

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
**KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE**



## **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

# **MONITOROVÁNÍ TOXIKOLOGICKÝCH TESTŮ**

Vedoucí diplomové práce: Doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Konzultant: prof. Manuel Miró

HRADEC KRÁLOVÉ, 2020

Bc. Michaela Rosecká

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 23.4.2020

---

podpis studentky

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí své diplomové práce paní Doc. PharmDr. Haně Sklenářové, Ph. D. za její trpělivost, ochotu, vstřícnost a cenné rady při zpracování mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině, která při mně vždy stála a podporovala mě.

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Bc. Michaela Rosecká

Školitel: Doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Název diplomové práce: Monitorování toxikologických testů

Cílem této práce bylo monitorování kinetických profilů permeace fluorescenčního markeru přes monovrstvu buněk (MDCKII-MDR) pomocí sekvenční injekční analýzy. K tomuto účelu byl využit nový typ cely, který umožňuje měření ze 2 kompartmentů – donorového a akceptorového.

Cela byla během experimentu termostatována na 37°C a obsah akceptorového kompartmentu byl nepřetržitě míchán. Experiment byl vždy několikrát opakován, aby byla zajištěna opakovatelnost interakce látky s membránovým transportérem. Inerty s monovrstvou buněk MDCKII-MDR byly po každém experimentu vyměněny.

Buňky použité v tomto experimentu měly geneticky modifikovaný P-glykoprotein. K on-line monitorování extracelulárního transportu byl využit Rhodamin 123 jakožto fluorescenční marker.

Kinetika průchodu tohoto markeru byla sledována pomocí plně automatizovaného systému sekvenční injekční analýzy, a to v pětiminutových intervalech vždy po dobu 120 minut. Vzorek byl vždy v jednom cyklu odebírán z donorového kompartmentu, v následujícím cyklu pak z kompartmentu akceptorového.

Dále byl zkoumán vliv inhibitoru P-glykoproteinu, kterým byl v této práci verapamil. Byl sledován jeho účinek na výsledný kinetický profil, který se projevil inhibicí testovaného transportéru.

# ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Bc. Michaela Rosecká

Supervisor: Doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Title of Diploma Thesis: Monitoring of toxicological tests

The aim of this work was to monitor kinetic profiles of permeation of fluorescent marker through cell monolayer (MDCKII-MDR) by sequential injection analysis. For this purpose, a new type of permeation module was prepared that could measure from 2 compartments – donor and acceptor.

The module was thermostated at 37°C during the experiment and liquid in the acceptor compartment was continuously agitated. Experiments were repeated to observe difference in interaction of fluorescent marker with cell membrane transporter. MDCKII-MDR monolayer cell inserts were replaced after the experiments.

The cell line used in this experiment include a genetically modified P-glycoprotein. Rhodamine 123, the fluorescent agent, was applied for on-line monitoring of extracellular transport.

The permeability kinetics of this marker was monitored using a fully automated sequential injection analysis system with five minutes sampling intervals for the testing period of 120 minutes. The sample was taken from the donor compartment in one cycle, and from the acceptor one in the next cycle.

Then, the effect of the P-glycoprotein inhibitor, which was verapamil in this work, was investigated. Its inhibition effect on the cell membrane transporter was proved in the resulting obtained kinetic profile.

# OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	8
1. ÚVOD	9
2. CÍLE A POPIS ZADÁNÍ PRÁCE	10
3. TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1 NESEPARAČNÍ PRŮTOKOVÉ METODY	11
3.1.1 Průtoková injekční analýza (FIA)	11
3.1.2 Sekvenční injekční analýza (SIA)	12
3.1.3 Budoucnost průtokových metod	13
3.2 PERMEAČNÍ STUDIE	16
3.2.1 P-glykoprotein (P-gly)	16
3.2.2 Rhodamin 123 (Rho 123)	17
3.2.3 Verapamil (Ver)	18
3.3 MOŽNOSTI PROVEDENÍ LIBERAČNÍCH/PERMEAČNÍCH TESTŮ	18
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	21
4.1 PŘÍSTROJE A POMŮCKY	21
4.1.1 SIA aparatura	21
4.1.2 Fluorescenční detektor č. 1 – PMT-FL	22
4.1.3 Fluorescenční detektor č. 2 – Shimadzu RF-6000	22
4.1.4 3D tištěná permeační cela	22
4.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	23
4.3 POPIS PŘÍSTROJE	24
4.4 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ A BUNĚK	24
4.5 POSTUPY PŘI MĚŘENÍ	25
4.5.1 Postup při měření kalibrace	25
4.5.2 Postup při měření permeačních testů	26
5. VÝSLEDKY	30
5.1 KALIBRACE	30
5.1.1 Kalibrace Rhodaminu 123 s detektorem FIALab	30
5.1.2 Kalibrace Rhodaminu 123 v médiu pomocí detektoru FIALab	31
5.1.3 Kalibrace Rhodaminu 123 v médiu pomocí detektoru Shimadzu	32
5.2 MONITOROVÁNÍ PERMEAČNÍHO TESTU POMOCÍ FIALAB DETEKTORU	35
5.3 MONITOROVÁNÍ PERMEAČNÍHO TESTU POMOCÍ DETEKTORU SHIMADZU	36
5.3.1 Permeace Rhodaminu 123 o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$	37
5.3.2 Permeace Rhodaminu 123 a verapamilu v poměru 5:1	39
5.3.3 Permeace Rhodaminu 123 s verapamilem v poměru 1:1	42
5.3.4 Permeace Rhodaminu 123 o koncentraci 20 $\mu\text{mol/l}$	45
5.3.5 Permeace Rhodaminu 123 s verapamilem v poměru 2:5	47
5.3.6 Permeace Rhodaminu 123 o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$	50

5.3.7	Permeace Rho 123 s verapamilem v poměru 1:5	52
5.3.8	Permeace Rhodaminu 123 s verapamilem v poměru 1:10	55
6.	SHRNUTÍ	58
7.	ZÁVĚR	61
8.	POUŽITÁ LITERATURA	62
9.	SEZNAM OBRÁZKŮ	66
10.	SEZNAM TABULEK	67
11.	SEZNAM ROVNIC	68
12.	SEZNAM GRAFŮ	69

## **SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK**

DMSO – dimethylsulfoxid

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's medium

FIA – průtoková injekční analýza

LOV – lab-on-valve

MSFIA – multisyringe flow injection analysis

P-gly – P-glykoprotein

Rho 123 – Rhodamin 123

SIA – sekvenční injekční analýza

SIC – sekvenční injekční chromatografie

SI-LOV – lab-on-valve v kombinaci se sekvenční injekční analýzou

Ver – verapamil



# 1. ÚVOD

V dnešní době je kladen důraz na zpracování co největšího počtu vzorků, a to nejen v klinických laboratořích, ale i ve výzkumu. Pokud by se každý vzorek musel zpracovávat ručně, nebyly by výsledky získané dostatečně rychle ani dostatečně přesné. Proto je vyvíjen velký tlak na automatizování odběru a analýzy vzorku. K tomuto účelu se mohou využívat neseparační průtokové metody, jako je průtoková injekční analýza a sekvenční injekční analýza. Jednak pro jejich nenáročnost na obsluhu, rychlost analýzy a kompatibilitu s mnoha detektory, tak i pro úsporu organických rozpouštědel a množství modifikací jednotlivých přístrojů a metod. Přesto jejich využití v nemocniční klinické praxi je mizivé, uplatňují se zejména v analýze životního prostředí a ve výzkumu např. při farmakologických/toxikologických experimentech.

V této diplomové práci byl využit nový typ permeační cely, který byl vytištěn na 3D tiskárně. Právě 3D tisk umožňuje rychlé uskutečnění některých zajímavých modifikací, k nimž patří i tato celda. Tato celda byla testována pro automatizaci permeace Rhodaminu 123 přes monovrstvu buněk s P-glykoproteinovým membránovým transportérem, a jeho případné inhibice verapamilem, s použitím sekvenční injekční analýzy.

## **2. CÍLE A POPIS ZADÁNÍ PRÁCE**

Cílem této práce bylo vyzkoušet nový typ 3D tištěné permeační cely s pomocí sekvenční injekční analýzy a optimalizovat podmínky měření pro permeační studii transportu Rhodaminu 123 monovrstvou buněk MDCKII-MDR1. Cílem bylo zjistit poměr koncentrací Rhodaminu 123 a verapamilu, inhibitoru P-glykoproteinového transportéru, který chrání buňku před vstupem Rhodaminu, a čas nutný pro tuto inhibici, respektive blokaci tohoto transportéru, jelikož bylo provedeno monitorování permeace v reálném čase. Dalším cílem bylo ověřit kompatibilitu použitého materiálu 3D tištěné cely a to nejen s použitými chemikáliemi, ale i s životaschopností buněk a s funkčností membránového transportéru.

## **3. TEORETICKÁ ČÁST**

### **3.1 Neseparační průtokové metody**

Neseparační průtokové metody prošly od zavedení průtokové injekční analýzy velkým vývojem, což dokazuje značné množství článků na toto téma. Jedná se tedy o vyspělé a široce uznávané techniky [1].

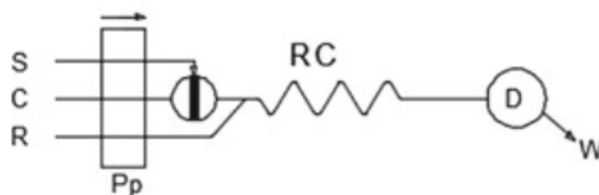
#### **3.1.1 Průtoková injekční analýza (FIA)**

Průtoková injekční analýza (FIA) vedla k významnému pokroku v oblasti automatizace přípravy vzorku, především díky své účinnosti, spolehlivosti, rychlosti a robustnosti, a to vše bez rizika chyb při manuálním provedení. Od svého zavedení v roce 1975 si získala řadu příznivců [1].

Principem této metody je vstříknutí definovaného objemu vzorku do nosného proudu, který slouží zároveň jako nosič, a jeho transport do průtokové cely detektoru. V čase mezi vstříknutím a vlastní detekcí může být vzorek chemicky i fyzikálně modifikován, aby bylo možné analyt co nejlépe detekovat [2].

Výhodou této metody je jednoznačně to, že nepotřebuje žádné drahé vybavení. Ve srovnání s jinými metodami nabízí rychlé dávkování vzorků, přesnost a především univerzálnost. Tato metoda se zdá jako vhodná pro tzv. zelenou chemii, jelikož se vyznačuje jak nižší spotřebou organických rozpouštědel, tak činidel obecně [2].

Výše uvedené výhody jsou hlavním důvodem pro rostoucí zájem o tuto metodu. Tomu napomáhá i fakt, že přístroj FIA je kompatibilní se širokou škálou detektorů, od jednoduchého UV spektrofotometru, přes fluorescenční, chemiluminiscenční a elektrochemickou detekci až po instrumentálně složitější připojení k hmotnostnímu spektrometru [2]. V rutinních analýzách se FIA uplatňuje pouze v kontrole kvality povrchové vody.



Obrázek 1 – Schéma přístroje FIA (S – vzorek; C – nosný proud; R – činidlo; Pp – peristaltické čerpadlo; RC – reakční cívka; D – detektor; W – odpad) [3]

### 3.1.2 Sekvenční injekční analýza (SIA)

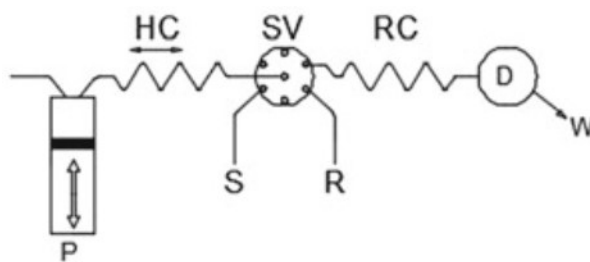
Sekvenční injekční analýza (SIA) byla představena v roce 1990 a ihned se stala jednou z nejvýznamnějších průtokových metod.

Principem této metody je to, že vzorek, činidla a další roztoky jsou postupně nasávány přes vícecestný selekční ventil směrem k mísící cívce a poté při obrácení směru toku transportovány do průtokové cely detektoru [4]. SIA systém je založen na přesně naprogramovaných cyklech, které zabezpečují dokonalé sladění pístového čerpadla s vícecestným selekčním ventilem. Právě tato synchronizace a reprodukovatelnost těchto kroků je nutnou podmínkou správného fungování SIA systému [5].

Během několika let se SIA ukázala jako výkonná a univerzální technika pro automatizaci nejrůznějších analytických postupů. Stejně jako u FIA systému, i SIA systém lze spojit se širokým spektrem detektorů od UV spektrofotometrie, fluorescence, chemiluminiscence, turbidimetrie, přes elektrochemické detektory, atomovou absorpční i emisní spektrofotometrie až po hmotnostní spektrometrii [6].

Tato technika proto našla uplatnění v široké škále oborů. V analýze životního prostředí se využívá ke stanovování některých anorganických iontů ve vodě, jelikož je možné stanovení více iontů najednou. Nejvýznamnější analytickým využitím SIA v tomto odvětví je nejspíš stanovení dusitanů a dusičnanů v pitné vodě, v rutinních laboratořích se ale stále využívají pouze FIA systémy. V SIA systému je možné stanovovat také herbicidy nebo stopová množství těžkých kovů. Dalším polem působnosti SIA metod je bioanalýza, zejména pak imunoanalytické reakce antigenu

s protilátkou, případně reakce enzymu se substrátem. Imunoanalýza pomocí SIA se využívá i ve farmacii ke stanovení některých druhů léčiv [7].



Obrázek 2 – Schéma přístroje SIA (P – čerpadlo; HC – mísící cívka; SV – selekční ventil; S – vzorek; R – činidlo; RC – reakční cívka; D – detektor; W – odpad) [3]

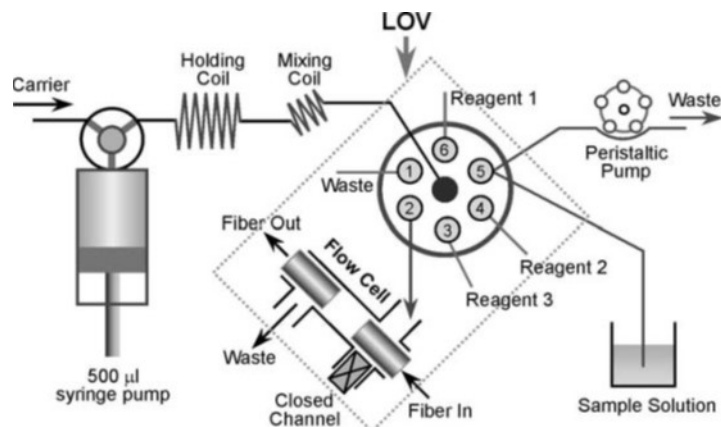
### 3.1.3 Budoucnost průtokových metod

Ačkoliv by se mohlo zdát, že průtokové metody jsou na takové úrovni, že je není možné dále zdokonalovat, opak je pravdou. Ať už v oblasti miniaturizace celého systému, analýzy více vzorků nebo v tzv. zelené chemii.

#### 3.1.3.1 Lab-on-valve (LOV)

Třetí generace průtokových metod, lab-on-valve (LOV), má oproti svým starším kolegyním specifické výhody umožňující nové aplikace. Právě zavedení této metody, zejména v kombinaci se SIA metodou (SI-LOV), vedlo k odstranění některých nevýhod předešlých průtokových metod. Jednou z těchto nevýhod, kterou SI-LOV pomohlo odstranit, bylo narušení reaktivního povrchu kolonky při online extrakci na tuhých fázích nebo vznik zpětného tlaku v plněném reaktoru [1].

Miniaturizovaný systém LOV má velký potenciál být zařízením, které by umožňovalo automatizovat jakýkoliv chemický nebo fyzikální proces [1].



Obrázek 3 – Miniaturizovaný LOV systém (carrier – nosný proud; holding coil – zadržová cívka; mixing coil – mísící cívka; LOV – lab-on-valve; peristaltic pump – peristaltické čerpadlo; waste – odpad; syringe pump – pístové čerpadlo; flow cell – průtoková cela; fiber in/out – vstup/výstup optického vlákna; closed channel – zavřený kanál; sample solution – roztok vzorku) [1]

### 3.1.3.2 Multisyringe flow injection analysis (MSFIA)

Jedná se o zajímavou metodu využívající možnost paralelní práce jako u FIA systému a zároveň robustnost systému SIA [8]. Základem této techniky je napojení více pístů v bloku na stejný motor. Na každý píst pak navazuje trojcestný elektromagnetický (někde označovaný jako solenoidní) ventil, který umožňuje jeho přepnutí mezi systémem a rezervoárem roztoku/činidla. Jsou zde dva směry toku, jeden pro dávkování roztoku do systému, druhý pro uzavřený okruh, když dávkování není potřeba [9].

Vlastnosti MSFIA systému jsou:

- robustnost SIA metod, která je daná použitým materiálem – hlavy pístů jsou vyrobeny z odolného polytetrafluorethylenu, což umožňuje použití agresivních činidel a organických rozpouštědel
- činidla jsou uložena podobně jako u SIA systému – vstříkují se v přesně daném čase do přesně daného objemu vzorku
- mohou být dávkované odlišné objemy vzorku a rozpouštědla – dané větším množstvím pístů, které mohou mít různé objemy [9].

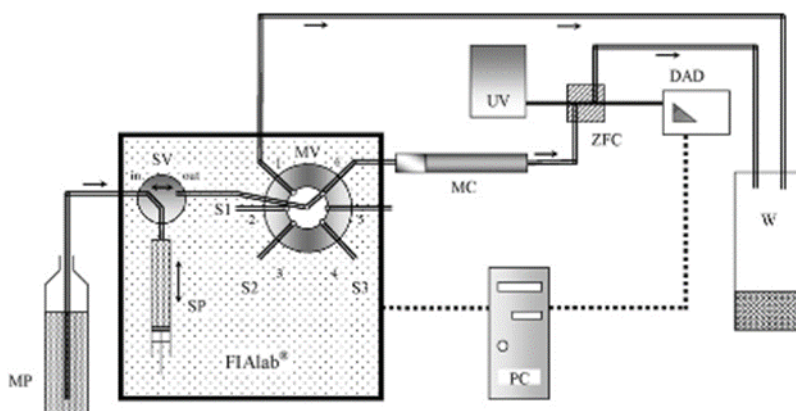
### 3.1.3.3 Sekvenční injekční chromatografie (SIC)

Sekvenční injekční chromatografie (SIC) vznikla na Katedře analytické chemie, Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové vložením monolitické kolony do SIA systému. Tato poměrně nová metoda spojuje výhody SIA a chromatografie, a tak umožňuje současné stanovení více látek ve směsi [5].

Největší výhodou SIC v porovnání s kapalinovou chromatografií je snížení nákladů na analýzu, a to nejen nákladů finančních, ale především zmenšení dopadu na životní prostředí (úspora činidel i organického odpadu) [5]. Dalšími výhodami jsou především rychlost analýzy, malý rozměr přístroje a jeho snadná údržba [10]. SIC je tedy vhodná pro rychlé stanovení jednoduchých směsí s možností snadné manipulace a předúpravy vzorku. Vzhledem k vysoké automatizaci systému je zde omezen kontakt vzorku a obsluhy, a tím i snížena chyba lidského faktoru. Tyto vlastnosti předurčují SIC jako vhodnou metodu pro stanovení agresivních nebo lidskému zdraví nebezpečných látek [11].

Nevýhodami systému jsou především absence softwaru pro vyhodnocování chromatografických dat a nižší robustnost [12].

Hlavní oblastí použití SIC je farmaceutická analýza, ale například i separace barviv v potravinách [11].



Obrázek 4 – Schéma SIC (MP – mobilní fáze; SP – pístové čerpadlo; SV – přepínací ventil; MV – vícecestný ventil; S1, S2, S3 – vzorky; MC – monolitická kolona, UV – zdroj UV světla, ZFC – Z-flow cela, DAD – diode-array detektor, PC – počítač, W – odpad) [11]

## **3.2 Permeační studie**

Permeační studie se běžně využívají pro studium a analýzu biologické dostupnosti látek. Právě údaje z těchto studií jsou důležitou informací pro určení, zda je vhodné dané podání, tedy zda látka prostupuje biologickou membránou či nikoliv. K těmto studiím jsou využívány permeační cely. Ty jsou nejčastěji vyrobené z plastu a mají nejrůznější velikosti. Nevýhodou provedení permeačních testů je off-line analýza vzorků manuálně odebíraných v určitých intervalech, nejčastěji max. 3 časové úseky ve 2 hod permeačním testu.

Pro automatizaci permeačního testu je možné použít skleněné Franzovy cely nebo design upravit pro výhodnější odebírání vzorků z donorového i akceptorového kompartmentu permeační cely. V permeační studii provedené v rámci této diplomové práce byla zkoumána interakce Rhodaminu 123 jako substrátu a verapamilu jako inhibitoru s P-glykoproteinovým membránovým transportérem. Design permeační cely byl upraven pomocí 3D tisku.

### **3.2.1 P-glykoprotein (P-gly)**

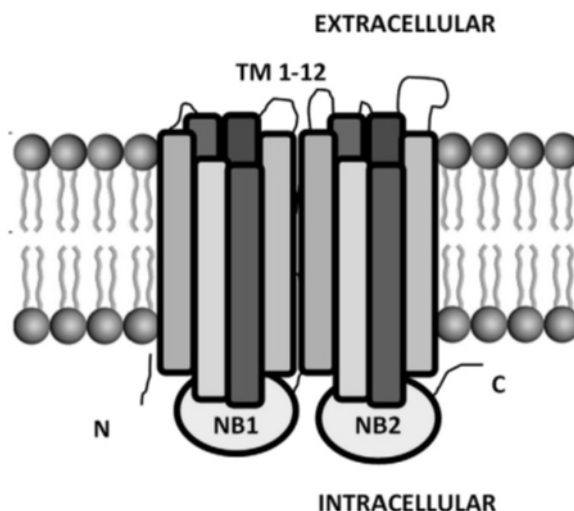
P-glykoprotein (P-gly) je efluxní transmembránová pumpa, kterou buňka využívá k transportu nežádoucích látek ven z buňky pomocí hydrolýzy ATP. Účastní se metabolismu xenobiotik, zejména léčiv [13].

Jelikož je P-gly kódován genem (konkrétně genem MDR-1 lokalizovaném na 7. chromozómu), kde se vyskytuje velké množství polymorfismů, je často zodpovědný za lékové rezistence a následné selhání léčby [14].

Právě tyto polymorfismy jsou zodpovědné za řadu onemocnění (zánětlivé onemocnění střev, rakovina plic, nádory ledvin). Naopak některé polymorfismy se zkoumají pro jejich ochranný účinek ve vývoji některých onemocnění, jakým je například Parkinsonova choroba [14].

K určení exprese P-gly se využívají nejrůznější metody, ať už Western blot, imunohistochemie nebo průtoková cytometrie v kombinaci s monoklonálními protilátkami [14].



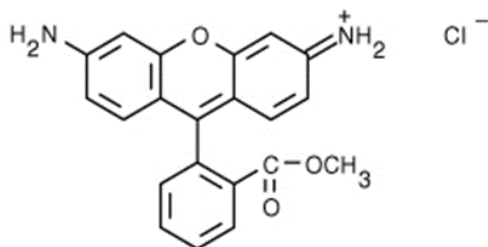


Obrázek 5 – Struktura P-glykoproteinů (N – N-konec proteinu; C – C-konec proteinu; TM – transmembránové úseky; NB – oblasti vázající nukleotidy; extracellular – extracelulární prostor; intracellular – intracelulární prostor) [13]

### 3.2.2 Rhodamin 123 (Rho 123)

Rhodamin 123 (Rho 123) je kationické, lipofilní, zelené fluorescenční barvivo vysoce specifické pro fluorescenční značení mitochondrií v živých buňkách. Na rozdíl od jiných barviv z rodiny rhodaminů, která mohou být excitována pouze zeleným světlem za vzniku červené fluorescence, Rho 123 může být excitován světlem o dvou barvách – modrým a zeleným za vzniku žlutozelené až červené fluorescence. Toho se využívá zejména při fluorescenční mikroskopii a cytometrii [15].

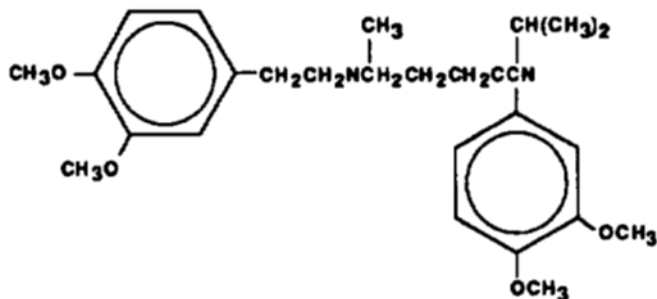
Rho 123 se využívá jako fluorescenční barvivo v průtokové cytometrii k znázornění množství mitochondrií a jejich aktivity. Dále slouží k analýzám funkčnosti nejrozličnějších membránových transportérů, kde slouží jako fluorescenční marker a současně substrát těchto transportérů [15].



Obrázek 6 – Chemická struktura Rhodaminu 123 [16]

### 3.2.3 Verapamil (Ver)

Verapamil (Ver) byl prvním blokátorem vápníkových kanálů. Jedná se o léčivo, které se využívá k léčbě ischemické choroby srdeční, anginy pectoris, jako antiarytmikum a antihypertenzivum [17]. V této práci byl Ver použit jako inhibitor testovaného membránového transportéru.



Obrázek 7 – Chemická struktura verapamilu [18]

### 3.3 Možnosti provedení liberačních/permeačních testů

Součástí této diplomové práce je rešerše odborných článků, které pojednávají o možnostech provedení liberačních/permeačních studií různých druhů látek. Testované látky jsou většinou léčiva nebo látky, které by mohly mít příznivý účinek na lidské zdraví. V článcích jsou použity různé buněčné linie, lidská kůže získaná od dobrovolných dárců, prasečí kůže z ucha prasete nebo jen samotná syntetická membrána. Tyto testy mají za cíl vyzkoušet nový typ podání jednotlivých látek. Rešeršní informace z článků jsou shrnuty v následující tabulce č. 1.

Některé ze studií byly automatizovány pomocí průtokových metod, kdy bylo využito připojení liberačních/permeačních jednotek a on-line odebrání vzorků a jejich analýza v daném průtokovém systému.

Tabulka 1 – Přehled liberačních/permeačních studií

Testovaná látka	Koncentrace testovaných látek	Médium	Provedení	Zpracování vzorku	Buněčná linie	Metoda	Detekce	Citace
rhodamin, verapamil	8,92-41,99 $\mu\text{M}$ , 100 $\mu\text{M}$	PRMI1640	permeace	off-line	K562/S, K562/ADR	měření fluorescence	fluorimetrie	[19]
propranolol, diklofenak, nitroglycerin	1,49 $\text{mg}/\text{cm}^2$ ; 1,29 $\text{mg}/\text{cm}^2$ ; 2,08 $\text{mg}/\text{cm}^2$ a 3,2 $\text{mg}/\text{cm}^2$	fyziologický roztok s azidem sodným (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	liberace	off-line	lidská kůže	HPLC	DAD	[20]
propranolol hydrochlorid	10 mg	DMEM	disoluce + permeace	on-line	Caco-2	SIA	fluorimetrie	[21]
kyselina salicylová	1. přípravek: 30 mg v 1 g masti 2. přípravek: 30 mg v 1 g masti	fosfátový pufr (pH 7,4)	liberace	on-line	nebyla využita	SIA	fluorimetrie	[22]
prilokain, lidokain	25 mg v 1 g, 25 mg v 1 g	nebylo využito	liberace	on-line	nebyla využita	SIC, HPLC	UV spektrometr	[23]
insulin	2-100 $\mu\text{m}/\text{ml}$	DMEM	permeace	off-line	Caco-2, Caco-2/HT29-MTX-E12	HPLC	UV spektrometr	[24]
lipidové nanočástice obsahující kofein	6-650 $\mu\text{M}$ (kofein)	HEPES	liberace	on-line	lidská kůže	LPC	UV-VIS spektrometr	[25]
niacinamid	5 % roztok (5 g/100 ml)	fosfátový pufr (pH 7,4)	liberace	off-line	lidská/prasečí kůže	HPLC	UV spektrometr	[26]
rivastigmin	1,8 $\text{mg}/\text{cm}^2$	fosfátový pufr (pH 7,4)	liberace	on-line	syntetická polymerová membrána/prasečí kůže	HPLC	DAD	[27]

kyselina salicylová	2 mg/ml	albumin rozpuštěný ve fosfátové m pufru (pH 7,4)	liberace	off-line	lidská kůže	HPLC	UV spektrometr	[28]
gestoden	není uvedeno	fosfátový pufr + 10 % methanol + destilovaná voda	liberace	on-line	membrána z PDLLA/PTMC/PCL/PCDLLA/PTCL	měření UV spektra	UV-VIS spektrometr	[29]
izoniazid	500 µg/ml	fosfátový pufr (pH 7,4)	liberace	off-line	prasečí kůže	HPLC	UV spektrometr	[30]
vitamín B <sub>12</sub> a jeho deriváty	200 µg/ml	HBSS	permeace	off-line	Caco-2/ potkaní střevo	HPLC	DAD	[31]
nanoemulze ketoprofenu	10 µg/ml	alkohol-fosfátový pufr (pH 7,4; 50:50)	liberace	off-line	prasečí kůže	HPLC	UV spektrometr	[32]

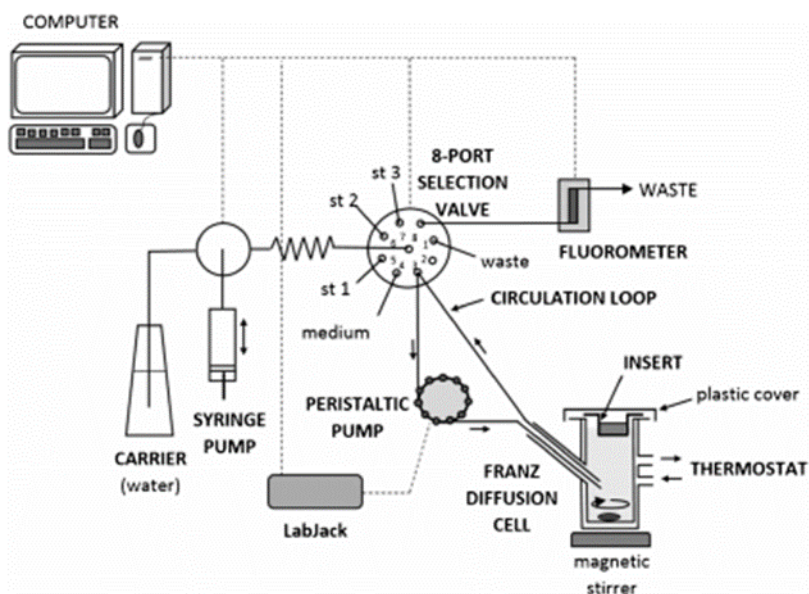
## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Přístroje a pomůcky

#### 4.1.1 SIA aparatura

Pro experiment byl využit MicroSIA systém (FIALab Instruments, Bellevue, WA, USA) s externím peristaltickým čerpadlem Minipuls 3 (Gilson, USA). Tento systém se skládal z programovatelného pístového čerpadla o objemu 2,5 ml, mísící cívky o objemu 400  $\mu$ l a šesticestného selekčního ventilu. Hadičky, o průměru 0,75 mm, použité v tomto experimentu, byly vyrobeny z fluorovaného ethylen-propylenu [33].

SIA přístroj byl ovládán za pomoci softwaru FIALab pro Windows 5.0, který ovládal všechny jeho součásti (čerpadlo, selekční ventil, v případě prvního detektoru i zpracování signálu).



Obrázek 8 – Schéma použitého systému (computer – počítač; carrier (water) – nosný proud (voda); syringe pump – pístové čerpadlo, 8-port selection valve – osmicestný selekční ventil; fluorometer – fluorimetr; waste – odpad; peristaltic pump – peristaltické čerpadlo; Franz diffusion cell – Franzova difuzní cela; insert – insert; plastic cover – víko; thermostat – termostát; magnetic stirrer – magnetické míchadlo) [33]

#### **4.1.2 Fluorescenční detektor č. 1 – PMT-FL**

Průtokový fluorescenční detektor PMT-FL (FIALab Instruments) byl vybaven zdrojem UV světla (D-1000-CE; Analytical Instrument Systems, Inc., USA). Průtoková detekční cela o objemu 100  $\mu$ l se skládala z křemenné Hellma květy (model 176.751, Helma-Analytics, Müllheim, Německo) [33].

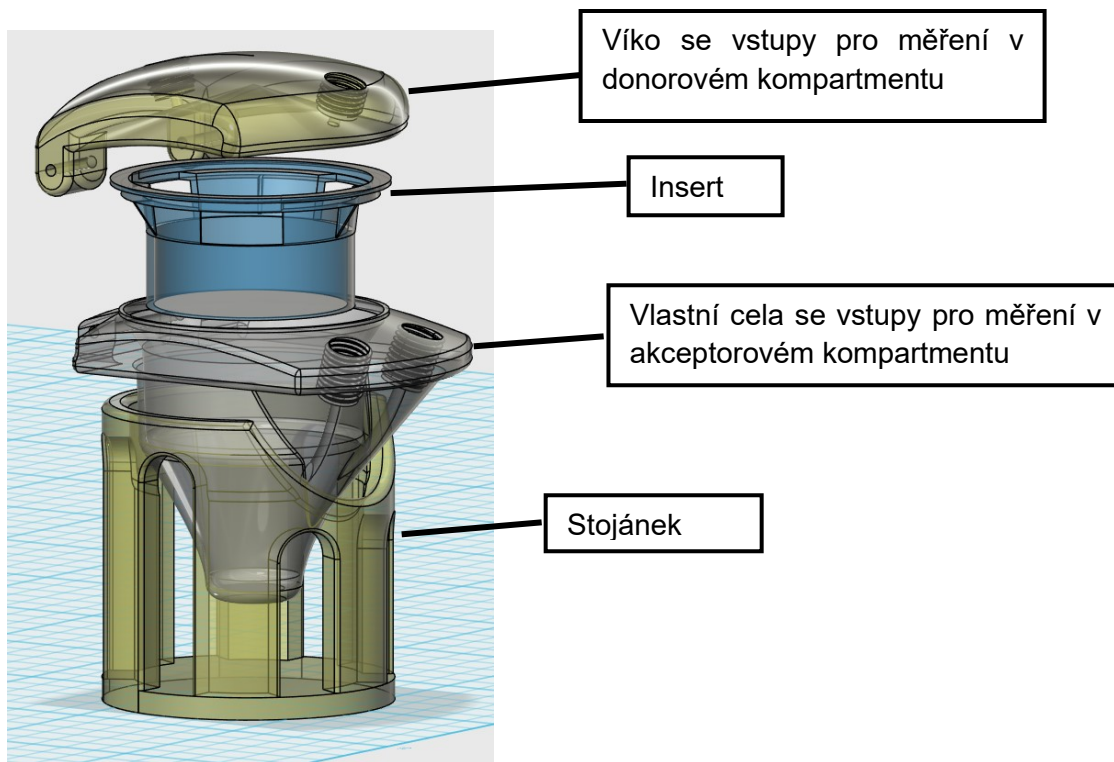
#### **4.1.3 Fluorescenční detektor č. 2 – Shimadzu RF-6000**

Spektrofluorimetr RF-6000 od firmy Shimadzu je schopen měřit v rozsahu vlnových délek 200-900 nm. Je vybaven 150 W xenonovou lampou s dlouhou životností. Ovládá se pomocí LabSolutions RF softwaru, kde najdeme několik modulů přizpůsobených přímo účelu měření [34].

#### **4.1.4 3D tištěná permeační cela**

Upravená Franzova cela použitá v tomto pokusu byla vyrobena na naší fakultě. Materiál použitý k výrobě je polyakrylát, pryskyřice pro tisk pak nese označení Clear – průhledná.

Její úprava spočívá v tom, že je možné současně odebírat vzorky z donorového i akceptorového kompartmentu. S tímto souvisí i zmenšení objemu v akceptorovém kompartmentu, což umožňuje přesnější stanovení koncentrace v této části. Dále je zde použit větší insert, čímž se zvětšila i plocha pro buněčnou membránu, což umožňuje zpřesnění výsledků měření. Jediné, co se nezměnilo, bylo umožnění nepřetržitého míchání akceptorového kompartmentu.



Obrázek 9 – 3D tištěná permeační cela (autor: Dr. Horstkotte)

## 4.2 Použité chemikálie

### Firma Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)

- Rhodamin 123, Mr = 380,82 g/mol,  $\geq 85\%$  (HPLC)
- Verapamil (verapamil hydrochlorid), Mr = 491,06 g/mol
- Dimethylsulfoxid, Mr = 78,13 g/mol

### Firma Thermo Fisher Scientific – Gibco

- Opti-MEM Reduced Serum Medium

### Buňky (Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova)

- buněčná linie MDCKII-MDR1

### **4.3 Popis přístroje**

Přístroj znázorněný na obrázku č. 8 pracuje na základě sekvenční injekční analýzy (SIA). Mezi jeho nejdůležitější části patří dvousměrné pístové čerpadlo, vícecestný ventil a mísící cívka. Dvousměrné pístové čerpadlo, jak už název napovídá, pracuje ve dvou směrech, a tím umožňuje dávkování nosného proudu a manipulaci s dalšími roztoky. Nosným proudem může být jakákoliv kapalina, kterou pro experiment potřebujeme, nejčastěji je to destilovaná voda, pufr nebo v našem případě kultivační médium. Zakončením pístového čerpadla je dvoucestný ventil, který slouží k přepínání mezi nasáváním a vyprazdňováním rezervoáru čerpadla. Následně vede z čerpadla hadička, stočená v podobě mísící cívky, do vícecestného selekčního ventilu. Podle toho, v jaké pozici se zrovna ventil nachází, dojde k dávkování vzorku, standardů nebo činidel, nebo k jejich transportu do detektoru a do odpadu. Pokud dojde k dávkování vzorku, je tento objem za pomoci nosného proudu transportován do mísící cívky, kde může dojít k promísení s činidlem. Mísící cívka je většinou hadička ve tvaru spirály, díky čemuž dochází k velmi efektivnímu promísení vlivem turbulentního proudění. Poté je vzorek, nebo produkt reakce mezi vzorkem a činidlem, transportován do průtokové cely v detektoru, kde již probíhá vlastní měření. Po skončení měření je průtoková cela důkladně promyta nosným proudem, aby nedošlo ke kontaminaci dalších vzorků. Náš měřený vzorek nebo produkt reakce mezi ním a činidlem následně oteče do odpadní nádoby [35].

### **4.4 Příprava roztoků a buněk**

Roztok Rhodaminu 123 (Rho 123) byl připraven rozpuštěním vypočítané navážky v dimethylsulfoxidu (DMSO) a následně doplněním vodou na příslušný objem. Bylo naváženo 1,53 mg Rho 123, který byl následně rozpuštěn v 7 ml DMSO a doplněn vodou na objem 20 ml za vzniku roztoku o koncentraci cca 200  $\mu\text{mol/l}$ . Z tohoto roztoku bylo následně připraveno 25 ml zásobního roztoku o koncentraci 100  $\mu\text{mol/l}$ . Následné koncentrace byly připraveny naředěním tohoto roztoku vodou nebo médiem. Roztoky byly v době, kdy se nepoužívaly, skladovány v lednici při 4°C, nejvyšší koncentrace byla navíc uchovávána v tmavé lahvičce.



Roztok verapamilu (Ver) byl připraven rozpuštěním vypočítané navážky v příslušném objemu vody. Bylo naváženo 9,94 mg verapamilu a rozpuštěno ve 20 ml destilované vody za vzniku roztoku o koncentraci cca 1 mmol/l. Z tohoto roztoku byl následně připraven zásobní roztok verapamilu o koncentraci 100  $\mu$ mol/l. Pokud se roztoky nepoužívaly, byly uskladněny v lednici při 4°C.

Buňky byly kultivovány v médiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) doplněném 10 % fetálním hovězím sérem. Následně byly buňky uchovávány při teplotě 37°C, v atmosféře s 5% oxidu uhličitého a 95% relativní vlhkosti. Každý den bylo médium vyměněno za nové. Pro provedení experimentu bylo nutné buňky kultivovat na insertech Transwell opatřených polykarbonátovou membránou (200 000 buněk/cm<sup>2</sup>) [33]. Po třech dnech byla monovrstva kompaktní a nedocházelo k pasivní difúzi mezi buňkami.

## **4.5 Postupy při měření**

Po přípravě roztoků Rho 123 a Ver došlo k promytí celého systému a detektoru, následně i k promytí portů, ke kterým byla připojena 3D tištěná cela. V případě měření kalibračních roztoků byl promyt i port, ze kterého byl dávkován vzorek. Na přístroji byly poté nastaveny podmínky vlastní analýzy (průtoková rychlost, množství přiváděného nosného proudu a vzorků, upřesnění čísel portů pro každý krok analýzy).

3D tištěná cela byla umístěna v termostatu nastaveném na 37°C a zároveň byl její spodní kompartment nepřetržitě míchán. Insert byl vkládán poté, co byl spodní kompartment naplněn příslušným objemem (9 ml) média. Následně byl příslušný objem roztoku Rho 123/Rho 123 + Ver (4 ml) nadávkován v daném poměru jednotlivých složek na insert. Insert se po každém experimentu vyměnil za nový.

### **4.5.1 Postup při měření kalibrace**

Byly testovány 4 druhy kalibrací. První z nich byla provedena s detektorem FIAlab a jednalo se o kalibraci vodného roztoku Rho 123. Její rozsah byl v rozmezí koncentrací 5-40  $\mu$ mol/l. Tato kalibrace byla pouze orientační a poskytla nám údaje

o rozsahu kalibrací následujících. Při druhé kalibraci prováděné na tomto typu detektoru již byl použit roztok Rho 123 v médiu. Zde byl rozsah koncentrací 5-50  $\mu\text{mol/l}$ . Následovaly dvě kalibrace, které byly provedeny s detektorem Shimadzu, ověřující správně nastavený dávkovaný objem a rychlost s jakou byl poslán do detektoru. První z nich byla provedena s dávkovaným objemem 50  $\mu\text{l}$  rychlostí 30  $\mu\text{l/s}$ . Druhá byla provedena s dávkovaným objemem 60  $\mu\text{l}$  rychlostí 20  $\mu\text{l/s}$ . V prvním případě byl rozsah koncentrací od 2,5  $\mu\text{mol/l}$  do 50  $\mu\text{mol/l}$ , ve druhém případě od 5  $\mu\text{mol/l}$  do 50  $\mu\text{mol/l}$ .

Při měření kalibrace bylo nejprve aspirováno 50  $\mu\text{l}$  vzorku, následně byl tento objem poslán do detektoru rychlost 30  $\mu\text{l/s}$ , odkud putoval do odpadu. Celý tento proces se opakoval 3x. Kalibrace probíhala stejným způsobem u obou typů detektorů, s výjimkou optimalizace objemu a průtoku, v tomto případě bylo aspirováno 60  $\mu\text{l}$  vzorku a do detektoru byl tento objem dávkován rychlostí 20  $\mu\text{l/s}$ . Přesně použité programy jsou uvedeny v souboru Programy měření, konkrétně se jedná o programy č. 1 (kalibrace pro detektor FIALab), č. 2 (kalibrace pro detektor Shimadzu – 30/50) a č. 3 (kalibrace pro detektor Shimadzu – 20/60).

#### **4.5.2 Postup při měření permeačních testů**

Program pro vlastní měření obsahoval navíc i cyklus promytí. Následně byl aspirován vzorek o objemu 50  $\mu\text{l}$  a rychlostí 30  $\mu\text{l/s}$  poslán do příslušného detektoru. Promytí i aspirace vzorku byly provedeny dvakrát. Nejprve se odebíral vzorek z vrchního kompartmentu (donorového), v dalším cyklu následoval kompartment spodní (akceptorový). Jeden cyklus trval přesně 5 minut, celé měření se skládalo ze 12 cyklů (6 cyklů pro vrchní kompartment a 6 cyklů pro spodní kompartment). Kompletní program je uveden v souboru Programy měření, konkrétně se jedná o programy č. 4 (detektor FIALab) a č. 5 (detektor Shimadzu). Jediné, co se lišilo, mezi měřeními s detektorem FIALab a Shimadzu, byl ovládací program. Program na ovládání detektoru FIALab byl součástí programu, který ovládal celý SIA systém. Detektor Shimadzu měl naopak ovládací software vlastní, proto se podmínky měření zadávali přímo tam. Další změnou a současně nevýhodou tohoto uspořádání, tedy

toho, že detektor měl vlastní software, byla skutečnost, že se po 30 minutách muselo celé měření spustit znovu kvůli limitu naměřených dat v jednom cyklu měření.

Tabulka 2 – Podmínky měření

Podmínky	
Objem dávkovaného vzorku	30 µl
Rychlost dávkování vzorku	50 µl/s
Objem nosného proudu	400 µl
Rovnice přímky	
$y = 6740,3x - 6176,9$	
Doplněné rozpouštědlo	250 µl
Objem systému	
Vrchní kompartment	4000 µl
Spodní kompartment	9000 µl

Po skončení měření bylo nutné dopočítat koncentrace ve jednotlivých časech dávkování vzorků, a to u obou kompartmentů.

$$\text{koncentrace } (\mu\text{mol/l}) = \frac{\text{průměr naměřených hodnot} - q}{k} = \frac{\text{průměr naměřených hodnot} + 6176,9}{6740,3}$$

Rovnice 1 – Výpočet koncentrace z rovnice kalibrační křivky

Vlastní výpočet koncentrace, který zahrnuje i naředění díky doplnění objemu akceptorového kompartmentu čistým kultivačním médiem, byl vypočten následujícím vztahem:

$$\text{dopočet koncentrace } (\mu\text{mol/l}) = \text{koncentrace } (\mu\text{mol/l}) + \frac{\text{doplněné rozpouštědlo}}{\text{celkový objem kompartmentu}} * \text{suma předchozích měření}$$

Rovnice 2 – Výpočet koncentrace (obecný vztah)

Dále uvádím tuto rovnici konkrétně pro každý kompartment zvlášť.

$$\text{dopočet koncentrace } (\mu\text{mol/l}) = \text{koncentrace } (\mu\text{mol/l}) + \frac{250 \mu\text{l}}{4000 \mu\text{l}} * \text{suma předchozích měření}$$

Rovnice 3 – Výpočet koncentrace pro donorový kompartment

$$\text{dopočet koncentrace } (\mu\text{mol/l}) = \text{koncentrace } (\mu\text{mol/l}) + \frac{250 \mu\text{l}}{9000 \mu\text{l}} * \text{suma předchozích měření}$$

Rovnice 4 – Výpočet koncentrace pro akceptorový kompartment

Byly testovány tři koncentrací Rho 123, konkrétně 50 µmol/l, 20 µmol/l a 10 µmol/l. Snížení koncentrace bylo provedeno kvůli porovnání profilů a interakce s membránovým transportérem v různém poměru. Zároveň tak bylo ověřeno, že ani nejvyšší koncentrace nepůsobí na buňky toxicky. Dále byla provedena měření v kombinaci s Ver, což je látka, která působí jako inhibitor a blokuje P-glykoprotein, jenž je zodpovědný za transport Rho 123 ven z buňky. Tímto způsobem jsou buňky

chráněné proti vstupu exogenních látek. Při působení inhibitoru je naopak průchod do buňky usnadněn a rozdíly jsou viditelné na získaných profilech Rho 123. Opět byly vyzkoušeny různé poměry Rho 123 a Ver, aby bylo prokázáno, jestli se interakce s P-gly transportérem liší nebo zůstává stejná.

Pro Rho 123 o koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$  byly provedeny 3 experimenty, a to se samotným Rho 123 a následně s Ver o koncentracích 10  $\mu\text{mol/l}$  a 50  $\mu\text{mol/l}$ , tedy poměry 5:1 a 1:1. S Rho 123 o koncentraci 20  $\mu\text{mol/l}$  byly provedeny experimenty dva – samotný Rho 123 a poté v kombinaci s Ver o koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$ , poměr 2:5. Pro Rho 123 o koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$  byly provedeny 3 experimenty. Jeden z nich byl se samotným Rho 123, následující poté s Ver o koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$  a poslední s Ver o koncentraci 100  $\mu\text{mol/l}$ , tedy v poměrech 1:5 a 1:10. U poslední koncentrace verapamilu bylo cílem i potvrzení nebo vyvrácení toxicity takto koncentrovaného roztoku.

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1 Kalibrace

Veškerá měření kalibrací byla prováděna v tripletech a následně byla vypočítána průměrná hodnota těchto tří měření, která byla zanesena do grafu lineární kalibrace. Kalibrace byla nejprve testována na detektoru firmy FIALab, který zaznamenává signál ve všech vlnových délkách a pak na detektoru firmy Shimadzu, kde je nutné nastavení emisní vlnové délky.

#### 5.1.1 Kalibrace Rhodaminu 123 s detektorem FIALab

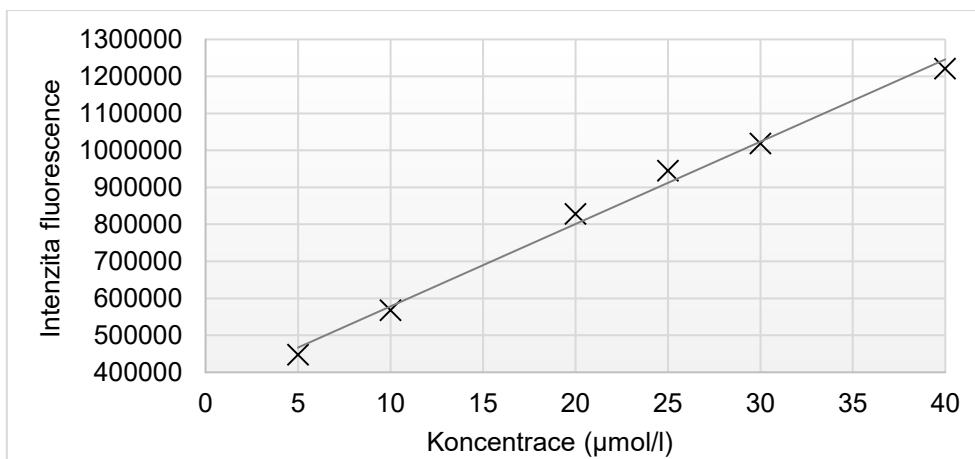
Lineární část této kalibrační křivky Rho 123 se pohybovala v koncentracích 5-40  $\mu\text{mol/l}$ .

Tabulka 3 – Výsledky kalibrace Rho 123 v rozsahu koncentrací 5-40  $\mu\text{mol/l}$  – detektor FIALab

c ( $\mu\text{mol/l}$ )	1. měření	2. měření	3. měření	průměr
5	428057	459258	456142	447819
10	575962	565329	562033	567774
20	842572	815109	825807	827830
25	944221	945634	943647	944502
30	1077605	991440	986703	1018583
40	1220972	1221161	1220259	1220797

Tabulka 4 – Statistické hodnocení kalibrační křivky Rho 123 v rozsahu koncentrací 5-40  $\mu\text{mol/l}$  – detektor FIALab

Statistické parametry pro regresi: $y = kx+q$		
počet bodů	n	6
směrnice	k	22 261
absolutní člen	q	355 573
korelační koeficient	r	0,993



Graf 1 – Kalibrační křivka Rho 123 v rozsahu koncentrací 5-40 µmol/l – detektor FIALab

### 5.1.2 Kalibrace Rhodaminu 123 v médiu pomocí detektoru FIALab

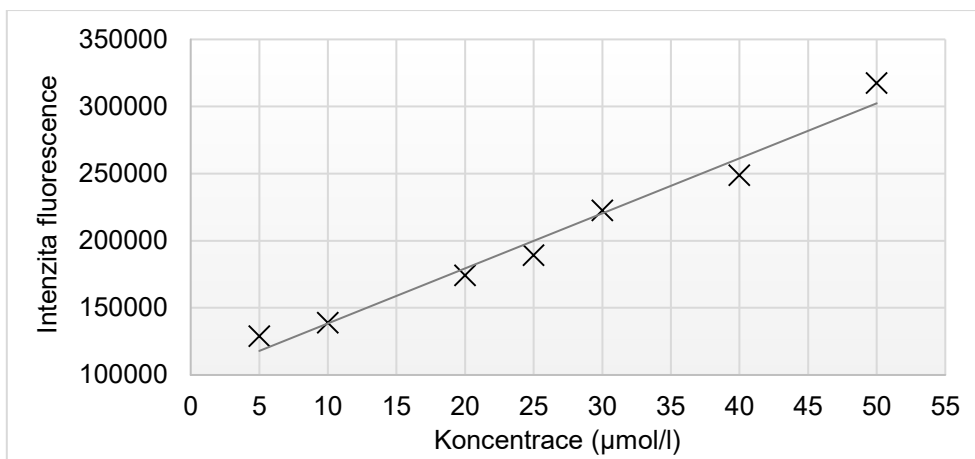
Lineární rozsah této kalibrační křivky pro roztok Rhodaminu 123 v médiu byl v rozmezí koncentrací 5-50 µmol/l.

Tabulka 5 – Výsledky kalibrace Rhodaminu 123 v médiu v rozsahu koncentrací 5-50 µmol/l – detektor FIALab

c (µmol/l)	1. měření	2. měření	3. měření	průměr
5	122967	131525	131850	128780
10	137757	137757	141398	138971
20	142834	180043	199463	174113
25	183847	190068	193711	189209
30	218884	218859	229673	222472
40	239935	254632	251915	248827
50	328360	308226	315837	317475

Tabulka 6 – Statistické hodnocení kalibrační křivky Rho 123 v médiu v rozsahu koncentrací 5-50 µmol/l – detektor FIALab

Statistické parametry pro regresi: $y = kx + q$		
počet bodů	n	7
směrnice	k	4 099,3
absolutní člen	q	97 426
korelační koeficient	r	0,9752



Graf 2 – Kalibrační křivka Rho 123 v médiu v rozsahu koncentrací 5-50  $\mu\text{mol/l}$  – detektor FIALab

### 5.1.3 Kalibrace Rhodaminu 123 v médiu pomocí detektoru Shimadzu

Před použitím tohoto detektoru bylo provedeno nastavení správné vlnové délky proměřením emisního spektra. Nejprve byla provedena rešerše literatury, kde bylo zjištěno teoretické maximum přibližně 530 nm v závislosti na použitém rozpouštědle. Při proměření na detektoru Shimadzu bylo zjištěno maximum emisního pásu při 533 nm.

Tabulka 7 – Nastavení detektoru Shimadzu

Nastavení detektoru	
akumulační čas	50 ms
čas cyklu měření	0,2 s
frekvence sběru dat	5 Hz

Kalibrace byla testována za různých podmínek objemu vzorku a rychlosti jeho transportu do detektoru.



### 5.1.3.1 Kalibrace Rhodaminu 123 v médiu při dávkování 50 µl rychlostí 30 µl/s

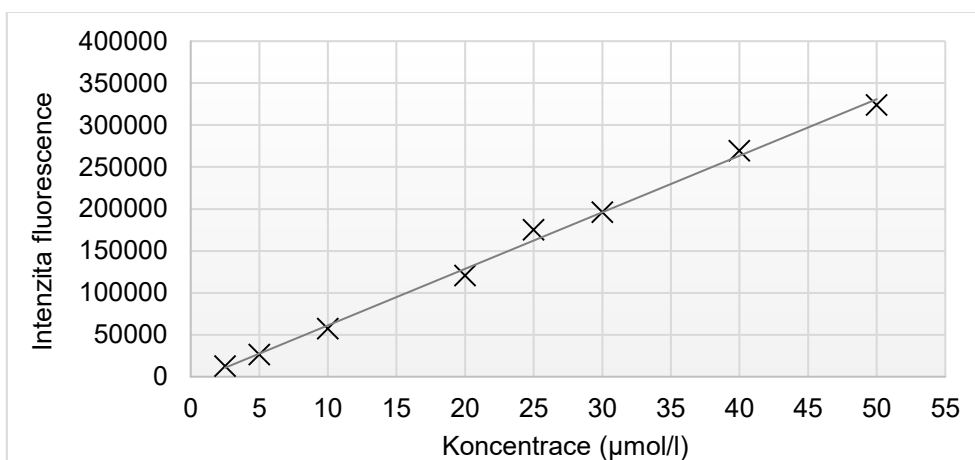
Tato kalibrační křivka roztoku Rho 123 v médiu byla lineární v rozmezí koncentrací 2,5-50 µmol/l.

Tabulka 8 – Výsledky kalibrace Rho 123 v médiu v rozsahu koncentrací 2,5-50 µmol/l, dávkování 50 µl rychlostí 30 µl/s

c (µmol/l)	1.měření	2.měření	3.měření	průměr
2,5	13149	12321	12192	12554
5	24759	25828	28125	26237
10	56813	57820	57216	57283
20	122692	119805	118763	120420
25	175329	174876	174542	174916
30	196419	195991	195444	195951
40	267515	271368	269286	269390
50	329113	321146	321546	323935

Tabulka 9 – Statistické hodnocení kalibrační křivky Rho 123 v médiu při dávkování 50 µl rychlostí 30 µl/s v rozsahu koncentrací 2,5-50 µmol/l

Statistické parametry pro regresi: $y = kx + q$		
počet bodů	n	8
směrnice	k	6 740,3
absolutní člen	q	- 6 176,9
koeficient determinace	R <sup>2</sup>	0,9964



Graf 3 – Kalibrační křivka Rho 123 v médiu v rozsahu koncentrací 2,5-50 µmol/l, dávkování 50 µl rychlostí 30 µl/s

### 5.1.3.2 Kalibrace Rhodaminu 123 v médiu při dávkování 60 µl rychlostí 20 µl/s

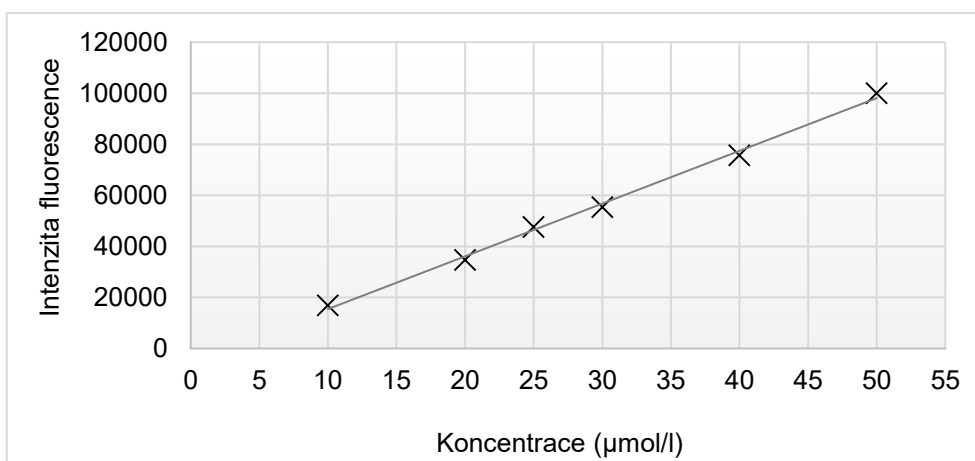
Tato kalibrační křivka roztoku Rho 123 v médiu vykazovala linearitu v rozmezí koncentrací 5-50 µmol/l.

Tabulka 10 – Výsledky kalibrace Rho 123 v médiu v rozsahu koncentrací 2,5-50 µmol/l, dávkování 60 µl rychlostí 20 µl/s

c (µmol/l)	1.měření	2.měření	3.měření	průměr
5	10245	7072	8024	8447
10	18505	16373	15773	16884
20	37469	33752	32684	34635
25	49384	48045	47248	47647
30	57947	54916	53421	55428
40	77228	75917	73910	75685
50	102408	100021	97533	99987

Tabulka 11 – Statistické hodnocení kalibrační křivky Rho 123 v médiu při dávkování 60 µl rychlostí 20 µl/s v rozsahu koncentrací 5-50 µmol/l

Statistické parametry pro regresi: $y = kx + q$		
počet bodů	n	7
směrnice	k	2 066,5
absolutní člen	q	- 5 229
koeficient determinace	R <sup>2</sup>	0,9968



Graf 4 – Kalibrační křivka Rho 123 v médiu v rozsahu koncentrací 5-50 µmol/l, dávkování 60 µl rychlostí 20 µl/s

Jak je vidět z předchozích údajů měření, nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi dávkováním 50  $\mu\text{l}$  rychlostí 30  $\mu\text{l/s}$  a dávkováním 60  $\mu\text{l}$  rychlostí 20  $\mu\text{l/s}$ . Vzhledem k tomu, že optimalizace metody i kalibrace s použitím staršího typu detektoru byly provedeny za podmínek 50  $\mu\text{l}/30 \mu\text{l/s}$ , které zároveň experiment urychlují, byly nadále využity tyto podmínky stanovení.

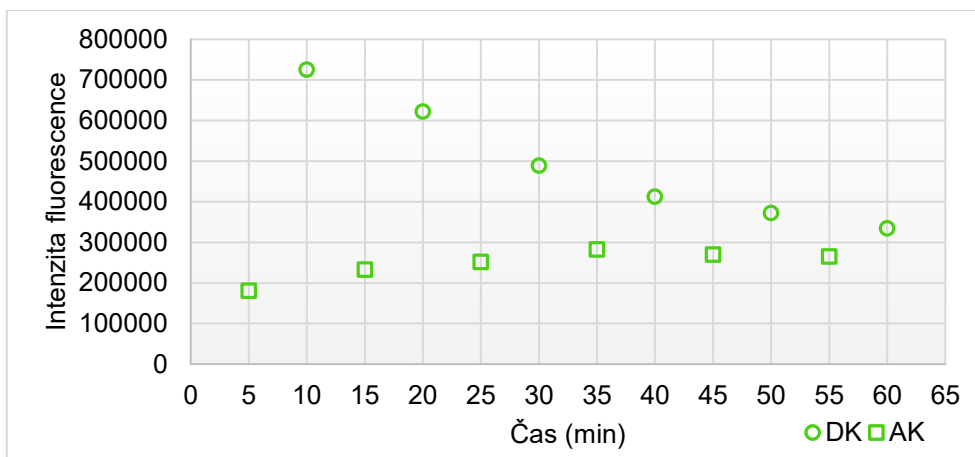
## 5.2 Monitorování permeačního testu pomocí FIAlab detektoru

S pomocí tohoto detektoru byla provedena optimalizace metody pro 3D tištěnou celu, a to s použitím samotného Rhodaminu 123.

Donorový kompartment byl naplněn 4 ml roztoku Rho 123 o koncentraci 100  $\mu\text{mol/l}$ , akceptorový kompartment byl naplněn 9 ml destilované vody. Prostor mezi kompartmenty vyplňoval prázdný, čistý insert. Tento pokus měl ukázat průběh permeace v případě, že koncentrace Rho 123 v obou kompartmentech se po čase vyrovnají. Zároveň by tento profil odpovídal poškozené monovrstvě buněk, kdy by docházelo k pasivní difuzi Rho 123 mezi buňkami.

Tabulka 12 – Výsledky měření Rho 123 o koncentraci 100  $\mu\text{mol/l}$  ve 3D tištěné cele

AKCEPTOROVÝ – AK				DONOROVÝ – DK			
Čas (min)	1. měření	2. měření	Průměr	Čas (min)	1. měření	2. měření	Průměr
5	259380	101466	<b>180423</b>	10	742948	708587	<b>725768</b>
15	187330	278280	<b>232805</b>	20	623454	621791	<b>622623</b>
25	226789	277082	<b>251935</b>	30	477268	500509	<b>488888</b>
35	288858	275977	<b>282417</b>	40	408125	417199	<b>412662</b>
45	265837	273195	<b>269516</b>	50	366437	378332	<b>372385</b>
55	263786	266481	<b>265133</b>	60	332465	336457	<b>334461</b>



Graf 5 – Pasivní difuze Rho 123 o koncentraci 100  $\mu\text{mol/l}$  ve 3D tištěné cele

### 5.3 Monitorování permeačního testu pomocí detektoru Shimadzu

Měření s pomocí detektoru Shimadzu probíhalo za podmínek, které jsou shrnuty v následující tabulce.

Tabulka 13 – Podmínky měření

Podmínky	
Objem dávkovaného vzorku	30 $\mu\text{l}$
Rychlost dávkování vzorku	50 $\mu\text{l/s}$
Objem nosného proudu	400 $\mu\text{l}$
Rovnice přímky	
$y = 6740,3x - 6176,9$	
Doplňné rozpouštědlo	250 $\mu\text{l}$
Objem systému	
Donorový kompartment	4 ml
Akceptorový kompartment	9 ml

Veškerá následující měření byla provedena s použitím insertů, které obsahovaly monovrstvu buněk MDCKII-MDR1.

Díky málo opakovatelným hodnotám prvních měření jsou tyto body vynechány v porovnávacích grafech.

### 5.3.1 Permeace Rhodaminu 123 o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$

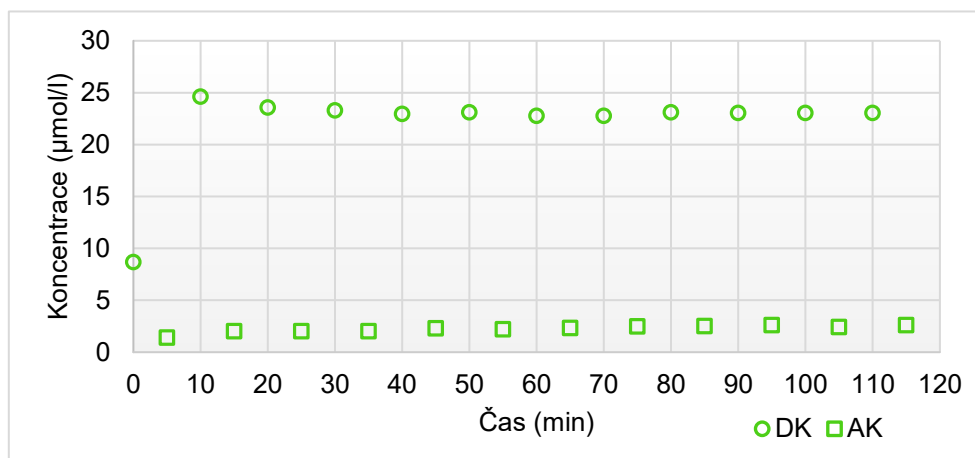
Při tomto experimentu byl donorový kompartment naplněn 4 ml roztoku Rho 123 o koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$ , akceptorový kompartment byl naplněn 9 ml média. Prostor mezi kompartmenty vyplňoval insert s buněčnou monovrstvou.

Tabulka 14 – Výsledky měření koncentrace Rho 123 v donorovém kompartmentu při použití Rho 123 o koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$

DONOROVÝ – DK						
Čas (min)	1. měření	2. měření	Průměr	c ( $\mu\text{mol/l}$ )	Suma předch. měření	Výsledná c ( $\mu\text{mol/l}$ )
0	81008	23771	52390	8,69	0,00	8,69
10	149656	162596	156126	24,08	8,69	24,62
20	133475	144233	138854	21,52	32,77	23,57
30	122569	133220	127895	19,89	54,29	23,28
40	112738	121983	117361	18,33	74,18	22,96
50	106272	114930	110601	17,33	92,50	23,11
60	97353	104776	101065	15,91	109,83	22,77
70	91250	97384	94317	14,91	125,74	22,77
80	87342	93218	90280	14,31	140,65	23,10
90	81481	86125	83803	13,35	154,96	23,03
100	76013	80693	78353	12,54	168,31	23,06
110	70652	75382	73017	11,75	180,85	23,05

Tabulka 15 – Výsledky měření koncentrace Rho 123 v akceptorovém kompartmentu při použití Rho 123 o koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$

AKCEPTOROVÝ – AK						
Čas (min)	1. měření	2. měření	Průměr	c ( $\mu\text{mol/l}$ )	Suma předch. měření	Výsledná c ( $\mu\text{mol/l}$ )
5	4487	2184	3336	1,41	0	1,41
15	6672	7836	7254	1,99	1,41	2,03
25	6397	7236	6817	1,93	3,40	2,02
35	5923	6911	6417	1,87	5,33	2,02
45	8654	7243	7949	2,10	7,20	2,30
55	7153	6835	6994	1,95	9,30	2,21
65	8252	6728	7490	2,03	11,25	2,34
75	9491	6828	8160	2,13	13,28	2,50
85	8695	7105	7900	2,09	15,40	2,52
95	9314	7025	8170	2,13	17,49	2,61
105	7788	5088	6438	1,87	19,62	2,42
115	7883	6753	7318	2,00	21,49	2,60



Graf 6 – Monitorování permeace Rhodamin 123 o koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$

Z grafu je patrné, že Rho 123 neprostupuje buněčnou vrstvou a zůstává tedy v donorovém kompartmentu. Tak je potvrzena funkce P-gly transportéru, který chrání buňky před vstupem exogenních látek.

### 5.3.2 Permeace Rhodaminu 123 a verapamilu v poměru 5:1

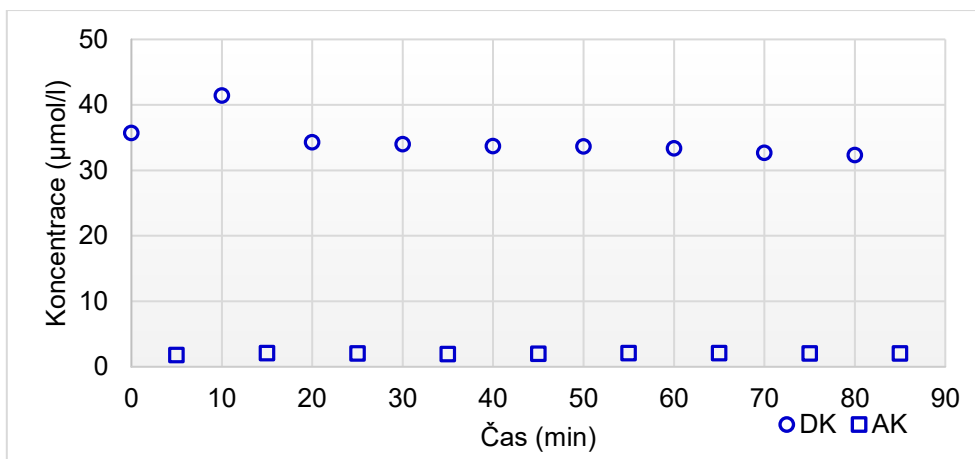
Při tomto experimentu byl donorový kompartment naplněn 4 ml roztoku směsi Rho 123 o koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$  a Ver o koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$ , a to v poměru 5:1, tedy 3,34 ml Rho 123 a 0,67 ml Ver. Akceptorový kompartment byl naplněn 9 ml média. Prostor mezi kompartmenty vyplňoval insert s buněčnou monovrstvou.

Tabulka 16 – Výsledky měření koncentrace Rho 123 v donorovém kompartmentu při použití Rho 123 o koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$  a Ver o koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$

DONOROVÝ – DK						
Čas (min)	1. měření	2. měření	Průměr	c ( $\mu\text{mol/l}$ )	Suma předch. měření	Výsledná c ( $\mu\text{mol/l}$ )
0	204735	264092	234414	35,69	0	35,69
10	247467	268820	258144	39,21	35,69	41,45
20	185171	201712	193442	29,62	74,91	34,30
30	170319	187218	178769	27,44	104,52	33,97
40	156416	174325	165371	25,45	131,96	33,70
50	146719	161750	154235	23,80	157,41	33,64
60	135711	148977	142344	22,03	181,21	33,36
70	122783	134193	128488	19,98	203,25	32,68
80	111961	123549	117755	18,39	223,23	32,34

Tabulka 17 – Výsledky měření koncentrace Rho 123 v akceptorovém kompartmentu při použití Rho 123 o koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$  a Ver o koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$

AKCEPTOROVÝ – AK						
Čas (min)	1. měření	2. měření	Průměr	c ( $\mu\text{mol/l}$ )	Suma předch. měření	Výsledná c ( $\mu\text{mol/l}$ )
5	6631	5154	5893	1,79	0,00	1,79
15	6197	9070	7634	2,05	1,79	2,10
25	7240	6334	6787	1,92	3,84	2,03
35	5529	5842	5686	1,76	5,76	1,92
45	6197	5308	5753	1,77	7,52	1,98
55	6491	5452	5972	1,80	9,29	2,06
65	6756	4971	5864	1,79	11,10	2,09
75	5827	4469	5148	1,68	12,88	2,04
85	5291	4341	4816	1,63	14,56	2,04



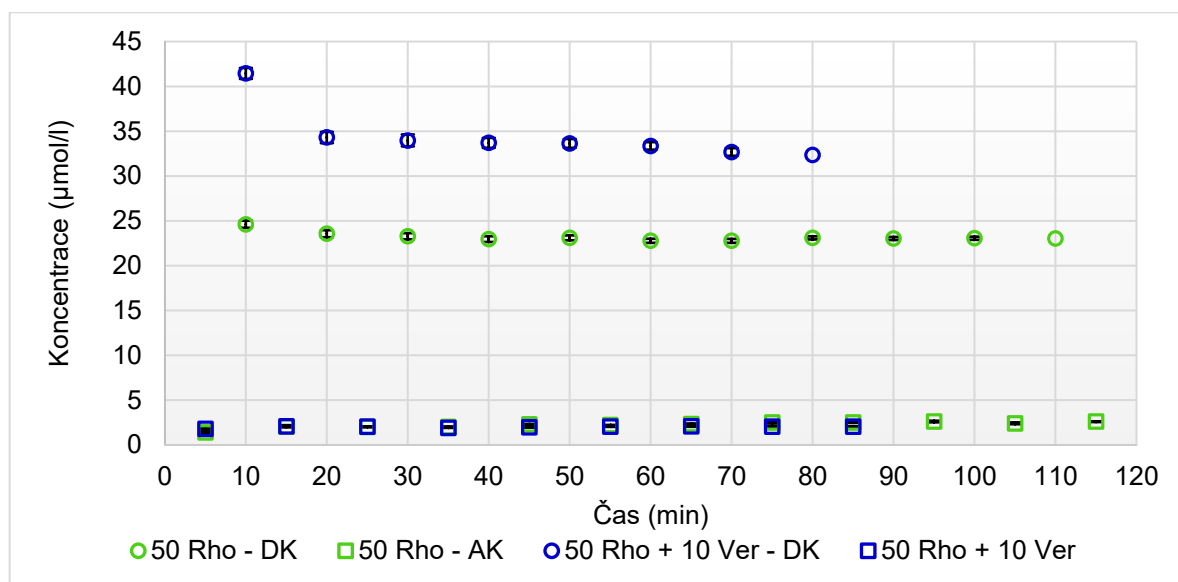
Graf 7 – Monitorování permeace Rho 123 o koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$  v kombinaci s Ver o koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$  (poměr 5:1)

Z tohoto grafu je patrné, že verapamil v takto nízké koncentraci dostatečně neinhibuje P-gly transportér, a tudíž zůstává Rhodamin 123 především v donorovém kompartmentu.



### 5.3.2.1 Porovnání permeace Rhodaminu 123 o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$ samotného a v kombinaci s verapamilem o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$

Na níže uvedeném grafu je vidět, že v tomto případě inhibice Ver nenastala, z důvodu jeho nízké koncentrace. Převažuje tedy interakce Rho 123 s membránovým transportérem, který chrání buňky před vstupem exogenních látek.



Graf 8 – Porovnání permeace Rhodaminu 123 o koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$  samotného a v kombinaci s verapamilem o koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$  (poměr 5:1)

### 5.3.3 Permeace Rhodaminu 123 s verapamilem v poměru 1:1

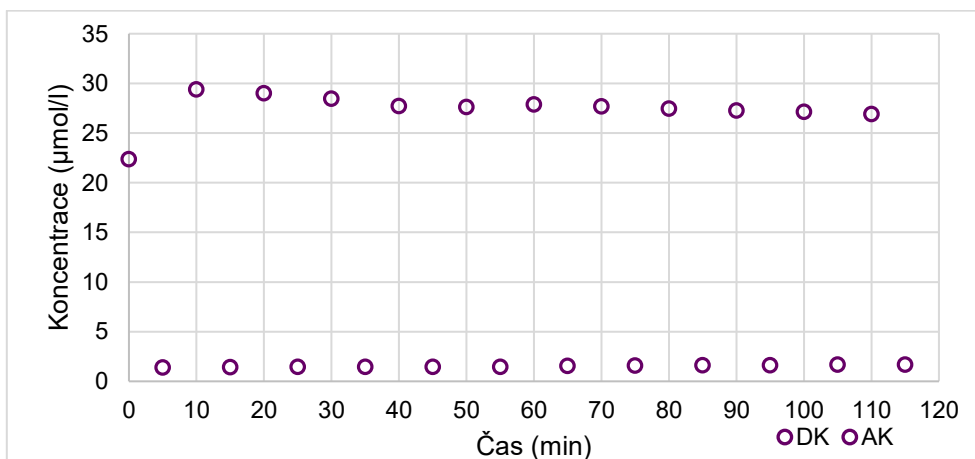
Při tomto experimentu byl donorový kompartment naplněn 4 ml roztoku směsi Rho 123 o koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$  a Ver o koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$ , a to v poměru 1:1, tedy 2 ml Rho 123 a 2 ml Ver. Akceptorový kompartment byl naplněn 9 ml média. Prostor mezi kompartmenty vyplňoval insert s buněčnou monovrstvou.

Tabulka 18 – Výsledky měření koncentrace Rho 123 v donorovém kompartmentu při použití Rho 123 o koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$  a Ver o koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$

DONOROVÝ – DK						
Čas (min)	1. měření	2. měření	Průměr	c ( $\mu\text{mol/l}$ )	Suma předch. měření	Výsledná c ( $\mu\text{mol/l}$ )
0	208670	80210	144440	22,35	0	22,35
10	175270	189441	182356	27,97	22,35	29,37
20	162870	173393	168132	25,86	50,32	29,01
30	148707	158442	153572	23,70	76,18	28,46
40	133549	143605	138577	21,48	99,88	27,72
50	123869	133871	128870	20,04	121,35	27,62
60	117470	126922	122196	19,06	141,39	27,88
70	109863	115483	112673	17,63	160,44	27,66
80	101036	106581	103809	16,32	178,07	27,45
90	92838	98618	95728	15,12	194,39	27,27
100	86195	90786	88491	14,05	209,50	27,14
110	78896	83202	81049	12,94	223,55	26,91

Tabulka 19 – Výsledky měření koncentrace Rho 123 v akceptorovém kompartmentu při použití Rho 123 o koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$  a Ver o koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$

AKCEPTOROVÝ – AK						
Čas (min)	1. měření	2. měření	Průměr	c ( $\mu\text{mol/l}$ )	Suma předch. měření	Výsledná c ( $\mu\text{mol/l}$ )
5	3790	2479	3135	1,38	0,00	1,38
15	3246	3013	3130	1,38	1,38	1,42
25	3132	2796	2964	1,36	2,76	1,43
35	2959	2807	2883	1,34	4,12	1,46
45	2647	2384	2516	1,29	5,46	1,44
55	2234	2497	2366	1,27	6,75	1,45
65	2489	2821	2655	1,31	8,02	1,53
75	2754	2558	2656	1,31	9,33	1,57
85	2659	2594	2627	1,31	10,64	1,60
95	2483	2557	2520	1,29	11,95	1,62
105	2728	2322	2525	1,29	13,24	1,66
115	2464	2422	2443	1,28	14,53	1,68

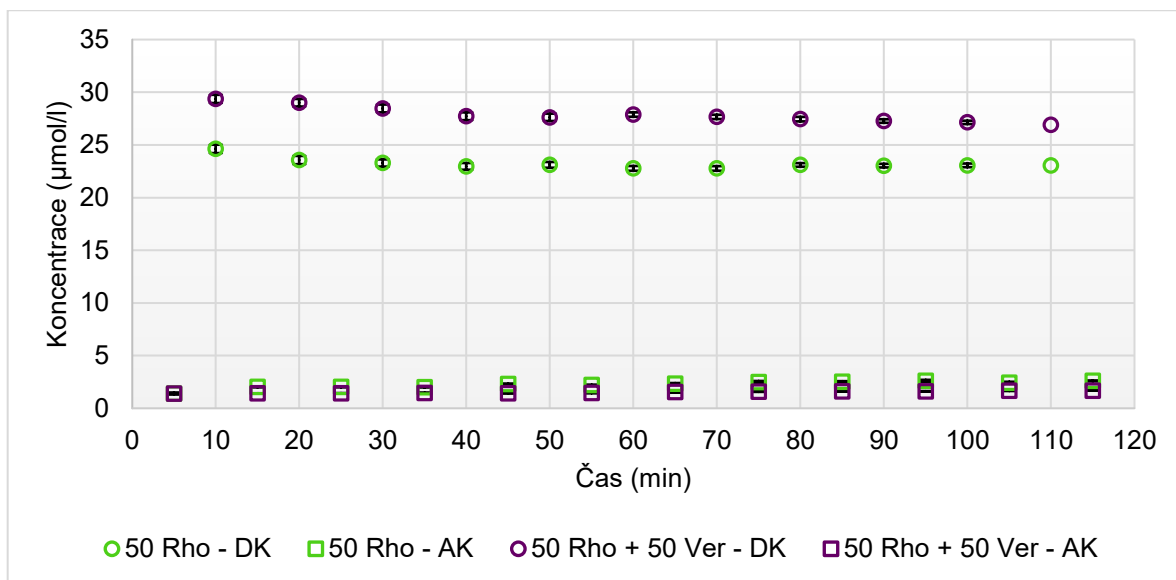


Graf 9 – Permeace Rho 123 o koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$  a Ver o koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$  (poměr 1:1)

Na tomto grafu je vidět, že tento poměr koncentrací Rho 123 a Ver stále není dostatečný k tomu, aby Ver inhiboval transport Rho 123 ven z buňky.

### 5.3.3.1 Porovnání permeace Rhodaminu 123 o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$ samotného a v kombinaci s verapamilem o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$

I na tomto grafu můžeme vidět, že k inhibici Ver, a tedy k blokaci P-gly transportéru, nedošlo. Pravděpodobně opět z důvodu nízké koncentrace Ver, která nezpůsobí zablokování membránového transportéru.



Graf 10 – Porovnání permeace Rhodaminu 123 o koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$  samotného a v kombinaci s verapamilem o koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$  (poměr 1:1)

### 5.3.4 Permeace Rhodaminu 123 o koncentraci 20 $\mu\text{mol/l}$

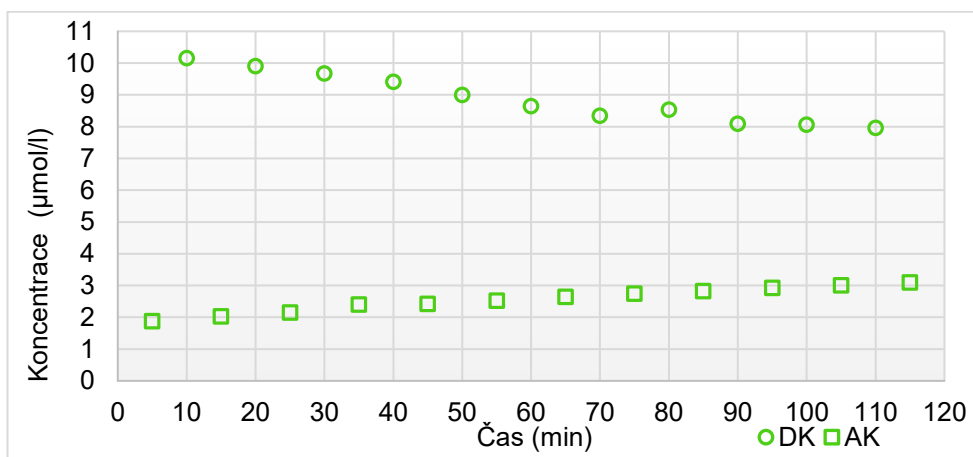
Při tomto experimentu byl donorový kompartment naplněn 4 ml roztoku Rho 123 o koncentraci 20  $\mu\text{mol/l}$ , akceptorový kompartment byl naplněn 9 ml média. Prostor mezi kompartmenty vyplňoval insert s buněčnou monovrstvou. Při tomto pokusu se vyskytla chyba a ve 30. minutě nebylo provedeno jedno měření.

Tabulka 20 – Výsledky měření koncentrace Rho 123 v donorovém kompartmentu při použití Rho 123 o koncentraci 20  $\mu\text{mol/l}$

DONOROVÝ – DK						
Čas (min)	1. měření	2. měření	Průměr	c ( $\mu\text{mol/l}$ )	Suma předch. měření	Výsledná c ( $\mu\text{mol/l}$ )
0	54581	59586	57084	9,39	0	9,39
10	56389	60401	58395	9,58	9,39	10,17
20	51831	53449	52640	8,73	18,97	9,91
30	-	47421	47421	7,95	27,69	9,68
40	40473	42270	42270	7,19	35,64	9,42
50	35174	36479	36479	6,33	42,83	9,01
60	30588	32295	31442	5,58	6,33	5,98
70	26268	27778	27023	4,93	54,74	8,35
80	23723	28824	26274	4,81	59,67	8,54
90	20444	21998	21221	4,06	64,48	8,09
100	18827	19877	19352	3,79	68,55	8,07
110	16696	17403	17050	3,45	72,33	7,97

Tabulka 21 – Výsledky měření koncentrace Rho 123 v akceptorovém kompartmentu při použití Rho 123 o koncentraci 20  $\mu\text{mol/l}$

AKCEPTOROVÝ – AK						
Čas (min)	1. měření	2. měření	Průměr	c ( $\mu\text{mol/l}$ )	Suma předch. měření	Výsledná c ( $\mu\text{mol/l}$ )
5	7592	5514	6553	1,89	0	1,89
15	7694	5745	6720	1,91	1,89	2,03
25	7591	5859	6725	1,91	3,80	2,15
35	7461	7850	7656	2,05	5,72	2,41
45	7450	6412	6931	1,95	7,77	2,43
55	7315	6225	6770	1,92	9,71	2,53
65	7087	6529	6808	1,93	11,63	2,65
75	7217	6034	6626	1,90	13,56	2,75
85	6651	6074	6363	1,86	15,46	2,83
95	6606	5997	6302	1,85	17,32	2,93
105	6257	5842	6050	1,81	19,17	3,01
115	6147	5655	5901	1,79	20,98	3,10



Graf 11 – Permeace Rho o koncentraci 20  $\mu\text{mol/l}$

Tento graf opět ukazuje, že zde nedochází k žádné inhibici a Rho 123, i přes zvýšení v akceptorovém kompartmentu, setrvává spíše v donorovém kompartmentu. Zvýšení je vidět díky celkově nižším hodnotám koncentrace Rho 123. Stále je však patrná dostatečná citlivost stanovení Rho 123 i v této nižší koncentrační hladině.

### 5.3.5 Permeace Rhodaminu 123 s verapamilem v poměru 2:5

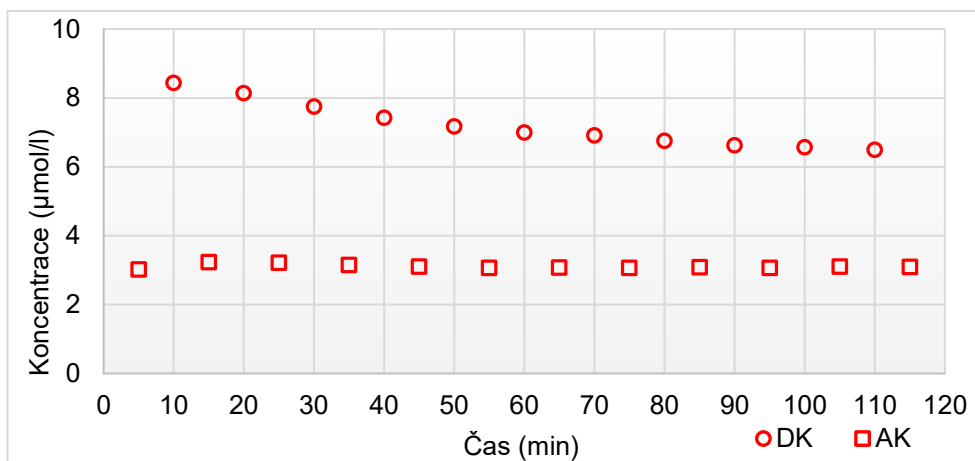
Při tomto experimentu byl donorový kompartment naplněn 4 ml roztoku směsi Rho 123 o koncentraci 20  $\mu\text{mol/l}$  a Ver o koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$ , a to v poměru 2:5, tedy 1,14 ml Rho 123 a 2,86 ml Ver. Akceptorový kompartment byl naplněn 9 ml média. Prostor mezi kompartmenty vyplňoval insert s buněčnou monovrstvou.

*Tabulka 22 – Výsledky měření koncentrace Rho 123 v donorovém kompartmentu při použití Rho 123 o koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$  a Ver o koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$*

DONOROVÝ – DK						
Čas (min)	1. měření	2. měření	Průměr	c ( $\mu\text{mol/l}$ )	Suma předch. měření	Výsledná c ( $\mu\text{mol/l}$ )
0	35091	50027	42559	7,23	0	7,23
10	46646	48673	47660	7,99	7,23	8,44
20	41335	43319	42327	7,20	15,22	8,15
30	35804	37445	36625	6,35	22,41	7,75
40	31036	32546	31791	5,63	28,76	7,43
50	26897	28563	27730	5,03	34,40	7,18
60	24203	24642	24423	4,54	39,43	7,00
70	21481	22443	21962	4,17	43,97	6,92
80	18567	19633	19100	3,75	48,14	6,76
90	16464	16844	16654	3,39	51,89	6,63
100	14549	15160	14855	3,12	55,28	6,58
110	12969	13111	13040	2,85	58,40	6,50

Tabulka 23 – Výsledky měření koncentrace Rho 123 v akceptorovém kompartmentu při použití Rho 123 o koncentraci 20  $\mu\text{mol/l}$  a Ver o koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$

AKCEPTOROVÝ – AK						
Čas (min)	1. měření	2. měření	Průměr	c ( $\mu\text{mol/l}$ )	Suma předch. měření	Výsledná c ( $\mu\text{mol/l}$ )
5	14571	13879	14225	3,03	0	3,03
15	15451	14712	15082	3,15	3,03	3,24
25	14691	14011	14351	3,05	6,18	3,22
35	13802	12899	13351	2,90	9,23	3,15
45	12692	12289	12491	2,77	12,12	3,11
55	12079	11457	11768	2,66	14,89	3,08
65	11577	11084	11331	2,60	17,56	3,09
75	10918	10610	10764	2,51	20,15	3,07
85	10543	10306	10425	2,46	22,67	3,09
95	9776	9867	9822	2,37	25,13	3,07
105	9675	9549	9612	2,34	27,50	3,11
115	9129	9183	9156	2,27	29,85	3,10



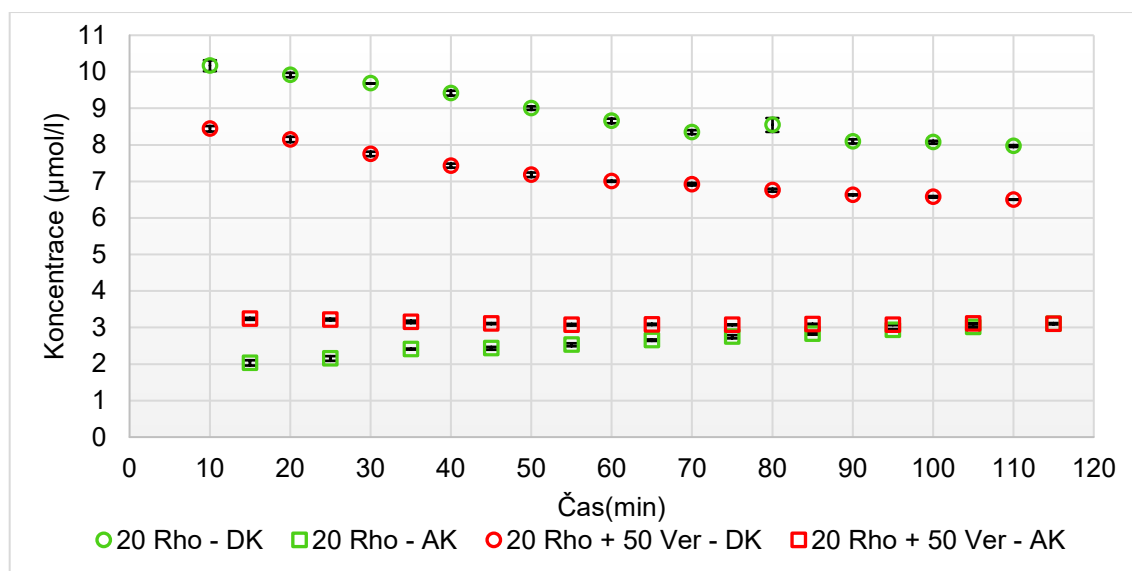
Graf 12 – Závislost permeace Rho 123 o koncentraci 20  $\mu\text{mol/l}$  a Ver o koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$  (poměr 2:5)

Z grafu je patrné, že koncentrace Ver není dostatečná k blokaci P-gly transportéru, ale jedná se o poměr, ve kterém se začíná projevovat účinek Ver na P-gly, ale kompletně ho neblokuje.



### 5.3.5.1 Porovnání permeace Rhodaminu 123 o koncentraci 20 $\mu\text{mol/l}$ samotného a v kombinaci s verapamilem o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$

Na níže uvedeném grafu je vidět, že nedochází k inhibici P-gly transportéru verapamilem.



Graf 13 – Porovnání permeace Rhodaminu 123 o koncentraci 20  $\mu\text{mol/l}$  samotného a v kombinaci s verapamilem o koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$  (poměr 2:5)

### 5.3.6 Permeace Rhodaminu 123 o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$

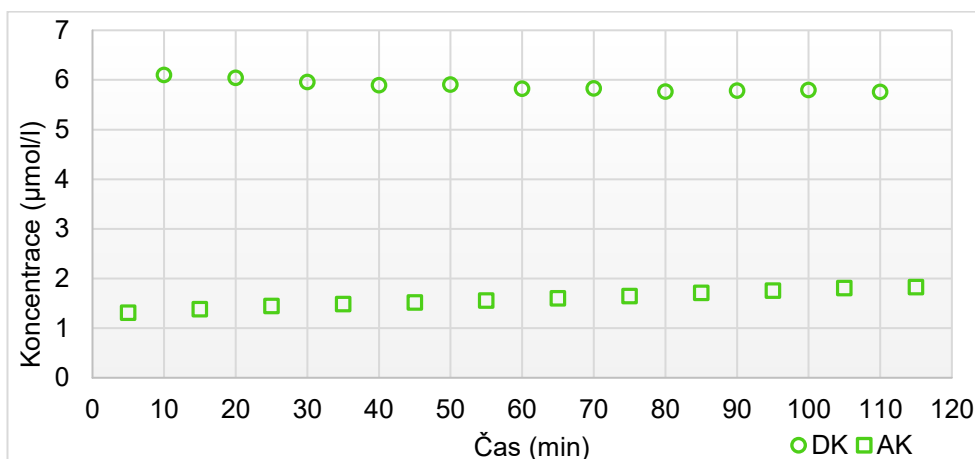
Při tomto experimentu byl donorový kompartment naplněn 4 ml roztoku Rho 123 o koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$ , akceptorový kompartment byl naplněn 9 ml média. Prostor mezi kompartmenty vyplňoval insert s buněčnou monovrstvou

Tabulka 24 – Výsledky měření koncentrace Rho 123 v donorovém kompartmentu při použití Rho 123 o koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$

DONOROVÝ – DK						
Čas (min)	1. měření	2. měření	Průměr	c ( $\mu\text{mol/l}$ )	Suma předch. měření	Výsledná c ( $\mu\text{mol/l}$ )
0	29515	34469	31992	5,66	0	5,66
10	31842	33283	32563	5,75	5,66	6,10
20	28804	30714	29759	5,33	11,41	6,04
30	26164	27703	26934	4,91	16,74	5,96
40	23616	25248	24432	4,54	21,65	5,89
50	21758	23462	22610	4,27	26,20	5,91
60	19927	20562	20245	3,92	30,47	5,82
70	18030	19188	18609	3,68	34,39	5,83
80	16343	16901	16622	3,38	38,06	5,76
90	14897	15766	15332	3,19	41,45	5,78
100	14372	13834	14103	3,01	44,64	5,80
110	12375	12763	12569	2,78	47,65	5,76

Tabulka 25 – Výsledky měření koncentrace Rho 123 v akceptorovém kompartmentu při použití Rho 123 o koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$

AKCEPTOROVÝ – AK						
Čas (min)	1. měření	2. měření	Průměr	c ( $\mu\text{mol/l}$ )	Suma předch. měření	Výsledná c ( $\mu\text{mol/l}$ )
5	4626	3416	4021	1,51	0	1,51
15	4658	3627	4143	1,53	1,51	1,57
25	4809	3696	4253	1,55	3,04	1,63
35	5179	4226	4703	1,61	4,59	1,74
45	4147	4971	4559	1,59	6,21	1,77
55	4356	5368	4862	1,64	7,80	1,85
65	4983	4553	4768	1,62	9,44	1,89
75	4445	4858	4652	1,61	11,06	1,91
85	4632	5010	4821	1,63	12,67	1,98
95	4977	4558	4768	1,62	14,30	2,02
105	5110	4529	4820	1,63	15,92	2,07
115	4705	4411	4558	1,59	17,55	2,08



Graf 14 – Permeace Rho 123 o koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$

Z grafu je patrná téměř konstantní koncentrace Rho 123 v obou kompartmentech. Opět je dokumentována dostatečná citlivost stanovení pro takto nízkou koncentraci Rho 123.

### 5.3.7 Permeace Rho 123 s verapamilem v poměru 1:5

Při tomto experimentu byl donorový kompartment naplněn 4 ml roztoku směsi Rho 123 o koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$  a Ver o koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$ , a to v poměru 1:5, tedy 0,67 ml Rho 123 a 3,34 ml Ver. Akceptorový kompartment byl naplněn 9 ml média. Prostor mezi kompartmenty vyplňoval insert s buněčnou monovrstvou.

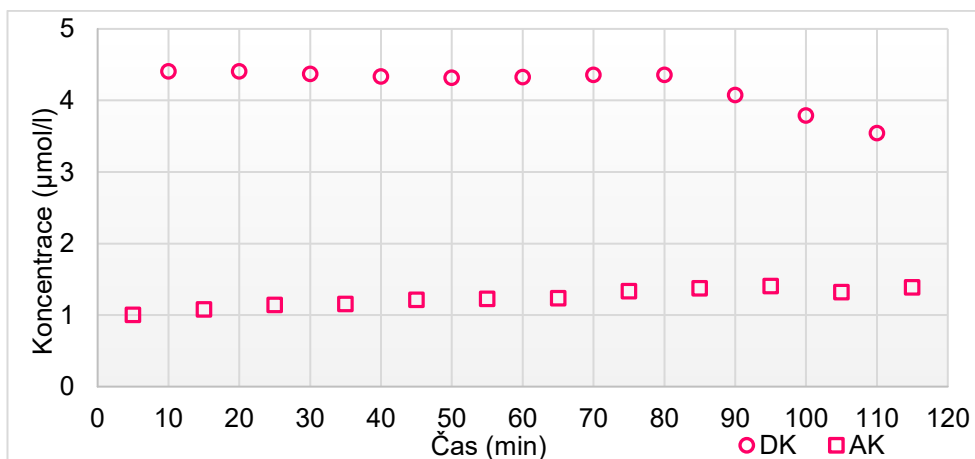
Tato permeace byla provedena dvakrát vždy se stejným výsledkem.

Tabulka 26 – Výsledky měření koncentrace Rho 123 v donorovém kompartmentu při použití Rho 123 o koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$  a Ver o koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$

DONOROVÝ – DK						
Čas (min)	1. měření	2. měření	Průměr	c ( $\mu\text{mol/l}$ )	Suma předch. měření	Výsledná c ( $\mu\text{mol/l}$ )
0	20995	22136	2156	4,12	0	4,12
10	20714	21405	21060	4,04	4,12	4,30
20	19728	19409	19569	3,82	8,16	4,33
30	17546	17533	17540	3,52	11,98	4,27
40	15622	15711	15667	3,24	15,49	4,21
50	13925	13549	13737	2,95	18,74	4,13
60	12630	12422	12526	2,77	21,69	4,13
70	11768	12230	11999	2,70	24,46	4,23
80	10872	11144	11008	2,55	27,16	4,25
90	10107	10312	10210	2,43	25,60	4,03
100	8763	8888	8826	2,23	23,99	3,72
110	8159	7289	7724	2,06	22,39	3,46

Tabulka 27 – Výsledky měření koncentrace Rho 123 v akceptorovém kompartmentu při použití Rho 123 o koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$  a Ver o koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$

AKCEPTOROVÝ – AK						
Čas (min)	1. měření	2. měření	Průměr	c ( $\mu\text{mol/l}$ )	Suma předch. měření	Výsledná c ( $\mu\text{mol/l}$ )
5	0	0	0	0,92	0	0,92
15	264	1012	638	1,01	0,92	1,04
25	798	1651	1225	1,10	1,93	1,15
35	594	1481	1038	1,07	3,03	1,15
45	549	1829	1189	1,09	4,10	1,21
55	769	1469	1119	1,08	5,19	1,23
65	687	916	802	1,04	6,27	1,21
75	1134	2259	1696	1,17	7,31	1,37
85	1443	1607	1525	1,14	8,47	1,38
95	1845	2346	2095	1,23	8,70	1,47
105	348	1824	1086	1,08	8,92	1,33
115	1376	1732	1554	1,15	8,85	1,39

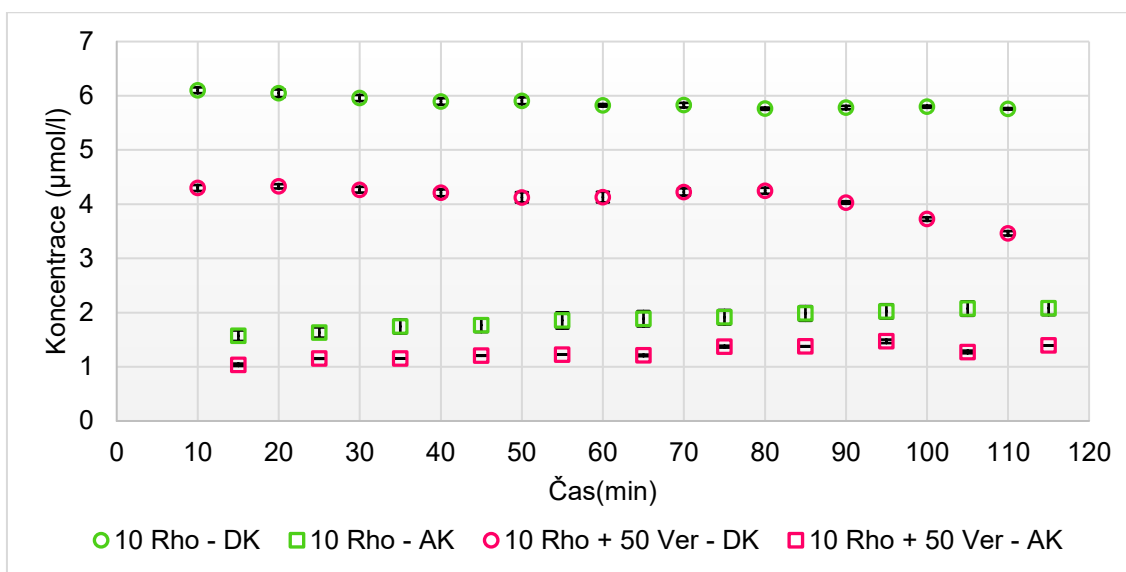


Graf 15 – Permeace Rho 123 o koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$  a Ver o koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$  (poměr 1:5)

Zde je již patrné, že Ver v této koncentraci úspěšně blokuje P-gly transportér, což se na grafu objevilo jako pokles v koncentraci Rho 123 v donorovém kompartmentu a velmi mírný nárůst koncentrace Rho 123 v akceptorovém kompartmentu. Většina Rho 123 tedy zůstává uvnitř buněk.

### 5.3.7.1 Porovnání permeace Rhodaminu 123 o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ samotného a v kombinaci s verapamilem o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$

Na níže uvedeném grafu je vidět inhibice způsobená schopností Ver blokovat P-gly transportér, a tím i vylučování Rho 123 ven z buňky. Blokace P-glykoproteinového transportu je patrná po 90. minutě.



Graf 16 – Porovnání permeace Rhodaminu 123 o koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$  samotného a v kombinaci s verapamilem o koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$  (poměr 1:5)

### 5.3.8 Permeace Rhodaminu 123 s verapamilem v poměru 1:10

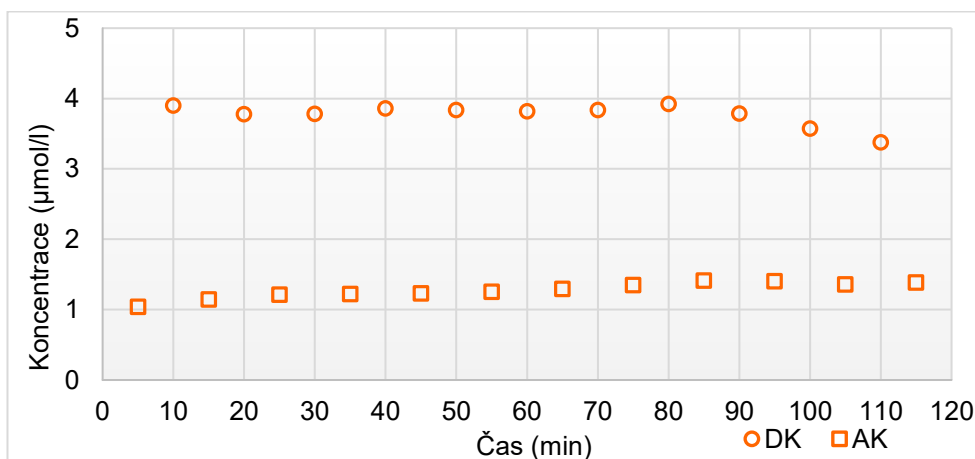
Při tomto experimentu byl donorový kompartment naplněn 4 ml roztoku směsi Rho 123 o koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$  a Ver o koncentraci 100  $\mu\text{mol/l}$ , a to v poměru 1:10, tedy 0,36 ml Rho 123 a 3,64 ml Ver. Akceptorový kompartment byl naplněn 9 ml média. Prostor mezi kompartmenty vyplňoval insert s buněčnou monovrstvou.

Tabulka 28 – Výsledky měření koncentrace Rho 123 v donorovém kompartmentu při použití Rho 123 o koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$  a Ver o koncentraci 100  $\mu\text{mol/l}$

DONOROVÝ – DK						
Čas (min)	1. měření	2. měření	Průměr	c ( $\mu\text{mol/l}$ )	Suma předch. měření	Výsledná c ( $\mu\text{mol/l}$ )
0	19660	20001	19831	3,86	0,00	3,86
10	18381	18608	18495	3,66	3,86	3,90
20	15909	16367	16138	3,31	7,52	3,78
30	14909	14652	14781	3,11	10,83	3,79
40	13754	14197	13976	2,99	13,94	3,86
50	12360	12794	12577	2,78	16,93	3,84
60	10949	11574	11262	2,59	19,71	3,82
70	10234	10360	10297	2,44	22,30	3,84
80	9195	10540	9868	2,38	24,74	3,93
90	9322	9809	9566	2,34	23,26	3,79
100	8583	8743	8663	2,20	21,94	3,57
110	7673	7963	7818	2,08	20,83	3,38

Tabulka 29 – Výsledky měření koncentrace Rho 123 v akceptorovém kompartmentu při použití Rho 123 o koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$  a Ver o koncentraci 100  $\mu\text{mol/l}$

AKCEPTOROVÝ – AK						
Čas (min)	1. měření	2. měření	Průměr	c ( $\mu\text{mol/l}$ )	Suma předch. měření	Výsledná c ( $\mu\text{mol/l}$ )
5	637	1088	863	1,04	0	1,04
15	1234	1453	1344	1,12	1,04	1,14
25	1517	1714	1616	1,16	2,16	1,22
35	1408	1495	1452	1,13	3,32	1,22
45	1299	1304	1302	1,11	4,45	1,23
55	987	1502	1245	1,10	5,56	1,26
65	1109	1550	1330	1,11	6,66	1,30
75	1470	1496	1483	1,14	7,77	1,35
85	1625	1789	1707	1,17	8,91	1,42
95	1190	1996	1593	1,15	9,03	1,40
105	1075	1533	1304	1,11	9,07	1,36
115	1497	1486	1492	1,14	9,02	1,39



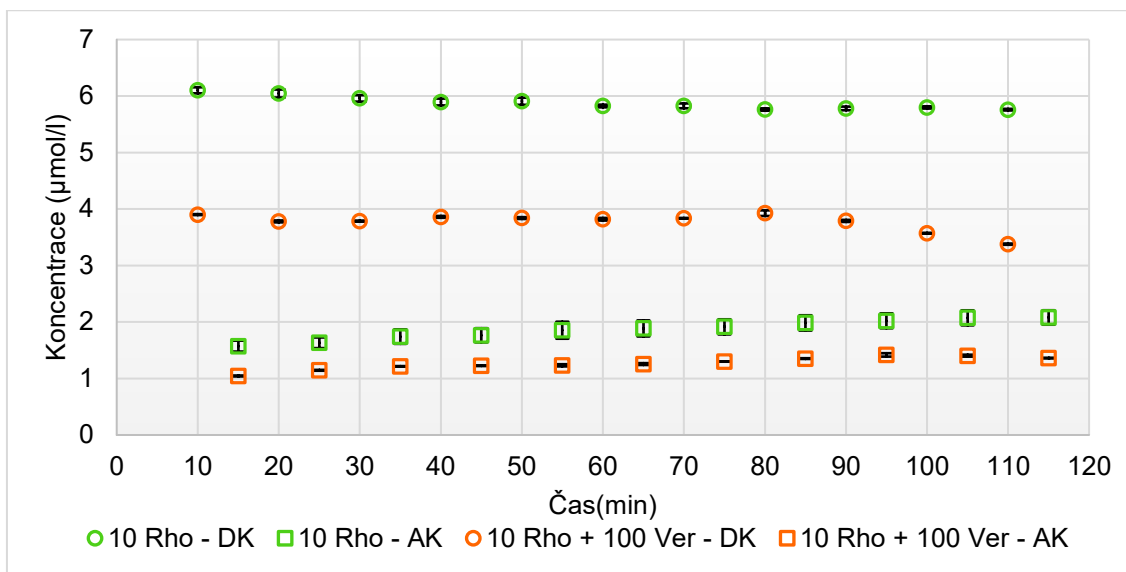
Graf 17 – Permeace Rho 123 o koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$  a Ver o koncentraci 100  $\mu\text{mol/l}$  (poměr 1:10)

Z grafu můžeme vidět snížení koncentrace Rho 123 v donorovém kompartmentu a zároveň zvýšení koncentrace Rho 123 v akceptorovém kompartmentu v důsledku blokace P-gly transportéru Ver.



### 5.3.8.1 Porovnání permeace Rhodaminu 123 o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ samotného a v kombinaci s verapilem o koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$

Na níže uvedeném grafu je vidět inhibice způsobená Ver, konkrétně jeho blokadí P-gly transportéru. Inhibice je opět patrná po 90. minutě, kdy je P-gly transportér blokován vazbou Ver.

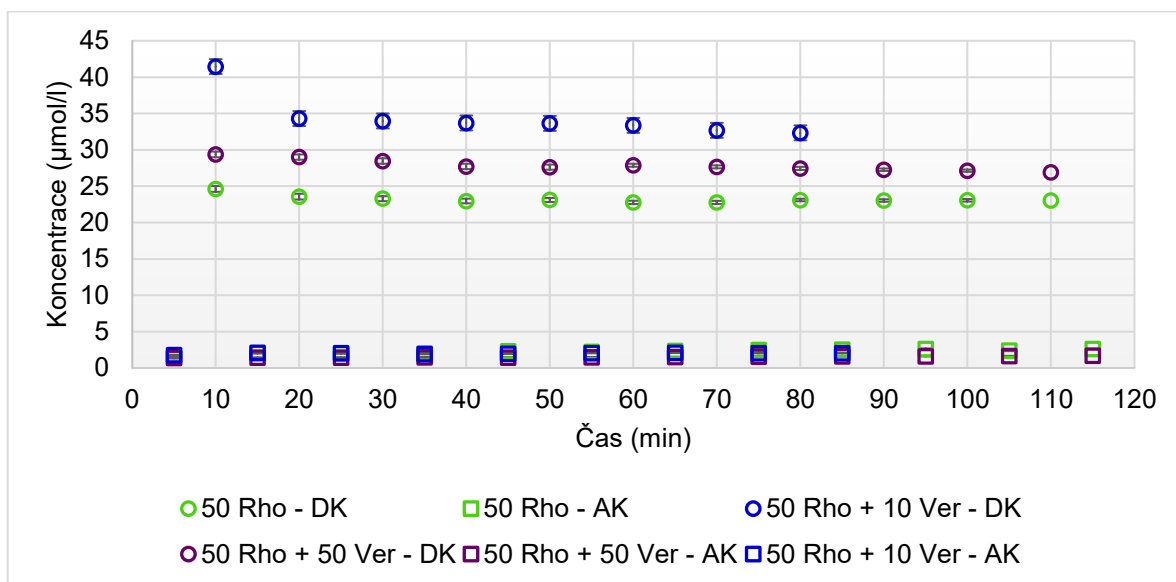


Graf 18 – Porovnání permeace Rhodaminu 123 o koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$  samotného a v kombinaci s verapilem o koncentraci 100  $\mu\text{mol/l}$  (poměr 1:10)

## 6. SHRnutí

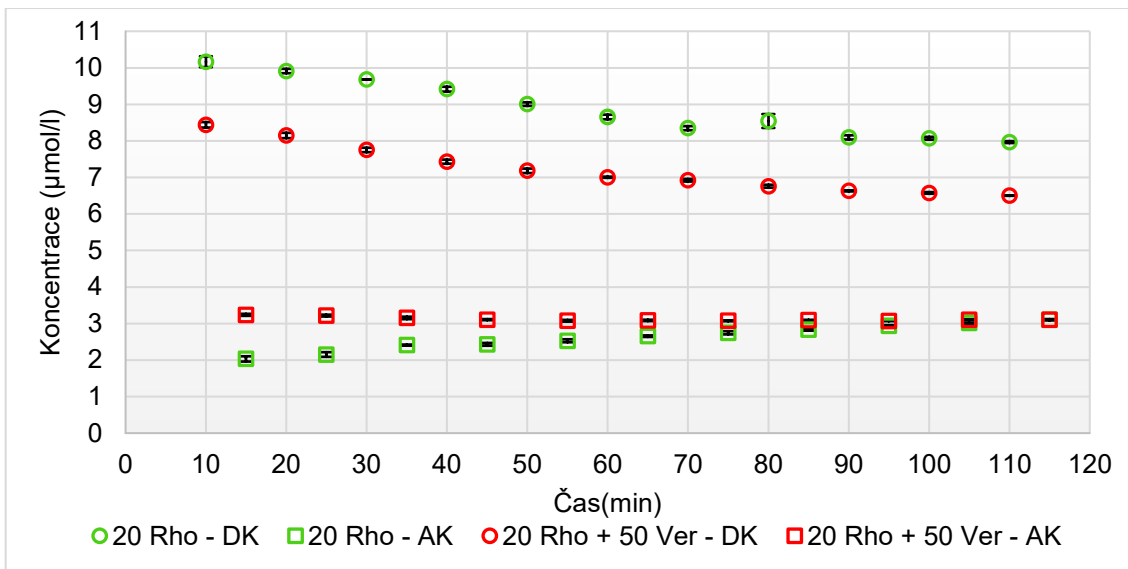
Následující grafy ukazují souhrnné porovnání provedených permeací pro koncentrace Rho 123 50  $\mu\text{mol/l}$ , 20  $\mu\text{mol/l}$  a 10  $\mu\text{mol/l}$ .

První graf znázorňuje permeaci s použitím Rho 123 o koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$  samotného a následně v kombinaci s Ver o koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$  a 50  $\mu\text{mol/l}$ , tedy v poměru 5:1 a 1:1. Je patrné, že tyto poměry nestačí k tomu, aby došlo k zablokování P-gly transportéru a zadržování Rho 123 uvnitř buněk.



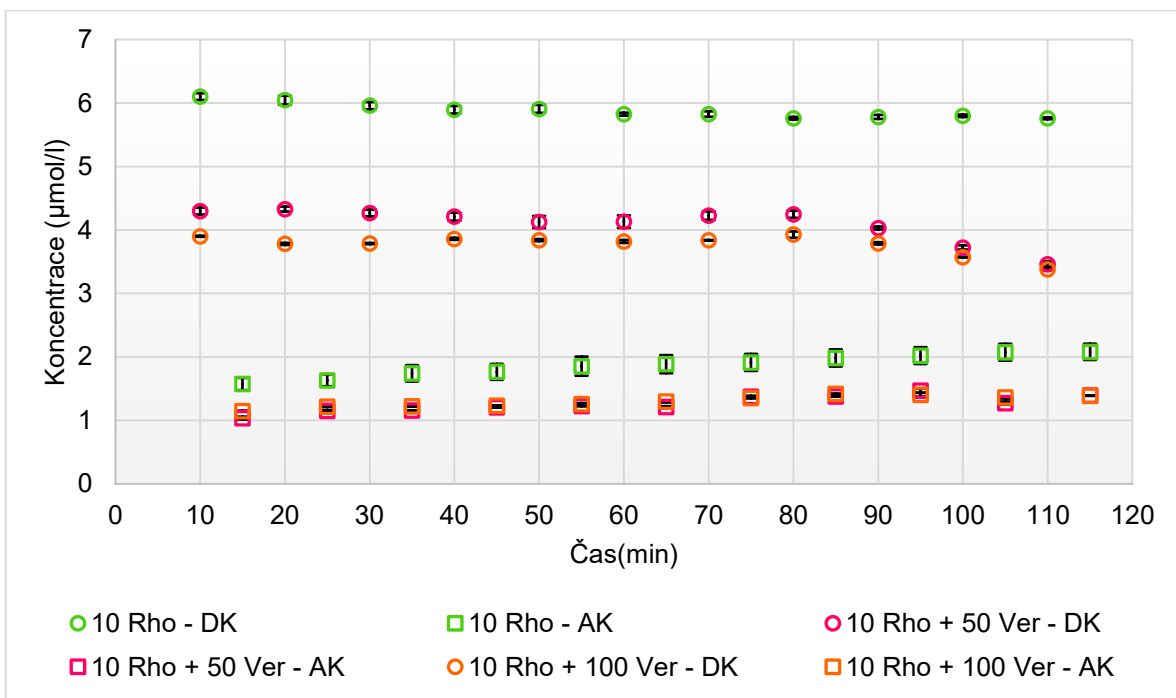
Graf 19 – Porovnání veškerých permeací s použitím Rho 123 o koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$

Druhý graf znázorňuje permeaci pro koncentraci Rho 123 20  $\mu\text{mol/l}$ , jak samotného, tak s použitím Ver o koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$ , tedy poměr 2:5. Opět je vidět, že k žádné inhibici nedochází, jen se snižuje koncentrace Rho 123 v akceptorovém kompartmentu při současném použití Ver, což je dáno postupnou vazbou Ver na P-gly.



Graf 20 – Porovnání veškerých permeací s použitím Rho 123 o koncentraci 20 µmol/l

Třetí graf pak znázorňuje permeace s použitím 10 µmol/l koncentrace Rho 123 a 50 µmol/l a 100 µmol/l koncentrace Ver, poměry 1:5 a 1:10. V 90. minutě již dochází k viditelnému poklesu koncentrace Rho 123 v donorovém kompartmentu, což signalizuje, že je Rho 123 zadržován buňkami. Tuto skutečnost dokládá i to, že v akceptorovém kompartmentu nedochází ke zvýšení koncentrace Rho 123.



Graf 21 - Porovnání veškerých permeací s použitím Rho 123 o koncentraci 10 µmol/l

Z grafů je vidět, že Ver blokuje P-glykoproteinové transportéry až ve vyšších koncentracích, respektive pokud je ve větším poměru k Rho 123 (poměr 1:5, 1:10). Dále můžeme vidět, že rozdíl v koncentracích Rho 123 v donorovém i akceptorovém kompartmentu mezi poměrem 1:5 a 1:10 je nepatrný. V obou případech dochází v 90. minutě k tomu, že se Rho 123 začne hromadit v buňce, která není schopná ho pomocí P-gly transportéru vyloučit ven. Tímto jevem dochází ke snižování koncentrace Rho 123 v donorovém kompartmentu, ale nezvyšuje se koncentrace v akceptorovém kompartmentu. Ta by se zvyšovala také v případě, pokud by byla buněčná monovrstva nekompaktní a Rho 123 by tak procházel vzniklými mezerami mezi buňkami do akceptorového kompartmentu, nebo pokud by byl stále funkční P-gly.

## 7. ZÁVĚR

Z provedených experimentů vyplývá, že Ver účinně blokuje P-gly transportér, pokud je poměr Rho 123 a Ver větší než 2:5, v tomto případě se jedná o poměry 1:5 a 1:10. Dále bylo prokázáno, že materiál použitý k výrobě 3D tištěné cely je kompatibilní nejen s použitými chemikáliemi, ale i s živými buňkami bez ztráty funkce membránových transportérů. Díky provedení monitorování v reálném čase byly zjištěny podrobné kinetické profily interakce Rho 123 a Ver s P-glykoproteinovým transportérem.

Dále bych chtěla uvést několik výhod 3D tištěné permeační cely. Jednou z nich je možnost stanovovat koncentrace Rho 123 v obou kompartmentech, což u běžné Franzovy cely není možné. To umožňuje provedení experimentů, při kterých se sleduje, zda daná látka prochází buňkami, či je jimi zadržována. Další výhodou je i použitý materiál, který je odolnější než sklo, ze kterého se běžně tyto cely vyrábí. Nespornou výhodou je i možnost použití většího insertu, který napomáhá přesnějším výsledkům měření, díky většímu počtu buněk.

## 8. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] J. Wang, E.H. Hansen, Sequential injection lab-on-valve: the third generation of flow injection analysis, *TrAC Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 225–231.
- [2] P.D. Tzanavaras, D.G. Themelis, Review of recent applications of flow injection spectrophotometry to pharmaceutical analysis, *Anal. Chim. Acta.* 588 (2007) 1–9.
- [3] A.M. Bevanda, S. Talić, A. Ivanković, Flow Injection Analysis Toward Green Analytical Chemistry, in: J. Płotka-Wasyłka, J. Namieśnik (Eds.), *Green Anal. Chem.*, Springer Singapore, Singapore, 2019: pp. 299–323.
- [4] E.A.G. Zagatto, F.R.P. Rocha, The multiple facets of flow analysis. A tutorial, *Anal. Chim. Acta.* 1093 (2020) 75–85.
- [5] P. Chocholouš, Sekvenční injekční chromatografie, disertační práce, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, 2006.
- [6] A.M. Pimenta, M.C.B.S.M. Montenegro, A.N. Araújo, J.M. Calatayud, Application of sequential injection analysis to pharmaceutical analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40 (2006) 16–34.
- [7] H. Paseková, M. Polášek, P. Solich, Sekvenční injekční analýza, *Chem. Listy.* 1999 354–359.
- [8] V. Cerdà, L. Ferrer, L.A. Portugal, C.T. de Souza, S.L.C. Ferreira, Multisyringe flow injection analysis in spectroanalytical techniques – A review, *TrAC Trends Anal. Chem.* 98 (2018) 1–18.
- [9] M. Miró, V. Cerdà, J.M. Estela, Multisyringe flow injection analysis: characterization and applications, *TrAC Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 199–210.
- [10] A.M. Idris, R.E.E. Elgorashe, Sequential injection chromatography against HPLC and CE: Application to separation and quantification of amoxicillin and clavulanic acid, *Microchem. J.* 99 (2011) 174–179.
- [11] P. Chocholouš, P. Solich, D. Šatínský, An overview of sequential injection chromatography, *Anal. Chim. Acta.* 600 (2007) 129–135.

- [12] O. Válová, Dvoudimenzionální separace v nízkotlakém systému sekvenční injekční chromatografie, Diplomová práce, Univerzita Karlova, 2013.
- [13] K. Pechandová, H. Buzková, O. Slanař, F. Perlík, Efluxní transmembránový transportér – P-glykoprotein, *Klin. Biochem. Metab.* 14 (2006) 196–201.
- [14] M. García-Carrasco, C. Mendoza-Pinto, S. Macias Díaz, M. Vera-Recabarren, L. Vázquez de Lara, S. Méndez Martínez, P. Soto-Santillán, R. González-Ramírez, A. Ruiz-Arguelles, P-glycoprotein in autoimmune rheumatic diseases, *Autoimmun. Rev.* 14 (2015) 594–600.
- [15] L.B. Chen, Mitochondrial Membrane Potential in Living Cells, (n.d.) 29.
- [16] Rhodamine 123, 25 mg, (2020).  
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/R302#/R302>.
- [17] A.M. Idris, A.E.E. Ibrahim, A.M. Abulkibash, T.A. Saleh, K.E.E. Ibrahim, Rapid inexpensive assay method for verapamil by spectrophotometric sequential injection analysis, *Drug Test. Anal.* 3 (2011) 380–386.
- [18] B. Materson, Calcium channel blockers: is it time to split the lump?, *Am. J. Hypertens.* 8 (1995) 325–329.
- [19] Y. Wang, D. Hao, W.D. Stein, L. Yang, A kinetic study of Rhodamine123 pumping by P-glycoprotein, *Biochim. Biophys. Acta BBA – Biomembr.* 1758 (2006) 1671–1676.
- [20] F. Cilurzo, U.M. Musazzi, S. Franzé, G. Fedele, P. Minghetti, Design of in vitro skin permeation studies according to the EMA guideline on quality of transdermal patches, *Eur. J. Pharm. Sci.* 125 (2018) 86–92.
- [21] S.A. Motz, J. Klimundová, U.F. Schaefer, S. Balbach, T. Eichinger, P. Solich, C.-M. Lehr, Automated measurement of permeation and dissolution of propranolol HCl tablets using sequential injection analysis, *Anal. Chim. Acta.* 581 (2007) 174–180.

- [22] J. Klimundová, H. Sklenářová, U.F. Schaefer, P. Solich, Automated system for release studies of salicylic acid based on a SIA method, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (2005) 893–898.
- [23] J. Klimundová, D. Šatínský, H. Sklenářová, P. Solich, Automation of simultaneous release tests of two substances by sequential injection chromatography coupled with Franz cell, *Talanta.* 69 (2006) 730–735.
- [24] J.R. Jørgensen, M.L. Jepsen, L.H. Nielsen, M. Dufva, H.M. Nielsen, T. Rades, A. Boisen, A. Müllertz, Microcontainers for oral insulin delivery – In vitro studies of permeation enhancement, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 143 (2019) 98–105.
- [25] A.C. Alves, I.I. Ramos, C. Nunes, L.M. Magalhães, H. Sklenářová, M.A. Segundo, J.L.F.C. Lima, S. Reis, On-line automated evaluation of lipid nanoparticles transdermal permeation using Franz diffusion cell and low-pressure chromatography, *Talanta.* 146 (2016) 369–374.
- [26] Y. Zhang, M.E. Lane, J. Hadgraft, M. Heinrich, T. Chen, G. Lian, B. Sinko, A comparison of the in vitro permeation of niacinamide in mammalian skin and in the Parallel Artificial Membrane Permeation Assay (PAMPA) model, *Int. J. Pharm.* 556 (2019) 142–149.
- [27] A. Simon, M.I. Amaro, A.M. Healy, L.M. Cabral, V.P. de Sousa, Comparative evaluation of rivastigmine permeation from a transdermal system in the Franz cell using synthetic membranes and pig ear skin with in vivo-in vitro correlation, *Int. J. Pharm.* 512 (2016) 234–241.
- [28] N. Leveque, S. Makki, J. Hadgraft, Ph. Humbert, Comparison of Franz cells and microdialysis for assessing salicylic acid penetration through human skin, *Int. J. Pharm.* 269 (2004) 323–328.
- [29] D. Liu, C. Zhang, X. Zhang, Z. Zhen, P. Wang, J. Li, D. Yi, Y. Jin, D. Yang, Permeation measurement of gestodene for some biodegradable materials using Franz diffusion cells, *Saudi Pharm. J.* 23 (2015) 413–420.



- [30] T. Caon, C.E.M. Campos, C.M.O. Simões, M.A.S. Silva, Novel perspectives in the tuberculosis treatment: Administration of isoniazid through the skin, *Int. J. Pharm.* 494 (2015) 463–470.
- [31] K. Netsomboon, A. Feßler, L. Erletz, F. Prüfert, M. Ruetz, C. Kieninger, B. Kräutler, A. Bernkop-Schnürch, Vitamin B12 and derivatives—In vitro permeation studies across Caco-2 cell monolayers and freshly excised rat intestinal mucosa, *Int. J. Pharm.* 497 (2016) 129–135.
- [32] L.G. Lucca, S.P. de Matos, P. Weimer, H.F. Teixeira, L.S. Koester, Improved skin delivery and validation of novel stability-indicating HPLC method for ketoprofen nanoemulsion, *Arab. J. Chem.* 13 (2020) 4505–4511.
- [33] L. Zelená, S.S. Marques, M.A. Segundo, M. Miró, P. Pávek, H. Sklenářová, P. Solich, Fully automatic flow-based device for monitoring of drug permeation across a cell monolayer, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 971–981.
- [34] Shimadzu Spectrofluorophotometer RF-6000 Instruction Manual, (2015). [http://www.quimica.uns.edu.ar/images/stories/descargas/Manuales%20LIUC/Shimadzu\\_RF6000/206-97851\\_IM\\_RF-6000\(E\).pdf](http://www.quimica.uns.edu.ar/images/stories/descargas/Manuales%20LIUC/Shimadzu_RF6000/206-97851_IM_RF-6000(E).pdf).
- [35] P. Čechurová, Automatizace chemiluminiscenčního stanovení ATP pomocí reakce s luciferázou, diplomová práce, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, 2013.

## 9. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Schéma přístroje FIA	12
Obrázek 2 – Schéma přístroje SIA	13
Obrázek 3 – Miniaturizovaný LOV systém	14
Obrázek 4 – Schéma SIC	15
Obrázek 5 – Struktura P-glykoproteinu	17
Obrázek 6 – Chemická struktura Rhodaminu 123	17
Obrázek 7 – Chemická struktura verapamilu	18
Obrázek 8 – Schéma použitého systému	21
Obrázek 9 – 3D tištěná permeační cela	23

## 10. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 – Přehled liberačních/permeačních studií	19
Tabulka 2 – Podmínky měření	28
Tabulka 3 – Výsledky kalibrace Rho 123 v rozsahu koncentrací 5-40 $\mu\text{mol/l}$ – detektor FIAlab	30
Tabulka 4 – Statistické hodnocení kalibrační křivky Rho 123 v rozsahu koncentrací 5-40 $\mu\text{mol/l}$ – detektor FIAlab	30
Tabulka 5 – Výsledky kalibrace Rhodaminu 123 v médiu v rozsahu koncentrací 5-50 $\mu\text{mol/l}$ – detektor FIAlab	31
Tabulka 6 – Statistické hodnocení kalibrační křivky Rho 123 v médiu v rozsahu koncentrací 5-50 $\mu\text{mol/l}$ – detektor FIAlab	31
Tabulka 7 – Nastavení detektoru Shimadzu	32
Tabulka 8 – Výsledky kalibrace Rho 123 v médiu v rozsahu koncentrací 2,5-50 $\mu\text{mol/l}$ , dávkování 50 $\mu\text{l}$ rychlostí 30 $\mu\text{l/s}$	33
Tabulka 9 – Statistické hodnocení kalibrační křivky Rho 123 v médiu při dávkování 50 $\mu\text{l}$ rychlostí 30 $\mu\text{l/s}$ v rozsahu koncentrací 2,5-50 $\mu\text{mol/l}$	33
Tabulka 10 – Výsledky kalibrace Rho 123 v médiu v rozsahu koncentrací 2,5-50 $\mu\text{mol/l}$ , dávkování 60 $\mu\text{l}$ rychlostí 20 $\mu\text{l/s}$	34
Tabulka 11 – Statistické hodnocení kalibrační křivky Rho 123 v médiu při dávkování 60 $\mu\text{l}$ rychlostí 20 $\mu\text{l/s}$ v rozsahu koncentrací 5-50 $\mu\text{mol/l}$	34
Tabulka 12 – Výsledky měření Rho 123 o koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ ve 3D tištěné cele	35
Tabulka 13 – Podmínky měření	36
Tabulka 14 – Výsledky měření koncentrace Rho 123 v donorovém kompartmentu při použití Rho 123 o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$	37
Tabulka 15 – Výsledky měření koncentrace Rho 123 v akceptorovém kompartmentu při použití Rho 123 o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$	38
Tabulka 16 – Výsledky měření koncentrace Rho 123 v donorovém kompartmentu při použití Rho 123 o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$ a Ver o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$	39
Tabulka 17 – Výsledky měření koncentrace Rho 123 v akceptorovém kompartmentu při použití Rho 123 o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$ a Ver o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$	39
Tabulka 18 – Výsledky měření koncentrace Rho 123 v donorovém kompartmentu při použití Rho 123 o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$ a Ver o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$	42
Tabulka 19 – Výsledky měření koncentrace Rho 123 v akceptorovém kompartmentu při použití Rho 123 o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$ a Ver o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$	43
Tabulka 20 – Výsledky měření koncentrace Rho 123 v donorovém kompartmentu při použití Rho 123 o koncentraci 20 $\mu\text{mol/l}$	45
Tabulka 21 – Výsledky měření koncentrace Rho 123 v akceptorovém kompartmentu při použití Rho 123 o koncentraci 20 $\mu\text{mol/l}$	46
Tabulka 22 – Výsledky měření koncentrace Rho 123 v donorovém kompartmentu při použití Rho 123 o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ a Ver o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$	47
Tabulka 23 – Výsledky měření koncentrace Rho 123 v akceptorovém kompartmentu při použití Rho 123 o koncentraci 20 $\mu\text{mol/l}$ a Ver o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$	48

Tabulka 24 – Výsledky měření koncentrace Rho 123 v donorovém kompartmentu při použití Rho 123 o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$	50
Tabulka 25 – Výsledky měření koncentrace Rho 123 v akceptorovém kompartmentu při použití Rho 123 o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$	51
Tabulka 26 – Výsledky měření koncentrace Rho 123 v donorovém kompartmentu při použití Rho 123 o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ a Ver o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$	52
Tabulka 27 – Výsledky měření koncentrace Rho 123 v akceptorovém kompartmentu při použití Rho 123 o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ a Ver o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$	53
Tabulka 28 – Výsledky měření koncentrace Rho 123 v donorovém kompartmentu při použití Rho 123 o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ a Ver o koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$	55
Tabulka 29 – Výsledky měření koncentrace Rho 123 v akceptorovém kompartmentu při použití Rho 123 o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ a Ver o koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$	56

## 11. SEZNAM ROVNIC

Rovnice 1 – Výpočet koncentrace z rovnice kalibrační křivky	26
Rovnice 2 – Výpočet koncentrace (obecný vztah)	26
Rovnice 3 – Výpočet koncentrace pro donorový kompartment	26
Rovnice 4 – Výpočet koncentrace pro akceptorový kompartment	26

## 12. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 – Kalibrační křivka Rho 123 v rozsahu koncentrací 5-40 $\mu\text{mol/l}$ – detektor FIALab	31
Graf 2 – Kalibrační křivka Rho 123 v médiu v rozsahu koncentrací 5-50 $\mu\text{mol/l}$ – detektor FIALab	32
Graf 3 – Kalibrační křivka Rho 123 v médiu v rozsahu koncentrací 2,5-50 $\mu\text{mol/l}$ , dávkování 50 $\mu\text{l}$ rychlostí 30 $\mu\text{l/s}$	33
Graf 4 – Kalibrační křivka Rho 123 v médiu v rozsahu koncentrací 5-50 $\mu\text{mol/l}$ , dávkování 60 $\mu\text{l}$ rychlostí 20 $\mu\text{l/s}$	34
Graf 5 – Rho 123 o koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ ve 3D tištěné cele	36
Graf 6 – Monitorování permeace Rhodamin 123 o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$	38
Graf 7 – Monitorování permeace Rho 123 o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$ v kombinaci s Ver o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ (poměr 5:1)	40
Graf 8 – Porovnání permeace Rhodaminu 123 o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$ samotného a v kombinaci s verapamilem o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ (poměr 5:1)	41
Graf 9 – Permeace Rho 123 o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$ a Ver o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$ (poměr 1:1)	43
Graf 10 – Porovnání permeace Rhodaminu 123 o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$ samotného a v kombinaci s verapamilem o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$ (poměr 1:1)	44
Graf 11 – Permeace Rho o koncentraci 20 $\mu\text{mol/l}$	46
Graf 12 – Závislost permeace Rho 123 o koncentraci 20 $\mu\text{mol/l}$ a Ver o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$ (poměr 2:5)	48
Graf 13 – Porovnání permeace Rhodaminu 123 o koncentraci 20 $\mu\text{mol/l}$ samotného a v kombinaci s verapamilem o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$ (poměr 2:5)	49
Graf 14 – Permeace Rho 123 o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$	51
Graf 15 – Permeace Rho 123 o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ a Ver o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$ (poměr 1:5)	53
Graf 16 – Porovnání permeace Rhodaminu 123 o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ samotného a v kombinaci s verapamilem o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$ (poměr 1:5)	54
Graf 17 – Permeace Rho 123 o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ a Ver o koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ (poměr 1:10)	56
Graf 18 – Porovnání permeace Rhodaminu 123 o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ samotného a v kombinaci s verapamilem o koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ (poměr 1:10)	57
Graf 19 – Porovnání veškerých permeací s použitím Rho 123 o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$	58
Graf 20 – Porovnání veškerých permeací s použitím Rho 123 o koncentraci 20 $\mu\text{mol/l}$	59
Graf 21 - Porovnání veškerých permeací s použitím Rho 123 o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$	59