

Univerzita Karlova Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza

Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Tereza Bosáková

Monitorování vybraných steroidních hormonů metodou HPLC-MS/MS a
studium jejich vlivu na myší spermie *in vitro*

Monitoring of selected steroid hormones by HPLC-MS/MS and studying their impact
on mouse sperm *in vitro*

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Kateřina Hortová, Ph.D.

Konzultant: doc. RNDr. Radomír Čabala, Dr.

Praha 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu, je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze 16. 5. 2017

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Kateřině Hortové, Ph.D. a svému konzultantovi doc. RNDr. Radomíru Čabalovi, Dr. za ochotu, odborné vedení a všestrannou pomoc při získávání i zpracování teoretické a experimentální části mé práce.

Abstrakt

Tato diplomová práce byla zaměřena na vývoj nové metody využívající vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii s tandemovou hmotnostní detekcí (HPLC-MS/MS) pro kvantifikaci vybraných steroidních hormonů, a to 17α -ethynylestradiolu (EE2) a progesteronu (PRG), v M2 fertilizačním médiu. Toto médium je používáno při kapacitaci spermií *in vitro*, což je proces, kdy dochází ke komplexním molekulárně-biochemickým změnám ve spermii, na jejichž základě spermie získávají schopnost oplodnění. Fyziologický průběh tohoto procesu je tudíž zásadní pro získání fertilizační schopnosti samčích gamet. Optimalizované HPLC-MS/MS podmínky (kolona Kinetex EVO C₁₈, mobilní fáze 50/50 (v/v) ACN/H₂O, s 0,1% obsahem mravenčí kyseliny v obou složkách, průtok mobilní fáze 0,3 ml/min, nástřik 7,5 μ l) byly aplikované pro sledování koncentračních změn jednotlivých analytů během časově závislé kapacity myších spermií. Testované koncentrace pro EE2 byly 200, 20 a 2 μ g/l a pro PRG pouze 200 μ g/l. Bylo zjištěno, že nejprve dochází k poklesu koncentrace volného, nevázaného EE2 (minimum okolo 60. min kapacity) a poté k jejímu opětovnému nárůstu. Tento trend vykazovaly všechny testované koncentrace. Koncentrace (200 μ g/l) volného, nevázaného PRG klesala po celou dobu kapacity. Závislosti koncentrace volného, nevázaného hormonu na době kapacity budou podkladem pro následné studium kinetiky tohoto procesu, jehož výsledky by měly pomoci objasnit interakční mechanismus mezi spermií a vybranými steroidními hormony na molekulární úrovni.

Abstract

The present project aims were development of a new sensitive separation method using high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection, which enables quantification of selected steroid hormones, namely 17 α -ethynylestradiol (EE2) and progesterone (PRG) in M2 fertilizing medium. M2 medium is used during sperm capacitation *in vitro*, which is the physiological process of complex molecular and biochemical changes, essential for obtaining fertilizing ability of male gametes. Optimized separation and detection conditions (column Kinetex EVO C₁₈ with mobile phase consisted of 50/50 (v/v) acetonitrile/water with 0.1% formic acid in both components) were applied on monitoring of concentration changes of each hormone during time dependent sperm capacitation. The concentration tested for EE2 were 200, 20 and 2 $\mu\text{g/l}$ and for PRG 200 $\mu\text{g/l}$ only. It was found that concentration of free, unbounded EE2 firstly decreases, reaches the minimum in about 60 min of capacitation and then increases again. This trend was observed for all three tested concentrations. Concentration (200 $\mu\text{g/l}$) of free unbounded PRG decreased during whole capacitation. The following kinetic analysis will be based on the concentration dependences of the free unbound hormones on the capacitation time. The results of kinetic study should help to understand better the interaction mechanism between the sperm and the selected steroid hormones on a molecular level.

Obsah

1. Seznam zkratk a symbolů	7
2. Úvod	9
3. Teoretická část.....	11
3.1 Endokrinní disruptory	11
3.2 Hormony.....	12
3.2.1 Estrogenní hormony a progestiny	14
3.2.2 17 α -Ethinylestradiol (EE2) a Progesteron (PRG).....	14
3.3 Spermatogeneze.....	16
3.4 Kapacitace a akrozomální reakce spermií	17
3.5 Metody stanovení estrogenních hormonů a progestinů.....	18
3.6 Metoda HPLC s MS detekcí	20
4. Experimentální část	22
4.1 Chemikálie	22
4.2 Instrumentace a pomůcky.....	22
4.3 Počáteční HPLC-MS/MS podmínky.....	23
4.4 Příprava zásobních a pracovních roztoků EE2 a PRG v ethanolu a vM2 médiu pro optimalizaci HPLC-MS/MS metody	23
4.5 Příprava biologického vzorku.....	25
5. Výsledky a diskuze.....	27
5.1 Optimalizace separačního systému pro EE2	27
5.2 Kalibrační závislosti pro EE2	34
5.3 Biologický pokus pro EE2.....	36
5.4 Optimalizace separačního systému pro PRG	47
5.5 Kalibrační závislosti pro PRG	52
5.6 Biologický pokus pro PRG.....	54
6. Závěr	59
7. Použitá literatura	61

1. Seznam zkratek a symbolů

APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Chemical Ionization)
AR	akrozomální reakce (Acrosomal Reaction)
a.u.	relativní jednotka (Arbitrary Unit)
BIOCEV	Biotechnologické a biomedicínské centrum Akademie věd a Univerzity Karlovy ve Vestci
BSA	hovězí sérový albumin (Bovine Serum Albumine)
DAD	detektor diodového pole (Diode Array Detector)
EDC	endokrinní disruptor (Endocrine Disrupting Chemicals)
e-EDC	estrogenní endokrinní disruptor (Estrogene Endocrine Disrupting Chemicals)
E	estron
E2	17 β -estradiol
E3	estriol
EE2	17 α -ethynylestradiol
EI	elektronová ionizace (Electron Ionization)
ELISA	enzymoimunoanalýza (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
ER	intracelulární estrogenní receptor (Estrogen Receptor)
ESI	ionizace elektrosprejem (Electrospray Ionization)
FD	fluorescenční detektor (Fluorescent Detector)
GC	plynová chromatografie (Gas Chromatography)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
IT	iontová past (Ion Trap)
mER	membránový estrogenní receptor (Membrane Estrogen Receptor)
LLE	extrakce kapalina-kapalina (Liquid-Liquid Extraction)
MRM	sken jedné nebo více iontových reakcí (Multiple Reaction Monitoring)
MS	hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)

m/z	poměr molekulové hmotnosti a nábojového čísla
PRG	progesteron
Q	kvadrupól (Quadrupole)
QqQ	trojitý kvadrupól
Scan	základní sken - sken hmotnostních spekter v určitém rozsahu m/z
SIM	selektivní záznam vybraného iontu (Selected Ion Monitoring)
SPE	extrakce na pevné fázi (Solid Phase Extraction)
t	čas (min)
TOF	průletový analyzátor (Time of Flight)
UV	ultrafialová oblast (ultraviolet)
v/v	objem/objem
α E2	17 α -estradiol

2. Úvod

Estrogenní látky jsou přítomné v živých organismech a řídí řadu fyziologických procesů, včetně maturace spermií a jejich přípravu k oplodnění. Shodné látky či jejich farmakologické modifikace se dostávají do životního prostředí jako důsledek zvýšené produkce a konzumace řady léčiv, podpůrných látek nebo krmiv v podobě odpadních produktů, které představují toxikologické reprodukční riziko již při velmi nízkých koncentracích (ng/l) [1]. Vhodné případy pro studium reprodukční biologie představují změny pohlaví a reprodukčních funkcí u zástupců vodních živočichů v důsledku výskytu tzv. endokrinních disruptorů (EDC) v životním prostředí [2]. Riziko jejich přítomnosti i ve velmi nízkých koncentracích spočívá v tom, že mohou simulovat chování endogenních hormonů vazbou na jejich receptory [3]. Tato vazba může inhibovat sekreci gonadotropin-vylučujícího hormonu, následně i luteinizačního hormonu, což vede ke snižování funkce, případně aktivity varlat a ovlivnění průběhu spermatogeneze, procesu tvorby a vývoje spermií, jejímž výsledkem je zralá samčí pohlavní buňka [4,5]. O aktuálnosti této problematiky svědčí i fakt, že během posledních několika desetiletí se výrazně snížila kvalita lidského spermioqramu [6], která je určována parametry WHO [7]. Spermie produkované ve varlatech jsou sice morfologicky zralé, ovšem nejsou schopné oplodnění, a po ejakulaci nemohou bezprostředně po vniknutí do samičího pohlavního ústrojí oplodnit vajíčko [8].

Po ejakulaci do samičího reprodukčního ústrojí podléhají spermie komplexním biochemickým a fyziologickým změnám, souhrnně nazývaných jako kapacitace [9], která je klíčovou událostí při studiu chování spermií před oplodněním. Pouze kapacitované spermie získávají progresivní motilitu a jsou schopny proniknout obaly vajíčka při procesu známém jako akrozomální reakce (AR) a oplodnit jej. Ke kapacitaci *in vivo* dochází v děloze a vejcovodech a je aktivována látkami, vylučovanými ze samičího pohlavního traktu. Rovněž tak následná AR je proces, kdy dochází k uvolňování lytických enzymů, které cíleně naruší glykoproteinový obal vajíčka (*zona pellucida*) a umožní spermii průnik a oplodnění [10]. Oba procesy jsou provázány a nejsou možné jeden bez druhého. Sledování průběhu kapacitace *in vivo* by nebylo technicky možné, a proto se veškeré experimenty tohoto druhu provádí *in vitro* [11] v kultivačním médiu, simulujícím *in vivo* prostředí. Albumin je hlavním proteinem, nacházejícím se v samičím pohlavním ústrojí a je taktéž přítomný v

kapacitačním/fertilizačním M2 médiu [11]. Pro kapacitaci *in vitro* musí být spermie nejprve inkubovány za přesně daných podmínek. Aby bylo možné studovat vliv přítomnosti exogenních hormonů na kapacitaci spermií *in vitro*, je důležité zjistit, jak je spermie schopna tyto hormony během těchto dějů vyvazovat a jaká je dynamika tohoto procesu.

Metody studia vlivu estrogenních hormonů na kapacitaci spermií jsou v literatuře publikovány pouze ojediněle. Imunochemické metody byly použity pro studium vlivu estrogenů na kapacitaci myších spermií *in vivo* [12] a kančích spermií *in vitro* [13]. Vliv estriolu na kapacitaci myších spermií byl sledován pomocí HPLC s UV detekcí, avšak s nízkou citlivostí detekce [14]. Využitím citlivé, tandemové hmotnostní detekce je možné studovat i nižší počáteční testovací koncentrace hormonů než 200 µg/l [15, 16] a tím se více přiblížit reálným hodnotám expozice.

Cílem této diplomové práce bylo sledovat vliv přítomnosti vybraných dvou steroidních hormonů, a to 17 α -ethynylestradiolu (EE2) a progesteronu (PRG), na myší spermie. Dané hormony se rovněž vyskytují v životním prostředí a mohou tudíž simulovat hormony endogenní. Za tímto účelem byla vyvinuta citlivá analytická metoda s využitím vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní detekcí pro jejich kvantifikaci. Bylo zjišťováno, zda a v jakém rozsahu mohou být tyto hormony vázány na myší spermie během jejich kapacitace *in vitro* v M2 kapacitačním médiu.

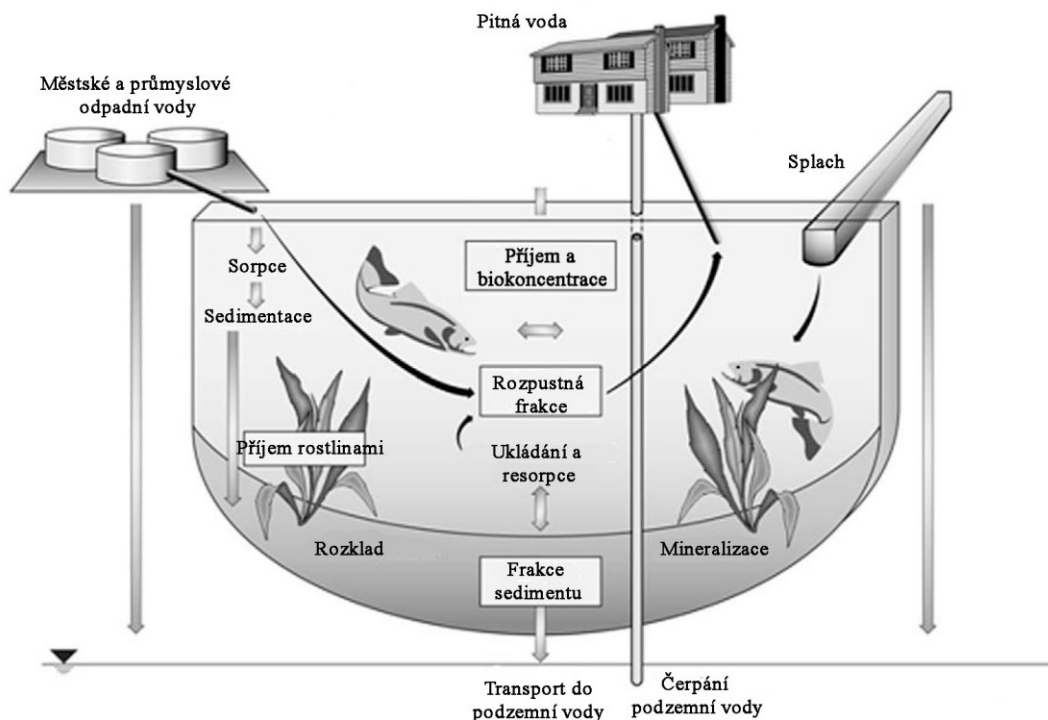
3. Teoretická část

3.1 Endokrinní disruptory

Endokrinní disruptory jsou environmentální chemické látky s negativním vlivem na endokrinní systém živočichů, potažmo i člověka [17]. Mohou působit na jedince nebo i na celé populace a následkem bioakumulace v živých tkáních mohou ovlivňovat také jedince jiného živočišného druhu. Chemická povaha EDC je různorodá a zahrnuje širokou škálu látek od přírodních estrogenů, androgenů a syntetických hormonů, přes farmaka, pesticidy až k průmyslovým chemikáliím a těžkým kovům. Lze je nalézt v běžně používaných produktech jako např. v plastových lahvách, jídle nebo kosmetice [18, 19]. Ve většině případů jde o dlouhodobou expozici organismů účinkům EDC. Jedná se tedy o mechanismus chronické toxicity. Příkladem může být feminizace samců ryb či ptáků v blízkosti čistíren odpadních vod nebo jiného vodního zdroje [20].

Žlázy s vnitřní sekrecí (endokrinní systém) vylučují hormony, které svým specifickým účinkem zajišťují chod organismu. Řídí jeho výživu, růst a reprodukci a podílí se také na udržování homeostázy. Všechny tyto procesy mohou endokrinní disruptory narušovat [21]. Evropská komise klasifikuje EDC jako „exogenní látky, popř. jejich směsi, které ovlivňují funkce endokrinního systému a následně způsobují vedlejší zdravotní účinky v celém organismu, jeho potomstvu nebo v (sub)populacích“ [22].

Příkladem EDC mohou být estrogenní endokrinní disruptory (e-EDC), což jsou hormonální estrogeny nebo chemikálie, které napodobují vliv estrogenních hormonů na organismus. Tyto látky mají různě silný negativní dopad na živočichy, některé jsou extrémně škodlivé, jiné méně. Estrogenní endokrinní disruptory se v přírodě objevují jak přírodní (např. 17β -estradiol, (E2)), tak syntetické (např. EE2), a to hlavně v odpadních vodách nebo v sedimentech, ale také v podzemních a povrchových vodách, a dokonce mohou být ve velmi nízkých koncentracích (ppb a ppt) přítomny i v pitné vodě [23 - 25]. Schéma koloběhu e-EDC je znázorněno na obr. 1.



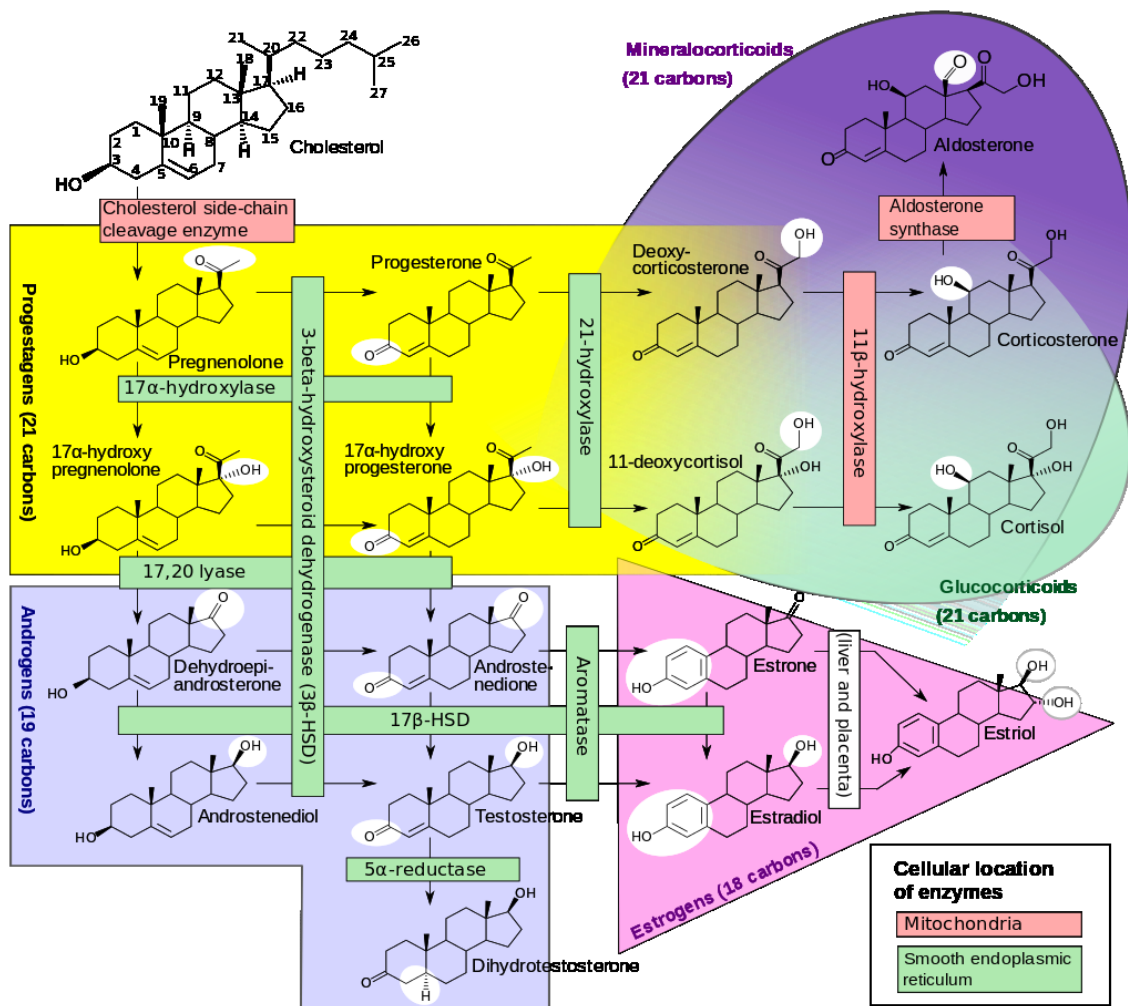
Obr. 1. Schéma výskytu a transportu e-EDC v životním prostředí [17].

3.2 Hormony

Hormony jsou látky, které zprostředkovávají signály mezi buňkami, a jsou tedy tzv. chemickými přenašeči. Působení hormonu je závislé na jeho detekci buňkou, interaguje tedy s odpovídajícím receptorem, který následně spustí kaskádu reakcí, vedoucích k odezvě. Hormony v lidském těle jsou syntetizovány endokrinními žlázami, které je vyplavují do krevního oběhu a ty poté působí na vzdálené buňky [26].

Steroidní hormony, do kterých patří estrogény, androgeny, gestageny (progestiny) a kortikosteroidy, jsou lipofilní, nízkomolekulární a biologicky aktivní látky. Jsou syntetizovány z cholesterolu (procesem steroidogeneze, viz obr. 2) [27], který je tvořen cyklopentaperhydro[a]fenantrenovým skeletem, také označovaným jako steran [28]. Jednotlivé skupiny steroidů se liší v pozicích funkčních skupin právě na steranu nebo v oxidaci tohoto skeletu. Funkční skupiny steroidů mohou být navíc jak v ekvatoriální, tak v axiální rovině, díky čemuž jsou biologicky aktivní. Podle toho mohou být tyto hormony rozděleny do dvou skupin, a to na pohlavní hormony

(estrogeny, androgeny a gestageny) a kortikosteroidy (kortikoidy), které se nadále dělí na glukokortikosteroidy a mineralokortikosteroidy. Steroidní hormony mohou být rozděleny do jednotlivých skupin také podle toho, zda jsou syntetizovány v lidském těle nebo nikoliv. Poté je dělíme na endogenní, tělu vlastní látky (např. E2), které hrají roli jako chemické přenašeče z jedné buňky na jinou, a na exogenní hormony (např. methyltestosteron), což jsou látky tělu cizí a mohou být jak přírodní, tak syntetické [29].



Obr. 2. Schéma procesu steroidogeneze v lidském těle [27].

3.2.1 Estrogenní hormony a progestiny

Estrogeny jsou steroidní látky, reprezentující samičí pohlavní hormony, jejichž jméno pochází z estrálního cyklu (označení pro periodické, fyziologické změny v těle samic placentálních savců), v němž hrají důležitou roli. Mezi tělu vlastní (přírodní, endogenní) estrogeny patří biologicky neaktivnější E2, dále pak 17α -estradiol (α E2), estriol (E3) a estron (E), nebo také umělý (syntetický, exogenní) EE2 [30]. Zástupce syntetických hormonů, tedy hormon EE2, je dále popsán v kapitole 3.2.2.

Endogenní estrogenní hormony jsou syntetizovány převážně z androgenních prekurzorů ve vaječnicích, v tukové tkáni a nadledvinkami. Tyto látky hrají důležitou roli v dospívání, stimulují vývoj sekundárních pohlavních znaků, ovlivňují menstruační cyklus u žen a zajišťují reprodukci i řízení menopauzy. Kromě reprodukce jsou estrogeny důležité i v metabolismu proteinů, tuků, minerálů a cukrů a byly také používány ve zvířecích krmivech kvůli svému anabolickému účinku.

Kromě estrogenů, patří mezi ženské pohlavní hormony i progestiny (gestageny). Progestiny jsou steroidní hormony tvořené skeletem s 21 uhlíky, tedy tzv. pregnanem. Mohou být opět přírodní nebo syntetické. Hlavním a současně i jediným přírodním progestinem je právě progesteron [29].

Estrogeny, podobně jako všechny hormony, interagují s odpovídajícími receptory. Váží se na klasické, intracelulární estrogenní receptory (ER_s), které se dělí na dvě skupiny: $ER\alpha$ (ESR1) a $ER\beta$ (ESR2). Estrogeny mohou interagovat rovněž s membránovým estrogenním receptorem (mER), spřaženým s G-proteiny tzv. GPER (GPR30) [31].

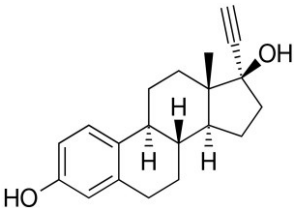
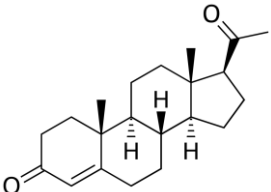
3.2.2 17α -Ethinylestradiol (EE2) a Progesteron (PRG)

17α -Ethinylestradiol, derivát estradiolu, je syntetický estrogenní hormon, který byl vyvinut v roce 1938 jako první perorálně účinný estrogen na světě, a v roce 1961 byl použit jako kontraceptivum. Je odolný vůči jaternímu odbourávání a doposud je používán téměř ve všech formách kombinovaných orálních kontraceptiv [32]. Kombinované antikoncepční tablety obsahují kromě EE2 také PRG. Obvyklé množství EE2 se v jedné antikoncepční tabletě pohybuje okolo 0,2 – 0,3 mg, při kterém je sníženo riziko možných nežádoucích účinků užívání.

Obě látky, které jsou chemicky velmi stabilní, se z těla ženy vylučují močí buď ve volné formě, nebo jako konjugáty (nejčastěji gluko- a sulfo-konjugáty). Tím se také dostávají do odpadních, povrchových a podzemních vod, kde fungují jako endokrinní disruptory [33, 34]. Koncentrace estrogenní hormonů se v podzemních a povrchových vodách pohybuje v rozmezí setin až jednotek ng/l, v odpadních vodách se může pohybovat do desítek až stovek µg/l [35, 36].

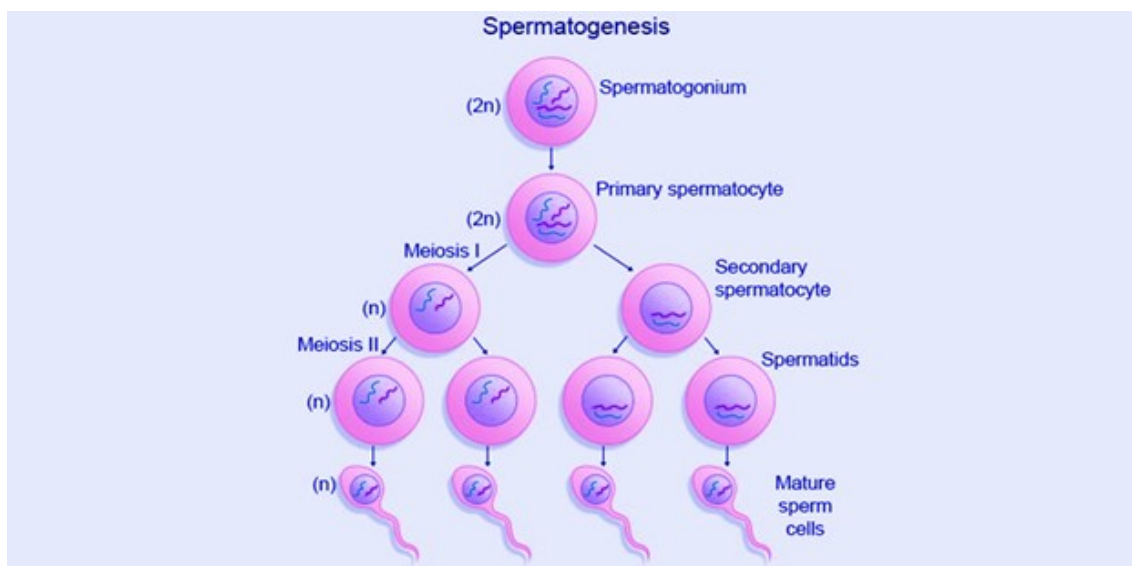
PRG je v organismu syntetizován z cholesterolu, a to hlavně ve žlutém tělísku vaječníků, v období těhotenství také v placentě a nadledvinkách, a v malém množství také ve varlatech [28]. Navozuje sekreční fázi menstruačního cyklu a podporuje růst děložní sliznice po ovulaci. V těhotenství zastavuje menstruační cyklus, navozuje vývoj mléčné žlázy, zvyšuje množství hlenu v děložním hrdle a tlumí (předčasné) kontrakce dělohy. Na rozdíl od estrogenů však nemá vliv na vývoj pohlaví plodu. Progestiny (gastrageny) a estrogény působí synergicky, protože estrogény iniciují tvorbu receptorů pro PRG [37]. Fyzikálně-chemické vlastnosti a struktura EE2 a PRG jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1. Vybrané fyzikálně-chemické vlastnosti a struktura EE2 (nahore) a PRG (dole); M_r – relativní molekulová hmotnost, K_{ow} – rozdělovací koeficient n-oktanol/voda, pK_a – záporně vzatý logaritmus kyselých disociačních konstanty [38].

struktura	M_r	rozpustnost ve vodě (mg/l)	$\log K_{ow}$	pK_a
	296,4	11,3	3,67	10,21
	314,5	8,81	3,87	-

3.3 Spermatogeneze

Spermatogeneze je proces tvorby samčích pohlavních buněk (spermií), která má tři fáze: rozmnožovací, růstovou a zrání. U člověka začíná proces zrání zárodečných buněk v období puberty a pokračuje zpravidla až do konce života. Výchozí buňky jsou spermatogonie, které mitózou dávají vzniknout diploidním primárním spermatocytům (rozmnožovací fáze). Primární spermatocyty vstupují do meiózy (procesu dělení, který redukuje počet chromozomů na polovinu) a dělí se na dvě haploidní buňky (s poloviční sadou chromozomů), tzv. sekundární spermatocyty (růstová fáze). Následuje druhé meiotické dělení, kdy ze dvou buněk vznikají čtyři haploidní buňky, tzv. spermatidy (zrání fáze). Ty postupně získávají svůj charakteristický tvar spermie v procesu spermiogeneze. Schéma spermatogeneze je uvedeno na obr. 3 [39]. Celý tento proces je druhově specifický a např. u člověka trvá 65 dní a u myši 34,5 dne. Po ukončení procesu spermiogeneze jsou spermie vytlačovány do nadvarlat, kde nadále dozrávají. Dozrávání je patrné hlavně u cytoplasmatické membrány, která je obohacena o cholesterol a proteiny [8, 9, 40]. Finální maturace u savců je dokončena až v reprodukčním traktu samice při procesu zvaném kapacitace.



Obr. 3. Schéma spermatogeneze [39].

3.4 Kapacitace a akrozomální reakce spermií

Spermie je samčí pohlavní buňka, která je určena k oplodnění vajíčka a tudíž k reprodukci. Spermie se skládá z hlavičky, která nese genetickou informaci, krčku, spojujícího hlavičku a bičík, a samotného bičíku, který umožňuje pohyb spermie, tzv. motilitu. Prostor hlavičky je vymezen cytoplazmatickou membránou, která ji obklopuje [41]. Po spermatogenezi, probíhající ve varlatech, je spermie morfologicky zralá, ale není u savců schopna vajíčko oplodnit. K získání schopnosti oplození dochází až po ejakulaci spermií v samičím pohlavním ústrojí, kde spermie podléhají mnoha biochemickým a fyziologickým změnám, které se nazývají kapacitace [42].

Kapacitace je stále předmětem intenzivních studií a její přesný průběh není zcela objasněný. I přesto je známo, že kapacitace zahrnuje několik zásadních dějů, a to vzrůst tekutosti cytoplazmatické membrány, snížení koncentrace cholesterolu v membráně (tzv. cholesterolový eflux), otevření iontových kanálů, po kterém následuje změna membránového potenciálu, dále ztráta některých povrchových proteinů a také fosforylace proteinů, navozující hyperaktivaci a AR [43].

Uvolňování cholesterolu z plasmatické membrány hlavičky spermie se uskutečňuje pomocí albuminu, který se nachází v pohlavním traktu samice [44]. Tento děj přispívá ke vzrůstu fluidity membrány a je pravděpodobně zodpovědný za následné navazování spermie na vajíčko [45, 46]. Během kapacitace se také mění membránový potenciál z přibližně -30 na -60 mV. Tento pokles je způsoben náhlým uvolněním draselných iontů z buňky, které následně ovlivňují vápenaté kanály [43, 47, 48]. Kanály se otevírají a extracelulární vápník vniká do buňky. Tento proces je pro kapacitaci velmi významným, neboť vápenaté ionty jsou nutné pro fúzi samčí a samičí membrány během oplození [46]. Následuje fosforylace proteinů na tyrosinových zbytcích, což je post-translační modifikace ovlivňující chování proteinů. Ta je pro spermii, neschopnou transkripce, velmi důležitá, a to také pro její hyperaktivaci a pro průběh AR [46, 49].

Akrozomální reakce je vyvrcholením kapacitace a je nezbytným předpokladem pro oplodnění vajíčka spermiemi savců. Spermie se váže k extracelulárnímu obalu vajíčka, tzv. *zona pellucida*, přes specifické receptory, které jsou lokalizovány na anteriorní části hlavičky spermie. Vazbou spermie k *zona pellucida* se aktivují specifické G-proteiny v plasmatické membráně spermie. G-proteiny hrají úlohu ve zvýšení intracelulární koncentrace vápenatých iontů, nutnou pro zdárný průběh AR

[50]. Při akrozomální reakci dochází k uvolnění lytických enzymů, díky jimž je spermie schopna projít vnějšími obaly vajíčka.

In vitro lze proces kapacitace, popřípadě navození AR, uskutečnit za přesně vymezených podmínek, a to pomocí inkubace spermií v kapacitačním/fertilizačním médiu, obsahujícím albumin a vápenaté ionty, za teploty 37 °C v atmosféře s 5% CO₂, čímž se napodobí fyziologické prostředí samičího pohlavního ústrojí [9, 43].

3.5 Metody stanovení estrogenních hormonů a progestinů

Metody, využívané ke stanovení estrogenní hormonů, musí být dostatečně citlivé pro stanovení těchto analytů, které se v životním prostředí vyskytují ve velmi nízkých koncentracích (ng/l). Velmi často tedy vlastním separačním technikám předchází prekoncentrace vzorku pomocí extrakce, nejčastěji pomocí extrakce kapalina-kapalina (LLE) nebo extrakce na pevné fázi (SPE), za použití methanolu, acetonitrilu nebo diethyletheru jako elučního činidla.

Pro analýzu estrogenů byly v minulosti často využívány imunologické metody, jako je tzv. radio immunoassay (RIA) nebo enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Tyto metody vykazovaly dostatečnou citlivost, avšak často nízkou selektivitu díky tzv. cross-reakci. V průběhu posledního desetiletí byly nahrazeny metodou plynové chromatografie (GC) a zejména HPLC [29, 30].

Plynová chromatografie se dnes nejčastěji využívá, v kombinaci s MS detekcí. Jelikož mají steroidní hormony nízkou termální stabilitu i těkavost, je nutná jejich předchozí derivatizace, nejčastěji pomocí silylace [51].

Dnes je nejvyužívanější metodou pro analýzu estrogenů HPLC s hmotnostní detekcí, hlavně díky možné kombinaci s různými iontovými zdroji jako je ionizace elektrosprejem (ESI) nebo ionizace za atmosférického tlaku (APCI) [29]. Hmotnostní detekce se velmi často používá v tandemovém uspořádání (kombinace dvou a více hmotnostní spektrometrů), které zvyšuje citlivost a selektivitu detekce [52]. Kromě MS se v případě vyšších koncentrací využívá také levnější spektrofotometrická detekce (DAD, UV) nebo fluorescenční detekce. Na rozdíl od GC není nutná derivatizace estrogenů [53]. V případě HPLC analýzy estrogenů se nejčastěji používá C₁₈ nebo C₈ stacionární fáze v kombinaci s vodně-methanolicou či vodně-acetonitrilovou mobilní fází. Způsoby a podmínky separace estrogenních hormonů v environmentálních

vzorcích a v potravinách jsou sumarizovány v několika přehledných článcích [52, 54, 55].

Počet prací, zabývajících se analýzou progestinů v životním prostředí, je malý. Podobně jako estrogeny se progestiny vyskytují v environmentálním prostředí jen ve velmi nízkých koncentracích ($\mu\text{g/l}$ až ng/l). Proto se k jejich analýze nejčastěji opět využívají metody GC a HPLC v kombinaci s MS detekcí. Těmto separačním metodám často předchází prekoncentrace pomocí SPE, obdobně jako u estrogenních hormonů [55, 56]. Pro stanovení vybraných steroidních hormonů (včetně PRG) ve vodných vzorcích (Balaton, Maďarsko) byla využita metoda HPLC/MS a separační systém se skládal z kolony Kinetex C_{18} , (velikost zrnění $2,6 \mu\text{m}$) a mobilní fáze, tvořené acetonitrilem a vodným roztokem mravenčí kyseliny. Koncentrace PRG, zjištěná ve 20 různých vodných vzorcích, se pohybovala v rozmezí $0,23 - 13,67 \text{ ng/l}$ [56].

Metody studia vlivu estrogenních hormonů na kapacitaci spermií a progesteronu na AR jsou v literatuře publikovány pouze ojediněle. Pro studium vlivu estrogenů na kapacitaci kančích spermií *in vitro* bylo použito imunochemických metod (ELISA, průtoková cytometrie) [13]. Bylo zjištěno, že stimulační vliv závisí na době kapacity, konkrétním estrogeneru a konkrétním jedinci. Při studiu vlivu estrogenů na kapacitaci myších spermií *in vivo* imunochemickými metodami bylo zjištěno, že při podávání E_2 myším samcům během jejich dospívání dochází k předčasné kapacitaci spermií v nadvarletí, což může ohrozit jejich oplozovací schopnost v samičím pohlavním ústrojí [12]. V publikaci Hortové et al. byla vypracována metoda HPLC s UV detekcí pro stanovení E_3 v M_2 fertilizačním médiu, pomocí níž byla sledována zbytková koncentrace E_3 během kapacity myších spermií. Bylo zjištěno, že během kapacity dochází k poklesu koncentrace volného E_3 [14]. Vypracovaná HPLC metoda s UV detekcí umožňovala otestovat pouze koncentrační hladinu $200 \mu\text{g/l}$, nikoli nižší. Pro sledování změny koncentrace E_2 během kapacity myších spermií byla vyvinuta metoda HPLC s tandemovou hmotnostní detekcí. Pro separaci E_2 byla použita kolona SunFire s navázanou C_{18} stacionární fází a s vodně-acetonitrilovou mobilní fází. Bylo zjištěno, že během kapacity dochází k poklesu a poté nárůstu koncentrace nevázaného E_2 [16].

3.6 Metoda HPLC s MS detekcí

V dnešní době je HPLC jednou z nejpoužívanějších technik v analytické chemii. Zvolení správného způsobu detekce je, vedle výběru vhodné kolony (stacionární fáze), velmi důležitým parametrem, ovlivňujícím úspěšné provedení analýzy. V poslední době je stále častěji používán hmotnostní spektrometr (MS), založený na principu určení hodnoty m/z (kde m je relativní molekulová hmotnost vzniklého iontu a z je nábojové číslo, tedy počet elementárních nábojů bez ohledu na polaritu), iontů vznikajících ionizací a následnou fragmentací molekuly analytu. Tyto ionty se pak dělí různými fyzikálními způsoby podle tohoto poměru.

Existuje několik různých typů provedení hmotnostního spektrometru, ale všechny typy se skládají ze tří základních částí: iontového zdroje, analyzátoru a detektoru částic. Iontový zdroj převádí neutrální molekuly na nabitě částice (kladné nebo záporné ionty), které jsou následně analyzovány v hmotnostním analyzátoru [57].

Samotná separace iontů je prováděna v hmotnostním analyzátoru, ve kterém dochází k separaci iontů na základě poměru m/z . Pro tento účel se mohou využít magnetický hmotnostní analyzátor, kvadrupólový analyzátor (Q), průletový analyzátor (TOF) nebo iontová past (IT). Již zmíněný kvadrupólový analyzátor je tvořen čtyřmi tyčemi s hyperbolickým nebo kruhovým průřezem, připojenými ve dvou protilehlých párech ke stejnosměrnému a střídavému napětí. Za přesně zvolené kombinace hodnot těchto napětí putují do detektoru ionty o odpovídajícím poměru m/z , zatímco ostatní jsou vychýleny a zachyceny na tyčích a tudíž na detektor nedopadají a nejsou detekovány.

V posledních letech se stále více používají tzv. hybridní analyzátory neboli sériové (tandemové) zapojení dvou a více různých (nebo stejných) analyzátorů, kde dochází ke spojení jejich výhod. Jmenovat lze např. trojitý kvadrupól (QqQ) [58]. Tandemové zapojení kvadrupólů (QqQ) bylo vyvinuto roku 1978 Yostem a Enkem. Toto zapojení se skládá ze dvou klasických kvadrupólů (Q), které po vhodně zvoleném napětí slouží jako filtry, propouštějící ionty pouze o definovaném poměru m/z . Mezi nimi je umístěna kolizní cela (q), která je naplněna kolizním plynem, sloužícím k fragmentaci iontů. Trojitý kvadrupól je vhodný zejména pro kvantitativní analýzu díky svému širokému dynamickému koncentračnímu rozsahu, vysoké citlivosti a

vysoké skenovací rychlosti. Naopak mezi jeho nevýhody patří nižší správnost určení poměru m/z , nižší rozlišovací schopnost a nižší hmotnostní rozsah [59].

Hmotnostní spektrometr v tandemovém zapojení umožňuje pracovat různými způsoby, v tzv. módech. Tyto módy dokáží podat rozdílné informace o analyzované látce díky odlišné kombinaci užití jednotlivých kvadrupólů. Základní módy, v nichž může trojitý kvadrupól pracovat, jsou: Scan, SIM, Product Ion a MRM mód. Základním typem je mód Scan, který pracuje v režimu jednoduchého kvadrupólu. K filtraci iontů dochází na třetím kvadrupólu a první a druhý kvadrupól (tzv. kolizní cela) slouží v tomto případě jako iontová optika. Pomocí tohoto módu získáme celkové hmotnostní spektrum dané látky. Druhým typem módu je tzv. monitorování vybraného iontu, mód SIM. Zde je aktivní první kvadrupól, který je nastaven tak, aby propouštěl pouze požadovanou hodnotu m/z , a v tomto případě slouží jako iontová optika druhý a třetí kvadrupól. Záznam tohoto módu vykazuje pouze intenzity iontu požadované hodnoty m/z . Třetím typem módu je sken produktových iontů, tzv. Product Ion mód, při kterém jsou aktivní všechny tři kvadrupóly a tudíž MS pracuje v režimu trojitého kvadrupólu. V tomto módu projde prvním kvadrupólem pouze iont o definovaném m/z , v kolizní cele dojde k jeho fragmentaci, díky které vzniká několik fragmentovaných iontů a ty jsou následně skenovány třetím kvadrupólem a dopadají na detektor. Pomocí tohoto módu lze získat hmotnostní spektrum fragmentů, vzniklých při štěpení iontu o definované hodnotě m/z v druhém kvadrupólu a lze určit m/z produktového iontu. Čtvrtý typ módu je tzv. MRM mód, při kterém jsou opět aktivní všechny tři kvadrupóly a MS tedy pracuje v režimu trojitého kvadrupólu. Prvním kvadrupólem projde iont o definované hodnotě m/z , tzv. prekurzorový iont, ten je štěpen v kolizní cele na fragmenty, třetím kvadrupólem projde pouze fragment, iont o definované hodnotě m/z , tzv. produktový iont, a ten je následně detekován. Díky tomuto skenu lze získat vysokou selektivitu, založenou na tzv. přechodu mezi prekurzorovým a produktovým iontem sledované látky [60].

4. Experimentální část

4.1 Chemikálie

- 17 α -ethynylestradiol (čistota \geq 98,0 %, Sigma – Aldrich, Německo)
- progesteron (čistota \geq 99,0 %, Sigma – Aldrich, Německo)
- M2 médium s 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonovou kyselinou (HEPES) bez penicilinu a streptomycinu, vhodné pro myší embrya, s 0,4% obsahem BSA (Sigma – Aldrich, Německo)
- acetonitril (čistota LC-MS, Sigma – Aldrich, Německo)
- ethanol (čistota \geq 99,9 %, Sigma – Aldrich, Německo)
- mravenčí kyselina (čistota 98 – 100 %, Merck, Německo)
- deionizovaná voda (vodivost 1,85 μ S, Milli-Q Millipore, Bedford, USA)
- parafinový olej (Nr 8904.1, Carl Roth, Německo)

4.2 Instrumentace a pomůcky

- HPLC Agilent Technologies 1290 Infinity (Agilent Technologies, Německo), sestávající z odplyňovače mobilní fáze, kvartérní pumpy, automatického dávkovače a kolonového termostatu
- MS/MS Triple Quad LC-MS Agilent Technologies 6460 tandemový hmotnostní spektrometr (Agilent Technologies, Německo)
- sbírání dat bylo provedeno v programu Agilent MassHunter Workstation Acquisition verze B.03.01 (Agilent Technologies, CA, USA)
- zpracování dat bylo provedeno v programu Agilent MassHunter Qualitative Analysis verze B.03.01 (Agilent Technologies, CA, USA), Microsoft Excel 2010 Professional (Microsoft Co., USA) a OriginPro 8.0 (OriginLab Co., CA, USA)
- kolona
 - SunFire C₁₈ (150 x 4,6 mm, 5 μ m, Waters, MA, USA)
 - Kinetex EVO C₁₈ (100 x 3,0 mm, 2,6 μ m, Phenomenex, CA, USA)
- analytické váhy APX-100 (Denver Instrument, Německo)
- ultrazvuk Ultrasonic LC 30H (Německo)

- centrifuga MiniSpin Plus (Eppendorf, Německo)
- inkubátor NB-203 (N-BIOTEK, Korea)
- světelný mikroskop Olympus CX 21 (Olympus, ČR)
- Flow box EN 12469 Biohazard CleanAir (Telstar, Španělsko)
- Petriho misky 35 mm x 10 mm (Corning, NY, USA)
- laboratorní myš, inbrední kmen BALB/c (Velaz, ČR)

4.3 Počáteční HPLC-MS/MS podmínky

Předkládaná diplomová práce navazuje na výsledky popsané v diplomové práci H. Adamusové [16]. V této práci byl sledován vliv E2 na průběh kapacitace myších spermií. Změny koncentrace E2 byly sledovány v reverzním separačním módu. Pro separaci byla použita kolona SunFire s vázanou oktadecylovou stacionární fází na deaktivovaném silikagelovém nosiči s velikostí zrnění 5 μm . Mobilní fáze byla tvořena binární směsí acetonitril/voda s přídavkem 0,1% mravenčí kyseliny (HCOOH) v obou složkách v objemovém poměru 40/60 (v/v). Pro detekci a kvantifikaci E2 a částečně i EE2 byla použita tandemová hmotnostní detekce s ionizací elektrosprejem v pozitivním ionizačním módu. Vzhledem ke strukturální podobnosti E2 s v této práci studovanými hormony, bylo při hledání vhodného systému pro analýzu EE2 a PRG vycházeno ze stejného separačního systému.

4.4 Příprava zásobních a pracovních roztoků EE2 a PRG v ethanolu a v M2 médiu pro optimalizaci HPLC-MS/MS metody

Studium působení steroidních hormonů na myší spermie bylo v rámci biologického pokusu se spermii zaměřeno na tři různé koncentrace (200, 20 a 2 $\mu\text{g/l}$) EE2 a PRG. Proto byly připraveny zásobní ethanolické roztoky EE2 a PRG o koncentraci 20 mg/l a poté pracovní roztoky EE2 a PRG v ethanolu a v M2 médiu.

Zásobní ethanolický roztok EE2

- 2 mg standardu EE2 bylo rozpuštěno ve 100 ml ethanolu.

Pracovní ethanolické roztoky EE2:

- ředění zásobního ethanolického roztoku
 - příprava koncentrace 200 $\mu\text{g/l}$
 - z odměrné baňky s koncentrací 20 mg/l bylo odpipetováno 500 μl do 50ml odměrné baňky a doplněno po risku ethanollem
 - příprava koncentrace 20 $\mu\text{g/l}$
 - z odměrné baňky s koncentrací 20 mg/l bylo odpipetováno 50 μl do 50ml odměrné baňky a doplněno po risku ethanollem
 - příprava koncentrace 2 $\mu\text{g/l}$
 - z odměrné baňky o koncentraci 200 $\mu\text{g/l}$ bylo odpipetováno 500 μl do 50ml odměrné baňky a doplněno po risku ethanollem

Zásobní ethanolický roztok PRG

- 2 mg standardu PRG bylo rozpuštěno v 100 ml čistého ethanolu

Pracovní ethanolické roztoky PRG o koncentraci 200, 20 a 2 $\mu\text{g/l}$ byly připraveny analogicky jako v případě EE2.

Následujícím způsobem byly připravovány také vzorky v M2 médiu, ve kterém byly poměřované stejné koncentrace (200, 20 a 2 $\mu\text{g/l}$) EE2 a PRG jako v případě ethanolických roztoků.

Vzorky EE2 a PRG v M2 médiu:

- příprava koncentrace 200 $\mu\text{g/l}$
 - ze 100ml odměrné baňky s koncentrací 20 mg/l v ethanolu bylo odpipetováno 10 μl do 2ml vialky a doplněno 990 μl M2 média do 1 ml
- příprava koncentrace 20 $\mu\text{g/l}$
 - z 50ml odměrné baňky s koncentrací 200 $\mu\text{g/l}$ v ethanolu bylo odpipetováno 100 μl do 2ml vialky a doplněno 900 μl M2 média do 1 ml
- příprava koncentrace 2 $\mu\text{g/l}$
 - z 50ml odměrné baňky s koncentrací 20 $\mu\text{g/l}$ v ethanolu bylo odpipetováno 100 μl do 2ml vialky a doplněno 900 μl M2 média do 1 ml

4.5 Příprava biologického vzorku

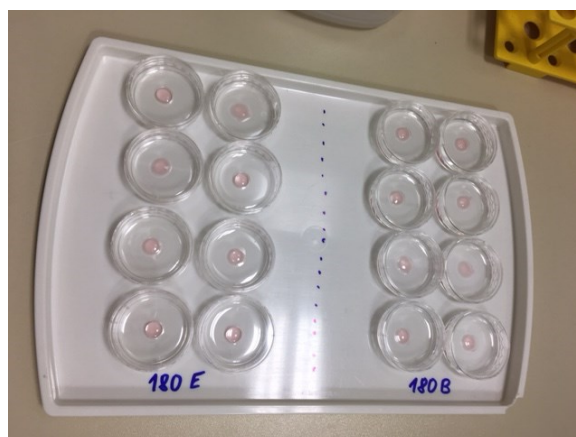
Nejprve byl připraven roztok standardu EE2 v ethanolu o koncentraci 200 mg/l. Z tohoto zásobního roztoku pak byly připraveny pracovní ethanolické roztoky EE2 o koncentraci 20 a 2 mg/l. Biologický vzorek, tedy směs M2 média, ethanolického roztoku standardu EE2 a myších spermií, byl připravován na pracovišti laboratoře reprodukční biologie, BTÚ AV ČR, BIOCEV následujícím způsobem:

Nejprve bylo v laminárním boxu odpipetováno 999 μ l M2 média do zkumavky a k němu byl napipetován 1 μ l pracovního ethanolického roztoku EE2 o příslušné koncentraci (200, 20 nebo 2 mg/l) tak, aby vznikla finální testovaná koncentrace EE2 v M2 médiu (200, 20 nebo 2 μ g/l) a obsah ethanolu ve vzorku byl zachován minimální a konstantní, což je důležité pro zachování životnosti (viability) později přidávaných spermií. Zkumavka byla řádně promíchána a následně se z ní odpipetovalo po 100 μ l do 8 malých fertilizačních Petriho misek. Napipetovaná směs byla v Petriho misce převrstvena 1,5 ml parafinového oleje, aby se zabránilo vypařování. Všechny vzorky (misky) pak byly vloženy do inkubátoru na 60 min temperaci, probíhající při teplotě 37 °C a pod 5% CO₂ ve vzduchu.

V mezičase (během 60 min temperace) byl usmrcen myší samec cervikální dislokací, kterému byla následně vyňata pravá i levá hlava nadvarlete (*cauda epididymis*) (viz obr. 4 vlevo). Z obou *caudae epididymidae* byl poté odebrán čtvrtý a pátý region, který obsahuje nejvíce zralých spermií. Pod světelným mikroskopem byla zkontrolována pohyblivost (motilita) spermií. Následně byly *caudae* vloženy do nachystaných fertilizačních Petriho misek s M2 médiem a parafinovým olejem na 10 min do inkubátoru, aby došlo k uvolnění spermií. Po 10 min byla opět zkontrolována motilita spermií pod mikroskopem. 5 μ l uvolněných spermií ($5 \cdot 10^6$) bylo napipetováno do každé Petriho misky, obsahující již vytemperovaný roztok EE2 v M2 médiu a takto připravené misky byly opět inkubovány za stejných podmínek po různě dlouhou dobu, a to 0, 30, 60, 90, 120, 150 a 180 min, během které probíhala kapacitace spermií. Po uplynutí jednotlivých časů byl ze všech 8 Petriho misek odpipetován roztok M2 média se spermiemi bez parafinového oleje do jedné mikrozkušavky (Eppendorfky) a poté centrifugován po dobu 10 min při 12 000 otáčkách/min. Tímto způsobem byly odděleny spermie od roztoku a 600 μ l získaného supernatantu bylo napipetováno do vialky a připraveno pro následnou analýzu optimalizovanou HPLC-MS/MS metodou. Takto

připravený vzorek reprezentoval jeden čas odběru během kapacity. Blank (referenční vzorek) byl připraven stejným experimentálním způsobem jako vlastní biologický vzorek, avšak bez přídavku myších spermií. Pro každý proměřovaný čas odběru (0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 min) bylo tedy nachystáno šestnáct misek, do osmi byly po 60ti min temperaci přidávány myší spermie, do osmi zbylých nikoliv. Ty posloužily jako blank (viz obr. 4 vpravo).

Stejným způsobem bylo postupováno i v případě přípravy biologického vzorku a blanku s PRG v M2 médiu.



Obr. 4. Technika odebrání myší *cauda epididymis* (vlevo); připravené Petriho misky obsahující (E) biologický vzorek a (B) blank, určené pro kapacitaci v čase 180 min (vpravo).

5. Výsledky a diskuze

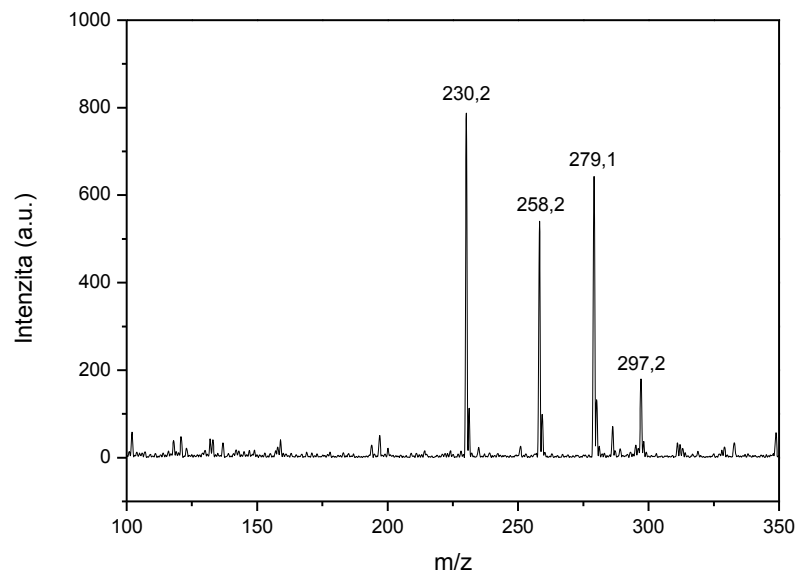
5.1 Optimalizace separačního systému pro EE2

Jak bylo již uvedeno v kapitole 4.3, pro analýzu EE2 byl jako první využit separační systém popsáný v diplomové práci H. Adamusové [16]. Pro separaci byla použita kolona SunFire a mobilní fáze o složení 40/60 (v/v) ACN/voda, s přidavkem 0,1% HCOOH v obou složkách (pro lepší ionizaci EE2 za podmínek ionizace v pozitivním ionizačním módu), průtoková rychlost mobilní fáze 0,8 ml/min, velikost nástřiku 5 μ l. Pro optimalizaci byl jako vzorek použit roztok EE2 v ethanolu o koncentraci 20 mg/l.

Nejprve byly optimalizovány podmínky hmotnostní detekce, konkrétně parametry elektrospreje. Byly testovány hodnoty teploty a průtoku sušícího plynu, napětí na kapiláře a tlak nebulizačního plynu. Optimalizované podmínky byly následující:

- teplota sušícího plynu: 350 °C
- průtok sušícího plynu: 10 l/min
- napětí na kapiláře: 4000 V
- tlak nebulizačního plynu: 55 psi

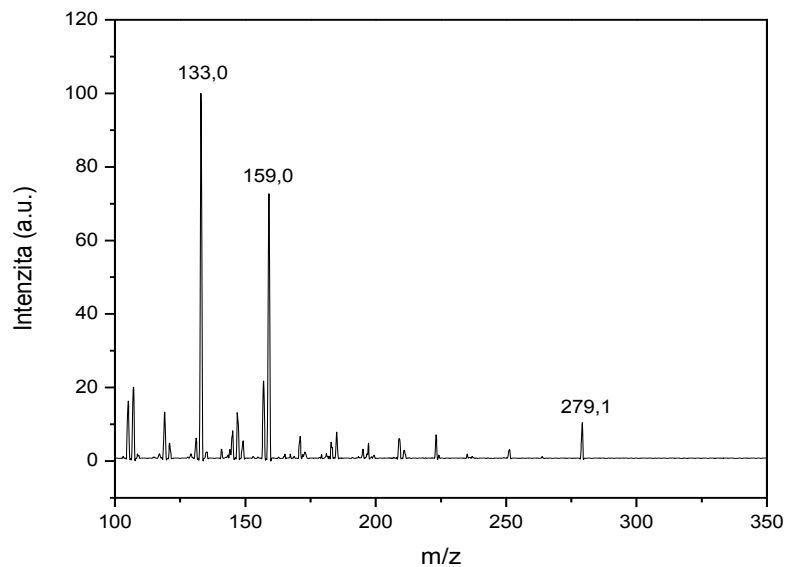
Následně byl 20 mg/l roztok EE2 změřen v módu Scan. Bylo tedy proměřováno jeho hmotností spektrum v rozsahu 100 – 350 m/z , s časem skenu 500 ms; napětí na fragmentoru bylo zvoleno 100 V a bylo měřeno v pozitivním ionizačním módu. Získané spektrum je ukázáno na obr. 5. V tomto módu je možné zvolit tzv. prekurzorový iont, tedy většinou pík s nejvyšší intenzitou. Relativní molekulová hmotnost EE2 je rovna 296 a ve spektru byl nalezen pík s $m/z = 297,2$, odpovídající protonovanému molekulárnímu iontu této látky $[296 + H]^+$, ale pouze s malou intenzitou. Jako prekurzorový iont byl zvolen iont $[278,1 + H]^+$, určený jako štěp po neutrální ztrátě vody ($296 - 18 = 278$). Nejintenzivnější signál ve spektru s hodnotou $m/z = 230,2$ se vyskytoval v průběhu celého měření s neměnnou intenzitou, šlo tudíž o neznámou kontaminaci.



Obr. 5. Kompletní hmotnostní spektrum EE2 změřené v módu Scan.

Dále byly v módu SIM testovány různé hodnoty napětí na fragmentoru (80, 100 a 120 V) a v módu Product Ion testovány různé hodnoty kolizní energie (5, 10, 15, 20 a 25 V) a hledán produktový iont. Jako produktový iont byla zvolena hmota odpovídající $m/z = 133,0$. Záznam hmotnostního spektra EE2, změřeného v módu Product Ion, je uveden na obr. 6. Z obr. 6 je také patrné, že intenzita píku, odpovídající prekurzorovému iontu s $m/z = 279,1$, je minimální a jde tedy o správně zvolenou fragmentaci. Optimalizované hodnoty, které vykazovaly největší plochu píku a tudíž nejvyšší citlivost, byly nastaveny následovně:

- prekurzorový iont = 279,1
- produktový iont = 133,0
- napětí na fragmentoru = 100 V
- kolizní energie = 15 V



Obr. 6. Záznam hmotnostního spektra EE2, změřeného v módu Product Ion po fragmentaci prekurzorového iontu o hodnotě $m/z = 279,1$.

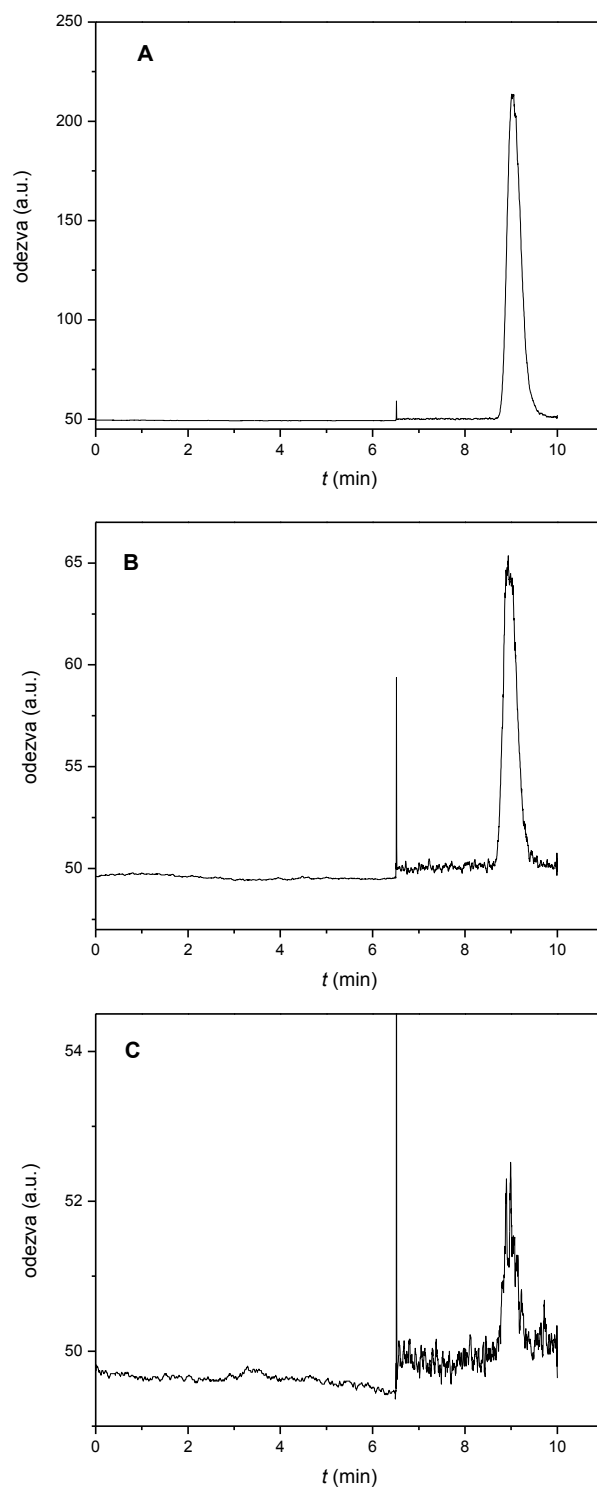
Další měření probíhala za výše popsaných optimalizovaných podmínek v tzv. MRM módu, umožňujícím sledovat analyt za daných specifických podmínek. Tento mód je podstatně citlivější, a tak byl pro další měření používán ethanolický roztok EE2 o koncentraci 200 $\mu\text{g/l}$.

Vzhledem k tomu, že v mobilní fázi o složení 40/60 (v/v) ACN/voda, s přidavkem 0,1% HCOOH v obou složkách, eluoval EE2 až ve 20,4 min, byly testovány i mobilní fáze s vyšším obsahem ACN, a to v rozsahu 45 – 60 obj. %. Z hlediska retence se jako nejvhodnější jevila mobilní fáze s obsahem ACN 55 obj. %, v níž došlo ke zkrácení retence EE2 na 6,5 min a k podstatnému zlepšení v symetrii píku. Vzhledem k tomu, že optimalizační měření byla prováděna s ethanolickým roztokem EE2, avšak pro biologické účely je nutné stanovovat EE2 v M2 médiu, obsahujícím BSA, bylo nutné zjistit, zda nedochází k vysrážení BSA v mobilních fázích s vyšším obsahem ACN. Bylo zjištěno, že v mobilních fázích s obsahem ACN vyšším než 50 obj. % dochází k vysrážení média, a proto bylo pro separaci EE2 vybráno složení mobilní fáze 50/50 (v/v) ACN/H₂O s přidavkem 0,1% HCOOH v obou složkách.

Při hmotnostní detekci je velikost odezvy závislá na ionizaci analytu, která se většinou zhoršuje se snižujícím se obsahem organické složky v mobilní fázi. Nižší

průtokové rychlosti umožňují dokonalejší odsušení mobilní fáze a tím i zlepšení ionizace. Na druhé straně však dochází k prodloužení retence a zhoršení symetrie píku. Proto byl sledován i vliv průtokové rychlosti mobilní fáze s 50% obsahem ACN v rozmezí 0,5 – 0,9 ml/min na symetrii píku a velikost odezvy a jako nejvhodnější se jevila průtoková rychlost 0,8 ml/min. Retenční čas analytu při těchto podmínkách byl 9,0 min. Jako poslední byl optimalizován objem nástřiku vzorku. Nástřik byl sledován v rozsahu 5 - 25 μ l a jako nejvhodnější byl vybrán objem 20 μ l, poskytující největší plochu i výšku píku, aniž by byl pík frontující, což je příznakem předávkování kolony.

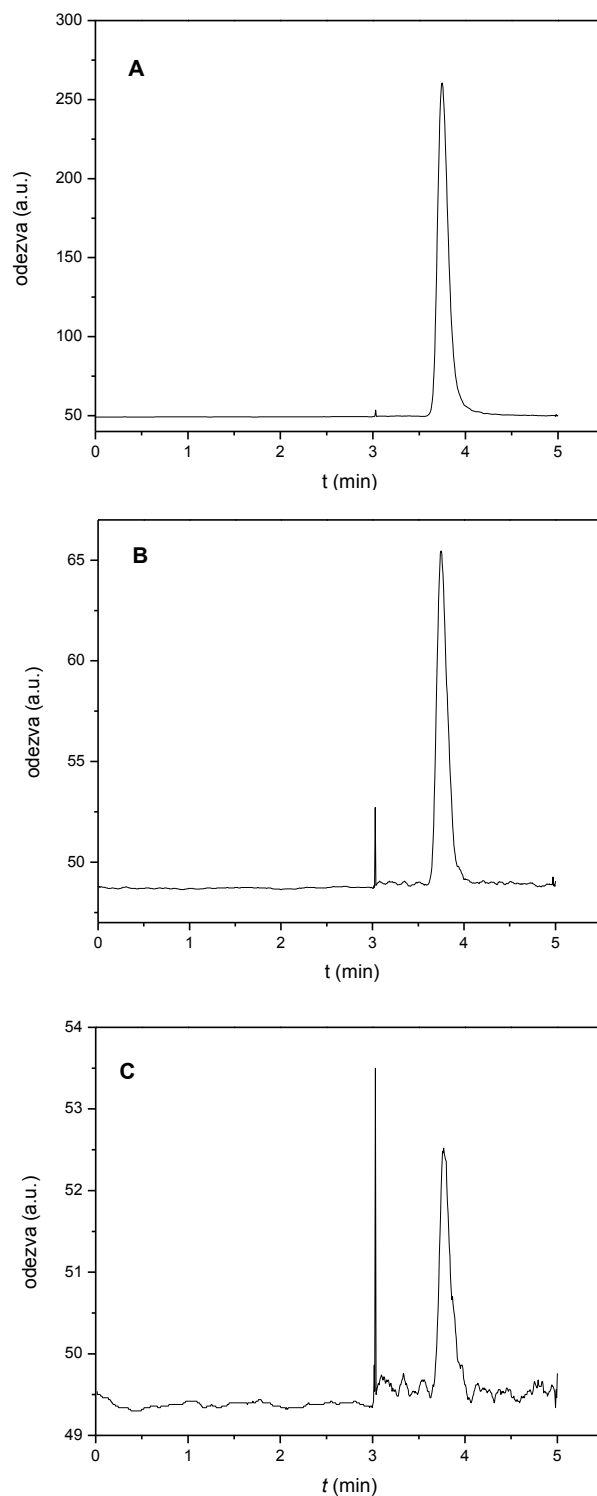
Optimalizované parametry byly aplikovány na analýzu roztoku EE2 v M2 médiu o koncentraci 200 μ g/l. Při proměřování vzorků v M2 médiu byl eluát prvních 6,5 min analýzy odváděn do odpadu, aby se minimalizoval vstup BSA do elektrospreje a až poté byl vzorek zaváděn do hmotnostního analyzátoru. Chromatogramy, získané jak pro ethanolické roztoky EE2, tak pro roztoky EE2 v M2 médiu (koncentrace 200, 20 a 2 μ g/l), byly porovnány a bylo zjištěno, že v obou roztocích bylo dosaženo podobné odezvy a že optimalizované parametry hmotnostní detekce, získané pro ethanolické roztoky EE2, lze použít i pro roztoky EE2 v M2 médiu a že matriční efekt M2 média je minimální. Chromatogramy, získané pro všechny tři testované koncentrace EE2 v médiu, jsou ukázány na obr. 7. Z obr. 7 je patrné, že pro koncentraci 2 μ g/l nebyl získán pík dostatečně rozeznatelný od šumu základní linie a nebylo by tudíž možné biologické vzorky s touto testovací koncentrací správně kvantifikovat. Z tohoto důvodu byla kolona SunFire vyměněna za kolonu Kinetex EVO C₁₈, která také obsahuje oktadecylovou stacionární fázi, je však kratší a s nižším zrněním, a tak by mohla poskytnout vyšší citlivost pro stanovení EE2.



Obr. 7. Chromatogramy získané pro koncentraci EE2 v M2 médiu (A) 200 µg/l, (B) 20 µg/l a (C) 2 µg/l. Podmínky měření: kolona SunFire C₁₈, mobilní fáze 50/50 (v/v) ACN/H₂O, s 0,1 % obsahem HCOOH v obou složkách, průtok mobilní fáze 0,8 ml/min, nástřik 20 µl, měřeno v MRM módu při přechodu 279,1→ 133,0, retenční čas 9,0 min.

Analýza EE2 na koloně Kinetex EVO C₁₈ probíhala za již zmíněných optimalizovaných podmínek pro separaci, tedy v mobilní fázi o složení 50/50 (v/v) ACN/H₂O, s přídavkem 0,1% HCOOH v obou složkách, v MRM módu při přechodu 279,1→ 133,0, napětí na fragmentoru 100 V a kolizní energii 15 V. Pro tuto kolonu byla znovu optimalizována průtoková rychlost mobilní fáze (0,2 - 0,5 ml/min) a objem nástřiku vzorku (1-10 µl). Jako nejlepší byla vybrána průtoková rychlost 0,3 ml/min a nástřik vzorku o objemu 7,5 µl. Navíc byl optimalizován i parametr „Dwell“ (100, 200, 400 a 500 ms) a byla vybrána hodnota 400 ms.

V optimalizovaných podmínkách byly změřeny všechny tři testované koncentrace EE2 v M2 médiu (200, 20 a 2 µg/l) v MRM módu. Jelikož je kolona Kinetex EVO C₁₈ kratší než kolona SunFire C₁₈, byl retenční čas EE2 3,7 min a celková analýza trvala pouze 4,5 min. První 3 min eluoval vzorek opět do odpadu a teprve poté byl zaveden do hmotnostního analyzátoru. Získané chromatogramy jsou uvedeny na obr. 8 a je vidět, že použití kolony Kinetex EVO C₁₈ vedlo k zúžení píku, k podstatnému zlepšení poměru signál/šum a tedy ke zvýšení citlivost pro stanovení EE2 v M2 médiu.



Obr. 8. Chromatogramy získané pro koncentraci EE2 v M2 médiu (A) 200 µg/l, (B) 20 µg/l a (C) 2 µg/l. Podmínky měření: kolona Kinetex EVO C₁₈, mobilní fáze 50/50 (v/v) ACN/H₂O, s 0,1 % obsahem HCOOH v obou složkách, průtok mobilní fáze 0,3 ml/min, nástřik 7,5 µl, měřeno v MRM módu při přechodu 279,1→ 133,0, retenční čas 3,7 min.

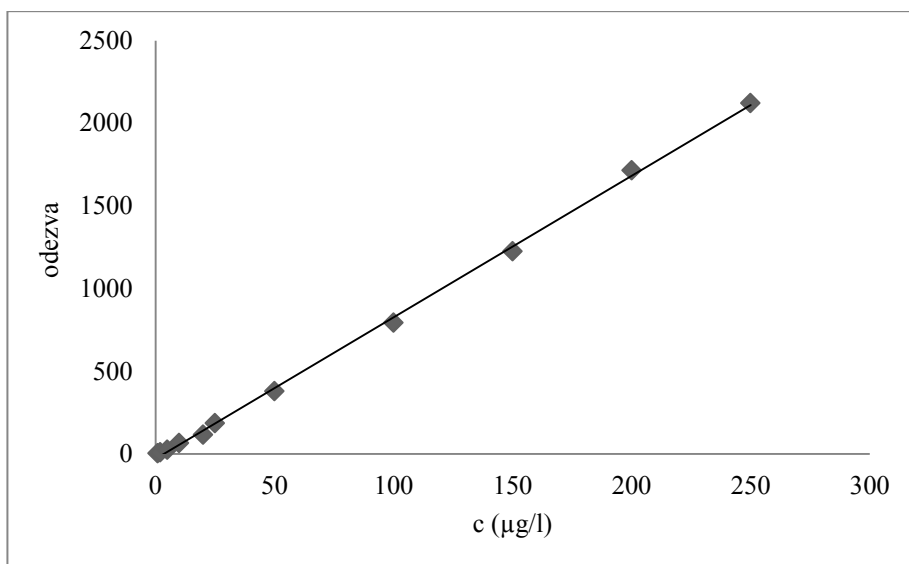
5.2 Kalibrační závislosti pro EE2

V optimalizovaných detekčních a separačních podmínkách (kolona Kinetex EVO C₁₈, ACN/H₂O (v/v) s 0,1% HCOOH v obou složkách, 0,3 ml/min, 7,5 µl, MRM mód, 279,1→133,0) byly proměřeny kalibrační závislosti ploch píků a výšek píků na koncentraci EE2 v M2 médiu

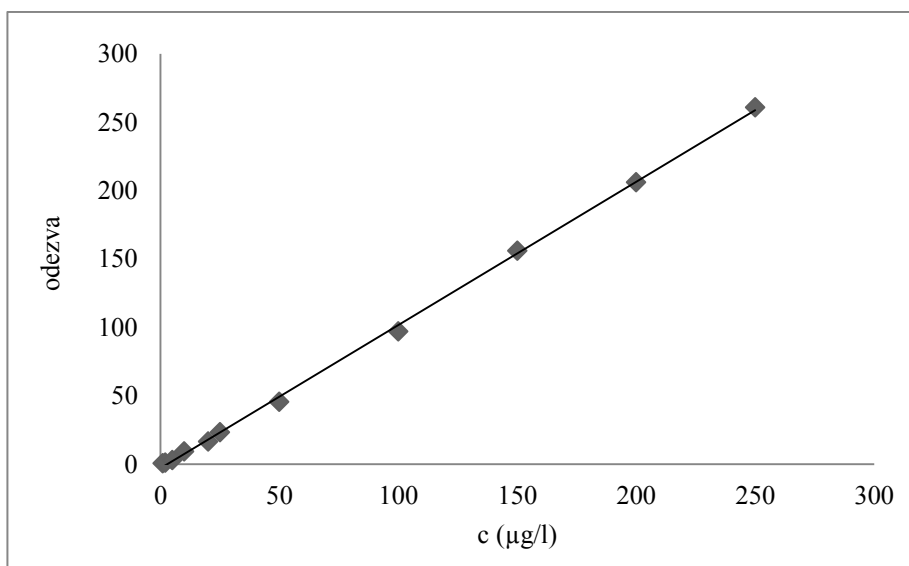
Proměřované koncentrace byly: 1, 2, 5, 10, 20, 25, 50, 100, 150, 200 a 250 µg/l. Tento rozsah byl zvolen tak, aby pokrýval všechny tři testované koncentrace vzorku (200, 20 a 2 µg/l) v biologickém pokusu (viz kap 4.5). Každá koncentrace byla proměřena pětkrát. Relativní směrodatná odchylka (RSD) se pohybovala v rozmezí 1,6 – 6,4 % pro koncentrace 5 – 250 µg/l, 7,2 % pro koncentraci 2 µg/l a 12,5 % pro koncentraci 1 µg/l. Závislosti ploch a výšek píků na koncentraci byly zpracovány metodou lineární regrese. V tabulce 2 jsou uvedeny výsledky regresní analýzy. Závislost plochy a výšky píku na koncentraci byla vyhodnocena pro celý koncentrační rozsah a byly vypočítány hodnoty limitu detekce (LOD) jako trojnásobek hodnoty šumu a limitu kvantifikace (LOQ) jako desetinásobek hodnoty šumu. Hodnota šumu byla získána z amplitudy maximální a minimální hodnoty šumu pro testovanou koncentraci 2 µg/l biologického vzorku (viz obr. 8 C). Pro ilustraci je na obr. 9, resp. 10, znázorněna kalibrační křivka závislosti plochy píku, resp. výšky píku, na koncentraci v celém proměřovaném koncentračním rozsahu.

Tabulka 2. Data, získaná lineární regresí závislosti plochy píku na koncentraci (¹EE2) a výšky píku na koncentraci (²EE2).

	směrnice (l·a.u.·min/µg)	úsek (a.u.·min)	koeficient determinace (R²)	koncentrační rozsah		
¹ EE2	8,56	-29,037	0,9989	1 - 250 µg/l		
	5,99	-1,459	0,9929	1- 25 µg/l		
	8,81	-74,700	0,9992	50 - 250 µg/l		
	směrnice (l·a.u./µg)	úsek (a.u.)	koeficient determinace (R²)	koncentrační rozsah	LOD (µg/l)	LOQ (µg/l)
² EE2	1,05	0,77	0,9993	1 - 250 µg/l	0,88	1,21



Obr. 9. Závislost plochy píku EE2 na jeho koncentraci v M2 médiu (1-250 $\mu\text{g/l}$).

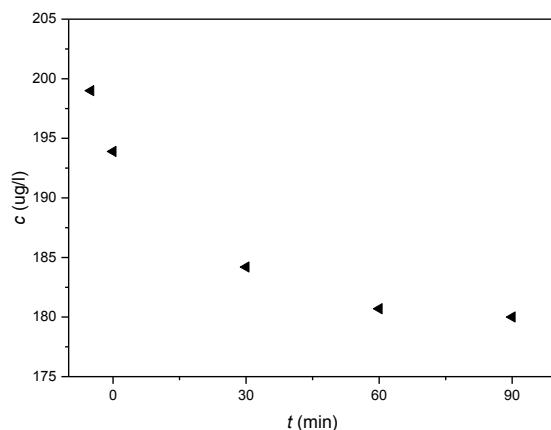


Obr. 10. Závislost výšky píku EE2 na jeho koncentraci v M2 médiu (1-250 $\mu\text{g/l}$).

5.3 Biologický pokus pro EE2

Biologický vzorek, popsáný v kapitole 4.5, posloužil ke sledování vyvazování EE2 myšími spermii a byl tedy proměřen za optimalizovaných podmínek vyvinuté HPLC-MS/MS metody (kolona Kinetex EVO C₁₈, ACN/H₂O (v/v) s 0,1% HCOOH v obou složkách, 0,3 ml/min, 7,5 µl, MRM mód, 279,1 → 133,0).

V literatuře [61, 62] již byla popsána schopnost BSA vázat některé estrogenní látky, a to zejména při *in vitro* podmínkách (60 min temperace, při 37 °C, 5% CO₂). Proto bylo v rámci experimentu zjišťováno, zda dochází k vyvazování i EE2 na BSA, a pokud ano, po jakou dobu. Z tohoto důvodu byly během temperace (EE2 v M2 médiu převrstveno parafinovým olejem, inkubátor, 60 min) odebírány vzorky v časech 0, 30, 60 a 90 min a následně analyzovány vyvinutou HPLC-MS/MS metodou. Byl také změřen kontrolní vzorek, tzn. pouze 200 µg/l EE2 v M2 médiu bez temperace (čas -5 min). Výsledky jsou uvedeny na obr. 11. Z obr. 11 je vidět, že během temperace dochází k poklesu koncentrace EE2 zejména v prvních 30 min a od 60 do 90 min je již koncentrace prakticky konstantní (~180 µg/l). To je velmi důležité, protože v 60. min, kdy při přípravě biologického vzorku temperace končí, jsou ke vzorku okamžitě přidány spermie a začíná jejich kapacitace. Získané výsledky ukazují, že průběh závislosti volného, nevázaného EE2 na čase kapacitace v přítomnosti spermií není ovlivněn přítomností BSA v M2 médiu.



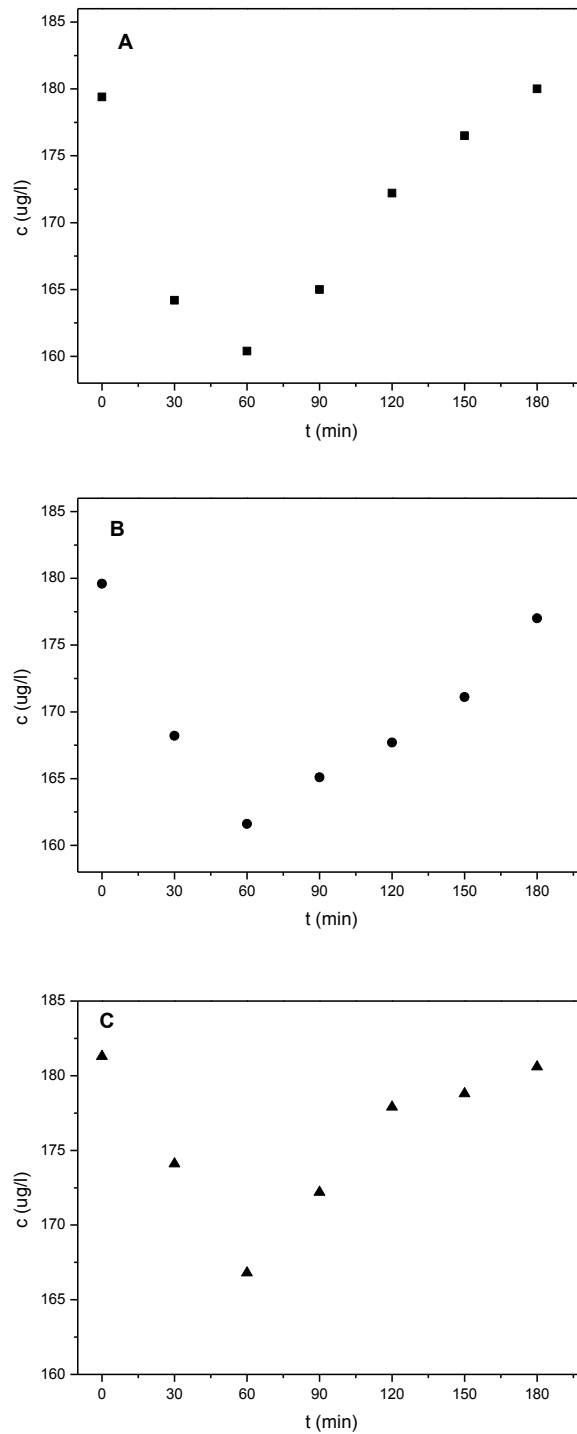
Obr. 11. Závislost koncentrace volného, nevázaného EE2 v M2 médiu během temperace roztoku, testovaná koncentrace EE2 200 µg/l.

Jednotlivé koncentrace EE2 (200, 20 a 2 $\mu\text{g/l}$), testované v rámci biologického pokusu, byly připraveny v M2 médiu. Příslušná koncentrační hladina EE2, tedy obsah volného, nevázaného EE2, byla monitorována během průběhu kapacitace v jednotlivých časech kapacitace. Kapacitace byla sledována v časovém intervalu 0, 30, 60, 90, 120, 150 a 180 min.

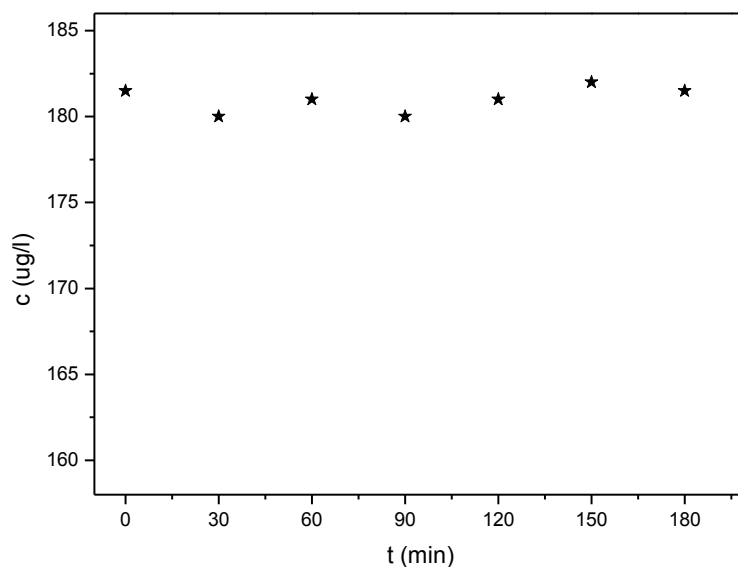
Biologický vzorek (EE2 v M2 médiu s přidavkem spermií) byl proměřován ve třech paralelních řadách, z nichž každá řada reprezentuje odběr spermií z jednoho jedince a sběr vzorků během jedné, časově závislé kapacitace. Pro každou testovanou koncentraci byly také připraveny blanky (tzv. slepé pokusy připravené za stejných experimentálních podmínek, pouze bez přidání spermií). Blanky posloužily pro kontrolu naměřených dat s biologickými vzorky, tzn. k odhalení případných chyb, vzniklých při přípravě a zpracování biologických vzorků před vlastní HPLC-MS/MS analýzou. Každý biologický vzorek i blank byl proměřen pětikrát. Průběh celého měření pro jednotlivé koncentrace EE2 je uveden na obr. 12 – 17.

Z obr. 12 pro proměřovanou koncentraci 200 $\mu\text{g/l}$ je patrný postupný pokles koncentrace v časovém rozmezí 0 až 60 min, s minimem křivky okolo 60 min kapacitace. Toto minimum ukazuje na nejnižší hodnotu volné koncentrace EE2, to tedy znamená, že okolo 60. min kapacitace dochází nejspíše k největšímu vyvazování hormonu povrchem spermie. Následně po prvotním poklesu došlo ke zvyšování koncentrace hormonu, a to až do konce kapacitace, tedy do 180. min, kdy se koncentrace volného, nevázaného EE2 přiblížila původní koncentraci v čase 0 min. Toto postupné zvyšování koncentrace bylo způsobeno nejspíše pozvolným uvolňováním vyvázaného EE2 z povrchu spermie zpět do M2 média. Porovnáním všech tří paralelních řad měření koncentrace 200 $\mu\text{g/l}$ bylo dosaženo velmi podobných výsledků.

Výsledky analýzy blanku, tedy vzorku bez přidavku spermií, jsou uvedeny na obr. 13. V tomto případě má křivka relativně konstantní průběh, kdy se koncentrace pohybovaly v rozmezí 180 - 182 $\mu\text{g/l}$ EE2. Pokles koncentrace z 200 $\mu\text{g/l}$ na počáteční koncentraci 182 $\mu\text{g/l}$, změřenou v čase 0 min, je pravděpodobně způsoben vyvazováním hormonu BSA, který je obsažen v M2 médiu, a také převrstvením M2 média parafinovým olejem. Relativní směrodatná odchylka ($n = 5$) pro všechna měření s testovací koncentrací 200 $\mu\text{g/l}$ nepřevýšila hodnotu 1,8 %.

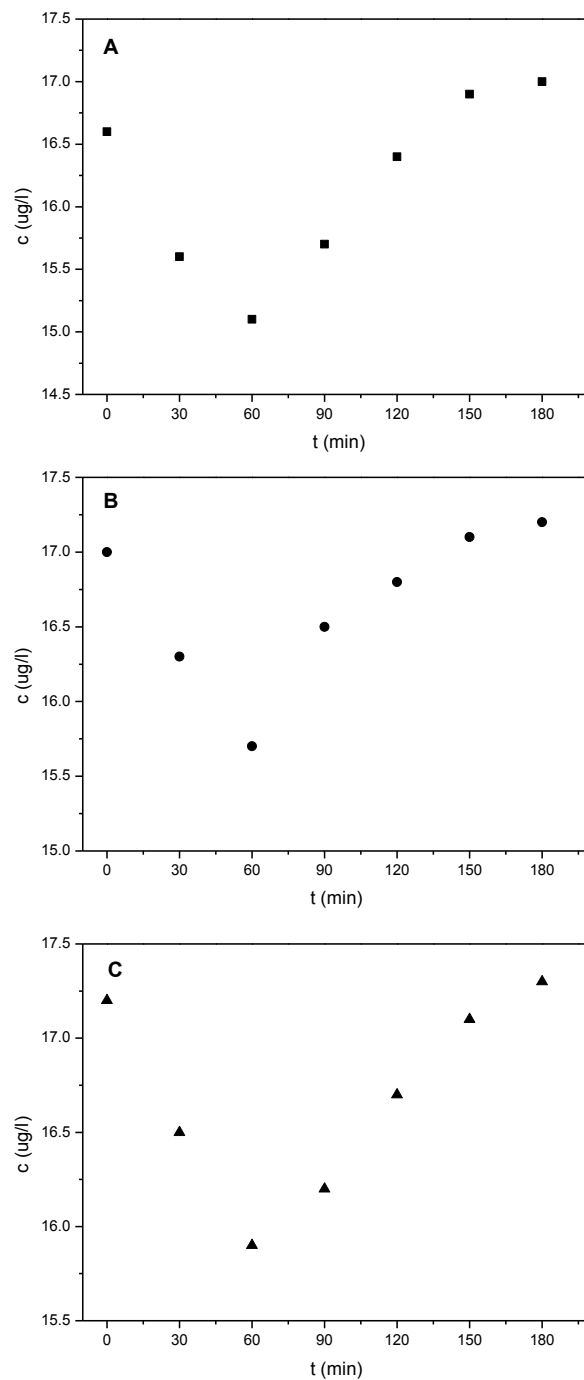


Obr. 12. Závislost koncentrace volného, nevázaného EE2 v M2 médiu na době kapacitace, (A) první řada, (B) druhá řada, (C) třetí řada; biologický vzorek, testovaná koncentrace EE2 200 µg/l.

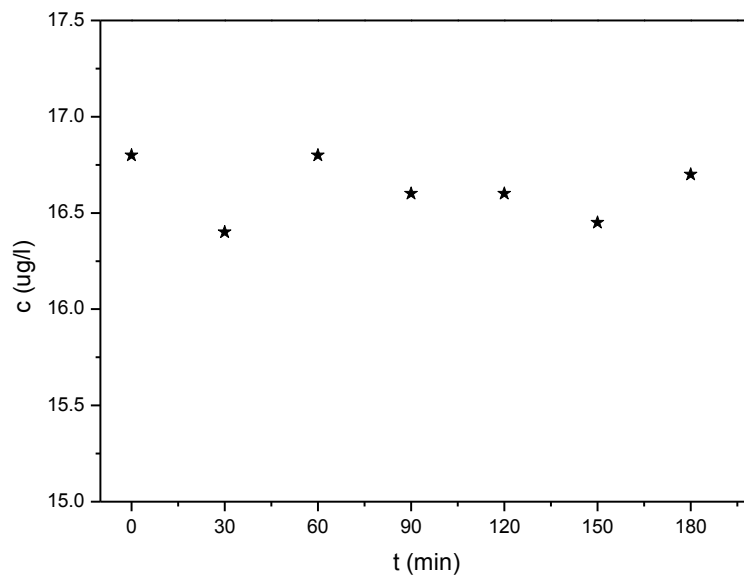


Obr. 13. Závislost koncentrace volného, nevázaného EE2 v M2 médiu na době kapacitace; blank, testovaná koncentrace EE2 200 µg/l.

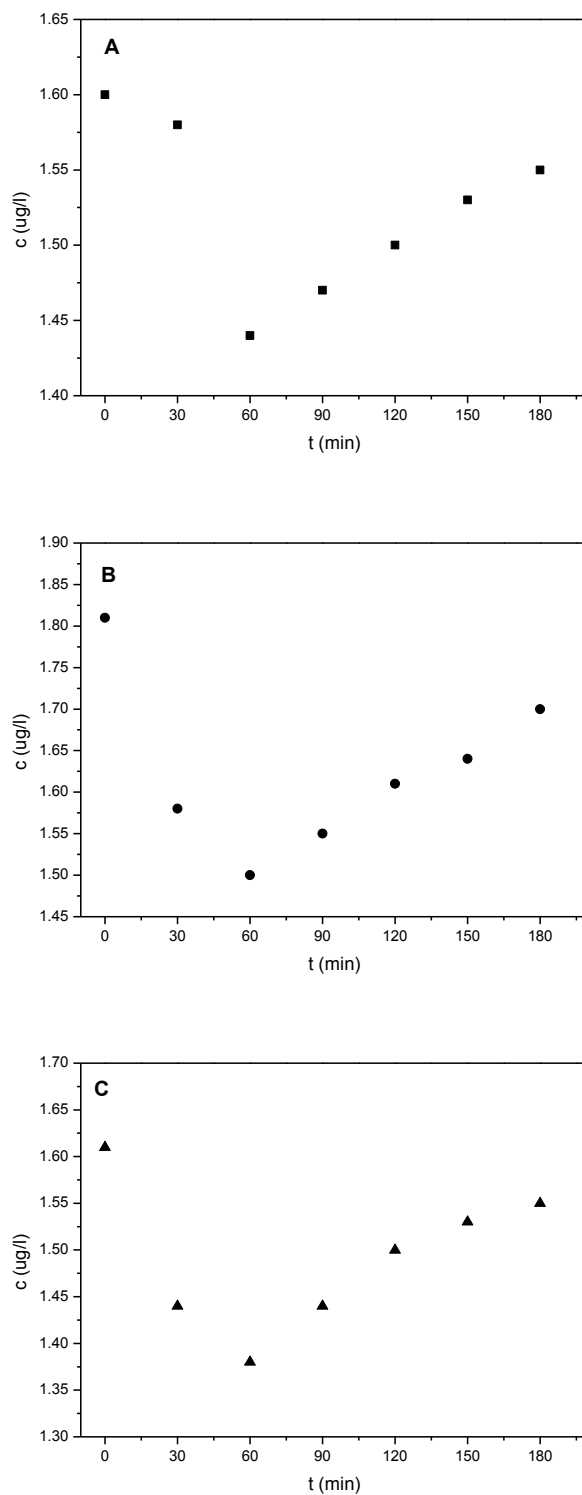
Pro další dvě testované koncentrace EE2, tedy pro 20 µg/l a 2 µg/l, byly získány výsledky, zobrazené na obr. 14 - 17. Jak je vidět na obr. 14 (pro koncentraci 20 µg/l) a obr.16 (pro koncentraci 2 µg/l), časové závislosti koncentrace volného, nevázaného EE2 v M2 médiu na kapacitaci vykazovaly obdobný trend, tzn. koncentrace EE2 nejprve postupně klesala až do minima křivky (nejnižší koncentrace a tedy největší množství vyvázaného EE2 spermii), nacházejícího se okolo 60. min a poté následoval opět vzestup koncentrace, a to až do konce celého průběhu kapacitace, tedy do 180. min. Největších rozdílů v průběhu závislosti mezi jednotlivými řadami bylo dosaženo pro nejnižší testovanou koncentraci 2 µg/l (viz obr. 16). Sledované koncentrační hladiny se pohybovaly již blízko hodnoty LOQ, vypočítané pro EE2, a měření bylo zatíženo největší chybou. Také malé rozdíly v přidávaném počtu spermií mohou mít v případě nejnižší testované koncentrace podstatnější vliv. Výsledky, získané pro blanky, jsou uvedeny na obr. 15 (pro 20 µg/l) a obr. 17 (pro 2 µg/l). Relativní směrodatná odchylka ($n = 5$) pro všechna měření s testovací koncentrací 20 µg/l nepřevýšila hodnotu 2,3 % a pro testovací koncentraci 2 µg/l nepřevýšila hodnotu 7,4 %.



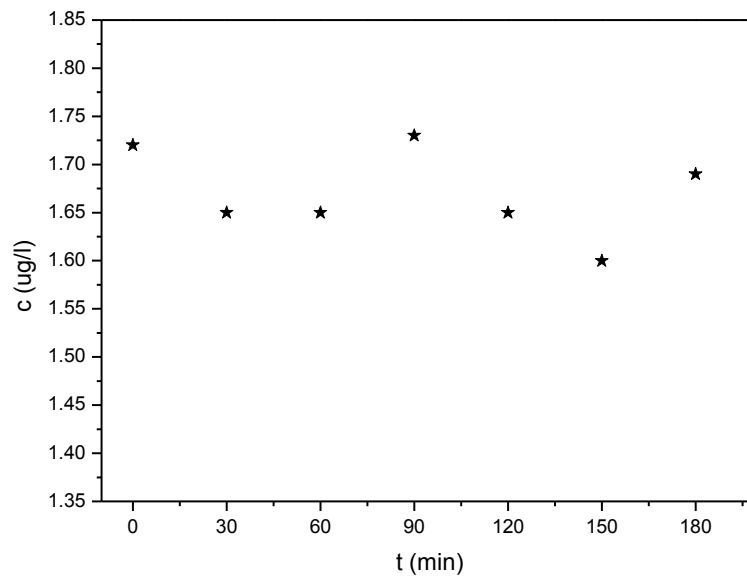
Obr. 14. Závislost koncentrace volného, nevázaného EE2 v M2 médiu na době kapacitace, (A) první řada, (B) druhá řada, (C) třetí řada; biologický vzorek, testovaná koncentrace EE2 20 µg/l.



Obr. 15. Závislost koncentrace volného, nevázaného EE2 v M2 médiu na době kapacitace; blank, testovaná koncentrace EE2 20 µg/l



Obr. 16. Závislost koncentrace volného, nevázaného EE2 v M2 médiu na době kapacitace, (A) první řada, (B) druhá řada, (C) třetí řada; biologický vzorek, testovaná koncentrace EE2 2 µg/l.



Obr. 17. Závislost koncentrace volného, nevázaného EE2 v M2 médiu na době kapacitace; blank, testovaná koncentrace EE2 2 $\mu\text{g/l}$.

Pro lepší porovnání jednotlivých koncentračních závislostí volného, nevázaného EE2 na době kapacitace, tedy eliminaci rozdílů, vzniklých v jednotlivých řadách rozdílnou koncentrací v čase 0 min, byly vypočítány tzv. relativní koncentrace B . Relativní koncentrace B je koncentrace, změřená pro jednotlivé časy kapacitace (30 – 180 min) a vztažená ke koncentraci, změřené v čase kapacitace 0 min. Vypočítané relativní koncentrace jsou uvedené v tabulkách 3 – 5. Tato veličina je výhodná pro popis závislostí z hlediska budoucí kinetické analýzy. Na obr. 18 je znázorněn průběh závislostí relativní koncentrace na době kapacitace pro všechny tři testované koncentrace (a,b,c) v rámci všech tří vyhodnocovaných řad a je vidět prakticky identický trend.

Tabulka 3. Hodnoty relativní koncentrace B pro biologický vzorek koncentrace 200 $\mu\text{g/l}$ látky EE2 na době kapacitace pro řady 1 – 3.

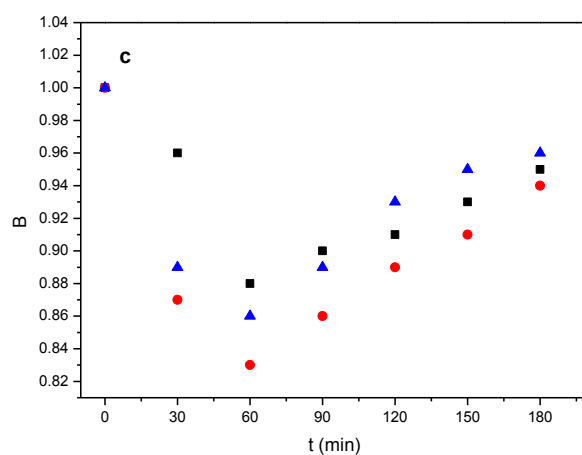
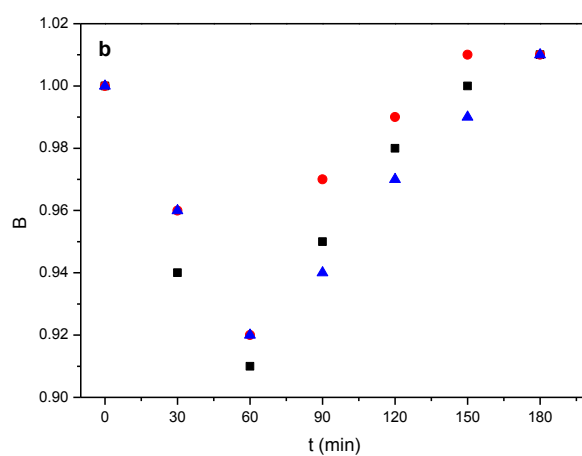
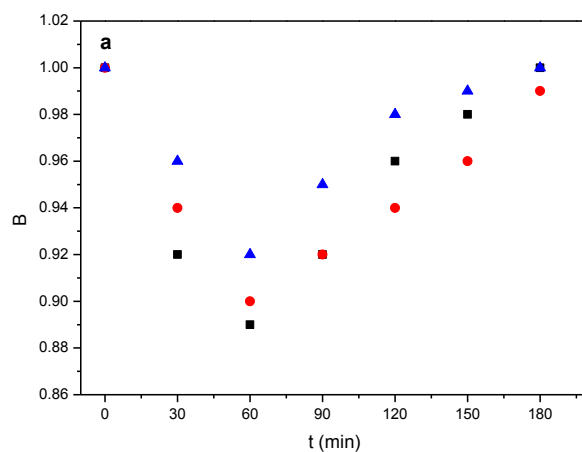
čas kapacitace (min)	1. řada	2. řada	3. řada
0	1,00	1,00	1,00
30	0,92	0,94	0,96
60	0,89	0,90	0,92
90	0,92	0,92	0,98
120	0,96	0,94	0,98
150	0,98	0,96	0,99
180	1,00	0,99	1,00

Tabulka 4. Hodnoty relativní koncentrace B pro biologický vzorek koncentrace 20 $\mu\text{g/l}$ látky EE2 na době kapacitace pro řady 1 – 3.

čas kapacitace (min)	1. řada	2. řada	3. řada
0	1,00	1,00	1,00
30	0,94	0,96	0,96
60	0,91	0,92	0,92
90	0,95	0,97	0,94
120	0,98	0,99	0,97
150	1,00	1,01	0,99
180	1,01	1,01	1,01

Tabulka 5. Hodnoty relativní koncentrace B pro biologický vzorek koncentrace $2 \mu\text{g/l}$ látky EE2 na době kapacitace pro řady 1 – 3.

čas kapacitace (min)	1. řada	2. řada	3. řada
0	1,00	1,00	1,00
30	0,96	0,87	0,89
60	0,88	0,83	0,86
90	0,90	0,86	0,89
120	0,91	0,89	0,93
150	0,93	0,91	0,95
180	0,95	0,94	0,96



Obr. 18. Závislost vypočítaných hodnot relativní koncentrace B pro testovací koncentraci (a) 200 µg/l (b) 20 µg/l (c) 2 µg/l EE2 na kapacitaci v časovém rozmezí 0 – 180 min, 1. řada – čtvereček, 2. řada – kolečko, 3. řada – trojúhelník.

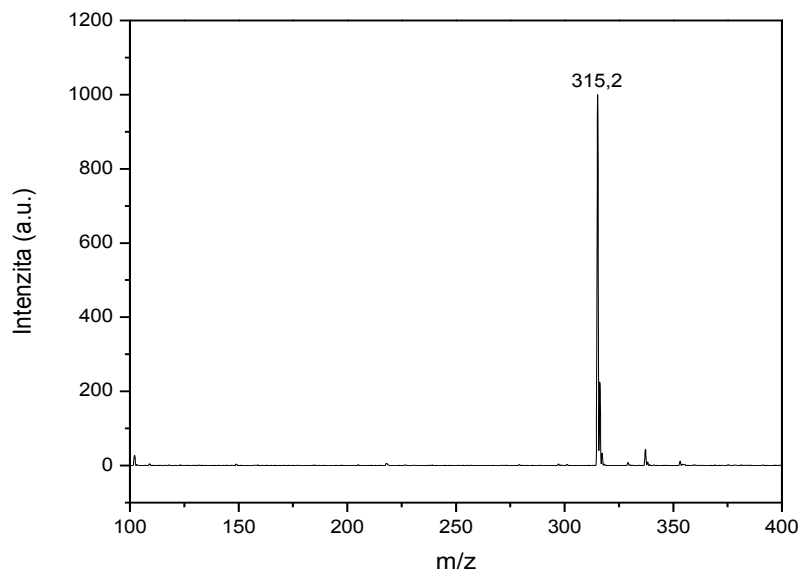
5.4 Optimalizace separačního systému pro PRG

Progesteron má obdobnou strukturu jako EE2. Z tohoto důvodu se předpokládalo obdobné separační chování této látky, a tedy i použití obdobných separačních a detekčních podmínek jako v případě EE2. Proto byl opět zvolen systém s kolonou Kinetex EVO C₁₈ v kombinaci s mobilní fází o složení ACN/H₂O (v/v) s 0,1% HCOOH v obou složkách, ve kterém byla provedena analýza EE2 s vyhovujícími výsledky. Průtoková rychlost mobilní fáze byla nastavena na 0,4 ml/min, velikost nástřiku 5 µl. Optimalizované podmínky pro hmotnostní detekci, konkrétně parametry elektrospreje, byly ponechány stejné jako v případě analýzy EE2 a byly následující:

- teplota sušícího plynu: 350 °C
- průtok sušícího plynu: 10 l/min
- napětí na kapiláře: 4000 V
- tlak nebulizačního plynu: 55 psi

Dále byly hledány optimální hodnoty parametrů pro hmotnostní detekci pro dosažení co nejvyšší citlivosti. Pro optimalizaci byl jako vzorek použit roztok PRG v ethanolu o koncentraci 20 mg/l.

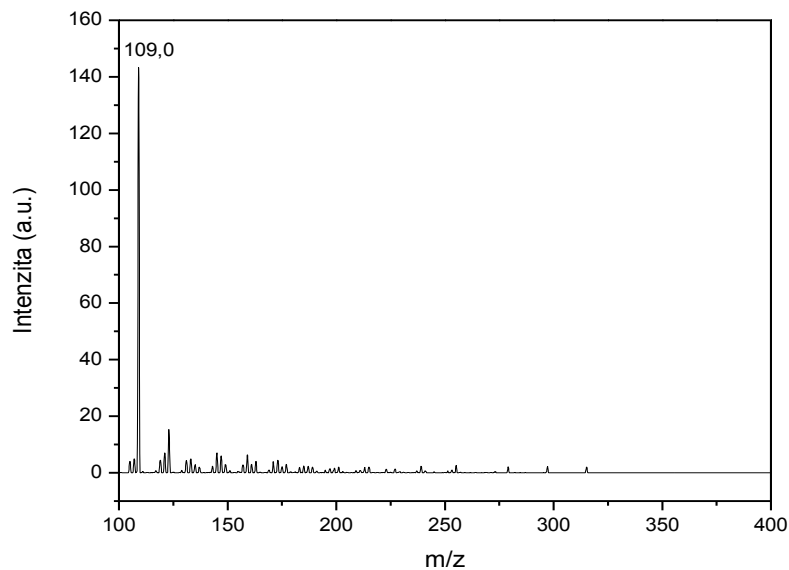
V rámci optimalizace hmotnostní detekce byl vzorek ethanolickeho roztoku PRG o koncentraci 20 mg/l proměřen v módu Scan. Bylo tedy proměřováno jeho hmotností spektrum v rozsahu 100 – 400 *m/z*, s časem skenu 500 ms; napětí na fragmentoru bylo zvoleno 100 V a bylo měřeno v pozitivním ionizačním módu. Získané spektrum je ukázáno na obr. 19. Prekursorový iont byl nalezen jako *m/z* = 315,2, který odpovídá protonovanému molekulárnímu iontu PRG [314,5 + H]⁺



Obr. 19. Záznam hmotnostního spektra PRG, změřeného v módu Scan.

Následně byly v módu SIM testovány hodnoty fragmentoru (80, 100, 120, 135 V) a v módu Product Ion testována hodnota kolizní energie (5,10,15,17, 20,25 V) a hledán produktový iont a následně také Dwell (100, 200, 400 a 500 ms). Produktový iont byl vyhodnocen jako pík s nejvyšší intenzitou a jeho hmotnostní spektrum je uvedeno na obr. 20. Optimalizované hodnoty, které poskytovaly při měření PRG největší plochy píků a tudíž nejvyšší citlivost, byly v MRM módu nastaveny jako:

- fragmentor = 100 V
- kolizní energie = 17 V
- dwell = 400 ms
- prekurzorový iont = 315,2
- produktový iont = 109,0



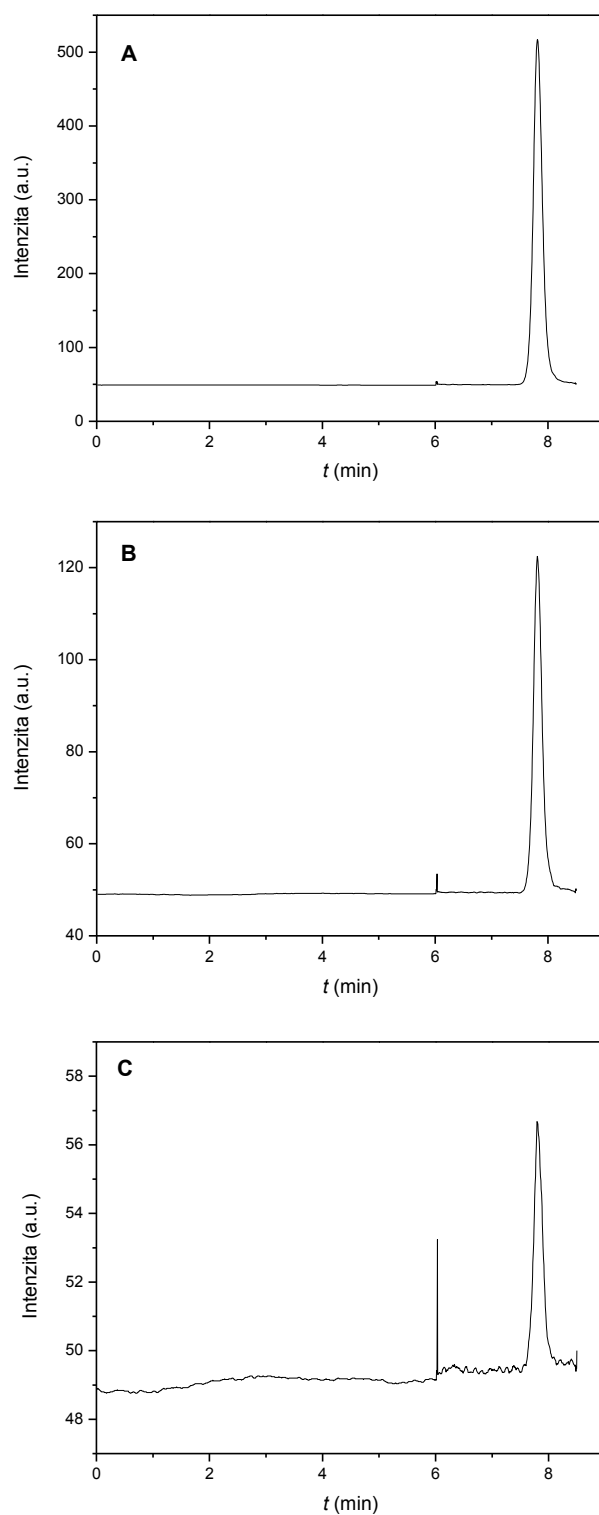
Obr. 20. Záznam hmotnostního spektra PRG, změřeného v módu Product Ion, po fragmentaci prekurzorového iontu o hodnotě $m/z = 315,2$.

Ze struktury PRG je patrné, že PRG je méně polární než EE2, tudíž bude za stejných separačních podmínek na koloně Kinetex EVO C₁₈ více zadržován. Vzhledem k tomu, že maximální obsah ACN v mobilní fázi může být 50 obj. % (kvůli srážení BSA v M2 médiu), nebylo složení mobilní fáze dále upravováno a byl sledován pouze vliv průtokové rychlosti (0,5 – 0,2 ml/min) a objem nástřiku (5 – 10 μ l) na velikost plochy a výšky píku pro ethanolický roztok PRG o koncentraci 200 μ g/l. Jako nejvhodnější se jevila průtoková rychlost 0,3 ml/min a objem nástřiku 7,5 μ l, poskytující největší plochu i výšku píku, aniž by byl pík frontující. Retenční čas PRG byl za těchto podmínek 7,8 min.

Optimalizované parametry byly aplikovány na analýzu roztoku PRG v M2 médiu o koncentraci 200 μ g/l. Při proměřování vzorků v M2 médiu byl eluát prvních 6 min analýzy opět odváděn do odpadua až poté byl vzorek zaváděn do hmotnostního analyzátoru. Chromatogramy, získané jak pro 200 μ g/l ethanolický roztok PRG, tak pro roztok PRG v M2 médiu o koncentraci 200 μ g/l byly porovnány a bylo zjištěno, že v obou roztocích bylo dosaženo podobné odezvy a že optimalizované parametry

hmotnostní detekce, získané pro ethanolický roztok PRG, lze použít i pro roztok PRG v médiu a že matriční efekt je opět minimální jako v případě EE2.

Za optimalizovaných podmínek byly změřeny koncentrace 200, 20 a 2 $\mu\text{g/l}$ PRG v M2 médiu v MRM módu a získané výsledky jsou uvedené na obr. 21.



Obr. 21. Chromatogramy získané pro koncentraci PRG v M2 médiu (A) 200 µg/l, (B) 20 µg/l a (C) 2 µg/l. Podmínky měření: kolona Kinetex EVO C₁₈, mobilní fáze 50/50 (v/v) ACN/H₂O, s 0,1 % obsahem HCOOH v obou složkách, průtok mobilní fáze 0,3 ml/min, nástřik 7,5 µl, měřeno v MRM módu při přechodu 315,2→ 109,0, retenční čas 7,8 min.

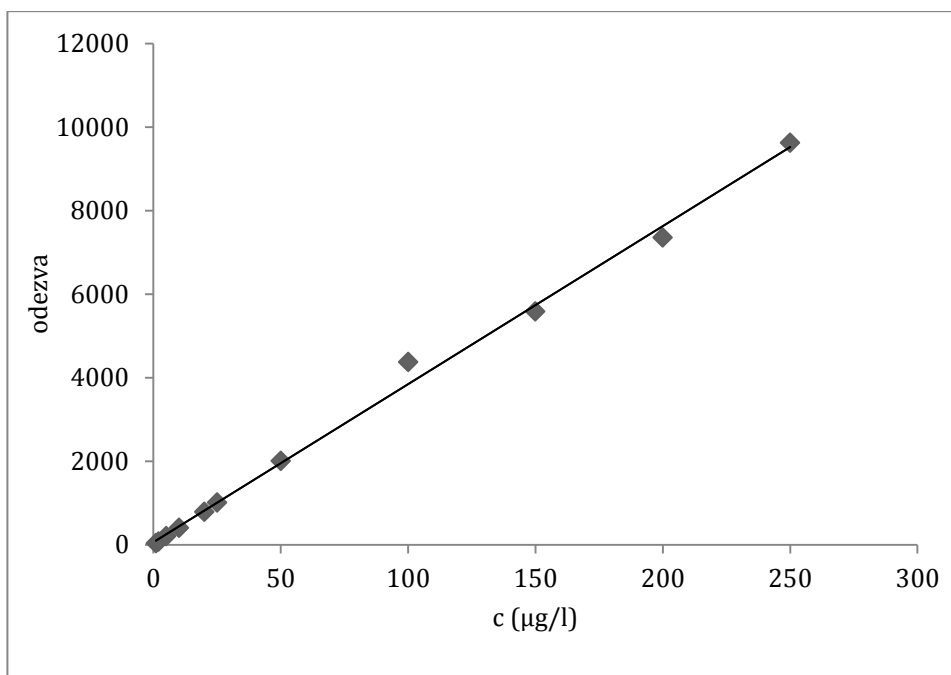
5.5 Kalibrační závislosti pro PRG

V optimalizovaných detekčních a separačních podmínkách (kolona Kinetex EVO C₁₈, ACN/H₂O (v/v) s 0,1% HCOOH v obou složkách, 0,3 ml/min, 7,5 µl, MRM mód, 315,2→ 109,0) byly proměřeny kalibrační závislosti ploch a výšek píků na koncentraci PRG v M2 médiu.

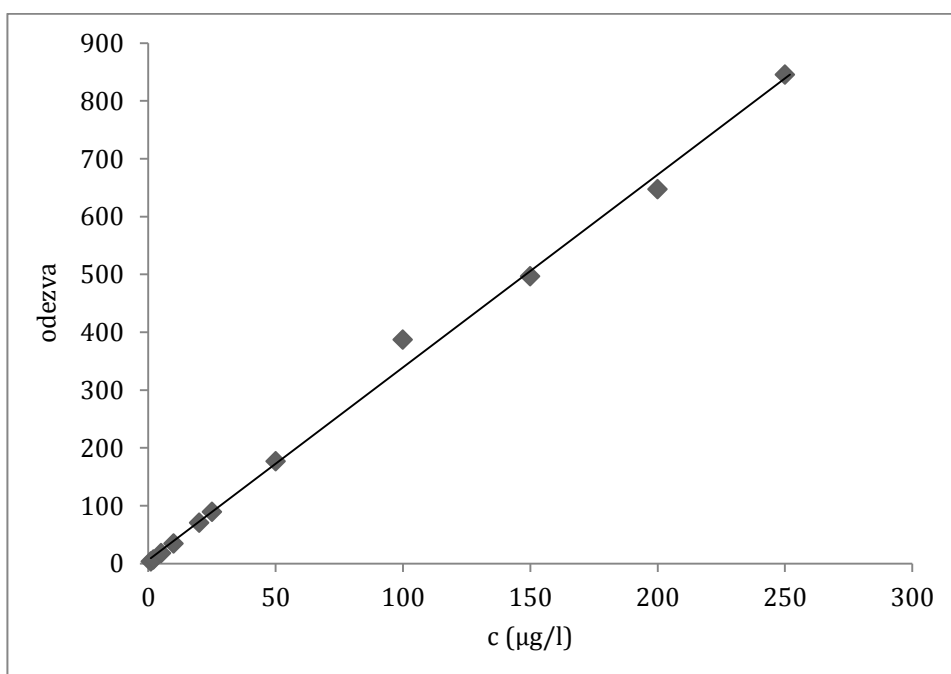
Proměřované koncentrace byly: 1, 2, 5, 10, 20, 25, 50, 100, 150, 200 a 250 µg/l. Tento rozsah byl zvolen tak, aby pokrýval všechny tři testované koncentrace vzorku (200, 20 a 2 µg/l) v biologickém pokusu (viz kap. 4.5). Každá koncentrace byla proměřena pětkrát. Relativní směrodatná odchylka (RSD) se pohybovala v rozmezí 1,4 – 5,0 % pro koncentrační rozsah 5 – 250 µg/l, 6,8 % pro koncentraci 2 µg/l a 10,4 % pro koncentraci 1 µg/l. Závislosti ploch a výšek píků na koncentraci byly zpracovány metodou lineární regrese. V tabulce 6 jsou uvedeny výsledky regresní analýzy. Závislost plochy a výšky píku na koncentraci byly zpracovány v celém proměřovaném koncentračním rozsahu 1-250 µg/l a byly vypočítány hodnoty limitu detekce (LOD) a limitu kvantifikace (LOQ). Získané závislosti pro plochu, resp. výšku píku na koncentraci PRG jsou uvedeny na obr. 22, resp. 23.

Tabulka 6. Data získaná lineární regresí závislosti plochy píku na koncentraci (¹PRG) a výšky píku na koncentraci (²PRG).

	směrnice (l·a.u.·min/µg)	úsek (a.u.·min)	koeficient determinace (R ²)	koncentrační rozsah		
¹ PRG	37,85	19,35	0,9962	1 - 250 µg/l		
	směrnice (l·a.u./µg)	úsek (a.u.)	koeficient determinace (R ²)	koncentrační rozsah	LOD (µg/l)	LOQ (µg/l)
² PRG	3,33	-1,01	0,9962	1 - 250 µg/l	0,36	0,48



Obr. 22. Závislost plochy píku PRG na jeho koncentraci v M2 médiu (1-250 µg/l).

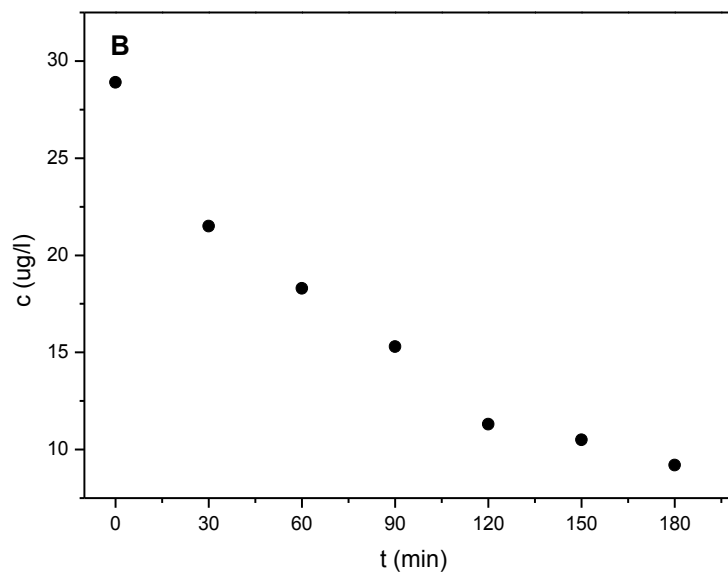
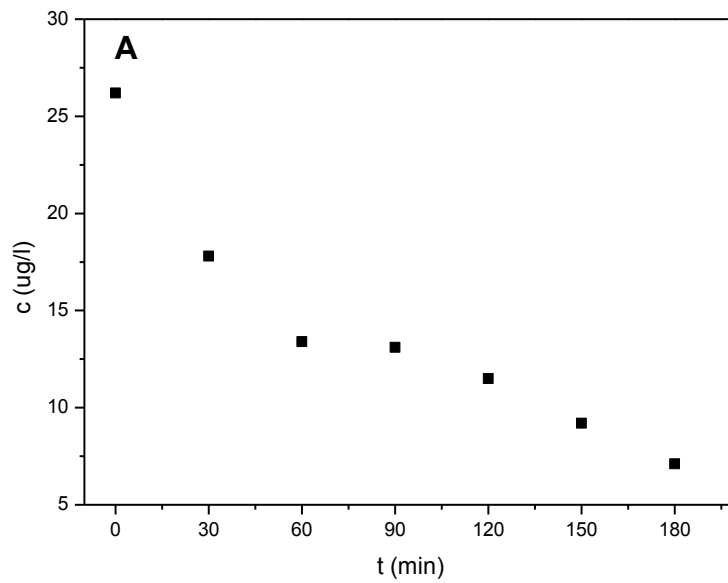


Obr. 23. Závislost výšky píku PRG na jeho koncentraci v M2 médiu (1-250 µg/l).

5.6 Biologický pokus pro PRG

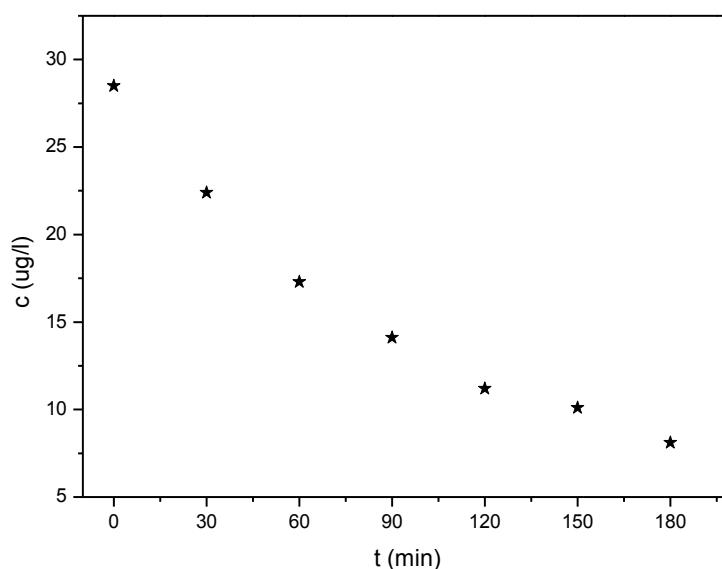
Biologický vzorek, popsáný v kapitole 4.5, posloužil ke sledování vyvazování také PRG myšími spermii a byl tedy proměřen za optimalizovaných podmínek vyvinuté HPLC-MS/MS metody (kolona Kinetex EVO C₁₈, ACN/H₂O (v/v) s 0,1% HCOOH v obou složkách, 0,3 ml/min, 7,5 µl, MRM mód, 315,2 → 109,0). Nejprve byla v rámci biologického pokusu připravena testovací koncentrace PRG 200 µg/l v M2 médiu. Koncentrační hladina PRG, tedy obsah volného, nevázaného PRG, byl monitorován během průběhu kapacity v jednotlivých časech kapacity. Kapacita byla sledována v časovém intervalu 0, 30, 60, 90, 120, 150 a 180 min.

Biologický vzorek (PRG v M2 médiu s přidavkem spermii) byl opět proměřován ve třech paralelních řadách, z nichž každá řada reprezentuje odběr spermii z jednoho jedince a sběr vzorků během jedné, časově závislé kapacity. Také byly připraveny blanky (tzv. slepé pokusy připravené za stejných experimentálních podmínek, pouze bez přidání spermii). Každý biologický vzorek i blank byl proměřován pětkrát. Získané výsledky jsou zobrazeny na obr. 24. Relativní směrodatná odchylka ($n = 5$) pro všechna měření s testovací koncentrací 200 µg/l nepřevýšila hodnotu 1,6 %.



Obr. 24. Závislost koncentrace volného, nevázaného PRG v M2 médiu na době kapacitace, (A) první a (B) druhá řada pro biologický vzorek; testovaná koncentrace PRG 200 µg/l.

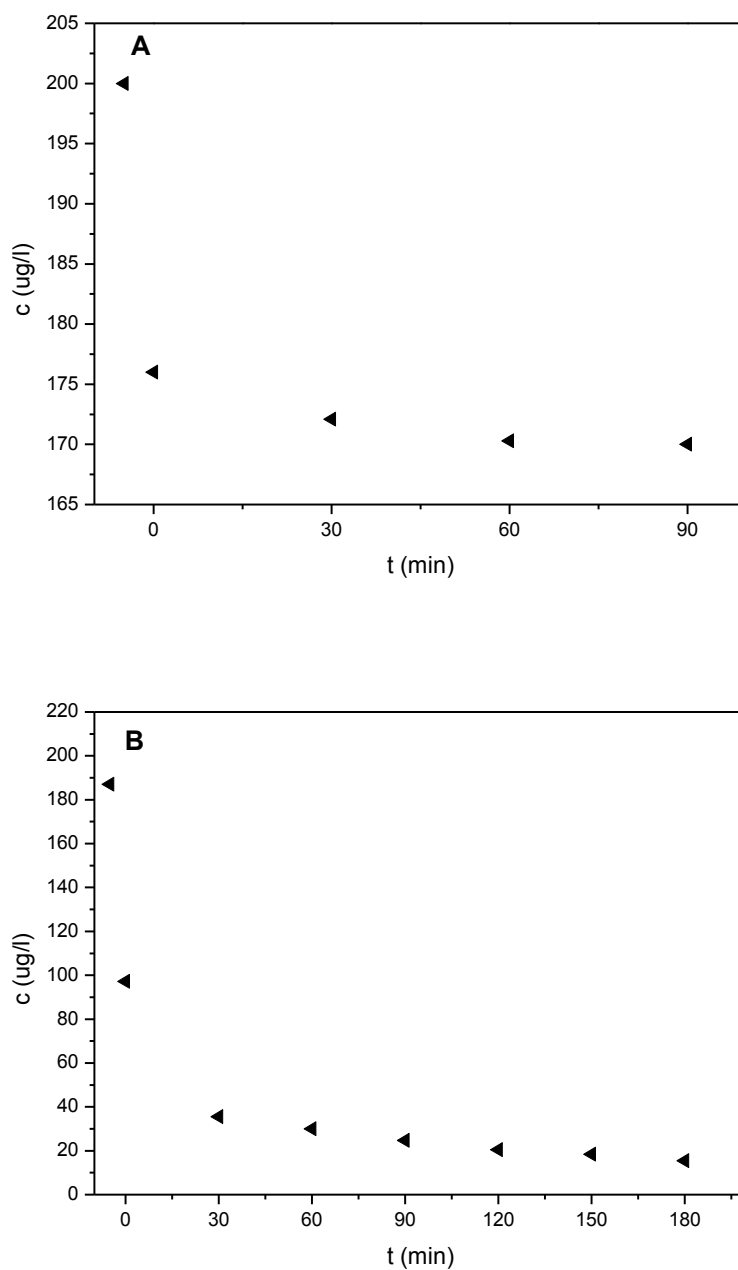
Z obr. 24 A, B je patrné, že průběh závislosti koncentrace volného, nevázaného PRG na čase kapacitace je zobrazen pouze pro dvě testované řady (měření pro třetí řadu bylo nevyhodnotitelné) a je značně odlišný od průběhu získaného pro EE2. Závislost nevykazuje žádné minimum, ale v celém sledovaném časovém intervalu kapacitace dochází ke kontinuálnímu snižování PRG. Ten samý průběh vykazuje i blank (viz obr. 25). Z tohoto důvodu nebyly počítány ani příslušné hodnoty relativních koncentrací.



Obr. 25. Závislost koncentrace volného, nevázaného PRG v M2 médiu na době kapacitace, blank; testovaná koncentrace PRG 200 µg/l.

Vzhledem k nezvyklému průběhu závislostí bylo zjišťováno, zda dochází k poklesu koncentrace PRG již během temperace vzorku, jak tomu bylo v případě EE2, vyvazováním PRG na BSA, případně, zda roli nehraje převrstvení vzorku parafinovým olejem. Proto byly do inkubátoru vloženy Petriho misky se vzorky PRG v M2 médiu o koncentraci 200 µg/l, bez převrstvení olejem (1 h, 37 °C, 5% CO₂) a vzorky byly odebírány v časech 0, 30, 60, a 90 min. Také byl změřen kontrolní vzorek, tzn. pouze 200 µg/l PRG v M2 médiu bez temperace (čas -5 min). Výsledky jsou uvedeny na obr. 26 A. Zároveň byla připravena i druhá série, kdy byl PRG v M2 médiu převrstven 1,5

ml oleje, následně vložen do inkubátoru a vzorky byly odebírány v prodlouženém časovém intervalu, a to v 0, 30, 60, 90, 120, 150 a 180 min. Také byl změřen kontrolní vzorek, tzn. pouze 200 $\mu\text{g/l}$ PRG v M2 médiu, převrstveném 1,5 ml oleje bez temperace (čas -5 min). Výsledky jsou uvedeny na obr. 26 B.



Obr. 26. Koncentrace PRG změřená během temperace 200 $\mu\text{g/l}$ PRG v M2 médiu (A) bez převrstvení a (B) s převrstvením olejem.

Z obr. 26 je patrné, že zatímco během temperace bez převrstvení (viz obr. 26 A) dochází k největšímu poklesu koncentrací na začátku temperace a od 30 min temperace se koncentrace ustálí na 170 $\mu\text{g/l}$, tak v případě převrstvení olejem (viz obr. 26 B) dochází k dramatickému poklesu mezi koncentrací kontrolního vzorku (187 $\mu\text{g/l}$) a temperací do 30 min (35,5 $\mu\text{g/l}$). I po 30. min koncentrace mírně klesá, v 60. min, odpovídající času 0 kapacity (viz obr. 24), dosahuje hodnoty 30 $\mu\text{g/l}$ a v 180 min hodnoty 15,5 $\mu\text{g/l}$. Ze získaných výsledků je zřejmé, že během temperace dochází k vazbě PRG na BSA v prvních 30 min (viz obr. 26 A) a dále je koncentrace PRG již konstantní.

Potenciální přítomnost malého množství oleje ve vzorku a jeho matriční vliv nemá zásadní dopad na koncentraci PRG, jak je vidět z hodnoty kontrolního vzorku (187 $\mu\text{g/l}$), znázorněného na obr. 26 B v čase -5 min. Vysvětlením dramatického poklesu koncentrace PRG během temperace vzorku, převrstveného olejem, může být rozdělávání méně polárního PRG (ve srovnání s EE2) mezi vodnou složkou M2 média a nepolárním parafinovým olejem. Tomu by napovídala i exponenciální průběh časové závislosti. Analýza parafinového oleje pak potvrdila přítomnost PRG.

Snižující se koncentrace PRG v M2 médiu během vlastní kapacity a identický průběh této závislosti jak pro biologický vzorek, tak pro blank ukazují, že ke koncentračnímu poklesu během kapacity dochází ze stejného důvodu, popsaného pro temperaci (viz obr. 26 B). Pravděpodobně tedy nedochází k vazbě PRG na povrch spermie, jak tomu bylo v případě EE2, nebo že vyvazované množství PRG je tak malé, že ho stávající metodikou nelze zaznamenat. Z výše uvedených skutečností již nebyly nižší koncentrace (20 a 2 $\mu\text{g/l}$) PRG v biologickém vzorku testovány.

6. Závěr

Byla vyvinuta nová, analytická HPLC–MS/MS metoda pro analýzu dvou steroidních hormonů, a to 17 α -ethynylestradiolu a progesteronu. HPLC separační systém byl tvořený kolonou Kinetex EVO C₁₈, (velikost zrnění 2,6 μ m) a mobilní fází o složení 50/50 (v/v) ACN/H₂O, s 0,1% obsahem HCOOH v obou složkách a průtokové rychlosti 0,3 ml/min. V rámci tandemové hmotnostní detekce byly optimalizovány hodnoty parametrů ionizačního zdroje (ESI) a podmínky pro určení prekurzorových a produktových iontů obou analytů.

V optimalizovaných podmínkách byly změřeny kalibrační závislosti obou hormonů v M2 fertilizačním médiu v koncentračním rozsahu 1 – 250 μ g/l. Výsledky závislosti ploch a výšek píků na koncentraci hormonů byly zpracovány metodou lineární regrese a byly určeny meze detekce a kvantifikace pro EE2 jako LOD = 0,88 μ g/l a LOQ = 1,21 μ g/l a pro PRG jako LOD = 0,36 μ g/l a LOQ = 0,48 μ g/l.

V optimalizovaných detekčních a separačních podmínkách byly u biologických vzorků sledovány koncentrační změny obou hormonů během časově závislé kapacity myších spermií pro objasnění, zda a v jakém rozsahu jsou schopné (během kapacity *in vitro*) vázat, resp. uvolňovat testované hormony.

V rámci biologického vzorku byly testovány tři koncentrace (200, 20 a 2 μ g/l) EE2 a každá koncentrace byla testována ve třech paralelních řadách. Bylo zjištěno, že závislosti koncentrace volného, nevázaného EE2 na čase kapacity mají obdobný průběh v rámci jednotlivých testovaných řad i při porovnání jednotlivých testovaných koncentrací. Koncentrace EE2 nejprve postupně klesala až do minima křivky (nejnižší koncentrace a tedy největší množství navázaného EE2 spermiemi), nacházejícího se okolo 60 min a poté následoval vzestup koncentrace, a to až do konce celého průběhu kapacity, tedy do 180 min. Koncentrace EE2 v blanku zůstávala během celé kapacity prakticky konstantní. Vliv BSA, přítomného v M2 kapacitačním médiu, na stupeň vyvazování během vlastní kapacity nebyl prokázán. Časové závislosti relativní koncentrace volného, nevázaného EE2 na čase kapacity budou sloužit jako vstupní data pro kinetickou analýzu, která by mohla pomoci objasnit mechanismus působení EE2 na spermie.

Časové závislosti koncentrace volného, nevázaného PRG však měly podstatně jiný charakter. Pro testovací koncentraci 200 μ g/l v biologickém vzorku bylo zjištěno,

že dochází ke kontinuálnímu úbytku koncentrace během celé doby kapacitace. Shodné výsledky byly získány pro obě řady biologického vzorku (třetí řada nebyla vyhodnotitelná) a identický průběh byl zaznamenán také pro blank. Z tohoto důvodu byl sledován nejen vliv BSA v M2 médiu, ale také vliv parafinového, převrstvovacího oleje, na koncentraci PRG v médiu během doby temperace vzorku. Bylo zjištěno, že zatímco vzorky, získané bez převrstvení olejem, vykazují pokles koncentrace PRG pouze v prvních 30 min, u vzorků, které byly převrstveny olejem, koncentrace výrazně klesá v prvních 60 min a mírný pokles se projevuje až do konce sledovaného časového intervalu (180 min). Analýzou převrstvovacího oleje byla prokázána přítomnost PRG v oleji. Proto nebyly nižší koncentrace PRG v biologickém vzorku již testovány a v budoucnu bude nutná detailnější analýza všech složek vzorku.

7. Použitá literatura

- [1] López de Alda, M. J.; Barceló, D.: Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disruptors in water by liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **892**, 391- 406 (2000).
- [2] Colborn, T.; vom Saal, F. S.; Soto, A. M.: Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health Perspectives* **101** (1), 378-384 (1993).
- [3] Della Seta, D.; Farabollini, F.; Dessí-Fulgheri, F.; Fusani, L.: Environmental-like exposure to low levels of estrogen affects sexual behavior and physiology of female rats. *Endocrinology* **149**, 5592-5598 (2008).
- [4] Safe, S. H.; Pallaroni, L.; Yoon, K.; Gaido, K.; Ross, S; Saville, B.; McDonnell, D.: Toxicology of environmental estrogens. *Reproduction Fertility and Development* **13**, 307-315 (2001).
- [5] Kumar, V.; Majumdar, C; Roy, P.: Effects of endocrine disrupting chemicals from leather industry effluents on male reproductive system. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **111**, 208-216 (2008).
- [6] Jensen, T. K.; Toppari, J.; Keiding, N.; Skakkebaek, N. E.: Do environmental estrogens contribute to the decline in male reproductive health? *Clinical Chemistry* **41**, 1896-1901 (1995).
- [7] Semen analysis. In: *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*, World Health Organization, 5. vyd., 2010, p. 7-36.
- [8] Yoshida, M.; Kawano, N.; Yoshida, K.: Control of sperm motility and fertility: diverse factors and common mechanisms. *Cellular and Molecular Life Sciences* **65**, 3446-3457 (2008).

- [9] Yanagimachi, R.: Mammalian fertilization. In: *The Physiology of Reproduction*. Knobil, E.; Neill J. D. (Eds.). New York: Raven Press, 1994, p. 189-317.
- [10] Huang, T.T.; Fleming, A.D., Yanagimachi, R.: Only acrosome-reacted spermatozoa can bind to and penetrate zona pellucida: a study using the guinea pig. *Journal of Experimental Zoology* **217**, 287–290 (1981).
- [11] Abou-haila, A.; Tulsiani, D. R. P.: Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **485**, 72-81(2009).
- [12] Ded, L.; Sebková, N.; Cerna, M.; Elzeinova, F.; Dostalova, P.; Peknicova, J.; Dvorakova-Hortova, K.: *In vivo* exposure to 17 β -estradiol triggers premature sperm capacitation in cauda epididymis. *Reproduction* **145**, 255-263, (2013).
- [13] Děd, L.; Dostálová, P.; Dorosh, A.; Dvořáková-Hortová, K.; Pěkníková, J.: Effect of estrogens on boar sperm capacitation *in vitro*. *Reproductive Biology and Endocrinology* **8** (87), (2010).
- [14] Dvořáková-Hortová, K.; Honetschlägerová, M.; Tesařová, E.; Vašínová, J.; Frolíková, M.; Bosáková, Z.: Residual concentration of estriol during mouse sperm capacitation *in vitro* determined by HPLC method. *Folia Zoologica* **58**, 75-81, (2009).
- [15] Kozlik, P.; Bosakova, Z.; Tesarova, E.; Coufal, P.; Cabala, R.: Development of a solid-phase extraction with capillary liquid chromatography tandem mass spectrometry for analysis of estrogens in environmental water samples. *Journal of Chromatography A* **1218**, 2127-2132 (2011).
- [16] Adamusová, H.: Studium vlivu 17 β -estradiolu a 17 α -ethynylestradiolu na kapacitaci myších spermií *in vitro*. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta (2011).

- [17] Campbell, C. G.; Borglin, S. E.; Green, F. B.; Grayson, A.; Wozel, E.; Stringfellow W. T.: Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: A review. *Chemosphere* **65** (8), 1265-1280 (2006).
- [18] Liu, Z. H. K.; Mamoru, Y.; Yamamoto, I. A.: Profile and removal of endocrine disrupting chemicals by using an ER/AR competitive ligand binding assay and chemical analyses. *Journal of Environmental Sciences* **21** (7), 900-906 (2009).
- [19] Giesy, J. P.; Hilscherová, K.; Jones, P. D.; Kannan, K.; Machala, M.: Cell bioassays for detection of aryl hydrocarbon (AhR) and estrogen receptor (ER) mediated activity in environmental samples. *Marine Pollution Bulletin* **45**, 3-16 (2002).
- [20] Berg, C.; Halldin, K.; Brunström, B.; Brandt, I.: Methods for studying xenoestrogenic effects in birds. *Toxicology Letters* **102-103**, 671-676 (1998).
- [21] Amaral Mendes, J. J.: The endocrine disrupters: A major medical challenge. *Food and Chemical Toxicology* **40** (6), 781-788 (2002).
- [22] European commission. Dostupné z URL:
http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/index_en.htm [cit. 20. 4. 2017]
- [23] Benfenati, E.; Barceló, D.; Johnson, I.; Galassi, S.; Levsen, K.: Emerging organic contaminants in leachates from industrial waste landfills and industrial effluent. *Trends in Analytical Chemistry* **22**, 757-765 (2003).
- [24] Petrović, M.; Eljarrat, E.; Lopez de Alga, M.; Barceló, D.: Recent advances in the mass spectrometric analysis related to endocrine disrupting compounds in aquatic environmental samples. *Journal of Chromatography* **974**, 23-51 (2002).

- [25] Petrović, M.; Barceló, D.: Determination of anionic and nonionic surfactants, their degradation products, and endocrine-disrupting compounds in sewage sludge by liquid chromatography/mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **72**, 4560-4567 (2000).
- [26] Voet, D. V. J.: *Biochemistry*. Praha: Victoria Publishing (1995).
- [27] Häggström, M.; Richfield, D.: Diagram of the pathways of human steroidogenesis. *Wikiversity Journal of Medicine* **1** (1):5 (2014).
- [28] Silbernagl, S. D.; Despopoulos, A.: *Atlas fyziologie člověka*. Praha:Grada publishing spol. s.r.o. (2004).
- [29] Noppe, H.; Le Bizec, B.; Verheydena, K.; De Brabander, H. F.: Novel analytical methods for the determination of steroid hormones in edible matrices. *Analytica Chimica Acta* **611**, -16 (2008).
- [30] LaFleur, A. D.; Schug, K. A.:A review of separation methods for the determination of estrogens and plastics-derived estrogen mimics from aqueous systems. *Analytica Chimica Acta*. **696**, 6-26 (2011).
- [31] Dostalova, P.; Zatecka, E.; Dvorakova-Hortova, K.: Of oestrogens and sperm: A review of the roles of oestrogens and oestrogen receptors in male reproduction. *International Journal of Molecular Sciences* **18** (5), 904, 1-23, (2017).
- [32] Lüllmann, H.; Mohr, K.; Wehling, M.: *Farmakologie a toxikologie*. Praha: Gradapublishing spol. s.r.o. (2004).
- [33] Ingrand, V.; Herry, G.; Beausse, J.; de Roubin, M. R.: Analysis of steroid hormones in effluents of wastewater treatment plants by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1020**, 99-104 (2003).

- [34] Thavrin, M.; Wilson, J.: The current preference for the immuno-analytical ELISA method for quantitation of steroid hormones (endocrine disruptor compounds) in wastewater in South Africa. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **407**, 4949–4970 (2015).
- [35] Jurado, A.; Vazquez-Sune, E.; Carrera, J.; Lopez de Alda, M. L.; Pujades, E.; Barcelo, D.: Emerging organic contaminants in groundwater in Spain: A review of sources, recent occurrence and fate in a European context. *Science of the Total Environment* **440**, 82-94, (2012).
- [36] Baronti, C. ; Curini, R.; D'Ascenzo, G.; Di Corcia, A.; Gentili, A.; Samperi, R.: Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. *Environmental Science and Technology* **34** (24), 5059-5066, (2000).
- [37] Luconi, M.; Francavilla, F.; Porazzi, I.; Macerola, B.; Forti, G.; Baldi, E.: Human spermatozoa as a model for studying membrane receptors mediating rapid nongenomic effects of progesterone and estrogens. *Steroids* **69**, 553-559, (2004).
- [38] PubChem. Dostupné z URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> [cit. 29. 4. 2017].
- [39] Bajus.com. Dostupné z URL: <https://www.bajus.com/biology/spermatogenesis/> [cit. 20.4. 2017].
- [40] Valli, H.; Phillips, B. T.; Shetty, G.; Byrne, J. A.; Clark, A. C.; Meistrich, M. L.; Orwig, K. E.: Germline stem cells: toward the regeneration of spermatogenesis. *Fertility and Sterility* **101** (1), 3-13 (2014).
- [41] Millette, C. F.: Spermatozoa. In: *Encyclopedia of Reproduction*. Knobil, E.; Neill J. D. (Ed.). San Diego: Academic Press, 1998, p. 586-596.
- [42] Visconti, P.E.; Bailey, L.; Moore, G.D.; Olds-Clarke, P.; Kopf, G.S.: Capacitation of mouse spermatozoa, *Development*, **121**, 1129-1137, (1995).

- [43] Naz, R. K.; Rajesh, P. B.: Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation/acrosome reaction. *Reproductive Biology and Endocrinology* **2**, 75-87, (2004).
- [44] Cross, N. L.: Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biology of Reproduction* **59**, 7-11 (1998).
- [45] Martinez, P.; Morros, A.: Membrane lipid dynamics during human sperm capacitation. *Frontiers in Bioscience* **1**, 103-117, (1996).
- [46] Bedford, J. M.; Cross, N. L.: Sperm Capacitation. In: *Encyclopedia of Reproduction*. Knobil, E.; Neill J. D. (Eds.). San Diego: Academic Press, 1998, p. 597-602.
- [47] Demarco, I. A.; Espinosa, F.; Edwards, J.; Sosnik, J.; De la Vega-Beltran, J. L.; Hockensmith, J. W.; Kopf, G. S.; Darszon, A.; Visconti, P. E.: Involvement of a $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporter in mouse sperm capacitation. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 7001-7009 (2003).
- [48] Munoz-Garay, C.; De la Vega-Beltran, J. L.; Delgado, R.; Labarca, P.; Felix, R.; Darszon, A.: Inwardly rectifying K^+ channels in spermatogenic cells: functional expression and implication in sperm capacitation. *Developmental Biology* **234**, 261-274 (2001).
- [49] Mahony, M. C.; Gwathmey, T. Y.: Protein tyrosine phosphorylation during hyperactivated motility of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) spermatozoa. *Biology of Reproduction* **60**, 1239-1243, (1999).
- [50] Breitbart, H.; Spungin, B.: The biochemistry of the acrosome reaction. *Molecular Human Reproduction* **3**, 195-202 (1997).

- [51] Caban, M.; Czerwicka, M.; Lukaszewicz, P.; Migowska, N.; Stepnowski, P.; Kwiatkowski, M.; Kumirska, J.: A new silylation reagent dimethyl(3,3,3-trifluoropropyl)silyldiethylamine for the analysis of estrogenic compounds by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1301**, 215-224 (2013).
- [52] Pacáková, V.; Loukotková, L.; Bosáková, Z.; Štulík, K.: Analysis for estrogens as environmental pollutants – a review. *Journal of Separation Science* **32**, 867-882 (2009).
- [53] Scherr, F. F.; Sarmah, A. K.: Simultaneous analysis of free and sulfo-conjugated steroid estrogens in artificial urine solution and agricultural soils by high-performance liquid chromatography. *Journal of Environmental Science and Health Part B* **46**, 763-772 (2011).
- [54] Adamusova, H.; Bosakova, Z.; Coufal, P.; Pacakova, V.: Analysis of estrogens and estrogen mimics in edible matrices - A review. *Journal of Separation Science* **37** (8), 885-905 (2014).
- [55] Aufartová, J.; Mahugo-Santana, C.; Sosa-Ferrera, Z.; Santana-Rodríguez, J. J.; Nováková, L.; Solich, P.: Determination of steroid hormones in biological and environmental samples using green microextraction techniques: An overview. *Analytica Chimica Acta* **704**, 33-46 (2011).
- [56] Avar, P.; Maasz, G.; Takács, P.; Lovas, S.; Zrinyi, Z.; Svigruha, R.; Takátsy, A.; Tóth, L. G.; Pirger, Z.: HPLC-MS/MS analysis of steroid hormones in environmental water samples. *Drug Testing and Analysis* **8** (1), 123-127 (2016).
- [57] Holcapek, M.; Jirasko, R.; Lisa, M.: Recent Developments in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Related Techniques, *Journal of Chromatography A*, **1259**, 3-15 (2012).

- [58] Friedecký, D.; Lemr, K.: Úvod do hmotnostní spektrometrie, 1. Díl, *Klinická biochemie a metabolismus* **20** (41), 152-157 (2012).
- [59] Himmelsbach, M.: 10 years of MS instrumental developments impact on LC-MS/MS in clinical chemistry. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **883-884**, 3-17 (2012).
- [60] Somogyi, A.: Mass Spectrometry Instrumentation and Techniques. In: *Medical Applications of Mass Spectrometry*. Vékey, K.; Telekes, A.; Vertes, A. (Eds.). Amsterdam: Elsevier, 2008, p. 93-140.
- [61] Davis, B. K.; Byrne, R.; Hungund, B.: Studies on the mechanism of capacitation. II Evidence for lipid transfer between plasma membrane of rat sperm and serum albumin during capacitation *in vitro*. *Journal of Chromatography B* **558** (3), 257-266, (1979).
- [62] Dow, M. P. D.; Bavister, B. D.: Direct contact is required between serum albumin and hamster spermatozoa for capacitation *in vitro*. *Gamete Research* **23** (2), 171-180 (1989).