissue measured by serial analysis of gene expression. *J Mol Endocrinol.* Oct 33(2): 429–44, 2004.

14. Bolduc C, Yoshioka M, St-Amand J. Transcriptomic characterization of long term dihydrotestosterone effects in adipose tissue. *Obesity* 15(5): 1107–1132, 2007.
15. Brambilla DJ, Matsumoto AM, Araujo AB, McKinlay JB. The effect of diurnal variation on clinical measurement of serum testosterone and other sex hormone levels in men. *J Clin Endocrinol Metab.* 94(3): 907–13, 2009.
16. Bruchovsky N, Wilson JD. The conversion of testosterone to 5-alpha-androstan-17-beta-ol-3-one by rat prostate in vivo and in vitro. *J Biol Chem.* Apr. 25,243 (8):2012–21, 1968.
17. Chen W, Yang CC, Chen GY, Wu MC, Sheu HM, Tzai TS. Patients with a large prostate show a higher prevalence of androgenetic alopecia. *Arch Dermatol Res.* 296(6): 245–9, 2004.
18. Cohen PG. The hypogonadal-obesity cycle: role of aromatase in modulating the testosterone-estradiol shunt – a major factor in the genesis of morbid obesity. *Med Hypotheses.* 52: 49–51, 1999.
19. Corbould AM, Bawden MJ, Lavranos TC, Rodgers RJ, Judd SJ. The effect of obesity on the ratio of type 3 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase mRNA to cytochrome P450 aromatase mRNA in subcutaneous abdominal and intra-abdominal adipose tissue of women. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 26(2): 165–175, 2002.
20. Côté JA, Lessard J, Mailloux J, Laberge P, Rhéaume C. Circulating 5 α -dihydrotestosterone, abdominal obesity and adipocyte characteristics in women. *Horm Mol Biol Clin Incest.* 12(2): 391–400, 2012.
21. Dandona P, Dhindsa S. Hypogonadotropic hypogonadism in type 2 diabetes and obesity. *J. Clin. Endocrinol.Metab.* 96(9): 4078–4088, 2011.
22. Dati E, Baroncelli GI, Mora S, Russo G, Baldinotti F, Parrini D, Erba P, Simi P, Bertelloni S. Body composition and metabolic profile in women with complete androgen insensitivity syndrome. *Sex Dev.* 3(4):188–93, 2009.
23. Dehennin L, Lafarge P, Dailly P, Bailloux D, Lafarge JP. Combined profile of androgen glucuro- and sulfoconjugates in post-competition urine of sportsmen: a simple screening procedure using gas chromatography-mass spectrometry, *J Chromatogr B Biomed Appl.* 687(1): 85–91, 1996.
24. De Maddalena C, Vodo S, Petroni A, Aloisi AM. Impact of testosterone on body fat composition. *J Cell Physiol.* 227(12): 3744–3748, 2012.
25. De Pergola G, Triggiani V, Giorgino F, Cospite MR, Garruti G. The free testosterone to dehydroepiandrosterone sulphate molar ratio as a marker of visceral fat accumulation in premenopausal obese women. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 18(10): 659–664, 1994.
26. Denti L, Pasolini G, Cortellini P, Sanfelici L, Benedetti R, Cecchetti A, Ferretti S, Bruschi L, Ablondi F, Valenti G. Changes in HDL-cholesterol and lipoprotein Lp(a) after 6-month treatment with finasteride in males affected by benign prostatic hyperplasia (BPH). *Atherosclerosis* 152(1): 159–66, 2000.
27. Dogramaci AC, Balci DD, Balci A, Karazincir S, Savas N, Topaloglu C, Yalcin F. Is androgenetic alopecia a risk for atherosclerosis? *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 23(6): 673–7, 2009.

28. Dorfman RI, Hamilton JB. Urinary excretion of androgenic substances after intramuscular and oral administration of testosterone propionate to humans. *J Clin Invest.* 18(1): 67–71, 1939.
29. Drafta D, Schindler AE, Stroe E, Neacșu E: Age-related changes of plasma steroids in normal adult males. *J Steroid Biochem.* 17(6):683-7, 1982.
30. Dušková M, Pospíšilová H. The role of non-aromatizable testosterone metabolite in metabolic pathways, *Phys Res.* vol. 60, p. 253-61, 2011.
31. Dušková M, Pospíšilová H, Hill M, Stárka L. Obesity, circulating androgens and their precursors, *J. Steroids Hormon Sci* 2013.
32. Dušková M, Čermáková I, Hill M, Vaňková M, Šamalíková P, Stárka L. What may be the markers of the male equivalent of polycystic ovary syndrome? *Physiological Research.* 53: 287–94, 2004.
33. Dušková M, Hill M, Stárka L. Changes of metabolic profile in men treated for androgenetic alopecia with 1 mg finasteride. *Endocr Regul.* Jan. 44(1):3–8, 2010.
34. Elmlinger MW, Dengler T, Weinstock C, Kuehnel W. Endocrine alterations in the aging male. *Clin Chem Lab Med.* 41(7):934-41, 2003.
35. Fabregat A, Pozo OJ, Van Renterghem P, Van Eenoo P, Marcos J, Segura J, Ventura R. Detection of dihydrotestosterone gel, oral dehydroepiandrosterone, and testosterone gel misuse through the quantification of testosterone metabolites released after alkaline treatment. *Drug Test Anal.* 3(11-12): 828-83, 2011.
36. Feldman HA, Longcope C, Derby CA, Johannes CB, Araujo AB, Coviello AD, Bremner WJ, McKinlay JB. Age trends in the level of serum testosterone and other hormones in middle-aged men: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. *J Clin Endocrinol Metab.* Feb;87(2): 589–98, 2002.
37. Finasteride Male Pattern Hair Loss Study Group. Long-term (5year) multinational experience with finasteride 1 mg in the treatment of men with androgenetic alopecia. *Eur J Dermatol.* 12: 38–49, 2002.
38. Flück CE, Meyer-Böni M, Pandey AV, Kempná P, Miller WL, Schoenle EJ, Bignon-Laubert A. Why boys will be boys: two pathways of fetal testicular androgen biosynthesis are needed for male sexual differentiation. *J Hum Genet.* 2011:201-18.
39. Ford ES, Freedman DS, Byers T. Baldness and ischemic heart disease in a national sample of men. *Amer J. Epidemiol.* 143: 651–657, 1996.
40. Ghanadian R, Puh CM: Age-related changes of serum 5alpha-androstane-3alpha, 17beta-diol in normal men. *Gerontology.* 27(5):281-5, 1981.
41. Gilles GG, Severi G, Sinclair R, English DR, McCredie MR, Johnson W, Boyle P, Hopper JL. Androgenetic alopecia and prostate cancer: findings from an Australian case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 11 (6): 549, 2002.
42. Giusti G, Gonnelli P, Borrelli D, Fiorelli G, Forti G, Pazzagli M, Serio M. Age-related secretion of androstenedione, testosterone and dihydrotestosterone by the human testis. *Exp Gerontol.* 10(5):241-5, 1975.

43. Glass AR. Endocrine aspects of obesity. *Med Clin North Am.* 73(1): 139–160, 1989.
44. Gonzalez-Gonzalez JG, Mancillas-Adame LG, Fernandez-Reyes M, Gomez-Flores M, Lavalle-Gonzalez FJ, Ocampo-Candiani J, Villarreal-Perez JZ. Androgenetic alopecia and insulin resistance in young men. *Clin Endocrinol* 15, 2008.
45. González-Santos MR, Gajá-Rodríguez OV, Alonso-Uriarte R, Sojo-Aranda I, Cortés-Gallegos V. Sleep deprivation and adaptive hormonal responses of healthy men. *Arch Androl.* 22(3): 203–7, 1989.
46. Gormley GJ, Stoner E, Rittmaster RS, Gregg H, Thompson DL, Lasseter KC, Vlasses PH, Stein EA. Effects of finasteride (MK-906), a 5 alpha-reductase inhibitor, on circulating androgens in male volunteers. *J Clin Endocrinol Metab* 70(4): 136–41, 1990.
47. Gray A, Feldman HA, McKinlay JB, Longcope C. Age, disease, and changing sex hormone levels in middle-aged men: results of the Massachusetts Male Aging Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 73(5): 1016–25, 1991.
48. Grossmann M. Low testosterone in men with type 2 diabetes: Significance and treatment. *J. Clin.Endocrinol.Metab.* 98(6), 2341-2353, 2011.
49. Gupta V, Bhasin S, Guo W, Singh R, Miki R, Chauhan P, Choong K, Tchkonja T, Lebrasseur NK, Flanagan JN, Hamilton JA, Viereck JC, Narula NS, Kirkland JL, Jasuja R. Effects of dihydrotestosterone on differentiation and proliferation of human mesenchymal stem cells and preadipocytes. *Mol Cell Endocrinol.* 16;296(1-2): 32–40, 2008.
50. Hampl R., Dvořák P., Lukešová Š., Kozák I., Chrpová M., Stárka L. The use of iodinated steroids as radioligand for testosterone radioimmunoassay. *J. Steroid Biochem.* 9: 771-773, 1978.
51. Hampl R, Putz Z, Stárka L. Radioimmunological determination of dihydrotestosterone and its importance for laboratory diagnostic. *Biochem.Clin.Bohemoslov.* 19, 157-163, 1990.
52. Hawk W, Breslow RA, Graubard BI. Male pattern baldness and clinical prostate cancer in the epidemiologic follow-up of the first National Health and Nutrition Examination survey. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 9: 523–527, 2000.
53. Hawkins VN, Foster-Schubert K, Chubak J, Sorensen B, Ulrich CM, Stanczyk FZ, Plymare S, Stanford J, White E, Potter JD, McTiernan A. Effect of exercise on serum sex hormones in men: a 12-month randomized clinical trial. *Med Sci Sports Exerc.* 40(2): 223–33, 2008.
54. Herrera CR, D'Agostino RB, Gertsman BB, Boscoe LA, Belanger AJ. Baldness nad coronary heart disease rates in men from the Farmingham Study. *Am. J. Epidemiol.* 142: 828–833, 1995.
55. Hill M, Parizek A, Kancheva R, Duskova M, Velikova M, Kriz L, Klimkova M, Paskova A, Zizka Z, Matucha P, Meloun M, Starka L. 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.* 121(3–5): 594–610, 2010.

56. Hill M, Paskova A, Kancheva R, Velikova M, Kubatova J, Kanchewa L, Adamcova K, Mikesova M, Zizka Z, Koucky M, Sarapatkova H, Kacer V, Matucha P, Meloun M, Parizek A. Steroid profiling in pregnancy: A focus on the human fetus. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 2013, in press.
57. Hirso P, Rajala U, Hiltunen L, Jokelainen J, Keinänen-Kiukaanniemi S, Näyhä S. Obesity and low-grade inflammation among young Finnish men with early-onset alopecia. *Dermatology* 214(2): 125–9, 2007.
58. Hofstra J, Loves S, van Wageningen B, Ruinemans-Koerts J, Jansen I. High prevalence of hypogonadotropic hypogonadism in men referred for obesity treatment. *Neth J Med* 66. 103–109, 2008.
59. Hsieh CC, Thanos A, Mitropoulos D, Deliveliotis C, Mantzoros CS, Trichopoulos D. Risk factors for prostate cancer: a case-control study in Greece. *Int J Cancer*. 80(5): 699–703, 1999.
60. Ilangovan R, Sittadjody S, Balaganesh M, Sivakumar R, Ravi Sankar B, Balasubramanian K, Srinivasan S, Subramanian C, Thompson DM, Queimado L, Srinivasan N. Dihydrotestosterone is a determinant of calcaneal bone mineral density in men. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 117(4–5): 132–8, 2009.
61. Imperato-McGinley J, Guerrero L, Gautier T, Peterson RE. Steroid 5 α -reductase deficiency in man: an inherited form of male pseudohermaphroditism. *Science*. 186: 1213–1215, 1974.
62. Jamin C. Androgenetic alopecia. *Ann Dermatol Venereol*. 129 (5 Pt 2):801–3, 2002.
63. Kaufman, Kd. Androgens and alopecia. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 198, (1): 89–95, 2002.
64. Kunelius P, Lukkarinen O, Hannuksela ML, Itkonen O, Tapanainen JS. The effects of transdermal dihydrotestosterone in the aging male: a prospective, randomized, double-blind study. *J Clin Endocrinol Metab*. 87, 1467–1472, 2002.
65. Labrie F, Bélanger A, Cusan L, Gomez JL, Candas B. Marked decline in serum concentrations of adrenal C19 sex steroid precursors and conjugated androgen metabolites during aging. *J Clin Endocrinol Metab*. 82(8): 2396-2402, 1997.
66. Lesko SM, Rosenberg L, Shapiro S. A case-control study of baldness in relation to myocardial infarction in men. *J. Amer. Med. Assoc*. 269: 998–1003, 1993.
67. Li JY, Li XY, Li M, Zhang GK, Ma FL, Liu ZM, Zhang NY, Meng P. Decline of serum levels of free testosterone in aging healthy Chinese men. *Aging Male*. 8(3-4):203-6, 2005.
68. Li S, Li X, Li J, Deng X, Li Y, Cong Y. Experimental arterial thrombosis regulated by androgen and its receptor via modulation of platelet activation. *Thromb Res*. 121(1): 127–34, 2007.
69. Litman HJ, Bhasin S, Link CL, Araujo AB, McKinlay JB. Serum androgen levels in black, Hispanic, and white men. *J Clin Endocrinol Metab*. Nov;91(11): 4326–34, 2006.
70. Lotufo PA, Chae CU, Ajani UA, Hennekens CH, Manson JE: Male pattern baldness and coronary heart disease. *The Physicians' Health Study*. *Arch Intn Med*. 160: 165–171, 2000.
71. Ly LP, Jimenez M, Zhuang TN, Celermajer DS, Conway AJ. A double-blind, placebo-controlled, randomized trial of transdermal dihydrotestosterone gel on muscular strength, mobility, and quality of life in older men with partial androgen deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 86, 4078–4088, 2001.

72. Maier U. Hormone profile in the aging male. *Sien. Med. Wochenschr.* 151 (18–20): 422–425, 2001.
73. Matilainen V, Koskela P, Keinänen-Kiukaanniemi S. Early androgenetic alopecia as a marker of insulin resistance. *Lancet* 356: 1165–1166, 2000.
74. Meloun M, Hill M, Militky J, Kupka K. Transformation in the PC-aided biochemical data analysis. *Clin Chem Lab Med.* 38: 553–9, 2000.
75. Meloun M, Militky J, Hill M, Brereton RG. Crucial problems in regression modelling and their solutions. *Analyst.* 127 433–50, 2002.
76. Meloun M, Hill M, Militky J, Vrbikova J, Stanicka S, Skrha J. New methodology of influential point detection in regression model building for the prediction of metabolic clearance rate of glucose. *Clin Chem Lab Med.* 42,311–22, 2004.
77. Meusy-Dessolle N, Dang DC. Plasma concentrations of testosterone, dihydrotestosterone, delta 4-androstenedione, dehydroepiandrosterone and oestradiol-17 beta in the crab-eating monkey (*Macaca fascicularis*) from birth to adulthood. *J Reprod Fertil.* 74(2):347–59, 1985.
78. Moverare-Skrtic S, Venken K, Andersson N, Lindberg MK, Svensson J, Swanson C, Vanderschueren D, Oscarsson J, Gustafsson JA, Ohlsson C. Dihydrotestosterone treatment results in obesity and altered lipid metabolism in orchidectomized mice. *Obesity.* 16: 662–672, 2006.
79. Ng MK, Quinn CM, McCrohon JA, Nakhla S, Jessup W, Handelsman DJ, Celermajer DS, Death AK. Androgens up-regulate atherosclerosis-related genes in macrophages from males but not females: molecular insights into gender differences in atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* Oct 1;42 (7): 1306–13, 2003.
80. Nielsen TL, Hagen C, Wraae K, Brixen K, Petersen PH, Haug E, Larsen R, Andersen M. Visceral and subcutaneous adipose tissue assessed by magnetic resonance imaging in relation to circulating androgens, sex hormone-binding globulin, and luteinizing hormone in young men. *J Clin Endocrinol Metab.* Jul;92(7): 2696–705, 2007.
81. Oh BR, Kim SJ, Moon JD, Kim HN, Kwon DD, Won YH, Ryu SB, Park YI. Association of benign prostatic hyperplasia with male pattern baldness. *Urology.* 51: 744–748, 1998.
82. Ohlsson C, Barret-Connor E, Bhasin S, Orwoll E, Labrie F, Larsson MK, Ljunggren O, Vandenput L, Mellstrom D, Tiveste A. High serum testosterone is associated with reduced risk of cardiovascular events in elderly men. The MrOS (Osteoporotic fractures in men) study in Sweden. *J. Am. Coll. Cardiol.* 58(16), 674–1681, 2010.
83. Opstad PK. The hypothalamo-pituitary regulation of androgen secretion in young men after prolonged physical stress combined with energy and sleep deprivation. *Acta Endocrinol (Copenh).* Sep;127(3): 231–6, 1992.
84. Orwoll ES, Nielson CM, Labrie F, Barrett-Connor E, Cauley JA, Cummings SR, Ensrud K, Karlsson M, Lau E, Leung PC, Ljunggren O, Mellström D, Patrick AL, Stefanick ML, Nakamura K, Yoshimura N, Zmuda J, Vandenput L, Ohlsson C. for the Osteoporotic Fractures in Men (MrOS) Research Group: Evidence for

- Geographical and Racial Variation in Serum Sex Steroid Levels in Older Men. *J Clin Endocrinol Metab.* Jul 28, 2010.
85. Page ST, Amory JK, DuBois Bowman F, Bradley D, Anawalt D, Matsumoto M, Brenner WJ, Tenover JL. Exogenous testosterone (T) alone or with finasteride increases physical performance, grip strength, and lean body mass in older men with low serum. *T. J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 1502-1510, 2005.
 86. Pirke KM, Doerr P. Age related changes in free plasma testosterone, dihydrotestosterone and oestradiol. *Acta Endocrinol (Copenh).* Sep;80(1): 171–8, 1975.
 87. Pospíšilová H, Vaňková M, Hill M, Meloun M, Bendlová B, Dušková M, Stárka L. The differences between aromatizable and non-aromatizable androgens in relation to body composition and metabolic syndrome risk factors in men. *J Steroid Biochem Mol Biol.* Mar 6., 2012.
 88. Potter LK, Zager MG, Barton HA. Mathematical model for the androgenic regulation of the prostate in intact and castrated adult male rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 291(5):E952-64. 2006.
 89. Qiu Y, Yanase T, Hu H, Tanaka T, Nishi Y, Liu M, Sueishi K, Sawamura T, Nawata H. Dihydrotestosterone suppresses foam cell formation and attenuates atherosclerosis development. *Endocrinology.* 151(7): 3307–16, 2010.
 90. Rasmussen LE, Buss IO, Hess DL, Schmidt MJ. Testosterone and dihydrotestosterone concentrations in elephant serum and temporal gland secretions. *Biol Reprod.* 30(2):352-62, 1984.
 91. Rolf HJ, Fischer K. Serum testosterone (T) and 5-alpha-dihydrotestosterone (DHT) in male fallow deer (*Dama dama* L.): seasonality and age dependence. *Comp Biochem Physiol A.* 95(3):445-52, 1990.
 92. Roth MY, Page ST. A role for dihydrotestosterone treatment in older men? *Asian J. Androl.* 13, 199–200, 2011.
 93. Saksena SK, Lau IF. Variations in serum androgens, estrogens, progestins, gonadotropins and prolactin levels in male rats from prepubertal to advanced age. *Exp Aging Res.* 5(3):179-94, 1979.
 94. Sasmaz S, Senol M, Ozcan A, Dogan G, Tuncer C, Akyol O, Sener S. The risk of coronary heart disease in men with androgenetic alopecia. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 12(2):123–5, 1999.
 95. Sato T, Matsumoto T, Yamada T, Watanabe T, Kawano H, Kato S. Late onset of obesity in male androgen receptor-deficient (AR KO) mice. *Biochem Biophys Res Commun.* Jan 3;300 (1): 167–71, 2003.
 96. Scatà MC, Napolitano F, Casu S, Carta A, De Matteis G, Signorelli F, Annicchiarico G, Catillo G, Moioli B. Ovine acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase 1- molecular characterization, polymorphisms and association with milk traits. *Anim Genet.* Oct;40(5): 737–42, 2009
 97. Sedláčková B, Dušátková L, Zamrazilová H, Matucha P, Bičíková M. 7-oxygenated derivatives of dehydroepiandrosterone and obesity. *Prague Med Rep.* 113 (2): 147-155, 2012.
 98. Shahar E, Heiss G, Rosamond WD, Szklo M. Baldness and myocardial infarction in men: the atherosclerosis risk in communities study. *Am J Epidemiol.* 15;167 (6): 676–83, 2008.

99. Signorelli SS, Barresi V, Musso N, Anzaldi M, Croce E, Fiore V, Condorelli DF. Polymorphisms of steroid 5-alpha-reductase type I (SRD5A1) gene are associated to peripheral arterial disease. *J Endocrinol Invest.* 31(12): 1092–7, 2008.
100. Singh R, Artaza JN, Taylor WE, Gonzalez-Cadavid NF, Bhasin S. Androgens stimulate myogenic differentiation and inhibit adipogenesis in C3H 10T1/2 pluripotent cells through an androgen receptor-mediated pathway. *Endocrinology.* Nov;144(11): 5081–8, 2003.
101. Sodergard R, Backstrom T, Shanbhag V, Carstensen H. Calculation of free and bound fractions of testosterone and estradiol-17 β to human plasma protein at body temperature. *J. Steroid Biochem.* 16, 801–810, 1982.
102. Somjen D, Kohen F, Gayer B, Knoll E, Many A, Stern N. Dihydrotestosterone and estradiol-17 β mutually neutralize their inhibitory effects on human vascular smooth muscle cell growth in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol.* Feb;113(3–5): 171–6, 2009.
103. Stárka L, Pospíšilová H, Hill M. Free testosterone and free dihydrotestosterone throughout the life span of men. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 116(1-2): 118-20, 2009.
104. Stárka L, Dusková M, Hill M. Dihydrotestosterone and testosterone throughout the life span of Czech men. *Neuro Endocrinol Lett.* Apr;29(2): 201–4, 2008.
105. Tchernof A, Labrie F. Dehydroepiandrosterone, obesity and cardiovascular disease risk: a review of human studies. *Eur J Endocrinol.* 151(1): 1-14, 2004.
106. Thiboutot D, Harris G, Iles V, Cimis G, Gilliland K, Hagari S. Activity of the type 15 alpha-reductase exhibits regional differences in isolated sebaceous glands and whole skin. *J Invest Dermatol.* 105(2):209–14, 1995.
107. Trevisan M, Farinaro E, Krogh V, Jossa F, Giumetti D, Fusco G, Panico S, Mellone C, Frascatore S, Scottoni A. Baldness and coronary heart disease risk factors. *J Clin Epidemiol.* 46(10): 1213–8, 1993.
108. Trygg J, Wold S. Orthogonal projections to latent structure, *J. Chemometrics.* 16, 119-128, 2002.
109. Trygg J, Holme E, Lundstedt T. Chemometrics in metabonomics. *J. Proteome. Res.* 6 (2) 469-479, 2007.
110. Uemura M, Tamura K, Chung S, Honma S, Okuyama A, Nakamura Y, Nakagawa H. Novel 5 alpha-steroid reductase (SRD5A3, type-3) is overexpressed in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Sci.* 99(1): 81–6, 2008.
111. Vandenput L, Mellstrom D, Lorentzon M, Swanson C, Karlsson MK, Brandberg J, Lonn L, Orwoll E, Smith U, Labrie F, Ljunggren O, Tivesten A, Ohlsson C. Androgens and glucuronidated androgen metabolites are associated with metabolic risk factors in men. *J Clin Endocrinol Metab.* 92(11): 4130–4137, 2007.
112. van der Merwe J, Brooks NE, Myburgh KH. Three weeks of creatine monohydrate supplementation affects dihydrotestosterone to testosterone ratio in college-aged rugby players. *Clin J Sport Med.*;19(5): 399–404, 2009.
113. Vermeulen A, Verdock L, Kaufman JM. A critical evaluation of simple method for the estimation of free testosterone in serum, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84: 3666–3672, 1999.

114. Wake DJ, Strand M, Rask E, Westerbacka J, Livingstone DE. Intra-adipose sex steroid metabolism and body fat distribution in idiopathic human obesity. *Clin Endocrinol. (Oxf)* 66(3): 440–446, 2007.
115. Wang C, Jackson G, Jones TH, Matsumoto AM, Nehra A. Low testosterone associated with obesity and the metabolic syndrome contributes to sexual dysfunction and cardiovascular disease risk in men with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 34(7): 1669–1675, 2011.
116. Yanes LL, Romero DG. Dihydrotestosterone stimulates aldosterone secretion by H295R human adrenocortical cells. *Mol Cell Endocrinol* 303(1–2): 50–6, 2009.

XII. Vlastní práce

a) impaktované se vztahem k tématu

- Stárka L, Pospíšilová H, Hill M. Free testosterone and free dihydrotestosterone throughout the life span of men. J Steroid Biochem Mol Biol. 2009;116(1-2): 118-20, **IF=3,053**
- Dušková M, Pospíšilová H. The role of non-aromatizable testosterone metabolite in metabolic pathways, Phys Res 2011, 60: 253-61. **IF=1,43**
- Pospíšilová H, Vaňková M, Hill M, Meloun M, Bendlová B, Dušková M, Stárka L. The differences between aromatizable and non-aromatizable androgens in relation to body composition and metabolic syndrome risk factors in men. J Steroid Biochem Mol Biol. 2012 132(1-2): 105-111. **IF=3,053**

b) neimpaktované se vztahem k tématu

- Dušková M, Pospíšilová H, Hill M, Stárka L. Obesity, circulating androgens and their precursors, J. Steroids Hormon Sci 2013; S11: 001. Doi: 10.4172/2157-7536.S11-001

c) impaktované bez vztahu k tématu

- Dušková M, Šimůnková K, Hill M, Velíková M, Kubátová J, Kancheva L, Kazihnitková H, Hruškovičová H, Pospíšilová H, Rácz B, Salátová M, Cirmanová V, Králíková E, Stárka L, Pařízek A. Chronic cigarette smoking alters circulating sex hormones and neuroactive steroids in premenopausal women, Phys Res, 2012 Mar 6;61(1):97-111 **IF= 1,646**
- Hruškovičová H, Dušková M, Šimůnková K, Hill M, Pospíšilová M, Rácz B, Králíková K, Vondra K, Stárka L. Effects of Smoking Cessation on Hormonal Levels in Men, Physiol Res. 2012 Nov 22. **IF =1,555**

d) neimpaktované bez vztahu k tématu

- Dušková M, Šimůnková K, Hill M, Velíková M, Kubátová J, Hruškovičová H, Pospíšilová H, Rácz B, Cirmanová V, Králíková E, Stárka L. Cigarette Smoking and Progesterone and Androgen Metabolites in Premenopausal Women, *Horm Mol Biol Clin Invest* 2011; 6(3):259-264.
- Dušková M, Šimůnková K, Hill M, Hruškovičová H, Pospíšilová H, Králíková E, Stárka L. Hyperandrogenism with women smokers and its role in the prediction of smoking cessation treatment success. *Giornale Italiano di Obstetricia e Ginecologia*, 2012, 34(1): 167-168.

e) abstrakta se vztahem k tématu

Autor ústního sdělení:

- Pospíšilová H., Dušková M., Šimůnková K., Hruškovičová H., Kubátová J., Hill M., Bendlová B., Králíková E., Stárka L. Vztah steroidního spektra a antropometrických údajů – pilotní vztahy ze studie odvykání kouření, *Imunoanalýza* 2010; Lubochňa
- Pospíšilová H, Dušková M, Hill M, Meloun M, Bendlová B, Vaňková M, Stárka L: Vliv aromatizovatelných a nearomatizovatelných steroidů na antropometrické parametry. *Imunoanalýza* 2011; Lubochňa
- Pospíšilová H, Vaňková M, Hill M, Meloun M, Bendlová B, Dušková M, Stárka L. Úloha dihydrotestosteronu v rozvoji metabolického syndromu. *Imunoanalýza* 2012; Lubochňa
- Pospíšilová H, Dušková M, Hill M, Stárka L. Změny steroidogeneze v závislosti na nárůstu hmotnosti. *Endokrinologické dny Bratislava*, 2012

Autor posterového sdělení:

- Pospíšilová H., Dušková M., Hill M., Stárka L.: Vztah hladin DHT a metabolických parametrů, *Endokrinologické dny, Český Krumlov*, 2009
- Pospíšilová H., Dušková M., Hill M., Stárka L.: Vztah hladin DHT a metabolických parametrů, *Aterosklerotický kongres, Špindlerův Mlýn*, 2009

- Pospíšilová H., Dušková M., Hill M., Stárka L. Influence of steroid hormones on anthropometric parameters in men, *Endocrine Abstract*, 12th European congress of Endocrinology, 2010, Vol 22; P 732
- Pospíšilová H., Dušková M., Hill M., Vanková M., Bendlová B., Stárka L.: Vliv aromatizovatelných a nearomatizovatelných steroidů na antropometrické parametry, *Endokrinologické dny*, 2010, Košice, 95.
- Pospíšilová H., Simunkova K, Dušková M., Hill M., Vanková M., Bendlová B., Stárka L: Vliv aromatizovatelných a nearomatizovatelných steroidů na antropometrické parametry, *Aterosklerotický kongres*, 2010, Špindlerův Mlýn
- Pospíšilová H, Dušková M, Hill M, Meloun M, Bendlová B, Vanková M, Stárka L: Vliv aromatizovatelných a nearomatizovatelných steroidů na antropometrické parametry, *Endokrinologické dny*, 2011, Brno.
- Pospíšilová H., Dušková M., Hill M., Meloun M., Bendlová B., Vanková M., Stárka L.: Vztah antropometrických a metabolických parametrů ke steroidnímu spektru, *Aterosklerotický kongres*, 2011, Špindlerův Mlýn
- Pospíšilová H, Vaňková M, Hill M, Meloun M, Bendlová B, Dušková M, Stárka L. The influence of aromatizable and non-aromatizable steroids on anthropometric parameters. *Endocrine Abstract*, 14th European congress of Endocrinology, 2012
- Pospíšilová H, Dušková M, Hill M, Stárka L: The influence of androgens on anthropometric parameters. 15th ICHSHC, Kanazawa, Japonsko, 2012
- Pospíšilová H, Dušková M, Hill M, Stárka L: Změny hladin androgenů v průběhu života a jejich vliv v rozvoji některých onemocnění, XVI. kongres o ateroskleróze, Špindlerův mlýn, 2012

Spoluautor posterového sdělení:

- Dušková M., Pospíšilová H., Hill M., Stárka L.: Průběh hladin celkového a volného dihydrotestosteronu během života, *Endokrinologické dny*, Český Krumlov, 2009

- Dušková M, Hill M, Pospíšilová H, Stárka L: Změny metabolického profilu u mužů s androgenní alopecii léčených 1mg finasteridu, Aterosklerotický kongres, Špindlerův Mlýn, 2009
- Dušková M, Simunkova K, Pospíšilová H, Hill M, Stárka L: Steroid hormones and fat distribution in men, Congress on Steroid Research, Chicago, 2011

f) abstrakta bez vztahu k tématu

Spoluautor ústního sdělení:

- Dušková M, Šimůnková K, Hill M, Velíková M, Kubátová J, Hruškovičová H, Pospíšilová H, Králíková E, Stárka L: Vliv odvykání kouření na steroidní spektrum, Imunoanalýza 2011; Lubochňa
- Hruškovičová H, Dušková M, Pospíšilová H, Hill M, Vondra K, Stárka L. Neuroaktivní steroidy a závislosti. Imunoanalýza 2012; Lubochňa
- Dušková M, Hruškovičová H, Pospíšilová H : The effect of smoking and smoking cessation on the endocrine systém. The 4th European Seminar on Methodology of Clinical Research in Smoking, Paris, 2010

Autor posterového sdělení:

- Pospíšilová H, Dušková M, Šimůnková K, Hill M, Hruškovičová H, Králíková E, Stárka L: Influence of smoking cessation on steroid spectrum in premenopausal women, Endocrine Abstract, 13th European congress of Endocrinology, 2011, Vol 26; P 127
- Pospíšilová H., Žofková I., Dušková M., Hruškovičová H., Šimůnková K., Hill M., Králíková E.: Význam kvantitativních charakteristik nikotinu na stupeň poškození ženského skeletu, Osteologický kongres 2011, Hradec Králové
- Pospíšilová H, Dušková M, Šimůnková K, Hill M, Hruškovičová H, Králíková E, Stárka L: Influence of cigarette smoking on steroid spectrum in fertile women, The Oocyte: from Basic Research to Clinical Practice, 2011, Barcelona

- Pospíšilová H, Žofková I, Dušková M, Hruškovičová H, Šimůnková K, Hill M, Stárka L, Králíková E. The significance of the quantitative characteristics of nicotine in relation to the level of female skeleton damage. Congress on osteology, 2012, Bordeaux

Spoluautor posterového sdělení:

- Dušková M, Hruškovičová H, Pospíšilová H, Hill M, Králíková E, Stárka L: Vliv kouření na hormonální homeostázu, Endokrinologické dny 2010, Košice, 23.
- Dušková M, Šimůnková K, Hill M, Hruškovičová H, Pospíšilová H, Králíková E, Stárka L: Cigarette smoking and progesterone and androgen metabolites in premenopausal women, Endocrine Abstract, 13th European congress of Endocrinology, 2011, Vol 26; P 126
- Dušková M, Šimůnková K, Hill M, Velíková M, Kubátová J, Hruškovičová H, Pospíšilová H, Králíková E, Stárka L: Vliv odvykání kouření na steroidní spektrum, Endokrinologické dny, 2011, Brno.
- Dušková M, Šimůnková K, Hill M, Velíková M, Kubátová J, Hruškovičová H, Pospíšilová H, Králíková E, Stárka L: Změny ve steroidním spektru při odvykání kouření a predikce úspěšnosti, Aterosklerotický kongres, 2011, Špindlerův Mlýn
- Dušková M, Šimůnková K, Hill M, Hruškovičová H, Pospíšilová H, Králíková E, Stárka L: Hyperandrogenism with women smokers and its role in the prediction of smoking cessation treatment success. 15th world congress of gynecological endocrinology, 2012, Firenze, Italy
- Dušková M, Pospíšilová H, Žofková I, Hruškovičová H, Šimůnková K, Hill M, Stárka L, Králíková E. The relation between quantitative characteristics of smoking and level of female skeleton damage. Endocrine Abstract, 14th European congress of Endocrinology, 2012
- Hruškovičová H, Dušková M, Pospíšilová H, Šimůnková K, Hill M, Vondra K, Stárka L. Effect of smoking cessation on hormonal balance. Endocrine Abstract, 14th European congress of Endocrinology, 2012
- Hruškovičová H, Dušková M, Hill M, Pospíšilová H, Šimůnková K, Králíková E, Vondra K, Stárka L. Vliv odvykání kouření na hormonální hladiny u mužů. Endokrinologické dny Bratislava, 2012

- Duskova M, Simunkova K, Hill M, Hruskovicova H, Pospisilova H, Starka L. Influence of smoking cessation on steroid metabolism. 15th ICHSHC, Kanazawa, Japonsko, 2012
- Dušková M, Hruškovičová H, Hill M, Pospíšilová H, Králíková E, Stárka L: Vliv přerušení kouření na steroidní spektrum, XVI. kongres o ateroskleróze, Špindlerův mlýn, 2012

XIII. Seznam příloh

- I. Stárka L, Pospíšilová H, Hill M. Free testosterone and free dihydrotestosterone throughout the life span of men. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2009; 116(1-2): 118-20.
- II. Dušková M, Pospíšilová H. The role of non-aromatizable testosterone metabolite in metabolic pathways, *Phys Res* 2011, vol. 60, p. 253-61.
- III. Pospíšilová H, Vaňková M, Hill M, Meloun M, Bendlová B, Dušková M, Stárka L. The differences between aromatizable and non-aromatizable androgens in relation to body composition and metabolic syndrome risk factors in men. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2012; 132(1-2): 105-111.
- IV. Dušková M, Pospíšilová H, Hill M, Stárka L. Obesity, circulating androgens and their precursors, *J. Steroids Hormon Sci* 2013; S11: 001. Doi: 10.4172/2157-7536.S11-001

**Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta
Kateřinská 32, Praha 2**

Prohlášení zájemce o nahlédnutí

do závěrečné práce absolventa studijního programu

uskutečňovaného na 1. lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Praze

Jsem si vědom/a, že závěrečná práce je autorským dílem a že informace získané nahlédnutím do zpřístupněné závěrečné práce nemohou být použity k výtěžným účelům ani nemohou být vydávány za studijní, vědeckou nebo jinou tvůrčí činnost jiné osoby než autora.

Byl/a jsem seznámen/a se skutečností, že si mohu pořizovat výpisy, opisy nebo kopie závěrečné práce, jsem však povinen/a s nimi nakládat jako s autorským dílem a zachovávat pravidla uvedená v předchozím odstavci.

Příjmení, jméno (hůlkovým písmem)	Číslo dokladu totožnosti vypůjčitele (např. OP, cestovní pas)	Signatura závěrečné práce	Datum	Podpis