

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO – TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2012

Bc. Lenka Svobodová

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO – TECHNOLOGICKÁ
Katedra biologických a biochemických věd

**STANOVENÍ MALONDIALDEHYDU V SEMINÁLNÍ
PLAZMĚ METODOU KAPALINOVÉ CHROMATOGRFIE**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: Bc. Lenka Svobodová

VEDOUCÍ PRÁCE: Doc. Mgr. Roman Kand'ár, Ph.D.

2012

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
Department of Biological and Biochemical Sciences

**THE DETERMINATION OF SEMINAL PLASMA
MALONDIALDEHYDE BY LIQUID CHROMATOGRAPHY**

THESIS

AUTOR: Bc. Lenka Svobodová

SUPERVISOR: Doc. Mgr. Roman Kand'ár, Ph.D.

2012

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lenka Svobodová**
Osobní číslo: **C10912**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**
Název tématu: **Stanovení malondialdehydu v seminální plazmě metodou kapalinové chromatografie**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

- 1) Teoretická část:
 - a) Oxidační stres
 - b) Malondialdehyd jako ukazatel lipoperoxidaceMožnosti stanovení malondialdehydu v seminální plazmě
- 2) Praktická část:
 - a) Příprava a zpracování ejakulátu a seminální plazmy pro stanovení malondialdehydu metodou kapalinové chromatografie
 - b) Výběr pacientů pro posouzení vhodnosti použití malondialdehydu jako možného ukazatele oxidačního stresu a lipoperoxidace u lidských spermiíStatistické vyhodnocení

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce:

doc. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce:

Mgr. Xenie Štramová

Datum zadání diplomové práce:

3. října 2011

Termín odevzdání diplomové práce:

4. května 2012



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.

děkan

L.S.



doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

vedoucí katedry

V Pardubicích dne 23. února 2011

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 4. 5. 2012

Lenka Svobodová

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu práce doc. Mgr. Romanu Kandárovi, Ph.D. a Mgr. Xenii Štramové, za odborné vedení a pomoc v průběhu experimentu a za pomoc při zpracování naměřených výsledků.

Také bych chtěla poděkovat pacientům, kteří poskytli vzorky seminální plazmy, a všem zaměstnancům Centra asistované reprodukce Sanus Pardubice.

Dále bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za veškerou podporu během mého studia.

SOUHRN

Malondialdehyd (MDA) je jedním z konečných produktů peroxidace lipidů. Je to velmi toxická molekula. MDA reaguje především s lipidy, proteiny nebo DNA, a tím ovlivňuje fyziologické mechanismy v těle.

Plazmatické membrány spermií obsahují velké množství fosfolipidů. Jejich polyneenasycené mastné kyseliny (PUFA) snadno podléhají lipidové peroxidaci, proto se malondialdehyd používá jako diagnostický marker lipoperoxidace, tedy ukazatel oxidačního stresu.

Stanovovali jsme malondialdehyd v seminální plazmě vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií v systému obrácených fází s fluorescenční detekcí. Malondialdehyd byl derivatizován kyselinou thiobarbiturovou a následně separován na koloně LiChroCART® 125-4, Purospher STAR RP-18e, 5 μm . Mobilní fází byla směs 25 mmol/l KH_2PO_4 a ethanolu (80:20, v/v), upravená na pH 6,0.

Analytické parametry této metody byly následující: přesnost v sérii vyjádřená variačním koeficientem byla 4,0 %, správnost vyjádřená průměrnou výtěžností byla 99,0 % (CV 3,6 %). Kalibrační křivka byla lineární v celém rozsahu koncentrací použitých standardů malondialdehydu (0,00-0,25 $\mu\text{mol/l}$).

Hladina malondialdehydu se pohybovala u jednotlivých souborů pacientů v těchto rozmezích: všichni pacienti 0,82-2,22 $\mu\text{mol/l}$, kuřáci 0,91-2,22 $\mu\text{mol/l}$, nekuřáci 0,82-1,99 $\mu\text{mol/l}$.

SUMMARY

Malondialdehyde (MDA) is one of the final products of lipid peroxidation (LPO). This molecule is very toxic. MDA reacts with lipids, proteins or DNA and this way it affects physiological mechanisms in the organism.

Sperm plasma membranes contain large number of phospholipids. Phospholipids polyunsaturated fatty acids can be subject of lipid peroxidation. Malondialdehyde is used as a diagnostic marker of LPO and indicator of oxidative stress.

We have determined malondialdehyde in the seminal plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. Malondialdehyde was derivatized with thiobarbituric acid and MDA(TBA)₂ adduct was separated on column LiChroCART® 125-4, Purospher® STAR RP-18e, 5 µm. A mobile phase, 25 mmol/l KH₂PO₄ and ethanol (80:20, v/v), pH 6.0 was used.

Analytic parameters of this method were following: intra-assay was 4 %, recovery was ranged in 94.77 % – 103.16 %, average 99 % (CV 3.65 %). The calibration curve was linear in the whole range of concentrations (0.00-0.25 µmol/L).

SEZNAM ZKRATEK

AP-1	Aktivační protein-1
ATP	Adenosintrifosfát
ART	Asistovaná reprodukce
BHA	β -Hydroxyakrolein
DETBA	Diethylthiobarbiturová kyselina
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
G6PD	Glukosa-6-fosfát-dehydrogenasa
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPCE	Vysokoúčinná kapilární elektroforéza
4-HNE	4-Hydroxynonenal
LPO	Lipidová peroxidace, lipoperoxidace
LDL	Lipoprotein o nízké hustotě
MDA	Malondialdehyd
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát, redukovaná forma
NF- κ B	Nukleární faktor kappa B
OS	Oxidační stres
PUFA	Polynenasycené mastné kyseliny
ROS	Reaktivní formy kyslíku
RNS	Reaktivní formy dusíku
RONs	Reaktivní formy kyslíku a dusíku
SP	Seminální plazma
TBA	Thiobarbiturová kyselina
TEP	1,1,3,3 Tetraethoxypropan
TMP	1,1,3,3 Tetramethoxypropan
VR	Volné radikály

OBSAH

1 ÚVOD	14
2 TEORETICKÁ ČÁST	15
2.1 Volné radikály	15
2.1.1 Definice volných radikálů	15
2.1.2 Vznik volných radikálů	15
2.2 Reaktivní formy kyslíku a dusíku.....	16
2.2.1 Význam reaktivních forem kyslíku a dusíku.....	17
2.2.1.1 Význam reaktivních forem kyslíku a dusíku pro přenos energie	17
2.2.1.2 Reaktivní formy kyslíku a dusíku jako signální molekuly	17
2.2.1.3 Reaktivní formy kyslíku a dusíku jako účinná zbraň fagocytů proti bakteriím a cizím strukturám	18
2.3 Antioxidační ochranné mechanismy	19
2.4 Oxidační stres	20
2.4.1 Peroxidace lipidů	20
2.4.1.1 Neenzymová peroxidace lipidů	20
2.4.1.2 Enzymová peroxidace lipidů	22
2.5 Malondialdehyd	23
2.5.1 Vznik malondialdehydu.....	23
2.5.2 Odbourávání MDA	25
2.5.3 Toxicita MDA	25
2.6 Složení ejakulátu	27
2.6.1 Seminální plazma	27
2.6.2 Spermie.....	28
2.7 Vliv oxidačního stresu a lipoperoxidace na mužskou plodnost	29

2.7.1 Vliv na motilitu spermií.....	29
2.7.2 Poškození DNA indukované oxidačním stresem	30
2.7.3 Fyziologický vliv reaktivních forem kyslíku na spermie	30
2.8 Stanovení malondialdehydu	31
2.8.1 Spektrofotometrické stanovení	31
2.8.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	31
2.8.2.1 Derivatizace s 2-thiobarbiturovou kyselinou.....	32
2.8.2.2 Derivatizace s diethylthiobarbiturovou kyselinou.....	32
2.8.2.3 Derivatizace s 2,4-dinitrofenylhydrazinem	32
2.8.3 Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí.....	32
2.8.4 Elektromigrační metody	33
2.8.4.1 Vysokoúčinná kapilární elektroforéza.....	33
2.8.4.2 Kapilární zónová elektroforéza	33
2.8.4.3 Micelární elektrokinetická chromatografie	33
2.8.5 ELISA.....	33
3 CÍL PRÁCE	34
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	35
4.1 Charakteristika sledované populace	35
4.2 Vyšetření spermioqramu	36
4.2.1 Makroskopické vyšetření.....	36
4.2.2 Mikroskopické vyšetření	36
4.2.3 Referenční hodnoty.....	37
4.3 Stanovení malondialdehydu v seminální plazmě	39
4.3.1 Vzorky	39
4.3.2 Chemikálie.....	39
4.3.3 Pomůcky a přístroje.....	40

4.3.4 Příprava pracovních roztoků.....	41
4.3.5 Postup stanovení malondialdehydu v seminální plazmě vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií	42
4.3.5.1 Příprava vzorků	42
4.3.5.2 Chromatografická analýza.....	42
4.3.5.3 Kalibrace.....	43
4.3.5.4 Analytické parametry	43
4.3.5.5 Zpracování výsledků.....	45
5 VÝSLEDKY A DISKUZE	46
5.1 Chromatografická analýza.....	46
5.1.1 Příprava vzorku	46
5.1.2 HPLC analýza.....	47
5.1.3 Kalibrační křivka	47
5.1.4 Analytické parametry	48
5.2 Základní statistická analýza naměřených dat	51
5.3 Porovnání parametrů mezi kuřáky a nekuřáky	53
5.4 Distribuce hladiny malondialdehydu u jednotlivých souborů pacientů	54
6 ZÁVĚR.....	57
7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	58

PŘÍLOHY

1 ÚVOD

Reaktivní formy kyslíku mohou reagovat s dvojnými vazbami polynenasycených mastných kyselin. Tento proces se nazývá lipidová peroxidace. Primárními produkty jsou hydroperoxydy, které podléhají dalším chemickým reakcím za vzniku sekundárních produktů – hydroxyaldehydů.

Malondialdehyd je hlavním a jedním z nejvíce studovaných produktů lipidové peroxidace. Je to genotoxická a velmi reaktivní látka. Všechny potenciálně genotoxické vlastnosti MDA mohou vést k mutacím a následně k rakovině. MDA je schopen reagovat s molekulami jako je DNA nebo proteiny a tím ovlivnit fyziologické mechanismy v těle.

Lipoperoxydy a metabolity lipoperoxidace mohou poškozovat průběh spermatogeneze, což vede k poklesu počtu spermií (spojené s mužskou neplodností) a k poškození kvality spermatu, včetně abnormalit krčku, snížené pohyblivosti spermií, ztráty schopnosti spermií podstoupit akrozomovou reakci a oplodnění. Proto je nutné určit míru lipidové peroxidace v lidské seminální plazmě pro studii mužské patologické neplodnosti.

Malondialdehyd můžeme stanovit několika způsoby, nejčastěji se využívají spektrofotometrické a chromatografické metody, především pak vysokoúčinná kapalinová chromatografie a plynová chromatografie s hmotnostní detekcí. Dále se používají také metody elektromigrační.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Volné radikály

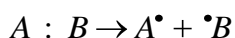
2.1.1 Definice volných radikálů

Jako volné radikály (VR) jsou označovány atomy, molekuly či ionty, které obsahují jeden nebo více nepárových elektronů ve svém atomovém nebo molekulovém orbitalu a jsou schopné samostatné existence (*Tremellen 2008; Racek a Holeček 1999*). Jsou to vysoce reaktivní částice, které mohou iniciovat řadu dalších reakcí, protože se snaží získat párový elektron odejmutím elektronu či jeho předáním jiným molekulám. Tyto molekuly se poté mění na další volný radikál a dochází tak k propagaci radikálové reakce. Pokud spolu reagují dva volné radikály, dojde ke spojení nepárových elektronů a k terminaci reakce. VR napadají různé biologické struktury, jako mastné kyseliny, lipidy, nukleové kyseliny, sacharidy, aminokyseliny a bílkoviny, enzymy, koenzymy i nízkomolekulární látky, což může vést k těžkému poškození tkání i celých orgánů (*Kand'ár a Žáková 2007; Racek a Holeček 1999; Štípek a kol. 2000; Chari a Colagar 2011*).

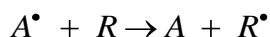
2.1.2 Vznik volných radikálů

Z chemického hlediska mohou radikály vznikat následujícími reakcemi:

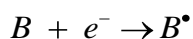
a) *homolyticky* - tj. štěpení kovalentní vazby, kdy každý fragment získá jeden nepárový elektron. K tomuto rozpadu je ovšem zapotřebí dostatek energie a vyvolat jej tedy může např. UV záření, ionizační záření, vysoká teplota, radiace apod.



b) *oxidací* - kdy normální molekula ztrácí elektron



c) *redukci* - kdy normální molekula přijímá elektron



2.2 Reaktivní formy kyslíku a dusíku

Reaktivní formy kyslíku a dusíku zahrnují volné radikály i látky neradikálové povahy, které vznikají dalšími přeměnami VR (Tab. 1). Souhrnně se nazývají reaktivní formy kyslíku (ROS) a reaktivní formy dusíku (RNS). Tyto látky mají značný fyziologický i patologický význam (Racek a Holeček 1999; Štípek a kol. 2000).

Tab. 1.: Reaktivní formy kyslíku (Halliwell a Gutteridge 2001).

Radikály	Neradikálové látky
Superoxid, $O_2^{\bullet-}$	Peroxid vodíku, H_2O_2
Hydroxylový radikál, HO^{\bullet}	Kyselina chlorná, $HOCl$
Peroxyl, RO_2^{\bullet}	Ozon, O_3
Alkoxyl, RO^{\bullet}	Singletový kyslík, 1O_2
Hydroperoxyl, HO_2^{\bullet}	Peroxynitrit, $ONOO^-$

Tab. 2.: Reaktivní formy dusíku (Halliwell a Gutteridge 2001)

Radikály	Neradikálové látky
Oxid dusnatý, NO^{\bullet}	Kyselina dusitá, HNO_2
Oxid dusičitý, NO_2^{\bullet}	Oxid dusitý, N_2O_3
	Oxid dusičitý, N_2O_4
	Nitronium, NO_2^+
	Peroxynitrit, $ONOO^-$
	Kyselina peroxydusitá, $ONOOH$
	Alkylperoxynitrit, $ROONO$
	Nitroxyl, NO^-
	Nitrosyl, NO^+
	Nitrylchlorid, NO_2Cl

2.2.1 Význam reaktivních forem kyslíku a dusíku

2.2.1.1 Význam reaktivních forem kyslíku a dusíku pro přenos energie

Radikálové reakce v organismech jsou životně důležitými pochody, protože ke správné funkci organismu je zapotřebí obrovské množství energie, která se získává přenosem elektronů, získaných ze živin, na kyslík. Reaktivní formy kyslíku a dusíku (RONS) se tedy účastní uvolňování a přeměny energie pomocí 4-elektronové redukce kyslíku. Tento děj probíhá pomocí enzymů. Příkladem je enzym cytochromoxidasa, který v dýchacím řetězci v mitochondriích předává elektrony přes koenzym Q a cytochrom c na molekulární kyslík. Kyslík se dále redukuje čtyřmi elektrony za vzniku dvou molekul vody a energie pro syntézu adenosintrifosfátu (ATP). V průběhu redukce vznikají jako meziprodukty ROS – peroxid vodíku a superoxid, které zůstávají vázány na enzym a tím nepoškozují okolní biomolekuly. Dalším enzymem je monooxygenasa, která se vyskytuje v endoplazmatickém retikulu jater nebo v mitochondriích nadledvinek. Kyslík je zde redukován třemi elektrony na hydroxylový radikál, který slouží k hydroxylaci řady endogenních a exogenních látek, včetně léků. Reaktivní meziprodukty kyslíku zůstávají také vázány na enzym (*Štípek a kol. 2000; Fang a kol. 2002*).

2.2.1.2 Reaktivní formy kyslíku a dusíku jako signální molekuly

Antioxidační ochranné systémy nikdy neodstraňují RONS zcela, ale udržují jejich hladiny v určitých mezích. Volné radikály a jejich metabolity totiž nalézají uplatnění v řadě signálních dějů. Některé buněčné kultury reagují na snížené hodnoty ROS zvýšenou proliferací a naopak vyšší hodnoty mají inhibiční až cytotoxický efekt. Redoxní změny také regulují aktivity některých transkripčních faktorů, například aktivačního proteinu-1 (AP-1) a nukleárního faktoru kappa B (NF- κ B).

Jako důležitý regulační mechanismus zřejmě působí také vzájemné interakce mezi ROS a RNS. Zatímco H_2O_2 aktivuje NF- κ B, NO^\bullet jej inhibuje. V cévním endotelu působí kyslíkové a dusíkové radikály také antagonisticky, $O_2^{\bullet-}$ způsobuje cévní vazokonstrikci, naopak pod vlivem NO^\bullet hladký sval relaxuje. Rovnováha $O_2^{\bullet-}/NO^\bullet$ je tedy pravděpodobně jedním z fyziologických mechanismů pro regulaci krevního tlaku (*Štípek a kol. 2000; Gutteridge a Halliwell 1994; Thannickal a kol 2000*).

2.2.1.3 Reaktivní formy kyslíku a dusíku jako účinná zbraň fagocytů proti bakteriím a cizím strukturám

Volné radikály kyslíku a dusíku iniciují řadu biochemických reakcí v organismu. Další jejich fyziologickou úlohou je například mikrobicidní účinek na fagocytované mikroby a cizí struktury a mají tedy vliv na imunitní odpověď a zánětlivou reakci.

Na plazmatické membráně neutrofilů a makrofágů se nachází enzym nikotinamidadenindinukleotidfosfát-oxidasa (NADPH-oxidasa), která obsahuje flavocytochrom b_{558} . Po pohlcení cizí částice dochází k tzv. respiračnímu vzplanutí. Aktivuje se NADPH-oxidasa, redukovaný NADPH slouží jako substrát pro přenos elektronů na kyslík za vzniku superoxidu a následně peroxidu vodíku. Kyselé prostředí ve fagosomu podporuje uvolnění iontů železa pro Fentonovu reakci a tvoří se hydroxylový radikál.

U polymorfonukleárů se ještě uplatňuje myeloperoxidasa, která katalyzuje tvorbu kyseliny chlorné z peroxidu vodíku a chloridového iontu. Kyselina chlorná má silný antibakteriální účinek *in vitro*.

2.3 Antioxidační ochranné mechanismy

Aerobní organismy využívají účinné antioxidační mechanismy, které za fyziologických podmínek postačují k inaktivaci volných radikálů. Jednou obranou je záchyt a odstranění již vytvořených VR (*Kand'ár a Žáková 2007*). Odstraňování volných radikálů v organismu probíhá několika způsoby:

- a) pomocí antioxidantů
- b) volné radikály jsou pevně zachyceny jinými molekulami a tak zneškodněny (quenching)
- c) při reakci 2 volných radikálů dojde ke sdílení elektronů a volné radikály zaniknou, např. $\text{NO}^\bullet + \text{OH}^\bullet \rightarrow \text{ONOO}^\bullet$, NADH reaguje 100krát rychleji s peroxynitritem než bílkoviny, tj. chrání je před nitrací
- d) volné radikály jsou vylučovány z těla (močí, stolicí, hnisem apod.) (*Holeček 2006*)

Nejběžnější obrana proti tvorbě nadměrného množství RONS je regulace aktivity enzymů, které je tvoří. Mezi enzymatické mechanismy řadíme cytochrom c, katalasu, glutathionperoxidasu, cytoplazmatickou a mitochondriální superoxiddismutasu a ceruloplasmin.

Další způsob antioxidační ochrany jsou obecné reparační mechanismy poškozených biomolekul, například degradace poškozených proteinů, oprava oxidačně poškozených bazí nebo apoptóza (*Kand'ár a Žáková 2007; Carbonneau a kol. 1991*).

2.4 Oxidační stres

Za fyziologických podmínek je v organismu ustálena oxidoredukční rovnováha, která je důležitá pro udržení homeostasy. Nadměrnou produkcí RONS nebo nedostatečnou funkcí antioxidačního systému (popř. kombinací obou faktorů) může dojít k porušení rovnováhy mezi vznikem a odstraňováním RONS. Tento jev se nazývá oxidační stres, který způsobuje oxidační poškození biomolekul, enzymových komplexů a buněčné signalizace. V důsledku tohoto poškození vzniká také řada onemocnění – ateroskleróza, diabetes mellitus, hepatitidy, Crohnova choroba, hypertenze, akutní pankreatitida a další. Důležitým projevem vystavení organismu oxidačnímu stresu je proces stárnutí. S rostoucím věkem roste také tvorba ROS, volných radikálů, kapacita antioxidačního ochranného systému klesá a dochází ke stále většímu ischemickému a toxickému poškození organismu (*Kand'ár a Žáková 2007; Fang a kol. 2002; Sies 1997*).

2.4.1 Peroxidace lipidů

Lipidová peroxidace (LPO) je kaskáda chemických reakcí. Je to proces oxidačního poškození polynenasycených mastných kyselin (PUFA) lipidů důsledkem nadměrné produkce reaktivních forem kyslíku. Primárně vznikají hydroperoxydy mastných kyselin, které jsou dalšími reakcemi přeměněny na sekundární produkty. Tyto metabolity bývají často velmi reaktivní a narušují strukturu biomolekul. Toxické jsou především některé aldehydy, malondialdehyd (MDA) a 4-hydroxynonenal (4-HNE).

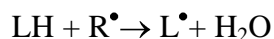
V biologických systémech může LPO probíhat buď neenzymovým mechanismem (autooxidace), nebo řízeným enzymovým mechanismem. Pod pojmem peroxidace lipidů je většinou myšlen neenzymový a nekontrolovaný proces přeměny lipidů.

LPO probíhá hlavně v biologických membránách a lipoproteinech. Zde jsou jako součásti fosfolipidů v největší koncentraci přítomny polynenasycené mastné kyseliny, které jsou hlavními substráty lipoperoxidace.

2.4.1.1 Neenzymová peroxidace lipidů

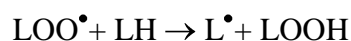
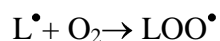
Stejně jako ostatní radikálové reakce i LPO zahrnuje tři fáze: iniciaci, propagaci a terminaci. Při iniciaci dochází k reakci, při které je molekula mastné kyseliny atakována volným reaktivním radikálem, tedy látkou s dostatečnou afinitou k elektronům. PUFA obsahují jednu nebo více methylenových skupin umístěných mezi *cis* dvojnými vazbami.

VR dokáže vytrhnout vodíkový atom z methylenové skupiny (-CH₂-) uhlovodíkového řetězce mastné kyseliny, a ta se tak stává uhlíkovým radikálem L[•]:



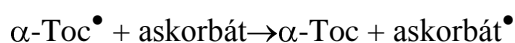
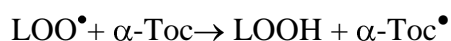
Největší význam se připisuje působení hydroxylového radikálu, iniciaci však v závislosti na podmínkách mohou vyvolat i radikály jiné, například alkoxylový, peroxylový nebo hydroperoxylový.

V uhlíkovém radikálu následně dochází k přeskupení dvojných vazeb za vzniku konjugovaného dienu. Tím začíná fáze propagace. Konjugovaný dien reaguje s molekulárním kyslíkem a mění se na peroxylový radikál (LOO[•]). Peroxylový radikál oxiduje další molekulu PUFA za vzniku nového radikálu této a sám se přemění na hydroperoxid mastné kyseliny, lipidový peroxid (LOOH). Celá reakce se řetězově šíří dál.

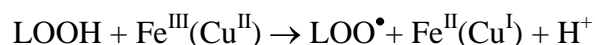
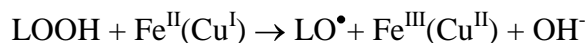


V této fázi může také dojít k cyklizaci dvou atomů kyslíku za vzniku cyklického endoperoxidu a následně malondialdehydu.

Radikálová reakce pokračuje, dokud se peroxylový radikál nesetká s jiným radikálem, nebo antioxidantem, např. vitamínem E (α -tokoferol) či ubichinolem (CoQH₂). Tím dojde k terminaci a řetězová reakce se ukončí. Vitamin E i ubichinol se oxidují na radikál, který je poté regenerován vitamínem C (askorbát).



Hydroperoxydy mastných kyselin, které vznikají v propagační fázi, jsou nestabilní především v přítomnosti iontů přechodných kovů a jsou štěpeny na alkoxylové a peroxylové radikály.



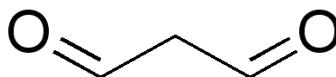
(Štípek a kol. 2000; Chari a Colagar 2011; Marnett a kol. 1999; Halliwell a Chirico 1993)

2.4.1.2 Enzymová peroxidace lipidů

V řadě buněk však probíhá i enzymová peroxidace lipidů. Tato reakce je fyziologická. Probíhá na aktivních centrech hydroperoxidas a endoperoxidas a vede k tvorbě biologicky aktivních produktů, důležitých pro regulaci buněčných pochodů (např. prostaglandiny a leukotrieny).

2.5 Malondialdehyd

Malondialdehyd je hlavní a nejvíce studovaný produkt peroxidace polyneenasycených mastných kyselin. Je to genotoxická a velmi reaktivní látka. Od roku 1960 bylo vyvinuto několik metod ke kvantifikaci MDA jako markeru oxidačního stresu (Kand'ár a Žáková 2007; Del Rio a kol. 2005). Jedná se o aldehyd, jehož sumární vzorec je $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$, při fyziologickém pH existuje především v enol-formě.

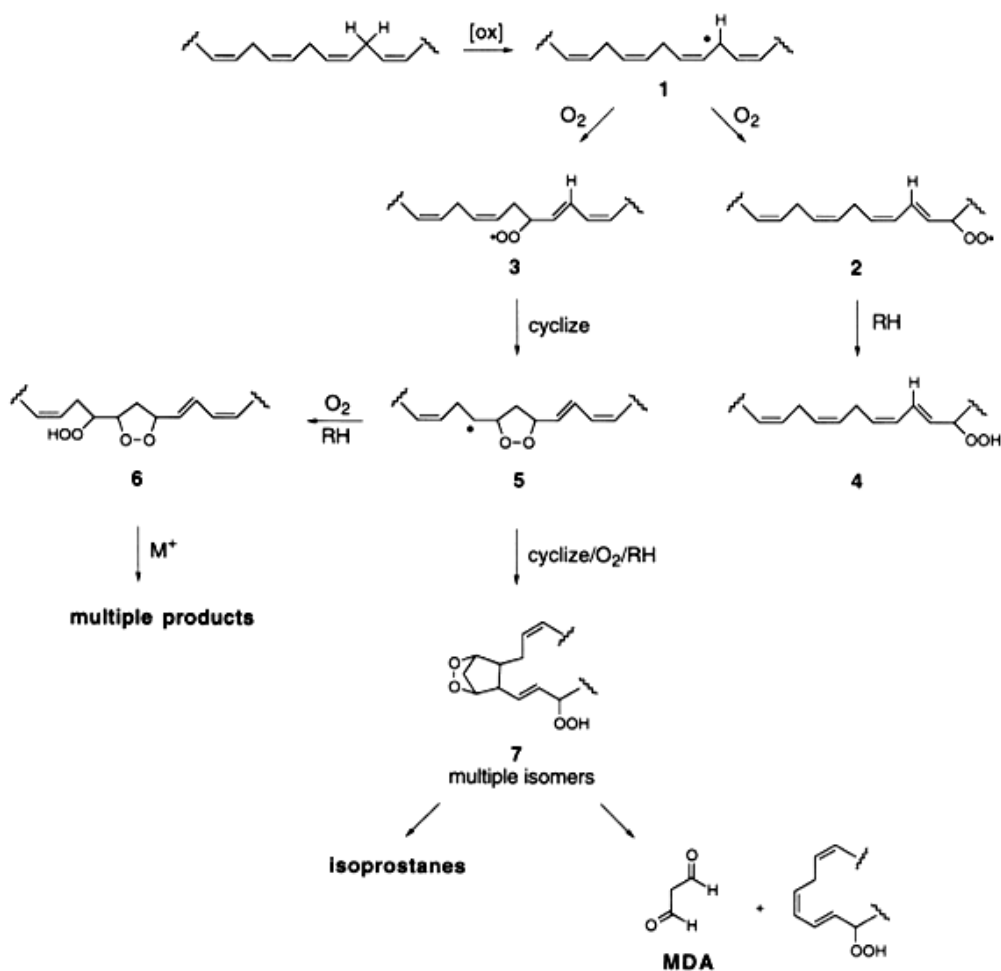


Obr. 1 Malondialdehyd

2.5.1 Vznik malondialdehydu

Hlavním zdrojem MDA v biologických vzorcích je peroxidace polyneenasycených mastných kyselin se dvěma nebo více dvojnými vazbami. Bylo navrženo několik hypotéz, které popisují vznik MDA *in vivo*.

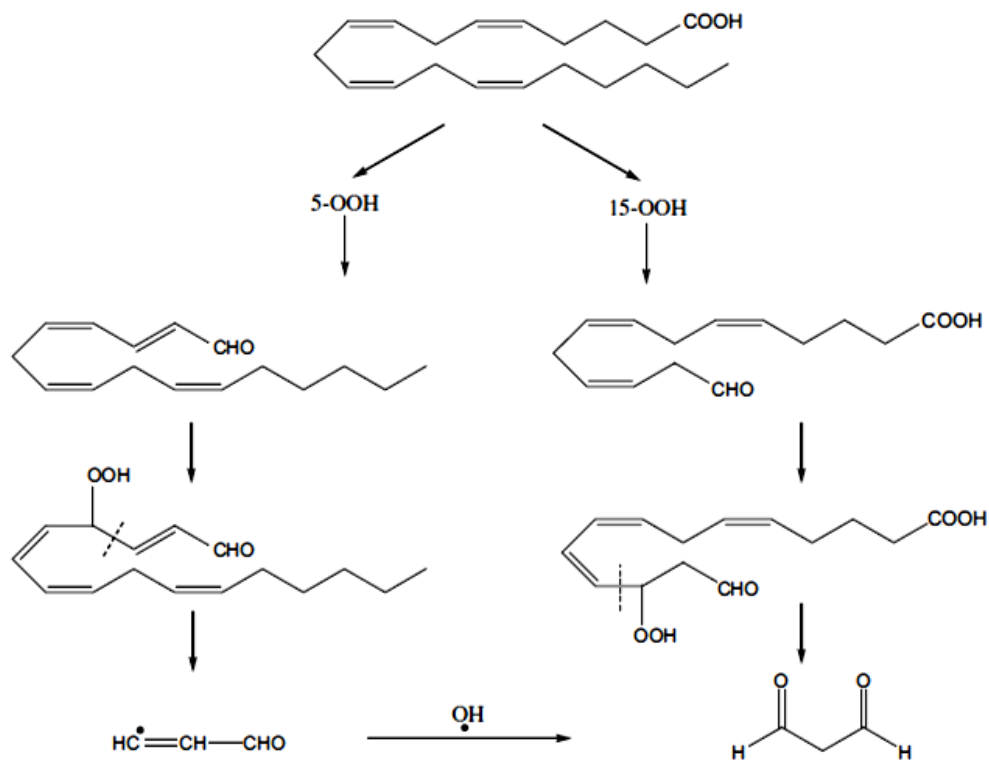
Podle Pryora a Stanleyho (1975) je malondialdehyd produktem rozkladu. Počátečním produktem oxidace PUFA je peroxylový radikál PUFA. Další osud tohoto radikálu závisí na jeho pozici v uhlíkatém řetězci mastné kyseliny. Pokud se nachází na jednom ze dvou konců systému dvojných vazeb, vzniká hydroperoxid mastné kyseliny. Jestliže se peroxylový radikál nachází uvnitř systému dvojných vazeb, konkuruje tvorbě hydroperoxidu cyklizace na sousední dvojnou vazbu, při které vzniká endoperoxid PUFA, tj. meziprodukt vedoucí k tvorbě MDA. Cyklizací vytvořená endoperoxylová skupina sousedí s radikálovým uhlíkem. Tento radikál může reagovat s O_2 za tvorby peroxylového radikálu mastné kyseliny. Ten je následně buď redukován na hydroperoxid, nebo podstupuje sekundární cyklizaci za vzniku nestabilní bicyklické sloučeniny. Z ní se po reakci s O_2 a následné redukci vytváří bicyklický endoperoxylový hydroperoxid mastné kyseliny, který má prostaglandin G-kruhový systém. Při jeho degradaci vzniká MDA (Obr. 2). Frankel a Neff (1983) provedli studii, která tuto hypotézu potvrdila (Del Rio a kol. 2005; Lykkesfeldt 2007; Marnett 1999).



Obr. 2 Vznik MDA (Marnett L. J. 1999)

V prvním kroku lipoperoxidace vzniká peroxylový radikál PUFA (1), pokud peroxylový radikál existuje na jednom ze dvou konců dvojné vazby (2), vznikne hydroperoxid (4), jestliže se nachází uvnitř systému dvojných vazeb (3), podstupuje sekundární cyklizaci za vzniku nestabilní bicycké sloučeniny (5). Z ní opět vzniká hydroperoxid (6), nebo se oxidací a následnou redukcí vytváří bicycký endoperoxylový hydroperoxid mastné kyseliny (7), který má prostaglandin G-kruhový systém. Při jeho degradaci vzniká MDA.

Esterbauer a kol. (1991) předložili další hypotézu, která je založená na postupných hydroperoxidových formacích a β -štěpení řetězce polynenasycených mastných kyselin, vzniká 3-hydroperoxylaldehyd. MDA se pak tvoří buď jeho přímým rozštěpením, nebo reakcí mezi akroleinovým a hydroxylovým radikálem (Del Rio a kol. 2005; Lykkesfeldt 2007).



Obr. 3 Mechanismus vzniku MDA (Del Rio D. a kol. 2005)

MDA také vzniká enzymatickými procesy z různých prostaglandinů. Hecker a Ulrich (1989) popsali biosyntézu tromboxanu A₂, která vede ke vzniku malondialdehydu a 12(S)-hydroxy-8, 10 (E, E) – heptadekadienové kyseliny (HHT) jako dalších produktů (Del Rio a kol. 2005).

2.5.2 Odbourávání MDA

MDA je metabolizován v játrech na semialdehyd malonové kyseliny. Ten je nestabilní a spontánně se rozkládá na acetaldehyd, který je pak převeden aldehyddehydrogenasou na acetát, eventuálně vzniká acetyl-CoA.

2.5.3 Toxicita MDA

Pod fyziologickou hodnotou (pH < 7,4), existuje malondialdehyd ve formě enolátového aniontu. Tato málo reaktivní forma reaguje s lysinem za tvorby Schiffových bazí a hraje hlavní roli v modifikaci lipoproteinů o nízké hustotě (LDL) a jejich následném rozpoznávání makrofágy (Del Rio a kol. 2005).

Při více kyselém pH ($\text{pH} < 4$), převládá forma β -hydroxyakroleinu (BHA). BHA je velmi reaktivní a reaguje s řadou biologicky významných nukleofilů.

MDA se váže na volné aminoskupiny proteinů. Důsledkem toho se proteiny agregují, sítují a stávají se citlivější k proteolytické degradaci. Dochází ke změně fluidity membrán, zvyšuje se propustnost pro ionty, mění se membránový potenciál a dochází k lýzi buněk.

MDA také velmi často reaguje s DNA (adeninem, produkt je označován zkratkou M1A, cytosinem, M1C, a guaninem, M1G). Tyto sloučeniny mají antigenní účinky, protilátky proti nim jsou přítomny v organismu a mohou evokovat aterosklerózu. (*Del Rio a kol. 2005, Marnett 1999*).

Všechny tyto potenciálně genotoxické vlastnosti MDA mohou vést k mutacím a následně k rakovině. MDA je schopen reagovat s molekulami jako je DNA nebo proteiny a tím ovlivnit fyziologické mechanismy v těle (*Del Rio a kol. 2005*).

2.6 Složení ejakulátu

Ejakulát obsahuje vlastní gamety, spermie a seminální plazmu. Je to nehomogenní tekutina, která má tři složky:

1. Prostatická složka je tvořena sekrety prostaty, je řídká a má mléčný vzhled. Obsahuje kyselou fosfatasu a fibrinolysin.
2. Další složka obsahuje velké množství normálních spermií a je objemově největší.
3. Poslední složka je tvořena hlavně výměšky semenných váčků a je rosolovitá. Obsahuje fruktosu, prostaglandiny, kyselinu askorbovou, globuliny, glykoproteiny a převážně nefunkční a abnormální formy spermií (*Malínský a kol. 2004; Owen a Katz 2005*).

2.6.1 Seminální plazma

Seminální plazma (SP) je tekutina, ve které se pohybují spermie. Je to jejich přirozené prostředí a může svými vlastnostmi a složením ovlivnit oplodňovací schopnosti spermií.

Seminální plazma obsahuje výměšky stočených kanálků, nadvarlete, semenných váčků, prostaty a přídatných žláz. Její látkové složení je velmi podobné složení krevní plazmy – obsahuje bílkoviny, lipidy a sacharidy. Oproti krevní plazmě obsahuje více fruktosy a méně glukosy. Spermie využívají fruktosu jako hlavní zdroj energie.

Prostatická složka SP obsahuje antioxidantní látky, vápník, hořčík, zinek, a tím chrání spermie před toxickým poškozením. Prostata je také zdrojem kyselých fosfatasy, kyseliny citronové a inositolu (*Malínský a kol. 2004; Ulčová-Gallová 2006*).

Fibrinogen ze semenných váčků, koagulační enzymy z prostatických žlázek a fibrinolysin jsou odpovědné za vytvoření koagula a částečnou imobilizaci spermií po ejakulaci. Mimo vlastní organismus se ejakulát za 15 až 20 minut, díky působení fibrinolyzinu, zkapalňuje.

Seminální plazma je lehce zásaditá (pH = 7,5). Po ejakulaci spermie spotřebovávají fruktosu, produkují kyselinu mléčnou, a tím může pH po delší době stání klesat (*Owen a Katz 2005*).

2.6.2 Spermie

Spermie je specializovaná buňka, která slouží k přenosu genetické informace při oplození. Skládá se z hlavičky, středního oddílu, který je tvořený krčkem a spojovacím oddílem, a bičíku, který se skládá z hlavní a terminální části.

Hlavička mužské spermie má oválný tvar a je oploštělá. Uvnitř má jádro se silně kondenzovaným chromatinem. Na povrchu je cytoplasmatická membrána a pod ní se nachází akrosom, vakovitý útvar, který nasedá na oploštělou část jádra. Akrosom obsahuje velké množství lytických enzymů, které pomáhají spermii proniknout do vajíčka během oplození. Při basální části hlavičky je postakrosomální pochva. Ohraničení hlavičky proti krčku tvoří basální ploténka (*Malínský a kol. 2004*).

Hlavní součástí krčku je proximální centriol, kolem kterého je uloženo 9 příčně žíhaných provazců, označovaných jako segmentované chordy krčku. Na hranici se spojovacím oddílem je distální centriol, který představuje basální tělísko osového vlákna bičíku, axonem.

Středem spojovacího oddílu probíhá osová vlákna – axonem. Axonem tvoří na obvodu 9 párů mikrotubulů a uprostřed dvojice centrálních tubulů. K periferním dvojicím mikrotubulů se přikládá 9 podélně probíhajících tmavých provazců – hladké chordy, které jsou pokračováním žíhaných chord v krčku. Ty se uplatňují při pohybu bičíku. Zevně od hladkých chord jsou uloženy mitochondrie, které tvoří souvislou vrstvu šroubovitě probíhající v celém spojovacím oddíle, označovanou jako mitochondriální pochva.

Hlavní část bičíku má v osově části stejné uspořádání jako spojovací oddíl. V zevní vrstvě je místo mitochondrií fibrózní pochva, která se skládá ze dvou poloobloukovitých žeber. S žebry splývají dvě hladké chordy a tvoří dva podélné sloupce, které rozdělují hladké chordy na dvě asymetrické poloviny. Toto uspořádání způsobuje při kontrakci vlnitý pohyb bičíku.

Terminální část bičíku je tvořena pouze axonem a na povrchu je ohraničena cytoplasmatickou membránou.

Celý bičík je dlouhý asi 65 μm a široký 1 μm a umožňuje progresivní pohyb spermie. V ejakulátu se rychlost spermií uvádí 10 – 60 μm za sekundu (*Malínský a kol. 2004; Ulčová-Gallová 2006*).

2.7 Vliv oxidačního stresu a lipoperoxidace na mužskou plodnost

Spermie jsou velmi náchylné k poškození oxidačním stresem (OS), zvláště jsou citlivé na reaktivní formy kyslíku, protože jejich plasmatické membrány obsahují velké množství polynenasycených mastných kyselin a jejich cytoplazma obsahuje nízké koncentrace antioxidantních enzymů. Oxidační stres má vliv nejen na fluiditu plasmatické membrány spermií, ale i na integritu DNA v jádře spermií. OS vede k mutaci mitochondriálního genomu a narušuje normální funkci spermií (*Colagar a kol. 2009; Shamsi a kol. 2010*).

Lipoperoxidy a metabolity LPO mohou indukovat a urychlit proces apoptózy zárodečných buněk. To vede k poklesu počtu spermií a zhoršení tak kvality spermatu, včetně abnormalit krčku, snížené pohyblivosti spermií, ztráty schopnosti spermií podstoupit akrosomovou reakci a oplodnění. Proto je nutné určit míru LPO seminální plazmy. Za účelem studie mužské neplodnosti (*Li a kol. 2004; Shamsi a kol. 2010*).

Vysoké hladiny ROS mohou narušit vnitřní a vnější mitochondriální membrány, což vede k uvolnění cytochromu c z mitochondrií, který aktivuje enzym kaspasu a indukuje apoptózu. Studie u neplodných mužů ukázaly, že vysoké hladiny cytochromu c v seminální plazmě naznačují významné mitochondriální poškození ROS, zvýšenou apoptózu a nakonec i poškození DNA. Apoptóza spermií je často zahájena povrchovým receptorem, který je známý jako Fas nebo CD 95. Fas je membránový protein typu I, který zprostředkovává apoptózu. K apoptóze dochází, pokud se Fas ligand nebo anti-Fas protilátky navážou na Fas protein (*Chari a kol. 2011*).

2.7.1 Vliv na motilitu spermií

Zvýšená tvorba ROS koreluje se snížením motility spermií. Vysoká hladina ROS vede ke snížení fosforylace axonemálních proteinů a imobilizaci spermií, což je spojené se snížením tekutosti membrány, která je nezbytná pro fúzi spermie - vajíčko.

Další hypotézou je, že se peroxid vodíku může šířit přes membrány do buněk a tam potlačuje aktivitu některých enzymů, jako je glukosa-6-fosfát-dehydrogenasa (G6PD). Snížená aktivita G6PD vede ke snížené produkci NADPH, který je nutný pro regeneraci glutathiondisulfidu na glutathion (*Saleh a kol. 2002*).

2.7.2 Poškození DNA indukované oxidačním stresem

Různé studie prokázaly, že pokud byly spermie vystaveny účinkům ROS, vedlo to k výraznému zvýšení poškození DNA.

Bylo prokázáno, že vysoké hladiny ROS jsou příčinou fragmentace DNA spermií, běžně pozorované u neplodných mužů. Tato informace má významné klinické důsledky. Má význam pro klinickou praxi, především pro asistovanou reprodukci (ART). Spermie vybrané pro ART s největší pravděpodobností pocházejí z prostředí, kde dochází k OS a vysoké procento těchto spermií má poškozenou DNA. Existuje značné riziko, že se u této formy léčení používají spermie nesoucí poškozenou DNA. Při použití intrauterinní inseminace nebo spontánního oplodnění *in vitro*, se nemusíme ničeho obávat, protože poškození plazmatické membrány spermií LPO zajistí, že nemůže dojít k oplodnění spermií s poškozenou DNA. Pokud je spermie přímo injektována do vajíčka, pak se může stát, že vajíčko bude oplodněno spermií nesoucí poškozenou DNA (Aitken a Koppers 2011; Saleh a kol. 2002).

2.7.3 Fyziologický vliv reaktivních forem kyslíku na spermie

Až donedávna byly ROS považovány za výhradně toxické pro lidské spermie. Studie Atkiena a kol. (1989) ukázala, že omezené množství ROS významně reguluje některé funkce spermií. Autoři zjistili, že nízké hladiny ROS mohou zlepšit schopnost lidských spermií vázat se na *zonae pellucida*.

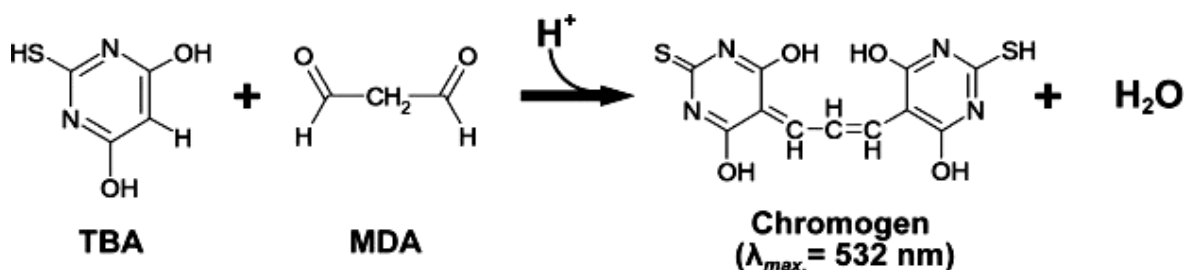
Jiné studie ukázaly, že inkubace spermií při nízké koncentraci peroxidu vodíku stimuluje kapacitaci spermií, hyperaktivaci a zlepšuje schopnost spermií podstoupit akrosomovou reakci a fúzi s oocytem. Další ROS, jako je oxid dusnatý a superoxidový anion také podporují kapacitaci spermií a akrosomovou reakci (Saleh a kol. 2002).

2.8 Stanovení malondialdehydu

Stanovení malondialdehydu se používá především k posouzení oxidačního stresu a míry lipidové peroxidace.

2.8.1 Spektrofotometrické stanovení

Malondialdehyd se nejčastěji stanovuje spektrofotometricky jako adukt s kyselinou thiobarbiturovou. Tato metoda je jednoduchá a levná, ale velmi nespecifická, protože TBA reaguje nejen s MDA, ale také s mnoha dalšími sloučeninami, např. se sacharidy, aminokyselinami, pigmenty (*Mateos a kol. 2005; Del Rio 2005*).



Obr.4 Vznik komplexu $\text{MDA}(\text{TBA})_2$ (*Bastos a kol. 2012*)

Vzorky ejakulátu jsou po zkapalnění centrifugovány a poté se odpipetuje supernatant (seminální plazma). Postup přípravy vzorku se mezi jednotlivými autory liší. K supernatantu je přidáno derivatizační činidlo, které je modifikované různými způsoby. Nejčastěji se ke kyselině 2-thiobarbiturové přidává kyselina octová (*Chari a Colagar 2011*), nebo kyselina trichloroctová (*Shamsi B. S. a kol. 2010*). Vzorek se dále inkubuje při 100 °C v různých časových intervalech, nejčastěji 1 hodinu. Po ochlazení je vzorek centrifugován. Supernatant je měřen spektrofotometricky při 534 nm (*Chari a Colagar 2011*), nebo při 532 nm (*Shamsi a kol. 2010*).

2.8.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) se nejčastěji používá v systému obrácených fází, kdy je stacionární fáze nepolární a mobilní fáze je polární. HPLC se užívá ve spojení s UV/Vis nebo fluorescenční detekcí.

2.8.2.1 Derivatizace s 2-thiobarbiturovou kyselinou

Tato metoda je založena na reakci MDA a TBA za vzniku červeně zbarveného komplexu $\text{MDA}(\text{TBA})_2$ s absorpčním maximem při 532 nm.

Příprava vzorku je zde podobná jako u spektrofotometrického stanovení, u různých autorů se liší složení mobilní fáze a detekce. Mobilní fází může být směs methanolu a fosfátového pufru (*Li a kol. 2004*), nebo acetonitrilu a vody (*Fukunaga a kol. 1995*). Používá se UV/Vis nebo fluorescenční detekce.

Tato metoda je rychlá a citlivá, ale derivatizace s 2-thiobarbiturovou kyselinou má několik nedostatků - nízkou selektivitu a drsné podmínky derivatizace (*Claeson a kol. 2001*).

2.8.2.2 Derivatizace s diethylthiobarbiturovou kyselinou

Derivatizační činidlo diethylthiobarbiturová kyselina (DETBA) tvoří komplexy MDA-DETBA, které jsou méně polární než komplex MDA-TBA. Chromatografické záznamy jsou přehlednější, metoda je více selektivní a citlivá. Tato metoda je vhodná pro stanovení MDA v moči (*Guichardant a kol. 1994*).

2.8.2.3 Derivatizace s 2,4-dinitrofenylhydrazinem

Derivatizace s 2,4-dinitrofenylhydrazinem (DNPH) umožňuje simultánní stanovení i jiných karbonylových sloučenin. Před vlastní HPLC analýzou je nutná předseparace tenkovrstvou chromatografií (TLC), případně extrakcí tuhou fází (SPE) (*Mateos a kol. 2005*).

2.8.3 Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

Další technika pro stanovení malondialdehydu je plynová chromatografie (GC) s hmotnostní detekcí. Jako derivatizační činidlo se používají fenylylhydraziny, například pentafluorofenylylhydrazin (*Mateos a kol. 2005*) nebo 2,4,6-trichlorofenylylhydrazin (*Stalikas a kol. 2001*).

Pro stanovení volného MDA jsou vzorky derivatizovány s fenylylhydrazinem za mírných podmínek (25 °C, pH 4,0, 30 minut) a poskytují 1-fenylylpyrazolové deriváty. Pro stanovení celkové hladiny MDA je před derivatizací vzorek hydrolyzován NaOH (1 ml/l). Tato metoda je velmi specifická, přesná, citlivá, ale vyžaduje drahé vybavení (*Cighetti a kol. 1999; Mateos a kol. 2005*)

2.8.4 Elektromigrační metody

2.8.4.1 Vysokoučinná kapilární elektroforéza

Wilson a kol. (1997) popsali metodu pro měření volného MDA v krevní plazmě s použitím vysokoučinné kapilární elektroforézy (HPCE) ve spojení s UV detekcí. Oproti metodě HPLC využívající 2-TBA jako derivatizačního činidla, je HPCE mnohem specifičtější a citlivější (*Wilson a kol. 1997*).

2.8.4.2 Kapilární zónová elektroforéza

Malondialdehyd je možné separovat také kapilární zónovou elektroforézou (CZE) s UV detekcí při 267 nm. CZE se osvědčila pro přímé stanovení MDA díky dobré separační účinnosti a nízkým požadavkům na objem vzorku (*Claeson a kol. 2001*).

2.8.4.3 Micelární elektrokinetická chromatografie

Při micelární elektrokinetické chromatografii se separace provádí v elektrolytovém roztoku, který obsahuje tenzid v koncentraci vyšší než kritická micelární koncentrace. Molekuly rozpuštěné látky jsou rozděleny mezi pufrem a pseudostacionární fází tvořenou micelami.

Malondialdehyd je separován ve fosfátovém pufru (pH 7), jako tenzid se používá dodecylsulfát sodný a vkládá se napětí 120 kV (*Claeson K. a kol. 2001*).

2.8.5 ELISA

Byla vyvinuta metoda sendvičové enzymoimunoanalýzy (ELISA) pro měření LDL modifikované MDA v krevním séru. MDA-LDL je v krvi a séru nestabilní, při skladování se postupně zvyšuje (*Kitano a kol. 2004*).

3 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo optimalizovat metodu pro stanovení malondialdehydu v seminální plazmě pomocí HPLC s fluorescenční detekcí a zjistit, zda existuje vztah mezi hladinou malondialdehydu a vybranými parametry spermiogramu.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Charakteristika sledované populace

Vzorky seminální plazmy jsme získali v Centru asistované reprodukce Sanus Pardubice. Vzorky seminální plazmy byly odebrány do polypropylenových (PP) mikrozkušavek obsahující butylovaný hydroxytoluen (BHT). Do PP mikrozkušavek jsme přidali 200 µl 0,1% BHT v ethanolu. Rozpouštědlo jsme odpařili pod jemným proudem dusíku (čistota 4,6; Linde Gas a. s., Praha, ČR). Do takto připravených PP mikrozkušavek bylo odebíráno 200 µl seminální plazmy. Vzorky seminální plazmy byly uchovávány při -80 °C.

Pacienti byli rozděleni do skupin na základě vyšetření spermioqramu a také podle vyplněného dotazníku na kuřáky a nekuřáky (Tab. 3).

Tab. 3.: *Charakteristika sledované populace*

Soubor pacientů	počet	věk
všichni	50	21 - 48
kuřáci	18	21 - 37
nekuřáci	32	25 - 48
normospermie	37	26 - 38
azoospermie	1	41
teratozoospermie	5	30 - 37
oligoteratozoospermie	3	31 - 48
oligoasthenoteratozoospermie	1	29
oligozoospermie	2	34 - 43
oligoasthenozoospermie	1	37

4.2 Vyšetření spermioqramu

Spermioqramy byly vyhodnocovány v Centru asistované reprodukce Sanus a vyšetření spermioqramu se řídí Laboratorní příručkou pro andrologickou laboratoř.

Před odebráním vzorku je potřeba dodržet minimálně dvoudenní pohlavní abstinenci. Ejakulát se získává masturbací. Pro odběr ejakulátu se používá sterilní nádobka, kelímek s víčkem. Vzorek je odebrán v odběrové místnosti blízko andrologické laboratoře. Ve výjimečných případech je umožněn odběr doma a pacient by měl doručit vzorek do laboratoře nejpozději do jedné hodiny po odběru, delší čekací doba nebo chlazení ejakulátu může poškodit sperma.

Ejakulát se vyšetřuje makroskopicky i mikroskopicky. Laboratorní vyšetření začíná po zkapalnění spermatu, obvykle asi po 20-30 minutách.

4.2.1 Makroskopické vyšetření

Při makroskopickém vyšetření hodnotíme vzhled a stanovujeme objem a pH vzorku.

Normální vzorek je šedavě opalescentní, homogenní a při pokojové teplotě do 60 minut zkapalní. Je třeba zaznamenat průhlednost, nebo naopak příměsi krve, vláken a hlenu. V normálním vzorku mohou být gelová zrna, která nezkapalní. U mužů, kteří používají určité léky a vitamíny, se může objevit žlutý ejakulát.

Stanovení objemu se provádí sterilní Pasteurovou pipetou. Množství spermatu obvykle nemá žádný významný vliv na plodnost. Rozhodujícím faktorem je množství spermií v tekutině.

Normální pH je mírně zásadité, při nižším pH dochází k poškození spermií. K vyšetření se používá papírek s indikačním rozmezím 6,4 - 10,0. Hodnocení se provádí 30 sekund po natření vzorkem. Normální pH ejakulátu je 7,2 - 7,8.

4.2.2 Mikroskopické vyšetření

Mikroskopické hodnocení spermií se zaměřuje na hodnocení koncentrace - počtu spermií, pohyblivosti a morfologie. Také se hodnotí přítomnost jiných buněčných elementů než spermií a aglutinace.

Z odběrové nádobky se po řádném promíchání odebere vzorek ejakulátu a ten se dále vyšetřuje v Bürkerově počítací komůrce.

Motilita spermií se hodnotí semisubjektivně a rozlišují se 3 druhy pohybů. Progresivní pohyb je charakterizován aktivním pohybem spermií a to buď lineárně, nebo v rozsáhlém kruhu bez ohledu na rychlost. Neprogresivní pohyb se projevuje chybějící progresí, např. pohyb v malých kruzích, pohyb na místě. Posledním typem pohybu je nepohyblivost spermií. Pohyblivost se zjišťuje současně se stanovením koncentrace spermií.

Dalším parametrem je morfologie spermií, zjišťují se patologické tvary spermií a v jakém počtu se v ejakulátu vyskytují. Odchylek od normálního tvaru je řada: deformace hlaviček, defekty krčku, bičíku, dvojité bičíky, cytoplazmatické kapky. Vyhodnocením 100 spermií se určuje procentuální podíl morfologicky normálních spermií. Tvar spermií je považován za důležitý faktor pro posouzení plodnosti.

Aglutinací rozumíme vzájemné shlukování pohyblivých spermií hlavičkami, středními částmi či bičíky, či smíšeně (např. středními částmi s bičíky apod.). Pohyblivost spermií je zachována, aglutinát připomíná pohyb klubka hadů. Aglutinace ukazuje na možnou imunologickou příčinu infertility, ale nedokazuje ji.

V ejakulátu nacházíme také polygonální epitelie z uretry, spermatogonie a leukocyty. Jejich počet se stanoví v počítací komůrce stejným způsobem jako počet spermií.

Stanovení životaschopnosti (vitalita, procento živých spermií) probíhá zabarvením mrtvých spermií pomocí barviva eosin, které proniká přes buněčnou membránu do buňky. Buněčná membrána živých spermií je pro eosin nepropustná.

Přítomnost protilátek proti spermiím v semenné tekutině může také ovlivnit plodnost. Tyto protilátky jsou namířeny proti spermiím s vazbou na autoimunitní reakci těla, jejich cílem je snížit pohyblivost spermií. Proto je ejakulát vyšetřován na tzv. smíšené antiglobulinové reakce (MAR), na protilátky proti spermiím.

4.2.3 Referenční hodnoty

Světová zdravotnická organizace (WHO) stanovuje doporučující hodnoty pro vyšetření spermioqramu. Parametry WHO představují celosvětový nástroj pro hodnocení mužské plodnosti a umožňují standardizované a srovnatelné hodnocení. Referenční hodnoty pro vyšetření ejakulátu jsou vydávány v pravidelných intervalech, jsou revidovány a aktualizovány (Tab. 4). Hodnoty se odvíjí od skutečných výsledků

plodných mužů. Na jaře roku 2010 bylo vydáno již páté vydání příručky "WHO laboratorní příručka pro zkoumání a zpracování lidského spermatu".

Tab. 4.: Referenční hodnoty dle WHO

Parametr	Referenční hodnota
Hodnota pH	≥ 7,2
Objem ejakulátu	1,5 ml
Koncentrace spermií	≥ 15 milionů spermií na 1 ml
Celkový počet spermií	≥ 39 milionů spermií
% pohyblivých spermií	≥ 40 %
% progresivního pohybu	≥ 32 % PR
Morfologie	>4% normálních forem
Eosin – test (podíl živých spermií)	≥ 58 %
MAR – test (smíšená antiglobulinová reakce)	< 50 % spermií s navázanými částicemi
Leukocyty	< 1 milion na mililitr

Na základě makroskopického a mikroskopického vyšetření ejakulátu se podle referenčních hodnot určuje závěr:

- Normospermie - normální ejakulát podle výše popsaných parametrů
- Oligozoospermie - koncentrace spermií v ejakulátu je nižší než 15 mil/ml
- Kryptozoospermie – po centrifugaci jsou spermie ojedinele přítomny
- Asthenozoospermie - % celkového pohybu je nižší než 40 %, % progresivního pohybu z celkové koncentrace je nižší než 32 %
- Teratozoospermie - % morfologicky normálních spermií je nižší než 4 %
- Azoospermie - v ejakulátu nejsou přítomny žádné spermie
- Hypospermatismus - objem ejakulátu je nižší než 1,5 ml
- Aspermie – nepřítomnost ejakulátu
- Nekrospermie – mrtvé spermie v ejakulátu
- Pyospermie (leukospermie) - hnis / bílé krvinky ve spermatu
- Oligoasthenozoospermie - nižší počet, snížená pohyblivost spermií
- Astenoteratozoospermie - tvarově neodpovídající normě, zároveň jsou méně pohyblivé
- Oligoastenoteratozoospermie – kombinace zmíněných parametrů

4.3 Stanovení malondialdehydu v seminální plazmě

4.3.1 Vzorky

Vzorky seminální plazmy pro tuto diplomovou práci jsme získali od vyšetřovaných pacientů v Centru asistované reprodukce Sanus v Pardubicích. Vzorky byly odebírány do polyethylenových mikrozkušavek a byly uskladněny v mrazicím boxu při teplotě -80 °C. Prováděná studie byla povolena etickou komisí, její souhlas je přiložen v příloze

4.3.2 Chemikálie

- Deionizovaná voda [$E = 0,055 \mu\text{S}$]
- Dihydrogenfosforečnan draselný [KH_2PO_4 ; $M_r = 136,09$; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Německo]
- Ethanol gradient grade pro HPLC [$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$; $M_r = 46,07$; Merck KgaA Darmstadt, Německo]
- Hydroxid draselný [KOH ; $M_r = 56,00$; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Německo]
- Kyselina fosforečná [H_3PO_4 ; $w = 0,85$; $M_r = 98,00$; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Německo]
- Kyselina octová [CH_3COOH ; $w = 0,99$; $M_r = 60,05$; Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Německo]
- n-Butanol [$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$; $M_r = 74,12$; Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Německo]
- Kyselina 2-thiobarbiturová [$\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$; $M_r = 144,14$; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Německo]
- Tetramethoxypropan [$\text{C}_7\text{H}_{16}\text{O}_4$; $M_r = 164,2$; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Německo]
- Kyselina ethylendiamintetraoctová [$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$; $M_r = 372,2$; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Německo]
- Dusík [čistota 4,6; Linde Gas a. s., Praha, ČR]
- 2,6-di-tert-Butyl-4-methyl fenol, butylovaný hydroxytoluen [BHT; $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$; $M_r = 220,4$; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Německo]

4.3.3 Pomůcky a přístroje

- Analytické váhy LB-1050/2 (Laberte, Budapešť, Maďarsko)
- Automatické mikropipety Biohit (Biohit PLC., Helsinky, Finsko)
- Autosampler SIL-10ADVP pro HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)
- Čerpadlo LC-10ADVP pro HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)
- Filtrační aparatura Supelco (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
- Fluorescenční detektor RF-10AXL pro HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)
- Hlubokomrazící box MDF-U 3086S (Sanyo Electric, Osaka, Japonsko)
- HPLC kolona LiChroCART® 125-4, Purospher® STAR RP-18e, 5 µm
- Chlazená centrifuga
- Chromatografická datastanice pro Windows, Clarity (DataApex Ltd., Praha, ČR)
- Kombinovaná chladnička s mrazničkou (Liebherr, Švýcarsko)
- Magnetické míchadlo Heidolph MR 3001K (Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, Německo)
- Multidávkoč (Eppendorf, Německo)
- Nylonové filtry pro filtrování mobilních fází pro HPLC; 0,2 µm (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
- Odstředivka Jouan MR 23i (Jouan SA, St. Herblain, Francie)
- pH-metr inoLab, Level 2 (WTW Wissenschaftlich-TechnischeWerkstättenGmbH, Weilheim, Německo)
- Polypropylenové mikrozkušavky; 1,5 ml (FisherScientific, spol. s. r.o., Pardubice, ČR)
- Předvážky Sartorius L2200P (Sartorius Laboratories, Goettingen, Německo)
- Řídící jednotka SCL-10AVP pro HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)
- Skleněné vialky se šroubovacím víčkem (Fisher Scientific, spol. s. r.o., Pardubice, ČR)
- Termostat kolon CTO-10ACVP pro HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)
- Třepačka s nástavcem pro mikrozkušavky (Heildoph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, Německo)
- Ultrazvuková lázeň K12 (Kraintek s.r.o., Podhajska, Slovensko)
- Kádinky, odměrné baňky, odměrné válce

4.3.4 Příprava pracovních roztoků

Zásobní roztok malondialdehydu, 1 mmol/l

Zásobní roztok jsme připravili napipetováním 16,5 μ l TMP do 100 ml odměrné baňky a doplnili deionizovanou vodou po rysku.

Pracovní roztok malondialdehydu, 10 μ mol/l

Pracovní roztok jsme získali zředěním zásobního roztoku. K 50 μ l zásobního roztoku jsme přidali 4,95 ml deionizované vody.

Derivatizační činidlo - roztok thiobarbiturové kyseliny, asi 28 mmol/l

V 5 ml deionizované vody jsme rozpustili přibližně 0,04 g 2-TBA a poté jsme přidali 5 ml koncentrované kyseliny octové. Tím jsme získali asi 28-mmol/l roztok 2-TBA v 50% kyseliny octové.

Roztok kyseliny ethylendiamintetraoctové, asi 0,1 %

Navážku 0,01g EDTA jsme rozpustili v 10-ti ml deionizované vody.

Mobilní fáze A, 25mmol/l KH_2PO_4 – ethanol (80:20, v/v), pH 6,0

V 800 ml deionizované vody jsme rozpustili navážku 2,72 g KH_2PO_4 , po rozpuštění jsme přidali 200 ml ethanolu. pH mobilní fáze jsme upravili pomocí KOH (2 mol/l) na hodnotu 6,0. Mobilní fázi jsme přefiltrovali přes nylonový filtr a odvzdušnili pomocí ultrazvuku.

Mobilní fáze B, 25mmol/l KH_2PO_4 – ethanol (50:50, v/v), pH 6,0

Ve 250 ml deionizované vody jsme rozpustili navážku 0,85 g KH_2PO_4 , po rozpuštění jsme přidali 250 ml ethanolu. pH mobilní fáze B jsme upravili pomocí KOH (2 mol/l) na hodnotu 6,0. Mobilní fázi jsme přefiltrovali přes nylonový filtr a odvzdušnili pomocí ultrazvuku.

Deionizovaná voda

Deionizovanou vodu, která je určená pro proplach HPLC systému, včetně kolony, jsme přefiltrovali přes nylonový filtr a odvzdušnili pomocí ultrazvuku.

Příprava kalibračních roztoků

Kalibrační roztoky jsme připravili ředěním pracovního roztoku malondialdehydu o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$, deionizovanou vodou.

4.3.5 Postup stanovení malondialdehydu v seminální plazmě vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií

Tato metoda je založena na reakci malondialdehydu (MDA) s 2-thiobarbiturovou kyselinou (TBA), za vzniku červeně zbarveného produktu $\text{MDA}(\text{TBA})_2$ s maximální absorbcí při 532 nm. Metoda je rychlá a citlivá a byla úspěšně aplikována pro kvantifikaci MDA jako ukazatel míry peroxidace lipidů v seminální plazmě.

4.3.5.1 Příprava vzorků

Vzorky seminální plazmy jsme nechali přibližně půl hodiny stát při laboratorní teplotě, aby došlo k jejich rozmražení. Do připravené skleněné vialky jsme napipetovali 50 μl vzorku seminální plazmy, přidali jsme 100 μl 0,1% roztoku EDTA, 50 μl 2-TBA a směs jsme důkladně promíchali a inkubovali 60 minut při 100 °C. Směs jsme po inkubaci ochladili, přidali jsme 1,0 ml vychlazeného n-butanolu a nechali jsme 10 minut třepat. Poté jsme směs odstředili (4000 r.p.m, 30 minut, 25 °C). Do připravené vialky jsme odpipetovali 300 μl butanolové vrstvy a zbytek do zkumavky (pro spektrofotometrické stanovení).

Standardy malondialdehydu jsme připravili stejným způsobem jako vzorky.

4.3.5.2 Chromatografická analýza

HPLC sestava:

- Čerpadlo LC-10ADVP pro HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)
- Autosampler SIL-10ADVP pro HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japonsko), chlazený na 8 °C
- HPLC kolona LiChroCART® 125-4, Purospher® STAR RP-18e, 5 μm , termostatována na 37 °C
- Fluorescenční detektor RF-10AXL pro HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)
- Řídicí jednotka SCL-10AVP pro HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)

Mobilní fáze A: směs 25 mmol/l KH_2PO_4 a ethanolu (80:20, v/v), pH 6,0

Mobilní fáze B: směs 25 mmol/l KH_2PO_4 a ethanolu (50:50, v/v), pH 6,0

Časový program:

0,01 min	0 % B
8,00 min	0 % B
8,01 min	100 % B
13,00 min	100 % B
13,01 min	0 % B

Mobilní fáze B byla použita pro vymytí interferujících látek z kolony.

Průtok mobilní fáze: 0,5 ml/min

Dávkovaný objem: 10 μl

Fluorescenční detektor: $\lambda_{\text{excitační}} = 532 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisní}} = 553 \text{ nm}$

Doba analýzy: 20 minut

4.3.5.3 Kalibrace

Pro kvantifikaci malondialdehydu v seminalní plazmě jsme použili metodu kalibrační křivky. Rovnici kalibrační křivky jsme získali proložením závislosti plochy píků na koncentraci standardů metodou nejmenších čtverců.

4.3.5.4 Analytické parametry

Linearita

Linearita kalibračního vztahu je schopnost metody dávat výsledky přímo úměrně koncentraci analytu v daném rozmezí. Lineární rozsah odezvy je interval mezi nejnižší a nejvyšší hladinou stanovované látky, v němž je látka stanovována s určitou přesností, správností a linearitou. Testuje se minimálně pět různých koncentrací standardní látky.

Přesnost

Přesnost analytické metody je mírou shody mezi jednotlivými hodnotami, které jsou měřeny při stejných analytických podmínkách opakovaně s homogenním vzorkem. Přesnost stanovení daného analytu v sérii jsme určili analýzou deseti nezávisle připravených vzorků stejné seminalní plazmy získané smícháním několika vzorků pacientů. Vzorky jsme analyzovali během jednoho dne. Jako míru přesnosti jsme použili variační koeficient (CV).

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(X_I - AVG)^2}{n - 1}}$$

$$CV (\%) = \frac{SD}{AVG} \cdot 100$$

Kde SD je standardní odchylka měření, X_I je koncentrace vždy jednoho ze vzorků v sérii, AVG je aritmetický průměr, n je počet vzorků.

Výtěžnost (recovery)

Výtěžnost vyjadřuje schopnost metody postihnout měřeným signálem veškerý analyt přítomný ve vzorku. Je mírou účinnosti dané metody. Výtěžnost jsme zjišťovali metodou přidavků známého množství analytu k vybraným vzorkům seminální plazmy s různou endogenní koncentrací. Hodnoty recovery jsme vypočetli jako stonásobek poměru mezi nalezeným a přidaným množstvím analytu:

$$Recovery (\%) = \frac{X_I - X_0}{A}$$

Kde X_I je koncentrace analytu ve vzorku s přidavkem, X_0 je endogenní koncentrace analytu a A je koncentrace přidaného analytu.

Mez detekce

Mez detekce je obecně nejnížší množství analytu ve vzorku, které jsme schopni detekovat, ale které není nutně kvantifikovatelné jako exaktní hodnota.

Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti je nejnížší koncentrace analytu, jež může být stanovena s přijatelnou mírou správnosti a přesnosti. Může to být nejnížší bod kalibrační křivky (vždy nenulový), avšak měření v nejnížší oblasti pak bývá zatíženo velkou relativní chybou. Nesmí být stanovována extrapolací.

4.3.5.5 Zpracování výsledků

Pro statistické zpracování jsme použili program MS Excel a program poskytovaný softwarem QCExpert (Trilobyte, ČR). Statistické zpracování jsme provedli na hladině významnosti 0,05.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Chromatografická analýza

5.1.1 Příprava vzorku

Vzorky ejakulátu byly získány od dobrovolných dárců masturbací po 2-4 dnech pohlavní abstinence. Vzorky se nechaly zkapalnět asi 35 minut, byly makroskopicky i mikroskopicky vyhodnoceny podle WHO a odstředěny (9 minut, laboratorní teplota, 1 700 g). Do mikrozkušavek obsahujících 0,1% BHT byl odpipetován supernatant, seminální plazma, která byla následně zamražena při -80°C. Přidání antioxidantu BHT ke vzorku doporučují ve svých publikacích také Verbunt a kol. (1996), Li a kol. (1994) nebo Mateos a kol. (2005).

Derivatizační činidlo, roztok kyseliny 2-thiobarbiturové jsme připravili rozpuštěním TBA v 50% kyselině octové. Přípravy derivatizačního činidla se u různých autorů poměrně značně liší. Někteří autoři uvádějí rozpuštění TBA v 50% kyselině octové s přídavkem 0,25 mol/l NaOH (*Chari a kol. 2010; Hsieh a kol. 2006*), v jiných publikacích se ke kyselině 2-thiobarbiturové přidává kyselina trichloroctová s 0,25 mol/l kyselinou chlorovodíkovou (*Kobayashi a kol. 1991, Suleiman a kol. 1996, Shamsi a kol. 2010*). Li a kol. (2004) vodný roztok kyseliny 2-TBA zahřívají na teplotu 55-60 °C a následně ochladili.

Ionty železa a mědi, které jsou přítomny v seminální plazmě, mohou iniciovat lipoperoxidaci. Proto jsme ke vzorku přidali chelatační činidlo – kyselinu ethylendiamintetraoctovou. Ta vyvazuje ionty železa a mědi a tím inhibuje peroxidaci lipidů *in vitro*.

Důležitým parametrem při přípravě vzorku je teplota a čas inkubace reakční směsi. V literatuře jsou publikovány různé údaje, je uváděna teplota 95° C po dobu 45 minut (*Li a kol. 2004*), až 100° C po dobu 13 minut (*Shamsi a kol. 2010*), 15 minut (*Kobayashi a kol. 1991; Suleiman a kol. 1996*) až 60 minut (*Hsieh a kol. 2006; Chari a kol. 2010*). My jsme vzhledem k barevné intenzitě vzorků zvolili inkubaci 1 hodinu při teplotě 100° C.

Extrakce komplexu MDA(TBA)₂ do organického rozpouštědla, nejčastěji se používá butanol nebo isobutanol, výrazně snižuje interferenci ostatních látek (*Li a kol. 2004*).

Zásobní roztok MDA je nejčastěji připravován kyselou hydrolýzou 1,1,3,3-tetraethoxypropanu (TEP) nebo 1,1,3,3-tetramethoxypropanu (TMP) (*Cutteridge 1975*). V literatuře je pro stanovení malondialdehydu nejvíce používaný TEP. Další možností je použití tetrabutylamoniové soli malondialdehydu nebo použití bis(diethyl)acetátu malondialdehydu.

5.1.2 HPLC analýza

Malondialdehyd jsme stanovovali jako komplex $\text{MDA}(\text{TBA})_2$ metodou HPLC v systému obrácených fází s fluorescenční detekcí.

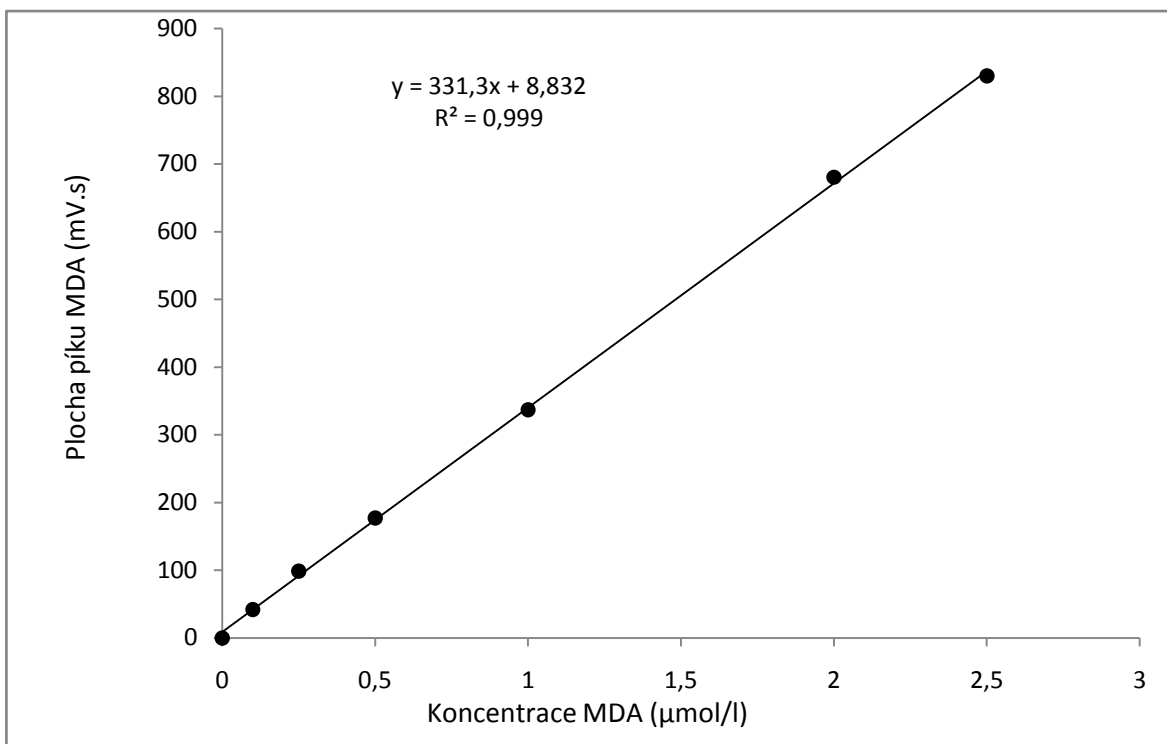
Za účelem optimalizace separačního kroku jsme testovali: pH, koncentraci fosfátového pufru a procentuálního zastoupení ethanolu v mobilní fázi. Nejlepších výsledků jsme dosáhli s mobilní fází 25 mmol/l KH_2PO_4 – ethanol (80:20, v/v), pH 6,0.

My jsme v mobilní fázi, na rozdíl od Li. a kol. (2004), jako organické rozpouštědlo použili ethanol místo methanolu. Methanol je oproti ethanolu mnohem více toxický.

Vlivem interferujících látek docházelo po několika nástřících ke chvostování píku, jak je znázorněno na chromatografických záznamech (příloha 4 a 5). Pro zlepšení separačního kroku jsme kolonu proplachovali 5 minut mobilní fází B (25 mmol/l KH_2PO_4 a ethanol, 50:50, v/v, pH 6,0) a tím jsme odstranili interferující látky z kolony. Prodloužila se tak doba analýzy, ale zlepšila se separace a ani po 50-ti nástřících nedocházelo ke chvostování píku, jak je znázorněno na chromatografickém záznamu v příloze č. 7.

5.1.3 Kalibrační křivka

Pro kvantifikaci malondialdehydu jsme použili metodu kalibrační křivky. Kalibrační křivku jsme získali vynesáním závislosti plochy píku (mV.s) na koncentraci standardu (Obr. 5). Linearita byla zachována v celém rozsahu koncentrací použitých standardů (0,0 až 2,5 $\mu\text{mol/l}$).



Obr. 5 Kalibrace pro stanovení MDA (koncentrační rozsah 0,0 až 2,5 μmol/l)

5.1.4 Analytické parametry

Linearita

Linearita byla zjišťována jako součást kalibrace, analýzou třinácti standardů o různých koncentracích MDA. Kalibrační křivka pro ověření linearity metody byla lineární v celém rozsahu testovaných koncentrací (0,10-10,00 μmol/l). Rovnice regresní přímky byla $y = 333,6x + 12,721$.

Přesnost v sérii

Přesnost stanovení malondialdehydu v sérii jsme určili analýzou 10-ti nezávisle připravených vzorků. Průměrná hodnota byla 2,16 μmol/l, SD 0,09 μmol/l, CV 4,0 %.

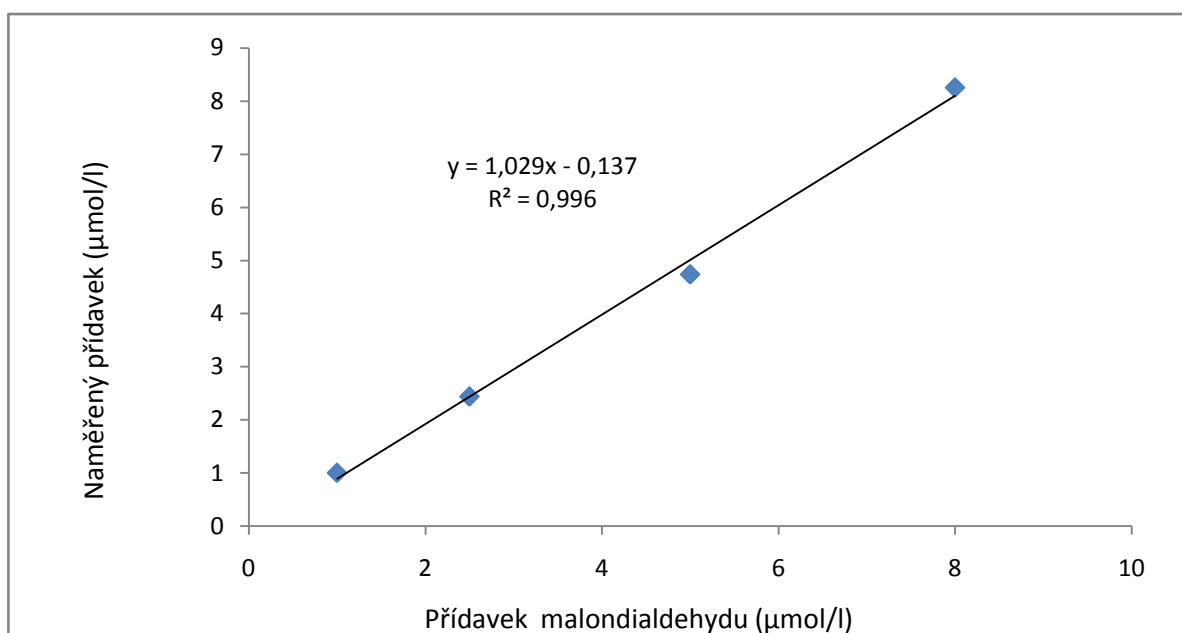
Výtěžnost (Správnost)

Správnost stanovení malondialdehydu jsme určili metodou standardních přidavků.

Tab.5.: *Správnost stanovení malondialdehydu metodou standardních přidavků*

	Přídavek (μmol/l)	Naměřeno (μmol/l)	Výtěžnost (%)
1	1,00	1,00	100,46
2	2,50	2,44	97,61
3	5,00	4,74	94,77
4	8,00	8,25	103,16
AVG			99,00
SD			3,62
CV (%)			3,65

Obr.6 Grafické znázornění výtěžnosti standardů MDA metodou HPLC s fluorescenční detekcí



Mez detekce

Mez detekce odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. Mez detekce se v separačních metodách vyjadřuje jako trojnásobek šumu základní linie.

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot h_n}{m}$$

Kde h_n je šum na základní linii, m je směrnice kalibrační křivky.

LOD= 15 fmol

Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti odpovídá koncentraci, při které je přesnost stanovení taková, že dovoluje kvantitativní vyhodnocení. Mez stanovitelnosti se v separačních metodách vyjadřuje jako desetinásobek šumu základní linie.

$$\text{LOD} = \frac{10 \cdot h_n}{m}$$

Kde h_n je šum na základní linii, m je směrnice kalibrační křivky.

LOQ= 50 fmol

5.2 Základní statistická analýza naměřených dat

Základní statistická analýza naměřených dat je shrnuta v Tab. 6 a 7.

Tab. 6.: *Základní statistická analýza naměřených dat – klasické parametry*

Parametr (jednotka)	Soubor	Počet	Průměr	SD
Věk (roky)	Všichni	50	32,1	4,8
	Kuřáci	18	30,7	4,2
	Nekuřáci	32	32,9	4,9
BMI (kg/m ²)	Všichni	50	27,0	3,9
	Kuřáci	18	27,3	3,2
	Nekuřáci	32	26,9	4,4
MDA (μmol/l)	Všichni	50	1,48	0,36
	Kuřáci	18	1,47	0,44
	Nekuřáci	32	1,48	0,33
Objem ejakulátu (ml)	Všichni	50	3,5	1,6
	Kuřáci	18	3,6	1,7
	Nekuřáci	32	3,5	1,6
Počet spermií (mil)	Všichni	50	152,7	139,3
	Kuřáci	18	138,0	102,6
	Nekuřáci	32	161,0	157,2
Koncentrace spermií (mil/ml)	Všichni	50	44,8	33,1
	Kuřáci	18	41,4	26,6
	Nekuřáci	32	46,8	36,5
Celková motilita (%)	Všichni	50	73,6	15,8
	Kuřáci	18	77,0	9,8
	Nekuřáci	32	71,7	18,2
Progresivní motilita (%)	Všichni	50	60,3	18,8
	Kuřáci	18	61,6	15,6
	Nekuřáci	32	59,6	20,5
Morfologie (%)	Všichni	50	11,2	7,2
	Kuřáci	18	11,1	5,2
	Nekuřáci	32	11,3	8,1

Tab. 7.: *Základní statistická analýza naměřených dat- robustní parametry*

Parametr (jednotka)	Soubor	Počet	Min	Max	Medián
Věk (roky)	Všichni	50	29,5	32,5	31
	Kuřáci	18	24,6	36,4	30,5
	Nekuřáci	32	29,9	34,0	32
BMI (kg/m ²)	Všichni	50	24,7	27,7	26,2
	Kuřáci	18	21,1	32,1	26,6
	Nekuřáci	32	23,8	28,5	26,1
MDA (μmol/l)	Všichni	50	1,3	1,7	1,5
	Kuřáci	18	0,7	2,0	1,4
	Nekuřáci	32	1,2	1,8	1,5
Objem ejakulátu (ml)	Všichni	50	3,0	4,0	3,5
	Kuřáci	18	0,7	6,2	3,5
	Nekuřáci	32	2,7	4,3	3,5
Počet spermií (mil)	Všichni	50	83,2	151,8	117,5
	Kuřáci	18	-27,8	250,4	111,3
	Nekuřáci	32	44,5	200,5	122,5
Koncentrace spermií (mil/ml)	Všichni	50	27,3	43,7	35,5
	Kuřáci	18	-2,3	76,3	37,0
	Nekuřáci	32	12,6	57,4	35,0
Celková motilita (%)	Všichni	50	71,8	82,4	77,1
	Kuřáci	18	64,3	91,2	77,8
	Nekuřáci	32	65,8	86,5	76,2
Progresivní motilita (%)	Všichni	50	53,8	68,1	61,0
	Kuřáci	18	39,0	82,4	60,7
	Nekuřáci	32	49,9	72,6	61,3
Morfologie (%)	Všichni	50	6,9	13,1	10,0
	Kuřáci	18	2,4	18,6	10,5
	Nekuřáci	32	4,3	15,8	10,0

5.3 Porovnání parametrů mezi kuřáky a nekuřáky

Porovnání parametrů mezi kuřáky a nekuřáky je uvedeno v Tab. 8. Vyhodnocování jsme prováděli testem Mann-Whitney Rank Sum Test na hladině významnosti 0,05. Ani u jednoho z uvedených parametrů jsme nenašli statisticky významný rozdíl mezi kuřáky a nekuřáky.

Chari a Colagar (2010) publikovali práci, ve které stanovovali hladinu malondialdehydu u skupiny asthenoteratospermických pacientů kuřáků a nekuřáků a porovnávali s kontrolní skupinou zdravých mužů. Koncentrace malondialdehydu byla u pacientů výrazně vyšší než u zdravých mužů, ale rozdíly mezi kuřáky a nekuřáky nebyly statisticky významné. Přesto došli k závěru, že kouření cigaret je rizikovým faktorem.

Tab. 8.: Porovnání dvou výběrů

Parametr (jednotka)	Počet (n)	Mann-Whitney Rank Sum Test		
		Kuřáci	Nekuřáci	P
Věk (roky)	18/32	30,5	32	0,211
BMI (kg/m ²)	18/32	26,6	26,14	0,461
Objem ejakulátu (ml)	18/32	3,45	3,5	0,776
Počet spermií (mil)	18/32	111,3	122,5	0,903
Koncentrace spermií (mil/ml)	18/32	37	35	0,903
Celková motilita (%)	18/32	77,8	76,2	0,413
Progresivní motilita (%)	18/32	60,7	61,3	0,872
Morfologie (%)	18/32	10,5	10	0,792
Kulaté buňky (mil)	18/32	2	1	0,159
MDA (μmol/l)	18/32	1,36	1,52	0,832

5.4 Distribuce hladiny malondialdehydu u jednotlivých souborů pacientů

Statistickou analýzou (Tab. 6. a 7.) jsme zjistili, že průměrná hodnota malondialdehydu byla u všech pacientů $1,48 \pm 0,36 \mu\text{mol/l}$, kuřáci $0,91-2,22 \mu\text{mol/l}$, nekuřáci $0,82-1,99 \mu\text{mol/l}$.

Pacienty je možné rozdělit na základě spermioqramu do skupin: normospermie, oligozoospermie, asthenozoospermie, oligoasthenozoospermie, oligoasthenoteratozoospermie a azoospermie. Naše skupiny těchto pacientů obsahují malý počet jedinců, pro správné statistické vyhodnocení je potřeba mít větší soubory pacientů (Tab. 3).

V roce 2010 byla vydána nová příručka WHO a výrazně se snížily referenční hodnoty pro hodnocení ejakulátu. V dohledaných publikacích, které uvádějí hladiny malondialdehydu v seminální plazmě u jednotlivých souborů pacientů rozdělených podle spermioqramu, byly použity referenční hodnoty dle WHO manuálu z roku 1999. Na základě tohoto rozdílu mezi referenčními hodnotami spermioqramu nemůžeme porovnat hladiny malondialdehydu u jednotlivých souborů pacientů s literaturou.

5.5 Závislost hladiny malondialdehydu na jednotlivých parametrech spermogramu, věku a BMI u kuřáků a nekuřáků

Závislost hladiny malondialdehydu na jednotlivých parametrech spermogramu, věku a BMI u kuřáků a nekuřáků je uvedena v Tab. 9.

Pacienti vyplňovali dotazník uvedený v příloze 2., podle váhy a výšky jsme vypočítali BMI.

Zjišťovali jsme závislosti hladiny malondialdehydu na vybraných parametrech spermogramu, věku a BMI. Našli jsme korelace mezi hladinou MDA a celkovou motilitou spermií všech pacientů. U nekuřáků jsme našli korelaci mezi hladinou MDA a progresivní motilitou. Čím vyšší byla koncentrace malondialdehydu v plazmě, tím menší byla motilita spermií. Tyto korelace jsou statisticky významné.

Kobayashi a kol. (1991) dokázali, že koncentrace MDA v seminální plazmě významně souvisí s počtem imotilních spermií. Hsieh a kol. (2006) ve své publikaci prokázali negativní korelaci MDA v seminální plazmě s motilitou spermií i jejich koncentrací. Chari a Colagar (2010) potvrdili také negativní korelaci s morfologií spermií. Suleiman a kol. (1996) naopak prokázali, že koncentrace MDA v seminální plazmě nekoreluje s koncentrací spermií, motilitou ani počtem imotilních spermií.

Negativní korelace mezi hladinou MDA a motilitou spermií lze vysvětlit. Plasmatické membrány spermií obsahují velké množství PUFA a jsou velmi náchylné k lipidové peroxidaci. Zvýšené množství malondialdehydu znamená zvýšenou lipidovou peroxidaci, která může způsobovat poškození membrány, což vede ke snížení integrity membrány a ztrátě hybnosti spermií. Tento závěr potvrzují i studie Kobayashi T. a kol. (1991), Hsieh a kol. (2006), Franczek a kol. (2001), Tavilani a kol. (2005), Nabil a kol. (2008).

Peroxidace lipidů má škodlivý účinek na kvalitu spermatu. Zvýšená hladina MDA v seminální plazmě může korelovat nebo být dokonce zodpovědná za patofyziologii mužské neplodnosti.

Tab. 9.: *Závislost hladiny malondialdehydu na vybraných parametrech*

Parametr	Soubor	Spearmanova korelace	Pravděpodobnost
MDA/Věk	Všichni	0,026939	0,863
	Kuřáci	0,143447	0,0928
	Nekuřáci	-0,07441	0,742
MDA/BMI	Všichni	-0,07755	0,596
	Kuřáci	-0,0258	0,915
	Nekuřáci	-0,04472	0,82
MDA/Objem ejakulátu	Všichni	-0,11568	0,455
	Kuřáci	-0,30031	0,211
	Nekuřáci	0,015762	0,88
MDA/Počet spermií	Všichni	-0,11352	0,427
	Kuřáci	0,001032	0,993
	Nekuřáci	-0,19153	0,285
MDA/Koncentrace spermií	Všichni	0,028091	0,822
	Kuřáci	0,221878	0,255
	Nekuřáci	-0,13856	0,46
MDA/Celková motilita	Všichni	-0,29056	0,037
	Kuřáci	-0,38287	0,118
	Nekuřáci	-0,26631	0,124
MDA/Progresivní motilita	Všichni	-0,22242	0,115
	Kuřáci	-0,06914	0,799
	Nekuřáci	-0,35942	0,0412
MDA/Morfologie	Všichni	0,000768	0,967
	Kuřáci	0,199174	0,446
	Nekuřáci	-0,09622	0,652

6 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo vypracovat vhodnou metodiku pro stanovení malondialdehydu v seminální plazmě u pacientů z Centra asistované reprodukce Sanus. Podařilo se nám optimalizovat metodu vysokoúčinné kapalinové chromatografie v systému obrácených fází s fluorescenční detekcí.

Popsaná metoda je vhodná pro stanovení celkového malondialdehydu v seminální plazmě. Reprodukovatelnost jednotlivých analýz i výtěžnost této metody je poměrně dobrá.

Statistickým zpracováním dat nebyla zjištěna žádná vazba mezi hladinou malondialdehydu a kuřáky či nekuřáky. Mezi hladinou malondialdehydu a věkem, BMI, počtem spermií a morfologií spermií u všech pacientů, kuřáků a nekuřáků jsme našli korelace, které byly statisticky nevýznamné. Jediná statisticky významná korelace byla mezi hladinou malondialdehydu a celkovou motilitou spermií.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Aitken R. J., Koppers A. J.: Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian Journal of Andrology* **13**, 36-42, 2011.
- Bastos A. S., Loureiro A. P., de Oliveira T. F., Corbi S. C., Caminaga R. M., Júnior C. R., Orrico S. R.: Quantitation of malondialdehyde in gingival cervical fluid by a high-performance liquid chromatography-based method. *Analytical Biochemistry* **423**, 141-146, 2012.
- Carbonneau M. A., Peuchant E.: Free and bound malondialdehyde measured as thiobarbituric acid adduct by HPLC in serum and plasma. *Clinical Chemistry* **8**, 1423-1429, 1991.
- Cighetti G., Debiasi S., Parono R.: Free and total malondialdehyde assessment in biological matrices by gas chromatography-mass spectrometry: What is needed for an accurate detection. *Analytical Biochemistry* **266**, 222-229, 1999.
- Claeson K., Thorsen G. Karlebrg B.: Methyl malondialdehyde as an internal standard for the determination of malondialdehyde. *Journal of Chromatography B* **751**, 315-323, 2001.
- Cutteridge J. M. C.: The use of standards for malondialdehyde. *Analytical Biochemistry* **69**, 518-526, 1975.
- Del Rio D., Stewart A. J., Pellegrini N.: A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* **15**, 316 -328, 2005.
- Droge W.: Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* **82**, 47-95, 2002.

- Fang Y., Yang S., Wu G.: Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* **18**, 872- 879, 2002.
- Fraczek M., Szkutnik D., Sanocka D., Kurpisz M.: Peroxidation components of sperm lipid membranes in male infertility. *Gynekologia Polska* **72**, 73-79, 2001.
- Fujii J., Iuchi Y., Matsuki S., Ishii T.: Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissues. *Asian Journal of Andrology* **5**, 231-242, 2003.
- Fukunaga K., Takama K., Suzuki T.: HPLC determination of plasma malondialdehyde levels without a solvent extraction procedure. *Analytical Biochemistry* **230**, 20-23, 1995.
- Garridu N., Meseguer M., Simon C., Pellicer A.: Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. *Asian Journal of Andrology* **6**, 59-65, 2004.
- Gil-Guzman E., Ollero M., Lopez M. C., Sharma R. K., Alvarez J. G., Thomas A. J., Agarwal A.: Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Human Reproduction* **9**, 1922-1930, 2001.
- Guichardant M., Valette-Talbi L., Cavadini C., Crozier G., Berger M.: Malondialdehyde measurement in urine. *Journal of Chromatography B* **655**, 112-116, 1994.
- Gutteridge J. M. C., Halliwell B.: Antioxidants in nutrition, health, and disease. *Oxford University Press*, Oxford, ISBN 0-19-854902-4, 1994.
- Halliwell B., Chirico S.: Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition* **57**, 715-725, 1993.

- Holeček V.: Volné radikály, antioxidanty a jak dále? *Klinická biochemie a metabolismus* **3**,140-145, 2006.
- Hsieh Y., Chang C., Lin C.: Seminal malondialdehyde concentration but not glutathione peroxidase activity is negatively correlated with concentration and motility. *International Journal of Biological Sciences* **2**, 23-29, 2006.
- Kand'ár R., Žáková P.: Monitorování oxidačního stresu pomocí kapalinové chromatografie. *CHEMagazín* **5**, 8-11, 2007.
- Khoschsorur G. A., Winklhofer-Roob B. M., Rabl H., Auer T., Peng Z., Schaur R. J.: Evaluation of a sensitive HPLC method for the determination of malondialdehyde, and application of the method to different biological materials. *Chromatographia* **52**, 181-184, 2000.
- Kitano S., Kanno T., Maekawa M., Sakurabayashi I., Kotani K., Hisatomi H., Hibi N., Kubono K., Harada S.: Improved method for the immunological detection of malondialdehyde-modified low density lipoproteins in human serum. *Analytica Chimica Acta* **509**, 229-235, 2004.
- Kobayashi T., Miyazaki T., Natori M., Nozawa S.: Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility: superoxide dismutase activity and lipid peroxide in human seminal plasma and spermatozoa. *Human Reproduction* **6**, 987-991, 1991.
- Li K., Shang X., Chen Y.: High-performance liquid chromatographic detection of lipid peroxidation in human seminal plasma and its application to male infertility. *Clinica Chimica Acta* **346**,199-203, 2004.
- Li X., Chow C. K.: An improved method for the measurement of malondialdehyde in biological samples. *Lipids* **29**, 73-75, 1994.

- Lykkesfeldt J.: Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clinica Chimica Acta* **380**, 50-58, 2007.
- Malínský J., Lichnovský V., Michalíková Z.: Přehled histologie člověka v obrazech – II. díl. *Univerzita Palackého v Olomouci*, Olomouc, ISBN 80–244–0850-3, 2004.
- Marnett L. J.: Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research* **424**, 83-95, 1999.
- Mateos R., Lecumberri E., Ramos S., Goya L., Bravo L.: Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress. Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. *Journal of Chromatography B* **827**, 76-82, 2005.
- Nabil H., Moemen L. A., Abu Elela M. H.: Studying the levels of malondialdehyde and antioxidant parameters in normal and abnormal human seminal plasma. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* **2**, 773-778, 2008.
- Ozgocmen S., Sogut S., Fadillioglu E., Ardicoglu A., Ardicoglu O.: Antioxidant status and lipid peroxidation in seminal plasma and spermatozoa of patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatology* **42**, 805-807, 2003.
- Pilz J., Meineke I., Gleiter C. H.: Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma. *Journal of Chromatography B* **742**, 315-325, 2000.
- Racek J., Holeček V.: Enzymy a volné radikály. *Chemické Listy* **93**, 774-780, 1999.
- Saleh A. R., Agarwal A.: Oxidative stress and male infertility: From research bench to clinical practice. *Journal of Andrology* **6**, 737-752, 2002.
- Shamsi B. S., Venkatesh S., Kumar R., Gupta N. P., Malhotra N., Singh N., Mittal S., Arora S., Arya D. S., Talwar P., Sharma R. K., Dada R.: Antioxidant levels in

blood and seminal plasma and their impact on sperm parameters in infertile men. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* **47**, 38- 43, 2010.

- Sies H.: Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology* **82**, 291-295, 1997.
- Sikka S. C., Rajasekaran M., Hellstrom W. J. G.: Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *Journal of Andrology* **6**, 464- 468, 1995.
- Stalikas C. D., Konidari C. N.: Analysis of malondialdehyde in biological matrices by capillary gas chromatography with electron-capture detection and mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* **290**, 108-115, 2001.
- Suleiman S. A., Ali M. E., Zaki Z. M., El-Malik E. M., Nasr M. A.: Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. *Journal of Andrology* **17**, 530-537, 1996.
- Suttnar J., Čermák J., Dyr J. E.: Solid-phase extraction in malondialdehyde analysis. *Analytical Biochemistry* **249**, 20-23, 1997.
- Štípek S. a kol.: Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci. *Grada Publishing, Praha*, ISBN 80-7169-704-4, 2000.
- Tavilani H., Doosti M., Saeidi H.: Malondialdehyde levels in sperm and seminal plasma of asthenozoospermic and its relationship with semen parameters. *Clinica Chimica Acta* **356**, 199-203, 2005.
- Thannickal V. J., Fanburg B. L.: Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology* **279**, 1005-1028, 2000.
- Tracerso N., Menini S., Maineri E. P., Patriarca S., Odetti P., Cottalasso D., Marinari U. M., Pronzato M. A.: Malondialdehyde, a lipoperoxidation-derived

aldehyde, can bring about secondary oxidative damage to proteins. *The Journals of Gerontology* **59**, 890-895, 2004.

- Tremellen K.: Oxidative stress and male infertility - a clinical perspective. *Human Reproduction Update* **3**, 243-258, 2008.
- Ulčová-Gallová Z.: Neplodnost. Útok imunity. *Grada Publishing*, Praha, ISBN 80-247-1493-0, 2006.
- Verbunt R. J., Egas J. M., Van der Laarse A.: Risk of overestimation of free malondialdehyde in perfused rat hearts due to homogenization artifacts. *Cardiovascular Research* **31**, 603-606, 1996.
- Wilson D. W., Metz H. N., Graver M. L., Rao P. S.: Direct method for quantification of free malondialdehyde with high-performance capillary electrophoresis in biological samples. *Clinical Chemistry* **10**, 1982-1984, 1997.

PŘÍLOHY

Jméno pacienta Rodné číslo Pojišťovna

Jméno manželky/partnerky Rodné číslo

Datum odběru Lékař žádající vyšetření

Spermiogram:

Vzhled - normální - abnormální

Viskozita - normální - abnormální

Kolikvace - normální - abnormální

	Nativní ejakulát	Referenční hodnoty
Objem ejakulátu [ml]		> 1,5
Celkový počet spermií v ejakulátu [mil.]		> 39
Koncentrace spermií v 1 ml ejakulátu [mil/ml]		> 15
Celková motilita spermií [% progresivních a neprogresivních sp.]		> 40
Progresivní motilita spermií [%]		> 32
Morfologie [% morfologicky normálních forem]		> 4
Aglutinace		záznam o přítomnosti
Koncentrace kulatých buněk v 1 ml ejakulátu [mil/ml]		< 5

Závěr: normospermie oligospermie astenospermie teratospermie
 azoospermie aglutinace vyšší koncentrace buněk hypospermatismus

Poznámky: Na základě starého WHO manuálu a zkušeností z klinické praxe je pravděpodobnost přirozeného otěhotnění u spermií s morfologií nižší než 15 % méně pravděpodobná a lze doporučit některou z metod asistované reprodukce.

.....
 Vyšetření provedl:
 razítko a podpis

.....
 Za provedení odpovídá:
 razítko a podpis

F 07 - 08/26 - PA/E

Tento formulář je majetkem společnosti PRVNÍ PRIVÁTNÍ CHIRURGICKÉ CENTRUM, spol. s r.o. a je určen pouze pro vnitřní potřebu. Rozmnožování a jeho předávání mimo společnost je možné pouze se souhlasem jednatele společnosti.

Katedra biologických a biochemických věd Univerzita Pardubice
Centrum asistované reprodukce Sanus Pardubice

STUDIE: „Sledování vybraných antioxidantů v seminální plazmě“

Pořadové číslo:

Datum narození:

Výška:

Váha:

Užíváte dlouhodobě nějaké léky, doplňky stravy? (pokud ano, jaké)

Kouříte nyní cigarety?

Příloha 2 *Dotazník, který vyplňovali pacienti Centra asistované reprodukce Sanus. Na jeho základě jsme rozdělili pacienty do skupin na kuřáky a nekuřáky.*

První privátní chirurgické centrum, s.r.o., Hradec Králové

Labská kotlina 1220, Hradec Králové 2, PSČ 500 02



Zápis z jednání etické komise dne 13.7.2011

1. Etická komise souhlasí s řešením projektu „Vliv oxidačního stresu na množství a kvalitu lidských spermií, vliv suplementace antioxidanty“, „informovaný souhlas pacienta“ je v souladu se zákonem č. 96/2001 Sb. m.s. o ochraně osobních údajů.
2. Etická komise souhlasí s řešením projektu „Vliv kvality integrity chromatinu měřené disperzním testem chromatinu spermií a selektivní vazby spermií na hyaluronan na výsledky léčby neplodnosti metodami asistované reprodukce, „informovaný souhlas pacienta“ je v souladu se zákonem č.96/2001 Sb. m.s. o ochraně lidských práv a biomedicině a zákona č. 101/2000 Sb. o ochraně osobních údajů.
3. Etická komise souhlasí s řešením projektu „ Analýza integrity chromatinu spermií mužů neplodných párů pomocí disperzního testu chromatinu spermií a studium účinku resveratrolu ve vztahu ke kvalitě spermií a výsledkům léčby neplodnosti pomocí asistované reprodukce“, „informovaný souhlas pacienta“ je v souladu se zákonem č. 96/2001 Sb. m.s. o ochraně lidských práv a biomedicině a zákona č. 101/2000 Sb. o ochraně osobních údajů.

V Hradci Králové dne 13.7.2011


Jiří Kliment – předseda komise

Tel.ústř.: 495 757 111

Fax: 495 523 427

První privátní chirurgické centrum, s.r.o., Hradec Králové

Labská kotlina 1220, Hradec Králové 2, PSČ 500 02



**Prezenční listina
z jednání etické komise dne 13.7.2011**

Členové komise :

Jiří Kliment – předseda komise

MUDr. Jiří Štěpán, CSc.

MUDr. Břetislav Krátký

MUDr. Erik Antuš

Stanislava Jílovská

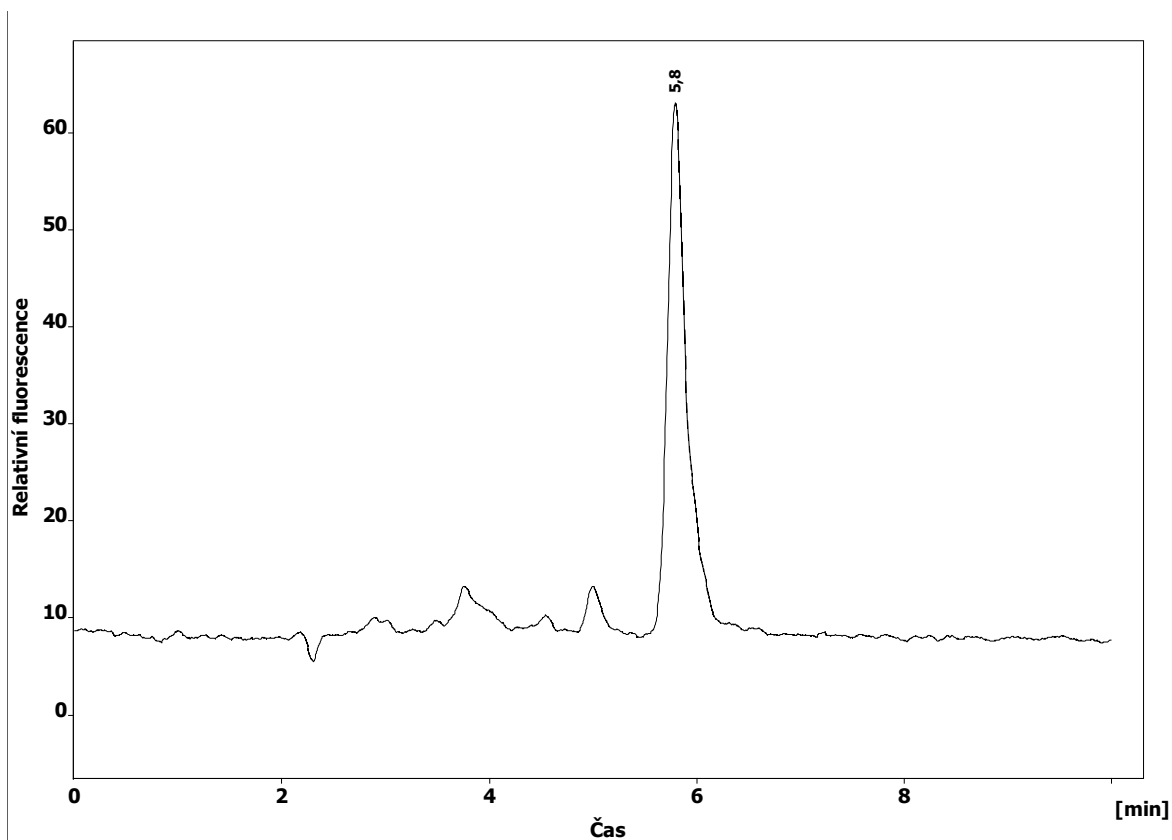
Renata Ježková

Přizván : MUDr. Jan Hiblbauer

Etická komise pracuje podle zásad správné klinické praxe /GCP/ a příslušných zákonů.

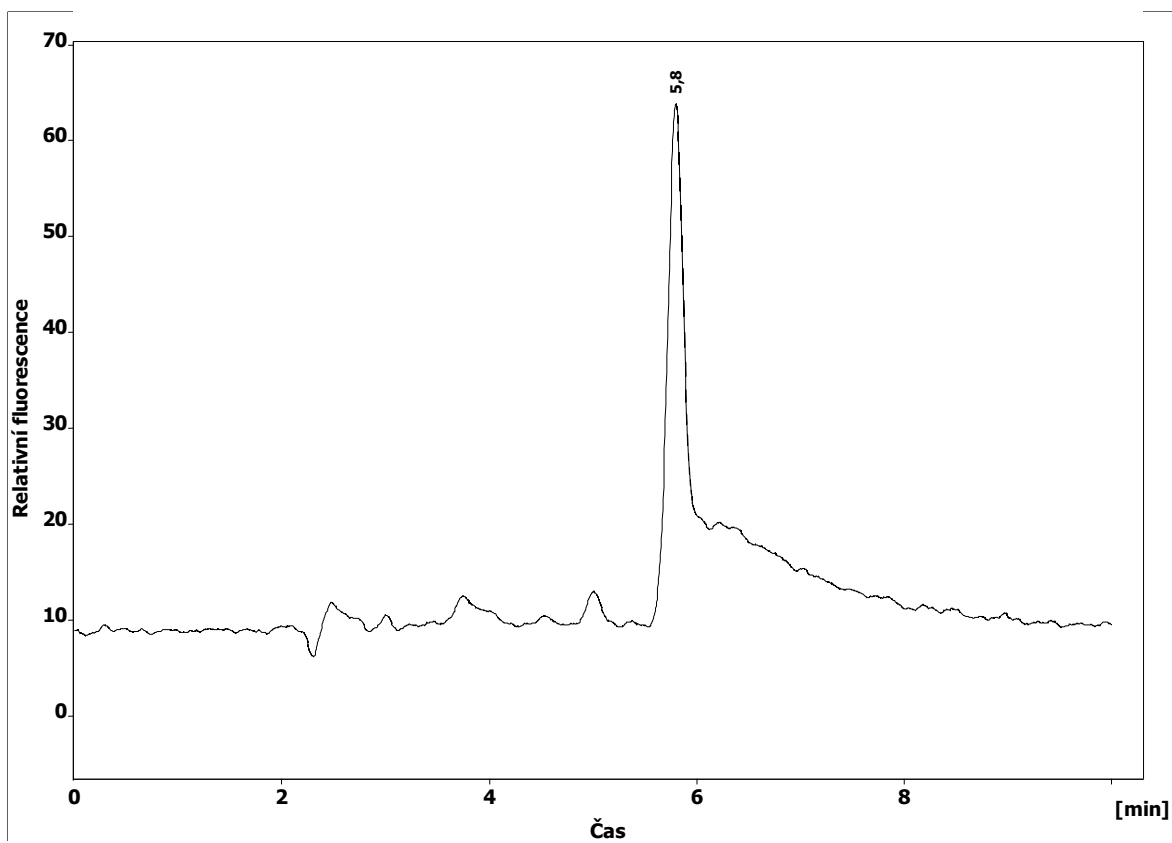
Jiří Kliment – předseda komise

Tel.ústř.: 495 757 111
Fax: 495 523 427



Příloha 4 Chromatografický záznam vzorku seminální plazmy

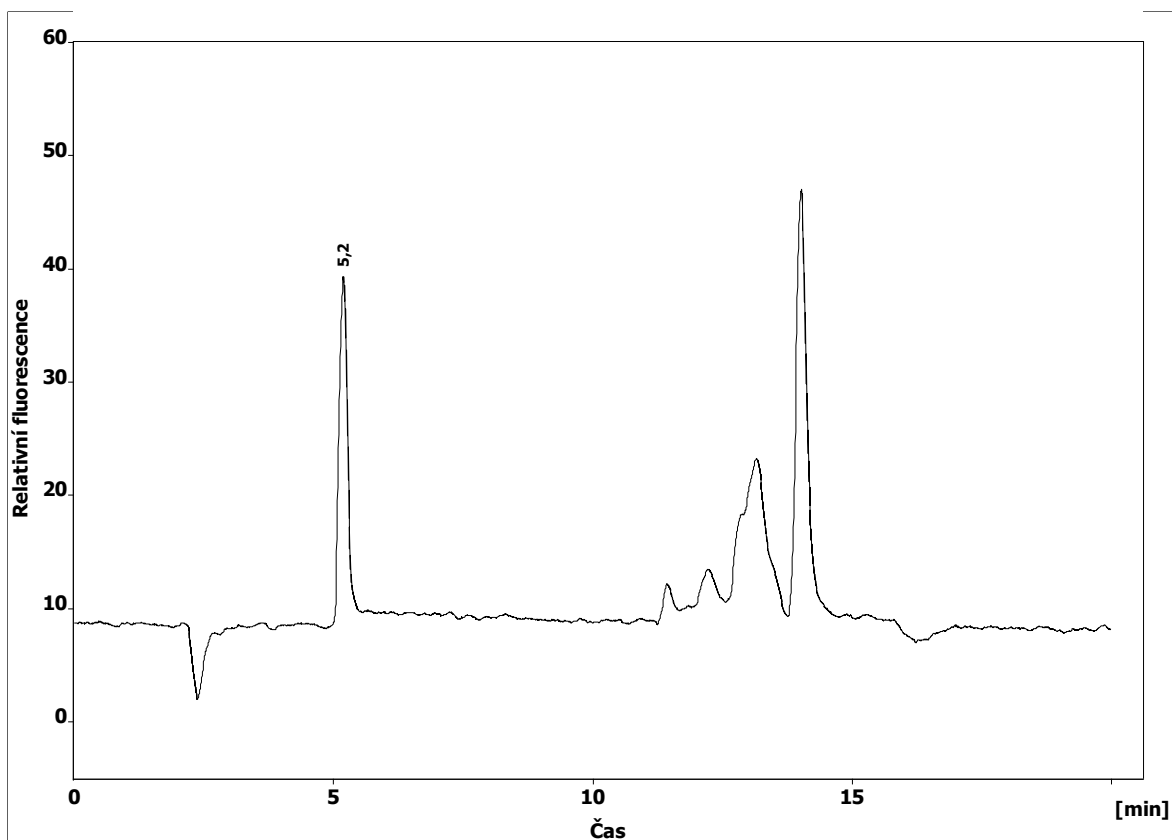
HPLC podmínky: Mobilní fáze byla směs 25mmol/ l KH_2PO_4 a ethanolu (80:20, v/v), pH 6,0, průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min, detekce fluorescenční ($\lambda_{\text{excitační}} = 532 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisní}} = 553 \text{ nm}$), dávkovaný objem 10 μl .



Příloha 5 Chromatografický záznam vzorku seminální plazmy

Jedná se o nástřík posledního vzorku v sérii. Na záznamu lze vyzorovat významné chvostování píku odpovídající komplexu $MDA(TBA)_2$.

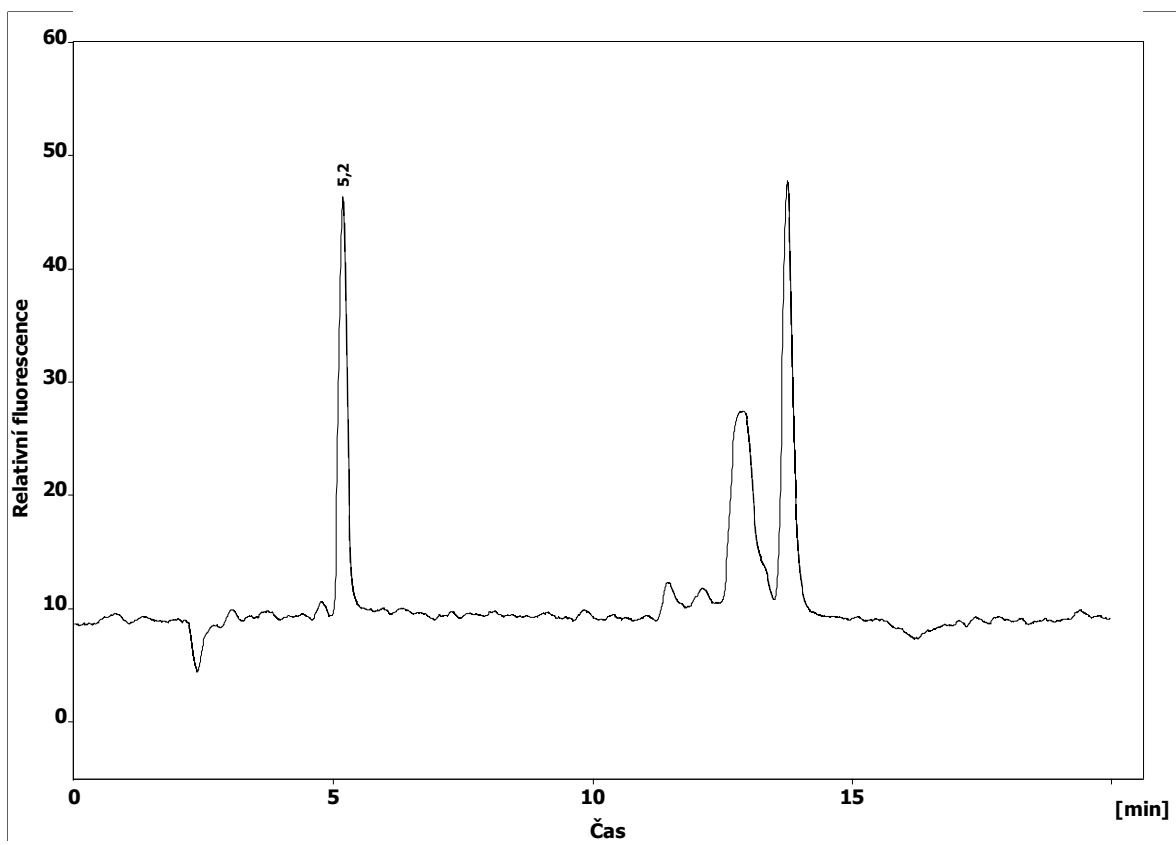
HPLC podmínky jsou uvedeny u přílohy 4.



Příloha 6 Chromatografický záznam standardního roztoku MDA (0,74 $\mu\text{mol/l}$).

HPLC podmínky: Mobilní fáze A byla směs 25mmol/l KH_2PO_4 a ethanolu (80:20, v/v), pH 6,0; mobilní fáze B byla směs 25mmol/l KH_2PO_4 a ethanolu (50:50, v/v), pH 6,0, průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min, detekce byla fluorescenční ($\lambda_{\text{excitační}} = 532 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisní}} = 553 \text{ nm}$), dávkovaný objem byl 10 μl .

Časový program byl následující: 0,0-8,0 min, 0 % B; 8,0-13,0 min, 100 % B; 13,0-20,0 min, 0 % B.



Příloha 7 Chromatografický záznam seminální plazmy. Koncentrace MDA je 0,89 $\mu\text{mol/l}$. HPLC podmínky jsou uvedeny u přílohy 6.