

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza

Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Hana Adamusová

Studium vlivu 17β -estradiolu a 17α -ethynylestradiolu na kapacitaci myších
spermií *in vitro*

Study of influence of 17β -estradiol and 17α -ethynylestradiol on capacitation
of mouse sperm *in vitro*

Diplomová práce

Školitel:

Doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

Praha, 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem 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.

V Praze, 11.5.2011

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce Doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc., školitelce-konzultantovi RNDr. Kateřině Hortové, Ph.D. z Katedry zoologie a Mgr. Petrovi Kozlíkovi za odborné vedení, vytvoření příjemného pracovního prostředí, trpělivost a pomoc při zpracování této diplomové práce.

Dále bych chtěla poděkovat laborantce Lence Bulvové z Katedry zoologie za vstřícnost a příjemnou spolupráci při provádění biologického pokusu a také bych chtěla poděkovat studentům doktorandského studia Analytické chemie z laboratoře č. 119 za vstřícnost a ochotu pomoci nebo poradit.

Závěrem bych ráda poděkovala své rodině za podporu během celého studia a vytvoření vhodného zázemí.

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MŠMT 0021620857 a za finanční podpory Centra 1M06011.

ABSTRAKT

Mezi polutanty vyskytující se v životním prostředí patří také látky nazývané se endokrinní disruptory (EDC). Ty působí změny ve funkci endokrinních orgánů a mimo jiné mezi ně patří i estrogenní hormony, a to jak přirozené, tak syntetické. EDC se mohou vázat na receptory endogenních hormonů nebo bránit jejich syntéze. 17β -Estradiol je přirozený estrogenní hormon patřící do skupiny endokrinních disruptorů, ve větší míře jej vylučují ženy, avšak u mužů je produkován také. Mezi EDC patří také syntetický estrogen 17α -ethynylestradiol, který je hlavní složkou hormonální antikoncepce a spolu s ostatními estrogenními endokrinními disruptory je nejspíš zodpovědný za feminizaci samců u živočichů žijících v blízkosti čistíren odpadních vod.

Účelem této práce bylo vyvinout metodu pro stanovení koncentrace volného 17β -estradiolu (BE2) a 17α -ethynylestradiolu (EE2) dostupného pro kapacitující spermie. Pro stanovení BE2 během kapacitace myších spermií *in vitro* bylo použito vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s tandemovou hmotnostní detekcí (MS/MS). Separační systém v reverzním módu se sestával z kolony SunFire C_{18} a jednoduché binární mobilní fáze složené z ACN a vody v poměru 40/60 (v/v), obě složky mobilní fáze obsahovaly 0,1% roztok mravenčí kyseliny. Za optimalizovaných separačních a kvantifikačních podmínek s ionizací elektrosprejem v pozitivním módu byly změřeny kalibrační závislosti pro 17β -estradiol a 17α -ethynylestradiol v koncentračním rozmezí 1-25 $\mu\text{g/L}$ a 100-250 $\mu\text{g/L}$, respektive 1-25 $\mu\text{g/L}$ a 100-200 $\mu\text{g/L}$ a byly určeny meze detekce a kvantifikace v desetinách, respektive v jednotkách $\mu\text{g/L}$. Vyvinutá metoda byla aplikována na sledování vyvazování 17β -estradiolu hovězím sérovým albuminem v M2 médiu a na stanovení volné koncentrace 17β -estradiolu během časově závislé kapacitace myších spermií. Tato vyvinutá metoda představuje důležitý nástroj pro stanovení množství environmentálních estrogenů zejména 17β -estradiolu vázaného na spermie v konkrétních časech kapacitace *in vitro*. Z časových důvodů nebylo možné obdobné experimenty provést také pro 17α -ethynylestradiol.

ABSTRACT

Environmental estrogens (natural and synthetic) belong to a group of contaminants called endocrine disrupting chemicals (EDCs). These compounds interfere with a function of endocrine system. They can bind to natural estrogen receptors or block synthesis of endogenous hormones. 17β -Estradiol (BE2) is a natural endocrine disruptor produced more by women than men. Also a synthetic 17α -ethynylestradiol (EE2) belongs to EDCs. It is used as a main part of birth control pills. Together with other endocrine disruptors EE2 is probably responsible for feminization of male animals living in effluents of waste water treatment plants.

The aim of this thesis was to develop a method for determining free 17β -estradiol and 17α -ethynylestradiol available to capacitating sperm. In order to determine a status of BE2 during mouse sperm capacitation *in vitro*, a high performance liquid chromatography (HPLC) method with tandem mass spectrometry (MS/MS) detection was used. A reversed-phase separation mode using a SunFire C₁₈ column with a simple mobile phase composed of acetonitrile and water at the ratio 40/60 (v/v) containing 0,1% formic acid in both components was applied. Under the optimized separation conditions, calibration curves for 17β -estradiol and 17α -ethynylestradiol were measured in the concentration range of 1-250 $\mu\text{g/L}$ and 1-200 $\mu\text{g/L}$, respectively. Limits of detection and quantification for the both analytes were determined as tenths and units of $\mu\text{g/L}$, respectively. A free as well as bound 17β -estradiol to the bovine serum albumin as an essential compound of capacitation medium can be quantified by the proposed method. Results show that the level of free 17β -estradiol available for mouse spermatozoa during capacitation *in vitro* can be quantified by HPLC method with MS/MS detection. This method represents an important tool to determine the amount of environmental estrogens, such as 17β -estradiol, bound to sperm cells at the specific time point of capacitation *in vitro*. With a respect to long time that was taken by the biological experiments with 17β -estradiol, there were only calibration dependences measured for 17α -ethynylestradiol.

OBSAH

1	ÚVOD	10
2	TEORETICKÁ ČÁST	12
2.1	Estrogenní hormony.....	12
2.1.1	17 β -Estradiol	12
2.1.2	17 α -Ethinylestradiol	13
2.2	Metody stanovení estrogenů.....	14
2.3	Spermatogeneze a patologie spermií	17
2.4	Kapacitace.....	19
2.5	HPLC	21
2.5.1	Princip.....	21
2.5.2	Typy chromatografie	21
2.5.3	Stacionární a mobilní fáze	21
2.5.4	Detekce	22
2.5.5	Vybrané chromatografické charakteristiky	25
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
3.1	Chemikálie.....	27
3.2	Přístroje a pomůcky	27
3.3	Separční systém	28
3.4	Podmínky měření.....	28
3.5	Kapacitace spermií <i>in vitro</i>	28
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	31
4.1	UV-detekce	31
4.2	Optimalizace MS-detekce.....	35
4.3	Kalibrační závislosti	44

4.4	Biologický pokus s 17 β -estradiolem	47
4.4.1	Vyvazování 17 β -estradiolu hovězím sérovým albuminem	47
4.4.2	Sledování volné koncentrace 17 β -estradiolu během kapacitace	49
5	ZÁVĚR.....	53
6	POUŽITÁ LITERATURA.....	55

KLÍČOVÁ SLOVA: endokrinní disruptory, estrogenní hormony, 17β -estradiol, 17α -ethynylestradiol, kapacitace, kvantifikace

PŘEDMĚTOVÁ HESLA: analytická chemie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, tandemová hmotnostní spektrometrie

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

<i>A</i>	plocha píku
ACN.....	acetonitril
<i>As</i>	faktor asymetrie píku
BE2.....	17 β -estradiol
BSA.....	hovězí sérový albumin
DAD.....	detekce s diodovým polem
E1.....	estron
E3.....	estriol
EDC.....	endokrinní disruptory
EE2.....	17 α -ethynylestradiol
ELISA.....	enzymově vázaná imunochemická analýza
ESI.....	ionizace elektrosprejem
EtOH.....	ethanol
<i>F_m</i>	přítok mobilní fáze
GC.....	plynová chromatografie
<i>H</i>	výškový ekvivalent teoretického patra
HCOOH.....	mravenčí kyselina
<i>h_n</i>	šum základní linie
HPLC.....	vysokoučinná kapalinová chromatografie
IAE.....	imunoafinitní extrakce
<i>k</i>	retenční faktor
<i>L</i>	délka kolony
LOD.....	mez detekce
LOQ.....	mez stanovitelnosti
<i>Mr</i>	relativní molekulová hmotnost
MRM.....	sledování mnohonásobných reakcí
MS/MS.....	tandemová hmotnostní spektrometrie
MS.....	hmotnostní spektrometrie
<i>N</i>	počet teoretických pater na metr kolony
<i>n</i>	počet teoretických pater
ODS.....	oktadecylsiloxan
QQQ.....	trojitý kvadrupólový analyzátor
<i>R</i>	rozlišení píků
SIM.....	sledování vybraného iontu
SPE.....	extrakce pevnou fází
SPME.....	mikroextrakce tuhou fází
<i>t_M</i>	mrtvý čas kolony
<i>t_R</i>	retenční čas analytu
<i>v/v</i>	objemový podíl
<i>w_{1/2}</i>	šířka píku analytu v polovině jeho výšky
WHO.....	světová zdravotnická organizace

1 ÚVOD

V životním prostředí se nalézá mnoho polutantů, mezi které patří i tzv. endokrinní disruptory (EDC). Jsou to látky s nepříznivými účinky na živé organismy, které se projevují změnami ve funkci endokrinních orgánů. [1]

Endokrinní disruptory zastupují skupinu hormonálních polutantů, která se ve vodě a v životním prostředí celkově nalézá v nízkých koncentracích (desetiny až stovky ng/L). Tento fakt představuje hlavní problém pro jejich stanovení. [2] Analýza těchto polutantů proto vyžaduje vysoce citlivé metody, které je nutné kombinovat s účinným předseparačními a prekoncentračními technikami.

Estrogeny vyskytující se v životním prostředí mohou simulovat chování přirozených hormonů vazbou na jejich receptory. [3] Tím mohou blokovat vazbu endogenních hormonů na receptory nebo bránit syntéze specifických hormonů. To zahrnuje např. inhibici sekrece gonadotropin-vylučujícího hormonu a následné snížení sekrece folikuly stimulujícího hormonu a luteinizačního hormonu, což vede ke snižování funkce, případně aktivity varlat a ovlivnění průběhu spermatogeneze, procesu tvorby a vývoje spermií, na jejímž konci je zdravá zralá mužská pohlavní buňka. [4,5] Dále mohou bránit transportu hormonů do krevního řečiště nebo pozměňovat jejich vylučování z těla. [6]

Endokrinní disruptory se dostávají do životního prostředí jako důsledek zvýšené produkce a konzumace řady léčiv a podpůrných látek v podobě odpadních produktů, které představují toxikologické reprodukční riziko již při velmi nízkých koncentracích. Estrogenní látky přítomné v jídle, plastových obalech a balených vodách představují látky potenciálně ohrožující zdraví mužů. [7]

Výskyt estrogenních polutantů také úzce souvisí se zvyšujícím se užíváním antikoncepčních tablet, které dnes obsahují látky s vysokou fyziologickou aktivitou. [1] Byla již popsána změna pohlaví a reprodukčních funkcí u plazů, ptáků, obojživelníků, korýšů a ryb v důsledku přítomnosti estrogenů v životním prostředí. [8]

Během posledních několika desetiletí došlo v lidské populaci k nárůstu testikulárních nádorů, defektů ve vývoji reprodukčních orgánů a snížila se výrazně kvalita lidského spermioqramu. [9,10] Jednou z příčin může být vedle důsledků negativního životního stylu i přítomnost estrogenních polutantů. V případě některých z nich byl již jejich negativní vliv na reprodukci prokázán (diethylstilbestrol) nebo je testován (např. bisfenol A nebo nonylfenol). [10-12] Do skupiny estrogenních polutantů jsou řazeny

i přírodní hormony jako 17α -estradiol, 17β -estradiol (BE2), estriol (E3), estron (E1) a syntetická kontraceptiva mestranol a 17α -ethynylestradiol (EE2). V současnosti se *in vivo* testuje vliv vybraných látek (fluoridů, estrogenních hormonů) na fertilitu myší. [13]

Kapacitace je klíčovou událostí při studiu chování spermií před oplodněním. Pouze kapacitované spermie jsou dostatečně aktivní a schopné oplodnění. Ke kapacitaci *in vivo* dochází v děloze a vejcovodech a je usnadněna látkami vylučovanými ze samičího pohlavního traktu. Sledování vlivu estrogenních polutantů na kapacitaci spermií *in vivo* by bylo velmi náročné a proto se provádí *in vitro*. [14]

Především při snaze o bližší porozumění procesu, při kterém spermie získávají schopnost oplodnit vajíčko, musí experimenty *in vitro* co nejvíce simulovat *in vivo* prostředí. Aby bylo možné studovat, zda má exogenní přítomnost estrogenních hormonů vliv na kapacitaci spermií, je důležité zjistit, zda je spermie schopna exogenní estrogenu vyvazovat. [15]

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout HPLC metodu vhodnou pro separaci a kvantifikaci 17β -estradiolu a 17α -ethynylestradiolu v kapacitačním M2 médiu. Vypracovaná metoda byla aplikována pro sledování volné (nevázané) koncentrace 17β -estradiolu během časově závislé kapacitace myších spermií *in vitro*. Bylo zjišťováno, jaké množství hormonu je vázáno na hovězí sérový albumin přítomný v M2 kapacitačním médiu a jaké množství volného estrogenu je tedy dostupné pro spermie během kapacitace.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Estrogenní hormony

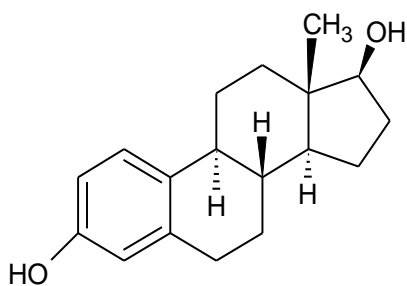
Estrogeny patří do skupiny steroidních látek. Jako prakticky všechny živočišné steroidní látky vznikají i estrogeny biotransformací cholesterolu.

Jsou to pohlavní hormony nezbytné pro normální dospívání, stimulují vývoj primárních a sekundárních pohlavních znaků. Vaječníky vylučují kromě progesteronu následující látky: 17β -estradiol (BE2), estron (E1), estriol (E3) a 17α -estradiol. Do skupiny estrogenů také patří syntetický 17α -ethynylestradiol (EE2) a mestranol. [16]

17α -Ethynylestradiol a 17β -estradiol reprezentují většinu všech estrogenů v odpadních i povrchových vodách. Výzkumy *in vivo* na rybách ukázaly, že už koncentrace 1 ng/L BE2 nebo 0,1 ng/L EE2 vyvolává u některých druhů feminizaci samců. Estrogeny EE2, BE2 a E1 jsou vylučovány buď v nezměněné podobě nebo převážně jako konjugáty (sulfáty nebo glukuronáty). Konjugované formy nevykazují biologickou aktivitu, ale mohou být prekurzory pro přeměnu na volné estrogeny ve splašcích nebo při průchodu čistírnou. [17]

K lékařským účelům jsou používány především stabilní syntetické deriváty steroidních hormonů – mestranol a 17α -ethynylestradiol – ze skupiny estrogenů a gestoden, levonogestrel aj. patřící mezi deriváty progesteronu. Uplatňují se v antikoncepčních tabletách (hlavní uplatnění EE2), jako fyziologická náhražka při nedostatku hormonů, při léčbě karcinomu prostaty a prsu, u žen po menopauze, při léčbě neplodnosti, endometriózy, menstruačních poruch aj. Terapeutické dávky estrogenů aplikované při léčbě jsou často mnohem vyšší, než je obsah těchto látek v antikoncepci. [1,18]

2.1.1 17β -Estradiol



Obrázek 1.
Struktura 17β -estradiolu
 $M_r = 272,4$

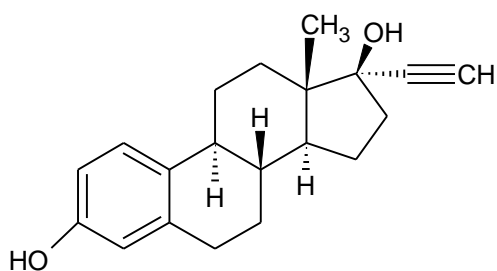
17β -Estradiol (viz obr. 1) představuje dominantní ženský estrogenní hormon, je zodpovědný za vývoj sekundárních pohlavních znaků, růst vaječnickových folikulů a regulaci menstruačního cyklu. Tento estrogenní hormon je produkován především granulózovými buňkami vaječnickových folikulů, ale také žlutým tělískem a placentou. Vzniká přeměnou

androgenů, konkrétně aromatizací testosteronu, katalyzovanou enzymem aromatasou.

Většina cirkulujícího 17β -estradiolu je vázaná na bílkoviny albumin nebo globulin. V játrech je tento hormon, stejně jako ostatní estrogény, přeměňován na glukuronidové a sulfátové konjugáty, které jsou následně vyloučeny močí.

Plazmatická koncentrace BE2 se mění během menstruačního cyklu. Těsně před ovulací a uprostřed luteální fáze jsou koncentrace hormonu nejvyšší. Sekreční rychlost u žen v časně folikulární fázi je $36 \mu\text{g}/\text{den}$, těsně před ovulací dosahuje maxima $380 \mu\text{g}/\text{den}$ a druhý vrchol sekrece nastává uprostřed luteální fáze se sekreční rychlostí vylučování BE2 $250 \mu\text{g}/\text{den}$. U mužů se tvoří 17β -estradiol také, avšak jeho sekreční rychlost je výrazně nižší. [19]

2.1.2 17α -Ethinylestradiol



Obrázek 2.

Struktura 17α -ethinylestradiolu
 $M_r = 296,4$

17α -Ethinylestradiol byl vyvinut v roce 1938 pracovníky firmy Schering jako první perorálně účinný estrogen na světě. Je to syntetický estrogenní hormon, odolný vůči jaternímu metabolismu. Účinnost přirozených estrogenů je při perorální aplikaci nižší, protože jsou v játrech inaktivovány dříve, než vstoupí do celkového oběhu. Hlavní aplikací 17α -ethinylestradiolu jsou perorální kontraceptiva. [18,20,21] Dnes se

v antikoncepčních přípravcích používá jako estrogenní složka výhradně 17α -ethinylestradiol. [21] Antikoncepční přípravky jsou většinou kombinované a vedle estrogenní složky obsahují také syntetické deriváty progesteronu – gestageny. Gestagení složka je proměnlivější, tvoří specifickou složku kombinované antikoncepční tablety.

Množství 17α -ethinylestradiolu v jedné tabletě se pohybuje v rozmezí od 0,15 do 0,5 mg. Tablety s vysokou dávkou EE2 (0,4 – 0,5 mg) se již běžně nepoužívají, za obvyklou dávku je považováno množství 0,2 – 0,3 mg EE2; při kterém jsou snížena rizika nežádoucích účinků, jako jsou např.: hypertenze, nárůst hmotnosti, rizika vzniku tromboembolie aj. Přípravky s nejnižší dávkou obsahují 0,15 mg EE2, toto snížení obsahu 17α -ethinylestradiolu již však nepřineslo výrazné zmírnění zbývajících nežádoucích účinků.

V České republice užívá hormonální antikoncepci přes 50 % žen ve fertilním věku (15 – 49 let). [22]

2.2 Metody stanovení estrogenů

Pro analýzu estrogenů lze využít různé techniky, mezi nejpoužívanější patří chromatografické metody (HPLC, GC) a imunochemické metody. V oblasti chromatografických metod jsou aplikovány různé způsoby detekce, nejčastěji je pro svou citlivost využíván hmotnostní detektor (MS). Pro snížení meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ) je často před vlastní separací předřazen prekoncentrační krok, u estrogenů nejčastěji extrakce tuhou fází (SPE).

Imunochemické metody

Tyto metody jsou založeny na reakci antigenu s protilátkou. Pro stanovení estrogenů se většinou používá metoda enzymově vázané imunochemické analýzy (ELISA) v tzv. „sandwichovém“ uspořádání a detekovanou složkou je zde antigen. Tato reakce může být značně specifická. Záleží na typu použité protilátky, zda bude použita monoklonální či polyklonální protilátka.

Při screeningu steroidních látek ve vzorcích ze životního prostředí jsou imunochemické metody nenahraditelné, co se týče rychlosti, nízké ceny ale také možnosti analyzovat množství vzorků přímo v terénu. Bylo vyvinuto několik metod ELISA pro stanovení estrogenů. S použitím polyklonální protilátky a kombinací s SPE bylo dosaženo vysoce selektivní a citlivé metody, kde LOD pro estron byl určen jako 1,25 ng/L. [23]

V rychlém screeningu pro stanovení BE2, E1 a EE2 v různých vodních matricích zahrnujících odpadní, říční i podzemní vody, byly porovnány 4 rozdílné komerčně dostupné monoklonální sady ELISA. Vlastnímu stanovení předcházela úprava vzorků metodou SPE. Dynamický rozsah stanovení se pohyboval v rozmezí 0,05 – 5 µg/L a bylo dosaženo LOD 0,05 µg/L. [24]

Imunochemické metody jsou velmi užitečné i přesto, že mají svá omezení. Jejich citlivost je v řadě případů nedostačující pro stopové analýzy a analýzy strukturně podobných estrogenů kvůli nespecifické vazbě na protilátku. Při porovnání metod ELISA, GC a HPLC v tandemovém uspořádání s MS detekcí jsou výsledky všech těchto metod srovnatelné. Oproti GC má ELISA nižší citlivost vůči vlivům matrice. [25]

Plynová chromatografie

Tuto metodu lze využít jak ke kvalitativní, tak kvantitativní analýze. Signál analytu poskytovaný měřicím zařízením je úměrný jeho množství. Výhody plynové chromatografie zahrnují vysokou separační účinnost, vysokou rychlost analýzy a možnost použití vysoce citlivých detektorů. [25,26]

Estrogeny mohou být stanoveny metodou GC přímo bez předchozí derivatizace, nicméně derivatizace na těkavější deriváty je upřednostňována. [27,28] Nejběžnější derivatizační technikou je silylace, vzniklé deriváty jsou charakterizované sníženou polaritou, zvýšenou těkavostí a lepší teplotní a katalytickou stabilitou. Jako doplněk může být k silylaci také použita alkylace. Metoda zahrnující derivatizaci analytů anhydridem pentafluoropropionové kyseliny následovanou GC-MS analýzou na koloně HP-5 MS (30 m × 0,25 mm s tloušťkou filmu 0,25 μm) v módu sledování vybraného iontu (SIM) vykazovala limity detekce v rozmezí 0,6 – 2,5 ng/L pro estron, 17α-estradiol, 17β-estradiol, estriol a mestranol. [29] Pro stanovení estrogenů ve vzorcích z odpadních vod byla také optimalizována mikroextrakce tuhou fází následovaná metodou GC s tandemovou hmotnostní detekcí (MS/MS), kde se limity detekce pohybovaly v rozmezí 0,2 – 0,3 ng/L. Velmi citlivé stanovení BE2 a EE2 ve znečištěných vodách poskytovala metoda GC-MS/MS. Limity detekce pro odpadní vodu činily 0,1 ng/L a pro povrchovou vodu 0,05 ng/L. [30,31]

Kapalinová chromatografie

Metodou HPLC je možno analyzovat estrogeny přímo, bez předchozí derivatizace. Metoda HPLC-MS nebo HPLC-MS/MS spolu s UV spektrofotometrickou, fluorescenční nebo elektrochemickou detekcí bývá pro analýzu vodných vzorků estrogenních polutantů použita nejčastěji. [32-35]

Jako mobilní fáze se používají směsi vody (pufru) s organickým modifikátorem, nejčastěji methanolem nebo acetonitrilem. Stacionárními fázemi jsou především chemicky vázané n-alkyly na silikagelovém nosiči, nejčastěji C₁₈ nebo C₈.

Oproti GC má kapalinová chromatografie některé nesporné výhody: vzorky mohou být analyzovány přímo, bez předchozí derivatizace, vodné vzorky není nutné před analýzou nejprve vysušit, což u GC nutné je. Samotné analýze často předchází prekoncentrace s využitím SPE nebo mikroextrakce tuhou fází (SPME).

Obecně lze říci, že pro separaci estrogenů se nejčastěji využívá reverzní separační mód. Jako stacionární fáze byly s úspěchem použity fenylové nebo oktadecylové fáze.

Pro dosažení dostatečné citlivosti detekce je nejčastěji volena MS detekce. Pokud je hmotnostní spektrometrie použita v tandemovém uspořádání zlepšují se jak hodnoty LOD, tak LOQ. [25]

Plně automatizovaná metoda SPME-LC-ESI-MS s isokratickou elucí byla použita pro stanovení čtyř nejběžněji sledovaných estrogenů ve vodných vzorcích. Pro stanovení byla využita C₈ kolona a mobilní fáze o složení 0,01% roztok amoniaku ve směsi s acetonitrilem v poměru 60/40 (v/v). Limity detekce se pohybovaly v rozmezí 2,7 – 11,7 ng/L. [36] Další plně automatizovaná metoda SPE-LC-ESI-MS/MS s gradientovou elucí byla vyvinuta za použití C_{18e} stacionární fáze a ACN jako organickým modifikátorem mobilní fáze. V této metodě dosahoval LOQ hodnot 0,02 – 1,02 ng/L. Metoda dávala lineární odezvu, byla selektivní a vyžadovala minimální přípravu vzorku. [33] Pro stanovení estrogenů byl jako velmi vhodný navržen separační systém LC-ESI-MS/MS s detekcí v negativním iontovém módu, při němž bylo dosaženo LOD 0,1 – 10 µg/L. Jako stacionární fáze byla použita kolona C₁₈, v kombinaci s binární mobilní fází tvořenou vodou a acetonitrilem s přidavkem amonné soli a byl aplikován lineární gradient. [37,38]

Estrogeny byly také stanovovány metodou SPME-HPLC jak s UV detekcí při 280 nm (LOD 0,3 – 1,1 µg/L), tak s elektrochemickou detekcí (LOD 0,06 – 0,08 µg/L). Pro toto stanovení byla použita C₁₈ stacionární fáze a mobilní fáze obsahující acetonitril a vodu s přidavkem 1% octové kyseliny a 0,5 g/L KCl. Obsah ACN byl během analýzy regulován gradientem. [39] Tabulka 1 sumarizuje metody pro stanovení BE2, dosažené LOD a lokalizaci analyzovaných vodných vzorků.

Tabulka 1. Porovnání různých metod pro stanovení 17β-estradiolu.

LOD	metoda	řeka, stát
7,4 ng/L	SPME-LC-MS/MS	Asahi, Japonsko [33]
0,18 ng/L	IAE*-HPLC-MS	Long Island NY, USA [40]
7,3 ng/L	GC-MS	Tama, Japonsko [41]
1,3 - 11 ng/L	GC-MS	Vltava, ČR [42]

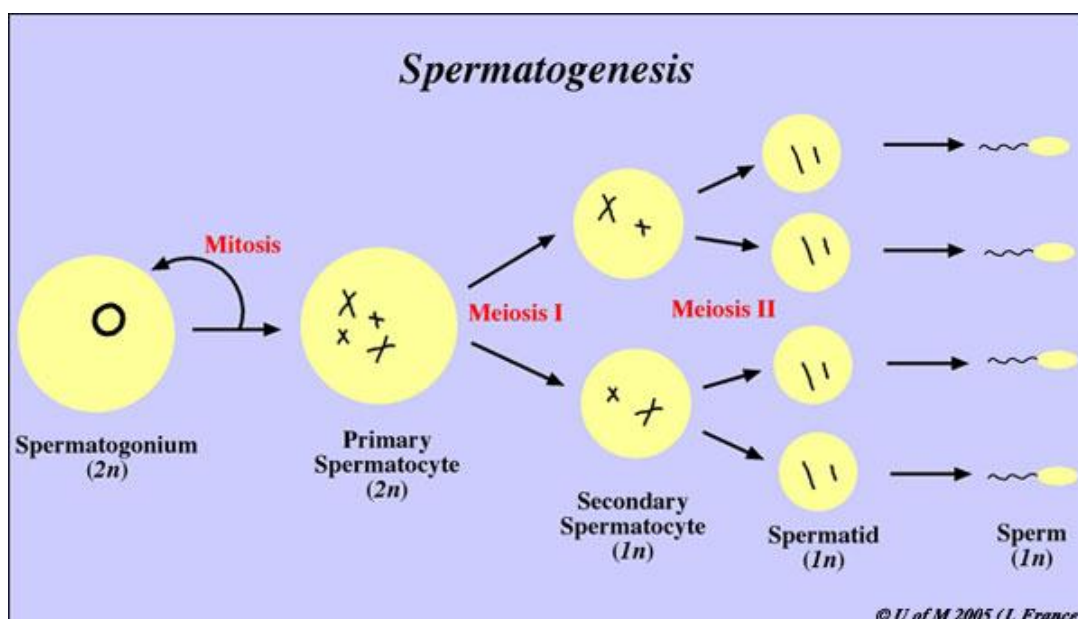
*IAE – imunoafinitní extrakce

2.3 Spermatogeneze a patologie spermií

Gamety (spermie a vajíčko) vznikají meiózou tj. redukčním dělením. Proto mají pohlavní buňky poloviční počet chromozomů než všechny ostatní buňky v těle a jsou tedy haploidní (značí se $1n$, diploidní buňky se značí $2n$). [43]

Spermatogeneze je proces zahrnující přeměnu zárodečných buněk – spermatogonií – na spermie. Zrání zárodečných buněk začíná v pubertě a končí v pozdním stáří.

Spermatogonie jsou od fetálního vývoje uloženy v semenotvorných kanálcích. V pubertě se opakovanými mitózami zvýší jejich počet a začne diferenciaci na primární spermatocyty. Následuje první redukční meiotické dělení a tím vznikají sekundární spermatocyty, které jsou již haploidní. Ty se ještě jednou meioticky rozdělí za vzniku spermatid, ze kterých v procesu spermiogeneze vznikají spermie (viz obr. 3). Celý tento proces spermatogeneze (včetně spermiogeneze) trvá u člověka přibližně dva měsíce a u myši jeden měsíc. Na regulaci spermatogeneze se podílejí Sertoliho buňky, které vystylají semenotvorné kanálky a vyživují zárodečné buňky. Vzniklé spermie jsou transportovány vzestupnými kanálky do nadvarlat, kde jsou skladovány a zvolna dozrávají. Na nadvarlata navazuje chámovod, kterým jsou spermie dopravovány do močové trubice. Nadvarle mají pouze savci, u ostatních živočichů dochází k obdobným jevům v chámovodu. [43,44]



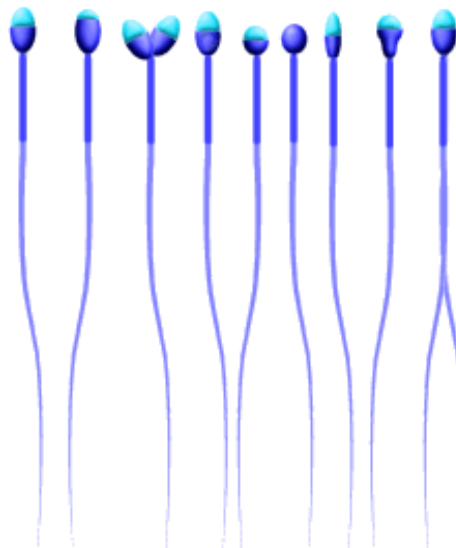
Obrázek 3. Schéma spermatogeneze; převzato z: [45].

Správně maturovaná lidská spermie má dle Světové zdravotnické organizace (WHO) oválně tvarovanou hlavičku s neporušeným okrajem. Hlavičku tvoří světlejší anteriorní část, tzv. akrozóm, který zaujímá 40 – 70 % celkového povrchu hlavičky spermie, a posteriorní část. Bičík spermie je připojen v symetricky situované prohlubni na bázi hlavičky. Je pouze jeden a není stočený ani přehnutý přes sebe. [46]

Patologie spermií

V průběhu spermatogeneze a dozrávání spermií v nadvarleti je přibližně 75 % všech vyvíjejících se zárodečných buněk fyziologicky redukováno. Fyziologická redukce patologických buněk je uskutečňována prostřednictvím apoptózy a ubiquitinace. U člověka dosáhne pouze 25 % vznikajících zárodečných buněk ejakulace a přesto je ještě více než polovina z tohoto množství malformovaná. [47]

Dále může docházet i k poruchám spermatogeneze. Ta může být narušena v jakémkoliv svém kroku vlivem životního prostředí, které působí na organismus nebo chorobami, které mají přímý nebo nepřímý vliv na spermatogenezi. [48,49] Poškozeny mohou být i již vzniklé spermie, a to buď z hlediska funkce nebo struktury. Na obrázku 4 jsou ukázány normální lidské spermie a příklady abnormálních tvarů.



Obrázek 4. Morfologie lidských spermií, zleva doprava: spermie normálního tvaru, spermie s malým akrozómem, se dvěma hlavičkami, s vakuolou v hlavičce, s kulatou hlavičkou, s kulatou hlavičkou bez akrozómu, se zúženou hlavičkou, hruškovitou hlavičkou a se dvěma bičíky; převzato z [50].

WHO definuje několik kategorií patologických spermií podle různých kritérií: snížený počet spermií v ejakulátu, snížená pohyblivost spermií, snížený počet spermií normálního tvaru a jejich kombinace. Pokud není v ejakulátu měřitelná hladina spermatických buněk, případně pokud spermie v ejakulátu nejsou přítomné vůbec, je tento stav také vyhodnocen jako patologický.

2.4 Kapacitace

Spermie produkované ve varlatech nejsou samy o sobě zralé a schopné oplození. [44] Ani ejakulované spermie nemohou bezprostředně po vniknutí do samičího pohlavního ústrojí oplodnit vajíčko. Zatímco se spermie pohybují samičím pohlavním ústrojím, podléhají mnoha biochemickým a fyziologickým změnám souhrnně nazývaných kapacitace. [51] Spermie, které neprošly kapacitací, jsou zpomaleny a k vajíčku obvykle vůbec nedospějí. [52] Přestože nutnost kapacitace byla zjištěna u všech studovaných savčích druhů již před více než padesáti lety nezávisle dvěma skupinami [53,54], není dodnes, i přes intenzivní studium, její přesný průběh na molekulární úrovni zcela znám.

Při kapacitaci nedochází k morfologickým změnám spermie, ale převážně ke změnám chemickým. Kapacitace zahrnuje: a) vzrůst tekutosti membrány hlavičky spermie snížením koncentrace cholesterolu v membráně, b) tok iontů vedoucí ke změně membránového potenciálu, c) tyrozinovou fosforylaci mnoha proteinů, d) hyperaktivaci a schopnost navození akrozomální reakce. [55]

Plazmatická membrána spermie obsahuje velké množství cholesterolu, který reguluje tekutost membrány a hraje důležitou roli při kapacitaci. [56] Aby ke kapacitaci došlo, musí poměr mezi cholesterolem a fosfolipidy v membráně poklesnout. Pokud k poklesu nedojde, spermie není schopná oplození. [57]

Sérový albumin je nezbytnou složkou kapacitačního média, protože vyvazuje cholesterol z plazmatické membrány spermie. [58-60] Během kapacitace může mít i jiné funkce [61], ale jeho schopnost umožňovat tzv. „cholesterolový efflux“ je pro kapacitaci nejdůležitější. Následkem snížené koncentrace cholesterolu v membráně je zvýšení pH v buňce, nárůst koncentrace HCO_3^- a Ca^{2+} iontů v buňce a aktivace adenylátcyklasy. [57]

Během transportu spermií samčím a samičím reprodukčním traktem jsou spermie vystaveny změnám okolního prostředí. Tekutina z nadvarlat je prostředí, které obsahuje

vysokou koncentraci K^+ iontů, nízkou koncentraci Na^+ iontů a velmi nízkou koncentraci HCO_3^- . [62,63] Po ejakulaci dojde k dramatickým změnám v koncentracích iontů nejprve v seminální tekutině a poté v samičím reprodukčním traktu. K^+ ionty jsou redukovány a koncentrace iontů Na^+ a HCO_3^- výrazně vzrůstají. [62-64] Jako následek změn v extracelulární koncentraci iontů dochází ke změnám potenciálu plazmatické membrány spermie. [65,66]

Membrána je propustnější pro K^+ ionty, které proudí z buňky ven. Zároveň dochází k ovlivnění napětově ovládaných Ca^{2+} iontových kanálů, které se otevírají, a extracelulární vápník vstupuje do buňky. Zvýšení koncentrace Ca^{2+} iontů v buňce je nezbytné pro začátek akrozomální reakce. [57]

Fosforylace proteinů je posttranslační modifikace, která je jedním z nejběžnějších mechanismů regulace aktivity proteinů. Může probíhat na serinových, threoninových nebo tyrozinových zbytcích proteinů. [55] Tyrozinová fosforylace proteinů bičíku je důležitá pro hyperaktivaci spermie [67,68] a v oblasti akrozomální části hlavičky je nezbytná pro průběh akrozomální reakce a následnou fúzi membrán spermie a vajíčka. Spermie, u kterých neprobíhá kapacitace, jsou v oblasti akrozómu nefosforylované.

Následkem kapacitace dochází ke změně pohybu bičíku spermii – k tzv. hyperaktivaci. Bičík se pohybuje v hlubokých ohybech a jeho pohyb je méně symetrický. Toto schéma pohybu umožňuje spermii pronikat vysoce viskózním prostředím vejcovodu, kumulárním matrixem a po akrozomální reakci také penetrovat zona pellucida. Nejdůležitějším faktorem, který reguluje hyperaktivaci spermii, je hladina Ca^{2+} iontů.

Akrozomální reakce je vyvrcholením kapacitace a je nezbytným předpokladem pro oplodnění vajíčka spermii savců. [64] Spermie se váže k zona pellucida vajíčka přes specifické receptory, které jsou lokalizovány na anteriorní části hlavičky spermie. Vazba spermie k zona pellucida aktivuje specifické G-proteiny v plazmatické membráně spermie. G-proteiny hrají úlohu ve zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} iontů nutných pro průběh akrozomální reakce. [69]

Kapacitace probíhá *in vivo* v prostředí dělohy nebo vejcovodů vlivem vylučovaných látek těmito orgány. Albumin je hlavním proteinem, který se nachází v samičím pohlavním ústrojí. Pro realizaci kapacitace *in vitro* je vhodné používat médium simulující prostředí v samičím pohlavním traktu, a to médium, jehož hlavní složkou je

hovězí sérový albumin. [51] Pro kapacitaci *in vitro* musí být spermie nejprve inkubovány za speciálních podmínek. [43]

2.5 HPLC

2.5.1 Princip

Chromatografie je separační metoda, při které se látky rozdělují mezi dvě nemísitelné fáze na základě fyzikálně-chemických interakcí. Mezi její výhody patří široká oblast použitelnosti – metodou HPLC lze analyzovat ionty, látky polární, nepolární, málo těkavé, tepelně nestabilní i vysokomolekulární – cca 80 % všech známých látek. Oproti GC má HPLC také výhodu v možnosti ovlivnění separace změnami v mobilní fázi, která není inertní a významně se na separaci podílí. [26]

2.5.2 Typy chromatografie

Existuje několik typů chromatografie, každý z nich využívá jiný princip separace analytů. Jsou to chromatografie: adsorpční, rozdělovací, iontově-výměnná, afinitní a vylučovací.

K nejčastěji využívaným patří rozdělovací chromatografie. Její princip je založen na rozdělování analytu mezi dvě nemísitelné kapaliny, které jsou ve formě mobilní a stacionární fáze. Stacionární fáze je zakotvena na inertním nosiči, nejčastěji na silikagelu. Tento typ chromatografie má nejširší využití, lze jej vhodnými úpravami přizpůsobit pro separaci látek nepolárních, polárních i iontových. [26]

2.5.3 Stacionární a mobilní fáze

Stacionární fáze

Mezi nejpoužívanější stacionární fáze v HPLC patří chemicky vázané stacionární fáze, z nich pak především nepolární reverzní fáze, které mají mnoho výhod. Jsou dostupné v širokém rozsahu polaritě, z čehož vyplývá flexibilita jejich aplikací.

Nejčastějším nosičem chemicky vázaných fází je silikagel, který má řadu výhod, jakými jsou: uniformní kulovité částice, vysoký specifický povrch, regulovatelná pórovitost aj. Silikagel obsahuje skupiny Si – OH s aktivním vodíkem, který může být nahrazen různými funkčními skupinami, díky tomu lze připravit stacionární fáze o různé polaritě. Většina stacionárních fází jsou oktadecylsiloxany (ODS), časté jsou

také navázané kratší alkyly např. oktyl nebo butyl. Chemicky vázané fáze ale mají i nevýhody. Fáze na bázi silikagelu jsou stabilní jen v omezeném rozsahu pH ~ 3 – 7, přítomnost nezreagovaných silanolových skupin vede k nežádoucím interakcím. Nezreagované silanolové (–OH) skupiny mohou interagovat s molekulami analytu a způsobovat nesymetrii píků a vyšší retenci, zejména pro látky bazické povahy. Moderní stacionární fáze proto mají blokované zbytkové silanolové skupiny. K blokaci (tzv. „endcapping“) se využívá dodatečná silanizace např. trimethylchlorsilanem.

Příkladem moderní stacionární fáze může být kolona SunFire®, která představuje novou generaci kolon firmy Waters. Vyznačuje se vysoce deaktivovaným povrchem a patentovanou technologií navázání alkylového ligandu na silikagelový nosič. Tato kolona obecně vykazuje vysokou účinnost, stabilitu při nízkých hodnotách pH a dlouhou životnost.

Mobilní fáze

Mobilní fáze se v HPLC významně podílí na separačním procesu. Změnami mobilní fáze lze významně a poměrně jednoduše ovlivňovat analýzu např. změnami typu rozpouštědel, hodnotou pH vodné složky mobilní fáze, popřípadě přidávkem iontově-párových činidel do mobilní fáze aj. Mobilní fáze by měla dávat v detektoru co nejnižší signál, aby umožnila co nejcitlivější stanovení analytů.

Mobilní fáze, tvořené převážně směsí organického rozpouštědla s vodou nebo vodnými pufrů jsou relativně levné a ustavování rovnováhy v koloně je rychlé. Při vhodné kombinaci s mobilní fází lze reverzní stacionární fáze aplikovat přímo na biologické systémy.

2.5.4 Detekce

Mezi nejčastěji používané detektory v HPLC patří spektrofotometrický, hmotnostní, fluorimetrický, refraktometrický a elektrochemický detektor. V této diplomové práci byly použity dva způsoby detekce, a to spektrofotometrická detekce s diodovým polem a tandemová hmotnostní detekce.

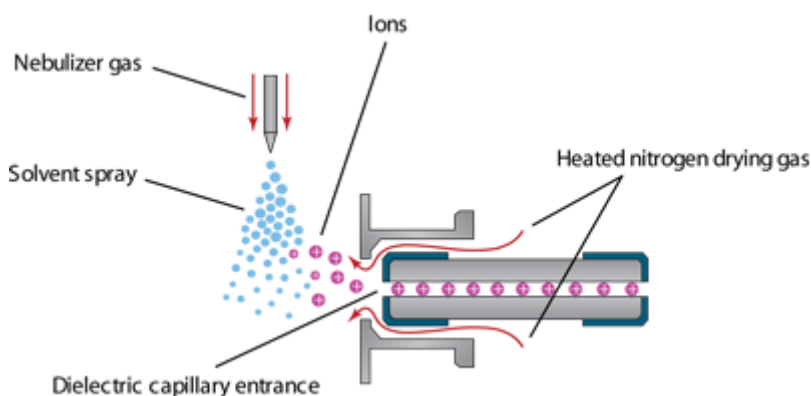
Hmotnostní detektor se skládá z několika částí zahrnujících interface a iontový zdroj, hmotnostní analyzátor, detektor a zdroj vakua.

Interface a iontový zdroj – ESI

Mezičlen (interface) převádí, v případě spojení kapalinové chromatografie s MS detekcí, analyty do plynné fáze a umožňuje jejich ionizaci. V této práci byl jako iontový zdroj použit elektrosprej (ESI), který je nejčastěji používaný v aplikacích LC/MS. Pracuje za atmosférického tlaku a dle použité energie se řadí mezi „měkké“ ionizační techniky.

Princip vzniku iontů v ESI zahrnuje několik následných kroků. Nejprve je eluát z HPLC veden do iontového zdroje elektricky vodivou kapilárou, na kterou je vloženo elektrické napětí 3 – 4 kV. Na výstupu z kapiláry vytvoří eluát vlivem elektrického pole meniskus (Taylorův kužel), ze kterého se uvolňují coulombickým štěpením ionty analytu, které následně putují do hmotnostního spektrometru. Při tomto způsobu ionizace vznikají nejčastěji molekulární adukty $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ a $[M-H]^-$. [70]

Citlivost, robustnost a velikost matričních efektů ovlivňuje také geometrie sprejování. V této diplomové práci bylo použito ortogonálního (kolmého) sprejování, které by dle výrobce mělo snižovat šum neúplně vysušených kapek rozpouštědla a udržovat vzorkovací kapiláru a iontovou optiku čistší. Na obrázku 5 lze vidět vznik iontů z eluátu a kolmé sprejování. [71]



Obrázek 5. Znárodnění vzniku iontů a jejich vstup do hmotnostního spektrometru; převzato z [71].

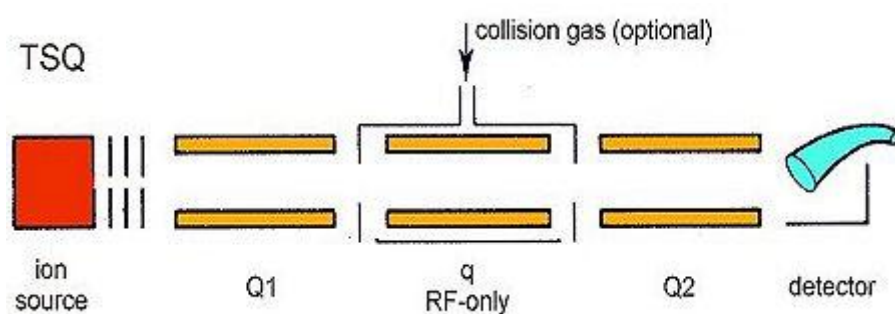
Hmotnostní analyzátor – QQQ

Lineární kvadrupólový analyzátor se skládá ze 4 tyčí kruhového nebo hyperbolického tvaru, na které se vkládá potenciál. Ionty vstupující z iontového zdroje

začnou v kvadrupólu oscilovat, projdou jím však pouze ty ionty, jejichž oscilace jsou stabilní po celé délce kvadrupólu.

Stabilitu konkrétních iontů určuje stabilitní diagram závislosti vkládaného stejnosměrného proudu na střídavém napětí. [72-74]

V této diplomové práci byl použit trojitý kvadrupólový analyzátor. První a třetí kvadrupól pracují na principu uvedeném výše. Prostřední kvadrupól (hexapól) se využívá jako kolizní cela a dochází v něm k fragmentaci iontů. Díky tomu je možno detekovat produktový iont, který vznikne rozštěpením prekursorového iontu v kolizní cele. [75,76] Jako kolizní plyn byl použit dusík. Schéma celého hmotnostního spektrometru je ukázáno na obrázku 6.



Obrázek 6. Schéma hmotnostního spektrometru s trojitým kvadrupólovým analyzátozem; převzato z [77].

2.5.5 Vybrané chromatografické charakteristiky

Retenční faktor k vyjadřuje míru zadržení analytu v koloně, tedy jeho zpoždování.

Platí pro něj:

$$k = (t_R - t_M)/t_M, \quad (1)$$

kde t_R je retenční čas látky a t_M je mrtvý čas.

Účinnost kolony je definována počtem teoretických pater n vztahem:

$$n = 5,545 \cdot (t_R/w_{1/2})^2, \quad (2)$$

kde n je počet teoretických pater kolony, t_R je retenční čas látky a $w_{1/2}$ je šířka píku v polovině jeho výšky.

Pro porovnání účinnosti různě dlouhých kolon se používá výškový ekvivalent teoretického patra H definovaný vztahem:

$$H = L/n, \quad (3)$$

kde H je výškový ekvivalent teoretického patra, L je délka kolony a n je počet teoretických pater kolony.

Separční faktor pro látky 1 a 2 se udává pomocí poměru jednotlivých retenčních faktorů, tento poměr se nazývá také relativní retence nebo selektivita. Platí tedy:

$$\alpha_{1,2} = k_2/k_1, \quad (4)$$

kde $\alpha_{1,2}$ je selektivita, k_1 a k_2 jsou retenční faktory dříve eluující (1), respektive později eluující (2) látky.

Mez detekce je nejnižší hodnota koncentrace, kterou můžeme spolehlivě detekovat za daných experimentálních podmínek.

$$\text{LOD} = (3 \cdot h_n)/m, \quad (5)$$

kde h_n je šum základní linie a m směrnice kalibrační přímky.

Mez stanovitelnosti je nejnižší koncentrace, kterou můžeme spolehlivě stanovit za daných experimentálních podmínek.

$$\text{LOQ} = (10 \cdot h_n)/m, \quad (6)$$

kde h_n a m mají stejný význam jako u meze detekce.

Parametr sloužící k posouzení tvaru píku se nazývá symetrie píku, resp. asymetrický faktor A_s .

$$A_s = B/A, \quad (7)$$

kde A, B jsou pološířky píku v 10 % jeho výšky a A je pološířka ve vzestupné části píku a B v sestupné části píku.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie

Acetonitril CHROMASOLV, gradient grade, Sigma-Aldrich, Německo

Ethanol, 96 %, Lach-Ner, Česká republika

Mravenčí kyselina, 98 – 100 %, MERCK, Německo

M2 médium s 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonovou kyselinou (HEPES) bez penicillinu a streptomycinu; vhodné pro myši embrya, Sigma-Aldrich, Německo

17 β -Estradiol, standard 98 %, Sigma-Aldrich, Německo

17 α -Ethinylestradiol, standard minimum 98 % HPLC, Sigma-Aldrich, Německo

Deionizovaná voda, Milli-Q Millipore, Bedford, USA

Parafinový olej, (Nr 8904.1) Carl Roth, Německo

3.2 Přístroje a pomůcky

HPLC kapalinový chromatograf – Agilent Technologies, Waldbroon, Německo:

- 1200 Series Infinity LC (pumpa, odplyňovač, autosampler s dávkovací smyčkou nastavenou na objem 10 μ L, termostat pro autosampler, termostat pro kolonu)
- 1290 Infinity DAD detektor
- 6460 Triple Quadrupole LC/MS
- Mass Hunter workstation software – počítačový program pro zpracování výsledků

Kolona SunFire® C₁₈ (150 x 4,6 mm, oktadecyl navázaný na silikagelový nosič, velikost zrnění 5 μ m), Waters, MA, USA

Počítačový program Origin 6.0, OriginLab Corporation, USA, pro vyhodnocení dat

Centrifuga MiniSpin® Plus, Eppendorf, Německo

Inkubátor NB-203, N- BIOTEK, Korea

Světelný mikroskop, Olympus CX 21, Česká republika

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, Česká republika

3.3 Separační systém

Jako stacionární fáze byla vybrána kolona SunFire® C₁₈, která již byla s úspěchem použita pro separaci estrogenů v různých matricích. [78-80] Také složení mobilní fáze bylo vybráno s ohledem na výsledky získané pro analýzu estrogenů. [78] Byla to jednoduchá binární směs skládající se z acetonitrilu a vody v různých objemových poměrech. Při použití MS detekce byla do mobilní fáze přidána mravenčí kyselina (tvořila 0,1% roztok) pro lepší ionizaci analytu v nebulizéru. [81]

3.4 Podmínky měření

Zásobní roztok obou analytů o koncentraci 200 mg/L byl připraven navážením příslušného množství standardu, který byl rozpuštěn v ethanolu. Zásobní roztok byl skladován při 5 °C. Pracovní roztoky byly připraveny rozředěním zásobního roztoku do ethanolu nebo do M2 média na příslušné koncentrace. Během chromatografického měření byla kolona termostatována na teplotu 21 °C a rychlost průtoku mobilní fáze byla 0,8 mL/min.

Odplynění mobilní fáze bylo prováděno „online“ odplyňovačem zabudovaným v HPLC pumpě. Objem zpracovávaných vzorků byl 500 µL.

Byly použity dva různé způsoby detekce, a to detekce s diodovým polem (DAD) a tandemová hmotnostní detekce. Při MS detekci byla použita ionizace v pozitivním módu. Při měření vzorků v M2 médiu byl nastaven časový úsek, během kterého byl eluát pouštěn do odpadu a pouze v okolí doby retence analytu byl eluát veden do hmotnostního spektrometru, aby se co nejvíce eliminovalo znečištění sprejovací části přístroje. Pro BE2 byl eluát veden do MS od 12,5. do 15,5. minuty a pro EE2 od 18,5. do 22. minuty.

3.5 Kapacitace spermií *in vitro*

Biologický pokus byl prováděn na sekci biologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze pod vedením RNDr. Kateřiny Hortové, Ph.D.

Průběh biologického pokusu:

Pro dosažení výchozích testovacích koncentrací 200 a 20 µg/L byl ze zásobních ethanolických roztoků o koncentraci 200, respektive 20 mg/L odebrán vždy 1 µL, který

byl doplněn do objemu 1 mL M2 kapacitačním médiem, a to z důvodu minimalizace přítomnosti ethanolu v biologických vzorcích. Z takto připraveného 1 mL roztoku (o příslušné výchozí koncentraci hormonu pro konkrétní pokus) bylo 100 μ L napipetováno do středu každé z použitých *in vitro* fertilizačních Petriho misek a převrstveno 1 mL parafinového oleje. Vše se provádělo ve sterilním „flow boxu“. Všechny takto připravené Petriho misky byly umístěny na 1 hodinu do inkubátoru s teplotou 37 °C a byly syceny 5 % CO₂ ve vzduchu. Tento *in vitro* systém simuluje *in vivo* fyziologické prostředí reprodukčního traktu samice savců. Během této hodiny byl zabit myší samec a byla mu odebrána levá i pravá cauda nadvarlate. Z cauda epididymis byl odebrán poslední 4. a 5. region obsahující nejvíce maturované spermie, připravené k transportu chámovodem k ejakulaci. Tato část cauda epididymis byla vložena na 10 minut do inkubátoru kvůli uvolnění spermií. Výsledná koncentrace spermií v M2 médiu byla nastavena přibližně na 10⁶ spermií/mL. Pro ověření koncentrace spermií byla používána Bürkerova komůrka. [82] Pod světelným mikroskopem při stonásobném zvětšení bylo kontrolováno, zda jsou spermie živé a pohyblivé.

Do předem vytemperovaných Petriho misek obsahujících 100 μ L média s hormonem o příslušné koncentraci bylo skrz vrstvu parafinového oleje napipetováno 5 μ L roztoku spermií v M2 médiu. Takto nachystané Petriho misky byly dány opět do inkubátoru, aby spermie kapacitovaly. Od tohoto okamžiku byl měřen čas kapacitace. Biologické vzorky byly inkubovány po různě dlouhou dobu: 0, 30, 60, 90, 120, 150 a 180 minut. Pro každý čas bylo paralelně inkubováno 6 Petriho misek, každá s objemem 105 μ L vlastního vzorku a 1 mL parafinového oleje. V uvedených časových intervalech byly prováděny odběry vzorků. Pro jednotlivé časy bylo při odběru postupováno následovně: z každé Petriho misky byl co nejopatrněji odpipetován roztok M2 média se spermii tak, aby neobsahoval parafinový olej, a následně byl roztok napipetován do mikrozkušavky (společné pro sběr ze všech 6 Petriho misek) a centrifugován po dobu 10 minut při 12000 otáčkách za minutu pro odstranění spermií. Po centrifugaci byl supernatant ihned pipetován do vialky a byl analyzován vyvinutou HPLC-MS/MS metodou. Objem vzorku byl 500 μ L.

Jako referentní vzorky (blanky) byly použity vzorky, které prošly stejným experimentálním postupem jako vlastní vzorky, pouze k nim nebyly připipetovány spermie. Pro kontrolu měření HPLC-MS/MS přístroje byl na Katedře analytické chemie

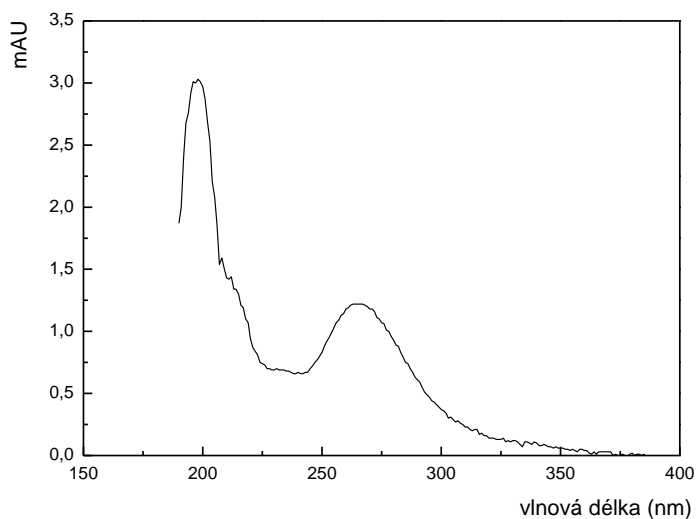
připravován i vzorek hormonu v M2 médiu o výchozí testovací koncentraci hormonu pro biologický pokus. Takto připravený vzorek neprošel žádnou temperací.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Aby bylo možné zjišťovat, zda a pokud ano, v jaké míře se 17β -estradiol (popřípadě 17α -ethynylestradiol) během kapacitace spermií *in vitro* vyvazuje, bylo nutné vybrat vhodný způsob detekce.

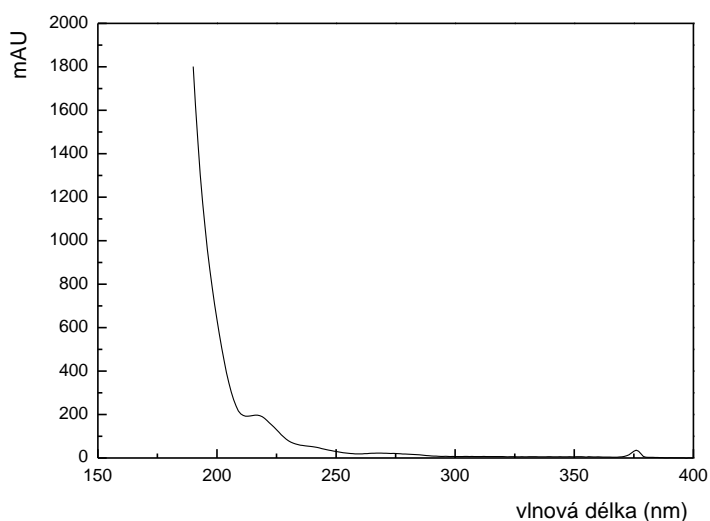
4.1 UV-detekce

Na základě již získaných výsledků pro separaci estrogenů [78], byl pro separaci studovaných hormonů vybrán separační systém tvořený kolonou SunFire C₁₈ v kombinaci s mobilní fází ACN/H₂O, 40/60 (v/v). Tento systém se osvědčil i pro sledování volné koncentrace estriolu v M2 médiu během kapacitace myších spermií *in vitro* [80], při kterém byla použita UV detekce při 200 nm. Z tohoto důvodu byla vybrána UV detekce i pro sledování studovaných analytů. S využitím detektoru s diodovým polem (DAD), který umožňuje snímat UV spektrum v nastaveném rozmezí vlnových délek v čase, bylo nejprve proměřeno UV spektrum 17β -estradiolu v rozsahu 190 – 400 nm. Ethanolický roztok BE2 o koncentraci 200 µg/L byl nadávkován do separačního systému (SunFire C₁₈, ACN/H₂O, 40/60 (v/v), $F_m = 0,8$ mL/min) a záznam závislosti velikosti absorpance na vlnové délce v retenčním čase analytu (13,7 min) je zobrazen na obr. 7.



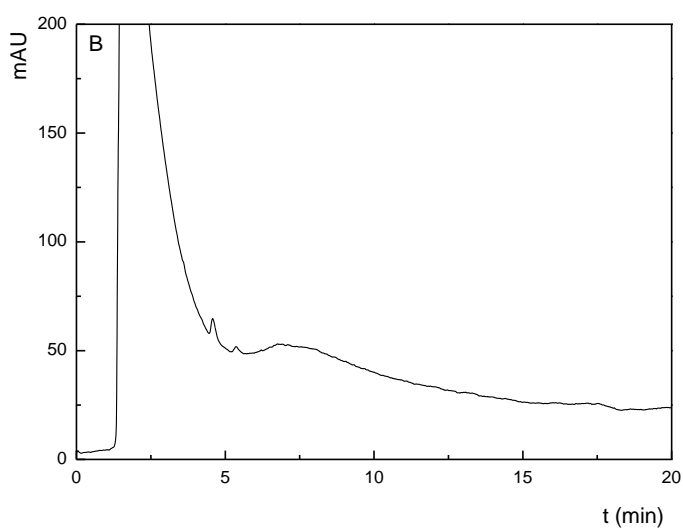
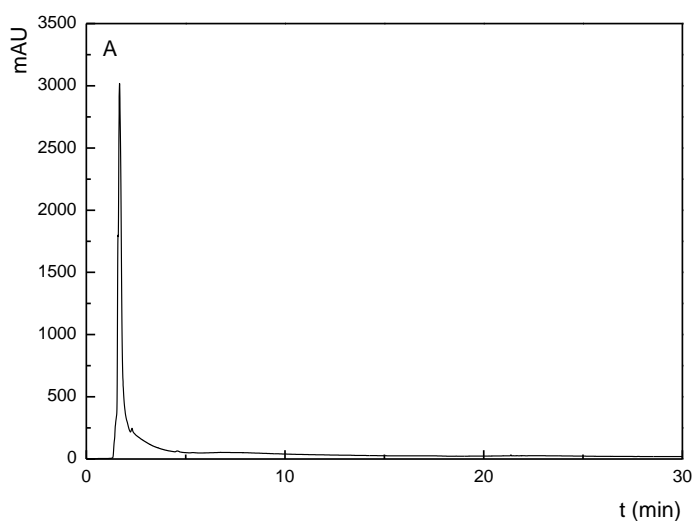
Obrázek 7. Průběh UV spektra ethanolického roztoku 17β -estradiolu o koncentraci $200\ \mu\text{g/L}$, proměřovaného v rozsahu $190 - 400\ \text{nm}$ při složení mobilní fáze $40/60\ (\text{v/v})$; $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$ a $F_m = 0,8\ \text{mL/min}$, $t_R = 13,7\ \text{min}$.

Z obr. 7 je patrné, že UV spektrum vykazuje dvě lokální maxima, nižší při $265\ \text{nm}$ a vyšší při $200\ \text{nm}$. Obdobným způsobem bylo proměřeno i UV spektrum M2 média, jehož záznam je na obr. 8. Zobrazené spektrum bylo snímáno ve $13,7$ minutě tj. v retenčním čase BE2.



Obrázek 8. Průběh UV spektra M2 média proměřovaný v rozsahu 190 – 400 nm; při složení mobilní fáze ACN/H₂O 40/60 (v/v) a $F_m = 0,8$ mL/min.

Ve spektru (obr. 8) je patrné lokální maximum při vlnové délce 218 nm a prudký vzrůst absorbance od 210 ke 190 nm. Na obr. 9A je pro ilustraci ukázán chromatogram samotného média, zaznamenaný v čase 0 – 30 min s UV detekcí při 200 nm. Na obr. 9B je výřez z tohoto chromatogramu.



Obrázek 9A, B. Chromatogram samotného M2 média při složení mobilní fáze ACN/H₂O 40/60 (v/v) a $F_m = 0,8$ mL/min; (A) celkový chromatogram, (B) jeho výřez.

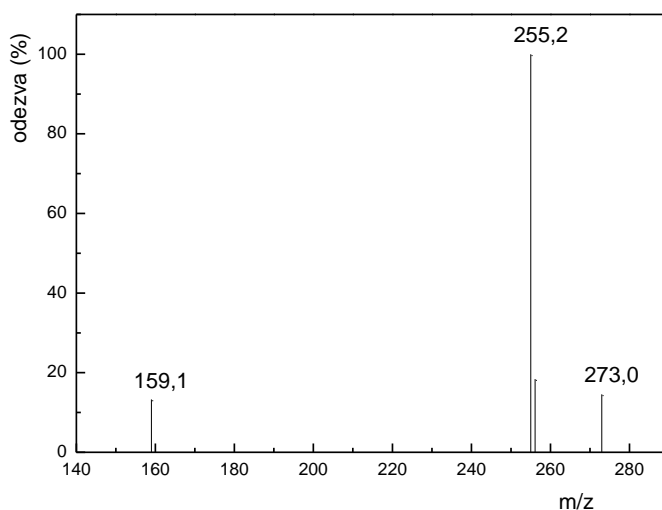
Z obr. 9B je patrné, že absorbance M2 média je při 200 nm v době retence BE2 (13,7 min) stále velmi vysoká a mnohonásobně převyšuje odezvu samotného analytu (obr. 7 vs. 9B). Pro zlepšení nepříznivého poměru signálu analyt/M2 médium byly vyzkoušeny i mobilní fáze s vyšším obsahem acetonitrilu (50 a 60 obj. %). Zvýšení obsahu acetonitrilu zrychlilo retenci analytu na 6,8 respektive 4,4 minuty, čímž došlo k zúžení píku a zvýšení jeho výšky. Nicméně při porovnání s chromatogramy získanými

pro samotné M2 médium v daných mobilních fázích bylo zjištěno, že signál samotného M2 média stále převyšuje signál analytu téměř o dva řády. Ani detekce při 265 nm (další lokální maximum BE2) nepřinesla uspokojivé výsledky. UV detekce 17 α -ethynylestradiolu vykazovala obdobný průběh jako pro 17 β -estradiol, avšak s ještě horším poměrem signálu analyt/M2 médium. Ze získaných výsledků je zřejmé, že UV detekci nelze pro tento účel použít. Proto byla jako druhý způsob detekce vyzkoušena tandemová hmotnostní detekce, která podstatně lépe eliminuje matriční vlivy.

4.2 Optimalizace MS-detekce

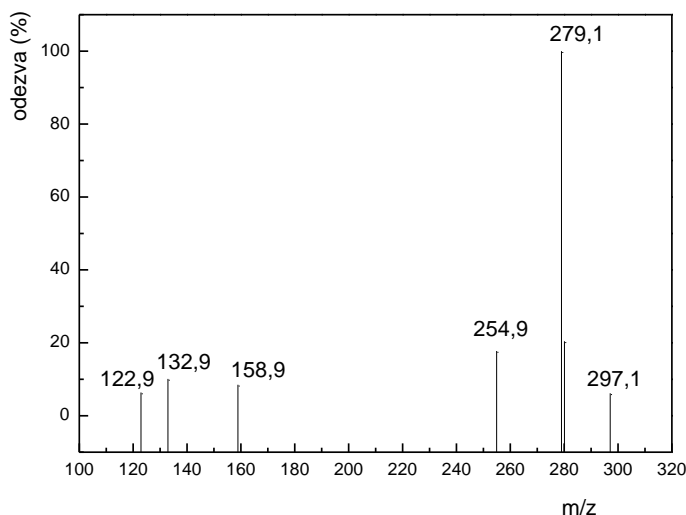
Detekce 17 β -estradiolu a 17 α -ethynylestradiolu byla prováděna pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie v režimu MRM („multiple reaction monitoring“ – sledování mnohonásobných reakcí). Jeho principem je sledování specifického přechodu prekurzorového a produktového iontu daného analytu. Pro každý analyt je třeba zjistit 4 hodnoty, a to: m/z prekurzorového a produktového iontu, napětí na fragmentoru a kolizní energii a následně optimalizovat parametry elektrospreje v závislosti na průtoku mobilní fáze tak, aby analyty poskytovaly maximální odezvu.

Jako první byly hledány prekurzorové a produktové ionty pro 17 β -estradiol a 17 α -ethynylestradiol. Bylo postupováno tak, že se pro daný analyt změnilo celkové hmotnostní spektrum v režimu „scan“ (sledování všech iontů ve vymezeném rozsahu m/z) kontinuálním externím pumpováním ethanolického roztoku příslušného hormonu o koncentraci 1 mg/L přímo do iontového zdroje. Hmotnostní spektrum pro BE2 je uvedeno na obr. 10. Z tohoto hmotnostního spektra je patrné, že nejintenzivnější signál byl získán pro hodnotu 255,2, která odpovídá odštěpení hydroxy skupiny ze struktury 17 β -estradiolu. Tato hodnota m/z odpovídá prekurzorovému iontu BE2.



Obrázek 10. Hmotnostní „scan“ spektrum pro 17β-estradiol.

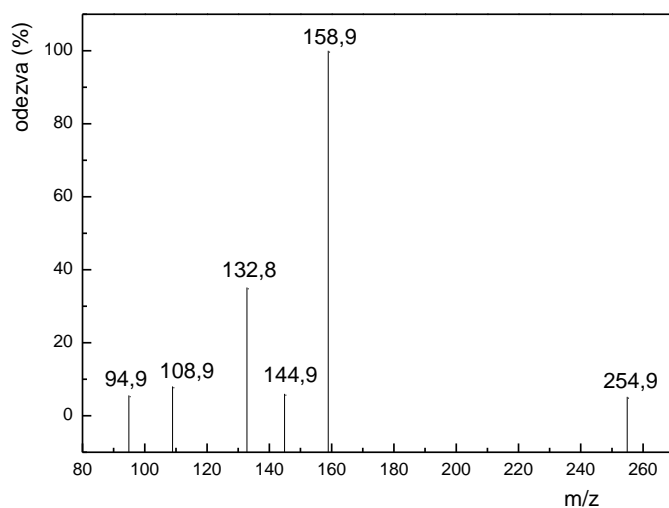
Při zjišťování m/z prekurzorového iontu u 17α-ethynylestradiolu bylo postupováno analogickým způsobem jako u 17β-estradiolu. Pro daný analyt se změřilo celkové hmotnostní spektrum v režimu „scan“. Hmotnostní spektrum pro EE2 ukazuje obr. 11. Z tohoto hmotnostního spektra je patrné, že nejintenzivnější signál byl získán pro hodnotu 279,1, která odpovídá odštěpení hydroxy skupiny ze struktury 17α-ethynylestradiolu. Tato hodnota m/z tedy odpovídá prekurzorovému iontu EE2.



Obrázek 11. Hmotnostní „scan“ spektrum pro 17α -ethynylestradiol.

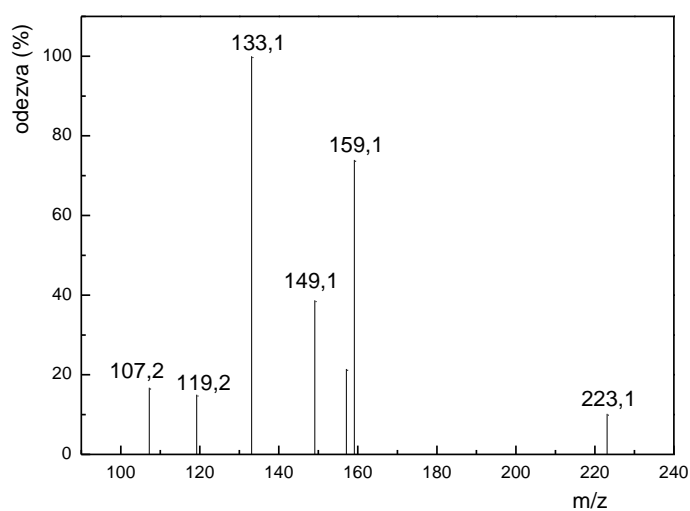
Následně bylo testováno při jakém napětí fragmentoru dosahuje prekurzorový ion nejvyšší intenzity. To bylo prováděno v režimu SIM („selected ion monitoring“ – sledování vybraného iontu), kdy byla nastavena fixní sledovaná hodnota m/z prekurzorového iontu pro každý analyt a měnilo se napětí fragmentoru.

Po nalezení optimálního napětí fragmentoru byl v režimu PI („product ion“) hledán produktový ion. Nejprve se nastavila příslušná hodnota m/z prekurzorového iontu. Pouze ionty s touto hodnotou m/z prošly prvním kvadrupólem a byly následně štěpeny v kolizní cele. Ionty vzniklé v kolizní cele byly snímány druhým kvadrupólem a tímto způsobem bylo získáno hmotnostní spektrum vzniklé z prekurzorového iontu. Z tohoto spektra byl vybrán nejintenzivnější signál, který odpovídal hodnotě m/z produktového iontu. Rozštěpením prekurzorového iontu s m/z 255,2 bylo získáno hmotnostní spektrum uvedené na obr. 12. Nejintenzivnější signál získaný pro hodnotu 158,9 je hledaný produktový ion pro BE2.



Obrázek 12. Spektrum vzniklé rozštěpením prekurzorového iontu o $m/z = 255,2$ 17β -estradiolu.

Na obr. 13 je hmotnostní spektrum vzniklé rozštěpením prekurzorového iontu o m/z 279,1. V tomto spektru je nejintenzivnější signál pro m/z 133,1, který tedy odpovídá produktovému iontu pro EE2.



Obrázek 13. Spektrum vzniklé rozštěpením prekurzorového iontu o $m/z = 279,1$ 17α -ethynylestradiolu.

Tímto postupem byl nalezen prekurzorový a produktový ion pro BE2 a EE2 a optimální hodnota napětí fragmentoru. Následně byl v režimu MRM nastaven specifický přechod pro daný analyt a zjištěné optimální napětí fragmentoru. Poté byla měněna hodnota kolizní energie a bylo sledováno, při jaké hodnotě bude intenzita odezvy signálu maximální. Takto byly získány pro každý analyt specifické přechody s optimální hodnotou napětí fragmentoru a kolizní energie. Jejich souhrn uvádí tabulka 2.

Tabulka 2. Souhrn optimalizovaných hodnot pro sledování 17 β -estradiolu a 17 α -ethynylestradiolu tandemovou hmotnostní detekcí v MRM režimu.

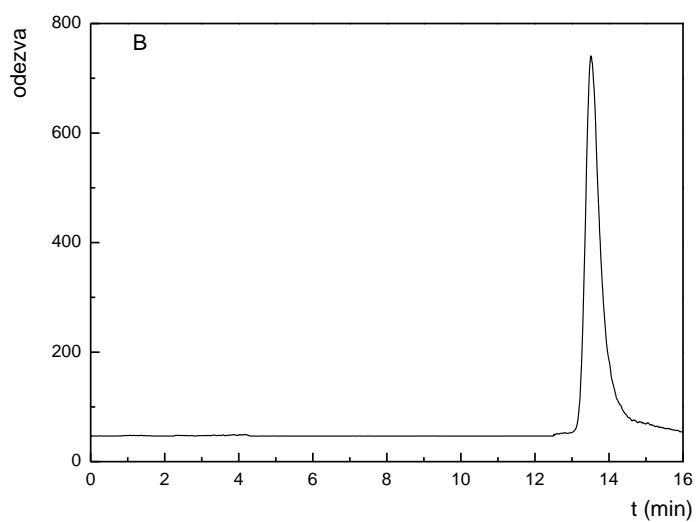
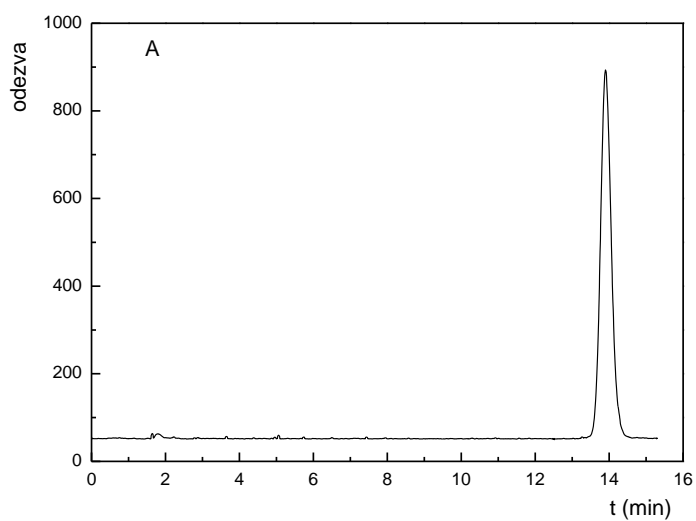
analyt	prekurzorový ion	produktový ion	fragmentor (V)	kolizní energie (V)
BE2	255,2	158,9	120	14
EE2	279,1	133,1	100	12

Následně byly optimalizovány tyto parametry elektrospreje: nastavení sušícího plynu (teplota a průtok), tlak nebulizačního plynu a napětí na kapiláře. Teplota sušícího plynu byla testována v rozmezí 150 – 350 °C, průtok sušícího plynu byl testován v rozmezí 4 – 12 L/min a tlak nebulizačního plynu v rozmezí 15 – 60 psi. Tato optimalizační měření již nebyla prováděna v módu přímého nástřiku analytů, ale po separaci jednotlivých analytů na koloně s využitím mobilní fáze o složení 40/60 (v/v) ACN/voda s přidávkem mravenčí kyseliny (HCOOH) o koncentraci 0,1 % do obou složek mobilní fáze pro lepší ionizaci analytů v pozitivním módu. Souhrn optimalizovaných hodnot pro nastavení zdroje při použití ionizace elektrosprejem uvádí tabulka 3.

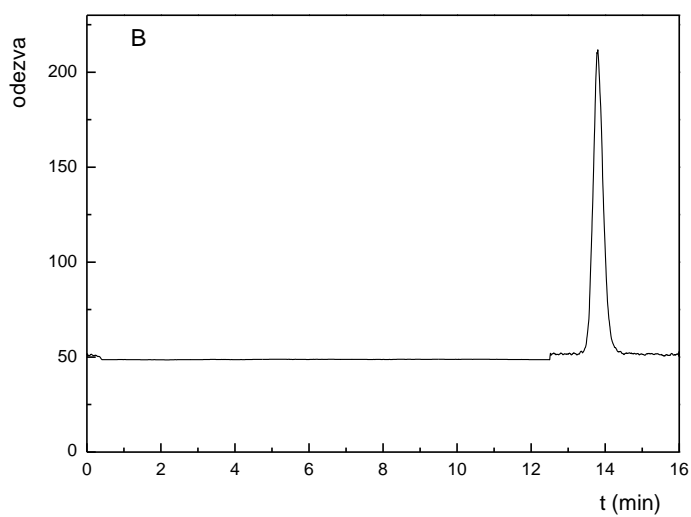
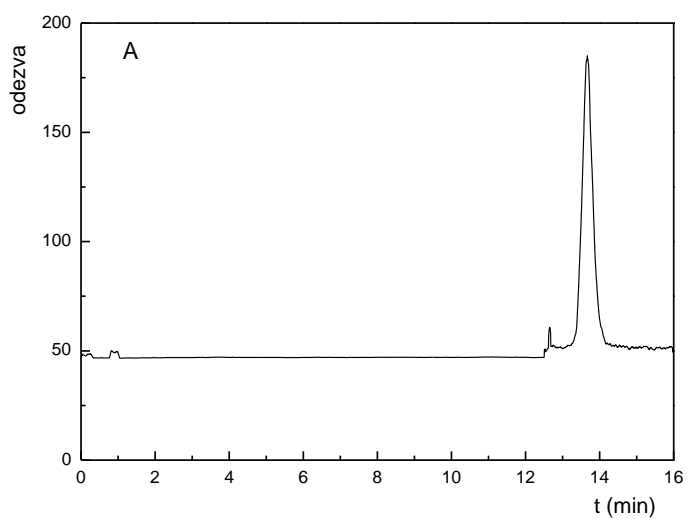
Tabulka 3. Souhrn optimalizovaných hodnot pro nastavení zdroje při použití ionizace s elektrosprejem.

parametr	optimální hodnota
průtok sušícího plynu	10 L/min
teplota sušícího plynu	350 °C
tlak nebulizačního plynu	60 psi
kapilární napětí	5500 V

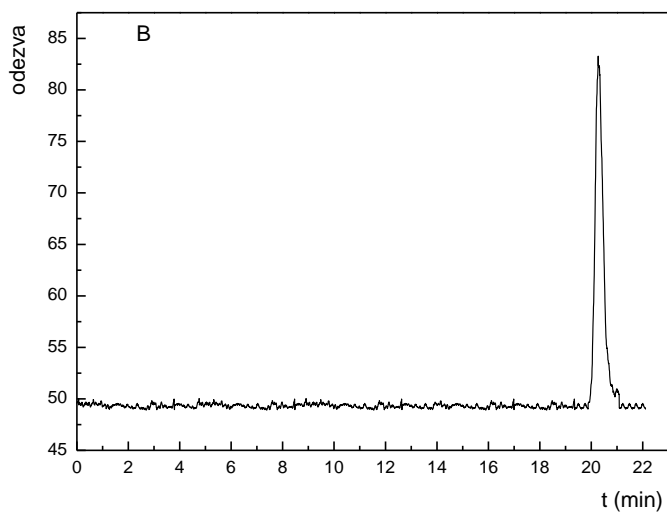
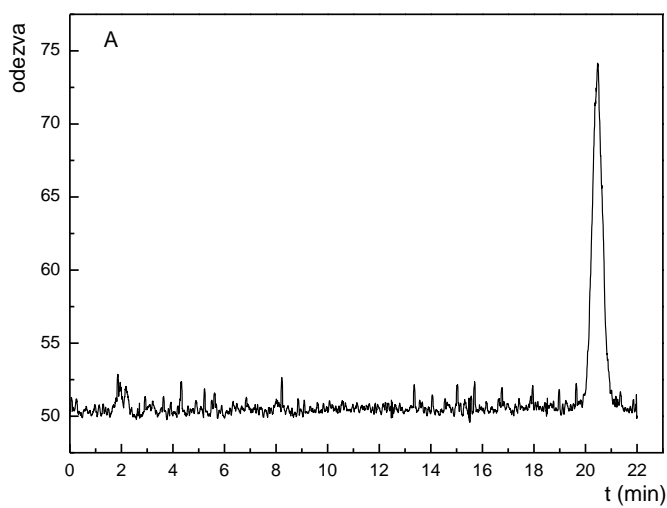
Na obrázcích 14A,B jsou uvedeny chromatogramy získané v optimalizovaných podmínkách MS/MS detekce pro 17β -estradiol o koncentraci $200\ \mu\text{g/L}$ (A) v ethanolu, (B) v M2 médiu. Na obr. 15A,B je zobrazeno totéž, ale pro koncentraci $20\ \mu\text{g/L}$. Z porovnání obr. 14A a B, respektive 15A a B je zřejmé, že přítomnost M2 média nemá na ionizaci a následnou detekci 17β -estradiolu žádný vliv, což je doloženo srovnatelnými plochami píků (A) získanými pro dané koncentrace v obou maticích. Obdobné výsledky byly získány i pro analýzu 17α -ethynylestradiolu v ethanolu a v M2 médiu o koncentraci 200 a $20\ \mu\text{g/L}$. Pro ilustraci je na obr. 16A,B uveden chromatogram $20\ \mu\text{g/L}$ roztoku 17α -ethynylestradiolu (A) v ethanolu, a (B) v M2 médiu. Hodnoty ploch píků jsou opět srovnatelné. Koncentrace 200 a $20\ \mu\text{g/L}$ obou hormonů byly vybrány s ohledem na zvolené počáteční testovací koncentrace jednotlivých hormonů v rámci biologického pokusu. Jak je vidět z obr. 17, píky vykazují dobrou symetrii, oba studované analyty elují v dostatečně rozdílných retenčních časech ($13,7$ min pro BE2 a $20,4$ min pro EE2) a lze je v případě potřeby (např. použití EE2 jako vnitřní standard) separovat a kvantifikovat v rámci jedné analýzy. Zobrazené chromatogramy dokládají, že hmotnostní detekce je vhodná pro analýzu 17β -estradiolu i 17α -ethynylestradiolu v M2 médiu.



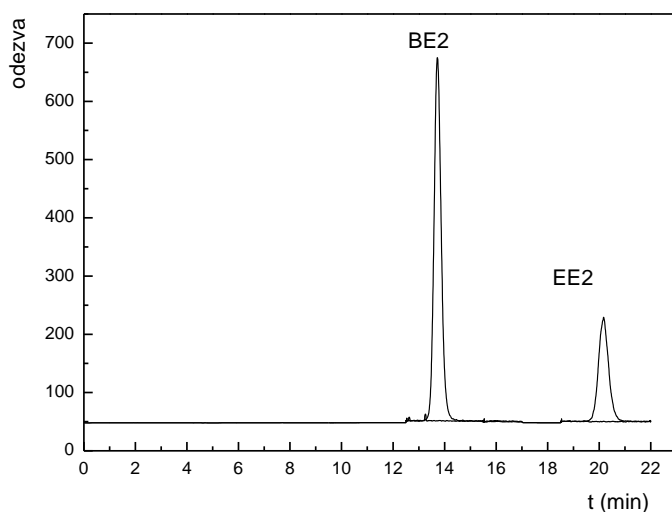
Obrázek 14A,B. Chromatogram BE2 o koncentraci 200 $\mu\text{g/L}$, (A) ethanolický roztok ($A = 18\ 733$), (B) roztok M2 média ($A = 18\ 649$); experimentální podmínky: 40/60 (v/v) ACN/H₂O, s přidavkem 0,1 % HCOOH, měřeno v MRM módu při přechodu 255,2→158,9.



Obrázek 15A,B. Chromatogram BE2 o koncentraci 20 $\mu\text{g/L}$, (A) ethanolický roztok ($A = 1\,723$), (B) roztok M2 média ($A = 1\,689$); experimentální podmínky: 40/60 (v/v) ACN/H₂O, s přidavkem 0,1 % HCOOH, měřeno v MRM módu při přechodu 255,2 \rightarrow 158,9.



Obrázek 16A,B. Chromatogram EE2 o koncentraci 20 $\mu\text{g/L}$ (A) ethanolický roztok ($A = 624$), (B) roztok M2 média ($A = 686$); experimentální podmínky: 40/60 (v/v), ACN/ H_2O , s přidavkem 0,1 % HCOOH , změřeno v MRM módu při přechodu 279,1 \rightarrow 133,1.



Obrázek 17. Chromatogram roztoku BE2 a EE2 v M2 médiu o koncentraci obou hormonů 200 $\mu\text{g/L}$, experimentální podmínky: 40/60 (v/v) ACN/ H_2O , s přidavkem 0,1 % HCOOH , změřeno v MRM módu při přechodu 255,2 \rightarrow 158,9 pro BE2 a 279,1 \rightarrow 133,1 pro EE2.

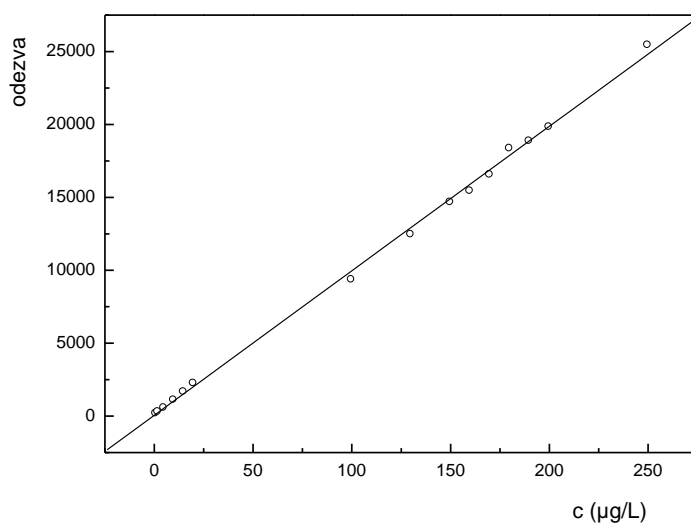
4.3 Kalibrační závislosti

V optimalizovaných separačních podmínkách (kolona SunFire® C_{18} , mobilní fáze: ACN/ H_2O , 40/60 (v/v), obě s 0,1 % HCOOH , $F_m = 0,8 \text{ mL/min}$ s tandemovou hmotnostní detekcí (detaily nastavení pro jednotlivé analyty viz tabulky 2 a 3 v kapitole 4.2)) byly proměřeny kalibrační závislosti ploch a výšek píků na koncentraci 17β -estradiolu a 17α -ethynylestradiolu v M2 médiu. Závislost pro BE2 byla proměřena v rozsahu koncentrací 1 – 250 $\mu\text{g/L}$, pro EE2 byl rozsah proměřených koncentrací 1 – 200 $\mu\text{g/L}$. Protože jako výchozí testovací koncentrace 17β -estradiolu pro biologický pokus byly vybrány 200 a 20 $\mu\text{g/L}$, byly kalibrační závislosti proměřeny v rozsahu 1 – 25 $\mu\text{g/L}$ a 100 – 250 $\mu\text{g/L}$ pro BE2 a 1 – 25 $\mu\text{g/L}$ a 100 – 200 $\mu\text{g/L}$ pro EE2. Na obr. 18 – 21 jsou uvedeny závislosti zpracované pro celkové koncentrační rozsahy. Pro oba analyty byly vyhodnocovány závislosti plochy i výšky píků na jednotlivých proměřovaných koncentracích, které byly zpracovány metodou lineární regrese. Tyto závislosti uvádí obr. 18, respektive obr. 19 pro BE2 v M2 médiu a obr. 20, respektive

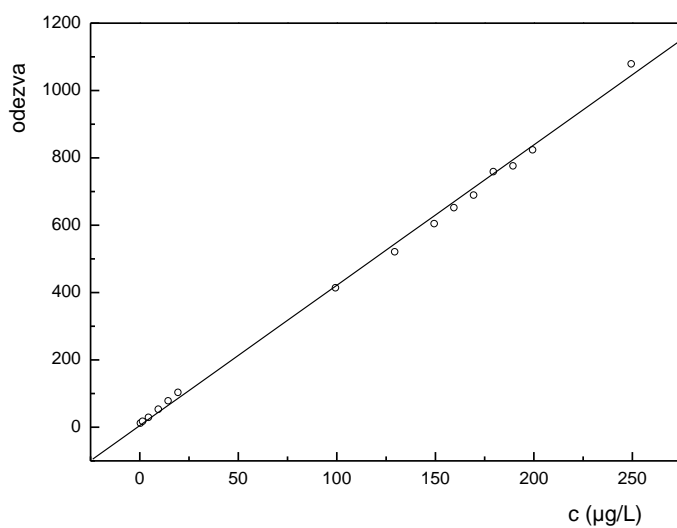
obr. 21 pro EE2 v M2 médiu. Parametry kalibračních křivek uvádí tabulka 4. Měření každé koncentrace bylo provedeno čtyřikrát.

Tabulka 4. Parametry kalibračních křivek a hodnoty LOD a LOQ; (standardní odchylky jsou uvedeny v závorkách); ¹ zpracované závislosti ploch píků na koncentraci analytu, ² zpracované závislosti výšek píků na koncentraci analytu.

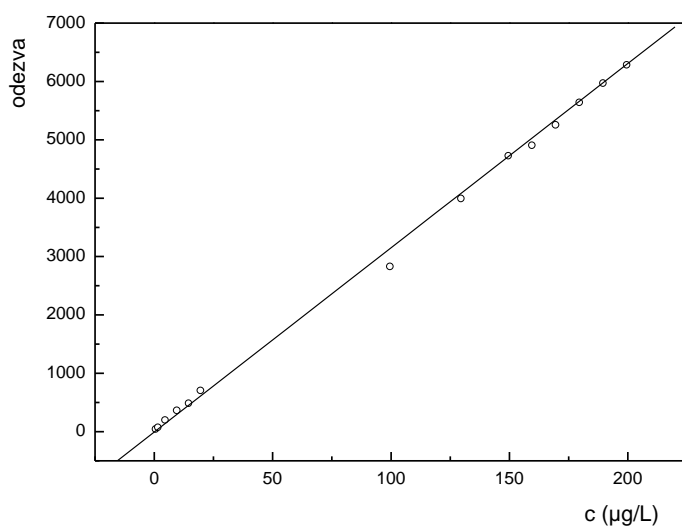
látka	směrnice (L·a.u.·s/μg)	úsek (a.u.·s)	korelační koeficient		
¹ BE2	99,13 (1,07)	- 18,66 (146,03)	0,9992		
¹ EE2	30,99 (0,33)	- 7,57 (40,42)	0,9993		
látka	směrnice (L·a.u./μg)	úsek (a.u.)	korelační koeficient	LOD (μg/L)	LOQ (μg/L)
² BE2	4,11 (0,05)	3,92 (7,10)	0,9989	0,3	1,1
² EE2	1,45 (0,01)	0,73 (1,46)	0,9996	0,5	1,6



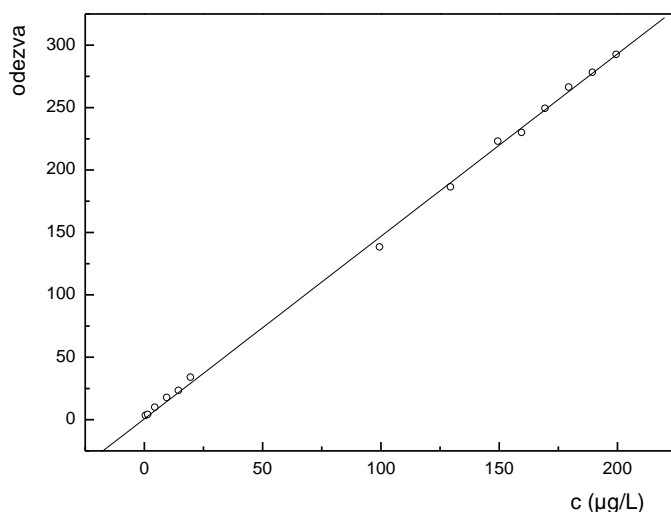
Obrázek 18. Závislost plochy píku BE2 na jeho koncentraci v M2 médiu (1-250 μg/L).



Obrázek 19. Závislost výšky píku BE2 na jeho koncentraci v M2 médiu (1-250 µg/L).



Obrázek 20. Závislost plochy píku EE2 na jeho koncentraci v M2 médiu (1-200 µg/L).



Obrázek 21. Závislost výšky píku EE2 na jeho koncentraci v M2 médiu (1-200 $\mu\text{g/L}$).

Při určení meze detekce a meze stanovitelnosti byl určen šum základní linie chromatogramu. Mez detekce a mez stanovitelnosti byly vypočítány z regresní rovnice pro závislost výšky píku na koncentraci jako trojnásobek, respektive desetinásobek šumu. Úsek byl statisticky testován t -testem na hladině významnosti $\alpha = 0,95$ a bylo zjištěno, že je statisticky významně odlišný od nuly. Pro BE2 byla hodnota LOD určena jako 0,3 $\mu\text{g/L}$ a hodnota LOQ jako 1,1 $\mu\text{g/L}$.

Při určování meze detekce a meze stanovitelnosti pro 17α -ethynylestradiol bylo postupováno obdobně jako v případě 17β -estradiolu. Hodnota LOD byla pro EE2 vypočtena jako 0,5 $\mu\text{g/L}$ a hodnota LOQ jako 1,6 $\mu\text{g/L}$.

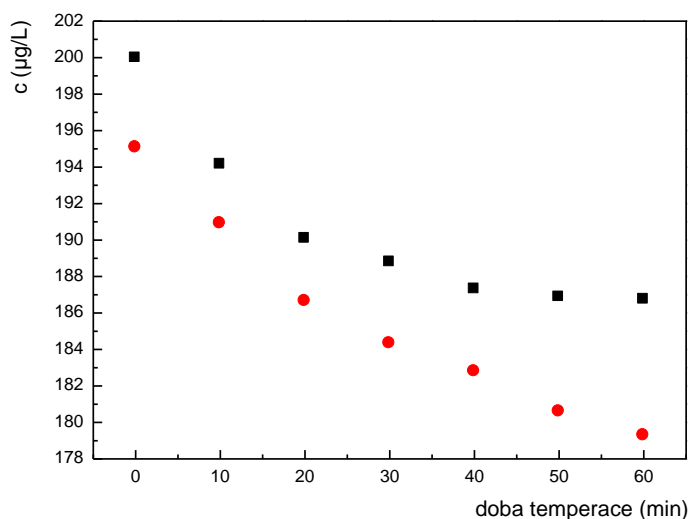
4.4 Biologický pokus s 17β -estradiolem

4.4.1 Vyvazování 17β -estradiolu hovězím sérovým albuminem

Jednou ze složek M2 média, je hovězí sérový albumin (BSA), na který se zejména při *in vitro* podmínkách (hodinová teplota na 37 °C, 5% CO_2) mohou vyvazovat estrogény. Z tohoto důvodu bylo nutné zjistit, jaká je volná koncentrace 17β -estradiolu v M2 médiu (nevázaná na BSA), dostupná pro interakci se spermii, tzn. před jejich přidáním k vytemperovanému roztoku M2 média s hormonem. Proto byly během

hodinové temperace média s hormonem (viz kap. 3.5) v časech 0, 10, 20, 30, 40, 50 a 60 min odebírány vzorky (objem 500 μL) a analyzovány vyvinutou HPLC-MS/MS metodou. M2 médium má deklarovanou stálost svého složení po dobu 3 týdnů od otevření při skladování v 5 $^{\circ}\text{C}$. Proto byl pokus proveden pro dvě různě dlouho otevřená M2 média, a to pro M2 médium 3 dny otevřené (viz obr. 22 řada znázorněná černými čtverečky) a M2 médium otevřené 1 měsíc (viz obr. 22 řada znázorněná červenými kolečky). Obrázek 22 zobrazuje průběh vyvazování 17β -estradiolu hovězím sérovým albuminem pro výchozí koncentraci BE2 v M2 médiu 200 $\mu\text{g/L}$. Obě řady v obrázku znázorňují průběh vyvazování 17β -estradiolu hovězím sérovým albuminem v souřadnicích koncentrace nevázaného (volného) analytu versus čas. Z průběhů je vidět, že v M2 médiu 3 dny otevřeném dochází k hlavnímu vyvazování v průběhu 0. až 30. minuty a od 40. minuty je koncentrace BE2 již téměř konstantní. V případě M2 média otevřeného 1 měsíc dochází k poklesu volné koncentrace BE2 prakticky až do 60. minuty.

Z kalibrační křivky pro závislost plochy píku na koncentraci 17β -estradiolu (obr. 18) byla určena koncentrace volného 17β -estradiolu v čase 60 min., tzn. těsně před přidáním spermií. Pro 3 dny otevřené M2 médium byla určena jako 187 $\mu\text{g/L}$ a pro 1 měsíc otevřené M2 médium jako 179 $\mu\text{g/L}$. Dosažené výsledky ukázaly, že doba od otevření M2 média mírně ovlivňuje průběh a stupeň vyvázání BE2 hovězím sérovým albuminem během temperace M2 média a je tedy nutné, aby experimenty probíhaly za identických podmínek. Jako vhodnější se ukázalo být M2 médium 3 dny otevřené, které bylo používáno v následujících pokusech.



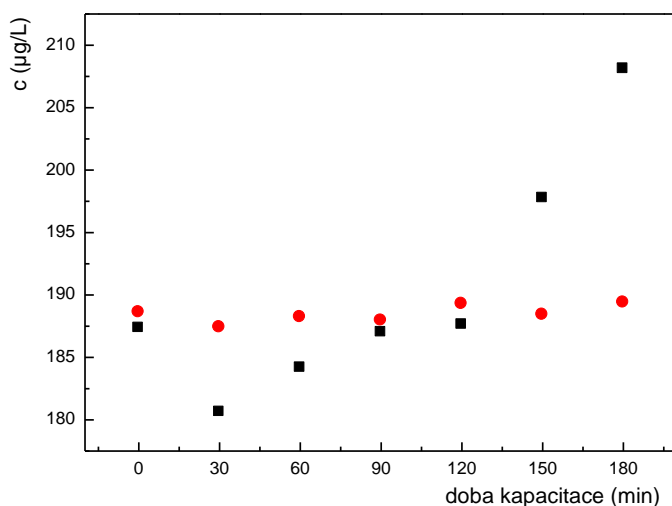
Obrázek 22. Závislost koncentrace nevázaného BE2 na době temperace roztoku M2 média a hormonu, 3 dny otevřené M2 médium (černé čtverečky), M2 médium otevřené 1 měsíc (červená kolečka), testovací koncentrace 17β -estradiolu $200 \mu\text{g/L}$; experimentální podmínky: 40/60 (v/v) ACN/ H_2O , s přidavkem 0,1 % HCOOH ; změřeno v MRM módu při přechodu $255,2 \rightarrow 158,9$.

4.4.2 Sledování volné koncentrace 17β -estradiolu během kapacitace

V optimalizovaných podmínkách byla pro 2 výchozí testovací koncentrace 17β -estradiolu (200 a $20 \mu\text{g/L}$) v kapacitačním M2 médiu prováděna měření závislosti volné koncentrace hormonu na době kapacitace myších spermií. Kapacitace byla sledována v časovém rozsahu 0 – 180 min v intervalu 0, 30, 60, 90, 120, 150 a 180 min. Delší čas nemá z fyziologického hlediska význam, neboť kapacitace u myších spermií je již v 90 až maximálně ve 180 minutách dokončena.

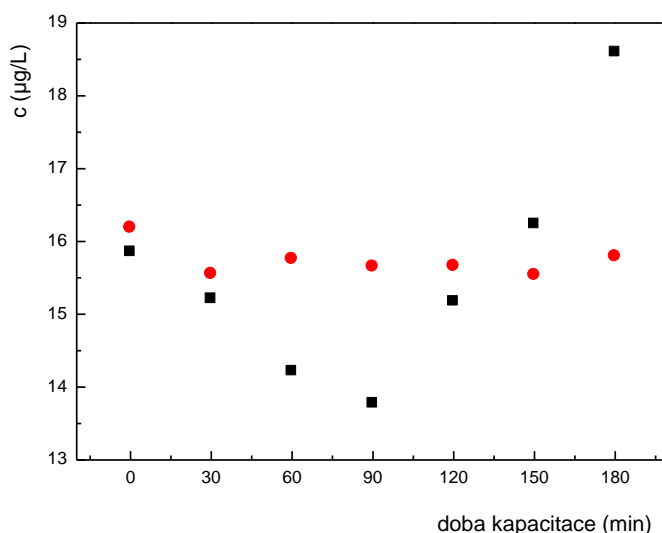
Při každém pokusu byly paralelně připravovány a následně měřeny dvě sady vzorků: jedna sada s přítomností spermií ve vytemperovaném M2 médiu, obsahujícím příslušnou testovací koncentraci 17β -estradiolu a druhá sada bez přítomnosti spermií, tzn. sada slepých vzorků (blanků). Sada slepých vzorků byla připravována stejným experimentálním postupem jako vzorky obsahující spermie (tj. stejnou pipetáží atd.) a byla vystavena identickým podmínkám časově závislé inkubace. Tyto slepé vzorky sloužily k tomu, aby mohly být eliminovány případné chyby, vzniklé při vlastní

přípravě vzorků jako jsou například nepřesnosti v pipetování analytu (1 μL ethanolického zásobního roztoku hormonu do 999 μL M2 média), možné částečné odpaření vzorků během inkubace (nedostatečné převrstvení vzorku parafínovým olejem), chyby vzniklé při odběru supernatantu aj. (viz postup popsáný v kapitole 3.5). Pro kontrolu vlastního HPLC měření byly k biologickým vzorkům zařazeny i kontrolní vzorky, obsahující 500 μL média o příslušné testovací koncentraci BE2 (200 nebo 20 $\mu\text{g/L}$). Tyto vzorky byly připraveny těsně před HPLC měřením bez hodinové temperace v inkubátoru. Všechny vzorky byly poté změřeny za optimalizovaných podmínek vyvinuté HPLC-MS/MS metody. Pro obě testovací koncentrace byl pokus opakován 6 \times . Reprezentativní průběh závislosti koncentrace nevázaného 17 β -estradiolu na době kapacitace je pro testovací koncentraci 200 $\mu\text{g/L}$ uveden na obr. 23 a pro koncentraci 20 $\mu\text{g/L}$ na obr. 24. Červená kolečka odpovídají slepým vzorkům (blanky), černé čtverečky vlastním vzorkům, tedy vzorkům, kde byly během kapacitace přítomny spermie. Jak je vidět na obr. 23 pro černé čtverečky, docházelo nejprve k poklesu koncentrace. Doba poklesu se v rámci jednotlivých pokusů lišila, ale vždy nastávala mezi 0. a 60. minutou kapacitace. To je v souladu s fyziologickým chováním spermií, při kterém ke kapacitaci dochází mezi 30. a 90. minutou po vystavení spermií prostředí v samičím pohlavním traktu. Pokles byl způsoben pravděpodobně vyvázáním hormonu na povrch spermie. Po prvotním poklesu docházelo následně ke zvýšení koncentrace hormonu na hladinu shodnou s výchozí koncentrací pokusu. Tento vzrůst koncentrace byl způsoben nejspíš uvolněním vyvázaného BE2 z povrchu spermie zpět do kapacitačního M2 média. S delší dobou kapacitace docházelo ke zvyšování koncentrace nad výchozí hodnotu koncentrace BE2 a dokonce i nad hodnotu, odpovídající situaci, kdy by se estrogen na médium vůbec nevázal (viz obr. 22, čas $t = 0$). To naznačuje, že původ vzestupu koncentrace nevázaného 17 β -estradiolu by mohl být z vlastní produkce spermie. Z obr. 23 je také vidět, že koncentrace 17 β -estradiolu ve slepých vzorcích je prakticky konstantní (červená kolečka).



Obrázek 23. Závislost volné koncentrace BE2 na době kapacity myších spermií, testovací koncentraci 200 µg/L v M2 médiu, vlastní vzorky (černé čtverečky), blanky (červená kolečka); experimentální podmínky: 40/60 (v/v) ACN/H₂O, s přidavkem 0,1 % HCOOH; změřeno v MRM módu při přechodu 255,2→158,9.

Jak je vidět z porovnání obr. 23 a 24, obdobné trendy byly získány i pro koncentraci 20 µg/L. Na obr. 24 je vidět, že nejprve opět docházelo k poklesu koncentrace, doba poklesu koncentrace se lišila, nastávala později, mezi 30. až 90. minutou kapacity. Tento fakt bude nejspíš způsoben nižší dostupnou koncentrací hormonu pro spermie, a proto může trvat déle, než jej naváží na svůj povrch. Po prvotním poklesu opět docházelo ke zvýšení koncentrace hormonu na hladinu shodnou s výchozí koncentrací pokusu a růst pokračoval až nad tuto výchozí hodnotu. Hodnoty koncentrace změřené v blankách i zde zůstávaly během kapacity prakticky stejné.



Obrázek 24. Závislost volné koncentrace BE2 na době kapacitace myších spermií pro výchozí koncentraci 20 µg/L v M2 médiu, vlastní vzorky (černé čtverečky), blanky (červená kolečka); experimentální podmínky: 40/60 (v/v) ACN/H₂O, s přidavkem 0,1 % HCOOH; změřeno v MRM módu při přechodu 255,2→158,9.

Z výsledků biologického pokusu vyplývá, že spermie během kapacitace *in vitro* váží externě dodaný 17β-estradiol a v pozdější době kapacitace jej opět uvolňují, a to i nad vstupní hodnotu. S delší dobou kapacitace by mohlo docházet k uvolňování předem navázaného BE2 z období maturace spermií v nadvarletí, nebo přímo k syntéze BE2 spermií pomocí specifické aromatasy. Tento jev pravděpodobně nezávisí na hodnotě externí koncentrace 17β-estradiolu.

Výsledky získané v rámci této diplomové práce částečně korespondují s již dříve dosaženými daty pro estriol. Při sledování nevázané koncentrace estriolu v kapacitačním M2 médiu během kapacitace myších spermií *in vitro* byl také pozorován pokles volné koncentrace estriolu. V tomto případě mohla být použita UV detekce [80], ale pouze pro testovací koncentraci 200 µg/L. Doba kapacitace však byla sledována pouze v rozsahu 0 až 90 min a byl pozorován pouze pokles koncentrace estriolu okolo 10 %. Vzhledem k tomu, že pokusy s BE2 byly časově náročné, nebyl již čas změřit vyvazování 17α-ethynylestradiolu hovězím sérovým albuminem a závislosti jeho volné koncentrace na době kapacitace. Výchozí koncentrace 200 a 20 µg/L pro 17α-ethynylestradiol budou testovány v budoucnu spolu s dalším studiem kinetiky celého procesu.

5 ZÁVĚR

Pro analýzu 17 β -estradiolu a 17 α -ethynylestradiolu metodou HPLC byl vybrán separační systém tvořený kolonou SunFire® C₁₈, a mobilní fází o složení ACN/H₂O, 40/60 (v/v) a průtokovou rychlostí mobilní fáze 0,8 mL/min. Bylo zjištěno, že pro stanovení 17 β -estradiolu a 17 α -ethynylestradiolu v kapacitačním M2 médiu nelze použít UV detekci, protože signál poskytovaný M2 médiem mnohonásobně převyšoval signály analytů.

Proto byla zvolena tandemová hmotnostní detekce, která lépe eliminuje matriční vlivy a je podstatně citlivější. Pro oba analyty byly nalezeny prekurzorové i produktové ionty a byla optimalizována hodnota napětí fragmentoru a kolizní energie. Následně byly optimalizovány hodnoty pro nastavení zdroje při použití ionizace elektrosprejem v pozitivním módu s využitím mobilní fáze 40/60 (v/v) ACN/H₂O, s přidavkem 0,1 % HCOOH.

V optimalizovaných podmínkách pro hmotnostní detekci byly změřeny vzorky 17 β -estradiolu a 17 α -ethynylestradiolu v EtOH i v M2 médiu o koncentracích 200 a 20 μ g/L a bylo zjištěno, že plochy získané pro jednotlivé koncentrace jsou v obou maticích srovnatelné a přítomnost média neovlivňuje ionizaci analytů. Proto byly v M2 médiu proměřeny kalibrační křivky pro 17 β -estradiol v koncentračním rozsahu 1 – 25 μ g/L a 100 – 250 μ g/L a pro 17 α -ethynylestradiol v kalibračním rozsahu 1 – 25 μ g/L a 100 – 200 μ g/L. Pro oba analyty byly vyhodnoceny závislosti ploch i výšek piků na koncentraci, které byly zpracovány metodou lineární regrese a byly určeny meze detekce a kvantifikace, které se pohybovaly v desetínách, respektive jednotkách μ g/L.

V rámci biologického pokusu bylo nejprve sledováno vyvazování 17 β -estradiolu hovězím sérovým albuminem, přítomným v M2 médiu, během hodinové temperace. Bylo zjištěno, že pro 3 dny otevřené médium již od 40. min k vyvazování nedochází, zatímco u M2 média, otevřeného jeden měsíc byl pokles volné koncentrace 17 β -estradiolu patrný až do 60. min. Závislost volné koncentrace BE2 na době kapacitace byla sledována pro dvě koncentrační hladiny hormonu, a to 200 a 20 μ g/L a pro obě testované koncentrační hladiny hormonu byly pozorovány obdobné trendy. Nejprve docházelo k poklesu koncentrace volného hormonu mezi 0. a 90. minutou kapacitace, což odpovídá fyziologickému průběhu kapacitace *in vivo*. Poté následoval růst koncentrace na úroveň výchozí hladiny, který pokračoval až nad výchozí hodnotu

koncentrace hormonu. Příčiny těchto změn jsou pravděpodobně spojeny s vyvázáním určitého množství estrogenního hormonu na povrch spermií pomocí specifických receptorů a následným uvolněním hormonu do kapacitačního média.

6 POUŽITÁ LITERATURA

1. López de Alda M. J., Barceló D.: Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by liquid chromatography-diode array detection–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 892 (2000), 391-406.
2. Wu T., Wang W. Y., Jiang L. M., Chu Q. C., Delaire J., Ye J. N.: Determination of natural and synthetic endocrine-disrupting chemicals (EDCs) in sewage based on SPE and MEKC with amperometric detection. *Chromatographia* 68 (2008), 339-344.
3. Della Seta D., Farabollini F., Dessì-Fulgheri F., Fusani L.: Environmental-like exposure to low levels of estrogen affects sexual behavior and physiology of female rats. *Endocrinology* 149 (2008), 5592-5598.
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 (2001), 307-315.
5. Kumar V., Majumdar C., Roy P.: Effects of endocrine disrupting chemicals from leather industry effluents on male reproductive system. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 111 (2008), 208-216.
6. Fisch H., Hyun G., Golden R.: Environmental risk sciences, Washington D.C., USA. The possible effects of environmental estrogens disrupters on reproductive health. *Current Urology Reports* 1. (2000), 253-261.
7. Wagner M., Oehlmann J.: Endocrine disruptors in bottled mineral water: total estrogenic burden and migration from plastic bottles. *Environmental Science and Pollution Research* 16 (2009), 278-286.
8. Reinen J., Vriese E., Glatt H., Vermuelen N.P.E.: Development and validation of a fluorescence HPLC-based screening assay for inhibition of human estrogen sulfotransferase. *Analytical Biochemistry* 357 (2006), 85-92.
9. Forman D., Moller H.: Testicular cancer. *Cancer Surveys* 19/20 (1994), 323-341.
10. Jensen T.K., Toppari J., Keiding N., Skakkebaek N.E.: Do environmental estrogens contribute to the decline in male reproductive health. *Clinical Chemistry* 41 (1995), 1896-1901.

11. Whitehead E.D., Leiter E.: Genital abnormalities and abnormal semen analyses in male-patients exposed to diethylstilbestrol in utero. *Journal of Urology* 125 (1981), 47-50.
12. Pěkníková J., Kyselová V., Buckiová D., Boubelik M.: Effect of an Endocrine Disruptor on Mammalian Fertility. Application of Monoclonal Antibodies against Sperm Proteins as Markers for Testing Sperm Damage. *American Journal of Reproductive Immunology*, 47 (2002), 311-318, Konference Opatija, Croatia, 2-6.07.2001.
13. Pěkníková J.: Vliv endokrinních disruptorů na fertilitu savců. *Urologické Listy* 5 (2007), 6-10.
14. Dvořáková-Hortová K., Šandera M., Jursová M., Vašinová J., Pěkníková J.: The influence of fluorides on mouse sperm capacitation. *Animal Reproduction Science* 108 (2008), 157-170.
15. Tan E., Lu T., Pang K.S.: Futile cycling of estrone sulfate and estrone in the recirculating perfused rat liver preparation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 297 (2001), 423-436.
16. Paleček, J.; Hampl, F.: *Farmakochemie*, VŠCHT, Praha (1997).
17. Zuehlke S., Duennbier U., Heberer T.: Determination of estrogenic steroids in surface water and wastewater by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science* 28 (2005), 52-58.
18. Matějčík D.; Kubáň V.: High performance liquid chromatography/ion-trap mass spectrometry for separation and simultaneous determination of ethynylestradiol, gestodene, levonorgestrel, cyproterone acetate and desogestrel. *Analytica Chimica Acta* 588 (2007), 304-315.
19. Ganong, W. F. : *Review of Medical Physiology*, 20th edition, McGraw – Hill Companies (2001).
20. 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 (2003), 99-104.
21. Lüllmann, H.; Mohr, K.; Wehling, M.: *Farmakologie a toxikologie*; Grada publishing spol. s.r.o. Praha (2004).

22. Zdravotnictví České republiky 2007 ve statistických údajích; 2007/2008: Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR.
23. Suzuki Y., Matuyama T.: Fate of natural estrogens in batch mixing experiments using municipal sewage and activated sludge. *Water Research* 40 (2006), 1061-1069.
24. Farre M., Kuster M., Brix R., Rubio F., Lopez de Alda M., Barcelo D.: Comparative study of an estradiol enzyme-linked immunosorbent assay kit, liquid chromatography-tandem mass spectrometry, and ultra performance liquid chromatography-quadrupole time of flight mass spectrometry for part-per-trillion analysis of estrogens in water samples. *Journal of Chromatography A* 1160 (2007), 166-175.
25. Pacáková V.; Loukotková L.; Bosáková Z.; Štulík K.: Analysis for estrogens as environmental pollutants – a review. *Journal of Separation Science* 32 (2009), 867-882.
26. Bosáková Z.; Coufal P.; Jelínek I.; Pacáková V.; Ševčík J. G.; Štulík K.: *Analytické separační metody*, Karolinum, Praha (2004).
27. Soliman M. A., Pedersen J. A., Suffet I. H.: Rapid gas chromatography–mass spectrometry screening method for human pharmaceuticals, hormones, antioxidants and plasticizers in water. *Journal of Chromatography. A*, 1029 (2004), 223-227.
28. Hájková K., Pulkrabová J., Schůrek J., Hajšlová J., Poustka J, Nápravníková M., Kocourek V.: Novel approaches to the analysis of steroid estrogens in river sediments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387 (2007), 1351-1363.
29. Peng X., Wang Y., Yang C., Chen F., Mai B.: Simultaneous determination of endocrine-disrupting phenols and steroid estrogens in sediment by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1116 (2006), 51-56.
30. Carpinteiro J., Quintana J. B., Rodriguez I., Carro A. M., Lorenzo R. A., Cela R.: Applicability of solid-phase microextraction followed by on-fiber silylation for the determination of estrogens in water samples by gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1056 (2004), 179-185.
31. Huang C. H., Sedlak D. L.: Analysis of estrogenic hormones in municipal wastewater effluent and surface water using enzyme-linked immunosorbent assay and gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20 (2001), 133-139.
32. Penalver A., Pocurull E., Borull F., Marce M.R.: Method based on solid-phase microextraction-high-performance liquid chromatography with UV and electrochemical

detection to determine estrogenic compounds in water samples. *Journal of Chromatography A* 964 (2002), 153-160.

33. Mitani, K.; Fujioka, M.; Kataoka, H.: Fully automated analysis of estrogens in environmental waters by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1081 (2005), 218-224.

34. Hsu J.F., Chang Y.C., Chen T.H., Lin L.C., Liao P.C.: Evaluation of electrospray ionization and atmospheric pressure chemical ionization for simultaneous detection of estrone and its metabolites using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical Life Sciences* 860 (2007), 49-56.

35. Watabe Y., Kubo T., Nishikawa T., Fujita T., Hosoy K.: Fully automated liquid chromatography-mass spectrometry determination of 17 β -estradiol in river water. *Journal of Chromatography A* 1120 (2006), 252-259.

36. Hu J., Zhang H, Chang H.: Improved method for analyzing estrogens in water by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1070 (2005), 221-224.

37. Rodriguez-Mozaz S., López de Alda M. J., Barcelo D.: Picogram per liter level determination of estrogens in natural waters and waterworks by a fully automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry method. *Analytical Chemistry* 76 (2004), 6998-7006.

38. López de Alda M. J., Barcelo D.: Review of analytical methods for the determination of estrogens and progestogens in waste waters. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 371 (2001), 437-447.

39. Díaz-Cruz M. S., López de Alda M. J., López R., Barcelo D.: Determination of estrogens and progestogens by mass spectrometric techniques (GC/MS, LC/MS and LC/MS/MS). *Journal of Mass Spectrometry* 38 (2003), 917-923.

40. Ferguson P.L., Iden C.R., McElroy A.E, Brownawell B.J., Determination of steroid estrogens in wastewater by immunoaffinity extraction coupled with HPLC-Electrospray-MS. *Analytical Chemistry* 73 (2001), 3890-3895.

41. Nakamura S., Sian T.H., Daishima S.: Determination of estrogens in river water by gas chromatography-negative-ion chemical-ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 919 (2001), 275-282.

42. Morteani G., Möller P., Fuganti A., Paces T.: Input and fate of anthropogenic estrogens and gadolinium in surface water and sewage plants in the hydrological basin of Prague (Czech Republic). *Environmental Geochemistry and Health* 28 (2006), 257-264.
43. Moore, K. L.; Persaud, T. V. N.; *The Developing Human*, (2000) nakladatelství ISV.
44. Yoshida M.; Kawano N.; Yoshida K.: Control of sperm motility and fertility: Diverse factors and common mechanisms. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65 (2008), 3446-3457.
45. University of Manitoba, Winnipeg Canada, Lab reviews (Gametogenesis and development): http://umanitoba.ca/Biology/lab14/biolab14_2.html [cit. 23. 3. 2011].
46. WHO Manual on basic semen analysis (2002): The Nordic Association for Andrology (NAFA) and European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) – Special Interest Group of Andrology (SIGA).
47. Holstein A.F., Schulze W., Davidoff M.: Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1(2003), 107.
48. Holstein A.F., Schulze W., Breucker H.: Histopathology of human testicular and epididymal tissue. *Male infertility*, London, Berlin, Heidelberg, New York: Springer (1994), 105-148.
49. Nieschlag E., Behre H.M.: *Andrology. In Male Reproductive Health and Dysfunction*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer(2001).
50. Centrum reprodukční medicíny a preimplantační diagnostiky- komplexní diagnostika neplodnosti- vyšetření spermioqramu- morfologie spermií: http://www.repromeda.cz/data/Morfologie_spermii.gif [cit. 8.5.2011].
51. Abou-haila A.; Tulsiani D. R. P.: Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 485 (2009), 72-81.
52. Austin C.R.: Capacitation and the release of hyaluronidase. *Journal of Reproduction and Fertility* 1 (1960), 310-311.

53. Chang M.C.: Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 168 (4277) (1951), 697-8.
54. Austin C.R.: Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Australian Journal of Scientific Research* (B) 4(4) (1951), 581-96.
55. Naz R.K., Rajesh P.B.: Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation/acrosome reaction. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2 (2004), 75.
56. Martinez, P., Morros, A.: Membrane lipid dynamics during human sperm capacitation. *Frontiers in Bioscience* 1 (1996), 103-117.
57. Bedford J.M., Cross N.L.: Sperm capacitation. *Encyclopedia of Reproduction* (1999) Academic Press, 597-602.
58. Cross, N.L.: Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biology of Reproduction* 59 (1998),7-11.
59. Davis B.K.: Timing of fertilization in mammals: sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 78 (1981), 7560-7564.
60. Go K.J., Wolf D.P.: Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. *Biology of Reproduction* 32 (1985), 145-153.
61. Espinosa F., Lopez-Gonzales I., Munoz-Garay C., Felix R., De la Vega-Beltran J.L., Kopf G.S., Visconti P.E., Darszon A.: Dual regulation of the T-type Ca(2+) current by serum albumin and beta-estradiol in mammalian spermatogenic cells. *Federation of the Societies of Biochemistry and Molecular Biology (FEBS) Letters* 475 (2000), 251-526.
62. Brooks D.E.: Epididymal functions and their hormonal regulation. *Australian Journal of Biological Sciences* 36 (1983), 205-221.
63. Setchell B.P., Maddocks S., Brooks D.E.: Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the male reproductive tract. *The Physiology of Reproduction*, New York: Raven Press (1994), 1063-1175.

64. Yanagimachi R.: Mammalian fertilization. *The Physiology of Reproduction*, New York: Raven Press (1994), 189-317.
65. 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 Na⁺/HCO₃ cotransporter in mouse sperm capacitation. *Journal of Biological Chemistry* 278 (2003), 7001-7009.
66. 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 (2001) 261-274.
67. Mahony M.C., Gwathmey T.Y.: Protein tyrosine phosphorylation during hyperactivated motility of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) spermatozoa. *Biology of Reproduction* 60 (1999), 1239-1243.
68. Nassar A., Mahony M., Morshedi M., Lin M.H., Srisombut C., Oehninger S.: Modulation of sperm tail protein tyrosine phosphorylation by pentoxifylline and its correlation with hyperactivated motility. *Fertility and Sterility* 71 (1999), 919-923.
69. Breitbart H., Spungin B.: The biochemistry of the acrosome reaction. *Molecular Human Reproduction* 3 (1997), 195-202.
70. Gross J. H.: *Mass Spectrometry a Textbook*, (2004) Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
71. Web Agilent Technologies: Product and Services – LC/MS – Ion Source Technology:<http://www.chem.agilent.com/en-US/Products/Instruments/ms/lc-ms/ionsources/Pages/technology.aspx> [cit. 13.10.2010].
72. Lawson G.; Todd J.F.J.: Radiofrequency Quadrupole Mass Spectrometers. *Chemistry in Britain* 8 (1972), 373-380.
73. Dawson P.H: *Quarupole Mass Spectrometry and Its Applications*, 1st ed. Elsevier, New York, 1976.
74. Dawson P.H.: Quadrupole Mass Analyzers: Performance, Design and Some Recent Applications, *Mass Spectrometry Reviews* 5 (1986), 1-37.

75. Huang Y.; Guan S.; Kim H.S; Marshall A.G.: Ion Transport Through a Strong Magnetic Field Gradient By Radio Frequency-Only Octupole Ion Guides, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 152 (1996),121-133.

76. Thomson B.A.: 1997 McBryde Medal award Lecture Radio Frequency Quadrupole Ion Guides in Modern Mass Spectrometry. *Canadian Journal of Chemistry* 76 (1998), 499-505.

77. University of Heidelberg, Mass Spectrometry Facility Institute of Organic Chemistry, Little Encyclopedia:

<http://www.rzuser.uni-heidelberg.de/~bl5/ency/triplequadms.html> [cit 22.10.2010].

78. Kozlík P.; *Diplomová práce oboru Klinická a toxikologická analýza; Stanovení estrogenních polutantů v reálné vodné matrici metodou HPLC-UV po extrakci na tuhé fázi*; Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, Praha 2010.

79. Kopřivová H.; *Bakalářská práce oboru Klinická a toxikologická analýza; Analýza ethynylestradiolu metodou HPLC*; Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, Praha 2009.

80. Dvořáková-Hortová K.; Honetschlägerová M.; Tesařová E.; Vašinová J.; Frolíková M.; Bosáková Z.: Residual concentration of estriol during mouse sperm capacitation *in vitro* determined by HPLC method. *Folia Zoologica*, 58 (2009), 75-81.

81. Kozlík P., Bosáková Z., Tesařová E., Coufal P., Čabala 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 (2011), 2127-2132.

82. Vašinová J.: *Diplomová práce: Vliv ekotoxikologických faktorů na spermatogenezi, morfologii a funkci spermií savců*; Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra buněčné biologie, Praha 2008.