

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta



**VLIV VYBRANÝCH ENDOKRINNÍCH DISRUPTORŮ NA
LIDSKOU SPERMATOGENEZI**

**(Polychlorované bifenylly a bisfenol A v mužské
reprodukci)**

Mgr. Jana Vítků

2015

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor:

Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady:

Prof. MUDr. Jaroslav Pokorný DrSc.

Školící pracoviště:

Endokrinologický ústav, Národní 8, Praha 1

Školitel:

Ing. Martin Hill, DrSc.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Obsah

| | |
|---|----|
| Souhrn | 4 |
| Summary | 5 |
| 1 Úvod | 6 |
| 2 Pracovní hypotéza | 7 |
| 3 Cíle disertační práce | 8 |
| 4 Materiál a metodika | 8 |
| 4.1 Účastníci studie | 8 |
| 4.2 Sběr vzorků | 9 |
| 4.3 Kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí .. | 10 |
| 4.4 Další měření | 10 |
| 4.5 Statistická analýza | 10 |
| 5 Výsledky | 11 |
| 5.1 Vývin metody na stanovení steroidů a BPA v plasmě a seminální plasmě na UHPLC-MS/MS | 11 |
| 5.2 Rozdíly v hladinách ED, steroidů a dalších relevantních analytů u 4 skupin mužů s různým stupněm neplodnosti | 12 |
| 5.3 Vliv vybraných ED na parametry spermiogramu | 12 |
| 5.4 Vliv vybraných ED na aktivitu 11 β HSD a dalších enzymů | 13 |
| 5.5 Vliv vybraných ED na hladiny imunoaktivních a dalších steroidů | 14 |
| 5.6 Vliv vybraných ED na hladiny stopových prvků | 14 |
| 5.7 Korelace jednotlivých analytů v plasmě a seminální plasmě | 14 |
| 6 Diskuse | 15 |
| 7 Závěry | 17 |
| 8 Literatura | 18 |
| 9 Seznam vlastních prací | 21 |

Souhrn

Steroidní hormony hrají důležitou roli během spermatogeneze, v produkci spermatu a v neposlední řadě také v udržování sekundárních mužských pohlavních znaků a libida. Jsou také diskutovaným cílem pro látky, které se nazývají endokrinní disruptory (ED).

Cílem mé disertační práce bylo vyvinout a zvalidovat metodu pro stanovení bisfenolu A (BPA) a spektra steroidů v plasmě a seminální plasmě a tuto metodu společně s dalšími ukazateli využít k vyhodnocení vlivu BPA a polychlorovaných bifenyliů (PCB) na lidskou spermatogenezi a steroidogenezi.

Byly vyvinuty 2 nové metody na stanovení BPA a 11 steroidů v plasmě a seminální plasmě a tyto metody byly použity ke stanovení 191 vzorků v obou tělních tekutinách u mužů s různým stupněm neplodnosti. Současně byly v plasmě stanoveny hladiny 6 kongenerů PCB, gonadotropinů, selenu a zinku. K vyhodnocení vztahů mezi všemi analyty byly použity parciální korelace adjustované na věk a BMI.

BPA v seminální plasmě negativně koreloval s koncentrací spermií, celkovým počtem spermií a jejich morfologií. Tyto vztahy byly zjištěny jen pro BPA v seminální plasmě, což poukazuje na unikátnost této tělní tekutiny ve studiu ED. V seminální plasmě BPA negativně koreloval s hladinami steroidních prekurzorů (pregnenolon, 17 α -hydroxy-pregnenolon), opačné vztahy byly zaznamenány pro BPA a steroidní prekurzory v krevní plasmě. V obou tělních tekutinách byly zjištěny pozitivní korelace BPA s hladinami estrogenů. Součet hladin kongenerů PCB negativně koreloval s koncentrací testosteronu, volného testosteronu a dihydrotestosteronu v plasmě.

BPA negativně přispívá k výsledné kvalitě spermií. Výsledky naznačují odlišný vliv BPA na gonadální a adrenální steroidogenezi a následné narušení steroidogeneze i v dalších krocích. Hladiny PCB v životním prostředí u studované skupiny mužů překvapivě neměly vliv na kvalitu spermií, ale snižovaly koncentrace androgenů v plasmě.

Summary

Steroid hormones in testis play an important role in spermatogenesis, maintenance of the male reproductive tract and production of semen. They are also discussed as a target for substances called endocrine disruptors (EDs).

The aim of the PhD. thesis was to develop and validate a method for determination of bisphenol A (BPA) and steroid spectrum in plasma and seminal plasma and to shed more light into mechanisms of ED action and effects of BPA and polychlorinated biphenyls (PCBs) on human spermatogenesis and steroidogenesis.

Two new liquid-chromatography mass spectrometry methods for determination of BPA and 11 steroids in plasma and seminal plasma were developed. The methods were used for estimation of analyte concentrations in 191 men with a different degree of fertility. Concurrently, the levels of six congeners of PCBs, gonadotropins, selenium and zinc in plasma were estimated. Partial correlations adjusted for age and BMI were calculated to evaluate relationships between these analytes.

Seminal BPA, but not plasma BPA, was negatively associated with sperm concentration, sperm count and morphology. These relationships were observed only in seminal plasma BPA, which indicates the uniqueness of seminal plasma in the ED research. BPA in seminal plasma negatively correlated with seminal steroid precursors (pregnenolone, 17α -hydroxy-pregnenolone), on the other hand, the opposite results were found for BPA and steroid precursors in plasma. The sum of PCB congeners was negatively associated with testosterone, free testosterone and dihydrotestosterone in plasma.

BPA negatively contributes to the final state of sperm quality. Moreover, the present data indicate that BPA influence human gonadal and adrenal steroidogenesis at various steps. Environmental levels of PCBs in our study population negatively correlated with androgen levels, but surprisingly without negative effects on sperm quality.

1 Úvod

V posledních dekádách se do životního prostředí dostávají antropogenní činností tisíce tun různých chemikálií. O těchto látkách se předpokládalo, že nemají žádnou, či mají jen velmi malou biologickou toxicitu. Dnes nás obklopují běžně v každodenním životě, jsou např. ve vzduchu, vodě, půdě, potravinách, elektronice či plastech a nyní se ukázalo, že mnoho z nich má schopnost zasahovat do endokrinního systému. Tyto látky se nazývají endokrinní disruptory (ED). Postupně přibývají důkazy o jejich negativních vlivech jak na živočišnou populaci, tak na lidský organismus [1, 2].

V posledních desetiletích byly také zaznamenány zhoršující se reprodukční funkce u lidí i zvířat. Již v roce 1992 byla publikována rozsáhlá metaanalýza, kde bylo prezentováno postupné snižování počtu spermií u mužů z různých částí světa v průběhu uplynulých padesáti let [3]. Tyto výsledky podpořily i další studie [4-6], naopak některé pokles kvality spermií neprokázaly [7, 8]. Byl zjištěn také sekulární pokles hladin testosteronu u mužů [9, 10].

Carlsenová [3] svoje analýzy dávala do souvislosti právě se zvyšujícím se výskytem chemikálií v prostředí. Kromě kvality spermií byl zaznamenán vyšší výskyt nádorů varlat [11] a vyšší riziko kryptorchismu a hypospadie [12, 13]. Stále častěji se uvažuje, že expozice ED je největší viník těchto problémů. Mezi nejdiskutovanější ED patří polychlorované bifenylly (PCB), dioxiny, ftaláty, a bisfenol A (BPA), a to buď kvůli jejich perzistenci v prostředí a schopnosti bioakumulaci v potravinovém řetězci (PCB, dioxiny), nebo kvůli jejich všudypřítomnosti, např. v obalech na potraviny (BPA, ftaláty).

Lidé jsou vystaveni vlivu ED ve svém každodenním životě a není možné zcela zabránit jejich působení. Hlavními cestami, jak se ED dostanou do organismu, je požití kontaminované potravy a tekutiny, dýchání kontaminovaného vzduchu, či transdermálně [14].

Naopak některé látky přítomné v životním prostředí mohou, pokud jde o mužskou reprodukci, působit příznivě. Mezi ně patří selen a také zinek. Selen (Se) je klíčovým

prvkem pro fyziologický vývoj varlat a neporušenou spermatogenezi [15]. Některé studie prokázaly u mužů s deficitem Se zlepšení motility spermií a zvýšení šance k početí po jeho suplementaci [16]. Obsah zinku (Zn) ve varlatech a v seminální tekutině je vyšší než v ostatních tkáních těla. Zinek má antioxidační vlastnosti a hraje roli v odstraňování reaktivních kyslíkových radikálů. Výsledky několika studií naznačují, že snížení koncentrace Zn v seminální tekutině je rizikový faktor pro fyziologickou tvorbu spermií a jednou z možných příčin poruch mužské plodnosti [17, 18].

Ačkoli účinky některých ED na organismus jsou dobře známé, u jiných stále převládá nejistota a nekonzistence. Cílem disertační práce bylo přispět k objasnění vlivu některých vybraných faktorů vnějšího prostředí na lidskou spermatogenezi a steroidogenezi.

2 Pracovní hypotéza

Jedním z možných mechanismů působení ED by mohlo být ovlivnění aktivity významného enzymu metabolismu steroidů, 11 β -hydroxysteroidní dehydrogenázy (11 β HSD) typu 1 a 2. Isoformy tohoto enzymu chrání testes před nadbytkem glukokortikoidů tak, že upravují lokální poměr kortizolu ke kortizonu ve prospěch kortizonu. Pokud by tento enzym byl inhibován, nadbytečné množství kortizolu v Leydigových buňkách způsobí snížení tvorby testosteronu, který je zásadní pro fyziologickou tvorbu spermií. Dalším důležitým faktorem pro celkový počet, motilitu a morfologii spermií je přiměřená koncentrace některých prvků, konkrétně Zn nebo Se. Všechny tyto vlivy, jak pozitivní (Se a Zn) tak negativní (vysoké hladiny glukokortikoidů a působení endokrinních disruptorů) mají podle naší hypotézy vliv na normospermii.

3 Cíle disertační práce

Cílem disertační práce je přispět k objasnění vlivu některých vybraných faktorů vnějšího prostředí na lidskou spermatogenezi, se zaměřením na steroidy a jejich úlohu v mužské reprodukci. Vytyčené cíle jsou konkrétně tyto:

- 1) Vyvinout metodu na stanovení steroidů a BPA v plasmě a seminální plasmě na vysokoúčinném kapalinovém chromatografu s tandemovou hmotnostní detekcí (UHPLC-MS/MS)
- 2) Vyšetřit rozdíly v hladinách vybraných ED, steroidů a dalších relevantních analytů u 4 skupin mužů s různým stupněm neplodnosti
- 3) Zhodnotit vliv vybraných ED na parametry spermiogramu
- 4) Zhodnotit vliv vybraných ED na aktivitu 11 β HSD a dalších enzymů steroidogeneze.
- 5) Zhodnotit vliv vybraných ED na hladiny imunoaktivních a dalších steroidů.
- 6) Zhodnotit vliv vybraných ED na hladiny vybraných stopových prvků
- 7) Zhodnotit, nakolik spolu korelují jednotlivé analyty v plasmě a seminální plasmě

4 Materiál a metodika

4.1 Účastníci studie

Studovaná skupina se skládala ze 191 mužů, kteří navštěvovali Centrum asistované reprodukce Pronatal v období od dubna 2012 do září 2015. Muži se lišili ve stupni plodnosti. Část souboru zahrnovala muže-normospermiky, kde příčina neplodnosti byla na straně partnerky. Ostatní pacienti měli různé defekty spermií od mírných defektů až po azospermiky. Každý pacient podstoupil standardizované vyšetření ejakulátu (spermiogram), které probíhalo podle kritérií Světové zdravotnické organizace (WHO) z roku 2010. Všichni pacienti podstoupili základní urologické a andrologické

vyšetření včetně ultrasonografie prostaty, seminálních váčků a varlat, kde nebyly zjištěny žádné patologické nálezy. Dále byla zaznamenána jejich váha a výška.

Muži byli rozděleni na základě výsledků spermioqramu do 4 skupin. První skupina (n=89) zahrnovala muže s normospermii, do druhé (n=59) byli zařazeni muži s oligospermii, asthenospermii a oligoasthenospermii, třetí skupina (n=25) obsahovala muže s teratospermii, oligoasthenoteratospermii či oligoteratospermii a v poslední skupině byli muži-azoospermici (n=18). Tyto skupiny jsme pojmenovali jako zdravé muže (1.sk), a dále mírně (2.sk), středně (3.sk) a těžce (4.sk) neplodné muže.

Studie byla vedena v souladu s Helsinskou deklarací vydanou Světovou lékařskou asociací (WMA). Protokol byl schválen etickou komisí Endokrinologického ústavu. Každý pacient podepsal informovaný souhlas před zařazením do studie a odběrem biologického materiálu.

4.2 Sběr vzorků

Od každého pacienta byl odebrán vzorek krve do zkumavek pro nesrážlivou krev obsahující ethylendiamintetraoctovou kyselinu (EDTA) a vzorek ejakulátu. Plasma byla získána 10-ti minutovou centrifugací při 1500g. Ejakulát byl centrifugován 10 minut při 2000g a supernatant - seminální plasma - byla následně převedena do nové zkumavky. Vzorky byly uloženy v teplotě -20°C a rezervní vzorky při -80°C až do doby, kdy byly zpracovány. Všechny kroky v pracovním postupu včetně skladování byly provedeny ve skle a za užívání skleněných pomůcek, abychom se vyhnuli kontaminaci BPA. Doba stání krve v odběrové zkumavce byla snížena na minimum a bylo ověřeno, že touto cestou nedochází ke kontaminaci. Více se tímto problémem zabýváme ve článku Vítků a kol. 2015a [19].

4.3 Kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí

Pro stanovení steroidů a BPA v plasmě a seminální plasmě byla použita kapalinová chromatografie Eksigent ultraLC 110 (Redwood City, CA, USA), která byla vybavena kolonou Kinetex C18 (100 x 3.0 mm, 2.6 μm , příp. 1.7 μm ; Phenomenex, Torrance, CA, USA) a předkolonou Security Guard ULTRA cartridge system (UHPLC C18 pro 3mm průměr kolony; Phenomenex, Torrance, CA, USA).

Detekce analytů byla prováděna na hmotnostním detektoru API 3200 od firmy AB Sciex (AB Sciex, Concord, Kanada), kde probíhala ionizace elektrosprejem v pozitivním módu.

4.4 Další měření

Kromě steroidů a BPA měřených pomocí kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní detekcí byly změřeny koncentrace LH, FSH a globulin vázající pohlavní hormony (SHBG), DHT, Se a Zn a 6 kongenerů PCB (PCB 28, 101, 118, 138, 153, 180).

4.5 Statistická analýza

Na základě běžné praxe byla data pod limitem detekce (LOD) nahrazena hodnotou $\text{LOD}/\sqrt{2}$ [20]. Všechna data byla transformována kvůli významné šikmosti, špičatosti a nekonstatnímu rozptylu (heteroskedasticitě) pomocí Box-Coxovy transformace směrem k symetrii rozdělení data a reziduí a ke konstantnímu rozptylu (homoskedasticitě). Rozdíly mezi skupinami v jednotlivých analytech byly vyhodnoceny jednofaktorovou analýzou variance, která byla následována vícenásobným porovnáním metodou nejmenších významných rozdílů. Tyto statistické operace byly provedeny v softwaru Statgraphics Centurion XVI od firmy Statpoint Inc. (Warrenton, VA, USA). Vícerozměrná korelační analýza a s tím související

vyhledání vícerozměrných nehomogenit byly provedena v software NCSS 2007 (Kaysville, UT, USA).

5 Výsledky

5.1 Vývin metody na stanovení steroidů a BPA v plasmě a seminální plasmě na UHPLC-MS/MS

Systém UHPLC-MS/MS, který máme v laboratoři, neumožnil stanovení všech steroidů bez větší přípravy kvůli malé citlivosti. Proto bylo nutné použít derivatizační činidlo, abychom zvýšili citlivost a rozlišení. Po vyzkoušení několika různých derivatizačních činidel byly vybrány 2 derivatizační činidla - 2-hydrazinopyridin pro stanovení steroidů s ketoskupinou a dansyl chlorid pro stanovení analytů s fenolovou skupinou - estrogenů (estron, 17 β -estradiol, estriol) a BPA.

Obě metody byly optimalizovány jak z hlediska množství derivatizačního činidla, délky jeho působení a dalších kroků, jako je volba chromatografické kolony a nastavení vhodných podmínek pro hmotový spektrometr. Metoda na stanovení BPA a estrogenů byla navíc testována pro vyloučení možné kontaminace během pracovního postupu. Druhá metoda umožnila stanovit 10 steroidů v plasmě [kortizol, kortizon, dehydroepiandrosteron (DHEA) a jeho 7-hydroxylované metabolity (7 α -OH-DHEA, 7 β -OH-DHEA, 7-oxo-DHEA), pregnenolon (PREG), 17 α -hydroxy-pregnenolon (17-OH-PREG), Testosteron (T) a androstendion (ADION)] a 11 steroidů v seminální plasmě [navíc dihydrotestosteron (DHT)].

Metody byly publikovány v časopisech s impakt faktorem, kde je detailněji popsán pracovní postup a výsledky validace [19, 21].

5.2 Rozdíly v hladinách ED, steroidů a dalších relevantních analytů u 4 skupin mužů s různým stupněm neplodnosti

Průměrný věk (\pm SD) všech účastníků studie byl 35.8 ± 5.6 let a průměrná hodnota BMI (\pm SD) byla 27.2 ± 3.6 kg/m². Do studie bylo zařazeno 55% mužů trpících nadváhou (BMI 25-30) a 20% obézních (BMI >30). Věk i hodnoty BMI se významně nelišily mezi 4 sledovanými skupinami mužů .

BPA byl detekován v 89% plasmatických vzorcích a v 93% seminálních vzorcích. Mezi nejhojnější kongenery PCB se zařadili PCB 180 a PCB 153 (detekovány v 99 a 100% vzorků). Dále následovaly PCB 138 (v 96 % vzorků), PCB 118 (v 56 % vzorků), PCB 101 (v 8 % vzorků) a PCB 28 (5%).

Hladiny seminálního BPA se zvyšovaly směrem k těžce neplodným mužům. Plasmatické hladiny BPA byly významně vyšší u mírně a středně neplodných mužů v porovnání se zdravými a těžce neplodnými muži. Součet hladin kongenerů byl nižší u mírně neplodných mužů v porovnání s ostatními skupinami. Pro samostatné kongenery PCB 101 a 28 nebylo vícenásobné porovnání provedeno z důvodu malého počtu vzorků s koncentracemi nad limitem detekce. Vícenásobné porovnání bylo provedeno stejným způsobem i pro steroidy v plasmě a seminální plasmě a další relevantní analyty v plasmě (LH, FSH, SHBG, Se, Zn) a steroidy v plasmě.

5.3 Vliv vybraných ED na parametry spermioqramu

Pomocí parciálních korelací adjustovaných na věk a BMI byly vyhodnoceny vztahy mezi jednotlivými ED a parametry spermioqramu – celkovým počtem spermií, koncentrací spermií, motilitou a morfologií (Tab. 1).

Hladiny BPA v seminální tekutině negativně korelovaly s koncentrací, celkovým počtem spermií a morfologií, na druhou stranu tyto závislosti nebyly zjištěny u BPA v plasmě. Zde byla pozorována pozitivní korelace mezi BPA a počtem neprogresivně pohyblivých spermií. Hladiny PCB v plasmě

překvapivě pozitivně korelovaly s koncentrací a celkovým počtem spermií.

Tab. 1. Vliv vybraných ED na parametry spermiogramu

| Parametry spermiogramu | Σ 6 PCB kongenerů v plasmě | | BPA v plasmě | | BPA v seminální plasmě | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------|--------------|-------------------|------------------------|-------------------|
| | <i>r</i> | <i>p</i> -hodnota | <i>r</i> | <i>p</i> -hodnota | <i>r</i> | <i>p</i> -hodnota |
| | Koncentrace (10 ⁶ /mL) | 0.273 | 0.000 | -0.119 | 0.134 | -0.212 |
| Celkový počet | 0.308 | 0.000 | -0.115 | 0.146 | -0.178 | 0.018 |
| Motilita | 0.069 | 0.376 | 0.139 | 0.079 | -0.106 | 0.164 |
| - Progresivně pohyblivé spermie | 0.112 | 0.147 | 0.095 | 0.233 | -0.122 | 0.108 |
| - Neprogresivně pohyblivé spermie | -0.064 | 0.411 | 0.192 | 0.014 | -0.039 | 0.606 |
| - Nepohyblivé spermie | -0.027 | 0.723 | 0.071 | 0.373 | -0.037 | 0.626 |
| Morfologie | 0.099 | 0.223 | -0.029 | 0.729 | -0.156 | 0.049 |

5.4 Vliv vybraných ED na aktivitu 11βHSD a dalších enzymů

Pro zjištění aktivity některých enzymů steroidogeneze byly koncentrace steroidů dány do poměrů – vždy prekurzor ku produktu a hledány závislosti s vybranými ED. Vztahy jsou uvedeny jako parciální korelace adjustované na věk a BMI. Korelace podílů s plazmatickými ED byly vypočítány z plasmatických hladin, korelace se seminálním BPA byly spočítány z poměrů hladin steroidů v seminální plasmě.

Významné parciální korelace byly nalezeny pro PCB a poměry Androstendion/T a T/DHT odpovídající enzymům 17βHSD a 5α-reduktáze. V periférii byl BPA asociován s poměrem kortizol/kortizon (enzym 11βHSD), DHEA/androstendion (enzym 3βHSD), androstendion/T (enzym 17βHSD či aldoketoreduktáza AKR1C3) a T/E2 (enzym aromatáza). Naopak v seminální plasmě nebyl nalezen žádný vztah mezi BPA a poměry steroidů, což naznačuje spíše ovlivnění systémových enzymů

steroidogeneze uložených v nadledvinách a periferních tkáních.

5.5 Vliv vybraných ED na hladiny imunoaktivních a dalších steroidů

Pro hodnocení vztahů mezi imunoaktivními steroidy a ED byly opět vypočítány parciální korelace adjustované na věk a BMI. Pro úplnost byly zjištěny i korelace s plasmatickými gonadotropiny a SHBG. Hladiny plasmatických ED byly korelovány s plasmatickými hladinami analytů a koncentrace BPA v seminální plasmě byla korelována s koncentracemi steroidů v seminální plasmě. Nebyl zde patrný vliv BPA ani PCB na hladiny plasmatických gonadotropinů a SHBG. Koncentrace 6 kongenerů PCB negativně korelovala s plasmatickými androgeny - T, DHT i volným T. Opačné výsledky byly pozorovány u BPA v plasmě a seminální plasmě u steroidů na začátku steroidní biosyntézy: BPA v plasmě pozitivně koreloval s PREG, 17-OH-PREG a DHEA v plasmě, naopak BPA v seminální plasmě s PREG a 17-OH-PREG koreloval negativně. Dále BPA v plasmě i seminální plasmě koreloval s plasmatickými, resp. seminálními estrogeny. Kromě pozitivní korelace mezi plasmatickým DHEA a BPA v plasmě nebyly zaznamenány žádné další významné vztahy mezi imunoaktivními steroidy.

5.6 Vliv vybraných ED na hladiny stopových prvků

Parciální korelace adjustované na věk a BMI byly opět využity k odhalení vztahů mezi PCB a BPA a hladinami stopových prvků v plasmě. Nebyly zde pozorovány žádné významné asociace.

5.7 Korelace jednotlivých analytů v plasmě a seminální plasmě

Na závěr bylo zjištěno, nakolik jednotlivé analyty v plasmě korelují se svými protějšky v seminální plasmě. Lze

shrnout, že steroidy v obou biologických tekutinách spolu vzájemně korelují, kromě 7-oxo-DHEA, DHT, estronu a estradiolu. Všechny tyto steroidy jsou syntetizovány zejména enzymy v periférii, naopak v testes se tvoří minoritně.

6 Diskuse

Působení ED na lidský organismus představuje v současnosti velice diskutovaný problém, jak na národní, tak na mezinárodní úrovni.

Ve většině studií zkoumajících účinky ED na hladiny reprodukčních hormonů byly korelovány močové koncentrace ED s plasmatickými hladinami hormonů. Jen málo studií porovnávalo plasmatické hladiny ED s plasmatickými, příp. seminálními hladinami hormonů (shrnuto v článku [22]). Vycházeli jsme z předpokladu, že hladiny ED měřené přímo v seminální tekutině budou nejlépe odrážet jejich působení na kvalitu spermií a steroidogenezi ve varlatech (shrnuto v článku [23]). Současné měření ED a steroidů v plasmě umožnilo zjistit, do jaké míry spolu korelují plasmatické a seminální koncentrace sledovaných analytů a odhadnout vliv ED na steroidogenezi v periférii.

V naší studii BPA v plasmě jen mírně koreloval s BPA v seminální plasmě a jen BPA v seminální plasmě negativně ovlivňoval koncentraci spermií, jejich morfologii a celkový počet spermií. Těchto výsledků jsme dosáhli jak na menším počtu pacientů, tak poté na celé skupině 191 mužů [24]. Jiné studie měřily BPA v moči a ani v rámci této matrice nebylo dosaženo shody ve výsledcích.

Vztahy mezi vlivem PCB a kvalitou spermií byly shrnuty v přehledovém článku od Meekera a Hausera [25]. Autoři ukázali konzistentní vztah mezi PCB a zhoršenou motilitou, který v naší studii potvrzen nebyl. Dále bylo zjištěno, že hladiny PCB v plasmě byli nižší u zdravých mužů v porovnání se středně neplodnými muži a současně pozitivně korelovaly s celkovým počtem spermií a jejich koncentrací.

Podobné výsledky byly uvedeny ve studii Dallingy a kol. [26]. Podobně jako studie výše uvedených autorů i naše práce naznačuje, že horší kvalita spermií není zapříčiněna expozicí PCB, ale jinými, dosud neznámými faktory.

Na téma vlivu močového BPA na hladiny plasmatických reprodukčních hormonů bylo publikováno více studií, ovšem s protichůdnými výsledky [27-34]. Jedno z možných vysvětlení zvýšených hladin estrogenů a sníženého poměru T/E2 v plasmě by mohlo být zvýšení aktivity či exprese aromatázy na periférii nebo přímo ve varlatech. Vysvětlením by mohlo být také pomalejší odbourávání estrogenů pomocí sulfotransferáz či UDP-glukuronosyltransferáz. Podle jedné studie je i BPA glukuronidován při katalýze různými izoformami UDP-glukuronosyltransferáz [35]. Mohlo by tedy jít o kompetici na těchto enzýmech.

Pokud je nám známo toto je první studie zabývající se vlivem ED na hlavní kroky steroidogeneze. Zatímco v krevní plasmě prekurzory pohlavních hormonů (PREG, 17-OH-PREG a DHEA) pozitivně korelovaly s BPA, v seminální plasmě BPA s PREG a 17-OH-PREG zde koreloval negativně. Plasmatické koncentrace Δ^5 steroidů odrážejí hlavně jejich produkci v nadledvinách [36], zatímco v seminální plasmě předpokládáme převážně testikulární původ Δ^5 steroidů [22]. Vzhledem k tomu že na poměry PREG/17-OH-PREG v plasmě i seminální plasmě BPA vliv nemá, snížení produkce prekurzorů reprodukčních hormonů ve varlatech by mohlo být způsobeno sníženou dodávkou substrátu do mitochondrií (snížení aktivity či exprese cholesterol desmolázy či StAR). Dřívější *in vitro* studie a studie na myších prokázaly snížení exprese StAR proteinu po expozici BPA [37, 38] ve shodě s naší hypotézou. V plasmě byla situace obrácená, možným vysvětlením je naopak zvýšená dodávka cholesterolu do mitochondrie nebo snížení aktivity či exprese enzymů stojící dále ve steroidní cestě a tím akumulace prekurzorů.

Poprvé byly stanoveny koncentrace ED společně s hladinami 7-hydroxylovaných metabolitů DHEA, o kterých se

předpokládají imunomodulační a imunoprotektivní účinky [39-41]. Žádné další korelace mezi 7-hydroxylovanými metabolity DHEA a ED nebyly nalezeny ani v plasmě ani v seminální plasmě. Nebyl nalezen ani žádný vztah mezi hladinami Se a Zn v plasmě a kvalitou spermií, ačkoli se obecně uznává, že tyto stopové prvky mají příznivý vliv na spermatogenezi [42-44].

7 Závěry

- Dvě metody na stanovení BPA a 10 steroidů v plasmě či 11 steroidů v seminální plasmě byly vyvinuty a validovány. Obě metody poskytují nízké limity kvantifikace, přesnost a selektivitu.
- Environmentální hladiny PCB nemají vliv na kvalitu spermií u studované populace mužů z ČR.
- Byla však prokázána negativní korelace mezi PCB a hladinami T, FT a DHT v krvi.
- Zvýšené hladiny BPA v seminální plasmě byly spojené se signifikantně sníženým celkovým počtem spermií, koncentrací a morfologií spermií. BPA tedy představuje nepříznivý faktor pro lidskou reprodukci.
- Výsledky dále naznačují, že BPA snižuje rychlost steroidogeneze v testes v Δ^5 cestě, naopak tato cesta byla stimulována v periférii, tedy v nadledvinách. Další narušení steroidogeneze se zřejmě odehrává na úrovni estrogenního metabolismu, kdy dochází buď k potlačení estrogenního katabolismu či zvýšení aktivity či exprese aromatázy.

Disertační práce byla podpořena projektem Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví NT/13369.

8 Literatura

1. E. Diamanti-Kandarakis, J.P. Bourguignon, L.C. Giudice, R. Hauser, G.S. Prins, A.M. Soto, R.T. Zoeller, and A.C. Gore, Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev.* 30(4) (2009): p. 293-342.
2. U.U.N.E.P.a.W.W.H. Organization). State of the science of endocrine disrupting chemicals - 2012. 2012 2.11.2015].
3. E. Carlsen, A. Giwercman, N. Keiding, and N.E. Skakkebaek, Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ.* 305(6854) (1992): p. 609-13.
4. J. Auger, J.M. Kunstmann, F. Czyglik, and P. Jouannet, Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N Engl J Med.* 332(5) (1995): p. 281-5.
5. S. Irvine, E. Cawood, D. Richardson, E. MacDonald, and J. Aitken, Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom: birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years. *BMJ.* 312(7029) (1996): p. 467-71.
6. S.H. Swan, E.P. Elkin, and L. Fenster, Have sperm densities declined? A reanalysis of global trend data. *Environ Health Perspect.* 105(11) (1997): p. 1228-32.
7. H. Fisch, E.T. Goluboff, J.H. Olson, J. Feldshuh, S.J. Broder, and D.H. Barad, Semen analyses in 1,283 men from the United States over a 25-year period: no decline in quality. *Fertil Steril.* 65(5) (1996): p. 1009-14.
8. J.T. Seo, K.H. Rha, Y.S. Park, and M.S. Lee, Semen quality over a 10-year period in 22,249 men in Korea. *Int J Androl.* 23(4) (2000): p. 194-8.
9. A.M. Andersson, T.K. Jensen, A. Juul, J.H. Petersen, T. Jorgensen, and N.E. Skakkebaek, Secular decline in male testosterone and sex hormone binding globulin serum levels in Danish population surveys. *J Clin Endocrinol Metab.* 92(12) (2007): p. 4696-705.
10. H.A. Feldman, C. Longcope, C.A. Derby, C.B. Johannes, A.B. Araujo, A.D. Coviello, W.J. Bremner, and J.B. McKinlay, 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.* 87(2) (2002): p. 589-98.
11. H.O. Adami, R. Bergstrom, M. Mohner, W. Zatonski, H. Storm, A. Ekblom, S. Tretli, L. Teppo, H. Ziegler, M. Rahu, and et al., Testicular cancer in nine northern European countries. *Int J Cancer.* 59(1) (1994): p. 33-8.
12. C. Chilvers, M.C. Pike, D. Forman, K. Fogelman, and M.E. Wadsworth, Apparent doubling of frequency of undescended testis in England and Wales in 1962-81. *Lancet.* 2(8398) (1984): p. 330-2.
13. L.J. Paulozzi, International trends in rates of hypospadias and cryptorchidism. *Environ Health Perspect.* 107(4) (1999): p. 297-302.
14. P.D. Darbre, *Entry into human tissues*, in *Endocrine disruption and human health*. 2015, Academic Press.
15. G. Bleau, J. Lemarbre, G. Faucher, K.D. Roberts, and A. Chapdelaine, Semen selenium and human fertility. *Fertil Steril.* 42(6) (1984): p. 890-4.
16. R. Scott, A. MacPherson, R.W. Yates, B. Hussain, and J. Dixon, The effect of oral selenium supplementation on human sperm motility. *Br J Urol.* 82(1) (1998): p. 76-80.
17. A.H. Colagar, E.T. Marzony, and M.J. Chaichi, Zinc levels in seminal plasma are associated with sperm quality in fertile and infertile men. *Nutr Res.* 29(2) (2009): p. 82-8.

18. S.E. Chia, C.N. Ong, L.H. Chua, L.M. Ho, and S.K. Tay, Comparison of zinc concentrations in blood and seminal plasma and the various sperm parameters between fertile and infertile men. *J Androl.* 21(1) (2000): p. 53-7.
19. J. Vitku, T. Chlupacova, L. Sosvorova, R. Hampl, M. Hill, J. Heracek, M. Bicikova, and L. Starka, Development and validation of LC–MS/MS method for quantification of bisphenol A and estrogens in human plasma and seminal fluid. *Talanta.* 140(0) (2015): p. 62-67.
20. R.W. Hornung and L.D. Reed, Estimation of Average Concentration in the Presence of Nondetectable Values. *Applied Occupational and Environmental Hygiene.* 5(1) (1990): p. 46-51.
21. L. Sosvorova, J. Vitku, T. Chlupacova, M. Mohapl, and R. Hampl, Determination of seven selected neuro- and immunomodulatory steroids in human cerebrospinal fluid and plasma using LC-MS/MS. *Steroids.* 98(2015): p. 1-8.
22. R. Hampl, J. Kubatova, J. Heracek, V. Sobotka, and L. Starka, Hormones and endocrine disruptors in human seminal plasma. *Endocr Regul.* 47(3) (2013): p. 149-58.
23. R. Hampl, J. Kubatova, V. Sobotka, and J. Heracek, Steroids in semen, their role in spermatogenesis, and the possible impact of endocrine disruptors. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 13(1) (2013): p. 1-5.
24. J. Vitku, L. Sosvorova, T. Chlupacova, R. Hampl, M. Hill, V. Sobotka, J. Heracek, M. Bicikova, and L. Starka, Differences in bisphenol A and estrogen levels in the plasma and seminal plasma of men with different degrees of infertility. *Physiological Research.* 64 (Suppl. 2)(2015): p. S303-S311.
25. J.D. Meeker and R. Hauser, Exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs) and male reproduction. *Syst Biol Reprod Med.* 56(2) (2010): p. 122-31.
26. J.W. Dallinga, E.J. Moonen, J.C. Dumoulin, J.L. Evers, J.P. Geraedts, and J.C. Kleinjans, Decreased human semen quality and organochlorine compounds in blood. *Hum Reprod.* 17(8) (2002): p. 1973-9.
27. T. Galloway, R. Cipelli, J. Guralnik, L. Ferrucci, S. Bandinelli, A.M. Corsi, C. Money, P. McCormack, and D. Melzer, Daily bisphenol A excretion and associations with sex hormone concentrations: results from the InCHIANTI adult population study. *Environ Health Perspect.* 118(11) (2010): p. 1603-8.
28. E.J. Kim, D. Lee, B.C. Chung, H. Pyo, and J. Lee, Association between urinary levels of bisphenol-A and estrogen metabolism in Korean adults. *Sci Total Environ.* 470-471(2014): p. 1401-7.
29. T.H. Lassen, H. Frederiksen, T.K. Jensen, J.H. Petersen, U.N. Joensen, K.M. Main, N.E. Skakkebaek, A. Juul, N. Jorgensen, and A.M. Andersson, Urinary bisphenol A levels in young men: association with reproductive hormones and semen quality. *Environ Health Perspect.* 122(5) (2014): p. 478-84.
30. X. Liu, M. Miao, Z. Zhou, E. Gao, J. Chen, J. Wang, F. Sun, W. Yuan, and D.K. Li, Exposure to bisphenol-A and reproductive hormones among male adults. *Environ Toxicol Pharmacol.* 39(2) (2015): p. 934-41.
31. J.D. Meeker, A.M. Calafat, and R. Hauser, Urinary bisphenol A concentrations in relation to serum thyroid and reproductive hormone levels in men from an infertility clinic. *Environ Sci Technol.* 44(4) (2010): p. 1458-63.
32. J. Mendiola, N. Jorgensen, A.M. Andersson, A.M. Calafat, X. Ye, J.B. Redmon, E.Z. Drobnis, C. Wang, A. Sparks, S.W. Thurston, F. Liu, and S.H. Swan, Are

- environmental levels of bisphenol a associated with reproductive function in fertile men? *Environ Health Perspect.* 118(9) (2010): p. 1286-91.
33. Q. Zhou, M. Miao, M. Ran, L. Ding, L. Bai, T. Wu, W. Yuan, E. Gao, J. Wang, G. Li, and D.K. Li, Serum bisphenol-A concentration and sex hormone levels in men. *Fertil Steril.* 100(2) (2013): p. 478-82.
34. W. Zhuang, K. Wu, Y. Wang, H. Zhu, Z. Deng, L. Peng, and G. Zhu, Association of serum bisphenol-A concentration and male reproductive function among exposed workers. *Arch Environ Contam Toxicol.* 68(1) (2015): p. 38-45.
35. T. Trdan Lusin, R. Roskar, and A. Mrhar, Evaluation of bisphenol A glucuronidation according to UGT1A1*28 polymorphism by a new LC-MS/MS assay. *Toxicology.* 292(1) (2012): p. 33-41.
36. J. Sagel, J.H. Levine, R.S. Mathur, G. Rosebrock, J. Gonzalez, C. de Villier, and R.M. Nair, Plasma steroid concentrations in patients with hypopituitarism and Kallman's syndrome: effects of testosterone replacement therapy. *Clin Endocrinol (Oxf).* 17(3) (1982): p. 223-31.
37. J. Peretz, R.K. Gupta, J. Singh, I. Hernandez-Ochoa, and J.A. Flaws, Bisphenol A impairs follicle growth, inhibits steroidogenesis, and downregulates rate-limiting enzymes in the estradiol biosynthesis pathway. *Toxicol Sci.* 119(1) (2011): p. 209-17.
38. S. Chouhan, S.K. Yadav, J. Prakash, S. Westfall, A. Ghosh, N.K. Agarwal, and S.P. Singh, Increase in the expression of inducible nitric oxide synthase on exposure to bisphenol A: a possible cause for decline in steroidogenesis in male mice. *Environ Toxicol Pharmacol.* 39(1) (2015): p. 405-16.
39. R. Hampl, M. Pohanka, M. Hill, and L. Starka, The content of four immunomodulatory steroids and major androgens in human semen. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 84(2-3) (2003): p. 307-16.
40. V. Chmielewski, F. Drupt, and R. Morfin, Dexamethasone-induced apoptosis of mouse thymocytes: prevention by native 7 α -hydroxysteroids. *Immunol Cell Biol.* 78(3) (2000): p. 238-46.
41. S. Niro, O. Hennebert, and R. Morfin, New insights into the protective effects of DHEA1). *Horm Mol Biol Clin Investig.* 4(1) (2010): p. 489-98.
42. U. Ahsan, Z. Kamran, I. Raza, S. Ahmad, W. Babar, M.H. Riaz, and Z. Iqbal, Role of selenium in male reproduction - a review. *Anim Reprod Sci.* 146(1-2) (2014): p. 55-62.
43. M.I. Camejo, L. Abdala, G. Vivas-Acevedo, R. Lozano-Hernandez, M. Angeli-Greaves, and E.D. Greaves, Selenium, copper and zinc in seminal plasma of men with varicocele, relationship with seminal parameters. *Biol Trace Elem Res.* 143(3) (2011): p. 1247-54.
44. A.E. Omu, M.K. Al-Azemi, M. Al-Maghrebi, C.T. Mathew, F.E. Omu, E.O. Kehinde, J.T. Anim, M.A. Oriowo, and A. Memon, Molecular basis for the effects of zinc deficiency on spermatogenesis: An experimental study in the Sprague-dawley rat model. *Indian J Urol.* 31(1) (2015): p. 57-64.

9 Seznam vlastních prací

(Jana Vítků, rodné příjmení Kubátová)

a) Impaktované se vztahem k tématu

1. Hampl R., **Kubátová J.**, Stárka L.: Steroids and endocrine disruptors – History, recent state of art and open questions, J Steroid Biochem Mol Biol (2014) In press, available online. IF = 3.628.
2. **Vítku J.**, Starka L., Bicikova M., Hill M., Heracek J., Sosvorova L., Hampl R.: Endocrine disruptors and other inhibitors of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 and 2: Tissue-specific consequences of enzyme inhibition. J Steroid Biochem Mol Biol (2014) In press, available online. IF = 3.628.
3. Sosvorova L., **Vítku J.**, Chlupacova T., Mohapl M., Hampl R.: Determination of seven selected neuro- and immunomodulatory steroids in human cerebrospinal fluid and plasma. Steroids, 98, 1 – 8 (2014). IF = 2.639.
4. **Vítku J.**, Chlupacova T., Sosvorova L., Hampl R., Hill M., Heracek J., Bicikova M., Starka L.: Development and validation of LC-MS/MS method for quantification of bisphenol A and estrogens in human plasma and seminal fluid. Talanta, 140, 62-7 (2015). IF = 3.545.
5. **Vítku J.**, Sosvorova L., Chlupacova T., Hampl R., Hill M., Sobotka V., Heracek J., Bicikova M., Starka L.: Differences in bisphenol A and estrogen levels in the plasma and seminal plasma of men with different degrees of infertility, Phys Res, 64 (Suppl. 2) S303 - S311 (2015). IF = 1.293.
6. **Vítku J.**, Heracek J., Sosvorova L., Chlupacova T., Hampl R., Hill M., Sobotka V., Bicikova M., Starka L.: The impact of bisphenol A and polychlorinated biphenyls on spermatogenesis and steroidogenesis: two biological fluids in men from an infertility clinic. Environment International, odesláno do tisku.

b) Neimpaktované se vztahem k tématu

7. Hampl R., **Kubatova J.**, Heracek J., Sobotka V., Starka L.: Hormones and Endocrine disruptors in human seminal plasma, Endocr Regul, 47(3), 149 – 158 (2013).
8. Hampl R., **Kubatova J.**, Sobotka V., Heráček J.: Steroids in semen, their role in spermatogenesis, and the possible impact of endocrine disruptors, Horm Mol Biol Clin Invest, 13(1), 1 – 5 (2013).
9. **Kubátová J.**, Stárka L.: Endokrinní disruptory a jejich vliv na spermatogenezi a testikulární steroidogenezi. Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa, 16(2), 102 – 107 (2013).

10. **Kubátová J.**, Stárka L., Bičíková M., Hampl R.: Endokrinní disruptory – sílící hrozba pro lidskou populaci i volně žijící organismy. *Lékařské listy*, 11, 14 – 16 (2013).

c) Impaktované bez vztahu k tématu

11. Sramkova M., Duskova M., **Vitku J.**, Vcelak J., Matucha P., Bradnova O., de Coreiro J., Starka L.: Levels of adipokines and some steroids during the menstrual cycle. *Physiol Res*. 64(Suppl. 2) (2015): p. S147-S154. IF = 1.293
12. Sosvorova L., Mohapl M., Hill M., Starka L., Bicikova M., **Vitku J.**, Kanceva R., Bestak J., Hampl R.: Steroid hormones and homocysteine in the outcome of patients with normal pressure hydrocephalus. *Physiol Res*. 64(Suppl. 2) (2015): p. S227-S236. IF = 1.293
13. Sosvorova L., Mohapl M., Vcelak J., Hill M., **Vitku J.**, Hampl R.: The impact of selected cytokines in the follow-up of normal pressure hydrocephalus. *Physiol Res*. 64(Suppl. 2) (2015): p. S283-S290. IF = 1.293
14. Macova L., Sosvorova L., **Vitku J.**, Bicikova M., Hill M., Zamrazilova H., Sedlackova B., Starka L.: Steroid hormones related to 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in treated obesity. *Physiol Res*. 64(Suppl. 2) (2015): p. S121-S133. IF = 1.293
15. Bicikova M., Duskova M., **Vitku J.**, Kalvachova B., Ripova D., Mohr P., Starka L.: Vitamin D in anxiety and affective disorders. *Physiol Res*. 64(Suppl. 2) (2015): p. S101-S103. IF = 1.293
16. Sosvorova L., Hill M., Mohapl M., **Vitku J.**, Hampl R.: Steroid hormones in prediction of normal pressure hydrocephalus. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 152(2015): p. 124-32. IF = 3.628
17. Sosvorova L., Vcelak J., Mohapl M., **Vitku J.**, Bicikova M., Hampl R.: Selected pro- and anti-inflammatory cytokines in cerebrospinal fluid in normal pressure hydrocephalus. *Neuro Endocrinol Lett*. 35(7) (2014): p. 586-93. IF = 0.799
18. Sosvorova L., Bestak J., Bicikova M., Mohapl M., Hill M., **Kubatova J.**, Hampl R.: Determination of homocysteine in cerebrospinal fluid as an indicator for surgery treatment in patients with hydrocephalus. *Physiol Res*. 63(4) (2014): p. 521-7. IF = 1.293
19. Paskova A., Parizek A., Hill M., Velikova M., **Kubatova J.**, Duskova M., Adamcova K., Koucky M., Simjak P., Cerny A., Starka L.: Steroid metabolome in the umbilical cord: is it necessary to differentiate between arterial and venous blood? *Physiol Res*. 63(1) (2014): p. 115-26. IF = 1.293
20. Duskova M., Simunkova K., Hill M., Velikova M., **Kubatova J.**, Kancheva L., Kazihnitkova H., Hruskovicova H., Pospisilova H., Racz B., Salatova M., Cirmanova V., Kralikova E., Starka L., Parizek A.: Chronic cigarette smoking alters circulating sex hormones and

- neuroactive steroids in premenopausal women. *Physiol Res.* 61(1) (2012): p. 97-111.
21. Hill M., Paskova A., Kanceva R., Velikova M., **Kubatova J.**, Kancheva 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. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 139(2014): p. 201-22. IF = 3.628
 22. Hill M., Vrbikova J., Zarubova J., Kancheva R., Velikova M., Kancheva L., **Kubatova J.**, Duskova M., Marusic P., Parizek A., Starka L.: The steroid metabolome in lamotrigine-treated women with epilepsy. *Steroids.* 76(12) (2011): p. 1351-7. IF = 2.829
 23. Hill M., Parizek A., Cibula D., Kancheva R., Jirasek J.E., Jirkovska M., Velikova M., **Kubatova J.**, Klimkova M., Paskova A., Zizka Z., Kancheva L., Kazihnitkova H., Zamrazilova L., Starka L.: Steroid metabolome in fetal and maternal body fluids in human late pregnancy. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 122(4) (2010): p. 114-32. IF = 2.886
 24. Hill M., Zarubova J., Marusic P., Vrbikova J., Velikova M., Kancheva R., Kancheva L., **Kubatova J.**, Duskova M., Zamrazilova L., Kazihnitkova H., Simunkova K., Starka L.: Effects of valproate and carbamazepine monotherapy on neuroactive steroids, their precursors and metabolites in adult men with epilepsy. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 122(4) (2010): p. 239-52. IF = 2.886

d) Neimpaktované bez vztahu k tématu

25. Duskova M., Sosvorova L., **Vitku J.**, Jandikova H., Racz B., Chlupacova T., De Coreiro J., Starka L.: Changes in the concentrations of corticoid metabolites - the effect of stress, diet and analytical method. *Prague Med Rep.* 116(4) (2015): p. 268-278.
26. Dušková M., Šimůnková K., Hill M., Velíková M., **Kubátová J.**, Hruškovičová H., Pospíšilová H., Rác B., Cirmanová V., Králíková E., Stárka L.: Cigarette smoking and progesterone and androgen metabolites in premenopausal women. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation.* 6(3) (2011): p. 259.
27. Hill M., Parizek A., Velikova M., **Kubatova J.**, Kancheva R., Duskova M., Simunkova K., Klimkova M., Paskova A., Zizka Z., Jirasek J.E., Jirkovska M., Starka L.: The distribution of placental oxidoreductase isoforms provides different milieus of steroids influencing pregnancy in the maternal and fetal compartment. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 4(3) (2010): p. 581-600
28. Hill M., Vrbikova J., Zarubova J., Vcelakova H., Duskova M., Kancheva R., **Kubatova J.**, Starka L.: Sulphates of 3beta-hydroxy-5-ene steroids in women with epilepsy. *Prague Med Rep.* 111(2) (2010): p. 111-26