

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2023

Bc. Hana Pospíšilová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Stanovení progesteronu v moči netopýrů

Bc. Hana Pospíšilová

Diplomová práce

2023

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2022/2023

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Hana Pospíšilová**  
Osobní číslo: **C21418**  
Studijní program: **N0531A130028 Analytická chemie**  
Téma práce: **Stanovení progesteronu v moči netopýrů**  
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

## Zásady pro vypracování

1. V teoretické části vyhledejte a rešeršně zpracujte možnosti analýzy progesteronu různými technikami v moči a dalších tělních tekutinách netopýrů, respektive dalších živočichů.
2. V experimentální části navrhnete a ověřte vhodný postup zpracování vzorku moči netopýrů a následnou analýzu obsahu progesteronu.
3. Dosažené výsledky zhodnotte a kriticky diskutujte

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Jan Fischer, CSc.**  
Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce: **Ing. František Foret, DSc.**  
Ústav analytické chemie AV ČR, Brno

Datum zadání diplomové práce: **7. února 2023**

Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2023**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.**  
děkan

---

**doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2023

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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č.111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 5. 5. 2023

Bc. Hana Pospíšilová

## **ANOTACE**

Diplomová práce se v teoretické části zabývá obecným popisem netopýrů s konkrétním zaměřením na netopýry žijící v podnebí mírného pásu, jejich reprodukci a pohlavní hormon progesteron u samic. Druhá polovina teoretické části je zaměřena na způsoby odběru vzorků, popis obecných principů vhodných metod a technik pro analýzu progesteronu v tělních tekutinách.

Praktická část je věnována konkrétní práci v laboratoři. Zaměřuje se na získání vzorků moči netopýrů a následné měření pomocí vhodné metody s ohledem na finanční i časovou náročnost. Dále je popsán celý postup analýzy progesteronu včetně zkoumání vhodného absorpčního materiálu pro moč, výběru vhodného rozpouštědla, doby extrakce a teploty odparu. Na základě provedených testů a zkoumání bylo vyhodnoceno za nejvhodnější využití pro absorpci papír značky Whatman, dále rozpouštědlo hexan v ethylacetátu (3:2) za laboratorní teploty a doba extrakce 3 hodiny. Za těchto podmínek je stanovena účinnost extrakce a proměřen reálný vzorek se směsí moči a jiných tělních tekutin netopýra po porodu. Koncentrace progesteronu je stanovena imunoanalytickou metodou ELISA.

Na závěr je zvolený způsob analýzy progesteronu z moči netopýrů diskutován a na základě prvotních výsledků jsou navržena vylepšení celého přístupu k analýze moči netopýrů.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Moč netopýrů, progesteron, extrakce progesteronu, imunoanalýza, ELISA

## **TITLE**

Determination of progesterone in bat urine

## **ANNOTATION**

In the theoretical part, the thesis deals with a general description of bats with a specific focus on bats living in our climate, their reproduction, and the female sex hormone progesterone. The second half of the theoretical part is focused on sample collection methods, a description of general principles, suitable methods, and techniques for the analysis of progesterone in body fluids.

The practical part is dedicated to specific work in the laboratory. It focuses on choosing the right solution for obtaining bat urine samples and subsequent measurements using appropriate methods with regard to financial and time requirements. Next, the entire procedure of progesterone analysis is described, including the investigation of a suitable absorbent material for urine, the selection of a suitable solvent, the extraction time, and the temperature of the evaporator. Based on tests performed and options explored the most suitable absorbent material is rated Whatman filter paper, solvent hexane in ethylacetate (3:2) at room temperature, and the extraction time of 3 hours. Under these conditions, the extraction efficiency and the actual sample with a mixture of urine and other body fluids of the after-labor bat are measured. Progesterone concentration is determined by the immunoanalytical ELISA method.

In the end, the chosen method of progesterone analysis from bat urine is discussed and the conclusion of the whole approach to the analysis of bat urine is proposed.

## **KEYWORDS**

Bat urine, progesterone, progesterone extraction, immunoassay, ELISA

## Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu diplomové práce panu doc. Ing. Janu Fischerovi, CSc. za odborné vedení a konzultace. Také bych ráda poděkovala konzultantovi diplomové práce panu Ing. Františku Foretovi, DSc. za konzultace, trpělivost, podnětné návrhy i za zázemí pro zpracování diplomové práce v laboratoři Ústavu analytické chemie AV ČR, Brno. Dále bych chtěla poděkovat paní Mgr. Kateřině Zukalové za konzultace a přístup do laboratoře pro měření pomocí ELISA techniky na Ústavu ekologie a chorob zoovířat, zvěře, ryb a včel Fakulty veterinární hygieny a ekologie Veterinární univerzity v Brně. Poděkování patří také panu doc. Mgr. Zdeňku Farkovi, Ph.D. za konzultace věnované programu Origin pro zpracování výsledků a celé své rodině a blízkým za podporu během studia.



# OBSAH

<b>Seznam obrázků</b>	<b>10</b>
<b>Seznam tabulek</b>	<b>11</b>
<b>Seznam zkratk</b>	<b>12</b>
<b>Úvod</b>	<b>14</b>
<b>1 Obecný popis letounů</b>	<b>15</b>
1.1 Netopýři vyskytující se v České republice . . . . .	16
1.2 Reprodukce netopýřů . . . . .	17
1.3 Pohlavní hormony . . . . .	18
1.3.1 Progesteron . . . . .	18
<b>2 Obecné metody pro analýzu progesteronu</b>	<b>20</b>
2.1 Odběr a úprava vzorku . . . . .	20
2.2 Extrakce . . . . .	21
2.2.1 Extrakce kapalina-kapalina . . . . .	21
2.2.2 Extrakce pevná látka-kapalina . . . . .	22
2.2.3 Extrakce tuhou fází (SPE) . . . . .	22
2.2.4 Superkritická fluidní extrakce (SFE) . . . . .	23
2.2.5 QuEChERS . . . . .	24
2.3 Možnosti stanovení steroidních hormonů pomocí chromatografie . . . . .	24
2.3.1 Plynová chromatografie (GC) . . . . .	25
2.3.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) . . . . .	26
2.4 Hmotnostní spektrometrie ve spojení s HPLC a GC pro stanovení steroidních hormonů . . . . .	29
2.5 Imunoanalytické metody . . . . .	30
2.5.1 Dělení imunoanalytických metod . . . . .	31
2.5.2 ELISA . . . . .	32
2.6 Volba vhodné metody pro stanovení koncentrace progesteronu v tělních tekutinách netopýřů . . . . .	33

2.7	Analýza progesteronu . . . . .	34
2.7.1	Analýza progesteronu z krve netopýrů . . . . .	35
2.7.2	Analýza progesteronu z trusu netopýrů . . . . .	37
2.7.3	Analýza progesteronu z moči netopýrů . . . . .	37
<b>3</b>	<b>Experimentální část</b>	<b>39</b>
3.1	Použité chemikálie . . . . .	39
3.2	Použité přístroje a ostatní materiály . . . . .	39
3.3	Obecný postup extrakce a úpravy vzorku před stanovením . . . . .	40
3.4	Stanovení koncentrace progesteronu metodou ELISA . . . . .	40
<b>4</b>	<b>Výsledky</b>	<b>43</b>
4.1	Kalibrační závislost pro stanovení progesteronu ELISA metodou . . . . .	43
4.2	Výběr vhodného absorpčního materiálu pro moč . . . . .	44
4.3	Volba optimální teploty pro odparek . . . . .	45
4.4	Výběr doby extrakce a extrakčního rozpouštědla . . . . .	46
4.5	Účinnosti extrakce na koncentraci progesteronu ve vzorku . . . . .	48
4.6	Stanovení progesteronu v reálném vzorku . . . . .	49
<b>5</b>	<b>Diskuze</b>	<b>51</b>
	<b>Závěr</b>	<b>54</b>
	<b>Použitá literatura</b>	<b>55</b>
	<b>Seznam příloh</b>	<b>63</b>
	<b>Příloha A</b>	<b>64</b>
	<b>Příloha B</b>	<b>66</b>

# SEZNAM OBRÁZKŮ

1	Kaloň krátkonosý (lat. <i>Cynopterus sphinx</i> ) . . . . .	16
2	Netopýr velký (lat. <i>Myotis myotis</i> ) . . . . .	16
3	Gonan . . . . .	18
4	Cholesterol . . . . .	18
5	Mikroextrakce na jedné kapce. . . . .	22
6	Extrakce tuhou fází. . . . .	23
7	Schéma plynové chromatografie. . . . .	26
8	Schéma HPLC. . . . .	27
9	Schéma hmotnostního analyzátoru. . . . .	29
10	Vazba protilátka-antigen (imunokomplex). . . . .	31
11	Kompetitivní ELISA. . . . .	33
12	Schéma přípravy roztoků kalibrační řady. . . . .	41
13	Připravená 96-jamková destička pro měření absorbance roztoků. . . . .	42
14	Graf kalibrační řady standardu progesteronu. . . . .	43
15	Papír značky Whatman. . . . .	44
16	Vícevrstvý papír z buničiny. . . . .	44
17	Změna koncentrace progesteronu [pg/ml] v různých časových intervalech pro extrakční rozpouštědla methanol p.a, methanol 80% a hexan v ethalacetátu (3:2). . . . .	47
18	Reálný vzorek moči a jiných tělních tekutin po porodu netopýra rezavého. . . . .	49
19	Složný filtrační papír ve vybraném rozpouštědle. . . . .	49
20	Simulace moči na papírku značky Whatman. . . . .	66
21	Roztoky progesteronového kompetitivního ELISA kitu. . . . .	66
22	Orbitální třepačka se vzorky při extrakci. . . . .	67
23	Koncentrátor pro odparek vzorků. . . . .	67
24	Promývačka mikrodestiček. . . . .	67
25	Hybridní zobrazovací reader. . . . .	68

# SEZNAM TABULEK

1	Strukturní vzorec a fyzikálně-chemické vlastnosti progesteronu . . . . .	19
2	Srovnávací tabulka pro jednotlivé měřicí techniky. . . . .	34
3	Hodnoty koncentrace [pg/ml] a absorbance pro kalibrační řadu roztoků. . . . .	44
4	Nalezené koncentrace progesteronu [pg/ml] po extrakci 80% methanolem a pro teploty odparku při 45 °C a 60 °C. . . . .	45
5	Koncentrace progesteronu [pg/ml] pro různé doby extrakce a různé extrakční rozpouštědla. . . . .	46
6	Účinnost [%] extrakce pro různá rozpouštědla při různé době extrakce. . . . .	47
7	Výsledky koncentrací progesteronu po extrakci rozpouštědla hexan v ethylacetátu (3:2), hodnoty směrodatné odchylky a výtěžnost extrakce. . . . .	48
8	Výsledné hodnoty změřené absorbance a koncentrace progesteronu v reálném vzorku moči a jiných tělních tekutin. . . . .	50
9	Výsledné průměrné hodnoty progesteronu první skupiny samic netopýra rezavého s o 7 dní kratší dobou hibernace. . . . .	64
10	Výsledné průměrné hodnoty koncentrací progesteronu druhé skupiny samic netopýra rezavého s o 7 dní delší dobou hibernace. . . . .	64
11	Výsledné průměrné hodnoty koncentrací progesteronu 20 samic netopýra rezavého ze vzorků trusu. . . . .	65

# SEZNAM ZKRATEK

Ab	protilátka
AbAg	imunokomplex
Ag	antigen
APCI	ionizace za atmosferického tlaku (angl. <i>atmospheric pressure chemical ionization</i> )
APPI	fotoionizace za atmosferického tlaku (angl. <i>atmospheric pressure photoionization</i> )
AV ČR	Akademie věd České republiky
ELISA	enzymová imunoanalýza s vázaným enzymem na imunosorbent (angl. <i>enzyme-linked immuno sorbent assay</i> )
EI	elektronová ionizace (angl. <i>electron ionization</i> )
EIA	enzymová imunoanalýza (angl. <i>enzyme immunoassay</i> )
ESI	elektrosprej (angl. <i>electrospray</i> )
FIA	fluorescenční imunoanalýza (angl. <i>fluorescence immunoassay</i> )
FID	plamenově ionizační detektor (angl. <i>flame ionization detectory</i> )
GC	plynová chromatografie (angl. <i>gas chromatography</i> )
GLC	rozdělovací plynová chromatografie (angl. <i>gas-liquid chromatography</i> )
GSC	adsorpční plynová chromatografie (angl. <i>gas-solid chromatography</i> )
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (angl. <i>high performance liquid chromatography</i> )
LC	kapalinová chromatografie (angl. <i>liquid chromatography</i> )
LIA	luminiscenční imunoanalýza (angl. <i>luminoimmunoassay</i> )
LLE	extrakce kapalina-kapalina (angl. <i>liquid-liquid extraction</i> )
MS	hmotnostní spektrometr (angl. <i>mass spectrometer</i> )
PC	papírová chromatografie (angl. <i>paper chromatography</i> )
QqQ	trojitý kvadrupól (angl. <i>triple quadrupole</i> )
Q-TOF	hybridní analyzátor kvadrupól spojený s analyzátozem doby letu (angl. <i>quadrupole time of flight</i> )
QuEChERS	metoda disperzní extrakce tuhou fází - rychlé, jednoduché, levné, efektivní, robustní, bezpečné (angl. <i>quick, easy, cheap, effective, rugged, safe</i> )

RIA	radioimunoanalýza (angl. <i>radioimmunoassay</i> )
SDME	mikroextrakce na jedné kapce (angl. <i>single-drop microextraction</i> )
SFC	superkritická kapalinová chromatografie (angl. <i>supercritical fluid chromatography</i> )
SFE	superkritická fluidní extrakce (angl. <i>supercritical fluid extraction</i> )
SPE	extrakce na pevné fázi (angl. <i>solid-phase extraction</i> )
SPME	mikroextrakce na pevné fázi (angl. <i>solid-phase microextraction</i> )
TLC	tenkovrstvá chromatografie (angl. <i>thin layer chromatography</i> )
TOF	analyzátor doby letu (angl. <i>time of flight</i> )
UHPLC	ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie (angl. <i>ultra-high performance liquid chromatography</i> )

# ÚVOD

V současnosti je výzkum reprodukčních mechanismů u savců stále velmi aktuálním tématem. Například u člověka v posledních desetiletích stále narůstá počet párů s problematickým početím potomka. Díky podrobnějším výzkumům reprodukčních mechanismů jiných savců, bychom mohly nalézat řešení i při této problematice člověka.

Netopýři jsou jediní savci se schopností aktivního letu. Zároveň se některé druhy netopýřů zařazují do skupiny nejmenších savců na světě. Tito savci vynikají speciálními reprodukčními mechanismy, o kterých je dosud stále málo informací. Samice netopýřů mají schopnost částečně regulovat své oplození a správné načasování pro březost. Páří se v podzimních měsících, kdy může ihned vzniknout oplozené vajíčko, avšak další vývoj oplozeného vajíčka se zastaví do skončení zimní hibernace. Další z možností je uchování spermií v neaktivní formě ve vejcovodu po dobu hibernace. Po probuzení z hibernace je spuštěn znovu vývoj oplozeného vajíčka nebo v druhém případě dochází k opožděné ovulaci a k tzv. utajenému oplození vajíčka.

Významným steroidním hormonem pro ovulaci, početí, březost a porod je progesteron. Právě sledování koncentrace progesteronu umožňuje získat více informací o reprodukci netopýřů. Avšak pro hormonální vyšetření jsou nutné opakované odběry, což je jeden z problémů obecně u volně žijících zvířat. Nejčastěji se progesteron stanovuje invazivním odběrem z krevní plazmy. Pro odebrání vzorku krve netopýřů je zapotřebí dodržet určité podmínky a předem sjednané povolení. Netopýři totiž patří v mnoha zemích mezi chráněné živočichy. Vzhledem k jejich malé velikosti těla, představuje odběr krve mnohdy až život ohrožující situaci.

Právě díky problematickému invazivnímu odběru krve vědci hledají možnosti získání vzorku s co nejmenším zásahem pro život zvířete. Nadějnou cestou je získávání vzorku neinvazivní metodou, konkrétně se jedná o trus a moč. Získání trusu trvá významně delší čas než získání moči. Ovšem co se týče netopýřů, dosud nejsou takřka žádné dostupné publikace ohledně jakékoliv analýzy ze vzorku moči. Cílem diplomové práce je navržení metody a postupu zpracování vzorku moči netopýřů s následnou analýzou obsahu progesteronu.

# 1 OBECNÝ POPIS LETOUNŮ

Letouni (lat. *Chiroptera*) představují hned po hlodavcích (lat. *Rodentia*) druhý nejpočetnější řád z celé třídy savců. Věda jich aktuálně uznává přibližně 1250 druhů [1, 2]. Název *Chiroptera* pochází z řeckého slova *Cheir* „ruka“ a *Pteryx* „křídlo“. Českým ekvivalentem pro *Chiroptera* bylo uměle vytvořené slovo letouni [3]. Letouni byli donedávna dělení na dva podřády, kaloně (lat. *Megachiroptera*) a netopýry (lat. *Microchiroptera*) [4]. V dnešní době je jednou z využívaných možností dělení na letouny kaloňotvaré (lat. *Pteropodiformes*) a netopýrotvaré (lat. *Vespertilioniformes*) [1, 4, 5].

Letouni mají jako jediní savci schopnost aktivního letu díky předním končetinám, které jsou přeměněny v křídlo. Křídlo je tvořeno tenkou blánou. Charakteristickým znakem letounů je skvělá manévrovací schopnost při letu, zimní spánek neboli hibernace, utajené oplození a utajená březost [6]. Velmi zajímavá je dlouhověkost letounů vztažená k velikosti jejich těla. Existují záznamy o jedincích, kteří ve volné přírodě přežili více než 30 let. Významnou roli v dlouhověkosti letounů hraje hibernace, zeměpisná poloha, tělesná hmotnost a používání jeskynních úkrytů. Hibernující druhy žijí v průměru o 6 let déle než druhy letounů, kteří nemají schopnost hibernace. Dlouhověkost naopak není ovlivněna stravou nebo velikostí kolonie [7, 8]. Uvádí se, že délka života letounů je až tři a půl krát delší, než u jiného nelétavého savce s podobnou velikostí těla. Tento údaj může být podhodnocen, protože téměř všechny záznamy o délce života nelétajících savců pocházejí z populací v zajetí [9].

Velká část letounů má schopnost echolokace, není to však jejich charakteristickým znakem. Echolokace je aktivní způsob orientace a sbírání informací o svém okolí pomocí ozvěny zvuku, nejčastěji ultrazvuku. Echolokace pomocí ultrazvuku je vždy tvořena z otevřených úst nebo vynucená přes nosní cesty [6]. Mezi letouny bez schopnosti echolokace patří převážně druhy podřádu kaloňotvarých. Ti, kteří z tohoto podřádu echolokují, používají signál vytvořený pomocí klikání jazykem. Ostatní netopýrotvaří letouni echolokují pomocí signálu vytvořeného v hrtanu [8]. Letouni echolokaci využívají převážně pro orientaci v temných úkrytech, k detekci, hodnocení a sledování kořisti [10].

Letouni se vyskytují po celém světě. Existují druhy letounů, kteří jsou masožraví, hmyzožraví nebo naopak druhy živící se pouze ovocem, nektarem a pylem z rostlin [6]. Letouni jsou aktivní hlavně v noci. Přes den hledají ukryt v dutinách stromů, ve



skalách, na střechách domů a v budovách. Páří se koncem léta a počátkem podzimu. Mláďata se rodí převážně v červnu a červenci [11]. Rozmnožování letounů z hlediska počtu mláďat je velmi pomalé. Samice většiny evropských druhů mají jen 1–2 mláďata ročně. Většina letounů je proto zařazena do kategorie ohrožených druhů. V mnoha státech je jejich ochrana uzákoněna a existují národní i mezinárodní ochranné organizace. Přesto jsou i dodnes letouni záměrně loveni pro konzum a to převážně v některých zemích Afriky a Asie [12].

V podnebí Evropy lze nalézt kaloně (obr. 1) pouze výjimečně, nejčastěji se lze setkat s různými druhy netopýrů (obr. 2). Netopýři se od kaloňů dají velmi dobře rozpoznat díky charakteristickým rozdílům v anatomii těla i lebky. Netopýři mají znatelně menší velikost těla i očí. Živí se především hmyzem, využívají pro orientaci echolokaci a v zimních měsících hibernují [11, 12]. V českém podnebí žijí druhy netopýrů, kteří dosahují hmotnosti v rozsahu od 3 do 60 gramů [6].



Obrázek 1: Kaloň krátkonosý (lat. *Cynopterus sphinx*) [13].



Obrázek 2: Netopýr velký (lat. *Myotis myotis*) [14].

## 1.1 Netopýři vyskytující se v České republice

V České republice se vyskytuje okolo 26 druhů netopýrů a jsou rozděleni do dvou čeledí: vrápencovití (lat. *Rhinolophidae*) a netopýrovití (lat. *Vespertilionidae*). Jednotlivé

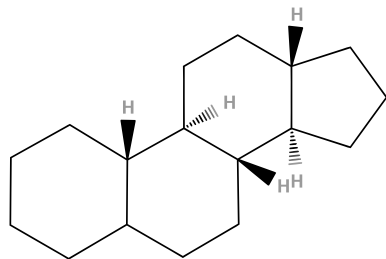
druhy netopýřů se liší v určitých vlastnostech, avšak životní cyklus a způsob rozmnožování je velmi obdobný. Životní cyklus netopýřů lze v podstatě rozdělit do čtyř hlavních fází v závislosti na ročním období. Samice netopýřů se v jarních měsících shromažďují do tzv. mateřských kolonií, kde následně začátkem léta rodí a odchovávají mláďata. Na konci léta a začátkem podzimu se obě pohlaví setkávají v přechodných úkrytech a páří se. V zimních měsících je období hibernace, po tuto dobu netopýři nepřijímají žádnou potravu a energii čerpají ze získaných tukových zásob [12, 15]. V našich podmínkách netopýři loví převážně nejrůznější druhy motýlů, brouků, pavouků a další zástupce dvoukřídlého hmyzu. Netopýři loví potravu ve volném prostoru nad zemí, přímo na listech a také v korunách stromů [12].

## 1.2 Reprodukce netopýřů

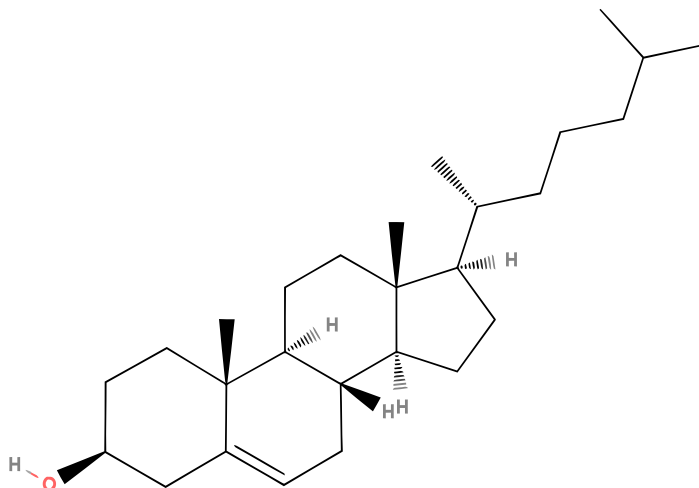
Netopýři vynikají vlastní unikátní reprodukcí, o které máme dosud stále velmi málo informací [16]. K páření typicky dochází před hibernací, není to však pravidlem a k páření může dojít i během hibernace nebo po ní [17]. Samice netopýřů mají schopnost částečně regulovat oplození. Velmi dobře reagují na klimatické změny, či jiné rušivé vlivy, které by mohly znemožnit úspěšnou reprodukci. Po spáření může ihned vzniknout oplozené vajíčko a další vývoj oplozeného vajíčka se přes dobu hibernace zastaví. Další možností je, že k oplození nedochází ihned, ale samice si uchovávají spermie ve vejcovodu. Uchované spermie ve vejcovodu zůstanou přes celé období hibernace v neaktivní formě. Po probuzení ze zimního spánku při vhodných podmínkách dochází k opožděné ovulaci a následně k tzv. utajenému oplození vajíčka [18]. Při maximální dostupnosti potravin v začátku léta samice porodí mládě a zahájí laktaci [19]. Březost, porod i laktace je ovlivněna určitou koncentrací pohlavních hormonů (estrogeny, progesteron) [18]. Právě sledování koncentrace progesteronu umožňuje získat více informací o reprodukci netopýřů. Takové informace je možno získat invazivní metodou například odebráním krve. Vzhledem k velikosti těla netopýřů je odebírání krve velký zásah pro jejich organismus. Vhodnější je použití neinvazivních metod, při kterých je možné odebrat, například moč nebo trus jedince. Volba neinvazivní metody odběru umožňuje získání vzorků od velkého počtu jedinců nebo opakované odběry bez rizika usmrcení jedince [20, 21, 22].

## 1.3 Pohlavní hormony

Pohlavní hormony patří do skupiny biologicky aktivních látek se steroidní strukturou. Hormony jsou odvozeny od základní struktury gonanu (obr. 3), starší označení gonanu je steran. Vznikají biotransformací cholesterolu (obr. 4) a jsou vylučovány v kůře nadledvin, varlately a vaječnících či v placentě [23]. Mezi pohlavní hormony patří androgeny (testosteron, androstendion a dehydroepiandrosteron), což jsou samčí pohlavní hormony, estrogeny (estron, estradiol a estriol) a gestageny (progesteron), což jsou samičí pohlavní hormony. Steroidní pohlavní hormony regulují fyziologické procesy a podílí se na správném vývoji a funkci některých primárních či sekundárních pohlavních znaků [24, 25].



Obrázek 3: Gonan [26].



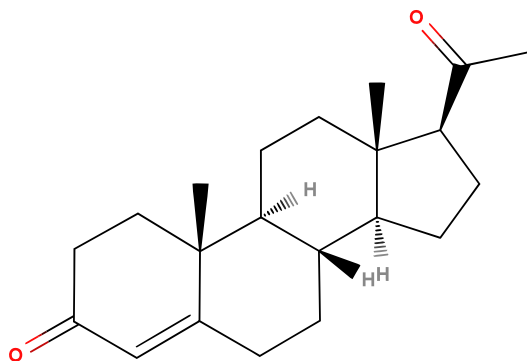
Obrázek 4: Cholesterol [27].

Tato práce se primárně věnuje analýze progesteronu, a proto je tomuto pohlavnímu hormonu věnována větší pozornost. Ostatní hormony z výše jmenovaných blíže popsány v této práci nebudou.

### 1.3.1 Progesteron

Progesteron z chemického hlediska obsahuje 21 uhlíků a jeho strukturní název je pregn-4-en-3,20-dion [22, 28]. Strukturní vzorec a fyzikálně-chemické vlastnosti progesteronu jsou zpracovány v tabulce (tab. 1). Uvedený rozdělovací koeficient oktanol-voda  $K_{ow}$  charakterizuje polaritu látky, čím je  $\log K_{ow}$  menší, tím je látka polárnější [29].

Tabulka 1: Strukturální vzorec a fyzikálně-chemické vlastnosti progesteronu [29].

Progesteron	
	$M$ ( $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) : 314,5
	$t_t$ ( $^{\circ}\text{C}$ ) : 121
	$\rho$ ( $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ) při $23^{\circ}\text{C}$ : 1,166
	$\log K_{ow}$ (-) : 3,87
	Bílý krystalický prášek bez zápachu
	Rozpustnost ve vodě ( $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) : 9,12
	Rozpustný v: etanol, metanol, aceton a dioxan
	Stabilní na vzduchu, ale citlivý na světlo

Primárně je progesteron produkován buňkami žlutého tělíska vaječníků, v menší míře kůrou nadledvin a v těhotenství placentou a je klíčovou složkou pro správnou reprodukci savců [24, 25]. Hlavní funkce v děloze a vaječniku spočívá v uvolnění a uhnízdění zralého vajíčka s následným udržením těhotenství. V mléčné žláze progesteron reguluje tvorbu mléka a v mozku zprostředkovává signály nutné k sexuálnímu chování. Vyšší hodnoty koncentrace progesteronu u netopýřů či jiných savců nalezneme hlavně v období ovulace a při těhotenství [22, 28].

V současnosti je výzkum progesteronu u savců stále velmi aktuálním tématem. Studie pomáhají rozšířit znalosti o ovulaci, menstruačním cyklu a březost jedinců. Nově získané poznatky lze dále uplatnit například v asistované reprodukci, při které je progesteron nezbytnou součástí pro úspěšné početí.

Progesteron má několik pozitivních účinků na zdraví člověka, konkrétně je významný hlavně pro ženské pohlaví. Mezi pozitivní účinky patří například endometriální ochrana, neuroprotektivní účinky a ochrana před vznikem rakoviny prsu. Dále je progesteron významně používán v hormonální terapii, při léčbě potíží spojených s menopauzou nebo jako antikoncepční prostředek [30, 31]. Progesteron je v organismu velmi rychle inaktivován, proto se ve farmacii a medicíně používají převážně synteticky připravené deriváty progesteronu, které mají podobné účinky [32].

## 2 OBECNÉ METODY PRO ANALÝZU PROGESTERONU

Při výběru vhodné analytické metody je třeba uvažovat nad řadou okolností, které by mohly ovlivnit průběh analýzy. Jednou z nejdůležitějších je množství požadovaného vzorku a koncentrace sledované látky (analytu) v daném vzorku. Dále je třeba přihlídnout k dostupnosti chemických látek a jejich toxikologickému profilu a celkovým finančním nákladům, které jsou spojené také s přístrojovým vybavením [33].

### 2.1 Odběr a úprava vzorku

Správný odběr vzorku je při každé analýze klíčový, neboť vzniklé chyby při odběru již nelze napravit. Před odběrem je nutné znát povahu a účel dané analýzy, aby byl zajištěn například správný typ konzervace vzorku [33, 34].

Od volně žijících živočichů nebo živočichů v zajetí lze odebírat různé druhy vzorků. Metody odběru vzorku od živočichů dělíme na invazivní a neinvazivní. Invazivní metody zahrnují například odběr krve nebo mozkomíšního moku. Neinvazivní metody umožňují minimální zásah do života zkoumaného živočicha [20, 21, 22].

Nejčastěji se progesteron stanovuje v krevním séru. Pro člověka a domestikovaná zvířata menší odběr krve nepředstavuje ohrožení na životě [35]. Vzorek krve (sérum, plazma) se pro zachování stability uchovává po dobu méně než 7 dní v lednici při 2–8 °C a po více, než 7 dnech je vzorek zamrazen a uchován při -20 °C.

Pro hormonální vyšetření a úspěšný výzkum reprodukce jsou nutné opakované odběry, což vede k zásadnímu problému, který se týká volně žijících zvířat. Invazivní metoda je pro volně žijící živočichy velkým zásahem do jejich života. Opakovaný odběr krve, je tudíž velmi složitý proces a v mnoha případech ho nelze uskutečnit [35]. Například odebrání krve u netopýřů, může být v některých případech až život ohrožující, vzhledem k malé velikosti jejich těla. Dále je potřeba zmínit, že netopýři jsou v mnoha zemích chráněnými živočichy a proto je při invazivní metodě výzkumu nutné žádat o speciální povolení [20, 21, 22]. Vědci proto hledají možnosti výzkumu s co nejnižším zásahem pro život zvířete. Nadějnou cestou k hledání řešení jsou právě neinvazivní metody odběru [35]. Vzorky získané neinvazivní metodou (moč, trus) jsou uchovány při teplotě -20 °C, dále se

upravují dle potřeby stanovení sušením nebo lyofylizací. Vzorkům moči nebo trusu musí být věnována velká opatrnost před vzájemnou kontaminací, např. moč kontaminovaná trusem a naopak. V takovém případě by hrozilo znehodnocení celé analýzy [36].

Při dlouhodobé konzervaci mražením (3 a více let), se může progesteron absorbovat do stěn plastových nádob. V nechráněných vzorcích může proběhnout oxidace a bakteriální metabolismus, což může následně ovlivnit koncentraci steroidů ve vzorku [37].

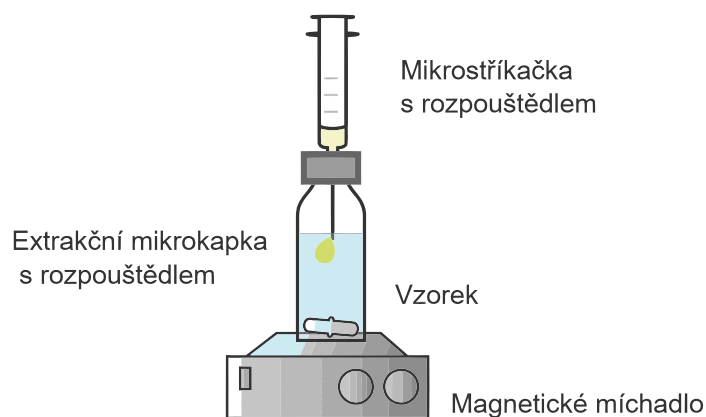
## 2.2 Extrakce

Extrakce je separační metoda, při které jsou v kontaktu dvě navzájem nemísitelné fáze. Analyty se mezi tyto fáze rozdělují na základě různých rozdělovacích koeficientů, tedy na základě různých rozpustností [33, 38]. Dle způsobu provedení se extrakce rozděluje na jednostupňovou, vícešupňovou a kontinuální. Z hlediska typů extrakčních soustav a podle skupenství fází je rozdělena na: pevná látka-kapalina a kapalina-kapalina. Volba vhodného rozpouštědla závisí na polaritě extrahované látky, tudíž polarita zvoleného rozpouštědla by měla přibližně odpovídat polaritě extrahované látky [39].

### 2.2.1 Extrakce kapalina-kapalina

Extrakce kapalina-kapalina (LLE, angl. *liquid-liquid extraction*) je separační metoda založená na přechodu rozpuštěné látky (analytu) v rozpouštědle do druhého vzájemně nemísitelného rozpouštědla [33]. Rozpouštědlem je nejčastěji vodný roztok a analyt je extrahován do nemísitelného rozpouštědla (např. chloroform, ether, hexan). Extrakce kapalina-kapalina se nejčastěji uskutečňuje za třepání obou kapalin v dělicí nálevce. Mezi faktory ovlivňující tento typ extrakce patří úprava pH nebo přídavek solí [39].

Nyní se můžeme často setkat s miniaturizovanou extrakcí kapalina-kapalina, což je tzv. mikroextrakce na jedné kapce (SDME, angl. *single-drop microextraction*). V mikroextrakci na jedné kapce (obr. 5) jsou používány systémy, které využívají kapku rozpouštědla na konci teflonového vlákna, či nástřikové jehly. Kapka rozpouštědla je ponořena do roztoku vzorku a po pár minutách extrahování je kapka vtažena zpět a použita například při chromatografickém stanovení [40].



Obrázek 5: Mikroextrakce na jedné kapce [33].

### 2.2.2 Extrakce pevná látka-kapalina

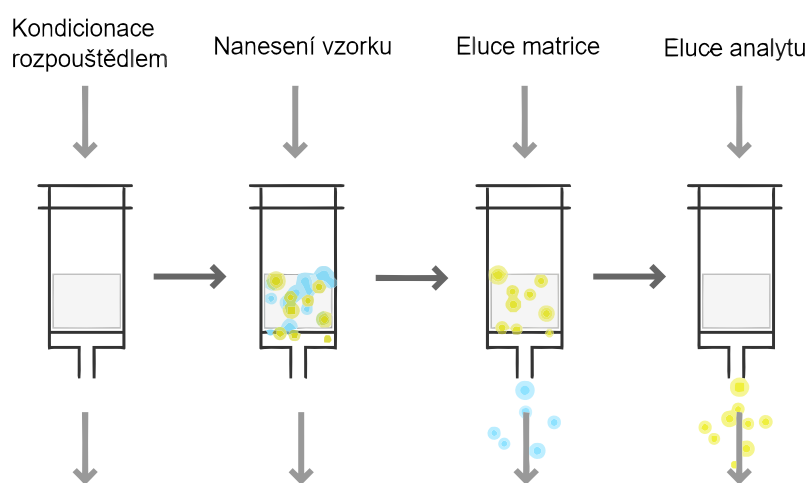
Tento typ extrakce zahrnuje různé metody provedení, jako je: macerace, digesce, extrakce v Soxhletově extraktoru a extrakce podporované mikrovlnným ohřevem, teplotou nebo tlakem. Nejjednodušší metodou je macerace, při níž se tuhá látka rozmíchá v rozpouštědle a poté zfiltruje. Digescí se označuje macerace, při které je použito horké rozpouštědlo [41]. Extrakce v Soxhletově extraktoru používá extrakční patronu, do které je vložen vzorek. Následně je vzorek s patronou umístěn do speciální aparatury, kde rozpouštědlo po zahřátí kondenzuje a horké vymývá analyty z patrony. Kondenzované rozpouštědlo se společně s analyty vrací zpět do varné baňky a celý proces se vícekrát opakuje.

V posledních letech je snaha zvolit metody extrakce, u kterých bude malá spotřeba rozpouštědel a budou splněny principy zelené analytické chemie. Hlavní nevýhodou například extrakce v Soxhletově extraktoru je velká spotřeba rozpouštědel a časová náročnost, tudíž v dnešní není nejvhodnější metodou [39, 41].

### 2.2.3 Extrakce tuhými fázemi (SPE)

Extrakce tuhými fázemi (SPE, angl. *solid-phase extraction*) je fyzikální extrakční proces zahrnující kapalnou a tuhou fázi (sorbent). Sorbent má vyšší afinitu k danému analytu, než k roztoku, ve kterém je rozpuštěn. Vzorek se prosává skrz extrakční náplň pomocí vakua, proudem vzduchu nebo proudem dusíku, případně je aplikován pomocí stříkačky [33]. Analyt se zachytí v sorbentu, následuje promývání (eluce matrice) a v posledním kroku vymytí (eluce analytu). Základní schéma pro extrakci tuhými fázemi

znázorňuje obrázek 6. Metoda využívá podobný mechanismus se sorpčním procesem, který je základem kapalinové chromatografie [41]. Pevná fáze je tvořena membránou či jednorázovou kolonkou nebo patronou naplněnou sorbentem. Nejčastěji jsou používány univerzální sorbenty na bázi silikagelu, respektive chemicky modifikovaného silikagelu (oktadecylsilikagel) nebo různé chemicky upravené polymery [33]. Hlavní výhodou extrakce tuhými fázemi je vysoký stupeň zakoncentrování analytu a malý finální objem koncentráту [39]. Velké uplatnění zaujímá tato metoda, například v oblasti životního prostředí pro zakoncentrování vzorků vod a následné stanovení například pesticidů, hormonů, či antibiotik [33, 42].



Obrázek 6: Extrakce tuhými fázemi [33].

Příbuznou technikou je mikroextrakce na pevné fázi (SPME, angl. *solid-phase microextraction*). Tato technika používá k extrakci křemenná vlákna potažená vhodným polymerem. Extrakce organických analytů probíhá ponořením vlákna do kapalného vzorku nebo parního prostoru nad ním v uzavřené nádobce tzv. (angl. *headspace*). Následně jsou analyty tepelně desorbovány v nástřikové hlavě plynového chromatografu [33].

## 2.2.4 Superkritická fluidní extrakce (SFE)

Superkritická fluidní extrakce (SFE, angl. *supercritical fluid extraction*) využívá jako extrakční media látky v tzv. superkritickém stavu, který vzniká po zahřátí nad jejich kritickou teplotu a stlačením nad jejich kritický tlak. Nejvíce používaná superkritická tekutina je oxid uhličitý s kritickou teplotou 31,3 °C a kritickým tlakem 7,38 MPa. Důležitá



vlastnost těchto tekutin spočívá v jejich hustotě blížíci se hustotě kapalin a nízké viskozitě blížíci se viskozitě plynů. Tento typ extrakce nabízí unikátní možnosti zpracování složitých vzorků, např. životního prostředí nebo potravin [33, 41].

### 2.2.5 QuEChERS

Název metody QuEChERS, je zkratkou anglických slov Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged a Safe. V překladu slova charakterizují všechny výhody dané metody: rychlé, jednoduché, levné, efektivní, robustní a bezpečné [39, 43]. Tato metoda splňuje všechny potřeby moderní laboratoře, včetně snížení spotřeby rozpouštědel, zkrácení času i finančních nákladů na analýzu [44]. Extrakce začíná přidáním organického rozpouštědla (acetonitril) ke vzorku. Následuje krok vysolení cílových analytů do organické fáze po přidání síranu hořečnatého a chloridu sodného. V případě potřeby přečištění se využívají různé modifikace silikagelu. Následným intenzivním třepáním a centrifugací je oddělena pevná fáze od kapalně. Odebere se alikvotní množství kapalně organické fáze, která je podle potřeby znovu přečištěna nebo rovnou analyzována pomocí kapalinové či plynové chromatografie [39, 43].

Metoda je široce využívána pro extrakci různých potravin, farmaceutik, pesticidů, mykotoxinů a mnoho dalších vzorků se složitou matricí [44]. Konkrétně se touto metodou, například podařilo extrahovat steroidní hormony z mléka některých domestikovaných zvířat [45].

## 2.3 Možnosti stanovení steroidních hormonů pomocí chromatografie

Úprava extrakcí zajistí, aby byl získán vzorek s požadovanou skupinou analytů. Následně je nutné od sebe oddělit jednotlivé sloučeniny a podrobit je identifikaci. Jednou z možností stanovení steroidů (progesteronu) je chromatografie [33].

Chromatografie je separační metoda, která se dále dělí na několik různých systémů a technik. Všechny techniky a systémy však mají společné to, že pro separaci používají stacionární (nepohyblivou) a mobilní (pohyblivou) fázi. Složky směsi jsou unášeny tokem mobilní fáze přes stacionární fázi. Separace je založena na rozdílné afinitě ke stacionární fázi a rozdílné rychlosti jejich pohybu [41].

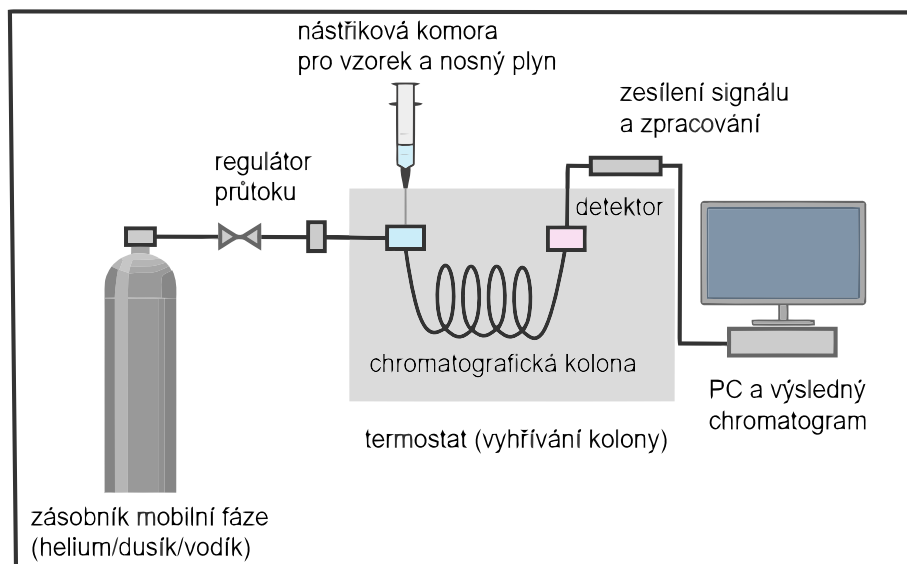
Chromatografii lze rozdělit podle způsobu umístění stacionární fáze na: kolonovou a planární. Mezi planární chromatografii patří papírová chromatografie (PC, angl. *paper chromatography*) a tenkovrstvá chromatografie (TLC, angl. *thin layer chromatography*), jako stacionární fáze se používá porézní vrstva (papír nebo vrstva na ploché desce). Druhý způsob rozdělení chromatografie je podle toho, je-li mobilní fáze plyn (GC, angl. *gas chromatography*), kapalina (LC, angl. *liquid chromatography*) nebo superkritická tekutina (SFC, angl. *supercritical fluid chromatography*). Pro stanovení steroidních hormonů ve vzorcích tělních tekutin živočichů se běžně používají kapalinová i plynová chromatografie. V následujících podkapitolách je proto stručný popis daných metod, včetně zhodnocení výhod a nevýhod jejich použití pro dané stanovení [33].

### 2.3.1 Plynová chromatografie (GC)

Plynová chromatografie separuje složky vzorku na základě distribuce mezi plynnou mobilní fází a kapalnou nebo pevnou stacionární fází. Vzorek je převeden do plynného stavu a dávkuje se na čelo chromatografické kolony. Eluce probíhá díky toku inertní plynné fáze kolonou. Mobilní fáze s molekulami analytu neinteraguje, ale pouze je unáší kolonou. Plynovou chromatografii lze rozdělit na dva typy: rozdělovací plynová chromatografie (GLC, angl. *gas-liquid chromatography*) a adsorpční plynová chromatografii (GSC, angl. *gas-solid chromatography*). Rozdělovací chromatografie má široké uplatnění ve všech vědních oborech, běžně se používá zkrácený název plynová chromatografie (GC). Zařízení pro plynovou chromatografii je zobrazeno na obrázku 7 a obsahuje tyto základní součásti: zdroj nosného plynu, regulátor průtoku, nástřiková komora, kolona, termostat, detektor a příslušné vyhodnocovací zařízení [33].

Nosný plyn mobilní fáze musí být chemicky inertní, nejběžnějším nosným plynem je helium, avšak používá se i argon, dusík nebo vodík. K dávkování vzorku se používají kalibrované mikrostřičky, které vzorek dávkují skrz silikonovou membránu nebo septum do vyhřívaného injektoru. Moderní plynové chromatografy pro nástřik využívají autoinjektory (zařízení, které automaticky dávkují vzorek do injektoru) a autosamplery (zařízení, které umožňuje automatické periodické analýzy). Málo těkavé analyty se před stanovením mohou převést na své těkavější deriváty [33].

V minulosti se pro většinu separací používaly náplňové kolony, v dnešních aplikacích byl tento typ kolon nahrazen účinnějšími kapilárními kolonami [41].



Obrázek 7: Schéma plynové chromatografie [33].

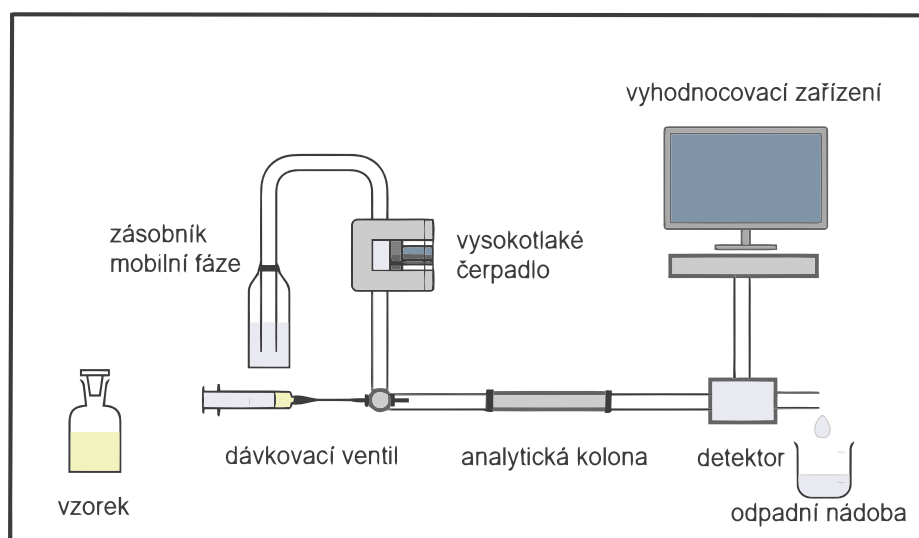
V plynové chromatografii lze používat desítky různých detektorů, mezi nejběžněji používané patří například: plamenově ionizační detektor (FID, angl. *flame ionization detector*), tepelně vodivostní detektor (TCD, angl. *thermal conductivity detector*) a hmotnostní spektrometr (MS, angl. *mass spectrometer*). Ideální detektor by měl mít adekvátní citlivost k danému analytu, velkou stabilitu, reprodukovatelnost, spolehlivost a nedestruktivní charakter vůči vzorku [33, 41].

Plynová chromatografie se nejčastěji využívá pro stanovení steroidních hormonů v kombinaci s hmotnostní detekcí (GC/MS). Steroidní hormony mají nízkou termální stabilitu i těkavost, proto je nutná derivatizace před GC/MS analýzou. Úspěšné derivatizace steroidů lze dosáhnout pomocí silylačních činidel nebo lze využít různé acetáty a estery. Metoda GC/MS pro stanovení steroidů z moči je oproti imunoanalytickým testům časově i finančně daleko náročnější, ale vhodnější z hlediska specificity a citlivosti [46, 47]. Mezi hlavní výhody použití GC/MS pro analýzu steroidních hormonů patří: vysoké chromatografické rozlišení, citlivost, malý objem vzorku a automatizace. Nevýhodou metody, jak již bylo zmíněno, je převedení na těkavé analyty pomocí derivatizace, časová náročnost a vysoká teplota, která může analyty rozkládat [47].

### 2.3.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC, angl. *high performance liquid chromatography*) je dalším typem eluční chromatografie. Módy HPLC lze dále klasifikovat

podle separačních mechanismů nebo typu stacionární fáze na chromatografii: rozdělovací, adsorpční, iontovou, vylučovací, afinitní a chirální [33]. Zařízení pro HPLC obsahuje tyto základní části: zásobník mobilní fáze, vysokotlaké čerpadlo, dávkovací zařízení, kolonu, detektor a vyhodnocovací zařízení [48]. Základní schéma zapojení typického zařízení pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii je zobrazeno na obrázku 8.



Obrázek 8: Schéma HPLC [33].

Kapalný vzorek obsahující rozpuštěné analyty je unášen na kolonu se stacionární fází, která je tvořena povrchově porézními částicemi nebo zcela porézními mikročásticemi (silikagel, alumina, ionově výměnná pryskyřice) [33]. Podle polaritativy mobilní a stacionární fáze dělíme kapalinovou chromatografii na tzv. systémy s normálními a reverzními fázemi. Chromatografie v systému s normálními fázemi používá nepolární mobilní fázi a polární stacionární fázi. Chromatografie v systému obrácenými fázemi používá polární mobilní fázi, jako je například voda ve směsi s methanolem nebo acetonitrilem a nepolární stacionární fázi, kterou je nejčastěji silikagel s navázaným uhlovodíkovým zbytkem [33, 48].

Vzorky jsou dávkovány pomocí injekční stříkačky do dávkovacího ventilu (dávkovací smyčka). Tento typ dávkovacího ventilu umožňuje dávkovat objem vzorku standardně od 1 do 100  $\mu\text{l}$ , ale lze i více. V dnešní době mnoho přístrojů pro HPLC zahrnuje autosampler s automatickým dávkovačem.

Velmi často se mezi dávkovací ventil a kolonu umísťuje předkolona, která je naplněna stejnou stacionární fází, jako je analytická kolona. Hlavní účel předkolony je zabránění

vstupu nečistot a kontaminace analytické kolony. Předkolona se pravidelně vyměňuje a pomáhá prodloužit životnost kolony.

Kolony pro HPLC zařízení jsou zpravidla vyrobeny z nerezové oceli, v některých případech mohou být použity kolony ze skla nebo plastu. Na rozdíl od plynové chromatografie se ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii používají výhradně přímé kolony. Většina používaných kolon má délku v rozmezí 5–25 cm s vnitřním průměrem od 3–5 mm. Použitím tzv. mikrokolon s vnitřním průměrem 1–4,6 mm a délkou 3–7,5 cm, lze dosáhnout rychlé separace s minimální spotřebou rozpouštědel. Na přelomu dvacátého a jednadvacátého století byla použita instrumentace stacionární fáze s obsahem částic o velikosti menší než 2 μm. Technika se označuje jako ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC, angl. *ultra-high performance liquid chromatography*) a nabízí výrazně větší účinnost, zkrácení doby analýzy a úsporu rozpouštědel.

Nejběžněji se pro HPLC zařízení používají detektory, které jsou založeny na absorpci ultrafialového nebo viditelného záření (s nastavitelnou vlnovou délkou nebo s diodovým polem). Široké uplatnění poskytuje kombinace HPLC s hmotnostní spektrometrií, která umožňuje velmi dobrou identifikaci separovaných analytů [33].

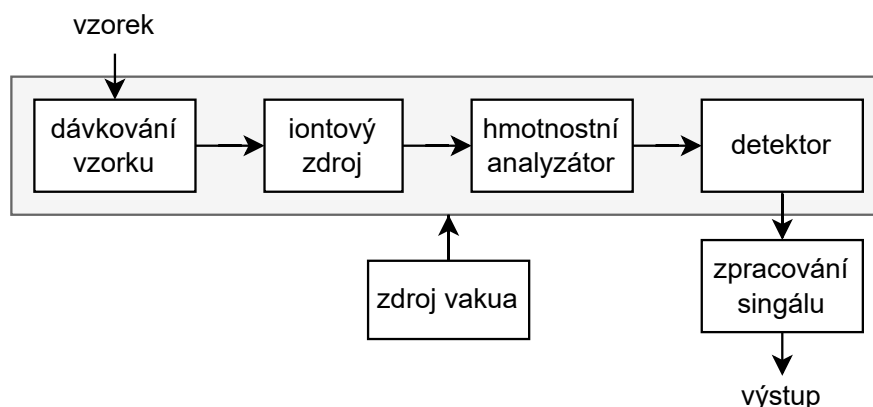
Při HPLC analýze steroidních hormonů se nejčastěji pracuje v systému s reverzní (obrácenou) fází. Vhodnou stacionární fází je proto modifikovaný silikagel C18. Vyhovující mobilní fáze obsahuje organickou složku (acetonitril nebo methanol) a vodnou složku (čistá voda nebo okyselená kyselinou mravenčí/octovou) [49].

Pro přímou separaci steroidních hormonů se nejčastěji volí detekce pomocí hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS). Velkou výhodou oproti GC/MS je analýza netěkavých vzorků a nízká teplota během analýzy. Derivatizace vzorku v tomto případě není podmínkou, ale v některých případech může být i u HPLC/MS prospěšná, například pro zlepšení citlivosti a rozlišení. Další výhodou je kratší doba analýzy, malý objem vzorku a automatizace analýzy. Hlavní nevýhody HPLC/MS zahrnují: obavy z rozpustnosti, nižší chromatografické rozlišení a vysoké náklady [47].

## 2.4 Hmotnostní spektrometrie ve spojení s HPLC a GC pro stanovení steroidních hormonů

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda, která umožňuje stanovit hmotnost jednotlivých atomů či celých molekul v analyzovaném vzorku. Výše v textu bylo zmíněno, že se pro stanovení steroidních hormonů pomocí separačních metod (HPLC, GC) nejčastěji používá detekce pomocí hmotnostní spektrometrie. V následujícím textu jsou proto krátce popsány vhodné ionizační techniky, hmotnostní analyzátoři a detektory iontů pro spojení hmotnostní spektrometrie s HPLC a GC [46, 47].

Zařízení pro hmotnostní spektrometrii se skládá se tří základních komponent: iontového zdroje, hmotnostního analyzátoři a detektoru. Blokové schéma hmotnostního spektrometru je zobrazeno na obrázku 9.



Obrázek 9: Schéma hmotnostního analyzátoři [33].

Analyty vzorku jsou nejprve převedeny na ionizované částice v iontovém zdroji. Následně jsou vzniklé ionty rozděleny na základě poměru své hmotnosti a náboje ( $m/z$ ) v analyzátoři. Rozdělené ionty o různých poměrech hmotnosti a náboje dopadají na detektor a následně je vyhodnocen grafický záznam závislosti  $m/z$ . Celý systém hmotnostního spektrometru pracuje ve vakuu ( $10^{-1}$ – $10^5$  Pa), aby se předešlo srážkám vzniklých iontů s molekulami vzduchu. Výjimkou jsou iontové zdroje, které pracují za atmosférického tlaku [33].

Malé množství vzorku je dávkováno do iontového zdroje, kde jsou složky vzorku ionizovány a převedeny do plynného skupenství díky vzájemným srážkám s elektrony,

fotony nebo molekulami [33]. Pro spojení HPLC/MS se nejvíce využívá technika ionizace pomocí elektrospreje (ESI, angl. *electrospray*) v pozitivním i negativním módu. Dále se běžně využívá chemická ionizace za atmosferického tlaku (APCI, angl. *atmospheric pressure chemical ionization*) a fotoionizace za atmosferického tlaku (APPI, angl. *atmospheric pressure photoionization*) v obou módech. Progestiny se měří v kladném ionizačním módu a poskytují  $(M+H)^+$  [50]. GC/MS systém využívá pro stanovení steroidních hormonů elektronovou ionizaci (EI, angl. *electron ionization*) [33].

Ideální hmotnostní analyzátor by měl být schopen rozlišit velmi malé rozdíly v hmotnosti iontů a zároveň by měl propouštět velké množství příslušných iontů, aby jejich dopadem na detektor byl vyvolán měřitelný signál [33]. V současnosti je pro analýzu steroidních hormonů nejvyužívanějším analyzátozem trojitý kvadrupól (QQQ, angl. *triple quadrupole*) [51, 52]. Dále lze využít analyzátor doby letu (TOF, angl. *time of flight*), sférickou iontovou past a hybridní analyzátor kvadrupól spojený s analyzátozem doby letu (Q-TOF, angl. *quadrupole time of flight*) [53].

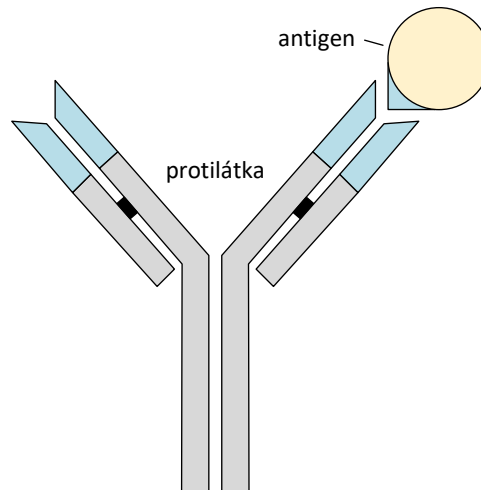
V dnešní době lze použít hned několik typů iontových převodníků pro hmotnostní spektrometrii. Nejobvyklejším detektorem v hmotnostní spektrometrii je násobič elektronů, princip je obdobný jako u fotonásobičů, které se používají v optických metodách. Dopadem iontů na katodu jsou vyraženy elektrony, které se odrážejí od stěn násobiče, tím jsou generovány další elektrony a zesiluje se výsledný signál. Dále můžeme použít Faradayovy detektory nebo plošné detektory např. mikrokanálovou destičku [33].

## 2.5 Imunoanalytické metody

Základní princip imunoanalýzy spočívá v imunochemické reverzibilní reakci, kterou znázorňuje rovnice 1. Při ní antigen (Ag) reaguje s protilátkou (Ab) za vzniku imunokomplexu (AbAg):



Vazba protilátka-antigen (imunokomplex), znázorněna na obr. 10, závisí na hydrofóbních vazbách, vodíkových můstcích, van der Waalsových silách a na interakcích s ionty [54]. Antigeny jsou látky, které imunitní systém rozeznává jako cizí. Mohou být přirozeného nebo syntetického původu. Protilátky lze rozdělit podle způsobu přípravy na monoklonální a polyklonální.



Obrázek 10: Vazba protilátka-antigen (imunokomplex) [55].

Monoklonální protilátky neprodukuje přímo organismus, ale daná buněčná kultura. V prvním kroku probíhá imunizace zvířete příslušným antigenem, následně se ze sleziny získají lymfocyty produkující protilátky. Dalším krokem hybridizace s nádorovými buňkami, kde dochází k fúzi buněk a vytvoření tzv. hybridomů. Vhodnou selekcí hybridomů (klonováním) jsou vybrány ty klony, které produkují protilátky pro danou antigenní determinantu antigenu. Takto vyrobená protilátka je produktem jednoho klonu s jedním typem vazebného místa a reprodukovatelnou vlastností.

Polyklonální protilátky se připravují cílenou imunizací zvířat antigenem. Po aplikaci směsi antigenů je zvýšena imunitní reakce na podané antigeny a následně v krevním séru zvířete vzniká směs protilátek proti různým antigenním determinantům. Jedná se o nereprodukovatelný proces a opakováním nelze připravit identické protilátky [55].

Imunoanalýza umožňuje kvantifikovat molekuly v biologických tekutinách, extraktech tkání či supernatantech buněčných kultur. Mezi hlavní výhody imunoanalytických metod patří snadná proveditelnost, možnost automatizace, mimořádná citlivost s detekčními limity dosahujícími hodnot  $10^{-25}$ – $10^{-20} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a menší finanční náročnost oproti jiným metodám. Imunoanalýza se využívá zejména ke stanovení látek s velmi nízkou koncentrací, jedná se například o hormony, nádorové markery, cytokiny, léčivé látky nebo viry [54].

### 2.5.1 Dělení imunoanalytických metod

Imunoanalytické metody lze rozdělit z mnoha aspektů, některé z nich jsou níže krátce popsány. Dělení může být dle:



- Přidání konjugátu - metody přímé a nepřímé. U přímé metody se konjugát váže na antigen ihned a u nepřímé metody se konjugát se přidává, až po vytvoření imunokomplexu.
- Počtu antigenů - kompetitivní a nekompetitivní. Kompetitivní metody využívají dva antigeny soutěžících o vazebné místo na protilátce a nekompetitivní využívají jeden antigen, který se naváže na protilátky v nadbytku.
- Prostředí - homogenní a heterogenní. Homogenní imunoanalýza probíhá přímo v reakční směsi a není před ní nutná separace. Heterogenní imunoanalýza vyžaduje separaci vázaných a volných antigenů.
- Použité techniky k měření signálu - radioimunoanalytické (izotopové) metody (RIA, angl. *radioimmunoassay*), enzymová imunoanalýza (EIA, angl. *enzyme immunoassay*), luminiscenční imunoanalýza (LIA, angl. *luminoimmunoassay*) a fluorescenční imunoanalýza (FIA, angl. *fluorescence immunoassay*) [56].

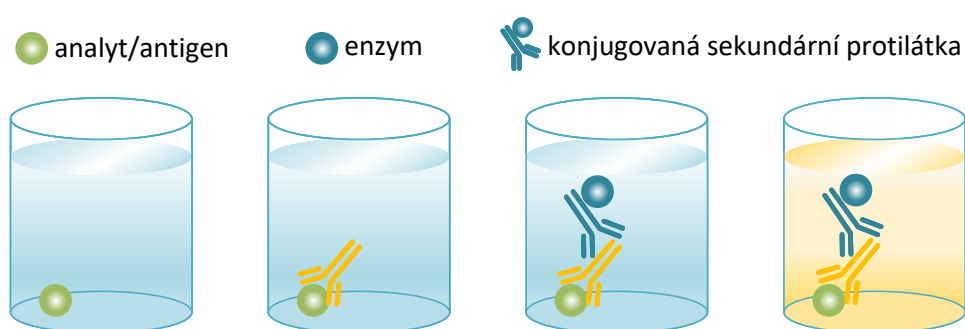
## 2.5.2 ELISA

Enzymová imunoanalýza s vázaným enzymem na imunosorbent (ELISA, angl. *enzyme-linked immuno sorbent assay*), je nejznámější heterogenní EIA. ELISA byla vyvinuta na začátku sedmdesátých let minulého století jako náhrada radioimunoanalýzy, která při své aplikaci využívá radionuklidy. ELISA k detekci antigenu (Ag) využívá protilátku (Ab) konjugovanou enzymem (E). Nejčastěji používanými enzymy detekčních nebo sekundárních protilátek jsou: křemová peroxidáza a alkalická fosfatáza. Měření se nejčastěji provádí v 96-jamkových mikrotitračních polystyrenových destičkách, k jejichž dnu mohou imunokomplexy pevně přilnout a následně je lze detekovat. Detekce probíhá za přítomnosti specifické reakce, která je katalyzovaná daným enzymem. Výchozí bezbarvý substrát je přeměněn na barevný produkt, přičemž intenzita zabarvení je přímo úměrná koncentraci stanovovaného analytu. Koncentrace analytu je zjištěna na základě absorpce světelného záření ve spektrofotometru. ELISA metodu rozdělujeme na několik typů podle uspořádání jednotlivých komponentů reakce - přímá, nepřímá, kompetitivní a sendvičová [55].

Přímá ELISA metoda má nejjednodušší uspořádání. Při stanovení dochází k reakci antigenu imobilizovaného na pevný povrch s protilátkou značenou enzymem. Následuje reakce se substrátem za vzniku měřitelné barevné změny.

Nepřímá ELISA metoda probíhá následovně: nejprve se na antigen naváže primární protilátka, následuje krok přidání značené protilátky proti primární protilátce (tzv. sekundární protilátky), která je v závěru detekována. Tímto způsobem uspořádání je zajištěna větší specifita reakce a vyšší citlivost.

Kompetitivní ELISA metoda spočívá v kompetici (soutěžení) cílového antigenu s referenčním značeným antigenem o vazebné místo na dodané protilátce (obr. 11). jinak řeženo, referenční značená protilátka soutěží s hledanou neznačenou protilátkou o antigen. Kompetitivní uspořádání je užitečné pro měření koncentrace antigenu v komplexních směsích a lze použít surové, nepurifikované vzorky.



Obrázek 11: Kompetitivní ELISA [55].

Sendvičová ELISA metoda se vyznačuje speciálním uspořádáním, kdy jsou na dno jamky navázány imobilizované protilátky proti hledanému antigenu (tzv. záchytné protilátky). V dalším kroku je do jamky nanesen testovaný vzorek s hledaným antigenem a navazuje promytí nenavázaného antigenu. V posledním kroku je přidána značená protilátka proti danému antigenu, která je v závěru detekována [57, 58].

ELISA metoda je vhodná pro stanovení pohlavních hormonů v moči, plazmě, slinách, mléce nebo trusu, zejména díky své jednoduchosti, rychlosti a levnějším nákladům na analýzu vzorků. Mezi nevýhody metody patří nižší specifita a přesnost [59, 60].

## 2.6 Volba vhodné metody pro stanovení koncentrace progesteronu v tělních tekutinách netopýrů

Vhodná metoda pro stanovení koncentrace progesteronu v tělních tekutinách netopýrů byla vybírána podle předem daných požadavků na analýzu. Jedním z důležitých požadavků na výběr vhodné metody byla nutnost použití velmi malých objemů vzorku,

kteří mohou být řádově až v jednotkách  $\mu\text{l}$ . Dále bylo potřeba vybrat metodu schopnou stanovit koncentraci progesteronu na velmi nízké hladině, konkrétně v jednotkách  $\text{ng/ml}$ . Také bylo potřeba přihlídnout k dostupnosti chemických látek, přístrojovému vybavení laboratoře a celkově k finančním i časovým nákladům na analýzu. Po zhodnocení všech požadavků byla pro stanovení koncentrace progesteronu vybrána imunoanalytická metoda, konkrétně ELISA. Tabulka 2 shrnuje výhody a nevýhody použití imunoanalýzy oproti chromatografickým metodám ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC/MS, HPLC/MS).

Tabulka 2: Srovnávací tabulka pro jednotlivé měřicí techniky [47, 59].

Metoda	Technika	Výhody	Nevýhody
Imunoanalýza	ELISA	Detekce nízkých koncentrací analytu, vyšší citlivost, rychlá odezva, jednoduchost, cenová dostupnost, malý objem vzorků (např. moč i krev 1–300 $\mu\text{l}$ ).	Zkřížená reaktivita látek může vyvolat falešné pozitivní odezvy, schopnost zachytit pouze omezené množství látek.
Chromatografie s hmotnostní spektrometrií	GC/MS	Vysoké chromatografické rozlišení, možnost automatizace, spolehlivost, citlivost, malý objem vzorků (např. krev 0,1–2 ml, moč 0,1–5 ml).	Použití pouze pro těkavé analyty, nutná derivatizace před analýzou, může docházet k rozkladu analytu při vysoké teplotě, vysoké provozní náklady.
	HPLC/MS	Není nutná derivatizace před analýzou, možnost automatizace, kratší čas analýzy, malý objem vzorků (např. krev 0,1–2 ml, moč 0,1–5 ml).	Omezená rozpustnost analytů v rozpouštědlech, nižší chromatografické rozlišení, vysoké provozní náklady.

## 2.7 Analýza progesteronu

Savci, kteří mají podobnou velikost těla jako netopýři, obecně produkují velké vrhy nových mláďat s vlastností rychlého růstu a kratší délkou života. Netopýři žijící v mírném podnebném pásmu jsou z tohoto pohledu neobvyklí savci hlavně z důvodu odlišného reprodukčního cyklu. Každý rok netopýři rodí pouze jedno až dvě mláďata, mají pomalý růst a delší délku života oproti jiným stejně velkým savcům [61]. Další neobvyklostí pro netopýře je opožděná ovulace a oplodnění spermií, která je uchovaná a životaschopná přes celou dobu hibernace [62, 63]. Díky těmto neobvyklým vlastnostem se vědci v dnešní době snaží stále více porozumět reprodukčnímu mechanismu netopýřů.

Na základě spolupráce Ústavu analytické chemie AV ČR s paní magistrou Kateřinou Zukalovou, která dokončuje své doktorské studium na Ústavu ekologie a chorob zvířat, zvěře, ryb a včel na Fakultě veterinární hygieny a ekologie Veterinární univerzity v Brně, byla navíc pro tuto práci poskytnutá potřebná data z analýzy progesteronu ve vzorku krve a trusu netopýrů. Pro analýzu progesteronu z krve a trusu, byla již dříve paní magistrou vybrána imunoanalýza, konkrétně ELISA. Získání výsledků ze vzorku krve a trusu netopýrů vedlo k myšlence pokusit se o stanovení progesteronu i z moči a porovnat hodnoty koncentrace progesteronu v těchto různých matricích. Dále bylo cílem v budoucnu redukovat invazivní metody odběru vzorku u netopýrů a na základě naměřených hodnot progesteronu se pokusit vysvětlit některé jejich reprodukční mechanismy a strategie.

Při probíhající rekonstrukci budovy byla nalezena kolonie samic netopýra rezavého (*Nyctalus noctula*) a vznikla tím jedinečná příležitost získat vzorky krve a trusu od 22 samic tohoto netopýra. Na základě analýzy těchto vzorků bylo možné monitorovat březost samic a sledovat v jakých jednotkách se pohybují koncentrace pohlavního hormonu progesteronu.

Nejprve byla provedena identifikace zvířete, zvážení, označení a určení věku. Následně byly samice uchovány 2 týdny při 6 °C v uměle vytvořeném prostředí pro hibernaci a standardizaci počátečních podmínek. Pro experiment byly samice rozděleny náhodně do dvou skupin, přičemž jedna skupina měla uměle vytvořenou kratší dobu hibernace o 7 dní než skupina druhá. Po skončení hibernace byly samice uchovány při okolní teplotě 22 °C v dřevěných bednách s dostatkem potravy na bázi moučných červů a doplňky stravy na posílení imunity. Z neznámých příčin během zajetí zemřely dvě samice. Pro analýzu progesteronu byly nakonec získány vzorky krve od 20 samic [64].

### **2.7.1 Analýza progesteronu z krve netopýrů**

Následující část práce pojednává detailně o postupech a výsledcích analýzy progesteronu ze vzorků krve, které byly prováděny na Fakultě veterinární hygieny a ekologie Veterinární univerzity v Brně. Výsledky z této analýzy byly nutným předpokladem pro vypracování mé diplomové práce.

Krev byla odebrána každé samici netopýra třikrát, konkrétně se jednalo o měsíc duben, květen a červen. První odběr v dubnu byl za předpokladu počáteční fáze těhotenství (7 dní po konci hibernace). Druhý odběr v květnu představoval pozdní fázi těhotenství a třetí

odběr v červnu byl krátce po porodu [64]. Místo odběru krve bylo dezinfikováno alkoholem, poté byly aplikovány asi 2  $\mu$ l heparinu na kůži a krevní céva byla propíchnuta sterilní jehlou. Vzorek krve byl odebrán pomocí automatické pipety se sterilní heparizovanou špičkou a umístěn do předem připravené zkumavky. Tato metoda odběru může poskytnout až 200  $\mu$ l krve, což je maximální povolený a bezpečný objem pro savce takové velikosti [65]. Po odběru bylo místo stlačeno a utěsněno kapkou absorbovatelného chirurgického tkáňového lepidla (Surgibond, SMI AG, Belgie) a samicím netopýra rezavého byla dodaná potrava doplněná o glukózu. Plazma byla oddělena centrifugací a uchovaná v mrazničce při  $-20^{\circ}\text{C}$  do analýzy vzorku. Koncentrace progesteronu v plazmě byla stanovena pomocí zakoupené soupravy na měření progesteronu metodou ELISA.

Většina samic z obou skupin porodila jedno mládě. Výjimkou byla jediná samice, která potratila dvě mláďata dva dny před úspěšnými porody ostatních samic netopýra rezavého. Z uvedených dat vyplývá, že délka hibernace ani vyšší koncentrace progesteronu neměla vliv na počet narozených mláďat. Naopak se ukázalo, že na počet narozených mláďat má vliv váha těla samice, kdy lehčí samice rodí jedno mládě a těžší rodí mláďata dvě. Samice se střední hmotností z počátku tvoří v těle dva plody, z nichž jeden plod se během gestace resorbuje a následně se rodí jedno mládě. Obě experimentální skupiny se výrazně lišily v délce březosti. Déle hibernující samice zkracovaly svoji březost přibližně o dva až tři dny, aby mláďata mohla růst standardně během letní sezóny s bohatými potravinovými zdroji [64].

Naměřené hodnoty progesteronu naznačují, že k úspěšné březosti netopýra rezavého se maximální koncentrace progesteronu v plazmě pohybuje přibližně v rozmezí 200–700 ng/ml. Konkrétně z naměřených dat v počáteční fázi těhotenství byla naměřená nejnižší průměrná koncentrace okolo 288 ng/ml a nejvyšší průměrná koncentrace 568 ng/ml. V pozdní fázi těhotenství byla naměřená průměrná nejnižší hodnota koncentrace 396 ng/ml a nejvyšší průměrná hodnota 648 ng/ml. Po porodu hodnoty koncentrace progesteronu klesly na průměrnou nejnižší hodnotu 80 ng/ml a nejvyšší průměrnou hodnotu 248 ng/ml. Přesné naměřené koncentrace progesteronu v krvi pro identifikované samice netopýra rezavého jsou k dispozici v příloze A v tabulce 9 a 10.

Na základě získaných dat ze vzorku krve, bylo zjištěno v jakých koncentracích a jednotkách se pohybuje koncentrace progesteronu u netopýra rezavého v období březosti. Řádově byly hodnoty v desítkách až stovkách ng/ml, což poskytlo významnou informaci

pro vzorky trusu a moči. Ve vzorcích trusu a moči s velkou pravděpodobností jsou koncentrace progesteronu v nižších hodnotách (řádově jednotky až desítky ng/ml), než v krevní plazmě, a proto bylo potřeba přizpůsobit způsob měření i zakoupení ELISA kitu v odpovídajícím rozsahu koncentrací.

### **2.7.2 Analýza progesteronu z trusu netopýrů**

Analýza progesteronu z trusu netopýrů byla provedena od stejných samic netopýra rezavého, jako v případě předchozí analýzy z krve, vzorky byly získány v dubnu, květnu a červnu [64]. Odebraný trus byl uchován v mrazničce při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do analýzy. Vzorek trusu byl před analýzou vysušen a zhomogenizován, následně byl progesteron stanoven v ethanolickém extraktu pomocí imunoanalytické metody, konkrétně zakoupeným kompetitivním ELISA kitem.

Na začátku těhotenství byly naměřeny hodnoty v rozmezí 11–35 ng progesteronu vztažené na 200 mg vysušeného trusu. V pozdní fázi těhotenství byly hodnoty progesteronu přibližně 27–77 ng/200 mg vysušeného trusu a po porodu opět hodnoty klesly do rozmezí 10–41 ng/200 mg vysušeného trusu. Nalezené koncentrace progesteronu v suchém vzorku odpovídají v přepočtu koncentracím v desítkách ng/ml extraktu. Zjištěné koncentrace progesteronu v trusu pro identifikované samice netopýra rezavého jsou k dispozici v příloze A tabulce 11. Tyto výsledky, ač nejsou přímou součástí méj práce, byly nezbytné pro pořízení vhodného ELISA kitu s odpovídajícím koncentračním rozsahem pro předpokládané analýzy obsahu progesteronu v moči netopýrů.

### **2.7.3 Analýza progesteronu z moči netopýrů**

Analýza progesteronu ze vzorku moči je u většiny savců takřka bezproblémová, z důvodu snadného odběru a dostupnosti poměrně dostatečného objemu vzorku. Nicméně u netopýrů představuje právě odběr moči v tekutém stavu velké komplikace. Takřka všechny vědecké publikace, které jsou zaměřeny na zkoumání života netopýrů k analýze používají invazivní metody (odběr krve), popřípadě výjimečně neinvazivní metodu (odběr trusu). K odběru moči u netopýrů a následné analýze nebyly nalezeny téměř žádné publikace. Proto je cílem této práce pokusit se vhodným způsobem o analýzu progesteronu z moči netopýrů.

Získání vzorku trusu trvá významně delší čas, než získání moči. Sběr vzorků moči je jednodušší, jelikož při odchycení netopýři vlivem velkého stresu ihned vypustí samovolně svoji moč. Jak již bylo zmíněno v textu, netopýři jsou v mnoha zemích chráněná zvířata, proto se odběry vzorků musí provádět s určitou opatrností a za předem daných podmínek, proto by úspěšná analýza progesteronu z moči představovala výrazný posun v jednoduchosti a dostupnosti vzorků. Ovšem, jak již bylo zmíněno, získání moči v tekutém stavu je takřka nereálné, jelikož netopýr je velmi malý savec a i jeho moč má velmi malý objem (řádově jsou to desítky až stovky  $\mu\text{l}$ ). Řešení představuje pohlcení vzorku tekuté moči do savého materiálu a jeho následná analýza. Obdobným způsobem lze analyzovat například moč novorozenců, kdy se na plenku s močí přiloží filtrační papír, který do sebe vsákne určité množství moči pro analýzu a získání požadovaných informací.

Následující podkapitoly se zabývají experimentální simulací „vymočení netopýra“, vsáknutí roztoku progesteronu o předem známé koncentraci do vhodného absorpčního materiálu, výběrem vhodných extrakčních podmínek a následným stanovením koncentrace progesteronu, včetně zhodnocení experimentu a proměření reálného vzorku. Simulace moči na vhodném papírku je znázorněna v příloze B na obrázku 20.

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Použité chemikálie

- Ethanol 96%, Sigma-Aldrich, USA
- Methanol p.a. 99,9%, Sigma-Aldrich, USA
- Ethylester kyseliny octové, LACHEMA, ČR
- Hexan p.a., Lach-Ner, ČR
- Progesteron, BioReagent, Sigma-Aldrich, USA
- Progesteron standard 32,000 pg/ml, Invitrogen, USA
- Testovací pufr koncentrovaný (5x), Invitrogen, USA
- Progesteron protilátka, Invitrogen, USA
- Progesteron konjugát, Invitrogen, USA
- Promývací pufr koncentrovaný (20x), Invitrogen, USA
- Tetramethylbenzidin substrát (TMB), Invitrogen, USA
- Zastavovací roztok (stop roztok) s obsahem 1M HCl, Invitrogen, USA

### 3.2 Použité přístroje a ostatní materiály

- Běžné laboratorní vybavení (sklo, kádinky, baňky)
- Analytické váhy, KERN, Německo
- Mikropipety, Thermo Fischer Scientific, USA
- Koncentrátor, Eppendorf, Německo
- Centrifuga Hettich EBA, Německo
- Třepačka orbitální Heidolph Rotamax 120, Německo
- Třepačka Mini-Shaker, 3D, Sunflower, bioSan, Lotyšsko
- Filtrační papír Whatman 43, UK
- Filtrační papír (archy), ČR
- Vícevrstvý papír z buničiny, ČR
- Promývačka mikrodestiček BioTek, Agilent technologies, USA
- Progesteron kompetitivní ELISA kit, Thermo Fischer Scientific, USA
- 96-jamkové destičky potažené protilátkou (kozí anti-myší IgG), Invitrogen, USA



- Hybridní zobrazovací reader Cytation 1 BioTek, Agilent technologies, USA
- PC se softwarem pro řízení a sběr dat readeru Cytation 1
- Plastové zkumavky s uzávěrem 13 a 2 ml, Eppendorf, Německo

### **3.3 Obecný postup extrakce a úpravy vzorku před stanovením**

Tato podkapitola uvádí obecný postup extrakce a úpravy vzorku před stanovením progesteronu, který byl aplikován na různá rozpouštědla, čas extrakce a teplotu odparku.

Na vhodný absorpční materiál byl pomocí automatické pipety nanesen standardní roztok progesteronu o známé koncentraci a objemu, tak aby byla provedena simulace vymočení netopýra na vhodný materiál. Po zaschnutí na vzduchu byl absorpční materiál vložen do 12 ml extrakčního rozpouštědla v 13 ml plastových zkumavkách s uzávěrem. Takto připravené zkumavky byly vloženy do orbinální třepačky na předem určenou dobu pro extrakci. Po uplynutí času byla zkumavka vložena na 10 minut do centrifugy, při 2000 otáčkách za minutu. Přesný objem 1 ml supernatantu byl přenesen do čisté 2 ml plastové mikrozkušavky a následně odpařen v koncentrátoru při 45 °C do sucha. Takto připravené vzorky byly uchovány v mrazničce při -20 °C, než byla následující den provedena analýza. Koncentrace progesteronu po extrakci a odpaření byla stanovena pomocí ELISA kitu, podrobný postup stanovení popisuje následující podkapitola.

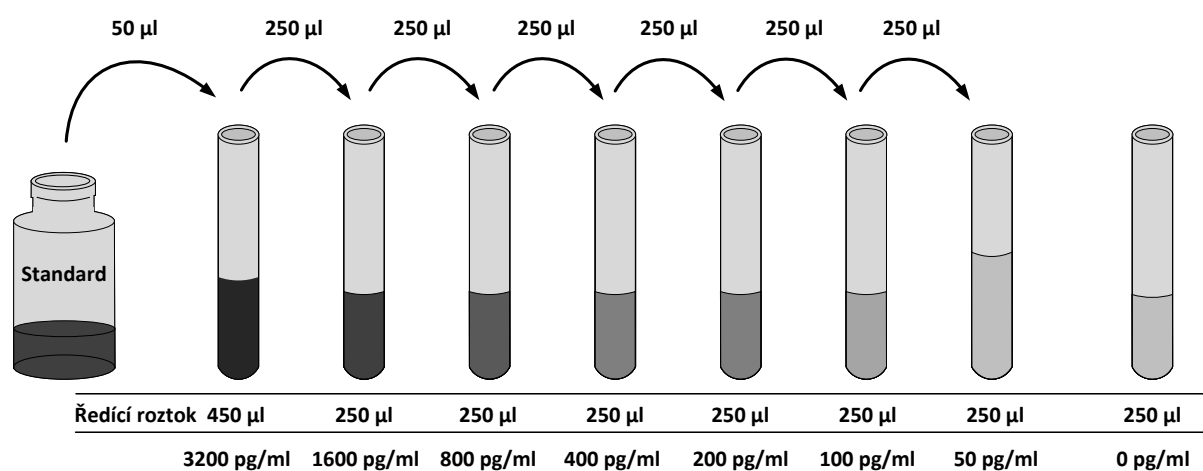
### **3.4 Stanovení koncentrace progesteronu metodou ELISA**

Pro stanovení koncentrace progesteronu ve vybraných vzorcích byl použit Progesteron kompetitivní ELISA kit (Thermo Fischer Scientific). Při stanovení progesteronu bylo postupováno dle kroků, které byly v příloženém návodu od výrobce ELISA kitu [66].

Nejprve byl připraven promývací pufr zředěním 15 ml koncentrovaného promývacího pufru s 285 ml deonizované vody. Testovací pufr byl připraven obdobným způsobem, jako roztok promývací, 14 ml testovacího pufru bylo smícháno s 56 ml deonizované vody. Dalším krokem byla příprava vzorku k analýze. K odpařeným extraktům v plastových mikrozkušavkách bylo přidáno 100  $\mu$ l 96% ethanolu a 400  $\mu$ l testovacího pufru. Vzorky

byly dobře promíchány pomocí třepačky a inkubovány po dobu 10 minut, aby se zajistilo úplné rozpuštění progesteronu.

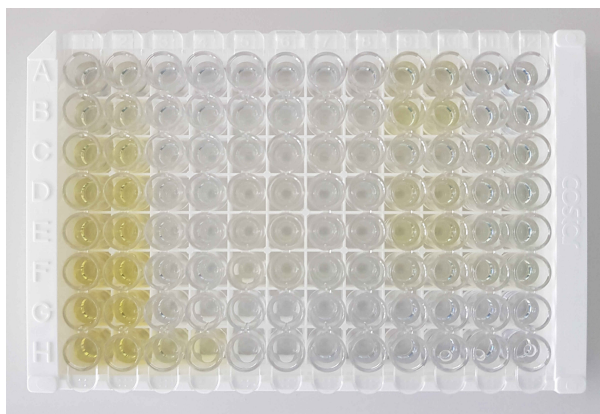
Pro stanovení byly tímto způsobem připraveny roztoky kalibrační řady o koncentracích progesteronu 3200, 1600, 800, 400, 200, 100, 50 a 0 pg/ml. Roztok pro kalibrační řadu s koncentrací 3200 pg/ml byl připraven odpipetováním 50  $\mu$ l standardního roztoku s koncentrací 32000 pg/ml progesteronu (součást kitu) do 450  $\mu$ l testovacího pufru. Dále bylo do sedmi plastových zkumavek odpipetováno 250  $\mu$ l testovacího pufru a sériovým ředěním, které je zobrazeno na obrázku 12, byla připravená celá kalibrační řada pro měření.



Obrázek 12: Schéma přípravy roztoků kalibrační řady [66].

Do předem nachystané 96-jamkové destičky bylo paralelně odpipetováno do každé jamky 50  $\mu$ l vzorku nebo roztoku kalibrační řady. Následně bylo do každé jamky odpipetováno 25  $\mu$ l progesteronové protilátky (součást kitu) a roztoky v mikrodestičce získaly fialové zabarvení. Takto připravená destička byla přikrytá hliníkovou folií a za stálého míchání v třepačce inkubována po dobu 2 hodin. Po uplynutí potřebného času na inkubaci byla destička vložena do promývačky mikrodestiček, přítomné roztoky byly odsáty a jamky promyty čtyřikrát 300  $\mu$ l promývacího pufru. Po důkladném promytí bylo do každé jamky odpipetováno 100  $\mu$ l substrátu tetramethylbenzidinu (součást kitu). Roztok substrátu tetramethylbenzidinu byl v jamkách mikrodestičky zabarvený do modré barvy.

Dalším krokem byla inkubace po dobu 30 minut, tentokrát bez třepání. Po uplynutí potřebného času na inkubaci bylo do každé jamky odpipetováno 50  $\mu$ l zastavovacího



Obrázek 13: Připravená 96-jamková destička pro měření absorbance roztoků.

roztoku, čímž proběhla změna barvy z modré na žlutou. Nižší koncentrace progesteronu měly žluté zabarvení sytější než koncentrace vyšší. Finální žlutě zabarvená 96-jamková destička je zobrazená na obrázku 13.

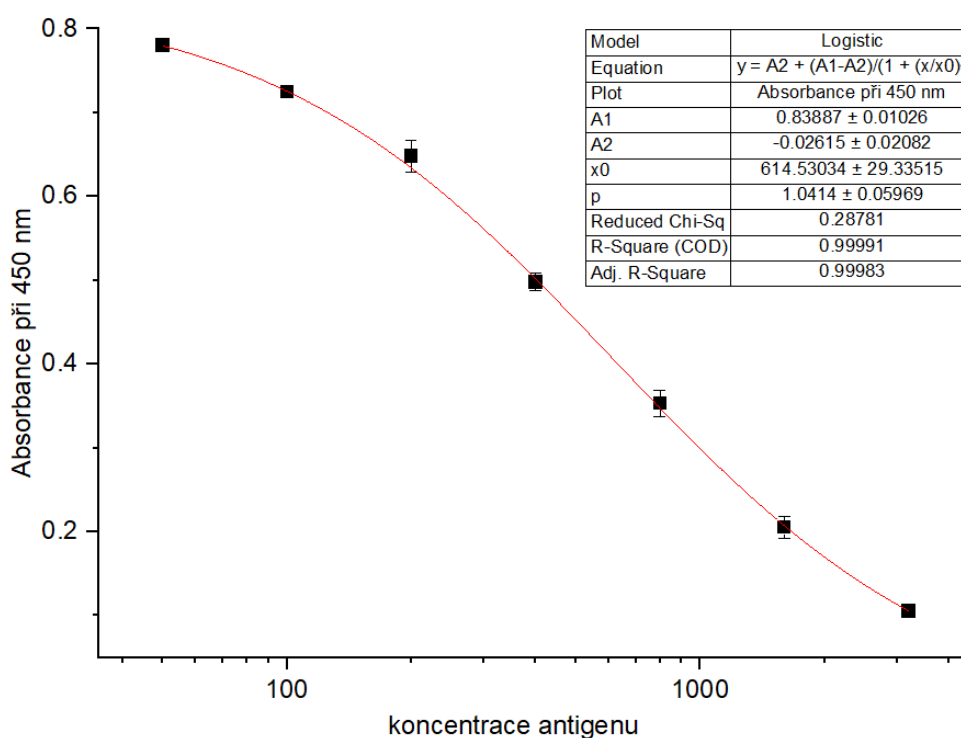
Pomocí hybridního zobrazovacího readeru Cytation 1 BioTek byla odečtena absorbance při 450 nm. Také byla odečtená absorbance při 630 nm, což bylo použito ke korekci pozadí. Kalibrační závislost byla získaná změřením absorbance řady kalibračních roztoků viz výše.

Vyhodnocení výsledků z ELISA měření bylo zpracováno pomocí programu Origin (OriginLab Corporation). Programem byla sestavená sigmoidní standardní křivka, podle které byly následně vyhodnoceny koncentrace progesteronu v pg/ml pro testované vzorky.

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Kalibrační závislost pro stanovení progesteronu ELISA metodou

Podle postupu uvedeného v odstavci 3.4 byla sestrojena závislost absorbance finálního ELISA roztoku na koncentraci v původním kalibračním roztoku.



Obrázek 14: Graf kalibrační řady standardu progesteronu.

Vynesením hodnot absorbance proti hodnotám koncentrace v logaritmickém měřítku byla získaná sigmoidní standardní křivka, kterou zobrazuje obrázek 14. Křivka je logaritmickou transformací na ose x částečně linearizovaná, ale obsahuje i okrajové nelinearizované části, kde se nachází pracovní rozsah metody. U vzorků bylo nutné upravit jeho koncentraci tak, aby se jeho finální absorbance nacházela v lineární části křivky. Linearizovaná oblast se nachází přibližně v intervalu 100–1000 pg/ml. Tabulka 3 obsahuje hodnoty absorbance a koncentrace pro kalibrační roztoky, ze kterých byla vytvořena sigmoidní standardní křivka.

Tabulka 3: Hodnoty koncentrace [pg/ml] a absorbance pro kalibrační řadu roztoků.

Koncentrace progesteronu v kalibrační řadě [pg/ml]	Absorbance kalibračních roztoků [-]
3200	0,106 ± 0,006
1600	0,205 ± 0,013
800	0,353 ± 0,015
400	0,498 ± 0,010
200	0,648 ± 0,011
100	0,725 ± 0,005
50	0,780 ± 0,005

## 4.2 Výběr vhodného absorpčního materiálu pro moč

Jedním z důležitých kroků je výběr vhodného absorpčního materiálu, ze kterého by mohl být následně progesteron stanoven. Pro analýzu byly testovány tři typy absorpčního materiálu. Konkrétně byl testován klasický filtrační papír dostupný v laboratoři, papír Whatman 43 (obr. 15) a vícevrstvý papír z buničiny (obr. 16).



Obrázek 15: Papír značky Whatman.



Obrázek 16: Vícevrstvý papír z buničiny.

Při testování vhodného absorpčního materiálu byl dodržen obecný postup extrakce a stanovení pomocí ELISA, který je podrobněji popsán v předchozích podkapitolách. Konkrétně k testování absorpčního materiálu byl použit jako extrakční medium 80% methanol, prvotní zkušební doba extrakce byla 1 hodina a teplota odparku 45 °C.

Bylo zjištěno, že použití papíru běžně dostupného v laboratoři, by mohlo nést riziko kontaminace, jelikož tento filtrační papír byl volně dostupný v laboratoři. Vícevrstvý papír

vynikal dokonalejší absorpcí kapaliny, nicméně po extrakci a vložení do centrifugy se papír rozmočil (rozvláknil) natolik, že supernatant obsahoval malá papírová vlákna a proto byl vyhodnocen jako nevhodný k dalšímu použití. Z testovaných absorpčních materiálů byl vybrán jako nejvhodnější k použití filtrační papír (Whatman 43). Další testování bylo provedeno s tímto papírem.

### 4.3 Volba optimální teploty pro odparek

Vliv teploty odparku na nalezený obsah progesteronu ve vzorku byl zjišťován pro dvě různé teploty, konkrétně pro 45 °C a 60 °C.

Nejprve byly připraveny roztoky standardu progesteronu. Byl připraven základní standard s koncentrací 1 mg/ml roztoku progesteronu v čistém methanolu. Postupným ředěním byly připraveny roztoky s takovou koncentrací progesteronu, aby při teoretické stoprocentní účinnosti extrakce ve 12 ml rozpouštědla byla výsledná koncentrace progesteronu 3000, 2000, 1500, 1000 a 500 pg/ml. Na papíry Whatman 43 byl nadávkován 1 ml takto připravených roztoků progesteronu. Dále se postupovalo dle obecného postupu extrakce a úpravy vzorku. Jako extrakční rozpouštědlo byl použit 80% methanol a zkušební doba extrakce byla 1 hodina. Přesný objem supernatantu (1 ml) byl odpařen v koncentrátoru při 45 °C a 60 °C do sucha. Následně byla stanovena koncentrace progesteronu pomocí ELISA kitu, která je podrobně popsána výše v textu. Tento pokus byl opakován třikrát, v tabulce 4 jsou uvedeny nalezené hodnoty progesteronu po extrakci a odpaření.

Tabulka 4: Nalezené koncentrace progesteronu [pg/ml] po extrakci 80% methanolem a pro teploty odparku při 45 °C a 60 °C.

Původní roztoky o známé koncentraci progesteronu [pg/ml]	Koncentrace progesteronu [pg/ml] po extrakci a odparku	
	45 °C	60 °C
3000	1792 (1766; 1820)	1798 (1771; 1823)
2000	1011 (998; 1025)	1005 (996; 1016)
1500	743 (725; 762)	746 (727; 764)
1000	468 (434; 502)	469 (431; 505)
500	–	–

Z výsledků vyplývá, že teplota odparku nemá vliv na nalezené koncentrace progesteronu. Průměrný čas odparku 1 ml supernatantu při 60 °C trval přibližně 1–2 hodiny, při 45 °C přibližně 2–4 hodiny. Z časového hlediska bylo vhodnější použít teplotu odparku při 60 °C, nicméně s ohledem na degradaci progesteronu při vyšší teplotě, byla zvolena nižší teplota. Ve všech dalších experimentech byla používána teplota odparku 45 °C. Z tabulky 4 dále vyplývá, že předem známou koncentraci 500 pg/ml se již nepodařilo extrahovat a nebylo možné ji ELISA metodou stanovit.

#### 4.4 Výběr doby extrakce a extrakčního rozpouštědla

V tomto kroku byl studován vliv doby extrakce a různé druhy rozpouštědel na výslednou účinnost extrakce, respektive na nalezené množství progesteronu v extraktu. Testovaný čas extrakce byl 30, 60, 120 a 180 minut. Byla testována tři různá rozpouštědla, a sice 80% methanol, čistý methanol a směs hexanu v ethylacetátu (3:2). Na papíry (Whatman 43) byly pomocí automatické pipety nakapány roztoky o objemu 1 ml s takovou koncentrací progesteronu, aby po teoretické stoprocentní extrakci ve 12 ml rozpouštědla, byla výsledná koncentrace 3000 pg/ml. Dále se postupovalo dle obecného postupu extrakce a stanovení koncentrace progesteronu pomocí ELISA kitu, který byl podrobně popsán výše v textu. Celé testování bylo provedeno třikrát. Tabulka 5 znázorňuje výsledné hodnoty koncentrace progesteronu pro testovaný čas i rozpouštědlo.

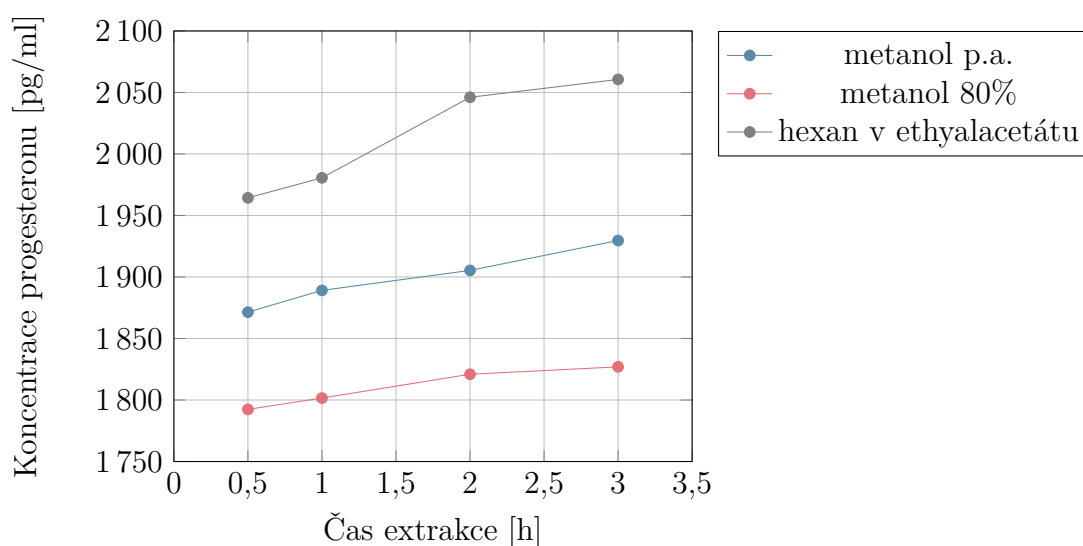
Tabulka 5: Koncentrace progesteronu [pg/ml] pro různé doby extrakce a různé extrakční rozpouštědla.

Čas extrakce v hodinách	Extrakční rozpouštědlo		
	methanol čistý	methanol 80%	hexan v ethylacetátu (3:2)
0,5	1871 (1859; 1884)	1792 (1777; 1808)	1964 (1951; 1976)
1	1889 (1863; 1915)	1802 (1780; 1824)	1981 (1958; 2004)
2	1905 (1877; 1933)	1821 (1793; 1849)	2046 (2027; 2066)
3	1921 (1893; 1950)	1827 (1798; 1856)	2061 (2045; 2078)

Teoretická koncentrace při stoprocentní účinnosti je 3000 pg/ml, účinnost je uvedená v tabulce 6 pro střední průměrnou nalezenou koncentraci.

Tabulka 6: Účinnost [%] extrakce pro různá rozpouštědla při různé době extrakce.

Čas extrakce v hodinách	Účinnost extrakce [%]		
	methanol čistý	methanol 80%	hexan v ethylacetátu (3:2)
0,5	62,4	59,7	65,5
1	63,0	60,1	66,0
2	63,5	60,7	68,2
3	64,0	60,9	68,7



Obrázek 17: Změna koncentrace progesteronu [pg/ml] v různých časových intervalech pro extrakční rozpouštědla methanol p.a, methanol 80% a hexan v ethylacetátu (3:2).

Z uvedené tabulky 5 i grafického znázornění na obrázku 17 vyplývá, že účinnost extrakce roste s její dobou, dále z tohoto grafického znázornění vyplývá, že mezi 2 a 3 hodinou není razantní rozdíl v absolutním přírůstku. Nejdelší testovaný časový interval 3 hodiny byl zvolen pro další analýzu účinnosti extrakce. Delší časové intervaly nebyly zkoumány z důvodů, že nebylo předpokládáno zvýšení výtěžku extrakce. Z porovnání účinnosti extrakce jednotlivých extrakčních rozpouštědel vyplývá, že ve všech případech je nejvyšší účinnost s použitím směsi hexanu v ethylacetátu (3:2), lze pozorovat v tabulce 6. Na základě výsledků byl pro další experimenty vybrán čas 3 hodiny a extrakční rozpouštědlo hexan v ethylacetátu (3:2).



## 4.5 Účinnosti extrakce na koncentraci progesteronu ve vzorku

V dalším kroku byl testován vliv koncentrace progesteronu ve zpracovávaném vzorku na výslednou účinnost extrakce. Tento parametr byl testován pro extrakční rozpouštědlo hexan v ethylacetátu (3:2), po dobu 3 hodin a odpaření při 45 °C. Na papíry (Whatman 43) byly pomocí automatické pipety nakapány roztoky o objemu 1 ml s takovou koncentrací progesteronu, aby po teoretické stoprocentní extrakci ve 12 ml rozpouštědla, byla výsledná koncentrace 3000, 2000, 1500, 1000 a 500 pg/ml. Dále se postupovalo dle obecného postupu extrakce a stanovení koncentrace progesteronu pomocí ELISA kitu, který byl podrobně popsán výše v textu.

Celé testování bylo provedeno třikrát a v tabulce 7 jsou nalezené hodnoty absorbance, odpovídající hodnoty koncentrace progesteronu stanovené ELISA metodou a účinnost extrakce pro střední průměrnou nalezenou koncentraci.

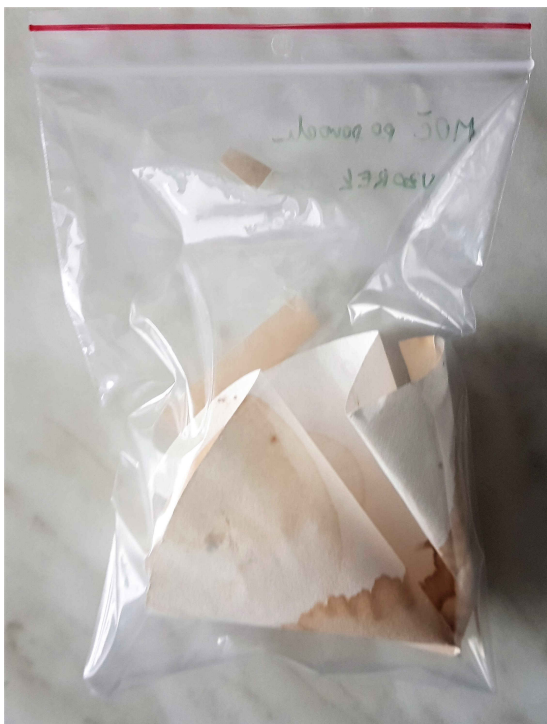
Tabulka 7: Výsledky koncentrací progesteronu po extrakci rozpouštědla hexan v ethylacetátu (3:2), hodnoty směrodatné odchylky a výtěžnost extrakce.

Původní roztoky o známé koncentraci progesteronu [pg/ml]	Absorbance vzorků [-]	Vypočítaná koncentrace progesteronu [pg/ml]	Účinnost extrakce [%]
3000	0,165 ± 0,005	2061 (2045; 2078)	68,7
2000	0,273 ± 0,007	1134 (1109; 1162)	56,7
1500	0,312 ± 0,004	941 (919; 964)	62,7
1000	0,420 ± 0,010	578 (538; 618)	57,8
500	0,05 ± 0,020	–	–

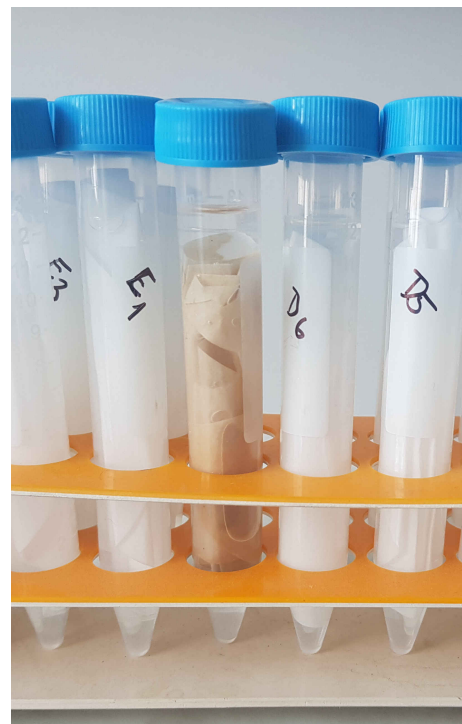
V účinnosti extrakce není vidět žádný trend, hodnoty jsou rozházené. Průměrná hodnota účinnosti extrakce byla přibližně 61,5%. Relativně nízká hodnota účinnosti extrakce mohla být způsobena pravděpodobně tím, že část progesteronu zůstala zachycena na papíru nebo na stěnách plastových zkumavek. Z tabulky 7 lze opět vidět, že koncentraci pod 500 pg/ml se již nepodařilo stanovit, podobně jako v předchozí podkapitole.

## 4.6 Stanovení progesteronu v reálném vzorku

Pro analýzu reálného vzorku moči netopýra rezavého byl k dispozici pouze jeden zkušební vzorek. Jednalo se o směs moči a jiných tělních tekutin po porodu, tato směs moči byla zachycená ještě na obyčejný filtrační papír, protože experimenty s filtračním papírem (Whatman 43), které jsou uvedené výše byly provedeny až po odběru tohoto vzorku. Papír se zaschlou močí byl uchováván v mrazničce při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do analýzy. Obrázek 18 zobrazuje reálnou fotku vzorku směsi moči a jiných tělních tekutin po porodu na filtračním papíru. Obrázek 19 zobrazuje složený filtrační papír ve vybraném rozpouštědle.



Obrázek 18: Reálný vzorek moči a jiných tělních tekutin po porodu netopýra rezavého.



Obrázek 19: Složený filtrační papír ve vybraném rozpouštědle.

Extrakce byla provedena za optimalizovaných podmínek (extrakční rozpouštědlo hexan v ethylacetátu (3:2), čas extrakce 3 hodiny a teplota odparku  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Byl dodržen obecný postup extrakce a stanovení pomocí zakoupeného ELISA kitu, který byl popsán výše v textu. Celé měření bylo provedeno třikrát, v tabulce 8 jsou uvedeny absorbance reálného vzorku a výsledné hodnoty koncentrace progesteronu ve roztoku.

Budeme-li předpokládat, že extrakce s použitím hexanu v ethylacetátu (3:2) je přibližně s 61,5% účinností, tak při 100% účinnosti by koncentrace progesteronu v reálném vzorku

Tabulka 8: Výsledné hodnoty změřené absorbance a koncentrace progesteronu v reálném vzorku moči a jiných tělních tekutin.

Absorbance [-]	Koncentrace progesteronu [pg/ml]
0,283	1079
0,288	1054
0,293	1029

byla 1713 pg/ml. Při předpokladu, že filtrační papír s močí byl extrahován do 12 ml rozpouštědla a z toho byl odebrán 1 ml, přepočítané absolutní množství progesteronu na filtračním papíře je 20,5 ng.

## 5 DISKUZE

Před samotnou analýzou progesteronu z moči netopýrů bylo potřebné nejprve zhodnotit, jakým vhodným způsobem bude možné moč získat a následně ji analyzovat. Nejlepší řešení představovalo, vzhledem k požadavkům, použití vhodného absorpčního materiálu, ze kterého by bylo možné progesteron extrahovat a dále stanovit. Materiál se měl podobat tvarem klasickému papíru. Tento materiál by byl umístěn na dno malé plastové krabičky, do které by se netopýr odchytil (přenesl) na krátký čas a na tomto materiálu by zanechal svoji moč k následné analýze.

V úvahu přicházel obdobný materiál, který se používá jako náplň do SPE, ovšem tento typ materiálu není komerčně dostupný v požadovaném tvaru a navíc je finančně nákladný. Proto byly jako absorpční materiál použity tři různé typy celulózových materiálů, konkrétně se jednalo o laboratorní filtrační papír, vícevrstvý papír z buničiny a filtrační papír (Whatman 43). Laboratorní papír byl vyhodnocený jako nevhodný, jelikož byl volně dostupný v laboratoři a hrozilo riziko jeho kontaminace. Vícevrstvý papír splňoval výborně svoji absorpční schopnost, avšak při extrakci a centrifugaci se zcela rozmočil a supernatant obsahoval jemná vlákna, která rušila stanovení. Proto byl z testovaných papírů jako nejvhodnější vybrán filtrační papír (Whatman 43).

Jedním z cílů diplomové práce bylo najít optimální podmínky pro zpracování vzorku, před vlastní ELISA analýzou. Vzorek moči byl zpracován extrakcí, proto byly porovnány různé doby extrakce, různá rozpouštědla a různé teploty pro odpařování získaného extraktu.

Z výsledků vyplývá, že zvolená teplota odpařování neměla podstatný vliv na účinnost extrakce. Doba extrakce nad dvě hodiny dále nezvyšuje zásadním způsobem účinnost extrakce, avšak z důvodu maximalizace výtěžku byla zvolena doba extrakce 3 hodiny.

Nejlepší výtěžek extrakce byl zjištěn pro směs hexanu s ethylacetátem (3:2). Tato směs je méně polární, než methanol a směs methanolu s vodou, což koresponduje i se strukturou progesteronu. S ohledem na finanční náročnost a životní prostředí byly v počáteční fázi zkoumání testovány i roztoky 70% methanolu a 80% ethanolu. Nicméně u těchto dvou rozpouštědel z neznámých důvodů po stanovení progesteronu ELISA metodou vycházely výsledky s žádnou nebo naopak s přesaturovanou odezvou.

Jak vyplývá z výsledků progesteron se podařilo stanovit s použitím papíru (Whatman 43), ovšem extrakce byla méně účinná, dosahovala pouze 61,5 %. Jedním z důvodů nízké účinnosti extrakce mohlo být částečné zadržení progesteronu na papíru. Díky nízké účinnosti extrakce se nepodařilo v žádném z případů stanovit koncentraci na papírku o koncentraci 0,5 ng/ml.

Dále bylo potřeba zohlednit časový interval mezi odebráním vzorku a jeho analýzou. Ve zvířecích exkrementech stabilita steroidních hormonů s časem a teplotou klesá, proto by celá analýza měla být časově nenáročná. Další riziko představuje nevhodné skladování, kdy v nevhodných podmínkách může dojít k oxidaci nebo bakteriálnímu metabolismu ve vzorku, což může také ovlivnit výsledky analýzy [37].

Pro analýzu reálného vzorku moči byl k dispozici pouze jeden vzorek, konkrétně se jednalo o netopýra rezavého po porodu. ELISA metodou byla stanovená koncentrace po extrakci hexanem v ethylacetátu (3:2). Při předpokládané účinnosti okolo 61,5% lze předpokládat, že přepočtené množství progesteronu zachycené na filtračním papíře je 20,5 ng. Tento zjištěný výsledek koresponduje s hodnotami koncentrace progesteronu naměřenými v trusu netopýrů po porodu, kdy přibližné rozmezí nalezené ve vzorcích bylo 10-41 ng/200 mg suchého trusu. Lze proto předpokládat, že metoda analýzy progesteronu z moči netopýrů zachycené na filtračním papíře v budoucnu omezí invazivní metody odběru vzorku.

Z časových důvodů nemohl být získán větší počet reálných vzorků, u kterých by moč byla zachycená na vhodnější papír (Whatman 43). Netopýři se probouzejí z hibernace v jarních měsících, teprve během března postupně opouštějí svá zimoviště a začínají tvořit své letní kolonie. Vzorky je reálně získat nejdříve koncem dubna a začátkem května, proto již nebylo možné v rámci této diplomové práce získat nové vzorky pro analýzu.

Progesteron lze stanovit vedle ELISA metody i dalšími technikami, například kapalinovou nebo plynovou chromatografií, ovšem tyto separační techniky jsou podstatně finančně náročnější. ELISA metoda byla proto vybraná zejména díky své jednoduchosti, vyšší citlivosti a cenové dostupnosti. Nicméně i během testování se potvrdily i nevýhody této metody, jako je například zkřížená reaktivita látek. Zřejmě díky zkřížené reaktivitě látek byly v některých případech testování vyvolány falešně pozitivní výsledky, výsledky přesaturované nebo naopak nebyla žádná měřitelná odezva.

Porovnání nalezených výsledků s jinými pracemi nebylo možné, protože v dostupné literatuře se nepodařilo dohledat žádné práce, které by se týkaly analýzy progesteronu v moči netopýrů. Dále nebylo možné porovnání s ohledem na skutečnost, že dosud není k dispozici dostatečné množství výzkumů, které by se věnovaly analýze hormonů z moči netopýrů.

V další práci by bylo vhodné se zaměřit jednak na zvýšení účinnosti extrakce a dále ověřit možnost využití dalších analytických technik pro stanovení progesteronu, jako je kapalinová nebo plynová chromatografie. Jelikož ELISA metoda v některých případech poskytovala falešně pozitivní nebo naopak žádné výsledky, jak již bylo zmíněno výše, bylo by vhodné zkoušet hormon progesteron stanovit i jinou imunoanalytickou metodou, například radioimunoanalýzou.

Také by se dalo uvažovat nad změnou absorpčního materiálu pro zachycení moči, popřípadě se i přes velmi malý objem moči netopýrů pokusit o její odběr v kapalně formě. Řešením by mohlo být, například uzavření netopýra do plastové krabičky, která by měla nad dnem umístěnou síť a moč by propadla skrz ni na dno plastové krabičky, kde by se vzorek kapalně moči odebral pro další zpracování. Otázkou však je, jaký objem by se takto mohl získat a zdali by byl dostačující pro stanovení některými z výše uvedených metod.

# ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na možnosti analýzy progesteronu v moči netopýrů. Netopýři jsou zajímaví savci nejen kvůli schopnosti aktivního letu, ale také díky unikátním reprodukčním mechanismům. Právě jejich speciální reprodukce, která je dosud velmi málo prozkoumána, byla jedním z hlavních předmětů zájmu pro vypracování této práce.

Teoretická část obsahovala obecnou charakteristiku letounů s konkrétním zaměřením na netopýry žijící v mírném podnebném pásmu, jejich reprodukci a pohlavní hormon progesteron. Dále vypracovaný obecný popis a princip vhodných metod a technik včetně progesteronu.

Dále je uveden vhodný postup pro zpracování vzorku moči netopýrů s následnou analýzou obsahu progesteronu. Při výběru postupu byl zohledněn požadavek na možnost analýzy malého objemu vzorku řádově v jednotkách  $\mu\text{l}$ . Dále bylo potřeba přihlídnout k dostupnosti chemikálií, přístrojovému vybavení laboratoře a k celkovým finančním nákladům na analýzu. Použitá metoda musela být schopná stanovit hodnoty v řádech  $\text{ng/ml}$  a nižší. Po zhodnocení všech požadavků byla vybraná metoda pro stanovení progesteronu pomocí imunoanalytického testu, konkrétně ELISA metoda.

Během optimalizace extrakčního postupu, byly testovány různé druhy záchytných medií, různá rozpouštědla, doba extrakce a teplota odpaření vzorku. S použitím tohoto optimalizovaného postupu byl analyzován jeden reálný vzorek tělních tekutin netopýra rezavého, zachycený po porodu mláděte. Výsledné množství zachycené na filtračním papíře je  $20,5 \text{ ng}$ .

# POUŽITÁ LITERATURA

- [1] BENDA, Petr, Radek LUČAN, Ján OBUCH, et al. Bats (Mammalia: Chiroptera) of the Eastern Mediterranean and Middle East. Part 8. Bats of Jordan: fauna, ecology, echolocation, ectoparasites. *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae*. 2010, 74(3-4), 185-353.
- [2] WILSON, Don E. a DeeAnn M. REEDER. *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*. 1. JHU press, 2005. ISBN 0801882214.
- [3] KRATOCHVIL, Josef a Emanuel BARTOŠ. *Soustava a jména živočichů: podle zásad 1. sjezdu československých zoologů v Opavě 1951 zapracovali*. Nakladatelství Československé akademie věd, 1954.
- [4] ANDĚRA, Miloš. *České názvy živočichů*. Praha: Národní muzeum, 1999. ISBN 80-7036-098-4.
- [5] HANÁK, Vladimír. *Přehled soustavy a české názvy savců*. Praha: Národní muzeum Praha, 1975.
- [6] GAISLER, Jiří a Jan ZIMA. *Zoologie obratlovců*. Vyd. 2., přeprac. Praha: Academia, 2007. ISBN 978-80-200-1484-9.
- [7] WILKINSON, Gerald S. a Jason M. SOUTH. Life history, ecology and longevity in bats. *Aging cell*. 2002, 1(2), 124-131.
- [8] ADAMS, Rick A. a Scott C. PEDERSEN. *Bat evolution, ecology, and conservation*. Springer Science & Business Media, 2013.
- [9] AUSTAD, Steven N. a Kathleen E. FISCHER. Mammalian aging, metabolism, and ecology: evidence from the bats and marsupials. *Journal of gerontology*. 1991, 46(2), B47-B53.
- [10] KALKO, Elisabeth K. V. a H.-U. SCHNITZLER. The echolocation and hunting behavior of Daubenton's bat, *Myotis daubentoni*. *Springer*. 1989, 1989(24), 225-238.
- [11] REICHHOLF, Josef H. *Průvodce přírodou: Savci*. 1. Ikar, 1996. ISBN 802421637X.



- [12] ANDREAS, Michal, Eva CEPÁKOVÁ a Vladimír HANZAL. *Metodická příručka pro praktickou ochranu netopýrů: [metodika AOPK ČR]*. 2., aktualiz. a dopl. vyd. Praha: Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, 2010. ISBN 978-80-87051-82-5.
- [13] PRINCE, Mike. Cynopterus sphinx. Flicker [online]. 2019 2.7.2019 [cit. 2023-05-03]. Dostupné z: <https://www.flickr.com/photos/mikeprince/48203395606>
- [14] SVETLÍK, Ján. Myotis myotis. Flicker [online]. 2009, 7.10.2009 [cit. 2023-05-03]. Dostupné z: <https://www.flickr.com/photos/svetlik/3992816112>
- [15] ANDĚRA, Miloš a Ivan HORÁČEK. *Poznáváme naše savce*. 2., přeprac. vyd. Ilustroval Jan HOŠEK, ilustroval Jana ROŽÁNKOVÁ. Praha: Sobotáles, 2005. ISBN 8086817083.
- [16] BIRKHEAD, T.R., A.P. MØLLER a W.J. SUTHERLAND. Why do Females Make it so Difficult for Males to Fertilize their Eggs?. *Journal of Theoretical Biology* [online]. 1993, 161(1), 51-60 [cit. 2023-05-03]. ISSN 00225193. Dostupné z: doi:10.1006/jtbi.1993.1039
- [17] HOSKEN, D. J., J. E. O'SHEA a M. A. BLACKBERRY. Blood plasma concentrations of progesterone, sperm storage and sperm viability and fertility in Gould's wattled bat (*Chalinolobus gouldii*). *Reproduction* [online]. 1996, 108(2), 171-177 [cit. 2023-05-03]. ISSN 1470-1626. Dostupné z: doi:10.1530/jrf.0.1080171
- [18] HEIDEMAN, Paul D. Environmental Regulation of Reproduction. *Reproductive Biology of Bats* [online]. Elsevier, 2000, 2000, s. 469-499 [cit. 2023-05-03]. ISBN 9780121956707. Dostupné z: doi:10.1016/B978-012195670-7/50012-6
- [19] RACEY, P. A. Ecology of Bat Reproduction. KUNZ, Thomas H., ed. *Ecology of Bats* [online]. Boston, MA: Springer US, 1982, 1982, s. 57-104 [cit. 2023-05-03]. ISBN 978-1-4613-3423-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4613-3421-7\_2
- [20] AYALA, Ignacio, Nieves F. MARTOS, Gema SILVAN, Candido GUTIERREZ-PANIZO, Jose G. CLAVEL a Juan Carlos ILLERA. Cortisol, adrenocorticotropic hormone, serotonin, adrenaline and noradrenaline serum concentrations in relation to disease and stress in the horse. *Research in Veterinary*

- Science* [online]. 2012, 93(1), 103-107 [cit. 2023-05-03]. ISSN 00345288. Dostupné z: doi:10.1016/j.rvsc.2011.05.013
- [21] WATHAN, Jen, Anne M. BURROWS, Bridget M. WALLER a Karen MCCOMB. Correction: EquiFACS. *PLOS ONE* [online]. 2015, 10(9) [cit. 2023-05-03]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0137818
- [22] VOIGT, Christian C. a Franz SCHWARZENBERGER. Reproductive Endocrinology of a Small Tropical Bat (Female Saccopteryx bilineata; Emballonuridae) Monitored by Fecal Hormone Metabolites. *Journal of Mammalogy* [online]. 2008, 89(1), 50-57 [cit. 2023-05-03]. ISSN 0022-2372. Dostupné z: doi:10.1644/06-MAMM-A-432.1
- [23] HAMPL, František, Stanislav RÁDL a Jaroslav PALEČEK. *Farmakochemie. 2., rozš. vyd.* Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2007. ISBN 978-80-7080-639-5.
- [24] GUSTAFSON, A. W. a D. A. DAMASSA. Perinatal and Postnatal Patterns of Plasma Sex Steroid-Binding Protein and Testosterone in relation to Puberty in the Male Little Brown Bat\*. *Endocrinology* [online]. 1984, 115(6), 2347-2354 [cit. 2023-05-03]. ISSN 0013-7227. Dostupné z: doi:10.1210/endo-115-6-2347Endocrinology
- [25] YING, Guang-Guo, Rai S KOOKANA a Ying-Jun RU. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environment International* [online]. 2002, 28(6), 545-551 [cit. 2023-05-03]. ISSN 01604120. Dostupné z: doi:10.1016/S0160-4120(02)00075-2
- [26] Gonane: PubChem Compound Summary for CID 6857523. *PubChem* [online]. National Center for Biotechnology Information, 2004 [cit. 2023-05-03]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6857523>
- [27] Cholesterol: PubChem Compound Summary for CID 5997. *PubChem* [online]. National Center for Biotechnology Information, 2004 [cit. 2023-05-03]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5997>
- [28] GRAHAM, J. Dinny a Christine L. CLARKE. Physiological Action of Progesterone in Target Tissues\*. *Endocrine Reviews* [online]. 1997, 18(4), 502-519 [cit. 2023-05-03]. ISSN 0163-769X. Dostupné z: doi:10.1210/edrv.18.4.0308

- [29] *Progesterone: PubChem Compound Summary for CID 5994*. [online]. National Center for Biotechnology Information [cit. 2023-05-03]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5994>
- [30] HITCHCOCK, Christine L. a Jerilynn C. PRIOR. Oral micronized progesterone for vasomotor symptoms—a placebo-controlled randomized trial in healthy postmenopausal women. *Menopause* [online]. 2012, 19(8), 886-893 [cit. 2023-05-03]. ISSN 1072-3714. Dostupné z: doi:10.1097/gme.0b013e318247f07a
- [31] SEIFERT-KLAUSS, Vanadin a Jerilynn C. PRIOR. Progesterone and Bone: Actions Promoting Bone Health in Women. *Journal of Osteoporosis* [online]. 2010, 2010, 1-18 [cit. 2023-05-03]. ISSN 2042-0064. Dostupné z: doi:10.4061/2010/845180
- [32] BESSE, Jean-Philippe a Jeanne GARRIC. Progestagens for human use, exposure and hazard assessment for the aquatic environment. *Environmental Pollution* [online]. 2009, 157(12), 3485-3494 [cit. 2023-05-03]. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2009.06.012
- [33] SKOOG, Douglas A., Donald M. WEST, F. James HOLLER a Stanley R. CROUCH. *Analytická chemie*. Přeložil Karel NESMĚRÁK, přeložil Václav ČERVENÝ, přeložil Tomáš KŘÍŽEK, přeložil Eliška NOVÁKOVÁ. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2019. ISBN 9788075920430.
- [34] KŘÍŽENECKÁ, Sylvie a Václav SYNEK. *Základy analytické chemie*. Ústí nad Labem: Univerzita J.E. Purkyně v Ústí nad Labem, Fakulta životního prostředí, 2014. ISBN 9788074148040.
- [35] LASLEY, Bill L. a Jay F. KIRKPATRICK. Monitoring ovarian function in captive and free-ranging wildlife by means of urinary and fecal steroids. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. JSTOR, 1991, 23-31.
- [36] DECATANZARO, D, C MUIR, E BEATON, M JETHA a K NADELLA. Enzymeimmunoassay of oestradiol, testosterone and progesterone in urine samples from female mice before and after insemination. *Reproduction* [online]. 2003, 407-414 [cit. 2023-05-03]. ISSN 1470-1626. Dostupné z: doi:10.1530/rep.0.1260407

- [37] BOLELLI, Gianfranco, Paola MUTI, Micheli ANDREA, Sciajno RAFFAELLA, Franca FRANCESCHETTI, Krogh VITTORIO, Paola PISANI a Franco BERRINO. Validity for epidemiological studies of long-term cryoconservation of steroid and protein hormones in serum and plasma. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. AACR, 1995, 4(5), 509-513.
- [38] FIFIELD, Frederick William a David KEALEY. *Principles and Practice of Analytical Chemistry, 5th Edition*. Oxford: Blackwell Science, 2000. ISBN 978-0-632-05384-1.
- [39] KOSTRHOUNOVÁ, Romana a Ivana BORKOVCOVÁ. *EXTRAKČNÍ METODY používané pro stanovení lipofilních a hydrofilních látek* [online]. [cit. 2023-05-04]. Dostupné z: <https://bit.ly/3h2VI9K>
- [40] TANG, Sheng, Tong QI, Prince Dim ANSAH, Juliette Chancellevie NALOUZEBI FOUEMINA, Wei SHEN, Chanbasha BASHEER a Hian Kee LEE. Single-drop microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2018, 108, 306-313 [cit. 2023-05-04]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2018.09.016
- [41] HARVEY, David. *Modern Analytical Chemistry*. 1. United States of America: McGraw-Hill New York, 2000.
- [42] HO, Yu Bin, Mohamad Pauzi ZAKARIA, Puziah Abdul LATIF a Nazamid SAARI. Occurrence of veterinary antibiotics and progesterone in broiler manure and agricultural soil in Malaysia. *Science of The Total Environment* [online]. 2014, 488-489, 261-267 [cit. 2023-05-04]. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2014.04.109
- [43] ANASTASSIADES, Michelangelo, Steven J. LEHOTAY, Darinka STAJNBAHER a Frank J. SCHENCK. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *National Library of Medicine*. AOAC, 2003, 86(2), 412-31.
- [44] GONZÁLEZ-CURBELO, M.Á., B. SOCAS-RODRÍGUEZ, A.V. HERRERA-HERRERA, J. GONZÁLEZ-SÁLAMO, J. HERNÁNDEZ-BORGES a M.Á.

- RODRÍGUEZ-DELGADO. Evolution and applications of the QuEChERS method. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2015, 71, 169-185 [cit. 2023-05-04]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2015.04.012
- [45] TAN, Xin-tong, Zeng-mei LI, Li-gang DENG, Shan-cang ZHAO a Ming-lin WANG. Analysis of 13 kinds of steroid hormones in raw milk using modified QuEChERS method combined with UPLC-QTOF-MS. *Journal of Integrative Agriculture* [online]. 2016, 15(9), 2163-2174 [cit. 2023-05-04]. ISSN 20953119. Dostupné z: doi:10.1016/S2095-3119(16)61386-2
- [46] MCDONALD, Jeffrey G., Susan MATTHEW a Richard J. AUCHUS. Steroid Profiling by Gas Chromatography–Mass Spectrometry and High Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry for Adrenal Diseases. *Hormones and Cancer* [online]. 2011, 2(6), 324-332 [cit. 2023-05-04]. ISSN 1868-8497. Dostupné z: doi:10.1007/s12672-011-0099-x
- [47] CONKLIN, Steven E. a Claire E. KNEZEVIC. Advancements in the gold standard: Measuring steroid sex hormones by mass spectrometry. *Clinical Biochemistry* [online]. 2020, 82, 21-32 [cit. 2023-05-04]. ISSN 00099120. Dostupné z: doi:10.1016/j.clinbiochem.2020.03.008
- [48] KEALEY, David a P J HAINES. *BIOS Instant Notes in Analytical Chemistry* [online]. Taylor & Francis, 2002 [cit. 2023-05-04]. ISBN 9780429258428. Dostupné z: doi:10.4324/9780203645444
- [49] LINDHOLM-LEHTO, Petra C., Heidi S. J. AHKOLA a Juha S. KNUUTINEN. Procedures of determining organic trace compounds in municipal sewage sludge—a review. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 2017, 24(5), 4383-4412 [cit. 2023-05-04]. ISSN 0944-1344. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-016-8202-z
- [50] GUEDES-ALONSO, Rayco, Sarah MONTESDEOCA-ESPONDA, Zoraida SOSA-FERRERA a José Juan SANTANA-RODRÍGUEZ. Liquid chromatography methodologies for the determination of steroid hormones in aquatic environmental systems. *Trends in Environmental Analytical Chemistry* [online]. 2014, 3-4, 14-27 [cit. 2023-05-04]. ISSN 22141588. Dostupné z: doi:10.1016/j.teac.2014.10.001

- [51] NIETO, Antonio, Francesc BORRULL, Eva POCURULL a Rosa Maria MARCÉ. Determination of natural and synthetic estrogens and their conjugates in sewage sludge by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2008, 1213(2), 224-230 [cit. 2023-05-04]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2008.10.043
- [52] LIU, Shan, Guang-Guo YING, Jian-Liang ZHAO, Feng CHEN, Bin YANG, Li-Jun ZHOU a Hua-jie LAI. Trace analysis of 28 steroids in surface water, wastewater and sludge samples by rapid resolution liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2011, 1218(10), 1367-1378 [cit. 2023-05-04]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2011.01.014
- [53] NIETO, Antonio, Francesc BORRULL, Eva POCURULL a Rosa Maria MARCÉ. Occurrence of pharmaceuticals and hormones in sewage sludge. *Environmental Toxicology and Chemistry* [online]. 2010, 29(7), 1484-1489 [cit. 2023-05-04]. ISSN 07307268. Dostupné z: doi:10.1002/etc.188
- [54] VAN EMON, Jeanette M., ed. *Immunoassay and Other Bioanalytical Techniques* [online]. CRC Press, 2016 [cit. 2023-05-04]. ISBN 9780429135170. Dostupné z: doi:10.1201/9781420020694
- [55] CROWTHER, John R. *The ELISA Guidebook: Second Edition*. 566. New York: Humana press, 2009. ISBN 978-1-60327-254-4.
- [56] CIBIČEK, Norbert a Jan VACEK. *Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. ISBN 978-80-244-3951-8.
- [57] *Imunologické metody* [online]. [cit. 2023-05-04]. Dostupné z: <https://labguide.cz/imunologicke-metody/>
- [58] *Metoda ELISA - aspekty jednotlivých uspořádání* [online]. Praha: Baria [cit. 2023-05-04]. Dostupné z: <https://bit.ly/3JOVbWk>
- [59] AB, Mekonnin, Howie AF, Rile SC, et al. Serum, milk, saliva and urine progesterone and estradiol profiles in crossbred (Zebu x Holstein Friesian) dairy cattle. *Animal*

- Husbandry, Dairy and Veterinary Science* [online]. 2017, 1(3) [cit. 2023-05-04]. ISSN 25139304. Dostupné z: doi:10.15761/AHDVS.1000118
- [60] DANA, O. I., R. H. MUKHTAR, M. O. MOHAMMED a H. O. DYARY. COMPARISON OF A RAPID TEST WITH bPAG ELISA IN PREGNANCY DIAGNOSIS IN COWS. *IRAQI JOURNAL OF AGRICULTURAL SCIENCES* [online]. 2021, 52(6), 1475-1481 [cit. 2023-05-04]. ISSN 2410-0862. Dostupné z: doi:10.36103/ijas.v52i6.1488
- [61] BARCLAY, Robert M.R, Joel ULMER, Cameron J.A MACKENZIE, Megan S THOMPSON, Leif OLSON, Julianne MCCOOL, Elvie CROPLEY a Graeme POLL. Variation in the reproductive rate of bats. *Canadian Journal of Zoology* [online]. 2004, 82(5), 688-693 [cit. 2023-05-04]. ISSN 0008-4301. Dostupné z: doi:10.1139/z04-057
- [62] KLEIMAN, Devra G. Maternal care, growth rate, and development in the noctule ( *Nyctalus noctula* ), pipistrelle ( *Pipistrellus pipistrellus* ), and serotine ( *Eptesicus serotinus* ) bats. *Journal of Zoology* [online]. 1969, 157(2), 187-211 [cit. 2023-05-04]. ISSN 0952-8369. Dostupné z: doi:10.1111/j.1469-7998.1969.tb01697.x
- [63] GAISLER, Jiří. *A contribution to the population ecology of Nyctalus noctula (Mammalia: Chiroptera)*. 1979.
- [64] ZUKALOVA, Katerina, Veronika SEIDLOVA, Vladimír PIACEK, Monika NEMCOVA, Michal PRIBYL, Jiri PIKULA a Jan ZUKAL. One or two pups - optimal reproduction strategies of common noctule females. *BMC Zoology* [online]. 2022, 7(1) [cit. 2023-05-04]. ISSN 2056-3132. Dostupné z: doi:10.1186/s40850-022-00119-8
- [65] Removal of blood from laboratory mammals and birds: First Report of the BVA/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. *Laboratory Animals* [online]. 1993, 27(1), 1-22 [cit. 2023-05-04]. ISSN 0023-6772. Dostupné z: doi:10.1258/002367793781082412
- [66] Progesterone Competitive ELISA kit [online]. Life Technologies Corporation [cit. 2023-05-04]. Dostupné z: <https://bit.ly/3A0qQcH>

# SEZNAM PŘÍLOH

Příloha A .....	64
Příloha B .....	66



# PŘÍLOHA A

Naměřené hodnoty koncentrace progesteronu u 20 samic netopýra rezavého ve třech různých časových odběrech vzorků krve a trusu.

Tabulka 9: Výsledné průměrné hodnoty progesteronu první skupiny samic netopýra rezavého s o 7 dní kratší dobou hibernace.

Identifikační číslo samice netopýra rezavého	Odběr I progesteron [ng/ml]	Odběr II progesteron [ng/ml]	Odběr III progesteron [ng/ml]
2	361	373	48
7	388	698	112
10	479	429	190
11	582	642	388
15	333	738	276
16	568	398	267
17	303	613	121
18	131	402	197
19	670	499	99
21	534	469	316
22	651	684	192

Tabulka 10: Výsledné průměrné hodnoty koncentrací progesteronu druhé skupiny samic netopýra rezavého s o 7 dní delší dobou hibernace.

Identifikační číslo samice netopýra rezavého	Odběr I progesteron [ng/ml]	Odběr II progesteron [ng/ml]	Odběr III progesteron [ng/ml]
1	175	606	76
3	462	718	81
5	530	750	491
6	438	383	138
8	628	766	95
9	327	589	72
13	521	283	236
14	703	476	304
20	623	423	88

Tabulka 11: Výsledné průměrné hodnoty koncentrací progesteronu 20 samic netopýra rezavého ze vzorků trusu.

Identifikační číslo samice netopýra rezavého	Odběr I progesteron [ng/200 mg]	Odběr II progesteron [ng/200 mg]	Odběr III progesteron [ng/200 mg]
1	18	36	33
2	11	34	18
3	11	27	22
5	35	40	28
6	13	37	33
7	22	36	17
8	17	37	29
9	19	31	18
10	22	28	12
11	20	78	17
13	27	39	26
14	25	38	10
15	25	33	25
16	27	48	14
17	25	51	16
18	24	29	17
19	22	39	42
20	27	27	23

# PŘÍLOHA B

Obrázky pořízené při simulaci obsahu progesteronu (moči) na papírku a při celkové analýze progesteronu z papírku.



Obrázek 20: Simulace moči na papírku značky Whatman.



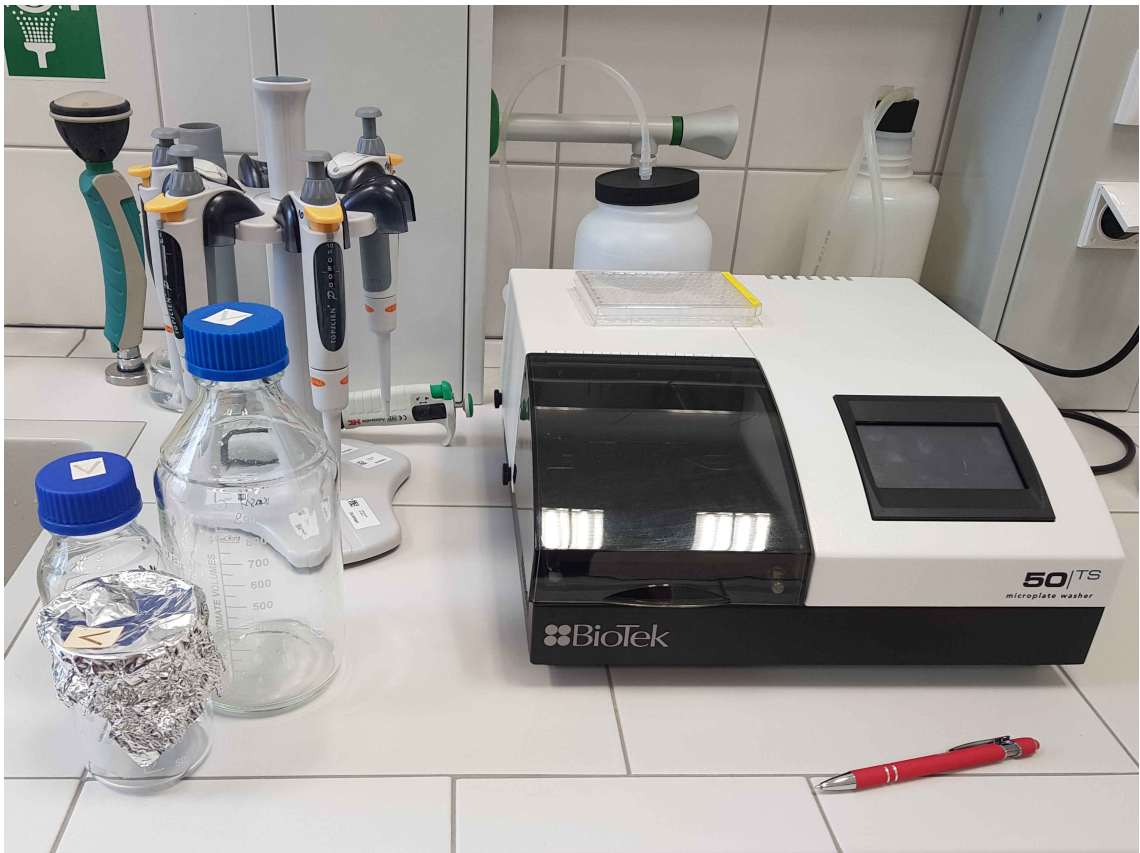
Obrázek 21: Roztoky progesteronového kompetitivního ELISA kitu.



Obrázek 22: Orbitální třepačka se vzorky při extrakci.



Obrázek 23: Koncentrátor pro odparek vzorků.



Obrázek 24: Promývačka mikrodestiček.



Obrázek 25: Hybridní zobrazovací reader.